

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Špela KOREN

**VPLIV KADMIJA NA MINERALNO PREHRANO
IN METABOLIZEM OGLJIKOVIH HIDRATOV
PRI RANEM MOŠNJAKU (*Thlaspi praecox* Wulf.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Špela KOREN

**VPLIV KADMIJA NA MINERALNO PREHRANO IN
METABOLIZEM OGLJIKOVIH HIDRATOV PRI RANEM
MOŠNJAKU (*Thlaspi praecox* Wulf.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**IMPACT OF CADMIUM ON MINERAL NUTRITION AND CARBOHYDRATE
METABOLISM IN PENNYCRESS (*Thlaspi praecox* Wulf.)**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Doktorsko delo je zaključek Interdisciplinarnega doktorskega študija Bioznanosti na področju biologije. Vzgoja rastlin in poskusi, ki so bili izvedeni v rastni komori ter pretežni del analiz so bili opravljeni na Katedri za fiziologijo rastlin, meritve z AAS pa so bile opravljene na Katedri za zoologijo, oboje na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. XRF analize so bile opravljene v Laboratoriju za rentgensko fluorescenčno spektrometrijo, na Odseku za fiziko nizkih in srednjih energij Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani, meritve z mikro-PIXE pa so bile opravljene v Mikroanalitskem centru Inštituta Jožef Stefan v Podgorici. Analize z ATR so bile opravljene v Laboratoriju za strukturo biomolekul, SEM mikrofografije pa so bile posnete v Laboratoriju za elektrokemijo materialov, oboje na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Sinhrotronska FTIR spektroskopija je bila opravljena na sinhrotronu Elettra v Italiji, na žarkovni liniji SSSI. Meritve EXAFS so bile izvedene na žarkovni liniji C laboratorija HASYLAB na sinhrotronu DESY v Nemčiji. Meritve μ -XANES so bile izvedene na žarkovni liniji ID 21 na sinhrotronu ESRF v Grenoblu, Francija. Vzgoja rastlin za poskuse, ki so bili izvedeni v rastlinjaku, ter pripadajoče analize biokemijskih dejavnikov so bile izvedene na »Université Catholique de Louvain, Earth and Life Institute«, v skupini za »Agricultural Plant Science and Botany« v Belgiji.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z 21. 9. 2011 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje biologija. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Marjana Regvar in za somentorico doc. dr. Katarina Vogel-Mikuš.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik: prof. dr. Alenka GABERŠČIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Članica: prof. dr. Marjana REGVAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Članica: doc. dr. Katarina VOGEL-MIKUŠ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Član: doc. dr. Primož PELICON
Inštitut Jožef Stefan, Mikroanalitski center, Odsek za fiziko nizkih in srednjih energij

Datum zagovora: 3. 10. 2013

Doktorsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Špela Koren

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 581.1:546.48:547.454(043.3)=163.6
KG	<i>Thlaspi praecox</i> /Cd/vezavne oblike/mineralno pomanjkanje/ogljikovi hidrati/SR-XRF/SR-FTIR
AV	KOREN, Špela, univ. dipl. biolog
SA	REGVAR, Marjana (mentor)/VOGEL-MIKUŠ, Katarina (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, znanstveno področje biologija
LI	2013
IN	VPLIV KADMIJA NA MINERALNO PREHRANO IN METABOLIZEM OGLJIKOVIH HIDRATOV PRI RANEM MOŠNJAKU (<i>Thlaspi praecox</i> Wulf.)
TD	Doktorska disertacija
OP	XX, 133 str., 8 pregl., 36 sl., 11 pril., 236 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	Raziskave vpliva Cd na mineralno prehrano in metabolizem ogljikovih hidratov pri ranem mošnjaku so pokazale, da se rastlina različno odziva na različne koncentracije Cd in različne Cd soli, pri čemer večje koncentracije negativno vplivajo na rast rastlin in vsebnost fotosinteznih pigmentov. Različne Cd soli so vplivale predvsem na porazdelitev Cd na celičnem nivoju in na razmerje med O in S ligandi, pri čemer je CdCl₂ spodbujal kopičenje Cd v vakuolah mezofilnih celic, CdSO₄ pa v celični steni. Privzem Cd je povzročil motnje v vsebnosti in porazdelitvi esencialnih nutrientov, predvsem je vplival na privzem mikronutrientov. Največje spremembe v ionomu rastline in rastnem odzivu smo ugotovili pri rastlinah, ki so rasle v pomanjkanju Ca in Fe ter ob dodatku Cd. Ob izpostavitvi rastlin Cd je prišlo tudi do sprememb v metabolizmu ogljikovih hidratov. Po akutni izpostavljenosti rastlin Cd smo opazili zadrževanje škroba v poganjkih in povečano razgradnjo v koreninah, po kronični izpostavljenosti pa smo opazili zadrževanje saharoze v koreninah in poganjkih, kar je sovpadalo z zmanjšano aktivnostjo encimov za razgradnjo saharoze. Celice palisadnega mezofila so bile pri rastlinah, ki so bile izpostavljene Cd, manjše in okrogle, v tem področju pa smo ugotovili povečanje prispevka skupnih ogljikovih hidratov, natančneje osnovnih strukturnih ogljikovih hidratov, kot so celuloza, hemiceluloze, pektin ter založnega ogljikovega hidrata, škroba. Preučevanje vpliva Cd na elementno sestavo in metabolni odziv hiperakumulacijskih rastlin na tkivnem, celičnem in sub-celičnem nivoju s sodobnimi metodami, kot so mikro-PIXE in na sinhrotronski svetlobi osnovane metode mikro-XRF, EXAFS, mikro-XANES in FTIR, predstavlja svojevrsten pristop v rastlinski fiziologiji in prispeva ključno znanje za razumevanje tolerance rastlin na Cd.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC UDK 581.1:546.48:547.454(043.3)=163.6
CX *Thlaspi praecox*/Cd/ligand environment/mineral deficiency/carbohydrates/SR-XRF/SR-FTIR
AU KOREN, Špela
AA REGVAR, Marjana (supervisor)/VOGEL-MIKUŠ, Katarina (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Scientific Field of Biology
PY 2013
TI IMPACT OF CADMIUM ON MINERAL NUTRITION AND CARBOHYDRATE METABOLISM IN PENNYCRESS (*Thlaspi praecox* Wulf.)
DT Doctoral dissertation
NO XX, 133 p., 8 tab., 36 fig., 11 ann., 236 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB Cadmium was shown to affect mineral nutrition and metabolism of carbohydrates in Cd hyperaccumulator *Thlaspi praecox* grown in hydroponics with higher concentrations of Cd having negative effects on plant growth and photosynthetic pigment content. Concentration- and salt-specific responses in localisation of Cd, Cl and S and in the relationship between O and S ligands of Cd were seen at cellular level in leaves. In leaf mesophyll cells CdCl₂ promoted accumulation of Cd in the vacuoles, while CdSO₄ promoted the accumulation of Cd in the cell wall. Cd hyperaccumulation caused disturbances in the content and the distribution of essential minerals in leaves, particularly micronutrients. The most significant changes in plant mineral composition and plant biomass were seen when treated with Cd and Ca or Fe deficiency. Acute exposure to Cd induced retention of starch in the shoots, while chronic exposures resulted in retention of sucrose in the shoots and the roots and decreased activity of enzymes for the degradation of sucrose. In addition, Cd influenced morphology of the palisade mesophyll cells, which were smaller and rounder with increased contribution of total carbohydrates than in non-Cd treated plants. These total carbohydrates comprised typical basic structural carbohydrates such as cellulose, hemicelluloses, pectin, and non-structural carbohydrate starch. The study into the Cd-induced tissue-specific elemental and metabolic responses of hyperaccumulating plant with state-of-the-art methods such as micro-PIXE and synchrotron radiation based micro-XRF, EXAFS, micro-XANES and FTIR, represents unique approach in plant physiology and offers crucial knowledge contributing to understanding Cd tolerance.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATIONS.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	X
KAZALO SLIK.....	XII
KAZALO PRILOG.....	XVII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XIX
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA IN RAZISKOVALNE HIPOTEZE.....	3
1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 METALOFITI	4
2.2 TOLERANČNE STRATEGIJE METALOFITOV	4
2.2.1 Hiperakumulacijske rastline	5
2.2.1.1 <i>Thlaspi praecox</i> Wulf. in <i>T. caerulescens</i> J. & C. Presl.....	6
2.2.2 Hiperakumulacijske sposobnosti <i>T. praecox</i>.....	7
2.3 POMEN KADMIJA, NJEGOV PRIVZEM IN MEHANIZMI STRUPENOSTI PRI RASTLINI	8
2.3.1 Strupenost kadmija	8
2.3.2 Vstop in prenos Cd po rastlini	8
2.3.3 Privzem in mehanizmi strupenosti Cd pri rastlinah.....	9
2.3.4 Prenašalci kovin.....	9
2.3.5 Vidni znaki strupenosti kadmija.....	11
2.3.6 Vpliv kadmija na fotosintezo.....	11
2.3.7 Vpliv kadmija na mineralno prehrano rastlin	13
2.3.7.1 Vloga Mg, Ca, Fe, Mn in Zn v rastlini ter njihovo pomanjkanje	13
2.3.8 Posledice vpliva Cd na mineralno prehrano	15
2.3.9 Vpliv kadmija na metabolizem ogljikovih hidratov	16
2.4 PREUČEVANJE STRUPENOSTI KADMIJA PRI RASTLINAH.....	18
2.4.1 Vzgoja rastlin za preučevanje privzema in porazdeljevanja kovin v rastlinskih tkivih	18
2.4.2 Metode za preučevanje privzema in porazdeljevanja kovin v rastlinskih tkivih	19

2.4.3	Metode za določanje skupnih koncentracij elementov v rastlinskih organih.....	20
2.4.3.1	Rentgenska fluorescenčna spektrometrija (XRF).....	20
2.4.3.2	Metoda standardne energijsko disperzijske rentgenske fluorescenčne analize (EDXRF)	20
2.4.3.3	Metoda rentgenske fluorescence s popolnim odbojem (TXRF).....	21
2.4.3.4	Atomska absorpcijska spektrometrija (AAS)	21
2.4.4	Metode za določanje porazdeljevanja elementov na tkivnem in celičnem nivoju.....	21
2.4.4.1	Protonsko inducirana emisija rentgenskih žarkov z visokoenergijskim fokusiranim žarkom (mikro-PIXE).....	22
2.4.4.2	Sinhrotronska mikro rentgenska spektrometrija (SR mikro-XRF).....	22
2.4.5	Metode za določanje vezavnih oblik Cd v listih na tkivnem in celičnem nivoju.....	22
2.4.5.1	Rentgenska absorpcijska spektrometrija.....	22
2.4.5.2	Metodi EXAFS in mikro-XANES.....	23
2.4.6	Metode za določanje sestave organske matrike poganjkov na organskem in tkivnem nivoju	24
2.4.6.1	Infrardeča spektroskopija (IR).....	24
2.4.6.2	Metoda oslajljene popolne refleksije (ATR)	24
2.4.6.3	Sinhrotronska infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (SR-FTIR).....	24
3	MATERIAL IN METODE	26
3.1	VZGOJA RASTLIN.....	26
3.1.1	Vzgoja kalic iz semen	26
3.1.2	Prenos v hidroponsko raztopino in rastni pogoji	26
3.1.3	Gojenje rastlin v rastni komori in v rastlinjaku	26
3.2	DOLOČANJE BIOMASE IN PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA ZA NADALJNJE ANALIZE.....	27
3.2.1	Priprava liofiliziranih rezin.....	27
3.3	BIOKEMIJSKE MERITVE	27
3.3.1	Meritve fotokemične učinkovitosti	27
3.3.2	Določanje koncentracije in vsebnosti klorofilov in antocianov v poganjkih.....	28
3.3.3	Analize sladkornega metabolizma	28
3.3.3.1	Določanje celotnih topnih sladkorjev	28

3.3.3.2	Določanje posameznih topnih sladkorjev z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti sklopljene z »refractive index« detektorjem (HPLC-RID)	29
3.3.3.3	Določanje škroba	29
3.3.3.4	Določanje koncentracije proteinov	30
3.3.3.5	Določanje encimske dejavnosti nekaterih encimov sladkornega metabolizma.....	30
3.4	METODE ZA PREUČEVANJE KONCENTRACIJE, PORAZDELITVE IN DOLOČEVANJE VEZAVNIH OBLIK ELEMENTOV V RASTLINI NA ORGANSKEM, TKIVNEM ALI CELIČNEM NIVOJU	31
3.4.1	Metoda standardne energijsko disperzijske rentgenske fluorescenčne analize (EDXRF).....	31
3.4.2	Metoda rentgenske fluorescence s popolnim odbojem (TXRF).....	31
3.4.2.1	Mineralizacija vzorcev v mikrovalovni pečici	31
3.4.3	Atomska absorpcijska spektrometrija (AAS).....	32
3.4.3.1	Mineralizacija vzorcev na termobloku	32
3.5	METODE ZA DOLOČANJE PORAZDELJEVANJA ELEMENTOV NA TKIVNEM IN CELIČNEM NIVOJU	32
3.5.1	Mikro protonsko inducirana emisija rentgenskih žarkov (mikro-PIXE)	32
3.5.2	Sinhrotronska mikro rentgenska spektrometrija (SR-mikro XRF).....	33
3.5.2.1	Analize kolokalizacije	33
3.6	METODE ZA DOLOČANJE VEZAVNIH OBLIK Cd V LISTIH NA TKIVNEM IN CELIČNEM NIVOJU.....	33
3.6.1	Metodi EXAFS in mikro-XANES.....	33
3.7	METODE ZA DOLOČANJE SESTAVE ORGANSKE MATRIKE POGANJKOV NA ORGANSKEM IN TKIVNEM NIVOJU	34
3.7.1	Metoda oslabiljene popolne refleksije (ATR)	34
3.7.2	Sinhrotronska infrardeča spektroskopija s Furierjevo transformacijo (SR-FTIR)	34
3.8	MORFOLOGIJA RASTLINSKIH TKIV	35
3.8.1	Svetlobna mikroskopija	35
3.8.2	Vrstična elektronska mikroskopija (SEM).....	35
3.9	POTEK RAZISKAV IN POGOJI MERJENJA	35

3.9.1	Preučevanje vpliva CdCl ₂ in CdSO ₄ na privzem, porazdelitev in vezavne oblike Cd v listih.....	36
3.9.2	Preučevanje vpliva CdSO ₄ in pomanjkanja Mg, Ca, Zn, Fe in Mn na privzem Cd in nekaterih esencialnih mineralnih hranil	38
3.9.3	Preučevanje vpliva CdSO ₄ na metabolizem ogljikovih hidratov.....	39
3.9.4	Preučevanje vpliva CdSO ₄ na sestavo organske matrike listov	41
3.10	STATISTIČNA ANALIZA IN OBDELAVA PODATKOV	42
4	REZULTATI.....	43
4.1	PREUČEVANJE VPLIVA CdCl ₂ IN CdSO ₄ NA PORAZDELITEV IN VEZAVNE OBLIKE Cd V LISTIH RANEGA MOŠNJAKA	43
4.1.1	Rastni odziv rastline ter koncentracija in vsebnost klorofilov in antocianov.....	43
4.1.2	Koncentracije in vsebnosti elementov v poganjkih.....	45
4.1.3	Porazdelitev Cd, S, Cl in P v listih <i>T. praecox</i>	47
4.1.4	Analize kolokalizacije elementov na celičnem nivoju	51
4.1.5	Vezavne oblike Cd v listih <i>T. praecox</i>	53
4.1.6	Vezavne oblike Cd v listih <i>T. praecox</i> na sub-celičnem nivoju	54
4.2	VPLIV Cd IN POMANJKANJA Mg, Ca, Zn, Fe in Mn NA PRIVZEM Cd IN NEKATERIH ESENCIALNIH MINERALNIH HRANIL.....	56
4.2.1	Rast rastlin ter vpliv na pigmente in fotokemično učinkovitost	56
4.2.2	Privzem esencialnih elementov in Cd v korenine in poganjke.....	59
4.2.3	Vpliv sprememb v mineralni prehrani na rastlinski ionom ter na spremembe fizioloških parametrov	64
4.2.4	Porazdelitev elementov na tkivnem nivoju z metodo mikro-PIXE	69
4.3	VPLIV CdSO ₄ NA METABOLIZEM OGLJIKOVIH HIDRATOV.....	73
4.3.1	Rast in odziv rastline na prisotnost CdSO ₄ v hranilni raztopini po 1 in po 4-ih tednih	73
4.3.2	Koncentracija Cd ter vsebnost topnih sladkorjev in škroba v koreninah in poganjkih	77
4.3.3	Vsebnost proteinov in izbranih encimov v poganjkih	82
4.4	VPLIV Cd NA MORFOLOGIJO IN SESTAVO ORGANSKE MATRIKE LISTOV	85
4.4.1	Vpliv Cd na morfolgijo lista	85
4.4.2	Vpliv Cd na sestavo organske matrike.....	87
5	RAZPRAVA.....	92

5.1	VPLIV CdCl_2 IN CdSO_4 NA PRIVZEM, PORAZDELITEV IN VEZAVNE OBLIKE Cd V LISTIH.....	92
5.2	VPLIV Cd IN MINERALNEGA POMANJKANJA NA PRIVZEM Cd IN NEKATERIH ESENCIALNIH MINERALNIH HRANIL	98
5.3	VPLIV Cd NA METABOLIZEM OGLJIKOVIH HIDRATOV	103
5.4	VPLIV Cd NA SESTAVO ORGANSKE MATRIKE LISTOV	107
6	SKLEPI.....	109
7	POVZETEK	110
7.1	POVZETEK.....	110
7.2	SUMMARY	113
8	VIRI	115

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Koncentracije Cd, S, Cl in P v ($\mu\text{g g}^{-1}$), izračunane iz kvantitativnih SR mikro-XRF map porazdelitve elementov med apoplastom in simplastom epidermisa ter mezofila ter razmerje simplast/apoplast (S/A)	48
Preglednica 2: Koncentracije kadmija (Cd), žvepla (S), klora (Cl) in fosforja (P), izračunane iz kvantitativnih SR mikro-XRF map porazdelitve elementov v področju floema in deleži ligandov Cd-žveplo in Cd-kisik, izračunani iz spektrov Cd-L ₃ mikro-XANES po modeliranju z linearno kombinacijo. Mape predstavljajo kvantitativno porazdelitev Cd v področju floema, mapirano v prečnem prerezu lista <i>T. praecox</i> , kot je označeno na mikroskopski sliki levo zgoraj.....	51
Preglednica 3: Pearsonovi korelacijski koeficienti (r) izračunani za korelacije med Cd ter S, Cl in P v apoplastu in simplastu epidermalnega tkiva in mezofila pri 100 in 300 $\mu\text{M CdCl}_2$ ter 100 in 300 $\mu\text{M CdSO}_4$	52
Preglednica 4: Koncentracije a) makroelementov in b) mikroelementov [$\mu\text{g g}^{-1}$ SM] v koreninah ranega mošnjaka (<i>T. praecox</i>) po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), dodatkom 150 $\mu\text{M CdSO}_4$ (Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom 150 $\mu\text{M CdSO}_4$ (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd) (povprečje $\pm$ SE; n=4-8).	61
Preglednica 5: Koncentracije a) makroelementov in b) mikroelementov [$\mu\text{g g}^{-1}$ SM] v poganjkih ranega mošnjaka (<i>T. praecox</i>) po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), dodatkom 150 $\mu\text{M CdSO}_4$ (Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom 150 $\mu\text{M CdSO}_4$ (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd).	62
Preglednica 6: Translokacijski faktorji za makroelemente in mikroelemente pri ranem mošnjaku (<i>T. praecox</i>) po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), dodatkom 150 $\mu\text{M CdSO}_4$ (Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom 150 $\mu\text{M CdSO}_4$ (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd).....	63

Preglednica 7: Rezultati analize linearne regresije za SM korenin in poganjkov, pigmentov ter dejanska in potencialno FU. Pobarvana polja pomenijo statistično značilen vpliv faktorja (pomanjkanje določenega elementa ali dodatek 150 μM Cd v HR pri posamezni primerjavi kontrole, Cd ter para pomanjkanja in pomanjkanja s Cd) .. 64

Preglednica 8: Rezultati analize linearne regresije za koncentracije elementov v koreninah, poganjkih ter za pripadajoče translokacijske faktorje. Pobarvana polja pomenijo statistično značilen vpliv faktorja (pomanjkanje določenega elementa ali dodatek 150 μM Cd v HR pri posamezni primerjavi kontrole, Cd ter para pomanjkanja in pomanjkanja s Cd). 66

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Rani mošnjak <i>Thlaspi praecox</i> Wulfen iz Žerjava, Slovenija (foto: Špela Koren).	6
Slika 2: Shematska ponazoritev tilakoidne membrane in elektronske transportne verige. Sistem je sestavljen iz proteinskega kompleksa fotosistema II (PSII), citokroma b_6f , plastocianina (PC), proteinskega kompleksa fotosistema I (PSI).	12
Slika 3: Shema pretvorbe saharoze in sodelujočih encimov.....	17
Slika 4: Potek poskusa, priprave materiala in analiz, katerih cilj je bil preučiti vpliv $CdCl_2$ in $CdSO_4$ na privzem, porazdelitev in vezavne oblike Cd v listih ranega mošnjaka (<i>T. praecox</i>).....	37
Slika 5: Potek poskusa, priprave materiala in analiz, kjer smo želeli preučiti vpliva $CdSO_4$ in pomanjkanja Mg, Ca, Zn, Fe in Mn na privzem Cd in nekaterih esencialnih mineralnih hranil pri ranem mošnjaku (<i>T. praecox</i>). 39	39
Slika 6: Potek poskusa, priprave materiala in analiz, kjer smo želeli preučiti vpliv $CdSO_4$ na metabolizem ogljikovih hidratov pri ranem mošnjaku (<i>T. praecox</i>).	41
Slika 7: Potek poskusa, priprave materiala in analiz, kjer smo želeli preučiti vpliv $CdSO_4$ na sestavo organske matrike listov pri ranem mošnjaku (<i>T. praecox</i>).	42
Slika 8: a) Suha masa poganjkov, b) skupne koncentracije ($mg\ g^{-1}$ SM) in vsebnosti klorofilov ($\mu g\ rastlino^{-1}$), c) koncentracije (RE g^{-1} SM) in vsebnosti antocianov (RE g^{-1} SM), v rastlinah ranega mošnjaka, izpostavljenih 100 oz. 300 μM $CdCl_2$ ali $CdSO_4$	44
Slika 9: Koncentracije ($\mu g\ g^{-1}$ SM) in vsebnosti ($\mu g\ rastlino^{-1}$) a) Cd, b) S, c) Cl in d) P.....	46
Slika 10: a-c) Slike površinske gostote vzorca ($\mu g\ cm^{-1}$ posnetih področij v listih in SR mikro-XRF porazdelitvene mape elementov (100 $\mu m \times 100 \mu m$): d-f) Cd, g-f) S, j-l) Cd in m-o) P posnete v področju zgornjega epidermisa/sub-epidermisa rastlin 300 μM $CdSO_4$ (1. stolpec) ter stebričastega mezofila listov 300 μM $CdCl_2$ (2. stolpec) in 300 μM $CdSO_4$ (3. stolpec) rastlin ranega mošnjaka (<i>T. praecox</i>). U	50
Slika 11: Kvantitativne SR mikro-XRF mape porazdelitve Cd (rdeča), S (modra) in Cl (zelena), posnete pri energiji 3,55 keV. Z rumeno barvo je prikazano prekrivanje Cd in Cl ter z vijolično prekrivanje Cd in S. a) epidermis	

	rastlin izpostavljenih 100 μM CdCl_2 , b) epidermis rastlin izpostavljenih 300 μM CdSO_4 , c) mezofil rastlin izpostavljenih 100 μM CdCl_2 in d) mezofil rastlin izpostavljenih 300 μM CdSO_4	53
Slika 12:	Delež kadmijevih O- in S-ligandov v homogeniziranih poganjkih ranega mošnjaka (<i>T. praecox</i>).	54
Slika 13:	Delež O- in S-ligandov v apoplastu in simplastu izbranih tkiv rastlin ranega mošnjaka (<i>T. praecox</i>) izpostavljenih 100 μM CdCl_2 in 300 μM CdSO_4 . nd-ni določeno	55
Slika 14:	Suha masa [g] korenin in poganjkov ranega mošnjaka (<i>T. praecox</i>) po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), dodatkom 150 μM CdSO_4 (Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom 150 μM CdSO_4 (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd)	57
Slika 15:	Koncentracije klorofila a, klorofila b in karotenoidov, izražene v mg g^{-1} SM poganjkov ranega mošnjaka (<i>T. praecox</i>) po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), dodatkom 150 μM CdSO_4 (Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom 150 μM CdSO_4 (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd)	57
Slika 16:	Potencialna in dejanska fotokemična učinkovitost fotosistema 2 izraženi v relativnih enotah, merjeni) po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), dodatkom 150 μM CdSO_4 (Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom 150 μM CdSO_4 (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd).....	58
Slika 17:	Koncentracije kadmija (Cd) v $\mu\text{g g}^{-1}$ SM korenin in poganjkov ranega mošnjaka (<i>T. praecox</i>) po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), dodatkom 150 μM CdSO_4 (Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom 150 μM CdSO_4 (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd)	59
Slika 18:	Diagram drevesaste strukture, ki kaže grupiranje rastlin <i>T. praecox</i> a) kontrole, rastlin ki so rastle v prisotnosti Cd ter vseh mineralnih pomanjkanj ter b) rastlin, ki so rastle v prisotnosti Cd ter v pomanjkanji z dodanim Cd.....	68

- Slika 19:** Graf linearne diskriminantne analize za koncentracije elementov Mg, P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe in Zn, pomejenih v celotni liofilizirani prečni rezini zrelega lista ranega mošnjaka (*T. praecox*) z metodo mikro-PIXE po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Fe), dodatkom 150 μM CdSO_4 (+Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom Cd (-Mg+Cd, -Ca+Cd, Fe+Cd) 70
- Slika 20:** Koncentracije **a)** Cd in **b)** Mg v $\mu\text{g g}^{-1}$ v izbranih listnih tkivih ranega mošnjaka (*T. praecox*) pomejenih na liofiliziranih prečnih rezinah listov z metodo mikro-PIXE po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Fe), dodatkom 150 μM CdSO_4 (+Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom Cd (-Mg+Cd, -Ca+Cd, Fe+Cd) 71
- Slika 21:** Koncentracije **a)** Ca in **b)** Fe v $\mu\text{g g}^{-1}$ v izbranih listnih tkivih ranega mošnjaka (*T. praecox*) pomejenih na liofiliziranih prečnih rezinah listov z metodo mikro-PIXE po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Fe), dodatkom 150 μM CdSO_4 (+Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom Cd (-Mg+Cd, -Ca+Cd, Fe+Cd) 72
- Slika 22:** Vrednosti suhe mase [g] korenin in poganjkov ranega mošnjaka (*T. praecox*) glede na kontrolo po **a)** 1 tednu in **b)** po 4 tednih rasti v rastlinjaku in izpostavitvi 50 μM ali 150 μM CdSO_4 73
- Slika 23:** Koncentracije klorofila **a** in klorofila **b** izražena v mg g^{-1} sveže mase poganjkov ranega mošnjaka (*T. praecox*) po **a)** 1 tednu in **b)** po 4 tednih rasti v rastlinjaku in izpostavitvi 50 μM ali 150 μM CdSO_4 74
- Slika 24:** Koncentracija karotenoidov izraženih v mg g^{-1} sveže mase (SvM) poganjkov ranega mošnjaka (*T. praecox*) po **a)** 1 tednu in **b)** po 4 tednih rasti v rastlinjaku in izpostavitvi 50 μM ali 150 μM CdSO_4 75
- Slika 25:** Potencialna in dejanska fotokemična učinkovitost fotosistema 2 izraženi v relativnih enotah, merjeni pri **a)** 1-tedenskem poskusu in izmerjeni na 1. dan izpostavitve, na 4. dan in nato na 7. dan izpostavitve ter **b)** merjeni pri 4-tedenskem poskusu in izmerjeni na 1. dan izpostavitve, po 2 tednih in nato po 4 tednih izpostavitve, vsakič na istem listu treh rastlin ranega mošnjaka (*T. praecox*), izpostavljenih 50 μM ali 150 μM CdSO_4 76
- Slika 26:** Koncentracije kadmija (Cd) v $\mu\text{g g}^{-1}$ SM korenin in poganjkov ranega mošnjaka (*T. praecox*) po **a)** 1 tednu in **b)** po 4 tednih rasti v rastlinjaku in izpostavitvi 50 μM ali 150 μM CdSO_4 77

- Slika 27:** Koncentracije celotnih topnih sladkorjev izražene v mg g⁻¹ sveže mase korenin in poganjkov ter njuno razmerje (pog/kor; na sekundarni osi) pri ranem mošnjaku (*T. praecox*) po a) 1 tednu in b) po 4 tednih rasti v rastlinjaku in izpostavitvi 50 μM ali 150 μM CdSO₄..... 78
- Slika 28:** Koncentracije škroba izražene v mg g⁻¹ sveže mase korenin in poganjkov ter njuno razmerje (pog/kor; na sekundarni osi) pri ranem mošnjaku (*T. praecox*) po a) 1 tednu in b) po 4 tednih rasti v rastlinjaku in izpostavitvi 50 μM ali 150 μM CdSO₄ 79
- Slika 29:** Koncentracije a) glukoze, b) saharoze in c) fruktoze izražene v mg na g sveže mase korenin in poganjkov pri ranem mošnjaku (*T. praecox*) po 1 tednu in po 4 tednih rasti v rastlinjaku in izpostavitvi 50 μM ali 150 μM CdSO₄ 80
- Slika 30:** Vsebnost proteinov v poganjkih, podana v mg g⁻¹ sveže mase poganjkov ranega mošnjaka (*T. praecox*) po a) 1 tednu in b) po 4 tednih rasti v rastlinjaku in izpostavitvi 50 μM ali 150 μM CdSO₄..... 83
- Slika 31:** Aktivnost encimov saharoze-6-fosfat sintaza (SS), kisle invertaze (IA), bazične oz. nevtralne invertaze (IN) in saharoze-6-fosfat fosfataza (SPS), izoliranih iz poganjkov, podane v nmol (min*g⁻¹ SvM) pri ranem mošnjaku (*T. praecox*), po a) 1 tednu in b) po 4 tednih rasti v rastlinjaku in izpostavitvi 50 μM ali 150 μM CdSO₄..... 84
- Slika 32:** Mikrografije presečne elektronske mikroskopije (SEM) prečnih prerezov listov a-b) kontrole in c-d) rastlin izpostavljenih 150 μM Cd. Rezine, debele 14 μm so bile nameščene med 2-slojno Au mrežico..... 86
- Slika 33:** Primerjava map lipidov, estrov in skupnih ogljikovih hidratov, pomerjenih v področju stebričastega mezofila na prečnih prerezih listov ranega mošnjaka kontrolnih rastlin in rastlin, izpostavljenih 150 μM CdSO₄. Spektri so bili pomerjeni z SR-FTIR..... 88
- Slika 34:** Reprezentativna spektra kontrole in rastlin, izpostavljenih Cd, v regiji od 1800 do 840 cm⁻¹, pomerjenih v področju palisadnega mezofila na prečnem prerezu listov ranega mošnjaka (*T. praecox*) s SR-FTIR. Črke označujejo značilna področja izbranih organskih spojin v IR spektru, ki so nas zanimala: a) lipidi (2980-2820 cm⁻¹), b) estri (1735 cm⁻¹), c) amid I (1655 cm⁻¹), d) amid II (1545 cm⁻¹), e) celuloza (1250 cm⁻¹), f) hemiceluloze (1070 cm⁻¹), g) škrob (1025 cm⁻¹), h) pektin (1014 cm⁻¹) in i) celotni ogljikovi hidrati (1180-950 cm⁻¹) (izbira področij prirejena po Regvar in sod., 2013)..... 89

- Slika 35:** Primerjava intenzitete absorbance, izračunanih iz ATR spektrov, posnetih v skupnih vzorcih listov kontrolnih rastlin ranega mošnjaka (*T. praecox*) in rastlin, izpostavljenih Cd. 91
- Slika 36:** Primerjava intenzitete absorbance, izračunanih iz SR-FTIR spektrov, posnetih v skupnih vzorcih listov kontrole in Cd. 91

KAZALO PRILOG

Priloga A:

Priloga A1: Mape s kolokalizacijo a-c) Cd-S, d-f) Cd-Cl in g-i) Cd-P posnete v področju zgornjega epidermisa/sub-epidermisa rastlin 300 μM CdSO_4 (1. stolpec) ter stebričastega mezofila listov 300 μM CdCl_2 (2. stolpec) in 300 μM CdSO_4 (3. stolpec) rastlin ranega mošnjaka (*T. praecox*).v epidermisu/sub-epidermisu zrelih listov

Priloga A2: Mikro-XANES spektri posneti na Cd-L₃ v epidermisu lista rastlin izpostavljenih 100 μM CdCl_2 ali 300 μM CdSO_4 in v floemu rastlin, izpostavljenih 100 ali 300 μM CdCl_2 ali CdSO_4 in mikro-XANES spektri na Cd-L₃ robu različnih modelnih spojin (CdCl_2 , Cd-fitat, Cd-malat, Cd-oksalat, Cd-citrat, Cd-pektin in Cd-glutation)

Priloga B:

Priloga B1: Graf nemetričnega večrazsežnostnega lestvičenja (nMDS), ki kaže grupiranje vseh rastlin *T. praecox* kontrole ter rastlin, ki so rastle v pomanjkanju oz. v pomanjkanju z dodanim Cd. Vnesli smo podatke o koncentracijah makro in mikro elementov v poganjkih ter vse izmerjene rastne in biokemijske parametre.

Priloga B2: Diagram drevesaste strukture, ki kaže grupiranje rastlin *T. praecox* kontrole ter rastlin ki so rastle v pomanjkanju oz. v pomanjkanju z dodanim Cd. Analiza je bila opravljena z Wardovo metodo na podlagi koncentracij vseh pomerjenih elementov v poganjkih brez Cd ter vsemi izmerjenimi rastnimi parametri.

Priloga B3: Rezultati linearne diskriminantne analize za koncentracije elementov Mg, P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe in Zn, pomerjenih v celotni liofilizirani prečni rezini zrelega lista ranega mošnjaka (*T. praecox*) z metodo mikro-PIXE

Priloga C

Priloga C1: Koncentracijske mape porazdelitve elementov Mg, Ca, Fe in Cd pomerjenih na liofiliziranih prečnih rezinah listov ranega mošnjaka (*T. praecox*) z metodo mikro-PIXE po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg), dodatkom 150 μM CdSO_4 (+Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom Cd (-Mg+Cd)

Priloga C2: Koncentracijske mape porazdelitve elementov Mg, Ca, Fe in Cd pomerjenih na liofiliziranih prečnih rezinah listov ranega mošnjaka (*T. praecox*) z metodo mikro-PIXE po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s

pomanjkanjem določenega minerala (-Ca, -Fe), dodatkom 150 μM CdSO_4 (+Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom Cd (-Ca+Cd, -Fe+Cd)

Priloga D

Priloga D1: Rezultati faktorske analize variance za SM korenin in poganjkov ter vsebnosti klorofilov a in b ter karotenoidov v poganjkih, potencialne in dejanske FU ter koncentracije Cd v koreninah in poganjkih ranega mošnjaka pri kontrolnih rastlinah in rastlinah izpostavljenih 50 μM ali 150 μM CdSO_4 za 1 teden oz. 4 tedne

Priloga D2: Rezultati faktorske analize variance za vsebnost celotnih topnih sladkorjev in škroba v koreninah in poganjkih ter razmerje pog/kor pri kontrolnih rastlinah in rastlinah izpostavljenih 50 μM ali 150 μM CdSO_4 za 1 teden oz. 4 tedne

Priloga D3: Rezultati faktorske analize variance za vsebnosti glukoze, saharoze in fruktoze v poganjkih ter aktivnost encimov saharoza sintaze, kislih in nevtralnih invertaz ter saharoza-6-fosfat sintaze v poganjkih pri kontrolnih rastlinah in rastlinah izpostavljenih 50 μM ali 150 μM CdSO_4 za 1 teden oz. 4 tedne

Priloga D4: Rezultati faktorske analize variance za vsebnost proteinov ter aktivnost encimov saharoza sintaze, kislih in nevtralnih invertaz ter saharoza-6-fosfat sintaze v poganjkih pri kontrolnih rastlinah in rastlinah izpostavljenih 50 μM ali 150 μM CdSO_4 za 1 teden oz. 4 tedne

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AAS	atomska absorpcijska spektromerija (angl. <i>atomic absorption spectrometry</i>)
ABC	angl. <i>ATP binding cassette</i>
AtCAX	angl. <i>Arabidopsis thaliana cation exchanger</i>
AtHMA	angl. <i>Arabidopsis thaliana heavy metal associated protein</i>
AtNRAMP	angl. <i>A. thaliana natural resistance associated macrophage protein</i>
ATR	oslabljena popolna refleksija (angl. <i>attenuated total reflection</i>)
BSA	goveji serum albumin (angl. <i>bovine serum albumin</i>)
Ca, Ca ²⁺	kalcij, kalcijev (II) ion
Cd, Cd ²⁺	kadmij, kadmijev (II) ion
CH	ogljikovi hidrati
Cl, Cl ⁻	klor, klorov ion
COPT	prenašalci družine COPT (angl. <i>high-affinity Cu uptake proteins</i>)
Cu, Cu ²⁺	baker, bakrov (II) ion
DNSA	dinitrosalicilna kislina
EDXRF	energijsko disperzijska rentgenska fluorescenčna analiza (angl. <i>energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry</i>)
EXAFS	podaljšana fina struktura rentgenskih absorpcijskih robov (angl. <i>extended X-ray absorption fine structure</i>)
Fe, Fe ²⁺ , Fe ³⁺	železo, železov (II) ion, železov (III) ion
FTIR	infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (angl. <i>synchrotron radiation-based Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
HPLC-RID	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti sklopljena z »refractive index« detektorjem (angl. <i>high performance liquid chromatography coupled to a refractive index detector</i>)
HR	hranilna raztopina
IA	kisle invertaze (angl. <i>acid invertases</i>)
IN	nevtralne invertaze
IR	infrardeča svetloba
IRT	prenašalec IRT iz družine ZIP (angl. <i>iron regulated transporter</i>)
LDA	linearna diskriminantna analiza (angl. <i>linear discriminant analysis</i>)
LHC II	svetlobni žetveni kompleks II (angl. <i>light harvesting complex II</i>)
LOD	meja zaznavanja (angl. <i>limit of detection</i>)
Mg, Mg ²⁺	magnezij, magnezijev (II) ion
mikro-PIXE	protonsko inducirana emisija rentgenskih žarkov z visokoenergijskim fokusiranim žarkom (angl. <i>particle induced micro-X-ray fluorescence emission</i>)
mikro-XRF	sinhrotronska mikro rentgenska spektrometrija (angl. <i>micro-X-ray fluorescence</i>)

Mn, Mn ²⁺	mangan, manganov (II) ion
nMDA	nemetrično večrazsežno lestvičenje (angl. <i>non-metric multidimensional scaling</i>)
NRAMP	prenašalci družine NRAMP (angl. <i>natural resistance associated macrophage protein</i>)
OEC	kisikov katalitični kompleks (angl. <i>oxygen evolving kompleks</i>)
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluorid
PS	fotosistem
RF	rentgenska fluorescenca
SEM	vrstična elektronska mikroskopija (angl. <i>scanning electron microscopy</i>)
SM	suha biomasa
SPS	saharoza-6-fosfat sintaza
SR	sinhrotronski/-a
SR-FTIR	sinhrotronska infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (angl. <i>synchrotron radiation-based Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
SS	saharoza sintaza
SvM	sveža biomasa
TXRF	rentgenska fluorescenca s popolnim odbojem (angl. <i>total reflection X-ray fluorescence</i>)
UDP	uracil difosfat
XANES	bližnja struktura rentgenskih absorpcijskih robov (angl. <i>X-ray absorption near-edge structure</i>)
XRF	rentgenska fluorescenčna spektrometrija (angl. <i>X-ray fluorescence spectrometry</i>)
YSL	prenašalci družine YSL (angl. <i>yellow stripe-like</i>)
ZIP	prenašalci družine ZIP (angl. <i>zinc-regulated and iron-regulated transporter-like proteins</i>)
Zn, Zn ²⁺	cink, cinkov (II) ion

1 UVOD

Onesnaženje tal s strupenimi kovinami in organskimi onesnažili predstavlja v okolju velik problem, saj onesnažila negativno vplivajo na rast in razvoj rastlin. To posledično vpliva tudi na pridelavo zdrave in z minerali bogate hrane, prav tako pa lahko spremembe v rastlinskem metabolizmu vplivajo na količino pridelka, okus in odpornost proti patogenom (Barcelo in Poschenrieder, 1999; Williams in Salt, 2009). Korenine namreč iz tal privzemajo vse elemente, tako esencialne (P, S, Mg, Ca, Fe, Mn, Zn), kot tudi elemente brez znane biološke funkcije (Cd, Pb, Hg). Le-ti lahko nato motijo normalno privzemanje mineralnih hranil pri rastlinah, ob tem pa z bioakumulacijo v rastlinah pomenijo vstop strupenih snovi v prehranjevalno verigo človeka. Za uspešno trajnostno kmetijstvo na zmerno onesnaženih tleh, je zato nujno potrebno poznati mehanizme interakcij med mineralnimi hranili in onesnažili pri rastlinah na organizemski, tkivni in celični ravni.

Kadmij je strupena kovina, ki je v prsti zelo mobilna in se zato lahko zlahka akumulira v rastlinah (Jarup in sod., 2003). Kljub temu, da je za večino rastlin izredno strupen, so nekatere rastlinske vrste razvile sposobnost kopičenja izjemnih količin Cd v poganjkih (nad 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase). Najbolj znani Cd hiperakumulacijski vrsti sta tako *Thlaspi caerulescens* in *T. praecox*, ki uspevata tudi v Sloveniji. Rastline, ki hiperakumulirajo kovine, predstavljajo odličen model za študije mehanizmov akumulacije in tolerance na kovine (Assunção in sod., 2003). Za človeka so zanimive predvsem zaradi možne neposredne uporabe za razstrupljanje tal, onesnaženih s kovinami zaradi antropogene dejavnosti, saj lahko tako tlem povrnemo rodovitnost in s tem omogočimo varnejšo pridelavo hrane (Baker in sod., 1994).

Znano je, da Cd negativno vpliva na privzem kationov in anionov, pomanjkanje esencialnih makroelementov pa nato ruši homeostatske procese. Posledično prihaja do sprememb v koncentraciji in porazdelitvi esencialnih hranil in organskih komponent v rastlini (Seregin in Ivanov, 2001). Do sedaj je bilo večino študij o vplivu Cd na esencialne elemente pri hiperakumulatorjih, narejenih pri vrsti *Thlaspi caerulescens*, le-to področje pa je pri sorodni vrsti *T. praecox* slabo preučeno.

Do sedaj je tudi že bilo ugotovljeno, da lahko Cd negativno vpliva tudi na metabolizem ogljikovih hidratov (Devi in sod., 2007; Verma in Dubey, 2001). Stopnja transporta fotosintatov v posamezne ponorne organe je namreč pomembna komponenta rasti in razvoja rastlinskih organov, saj pomembno določa samo produktivnost rastlin (Choundhury in sod., 2010). Vzdrževanje učinkovitega metabolizma ogljikovih hidratov, ki zagotavlja vir energije in ogljikovih skeletov, je tako osnovna strategija preživetja rastlin, ki so podvržene različnim okoljskim vplivom, tudi izpostavitvi

povečanim koncentracijam kovin (Stobrawa in Lorenc-Plucińska, 2007). Vpliv Cd na metabolizem ogljikovih hidratov pri rastlinah je še razmeroma slabo poznan, pri hiperakumulatorjih pa na tem področju še ni nič znanega.

Pretekle raziskave na hiperakumulacijski vrsti *T. praecox* so bile usmerjene predvsem v študije mehanizmov akumulacije in tolerance na kovine na tkivnem nivoju. Pri tem se je uporabljalo moderne fizikalne metode za kvantifikacijo kovin v posameznih rastlinskih organih ter za kvantifikacijo in hkratno lokalizacijo kovin na tkivnem nivoju. Pri tem se je omenjene pojave študiralo predvsem na rastlinah nabranih v naravnem okolju (Vogel-Mikuš in sod. 2007, 2008a, b). Omenjene raziskave bi bilo potrebno izvesti v nadzorovanem okolju in s tem izključiti morebitne učinke okoljskih dejavnikov. Tako bi bilo potrebno preučiti interakcije med kovinami in esencialnimi elementi ter vplivom Cd na metabolizem ogljikovih hidratov in organsko matriko rastlin na tkivnem in celičnem nivoju.

Za preučevanje vpliva strupenosti kadmija pri rastlinah imamo na voljo mnogo različnih metod. Pri preučevanju vpliva Cd na vsebnosti posameznih esencialnih elementov v rastlini je zelo informativno preučiti celoten ionom rastline (Williams in Salt, 2009), za kar imamo danes na voljo multielementne analize vzorcev. Poleg teh imamo na voljo tudi mnogo natančnih metod za vizualizacijo in preučevanje prostorske porazdelitve posameznih elementov v rastlinskih vzorcih na tkivnem, celičnem in sub-celičnem nivoju ter še podrobnejše analize, ki nam razkrijejo kompleksacijo in kemijsko okolje posameznega elementa. Te raziskave pa lahko danes dopolnimo še z oceno prostorske porazdelitve osnovnih organskih molekulskih gradnikov (proteini, ogljikovi hidrati) na tkivnem in celičnem nivoju.

Tovrstne raziskave in metodološki pristop predstavljajo v svetu novost in pomembno prispevajo k razumevanju mineralne prehrane in homeostaze rastlin na celičnem nivoju ter vpliva neesencialnih kovin na metabolizem strukturnih in nestrukturnih ogljikovih hidratov pri hiperakumulatorjih. Poleg tega pa omenjene raziskave tudi pomembno prispevajo k razvoju interdisciplinarnih povezav med znanstvenim področjem biologije rastlin s fiziko in kemijo.

1.1 NAMEN DELA IN RAZISKOVALNE HIPOTEZE

Namen doktorskega dela je bil podrobneje preučiti vpliv Cd na mineralno prehrano in metabolizem ogljikovih hidratov pri ranem mošnjaku (*Thlaspi praecox*). Preučili smo vpliv različnih Cd soli na rastni odziv rastline ter možne spremembe v prerazporeditvi Cd ter njegovih vezavnih oblikah v različnih tkivih na celičnem in sub-celičnem nivoju. Določili smo stopnjo privzema in prerazporejanja Cd in nekaterih esencialnih elementov v rastlinah, gojenih pri različnih pogojih pomanjkanja mineralnih hranil in interakcij z dodanim Cd na tkivnem nivoju.

Raziskali smo vpliv Cd na metabolizem ogljikovih hidratov, natančneje škroba in saharoze s kvantitativno kemijsko ekstrakcijo, ter dopolnili ugotovitve s preučevanjem sprememb v kemijski sestavi organske matrike z analizo prostorske porazdelitve funkcionalnih molekulskih skupin s poudarkom na strukturnih in nestrukturnih skupinah ogljikovih hidratov. Te spremembe pa smo dopolnili z ugotovitvami o vplivu Cd na spremembe v morfologiji z vrstično elektronsko mikroskopijo.

1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

- Predpostavljamo, da bo izpostavitve dvema različnima kemijskima oblikama Cd, CdSO_4 in CdCl_2 , zaradi razlike v prisotnosti različnih anionov (Cl^- oz. SO_4^{2-}) povzročilo različen odziv rastline, kot so razlike v akumulaciji Cd in biomasi rastlin.
- Cd se bo v rastlinskih tkivih vezal na različne ligande na tkivnem in celičnem nivoju. Predpostavljamo, da se bo Cd ob pomanjkanju S vezal večinoma na O-ligande.
- Tako pomanjkanje esencialnih mineralnih hranil kot dodatek Cd bodo povzročil motnje v vsebnosti in porazdeljevanju esencialnih mineralnih hranil. Največje spremembe v rastli rastlin pa pričakujemo v primeru kombinacije pomanjkanja esencialnih mineralnih hranil in dodatka kadmija.
- Izpostavitve rastlin Cd bo povzročilo spremembe v metabolizmu ogljikovih hidratov, pri čemer pričakujemo povečano zadrževanje sladkorjev v celicah mezofila.
- Pristotnost Cd v rastlini se bo odrazila v spremembah morfologije ter spremembah v sestavi organske matrike tkiva.

2 PREGLED OBJAV

2.1 METALOFITI

Kovine so lahko v tleh prisotne zaradi preperevanja matične kamnine ali pa so posledica raznovrstnega človekovega delovanja, kot so predelava rud, gnojenje ali industrija. Pojavljajo se v obliki prostih ali izmenljivih ionov, organsko vezanih kovin, topnih ali netopnih (precipitiranih) kompleksov (oksidi, karbonati, fosfati in hidroksidi) ali pa so del silikatnih mineralov (Leyval in Joner, 2001). Na njihovo biodostopnost vplivajo različni talni dejavniki, kot so struktura tal in prisotnost drugih ionov, pH, kationsko izmenjevalna kapaciteta, delež organske snovi in mikroorganizmi v tleh (Marschner, 1995).

Toleranca na kovine je dedna lastnost rastlin, ki jim omogoča preživetje na tleh, v katerih so koncentracije kovin tako velike, da so zaradi tega strupene za druge rastlinske vrste (Baker, 1981; Hall, 2002). Takšne rastline imenujemo metalofiti in njihov pojav je posledica različno dolgo let trajajočih selekcijskih pritiskov, kot so npr. prekomerne koncentracije kovin v tleh (Antonovics in sod., 1971). Tako ločimo med sabo metalofite in psevdometalofite. Slednji so rastlinske vrste z omejeno odpornostjo na kovine, ki jih najdemo v populacijah, ki so le nekaj let izpostavljene kovinam (npr. rastline v bližini mlajših rudnikov), posamezni osebki teh populacij so bolj odporni na kovine, kot osebki iste vrste, ki rastejo na neonesnaženih tleh (Baker, 1981; Whiting in sod., 2004; Ginocchio in Baker, 2004). Za metalofite pa je značilno, da so se ustalili na substratih, naravno bogatih s kovinami, in so v evoluciji razvili visoko specifične mehanizme odpornosti oziroma tolerance na kovine ter so popolnoma odvisni od tal določenih lastnosti (Baker, 1981; Baker in sod., 1999; Whiting in sod., 2004). V preteklosti se jih je zaradi svojih posebnih lastnosti pogosto uporabljalo kot geobotanične indikatorje za prisotnost kovin (Brooks, 1998).

2.2 TOLERANČNE STRATEGIJE METALOFITOV

V primeru, ko homeostazni mehanizmi rastlini omogočajo toleranco na kovine, jih imenujemo tolerančni mehanizmi (Ernst in sod., 1992). Na podlagi različnih tolerančnih mehanizmov rastlinske vrste delimo na izključevalske ter na akumulacijske rastlinske vrste. Izključevalci so zmožni preprečevati transport kovin v občutljive nadzemne dele preko večjega koncentracijskega območja kovin v tleh, vse do kritične koncentracije, ko mehanizmi izključevanja popustijo in se prične nekontroliran privzem kovin v rastlinska tkiva (Baker, 1981). Zanje je tudi značilno, da je razmerje koncentracije kovin med poganjki in koreninami <1 (translokacijski faktor, TF; Baker, 1981), koncentracije kovin v nadzemnih delih rastline pa so manjše kot v tleh, pri čemer je bioakumulacijski

faktor (razmerje koncentracij kovin v tleh in rastlini) <1 (Baker in sod., 1994). Za akumulacijske vrste pa je značilno, da kovine pospešeno privzemajo iz tal v korenine, kjer jih nato nalagajo v ksilem in transportirajo v nadzemne dele, kjer se le-te koncentrirajo (Baker, 1981). Pri teh rastlinah je značilno, da je razmerje koncentracij kovin med poganjki in koreninami >1 , koncentracije kovin v koreninah in poganjkih pa so večje od koncentracij v tleh, pri čemer je bioakumulacijski faktor prav tako >1 (Baker, 1981; Baker in sod. 1994).

2.2.1 Hiperakumulacijske rastline

Skrajna oblika akumulacijske strategije na kovine je hiperakumulacija (Hall, 2002), pri čemer rastline v nadzemnih delih aktivno kopičijo kovine v koncentracijah, ki daleč presegajo tiste v tleh oziroma v neakumulacijskih rastlinskih vrstah (Baker, 1981; Baker, 1987). Hiperakumulacijske rastline so namreč razvile izjemno učinkovite mehanizme privzema, razstrupljanja in sekvestracije kovin v svojih tkivih. Nekatere izmed njih so tako močno prilagojene na povečane vsebnosti kovin, da življenjskega cikla na s kovinami revnih tleh sploh ne morejo zaključiti (Hall, 2002).

Pogoj, da lahko neko rastlino razglasimo za hiperakumulacijsko rastlino je, da mora imeti razmerje koncentracij poganjki/tla ter poganjki/korenine krepko $\gg 1$. V primeru hiperakumulacije Cd mora koncentracija le-tega v poganjkih presegati 100 mg/kg suhe mase (kar je $> 0,01$ % SM rastline) (Brooks, 1998). Med literaturo najdemo mnogo objav, ki poročajo o izmerjenih velikih koncentracijah Cd in drugih kovin v poganjkih, a so bile mnoge izmed teh izmerjene v rastlinah, ki so rastle v lončnih ali hidroponskih poskusih (van der Ent in sod., 2013). Eno izmed nazadnje predlaganih meril po van der Ent in sod., (2013), po katerih lahko rastlino opredelimo kot hiperakumulacijsko, je namreč to, da morajo osebki, v katerih se izmeri veliko koncentracijo kovin, izvirati iz narave.

Hiperakumulacijske rastline predstavljajo majhen delež kritosemenk (450 vrst oz. manj kot 0,2 %), vendar se pojavljajo v raznolikih rodovih in družinah, zato velja, da so v kraljestvu rastlin redke (Baker in sod., 1999; Rascio in Navari-Izzo, 2011). Več kot 75 % teh vrst v svojih tkivih hiperakumulira Ni, medtem ko je danes znanih le nekaj vrst hiperakumulacijskih rastlin za Cd, med katerimi so naslednje rastlinske vrste: *Arabidopsis halleri* (Bert in sod., 2002), *Thlaspi caerulescens* (Reeves in sod., 2001) in *T. praecox* (Vogel-Mikuš in sod., 2005), med zadnje odkritimi pa so *Viola baoshanensis* (Liu in sod., 2004), *Solanum nigrum* (Sun in sod., 2006), *Sedum alfredii* (Deng in sod., 2008) in *Picris divaricata* (Ying in sod., 2010).

