

Modifications Morphologiques et Minérales Induites Par le Cadmium Chez *Vicia Faba*

Dalila Souguir

*Institut National de Recherche en Génie Rural
Eau et Forêts (INRGREF). Rue Hédi Karray, Manzeh IV BP 10; 2080-Ariana, Tunisie*
E-mail: souguir.dalila@yahoo.com
Tel: (00216) 71 719 630

Mohamed Hachicha

*Institut National de Recherche en Génie Rural
Eau et Forêts (INRGREF). Rue Hédi Karray
Manzeh IV BP 10; 2080-Ariana, Tunisie*
E-mail: hachicha.mohamed@iresa.agrinet.tn

Gérard Ledoigt

*Clermont Université, Université Blaise Pascal
UMR 547 PIAF/INRA, BP 80026, 63171 Aubière Cedex, France*
E-mail: Gerard.LEDOIGT@univ-bpclermont.fr

Ezzeddine El Ferjani

*Laboratoire de Physiologie et Génétique des Plantes à Intérêt Agronomique
Faculté des Sciences de Bizerte, 7021-Jarzouna, Tunisie*
E-mail: ezzferjani2002@yahoo.fr

Abstract

The present study evaluated the influence of Cd on the growth and nutrient distributions in the roots and leaves of the Cd-treated *Vicia faba* plants, which are highly consumed in Tunisia. Plants were cultivated in nutrients solutions containing increasing Cd concentrations during 12, 24 and 48 h. Cd effects on growth were higher in roots than in leaves. The distribution of some essential nutrients (Zn, Fe and Ca) was affected by the Cd concentrations and the prolonged period of the metallic treatments.

Keywords: Cadmium, *Vicia faba*, growth, nutrients.

1. Introduction

Le cadmium (Cd) est identifié comme un polluant extrêmement toxique (Godt et al., 2006). Quelle que soit son origine, le cadmium présent dans le sol ne se décompose ni par voie chimique, ni par voie biologique. Il est accumulé dans les couches superficielles des sols et peut être entraîné par les eaux de ruissellement pour atteindre les nappes phréatiques profondes. Dans le cas d'une accumulation du cadmium dans les couches superficielles des sols, il peut être absorbé par les plantes, ce qui représente un problème majeur pour la santé humaine (Godt et al., 2006). Les sols faiblement pollués par ce métal contiennent des concentrations comprises entre 0,04 et 0,32 mM du cadmium. Les sols modérément à

fortement contaminés atteignent quant à eux des concentrations supérieures à 0,32 mM et pouvant aller jusqu'à 1 mM (Sanità di Toppi and Gabbrielli, 1999). Dans la plupart des sols, plus de 99 % du cadmium est associé à la phase solide tandis que seulement moins d'un pour cent se retrouve dans la solution du sol (McLaughlin et Singh, 1999). Les facteurs pédologiques, tels que le pH ou l'échange de cation, ainsi que d'autres facteurs comme les précipitations, l'érosion, la topographie, les activités humaines, influencent le comportement du cadmium dans le sol. Le degré d'activité du cadmium, sa biodisponibilité et sa mobilité sont aussi influencés par la présence d'anions et la composition de la solution du sol. Chez les plantes, les symptômes de toxicité associés au cadmium sont peu différents de ceux produits par différents types de stress. Parmi les symptômes visibles, le cadmium induit une inhibition de la croissance des différentes parties des plantes (Chaoui et al., 2004 ; Aina et al., 2007 ; Finger-Teixeira et al., 2010 ; Jhanji et al., 2012). Ces inhibitions de la croissance s'accompagnent de changements anatomiques, structuraux et ultrastructuraux importants au niveau des feuilles (Sandalio et al., 2001) mais également des racines (Cosio et al., 2005; Patel et al., 2005 ; Boulila Zoghلامي et al., 2006). La réduction de l'élongation racinaire peut être causée par une inhibition de la division cellulaire (Souguir et al., 2008).

En présence de cadmium, des perturbations nutritionnelles peuvent avoir lieu suite à une baisse des teneurs en éléments essentiels pour la plante. Cette baisse peut être expliquée par (i) une perturbation de la perméabilité membranaire suite à une altération de leur composition lipidique (Ouariti et al., 1997), (ii) une compétition ionique au niveau des sites d'absorption (Van Assche and Clijsters, 1990 ; Ouariti et al., 1997) et/ou (iii) une plus forte affinité du polluant vis-à-vis de certains composés organiques, qui assurent à travers la sève xylémique et phloémique le transport des nutriments, ce qui restreint leur recirculation (Stephan and Scholz, 1993; Pich and Scholz, 1996).

