

Effets génotoxiques du Cuivre chez *Vicia faba* et *Pisum sativum*

D. Souguir^{(1) (2)}, P. Goupil⁽¹⁾, E. Ferjani⁽²⁾ et G. Ledoigt⁽¹⁾

- 1) ERTAC-PIAF, UMR 547 Université-INRA, université Blaise-Pascal, Campus Universitaire des Cézeaux, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France
- 2) Laboratoire de Physiologie et Génétique des Plantes à Intérêt Agronomique, Faculté des Sciences de Bizerte, Université de 7 novembre Carthage, 7021 Jarzouna, Tunisie

RÉSUMÉ

La génotoxicité du cuivre a été étudiée chez la fève (*Vicia faba*) et le pois (*Pisum sativum*) en culture hydroponique. Le cuivre cause un accroissement du taux de micronoyaux dans les deux plantes. L'analyse cytologique des cellules d'extrémités racinaires montre des effets clastogéniques et aneugéniques de cet élément sur les méristèmes de racines de ces plantes. Le cuivre induit des altérations chromosomiques aux plus faibles concentrations utilisées (2,5 mM), après une incubation de 42 heures, montrant le potentiel mutagène de cet élément. Plusieurs types d'anomalies chromosomiques ont été observés dans ces méristèmes racinaires.

Mots clés

Aberration chromosomique, élément trace métallique, genotoxicité, méristème racinaire, micronoyau

Abréviations : MCN micronoyau, HM hydrazide maléique

SUMMARY

COPPER GENOTOXICITY ON VICIA FABA AND PISUM SATIVUM ROOT TIPS

The potential genotoxicity of Cu^{2+} was investigated in *Vicia faba* and *Pisum sativum* seedlings in hydroponic culture conditions. Cu^{2+} caused an increase in micronuclei frequencies in both plant models. Cytological analysis of root tips cells showed clastogenic and aneugenic effects of this element on the plant root meristems. Cu^{2+} induced chromosomal alterations at the lowest concentration used (2.5 mM) when incubated for 42 h, indicating the potent mutagenic effect of this ion. Several kinds of chromosomal abnormalities were observed in the root meristems.

Key-words

Chromosomal aberration, genotoxicity, heavy metal, micronuclei, root tip.

RESUMEN**EFECTOS GENOTÓXICOS DEL COBRE EN VICIA FABA Y PISUM SATIVUM**

Se estudió la genotoxicidad del cobre en la haba (*Vicia faba*) y en el guisante (*Pisum sativum*) en cultivo hidropónico. El cobre produce un crecimiento de la tasa de micronúcleos en las dos plantas. El análisis citológico de las células de extremidades de las raíces muestra efectos clastogénicos y aneugénicos de este elemento sobre los meristemas de raíces de estas plantas. El cobre induce alteraciones cromosómicas a las concentraciones más bajas usadas (2,5 mM), después de una incubación de 42 h, que muestra el potencial mutageno de este elemento. Se observaron varios tipos de anomalías cromosómicas en estos meristemas de raíces.

Palabras clave

Aberración cromosómica, elemento en traza metálico, genotoxicidad, meristemo de raíces, micronúcleo

La contamination de l'environnement par les éléments métalliques a augmenté durant les dernières décennies (Nriagu et Pacyna, 1988). Les sources d'émissions métalliques dans l'environnement sont très nombreuses et difficiles à limiter. Les plus importantes sont d'origine anthropique (industries, fonderies, engrais chimiques...). Les teneurs du sol en cuivre sont notablement plus élevées au voisinage des mines (Baker, 1987; Wu et Lin, 1990) et des foyers industriels (Humphreys et Nicholls, 1984). Le cuivre est un élément essentiel pour la plante. Il entre dans la composition des métallo-enzymes impliquées dans les réactions d'oxydoréduction (Gupta, 1986). Les concentrations de cuivre dans le sol sont de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-6} M (Jiang *et al.* 2000). Asada *et al.* (1977) ont suggéré qu'il serait associé à la superoxyde dismutase des chloroplastes de végétaux supérieurs. Il est aussi un constituant du cytochrome oxydase et participe aux réactions de la photosynthèse. La mobilité du cuivre dans le sol est faible, ce qui est dû à sa forte liaison aux particules colloïdales. L'absorption de fortes quantités de cuivre engendre des signes de toxicité observés chez *Allium cepa* (Levan, 1945; Fiskejo, 1988) et *Helianthus annuus* (Jiang *et al.* 2000).