Kljub temu, da v naravi najdemo več ne-akumulacijskih kot akumulacijskih rastlinskih vrst, pa je slednjim rastlinam namenjenih vedno več raziskav. Za preučevanje so namreč zanimivi njihovi osnovni fiziološki mehanizmi ter njihova potencialna komercialna uporaba v fitoremediaciji (Whiting in sod., 2004).

2.2.1.1 *Thlaspi praecox* Wulf. in *T. caerulescens* J. & C. Presl.

Pseudometalofita rani mošnjak *Thlaspi* (*Noccaea*) *praecox* (**Slika 1**) in modrikasti mošnjak *Thlaspi* (*Noccaea*) *caerulescens* sta predstavnika družine križnic (Brassicaceae). Leta 2001 sta Koch in Mummenhoff, na podlagi jedrne ribosomske (ITS) DNA ter ostalih morfoloških in anatomskih razlik, na novo preučila rod *Thlaspi*. Pri tem sta mnoge hiperakumulacijske vrste (med njimi *T. caerulescens* in *T. goesingense*) uvrstila v rod *Noccaea*. Likar in sod. (2010) pa so nato potrdili 99% sorodnost med vsemi populacijami *T. praecox* v Sloveniji in sestrsko sorodnost do *T. caerulescens*, kar *T. praecox* prav tako uvršča v rod *Noccaea*.



Slika 1: Rani mošnjak *Thlaspi praecox* Wulfen iz Žerjava, Slovenija (foto: Špela Koren).

Figure 1: Pennycress *Thlaspi praecox* Wulfen from Žerjav, Slovenija (photo: Špela Koren).

Zaradi te nedavne premestitve v rod *Noccaea*, se v študijah mehanizmov tolerance pri objavah raziskav še vedno uporabljata obe poimenovanji, kot npr. *Thlaspi* (*Noccaea*) *caerulescens*. Pri tem doktorskem delu so bile vse raziskave opravljene na rastlinski vrsti rani mošnjak in pri tem bomo namesto vrstnega imena *Noccaea praecox* v nadaljnjem tekstu uporabljali že dobro ustaljeno in prepoznavno ime *Thlaspi praecox*.

Vrsti rani in modrikasti mošnjak sta trajnici z izrazito rozeto. Pri *T. praecox* na večjem številu cvetočih stebel nastane venec bele barve, čaša pa je pogosto rdečkasto nadahnjena (Martinčič in sod., 2007), vrsto *T. caerulescens* pa prepoznamo po rdečkastih do vijoličnih prašnicah (Wraber, 2005).

Obe vrsti najdemo tudi v Sloveniji. *T. praecox* raste širom Slovenije na suhih in kamnitih karbonatnih travnikih od nižine do subalpinskega pasu, a je za raziskave najbolj zanimiva populacija *T. praecox* iz Žerjava, ki hiperakumulira Cd in Zn. *T. caerulescens* najdemo v Sloveniji le na Banjščicah (Wraber, 2005). Poleg populacije *T. praecox* iz Žerjava, je za raziskave zanimiva tudi populacija *T. caerulescens* iz Gangesa, Francija, saj obe izkazujeta najvišjo sposobnost za hiperakumulacijo Cd in sta tako znani kot rastlini, najbolj tolerantni na Cd (Cosio in sod., 2004; Vogel-Mikuš in sod., 2005; Xing in sod., 2008).

Za raziskave so za nas najbolj zanimive rastline *T. praecox*, ki rastejo na onesnaženih pobočjih v Žerjavu. Seme le-teh rastlin se zato redno nabira in uporablja za vzgojo rastlin v rastnih komorah (Vogel-Mikuš in sod., 2005).

2.2.2 Hiperakumulacijske sposobnosti *T. praecox*

Za *Thlaspi praecox* je bilo l. 1995 najprej ugotovljeno, da je v svojih tkivih sposoben kopičiti do 2,1 % Zn (Brooks, 2000), kasneje pa so Vogel-Mikuš in sod. (2005) ugotovili, da je *Thlaspi praecox* iz okolice Žerjava sposoben kopičiti celo tri kovine hkrati. V njegovih poganjkih so namreč izmerili do 1,5 % Zn, 0,6 % Cd in 0,4 % Pb akumuliranih kovin v suhi masi (SM) rastlin iz narave. Tla v okolici Žerjava v Mežiški dolini, kjer je med leti 1896 in 1990 delovala talilnica in predelovalnica svinca, so namreč zaradi dolgoletnih nenadzorovanih izpustov kovin v izpustnem prahu trajno onesnažena s Zn, Cd in Pb, kar še danes predstavlja težavo vsem okoliškim organizmom, vključno z rastlinami (Fugaš in sod., 1984).

Še večja koncentracija Cd ($7428 \mu\text{g g}^{-1}$ SM) je bila izmerjena v poganjkih rastlin *T. praecox*, gojenih v rastlinjaku na substratu iz naravnega habitata (Vogel-Mikuš in sod., 2006), kar nam pove, da je to rastlina z uspešno strategijo spopadanja s stresom zaradi prisotnosti Cd, Zn in Pb v rastnem substratu. Visoke koncentracije kovin v poganjkih rani mošnjak tolerira tako, da kopiči predvsem Zn, pa tudi Cd, v vakuolah in celičnih stenah listne povrhnjice (Vogel-Mikuš in sod., 2008a, b). V primeru, ko celice povrhnjice ne nudijo več zadostnih kapacitet za shranjevanje, pa se Cd lahko kopiči tudi v fotosintezno aktivnem mezofilu. Pri zelo povišanih vsebnostih Cd v listih se pričnejo

na listih izražati simptomi strupenosti, kot so kloroze in propadanje tkiv, kar se povezuje s povišanimi koncentracijami Cd v citosolu (Vogel-Mikuš in sod., 2008a, b).

2.3 POMEN KADMIJA, NJEGOV PRIVZEM IN MEHANIZMI STRUPENOSTI PRI RASTLINI

2.3.1 Strupenost kadmija

Kadmij je neesencialen element, ki v živih organizmih nima znane biološke funkcije, z izjemo organizma morske diatomeje *Thalassiosira weissflogii*, v kateri se nahaja od kadmija odvisna karboanhidraza 1 (CdCA1), ki ima v aktivnem mestu koordiniran Cd, t. j. encim, ki katalizira reverzibilno pretvorbo ogljikovega dioksida in vode v bikarbonatni ion in je, razen v tem primeru, cinkov metaloencim (Cullen in sod., 1999). Kadmij je tako za rastline strupen in sicer v manjši koncentraciji v primerjavi z drugimi kovinami, kot so Zn, Pb in Cu (Dietz in sod., 1999).

Vzrok strupenosti Cd za rastlino je močna vezava kovine na S, O ali N atome (Dietz in sod., 1999; Hall, 2002), še posebej visoko afiniteto ima za vezavo na spojine s prostimi S skupinami, kot so tiolne skupine (-SH) ter različnih proteinov bogatih s Cys in Met (Reid in sod., 2003). Poleg tega, pa lahko Cd zamenja esencialne kovine v funkcionalnih skupinah proteinov, nukleinskih kislin in polisaharidov (Seregin in Ivanov, 2001; Maruthi Sridhar in sod., 2005). Rezultat vezave Cd je inaktivacija bioloških molekul oz. razpad njihove strukture, kar ovira metabolne reakcije (Dietz in sod., 1999; Hall, 2002).

Čeprav Cd ni fentonov reagent, lahko v celici povzroča oksidativni stres, saj poškoduje encime za razgradnjo vodikovega peroksida kot so katalaza in guaikol peroksidaze (Dat in sod., 2000; Pongrac in sod., 2009). Posledično se lahko tvorijo prosti radikali in reaktivne kisikove oblike, ki vodijo do nastanka oksidativnega stresa (Hall, 2002).

2.3.2 Vstop in prenos Cd po rastlini

Kadmij vstopa v rastlino preko koreninskega sistema (Adriano, 2001). Del Cd se v prosti obliki Cd^{2+} veže na celično steno (Greger, 1999), na negativno nabite karboksilne in hidroksilne skupine na površini korenin (Seregin in Ivanov, 2001). Preostali Cd takoj vstopi v koreninske celice, kjer se večinoma nalaga v vakuole, ali pa potuje naprej po apoplastu od koreninske povrhnjice do endoderma, kjer suberizirani Kasparijevi trakovi preprečijo nadaljnji prehod preko celičnih sten (Seregin in Ivanov, 2001) in tam vstopi v koreninske celice kot Cd^{2+} preko različnih prenašalcev (Greger, 1999). Obstaja tudi

verjetnost, da lahko Cd^{2+} in Cd-kelati dosežejo ksilem ekstracelularno, po apoplastni poti v regijah korenine, kjer ni Kasparijevega traku, vendar več rezultatov govori v prid prenosu Cd po simplastu (Greger, 1999; Lux in sod., 2010). Kadmij se nato naloži v ksilem in potuje do nadzemnih delov rastline s transpiracijskim tokom, najverjetneje v kompleksih z organskimi kislinami in aminokislinami (Briat in Lebrun, 1999; Seregin in Ivanov, 2001) ali pa v prosti obliki Cd^{2+} (Briat in Lebrun, 1999).

2.3.3 Privzem in mehanizmi strupenosti Cd pri rastlinah

Hiperakumulacija kovin v rastlinskih tkivih je povezana s fiziološkimi in biokemijskimi prilagoditvami rastlin na nivoju privzema kovin v koreninski sistem, transporta kovin iz korenin v poganjke in sekvestracije ter detoksifikacije kovin v poganjkih oz. listih (Baker, 1987; Hall, 2002). Takšni prilagoditvi sta na primer usmerjena rast korenin v zemlji k področjem z večjo koncentracijo kovin (Haines, 2002; Whiting in sod. 2000) in povečana ekspresija transporterjev kovin v koreninah (Lasat in sod., 1996).

Takšne rastline imajo tudi učinkovit transport kovin po rastlini, saj se, kot že omenjeno, večinoma transportirajo v vezani obliki, t. j. v obliki stabilnih kompleksov, kot so vezava na prosti histidin (His-Zn), nikotianamin, organske kisline (Krämer in sod., 1996; Küpper in sod., 2004) ali S-ligande (Küpper in sod., 2004; Vogel-Mikuš in sod., 2010).

V poganjkih se kovine pri hiperakumulacijskih rastlinah kopičijo večinoma na poti transpiracijskega toka, v povrhnjici listov in žilah, manj pa v stebričastem in gobastem mezofilu, kar kaže na odlaganje strupenih kovin stran od občutljivih fotosintezno aktivnih tkiv (Seregin in Ivanov, 2001; Wójcik in sod., 2005). Na celičnem nivoju se kovine zaradi visoko učinkovitih mehanizmov razstrupljanja kopičijo v vakuolah, kjer se vežejo na različne ligande, kot so organske kisline, aminokisline, fitokelatini in metalotioneini ter s tem vzdržujejo nizko koncentracijo prostih kovinskih ionov v simplastu (Salt in Krämer, 2000; Clemens in sod., 2002, Vogel-Mikuš s sod., 2008). Poleg teh mehanizmov pa obstaja še omejeno nalaganje in transport kovin po floemu od listov do semen, s čimer se zaščiti naslednjo generacijo pred bremenom kovin (Lasat in sod., 1998; Wójcik in sod., 2005; Vogel-Mikuš in sod., 2007).

2.3.4 Prenašalci kovin

Za ohranjanje homeostaze elementov v rastlini so bistvenega pomena transportni proteini, ki posredujejo pri privzemu in transportu esencialnih elementov. Nekateri od njih so manj specifični in zaradi tega lahko v rastlino vstopijo tudi neesencialni

elementi. Takšni prenašalci so pogosto del večje družine transportnih proteinov, kar nudi prilagodljivost pri različnih okoljskih pogojih, saj je ta nujna za uspešen membranski transport v posamezna tkiva, celice in organele (Williams in Salt, 2009). Transport je drugače zelo specifičen proces in je najverjetneje eden od vzrokov za različno občutljivost rastlin na Cd (Leitenmaier in Küpper, 2011).

V rastlinskem genomu je zapis za obsežne družine transporterjev kovin, ki se med sabo razlikujejo v lastnostih kot so specifičnost, vzorec izražanja in namestitvev v celici v odvisnosti od prerazporejanja določene kovine po rastlini (Colangelo in Guerinot, 2006; Haydon in Cobbett, 2007). Takšne so družine ZIP (angl. zinc-regulated and iron-regulated transporter-like proteins), ki v splošnem prispevajo k homeostazi kovin s transportom kationov v citoplazmo, COPT (angl. high-affinity Cu uptake proteins), ki so tesno povezani z ravnovesjem Cu v rastlini (Sancenón in sod., 2004), NRAMP (natural resistance associated macrophage protein), ki posredujejo pri transportu različnih dvovalentnih ionov ter družine YSL (angl. yellow stripe-like), ki bi naj posredovali pri privzemu kovin, ki so kompleksirane s fitosiderofori ali nikotinaminom (Curie, 2000), kar pomeni vstop Cd v rastlino v obliki Cd-kelatov (Lux in sod., 2010).

Dokazano je že, da transporterji AtIRT1, TcZNT1/TcZIP4 (vsi iz družine ZIP) in AtNRAMP3 (iz družine NRAMP) lahko prenašajo Cd^{2+} (Pence in sod., 2000; Thomine in sod., 2000; Lux in sod., 2010). Pri *Arabidopsis thaliana* so do sedaj identificirali 15 različnih ZIP genov za transporterje, ki lahko prenašajo dvovalentne katione, kot so Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} in Cd^{2+} (Guerinot, 2000), prav tako pa so ugotovili, da je izražanje ZIP genov regulirano s statusom kovine v rastlini, ki pa je odvisen od vsebnosti kovine v okolju (Grotz in sod., 1998).

Pri mnogih rastlinah je toleranca na Cd povezana z akumulacijo le-tega v vakuolah (Lux in sod., 2010), v katere se Cd^{2+} lahko transportira preko tonoplasta z $\text{H}^+/\text{Cd}^{2+}$ antiporterji, kot sta ortologa AtCAX2 in AtCAX4 (AtCAX, *Arabidopsis thaliana* cation exchange; Korenkov in sod., 2007, 2009), $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPaza za težke kovine, kot je AtHMA3 (angl. *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) Heavy Metal Associated3 protein; Morel in sod., 2009) in s Cd-kelati z ABC (angl. ATP binding cassette) prenašalci, kot je AtMRP3 (angl. ATP-dependent MRP-like ABC transporter; Lux in sod., 2010). Domneva se, da lahko Cd iz vakuol izstopa s prenašalci NRAMP, kot sta ortologa AtNRAMP3 in AtNRAMP4 (*A. thaliana* NRAMP; Thomine in sod., 2003; Verbruggen in sod., 2009).

2.3.5 Vidni znaki strupenosti kadmija

Prvi viden znak strupenosti določene kovine pri rastlinah je zmanjšanje biomase. Zaviranje v rasti rastlin se lahko pojavi posredno, zaradi spremenjenega metabolizma ali zaradi neposrednih interakcij kovin s polisaharidi celične stene, pri čemer se zmanjša celična plastičnost (Seregin in Ivanov, 2001). Prav tako lahko hiperakumulacijske rastline kažejo zmanjšanje biomase ob izpostavljenosti kovini, saj uravnavanje njenih strupenih učinkov zahteva veliko energije (Lombi in sod., 2000). Zmanjšanje biomase pa je ob izpostavitvi različnim koncentracijam Cd odvisno od tolerance posamezne populacije rastlin. Tako se pri hidroponsko vzgojeni populaciji Ganges vrste *T. caerulescens* biomasa ni zmanjšala po 4-tedenski izpostavitvi 500 μM Cd, medtem ko se je pri populaciji Prayon, ki ima manjšo sposobnost akumulacije, biomasa znatno zmanjšala pri izpostavljenosti tako 250 μM kot 500 μM Cd, pri populaciji Ganges pa šele po 12-ih tednih izpostavitvi 100 μM Cd (Lombi in sod., 2000). Pongrac in sod., (2009) pa so nato pri primerjavi *T. caerulescens* (Ganges) in *T. praecox* in ugotovili, da so ob prisotnosti Cd v rastnem substratu, rastline obeh vrst akumulirale primerljive koncentracije Cd v poganjke, prav tako se je biomasa rastlin in poganjkov obeh vrst povečala, a se je rastlinam *T. praecox* ob tem zmanjšala koncentracija klorofila ter povečala koncentracija ne-proteinskih tiolov, kar nakazuje na dejstvo, da so manj tolerantne na Cd kot *T. caerulescens*.

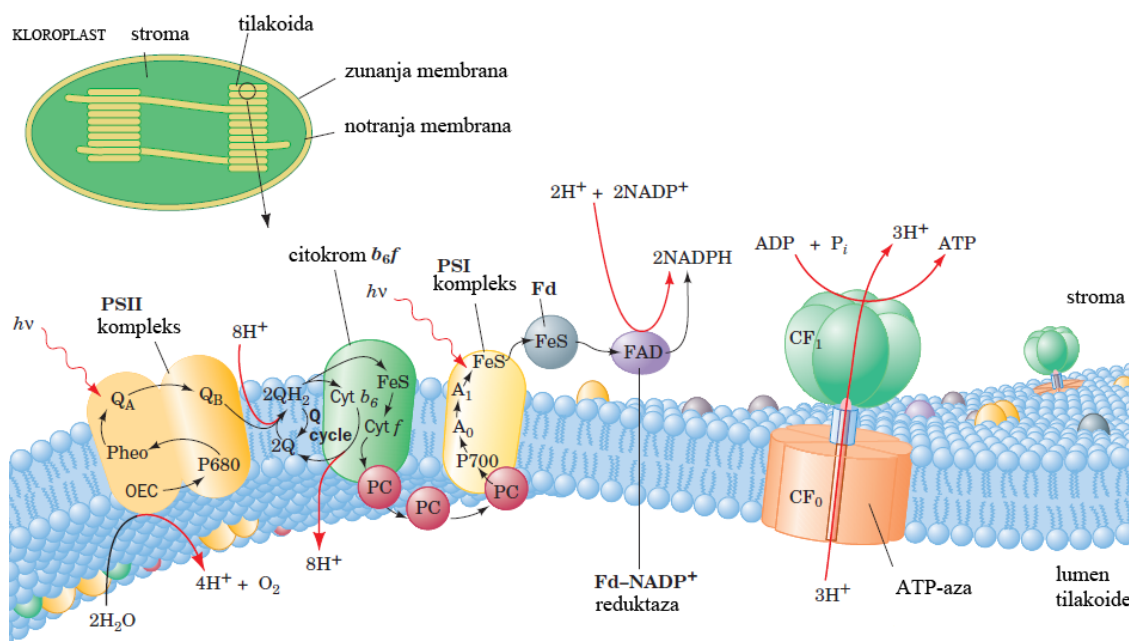
Strupeni učinki Cd se kažejo tudi v vijoličasti obarvanosti listov, ki pomeni akumulacijo antocianov, sušenju starejših listov v rozeti in v klorozah mlajših ter nekrozah starejših listov hidroponsko vzgojenih rastlin (Wójcik in sod., 2005). Akumulacijo antocianov v odvisnosti od izpostavitve Cd so dokazali že pri mnogih rastlinskih vrstah (Dai in sod., 2012; Mobin in Khan, 2007). Le-ta bi naj pomenila povečanje antioksidativne obrambe proti oksidativnemu stresu, ki ga sproži Cd (Dai in sod., 2012).

2.3.6 Vpliv kadmija na fotosintezo

Prisotnost Cd v rastlini lahko inhibira fotosintezo in njegov učinek se kaže v zmanjšanju vsebnosti klorofilov (Chl) in zmanjšanju razmerja Chl a/b, v inhibiciji PS I (fotosistem I) in PS II ter v dezorganizaciji Mn katalitičnega kompleksa za cepitev vode (oxygen-evolving kompleks, OEC) in svetlobnega žetvenega kompleksa II (light harvesting complex, LHC II) antenskega sistema (Joshi in Monhanty, 2004) (**Slika 2**). Natančneje, zmanjšano sintezo klorofilov povzroči interakcija Cd z SH- skupinami nekaterih encimov, zaradi katerih nato pride do akumulacije intermediatov v sintezi klorofila (Mishra in Dubey, 2005). Cd bi naj prav tako povzročil pomanjkanje Fe, kar tudi vpliva na biosintezo klorofila in na nekatere druge reakcije, povezane s fotosintezo (Mishra in Dubey, 2005).

Cd lahko prav tako neposredno deluje na sestavo in na strukturno-funkcijsko zvezo tilakoid (Joshi in Monhanty, 2004), kar bi naj bila osrednji vzrok za nadaljnje metabolne spremembe v rastlinah (Krupa, 1999). Poleg naštetega pa lahko Cd vpliva na zmanjšanje gostote listnih rež ter na njihovo prevodnost (Baryla in sod., 2001; Joshi in Monhanty, 2004).

Za preučevanje vpliva Cd na fotosintezo se uporablja meritev fluorescence, natančnejše meritve potencialne fotokemične učinkovitosti (F_v/F_m), kjer lahko ob prisotnosti Cd v rastnem mediju rastlin pride do inhibicije PS II, do katere pa ne pride v primeru kratkoročne izpostavitve rastlin Cd (Joshi in Monhanty, 2004). Tako se predpostavlja, da je v primeru izpostavitve Cd, ki značilno vpliva na zmanjšano rast rastlin in sintezo pigmentov, le nekoliko zmanjšana potencialna fotokemična učinkovitost, kar pomeni, da je vpliv Cd na PS II le sekundarnega pomena. Pomembne so namreč tudi majhne spremembe v odnosu strukture in funkcije tilakoid, ki jih določajo proste maščobne kisline, ki se sproščajo kot odgovor na vpliv Cd. Dokazano je namreč, da te proste maščobne kisline razgrajujejo proteine katalitičnega kompleksa in njihovo interakcijo z Mn^{2+} , Ca^{2+} in Cl^- (Joshi in Monhanty, 2004).



Slika 2: Shematska ponazoritev tilakoidne membrane in elektronske transportne verige. Sistem je sestavljen iz proteinskega kompleksa fotosistema II (PSII), citokroma b_6f , plastocianina (PC), proteinskega kompleksa fotosistema I (PSI). PSII vsebuje 4 Mn^{2+} ione, ki so vezani na proteine in sestavljajo Mn katalitični kompleks za cepitev vode (OEC, oxygen-evolving kompleks), ki veže 2 molekuli vode in povzroči nastanek kisika (prirejeno po Voet in Voet, 2010: 916).

Figure 2: A schematic presentation of the thylakoid membrane showing the components of its electron-transport chain. The system consists of three protein complexes: PSII, the cytochrome b_6f complex, and PSI. 4 Mn^{2+} are incorporated in PSII, and are bound to proteins and form oxygen-evolving complex (OEC), yielding O_2 (adapted after: Voet and Voet, 2010: 916).

2.3.7 Vpliv kadmija na mineralno prehrano rastlin

Kot že omenjeno, lahko presežek ali pomanjkanje makro in mikronutrientov znatno vplivata na metabolizem rastlin, saj se lahko spremenita vrsta in količina metabolitov (Williams in Salt, 2009). V naravi pa je pomanjkanje nekaterih mineralov mnogo večji problem od možnega pojavljanja le-teh v strupenih koncentracijah (Pilon in sod., 2009).

2.3.7.1 Vloga Mg, Ca, Fe, Mn in Zn v rastlini ter njihovo pomanjkanje

Mg je mobilen element in ima v rastlinah pomembno fiziološko in molekulsko vlogo, saj je komponenta molekule klorofila, kofaktor mnogih encimskih procesov povezanih s fosforilacijo in defosforilacijo, hidrolizo različnih komponent in strukturni stabilizator pri različnih nukleotidih. Glede na znane podatke bi naj bilo 15 do 30 % celotnega Mg v rastlini povezanega z molekulo klorofila, preostalih 70 do 85 % Mg pa naj bi bilo povezanega z njegovo vlogo kofaktorja v raznih encimskih procesih (Merhaut, 2006). Pomanjkanje Mg se na fiziološki ravni najprej pokaže v akumulaciji škroba v listih (Mehne-Jakobs, 1995), temu pa nato sledi zmanjšanje v rasti in zmanjšanem transportu ogljikovih hidratov iz listov do ponornih tkiv (Fischer in Bremer, 1993). Za tem se pojavijo kloroze starejših listov, ki se jo da pojasniti s spremembami v privzemu in prerazporeditvi Mg po rastlini. Pomanjkanje Mg se pokaže tudi pri sintezi in vzdrževanju proteinov v kloroplastih, saj lahko vodi v razpad proteinov in klorofilov v kloroplastih (Merhaut, 2006).

Ca ima pri višjih rastlinah različne vloge, ki se jih lahko razdeli na štiri glavna področja: interakcije z membranami, encimi, celičnimi stenami in fitohormoni. Ca^{2+} ioni v rastlini pomagajo vzdrževati strukturo membran, saj povezujejo fosfatne in karboksilatne skupine fosfolipidov in proteinov na površini membrane. Ca je tako ključni gradnik primarne celične stene, saj povezuje podenote v pektin (t.i. »egg-box« model). Več kot je prisotnega Ca, več navzkrižnih povezav se ustvari, s čimer se poveča čvrstost celične stene (Grant in sod., 1973). Za razliko od Mg^{2+} , je Ca^{2+} kofaktor manjšega števila encimov, prav tako pa se v citosolu nahaja v nizkih koncentracijah in se v večji meri sprošča iz vakuole po potrebi. Lokalno povečane koncentracije v citosolu namreč predstavljajo signal, ki sproži določen odgovor (npr. aktivacijo encimov, sproščanje veziklov, itd.) preko kalmodulinskega sistema, Ca prav tako sodeluje pri celični delitvi in podaljševanju celic in je povezan z delovanjem avksinov, ki vpliva na rahljanje celuloznih mikrofibril, ki so vpete v matriks, ki ga sestavljajo pektini in hemiceluloze. Pomanjkanje Ca se značilno kaže v rumeno-zelenem obarvanju zgornjega in temno zelenem obarvanju spodnjega dela poganjkov, saj je Ca slabo mobilen. Na nivoju celic pa pomanjkanje povzroči splošno zrušitev membran in zgradbe celične stene. V naravi

je takšno pomanjkanje Ca redko, a vseeno lahko pride do tega pojava pri napačni uporabi gnojil (Pilbeam in Morley, 2006).

Fe je nujno potreben za rast rastlin, hkrati pa je visoko reaktiven in toksičen, saj lahko nastopa kot Fentonov reagent. Rastline zato dobro regulirajo nivo Fe in vzdržujejo njegovo homeostazo ter takoj reagirajo ob njegovem pomanjkanju ali presežku (Morrissey in Gueriont, 2009). Fe lahko v rastlini spreminja valenčno stanje med Fe^{2+} in Fe^{3+} in zato z lahkoto tvori komplekse z različnimi ligandi. Kot komponenta hem-a ima pomembno vlogo pri fotorespiratornih reakcijah, prav tako pa ima bistveno vlogo pri sintezi klorofila. Protoporfirin je namreč prekursor hema, hkrati pa tudi prekursor klorofila, kar pomeni, da četudi Fe ni sestavni del klorofila, pomembno vpliva na njegovo biosintezo. Fe je tudi komponenta Fe-S proteinov, ki sodelujejo pri svetlobno odvisnih reakcijah fotosinteze. Feredoksin je vodotopen protein in je del PS I, ki zaradi visoko negativnega redoks potenciala omogoča prenos elektronov številnim prejemnikom (Römheld in Nikolic, 2006). Čeprav je v Fe zelo pogost element v zemeljski skroji, je njegova dostopnost za rastline nizka. Le-ta je namreč odvisna od redoks potenciala in pH zemlje, pri čemer je bolj dostopen rastlinam pri nižjem pH (Morrissey in Gueriont, 2009). Njegovo pomanjkanje v rastlini se značilno kaže kot pojav kloroz na listih, pri čemer ostanejo vene zelene, lamine med njimi pa porumenijo. Prav tako se pomanjkanje lahko kaže v morfoloških spremembah, natančneje v zmanjšanju kloroplastov (Römheld in Nikolic, 2006).

Mn leži v periodnem sistemu poleg Fe in ima zato tudi podobne kemijske lastnosti, prav tako pa ju v naravi pogosto najdemo skupaj. Mn se najpogosteje pojavlja v oksidacijskih stanjih +2, +4, +6 in +7. Mn ima v rastlini vlogo aktivatorja mnogih encimov, kot so dehidrogenaze, transferaze, hidroksilaze ter dekarboksilaze, ki so vpleteni v sintezo aminokislin in lignina. Najbolj pa je poznan po sodelovanju v redoks reakcijah v fotosintezni elektronski transportni verigi ter pri sproščanju O_2 v kloroplastih, zato že majhen primanjkljaj Mn povzroči inhibicijo fotosinteze. Pomanjkanje Mn se na videz kaže v tvorbi medžilnih kloroz pri mladih listih (Adriano, 2001) lahko pa tudi nekroz na listini lamini, ki se najprej pojavijo na listih srednje starosti (Humphries in sod., 2006).

Zn ima v rastlinskem metabolizmu pomembno vlogo, saj vpliva na aktivnost karbonske anhidraze in sintezo citokromov, encimi, ki jih aktivira Zn sodelujejo v metabolizmu ogljikovih hidratov, pri vzdrževanju integritete celičnih membran, sinteze proteinov, regulacije sinteze avksina ter celo tvorbe peloda (Hafeez in sod., 2013). Njegovo pomanjkanje se kaže v zmanjšani rasti rastlin, manjših listih in klorozah, ki se pojavijo med osrednjim rebrom lista in sekundarnimi listnimi venami (Storey, 2006).

Pomanjkanje tega minkronnutrienta ima negativne učinke na kvaliteto kmetijskih pridelkov, saj so takšne rastline bolj dovzetne za poškodbe zaradi visoke temperature in premočne svetlobe, poleg tega pa se poveča dovzetnost za glivne okužbe. Zn bi naj namreč vplival na kapaciteto rastline za privzem in transport vode po rastlini, v krajših obdobjih višjih temperatur ali slanostnega stresa pa pomaga zmanjševati negativne posledice (Hafeez in sod., 2013).

2.3.8 Posledice vpliva Cd na mineralno prehrano

Znano je, da kovine v tleh vplivajo na mineralno prehrano rastlin. V večini primerov prisotnost Cd v rastnem substratu neakumulacijskih rastlin negativno vpliva na privzem tako kationov (kot so K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} in Fe^{3+}) kot tudi anionov (NO_3^-), prav tako pa lahko ostali ioni znatno vplivajo na privzem kovin v različna rastlinska tkiva. Pomanjkanje esencialnih makroelementov nato ruši homeostatske procese, kar povzroča spremembe v koncentraciji in porazdelitvi esencialnih hranil in organskih komponent v rastlini (Seregin in Ivanov, 2001).

Pri hiperakumulacijskih rastlinah pa je do sedaj manj znanega o vplivu Cd na mineralno prehrano. Tako npr. vemo, da lahko ob prisotnosti Cd koncentracija Fe v listih upade (Küpper in Kochian, 2010), saj se Cd transportira večinoma preko Fe transporterjev iz družine IRT (Thomine in sod., 2000), kar pa vodi v pomanjkanje Fe in kot že omenjeno, posledično vpliva na fotosintezo (Nagajyoti in sod., 2010). Pri izpostavitvi sorodne vrste *T. caerulescens* kadmiju pa so zabeležili povečan privzem Mg, Ca in S ter zmanjšanje privzema Zn, Fe in Mn, najverjetneje zaradi tekmovanja pri transportu ali zaradi sprememb v regulaciji ekspresije genov za transportne proteine (Küpper in Kochian, 2010).

V nasprotju s pomanjkanjem mineralnih hranil, ki ga povzroči Cd, lahko npr. povišana koncentracija Mg zmanjša strupenost Cd, saj lahko več Mg v kloroplastih zaščiti klorofil pred vezavo Cd (Küpper in sod., 1996). Prav tako bi lahko povečan privzem Ca preprečil zamenjavo Ca s Cd v proteinih, ki bi lahko vplivala na inhibicijo fotosinteze. Povišana koncentracija S med izpostavljenostjo Cd bi lahko služila sintezi Cd in z žveplom bogatih ligandov, kot so glutation, metalotionini in fitohelatini (Cobbett in Goldsbrough, 2002).

Do sedaj je bilo večino študij o vplivu Cd na esencialne elemente pri hiperakumulatorjih narejenih na vrsti *T. caerulescens*, medtem ko pri sorodni vrsti *T. praecox*, hiperakumulatorju za Cd, vplivi Cd na privzem esencialnih elementov niso preučeni.

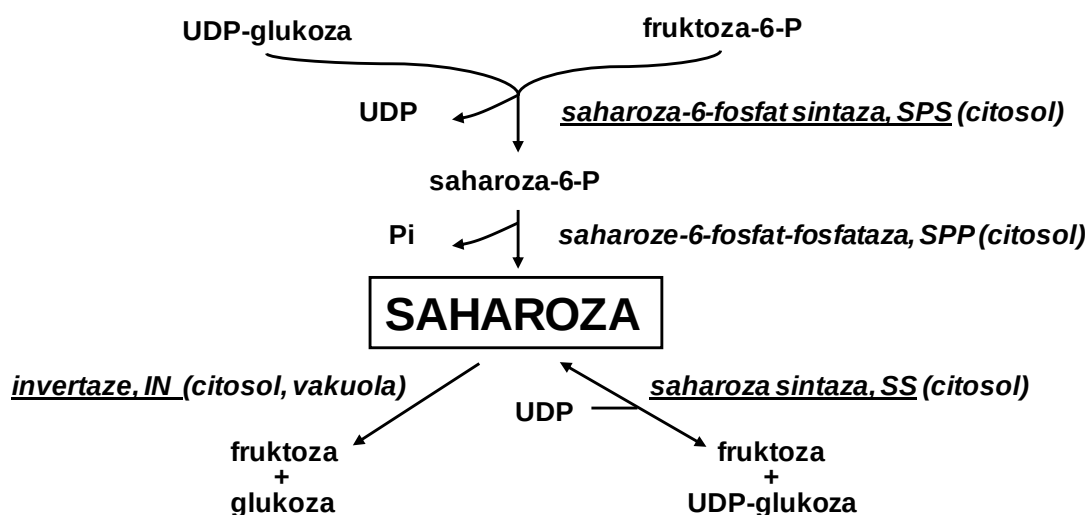
2.3.9 Vpliv kadmija na metabolizem ogljikovih hidratov

Pri procesu fotosinteze se ogljik vgrajuje v dve poglavitni obliki ogljikovih hidratov, saharozo in škrob. Tekom aktivne faze fotosinteze je substrat za biosintezo saharoze trioza fosfat, ki preide iz kloroplasta preko trioza fosfatnega transporterja. Prav tako se podnevi tvori škrob kot začasna založna oblika fiksiranega ogljika in se nalaga v škrobnih zrnih v kloroplastih, saharoza pa se medtem razporeja po rastlini od fotosinteznih do ponornih tkiv (Verma in Dubey, 2001; Zhou in sod., 2002). Vir za sintezo saharoze pa ponoči predstavlja glukoza, ki se mobilizira iz založnega škroba (Winter in Huber, 2000).

Stopnja transporta fotosintatov v posamezne ponorne organe je pomembna komponenta rasti in razvoja rastlinskih organov, saj je pomemben kriterij za določanje same produktivnosti rastlin (Choudhury in sod., 2010). Učinkovit metabolizem ogljikovih hidratov kot vira energije in ogljikovih skeletov, je osnovna preživitvena strategija rastlin, podvrženim različnim okoljskim vplivom, tudi izpostavitvi povišanim koncentracijam kovin. Status ogljikovih hidratov v drobnih koreninah je v tem primeru skoraj najpomembnejši, saj hitre spremembe v njihovem okolju zahtevajo sistematično obnovo in izgradnjo tkiv, kar je povezano s povečano potrebo po energiji in ogljikovih atomih (Stobrawa in Lorenc-Plucińska, 2007). Poleg že omenjene osrednje vloge najpomembnejšega transportnega sladkorja pri višjih rastlinah, ima saharoza tudi funkcijo signalne molekule. Osnovna regulatorna mehanizma za biosintezo pot saharoze pa sta stopnja asimilacije CO₂ in stopnja nastanka škroba (Winter in Huber, 2000).

Kot že omenjeno, lahko kovine, prisotne v citoplazmi, reagirajo tudi z organskimi komponentami, pri čemer prihaja do peroksidacije membran in s tem poškodb kloroplastov (Maruthi Sridhar in sod., 2005), oksidativne poškodbe pa poleg klorofila utrpijo tudi karotenoidi, encimi Kalvinovega cikla, ATP-sintetaza in drugi proteini (Dietz in sod., 1999). Poškodbe na membranah kloroplastov zaradi Cd prav tako vplivajo na metabolizem ogljikovih hidratov (Devi in sod., 2007). Zaradi prisotnosti Cd lahko tako prihaja do motenj pri transportu C3 sladkorjev iz kloroplastov v citoplazmo, kar lahko povzroči akumulacijo škroba v kloroplastih (Rufty in sod., 1988, Verma in Dubey, 2001), vzrok le-tega pa bi lahko bile morfološke spremembe listnega mezofila, kot sta bila povečanje in sprememba oblike kloroplastov pri kalicah redkvice, izpostavljenih Cd (Vitóra in sod., 2003, 2006). Med posredne vplive Cd pa štejemo še povzročen vodni stres, zapiranje listnih rež in s tem posledično pomanjkanje CO₂, kar negativno vpliva na stopnjo fotosinteze (Seregin in Ivanov, 2001).

Do motenj v metabolizmu ogljikovih hidratov lahko pride tudi zaradi že omenjenega vpliva Cd na proteine oz. v tem primeru na sodelujoče encime (shema delovanja encimov je predstavljena v **Sliki 3**). Tako so pomembni encimi, kot je saharoza-6-fosfat sintaza (SPS), ki katalizira sintezo saharoze v fotosintezno aktivnih tkivih ter v tkivih brez fotosinteze (Geigenberger in Stitt, 1993). Saharoza sintaza (SS) ter kisle invertaze razgrajujejo saharozo *in vivo*, a se njihovi razgradni produkti pomembno razlikujejo in vodijo nadalje do različnih metabolnih poti (Ranwala in Miller, 1998). Saharoza sintaza je citosolni encim, ki katalizira razgradnjo saharoze (saharoza + UDP $\leftrightarrow$ fruktoza + UDP-glukoza), jo je pa sposobna tudi sintetizirati (Geigenberger in Stitt, 1993). Invertaze pa so encimi z različnim pH optimumom delovanja, tako da se kisle invertaze nahajajo v vakuolah in katalizirajo hidrolizo saharoze (saharoza + H₂O $\rightarrow$ glukoza + fruktoza), prav tako kisle invertaze se nahajajo v celični steni, v citoplazmi pa lahko najdemo nevtralne ali bazične invertaze (Tymowska-Lalanne in Kreis, 1998; Winter in Huber, 2000; Van den Ende in sod., 2002; Ciereszko, 2009).



Slika 3: Shema pretvorbe saharoze in sodelujočih encimov. UDP-uracil difosfat, Pi-fosfatna skupina

Figure 3: A scheme of sucrose transformation with corresponding enzymes. UDP-uracil-diphosphate, Pi-phosphate group.

Poleg kovin lahko tudi ostale oblike stresa iz okolja vplivajo na metabolizem ogljikovih hidratov. Tako so zabeležili povečano vsebnost topnih sladkorjev zaradi slanosti (Dubey, 1997), vodnega stresa (Foyer in sod., 1998) in nizkih temperatur (Hurry in sod., 1995). V teh primerih je akumulacija sladkorjev najverjetneje imela vlogo regulacije notranje osmolarnosti in zaščite biomolekul in membran (Sinniah in sod., 1998).

Po nam znanih podatkih še ni bilo narejene študije, ki bi preučila vpliv Cd na metabolizem ogljikovih hidratov pri hiperakumulacijskih rastlinah in zato ni znano, ali

in kako Cd vpliva na ta segment rastlinskega metabolizma in če vpliva, kakšne so potem posledice.

2.4 PREUČEVANJE STRUPENOSTI KADMIJA PRI RASTLINAH

Pretekle raziskave na hiperakumulacijski vrsti *Thlaspi praecox* so bile usmerjene predvsem v študije mehanizmov akumulacije in tolerance na kovine na tkivnem nivoju z uporabo modernih fizikalnih metod za kvantifikacijo privzema kovin na organskem nivoju ter kvantifikacijo in hkratno lokalizacijo kovin, kot je metoda mikro protonsko inducirane emisije rentgenskih žarkov z visokoenergijskim fokusiranim žarkom (micro-PIXE), pri čemer se je omenjene pojave študiralo predvsem na rastlinah nabranih v naravnem okolju (Vogel-Mikuš in sod. 2006, 2007, 2008a, b).

Omenjene raziskave je potrebno dopolniti s kontroliranimi študijami interakcij med kovinami in esencialnimi elementi ter metaboliti na tkivnem in celičnem nivoju pri rastlinah, za kar imamo na voljo nekaj sinhrotronskih metod, ki se šele začenejo uveljavljati, saj so težje dostopne zaradi visokih obratovalnih stroškov in kratkih odobrenih merilnih časov.

2.4.1 Vzgoja rastlin za preučevanje privzema in porazdeljevanja kovin v rastlinskih tkivih

Pri študijah privzema kovin v rastline v naravnem okolju se srečujemo s težavami, kot sta večelementna kontaminacija (poleg Cd tudi Pb in Zn) in velika nehomogenost tal, kar ima za posledico veliko variabilnost koncentracij elementov v tleh in nato v rastlinah ter vpliv na fiziologijo rastlin (Baker in sod., 1994; Vogel-Mikuš in sod., 2005). Za sprejem Cd iz tal je zelo pomemben tudi pH tal, saj lahko znižanje pH vpliva na njegovo topnost in mobilnost (Seregin in Ivanov, 2001). Pomemben dejavnik, ki prav tako lahko vpliva na končni rezultat analize kovin v rastlinskih tkivih rastlin, nabranih v naravi, je površinska kontaminacija rastlinskega materiala. Delci prsti in prašni delci, ki vsebujejo kovine, se namreč vežejo na površino rastlinskih organov, poleg tega pa lahko vstopajo v liste tudi preko listnih rež (Reeves in Baker, 2000; Adriano, 2001). Da se izognemo omenjenim vplivom, je potrebno razmisliti o primernejšem načinu vzgoje rastlin. Najprimernejša je tako vzgoja rastlin v nadzorovanem okolju, kot so rastne komore ali rastlinjaki, z gojenjem na hidroponiki, s čimer lahko poljubno spreminjamo sestavo ter določamo in vzdržujemo pH hranilne raztopine (pripravljene po Tolra in sod., 1996).

Eden izmen načinov vzgoje rastlin je gojenje le-teh v hranilni raztopini z ali brez uporabe dodatnega organskega ali anorganskega medija (pesek, glinene kroglice, vermikulit, kamena volna, perlit, šota, kokosova vlakna ali žagovina). Pri uporabi samo vodnega sistema (hidroponika), pa korenine nimajo opore od nobenega izmed organskih ali anorganskih podpornih medijev (Jensen, 1999). Prednosti gojenja rastlin v hidroponskem sistemu so sledeče: natančno lahko določimo mineralno sestavo hranilne raztopine, nadzorujemo lahko pH in električno prevodnost same raztopine, opazujemo lahko interakcije med podobnimi elementi ter lahko preučujemo absorpcijo anionov ter kationov (Sonneveld in Voogt, 2009). Metoda hidroponskega gojenja rastlin je torej zelo uporabna in se že izvaja pri različnih raziskavah v rastlinski biologiji, kot so preučevanje rastlinske prehrane, vpliva težkih kovin, ugotavljanje elementov v pomanjkanju, ugotavljanje povezanosti (antagonizem ali sinergizem) med različnim hranili, preučevanje abiotskega stresa ter delovanja korenin in njihove anatomije (Jones, 1982; Jones, 1999; Torabi in sod., 2012).

V hranilno raztopino se kovine vedno dodaja v obliki topnih kovinskih soli. V raziskavah privzema, transporta in kompartmentizacije Cd, se po navadi uporablja kadmijevo sol v obliki CdSO_4 (Küpper in sod., 2004; Ebbs in sod., 2009; Pongrac in sod., 2009), CdCl_2 (Tolrà in sod., 2006) ali $\text{Cd}_2(\text{NO})_3$ (Isaure in sod., 2006). Zavedati pa se je potrebno, da dodatek kovinskih soli v hranilno raztopino ne spremeni le koncentracije kationov, temveč tudi koncentracijo anionov, čemur pa se pri preučevanju mehanizmov privzema in tolerance kovin do zdaj ni posvečalo veliko pozornosti. Ker o tem še ni zbranih podatkov, smo se odločili preučiti razlike v odzivu rastlin na organizemskem, tkivnem, celičnem in sub-celičnem nivoju pri izpostavitvi ranega mošnjaka dvema različnima oblikama Cd soli - CdSO_4 in CdCl_2 .

2.4.2 Metode za preučevanje privzema in porazdeljevanja kovin v rastlinskih tkivih

Za preučevanje strupenosti kadmija imamo na voljo mnogo različnih metod. Ločimo metode za skupne oz. »bulk« analize vzorcev, kot so standardna energijsko disperzijska rentgensko fluorescenčna analiza (angl. energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry oz. EDXRF), metoda rentgenske fluorescence s popolnim odbojem (angl. total reflection X-ray fluorescence oz. TXRF) in atomska absorpcijska spektrometrija (angl. atomic absorption spectrometry oz. AAS).

Poleg teh metod obstajajo mnogo bolj natančne metode za vizualizacijo in preučevanje prostorske porazdelitve posameznih elementov v bioloških vzorcih. Navadno se uporabljajo mikro-analizne metode, ki temeljijo na rentgenski fluorescenci, pri tem pa

se kot vir vzbujanja atomov v vzorcu uporablja nabite delce (elektroni, protoni ali težji delci) ali fotone (sinhrotronsko sevanje) (Khan in sod., 1984; Vázquez in sod., 1992; Frey in sod., 2000; Küpper in sod., 2000; Cosio in sod., 2005; Wójcik in sod., 2005; Isaure in sod., 2006; Vogel-Mikuš in sod., 2008a, b; Pongrac in sod., 2010). Takšni metodi sta protonsko inducirana emisija rentgenskih žarkov z visokoenergijskim fokusiranim žarkom (angl. particle induced micro-X-ray fluorescence emission oz. mikro-PIXE) in sinhrotronska mikro rentgenska spektrometrija (angl. synchrotron-based micro-X-ray fluorescence oz. mikro-XRF) (Vogel-Mikuš in sod., 2007, 2008a, b, 2010; Kaulich in sod., 2009).

Za še podrobnejše analize, ki nam razkrijejo kompleksacijo in kemijsko okolje posameznega elementa v bioloških tkivih pa se uporabljata metodi bližnje strukture rentgenskih absorpcijskih robov (angl. X-ray Absorption Near-Edge Structure ali XANES) in podaljšane fine strukture rentgenskih absorpcijskih robov (angl. Extended X-ray Absorption Fine Structure oz. EXAFS) (Vogel-Mikuš in sod., 2010, 2012).

Za oceno prostorske porazdelitve osnovnih organskih molekularnih gradnikov (proteini, ogljikovi hidrati) v celicah različnih tkiv pa se uporablja infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo s sinhrotronskim virom svetlobe (angl. synchrotron radiation-based Fourier transform infrared spectroscopy oz. SR-FTIR; Regvar in sod., 2013).

2.4.3 Metode za določanje skupnih koncentracij elementov v rastlinskih organih

2.4.3.1 Rentgenska fluorescenčna spektrometrija (XRF)

Rentgenska fluorescenca (RF) nastane z vzbujanjem (ionizacijo) atomov z rentgensko svetlobo (rentgenski žarki ali žarki X), ki so elektromagnetno valovanje z valovno dolžino v območju med 80 nm (okoli 15 eV) in 0,001 nm (okoli 1,2 MeV). Ker ima vsak element različne vezavne energije za posamezna stanja elektronov v različnih lupinah (K, L, M), se pri procesu nastanka rentgenske fluorescenca izsevajo za vsak element karakteristični rentgenski fotoni, na podlagi katerih lahko med seboj ločimo posamezne elemente (Markowicz, 1993).

2.4.3.2 Metoda standardne energijsko disperzijske rentgenske fluorescenčne analize (EDXRF)

Prednost metode EDXRF je preprosta priprava vzorca (Vogel-Mikuš in sod., 2010). Merilni sistem je v osnovi sestavljen iz radioizotopskega vira, energijsko disperzijskega

detektorja in več-kanalnega analizatorja. Kot vire sevanja smo uporabljali izotope Fe-55, Cd-109 ali Am-241, od katerih vsak seva na določenem energijskem nivoju in zato lahko učinkovito vzbuja atome elementov v omejenem obsegu (Nečemer in sod., 2011).

2.4.3.3 Metoda rentgenske fluorescence s popolnim odbojem (TXRF)

Metoda rentgenske fluorescence s popolnim odbojem je zaradi večje občutljivosti zlasti primerna za meritve kemijsko razklopljenih trdnih vzorcev oz. njihovih sušin nanesenih na kvarčne nosilce (Vogel-Mikuš in sod., 2010). Pri metodi TXRF se kot vir rentgenske svetlobe uporablja rentgensko cev, vendar je vpadno sevanje usmerjeno pod izredno majhnim kotom ($<1,8$ rad) in vzbuja fluorescenco le v vzorcu, v rentgenskem spektru se tako močno zmanjša ozadje na podlagi in je občutljivost tehnike precej boljša kot pri EDXRF (nekaj velikostnih razredov) (Kump, 1997, 2005).

2.4.3.4 Atomska absorpcijska spektrometrija (AAS)

Pri metodi AAS se izkorišča pojav atomske absorpcije. Energijo se pri tej metodi atomu doda v obliki visoke temperature, ki jo daje plamen ali plazma. Izbira specifičnega izvira svetlobe ter izbira valovne dolžine nam tako omogočata natančno določitev posameznih elementov (PerkinElmer, 2000).

Vse od zgoraj naštetih metod se pogosto uporablja pri preučevanju ranega mošnjaka, saj nam večelementne analize homogeniziranih rastlinskih vzorcev nudijo osnovne informacije o privzemu posameznih esencialnih in neesencialnih elementov v rastlino oz. vsebnost le teh v ravnem substratu (Vogel-Mikuš in sod., 2005; Pongrac in sod., 2009; Koren in sod., 2013).

2.4.4 Metode za določanje porazdeljevanja elementov na tkivnem in celičnem nivoju

Preučevanje porazdeljevanja kovin in njihovih vezavnih oblik v rastlini je bistvenega pomena za razumevanje fiziologije hiperakumulacije in tolerance na kovine. Nas zanima predvsem porazdelitev v listnih tkivih povrhnjice, mezofila in žile. Razumljivo je namreč, da je tudi mezofil lista udeležen pri hiperakumulaciji in toleranci, saj je to tkivo v listu obsežno in je umeščeno med žilno tkivo, ki zaradi nalaganja kovin v ksilem predstavlja izvor kovin v listu, in epidermalne celice (Ebbs in sod., 2009).

2.4.4.1 Protonsko inducirana emisija rentgenskih žarkov z visokoenergijskim fokusiranim žarkom (mikro-PIXE)

Metoda mikro-PIXE je elementno in krajevno občutljiva metoda za lokalizacijo in kvantifikacijo različnih elementov v bioloških vzorcih na tkivnem in celičnem nivoju (Vogel-Mikuš, s sod. 2008). Pri tej metodi se atome vzbuja s hitrimi protoni, ki izbijajo elektrone iz notranjih lupin atoma (Small, 1993; Maenhaut in Malmqvist, 1993). Z meritvijo energijskih spektrov izsevanih karakterističnih rentgenskih žarkov dobimo kvantitativne elementne mape posameznega vzorca, kot rezultat meritve energije protonov, ki so preleteli vzorec, pa sliko porazdelitve debeline vzorca, z metodo ionske presevalne mikroskopije (angl. Scanning Transmission Ion Microscopy, STIM) (Vogel-Mikuš in sod., 2009).

2.4.4.2 Sinhrotronska mikro rentgenska spektrometrija (SR mikro-XRF)

Mikro rentgenska fluorescenca osnovana na sinhrotronski svetlobi je edinstvena metoda, ki omogoča mapiranje porazdelitve elementov na tkivnem, celičnem in subceličnem nivoju. Pri tej metodi uporabljamo fokusirano sinhrotronsko monokromatsko svetlobo in z energijsko disperzijskim spektrometrom merimo intenziteto posameznih rentgensko fluorescenčnih karakterističnih črt, ki jih vzbuja v vzorcu (SR-mikro-XRF) (Vogel-Mikuš in sod., 2012). Metoda je zelo uporabna tudi zato, ker poleg kemijske informacije, ki temelji na mikro-XRF, torej mapiranja porazdelitve elementov na tkivnem, celičnem in subceličnem nivoju, z rentgenskim mikroskopom na žarkovni liniji hkrati pridobimo tudi informacijo o morfologiji vzorca (Kaulich in sod., 2011). To je pri rastlinskih vzorcih seveda možno le v nizkem energijskem območju (do 10 keV), saj so pri višjih energijah vzorci rastlinskega materiala prosojni za rentgenske žarke, pri pogoju, da je v področju za vzorcem vgrajena CCD kamera oz. fotopomnoževalka (Vogel-Mikuš in sod., 2012).

2.4.5 Metode za določanje vezavnih oblik Cd v listih na tkivnem in celičnem nivoju

2.4.5.1 Rentgenska absorpcijska spektrometrija

Pri metodah rentgenske absorpcijske spektrometrije merimo absorpcijski koeficient μ v odvisnosti od energije fotonov monokromatske rentgenske svetlobe, pri čemer najlažje in najbolj učinkovite meritve dosežemo s pomočjo sinhrotronske svetlobe (Arčon, 2008). V primeru, da je koncentracija preiskovanega elementa v vzorcu velika, meritve izvajamo v transmisijem načinu, če pa je koncentracija preiskovanega elementa v vzorcu majhna oz. je tanek vzorec nanesen na debelo podlago, pa uporabimo fluorescenčni način merjenja (Newville, 2004).

2.4.5.2 Metodi EXAFS in mikro-XANES

Visokoločljivostna rentgenska absorpcijska spektroskopija s svetlim sinhrotronskim virom rentgenskega sevanja je močno raziskovalno orodje za preučevanje atomske in molekulske strukture materialov (Wong in sod., 1984; Vogel-Mikuš in sod., 2010, 2012). Pri tej metodi merimo absorpcijski koeficient v odvisnosti od energije. Strukturo, ki je v energijskem območju do približno 50 eV od absorpcijskega roba imenujemo bližnja struktura absorpcijskega roba oz. XANES. Drobna struktura, ki se razteza približno od 50 eV do 1000 eV nad robom, pa se imenuje podaljšana robna struktura rentgenskih robov oz. EXAFS (Koningsberger in Prins, 1988; Stoehr, 1992).