Dans cette étude, les modifications de la croissance de *Vicia faba*, plante très consommée en Tunisie, ainsi que les perturbations nutritionnelles ont été suivies pendant une cinétique de 48 heures.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Germination des Graines et Culture Hydroponique

Les graines de *Vicia faba* (variété: Aguadulce) sont triées et désinfectées par un lavage à l'eau de Javel (10 %), puis rincées abondamment à l'eau distillée pour lessiver les produits de conservation ayant adhéré à la graine.

Pour faciliter et homogénéiser leur germination, les graines sont placées dans de l'eau distillée pendant une nuit. Elles sont ensuite, mises à germer entre deux couches de coton imbibé continuellement par de l'eau distillée. La germination se fait à l'obscurité et à une température de 24 ± 2 °C.

Après 4 jours de germination, les plantules sont repiquées en sceaux contenant un milieu nutritif hydroponique continuellement aéré (Souguir et al., 2008). Les solutions nutritives sont renouvelées tous les 2 jours et la culture se déroule en salle climatisée sous conditions contrôlées: 16 h de lumière/8 h d'obscurité, à une température 25°C/20°C et à une humidité relative de 65 (\pm 5)%. L'intensité lumineuse au niveau des plantules, assurée par des lampes de mercure, est de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.2. Traitement Métallique et Récolte des Plantules

Les plantules de *Vicia faba* âgées de 12 jours sont traitées par le cadmium (50, 100 et 200 μM) ajouté dans la solution nutritive sous forme de CdCl_2 . Pour chaque traitement, 3 répliquas sont réalisés. Les plantules sont récoltées après 12, 24 et 48 h du traitement.

2.3. Matières Fraîche et Sèche

Les plantules sont fractionnées en deux parties: racines et feuilles. Les racines sont lavées dans trois bains successifs d'eau distillée puis séchées entre deux couches de papier filtre.

Les lots destinés à l'étude de la croissance sont pesés et séchés dans l'étuve à 70°C pour déterminer leur matière sèche.

2.4. Préparation des Minéralisats et Dosage des éléments Minéraux

Le dosage des éléments minéraux a été effectué par spectrophotométrie d'absorption atomique (Perkin Elmer-model 2380.) suite à une minéralisation à froid dans du l'acide nitrique 65%.

2.5. Analyse Statistique

Les expériences sont répétées trois fois et les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne \pm SD calculés au seuil de probabilité inférieur ou égal à 95%. La signification de différences entre les plantules témoins et traitées est déterminée selon le test de Student.

3. Résultats

3.1. Effets de Cd sur les Biomasses Fraîche et Aèche et sur l'hydratation Tissulaire

Le Cd a induit une réduction significative ($P < 0,05$) de la biomasse fraîche des feuilles de *Vicia faba* à la fin du traitement. Cette réduction est d'environ 30% en présence de 50, 100 et 200 μ M de Cd dans la solution nutritive (Figure 1A). Au niveau racinaire (Figure 1B), la diminution de la biomasse fraîche est plus précoce (24 h). En prolongeant le temps de traitement, elle a atteint 40% de réduction en présence des plus faibles concentrations du métal (50 et 100 μ M) et 53% sous un traitement plus sévère (200 μ M).

Quant à la biomasse sèche, les feuilles de fève traitées n'ont pas montré une diminution significative de leur poids sec qu'à la fin du traitement (Figure 1C), alors que la réduction de la matière sèche racinaire (Figure 1D) est importante dès 24 h d'exposition à 100 et 200 μ M de Cd. Plus tard, cette réduction est plus prononcée sous l'effet des trois traitements. Toutefois, les racines semblent être plus affectées que les feuilles. En effet, une réduction d'environ 40% de la biomasse sèche a été notée au niveau racinaire à 48 h de traitement alors que cette réduction n'a atteint qu'environ 20% au niveau foliaire.