Le cuivre se lie à un récepteur spécifique sur la surface externe de la membrane plasmique (Lastra *et al.*, 1987). Le complexe est déplacé à travers la membrane plasmique et une fois sur la surface interne, le complexe change de configuration; le cuivre est alors libéré dans le cytoplasme. La sève brute du xylème permet son transport vers les parties aériennes. La sensibilité des racines au cuivre (Stiborva *et al.*, 1986; Jarvis et Whitehead, 1993) est probablement due à sa forte accumulation dans ces organes ainsi que sa faible translocation vers les parties aériennes. Jiang *et al.*, (2000) ont montré que le Cu^{2+} inhibe la croissance des racines d'*Helianthus annuus* à des concentrations de 10^{-4} à 10^{-2} M. Muller *et al.*, (2001) ont montré que, chez *Thypha latifolia*, l'élongation racinaire est le paramètre le plus sensible suite à des expositions au sulfate de cuivre présent dans l'eau ou dans le sédiment, alors que cette plante ne présente pas de signes de chlorose. L'inhibition de la croissance racinaire peut résulter de l'interférence du cuivre avec le métabolisme cellulaire (Seregin et Ivanov, 2001) (figure 1), notamment, avec la division cellulaire et/ou l'élongation cellulaire (Wainwright et Woolhouse, 1977; Hagemeyer et Breckle, 1996; Jiang *et al.* 2000).

Parmi les effets biologiques de la pollution métallique, on peut citer la toxicologie génétique ou génotoxicologie, qui concerne l'endommagement de l'ADN. En effet, différents agents sont potentiellement toxiques pour le génome et peuvent créer des lésions de la double hélice d'ADN (divers produits chimiques, polluants de l'atmosphère, radioactivité...). La génotoxicité induite par ces agents peut être de type clastogénique, se référant à un changement de la structure d'un chromosome, souvent le résultat d'un gain, d'une perte ou d'un réarrangement des fragments de chromosomes dans

le génome, ou aneugénique, résultat d'un gain ou d'une perte d'un ou plusieurs chromosomes (aneuploïdie) ou d'un groupe de chromosomes (euploïdie).

Les cellules de *Vicia faba* renferment 12 grands chromosomes (Ma, 1982a; Dekergommeaux *et al.* 1983; Kihlman et Anderson, 1984). Le caryotype de *Pisum sativum* a été identifié en 1903 et est de $2n = 14$ (Cannon, 1903).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Les matériels végétaux utilisés ont été la fève (Vicia faba, variété Aguadulce) et le petit pois (Pisum sativum, variété Douce de Provence).

Conditions de culture

Les graines de *Vicia faba* et de *Pisum sativum* ont été désinfectées par un lavage à l'eau de Javel (10 %) puis lavées abondamment à l'eau distillée pour éliminer les produits de conservation ayant adhéré à la graine. Pour faciliter et homogénéiser leur germination, les graines ont été placées dans de l'eau distillée pendant une nuit. Elles ont ensuite été placées entre deux feuilles de papier filtre imbibé continuellement d'eau distillée. La germination s'est faite à l'obscurité et à 25 °C.

Traitement des racines

Pour un litre de solution nutritive standard, 5 ml de solution de macroéléments, 1 ml de la solution d'oligoéléments (tableau 1) et 3 ml de solution de Fer-EDTA sont apportés. L'ensemble est versé dans un bécher gradué puis le volume est ramené avec de l'eau distillée à 1 litre puis ajusté à pH = 7. Lorsque les racines des plantules germées atteignent une longueur de 2 à 3 cm, elles sont placées dans des pots de 1 litre contenant la solution nutritive de Hoagland standard (pH = 7) (Knasmuller *et al.* 1998). Les traitements ont été effectués avec différentes concentrations de CuSO_4 : 1mM, 2,5mM, 5mM, 10mM, 50mM. L'hydrazide maléique (HM), à 4×10^{-3} M, est utilisé comme témoin positif. C'est un herbicide défini chimiquement comme étant le 1,2-dihydro-3,6-pyridazinedione, analogue de l'uracile, et utilisé dans l'agriculture pour retarder le développement des bourgeons de manière à améliorer la durée du stockage (Lee *et al.* 2001). Il est connu par sa capacité d'induire des micronoyaux et des aberrations chromosomiques chez *Vicia faba* (Marco *et al.* 2004). Le témoin négatif est représenté par la solution nutritive standard (SNS) (racines non traitées).

Figure 1 - Effets des métaux lourds sur la division cellulaire (GSH: Glutathion réduit; G1: phase G1; S: phase S; +: stimulation; -: diminution) (Seregin et Ivanov, 2001).

Figure 1 - Cell division and heavy metals (GSH: reduced Glutathione; G1 and S: mitosis phases; +: stimulation; -: reduction) (Seregin and Ivanov, 2001).