Za analizo signala EXAFS uporabimo Fourierjevo transformacijo, s katero lahko ločimo prispevke posameznih lupin sosedov ter tako izvemo informacije o vrsti sosednjih atomov ter njihovem odmiku od centralnega atoma (Vogel-Mikuš in sod., 2012). Iz strukture XANES lahko dobimo informacije o valenčnem stanju atoma, tipu ligandov in simetriji koordinacijske okolice atoma. Obliko absorpcijskega spektra v okolici absorpcijskega roba lahko uporabljamo kot prstni odtis (»fingerprint metoda«), v katerem prepoznavamo tipične vezavne oblike (Wong in sod., 1984). Pri sinhrotronskem viru rentgenskega sevanja lahko rentgenske žarke s posebno optiko fokusiramo na premer velikosti manj kot 1 μm . Meritve mikro-XANES so torej meritve XANES z mikro-žarkom (Kanngießer in sod., 2004), kar pomeni, da lahko preverimo vezavne oblike določenega elementa v različnih delih celice (celični in subcelični nivo) (Vogel-Mikuš in sod., 2012).

Raznovrstne ligande, ki neposredno vežejo kovine ali kako drugače sodelujejo v procesu razstrupljanja pri hiperakumulatorjih, se je že preučevalo na različne načine (Tolrà in sod., 1996; Küpper in sod., 2004; Mari in sod., 2006; Callahan in sod., 2007), vendar se jih je določalo večinoma na homogeniziranih vzorcih rastlinskih organov z uporabo različnih metod ekstrakcije, pri katerih bi lahko prišlo do razgradnje ali pretvorbe različnih celičnih komponent oz. sprememb v njihovi koncentraciji, ob tem pa ni bilo mogoče določiti natančno, v katerih celičnih strukturah (celična stena, vakuola ali citoplazma) se nahajajo kompleksi s kovino (Mari in Lebrun, 2005). Za obhod teh težav je najprimernejša čim hitrejša ohranitev materiala, kot je hitra zamrznitev, ki ji sledi nadzorovana liofilizacija. Za kvalitetne meritve na celičnem nivoju pa se v zadnjem času razvijajo še metode za merjenje vzorcev v zamrznjenem hidriranem stanju (Vogel-Mikuš in sod., 2012).

2.4.6 Metode za določanje sestave organske matrike poganjkov na organskem in tkivnem nivoju

2.4.6.1 Infrardeča spektroskopija (IR)

Infrardeča svetloba (IR) je svetloba valovne dolžine med 0,7 μm in 1 mm, pri uporabi infrardeče oz. vibracijske spektroskopije pa uporabljamo IR svetlobo v osrednjem območju (mid-IR) od 2,5 do 25 μm (oz. v recipročnih centimetrih s pretvorbo v $[\text{cm}^{-1}] = 1/\lambda [\text{cm}]$; 400 – 4000 cm^{-1}), pri čemer energija fotonov vzbuja nihanja atomov v molekulah (Dumas in sod., 2006). S pridobitvijo IR spektra iz rastlinskega vzorca lahko nato ugotovimo majhne razlike v makromolekulski sestavi vzorcev, kot so ogljikovi hidrati, proteini, lipidi in pektini celične stene (Surewicz in sod., 1993; McCann in sod., 1992).

2.4.6.2 Metoda oslabiljene popolne refleksije (ATR)

Pri ATR načinu meritve vzorec namestimo na kristal z lomnim količnikom, ki je večji od lomnega količnika vzorca, nato pa nanj usmerimo IR žarek pod kotom, ki omogoči popolni odboj žarka od kristala. Molekule v vzorcu absorbirajo IR svetlobo, izsevan žarek z manjšo energijo pa po nekaj odbojih zapusti kristal in se usmeri na detektor (Stuart, 2004).

2.4.6.3 Sinhrotronska infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (SR-FTIR)

Z združitvijo klasičnega FTIR spektrometra, mikroskopa in svetlega vira svetlobe, kot je sinhrotronska svetloba, lahko preučujemo prostorsko spreminjanje biokemijske zgradbe (imaging) celo na tkivnem nivoju (Dumas in sod., 2006). Z metodo sinhrotronske infrardeče spektroskopije s Fourierjevo transformacijo (SR-FTIR) lahko določimo že majhne spremembe makromolekulske sestave v rastlinskih vzorcih, kot so spremembe pri ogljikovih hidratih, proteinih, lipidih in pektinih celične stene (Surewicz in sod., 1993; McCann in sod., 1992). Zadnje čase se ta metoda v raziskavah rastlinske fiziologije uporablja za določanje natančne strukture določenih sekundarnih metabolitov (Ivanova in Singh, 2003), pri preučevanju Cd stresa na rastline pa ta metoda pomeni nov pristop (Wei in sod., 2009; Regvar in sod., 2013), še posebej informativni pa so lahko podatki o prostorski porazdelitvi biomolekul na tkivnem in celičnem nivoju.

Edina do sedaj opravljena raziskava na *T. praecox*, kjer se uporabilo metodo SR-FTIR, je bila narejena na vzorcih rastlin iz okolja (Regvar in sod., 2013), zato želimo dopolniti to znanje s primerjavo kontrolnih rastlin, ki bi rasle v hranilni raztopini brez Cd, z

rastlinami, izpostavljenimi Cd. Tako bi lahko ugotovili natančneje, kakšen je vpliv Cd na porazdelitev biomolekul v listnem tkivu, predvsem nas zanima vpliv na fotosintezno aktivna tkiva, kot je stebričasti mezofil.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZGOJA RASTLIN

3.1.1 Vzgoja kalic iz semen

Semena smo pobrali iz rastlin *T. praecox* na področju P3 v Žerjavu v severno-vzhodni Sloveniji (Vogel-Mikuš in sod., 2005). Zrela semena smo posejali v vermikulit (Agra-vermiculite) in jih zalivali s prilagojeno hranilno raztopino (HR) za zalivanje (po Tolrà in sod., 1996), ki je 2-krat bolj koncentrirana od hranilne raztopine, ki se uporablja za hidroponiko (hidroponska raztopina; v nadaljevanju HR).

3.1.2 Prenos v hidroponsko raztopino in rastni pogoji

Ko so bile rastline na rastni stopnji, kjer so imele razvitih 4 do 5 listov (po približno 30-ih dneh) (Krämer in sod., 1997), smo jih prenesli v prilagojeno HR (po Tolrà in sod., 1996), ki je vsebovala 3 mM KNO₃, 1 mM NH₄H₂PO₄, 2 mM Ca(NO₃)₂, 0,5 mM MgSO₄, 66 µM FeEDTA, 50 µM KCl, 46 µM H₃BO₃, 9 µM MnSO₄, 1,5 µM CuSO₄, 0,14 µM (NH₄)Mo₇O₂₄ in 15 µM ZnSO₄. pH hranilne raztopine je bil uravnan na vrednost 6,5 in je bil nadzorovan tedensko.

Rastline so rastle v rastni komori na hidroponskem sistemu z neprestanim prepihanjem zraka. Po 14-ih dneh adaptacije smo začeli rastline izpostavljati spremenjenim rastnim pogojem (sprememba hranilne raztopine). Hidroponsko raztopino za rastline smo zamenjali vsakih 7 dni ter jo ves čas prepihovali s pomočjo zračne črpalke (hidroponski sistem oz. hidroponika).

3.1.3 Gojenje rastlin v rastni komori in v rastlinjaku

Kalitev semen, rast kalic in poskusi so bili izvedeni v rastnih komorah Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin, Oddelka za biologijo (UL, Biotehniška fakulteta) z 16/8 dnevno/nočno ritmiko pri jakosti svetlobe 160 µmol m⁻² s⁻¹, temperaturi 21/19 °C in relativni zračni vlagi 50 do 60 %.

Za preučevanje vpliva CdSO₄ na metabolizem ogljikovih hidratov pri ranem mošnjaku, smo rastline vzgojili in nato izpostavili Cd v okviru Laboratorija za fiziologijo rastlin (Groupe de Recherche en Physiologie Végétale) na Earth and Life Institute v okviru Université catholique de Louvain, Louvain-La-Neuve, v Belgiji, kjer so bile rastline vzgojene iz semen v rastni komori pri podobnih pogojih rasti, kot je opisano zgoraj,

tekem adaptacije in samega poskusa pa so rastle v neklimatiziranem rastlinjaku s kombinirano naravno in umetno svetlobo.

3.2 DOLOČANJE BIOMASE IN PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA ZA NADALJNJE ANALIZE

Po končanem poskusu smo rastline ločili na korenine in nadzemni del – vegetativni poganjek (v nadaljnjem tekstu poganjek), sprali najprej pod tekočo in nato še z bidestilirano vodo. Korenine in poganjke smo stekali (sveža biomasa, SvM) in hitro zamrzili v tekočem dušiku. Zamrznjene vzorce smo nato liofilizirali (liofilizer Alpha Christ) oz. posušili v pečici pri 60 °C ter stekali (suha biomasa, SM). Za potrebe nekaterih analiz pa smo do uporabe pustili vzorce na -20 ali -80 °C.

Liofiliziran oz. v pečici posušen rastlinski material smo s pomočjo tekočega duška strli do finega prahu. Prah smo do uporabe shranili v označenih nepredušno zaprtih lončkih pri sobnih pogojih zračne vlage in temperature. Zamrznjen material smo prav tako strli s pomočjo tekočega dušika, a v hlajeni terilnici, tako da se material med trenjem ni odtajal.

3.2.1 Priprava liofiliziranih rezin

Pri preučevanju lokalizacije kovin v rastlinskih tkivih je bistveno, da tekom priprave poskušamo ohraniti porazdelitev elementov natančno takšno, kot se pojavlja v nativnem stanju (*in vivo*) (Vogel-Mikuš in sod., 2009). Ker to lahko dosežemo s hitrim zamrzovanjem vzorcev (5 x 5 mm velike koščke izbranega tkiva), smo za zamrzovanje uporabili tekoči propan hlajen s tekočim dušikom ter zamrzovalni kriofiksant (Tissue Freezing Medium, TFM™). Pri temperaturi med -20 in -35 °C smo v kriomikrotomu narezali tkivo na zeleno debelino rezin (10-60 µm) ter jih nato liofilizirali do suhega ter do uporabe shranili v eksikatorju. Metoda priprave rastlinskih vzorcev je povzeta po Schneider in sod. (2002), s priredbo Vogel-Mikuš in sod. (2008, 2009).

3.3 BIOKEMIJSKE MERITVE

3.3.1 Meritve fotokemične učinkovitosti

Fotokemično učinkovitost rastline lahko določamo preko fluorescence klorofila *a* v PS II (Adams in Demmig-Adams, 2004). Le-to smo pomerili *in situ* na 3 rastlinah (na vsaki rastlini pomerjeni 4 listi, skupno 12 meritev/tretma) vsakega tretmaja z uporabo fluorometra (OS-500, Optisciences, Tyngsboro, ZDA) po metodi opisani v Mechora in

sod. (2011), kjer smo liste osvetlili s saturacijskim pulzom bele svetlobe (PPFD $9000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $t=0,8 \text{ s}$). Fotokemična učinkovitost (Y oz. »yield«) je podana z razmerjem F_v/F_m . Meritve minimalne (F_0) in maksimalne (F_m) fluorescence klorofila temotno adaptiranega vzorca smo izvedli tako, da smo s ščipalko zatemnili list za vsaj 30 min. Potencialno in dejansko fotokemično učinkovitost smo izrazili v relativnih enotah (Schrieber in sod., 1995).

3.3.2 Določanje koncentracije in vsebnosti klorofilov in antocianov v poganjkih

Absorpcijo klorofila a (Chl a), klorofila b (Chl b) in karotenoidov smo določili fotometrično v ekstraktih liofiliziranih in homogeniziranih poganjkov, pripravljenih z 80-odstotnim acetonom po Monni in sod. (2001) ali v ekstraktu homogeniziranih svežih (predhodno zamrznjenih na -80°C) vzorcev, pripravljenih z 80-odstotnim acetonom po Lichtenthaler (1987), njihovo koncentracijo pa izračunali po Lichtenthaler in Buschmann (2001). Rezultate smo nato predstavili kot vsebnosti Chl a, Chl b oz. skupnih klorofilov Chl a+b (vse v $\text{mg g}^{-1} \text{ SM}$).

Na dan pospravljanja poskusa smo si ogledali liste rastlin in zabeležili možno vijolično obarvanost listov. V liofiliziranih in uprašenih vzorcih poganjkov smo po metodi povzeti po Lindoo in Caldwell (1978) določili vsebnost antocianov tako, da smo ekstrahirali 20 mg uprašenih liofiliziranih poganjkov v 2 ml raztopine metanol:koncentrirana HCl=99:1 in pustili 48h v hladilniku v temi. Vzorec smo nato centrifugirali in pomerili absorpcijo v supernatantu pri 530 in 657 nm. Koncentracijo antocianov smo določili po tako, da smo od absorbance pri 530 nm odšteli eno tretjino absorbance pti 657 nm in rezultate predstavili v relativnih enotah $\text{g}^{-1} \text{ SM}$ ($\text{RE g}^{-1} \text{ SM}$).

Zaradi možnega vpliva biomase rastlin na koncentriranje ali redčenje klorofilov in antocianov, smo koncentracije le-teh podali tudi kot vsebnosti v rastlini, izražene kot mg rastlino^{-1} pri klorofilih ter kot relativne enote rastlino^{-1} (RE rastlino^{-1}) pri antocianih.

3.3.3 Analize sladkornega metabolizma

3.3.3.1 Določanje celotnih topnih sladkorjev

Ekstrakt za določanje sladkorjev smo pripravili iz 500 mg svežega materiala (do analize zamrznjenega na -20°C), ki smo ga strli s tekočim dušikom, zmešali s 5 ml 70 % etanola ter pustili 5 min na ledu. Vzorce smo centrifugirali v ohlajeni centrifugi (4°C) 10 min pri 8000 rpm, nato pa prefiltrirali. Zbranemu ekstraktu smo dodali ohlajen 70 %

etanol, vorteksirali in pustili 5 min na ledu. Nato smo ponovili centrifugiranje z istimi nastavitvami ter zbrali supernatant.

Za analizo smo 200 μL vzorca (po tri ponovitve) dodali 1 ml raztopine antrona (0,5 g antrona (9,10-dihidro-9-oksoantracen), 250 ml konc. H_2SO_4 in 12,5 ml destilirane vode) in inkubirali 10 min pri 100 $^{\circ}\text{C}$ v vodni kopeli. Za zaustavitev reakcije smo vzorce dali na led, jih vorteksirali in pomerili absorpcijo pri 625 nm, po metodi Yemm in Willis (1954). Standardno krivuljo smo pripravili iz glukoze in 70 % etanola.

3.3.3.2 Določanje posameznih topnih sladkorjev z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti sklopljene z »refractive index« detektorjem (HPLC-RID)

Supernatant, pridobljen pri ekstrakciji celotnih topnih sladkorjev (Glej prejšnje poglavje) smo evaporirali do suhega s pomočjo vakuumskega koncentratorja SpeedVac (Heto Lab Equipment, Allerød, Denmark). Končni suhi ekstrakt smo re-suspendirali v 0,4 mili-Q vode in ga prefiltrirali preko mikrofiltra (0,45 μm Chromafil PES-45/15; Macherey-Nagel). 10 μL vzorca smo nanegli na kolono Hypersil GOLD Amino (150 x 4,6 mm ID; velikost delcev 3 μm ; Thermo Fisher Scientific) in vzdrževali pri temperaturi 28 $^{\circ}\text{C}$. HPLC-RID je bila izvedena s sistemom Shimadzu HPLC z enoto za doziranje topila LC-20AT, avtomatskim vzorčevalnikom SIL-HTc in RID-10A Differential detektorjem (Shimadzu, 's-Hertogenbosch, The Netherlands). Izokratni tok mobilne faze je bil 1,0 mL min^{-1} in s sestavo 83 % acetonitrila v vodi. Za umeritveno krivuljo so bili uporabljeni standardi posameznih sladkorjev (saharoza, glukoza, fruktoza, arabinoza, galaktoza, riboza, manosa, celobioza in ksiloza).

3.3.3.3 Določanje škroba

Za analizo škroba v usedlini, ki je ostala po zadnjem centrifugiranju in odlitju supernatanta za analizo topnih sladkorjev, smo dodali 5 ml 2 % v/v HCl in inkubirali v vodni kopeli s stresalnikom 2h pri 99 $^{\circ}\text{C}$. Po končani ekstrakciji smo vzorce centrifugirali 5 min pri 17,000g, 4 $^{\circ}\text{C}$ in zbrali supernatant. Ponovno smo dolili 5 ml % v/v HCl na preostalo usedlino, vorteksirali in ponovno centrifugirali (prirejena metoda po Brugnoli in sod., 1988). Zbrani supernatant smo združili s prejšnjim, vse skupaj prefiltrirali ter dolili do 20 ml z destilirano vodo. Priprava in analiza vzorcev z antronom je enaka, kot opisano pri analizi topnih sladkorjev, le da je standardna krivulja pripravljena iz glukoze in 2 % v/v HCl.

3.3.3.4 Določanje koncentracije proteinov

Ekstrakt za analizo proteinov smo pripravili tako, da smo 0,7 - 1 g svežega rastlinskega materiala (predhodno je bil zamrznjen na -80 °C) strli v terilnici s pomočjo tekočega dušika. Strt material smo zalili s 3,5 ml ekstrakcijskega pufra (50 mM Hepes/KOH, pH 7.5, z 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM NaHSO₃, 2 mM EDTA, 1 mM merkaptotetanol v 0,1% Polyclar-u) in 35 µl raztopine fenil-metil-sulfonil-fluorid (PMSF). Homogenat smo nato centrifugirali 5 min v predhodno ohlajeni centrifuge na 4 °C pri 10000 g. V označeno epruveto za centrifugiranje smo odlili 1,5 ml supernatanta in ponovili ekstrakcijo proteinov ter centrifugiranje. Nato smo v vsako epruveto s po 1,5 ml ekstrakta (paralelki) dodali 6 ml saturiranega amonijevega sulfata, vsebino premešali in pustili na ledu. Po 30 min smo vzorce centrifugirali 5 min pri 10000 g na 4 °C, odlili supernatant ter usedlino zalili s 3 ml 80 % amonijevega sulfata ter ponovno centrifugirali pri istih nastavitvah. Postopek z 80 % amonijevim sulfatom smo nato ponovili še enkrat. Na koncu smo odlili supernatant in usedlino raztopili s pomočjo vorteksiranja v 1,5 ml pufra za proteine (50 mM Hepes/KOH, pH 7.5, z 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂ in 2 mM EDTA). Dve paralelki smo nato združili v en vzorec. Koncentracijo proteinov v vzorcih smo določili po metodi Bradford (1976). Za standard smo uporabili goveji serum albumin (angl. bovine serum albumin oz. BSA).

3.3.3.5 Določanje encimske dejavnosti nekaterih encimov sladkornega metabolizma

Za analize aktivnosti encimov sladkornega metabolizma smo uporabili ekstrakt, v katerem smo določali koncentracijo proteinov. Ustrezen začetni volumen ekstrahiranih proteinov in najprimernejše čase inkubacije smo določili s predhodnimi poskusnimi analizami ter optimizacijo le-teh. Aktivnost saharoze-6-fosfat-sintaze (SPS) smo določili po protokolu Huber in sod. (1991), pri čemer smo za analizo uporabili 150 µL nerazredčenega ekstrakta proteinov in reakcijsko mešanico s končnim volumnom 300 µL inkubirali 45 min pri 25 °C. Aktivnost saharoze sintaze (SS) in kislih (IA) ter bazičnih oz. nevtralnih invertaz (IN) pa po metodi King in sod. (1997), kjer se za ustavitev reakcije uporablja 3,5-dinitrosalicilna kislina (DNSA). Pri zadnjih treh analizah smo prav tako uporabili 150 µL nerazredčenega ekstrakta proteinov, pri čemer smo nato reakcijsko mešanico za analizo aktivnosti SuSy inkubirali 30 min pri 25 °C, reakcijske mešanice za ugotavljanje aktivnosti IA in IN pa smo inkubirali 30 min pri 30 °C.

3.4 METODE ZA PREUČEVANJE KONCENTRACIJE, PORAZDELITVE IN DOLOČEVANJE VEZAVNIH OBLIK ELEMENTOV V RASTLINI NA ORGANSKEM, TKIVNEM ALI CELIČNEM NIVOJU

3.4.1 Metoda standardne energijsko disperzijske rentgenske fluorescenčne analize (EDXRF)

Za analizo je dovolj od 100 do 200 mg liofiliziranega in uprašenega vzorca, ki se ga s pomočjo hidravlične stiskalnice stisne v tableto enakomerne debeline, z znano maso in površino. Izmerjene spektre se nato obdela s programskim orodjem (AXIL; Vekemans in sod., 1994), kvantitativno analizo pa se izvede s QAES (Quantitative Analysis of Environmental Samples; Kump in sod., 2007).

Rezultate teh meritev smo predstavili v $\mu\text{g g}^{-1}$ SM. Zaradi možnega vpliva biomase rastline na koncentriranje ali redčenje elementov pa smo koncentracije podali tudi kot vsebnosti v rastlini, izražene v $\mu\text{g rastlino}^{-1}$.

3.4.2 Metoda rentgenske fluorescence s popolnim odbojem (TXRF)

Vzorci smo mineralizirali s pomočjo mikrovalovne pečice. Za analizo smo na kvarčni nosilec nanесли 2 x 10 μL mineraliziranega vzorca z zamešano znano količino Ga (100 μL), ki služi kot interni standard za kasnejši preračun koncentracij ostalih elementov v vzorcu. Počakali smo, da se vzorec posuši in nato pomerili sušino z metodo TXRF. Rezultate meritev smo predstavili v $\mu\text{g g}^{-1}$ SM.

3.4.2.1 Mineralizacija vzorcev v mikrovalovni pečici

V predhodno očiščene teflonske posode smo natehtali 100 mg suhega rastlinskega materiala in nanj odpipetirali 3 ml 65 % dušikove (V) kisline, močno premešali ter razklopili v mikrovalovki (CEM MARS-X, CEM, ZDA). Ohlajene vzorčke smo prelili v predhodno označene falkonke in dolili bidestilirano vodo do 10 ml.

Priprava vzorcev in meritve EDXRF in TXRF so bile izvedene na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani, na Odseku za fiziko nizkih in srednjih energij, v Laboratoriju za rentgensko fluorescenčno spektrometrijo pod vodstvom dr. Petra Kumpa in sodelavca dr. Marijana Nečemra.

3.4.3 Atomska absorpcijska spektrometrija (AAS)

Za mineralizacijo vzorcev smo uporabljali kislinski razklop s termoblokom ali z mikrovalovno pečico. V vzorcih smo z aparaturo Perkin Elmer AAnalyst 100A pomerili Cd, Zn in Mg v Laboratoriju za atomsko absorpcijo na Katedri za zoologijo na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Rezultate meritev smo predstavili v $\mu\text{g g}^{-1}$ SM.

3.4.3.1 Mineralizacija vzorcev na termobloku

Za analizo rastlinskega materiala smo zatehtali 100 mg fino zmletega in predhodno liofiliziran materiala, ki smo ga nato polili s kislinsko mešanico iz 65 % HNO_3 (Merck) in 70 % HClO_4 (Merck) v razmerju 7:1 ter vzorce razklopili na termobloku po metodi Vogel-Mikuš in sod. (2005). Če je bila izmerjena koncentracija v vzorcu prevelika, smo ga ustrezno redčili z raztopino 0,2 % HNO_3 , do takšnega redčenja, da je bila izmerjena absorpcija v območju linearnega dela umeritvene krivulje.

3.5 METODE ZA DOLOČANJE PORAZDELJEVANJA ELEMENTOV NA TKIVNEM IN CELIČNEM NIVOJU

3.5.1 Mikro protonsko inducirana emisija rentgenskih žarkov (mikro-PIXE)

Za meritev smo pripravili liofilizirane rezine prečnega prereza lista debele 35 μm in jih namestili v aluminijaste nosilce (Vogel-Mikuš in sod., 2007, 2009). Za detekcijo emitiranih rentgenskih žarkov, ki so imeli energije med 1 keV in 25 keV, sta bila uporabljena polprevodniška detektorja: silicijev detektor s prečnim zbiranjem naboja (angl. Silicon Drift Detector, SDD) za merjenje mehkih rentgenskih žarkov z energijami med 0,8 in 5 keV ter rentgenski detektor iz čistega germanija (angl. High Purity Germanium, HPGe) za zbiranje rentgenskih žarkov z energijami med 4 in 25 keV, kot je podrobneje opisano v Pongrac in sod., 2010. Kot rezultat meritev z mikro-PIXE in analize karakterističnih fluorescenčnih žarkov smo dobili mape porazdelitve posameznih elementov v vzorcu. Rezultat meritve porazdelitve transmitiranih ionov pa je slika površinske debeline vzorca (STIM oz. scanning transmission ion microscopy; Vogel-Mikuš in sod., 2009).

Za izračun koncentracij posameznih elementov na nivoju cele rezine ter v posameznih tkivih listov *T. praecox*, smo uporabili 8-bitne barvne kvantitativne mape (256 x 256 pikslov), generirane v programu GEOPIXE II, ki smo jih obdelali s pomočjo brezplačnega programa Mac Biophotonics Image J. V omenjenem programu smo s pomočjo vseh generiranih elementih map posameznega vzorca, STIM slike in svetlobne

mikrografije vzorca, obrisali posamezna tkiva na merjeni rezini in izračunali povprečne koncentracije v izbranih tkivih (v $\mu\text{g g}^{-1}$).

3.5.2 Sinhrotronska mikro rentgenska spektrometrija (SR-mikro XRF)

Meritve so bile izvedene v okviru odobrenega merilnega časa EC719 (poročilo: Pongrac in sod., 2011) na žarkovni liniji ID 21 na sinhrotronu ESRF v Grenoblu, Francija. Za meritve smo pripravili 20 μm debele rezine prečnih prerezov zrelih listov (glej poglavje 3.2.1 Priprava liofiliziranih rezin). Na izbranih področjih vzorca v velikosti 100 x 100 μm oz 100 x 100 pikselov smo pri vzbujevalni energiji 3,55 keV mikro žarka in zadrževalnim časom 300 ms piksel⁻¹ v vakuumu hkrati pomerili porazdelitvene mape za Cd, S, Cl in P. Podrobnejši parametri meritve ter analize rezultatov so opisani v Koren in sod. (2013).

3.5.2.1 Analize kolokalizacije

Analize kolokalizacije med Cd in Cl, S in P so bile narejene s programom ImageJ, z vključkom za korelacijsko analizo intenzitet »intensity correlation analysis«, s katero smo pridobili podatek o vrednosti Pearsonovega korelacijskega koeficienta (r). Kolokalizacijske mape pa so bile izrisane z uporabo vključka »intensity highlighter«, kot je podrobneje opisano v Koren in sod. (2013).

3.6 METODE ZA DOLOČANJE VEZAVNIH OBLIK Cd V LISTIH NA TKIVNEM IN CELIČNEM NIVOJU

3.6.1 Metodi EXAFS in mikro-XANES

Meritve EXAFS nad absorpcijskim Cd K-robom (26,711 eV) so bile izvedene v transmisiji na žarkovni liniji C laboratorija HASYLAB (Hamburg Synchrotron Radiation Laboratory) na sinhrotronu DESY v Nemčiji. Pomerili smo uprašene liofilizirane poganjke (združeni mladi, zreli in stare listi), ki smo jih namestili v 5 cm dolge plastične nosilce. Absorpcijski spektri so bili posneti na intervalu med -250 eV in 1000 eV relativno na Cd K-rob in nato obdelani s pomočjo IFEFFIT paketa (Ravel in Newville, 2005), kot je opisano v Vogel-Mikuš in sod. (2010).

Meritve mikro-XANES so bile izvedene kot je opisano v Koren in sod. (2013), na žarkovni liniji ID 21 na sinhrotronu ESRF, v Grenoblu v Franciji v okviru odobrenega merilnega časa EC719 (poročilo: Pongrac in sod., 2011). Meritve so bile izvedene na liofiliziranih rezinah prečnih prerezov listov (glej poglavje 3.2.1 Priprava liofiliziranih

rezin), v izbranih tkivih. Mikro-XANES spektri Cd na L3-robu se je posnelo v energijskem območju od 3,50 do 3,66 keV in nato primerjalo z meritvami modelnih Cd spojin, kot je opisano v (Koren in sod., 2013).

3.7 METODE ZA DOLOČANJE SESTAVE ORGANSKE MATRIKE POGANJKOV NA ORGANSKEM IN TKIVNEM NIVOJU

3.7.1 Metoda oslabiljene popolne refleksije (ATR)

Spektri so bili zajeti z aparaturo Bruker Vertex 80 z resolucijo 4 cm^{-1} , MCT detektorjem in uporabo Blackman Harris apodizacijsko funkcijo. Območje snemanja je bilo od 4000 do 650 cm^{-1} . Uporabili smo Golden gate ATR z diamantnim nosilcem in ZnSe optiko. Meritve so bile opravljene na Kemijskem inštitutu pod vodstvom dr. Jožeta Grdadolnika iz Laboratorija za strukturo biomolekul.

Spektre smo analizirali v programu OPUS 6.5 (Bruker), kjer smo jih sistematično obrezali na območje $3800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ in popravili bazno linijo z uporabo konkavnega »Rubberband« algoritma (64 točk, 5 ponovitev).

3.7.2 Sinhrotronska infrardeča spektroskopija s Furierjevo transformacijo (SR-FTIR)

Meritve smo izvedli na liofiliziranih rezinah prečnih prereзов listov ranega mošnjaka debeline $12\text{--}16\text{ }\mu\text{m}$ v okviru odobrenega merilnega časa na žarkovni liniji SSSI na sinhrotronu Elettra v Italiji (št. 20105375; poročilo Koren in sod., 2010). Iz posnetih spektrov na posameznem področju vzorca (2-4 celice) smo generirali mape, nato pa iz map ekstrahirali povprečne spektre, ki so predstavljali notranjost posameznih celic. Lete smo nato združili v en spekter, ki je predstavljal reprezentativni spekter izbranega tkiva v vzorcu posameznega tretmaja.

Spektre smo zajeli in obdelali s pomočjo računalniškega programa OPUS 6.5 (Bruker). Vsak spekter smo sistematično popravili za možne interference zaradi sprememb v merilnih pogojih atmosferske okolja, obrezali na obseg med $3800\text{ in }800\text{ cm}^{-1}$, zgladili z uporabo »Savitzky Golay« algoritma (9 točk) in popravili bazno linijo z uporabo konkavnega »Rubberband« algoritma (64 točk, 5 ponovitev).

Za natančnejšo primerjavo različnih področij v spektru in njihovih intenzitet, smo spektre normalizirali z uporabo algoritma za vektorsko normalizacijo, s čimer smo odstranili možne spremembe v spektru, ki so nastale zaradi popravkov bazne linije ali

kot posledica sipanja svetlobe zaradi mestoma predebelega vzorca. Za analizo vzorcev smo izbrali regije oz. vrhove v spektru za naslednje organske molekule oz. skupine molekul: lipidi ($2980\text{--}2820\text{ cm}^{-1}$), estri (1735 cm^{-1}), amid I (1655 cm^{-1}), amid II (1545 cm^{-1}), celuloza (1250 cm^{-1}), hemiceluloze (1070 cm^{-1}), škrob (1025 cm^{-1}), pektin (1014 cm^{-1}) in celotni ogljikovi hidrati ($1180\text{--}950\text{ cm}^{-1}$) (prirejeno po Regvar in sod., 2013).

3.8 MORFOLOGIJA RASTLINSKIH TKIV

3.8.1 Svetlobna mikroskopija

Sveže, na roko narezane preparate, ali liofilizirane rezine smo opazovali s svetlobnim mikroskopom Axioskop 2 MOT (Carl Zeiss) pri 40- in 100-kratni povečavi.

3.8.2 Vrstična elektronska mikroskopija (SEM)

Mikrografije liofiliziranih prečnih rezin listov *T. praecox* so bile posnete z uporabo visokoločljivega vrstičnega (ali »scanning«) elektronskega mikroskopa (SEM), ki lahko doseže ločljivost $1,0\text{ nm}$ pri 15 kV oz. $1,9\text{ nm}$ pri 1 kV . To je model SUPRA 35 VP (Carl Zeiss) opremljen z energijsko disperzijskim spektrometrom Inca 400 (Oxford Instruments) v L 10 - Laboratoriju za elektrokemijo materialov na Kemijskem Inštitutu v Ljubljani.

Rezine, ki so bile zaradi meritve na SR-FTIR nameščene v zlate mrežice, smo položili na dvostransko lepljiv karbonski trak, ki je že bil prilepljen na kovinski nosilec. Kljub temu, da vzorci pred pregledovanjem niso bili naprašeni s tanko plastjo ogljika, platine ali zlata, kot je običajen postopek, smo vseeno dobili zadostno količino iz vzorca izbitih elektronov in s tem dobro kvaliteto nastale slike. Mikrografije je posnela Marta Debeljak (Kemijski Inštitut).

3.9 POTEK RAZISKAV IN POGOJI MERJENJA

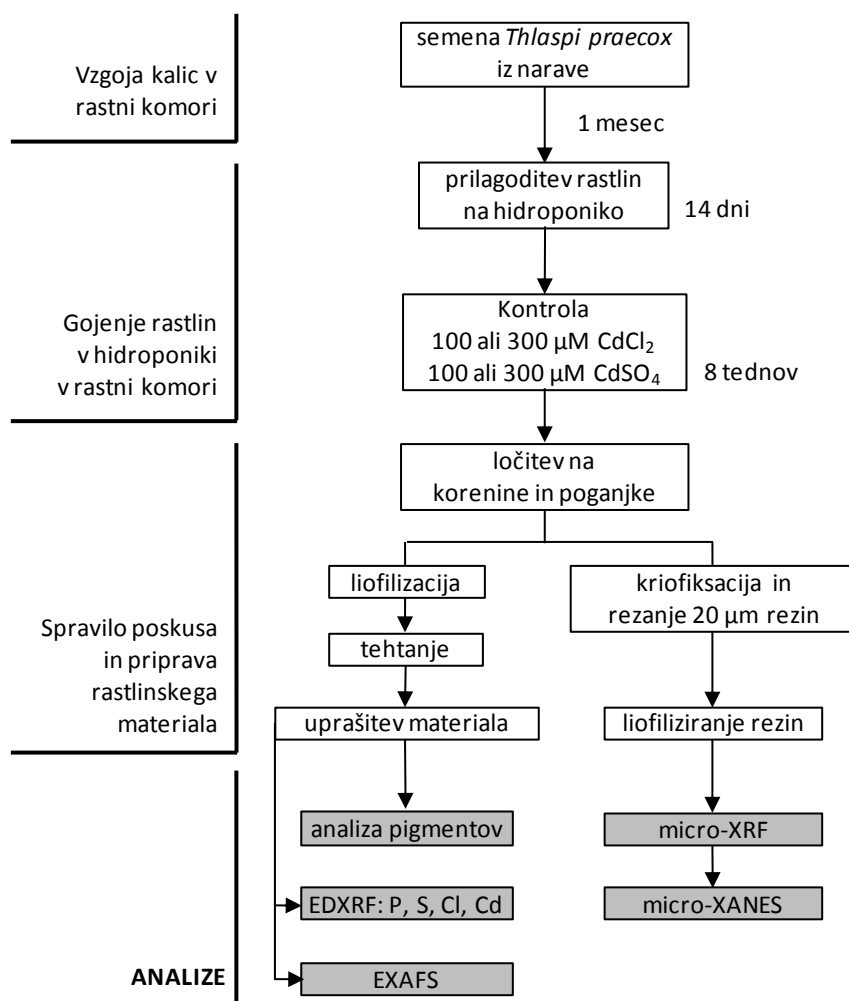
Raziskave smo razdelili v štiri sklope:

- 1) Preučevanje vpliva CdCl_2 in CdSO_4 na privzem, porazdelitev in vezavne oblike Cd v listih,
- 2) preučevanje vpliva CdSO_4 in pomanjkanja Mg, Ca, Zn, Fe in Mn na privzem Cd in nekaterih esencialnih mineralnih hranil,
- 3) preučevanje vpliva CdSO_4 na metabolizem ogljikovih hidratov ter
- 4) preučevanje vpliva CdSO_4 na sestavo organske matrike listov.

3.9.1 Preučevanje vpliva CdCl_2 in CdSO_4 na privzem, porazdelitev in vezavne oblike Cd v listih

V sklopu raziskav, kjer smo se namenili preučiti vpliv dveh različnih Cd soli, smo poskus izvedli v rastnih komorah (Glej shemo poskusa na **Sliki 4**). Kalice, vzgojene na vermikulitu (Glej poglavje 3.1.1 Vzgoja kalic...), smo po 1 mesecu prestavili v HR (Glej poglavje 3.1.2 Prenos v...). Po 14-ih dneh adaptacije v rastni komori (Glej poglavje 3.1.3 Gojenje rastlin...) smo rastline izpostavili dvema različnima oblikama Cd soli v koncentraciji 100 oz. 300 μM Cd. Poskus smo prekinili po 8-ih tednih. Rastni odziv rastlin smo ocenili na podlagi SM liofiliziranih korenin in poganjkov (Glej poglavje 3.2 Določanje biomase...), izmerjenih koncentracij in preračunanih vsebnosti klorofilov in antocianov (Glej poglavje 3.3.2 Določanje koncentracije...) ter koncentracij in vsebnosti Cd, S, Cl in P z metodo EDXRF (Glej poglavje 3.4.1 Metoda standardne...).

Nadalje smo z metodo EXAFS preučili vezavne oblike Cd v homogeniziranih vzorcih listov (Glej poglavje 3.6.1 Metodi EXAFS in...), porazdelitve Cd, S, Cl in P v simplastu in apoplastu epidermisa in mezofila ter regijo s floemom pa smo preučili na rezinah listov z metodo SR mikro-XRF (Glej poglavje 3.5.2 Sinhrotronska mikro...), nato pa naredili še analizo kolokalizacije med temi elementi. Na koncu smo v izbranih točkah epidermalnih celic in celic listnega mezofila pri rastlinah, izpostavljenih 100 μM CdCl_2 in 300 μM CdSO_4 ter v floemu vseh 4 izpostavitvev Cd, s pomočjo mikro-XANES na Cd L3-robu (Glej poglavje 3.6.1 Metodi EXAFS in...) poskušali ugotoviti vezavne oblike Cd na sub-celičnem nivoju. Poskus je bil ponovljen dvakrat, s 5-10 rastlinami na izpostavitvev.



Slika 4: Potek poskusa, priprave materiala in analiz, katerih cilj je bil preučiti vpliv CdCl₂ in CdSO₄ na privzem, porazdelitev in vezavne oblike Cd v listih ranega mošnjaka (*T. praecox*).

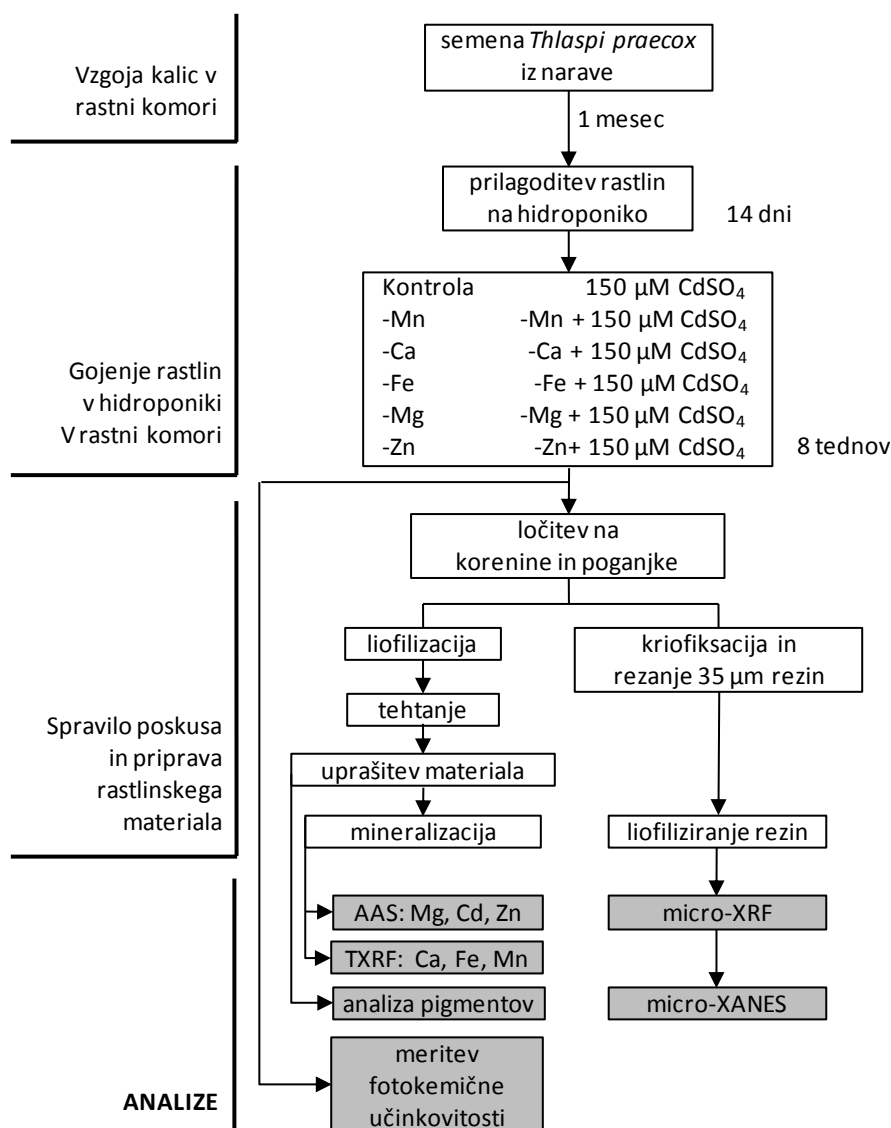
Figure 4: The experiment, preparation of material and analyses for studying influence of CdCl₂ and CdSO₄ supplementation on Cd distribution and ligand environment in leaves of the Cd hyperaccumulator *Thlaspi praecox*.

Pomembno je upoštevati dejstvo, da je dodatek CdCl₂ oz. CdSO₄ spremenil koncentraciji S in Cl v hranilni raztopini. Tako je hranilna raztopina z dodanim 100 μM CdCl₂ vsebovala 525 μM SO₄²⁻ in 250 μM Cl⁻, hranilna raztopina z dodanim 100 μM CdSO₄ pa 625 μM SO₄²⁻ in 50 μM Cl⁻. Hranilna raztopina z dodanim 300 μM CdCl₂ je vsebovala 525 μM SO₄²⁻ in 650 μM Cl⁻, hranilna raztopina z dodanim 300 μM CdSO₄ pa 825 μM SO₄²⁻ in 50 μM Cl⁻. Kontrolne rastline so rastle v HR, ki je vsebovala 525 μM SO₄²⁻ in 50 μM Cl⁻.

3.9.2 Preučevanje vpliva CdSO_4 in pomanjkanja Mg, Ca, Zn, Fe in Mn na privzem Cd in nekaterih esencialnih mineralnih hranil

V raziskavi, kjer smo se namenili preučiti vpliv Cd in pomanjkanja Mg, Ca, Zn, Fe in Mn na privzem Cd in nekaterih esencialnih mineralnih hranil, smo poskus izvedli v rastnih komorah (Glej shemo poskusa na **Sliki 5**). Kalice, vzgojene na vermikulitu (Glej poglavje 3.1.1 Vzgoja kalic...), smo po 1 mesecu prestavili v HR (Glej poglavje 3.1.2 Prenos v...). Po 14-ih dneh adaptacije v rastni komori (Glej poglavje 3.1.3 Gojenje rastlin...) smo začeli gojiti rastline v hranilnih raztopinah s pomanjkanjem določenih mineralnih hranil (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe) ter ob istem pomanjkanju z dodatkom 150 μM CdSO_4 (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd) ter jih primerjali z rastlinami, gojenimi v navadni hranilni raztopini ter z rastlinami, izpostavljenimi 150 μM Cd (Cd). Pri hranilnih raztopinah s pomanjkanjem posameznega minerala, je bila koncentracija le-tega zmanjšana na 1/3 koncentracije tega minerala v kontrolni HR.

Po 8-ih tednih smo poskus prekinili. Rastni odziv rastlin smo ocenili na podlagi izmerjene potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti (Glej poglavje 3.3.1 Meritve fotokemične...) na dan zaključna poskusa, nato pa še na podlagi SM liofiliziranih korenin in poganjkov (Glej poglavje 3.2 Določanje biomase...) ter izmerjenih koncentracij klorofila a, klorofila b in karotenoidov (Glej poglavje 3.3.2 Določanje koncentracije...). V liofiliziranih vzorcih poganjkov smo izmerili koncentracije esencialnih elementov in Cd s pomočjo metod TXRF (Glej poglavje 3.4.2 Metoda rentgenske...) in AAS (Glej poglavje 3.4.3 Atomska absorpcijske...) ter izračunali translokacijske faktorje za posamezne elemente. Podatke smo analizirali s pomočjo linearne regresije in klastrske analize, nato pa smo pri rastlinah, pri katerih smo opazili največja odstopanja od kontrole, podrobneje preučili elementno porazdelitev na tkivnem nivoju na prečnih prerezi listov z metodo mikro-PIXE (Glej poglavje 3.5.1 Mikro protonsko...) in tako poskušali na tkivnem nivoju poiskati vzroke za razlike na organizemskem nivoju.



Slika 5: Potek poskusa, priprave materiala in analiz, kjer smo želeli preučiti vpliva CdSO₄ in pomanjkanja Mg, Ca, Zn, Fe in Mn na privzem Cd in nekaterih esencialnih mineralnih hranil pri ranem mošnjaku (*T. praecox*).

Figure 5: The experiment, preparation of material and analyses for studying influence of CdSO₄ supplementation and Mg, Ca, Zn, Fe and, Mn deficiency on Cd uptake and uptake of some essential mineral nutrients in *T. praecox*.

3.9.3 Preučevanje vpliva CdSO₄ na metabolizem ogljikovih hidratov

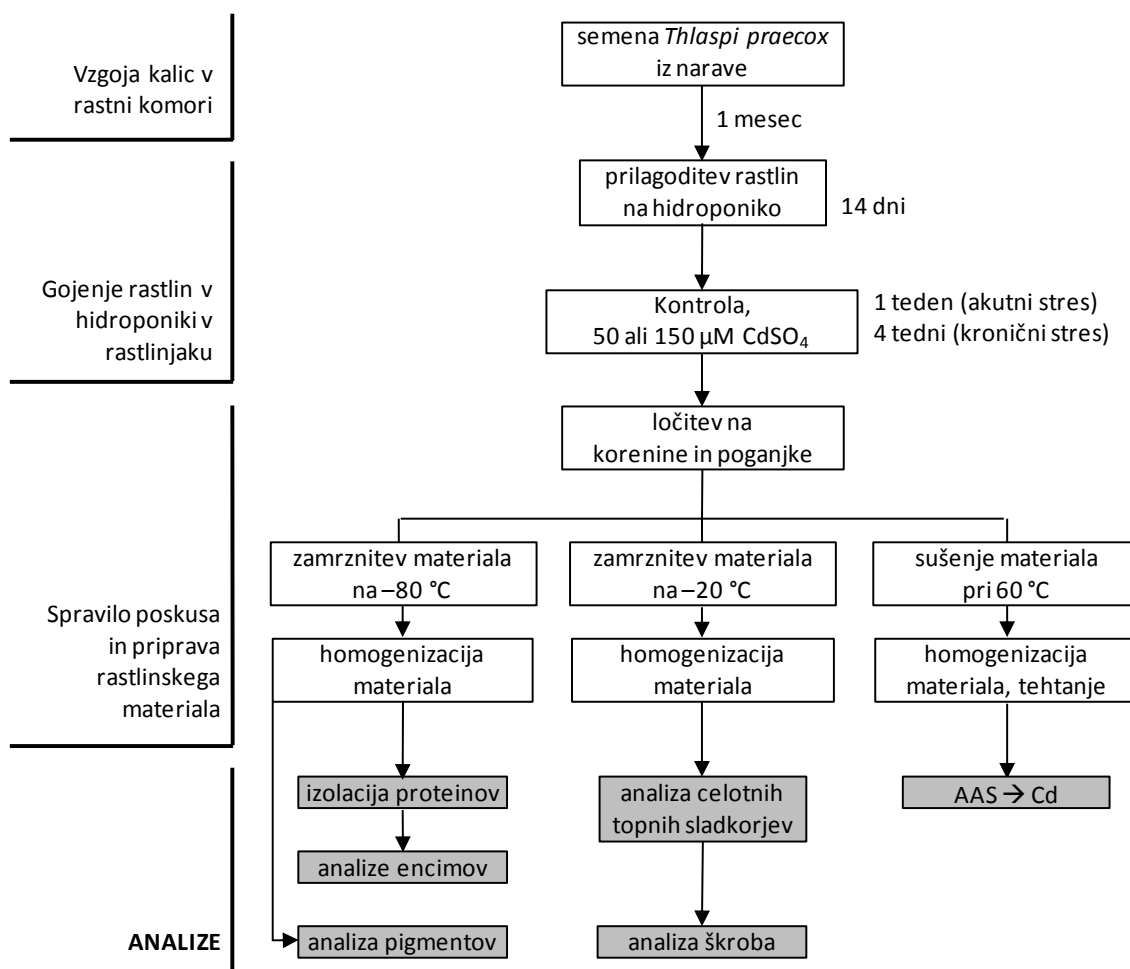
Vpliv CdSO₄ na metabolizem ogljikovih hidratov pri ranem mošnjaku smo preučevali na rastlinah, vzgojenih pod naravno svetlobo s kombinirano umetno osvetlitvijo v rastlinjaku (Glej poglavje 3.1.3 Gojenje rastlin...; glej shemo poskusa na **Sliki 6**). Kalice, vzgojene na vermikulitu (Glej poglavje 3.1.1 Vzgoja kalic...), smo po 1 mesecu predstavili v HR (Glej poglavje 3.1.2 Prenos v...). Po 14-ih dneh adaptacije v HR v rastlinjaku (Glej poglavje 3.1.3 Gojenje rastlin...) smo rastline za 1 oz. za 4 tedne

izpostavili koncentracijama 50 in 150 μM CdSO_4 (oznake kontrola, Cd50, Cd150). Poskus, ki je trajal 1 teden (akutni stres), je bil ponovljen enkrat, s 16-imi rastlinami na izpostavitve. Poskus, kjer smo rastline izpostavili za 4 tedne, t.j. kroničnemu stresu, pa je bil ponovljen dvakrat, prvič z 20-imi rastlinami na izpostavitve in drugič s 6-40 rastlinami na izpostavitve.

Tekom poskusa smo spremljali fotokemično učinkovitost na zrelih listih naključno izbranih rastlin (Glej poglavje 3.3.1 Meritve fotokemične...). Pri 1-tedenskem poskusu smo FU pomerili na 1., 4. in 7. dan, pri 1-mesečnem poskusu pa na 1. dan poskusa, po 2-h in 4-ih tednih. Po koncu poskusa smo dodatno ocenili rastni odziv rastlin še na podlagi biomase korenin in poganjkov (Glej poglavje 3.2 Določanje biomase...) ter izmerjenih koncentraciji klorofila a, klorofila b in karotenoidov (Glej poglavje 3.3.2 Določanje koncentracije...), z metodo AAS pa smo v posušenih vzorcih pomerili Cd (Glej poglavje 3.4.3 Atomska absorpcijske...).

Za večjo homogenost vzorcev smo združili posamezne korenine oz. poganjke v skupne vzorce in jih po potrebi zamrznili na -20 ali -80 $^{\circ}\text{C}$ (Glej 3.2 Določanje biomase...). Nato smo v vzorcih korenin in poganjkov določili vsebnosti skupnih topnih sladkorjev (Glej poglavje 3.3.3.1 Določanje topnih sladkorjev), posameznih topnih sladkorjev (Glej poglavje 3.3.3.3 Določanje posameznih...) in škroba (Glej poglavje 3.3.3.3 Določanje škroba).

Iz poganjkov smo nato izolirali proteine (Glej poglavje 3.3.3.4 Določanje koncentracije proteinov...) in nadalje v teh vzorcih določili encimsko dejavnost SPS, SS, IA ter IN (Glej poglavje 3.3.3.5 Določanje encimske...).



Slika 6: Potek poskusa, priprave materiala in analiz, kjer smo želeli preučiti vpliv CdSO₄ na metabolizem ogljikovih hidratov pri ranem mošnjaku (*T. praecox*).

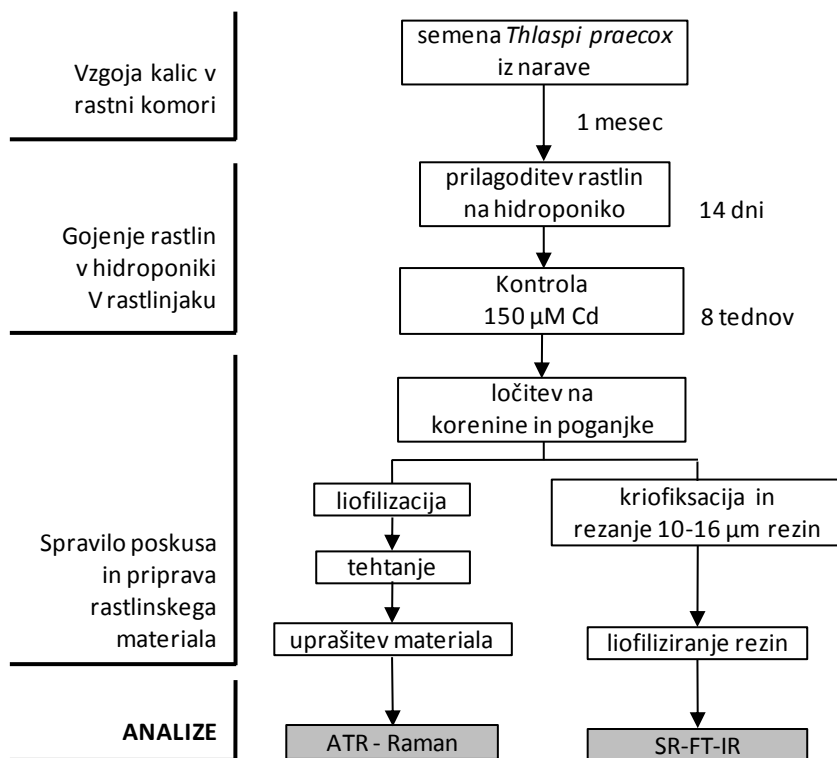
Figure 6: The experiment, preparation of material and analyses for studying influence of CdSO₄ supplementation on carbohydrate metabolism in *T. praecox*.