Les résultats concernant l'hydratation tissulaire ont montré (i) une teneur en eau non affectée par le stress métallique au niveau de la partie aérienne (Figure 1E) et (ii) une réduction notable de cette teneur après 48 h de traitement pour les différentes concentrations utilisées au niveau des racines de fève (environ 20% de réduction par rapport au témoin) (Figure 1F). En plus des modifications survenues en niveau racinaire citées ci-dessus, une diminution de l'élongation racinaire, un brunissement et une diminution du développement des racines latérales ont été observés surtout en présence de la plus forte concentration métallique (Figure 2).

Figure 1: Effets de différentes concentrations de Cd sur la matière fraîche (A, B), la matière sèche (C, D) et la teneur en eau (E, F) au niveau des feuilles et des racines de *Vicia faba* traités par 50, 100 et 200 μM of CdCl_2 pendant 12, 24 et 48 h. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles; * ($P < 0, 05$) comparé au témoin.

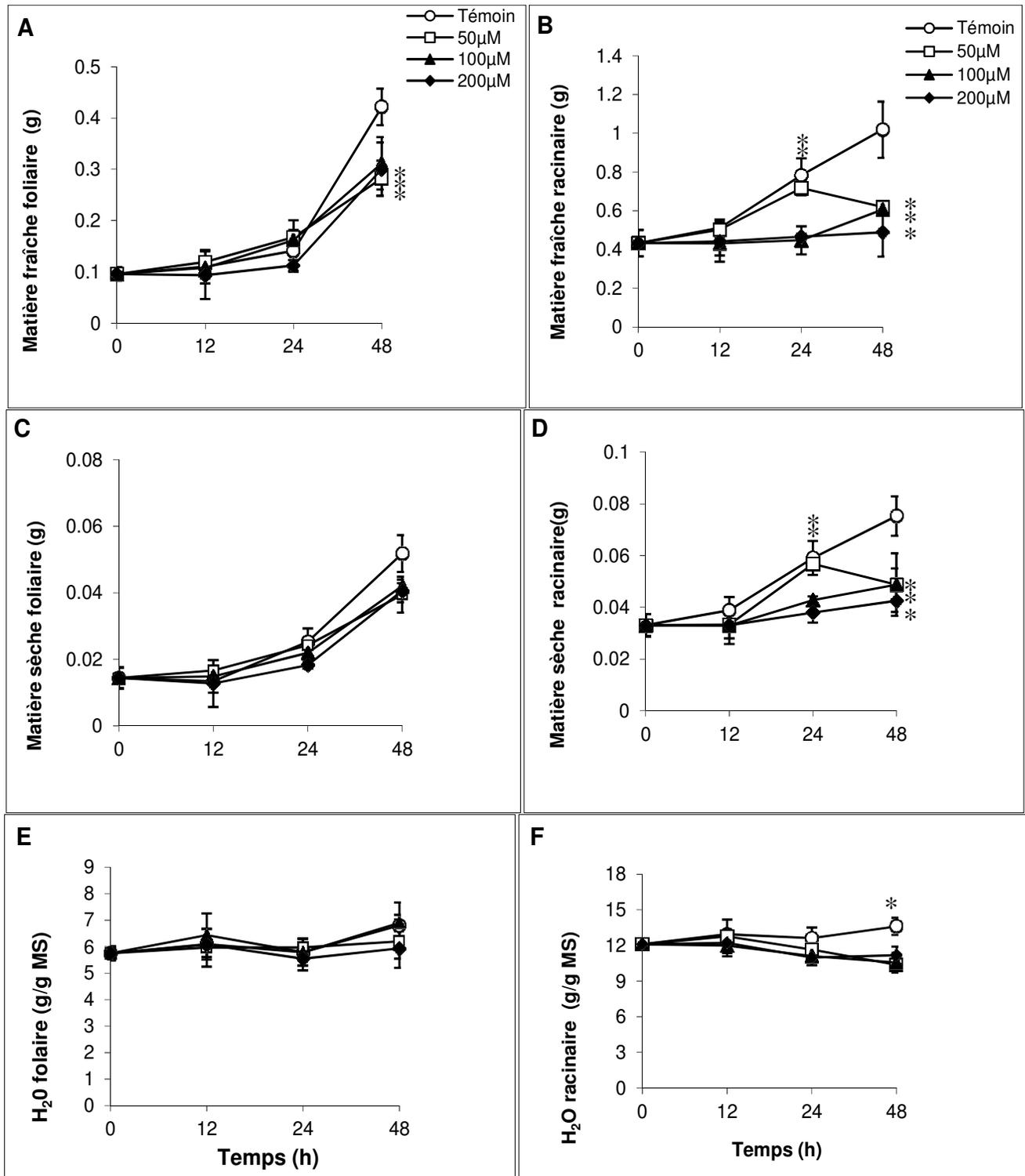
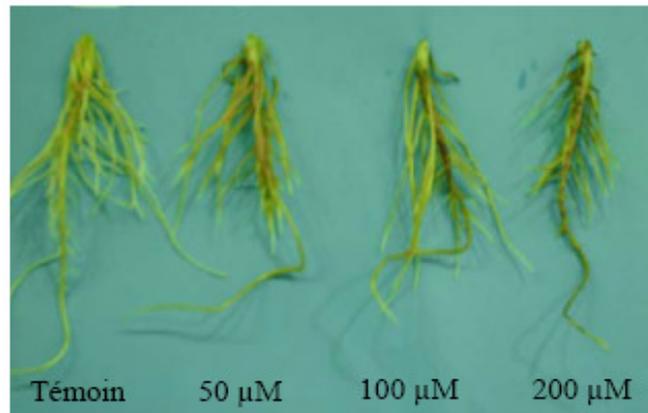