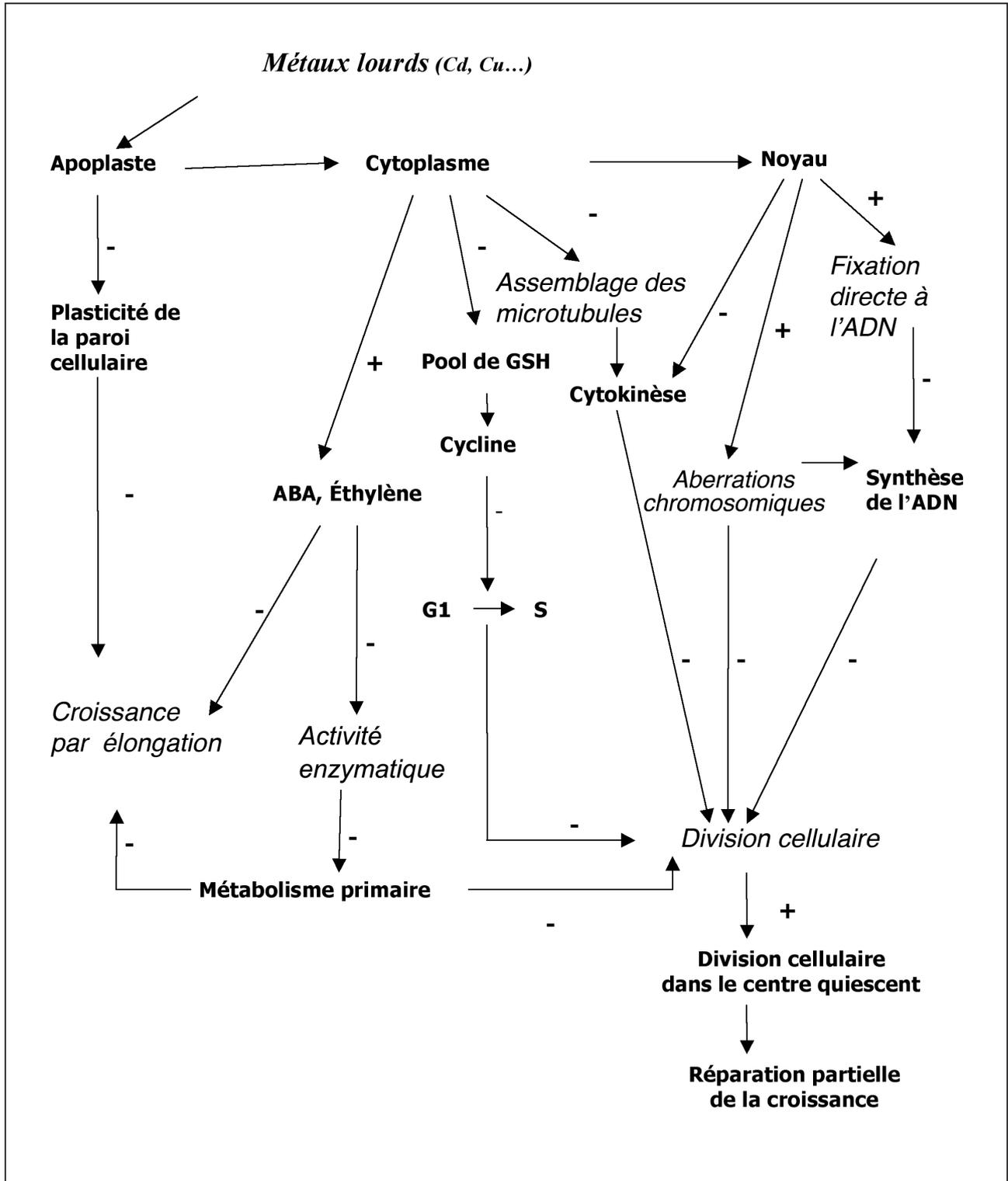


Tableau 1 : Composition de la solution standard de Hoagland et de la solution mère des oligoéléments.

Table 1: Hoagland standard solution and Oligonutriments.

Macroéléments	Concentrations de la solution mère
KNO ₃	1 M
KH ₂ PO ₄	1 M
CaNO ₃ 4H ₂ O	0,25 M
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,3 M

Oligoéléments	Concentrations de la solution mère
MnSO ₄ H ₂ O	10 mM
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	2 mM
CuSO ₄ 5 H ₂ O	1 mM
H ₃ BO ₃	25 mM
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0,1 mM

Le test des micronoyaux

Il vise à mettre en évidence la présence d'un nombre accru d'altérations chromosomiques, suite à l'exposition au sulfate de cuivre, dans les noyaux des cellules racinaires de *Vicia faba* et de *Pisum sativum*. Les graines sont mises à germer puis traitées. Pour chaque traitement, 3 réplicats sont préparés. 2 à 3 cm des zones méristématiques sont récupérées et fixées dans la solution de Carnoy (ou dans une solution d'acétoéthanol 1:3) durant une nuit, à l'obscurité et à 4 °C. Les racines sont

conservées dans l'éthanol 70 %, puis rincées à l'eau distillée pendant 10 minutes et hydrolysées par HCl (1N) qui permet la dissociation des structures cellulaires. Le temps d'hydrolyse dépend de l'espèce végétale et de la concentration du métal.

La coiffe racinaire est éliminée. Les deux premiers millimètres de la partie méristématique sont écrasés sur une lame de microscopie et colorés par l'orcéine (Ma *et al.* 1995). La préparation est observée en microscopie photonique (grossissement x 1 000). Les micronoyaux commencent à être visibles au grossissement x 400. Trois étalements sont réalisés pour chaque réplicat afin de décompter 1000 cellules par lames, soit 9000 cellules pour chaque traitement.