3.9.4 Preučevanje vpliva CdSO₄ na sestavo organske matrike listov

V raziskavi, kjer smo se namenili preučiti vpliv Cd na sestavo organske matrike listov na organskem in tkivnem nivoju, smo rastline gojili v rastni komori (Glej shemo poskusa na **Sliki 7**). Kalice, vzgojene na vermikulitu (Glej poglavje 3.1.1 Vzgoja kalic...), smo po 1 mesecu prestavili v HR (Glej poglavje 3.1.2 Prenos v...). Po 14-ih dneh adaptacije (Glej poglavje 3.1.3 Gojenje rastlin...) smo nekatere rastline premaknili v svežo HR (kontrolne rastline oz. oznaka kontrola), preostale pa smo izpostavili 150 μM CdSO₄.

Po 8-ih tednih smo poskus prekinili. Pripravili smo 10-16 μm tanke prečne rezine listov (Glej poglavje 3.2.1 Priprava liofiliziranih rezin), preostali material pa liofilizirali in uprašili. Slednjega smo nato uporabili pri meritvi sestave organske matrike na nivoju

lista z metodo ATR (Glej poglavje 3.7.1 Metoda oslABLJene...). Liofiliziranih rezine, vpete v Au mrežico pa smo pogledali s SEM (Glej poglavje 3.8.2 Vrstična elektronska...) ter na njih izvedli meritve SR-FTIR (Glej poglavje 3.7.2 Sinhrotronska infrardeča...).



Slika 7: Potek poskusa, priprave materiala in analiz, kjer smo želeli preučiti vpliv CdSO_4 na sestavo organske matrike listov pri ranem mošnjaku (*T. praecox*).

Figure 7: The experiment, preparation of material and analyses for studying influence of CdSO_4 supplementation on organic matrix composition in *T. praecox*.

3.10 STATISTIČNA ANALIZA IN OBDELAVA PODATKOV

Obdelava podatkov, kot so statistična analiza linearne regresije, klastrske analize (Wardov algoritem, evklidska razdalja) in analiz ANOVA (analiza variance) so bile narejene s pomočjo programov Statistica 8.0 (StatSoft) in MS Excel 2010 z dodatkom Daniel's XL Toolbox 5.0. Linearna diskriminantna analiza (LDA) je bila narejena z MS Excel dodatkom StatistiXL. Analiza ATR in SR-FTIR spektrov je bila narejena s programom OPUS 6.5 (Bruker). Analiza nemetričnega večrazsežnostnega lestvičenja (nMDS) je bila narejena s programom R.

4 REZULTATI

4.1 PREUČEVANJE VPLIVA CdCl_2 IN CdSO_4 NA PORAZDELITEV IN VEZAVNE OBLIKE Cd V LISTIH RANEGA MOŠNJAKA

Rastline ranega mošnjaka smo gojili na hidroponiki in jih izpostavili dvema različnima oblikama Cd soli (CdSO_4 in CdCl_2) v koncentraciji 100 oz. 300 μM Cd (skupno 4 izpostavitve; glej poglavje 3.9.1 Preučevanje vpliva...). Rastni odziv rastlin smo ocenili na podlagi suhe mase korenin in poganjkov, izmerjenih koncentracij in preračunanih vsebnosti klorofilov in antocianov ter koncentracij in preračunanih vsebnosti Cd, S, Cl in P.

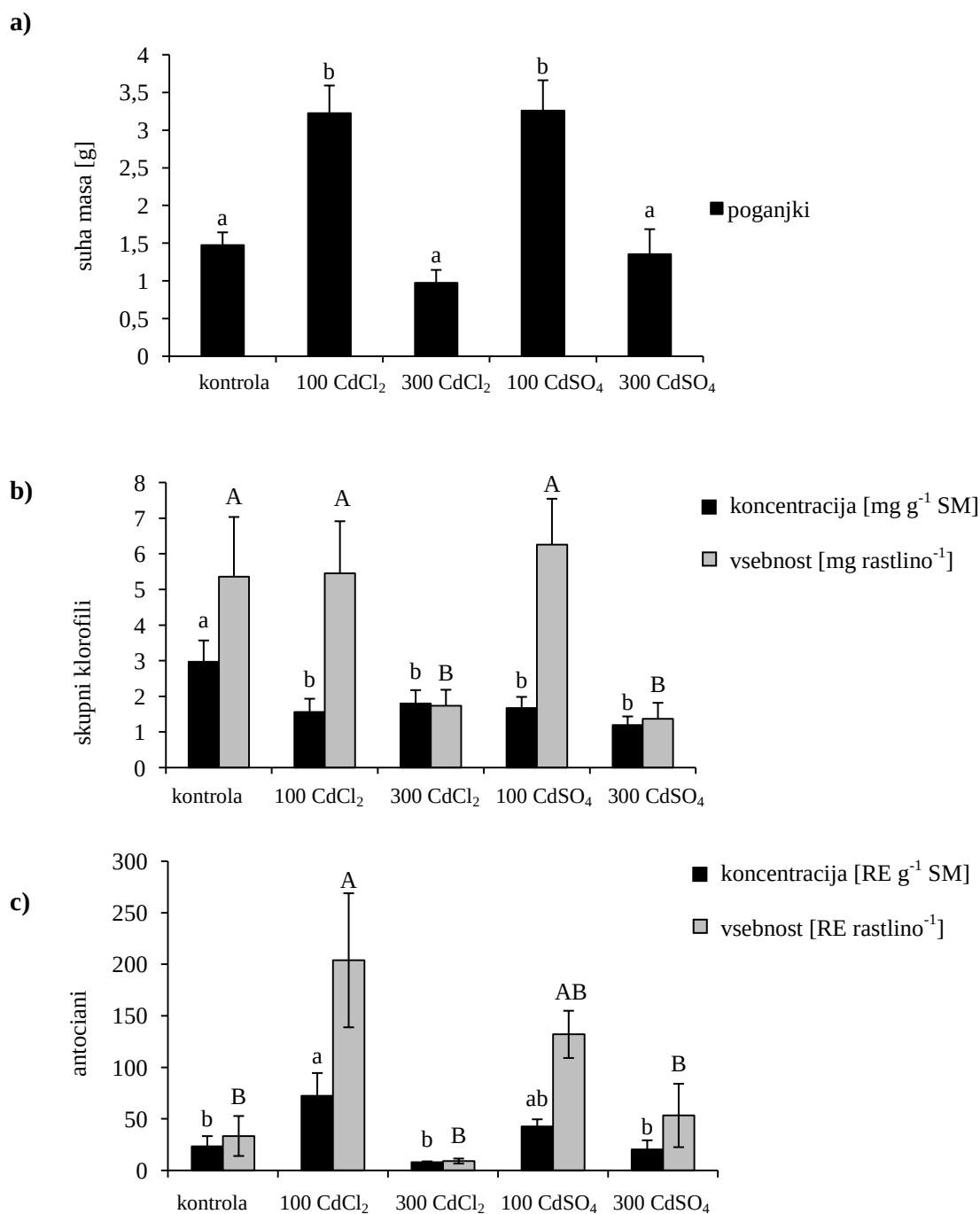
Z metodo EXAFS smo preučili vezavne oblike Cd in njihove deleže v homogeniziranih liofiliziranih uprašenih vzorcih listov ter porazdelitve Cd, S, Cl in P v simplastu in apoplastu epidermisa in mezofila ter na območju žile s floemom pa smo preučili na rezinah listov z metodo SR mikro-XRF, nato pa izvedli še analizo kolokalizacije med temi elementi. V izbranih točkah epidermalnih celic in celic listnega mezofila pri rastlinah, izpostavljenih 100 μM CdCl_2 in 300 μM CdSO_4 ter v floemu vseh izpostavitvev Cd, s pomočjo mikro-XANES na Cd L3-robu, ugotavljali vezavne oblike Cd na sub-celičnem nivoju.

4.1.1 Rastni odziv rastline ter koncentracija in vsebnost klorofilov in antocianov

Suha masa poganjkov se je značilno povečala v rastlinah, ki so bile izpostavljene 100 μM CdCl_2 in 100 μM CdSO_4 v primerjavi s kontrolo, medtem ko biomasa poganjkov, izpostavljenih 300 μM CdCl_2 in 300 μM CdSO_4 ni bila statistično značilno različna od kontrole (**Slika 8a**). Med biomaso poganjkov rastlin, izpostavljenih isti koncentraciji CdCl_2 ali CdSO_4 , pa ni bilo statistično značilnih razlik (**Slika 8a**).

Za oceno stresa pri rastlinah, izpostavljenih Cd, smo poleg suhe mase rastlin pomerili tudi koncentracije klorofilov in antocianov v poganjkih. Koncentracije klorofilov so bile, v primerjavi s kontrolo, značilno manjše v poganjkih rastlin izpostavljenih Cd (**Slika 8b**), vendar pa so bile izračunane vsebnosti klorofilov v rastlinah, izpostavljenih 100 μM Cd (ne glede na obliko dodane soli), primerljive z vsebnostmi klorofilov v kontrolnih rastlinah, pri 300 μM Cd pa so bile le-te značilno manjše (**Slika 8b**).

Rastline, ki so rastle v hranilni raztopini s 100 μM Cd, so imele liste obarvane intenzivno vijolično, česar pa nismo opazili pri 300 μM Cd rastlinah (ne glede na obliko dodane soli). V primerjavi s kontrolo smo povečanje koncentracije antocianov zabeležili pri rastlinah 100 μM CdCl_2 , le-to pa je bilo še posebej očitno pri izračunu vsebnosti



Slika 8: **a)** Suha masa poganjkov, **b)** skupne koncentracije (mg g^{-1} SM) in vsebnosti klorofilov ($\mu\text{g rastlino}^{-1}$), **c)** koncentracije (RE g^{-1} SM) in vsebnosti antocijanov (RE rastlino^{-1}), v rastlinah ranega mošnjaka, izpostavljenih 100 oz. 300 μM CdCl₂ ali CdSO₄ (povprečje $\pm$ SE, kontrola, $n=5$; izpostavljene rastline, $n=10$). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko (Duncanov test, $p<0,05$). SM - suha masa, RE - relativne enote.

Figure 8: **a)** Shoot dry biomass, **b)** total chlorophylls concentrations (mg g^{-1} SM) and contents ($\mu\text{g plant}^{-1}$), and **c)** anthocyanins concentrations (RE g^{-1} SM) and contents (RE plant^{-1}) of *T. praecox* plants treated with 100 or 300 μM of CdCl₂ or CdSO₄ (mean $\pm$ SE, control, $n=5$; treated, $n=10$). Different letters above the columns represent statistically significant difference, Duncan's test ($p<0.05$). SM - dry weight, RE - relative units.

(**Slika 8c**). Pri ostalih izpostavitvah se koncentracije in vsebnosti antocianov niso značilno razlikovale od vrednosti pri kontrolnih rastlinah (**Slika 8c**).

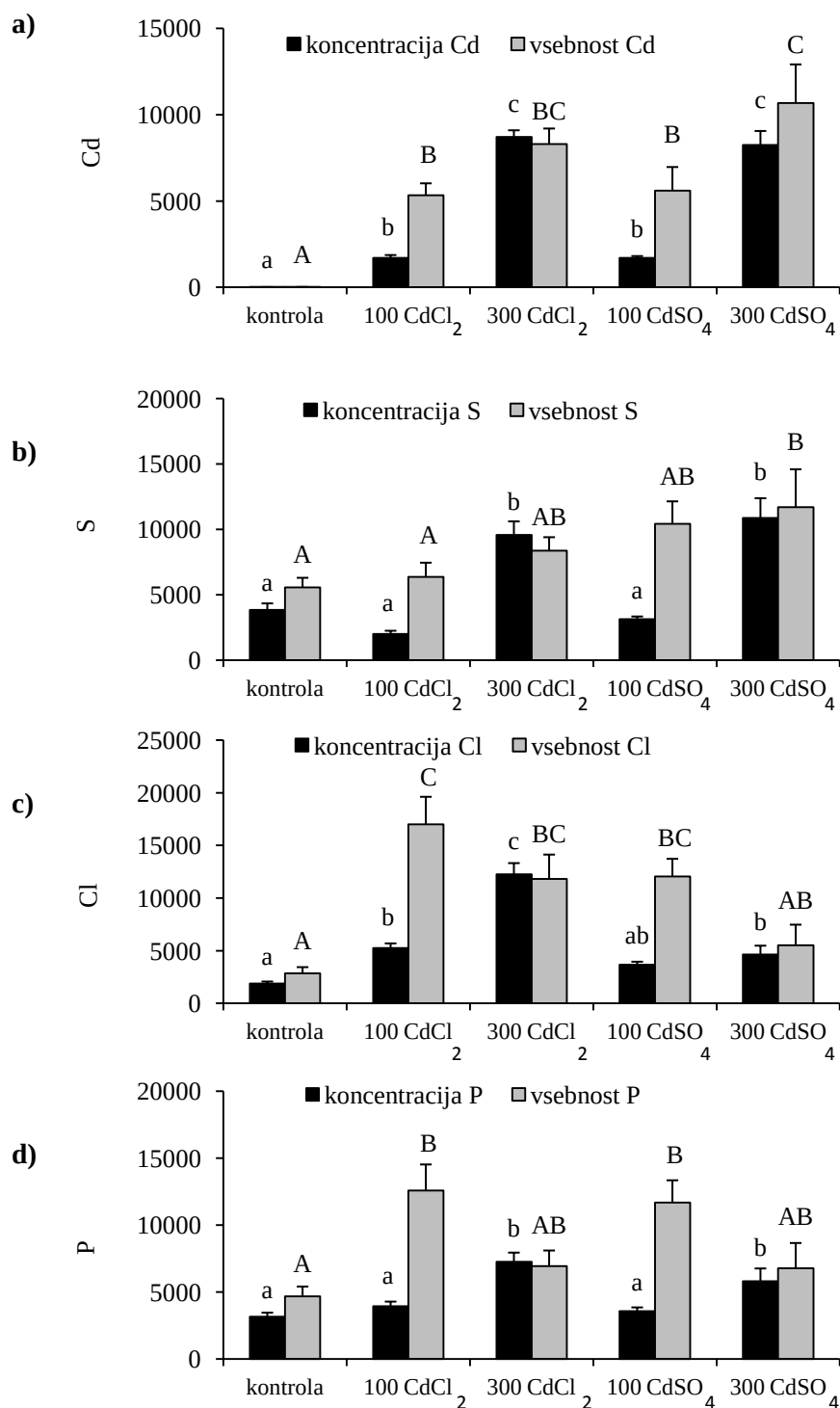
4.1.2 Koncentracije in vsebnosti elementov v poganjkih

V poganjkih smo pomerili koncentracije Cd, S, Cl in P ter nato preračunali tudi njihove vsebnosti v rastlinah (**Slika 9a-d**). V kontrolnih rastlinah smo zabeležili le sledi Cd, katerih vrednosti so bile blizu meje detekcije. Koncentracija Cd je v poganjkih rastlin, ki so rastle v pristnosti Cd v HR, naraščala z naraščanjem koncentracije Cd v HR in je bila neodvisna od oblike dodane soli (**Slika 9a**). Rastline pa se nato po vsebnosti Cd na rastlino niso značilno razlikovale (**Slika 9a**).

Koncentracije S so bile primerljive med kontrolnimi rastlinami in rastlinami 100 μM Cd, značilno višje koncentracije S pa smo opazili pri rastlinah 300 μM Cd, ponovno neodvisno od oblike dodane Cd soli (**Slika 9b**). Vsebnost S je bila značilno povečana le pri 300 μM CdSO_4 (**Slika 9b**).

Koncentracije Cl v rastlini so bile odvisne od koncentracije Cl^- v HR, pri čemer so bile le-te najmanjše pri kontrolnih rastlinah in večje pri CdCl_2 rastlinah (**Slika 9c**). Največje vsebnosti Cl pa smo zabeležili pri 100 μM CdCl_2 rastlinah (**Slika 9c**).

Koncentracije P so bile značilno večje pri rastlinah izpostavitve 300 μM Cd, neodvisno od oblike dodane soli (**Slika 9d**). Najvišje vsebnosti P pa smo, v nasprotju s koncentracijami, zabeležili pri rastlinah 100 μM Cd (**Slika 9d**).



Slika 9: Koncentracije ($\mu\text{g g}^{-1}$ SM) in vsebnosti ($\mu\text{g rastlino}^{-1}$) **a)** Cd, **b)** S, **c)** Cl in **d)** P (povprečje $\pm$ SE, kontrola, $n=5$; izpostavljene rastline, $n=10$) rastlin, izpostavljenih 100 oz. 300 μM CdCl₂ ali CdSO₄. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko (Duncanov test, $p<0,05$).

Figure 9: Concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ SM) and contents ($\mu\text{g plant}^{-1}$) of **a)** Cd, **b)** S, **c)** Cl, and **d)** P in shoots of *T. praecox* plants treated with 100 μM or 300 μM of CdCl₂ or CdSO₄ (mean $\pm$ SE, control, $n=5$; treated, $n=10$). Different letters above the columns represent statistically significant difference, Duncan's test ($p<0.05$).

4.1.3 Porazdelitev Cd, S, Cl in P v listih *T. praecox*

Porazdelitev elementov Cd, S, Cl in P smo ugotavljali na zrelih listih ranega mošnjaka, pri rastlinah, ki so bile izpostavljene Cd. Natančneje, pri vseh 4 izpostavitvah Cd smo preučili porazdelitev izbranih elementov v tkivih povrhnjice, mezofila in floema, pri povrhnjici in mezofilu pa smo podrobneje preučili še porazdelitev teh elementov med apoplastom in simplastom. Podrobneje bomo prikazali porazdelitvene mape ter kolokalizacijo elementov Cd-S, Cd-Cl ter Cd-P v epidermisu in mezofilu rastlin izpostavljenih 300 μM CdSO_4 ter v mezofilu rastlin izpostavljenih 300 μM CdCl_2 , saj je bila pri 300 μM CdCl_2 porazdelitev elementov v epidermisu identična kot pri 300 μM CdSO_4 .

V listih rastlin, izpostavljenih 300 μM Cd, smo izmerili večje koncentracije Cd kot pri rastlinah 100 μM Cd, kar je razvidno iz **Pregl. 1** in iz porazdelitvenih map (**Slike 10d-f**). Pričakovano to ustreza rezultatom analize skupnega Cd v poganjkih (**Slika 9a**). Pri vseh izpostavitvah se je Cd večinoma nahajal v velikih vakuolariziranih epidermalnih celicah. Pri rastlinah, izpostavljenih 300 CdSO_4 se je v relativno velikih koncentracijah nahajal tudi v apoplastu epidermalnih celic (**Pregl. 1**). Razmerje Cd simplast/apoplast v epidermisu nakazuje na to, da je koncentracija Cd v simplastu naraščala z večanjem Cd v HR ter da je bila le-te večja pri rastlinah CdCl_2 kot pri rastlinah CdSO_4 (**Pregl. 1**).

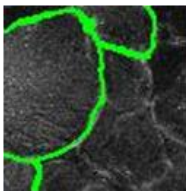
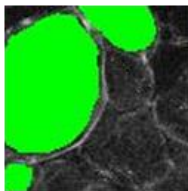
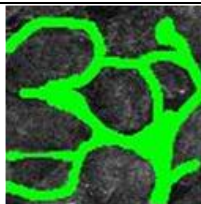
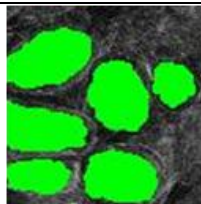
Porazdelitev Cd v stebričastem mezofilu lista se je razlikovala med rastlinami izpostavljenimi CdCl_2 in CdSO_4 (**Sliki 10e in f**). Razmerje porazdelitve Cd simplast/apoplast nakazuje, da se je pri rastlinah, izpostavljenih CdCl_2 , kadmij pretežno nahajal v simplastu, pri rastlinah, izpostavljenih CdSO_4 , pa v apoplastu (**Pregl. 1**). Pri obeh izpostavitvah CdSO_4 se je Cd nalagal v apoplastni prostor v obliki lokalnih depozitov, ki so bili bogati s P in S (mape prikazane le za 300 μM CdSO_4 ; **Slike 10f, l in o**).

Najmanjše koncentracije S v listih smo izmerili pri rastlinah izpostavitve 100 μM CdCl_2 in najvišje pri 300 μM CdSO_4 (**Pregl. 1, Slike 10g-i**), kar je v skladu z izmerjenimi skupnimi koncentracijami S v poganjkih (**Slika 9b**). V epidermisu so bile koncentracije S večje v apoplastu rastlin obeh izpostavitv CdCl_2 (**Pregl. 1**). V nasprotju s tem se je pri rastlinah 100 μM CdSO_4 večji del žvepla nahajal v simplastu, medtem ko je bil pri rastlinah 300 μM CdSO_4 večji delež S v apoplastu (**Pregl. 1**). Kljub izračunanemu razmerju simplast/apoplast, pa so bile absolutne koncentracije S v simplastu mnogo večje pri rastlinah 300 μM CdSO_4 , kot pri rastlinah 100 μM CdSO_4 (**Pregl. 1**).

Podobno kot v epidermisu, so bile koncentracije S v mezofilu neposredno odvisne od količine SO_4^{2-} dodanega v HR, pri čemer so bile v rastlinah CdCl_2 manjše koncentracije

Preglednica 1: Koncentracije Cd, S, Cl in P v ($\mu\text{g g}^{-1}$), izračunane iz kvantitativnih SR mikro-XRF map porazdelitve elementov med apoplastom in simplastom epidermisa ter mezofila ter razmerje simplast/apoplast (S/A), kar je na slikah reprezentativnih vzorcev označeno z zeleno barvo. Povprečje $\pm$ SE (v oklepajih), n=2-4.

Table 1: Concentrations of Cd, S, Cl, and P calculated from quantitative SR micro-XRF elemental distribution maps in apoplast and symplast of epidermis and mesophyll, and ratio symplast/apoplast (S/A), as shown in green in the images of representative samples of *T. praecox* leaf tissues. Mean $\pm$ SE (in parenthesis), n=2-4.

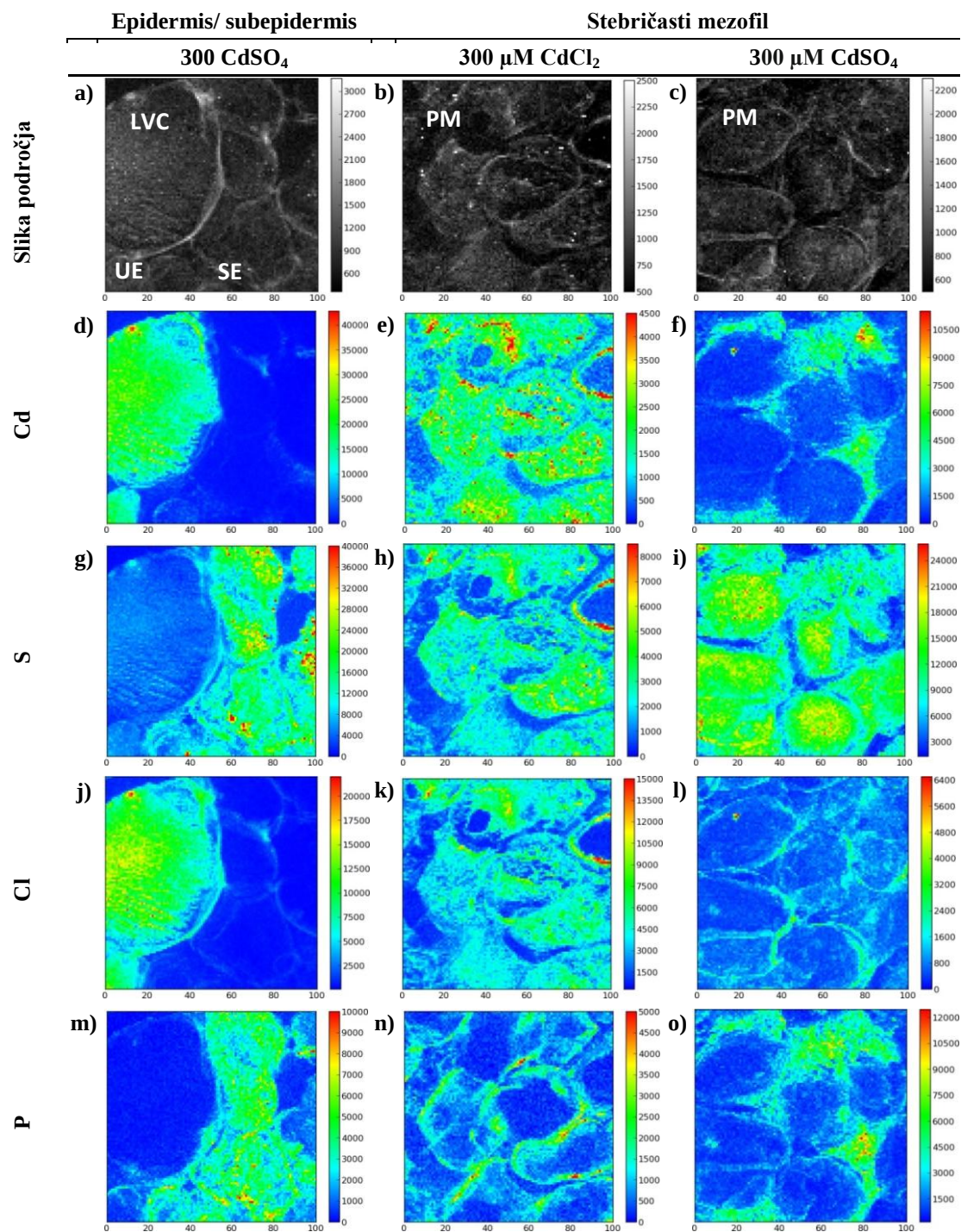
	Epidermis			Mezofil		
	Apoplast	Simplast	S/A	Apoplast	Simplast	S/A
El. Izpostavitvev						
Cd 100 CdCl ₂	1730 (250)	4900 (1700)	2,8	430 (151)	600 (200)	1,4
300 CdCl ₂	2080 (437)	7220 (1516)	3,4	1570 (518)	1960 (647)	1,2
100 CdSO ₄	1060 (350)	1250 (400)	1,2	1440 (650)	1070 (300)	0,7
300 CdSO ₄	6840 (970)	13900 (2502)	2,0	2100 (220)	835 (300)	0,4
S 100 CdCl ₂	410 (60)	320 (45)	0,8	810 (267)	340 (112)	0,4
300 CdCl ₂	1160 (290)	970 (243)	0,8	2550 (145)	2510 (90)	0,9
100 CdSO ₄	1060 (159)	1430 (215)	1,3	2480 (347)	2570 (360)	1,0
300 CdSO ₄	8080 (485)	6590 (395)	0,8	7550 (440)	8820 (640)	1,2
Cl 100 CdCl ₂	4800 (670)	5100 (710)	1,1	2090 (21)	1920 (19)	0,9
300 CdCl ₂	6780 (48)	7800 (65)	1,1	3908 (39)	4240 (42)	1,1
100 CdSO ₄	1140 (22)	870 (25)	0,7	1540 (15)	1180 (12)	0,7
300 CdSO ₄	4930 (730)	7900 (1180)	1,6	1390 (380)	830 (150)	0,6
P 100 CdCl ₂	820 (115)	600 (85)	0,7	1310 (432)	530 (175)	0,4
300 CdCl ₂	2170 (586)	1754 (474)	0,8	1300 (328)	620 (81)	0,5
100 CdSO ₄	1260 (378)	840 (252)	0,6	1210 (436)	578 (208)	0,5
300 CdSO ₄	2120 (430)	930 (251)	0,4	2610 (530)	1440 (430)	0,5

kot v rastlinah CdSO₄ (**Sliki 10h in i**). Delež S v simplastu je naraščal z večanjem Cd in S v HR, tako da smo izrazito velike koncentracije S izmerili v simplastu mezofila rastlin 300 μM CdSO₄ (**Pregl. 1**). Ob tem smo, kot že omenjeno pri porazdelitvi Cd, prav tako opazili depozite S v apoplastu (**Slika 10i**).

Največje koncentracije Cl smo izmerili v simplastu velikih vakuolariziranih celic v epidermisu (**Slika 10j**), skupaj z velikimi koncentracijami Cd (**Pregl. 1, Slika 10d**). V epidermisu rastlin izpostavljenih 100 μM CdSO₄ je prevladovalo nalaganje Cl v apoplast, medtem ko se je pri izpostavitvi 300 μM CdSO₄ klor ponovno nahajal v velikih koncentracijah v simplastu epidermisa (**Pregl. 1**). V mezofilu se je Cl pretežno

nahajal v apoplastu, z izjemo 300 μM CdCl_2 , kjer so se Cl v večjih koncentracijah nahajal v simplastu (**Pregl. 1, Sliki 10k in l**).

Fosfor se je pri vseh izpostavitvah večinoma nalagal v apoplastu epidermisa in mezofila (**Pregl. 1; Slike 10m-o**). V skladu z izmerjenimi celotnimi koncentracijami P v poganjkih (**Slika 9d**), so bile koncentracije P večje pri rastlinah izpostavljenih 300 μM Cd, pri čemer se je le-ta pretežno nalagal v apoplastu, še posebej izrazito pri rastlinah 300 μM CdSO_4 (**Pregl. 1**).



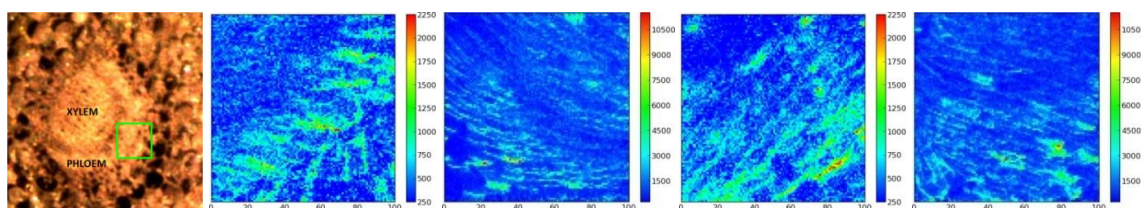
Slika 10: a-c) Slike površinske gostote vzorca ($\mu\text{g cm}^{-1}$) posnetih področij v listih in SR mikro-XRF porazdelitvene mape elementov ($100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$): d-f) Cd, g-f) S, j-l) Cd in m-o) P posnete v področju zgornjega epidermisa/sub-epidermisa rastlin $300 \mu\text{M CdSO}_4$ (1. stolpec) ter stebričastega mezofila listov $300 \mu\text{M CdCl}_2$ (2. stolpec) in $300 \mu\text{M CdSO}_4$ (3. stolpec) rastlin ranega mošnjaka (*T. praecox*). UE-zg. epidermis, LVC-velika vakuolarizirana epidermalna celica, SE-sub-epidermis, PM-palisadni mezofil.

Figure 10: a-c) Picture of areal density of the sample on recorded areas in leaves and SR micro-XRF distribution maps ($100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$) of d-f) Cd, g-f) S, j-l) Cd, and m-o) P recorded in epidermal/sub-epidermal region of $300 \mu\text{M CdSO}_4$ plants (1st column), palisade mesophyll of $300 \mu\text{M CdCl}_2$ (2nd column) and $300 \mu\text{M CdSO}_4$ (3rd column) *T. praecox* plants. UE-upper epidermis, LVC-large vacuolated cells, SE-sub-epidermis, PM-palisade mesophyll.

Koncentracije elementov smo prav tako pomerili v floemu, saj se le-te dober pokazatelj mobilne frakcije posameznega elementa. Največje koncentracije Cd so bile v rastlinah 300 μM Cd, pri čemer ni bilo razlik med rastlinami z dodanim CdCl_2 ali CdSO_4 v HR (**Pregl. 2**). Večje koncentracije Cl smo opazili pri rastlinah CdCl_2 , medtem ko pri porazdelitvi S ni bilo podobnega trenda (**Pregl. 2**). Zanimivo, višje koncentracije S smo opazili pri rastlinah 300 μM CdCl_2 , kot pri rastlinah 300 μM CdSO_4 . V floemu rastlin CdSO_4 smo pri obeh koncentracijah opazili porast koncentracije P v primerjavi z le-to pri rastlinah CdCl_2 (**Pregl. 2**).

Preglednica 2: Koncentracije kadmija (Cd), žvepla (S), klora (Cl) in fosforja (P), izračunane iz kvantitativnih SR mikro-XRF map porazdelitve elementov v področju floema in deleži ligandov Cd-žveplo in Cd-kisik, izračunani iz spektrov Cd- L_3 mikro-XANES po modeliranju z linearno kombinacijo. Mape predstavljajo kvantitativno porazdelitev Cd v področju floema, mapirano v prečnem prerezu lista *T. praecox*, kot je označeno na mikroskopski sliki levo zgoraj. Povprečje $\pm$ SE (v oklepajih), $n = 2$.

Table 2: Concentrations of cadmium (Cd), sulphur (S), chlorine (Cl), and phosphorus (P) calculated from quantitative SR mikro-XRF elemental distribution maps in phloem region, and the proportions of Cd-sulphur and Cd-oxygen ligands. Maps represent quantitative distributions of Cd in phloem region mapped in the *N. praecox* leaf cross-section as indicated in video-image (upper left). Mean $\pm$ SE (in parenthesis), $n=2$.



Konc. elementa

($\mu\text{g g}^{-1}$)/
izpostavitev

	100 CdCl_2	300 CdCl_2	100 CdSO_4	300 CdSO_4
Cd	530 (100)	1310 (200)	540 (60)	1320 (200)
S	2000 (230)	3900 (720)	2300 (350)	2020 (290)
Cl	3480 (460)	3100 (440)	1000 (140)	1500 (200)
P	3980 (460)	5340 (660)	5740 (800)	10800 (1410)
Cd S-ligandi (%)	37	23	8	13
Cd O- ligandi (%)	63	77	92	87
Cd S/O-ligandi	0,59	0,30	0,09	0,15

4.1.4 Analize kolokalizacije elementov na celičnem nivoju

Za ugotavljanje možnih soodvisnosti v porazdelitvi Cd, S, Cl in P, so bile na osnovi podatkov o porazdelitvi teh elementov izvedene analize kolokalizacije. Iz porazdelitvenih map je bil na izbranih področjih (le-ta so prikazana v **Pregl. 1**) za posamezne pare izbranih elementov kolokalizacije izračunan Pearsonov korelacijski koeficient (r) (**Pregl. 3**), prekrivanja Cd-Cl in Cd-S pa so prikazana na **Sliki 11**.

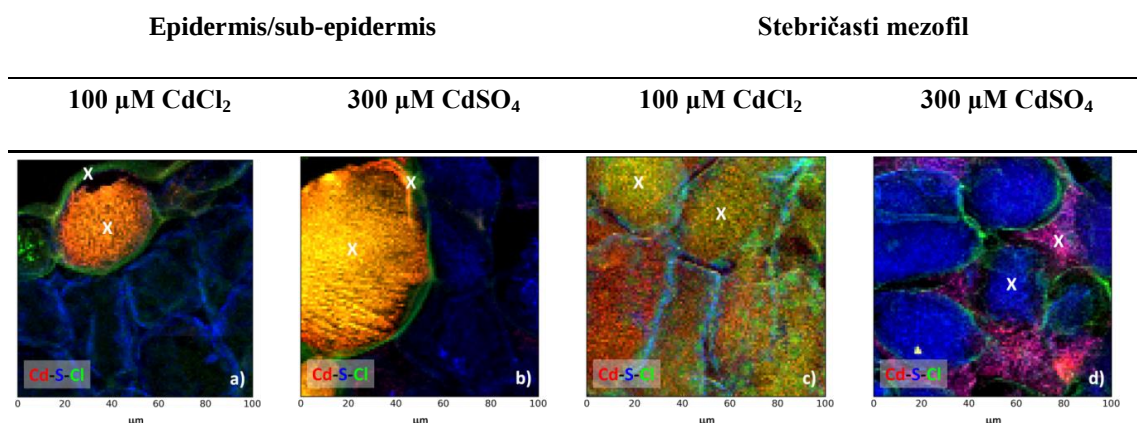
V epidermisu je bil kadmij v simplastu in apoplastu rastlin vseh izpostavitvev kolokaliziran s Cl, kar se vidi na kvantitativnih porazdelitvenih mapah s prekrivanjem podatkov za Cd, S in Cl (**Sliki 11a in b**; prekrivanje Cd-Cl je označeno z rumeno) ter kar potrjujejo izračunani Pearsonovi korelacijski koeficienti (z izjemo apoplasta 100 CdSO₄; **Pregl. 3**). Na podlagi Pearsonovih korelacijskih koeficientov smo kolokalizacijo Cd in S v epidermisu potrdili le v simplastu rastlin izpostavljenih 300 µM CdSO₄. Pri izpostavitvi CdCl₂ smo med P in Cd izračunali pozitivno kolokalizacijo v apoplastu epidermisa, medtem ko pri CdSO₄ nismo ugotovili nikakršne kolokalizacije (**Pregl. 3**).

V mezofilu vseh izpostavitvev smo ugotovili kolokalizacijo Cd in Cl v simplastu (**Pregl. 3**), v apoplastu mezofila pa smo ugotovili kolokalizacijo Cd s Cl le pri izpostavitvi 300 µM CdCl₂. Kolokalizacijo Cd s S v apoplastu in simplastu mezofila smo ugotovili le pri izpostavitvah 300 µM CdSO₄ in 300 µM CdCl₂. Zanimivo je, da smo pri rastlinah, izpostavljenih CdSO₄ opazili močno kolokalizacijo med Cd in P v apoplastu (v medceličnih prostorih), kar je bilo posebej izrazito pri izpostavitvi 300 µM CdSO₄ (r=0,79; **Pregl. 3**). V mezofilu rastlin izpostavljenih 100 µM CdCl₂ na podlagi Pearsonovega korelacijskega koeficienta (**Pregl. 3**) nismo ugotovili kolokalizacije med Cd in P, medtem ko je bila le-ta opazna na kolokalizacijskih mapah le v nekaterih predelih apoplasta pri izpostavitvi 300 µM CdCl₂ (**Pril. A**).

Preglednica 3: Pearsonovi korelacijski koeficienti (r) izračunani za korelacije med Cd ter S, Cl in P v apoplastu in simplastu epidermalnega tkiva in mezofila pri 100 in 300 µM CdCl₂ ter 100 in 300 µM CdSO₄, kot je označeno v **Pregl 1**.

Table 3: Pearson's correlation coefficients calculated for correlations between Cd and S, Cl in P in apoplast and simplast of epidermis and mesophyll at 100 and 300 µM CdCl₂, 100 and 300 µM CdSO₄ as marked in **Table 1**.

	izpostavitve/ področje	100 CdCl ₂		300 CdCl ₂		100 CdSO ₄		300 CdSO ₄	
		epi	mezo	epi	mezo	epi	mezo	epi	mezo
Cd-S	apoplast	0,31	0,00	0,33	0,78	0,39	0,19	-0,57	0,42
	simplast	-0,03	-0,17	0,15	0,73	0,37	0,17	0,97	0,38
Cd-Cl	apoplast	0,74	-0,28	0,61	0,84	0,15	0,29	0,85	0,12
	simplast	0,92	0,34	0,82	0,82	0,50	0,41	0,96	0,62
Cd-P	apoplast	0,40	-0,26	0,42	-0,07	0,07	0,44	-0,26	0,79
	simplast	-0,33	-0,18	-0,24	-0,15	-0,13	0,13	0,00	-0,15



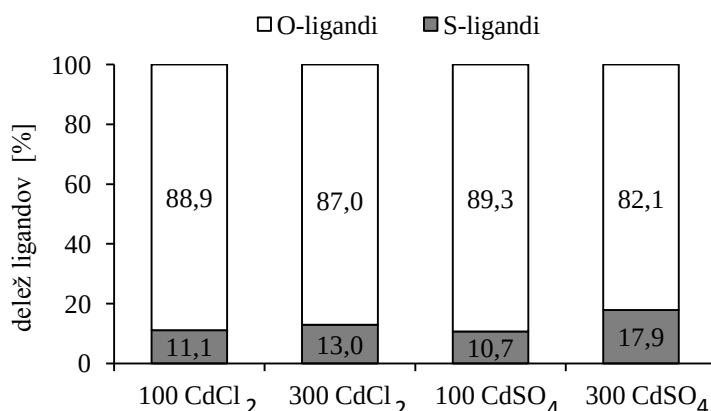
Slika 11: Kvantitativne SR mikro-XRF mape porazdelitve Cd (rdeča), S (modra) in Cl (zelena), posnete pri energiji 3,55 keV. Z rumeno barvo je prikazano prekrivanje Cd in Cl ter z vijolično prekrivanje Cd in S. **a)** epidermis rastlin izpostavljenih 100 μM CdCl_2 , **b)** epidermis rastlin izpostavljenih 300 μM CdSO_4 , **c)** mezofil rastlin izpostavljenih 100 μM CdCl_2 in **d)** mezofil rastlin izpostavljenih 300 μM CdSO_4 . Križci označujejo mesta, kjer so bili posneti mikro-XANES spektri na Cd- L_3 robu (Glej **Slika 13** in **Pril. A2**).

Figure 11: Quantitative SR micro-XRF distribution maps for Cd (red), S (blue), and Cl (green), recorded in *T. praecox* leaves. Yellow indicates overlap of Cd and Cl, and purple indicates overlap of Cd and S. **a)** Epidermis of plants treated with 100 μM of CdCl_2 , **b)** epidermis of plants treated with 300 μM of CdSO_4 , **c)** mesophyll of plants treated with 100 μM of CdCl_2 , and **d)** mesophyll of plants treated with 300 μM of CdSO_4 . Crosses indicate the points where Cd- L_3 edge micro-XANES spectra were recorded (Look at **Figure 13** and **Ann. A2**).

4.1.5 Vezavne oblike Cd v listih *T. praecox*

Analize vezavnih oblik smo nadaljevali na rastlinah, izpostavljenih Cd, saj v kontrolnih rastlinah ni bilo Cd. Na podlagi pomerjenih in analiziranih EXAFS spektrov smo ugotovili, da je bila pri vseh izpostavitvah večina Cd vezanega na O-ligande in le manjši delež na S-ligande. V drugi koordinacijski sferi pa smo zaznali atome C. Pri tem je potrebno poudariti, da podatki, pridobljeni pri tej EXAFS meritvi, predstavljajo vezavno obliko Cd na nivoju celega poganjka, ki vključuje mlade, zrele in stare liste.

Nekaj več Cd atomov je bilo vezanih na S-ligande pri rastlinah, izpostavljenih 300 μM Cd, kot pri rastlinah, izpostavljenih 100 μM Cd (**Slika 12**). Pri rastlinah, ki so bile izpostavljene 300 μM CdSO_4 , je bilo 5 % več S-ligandov kadmija kot pri rastlinah 300 μM CdCl_2 , medtem ko pri rastlinah obeh 100 μM Cd izpostavitvah ni bilo razlike med vezavnimi oblikami Cd (**Slika 12**).



Slika 12: Delež kadmijevih O- in S-ligandov v homogeniziranih poganjkih ranega mošnjaka (*T. praecox*).
Figure 12: Percentage of cadmium O- and S-ligands, in *T. praecox* homogenised shoot material.

4.1.6 Vezavne oblike Cd v listih *T. praecox* na sub-celičnem nivoju

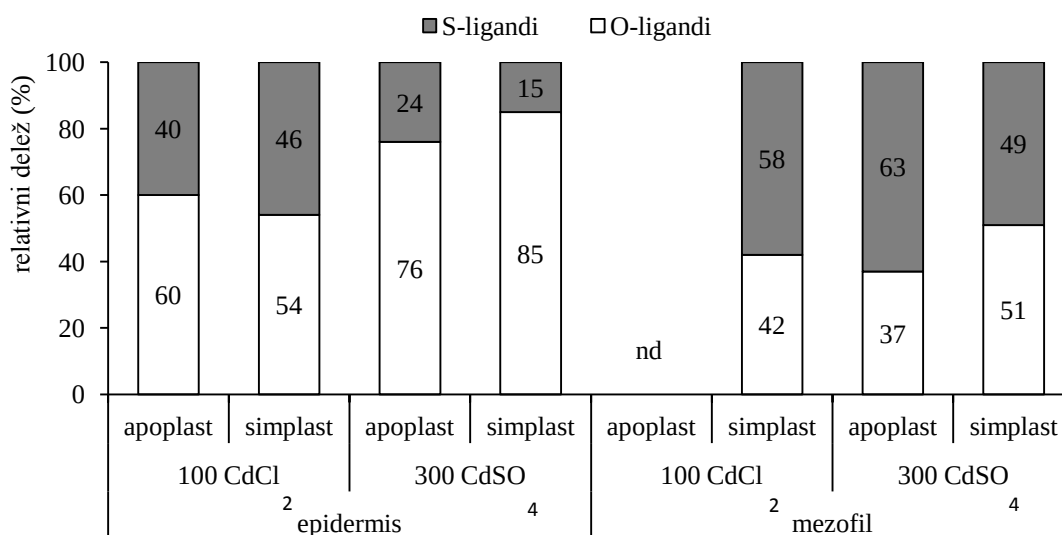
Po mapiranju smo v apoplastu in simplastu posneli mikro-XANES spektre na Cd L₃-robu na mestih, bogatih s Cd. Le-ta smo izbrali na področju epidermalnih celic in celic mezofila rastlin, izpostavljenih 100 μM CdCl₂ in 300 μM CdSO₄ (**Slika 11a-d**, označeno s križci) ter v področju žile v floemu vseh štirih izpostavitvev (**Pregl. 2**).

V vseh primerih smo, po linearni kombinaciji fitanja spektrov z znanimi spojinami Cd-ligandov (referenčni Cd standardi; **Pril. A2**), dobili najboljše ujemanje s spektrom Cd-glutaciona (koordinacija Cd-S-C-R) in s spektrom Cd-pektina (koordinacija Cd-O-C-R). Pri vseh izpostavitvah je bil Cd vezan na kisikove (O-) in žveplove (S-) ligande (**Slika 13**), kot je že bilo ugotovljeno pri EXAFS meritvah na Cd K-robu (**Slika 12**). Tukaj pridobljeni mikro-XANES spektri na Cd L₃-robu pa predstavljajo vezavno obliko Cd na sub-celičnem nivoju, natančneje na mestih prečnih prereзов listov, obogatenih s Cd.

V epidermalnih celicah so prevladovali O-ligandi tako v vakuolah, kot v apoplastu, čeprav je bil delež S-ligandov večji pri rastlinah 100 μM CdCl₂ kot pri 300 μM CdSO₄ (**Slika 13**). V simplastu mezofilnih celic rastlin 100 μM CdCl₂ je bil delež S-ligandov večji, kot delež O-ligandov (**Slika 13**), medtem ko v apoplastu nismo mogli posneti mikro-XANES spektrov na Cd L₃-robu, zaradi prenizkih koncentracij Cd. V simplastu mezofila rastlin 300 μM CdSO₄ sta bila deleža S- in O-ligandov bolj ali manj enaka (**Slika 13**), medtem ko so v apoplastu mezofila rastlin 300 μM CdSO₄ ob največjih akumuliranih koncentracijah Cd, močno prevladoval delež S-ligandov.

Četudi smo izračunali močno kolokalizacijo Cd in P v apoplastu mezofila rastlin izpostavljenih 300 μM CdSO₄, pa koordinacija Cd-O-P nismo potrdili.

Vezavne oblike Cd smo preučili tudi v floemu (**Pregl. 2, Pril. A2, Slika 13**). Ne glede na koncentracijo Cd, je bilo več S-ligandov v floemu rastlin izpostavljenih CdCl₂, kot pa pri rastlinah, izpostavljenih CdSO₄ (**Pregl. 2**). To se ujema z izmerjenimi večjimi koncentracijami S (iz kvantitativnih SR mikro-XRF porazdelitvenih map za to regijo) pri 300 µM CdCl₂, kot pri 300 µM CdSO₄ (**Pregl. 2**).



Slika 13: Delež O- in S-ligandov v apoplastu in simplastu izbranih tkiv rastlin ranega mošnjaka (*T. praecox*) izpostavljenih 100 µM CdCl₂ in 300 µM CdSO₄. nd-ni določeno

Figure 13: Percentage of O- and S-ligands in apoplast and symplast of *T. praecox* plants treated with 100 µM of CdCl₂ and 300 µM of CdSO₄. nd-not determined

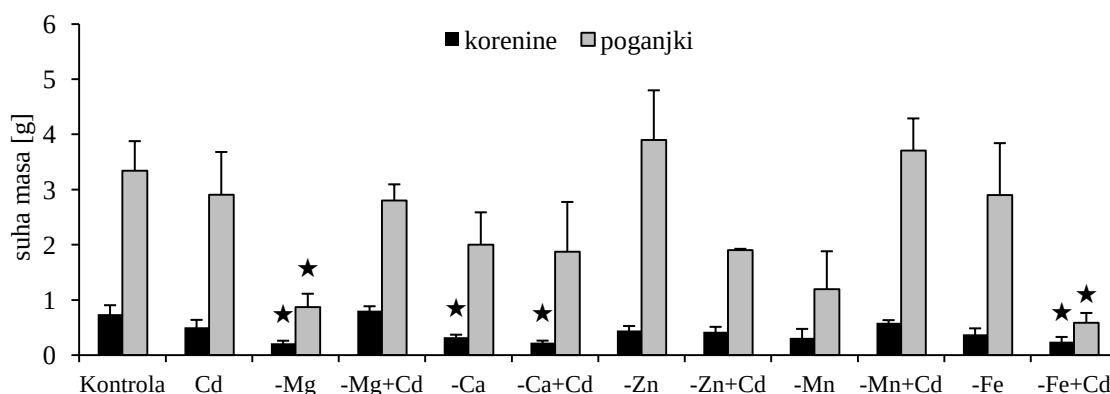
4.2 VPLIV Cd IN POMANJKANJA Mg, Ca, Zn, Fe in Mn NA PRIVZEM Cd IN NEKATERIH ESENCIALNIH MINERALNIH HRANIL

Rani mošnjak smo gojili v hranilnih raztopinah s pomanjkanjem določenih mineralnih hranil (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe) ter ob istem pomanjkanju z dodatkom 150 μM CdSO_4 (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd) ter jih primerjali z rastlinami, gojenimi v navadni hranilni raztopini ter z rastlinami, izpostavljenimi 150 μM Cd (Cd). Po koncu poskusa smo določili rastne parametre, pomerili potencialno in dejansko fotokemično učinkovitost rastlin, izmerili koncentracijo nekaterih esencialnih elementov ter Cd v koreninah in poganjkih ter izračunali translokacijske faktorje za posamezne elemente. Podatke smo analizirali s pomočjo linearne regresije, klastrske analize in NMDS, nato pa smo pri rastlinah, pri katerih smo opazili največja odstopanja od kontrole, podrobneje preučili elementno porazdelitev na tkivnem nivoju na prečnih prerezi listov z metodo mikro-PIXE in analizo LDA.

4.2.1 Rast rastlin ter vpliv na pigmente in fotokemično učinkovitost

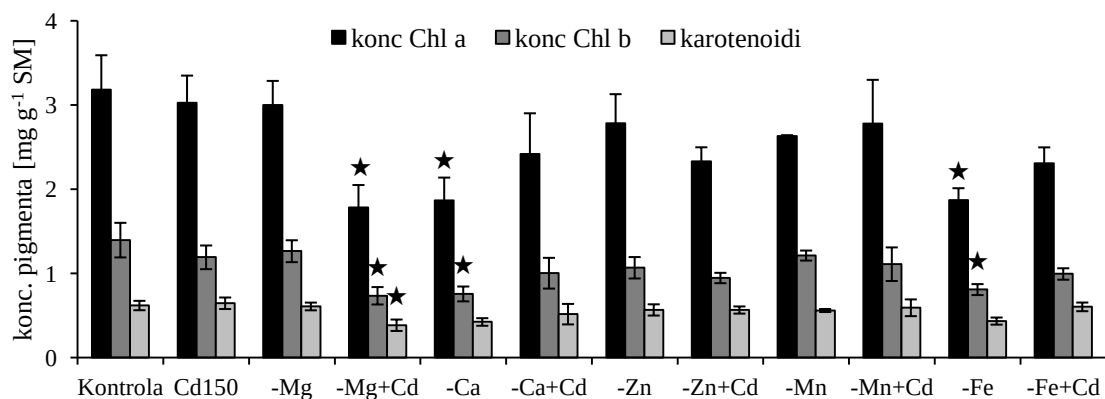
Po tehtanju liofiliziranega rastlinskega materiala smo zabeležili kar veliko variabilnost rastlin, zato smo pri primerjanju rastlin zaznali le nekaj statistično značilnih odstopanj v masi korenin oz. poganjkov od kontrole. Tako smo, v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, zabeležili zmanjšanje SM korenin in poganjkov rastlin, ki so rasle v pomanjkanju -Mg ter zmanjšanje korenin rastlin, ki so rastle pri pomanjkanju -Ca (**Slika 14**). Od rastlin, ki so rastle pri hkratnem pomanjkanju določenega elementa in dodatku Cd, smo zabeležili značilno zmanjšanje korenin in poganjkov pri -Fe+Cd in zmanjšanje SM korenin pri -Ca+Cd (**Slika 14**). Rastline, ki so rastle le ob dodatku 150 μM Cd, so imele primerljivo SM korenin in poganjkov, kot kontrolne rastline (**Slika 14**).

Z meritvijo koncentracije klorofila a (Chl a), klorofila b (Chl b) in karotenoidov ter potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti smo ocenili vpliv pomanjkanja oz. pomanjkanja in dodatka Cd na fotosintezo rastlin. Ugotovili smo, da so imele le rastline tretmaja -Mg+Cd hkrati značilno zmanjšane koncentracije Chl a, Chl b in karotenoidov (**Slika 15**). Med ostalimi tretmaji so imele rastline značilno zmanjšane koncentracije Chl a in Chl b le še rastline -Ca in -Fe (**Slika 15**). V primerjavi s kontrolo so imele le rastline -Zn+Cd in -Fe+Cd znatno zmanjšano potencialno in fotokemično učinkovitost, navkljub statistično neznačilnim zmanjšanjem Chl a in Chl b. Potencialna fotokemična učinkovitost vseh ostalih rastlin pa je bila primerljiva s kontrolo (vrednosti blizu 0,8), presenetljivo pa je bila dejanska fotokemična učinkovitost pri izpostavitvah -Mg+Cd in -Mn+Cd značilno povečana (**Slika 16**).