Figure 2: Effet du Cd sur la morphologie et la croissance de la racine de *Vicia faba* exposé à 50, 100 et 200 μM du métal pendant 48 h.



3.2. Effets de Cd sur la Nutrition Minérale

Le zinc: Les teneurs en zinc dans les tissus foliaires semblent significativement diminuées chez les plantules traitées par rapport à celles témoins dès 24 h de traitement (Figure 3A). Au niveau de cet organe, la diminution a atteint 30% par rapport au témoin en présence de 50 μM de Cd dans la solution nutritive, 40% en présence de 100 μM et n'a été que de 20% pour la plus forte concentration (200 μM). Cependant, au niveau des racines, la variation de la concentration du métal n'a pas conduit à une modification de la teneur en cet élément (Figure 3B).

Le fer: Dans des feuilles, le Cd a entraîné une réduction de la teneur en fer. Cette réduction est d'environ 55% à 48 h d'exposition quelle que soit la dose de Cd dans la solution nutritive (Figure 3C). Contrairement aux feuilles, les racines (Figure 3D) ont décrit une accumulation importante ($P < 0,05$) de cet oligo-élément dès 12 h de traitement. Cette augmentation a atteint 30%, 60% et 75% en présence, respectivement, de 50, 100 et 200 μM de Cd

Le calcium: Le Cd a provoqué une diminution de la teneur en calcium au niveau des feuilles de *Vicia faba*. En effet, à la fin du traitement (48 h), une dose de 50 μM du métal a réduit de 34% la teneur en calcium. Des concentrations plus sévères (100 et 200 μM) ont provoqué une réduction d'environ 60% de la teneur en calcium (Figure 3E). En ce qui concerne les racines (Figure 3F), une diminution de 26% de la teneur en cet élément a été observée suite à des traitements par 100 et 200 μM de Cd pendant 48 h.

Figure 2: Teneur en élément minéraux (Zn, Fe et Ca) au niveau des feuilles (A, C et E) et des racines (B, D et F) des plantules de *Vicia faba* traités par 50, 100 et 200 μM de CdCl_2 pendant 12, 24 et 48 h. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles; * ($P < 0,05$) comparé au témoin.