Les études statistiques portent sur un test de comparaison des valeurs obtenues après traitements et de la valeur de l'échantillon témoin.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Potentiel inducteur des micronoyaux par le cuivre

Les résultats du traitement des extrémités racinaires de *Vicia faba* par le sulfate de cuivre ont montré que les différentes concentrations testées induisent la formation des micronoyaux après 42 heures d'exposition (*figure 2*). Le comptage des micronoyaux montre que leur production débute de manière significative ($p < 0,05$) à une concentration de 2,5 mM. A cette concentration de cuivre, la fréquence des micronoyaux est de $1,89 \pm 0,11$ MCN/1000 cellules.

Suite à un traitement de 42 heures, le cuivre induit la formation de micronoyaux dans le méristème apical de *Pisum sativum*. La plus faible concentration de cuivre (1 mM) ne montre

Figure 2 - Induction des micronoyaux par le CuSO₄ chez *Vicia faba*. A: CuSO₄ (5 mM); B: CuSO₄ (10 mM); les flèches indiquent les micronoyaux.

Figure 2 - Micronuclei induction by CuSO₄ in *Vicia faba*. A: CuSO₄ (5 mM); B: CuSO₄ (10 mM); the arrows show the micronuclei.

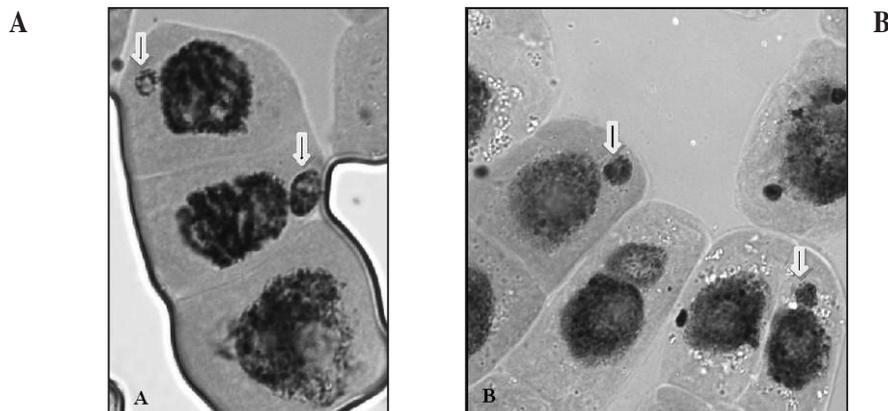
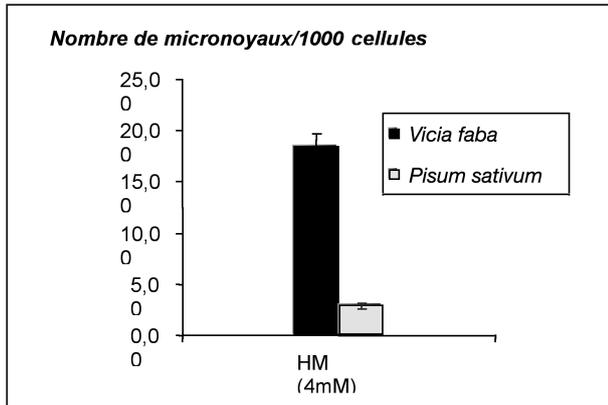


Figure 3 - Comparaison de la génotoxicité de l'hydrazide maléïque, HM (4 mM) chez *Vicia faba* et *Pisum sativum* en terme de fréquence de micronoyaux (Témoin SNS: 0,44 MCN/1000).

Figure 3 - Genotoxicity of the maleic hydrazide, HM (4 mM) in *Vicia faba* and *Pisum sativum* root tips (Témoin SNS: 0,44 MCN/1000).



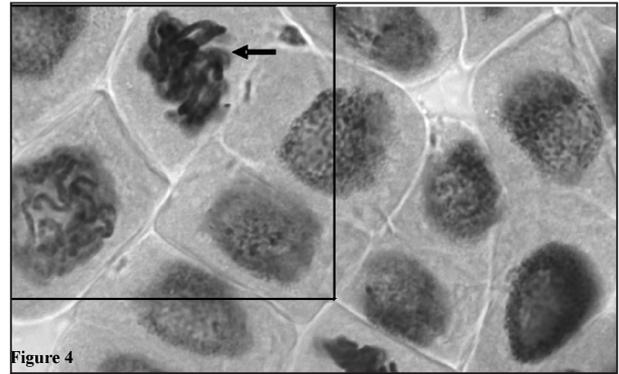
pas d'effet. L'effet commence à être significatif ($p < 0,05$) pour une concentration de 2,5 mM ($0,44 \pm 0,22$ MCN/1000 cellules). Nos résultats ont montré que le cuivre induit la formation de micronoyaux aussi bien chez *Vicia faba* que chez *Pisum sativum* mais la fréquence de ces derniers dépend de la concentration du métal et de l'espèce végétale. La différence de production de micronoyaux entre les deux plantes débute de manière significative ($p < 0,05$) à une concentration de 2,5 mM, pour laquelle le cuivre a engendré une génotoxicité environ 4,4 fois plus importante chez *Vicia faba* que chez *Pisum sativum* (Souguir *et al.*, 2008). Nous avons pu remarquer que pour une concentration de 10 mM de cuivre, la sensibilité de *Vicia faba* est environ 7 fois plus grande que celle de *Pisum sativum*. De même, à 50 mM de cuivre, cette sensibilité présente une différence de 20 fois environ. A la plus forte concentration (50 mM), le cuivre a engendré une augmentation de la fréquence des micronoyaux 90 fois plus élevée que celle du témoin négatif.