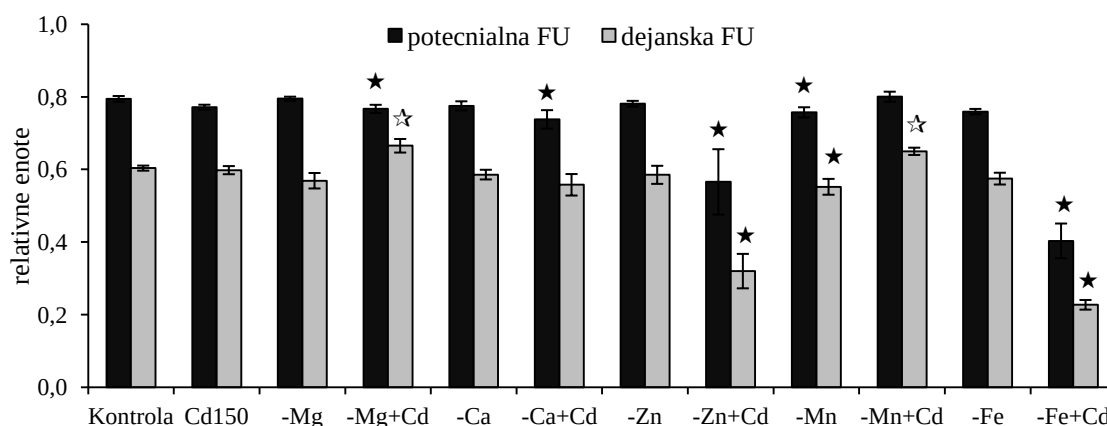
Slika 14: Suha masa [g] korenin in poganjkov ranega mošnjaka (*T. praecox*) po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), dodatkom 150 μM CdSO_4 (Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom 150 μM CdSO_4 (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd) (povprečje $\pm$ SE; $n=4-8$). Znaka ☆ (gor) in ★ (dol) nad stolpci označujeta statistično značilno razliko od kontrole pri primerjavi kontrole, Cd ter določenega para pomanjkanja in pomanjkanja z dodatkom Cd (Duncanov test, $p<0,05$).

Figure 14: Dry biomass [g] of shoots and roots of pennycress (*T. praecox*) after 8 weeks of growth in mineral solution with mineral deficiency of particular mineral (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), or addition of 150 μM CdSO_4 (Cd) or mineral deficiency of particular mineral with addition of 150 μM CdSO_4 (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd) (mean $\pm$ SE; $n=4-8$). Different symbols ☆ (up) in ★ (down) above columns represent statistically significant differences from control when comparing control, Cd and pair of particular mineral deficiency and mineral deficiency with addition of Cd (Duncan's test; $p<0,05$).



Slika 15: Koncentracije klorofila a, klorofila b in karotenoidov, izražene v mg g^{-1} SM poganjkov ranega mošnjaka (*T. praecox*) po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), dodatkom 150 μM CdSO_4 (Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom 150 μM CdSO_4 (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd) (povprečje $\pm$ SE; $n=4-8$). Znaka ☆ (gor) in ★ (dol) nad stolpci označujeta statistično značilno razliko od kontrole pri primerjanju kontrole, Cd ter določenega para pomanjkanja in pomanjkanja z dodatkom Cd (Duncanov test, $p<0,05$). Chl a-klorofil a, Chl b-klorofil b, SM-suha masa.

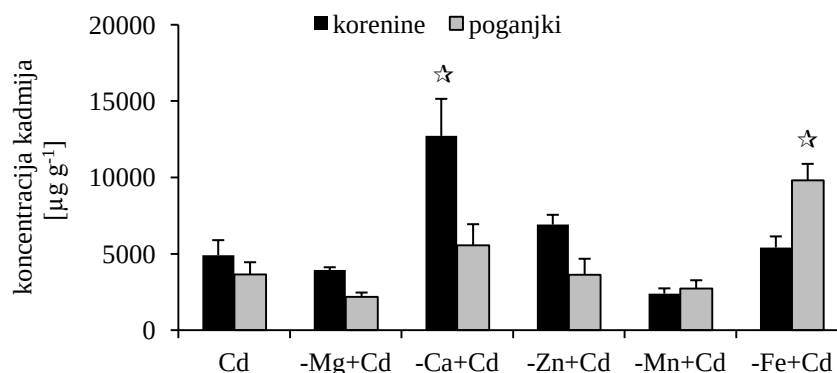
Figure 15: Concentrations of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids expressed in mg g^{-1} of dry shoot biomass of pennycress (*T. praecox*) after 8 weeks of growth in mineral solution with mineral deficiency of particular mineral (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), or addition of 150 μM CdSO_4 (Cd) or mineral deficiency of particular mineral with addition of 150 μM CdSO_4 (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd) (mean $\pm$ SE; $n=4-8$). Different symbols ☆ (up) in ★ (down) above columns represent statistically significant differences from control when comparing control, Cd and pair of particular mineral deficiency and mineral deficiency with addition of Cd (Duncan's test; $p<0,05$). Chl a-chlorophyll a, Chl b-chlorophyll b, SM-dry biomass.



Slika 16: Potencialna in dejanska fotokemična učinkovitost fotosistema 2 izraženi v relativnih enotah, merjeni po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), dodatkom 150 μM CdSO_4 (Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom 150 μM CdSO_4 (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd) (povprečje $\pm$ SE; $n=4-8$). Znaka ☆ (gor) in ★ (dol) nad stolpci označujeta statistično značilno razliko od kontrole pri primerjanju kontrole, Cd ter določenega para pomanjkanja in pomanjkanja z dodatkom Cd (Duncanov test, $p<0,05$). FU-fotokemična učinkovitost.

Figure 16: Potential and actual photochemical efficiency of photosystem 2 expressed in relative units, and after 8 weeks of growth in mineral solution with mineral deficiency of particular mineral (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), or addition of 150 μM CdSO_4 (Cd) or mineral deficiency of particular mineral with addition of 150 μM CdSO_4 (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd) (mean $\pm$ SE; $n=4-8$). Different symbols ☆ (up) in ★ (down) above columns represent statistically significant differences from control when comparing control, Cd and pair of particular mineral deficiency and mineral deficiency with addition of Cd (Duncan's test; $p<0,05$). FU-photochemical efficiency.

V liofiliziranih koreninah in poganjkih smo z metodo AAS pomerili koncentracije Cd. Nekaj Cd smo izmerili tudi v vseh vzorcih rastlin, ki niso bile izpostavljene Cd, a so bile te vrednosti v povprečju okoli 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ SM in zanemarljive v primerjavi z privzetimi koncentracijami Cd izpostavljenih rastlin, zato jih tukaj ne navajamo (**Slika 17**). Značilno povečanje koncentracije Cd v primerjavi z rastlinami, izpostavljenimi le 150 μM Cd smo izmerili le pri rastlinah -Ca+Cd, povečan privzem v poganjkih pa le pri rastlinah -Fe+Cd (**Slika 17**).



Slika 17: Koncentracije kadmija (Cd) v $\mu\text{g g}^{-1}$ SM korenin in poganjkov ranega mošnjaka (*T. praecox*) po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), dodatkom $150 \mu\text{M CdSO}_4$ (Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom $150 \mu\text{M CdSO}_4$ (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd) (povprečje $\pm$ SE; $n=4-8$). Znaka ☆ (gor) in ★ (dol) nad stolpci označujeta statistično značilno razliko od kontrole (Duncanov test, $p<0,05$).

Figure 17: Concentrations of cadmium (Cd) in roots and shoots of pennycress (*T. praecox*) after 8 weeks of growth in mineral solution with mineral deficiency of particular mineral (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), or addition of $150 \mu\text{M CdSO}_4$ (Cd) or mineral deficiency of particular mineral with addition of $150 \mu\text{M CdSO}_4$ (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd) (mean $\pm$ SE; $n=4-8$). Different symbols ☆ (up) in ★ (down) above columns represent statistically significant differences from control (Duncan's test; $p<0,05$).

4.2.2 Privzem esencialnih elementov in Cd v korenine in poganjke

V koreninah in poganjkih smo z metodo EDXRF določili koncentracije P, S, K, Ca Fe, Mn in Cu, z metodo AAS pa še Zn, Mg in Cd, nato pa izračunali še translokacijski faktor, razmerje porazdelitve koncentracij posameznih elementov med poganjki in koreninami (**Pregl. 4-6**). Pri ugotavljanju privzema izbranih mineralnih hranil in Cd smo ponovno iskali statistično značilne razlike pri primerjanju kontrole, Cd ter posameznega para pomanjkanja mineralnega hranila in pomanjkanja z dodatkom Cd.

Ugotovili smo, da je največ značilnih razlik med koncentracijami mikronutrientov v koreninah pri primerjavi s koncentracijami mikro- in makronutrientov v koreninah in poganjkih (**Pregl. 4 in 5**). Vsi tretmaji z dodanim Cd (Cd, -Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd) so imeli značilno več Fe v koreninah, izpostavitve Cd, -Mg+Cd, -Ca+Cd in -Fe+Cd pa tudi več Cu in Zn, le pri -Mn+Cd, -Fe+Cd pa manj Mn (**Pregl. 4**). V nasprotju s tem pa pri koncentracijah elementov v koreninah rastlin, ki so rastle le v pomanjkanju posameznih hranil, nismo opazili toliko odstopanj od kontrole. Tako smo pri -Mn izmerili pričakovano manj Mn v koreninah, česar pri ostalih zastavljenih pomanjkanjih nismo opazili (**Pregl. 4**). Pri poganjkih smo tako opazili le značilno manjšo koncentracijo Ca pri -Ca in -Ca+Cd rastlinah ter manjšo koncentracijo Mg v poganjkih -Mg+Cd rastlin (**Pregl. 5**), četudi so bile v hranilni raztopini ranega

mošnjaka koncentracije vseh mineralnih hranil v pomanjkanju zmanjšane na 1/3 le-teh v kontrolni hranilni raztopini.

Najbolje pa so spremembe v privzemu in prerazporeditvi izbranih mineralnih hranila in Cd med koreninami in poganjki pokazali izračunani translokacijski faktorji (TF). Pri makroelementih, razen pri S, Ca in K pri rastlinah, ki so rasle v pomanjkanju Fe, v TF ni bilo odstopanj od kontrole (**Pregl. 6**). Največ odstopanj od kontrole smo pri mikroelementih opazili pri TF za Cu, kjer je bil le-ta pri vseh izpostavitvah s Cd ter pri pomanjkanju Fe manjši od kontrole. Prav tako pa so pri vseh izpostavitvah s Cd, z izjemo –Mn+Cd, TF-ji za elementa Fe in Zn, manjši od kontrole (**Pregl. 6**).

Četudi torej pri rastlinah 150 μ M Cd še ni bilo sprememb v SM, v klorofilih ter v FU, pa so na nivoju mikroelementov že očitne spremembe v privzemu mineralnih elementov v korenine in s tem sprememb razmerja porazdelitve med poganjki in koreninami (**Slike 14-16, Pregl. 4-6**).

Preglednica 4: Koncentracije **a)** makroelementov in **b)** mikroelementov [$\mu\text{g g}^{-1}$ SM] v koreninah ranega mošnjaka (*T. praecox*) po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), dodatkom 150 μM CdSO_4 (Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom 150 μM CdSO_4 (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd) (povprečje $\pm$ SE; n=4-8). Modra (manjše) ali rdeča (večje) barva posameznega polja označuje statistično značilno razliko od kontrole (Duncanov test, $p < 0,05$).

Table 4: Concentrations of **a)** macronutrients and **b)** micronutrients [$\mu\text{g g}^{-1}$ SM] in roots of pennycress (*T. praecox*) after 8 weeks of growth in mineral solution with mineral deficiency of particular mineral (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), or addition of 150 μM CdSO_4 (Cd) or mineral deficiency of particular mineral with addition of 150 μM CdSO_4 (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd) (mean $\pm$ SE; n=4-8). Blue (lower) or red (higher) colour of some fields represent statistically significant differences from the control (Duncan's test; $p < 0,05$).

a)	P	S	K	Ca	Mg
Kontrola	8195 $\pm$ 980	5645 $\pm$ 668	28322 $\pm$ 8046	6437 $\pm$ 1386	1824 $\pm$ 133
Cd	7435 $\pm$ 1049	3970 $\pm$ 498	19850 $\pm$ 1171	5568 $\pm$ 608	3121 $\pm$ 400
-Mg	6404 $\pm$ 909	4097 $\pm$ 572	20919 $\pm$ 3298	5457 $\pm$ 1584	1273 $\pm$ 183
-Mg+Cd	4597 $\pm$ 528	2240 $\pm$ 399	13400 $\pm$ 808	5190 $\pm$ 214	1467 $\pm$ 34
-Ca	4713 $\pm$ 507	4053 $\pm$ 869	16477 $\pm$ 3853	3890 $\pm$ 424	2539 $\pm$ 165
-Ca+Cd	13067 $\pm$ 984	5730 $\pm$ 1176	23267 $\pm$ 2569	4677 $\pm$ 270	2356 $\pm$ 113
-Zn	8715 $\pm$ 695	6340 $\pm$ 1110	26000 $\pm$ 600	4825 $\pm$ 735	1773 $\pm$ 162
-Zn+Cd	9827 $\pm$ 1916	4367 $\pm$ 930	22933 $\pm$ 1288	7640 $\pm$ 1415	2732 $\pm$ 154
-Mn	6816 $\pm$ 831	5402 $\pm$ 838	17377 $\pm$ 788	5650 $\pm$ 1464	3445 $\pm$ 1741
-Mn+Cd	7825 $\pm$ 580	3720 $\pm$ 1128	12330 $\pm$ 3786	6760 $\pm$ 1528	4172 $\pm$ 178
-Fe	5527 $\pm$ 274	1577 $\pm$ 397	5113 $\pm$ 1094	13900 $\pm$ 1552	1764 $\pm$ 108
-Fe+Cd	7889 $\pm$ 1212	4897 $\pm$ 152	20556 $\pm$ 2539	5273 $\pm$ 277	1802 $\pm$ 216

b)	Mn	Fe	Cu	Zn
Kontrola	188 $\pm$ 41	1287 $\pm$ 373	196 $\pm$ 36	181 $\pm$ 38
Cd	106 $\pm$ 13	5738 $\pm$ 980	546 $\pm$ 75	913 $\pm$ 106
-Mg	155 $\pm$ 20	3281 $\pm$ 260	280 $\pm$ 11	343 $\pm$ 3
-Mg+Cd	144 $\pm$ 45	4670 $\pm$ 110	465 $\pm$ 75	576 $\pm$ 104
-Ca	220 $\pm$ 78	2230 $\pm$ 755	249 $\pm$ 14	657 $\pm$ 101
-Ca+Cd	163 $\pm$ 19	10613 $\pm$ 2485	1123 $\pm$ 218	1441 $\pm$ 321
-Zn	155 $\pm$ 10	1450 $\pm$ 390	100 $\pm$ 16	160 $\pm$ 26
-Zn+Cd	181 $\pm$ 28	5980 $\pm$ 811	231 $\pm$ 18	257 $\pm$ 9
-Mn	64 $\pm$ 17	2539 $\pm$ 1034	254 $\pm$ 57	315 $\pm$ 65
-Mn+Cd	33 $\pm$ 4	4710 $\pm$ 606	288 $\pm$ 38	340 $\pm$ 233
-Fe	305 $\pm$ 36	1717 $\pm$ 153	369 $\pm$ 12	352 $\pm$ 50
-Fe+Cd	43 $\pm$ 9	4466 $\pm$ 701	545 $\pm$ 189	1026 $\pm$ 185

Preglednica 5: Koncentracije **a)** makroelementov in **b)** mikroelementov [$\mu\text{g g}^{-1}$ SM] v poganjkih ranega mošnjaka (*T. praecox*) po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), dodatkom 150 μM CdSO₄ (Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom 150 μM CdSO₄ (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd) (povprečje $\pm$ SE; n=4-8). Modra (manjše) ali rdeča (večje) barva posameznega polja označuje statistično značilno razliko od kontrole (Duncanov test, $p < 0,05$).

Table 5: Concentrations of **a)** macronutrients and **b)** micronutrients [$\mu\text{g g}^{-1}$ SM] in shoots of pennycress (*T. praecox*) after 8 weeks of growth in mineral solution with mineral deficiency of particular mineral (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), or addition of 150 μM CdSO₄ (Cd) or mineral deficiency of particular mineral with addition of 150 μM CdSO₄ (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd) (mean $\pm$ SE; n=4-8). Blue (lower) or red (higher) colour of some fields represent statistically significant differences from control (Duncan's test; $p < 0,05$).

a)	P	S	K	Ca	Mg
Kontrola	1785 $\pm$ 192	2898 $\pm$ 237	17900 $\pm$ 1665	10615 $\pm$ 576	2662 $\pm$ 139
Cd	1923 $\pm$ 210	1870 $\pm$ 323	20300 $\pm$ 2249	7325 $\pm$ 1322	2891 $\pm$ 296
-Mg	1431 $\pm$ 450	2103 $\pm$ 158	16333 $\pm$ 1989	10550 $\pm$ 1228	2373 $\pm$ 453
-Mg+Cd	1505 $\pm$ 228	1120 $\pm$ 146	14067 $\pm$ 1277	4467 $\pm$ 779	1676 $\pm$ 218
-Ca	2000 $\pm$ 572	2783 $\pm$ 959	21900 $\pm$ 4543	4757 $\pm$ 917	2646 $\pm$ 172
-Ca+Cd	1796 $\pm$ 542	4237 $\pm$ 1818	29567 $\pm$ 8161	4510 $\pm$ 801	3592 $\pm$ 679
-Zn	950 $\pm$ 111	1795 $\pm$ 335	14450 $\pm$ 3050	7235 $\pm$ 1225	3150 $\pm$ 619
-Zn+Cd	1530 $\pm$ 171	2227 $\pm$ 462	22200 $\pm$ 3350	8367 $\pm$ 990	2989 $\pm$ 289
-Mn	1374 $\pm$ 292	2152 $\pm$ 236	14777 $\pm$ 417	7549 $\pm$ 57	2652 $\pm$ 334
-Mn+Cd	1210 $\pm$ 300	1775 $\pm$ 430	19867 $\pm$ 3414	7310 $\pm$ 1103	3179 $\pm$ 930
-Fe	1340 $\pm$ 179	2310 $\pm$ 376	17867 $\pm$ 3339	7303 $\pm$ 852	1950 $\pm$ 190
-Fe+Cd	1860 $\pm$ 168	2703 $\pm$ 775	30833 $\pm$ 8488	6560 $\pm$ 2440	4080 $\pm$ 605

b)	Mn	Fe	Cu	Zn
Kontrola	184 $\pm$ 48	429 $\pm$ 165	721 $\pm$ 196	957 $\pm$ 190
Cd	73 $\pm$ 3	160 $\pm$ 21	259 $\pm$ 35	475 $\pm$ 70
-Mg	167 $\pm$ 58	268 $\pm$ 88	846 $\pm$ 230	1059 $\pm$ 202
-Mg+Cd	75 $\pm$ 8	148 $\pm$ 36	263 $\pm$ 50	808 $\pm$ 58
-Ca	129 $\pm$ 35	419 $\pm$ 119	362 $\pm$ 51	558 $\pm$ 35
-Ca+Cd	114 $\pm$ 29	140 $\pm$ 25	417 $\pm$ 126	697 $\pm$ 191
-Zn	125 $\pm$ 42	176 $\pm$ 26	292 $\pm$ 130	637 $\pm$ 6
-Zn+Cd	79 $\pm$ 16	113 $\pm$ 7	146 $\pm$ 39	285 $\pm$ 72
-Mn	90 $\pm$ 2	254 $\pm$ 36	591 $\pm$ 122	765 $\pm$ 141
-Mn+Cd	36 $\pm$ 7	1023 $\pm$ 894	271 $\pm$ 42	711 $\pm$ 234
-Fe	118 $\pm$ 28	274 $\pm$ 168	368 $\pm$ 55	591 $\pm$ 162
-Fe+Cd	101 $\pm$ 17	131 $\pm$ 17	831 $\pm$ 151	892 $\pm$ 180

Preglednica 6: Translokacijski faktorji za makroelemente in mikroelemente pri ranem mošnjaku (*T. praecox*) po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), dodatkom 150 μM CdSO_4 (Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom 150 μM CdSO_4 (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd) (povprečje $\pm$ SE; n=4-8). Modra (manjše) ali rdeča (večje) barva posameznega polja označuje statistično značilno razliko od kontrole (Duncanov test, $p < 0,05$).

Table 6: Translocation factor for macronutrients and micronutrients at pennycress (*T. praecox*) after 8 weeks of growth in mineral solution with mineral deficiency of particular mineral (-Mg, -Ca, -Zn, -Mn, -Fe), or addition of 150 μM CdSO_4 (Cd) or mineral deficiency of particular mineral with addition of 150 μM CdSO_4 (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Zn+Cd, -Mn+Cd, -Fe+Cd) (mean $\pm$ SE; n=4-8). Blue (lower) or red (higher) colour of some fields represent statistically significant differences from control (Duncan's test; $p < 0,05$).

a)	P	S	K	Ca	Mg
Kontrola	0,22 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,07	1,21 $\pm$ 0,70	1,88 $\pm$ 0,37	1,50 $\pm$ 0,18
Cd150	0,27 $\pm$ 0,04	0,47 $\pm$ 0,05	1,01 $\pm$ 0,06	1,36 $\pm$ 0,27	1,03 $\pm$ 0,27
-Mg	0,23 $\pm$ 0,07	0,52 $\pm$ 0,04	0,80 $\pm$ 0,07	2,34 $\pm$ 0,70	1,92 $\pm$ 0,43
-Mg+Cd	0,35 $\pm$ 0,09	0,57 $\pm$ 0,19	1,05 $\pm$ 0,04	0,85 $\pm$ 0,13	1,15 $\pm$ 0,16
-Ca	0,41 $\pm$ 0,08	0,73 $\pm$ 0,28	1,38 $\pm$ 0,16	1,30 $\pm$ 0,36	1,06 $\pm$ 0,12
-Ca+Cd	0,13 $\pm$ 0,03	0,72 $\pm$ 0,27	1,24 $\pm$ 0,31	0,99 $\pm$ 0,22	1,53 $\pm$ 0,30
-Zn	0,11 $\pm$ 0,00	0,28 $\pm$ 0,00	0,55 $\pm$ 0,10	1,57 $\pm$ 0,49	1,82 $\pm$ 0,52
-Zn+Cd	0,18 $\pm$ 0,06	0,55 $\pm$ 0,13	0,98 $\pm$ 0,16	1,18 $\pm$ 0,25	1,09 $\pm$ 0,08
-Mn	0,21 $\pm$ 0,05	0,42 $\pm$ 0,08	0,86 $\pm$ 0,06	1,61 $\pm$ 0,53	1,26 $\pm$ 0,49
-Mn+Cd	0,16 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,29	2,46 $\pm$ 1,39	1,25 $\pm$ 0,36	0,77 $\pm$ 0,22
-Fe	0,24 $\pm$ 0,04	1,53 $\pm$ 0,18	4,19 $\pm$ 1,76	0,54 $\pm$ 0,07	1,11 $\pm$ 0,12
-Fe+Cd	0,24 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,17	1,46 $\pm$ 0,29	1,21 $\pm$ 0,40	2,37 $\pm$ 0,52

b)	Mn	Fe	Cu	Zn
Kontrola	0,98 $\pm$ 0,20	0,32 $\pm$ 0,10	3,58 $\pm$ 0,58	5,59 $\pm$ 0,93
Cd150	0,73 $\pm$ 0,12	0,03 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,05	0,54 $\pm$ 0,09
-Mg	1,07 $\pm$ 0,32	0,09 $\pm$ 0,03	3,10 $\pm$ 0,92	3,10 $\pm$ 0,60
-Mg+Cd	0,61 $\pm$ 0,15	0,03 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,10	1,48 $\pm$ 0,20
-Ca	0,62 $\pm$ 0,05	0,26 $\pm$ 0,11	1,47 $\pm$ 0,24	0,90 $\pm$ 0,16
-Ca+Cd	0,75 $\pm$ 0,23	0,02 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,14	0,55 $\pm$ 0,19
-Zn	0,83 $\pm$ 0,32	0,14 $\pm$ 0,05	2,77 $\pm$ 0,85	4,08 $\pm$ 0,69
-Zn+Cd	0,46 $\pm$ 0,10	0,02 $\pm$ 0,00	0,64 $\pm$ 0,16	1,10 $\pm$ 0,26
-Mn	1,63 $\pm$ 0,44	0,12 $\pm$ 0,04	2,42 $\pm$ 0,49	2,54 $\pm$ 0,56
-Mn+Cd	1,19 $\pm$ 0,37	0,22 $\pm$ 0,19	1,01 $\pm$ 0,28	5,27 $\pm$ 2,61
-Fe	0,40 $\pm$ 0,13	0,16 $\pm$ 0,10	0,99 $\pm$ 0,12	1,62 $\pm$ 0,31
-Fe+Cd	2,45 $\pm$ 0,23	0,03 $\pm$ 0,00	1,84 $\pm$ 0,53	0,90 $\pm$ 0,16

4.2.3 Vpliv sprememb v mineralni prehrani na rastlinski ionom ter na spremembe fizioloških parametrov

Vplive rasti rastlin v različnih kombinacijah pomanjkanja posameznih mineralnih hranil in dodatku Cd lahko povzamemo z rezultati analize linearne regresije, kjer lahko ugotovimo ali sprememba v mineralni prehrani (pomanjkanje določenega nutrienta, dodatek Cd) vpliva na določen rastni parameter oz. na koncentracijo posameznih mineralnih hranil v koreninah, poganjkih in posledično morda tudi na translokacijski faktor. Nato smo izvedli še klastersko analizo in analizo nMDS, kjer smo raziskali podobnosti v ionomu in izmerjenimi rastnimi parametri rastlin, ki so rastle v pomanjkanju ter podobnosti rastlin, ki so rastle ob prisotnosti Cd.

Preglednica 7: Rezultati analize linearne regresije za SM korenin in poganjkov, pigmentov ter dejanska in potencialno FU. Pobarvana polja pomenijo statistično značilen vpliv faktorja (pomanjkanje določenega elementa ali dodatek 150 μM Cd v HR pri posamezni primerjavi kontrole, Cd ter para pomanjkanja in pomanjkanja s Cd), modra barva pomeni negativen, rdeča barva pa pozitiven vpliv spremenljivke na izbrani parameter ($p < 0,05$). SM-suha masa, Chl a-klorofil a, Chl b-klorofil b.

Table 7: Linear regression analysis results for dry biomass of roots and shoots, pigments, and potential and actual photochemical efficiency. Coloured fields means statistically significant influence of the factor (element deficiency or supplementation with 150 μM Cd when comparing control, Cd and pair of particular mineral deficiency and mineral deficiency with addition of Cd), blue represents negative, and red represents positive influence of variable on selected parameter ($p < 0,05$). SM-dry mass, Chl a-chlorophyll a, Chl b-chlorophyll b.

Element\tretma		Mg		Ca		Zn		Fe		Mn	
		Mg	Cd	Ca	Cd	Zn	Cd	Fe	Cd	Mn	Cd
rastni odziv rastlina	SM korenin										
	SM poganjkov										
	Chl a										
	Chl b										
	karotenoidi										
	dejanska FU										
	potencialna FU										

Ugotovili smo, da je Cd značilno negativno vplival le na potencialno in/ali dejansko FU pri rastlinah, ki so rasle v kombinaciji s pomanjkanjem Mg, Ca, Zn in Fe, pri Zn in Fe pa je na FU vplivalo že samo pomanjkanje tega elementa (**Pregl. 7**), kot pa smo že omenili (Glej poglavje 4.2.1. Rast rastlin...), pa smo znatno zmanjšano potencialno in dejansko FU glede na vitalno kontrolo izmerili le pri $-\text{Zn}+\text{Cd}$ in $-\text{Fe}+\text{Cd}$. Pomanjkanje Ca v HR je negativno vplivalo na koncentracijo Chl a, Chl b in karotenoidov, pomanjkanje Fe pa na koncentracijo Chl a in Chl b (**Pregl. 7**). Pri rastlinah, ki so rastle v kombinaciji s pomanjkanjem Mn, pa nismo opazili nobenih značilnih vplivov koncentracije Mn ali Cd v HR (**Pregl. 7**).

Iz **Pregl. 8** je razvidno, da so koncentracije pomerjenih makro- in mikroelementov v koreninah bolj odvisne od sprememb v HR kot koncentracije teh elementov v poganjkih. Izkazalo se je, da Cd vpliva na več elementov, v primerjavi s pomanjkanjem določenega mineralnega hranila, in to predvsem na koncentracije mikroelementov. Natančneje, iz **Pregl. 8** lahko razberemo, da je Cd v koreninah pri vseh kombinacijah pomanjkanja in dodatka Cd pozitivno vplival na koncentracijo Fe, Cu in Zn, ter na koncentracijo samega Cd, pri kombinacijah s pomanjkanjem Mg, Zn in Fe pa je vplival tudi na povečanje koncentracije Mg v koreninah. Podoben vzorec nato opazimo v poganjkih le še pri kombinacijah s pomanjkanjem Mg, Zn in Mn, kjer pa je Cd vplival na zmanjšanje koncentracije Mn, Cu ter na povečanje koncentracije Cd v poganjkih.

Kot že omenjeno pri **Pregl. 6**, lahko celovitejšo sliko dobimo iz izračunanih TF, ki predstavljajo povzetek dogajanja v koreninah in poganjkih (**Pregl. 8**). Ugotovili smo negativen vpliv Cd na TF za Cd v rastlinah pri pomanjkanju Mg, Ca in Zn, pri kombinacijah s pomanjkanjem Fe je opazen pozitiven vpliv pomanjkanja Fe na TF za Cd, pri kombinaciji s pomanjkanjem Mn pa nismo zabeležili značilnih vplivov na TF za Cd (**Pregl. 8**).

Preglednica 8: Rezultati analize linearne regresije za koncentracije elementov v koreninah, poganjkih ter za pripadajoče translokacijske faktorje. Pobarvana polja pomenijo statistično značilen vpliv faktorja (pomanjkanje določenega elementa ali dodatek 150 μM Cd v HR pri posamezni primerjavi kontrole, Cd ter para pomanjkanja in pomanjkanja s Cd), modra barva pomeni negativen, rdeča barva pa pozitiven vpliv spremenljivke na izbrani parameter ($p < 0,05$).

Table 8: Linear regression analysis results for concentrations of elements in roots, shoots and its corresponding translocation factor. Coloured fields means statistically significant influence of the factor (element deficiency or supplementation with 150 μM Cd when comparing control, Cd and pair of particular mineral deficiency and mineral deficiency with addition of Cd), blue represents negative, and red represents positive influence of variable on selected parameter ($p < 0,05$).

Element\faktor		Mg		Ca		Zn		Fe		Mn	
		Mg	Cd	Ca	Cd	Zn	Cd	Fe	Cd	Mn	Cd
korenine	P										
	S										
	Mg										
	K										
	Ca										
	Fe										
	Mn										
	Cu										
	Zn										
	Cd										
poganjki	P										
	S										
	Mg										
	K										
	Ca										
	Fe										
	Mn										
	Cu										
	Zn										
	Cd										
TF	P										
	S										
	Mg										
	K										
	Ca										
	Fe										
	Mn										
	Cu										
	Zn										
	Cd										

Na podlagi te analize smo tako ugotovili, da lahko glede na odziv rastlin na prisotnost Cd v HR razdelimo rastline na dve skupini. Tako smo namreč opazili podoben odziv v rastnih parametrih in koncentracijah elementov na prisotnost Cd pri rastlinah, ki so rasle ob pomanjkanju Ca in Fe ter drugačen odziv pri rastlinah, ki so rasle v pomanjkanju Mg, Zn in Mn, od teh pa pomanjkanje Mn še nekoliko odstopa od preostalih tretmajev (**Slike 14-17; Pregl. 6-8**).

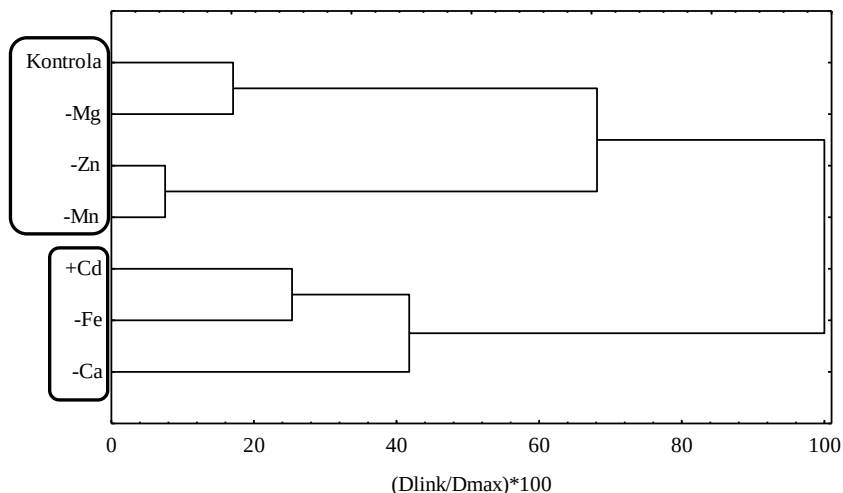
Na podlagi nemetričnega večrazsežnostnega lestvičenja nismo ugotovili izrazite grupacije podatkov posameznih tretmajev, saj so bile večinoma razlike znotraj tretmajev večje kot med posameznimi pari tretmajev (**Pril. B1**). Izrazitejšo grupacijo smo opazili le pri tretmaju –Fe+Cd, ki je bil precej odmaknjen od tretmaja Fe (podatki tukaj negrupirani), pri tretmaju –Zn+Cd pa smo že opazili prekrivanje s podatki tretmaja +Cd). Ti tretmaji so se najbolj izrazito ločili od ostalih po rastnih in biokemijskih parametrih, kot so suha masa in fotokemična učinkovitost PSII (**Sliki 14 in 16, Pregl. 7**).

S pomočjo klastrske analize po Wardovi metodi smo še dodatno izluščili podobnost v odzivu rastlin ob dodanem Cd v hranilni raztopini. Najprej smo poskušali ugotoviti, kako se grupirajo vsi tretmaji. Ugotovili smo, da se tretmaja –Ca+Cd in –Fe+Cd najbolj ločita od preostalih (**Pril. B2**). Nadalje smo izvedli podrobnejšo klastersko analizo na dveh skupinah tretmajev, tako da so bili v skupinah tretmaji, ki so imeli spremenjeno samo eno oz. dve sestavini hranilne skupine naenkrat, obakrat pa smo med podatke vključili tretma 150 μ M Cd, saj nas je za zanimala podobnost z ostalimi tretmaji. V prvo skupino smo tako vključili rastline kontrole, tretma +Cd in rastline, ki so rasle v pomanjkanju določenega minerala, v drugi skupini pa so bili vsi tretmaji s Cd.

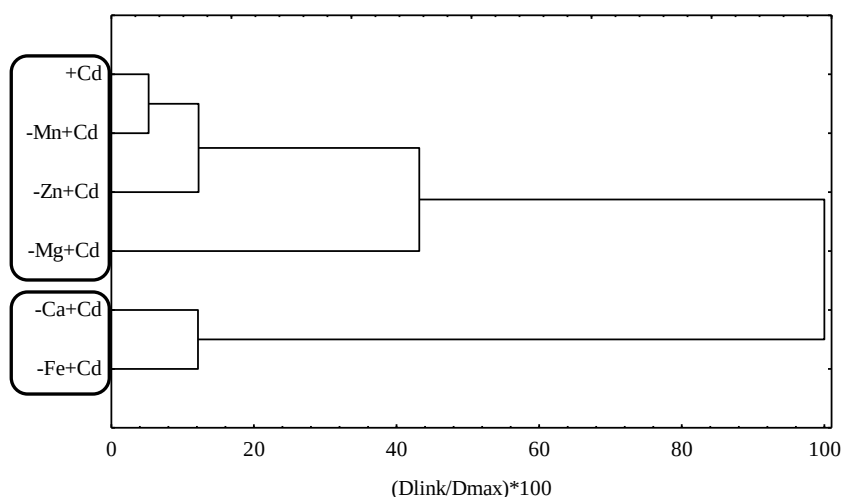
Glede na koncentracije vseh elementov v poganjkih in vseh izmerjenih rastnih parametrih, lahko rastline vseh izpostavitvev uvrstimo v eno izmed dveh skupin (**Sliki 18a in b**). Pri rastlinah, ki so rasle v pomanjkanju, opazimo skupino, v kateri so si najbolj podobne kontrola, -Mg, -Zn in Mn, v drugi skupini pa opazimo največjo podobnost med rastlinami, izpostavljenimi Cd ter rastlinami –Fe in –Ca (**Slika 18a**).

Pri primerjavi rastlin, ki so rasle v prisotnosti Cd ter v pomanjkanju z dodanim Cd opazimo isto oblikovanje skupin, saj sta si ponovno –Ca+Cd in –Fe+Cd najbolj podobna, v drugi skupini pa so rastline vseh ostalih izpostavitvev s Cd (**Slika 18b**).

a) Podobnosti med kontrolo, vsemi pomanjkanji in izpostavitvijo Cd



b) Podobnosti med vsemi izpostavitvami Cd



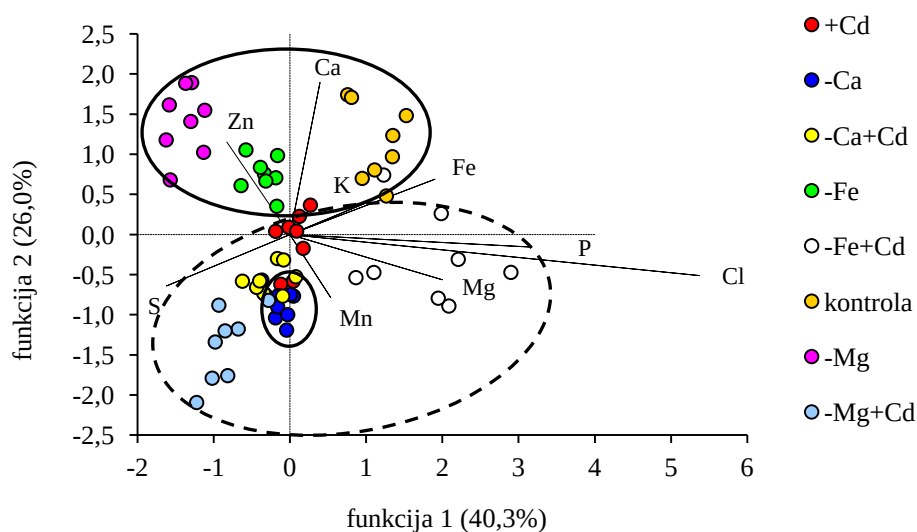
Slika 18: Diagram drevesaste strukture, ki kaže grupiranje rastlin *T. praecox* **a)** kontrole, rastlin ki so rastle v prisotnosti Cd ter vseh mineralnih pomanjkanj ter **b)** rastlin, ki so rasle v prisotnosti Cd ter v pomanjkanji z dodanim Cd. Analiza je bila opravljena z Wardovo metodo na podlagi koncentracij vseh pomerjenih elementov v poganjkih brez Cd ter vsemi izmerjenimi rastnimi parametri. Obkroženi so tretmaji, ki se grupirajo v dve ločeni skupini.

Figure 18: Tree diagram representing grouping of **a)** control plants, Cd treatment and all mineral deficiencies and, **b)** plants treated with Cd and all plants, grown in mineral deficiency with addition of Cd. The analysis was performed with Ward's method with the data on the concentrations of all measured elements without Cd and, all the measured growth parameters. The treatments that are separating in two distinguished groups are encircled.

4.2.4 Porazdelitev elementov na tkivnem nivoju z metodo mikro-PIXE

V nadaljevanju smo podrobneje preučili porazdelitev elementov z metodo mikro-PIXE. Zaradi največje podobnosti rastlin kontrole in rastlin, ki so rasle v pomanjkanju Mg (glede na **Slika 18**), smo podrobneje preučili porazdelitev elementov pri kontroli, -Mg, +Cd in -Mg+Cd, zaradi največjih odstopanj od kontrole pa smo podrobneje preučili še porazdelitev elementov pri tretmajih -Fe in -Fe+Cd ter porazdelitev elementov pri tretmajih -Ca in -Ca+Cd. Najprej smo pri izbranih tretmajih pomerili koncentracije Mg, P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe in Zn na lifiloziranih rezinah prečnih prerezih zrelih listov (**Pril. C1 in C2**) in naredili linearno diskriminantno analizo (LDA). Nato smo izračunali ter primerjali koncentracije Mg, Fe, Ca in Cd v posameznih listnih tkivih izbranih tretmajev. Pri rastlinah, ki niso bile izpostavljene Cd, ne navajamo koncentracij le-tega, saj so bile le-te pod mejo detekcije metode. Prav tako smo pri omenjenih izbranih tretmajih naredili linearno diskriminantno analizo.

Na podlagi LDA lahko s funkcijo 1 in 2 pojasnimo 66,3 % skupne variabilnosti (**Slika 19, Pril. B3**). Pri tem opazimo, da so se na podlagi koncentracije Ca, Zn, K in Fe zgrupirali tretmaji -Mg, -Fe in kontrola. Tretmaji, ki so rastli v pomanjkanju in hkratnem dodatku Cd pa so se zgrupirali v drugo skupino, z izjemo tretmaja -Ca. Tretmaja -Ca in -Ca+Cd sta namreč grupirana zelo blizu skupaj in blizu +Cd, kar pomeni, da ima samo pomanjkanje Ca na tkivnem nivoju podoben učinek kot le dodatek Cd. Kot že na organskem nivoju, smo tudi tukaj opazili ločenost tretmaja -Fe+Cd od ostalih na podlagi koncentracije Mg, pa tudi Fe, Cl, P in Mn.



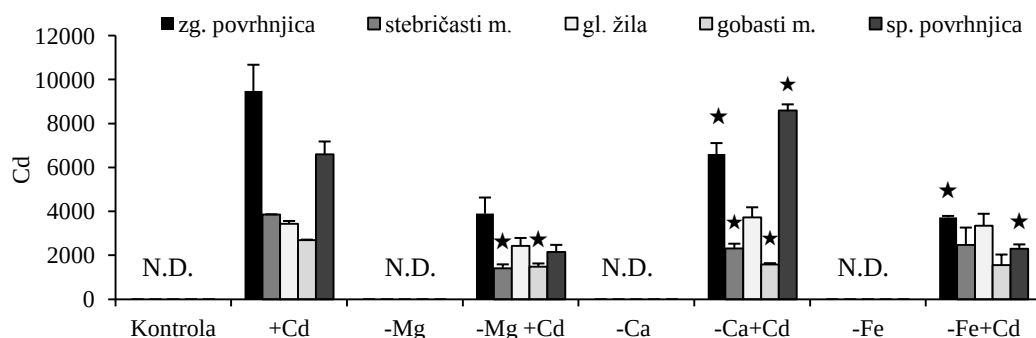
Slika 19: Graf linearne diskriminantne analize za koncentracije elementov Mg, P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe in Zn, pomerjenih v celotni liofilizirani prečni rezini zrelega lista ranega mošnjaka (*T. praecox*) z metodo mikro-PIXE po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Fe), dodatkom 150 μM CdSO_4 (+Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom Cd (-Mg+Cd, -Ca+Cd, Fe+Cd) (povprečje $\pm$ SE; $n=6-8$). Obkroženi so tretmaji, ki se grupirajo v dve ločeni skupini.
Figure 19: Linear discriminant analysis plot for concentrations of Mg, P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe and Zn, measured on whole freeze-dried cross section of mature leaf of pennycress (*T. praecox*) on freeze-dried cross sections with micro-PIXE after 8 weeks of growth in mineral solution with mineral deficiency of particular mineral (-Mg, -Ca, -Fe), or addition of 150 μM CdSO_4 (+Cd) or mineral deficiency of particular mineral with addition of Cd (-Mg+Cd, -Ca+Cd, Fe+Cd) (mean $\pm$ SE; $n=6-8$). The treatments that are separating in two distinguished groups are encircled.

Koncentracije Cd v izbranih listni tkivih so bile povsod le primerljive ali manjše kot pri izpostavitvi le 150 μM CdSO_4 (**Slika 20a**). Pri tretmaju -Mg+Cd smo izmed vseh tretmajev izmerili značilno najnižje koncentracije Cd v vseh tkivih (razen v glavni žili), kar sovпада z (neznačilno, a opazno) nižjimi celotnimi koncentracijami Cd, pomejenega v poganjkih (**Slika 17**). Pri tretmaju -e+Cd so bile koncentracije Cd v mezofilu primerljive s koncentracijami pri -Mg+Cd, le da so bile koncentracije Cd v mezofilu tretmaja višje in primerljive s tretmajem +Cd. Koncentracije Cd v obeh povrhnjicah so bile pri tretmaju -Ca+Cd najbolj primerljive s koncentracijo Cd v istih tkivih pri tretmaju +Cd, medtem ko so bile koncentracije v mezofilu značilno manjše. Zanimivo pa so koncentracije Cd v glavni žili primerljive med vsemi tretmaji, ne glede na možno dodatno pomanjkanje posameznih nutrientov (**Slika 20a**).

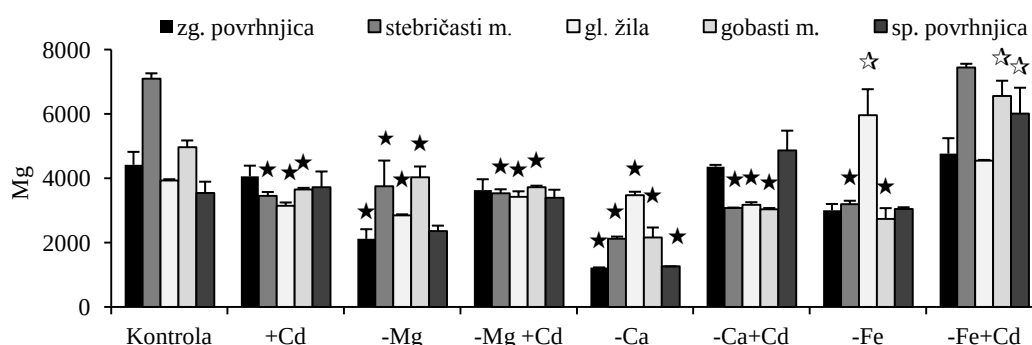
Ugotovili smo, da je so bile koncentracije Mg v nekaterih tkivih pri tretmajih -Fe in -Fe+Cd značilno povečane v primerjavi s kontrolo, medtem ko smo najnižje koncentracije Mg v posameznih listnih tkivih izmerili pri -Ca, pri katerem so bile koncentracije v vseh tkivih značilno nižje od kontrole. Pri vseh ostalih tretmajih smo zabeležili značilno manjše tkivne koncentracije Mg vsaj v osrednji žili in stebričastem ter gobastem mezofilu (**Slika 20b**). Pričakovano so bile tkivne koncentracije Mg

značilno nižje pri tretmaju s pomanjkanjem Mg, vendar presenetljivo niso bile najnižje. Prav tako nismo pričakovali, da bodo tkivne koncentracije Mg pri tretmaju –Mg+Cd primerljive z le-temi pri tretmaju +Cd (**Slika 20b**).

a)



b)



Slika 20: Koncentracije **a)** Cd in **b)** Mg v $\mu\text{g g}^{-1}$ v izbranih listnih tkivih ranega mošnjaka (*T. praecox*) pomejenih na liofiliziranih prečnih rezinah listov z metodo mikro-PIXE po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Fe), dodatkom 150 μM CdSO₄ (+Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom Cd (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Fe+Cd) (povprečje $\pm$ SE; n=2). Znak ☆ (gor) in ★ (dol) nad stolpci označujeta statistično značilno razliko **a)** od Cd oz. od **b)** kontrole (Duncanov test, $p < 0,05$). ND-ni določeno

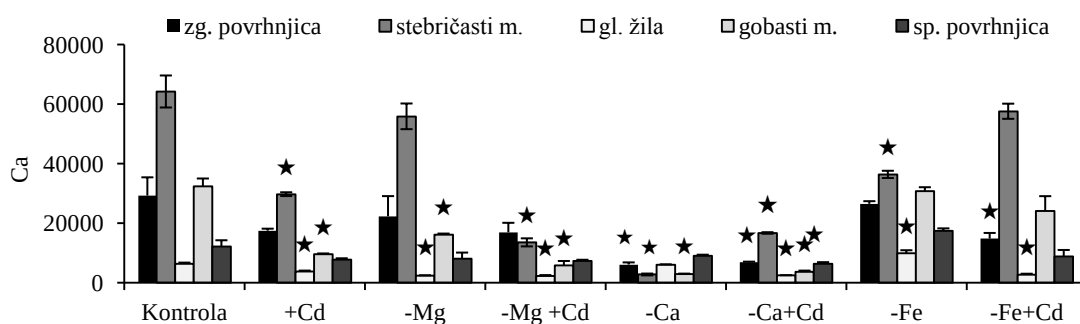
Figure 20: Concentrations of **a)** Cd and **b)** Mg $\mu\text{g g}^{-1}$ in selected leaf tissues of pennycress (*T. praecox*) on freeze-dried cross sections after 8 weeks of growth in mineral solution with mineral deficiency of particular mineral (-Mg, -Ca, -Fe), or addition of 150 μM CdSO₄ (+Cd) or mineral deficiency of particular mineral with addition of Cd (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Fe+Cd) (mean $\pm$ SE; n=2). Different symbols ☆ (up) in ★ (down) above columns represent statistically significant differences from **a)** control or **b)** Cd plants (Duncan's test; $p < 0,05$). ND-not determined

Pričakovano smo pri tretmajih –Ca in –Ca+Cd izmerili značilno nižje koncentracije Ca v vseh tkivih, z izjemo koncentracije Ca v glavni žili, ki je bila primerljiva s koncentracijo le-tega v glavni žili kontrole (**Slika 21a**). Pri vseh ostalih tretmajih so bile koncentracije Ca v glavni žili značilno manjše oz. večje (pri tretmaju –Fe) od koncentracij v glavni žili kontrole (**Slika 21a**). Zanimivo je dejstvo, da so koncentracije

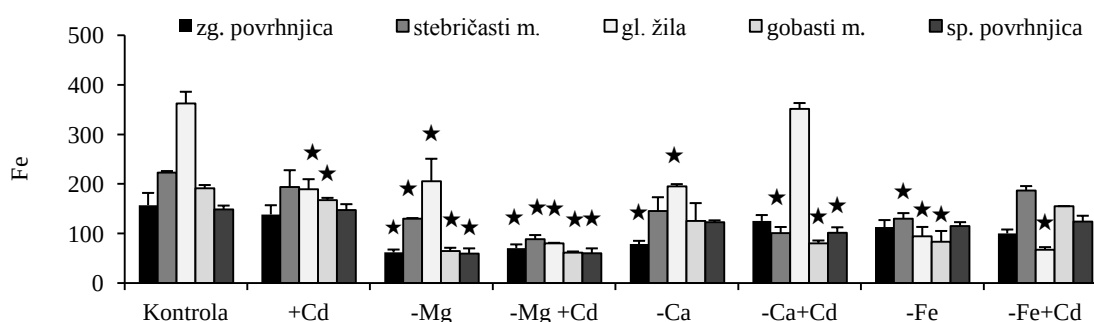
Ca v stebričastem mezofilu tretmajev –Mg in –Fe+Cd primerljive s koncentracijami pri kontroli, medtem ko so bile pri vseh ostalih tretmajih značilno nižje.

Koncentracije Fe so bile pričakovano nižje v mezofilu in žili tretmaja –Fe, a nepričakovano primerljive (razen v glavni žili) s kontrolo (**Slika 21b**). Prav tako nepričakovano smo izmerili značilno nižje koncentracije Fe v vseh listnih tkivih tretmajev –Mg in –Mg+Cd (**Slika 21b**). Zanimivo, koncentracija Fe v glavni žili je le pri tretmaju –Ca+Ca primerljiva s koncentracijo Ca v glavni žili kontrole (**Slika 21b**). Izmed vseh tretmajev, so koncentracije Fe v izbranih listnih tkivih pri tretmaju +Cd najbolj primerljive s kontrolo (**Slika 21b**).

a)



b)



Slika 21: Koncentracije a) Ca in b) Fe v $\mu\text{g g}^{-1}$ v izbranih listnih tkivih ranega mošnjaka (*T. praecox*) pomerjenih na liofiliziranih prečnih rezinah listov z metodo mikro-PIXE po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Fe), dodatkom 150 μM CdSO_4 (+Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom Cd (-Mg+Cd, -Ca+Cd, Fe+Cd) (povprečje $\pm$ SE; n=2). Znaka ☆ (gor) in ★ (dol) nad stolpci označujeta statistično značilno razliko od kontrole (Duncanov test, $p < 0,05$).

Figure 21: Concentrations of a) Ca and b) Fe $\mu\text{g g}^{-1}$ in selected leaf tissues of pennycress (*T. praecox*) on freeze-dried cross sections after 8 weeks of growth in mineral solution with mineral deficiency of particular mineral (-Mg, -Ca, -Fe), or addition of 150 μM CdSO_4 (+Cd) or mineral deficiency of particular mineral with addition of Cd (-Mg+Cd, -Ca+Cd, Fe+Cd) (mean $\pm$ SE; n=2). Different symbols ☆ (up) in ★ (down) above columns represent statistically significant differences from control plants (Duncan's test; $p < 0,05$).

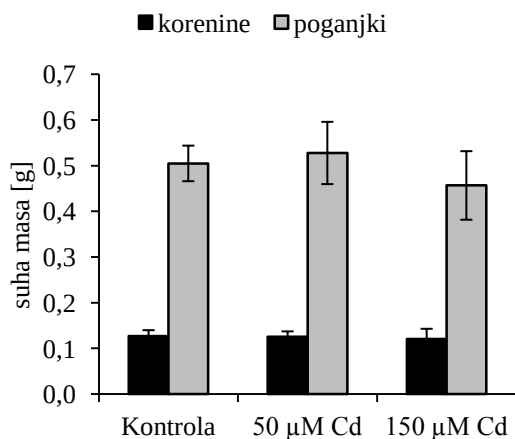
4.3 VPLIV CdSO_4 NA METABOLIZEM OGLJIKOVIH HIDRATOV

Pri ranem mošnjaku smo preučevali vpliv Cd na rastlinah, vzgojenih pod naravno svetlobo s kombinirano umetno osvetlitvijo v rastlinjaku na univerzi v Louvain-la-Neuve v Belgiji. Zanimal nas je odziv rastlin, izpostavljenih Cd za 1 teden (akutni test) in 4 tedne (kronični) test. Rastni odziv rastlin smo ocenili na podlagi biomase korenin in poganjkov, koncentracije klorofila a in b, karotenoidov ter meritev potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti. Z nadaljnjimi biokemijskimi analizami, kot so meritve posameznih topnih in netopnih sladkorjev in ocena aktivnosti izbranih encimov, pa smo ugotavljali ali izpostavitve Cd vpliva na izbrani del metabolizma ogljikovih hidratov, kjer se sintetizira oz. ponovno razkraja najpomembnejši transportni sladkor saharoza.