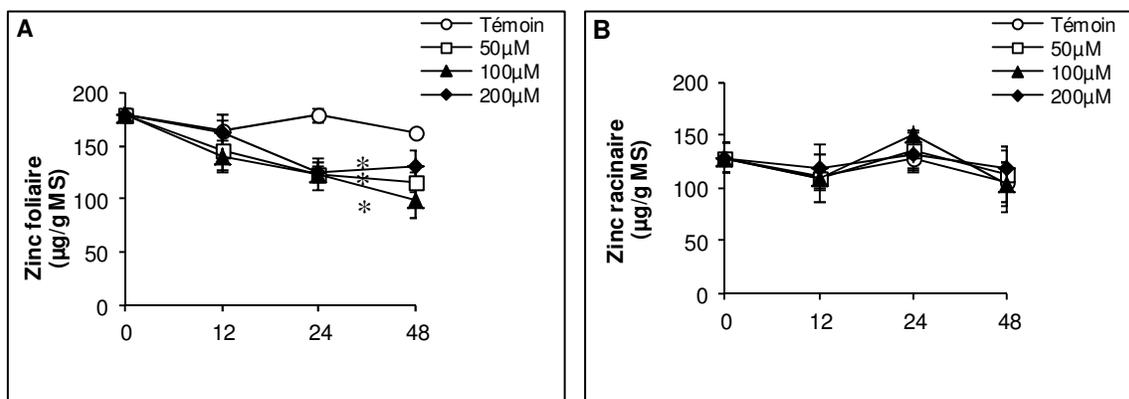
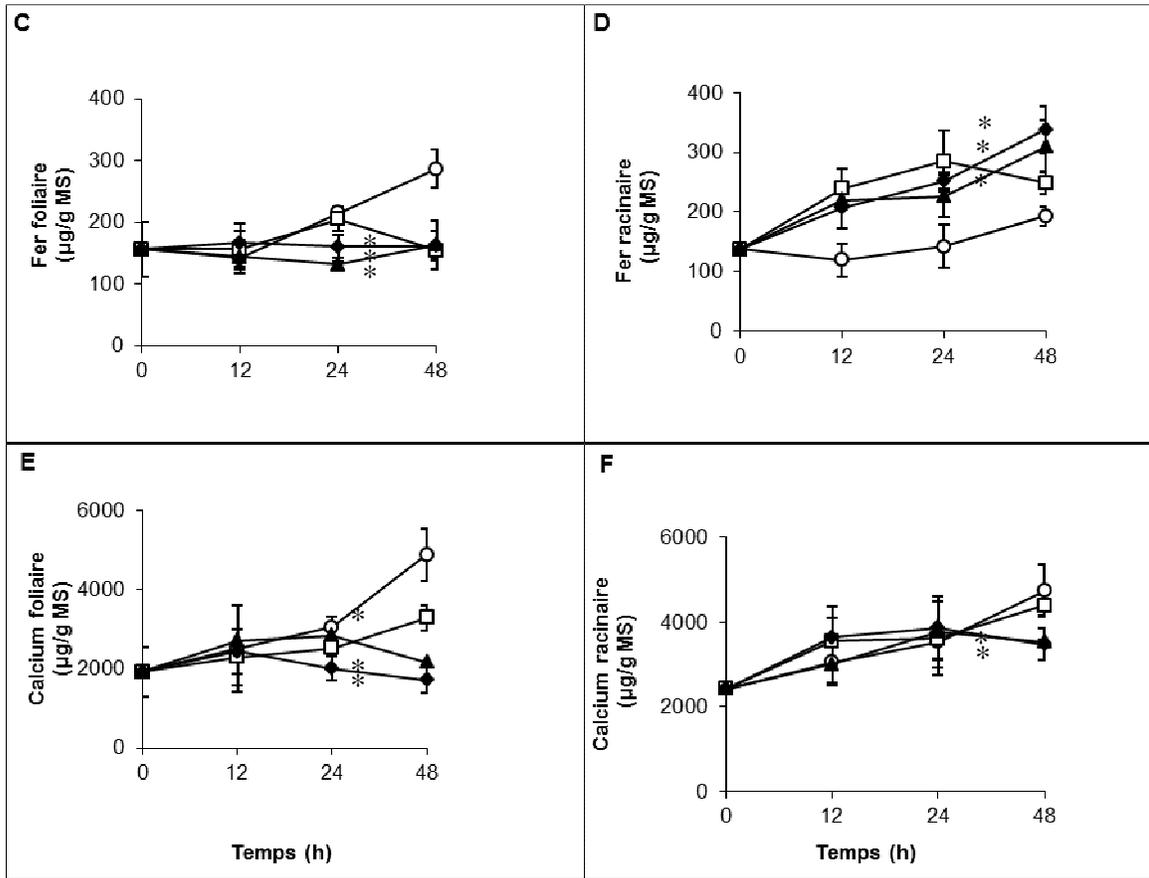


Figure 3: Teneur en élément minéraux (Zn, Fe et Ca) au niveau des feuilles (A, C et E) et des racines (B, D et F) des plantules de *Vicia faba* traités par 50, 100 et 200 μM of CdCl_2 pendant 12, 24 et 48 h. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles; * ($P < 0,05$) comparé au témoin. - continued