Potentiel inducteur des micronoyaux par l'hydrazide maléïque (HM) chez *Vicia faba* et *Pisum sativum*

L'hydrazide maléïque, HM, est utilisé comme un témoin positif. Il est connu pour sa forte capacité d'induire des micronoyaux. Une concentration de 4 mM de cet herbicide (exposition de 42 heures) a induit une augmentation très significative ($p < 0,001$) de la fréquence des micronoyaux au niveau des cellules méristématiques de *Vicia faba* et de *Pisum sativum* par rapport au témoin négatif. Les extrémités racinaires

Figure 4 - Formation d'agglomérats chromosomiques ou « stickiness » chez *Vicia faba* (CuSO_4 , 1 mM) ; les flèches indiquent les zones d'adhérence chromosomique (« stickiness »).

Figure 4 - Stickiness in *Vicia faba* (CuSO_4 , 1 mM) (arrows).



de *Vicia faba* et de *Pisum sativum* ayant subi un stress par le HM (figure 3) présentent des micronoyaux dont la fréquence est plus importante ($p < 0,05$) chez *Vicia faba* que chez *Pisum sativum*.

Aberrations chromosomiques

Lors des observations microscopiques, en plus de la formation de micronoyaux, d'autres types d'anomalies sont observées qui touchent aussi bien les chromosomes de *Vicia faba* que ceux de *Pisum sativum*. En effet, aux différentes concentrations de Cu^{2+} , il est observé des cellules comportant des chromosomes à structure altérée (clastogénicité) et des cellules présentant une mauvaise ségrégation de chromosomes (aneugénicité). Dans le cas des anomalies structurales qui touchent la morphologie des chromosomes, on a pu détecter la présence d'adhérences chromosomiques (« stickiness ») (figure 4), des fragments chromosomiques (figure 5) et des ponts anaphasiques (figure 6). Les fragments non rattachés à l'appareil mitotique se retrouvent perdus après la mitose.

Des chromosomes isolés suite à une non-migration des chromatides résultent d'un déplacement retardé (décalage) au cours de l'anaphase. Des chromosomes non-disjoints provenant de l'incapacité de chromatides-sœurs à se disjoindre lors de l'anaphase entraînent une migration des 2 chromatides vers l'un des pôles, l'autre cellule fille ne possédant pas ce matériel génétique. Une cellule peut présenter à la fois des signes de clastogénicité et des signes d'aneuploïdie.

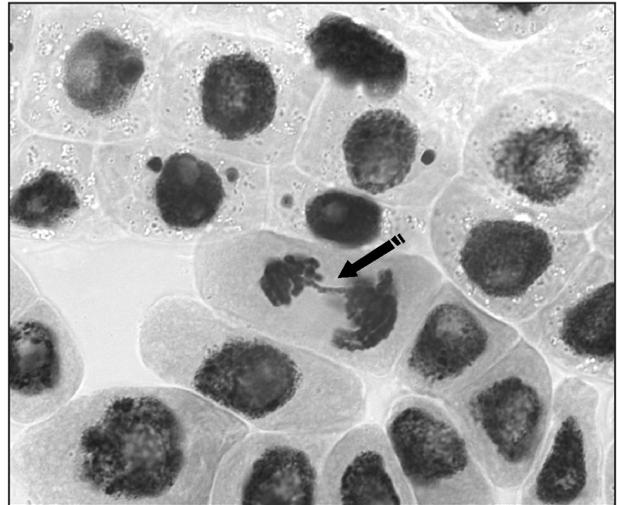
La génotoxicité se manifeste sous forme d'anomalies clastogéniques et aneugéniques. La clastogénicité peut être due à des interactions directes en créant des dommages au niveau de l'ADN ou indirectes suite à la production des espèces réactives de l'oxygène (Kovalchuk *et al.*, 2001). Chez les mammifères, cette clastogénicité peut être due aussi à l'inhibition de l'activité de la topoisomérase-II (Ferguson *et al.*

Figure 6 - Formation de ponts chromosomiques (A) chez *Pisum sativum* (CuSO_4 5 mM) et (B) chez *Vicia faba* (CuSO_4 2,5 mM) (→: pont chromosomique).