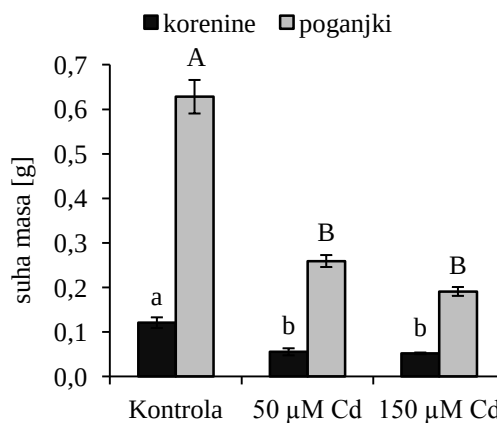
4.3.1 Rast in odziv rastline na prisotnost CdSO_4 v hranilni raztopini po 1 in po 4-ih tednih

Vrednosti suhe mase poganjkov in korenin smo izrazili kot razliko od kontrolnih rastlin. SM se po enem tednu niso značilno razlikovale (**Slika 22a**), medtem ko so bile po koncu 4-tedenskega poskusa v primerjavi s kontrolo statistično značilno manjše pri rastlinah, izpostavljenih Cd (**Slika 22b**).

a) 1 teden



b) 4 tedne

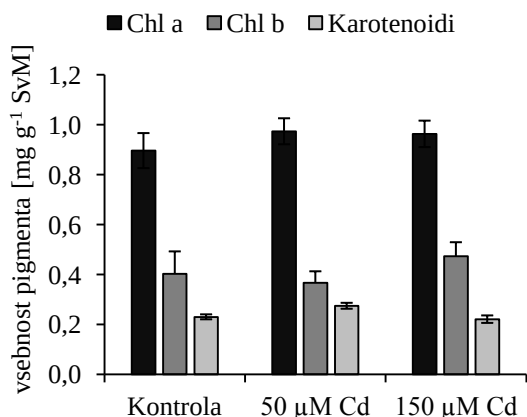


Slika 22: Vrednosti suhe mase [g] korenin in poganjkov ranega mošnjaka (*T. praecox*) glede na kontrolo po a) 1 tednu in b) po 4 tednih rasti v rastlinjaku in izpostavitvi 50 µM ali 150 µM CdSO_4 (povprečje $\pm$ SE; a) n=16, b) n=6-40). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko (Duncanov test, $p < 0,05$).

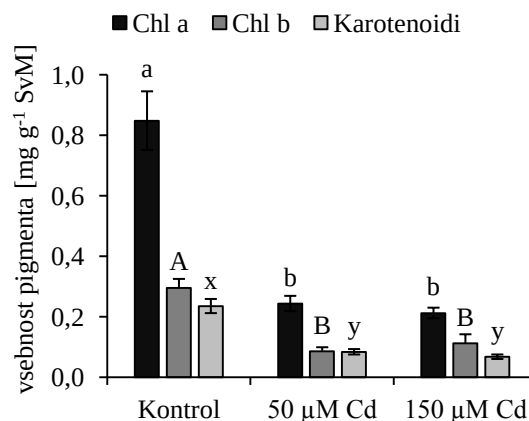
Figure 22: Dry biomass [g] of shoots and roots of pennycress (*T. praecox*) in comparison to control plants after a) 1 week and b) 4 weeks growth in greenhouse and treated with 50 µM or 150 µM CdSO_4 (mean $\pm$ SE; a) n=16, b) n=6-40). Different letters above columns represent statistically significant differences (Duncan's test; $p < 0,05$).

Kot oceno fotokemične učinkovitosti rastlin smo tekom rasti rastlin merili fluorescenco fotosinteznega sistema ter koncentracije pigmentov. Slednje smo pomerili v sveži masi homogeniziranega materiala poganjkov *T. praecox* in ugotovili, da se koncentracije klorofila a in b ter karotenoidov med kontrolo in različnima izpostavitvama Cd po enem tednu niso razlikovale (**Sliki 23a in 24a**), listi vseh rastlin pa so bili primerljive zelene barve. Po 4 tednih, pa so bile koncentracije klorofilov a in b ter tudi karotenoidov pri rastlinah, za razliko od 1-tedenskega poskusa, značilno manjše od koncentracij pri kontrolnih rastlinah (**Sliki 23b in 24b**). Poleg opravljenih meritev pa smo po 4 tednih opazili tudi vidne spremembe v barvi listov, saj so se na mlajših listih rastlin, izpostavljenih 150 μM Cd, pojavile kloroze, medtem ko so bili starejši listi normalno temno zeleno obarvani, kot celotne rastline kontrolne izpostavite.

a) 1 teden



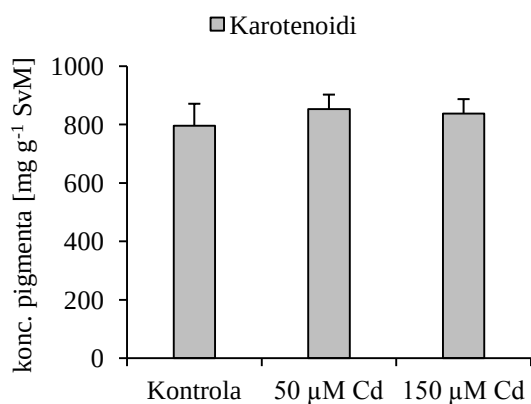
b) 4 tedni



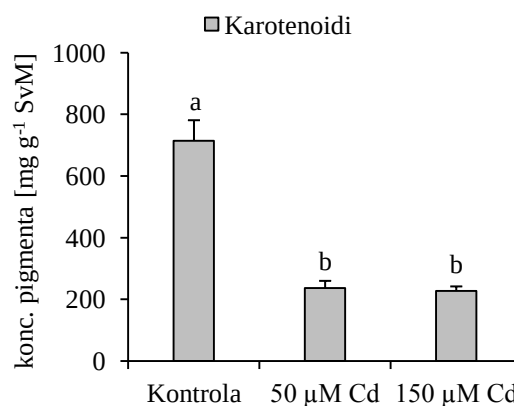
Slika 23: Koncentracije klorofila a in klorofila b izražena v mg g^{-1} sveže mase poganjkov ranega mošnjaka (*T. praecox*) po **a)** 1 tednu in **b)** po 4 tednih rasti v rastlinjaku in izpostavitvi 50 μM ali 150 μM CdSO_4 (povprečje $\pm$ SE; $n=4$, združeni vzorci). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko (Duncanov test, $p<0,05$). Chl a-klorofil a, Chl b-klorofil b, SvM-sveža masa.

Figure 23: Concentrations of chlorophyll a and chlorophyll b expressed in mg g^{-1} of fresh shoot biomass of pennycress (*T. praecox*) after **a)** 1 week and **b)** 4 weeks growth in greenhouse and treated with 50 μM or 150 μM CdSO_4 (mean $\pm$ SE; $n=4$, composed samples). Different letters above columns represent statistically significant differences (Duncan's test; $p<0,05$). Chl a-chlorophyll a, Chl b-chlorophyll b, SvM-fresh biomass.

a) 1 teden



b) 4 tedni

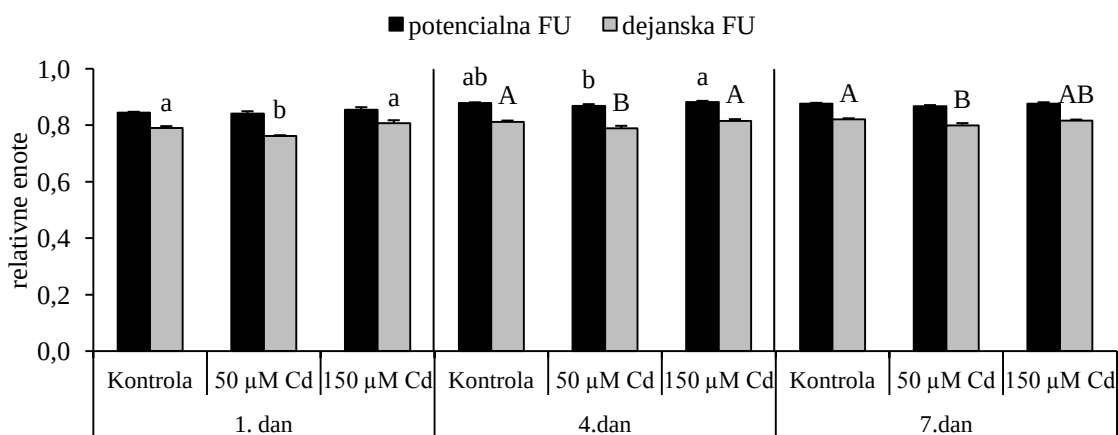


Slika 24: Koncentracija karotenoidov izraženih v mg g^{-1} sveže mase (SvM) poganjkov ranega mošnjaka (*T. praecox*) po **a)** 1 tednu in **b)** po 4 tednih rasti v rastlinjaku in izpostavitvi 50 μM ali 150 μM CdSO_4 (povprečje $\pm$ SE; $n=4$, združeni vzorci). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko (Duncanov test, $p<0,05$).

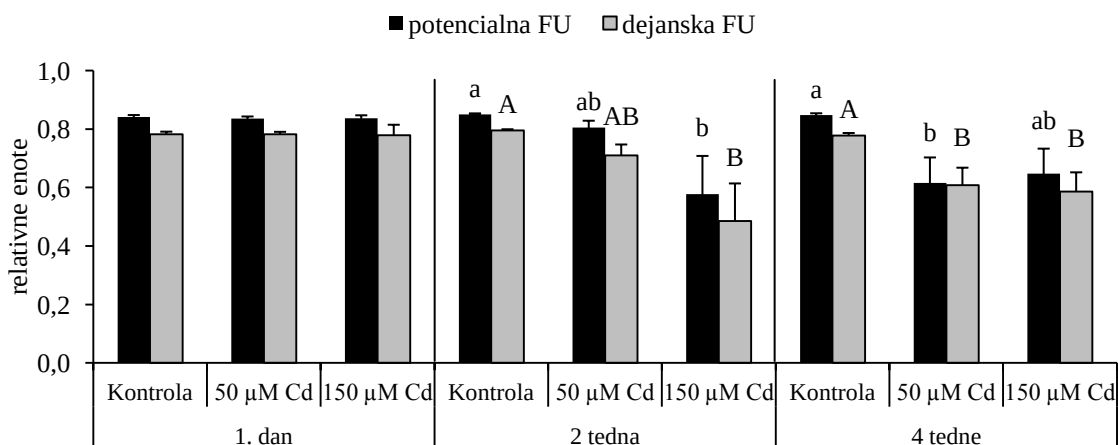
Figure 24: Concentrations of carotenoids expressed in mg g^{-1} of fresh shoot biomass of pennycress (*T. praecox*) after **a)** 1 week and **b)** 4 weeks growth in greenhouse and treated with 50 μM or 150 μM CdSO_4 (mean $\pm$ SE; $n=4$, composed sample). Different letters above columns represent statistically significant differences (Duncan's test; $p<0,05$).

Dejansko in potencialno fotokemično učinkovitost PSII smo ocenili z meritvijo fluorescence. Le-to smo pri 1-tedenskem poskusu izmerili na 1. dan izpostavitve rastlin Cd ter nato 4. in 7. dan, pri 4-tedenskem poskusu pa smo meritve izvedli na prvi dan izpostavitve rastlin kadmiju in nato po 2-h in 4-ih tednih. Pri 1-tedenskem poskusu (**Slika 25a**) smo med posameznimi izpostavitvami izmerili majhne spremembe v fluorescenci, ki pa so bile primerljivih vrednosti z vitalnimi kontrolnimi rastlinami in so znašale okoli 0,8 ter so se bolj ali manj ohranile od začetka do konca poskusa. Pri 4-tedenskem poskusu sta ob začetku poskusa pričakovano bili potencialna in dejanska FU vseh rastlin enaki (**Slika 25b**). Po dveh in štirih tednih sta potencialna in dejanska FU kontrolnih rastlin ostali nespremenjeni, pri rastlinah, izpostavljenih 150 μM Cd, sta značilno upadli že po 2 tednih, po 4 tednih pa sta značilno upadli pri obeh Cd izpostavitvah (**Slika 25b**), kar dokazuje, da so bile rastline v stresu.

a) 1 teden



b) 4 tedni



Slika 25: Potencialna in dejanska fotokemična učinkovitost fotosistema 2 izraženi v relativnih enotah, merjeni pri **a)** 1-tedenskem poskusu in izmerjeni na 1. dan izpostavitve, na 4. dan in nato na 7. dan izpostavitve ter **b)** merjeni pri 4-tedenskem poskusu in izmerjeni na 1. dan izpostavitve, po 2 tednih in nato po 4 tednih izpostavitve, vsakič na istem listu treh rastlin ranega mošnjaka (*T. praecox*), izpostavljenih 50 µM ali 150 µM CdSO₄ (povprečje ± SE; n=3). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko med meritvami na posamezen dan meritve (Duncanov test, $p < 0,05$). FU - fotokemična učinkovitost.

Figure 25: Potential and actual photochemical efficiency of photosystem 2 expressed in relative units, and measured at **a)** 1 week experiment on the 1st, 4th and 7th day of the treatment and at **b)** 4 week experiment, measured on the 1st day of the treatment and later after 2 and 4 weeks. The measurements were taken on the same leaf from three plants of treating *T. praecox* plants with 50 µM or 150 µM CdSO₄ (mean ± SE; n=3). Different letters above columns represent statistically significant differences between measurement on defined day of measurement (Duncan's test; $p < 0,05$). FU - photochemical efficiency.

Faktorska analiza variance je pokazala, da na prav vse izbrane analizirane parametre, vpliva čas izpostavitve (št. tednov) Cd (**Pril. D1**). Pri SM poganjkov, vsebnosti klorofila a, karotenoidov ter potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti na dan zaključka poskusa, pa je faktorska analiza variance pokazala statistično značilen vpliv samega tretmaja (kontrola, 50 μM ali 150 μM CdSO_4) ter interakcije tretmaja in časa trajanja posameznega poskusa (**Pril. D1**).

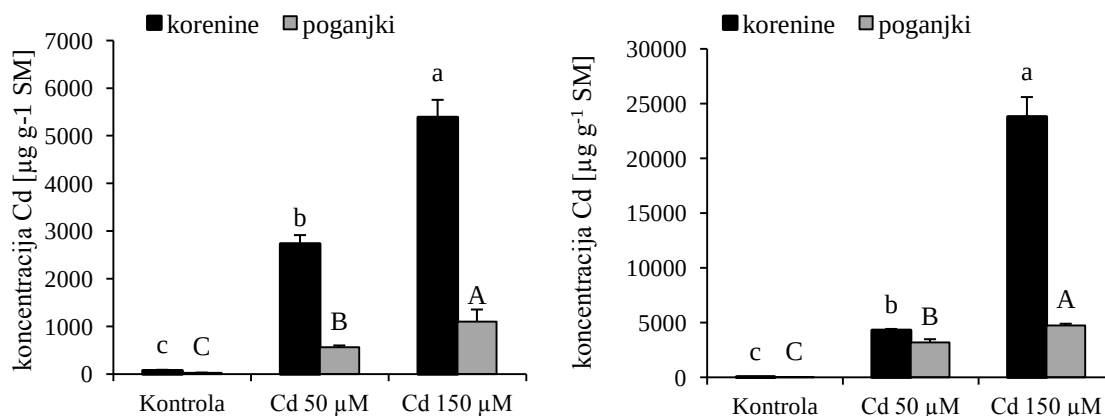
4.3.2 Koncentracija Cd ter vsebnost topnih sladkorjev in škroba v koreninah in poganjkih

Po temeljitom spiranju korenin in poganjkov po končanih poskusih, smo v posušeni vzorci z atomsko absorpcijsko spektrometrijo pomerili Cd. Koncentracije Cd so v rastlinah 1 in 4 tednov trajajočih poskusov naraščale z naraščanjem koncentracije dodanega Cd v HR ter so bile večje v koreninah kot v poganjkih (**Sliki 26a, b**). V poganjkih rastlin, izpostavljenih Cd, smo po 1 tednu izmerili že 18 % koncentracije Cd, ki so jo dosegle rastline po 4-ih tednih izpostavitvi 50 μM CdSO_4 in 23 % koncentracije Cd v primeru izpostavitvi 150 μM CdSO_4 (**Sliki 26a, b**).

Faktorska analiza variance je prav tako potrdila, da na koncentracijo Cd v koreninah in poganjkih vplivajo tretma, št. tednov izpostavitve Cd ter njuna interakcija (**Pril. D1**).

a) 1 teden

b) 4 tedni



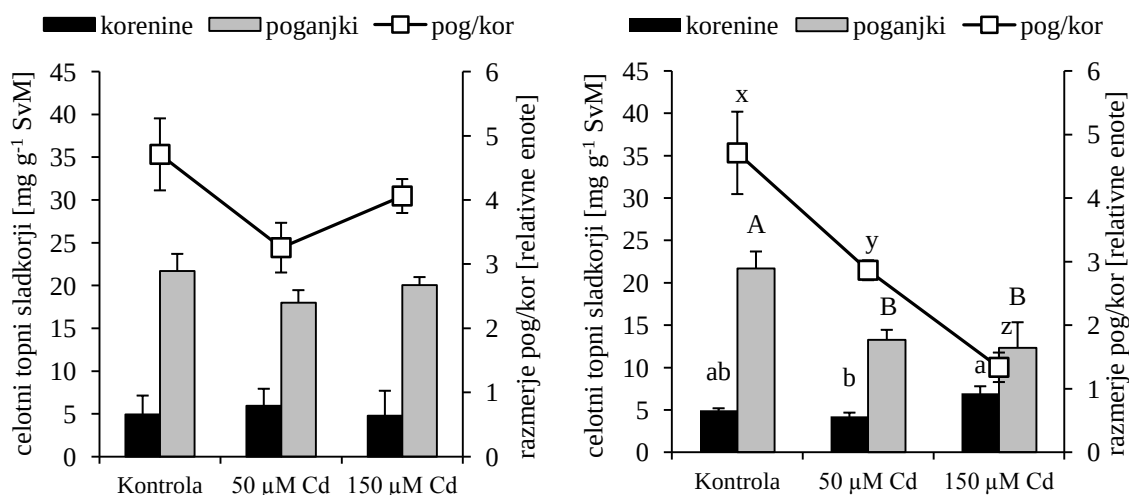
Slika 26: Koncentracije kadmija (Cd) v $\mu\text{g g}^{-1}$ SM korenin in poganjkov ranega mošnjaka (*T. praecox*) po a) 1 tednu in b) po 4 tednih rasti v rastlinjaku in izpostavitvi 50 μM ali 150 μM CdSO_4 (povprečje $\pm$ SE; n=4, združeni vzorci). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko (Duncanov test, $p < 0,05$). SM-suha masa.

Figure 26: Concentrations of cadmium (Cd) in roots and shoots of pennycress (*T. praecox*) after a) 1 week and b) 4 weeks growth in greenhouse and treated with 50 μM or 150 μM CdSO_4 (mean $\pm$ SE; n=4, composed sample). Different letters above columns represent statistically significant differences (Duncan's test; $p < 0,05$). SM-dry weight.

V svežem rastlinskem materialu smo pomerili izmerili celotne vsebnosti topnih sladkorjev in koncentracijo škroba na g SvM rastlinskega materiala. Koncentracije celotnih topnih sladkorjev v koreninah in poganjkih se po 1-tedenskem poskusu niso značilno razlikovale, prav tako ne razmerje med poganjki in koreninami (**Slika 27a**). Pri 4-tedenskem poskusu je bila v koreninah ranega mošnjaka, izpostavljenega 150 μM Cd, koncentracija topnih sladkorjev značilno večja kot pri kontroli in izpostavitvi 150 μM Cd (**Slika 27b**), v poganjkih pa smo opazili statistično značilen upad v vsebnosti topnih sladkorjev pri obeh Cd izpostavitvah. Zaradi spremembe vsebnosti celotnih topnih sladkorjev v koreninah in poganjkih se z naraščanjem Cd v HR značilno manjša tudi razmerje poganjki/korenine, tako da je največje v kontrolnih rastlinah in znaša 4,7 ter najmanjše pri izpostavitvi 150 μM Cd, kjer razmerje upade na 1,3, kar pomeni občutno spremembo porazdelitve topnih sladkorjev med koreninami in poganjki (**Slika 28b**).

a) 1 teden

b) 4 tedni



Slika 27: Koncentracije celotnih topnih sladkorjev izražene v mg g^{-1} sveže mase korenin in poganjkov ter njuno razmerje (pog/kor; na sekundarni osi) pri ranem mošnjaku (*T. praecox*) po **a)** 1 tednu in **b)** po 4 tednih rasti v rastlinjaku in izpostavitvi 50 μM ali 150 μM CdSO₄ (povprečje $\pm$ SE; n=4). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko (Duncanov test, $p < 0,05$). SvM-sveža biomasa.

Figure 27: Concentration of total soluble sugars expressed in mg g^{-1} fresh weight roots and shoots, and its ratio (shoot/root; on secondary axis) at *T. praecox* after **a)** 1 week and **b)** 4 weeks growth in greenhouse and treated with 50 μM or 150 μM CdSO₄ (mean $\pm$ se; n=4). Different letters above columns represent statistically significant differences (Duncan's test; $p < 0,05$). SvM-fresh biomass.

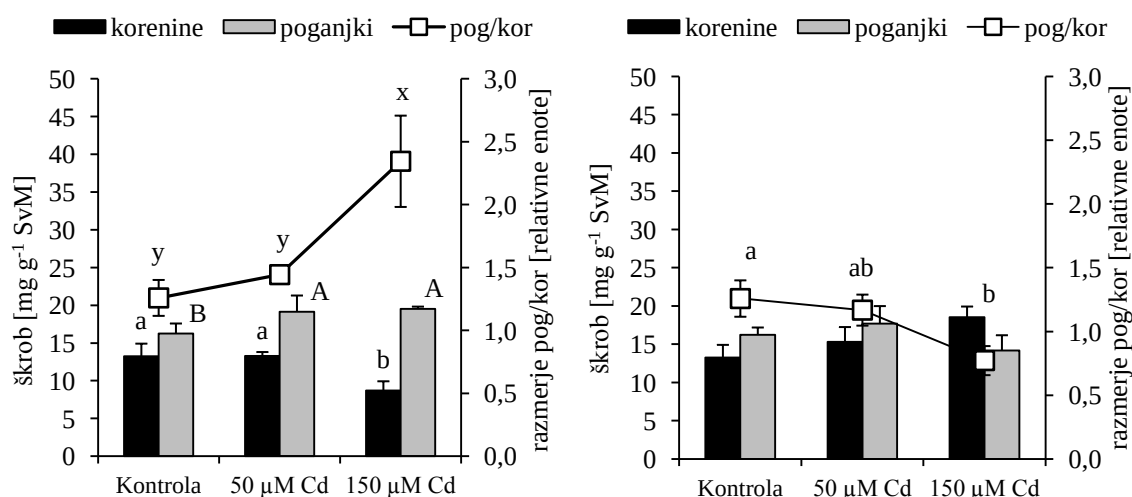
Od netopnih sladkorjev smo pomerili škrob. Pri 1-tedenskem poskusu smo izmerili značilno manjšo koncentracijo škroba v koreninah pri izpostavitvi z največ Cd ter značilno večjo koncentracijo škroba v poganjkih pri obeh Cd izpostavitvah, v primerjavi s kontrolnimi rastlinami (**Slika 28a**). Pri izračunu razmerja med poganjki in koreninami smo ugotovili, da je le-to pri kontrolnih rastlinah in rastlinah, izpostavljenih 50 μM Cd, malenkost večje od 1, kar pomeni zadrževanje škroba v poganjkih. Pri rastlinah,

izpostavljenih 150 μM , pa je to razmerje znatno večje od ena, kar nakazuje na večjo prerazporeditev škroba med koreninami in poganjki, predvsem na račun zmanjšanja le-tega v koreninah (**Slika 28a**).

Vsebnosti škroba se v koreninah in poganjkih po 4-tedenskem poskusu niso značilno razlikovale, čeprav pri izpostavitvi 150 μM Cd opazimo rahlo povečane koncentracije od kontrolnih, a le te zaradi večje variabilnosti podatkov niso statistično značilne (**Slika 28b**). Razmerje porazdelitve škroba med koreninami in poganjki je pri vseh treh izpostavitvah okoli vrednosti 1, vendar je razmerje pri izpostavitvi 150 μM Cd poganjki/korenine < 1 in je značilno manjše od razmerja pri kontrolnih rastlinah (**Slika 28b**). Pri izpostavitvi 150 μM Cd tako opazimo značilno kopičenje škroba v poganjkih po 1-tednu ter manjšo vsebnost škroba v koreninah, po 4 tednih pa se pri tej izpostavitvi stanje razmerje obrne, kar pomeni zadrževanje škroba v koreninah (**Sliki 28a in b**).

a) 1 teden

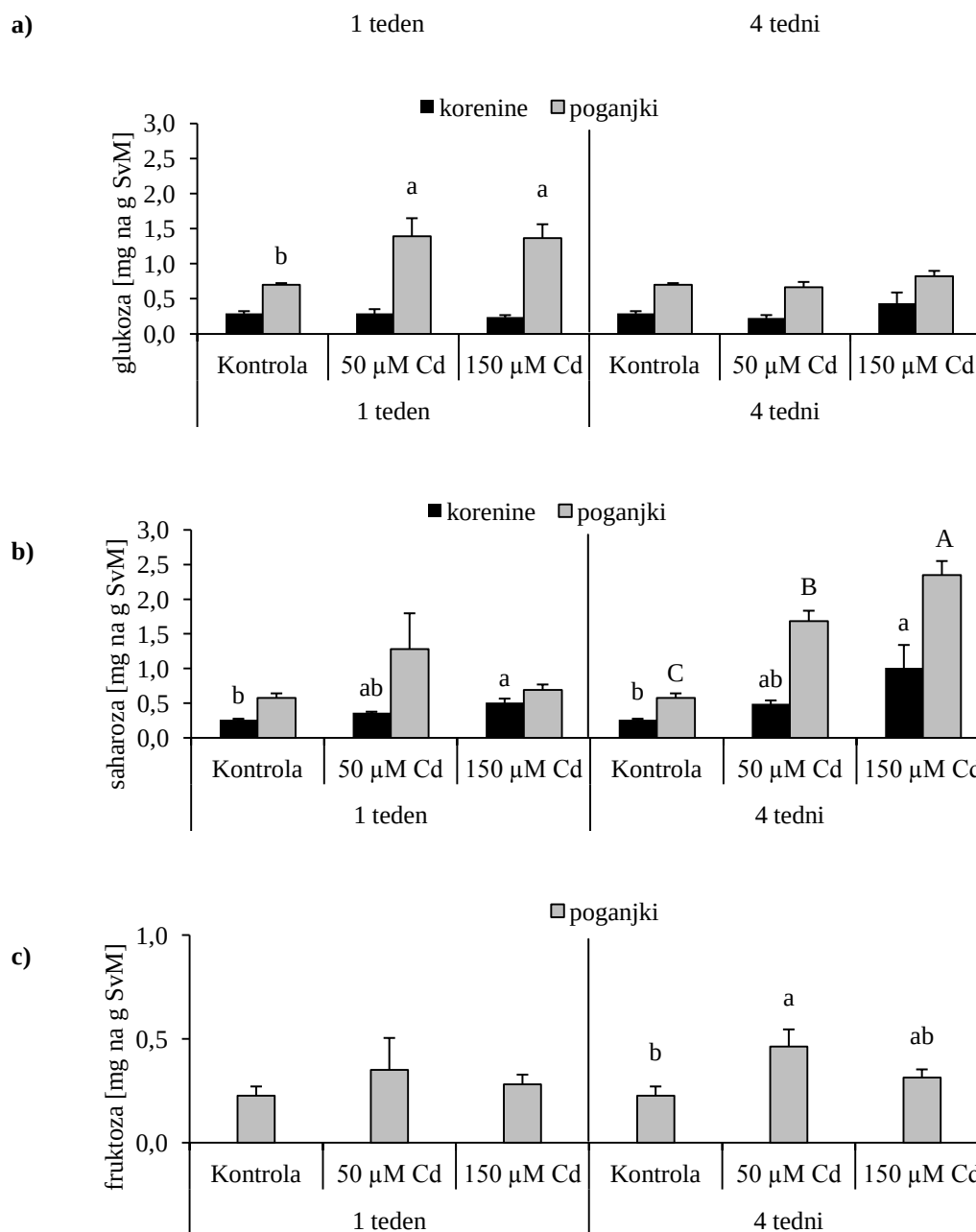
b) 4 tedni



Slika 28: Koncentracije škroba izražene v mg g^{-1} sveže mase korenin in poganjkov ter njuno razmerje (pog/kor; na sekundarni osi) pri ranem mošnjaku (*T. praecox*) po **a)** 1 tednu in **b)** po 4 tednih rasti v rastlinjaku in izpostavitvi 50 μM ali 150 μM CdSO_4 (povprečje $\pm$ SE; $n=4$). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko (Duncanov test, $p<0,05$). SvM-sveža biomasa.

Figure 28: Concentration of starch expressed in mg g^{-1} fresh weight roots and shoots, and its ratio (shoot/root; on secondary axis) at *T. praecox* after **a)** 1 week and **b)** 4 weeks growth in greenhouse and treated with 50 μM or 150 μM CdSO_4 (mean $\pm$ SE; $n=4$). Different letters above columns represent statistically significant differences (Duncan's test; $p<0,05$). SvM-fresh biomass.

Za podrobnejšo kvantifikacijo topnih sladkorjev, smo uporabili že pridobljeni ekstrakt in izparili tekočino. S pomočjo HPLC smo nato izmerili točne koncentracije sladkorjev glukoze, fruktoze in saharoze, koncentracije arabinoze, galaktoze, riboze, manoze, celobioze in ksiloze pa so bile pod mejo detekcije. Koncentracije posameznih sladkorjev smo nato preračunali na vsebnost v mg na g SvM (**Slika 29**).



Slika 29: Koncentracije **a)** glukoze, **b)** saharoze in **c)** fruktoze izražene v mg na g sveže mase korenin in poganjkov pri ranem mošnjaku (*T. praecox*) po 1 tednu in po 4 tednih rasti v rastlinjaku in izpostavitvi 50 µM ali 150 µM CdSO₄ (povprečje ± SE; n=4, združeni vzorci). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko znotraj posameznega poskusa (Duncanov test, $p < 0,05$). SvM-sveža biomasa.

Figure 29: Concentration of **a)** glucose, **b)** sucrose and, **c)** fructose expressed in mg per g of fresh weight of roots and shoots of *T. praecox* after 1 week in 4 weeks growth in greenhouse and treated with 50 µM or 150 µM CdSO₄ (mean ± se; n= 4, composed sample). Different letters above columns represent statistically significant differences between different treatments of individual experiment (Duncan's test; $p < 0,05$). SvM-fresh biomass.

Vsebnosti glukoze se v koreninah rastlin 1-tedenskega in 4-tedenskega poskusa niso značilno razlikovale, medtem ko so bile vsebnosti glukoze le pri 1-tedenskem poskusu večje v poganjkih Cd izpostavljenih rastlin v primerjavi s kontrolo (**Slika 29a**).

Po meritvah saharoze smo ugotovili, da je koncentracije le-te v koreninah s prisotnostjo Cd v HR naraščala, vendar so bile koncentracije v koreninah rastlin iz obeh poskusov značilno večje pri največji izpostavitvi Cd v primerjavi s kontrolo. Po 1-tedenskem poskusu zaradi variabilnosti podatkov nismo zaznali razlik v vsebnosti saharoze med različnimi poganjki, medtem ko smo po 4-ih tednih opazili značilno povečevanje vsebnosti saharoze z naraščanjem koncentracije Cd v HR (**Slika 29b**).

V poganjkih rastlin iz obeh poskusov smo zabeležili nižje vsebnosti fruktoze od glukoze in saharoze, v koreninah pa so bile koncentracije fruktoze očitno še nižje, saj so le-te bile pod mejo detekcije. V primeru fruktoze so zato prikazani le podatki o vsebnosti v poganjkih, kjer smo ugotovili, da po 1 tednu med kontrolnimi rastlinami in rastlinami, izpostavljenimi Cd ni bilo razlik, medtem ko se po 4 tednih pokažejo razlike, pri čemer je vsebnost fruktoze značilno večja v poganjkih rastlin izpostavljenih 50 μM CdSO_4 v primerjavi s kontrolnimi rastlinami (**Slika 29c**).

Faktorska analiza variance je pokazala, da so na koncentracije celotnih topnih sladkorjev v poganjkih in na njihovo razmerje poganjki/korenine vplivali vsi trije dejavniki – tretma, št. tednov poskusa in njuna interakcija, na koncentracije v koreninah pa le interakcija tretmaja in št. tednov poskusa (**Pril. D2**). Na vsebnosti škroba v poganjkih s faktorsko analizo variance nismo dokazali vplivov tretmaja ali št. tednov poskusa, sta pa na vsebnost škroba v koreninah in na razmerje poganjki/korenine vplivala tako tretma kot interakcija tretmaja in št. tednov poskusa (**Pril. D2**). Na vsebnost glukoze v poganjkih ter saharoze v koreninah in poganjkih, je po rezultatih faktorske analize variance vplival tretma, na vsebnost fruktoze v poganjkih pa tudi št. tednov poskusa ter njuna interakcija (**Pril. D3**). Na vsebnost glukoze v koreninah ni bilo vplivov (**Pril. D3**).

4.3.3 Vsebnost proteinov in izbranih encimov v poganjkih

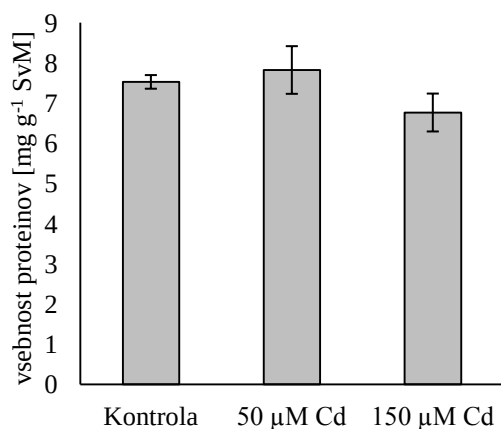
Da smo lahko merili aktivnost izbranih encimov, smo morali najprej izolirati proteine ter določiti njihovo koncentracijo, saj smo morali za nadaljnje delo ustrezno redčiti ekstrakt. Vsebnost proteinov se po 1-tedenskem poskusu med kontrolo in izpostavljenimi rastlinami ni značilno razlikovala (**Slika 30a**), prav tako nismo zabeležili značilnih sprememb v aktivnosti encimov oz. le-te zaradi variabilnosti podatkov nismo uspeli razbrati. Tako smo opazili le neznatno povečanje aktivnosti SS in AI pri rastlinah, izpostavljenih Cd, ter upad aktivnosti IN v primerjavi s kontrolo (**Slika 31a**).

Po 4 tednih smo v poganjkih Cd izpostavljenih rastlin izmerili značilno manjše koncentracije proteinov (**Slika 30b**), prav tako pa so se razlikovale aktivnosti nekaterih merjenih encimov, saj smo v primerjavi s kontrolo z večanjem koncentracije Cd opazili značilno zmanjšanje SS pri izpostavitvi 150 μM Cd ter zmanjšanje IA pri obeh izpostavah Cd. Aktivnost SPS je ostala primerljiva pri kontroli in obeh Cd izpostavitvah (**Slika 31b**).

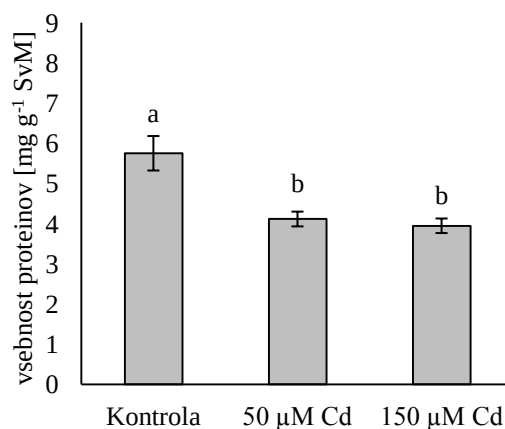
Prav tako smo ocenjevali encimsko aktivnost v koreninah. Za izolacijo ustrezne količine proteinov smo potrebovali več materiala kot pri izolaciji iz poganjkov, pri tem pa smo imeli težave z zbiranjem ekstrakta proteinov zaradi obilnega nabrekanja koreninskega materiala. Četudi smo nato uspeli izolirati dovolj proteinov, pa so bile aktivnosti encimov tako nizke, da jih nismo mogli izmeriti, zato smo predstavili podatke zgolj za poganjke.

Faktorska analiza variance je pokazala, da sta le količina proteinov v poganjkih in aktivnost IA statistično značilno odvisni od tretmaja ter od št. tednov poskusa. Aktivnost SS je bila odvisna le od interakcije tretmaja in št. tednov poskusa, medtem ko sta bili aktivnosti IN in SPS neodvisni od tretmaja in dolžine trajanja poskusa (**Pril. D4**).

a) 1 teden



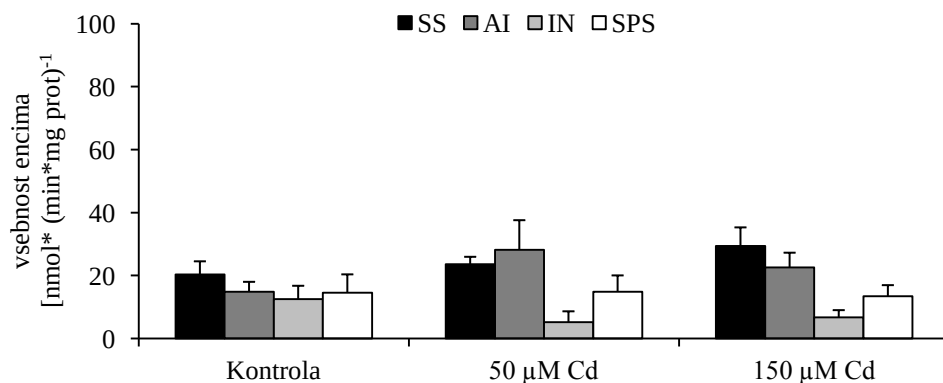
b) 4 tedni



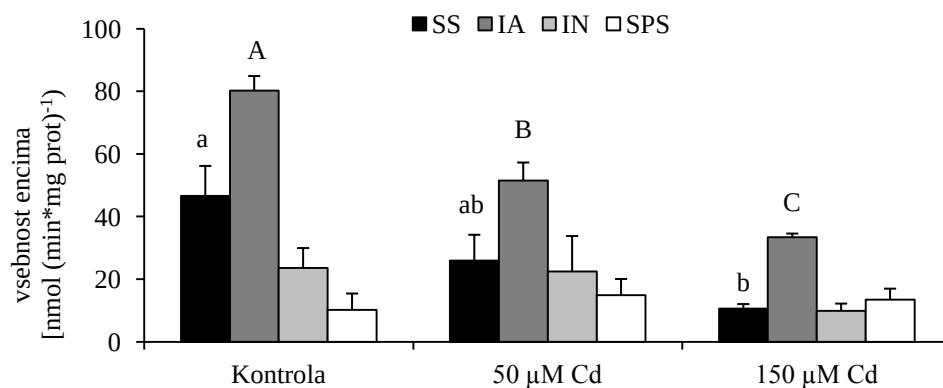
Slika 30: Vsebnost proteinov v poganjkih, podana v mg g^{-1} sveže mase poganjkov ranega mošnjaka (*T. praecox*) po **a)** 1 tednu in **b)** po 4 tednih rasti v rastlinjaku in izpostavitvi 50 μM ali 150 μM CdSO_4 (povprečje $\pm$ SE; $n=4$). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko (Duncanov test, $p<0,05$). SvM-sveža biomasa.

Figure 30: Content of extracted proteins given in mg g^{-1} fresh weight of *T. praecox* plants after **a)** 1 week, and **b)** after 4 weeks growth in greenhouse and treated with 50 μM or 150 μM CdSO_4 (mean $\pm$ se; $n=4$). Different letters above columns represent statistically significant differences (Duncan's test; $p<0,05$). SvM-fresh biomass.

a) 1 teden



b) 4 tedni



Slika 31: Aktivnost encimov saharoze-6-fosfat sintaza (SS), kisle invertaze (IA), bazične oz. nevtralne invertaze (IN) in saharoze-6-fosfat fosfataza (SPS), izoliranih iz poganjkov, podane v nmol (min* g^{-1} SvM) pri ranem mošnjaku (*T. praecox*), po **a)** 1 tednu in **b)** po 4 tednih rasti v rastlinjaku in izpostavitvi 50 μ M ali 150 μ M CdSO₄ (povprečje $\pm$ SE; n=4). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko (Duncanov test, $p < 0,05$). SvM-sveža biomasa.

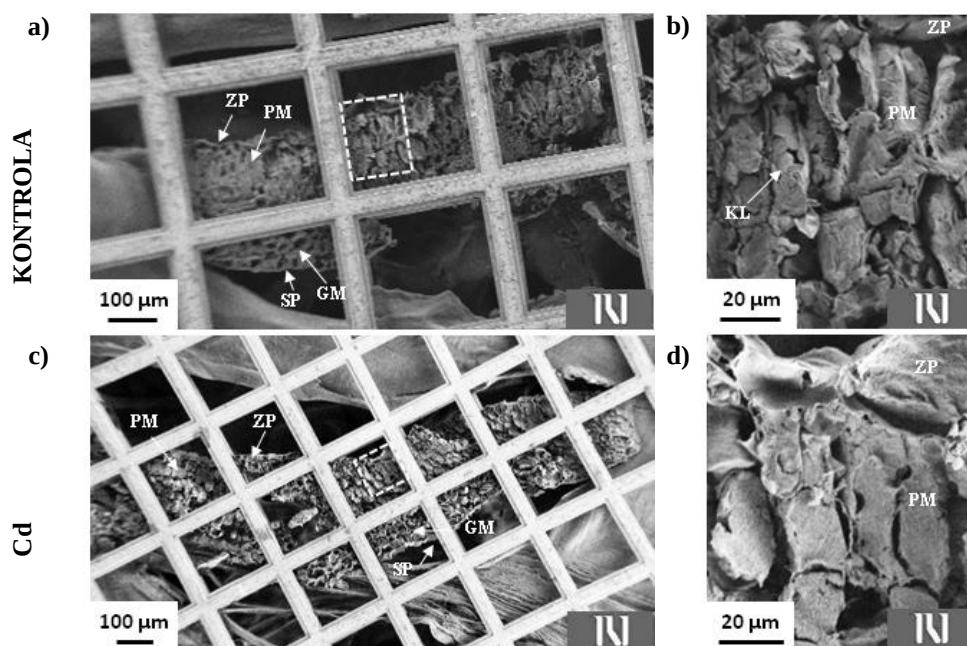
Figure 31: Enzymatic activity of sucrose-6-phosphate-phosphatase (SS), acid invertase (IA), basic or neutral invertase (IN) and sucrose-6-phosphate synthase (SPS) extracted from shoots, and expressed in nmol (min* g^{-1} of fresh weight) at *T. praecox* plants after **a)** 1 week, and **b)** after 4 weeks of growth in greenhouse and treated with 50 μ M or 150 μ M CdSO₄ (mean $\pm$ se; n=4). Different letters above columns represent statistically significant differences (Duncan's test; $p < 0,05$). SvM-fresh biomass.

4.4 VPLIV Cd NA MORFOLOGIJO IN SESTAVO ORGANSKE MATRIKE LISTOV

4.4.1 Vpliv Cd na morfolologijo lista

Za potrebe mapiranja organskih komponent v listih smo z metodo SR-FTIR pomerili liofilizirane prečne rezine, nameščene v Au mrežice. Pred meritvijo smo s pomočjo mikroskopa pri 400x povečavi izbrali najbolj ohranjene rezine, a vseeno nismo uspeli ugotoviti, do kakšne mere so ohranjene celične stene in vsebina celic. To smo lahko preverili s pomočjo SEM.

Kot je razvidno iz **Slik 32a** in **32c**, je bila struktura lista dobro ohranjena, le na nekaterih mestih je odstopila povrhnjica. Celice stebričastega mezofila pri kontroli in Cd tretmaju so polne, z vidnimi kloroplasti in zamreženo citoplazmo (**Sliki 32a in c**). Pri kontrolnih rastlinah smo opazili dolge in podolgovate celice stebričastega mezofila (**Slika 32b**), medtem ko so bile celice gobastega mezofila pri rastlinah, izpostavljenih Cd, krajše in ovalne (**Slika 32d**), kot je razvidno tudi iz **Slike 10**.



Slika 32: Mikrografije presevne elektronske mikroskopije (SEM) prečnih prerezov listov **a-b)** kontrole in **c-d)** rastlin izpostavljenih 150 μM Cd. Rezine, debele 14 μm so bile nameščene med 2-slojno Au mrežico. Na sliki **b)** je 800-krat povečano področje stebričastega mezofila kontrole, kjer vidimo podolgovate celice, na sliki **d)** pa je 770-krat povečan stebričasti mezofil rastlin izpostavljenih 150 μM Cd, kjer vidimo celice ovalne oblike. ZP-zgornja povrhnjica, PM-stebričasti mezofil, GM-gobasti mezofil, SP-spodnja povrhnjica. Foto: Marta Debeljak (KI)

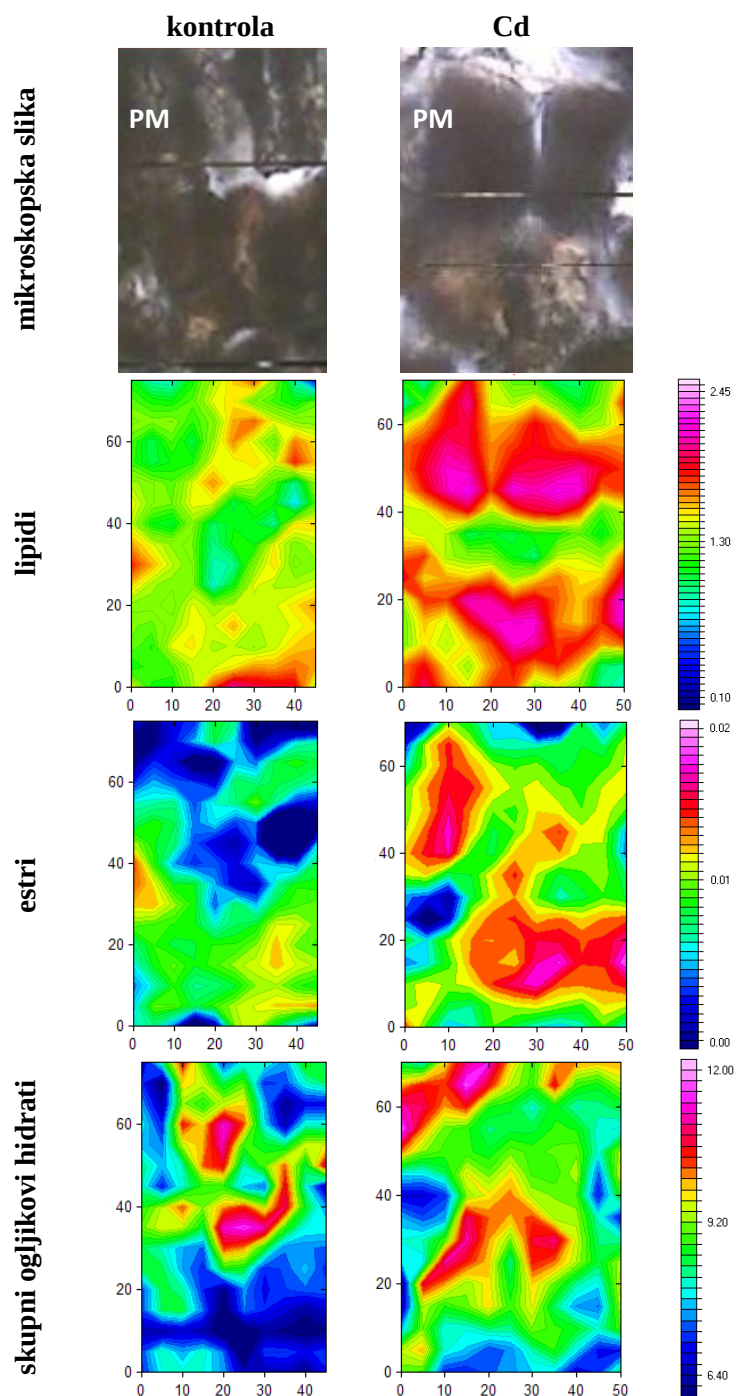
Figure 32: Scanning electron microscopy (SEM) micrography of leaf cross sections of **a-b)** control plants and **c-d)** plants supplemented with 150 μM Cd. The sections were placed between 2 layers of Au mesh. On figure **b)** is 800-fold enlarged area of palisade mesophyll of control plants, where we see oblong cells and, on figure **d)** is 770-fold enlarged area of palisade region of Cd treated plants with oval cells.. ZP-upper epidermis, PM-palisade mesophyll, GM-spongy mesophyll, SP-lower epidermis. Foto: Marta Debeljak (KI)

4.4.2 Vpliv Cd na sestavo organske matrike

Z metodo ATR smo najprej pomerili spektre v celotnih vzorcih listov kontrolnih rastlin in rastlin, izpostavljenih 150 μM CdSO_4 . Nato smo opravili podrobnejše meritve na tkivnem nivoju, kjer smo na prečnih rezinah listov v palisadnem mezofilu s SR-FTIR najprej pridobili mape porazdelitve organskih komponent, nato pa iz njih pridobili spektre v območju med 4000 in 800 cm^{-1} .

Iz porazdelitvenih SR-FTIR map, pomerjenih na vzorcih iste debeline, lahko ugotovimo, da so prispevki lipidov, estrov in skupnih ogljikovih hidratov v izbrani regiji lista pri rastlinah, izpostavljenih Cd, večji v primerjavi s kontrolo (**Slika 33**).

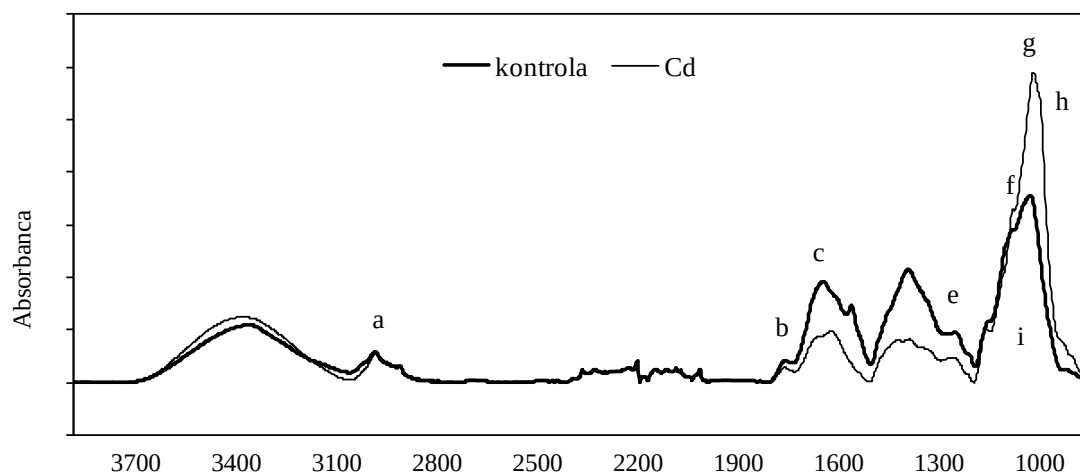
V spektrih kontrolnih in Cd izpostavljenih rastlin smo iskali ali so prisotna značilna področja za izbranih organskih komponent, kot so lipidi, proteini (amidi) in ogljikovi hidrati (celuloza, hemiceluloze, škrob in pektini). Poleg prisotnosti posameznih komponent nas je zanimala tudi njihova intenziteta, kot je to označeno na reprezentativnih spektrih, pomerjenih z ATR in s SR-FTIR (**Slik 34a in b**).



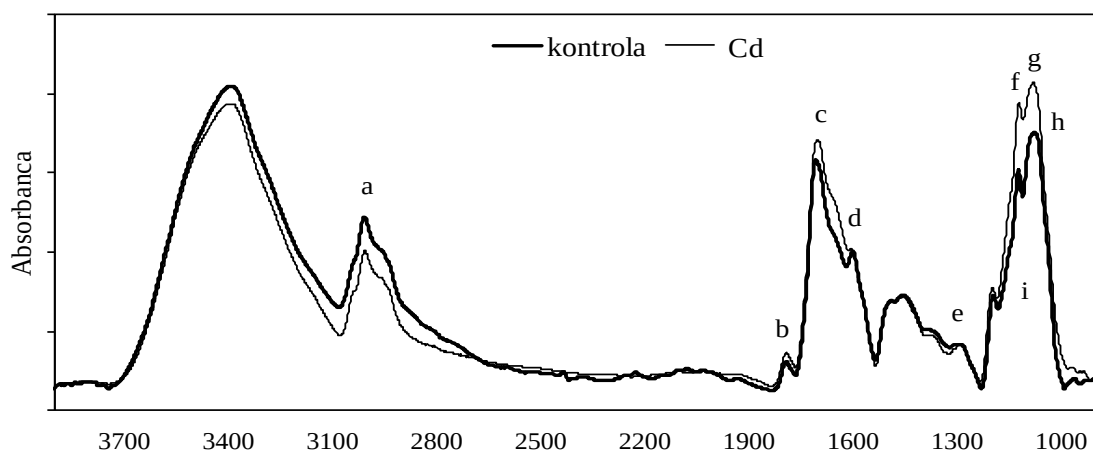
Slika 33: Primerjava map lipidov, estrov in skupnih ogljikovih hidratov, pomerjenih v področju stebričastega mezofila na prečnih prerezi listov ranega mošnjaka kontrolnih rastlin in rastlin, izpostavljenih 150 μM CdSO_4 . Spektri so bili pomerjeni z SR-FTIR. Vrednosti na x in y osi predstavljajo velikost mape v μm , vrednosti na intenzitetni skali pa normalizirano absorbanco. PM-palisadni mezofil

Figure 33: Comparison of maps for lipids, esters and total carbohydrates, measured in area of palisade mesophyll on cross leaf sections of control and with 150 μM CdSO_4 treated plants *T. praecox*. The spectra were measured with SR-FTIR. Values on x and y axis represents map dimensions in μm , values on intensities bar represent normalised absorbance. PM-palisade mesophyll

a) celotni vzorec (ATR)



b) palisadni mezofil (SR-FTIR)



Slika 34: Reprezentativna spektra kontrole in rastlin, izpostavljenih Cd, v regiji od 1800 do 840 cm^{-1} , pomejenih v področju palisadnega mezofila na prečnem prerezu listov ranega mošnjaka (*T. praecox*) s SR-FTIR. Črke označujejo značilna področja izbranih organskih spojin v IR spektru, ki so nas zanimala: **a)** lipidi (2980-2820 cm^{-1}), **b)** estri (1735 cm^{-1}), **c)** amid I (1655 cm^{-1}), **d)** amid II (1545 cm^{-1}), **e)** celuloza (1250 cm^{-1}), **f)** hemiceluloze (1070 cm^{-1}), **g)** škrob (1025 cm^{-1}), **h)** pektin (1014 cm^{-1}) in **i)** celotni ogljikovi hidrati (1180-950 cm^{-1}) (izbira področij prirejena po Regvar in sod., 2013).