4. Discussion

Dans ce travail, nous avons étudié l'incidence de trois doses de Cd (50, 100 et 200 μM), sur des plantules de *Vicia faba* durant une cinétique de 0, 12, 24 et 48 h. L'incidence de ce stress métallique a porté, en particulier, sur certains paramètres de croissance et sur la nutrition minérale. Sous traitement cadmique, plusieurs manifestations phénotypiques sont observées telles qu'un jaunissement foliaire ou chlorose (Ouzounidou et al., 1997 ; Ben Youssef et al., 2005 ; Gomes et al., 2013), et des nécroses (Ben Youssef et al., 2005). Dans notre étude, nous n'avons observé aucun de ces symptômes phénotypiques au niveau des feuilles de fève durant le traitement. Au niveau de la partie souterraine, un brunissement a caractérisé les racines traitées par les 3 doses du métal. Ces symptômes ont été aussi observés chez d'autres plantes soumises à un stress cadmique (Mishra et al., 2006 ; Elloumi et al., 2007, Gomes et al., 2013). Le brunissement des racines et le retard de développement des racines latérales pourraient être la conséquence d'une déficience en plusieurs nutriments comme l'ont suggéré Breckle and Kahle (1992).

La croissance racinaire est fortement affectée chez la fève. La diminution de la croissance racinaire ainsi que la réduction du nombre et de la longueur des racines latérales sont des caractères phénotypiques observés précédemment chez *Pisum sativum* par Rodriguez-Serrano et al. (2006) suite à un traitement par 50 μM de Cd pendant 14 jours. Lima et al. (2006) ont également montré une réduction de l'élongation racinaire chez la même espèce en présence de 30, 60 et 90 μM de Cd. Cette réduction a atteint 50% chez *Hordeum vulgare* traité par 1 mM de Cd pendant 24 h (Tamás et al., 2008).

Sous stress métallique, la croissance a été aussi marquée par une diminution de la matière fraîche et sèche. Cette diminution est plus précoce et plus importante dans les racines que les feuilles. La vulnérabilité du système racinaire semble être due à une accumulation préférentielle des ions cadmiques dans les racines et un faible passage vers les feuilles. Les racines limitent au maximum l'exportation des polluants métalliques vers les organes aériens. L'importance de la partie souterraine en tant que site d'accumulation privilégiée du cadmium comparativement aux autres parties de la plante a été beaucoup documentée (Mishra et al., 2006; Lin et al., 2007; Liu et al., 2007). La baisse de la croissance racinaire a été accompagnée par une diminution de l'hydratation tissulaire suite à une réduction de la surface d'absorption d'eau.

L'analyse de la composition minérale des plantules traitées a mis en évidence un désordre nutritionnel chez la fève qui est variable selon l'organe. Le zinc est un élément essentiel à la croissance des plantes et joue un rôle important dans la biosynthèse des enzymes, des auxines et plusieurs protéines (Vallee et Falchuk, 1993). Le maintien des teneurs importantes en cet élément peuvent minimiser la toxicité de Cd (Gomes et al., 2013). En effet, le zinc diminue significativement la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produite en cas du stress cadmique (Aravind et al., 2009). Dans notre étude, une diminution des teneurs en zinc a été observée dans les feuilles et une non-modification de ces teneurs dans les racines. En cas des carences en cet élément essentiel, une substitution du zinc par le Cd pourrait se produire et d'où une inhibition de l'activité Cu-Zn SOD, enzyme clé du métabolisme antioxydant (Van Assche et Clijsters, 1990; Aravind et Prasad, 2003).

Pour le fer, la diminution de sa teneur dans les feuilles de fève et son augmentation dans les racines ont été déjà montrées chez d'autres espèces (Sandalio et al., 2001; Elloumi et al., 2007). Cet élément est un cofacteur de plusieurs enzymes antioxydantes tels que la catalase et l'ascorbate peroxidase (Sharma et al., 2004). La diminution des teneurs en fer pourrait avoir comme conséquence une altération de l'activité de ces enzymes contre les ROS générés par le stress cadmique.

Une réduction de la teneur en calcium au niveau des feuilles et des racines traitées par le Cd a été observée chez notre plante d'intérêt. Des perturbations entre organe de la teneur en cet élément a été observé chez d'autres plantes (Gomes et al., 2013). Sachant que les ions cadmiques peuvent être transportés à travers les canaux protéiques du calcium au niveau membranaire (Tyler and McBride, 1990), une telle réduction des ions calciques en présence des ions cadmiques pourrait être expliquée par une éventuelle compétition entre les deux ions pour les mêmes sites d'absorption (Wells and Brown, 1990 ; Kwan and Smith, 1991 ; Wagner, 1993).