Figure 6 - Chromosomal bridges (arrows) (A) in *Pisum sativum* (CuSO_4 5 mM) and (B) in *Vicia faba* (CuSO_4 2,5 mM).



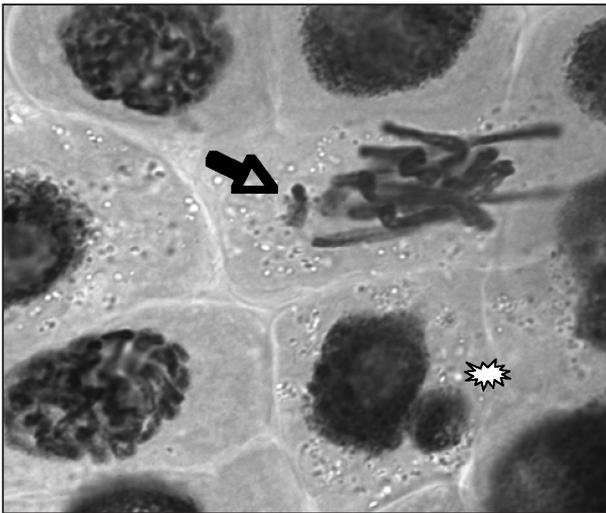
A



B

Figure 5 - Formation de fragments chromosomiques chez *Vicia faba* par le sulfate de cuivre (5 mM). La flèche indique un fragment chromosomique et le point indique un micronoyau.

Figure 5 - Chromosome fragmentation induction in *Vicia faba* by copper sulfate (5 mM). Arrow: chromosomal fragment; point: micronucleus.

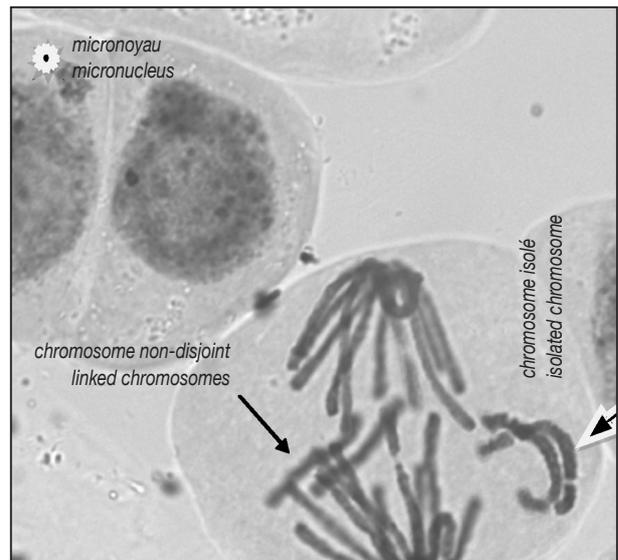


1989), alors que l'aneuploïdie a comme origine une altération de la fonction du fuseau mitotique.

Les micronoyaux trouvés dans le cytoplasme des cellules mitotiques en interphase, suite à de longues périodes de traitement, proviennent des fragments de chromosomes acentriques induits par la clastogénicité (Ma 1982a et b; Sandhu *et al.* 1989), de la rupture des ponts ou d'un retard de la ségrégation de chromosomes (Zaka *et al.* 2002). Nous observons que le Cu^{2+} induit des anomalies structurales et perturbe le fonctionnement du fuseau mitotique même aux faibles concentrations utilisées. Ces effets ont également été

Figure 7 - Différents types d'aberrations chromosomiques induites par CuSO_4 (10 mM) chez *Vicia faba*.

Figure 7 - Clastogenicity triggered by CuSO_4 (10 mM) in *Vicia faba*.



observés chez *Allium cepa* (Fiskesjo, 1985) et *Helianthus annuus* (Jiang *et al.* 2000) mais Fiskesjo (1988) et Liu *et al.*, (1995) ont signalé que ce métal n'est ni clastogène ni aneugène. La toxicité du cuivre est due à sa capacité à inhiber plusieurs enzymes, en se fixant sur leur groupement SH qui est essentiel pour leur activité (Fernandes et Henriques, 1991). Wang (1988) a suggéré, par ailleurs, que ce métal perturbe la distribution de Ca^{2+} dans la cellule dont dépend l'intégrité du nucléole.

D'après nos résultats, la fève semble être plus sensible au cuivre que le petit pois. Kihlman (1952) a montré que les cellules de *Pisum sativum* présentent des cassures au niveau des satellites mais considérablement moins fréquentes que celles trouvées chez *Vicia faba*. De même, *Pisum sativum* paraît plus résistant qu'*Allium cepa* au traitement par l'hydrazide maléique (Edwin et Reddy, 1993) et l'acénaphthène (Edwards, 1962) et ses chromosomes semblent être moins susceptibles aux cassures et aux adhérences (« stickiness »). Une résistance plus importante par rapport à *Lentus esculentum* a aussi été montrée à la suite d'un traitement par l'aldrine, l'heptachlore et le lindane (Jain et Sarbhoy, 1987a et b). La plus grande résistance de *Pisum sativum* peut être due au manque d'absorption de ces substances par ses racines (Edwards, 1962) et à ses chromosomes plus petits (Blixt, 1958, 1972). En effet, les espèces à grands chromosomes sont plus susceptibles aux cassures (Ma, 1982a; Dekergommeaux *et al.* 1983; Kihlman et Anderson, 1984).