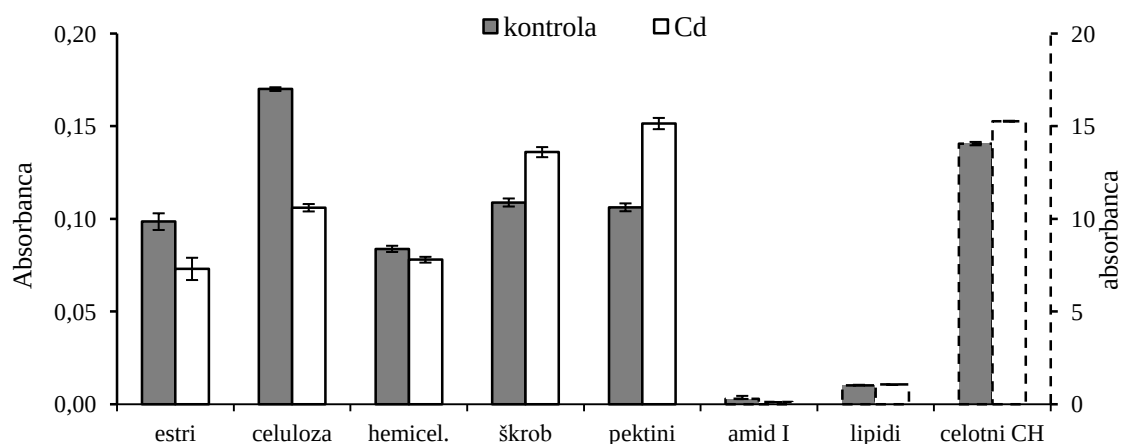
Figure 34: Representative SR-FTIR spectra of control and with Cd treated plants in region from 1800 to 840 cm^{-1} , measured in area of palisade mesophyll on leaf cross sections of *T. praecox*. Letters marks the signature areas of selected organic compounds in IR spectra that we were interested in: : **a)** lipids (2980-2820 cm^{-1}), **b)** ester band (1735 cm^{-1}), **c)** amide I (1655 cm^{-1}), **d)** amide II (1550 cm^{-1}), **e)** cellulose (1250 cm^{-1}), **f)** hemicelluloses (1070 cm^{-1}), **g)** starch (1025 cm^{-1}), **h)** pectin (1014 cm^{-1}) in **i)** total carbohydrates (1180-950 cm^{-1}) (similar areas were selected as in Regvar et al., 2013).

Iz vseh spektrov, pridobljenih z ATR in SR-FTIR smo lahko razbrali iste regije, značilne za posamezne organske komponente, le pri ATR nismo opazili vrha v območju pri 1545 cm^{-1} , ki je značilno za amide II in je sestavljeno iz $\delta(\text{N-H})$ prečnih in $\nu(\text{C-N})$

vzdolžnih nihanj amidnih vezi ter prečnih $\nu(\text{C-H})$ v proteinu, saj so se ti signali prekrivali s prispevki nihanj drugih komponent v vzorcu.

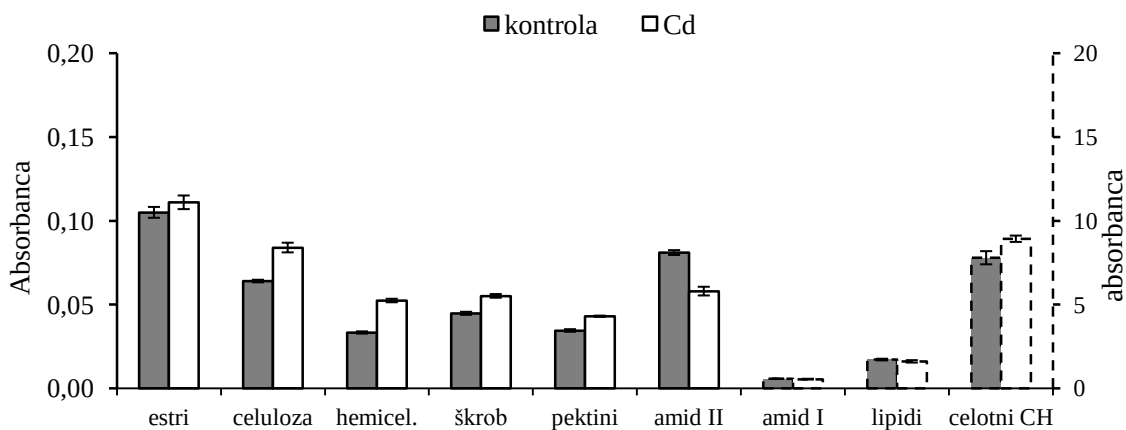
Pri primerjanju rezultatov meritev skupnih vzorcev listov (**Slika 35**) kontrole in rastlin, izpostavljenih 150 μM Cd, in nato podrobnejše analize v palisadnem mezofilu (**Sliki 36**) smo opazili nekaj podobnosti in razlik. Prispevki lipidov so bili primerljivi med kontrolo in Cd ter enaki na nivoju listov in na nivoju palisadnega mezofila, prispevki estrov, amidov I in celuloze so bili na nivoju listov manjši pri rastlinah, izpostavljenih Cd, medtem ko so bili prispevki teh komponent na nivoju palisadnega mezofila pri Cd večji od le-teh pri kontroli. Prispevek amidov II, ki ga pri analizi na nivoju listov nismo razbrali iz spektra, je bil v palisadnem mezofilu razločen in ob prisotnosti Cd mnogo manjši od kontrole. Prispevek hemiceluloz je bil na nivoju listov primerljiv med kontrolo in rastlinami, izpostavljenimi Cd, medtem ko smo na tkivnem nivoju pri Cd rastlinah zabeležili njihovo občutno povečanje (**Sliki 35 in 36**).

Za razliko od celuloze in hemiceluloz, pa smo pri ostalih ogljikovih hidratih opazili enak vzorec na organskem in tkivnem nivoju. Tako smo pričakovano opazili povečane prispevke škroba, pektinov in celotnih ogljikovih hidratov pri rastlinah, izpostavljenih Cd (**Sliki 35 in 36**).



Slika 35: Primerjava intenzitete absorbance, izračunanih iz ATR spektrov, posnetih v skupnih vzorcih listov kontrolnih rastlin ranega mošnjaka (*T. praecox*) in rastlin, izpostavljenih Cd. Vrednosti absorbance na primarni y-osi (leva), odgovarjajo stolpcem, ki so obrobljeni s polno črto (estri, celuloza, hemiceluloze, škrob, pektini), vrednosti absorbance na sekundarni y-osi (desna), pa odgovarjajo stolpcem, ki so obrobljeni s črtkano črto (amid I, lipidi, celotni CH). hemicel.-hemiceluloza

Figure 35: Comparison of absorbance intensities, calculated from ATR spectra, recorded on total leaf samples of control and Cd treated plants of *T. praecox*. Absorbance intensities on primary y-axis (left) corresponds to bars, bordered with continuous line (esters, cellulose, hemicelluloses, starch, pectins), and absorbance intensities on secondary y-axis (right) corresponds to bars, bordered with dashed line (amide I, lipids, total CH). hemicel.-hemicelluloses



Slika 36: Primerjava intenzitete absorbance, izračunanih iz SR-FTIR spektrov, posnetih v skupnih vzorcih listov kontrole in Cd. Vrednosti absorbance na primarni y-osi (leva), odgovarjajo stolpcem, ki so obrobljeni s polno črto (estri, celuloza, hemiceluloze, škrob, pektini), vrednosti absorbance na sekundarni y-osi (desna), pa odgovarjajo stolpcem, ki so obrobljeni s črtkano črto (amid I, lipidi, celotni CH). hemicel.-hemiceluloza

Figure 36: Comparison of absorbance intensities, calculated from SR-FTIR spectra, recorded on total leaf samples of control and Cd treated plants of *T. praecox*. Absorbance intensities on primary y-axis (left) corresponds to bars, bordered with continuous line (esters, cellulose, hemicelluloses, starch, pectins, and absorbance intensities on secondary y-axis (right) corresponds to bars, bordered with dashed line (amide I, lipids, total CH). hemicel.-hemicelluloses

5 RAZPRAVA

5.1 VPLIV CdCl_2 IN CdSO_4 NA PRIVZEM, PORAZDELITEV IN VEZAVNE OBLIKE Cd V LISTIH

Preučili smo ali z izpostavitvijo ranega mošnjaka dvema različnima oblikama Cd soli nastanejo razlike v odzivu rastline na organizemski ravni ter ali se razlike kažejo tudi v vezavni obliki Cd na tkivnem in celičnem nivoju. Predpostavili smo, da bodo razlike v prisotnosti S in Cl povzročile različen odziv rastline, kot sta razliki v biomasah korenin in poganjkov ter v akumulaciji Cd. Poleg teh dveh parametrov smo preverili še nekatere druge pokazatelje fizioloških prilagoditev rastlin, kot so koncentracije in vsebnosti klorofilov a in b ter antocianov, prav tako pa smo poleg Cd izmerili tudi koncentracije S, Cl in P. Na tkivnem in celičnem nivoju smo predpostavili spremembo vezavne oblike Cd. Le-to smo najprej preverili pri poganjkih na organskem nivoju, za preverjanje lokalne vezavne oblike Cd, pa smo morali najprej ugotoviti porazdelitev Cd v posameznih tkivih lista, ob tem pa smo analizirali še porazdelitve S, Cl in P ter izračunali stopnje njihove kolokalizacije.

Rastline *T. praecox*, ki so bile izpostavljene $100 \mu\text{M}$ CdCl_2 ali CdSO_4 , so imele značilno povečano biomaso poganjkov, kot so poročali tudi že Pongrac in sod. (2010). Pri rastlinah, izpostavljenih $300 \mu\text{M}$ CdCl_2 ali CdSO_4 pa je bila biomasa poganjkov manjša in primerljiva z maso kontrolne izpostavitve, kar nakazuje na visoko toleranco te rastline na Cd. Biomasa poganjkov je bila izrazito povečana pri $100 \mu\text{M}$ Cd rastlinah, kar je značilnost hormoneze. Pri hormonezi lahko prisotnost manjših koncentracij onesnažil (v tem primeru kovine Cd) spodbudi rast rastline, kar vodi v razredčevanje onesnažila v tkivih in tako do ohranjanja normalnega poteka metabolizma. Podobno je pri Cd hiperakumulatorju *T. caerulescens* ob izpostavitvi Cd prišlo do povečanja biomase poganjkov (Pongrac in sod., 2009) in hkrati do povečane aktivnosti nekaterih encimov, kot je npr. karbonska anhidraza (Liu in sod., 2008). To daje slutiti, da Cd lahko spodbudi rast ekotipov vrste *Thlaspi*, ki hiperakumulirajo Cd, vendar pa mehanizmi ostajajo neznani.

Dodatek različnih oblik soli v HR rastlin ni vplival na skupno koncentracijo klorofilov, so pa celotne koncentracije klorofilov v listih *T. praecox* vseh izpostavitvev s Cd v primerjavi s kontrolo upadle, kar je podobno kot v lončnem poskusu, ki so ga izvedli Pongrac in sod., (2009). Za razliko od koncentracij, pa so bile skupne vsebnosti pri rastlinah, izpostavljenih $100 \mu\text{M}$ Cd, primerljive z vsebnostmi klorofilov pri kontrolnih rastlinah, kar nakazuje na dejstvo, da je bilo zmanjšanje koncentracije klorofilov najverjetneje posledica povečanja suhe mase rastline. Pri rastlinah, izpostavljenih $300 \mu\text{M}$ Cd pa so bile celotne vsebnosti klorofilov značilno manjše kot pri kontroli, kar nakazuje na razvoj simptomov strupenosti, četudi nismo opazili vidnih znakov kloroze.

Cd naj bi vplival na razgradnjo klorofila pri rastlinah, saj so že Barylá in sod. (2001) predlagali, da bi lahko Cd neposredno vplival na encime, ki sodelujejo pri sintezi klorofilov, oz. bi lahko motil pravilno sestavljanje kompleksov pigment-protein v fotosistemih. Poleg tega pa bi naj Cd vplival na zalogo Fe, kar naj bi dodatno inhibiralo sintezo klorofilov (Bao in sod., 2012). Pri *T. praecox* se je zmanjšanje klorofila pojavilo šele pri velikih koncentracijah Cd v tkivih, kar kaže na zelo učinkovite mehanizme razstrupljanja.

Edina razlika med izpostavitvami CdCl_2 in CdSO_4 je bilo povečanje skupnih koncentracij antocianov pri rastlinah, izpostavljenih CdCl_2 . Akumulacijo antocianov v odvisnosti od izpostavitve Cd so dokazali že pri mnogih rastlinskih vrstah (Dai in sod., 2012; Mobin in Khan, 2007), s čimer bi se naj povečala antioksidativna sposobnost proti oksidativnemu stresu, ki ga sproži Cd (Dai in sod., 2012). Čeprav se antocianini prednostno shranjujejo v vakuolah, so pri vrstah *Lactuca sativa* in *Pseudowintera colorata* opazili, da se pred transportom v vakuole zadržujejo v citosolu, kjer bi njihova prisotnost lahko bila povezana z lovljenjem superoksidnih radikalov in H_2O_2 . Predlagano je bilo tudi, da se lahko antociani kompleksirajo z Mg (Kondo in sod., 1992), Fe (Everest in Hall, 1921), Al (Takeda in sod., 1985), Mo in W (Hale in sod., 2002). Nasprotno pa Cd pri rastlini *Brassica oleracea* (Hale in sod., 2002) ni povzročil barvne spremembe ekstrahiranih antocianinov. Hale in sod. (2002) predpostavljajo, da so antociani udeleženi pri sekvestraciji kovinskih ionov v periferna tkiva rastline. Vseeno bi bile potrebne nadaljnje študije, ki bi določile vlogo antocianov pri hiperakumulacijskih rastlinah. Rastline *T. praecox*, ki so bile izpostavljene $300 \mu\text{M}$ Cd, so v povprečju vsebovale okoli 1 % Cd, vsebnost antocianov pa je pri njih značilno upadla, v primerjavi s $100 \mu\text{M}$ Cd. To je verjetno posledica večje zastrupljenosti listnih tkiv in s tem posledično zmanjšana sposobnost sintetiziranja sekundarnih metabolitov (Krupa in sod., 1996).

Rani mošnjač, vzgojen v hidroponiki, je akumuliral do 1,2 % Cd v svojih poganjkih, kar so največje koncentracije, ki so bile izmerjene pri tej rastlinski vrsti (Vogel-Mikuš in sod., 2005; Tolrà in sod., 2006; Pongrac in sod., 2009). To je povezano z veliko koncentracijo Cd v HR rastlin ($300 \mu\text{M}$) in daljšim trajanjem poskusa (8 tednov). Koncentracije Cd v poganjkih so naraščale z naraščanjem koncentracije Cd v HR, ne glede na obliko dodane soli, vendar smo po izračunu vsebnosti Cd ugotovili, da so bile največje vrednosti Cd (do $25\,000 \mu\text{g rastlino}^{-1}$) v rastlinah, izpostavljenih $300 \mu\text{M}$ CdSO_4 .

Koncentracije S in Cl v poganjkih, so bile odvisne od koncentracij dodanih v HR. Zanimivo je, da smo pri rastlinah, izpostavljenih $300 \mu\text{M}$ Cd opazili povečane koncentracije P. Pravzaprav so bile povečane koncentracije P že pri rastlinah, izpostavljenih $100 \mu\text{M}$ Cd, kar nakazuje, da je bilo povečanje koncentracije P pri

rastlinah, izpostavljenih 300 μM Cd, najverjetneje posledica koncentracijskega učinka zaradi zmanjšane biomase poganjkov, ne pa spremembe v stopnji privzema, kot je bilo ugotovljeno že za Mg, Ca in S pri *T. caerulescens* (Küpper in Kochian, 2010).

S pomočjo analize EXAFS na Cd K-robu, smo pridobili informacijo o povprečni vezavni obliki Cd v celotnem poganjku *T. praecox* (mladi, zreli in stari listi), pri čemer smo ugotovili, da je delež O-ligandov večji od deleža S-ligandov pri vseh izpostavitvah. Isto je bilo ugotovljeno pri rastlinah *T. praecox*, nabranih v naravi, kjer je bilo približno 80 % Cd vezanega na O-ligande, kot so karboksilne in hidroksilne skupine organskih kislin in komponent celične stene, ter le 20 % na S-ligande (Vogel-Mikuš in sod., 2010). Četudi v mladih listih prevladuje večji delež S-ligandov in v starih listih prevladuje večji delež O-ligandov (Küpper in sod., 2004), pa lahko sklepamo, da je vezavna oblika Cd odvisna tudi od koncentracije oz. vsebnosti Cd v tkivih in prehranjenosti rastline z žveplom. Povečanje tkivne koncentracije Cd morda lahko sproži daljši zadrževalni čas Cd v citosolu, kjer se le-ta veže na močne S-ligande (še posebej v mladih listih; Küpper in sod., 2004), da ne moti vitalnih procesov, kot sta fotosinteza in celično dihanje. Po drugi strani pa prehranjenosti z žveplom predstavlja osnovo za sintezo S spojin oz. S-liganov, kar se lahko spremeni, če so rastline izpostavljene pomanjkanju S.

Kadmij se je pri vseh izpostavitvah v večini nahajal v vakuolah velikih vakuolariziranih epidermalnih celic zrelih listov in je v nekaterih predelih izmerjenih celic dosegal celo do 5 % suhe mase, odvisno od koncentracije Cd v HR rastlin, kot so ugotovili že drugi (Vázquez in sod., 1992; Wójcik in sod., 2005). Eden izmed vodilnih mehanizmov razstrupljanja kovin v listih je akumulacija kovin v metabolno manj aktivnih tkivih, kot je epidermis. Vendar pri upoštevanju relativnih utežnih deležev posameznega tkiva v listu *T. praecox* (epidermis 18,3 %, mezofil 74,8 % in žile 6,9 %) po Vogel-Mikuš in sod. (2008a), ugotavljamo, da se znatni delež Cd nahaja v mezofilu. Nedavna študija je pokazala, da je vzorec porazdelitve Cd v listnih tkivih Zn/Cd hiperakumulatorja *T. caerulescens* odvisen od različne stopnje izražanja kovinskih transporterjev, večinoma TcZNT5, ki so bolj zastopani v plazemski membrani velikih epidermalnih celic, kot pri ostalih tipih celic (Leitenmaier in Küpper, 2011). V naši raziskavi smo zabeležili velike koncentracije Cd v stenah epidermalnih celic (do 0,7 % SM), kar postavlja apoplast kot dodaten ponor Cd, kot je že bilo ugotovljeno (Vogel-Mikuš in sod., 2008a). Velika stopnja akumulacije Cd v apoplast nakazuje, da ima poleg sekvestracije v vakuole, pomembno vlogo pri razstrupljanju citosola epidermalnih celic pri *T. praecox* tudi iztok Cd (Ebbs in sod., 2009).

V velikih epidermalnih celicah je bil Cd močno kolokaliziran s Cl, ne glede na izpostavitve. Pri rastlinah, ki so bile izpostavljene 100 μM CdCl₂, je bilo več Cd in Cl akumuliranega v simplastu epidermisa, kot pri rastlinah 100 μM CdSO₄, medtem ko je

bilo pri rastlinah 300 μM Cd ravno nasprotno. To lahko delno pojasnimo z veliko variabilnostjo v velikosti epidermalnih celic in z majhnim številom ponovitev, zaradi omejenega merilnega časa na žarkovni liniji. Küpper in sod. (1999) so ugotovili, da je premer epidermalnih celic povezan s koncentracijo Zn v posamezni celici. Po tem lahko sklepamo, da lahko velike epidermalne celice akumulirajo velike koncentracije elementov, kot sta Cd in Cl, kot smo opazili v naši študiji. Prisotnost velikih koncentracij Cl v simplastu epidermisa, natančneje v vakuolah, je že bila opažena tudi pri *T. praecox* iz narave (Vogel-Mikuš in sod., 2008b), vendar se takrat temu dejstvu ni posvečalo veliko pozornosti.

Zadrževanje Cl^- v vakuolah vpliva na privzem kationov, saj so le-ti potrebni za vzdrževanje elektronegativnosti preko tonoplasta. Pleg tega je bilo ugotovljeno, da Cl stimulira protonsko črpalko vakuolnega tipa ATP-aze (V-tip ATP-aza), ki je odgovorna za vzdrževanje gradienta H^+ . Takšno črpalko se v rastlinah nahaja na membrani vakuole (Luttge in Ratajczak, 1997) in je lahko združena s kation/ H^+ -antiporterji, kjer spodbuja privzem kationov (pin rav tako Cd^{2+}) v vakuole (Golldack in Dietz, 2001). Poleg ostalih, sta kation/ H^+ -antiporterja CAX1 in CAX2 možna kandidata za sekvestracijo Cd v vakuole pri rastlini *T. praecox* (Hirschi in sod., 1996).

Povezava med akumulacijo Cd in Cl v simplastu in vplivi izpostavitve rastlinam CdCl_2 in CdSO_4 na porazdelitev Cd, je bil še bolj opazen v palisadi mezofila. Pri rastlinah, izpostavljenih CdCl_2 , se je Cd v večini nahajal v vakuolah palisade mezofila, medtem ko so rastline CdSO_4 imele nižje vsebnosti Cl^- in večje vsebnosti SO_4^{2-} (kar ne stimulira V-tipa ATP-azne aktivnosti do takšne mere kot Cl^-) (Broadley in sod., 2012) ter več Cd akumuliranega v apoplastu. Podobne razlike v porazdelitvi Cd v mezofilu so bile opažene pri dveh ekotopih *T. caerulescens*, Prayon in Ganges. Pri ekotipu Prayon je bila stopnja iztoka Cd iz mezofila večja, iz zato je bilo posledično več Cd akumuliranega v apoplastu mezofila, medtem ko ima ekotip Ganges večjo sposobnost sekvestracije Cd v vakuolah mezofila (Leitenmaier in Küpper, 2011). Omenjene razlike med tema dvema ekotipoma lahko pripišemo različni ekspresiji in porazdelitvi transporterjev kovin (Leitenmaier in Küpper, 2011). Dodatno razlago ponujajo naši rezultati, ki nakazujejo, da sta stopnja privzema in iztoka Cd in s tem končen vzorec porazdelitve Cd med apoplastom in simplastom v mezofilu lista pri *T. praecox* lahko odvisna tudi od količine Cl^- v rastlinskih tkivih.

Kot že omenjeno, se je Cd akumuliral v apoplastu mezofila v obliki depozitov, bogatih z S in P, kar je bilo posebej izrazito pri rastlinah, izpostavljenih 300 μM CdSO_4 , kjer so bile koncentracije Cd večje kot pri rastlinah, izpostavljenih 100 μM CdSO_4 . Pri ne-akumulacijskih rastlinah dodatek P v HR lahko poveča delež Cd vezanega v frakciji celične stene, še posebej v koreninah (Jiang C.F. in sod., 2007; Qiu in sod., 2011). Predlagano je bilo, da dodaten P poveča vsebnost elektronegativnih ionov, kot so

HPO_4^{2-} in H_2PO_4^- , kar lahko vodi v vezavo Cd^{2+} na komponente celične stene preko različnih mehanizmov, kot so adsorpcija, kompleksacija, precipitacija in kristalizacija, s čimer se zmanjša migracijska sposobnost Cd po rastlini (Jiang C.F. in sod., 2007; Qiu in sod., 2011). Poleg visoke ko-lokalizacije Cd s P, smo opazili tudi visok delež kolokalizacije z S pri rastlinah, izpostavljenih 300 μM Cd. Za odkritje vezavnih oblik Cd smo na področjih, kjer se je Cd odlagal, posneli spektre mikro-XANES na Cd L_3 -robu v določenih delih celic lista *T. praecox*.

Spektre mikro-XANES na Cd L_3 -robu smo posneli na področjih bogatih s Cd v apoplastu in simplastu zrelih listov, tako da rezultati odražajo le lokalno okolje Cd, in ne povprečja, kot smo ga pridobili s meritvami EXAFS na Cd K-robu. Najboljša linearna kombinacija fitanja z izmerjenimi referenčnimi spektri je bila s Cd-glutationom (Vogel-Mikuš in sod., 2010; Küpper in sod., 2004) in s Cd-pektinom (Ueno in sod., 2005; Küpper in sod., 2004). Predhodno so že bile potrjene velike koncentracije pektinskih komponent v epidermisu lista *T. praecox* iz narave z uporabo SR-FTIR (Regvar in sod., 2013). To nakazuje, da pri rastlini *T. praecox* pektinske komponente zagotavljajo znaten delež R-COOH in R-OH mest, kot potencialnih vezavnih mest za Cd, še posebej v celičnih stenah. V vakuolah pa so organske kisline verjetnejše komponente za vezavo Cd kot polisaharidi. Potrebo je poudariti, da so bili ti mikro-XANES spektri uporabljeni le kot orodje za primerjavo vezavnih oblik Cd z različnimi možnimi ligandi omenjenimi v literaturi (Isaure in sod., 2006, 2010) in kot taki ne odražajo stanja in-vivo.

Četudi smo ugotovili velike koncentracije Cl in značilno kolokalizacijo Cd-Cl v vakuolah velikih epidermalnih celic in celic mezofila rastlin izpostavljenih 100 μM CdCl_2 in 300 μM CdSO_4 , je bil Cd vezan na O-ligande in S-ligande ne pa na Cl-ligande. CdCl_2 je najverjetneje disociiral že v HR in se nato v rastlini ni ponovno povezal s Cl v CdCl_2 . CdCl_2 torej nima vloge pri olajšanem privzemu in transportu Cd v *T. praecox* preko mehanizmov odstranjevanja oz. zmanjševanja naboja (kot so CdCl_2^0 vrste), kar bi povečalo difuzivnost oz. lipofilnost Cd in s tem povečalo sposobnost za prehod skozi membrane, kot so predlagali Ozkultu in sod. (2007). Bolj verjetna je torej vloga Cl pri sekvestraciji Cd preko aktivacije V-ATP-aze (Broadley in sod., 2012).

V vakuolah epidermalnih celic je pri rastlinah, izpostavljenih 100 μM CdCl_2 in 300 μM CdSO_4 , delež O-ligandov naraščal z naraščanjem Cd koncentracije. Cd ima drugače večjo afiniteto za vezavo tiolov (R-SH) kot hidroksilnih (R-OH) in karboksilnih (R-COOH) skupin, tako da se prednostno Cd^{2+} ioni vežejo na R-SH skupine. Po saturaciji le-teh pa se Cd^{2+} ioni dalje vežejo na O-ligande. Velikost bazena R-SH, ki je na voljo, je odvisna od prehrane z žveplom, stopnje pretvorbe sulfata v tiole, rastlinske vrste in okoljskih dejavnikov, kot so temperatura, svetloba in dostopnosti vode ter od prisotnosti različnih stresnih dejavnikov (Hawkesford in sod., 2012). Predpostavljamo, da je pojav

simptomov strupenosti zaradi Cd in upad biomase rastlin pri rastlinah, izpostavljenih 300 μM Cd v primerjavi z rastlinami, izpostavljenimi 100 μM Cd, morda povezan s nasičenjem bazena R-SH ter z omejeno kapaciteto za shranjevanje Cd v metabolno manj aktivnih predelih rastline.

V simplastu mezofila, v vakuoli, je bil delež S-ligandov relativno velik (58 % pri rastlinah 100 μM CdCl₂, 49 % pri 300 μM CdSO₄), najverjetneje za zaščito zelo občutljivih metabolnih procesov pred prostimi Cd²⁺ ioni. Ta opažanja so v nasprotju z rezultati, pridobljenimi pri predhodni študiji na podlagi EXAFS na Cd K-robu, kjer so v mezofilu prevladovali O-ligandi (Vogel-Mikuš in sod., 2010). V pretekli študiji je bilo povprečje Cd ligandov določeno v izoliranem tkivu mezofila, ki je vseboval 1700 $\mu\text{g g}^{-1}$ Cd (4900 $\mu\text{g g}^{-1}$ v vakuolah) (Vogel-Mikuš in sod., 2008a, 2010), medtem ko smo v sedanji študiji določili povprečno koncentracijo Cd v vakuolah mezofila med 600 $\mu\text{g g}^{-1}$ in 850 $\mu\text{g g}^{-1}$. To ponovno nakazuje, da se delež S-ligandov v simplastu manjša z naraščanjem Cd v tkivih, kot je bilo opaženo v epidermalnih celicah.

V apoplastu mezofila rastlin, izpostavljenih 300 μM CdSO₄, kjer so koncentracije Cd v določenih depozitih dosegle več kot 1 %, je bilo 63 % Cd S-ligandov. To nakazuje, da močni Cd-S kompleksi niso prisotni le v simplastu (citosol), temveč tudi v celičnih stenah in medceličnih prostorov. Predlagan mehanizem akumulacije takšnih depozitov je lahko iztok (Ebbs in sod., 2009) Cd-S-R kompleksov iz citoplazme ali vezave Cd na R-SH spojine shranjene v celičnih stenah že pred vstopom v symplast, torej pri transportu iz ksilema preko apoplastne poti do mest, kjer izhlapeva voda. Cd-S kompleksi, shranjeni v mezofilu apoplasta *T. praecox* so bili obogateni tudi z P, vendar koordinacija Cd s fosfatnimi skupinami z mikro-XANES na Cd L3-robu tukaj ni bila potrjena. Spojine s P lahko morda pomagajo fiksirati Cd-S-R komplekse v netopne snovi, s čimer bi bilo preprečeno njihovo raztapljanje in ponovno privzemanje nazaj v celice mezofila. Za ugotovitev natančne sestave teh kompozitov bi bile potrebne nadaljnje analize.

Vezavne oblike Cd smo preučevali tudi v floemu. Prevladoval je delež O-ligandov, čeprav so relativni deleži S-ligandov in O-ligandov upadli z naraščanjem koncentracije Cd, kot smo že opazili v simplastu. Zanimivo je, da je bilo pri rastlinah, izpostavljenih CdCl₂, več Cd vezanega na S-ligande, kot pri CdSO₄, neodvisno od koncentracije Cd v HR. To bi lahko bilo povezano z večjo mobilnostjo Cd-S kompleksov ali večji koncentraciji R-SH spojin v floemu CdCl₂ rastlin, v primerjavi s CdSO₄ rastlinami. Redukcija sulfata se prednostno odvija v listih oz. natančneje v kloroplastih, nato pa se R-SH spojine nalagajo v floem v mezofilu lista in se transportirajo v korenine (Hawkesford in sod., 2012). Nizkomolekularni tioli imajo pomembno vlogo pri razstrupljanju Cd v koreninah hiperakumulatorja *T. caerulescens* (Hernandez-Allicia in sod., 2006) in ker izpostavitve Cd poveča potrebo po organskih S spojinah v koreninah,

to najverjetneje vodi v povečano nalaganje R-SH v floem. Naši rezultati kažejo na to, da dodatek CdCl_2 v primerjavi z dodatkom CdSO_4 lahko vodi v motnje žveplovega metabolizma, kar se lahko kaže v povečanju deleža Cd S-ligandov v floemu. Vseeno so za razrešitev tega vprašanja potrebne še dodatne študije.

5.2 VPLIV Cd IN MINERALNEGA POMANJKANJA NA PRIVZEM Cd IN NEKATERIH ESENCIALNIH MINERALNIH HRANIL

Akumulacija vsakega posameznega elementa je kompleksen proces, ki ga upravlja mreža genskih produktov, ki so ključni za privzem, vezavo, prenos in sekvestracijo tega elementa. Na mnoge od teh genov in fizioloških procesov vpliva več kot le en element naenkrat, zato je za preučevanje regulacije posameznih elementov najprej potrebno pomeriti čim večji možni nabor elementov v celici, tkivu ali organizmu (ionom), kot je mogoče (Baxter, 2009). Nas je zanimalo, kako vpliva CdSO_4 in pomanjkanje Mg, Ca, Zn, Fe ali Mn na rastlinski ionom, predvsem pa nas je zanimal privzem in porazdelitev Cd ter nekaterih esencialnih mineralnih hranil v koreninah in poganjkih, te rezultate pa smo primerjali tudi z meritvami rastnega odziva rastlin. Največje spremembe smo pričakovali v primeru kombinacije pomanjkanja ključnih esencialnih elementov za rast rastlin oz. razstrupljanje kovin in tretiranja s Cd.

Na podlagi suhe mase korenin in poganjkov, koncentracij Chl a, Chl b in karotenoidov ter meritve potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti smo ugotovili, da se kontrolne rastline in rastline, ki so rastle v rastnih komorah in so bile izpostavljene $150 \mu\text{M}$ Cd, niso značilno razlikovale po rastnem odzivu. Kot že omenjeno, to odraža učinkovitost tolerančnih mehanizmov ranega mošnjaka pri dolgotrajni izpostavljenosti Cd. Küpper in sod., (2007) so prav tako opazovali učinke dolgotrajne izpostavitve Cd pri rastlini *T. caerulea* in ugotovili, da so ravno parametri, povezani s fotokemijo rastline (npr. fluorescenca klorofila) boljši pokazatelji Cd stresa kot ne-fotokemični parametri, so pa že pri izpostavitvi $50 \mu\text{M}$ Cd zabeležili negativne učinke Cd na fotokemično učinkovitost rastlin.

Opozoriti je potrebno, da smo pa pri študiji, kjer smo preučevali vpliv Cd na metabolizem ogljikovih hidratov, pri isti koncentraciji Cd opazili negativne učinke pri rastnem odzivu rastline, a smo le-te pripisali sub-optimalnim pogojem za rast kot sta bili višja povprečna temperatura in nižja vlaga v rastlinjaku, v primerjavi s pogoji v rastni komori, ki jih uporabljamo pri vseh ostalih poskusih na ranem mošnjaku. Ker torej po rasti rastlin v optimalnih pogojih v rastni komori pri $150 \mu\text{M}$ Cd nismo opazili negativnih učinkov, smo sklepali, da koncentracija $150 \mu\text{M}$ Cd za te rastline ni strupena in je zato ustrezna izbira za preučevanje nadaljnjih interakcij s pomanjkanjem posameznih mineralov v HR rastlin.

Četudi nismo zabeležili razlik v rastnem odzivu rastlin, izpostavljenih 150 μM Cd, v primerjavi s kontrolo, pa smo opazili veliko spremembo v ionomu rastline. Pravzaprav so bile spremembe ionoma rastline pri izpostavitvi rastlin Cd mnogo večje, kot pri pomanjkanju katerega od preučevanih mineralov, ter so se ponovile pri kombinaciji pomanjkanja mineralov in hkratni izpostavitvi Cd. Iz tega lahko sklepamo, da prisotnost Cd mnogo kompleksnejše vpliva na homeostazo mineralov v rastlini kot pa pomanjkanje posameznega elementa.

Pri primerjanju rastnih parametrov in predvsem privzema mineralov v korenine in poganjke, torej na nivoju organov, smo tako opazili enoten vzorec pri odzivu rastlin na Cd in to so spremembe predvsem v koncentracijah mikronutrientov, natančneje njihovo povečanje v koreninah in nato zmanjšanje v poganjkih. Pri vseh rastlinah smo opazili skupno lastnost – spremembe v prerazporeditvi Fe, Cu in Zn med koreninami in poganjki. Prav do istih zaključkov so prišli tudi Przedpelska-Wąsowicz in sod. (2012), kjer so prvi ugotovili, da so pri Zn/Cd hiperakumulatorju *A. halleri* vsebnosti Cd v rastlini značilno povezane z vsebnostmi mineralnih nutrientov, kot so Fe^{2+} , Cu^{2+} in Zn^{2+} , poleg tega pa še z Mg^{2+} in Mn^{2+} . Prav tako smo mi opazili povezavo med Cd in Mg^{2+} , vendar le pri rastlinah -Mg+Cd in -Zn+Cd. V omenjeni študiji vzrokov za te korelacije ne pripisujejo le učinku kompeticije med temi elementi, temveč raje posledicam mehanizmov, povezanih z vzdrževanjem homeostaze ionov. Pri tem predpostavljajo, da je sposobnost tolerance in hiperakumulacije pri *A. halleri* ravno posledica sposobnosti vrste za vzdrževanje ionske homeostaze ob prisotnosti Cd stresa.

Na podlagi vseh pridobljenih rezultatov, predvsem pa linerarne regresije, lahko razločimo 2 skupini rastlin s podobnimi odzivi na prisotnost Cd v HR, v prvi skupini so torej -Mg+Cd, -Zn+Cd in -Mn+Cd, ki so po odzivu najbolj podobni izpostavitvi 150 μM Cd, v drugi skupini pa -Ca+Cd in -Fe+Cd. To nam daje slutiti na dejstvo, da prisotnost Cd v rastlini sproži vedno isto vrsto odziva ter da ti se le-ti odzivi rastlin spremenijo ob spremembi še drugega okoljskega dejavnika, kot je pomanjkanje katerega od esencialnih elementov.

Pri samem pomanjkanju Fe v HR ranega mošnjaka nismo dokazali tudi zmanjšanih koncentracij Fe v rastlini, smo pa pri -Fe+Cd opazili značilno povečan privzem Mg in Cd v poganjke. Koncentracija slednjega je bila celo višja kot pri izpostavitvi 150 μM Cd. Razlog za to je najverjetneje dejstvo, da se rastline na pomanjkanje Fe odzovejo s povečanjem biodostopnosti in transportom Fe (Kim in Guerinot, 2007). Povečanje privzema rastline dosežejo s povečanim delovanjem FRO (ferric-chelate reductase) ter z akumulacijo Fe^{2+} transporterja IRT1, kar pospeši privzem Fe celo do take stopnje, da so rastline sposobne vzdrževati stabilno koncentracijo Fe v poganjkih preko 10-kratnega razpona v koncentraciji Fe v rastnem mediju rastline (Baxter in sod., 2008). Pri *T. caerulescens* (Ganges) so tako že potrdili pozitiven učinek pomanjkanja Fe na privzem Cd v rastlino, kar bi naj bilo povezano s povečano ekspresijo genov, odgovornih za

privzem Fe^{2+} , najverjetneje TcIRT1-G Lombi in sod., 2002). Razlog za povečanje Cd, ki smo ga opazili pri $-\text{Fe}+\text{Cd}$ v poganjkih pa je najverjetneje tudi ta, da povečanje privzema Fe ni edini učinek povečanja ekspresije in akumulacije IRT1, saj te spremembe zaradi manjše specifičnosti IRT1 vplivajo tudi na povečanje privzema in akumulacije Cd, Zn in Mn (Vert in sod., 2001; Baxter, 2009), ob tem pa rastlina najverjetneje ne uspeva več uravnovesiti primanjkljaja Fe v rastlini.

V primeru *T. caerulescens* se je pokazalo, da je zelo občutljiv na pomanjkanje Zn v rastnem substratu, saj je ob dodatku Cd prišlo do povečane koncentracije slednjega v rastlini (Ozturk in sod., 2003). Pri že omenjeni raziskavi *T. caerulescens* sta Küpper in Kochian (2010) končno potrdila, kar se je domnevalo že nekaj časa, da lahko namreč Cd vstopi v rastlino tudi preko Zn transporterjev, saj so ob dodatku Cd opazili znaten upad koncentracije Zn v poganjkih. Podobno kompeticijo med Zn in Cd so pri *T. caerulescens* opazili tudi Assunção in sod. (2008) ter mi v tej študiji na *T. praecox*.

Za Ca je bilo v nekaterih raziskavah že dokazano, da lahko pomaga ublažiti strupenost Cd, saj namreč Ca in Cd tekmujeta za iste Ca kanalčke v rastlinah (Sarwar in sod., 2010). Ta učinek so opazili pri kalicah *A. thaliana* (Suzuki, 2005) ter pri pšenici, ki je rastla v lončnem poskusu, kjer so ugotovili, da lahko povečanje koncentracije Ca v prsti povzroči kar za 50 % zmanjšanje Cd v pšenici, a so ta učinek pripisali predvsem povečanju pH substrata, ki je imobiliziral kovino v prsti (Sarwar in sod., 2010). Za povečan privzem Cd v primeru pomanjkanja Ca pa bi lahko bil odgovoren transporter LCA1, ki je izvorno poznan pri pšenici. Dokazali so namreč, da pri kvasovkah posreduje pri privzemu Ca in Cd, pri čemer povečana ekspresija LCT1 vodi do povečanega privzema Cd (Clemens in sod., 1998). Zhao in sod., (2002) pa so predlagali, da bi Cd lahko vstopal v rastlino preko Ca kanalčkov. Tako sta tudi kation/ H^+ -antiporterja CAX1 in CAX2 možna kandidata za sekvestracijo Cd v vakuole pri rastlini *T. praecox* (Hirschi in sod., 1996).

Vpliv Mg na privzem Cd še ni dobro preučen, saj lahko iz literature razberemo nasprotujoče si podatke. Tako naj bi pomanjkanje Mg pri *A. thaliana* pozitivno vplivalo na zmanjšanje strupenosti Cd (Hermans in sod., 2011), medtem ko je ravno dodatek Mg pri rastlinah *Brassica rapa* povzročil zmanjšan privzem Cd (Kashem in Kawai, 2007).

Prav tako so šele pred kratkim za privzem Mn pri rastlinah iz rodu *Arabidopsis* ugotovili, da je v primeru njegovega pomanjkanja v rastlinah, za njegov privzem odgovoren AtNRAMP1, ki pa je hkrati odgovoren tudi za povečan privzem Fe v pogojih pomanjkanja le-tega (Ishimaru in sod., 2012). Kot skupen transporter za prenos Mn, Fe in Cd je bil prav tako pred kratkim odkrit OsNRAMP5 v rižu, ki se nahaja predvsem na epidermisu korenin, zunanjih plasteh korteksa in okoli ksilema (Ishimaru in sod., 2012).

Če torej povežemo vsa dejstva, lahko razumemo, da prav vsako od preučevanih pomanjkanj lahko (nehote) povzroči povečano akumulacijo Cd. Vendar to ne pojasni skoraj identičnega odziva pri rastlinah, ki so rastle v pomanjkanju in v dodatku Cd ter rastlinah, ki so rastle v polni HR z dodanim Cd. Kaj je skupnega vsem rastlinam? Če združimo te podatke s tistimi, ki smo jih pridobili pri rastlinah, ki so rastle le v pomanjkanju ugotovimo, da pomanjkanje Fe in Ca v rastlini povzroči podobne spremembe na nivoju ionoma in rastnega odziva, kot pri rastlinah, ki so rasle v kontrolni raztopini z dodanim Cd. Glede na podobnost v odzivu rastlin na hkratno pomanjkanje in dodatek Cd, lahko sklepamo, da obstaja povezava med transportom Ca, Fe in Cd. Razlog za povezavo teh dveh sistemov je najverjetneje ta, da hiperakumulacijske rastline pogosto rasejo na apnenčastih tleh, ki so bogata s Ca, a jim pogosto primanjkuje Fe (Keller in Hammer, 2004). Roosens in sod., (2003) so pri preučevanju različnih populacij *T. caerulescens* predpostavil, da obstajata dva ločena sistema, saj so ugotovili, da se pri Ganges populaciji Cd transportira večinoma preko visoko-afinitetnega sistema za privzem Fe, pri ostalih preučevanih populacijah pa preko nizko-afinitetne poti za privzem Ca. Vpliv pomanjkanja Ca v povezavi s privzemom Cd še vedno ostaja slabo preučen.

Na podlagi klastrske analize smo potrdili, da se ostale rastline prav tako združujejo po podobnostih v skupino, kjer so poleg kontrole še -Mg, -Zn in -Mn oz. pri Cd izpostavljenih rastlinah +Cd, -Mg+Cd, -Zn+Cd in -Mn+Cd, ob čemer predpostavljamo, da imajo ti esencialni minerali, katerih pomanjkanje smo testirali, podobne vzorce privzemanja oz. skupen transporter (morda tudi več). Na podlagi pregledane literature bi bil, kot že omenjeno, najverjetnejši kandidat kateri od transporterjev družine ZIP (Vert in sod., 2001; Baxter, 2009) ali NRAMP, ki so sposobne posredovati pri privzemu Cd, ter tudi Zn in/ali Fe (Mäser in sod., 2001).

Vseh razlik v rastnih parametrih si nismo znali pojasniti z večelementnimi analizami na organskem nivoju, zato smo podrobneje preučili porazdelitev elementov na tkivnem nivoju na prečnem prerezu zrelega lista. Na podlagi linearne diskriminantne analize se pokaže, da se grupirajo kot podobna pomanjkanja z dodanim Cd skupaj. Edino izjemo predstavlja pomanjkanje Ca, ki se grupira blizu -Ca+Cd in +Cd, kar pomeni, da ja na tkivnem nivoju učinek pri teh treh tretmajih najbolj podoben, kar pomeni, da že samo pomanjkanje Ca na nivoju rastline povzroči podobne učinke, kot dodatek Cd.

Nadalje smo primerjali koncentracije Mg, Ca, Fe in Cd na tkivnem nivoju pri tretmajih, ki so bili najbolj podobni kontroli (-Mg) oz. tretmaju z dodanim Cd (to sta bila -Ca in -Fe) ter tretmajih pomanjkanja teh elementov in z dodatkom Cd (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Fe+Cd). Razlog za značilno manjšo koncentracijo Chl a in Chl b pri tretmajih -Mg+Cd, -Ca in -Fe tako opazimo v značilno nižjih koncentracijah Mg v mezofilu teh rastlin. Rastlina je torej v primeru pomanjkanja Mg le-to uspešno kompenzirala, kar pa ji nato pri dodatnem stresu zaradi Cd ni več uspevalo. Kot že omenjeno, je najverjetneje prišlo

do inhibicije sinteze klorofila zaradi prisotnosti Cd^{2+} , saj bi le-ta lahko zamenjal Mg v mladih listih oz. kako drugače vpliva na sintezo klorofila (Krupa in sod. 1993, 1999; Küpper in sod. 2007).

Razloga za znaten in značilen upad potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti sistema v listih rastlin –Fe+Cd pa ne moremo pripisati pomanjkanju Mg v listnih tkivih, saj so bile le-te ravno nasprotno, primerljive ali celo značilno večje od kontrolnih. Vzrok lahko pripišemo koncentraciji Cd v mezofilu lista, saj je le-ta primerljiva s koncentracijo Cd pri rastlinah, izpostavljenih le Cd. Pomembna pa je tudi interakcija Mg in Fe, saj je poleg tega, da je Mg osnovni gradnik molekule klorofila, je za njegovo sintezo potreben tudi Fe, ki je del prekursorja klorofila, molekule protoporfirina (Römheld in Nikolic, 2006).

Cd se je v večjih koncentracijah nahajal v spodnji in zgornji povrhnjici pri vseh tretmajih, ta preferenčna porazdelitev pa se je ohranila tudi pri pomanjkanju Mg, Ca in Fe v HR, vendar so bile koncentracije Cd v tkivih le primerljive ali značilno nižje. Naši podatki se tako ujemajo s podatki, da naj bi ravno pomanjkanje Mg pri *A. thaliana* pozitivno vplivalo na zmanjšanje strupenosti Cd (Hermans in sod., 2011). Vzrok so verjetno poleg povečane ekspresije genov za transporterje Mg in Cd, kot je že omenjeni IRT1, povečana ekspresija še drugih transporterjev, ki lahko nato uspešno kompenzirajo pomanjkanje Mg kljub sočasnemu privzemu Cd. Znano je namreč, da je transkriptomski odziv na pomanjkanje Mg zelo poseben, saj lahko ob pomanjkanju Mg pride do pomanjkanja ostalih makroelementov (N, P, K, S), kar pa nato sproži ekspresijo ustreznih genov, ki sodelujejo pri povečanju kapacitete privzema v koreninah (Maruyama-Nakashita in sod., 2003; Misson in sod., 2005; Iyer-Pascuzzi in sod., 2009).

Tretmaji so se na podlagi ionoma poganjkov in biokemijskih podatkov grupirali drugače, kot so se nato na podlagi tkivnih koncentracij, pridobljenih z metodo mikro-PIXE. Pri tem je potrebno poudariti, da smo kot poganjke pomerili skupek starih, zrelih in mladih listov, na tkivnem nivoju pa smo preučili porazdelitev le pri zrelih listih. To razlikovanje očitno kaže na spremembe tekom razvoja rastlin, pomembna pa je tudi sama (ne-)mobilnost posameznih elementov. Na tkivnem nivoju tako lepo opazimo, da ima vpliv Cd podobne učinke na porazdelitev preostalih elementov ne glede na vrsto pomanjkanja, sama pomanjkanja pa se prav tako zgrupirajo skupaj. Edina izjema je pomanjkanje Ca ter pomanjkanje Ca z dodanim Cd, kjer oba tretmaja izkazujeta podobno porazdelitev, samo pomanjkanje Ca pa povzroči podobne učinke na tkivnem nivoju kot dodatek Cd, kar pomeni, da je homeostaza Ca pri ranem mošnjaku zelo pomembna.

Študija ionoma se je v tem primeru izkazala za zelo koristno, saj lahko s katero od cenovno dostopnih metod izvedemo mulitelemento analizo rastlin in si takoj ustvarimo celovitejšo sliko sprememb v mineralnem ravnovesju na nivoju cele rastline in ugotavljamo skupne točne in razlike, kot smo to naredili v naši raziskavi. Te podatke se

lahko nato primerja z že znanimi podatki iz literature o prisotnosti in lastnostih posameznih transporterjev pri izbrani rastlinski vrsti ali širšem sorodstvu, lahko pa služijo kot pokazatelj katera področja mineralne prehrane rastlin je potrebno še podrobneje preučiti. Seveda pa je, kot navajata Williams in Salt (2009), najboljši pristop več-stopenjski pristop, kjer hkrati zdržimo spoznanja preučevanja regulacije transkripcije, metabolitov in meritev encimske aktivnosti in jih poskušamo povezati z znanjem o mineralni preskrbljenosti in metabolnimi prilagoditvami rastline.

V prihodnje tako predlagamo usmeritev pozornosti na preučevanje interakcije med Cd in Ca, saj se je v naši raziskavi pokazala med njima močna povezava, a je zanekrat zbranih še premalo podatkov za postavitev teorije o mehanizmu njune interakcije.

5.3 VPLIV Cd NA METABOLIZEM OGLJIKOVIH HIDRATOV

Zanimalo nas je, kako Cd vpliva na metabolizem ogljikovih hidratov pri ranem mošnjaku. Za čim bolj nemoteno fotosintezo rastlin ter s tem nemoteno tvorbo in razporejanjem ogljikovih hidratov smo poskus izvedli na rastlinah, vzgojenih v rastlinjaku s kombinirano naravno in umetno osvetlitvijo. Da smo lahko primerjali učinke akutnega in kroničnega stresa zaradi prisotnosti Cd v HR rastlin ranega mošnjaka, smo primerjali rezultate različno trajajočih poskusov, kjer smo rastline izpostavili Cd stresu za različno obdobje časa. Za pokazatelja teh sprememb smo preučili koncentracijo transportnega sladkorja saharoze in aktivnost encimov, ki sodelujejo pri njegovi sintezi in razgradnji. Poleg encimov smo preučili tudi druge spremembe vpliva CdSO₄, kot so rast in odziv rastlin, s spremljanjem fotokemične učinkovitosti tekom poskusa ter končne koncentracije klorofilov in karotenoidov. Poleg skupnih topnih sladkorjev, smo pomerili še posamezne topne sladkorje ter škrob.

Ugotovili smo, da so rastline po 1 tednu izpostavljenosti privzele že znatne koncentracije Cd v svoja tkiva, a kljub temu niso kazale zunanjih znakov stresa, kot sta zmanjšanje mase korenin in poganjkov ali razbarvanje pigmentov, kar so potrdile tudi naše meritve mase, klorofila a, klorofila b in karotenoidov. Neprizadetost fotosinteznega sistema smo potrdili tudi z meritvijo fotokemične učinkovitosti (Adams in Demmig-Adams, 2004), saj so bile vrednosti potencialne fotokemične učinkovitosti okoli 0,8, kar nakazuje na nepoškodovan antenski kompleks (Bischof in sod., 1998), saj velja, da je potencialna fotokemična učinkovitost FS II sorazmerna neto fotosintezi (Krause in Weiss, 1991) in pri vitalnih rastlinah (neodvisno od vrste) dosega vrednosti 0,83 (Björkman in Demminf, 1987) oz. 0,8 (Azavedo in sod., 2005) in se zmanjša, kadar je rastlina izpostavljena stresnim razmeram (Björkman in Demminf, 1987).

Po kronični izpostavitvi Cd pa smo že opazili vidne spremembe na rastlinah, kot je zmanjšanje mase tako korenin in poganjkov, kar je značilen znak strupenosti zaradi

prisotnosti Cd (Seregin in Ivanov, 2001), čeprav pri preučevanju mineralnega pomanjkanja pri ranem mošnjaku do upada biomase rastlin ni prišlo in je bila le-ta pri rastlinah, izpostavljenih 150 μM Cd primerljiva s kontrolnimi rastlinami. Razlog za manjšo biomaso v primerjavi z ostalimi rezultati ostalih raziskav pripisujemo sub-optimalnim pogojem, kot sta bili višja povprečna temperatura in nižja vlaga v rastlinjaku, v primerjavi s pogoji v rastni komori, uporabljeni pri ostalih poskusih.

Druge vidne spremembe, kot so kloroze na mlajših listih rastlin, za 4 tedne izpostavljenih 150 μM Cd, smo potrdili tudi analizo. Kot že omenjeno, Krupa in sod. (1993, 1999) ter Küpper in sod. (2007) navajajo, da je v tem primeru najverjetneje prišlo do inhibicije sinteze klorofila zaradi prisotnosti Cd^{2+} , saj bi le-ta lahko zamenjal Mg v mladih listih. Kompleks klorofila z vgrajenim Cd je namreč zelo nestabilen in se razgradi v kratkem po nastanku, kar se na površini lista opazi kot razbarvanje (Küpper in sod., 1996). Cd bi lahko neposredno inhibiral tudi svetlobni žetveni kompleks II s PS II (Krupa, 1987). Zmanjšanje koncentracije klorofila a, klorofila b in karotenoidov ter upad potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti FS II, torej potrjujejo zmanjšanje fotosintezne sposobnosti rastlin, izpostavljenih Cd. O upadu koncentracije klorofilov ob povečevanju koncentracije Cd v HR pri *T. caerulescens* poročajo tudi Benzarti in sod., (2010). Pravzaprav je upad sinteze klorofilov v prisotnosti stresa zaradi povečanih koncentracij kovin dobro poznan pojav in ponazarja stopnjo fotosintezne aktivnosti v tako obremenjenih rastlinah (Jiang H.M. in sod., 2007). Zanimivo pa je dejstvo, da so Küpper in sod., (2007) po dolgotrajni izpostavljenosti *T. caerulescens* kadmiju opazili ponoven dvig fluorescence klorofila, kar so pripisali uspešni aklimatizaciji rastline in dejstvu, da je del te tolerance inducibilen in zajema začasno fiziološko heterogenost kot zasilen obrambni mehanizem.