5. Conclusion

Le traitement cadmique a entraîné une diminution de la croissance des plantules de fève. Cette diminution est plus importante au niveau racinaire que foliaire et elle s'est accompagnée par des symptômes de toxicité tels que un brunissement racinaire et une diminution du développement des racines latérales. L'absorption des ions cadmiques par la plante a provoqué des perturbations nutritionnelles variables selon les organes.

Références

- [1] Aina, R., Labra, M., Fumagalli P., Vannini, C., Marsoni, M., Cucchi U., Bracale M., Sgorbati S. and Citterio, S, 2007. "Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots". *Environmental and Experimental Botany* 59, pp. 381-392.
- [2] Aravind, P, and Prasad, M. N. V., 2003. "Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte". *Plant Physiology and Biochemistry* 41, pp.391-397.

- [3] Aravind, P., Prasad, M.N.V., Malec, P., Waloszek, A. and Strzaka, K, 2009. Zinc protects *Ceratophyllum demersum* L. (free-floating hydrophyte) against reactive oxygen species induced by cadmium". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 23, pp. 50-60.
- [4] Ben Youssef, N., Nouairi, I., Ben Temime, S., Taamalli, W., Ghorbal, M. H., Zarrouk, M. and Ben Miled Daoud, D, 2005. Effets du cadmium sur le métabolisme des lipides de plantules de colza (*Brassica napus* L.). *Compte Rendu Biologies* 328, pp. 745-757.
- [5] Boulila Zoghalmi, L., Djebali, W., Chaïbi, W. and Ghorbel, M.H, 2006. "Modifications physiologiques et structurales induites par l'interraction cadmium-calcium chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*)". *Compte Rendu Biologies* 329, 702-711.
- [6] Breckle, S.W. and Kahle, H, 1992. "Effects of toxic heavy metals (Cd, Pb) on growth and mineral nutrition of beech (*Fagus sylvatica* L.)". *Vegetation* 1001, pp. 43-53.
- [7] Carvalho Bertoli, A, Cannata, M.G., Carvalho, R. and Bastos, A.R.R, 2012. "*Lycopersicon esculentum* submitted to Cd-stressful conditions in nutrition solution: Nutrient contents and translocation". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 86, pp.176-181.
- [8] Chaoui A., Jarrar B. et El Ferjani E., 2004. "Effects of cadmium and copper on peroxidase, NADH oxydase and IAA oxidase activities in cell wall, soluble and microsomal membrane fractions of pea roots". *Journal of Plant Physiology* 161, pp. 1225-1234.
- [9] Cosio, C., Vollenweider, P. and Keller, C, 2005. "Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.). I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 58, pp.64-74.
- [10] Elloumi, N., Ben Abdallah, F., Rhouma, A., Ben Rwina, B., Mezghani, I., Boukhris, M, 2007. "Cadmium-induced growth inhibition and alteration of biochemical parameters in almond seedlings grown in solution culture". *Acta Physiology of Plant* 29, pp. 57-62.
- [11] Finger-Teixeira, A, Lucio Ferrarese, M.D.L., Soares R.A., da Silva, D. and Ferrarese-Filho, O, 2010. "Cadmium-induced lignification restricts soybean root growth". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, pp.959-1964.
- [12] Godt, J., Scheidig, F., Grosse-Siestrup, C., Esche, V., Brandenburg, P., Reich, A. and Groneberg, D, 2006. "The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health". *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 1, pp. 22-27.
- [13] Gomes M.P, Marques T.C.L.L.S.E.M. and Soares, A.M, 2013. Cadmium effects on mineral nutrition of the Cd-hyperaccumulator *Pfaffia glomerata*. *Biologia* 682, pp. 223-230.
- [14] Jhanji, S., Setia R.C., Kaur, N., Kaur, P., Setia, N. 2012. "Role of nitric oxide in cadmium-induced stress on growth, photosynthetic components and yield of *Brassica napus* L". *Journal of Environment and Biology* 33(6), pp.1027-32.
- [15] Kwan, K.H.M. and Smith, S, 2006. "Some aspects of the kinetics of cadmium and thallium uptake by friends of *Lemma minor* L". *New Phytologist* 117, pp.91-102.
- [16] Lima, A.I.G., Perira, S.I.A., Figueira, E.M.P., Caldeira, G.C.N., Caldeira, H.D.Q, 2006. "Cadmium detoxification in roots of *Pisum sativum* seedlings: relationship between toxicity levels, thiol pool alterations and growth". *Environmental and Experimental Botany* 55, pp. 149-162.
- [17] Lin, R., Wang, W., Luo, Y., Du W., Guo, H. and Yin, D, 2007. "Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.)". *Chemosphere* 69, pp. 89-98.
- [18] Liu, D. Jiang, W. and Gao, X, 2007. "Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic". *Biology Plantarum* 47, pp.79-83.
- [19] McLaughlin, M.J. and Singh, B.R., 1999, eds. "Cadmium in soils and plants", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 273.
- [20] Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Govindarajan, R., Kuriakose, S.V. and Prasad, M.N.V, 2006. "Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L". *Plant Physiology and Biochemistry* 44, pp. 25-37.