La génotoxicité du cuivre est due à la production de radicaux hydroxyles et d'espèces réactives de l'oxygène à travers la réaction de Fenton (Imaly et Linn, 1988) qui peuvent provoquer la mort cellulaire. Les rayons-X sont aussi à l'origine d'une augmentation très significative de la fréquence de micronoyaux chez *Vicia faba* (Rizzoni *et al.* 1987). Cependant, il a été montré que le cuivre n'est pas un mutagène chez *Vicia faba* à la suite d'une exposition à différentes concentrations de ce métal pendant 2 heures mais une concentration de 250 mM inhibe la division cellulaire, ce qui est à l'origine de la diminution de la fréquence de micronoyaux (Steinkellner *et al.* 1998).

Dans une perspective environnementale, la disponibilité du cuivre devient un problème croissant vis-à-vis de l'ensemble des organismes vivants, incluant les plantes. La nécessité d'élucider la toxicité du cuivre provient de son utilisation systémique comme fongicide, algicide ou bactéricide en agriculture (Souguir *et al.* 2008).

BIBLIOGRAPHIE

- Asada K., Kanematsu S., Uchida K., 1977 - Superoxide dismutase in photosynthetic organisms: absence of the cuprozinic enzyme in eukaryotic algae. *Arch. Biochem. Biophys* 179, pp. 243-256.
- Baker A.J.M., 1987 - Metal Tolerance, *New Phytol.* 106, pp. 93-111.
- Blixt S., 1958 - Cytology of *Pisum*. II. The normal Karyotype. *Agric. Hort. Genet.* 16, pp. 221-237.
- Blixt S., 1972 - Mutation genetic in *Pisum*. *Agric. Hort. Genet.* 30, pp. 1-293.
- Cannon W. A., 1903 - Studies in plant hybrids: the spermatogenesis of hybrid peas. *Bull. Torrey Bot. Club* 30, pp. 519-543.
- Dekergommeaux D.J., Grant W.F.S., Sadhu S., 1983 - Clastogenic and physiological response of chromosomes to nine pesticides in the *Vicia faba* in vivo root tip assay system. *Mutat. Res.* 124, pp. 69-84.
- Edwards W.G.H., 1962 - Action of some acenaphthene derivatives on mitosis in *Pisum* roots. *Nature* 169, pp. 688-689.
- Edwin R., Reddy V.R.K., 1993 - Effect of maleic hydrazide on somatic chromosomes of *Allium* and *Pisum*. *Adv. Plant Sci.* 6, pp. 134-142.
- Ferguson L.R., Van Zijl, P. Baguley B.C., 1989 - Mutagenicity profiles of newer amsacrine analogues with activity against solid tumours: comparison of microbial and mammalian systems. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 25, pp. 55-74.
- Fernandes J.C., Henriques F.S., 1991 - Biochemical physiological and structural effects of excess copper in plants. *Bot. Rev.* 57, pp. 246-273.
- Fiskesjo G., 1985 - The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102, pp. 99-112.
- Fiskejo G., 1988 - *Allium* test-an alternative in environmental studies: The relative toxicity of metal ions. *Mutat. Res.* 197, pp. 243-260.
- Gupta S.I., 1986 - Copper uptake and inhibition of growth, photosynthetic pigments and macromolecules in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Photosynthetica* 20, pp. 447-453.
- Hagemeyer J., Breckle S.W., 1996 - Growth under trace elements stress-In: Waisel, Y., Eshel, A., Kalkafi, U(ed): *Plant Roots, The Hidden Half*. pp. 415-433. Marcel Dekker, New York.
- Humphreys M.O., Nicholls M.K., 1984 - Relationships between tolerances to heavy metals in *Agrostis capillaris* L. (*A. Tenuis* Sobth). *New Phytol.* 98, pp. 177-190.
- Imaly J.A., Linn S., 1988 - DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240, pp. 1302-1309.
- Jain A.K., Sarbhoy R.K., 1987a - Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides. I. Effect on somatic chromosomes of *Lens* and *Pisum*. *Cytologia* 52, pp. 47-53.
- Jain A.K., Sarbhoy R.K., 1987b - Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides. I. Effect on meiotic chromosomes of *Lens* and *Pisum*. *Cytologia* 52, pp. 55-61.
- Jarvis S.C., Whitehead D.C., 1983 - The absorption, distribution and concentration of copper in white clover grown on a range of soils. *Plant Soil* 75, pp. 427-434.
- Jiang W., Liu D., Li A., 2000 - Effects of Cu²⁺ on root growth; Cell Division and Nucleolus of *Helianthus annuus* L. *Sci. Tot. Environ.* 256, p 59.
- Kihlman B.A., 1952 - Induction of chromosome changes with purine derivatives. *Symbolae Bot. Upsalienses* 11, pp. 1-96.
- Kihlman B.A., Anderson H.C., 1984 - Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges, in: B.J. kilbey, M. legator, W. Nichols and C. Ramel (eds.), *Handbook of mutagenicity test procedures*, 2nd edn. Elsevier, Amsterdam, pp. 531-554.
- Knasmuller S., Gottaman E., Steinkellner H., Formin A., Pickel C., Paschke A., God R., Kundi M., 1998 - Detection of genotoxicity effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutat. Res.* 420, pp. 37-48.