- [21] Ouariti, O. Gouia, H., Ghorbel, M.H, 1997. "Responses of bean and tomato plants to cadmium: Growth, mineral nutrition, and nitrate reduction". *Plant Physiology and Biochemistry* 35, pp.347-354.
- [22] Ouzounidou, G., Moustakas, M. and Eleftherious, E.P, 1997. "Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves". *Archive of Environmental Contamination and Toxicology* 32, pp. 154-160.
- [23] Patel, M.J., Patel, J.N. and Subramanian R.B, 2005. "Effect of cadmium on growth and the activity of H₂O₂ scavenging enzymes in *Colocassia esculentum*". *Plant and soil* 273, pp.183-188.
- [24] Pich, A. and Scholz, I. 1996. "Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem". *Journal of Experimental Botany* 47, pp.41-47.
- [25] Rodriguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C., Zabalza, A., Corpas, F. J., Gomez, M., Del Rio, L. A., Sandalio, L. M, 2006. "Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum Sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*". *Plant Cell and Environment* 29, pp. 1532-1544.
- [26] Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gómez, M., Romero-Puertas, M.C. and Del Rio. 2001. "Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants". *Journal of Experimental Botany* 52 (364), pp. 2115-2126.
- [27] Sanità di Toppi, L. and Gabbrielli, R, 1999. "Response to cadmium in higher plants". *Environmental and Experimental Botany* 41, pp.105–130.
- [28] Sharma, N.C., Gardea-Torresdey, J.L., Parsons, J. and Sahi, S.V, 2004. "Chemical speciation and cellular deposition of lead in *Sesbania drummondii*". *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, pp. 134
- [29] Souguir, D., El Ferjani, E., Ledoigt, G. and Goupil, P, 2008. "Exposure of *Vicia faba* and *Pisum sativum* to copper-induced genotoxicity". *Protoplasma* 233, pp. 203-207.
- [30] Stephan, U.W. and Scholz, G, 1993. "Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem?". *Physiology of Plant* 88, pp.522-529.
- [31] Tamás, L., Dudíková, J., Ďurčekova, K., Halušková, L., Hottová, J., Mistík, I., Ollé, M., 2008. "Alterations of the gene expression, lipid peroxidation, proline and thiol content along the barley root exposed to cadmium". *Journal of Plant Physiology* 165, pp. 1193-1203.
- [32] Tyler, L.D. and McBride, M.R., 1982. "Influence of Ca, pH and humic acid on cadmium uptake". *Plant Soil* 64, pp.259-262.
- [33] Vallee, B.L. and Falchuk, H. 1993. "The biochemical basis of zinc physiology". *Physiol Rev.* 73, pp.79-117.
- [34] Van Assche, F. and Clijsters, H. 1990. "Effects of metals on enzyme activity in plants". *Plant Cell and Environment* 13, pp. 195-206.
- [35] Van Assche, F. and Clysters, H, 1990. "Effect of metals on enzyme activity in plants"*Plant Cell Environment* 13, pp. 195–206.
- [36] Wagner, G.J. 1993. "Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health". *Advances in Agronomy* 51, pp. 173- 212.
- [37] Wells, J.M. and Brown, D.H, 1990."Ionic control of intracellular and extracellular Cd uptake by the mass *Rhytidadelphus squarrosus* (Head w) Warnst". *New Phytologist* 116, pp. 541-553