- Kovalchuk O., Titov V., Hohn B., Kovalchuck I., 2001 - A sensitive transgenic plant system to detect toxic inorganic compounds in the environment. *Nat. Biotechnol.* 19, pp. 568-572.
- Lastra O., Ghueca A., Gonzalez C., Lachica M., Gorge J. I., 1987 - El cobre comonutriente de la planta. *Annals edafol. Agrobiol* 46; pp. 1005-1020.
- Lee W., Tsung-Lin L., Pi-Chiou C., Shin-Shou C., 2001 - High performance Liquid chromatographic determination of maleic hydrazide residue in potatoes. *J. Food Drug Anal.* 9, pp. 167-172.
- Levan A., 1945 - Cytological reaction induced by inorganic salt solutions, *Nature (London)* 156, p 751.
- Liu D., Jiang W., Wang W., Zhai L., 1995 - Evaluation of metal ion on root tip cells by the Allium Test. *Israel J. Plant Sci.* 43; pp. 125-133.
- Ma T-H., 1982a - Tradescantia micronuclei (Trad-MCN) test for environmental clastogens, *ins* A.R. Kolber, T. K., Wong, L. D., Grant, R. S. De Woskin and T.J. Hughes (Eds), *in vitro* toxicity testing of environmental agents, Pt. A Plenum. New York; pp. 191-214.
- Ma T-H., 1982b - Tradescantia cytogenetic tests (root-tip mitosis, pollen miosis, pollen mother-cell meiosis). *Mutat. Res.* 99; pp. 293-302.
- Ma T-H., Zhidong X., Xu C., McComell H., Rabago E.V., Arreola G. A., Zhang H., 1995 - The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants, *Mutat. Res.* 334; pp. 185-195.
- Marcano L., Carruyo M.H., Del Campo A., Montiel A., 2004 - Cytotoxicity and mode of action of Maleic hydrazide in root tips of Allium cepa. *Environ. Res.* 94; pp. 221-226.
- Muller S.L., Huggett D.B., Rodgers Jr J.H., 2001 - Effects of sulfate on Typha latifolia seed germination and early seedling growth in aqueous and sediment exposures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, pp. 192-197.
- Nriagu J.O., Pacyna J.M., 1988 - Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333; pp. 134-139.
- Rizzoni M., Vitagliano E., Marconi M.C., Sottili A., Gustavino B., 1987 - Micronuclei induction by low doses of X-rays in Vicia faba root tips. *Mutat. Res.* 176; pp. 205-209.
- Sandhu S.S., Ma T-H., Pong Y., Zhou X., 1989 - Clastogenicity evaluation of seven chemicals commonly found at hazardous industrial waste sites. *Mutat. Res.* 224; pp. 437-445.
- Seregin I.V., Ivanov V.B., 2001 - Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 48 (4); pp. 606-630.
- Souguir D., Ferjani E., Ledoigt G., Goupil P., 2008 - Exposure of Vicia faba and Pisum sativum to copper-induced genotoxicity. *Protoplasma* 233, pp. 203-207.
- Steinkellner H., Mum-Sik K., Helma C., Ecker S., Ma T-H., Horak O., Kundi M., Knasmüller S., 1998 - Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays. *Environ. Mol. Mutagenesis* 31, pp. 183-191.
- Stiborva M.M., Doubravou A.A., Brezinova E., Friedricha A., 1986 - Effect of heavy ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley. *Photosynthetica* 20; pp. 418-425.
- Wainwright S.J., Woolhouse H.W., 1977 - Some physiological aspects of copper and zinc tolerance in Agrotis tenuis Sibth: Cell elongation and membrane damage. *J. Exp. Bot.* 28, pp. 1029-1036.
- Wang Y., 1988 - General cell biology. Shanghai, Pr China: Shanghai Scientific and Technical Publishing House, pp. 301-308.
- Wu I., Lin C., 1990 - Copper tolerance and copper uptake of Lotus purshianus (benth) clem and clem. and its symbiotic Rhizobium loti derived from copper mine waste population. *New Phytol.* 116, pp. 531-539.
- Zaka R., Chenal C., Misset M.T., 2002 - Study external low irradiation dose affects on induction of chromosomes aberrations in Pisum sativum root tip meristem. *Mutat. Res.* 517; pp. 87-99.