Nepričakovano so bile koncentracije Cd v koreninah 1- in 4-tedenskega poskusa večje od koncentracij v poganjkih, saj smo namreč pričakovali večji delež Cd v nadzemnih delih, kot je že bilo zabeleženo pri *T. caerulescens* (Roosens in sod., 2003; Pongrac in sod., 2009). V skladu z našimi rezultati pa so Benzarti in sod., (2010) po izpostavitvi hidroponsko gojenega *T. caerulescens* 100 μM Cd ugotovili, da se je cca. 70 % kovine akumuliralo v koreninah, kar so potrdile še druge študije (Vitóra in sod., 2001; Wójcik in sod., 2005; Benzarti in sod., 2008). Rezultati raziskav celo kažejo, da lahko celo med 30 % in 90 % celotnega Cd v koreninah (pri koncentracijah do 50 μM Cd v hranilni raztopini), ostane vezanega v celično steno, od katerega je okoli 30 % vezanega Cd neizmenljivega (Redjala in sod., 2009). Ker se pri *T. caerulescens* razmerje koncentracije Cd poganjki/korenine, ki je >1 pojavlja manj dosledno (Lombi in sod., 2000), so nekateri začeli pri pospravljanju poskusa desorbirati kovine iz korenin (Roosens in sod., 2003). Podatek, da so bile koncentracije Cd v poganjkih tega poskusa primerljive s koncentracijami, pridobljenimi pri ostalih poskusih, pa nakazuje na dejstvo, da neizmenljiv Cd, ki se veže v celično steno korenin, ne vpliva na privzem v korenino, bi pa vseeno bilo v prihodnje priporočljivo Cd ob koncu poskusa desorbirati

iz površine korenin, saj bi le tako lahko pridobili boljšo oceno o Cd, ki je dejansko vstopil v korenino.

Pridobljeni rezultati o koncentraciji škroba v rastlinah kažejo na to, da je akutni stres pri najvišji koncentraciji Cd v HR povzročil akumulacijo škroba v poganjkih in s tem nižjo koncentracijo škroba v koreninah, ob nespremenjenih vrednostih celotnih topnih sladkorjev v koreninah in poganjkih. Po dlje časa trajajočem stresu pa se je rastlina očitno uspela prilagoditi Cd stresu, s to razliko, da se je razmerje porazdelitve škroba med koreninami v poganjki prevesilo v prid koreninam, kar pomeni povečanje koncentracije založnega škroba v koreninah. Tako kot pri ranem mošnjaku, tudi pri rjavi ogrščici (*Brassica juncea*) po daljšem času izpostavitve Cd (16 dni) niso zabeležili značilnih sprememb v akumulaciji škroba ter nobenih strukturnih sprememb na nivoju listov, so pa pri le-te opazili v koreninah in stebelu (Maruthi Sridhar in sod., 2005). Žal pa pri omenjeni študiji ugotovitve temeljijo le na TEM mikrofografijah in niso bile podprte s kvantitativnimi analizami škroba. Podrobneje so časovnim spremembam v koncentraciji škroba v rastlini sledili pri rastlini *A. thaliana*, ker so ugotavljali odziv metabolizma CH na znižanje temperature okolja (Nägele in sod., 2011). Ugotovili so, da se po akutnem stresu (7 dni) poveča zadrževanje škroba v poganjkih, prav tako pa se poveča koncentracija heksoz v rastlini, kar sovпада z našimi rezultati. Vpliv nižjih temperatur v okolju tako lahko povzroči takojšnje reprogramiranje metabolizma CH, ki spremeni vgrajevanje na novo fiksiranega ogljika v saharozo, namesto v škrob (Strand in sod., 1997, 1999).

Hitra prilagoditev ranega mošnjaka na Cd stres (najkasneje po 4 tednih) je dober pokazatelj učinkovitega metabolizem ogljikovih hidratov, ki predstavlja rastlini vir energije in ogljikovih skeletov. Učinkovit metabolizem ogljikovih hidratov je osnovna strategija preživetja rastlin, ki so podvržene različnim okoljskim vplivom (Ciereszko, 2009), tudi izpostavitvi povečanim koncentracijam kovin (Stobrawa in Lorenc-Plucińska, 2007). S kontrolo primerljive koncentracije škroba v poganjkih in hkratno povečanje topnih sladkorjev v koreninah po 4ih tednih si razlagamo kot prilagoditev rastline na Cd stres posledico velike metabolne aktivnosti korenin in tako še eno uspešno prilagoditev ranega mošnjaka na Cd stres. Topni sladkorji namreč služijo rastlini, da lahko poveča zadostno zalogo ogljikovih hidratov, ki služi v podporo bazalnemu metabolizmu, še posebej v premeru okoljskega stresa (Hurry in sod., 1995; Dubey in Singh, 1999). V splošnem pa je status ogljikovih hidratov v koreninah v primeru okoljskega stresa skoraj najpomembnejši, saj hitre spremembe v njihovem okolju zahtevajo sistematično obnovo in izgradnjo tkiv, kar je povezano s povečano potrebo po energiji in ogljikovih atomih (Stobrawa in Lorenc-Plucińska, 2007).

Saharoza ima pri višjih rastlinah osrednjo vlogo najpomembnejšega transportnega sladkorja, vlogo hranila, prav tako pa je signalna molekula. Biosintezo saharoze katalizira zaporedno delovanje saharoza-6- fosfat sintaza (SPS) in saharoza 6-fosfat

fosfataza (Winter in Huber, 2000), razgrajujejo pa jo invertaze in saharoza sintaza (SS ali Susy), kar vodi v nastanek heksoz (Rosa in sod., 2009). Sprememba v aktivnosti SPS, SS ter invertaz (IA, IB) lahko tako ključno vpliva na metabolizem saharoze.

Delež proteinov, izoliranih iz sveže mase poganjkov ranega mošnjaka, predstavljajo tudi encimi sladkornega metabolizma. Na splošen upad encimske aktivnosti po izpostavljenosti Cd nakazujejo že podatki o neznačilnem zmanjšanju koncentracije proteinov po enem tednu in o značilnem zmanjšanju le teh po 4-ih tednih. Na žalost so podatki o encimskih aktivnostih zelo variabilni in zato nismo opazili značilnih sprememb po enem tednu, smo pa opazili neznačilno povečanje encimov SS in AI v poganjkih rastlin, izpostavljenih Cd, kar sovpada z neznačilnim povečanjem koncentracije saharoze (sinteza le-te) ter koncentracij glukoze in fruktoze, ki sta produkta razgradnje saharoze. Po 1 mesecu smo zabeležili povečanje fruktoze, za katero je znano, da lahko inhibira ivertaze (Foyer in sod., 1997). V skladu s tem smo izmerili povečano koncentracijo saharoze v koreninah in poganjkih po 4-ih tednih. Vzrok za zmanjšanje aktivnosti invertaz so lahko tudi višje okoljske temperature (Schöffl in sod., 1999). To bi tudi lahko bil razlog za zabeleženje slabših fizioloških parametrov ranega mošnjaka, kot jih po navadi ugotovimo po izpostavljenosti istim koncentracijam Cd, a v rasti pri optimalni temperaturi ok. 20 °C in ne pri poletnih temperaturah v neklimiziranem rastlinjaku.

Iz koncentracije celotnih topnih sladkorjev žal ne moremo neposredno sklepati na koncentracijo najpomembnejšega transportnega sladkorja saharoze, saj se v nasprotju z le-temi koncentracije saharoze ob naraščanju koncentracije Cd v HR povečujejo hkrati v koreninah in poganjkih. Značilen upad aktivnosti SS in IA pri rastlinah, ki je bil odvisen od izpostavitve Cd, sovpada z zmanjšanjem razgradnje saharoze oz. povečanja koncentracije le-te v poganjkih in koreninah. Ti podatki delno sovpadajo z raziskavo, opravljeno na kalicah riža (*Oryza sativa* L.), kjer so pri izpostavitvi 100 ali 500 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ za 20 dni prav tako izmerili povečanje aktivnosti kislih invertaz, a tudi hkratno povečanje SS (Verma in Dubey, 2001).

Aktivnost encima SPS je ostala primerljivih vrednosti v poganjkih rastlin vseh treh izpostavitvev in tako neodvisna od koncentracije in časa izpostavitve Cd. Prav nasprotno, upad aktivnosti SPS ter povečanje vsebnosti celotnih topnih sladkorjev so opazili pri že omenjeni študiji na kalicah riža, kjer so opazili upad aktivnosti SPS ter povečanje vsebnosti celotnih topnih sladkorjev ob izpostavitvi rastlin Cd po 20ih dneh (Verma in Dubey, 2001).

Iz korenin žal nismo uspeli izolirati zadostnih količin proteinov, da bi lahko v njih zaznali aktivnost encimov metabolizma ogljikovih hidratov. Celostna slika aktivnosti encimov v koreninah in poganjkih bi nam namreč lahko dala boljšo predstavbo o vplivu Cd na encimsko aktivnost na nivoju cele rastline. Tako so pri rastlinah črnega topola (*Populus nigra* L.), ki so rastle na onesnaženi zemlji (Cu, Pb) in bile s tem kronično

izpostavljene težkim kovinam, v primerjavi s kontrolo v koreninah zabeležili povišane aktivnosti encimov SS, IA in nevtralnih invertaz (Stobrawa in Lorenc-Plucińska, 2007).

Do sedaj še z objavljenimi študijami ni bilo zbranih dovolj rezultatov, da bi bilo možno posplošiti rezultate encimskih aktivnosti sinteze in razgradnje saharoze ter vsebnosti sladkorjev med vsemi rastlinami, saj so bili le-ti podatki pridobljeni na majhnem številu rastlinskih vrst, predvsem iz rodu *Arabidopsis*, na koruzi, pšenici, rižu in ječmenu, soji, krompirju, korenju, tobaku in nekaterih drugih (Rosa in sod., 2009). Zavedamo se, da je ravno zaradi znane variabilnosti preučevane rastline ter razlik v metabolizmu ogljikovih hidratov tekom dnevnega cikla, težko ugotoviti dejanske mehanizme rastlin ob izpostavljenosti Cd, so pa vseeno naši rezultati dobrodošel prispevek na tem področju, saj po nam znanih podatkih, za hiperakumulacijske rastline še ni bilo opravljenih takšnih raziskav.

5.4 VPLIV Cd NA SESTAVO ORGANSKE MATRIKE LISTOV

Pri hiperakumulatorjih so že opazili povezavo med porazdelitvijo Cd na tkivnem nivoju lista in ekspresijo genov, ki izražajo kovinske transporterje (Leitenmaier in Küpper, 2011), malo pa je do sedaj znanega o povezavi ključnih strukturnih biokemijskih molekulah s porazdelitvijo kovin (Regvar in sod., 2013) oz. njihovo prisotnostjo v rastlinskih tkivih ter možnim vplivom na tkivno morfologijo v listu.

Pri mikrofografijah SEM smo opazili potrdili, kar smo že dlje časa opažali pri svežih ali liofiliziranih vzorcih pri svetlobni mikroskopiji, da so namreč celice mezofila, pri rastlinah, ki so bile izpostavljene Cd, manjše in bolj okrogle. Ti rezultati se ujemajo z rezultati do sedaj edine nam znane raziskave, narejene na hiperakumulatorju. Pri rastlini *Picris divaricata* je namreč ob izpostavitvi Cd prišlo do zmanjšanja celic mezofila, hkrati pa do zmanjšanja velikosti kloroplastov, z nespremenjeno ultrastrukturo, a z manjšim številom škrobnih granul (Ying in sod., 2010). Te nasprotujoče si učinke Cd na kloroplaste ne-akumulatorskih in hiperakumulatorskih rastlin lahko pripišemo različnim sposobnostim posameznih rastlin za sekvestracijo in razstrupljanje Cd ter različnim ravnim pogojem rastlin izpostavljenih različnim koncentracijam Cd (Ying in sod., 2010).

Naši rezultati so pokazali, da se ob prisotnosti Cd povečajo prispevki skupnih ogljikovih hidratov, natančneje osnovnih strukturnih ogljikovih hidratov, kot so celuloza, hemiceluloze, pektini ter založnega ogljikovega hidrata, škroba. Ti rezultati se ujemajo z ugotovitvijo Regvar in sod. (2013), kjer so z metodo kemijskega mapiranja, izvedenega s SR-FTIR, pri rastlinah *T. praecox* nabranih v naravi ugotovili, da je pektin pomembna organska molekula v listnem epridermisu, v epidermalnih celicah, ki so bogate s Zn, pa je bila povečana lignifikacija celičnih sten, za katero se predpostavlja,

da bi lahko pomagala zadrževati v epidermisu ujete kovine stran od metabolno aktivnega mezofila lista.

Rezultati, pridobljeni z IR analizami, se ujemajo tudi z rezultati EXAFS analize na Cd K-robu ter s preučevanjem mineralnega pomanjkanja s študijo ionoma in meritvami mikro-PIXE. Tako smo pri EXAFS analizi na Cd K-robu ugotovili, da je bil Cd v listih večinoma vezan na O-ligande in le v manjšem deležu na S-ligande, z nadaljnjo preučitvijo mikro-XANES na sub-celičnem nivoju pa smo z veliko verjetnostjo potrdili pektin, kot najustreznejšega kandidata za O-liganda (koordinacija Cd s pektinom: Cd-O-C-R). Četudi smo v mezofilnih celicah pokazali, da je bil delež S-ligandov enak ali celo večji od deleža O-ligandov, pa to vseeno pomeni, da se je del Cd vezal na pektin, rastline pa so očitno povečale njegovo nalaganje v celične stene, kot smo pokazali z metodo SR-FTIR. Ti rezultati pa se ujemajo tudi z multielementnimi analizami pri preučevanju mineralnega pomanjkanja pri ranem mošnjaku, kjer smo ugotovili povezavo med prisotnostjo Cd in pomanjkanjem Ca. Ca je namreč, kot že omenjeno, ključni gradnik primarne celične stene, saj povezuje podenote v pektin (t.i. »egg-box« model). Več kot je prisotnega Ca, več navzkrižnih povezav se ustvari, s čimer se poveča čvrstost celične stene (Grant in sod., 1973).

Pri IR meritvi prispevek skupnih ogljikovih hidratov predstavlja poleg že omenjenega pektina, hemiceluloz in škroba tudi različne komponente celuloze ter topnih sladkorjev saharoze, glukoze in fruktoze (Hammouri in sod., 1998). Pri preučevanju vpliva Cd na metabolizem ogljikovih hidratov tako po 1-mesečni izpostavitvi ranega mošnjaka Cd sicer nismo opazili značilnih razlik v vsebnosti škroba v poganjkih, kot smo ga opazili pri IR meritvah, vendar je potrebno upoštevati dejstvo, da je metabolizem škroba zelo spremenljiv ter odvisen od mnogih dejavnikov, ki pa jih v rastlinjaku nismo uspeli vseh nadzorovati. Za razliko od škroba pa smo opazili povečanje posameznih topnih sladkorjev (saharoza, fruktoza). Povečan prispevek celotnih topnih sladkorjev, ki smo ga torej pomerili z IR metodama ATR in SR-FTIR, si torej lahko razlagamo kot sočasno povečano nalaganje komponent celične stene, kot so celuloze, hemiceluloze in pektini, za katerega smo potrdili da je Cd-ligand v listih ranega mošnjaka, poleg tega pa delež k celotnim ogljikovim hidratom pripevajo tudi topni sladkorji.

Cd torej v veliki meri vpliva na metabolizem ogljikovih hidratov v rastlini in za zaznanje le tega na nivoju encimskih pretvorb, bi bilo poleg dela metabolizma saharoze potrebno preučiti še metabolne poti drugih strukturnih in ne-strukturnih sladkorjev.

6 SKLEPI

Ugotovili smo, da ob izpostavitvi rastlin ranega mošnjaka dvema različnima oblikama Cd pride do različnega rastnega odziva rastline, a je ta odziv odvisen od koncentracije Cd in ne od oblike Cd soli. V nasprotju s tem pa zaradi različne oblike Cd soli nastanejo spremembe v vezavni obliki Cd na tkivnem in celičnem nivoju, ob tem pa smo ugotovili, da so te razlike odvisne tudi od koncentracije Cd.

Privzem Cd je povzročil motnje v vsebnosti in porazdelitvi esencialnih nutrientov, pri tem pa je predvsem vplival na mikronutriente. Največje spremembe v ionomu rastline in rastnem odzivu smo ugotovili pri rastlinah, ki so rasle v pomanjkanju Ca in Fe ter ob dodatku Cd.

Ob izpostavitvi rastlin Cd je prišlo do sprememb v metabolizmu ogljikovih hidratov. Po akutni izpostavljenosti rastlin Cd smo opazili zadrževanje škroba v poganjkih, po kronični izpostavljenosti pa smo opazili zadrževanje saharoze v poganjkih in koreninah, kar je sovpadalo z izmerjeno zmanjšano aktivnostjo encimov za razgradnjo le-te.

Na tkivnem nivoju smo opazili manjše in bolj okrogle mezofilne celice pri rastlinah, ki so bile izpostavljene Cd.

Naši rezultati so pokazali, da se ob prisotnosti Cd povečajo prispevki celotnih ogljikovih hidratov, natančneje osnovnih strukturnih ogljikovih hidratov, kot so celuloza, hemiceluloze in pektini ter založnega ogljikovega hidrata, škroba.

7 POVZETEK

7.1 POVZETEK

Zanimalo nas je, kakšen vpliv ima Cd na mineralno prehrano ter na metabolizem ogljikovih hidratov pri ranem mošnjaku (*T. praecox* Wulf.). Ob tem se nam je že v začetku postavilo tudi vprašanje, ali obstajajo razlike pri izpostavitvi rastlin dvema različnima oblikama Cd soli, kot sta, CdSO_4 in CdCl_2 . Pričakovali smo različen odziv rastline, kot so razlike v akumulaciji Cd in biomasi rastlin. Ugotovili smo, da so bili listna biomasa ter koncentracija klorofilov in antocianov odvisni od koncentracije Cd, ki so ji bile rastline izpostavljene, a niso bile odvisne od oblike Cd soli. Koncentracije Cd, Cl in S v listih so dobro korelirale s koncentracijami teh elementov v hidroponski raztopini, medtem ko smo opazili povečane koncentracije P pri rastlinah, izpostavljenih $300 \mu\text{M}$ Cd.

Prav tako smo pričakovali, da bo ob dodatku CdSO_4 ali CdCl_2 v hranilno raztopino rastlin prišlo do razlik v vezavnih oblikah Cd v rastlinskih tkivih in predpostavili smo, da se bo Cd vezal večinoma na O in S-ligande. Z metodo EXAFS na Cd K-robu smo ugotovili, da je bil Cd v listih večinoma vezan na O-ligande in v manjšem deležu na S-ligande. Delež O-ligandov in S-ligandov je bil odvisen od koncentracije Cd in oblike Cd soli, dodane v hidroponsko raztopino rastlin. Pri tem je bilo največ S-liganov pri rastlinah, izpostavljenih $300 \mu\text{M}$ CdSO_4 , najverjetneje na račun vezave Cd-S že v mladih listih.

Vzorec porazdelitve Cd v mezofilu lista je bil močno povezan z izpostavitvijo CdCl_2 oz. CdSO_4 . CdCl_2 je namreč povečal privzem Cd v vakuole celic mezofila, kjer je bil velik delež Cd vezan na S-ligande. V prisotnosti CdSO_4 pa je bil povečan iztok Cd iz simplasta mezofila, kar se je odrazilo v depozitih, ki so bili bogati s Cd-S kompleksi in so se nahajali v celičnih stenah in medceličnih prostorih. Dodatek CdCl_2 v hidroponsko raztopino je spremenil vezavne oblike Cd tudi v floemu, saj je bil pri tej soli delež S-ligandov večji.

Pri preučevanju interakcij med pomanjkanjem esencialnih mineralov in dodatka Cd smo predvidevali, da bo Cd povzročil motnje v vsebnosti in porazdeljevanju esencialnih mineralnih hranil. Z metodama TXRF in AAS smo naredili multielemente analize sestave korenin in poganjkov ter nekatere biokemijske teste in meritve fotokemične učinkovitosti PSII. Ugotovili smo, da se kontrolne rastline in rastline, ki so rastle v rastnih komorah in so bile izpostavljene $150 \mu\text{M}$ Cd, niso značilno razlikovale po rastnem odzivu, kar govori v prid učinkovitosti tolerančnih mehanizmov ranega mošnjaka pri dolgotrajni izpostavljenosti Cd. Pomanjkanje Fe in Ca v rastlini pa je

povzročilo podobne spremembe na nivoju ionoma in rastnega odziva, kot pri rastlinah, ki so rasle v kontrolni raztopini z dodanim Cd.

Glede na podobnost v odzivu rastlin na hkratno pomanjkanje in dodatek Cd, lahko sklepamo, da obstaja povezava med transportom Ca, Fe in Cd, najverjetneje v obliki skupnega transporterja v koreninah. Predpostavljamo, da imajo ti esencialni minerali, katerih pomanjkanje smo testirali, podobne vzorce privzemanja oz. skupen transporter (morda tudi več) in na podlagi pregledane literature za kandidata predlagamo katerega od transporterjev družine ZIP ali NRAMP.

Kontrolnim rastlinam so bile najbolj podobne tiste, ki so rasle v pomanjkanju Mg. Porazdelitev Mg smo zato podrobneje preučili na tkivnem nivoju, na prečni rezini lista z metodo mikro-PIXE in ugotovili, da Mg tudi pri pomanjkanju podobno porazdeljen po tkivih kot pri kontrolnih rastlinah in zato pomanjkanje samo ni imelo učinka na parametre povezane s fotosintezo, kar pomeni, da je rastlina uspešno kompenzirala pomanjkanje Mg, kar pa ji nato pri dodatnem stresu zaradi Cd ni več uspevalo.

Študija ionoma se je v tem primeru izkazala za zelo koristno, saj lahko s katero od cenovno dostopnih metod izvedemo multitelemento analizo rastlin in si takoj ustvarimo celovitejšo sliko sprememb v mineralnem ravnovesju na nivoju cele rastline in ugotavljamo skupne točne in razlike, kot smo to naredili v naši raziskavi. Te podatke se lahko nato primerja z že znanimi podatki iz literature o prisotnosti in lastnostih posameznih transporterjev pri izbrani rastlinski vrsti ali širšem sorodstvu, lahko pa služijo kot pokazatelj katera področja mineralne prehrane rastlin je potrebno še podrobneje preučiti.

Pri preučevanju vpliva Cd na metabolizem ogljikovih hidratov smo predpostavljali, da bo izpostavitve rastlin Cd povzročila spremembe v metabolizmu ogljikovih hidratov, pri čemer smo pričakovali zadrževanje sladkorjev v celicah mezofila, prav tako pa smo pričakovali spremembe morfologije ter spremembe v sestavi organske matrike listnih tkiv. Metabolizem ogljikovih hidratov smo preučili s kvantitativno analizo skupnih in posameznih sladkorjev ter z analizami aktivnosti encimov, ki sodelujejo pri tvorbi in razgradnji saharoze. Spremembe v listni morfologiji smo podrobneje preučili s SEM, spremembe organske matrike v palisadi mezofila pa s SR-FTIR.

Pri rastlinah, izpostavljenih Cd, smo opazili manjše in bolj kroglaste celice palisadnega mezofila, rezultati IR analize pa so pokazali, da se ob prisotnosti Cd povečajo prispevki celotnih ogljikovih hidratov, natančneje osnovnih strukturnih ogljikovih hidratov, kot so celuloza, hemiceluloze, pektini ter založnega ogljikovega hidrata, škroba. Ti rezultati se

ujemajo z rezultati EXAFS analize na Cd K-robu, kjer smo potrdili vezavo Cd večinoma na O-ligande in le v manjšem deležu na S-ligande, z nadaljnjo preučitvijo mikro-XANES na sub-celičnem nivoju pa smo z veliko verjetnostjo potrdili pektin, kot najustreznejši kandidat za O-liganda (koordinacija Cd s pektinom: Cd-O-C-R). Četudi smo v mezofilnih celicah pokazali, da je bil delež S-ligandov enak ali celo večji od deleža O-ligandov, pa to vseeno pomeni, da se je del Cd vezal na pektin, rastline pa so očitno povečale njegovo nalaganje v celične stene, kot smo to pokazali z metodo SR-FTIR.

Pri kvantitativni oceni vpliva Cd na metabolizem ogljikovih hidratov tako po kronični izpostavitvi ranega mošnjaka Cd sicer nismo opazili značilnih razlik v vsebnosti škroba v poganjkih, kot smo ga zabeležili po 1 tednu izpostavljenosti ter kot smo ga opazili pri IR meritvah, smo pa opazili povečanje posameznih topnih sladkorjev (saharoza, fruktoza). Povečan prispevek celotnih sladkorjev, ki smo ga torej pomerili z IR metodama ATR in SR-FTIR, si torej razlagamo kot sočasno povečano nalaganje komponent celične stene, kot so celuloze, hemiceluloze in pektini, za katerega smo potrdili da je Cd-ligand v listih ranega mošnjaka, poleg tega pa delež k celotnim ogljikovim hidratom pripevajo tudi topni sladkorji.

Cd torej lahko že znatno vpliva na metabolizem ogljikovih hidratov ter na spremembe rastlinskega ionoma, četudi le-to še ni opazno navzven. Preučevanje vpliva Cd na elementno sestavo in metabolni odziv hiperakumulacijskih rastlin na tkivnem, celičnem in sub-celičnem nivoju s sodobnimi metodami, kot so mikro-PIXE in na sinhrotronski svetlobi osnovane metode mikro-XRF, EXAFS, mikro-XANES in FTIR, tako predstavlja svojevrsten pristop v rastlinski fiziologiji in prispeva ključno znanje za razumevanje tolerance rastlin na Cd.

7.2 SUMMARY

We studied the impact of Cd on mineral nutrition and metabolism of carbohydrates in Cd hyperaccumulator *T. praecox*, grown in hydroponics. In studies of mineral nutrition we firstly studied differences in ionome and metabolic responses in plants treated with two different forms of Cd salts, CdSO₄ and CdCl₂ at the organ level. The leaf biomass, chlorophyll and anthocyanin concentration were concentration dependent, but were not Cd-salt dependent. Concentration of Cd, Cl and S in the leaves correlated with the concentration of these elements in the nutrient solution, while increased concentrations of P were seen in plants exposed to the highest Cd concentration, 300 µM Cd.

Secondly, we studied the impact of the different Cd-salts used for treatments at leaf cellular level. Analysis of the differences in Cd ligand environment with EXAFS on Cd K-edge showed that in the leaves Cd was generally bound to O-ligands, and to a lesser extent to the S-ligands. The proportion of O-ligands and S-ligands depended on the concentration of Cd and the form of Cd salts added to the nutrient solution. The highest proportion of S-ligands was seen in plants exposed to 300 µM CdSO₄, probably due to the Cd-S binding which took place already in the developing leaves. In addition, the distribution pattern of Cd in the leaf mesophyll was strongly linked to CdCl₂ and CdSO₄ exposure. CdCl₂ increased the uptake of Cd into the vacuoles of mesophyll cells, where a large proportion of Cd was bound to S-ligands and increased the proportion of S-ligands in the phloem. Treatment with CdSO₄ increased efflux of Cd from mesophyll simplast and the formation of Cd-S complexes rich in P, which were located in the cell walls and in the intercellular spaces.

When studying the interactions between different mineral deficiencies and Cd, control plants and Cd treated plants did not significantly differ in growth response, indicating to the effectiveness of *T. praecox* tolerance mechanisms to long-term exposure to Cd. Fe and Ca deficient plants exhibited similar responses in the ionome and in the biomass, as plants treated with sufficient mineral solution with the addition of Cd. These results suggest that the uptake and transport of Ca, Fe and Cd are linked in this plant, presumably via a common transporter(s) in the roots, supposedly belonging to the ZIP, NRAMP or CAX family of transporters.

Analyses of the ionome have proved to be very useful in this type of study. We demonstrated that the use of affordable methods for mulitelemental analysis can paint a more complete picture of changes in mineral homeostasis and to pinpoint the significant differences. The obtained data can be compared to the literature data on the presence and properties of the individual transporters in selected plant species. Additionally they can serve as an indicator of which areas of plant mineral nutrition are to be examined in greater detail in the future.

Cd treatment of *T. praecox* in hydroponics was believed to impact the carbohydrate metabolism via the retention of sugars in the mesophyll cells, changes in morphology and in the composition of the organic matrix of the leaf tissue. Carbohydrate metabolism was studied by quantitative analysis of total and individual sugars and the analysis of the activities of the enzymes involved in the formation and degradation of sucrose. Changes in the leaf morphology were studied in detail by SEM, and changes in the organic matrix in the palisade mesophyll with SR-FTIR. In plants exposed to Cd, palisade mesophyll cells were smaller and rounder than in control plants and there was an increase in the contributions of the total carbohydrates, specifically in the basic structural carbohydrates such as cellulose, hemicelluloses, pectin, and non-structural carbohydrates, such as starch. These results are consistent with the observation that Cd binds mainly to O-ligands, and that only a small proportion was coordinated to S-ligands. By further examination of Cd ligand environment at the subcellular level, we confirmed pectin as the most probable candidate for the O-ligand (Cd coordination with pectin: Cd-O-C-R). Although the proportion of S-ligands in the mesophyll cells was the same or even greater than that of the O-ligands a part of Cd was bound to pectin. These results indicated that the plants increased Cd loading into the cell walls during Cd exposure.

No changes in bulk leaf starch content were seen in plants in long term exposure to Cd, thus not confirming the differences in starch content observed at cellular level. Only increases in individual soluble sugars (sucrose, fructose) were seen. However, the increased contribution of the total carbohydrates can be linked to the simultaneous increase in loading of the cell wall components, such as cellulose, hemicelluloses and pectin, and the accumulation of total soluble sugars.

Despite the effects of Cd and Cd salts were not always evident from the bulk analyses in *T. praecox* we uncovered significant impacts that these treatments have on the ionome and on the metabolism of carbohydrates. The study into the Cd-induced tissue-specific elemental and metabolic responses of hyperaccumulating plant with state-of-the-art methods such as micro-PIXE and synchrotron radiation based micro-XRF, EXAFS, micro-XANES and FTIR, represents unique approach in plant physiology and offers crucial knowledge contributing to understanding Cd tolerance.

8 VIRI

- Adams W.W., Demmig-Adams B. 2004. Chlorophyll fluorescence as a tool to monitor plant responses to the environment. V: Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. Vol. 19. Papageorgiou G.C., Govindjee. (eds). Dordrecht, Springer: 583-604
- Adriano D.C. 2001. Trace Elements in Terrestrial Environments, Biochemistry, Bioavailability and Risk of Metals, 2nd edition. New York, Berlin, Heidelberg Springer-Verlag: 867 str.
- Antonovics J., Bradshaw A.D., Turner R.G. 1971. Heavy metal tolerance in plants. *Advances in Ecological Research*, 7: 1-85
- Arčon I. 2008. Introduction to XANES and EXAFS analysis. Nova Gorica, University of Nova Gorica: 35 str.
- Assunção A.G.L., Schat H., Aarts M.G. 2003. *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, 159: 351-360
- Assunção A.G.L., Bleeker P.M., Ten Bookum W.M., Vooijs R., Schat H. 2008. Intraspecific variation of metal preference patterns for hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*: evidence from binary metal exposures. *Plant and Soil*, 303: 289-299
- Azevedo H., Glória Pinto C.G., Fernandes J., Loureiro S., Santos C. 2005. Cadmium Effects on Sunflower Growth and Photosynthesis. *Journal of Plant Nutrition*, 28: 2211-2220
- Baker A.J.M. 1981. Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*, 3: 643-654
- Baker, A.J.M. 1987. Metal Tolerance. *New Phytologist*, 106: 93-111
- Baker A.J.M., McGrath S.P., Sidoli C.M.D, Reeves R.D. 1994. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resources, Conservation and Recycling*, 11: 41-9
- Baker A.J.M., McGrath S.P., Reeves R.D., Smith J.A. 1999. Metal Hyperaccumulator Plants: a Review of the Ecology and Physiology of a Biological Resource for Phytoremediation of Metal-Polluted Soils. V: *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Terry N., Bañuelos G.S. (eds.). Boca Raton, Florida, Lewis Publishers: 85-107
- Bao T., Sun T.H., Sun L.N. 2012. Effect of cadmium on physiological responses of wheat and corn to iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition*, 35: 1937-1948
- Barceló J., Poschenrieder C. 1999. Structural and ultrastructural changes in heavy metal exposed plants. In: *Heavy metal Stress in Plants* 1st edition. Prasad M.V.N., Hagemayer J. (eds.). Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag: 183-205

- Baryl A., Carrier P., Franck F., Coulomb C., Sahut C., Havaux M. 2001. Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta*, 212: 696-709
- Baxter I. 2009. Ionomics: studying the social network of mineral nutrients. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 381-386
- Baxter I.R., Vitek O., Lahner B., Muthukumar B., Borghi M., Morrissey J., Guerinot M.L., Salt D.E. 2008. The leaf ionome as a multivariable system to detect a plant's physiological status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105: 12081-12086
- Benzarti S., Mohri S., Ono Y. 2008. Plant response to heavy metal toxicity: Comparative study between the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (ecotype Ganges) and nonaccumulator plants: Lettuce, radish, and alfalfa. *Environmental Toxicology*, 23: 607-616
- Benzarti S., Hamdi H., Mohri S., Ono Y. 2010. Response of antioxidative enzymes and apoplastic bypass transport in *Thlaspi caerulescens* and *Raphanus sativus* to cadmium stress. *International Journal of Phytoremediation*, 12, 8: 733-44
- Bert V., Bonnin I., Saumitou-Laprade P., de Laguérie P., Petit D. 2002. Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? *New Phytologist*, 155: 47-57
- Bischof K., Hanelt D., Wiencke C. 1998. UV-radiation can affect depth-zonation of Antarctic macroalgae. *Marine Biology*, 131: 597-605
- Bjorkman O., Demming B. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170: 489-504
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for determining microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254
- Briat J.F., Lebrun M. 1999. Plant responses to metal toxicity. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences- Series III - Sciences de la Vie*, 322: 43-54
- Broadley M., Brown P., Cakmak I., Rengel Z., Zhao F. 2012. Function of Nutrients: Micronutrients. V: Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, Third edition. Marschner P. (ed.). London, Academic Press: 191-248
- Brooks R.R. 1998. Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals. Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining. CAB International. NY, USA: 384 str.

- Brooks R.R., 2000: Geobotany and Hyperaccumulators. V: Plants that hyperaccumulate heavy metals: their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration, and phytomining. Brooks R.R. (ur.). 2nd ed.. NY, USA, CAB International: 1-14
- Brugnoli E., Hubick K.T., von Caemmerer S., Wong S.C., Farquhar G.D. 1988. Correlation between the Carbon Isotope Discrimination in Leaf Starch and Sugars of C(3) Plants and the Ratio of Intercellular and Atmospheric Partial Pressures of Carbon Dioxide. *Plant Physiology* 88, 4: 1418-1424
- Callahan D.L., Kolev S.D., O'Hair R.A.J., Salt D.E., Baker A.J.M. 2007. Relationships of nicotianamine and other amino acids with nickel, zinc and iron in *Thlaspi* hyperaccumulators. *New Phytologist*, 176: 836-848
- Choudhury B., Mitra S., Biswas A.K. 2010. Regulation of sugar metabolism in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings under arsenate toxicity and its improvement by phosphate. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 16: 59-68
- Ciereszko I. 2009. Sucrose metabolism in plant tissues under stress conditions: key enzymes, localization and function. V: Compartmentation of Responses to Stresses in Higher Plants, True or False. Maksymiec W. (ed.). Transworld Research Network, Kerala, India: 193-218
- Clemens S., Antosiewicz D.M., Ward J.M., Schachtman D.P., Schroeder J.I. 1998. The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95, 20: 12043-12048
- Clemens S., Palmgren M.G., Krämer U. 2002. Along way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science*, 7: 309-315
- Cobbett C., Goldsbrough P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 159-182
- Colangelo E.P., Gueriot M.L. 2006. Put the metal to the petal: metal uptake and transport through plants. *Current opinion in plant biology*, 9: 322-30
- Cosio C., DeSantis L., Frey B., Diallo S., Keller C. 2005. Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany*, 56: 765-775
- Cosio C., Martinoia E., Keller C. 2004. Hyperaccumulation of cadmium and zinc in *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri* at the leaf cellular level. *Plant Physiology*, 134: 1-10
- Cullen J.T., Lane T.W., Morel F.M.M., Sherrell R.M. 1999. Modulation of cadmium uptake in phytoplankton by seawater CO₂ concentration. *Nature*, 402: 165-167
- Curie C., Alonso J.M., Le Jean M., Ecker J.R., Briat J.F. 2000. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochemical Journal*, 347: 749-755

- Dai L.P., Dong X.J., Ma H.H. 2012. Antioxidative and chelating properties of anthocyanins in *Azolla imbricata* induced by cadmium. *Polish Journal of Environmental Studies*, 21: 837-844
- Dat J., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57: 779-795
- Deng D.M., Deng J.C., Li J.T., Zhang J., Hu M., Lin Z., Liao B. 2008. Accumulation of zinc, cadmium, and lead in four populations of *Sedum alfredii* growing on lead/zinc mine spoils. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50: 691-698
- Devi R., Munjal N., Gupta A.K., Kaur N. 2007. Cadmium induced changes in carbohydrate status and enzymes of carbohydrate metabolism, glycolysis and pentose phosphate pathway in pea. *Environmental and Experimental Botany*, 61: 167-174
- Dietz K.J., Baier M., Krämer U. 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: *Heavy metal stress in plants. From molecules to ecosystems*. Prasad M.N.V., Hagemayes J. (eds.). Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 73-97
- Dubey R.S. 1997. Photosynthesis in plants under stressful conditions. In: *Handbook of Photosynthesis*. Pessarakli M. (ed.). New York, Marcel Dekker Inc.: 859-875
- Dubey R.S., Singh A.K. 1999. Salinity induces accumulation of soluble sugars and alter the activity of sugar metabolizing enzymes in rice plants. *Biologia Plantarum*, 42: 233-239
- Dumas P., Sockalingum G.D., Sulé-Suso, J. 2006. Adding synchrotron radiation to infrared microscopy: what's new in biomedical applications? *TRENDS in Biotechnology*, 25, 1: 40-44
- Ebbs S.D., Zambrano M.C., Spiller S.M., Newville M. 2009. Cadmium sorption, influx, and efflux at the mesophyll layer of leaves from ecotypes of the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, 181: 626-636
- Ernst W.H.O., Verkleij J.A.C., Schat H. 1992. Metal tolerance in plants. *Acta Botanica Neerlandica*, 41: 229-248
- Everest A.E., Hall A.J. 1921. Anthocyanins and anthocyanidins. Part IV — Observations on (a) anthocyan colours in flowers and (b) the formation of anthocyanins in plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 92: 150-162
- Fischer E.S., Bremer E. 1993. Influence of magnesium deficiency on rates of leaf expansion, starch and sucrose accumulation, and net assimilation in *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 89: 271-276
- Foyer C., Kingston-Smith A., Pollock C. 1997. Sucrose and invertase an uneasy alliance. *Iger innovations*: 18-21

- Foyer C.H., Valadier M.H., Migge A., Becker T.W. 1998. Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiology*, 117: 283-292
- Frey B., Keller C., Zierold K., Schulin R. 2000. Distribution of Zn in functionally different leaf epidermal cells of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell & Environment*, 23: 675-687
- Fugaš M., Hršak J., Souvent P. 1984. The effect of a new emission control system on lead, zinc and cadmium concentration in the environment of a lead smeltery. *Staub - Reinhaltung der Luft*, 44: 273-275
- Geigenberger P., Stitt M. 1993. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta*, 189: 329-339
- Ginocchio R., Baker A.J.M. 2004. Metallophytes in Latin America: a remarkable biological and genetic resource scarcely known and studied in the region. *Revista Chilena de Historia Natural*, 77: 185-194
- Golldack D., Dietz K.J. 2001. Salt-induced expression of the vacuolar H⁺-ATPase in the common ice plant is developmentally controlled and tissue specific. *Plant Physiology*, 125: 1643-1654
- Grant G.T., Morris E.R., Rees D.A., Smith P.J.C., Thom D. 1973. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Letters*, 32: 195-198
- Greger M. 1999. Metal availability and bioconcentration in plants. In: Heavy metal stress in plants. Prasad M.N.V. (eds). Hagemeyer J. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag: 1-27
- Grotz N., Fox T.C., Connolly E., Park W., Gurinot M.L., Eide D. 1998. Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 7220-7224
- Guerinot M.L. 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465: 190-198
- Hafeez B., Khanif Y.M., Saleem M. 2013. Role of Zinc in Plant Nutrition- A Review. *American Journal of Experimental Agriculture*, 3: 374-391
- Haines B.J. 2002. Zincophilic root foraging in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, 155: 363-372
- Hale K.L., Tufan H.A., Pickering I.J., George G.N., Terry N., Pilon M., Pilon Smits E.A.H. 2002. Anthocyanins facilitate tungsten accumulation in Brassica. *Physiologia Plantarum*, 116: 351-358
- Hall J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Biology*, 53: 1-11

- Hammouri M. K., Ereifej K.I., Shibli R.A., Al-Karaki G.N. 1998. Quantitative Analysis of Fructose Fate in a Plant Fermentation System . Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 1428-1432
- Hawkesford M., Horst W., Kichey T., Lambers H., Schjoerring J., Skrumsager Møller I., White P. 2012. Functions of Macronutrients. V: Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, Third edition. Marschner P. (ed.) London, Academic Press: 135-189
- Haydon M.J., Cobbett C.S. 2007. Transporters of ligands for essential metal ions in plants. New Phytologist, 174: 499-506
- Hermans C., Chen J., Coppens F., Inzé D., Verbruggen N. 2011. Low magnesium status in plants enhances tolerance to cadmium exposure. New Phytologist, 192: 428-436
- Hernandez-Allica J., Garbisu C., Becerril J.M., Barrutia O., Garcia-Plazaola J.I., Zhao F.J., McGrath S.P. 2006. Synthesis of low molecular weight thiols in response to Cd exposure in *Thlaspi caerulescens*. Plant Cell & Environment, 29: 1422-1429
- Hirschi K.D., Zhen R., Cunningham K.W., Rea P.A., Fink G.R. 1996. CAX1, an H^+/Ca^{2+} antiporter from Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93: 8782-8786
- Huber J.L., Hite D.R.C., Outlaw W.H., Huber S.C. 1991. Inactivation of highly activated spinach leaf sucrose phosphate synthase by dephosphorylation. Plant Physiology, 95: 291-297
- Humphries J.M., Stangoulis J.C.R., Graham R.D. 2006. Chapter 12: Manganese. In: Handbook of Plant Nutrition. Barke, A.V., Pilbeam D.J. (eds). Florida, CRC Press: 351-374
- Hurry V.M., Strand A., Tobiasson M., Gardestrom P., Oquist G. 1995. Cold Hardening of Spring and Winter Wheat and Rape Results in Differential Effects on Growth, Carbon Metabolism, and Carbohydrate Content. Plant Physiology, 109: 697-706
- Isaure M.P., Fayard B., Sarret G., Pairis S., Bourguignon J. 2006. Localization and chemical forms of cadmium in plant samples by combining analytical electron microscopy and X-ray spectromicroscopy. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 61: 1242-1252
- Isaure M.P., Sarret G., Harada E., Choi Y.E., Marcus M.A., Fakra S.C., Geoffroy N., Pairis S., Susini J., Clemens S., Manceau A. 2010. Calcium promotes cadmium elimination as vaterite grains by tobacco trichomes. Geochimica et Cosmochimica Acta, 74: 5817-5834
- Ishimaru Y., Takahashi R., Bashir K., Shimo H., Senoura T., Sugimoto K., Ono K., Yano M., Ishikawa S., Arao T., Nakanishi H., Nishizawa N.K. 2012. Characterizing the role of rice NRAMP5 in Manganese, Iron and Cadmium Transport. Scientific Reports, 2: 268

- Ivanova D.G., Singh B.R. 2003. Nondestructive FTIR monitoring of leaf senescence and elicitor-induced changes in plant leaves. *Biopolymers*, 72: 79-85
- Iyer-Pascuzzi A., Simpson J., Herrera-Estrella L., Benfey P.N. 2009. Functional genomics of root growth and development in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 165-171
- Jarup, L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68: 167-182
- Jensen M.H. 1999. Hydroponics worldwide. *Acta Horticulturae*, 2: 719-730
- Jiang C.F., Gao X.H., Liao L.L., Harberd N.P., Fu X.D. 2007. Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the gibberellin-DELLA signalling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 145: 1460-1470
- Jiang H.M., Yang J.C., Zhang J.F. 2007. Effects of external phosphorus on the cell ultrastructure and the chlorophyll content of maize under cadmium and zinc stress. *Environmental Pollution*, 147: 750-756
- Jones J.B. 1982. Hydroponics: its history and use in plant nutrition studies. *Journal of plant Nutrition*, 5: 1003-1030
- Jones Jr. J.B. 1999. Advantages gained by controlling root growth in a newly-developed hydroponic growing system. *Proceedings of International Symposium on Growing Media and Hydroponics*, 22: 1
- Joshi M.K., Mohanty P. 2004. Chlorophyll a fluorescence as a probe of heavy metal ion toxicity in plants. In: *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 19. Papageorgiou G.C., Govindjee (eds.) Dordrecht, Springer: 637-661
- Kanngießer B., Hahn O., Wilke M., Nekat B., Malzer W., Erko A. 2004. Investigation of oxidation and migration processes of inorganic compounds in ink-corroded manuscripts. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 59: 1511-1516
- Kashem A.A., Kawai S. 2007. Alleviation of cadmium phytotoxicity by magnesium in Japanese mustard spinach. *Soil Science and Plant Nutrition*, 53: 246-251
- Kaulich B., Gianoncelli A., Beran A., Eichert D., Kreft I., Pongrac P., Regvar M., Vogel-Mikuš K., Kiskinova M. 2009. Lowenergy X-ray fluorescence microscopy opening new opportunities for bio-related research. *Journal of the Royal Society Interface*, 6: 641-647
- Kaulich B., Thibault P., Gianoncelli A., Kiskinova M. 2011. Transmission and emission X-ray microscopy: Operation modes, contrast mechanisms and applications. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 23: 083002

- Keller C. in Hammer D. 2004. Metal availability and soil toxicity after repeated croppings of *Thlaspi caerulescens* in metal contaminated soils. *Environmental Pollution*, 131: 243-254
- Khan D.H., Duckett J.G., Frankland B., Kirkham J.B. 1984. An X-ray microanalytical study of the distribution of cadmium in roots of *Zea mays* L. *Journal of Plant Physiology*, 115: 19-28
- Kim S.A., Guerinot M.L. 2007. Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Letters*, 581: 2273-2280
- King S.P., Lunn J.E., Furbank R.T. 1997. Carbohydrate content and enzyme metabolism in developing canola siliques. *Plant Physiology*, 114: 153-160
- Koch M., Mummenhoff K. 2001. *Thlaspi* s.str. (Brassicaceae) versus *Thlaspi* s.l.: morphological and anatomical characters in the light of ITS nrDNA sequence data. *Plant Systematics and Evolution*, 227, 3-4: 209-225
- Kondo T., Yoshida K., Nakagawa A., Kawai T., Tamura H., Goto T. 1992. Structural basis of blue-colour development in flower petals from *Commelina communis*. *Nature*, 358: 515-518
- Koningsberger D.C., Prins R. 1988. X-ray Absorption, Principles, Techniques of EXAFS, SEXAFS and XANES. New York, John Wiley & Sons: 688 str.
- Koren Š., Arčon I., Kump P., Nečemer M., Vogel-Mikuš K. 2013. Influence of CdCl₂ and CdSO₄ supplementation on Cd distribution and ligand environment in leaves of the Cd hyperaccumulator *Noccaea (Thlaspi) praecox*. *Plant and Soil*, 370, 1: 125-148
- Koren Š., Regvar M., Vogel-Mikuš K., Pongrac P., Eichert D. 2010. Alteration in carbohydrate constitution and nutrient allocation in metal hyperaccumulating *Thlaspi praecox* after zinc and cadmium treatments: Elettra experimental report. Trieste: Elettra, 3 str.
- Korenkov V., Hirschi K., Crutchfield J.D., Wagner G.J. 2007. Enhancing tonoplast Cd/H antiport activity increases Cd, Zn, and Mn tolerance, and impacts root/shoot Cd partitioning in *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, 226: 1379-1387
- Korenkov V., King B., Hirschi K., Wagner G.J. 2009. Root-selective expression of AtCAX4 and AtCAX2 results in reduced lamina cadmium in field-grown *Nicotiana tabacum* L. *Plant Biotechnology Journal*, 7: 219-226
- Krämer U., Cotter-Howells J.D., Charnock J.M., Baker A.J.M., Smith J.A.C. 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, 379: 635-638
- Krämer U., Smith R.D., Wenzel W.W., Raskin I., Salt D.E. 1997. The Role of Metal Transport and Tolerance in Nickel Hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* Halacsy. *Plant Physiology*, 115, 4: 1641-1650
- Krause G.H., Weis F. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 42: 313-349

- Krupa, Z. 1987. Cadmium-induced changes in the composition and structure of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex II in radish cotyledons. *Physiologia Plantarum*, 73: 518-524
- Krupa Z., Öquist G., Huner N.P.A. 1993. The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* – a fluorescence analysis. *Physiologia Plantarum*, 88: 626-630
- Krupa Z., Baranowska M., Orzol D. 1996. Can anthocyanins be considered as heavy metal stress indicator in higher plants? *Acta Physiologiae Plantarum*, 18: 147-151
- Krupa Z. 1999. Cadmium against higher-plant photosynthesis – A variety of effects and where they possibly come from. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 54: 723-729
- Kump P., Nečemer M., Veber M. 1997. Determination of trace elements in mineral water using total reflection x-ray fluorescence spectrometry after preconcentration with ammonium pyrrolidinedithiocarbamate. *X-ray spectrometry*, 26: 232-236
- Kump P. 2005. Rentgenska fluorescenca. *Kemija v šoli*, 17, 4: 9-16
- Kump P., Nečemer M., Vogel-Mikuš K., Rupnik Z., Ponikvar D., Pelicon P., Pongrac P., Simčič J., Budnar M. 2007. Improvement of the XRF quantification and enhancement of the combined applications by EDXRF and Micro PIXE. In: First research coordination meeting under co-ordinated research project on “Unification of nuclear spectrometries: integrated techniques as a new tool for materials research”: report: Vienna, 16-20 April, 2007, (IAEA/AL/, 181). IAEA, Vienna: 91-95
- Küpper H., Küpper F., Spiller M. 1996. Environmental relevance of heavy metal substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany*, 47: 259-266
- Küpper H., Zhao F., McGrath S.P. 1999. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*, 119: 305-311
- Küpper H., Lombi E., Zhao F.J., McGrath S.P. 2000. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta*, 212: 75-84
- Küpper H., Mijovilovich A., Meyer-Klaucke W., Kroneck P.H.M. 2004. Tissue- and age-dependent differences in the complexation of cadmium and zinc in the cadmium/zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges ecotype) revealed by X-ray absorption spectroscopy. *Plant Physiology*, 134: 748-757
- Küpper H., Parameswaran A., Leitenmaier B., Trtílek M., Setlík I. 2007. Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, 175, 4: 655-674
- Küpper H., Kochian L.V. 2010. Transcriptional regulation of metal transport genes and mineral nutrition during acclimatization to cadmium and zinc in the Cd/Zn hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens* (Ganges population). *New Phytologist*, 185: 114-129

- Lasat M.M., Baker A.J.M., Kochian L.V. 1996. Physiological characterisation of root Zn^{2+} absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and non-accumulator species of *Thlaspi*. *Plant Physiology*, 112: 1715-1722
- Lasat M.M., Baker A.J.M., Kochian L.V. 1998. Altered Zn compartmentation in root symplasm and stimulated Zn absorption into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*, 118: 875-883
- Leitenmaier B., Küpper H. 2011. Cadmium uptake and sequestration kinetics in individual leaf cell protoplasts of the Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell & Environment*, 34: 208-219
- Leyval C., Joner E.J. 2001. Bioavailability of Heavy Metals in the Mycorrhizosphere. In: Trace Metals in the Rhizosphere. Gobran R.G., Wenzel W.W., Lombi E. (eds.). Florida, USA, CRC Press: 165-185
- Lichtenthaler H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350-382
- Lichtenthaler H.K., Buschmann C. 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: Current protocols in food analytical chemistry. New York, John Wiley & Sons: F4.3.1-F.4.3.8
- Likar M., Pongrac P., Vogel-Mikuš K., Regvar M. 2010. Molecular diversity and metal accumulation of different *Thlaspi praecox* populations from Slovenia. *Plant and soil*, 330: 195-205
- Lindoo S.J., Caldwell M.M. 1978. Ultraviolet-B radiation-induced inhibition of leaf expansion and promotion of anthocyanin production. Lack of involvement of the low irradiance phytochrome system. *Plant Physiology*, 61: 278-282
- Liu M.Q., Yanai J., Jiang R.F., Zhang F., McGrath S.P., Zhao F.J. 2008. Does cadmium play a physiological role in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*? *Chemosphere*, 71: 1276-1283
- Liu W., Shu W., Lan C. 2004. *Viola baoshanensis*, a plant that hyperaccumulates cadmium. *Chinese Science Bulletin*, 49: 29-32
- Lombi E., Zhao F.J., Dunham S.J., McGrath S.P. 2000. Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. *New Phytologist*, 145: 11-20
- Lombi E., Taerall K.L., Howarth J.R., Zhao F.-J., Hawkesford M.J., McGrath S.P. 2002. Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*, 128: 1359-1367
- Luttge U., Ratajczak R. 1997. The physiology, biochemistry and molecular biology of the plant vacuolar ATPase. V: The Plant Vacuole. Leigh R.A., Sanders D. (eds). London, Academic Press: 253-296

- Lux A., Martinka M., Vaculík M., White P.J. 2010. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of Experimental Botany*, 62: 21-37
- Mac Biophotonics Image J. <http://www.macbiophotonics.ca/software.htm> (6. jun. 2013)
- Maenhaut W., Malmqvist K.G. 1993. Particle-induced X-ray emission. In: *Handbook of X-ray spectrometry*. Van Grieken R.E., Markowicz A.A. (eds.). New York, Marcell Dekker: 517-582
- Mari S., Lebrun M. 2005. Metal immobilization: where and how? In: *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification*. Tamás M.J., Martinova E. (eds.) Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 273-298
- Mari S., Gendre D., Pianelli K., Ouerdane L., Lobinski R., Bryat J.F., Lebrun M., Czernic P. 2006. Root-to-shoot long-distance circulation of nicotianamine-nickel chelates in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany*, 57: 4111-4122
- Markowicz A.A. 1993. X-ray in physics. Van Grieken RE, Markowicz AA. *Handbook of X-ray spectrometry*. Marcell Dekker, New York: 1-74
- Marschner H. 1995. Ion uptake of individual cells and roots: Short distance transport. In: *Mineral nutrition of higher plants*. Marschner H. (ed.). London, UK, Academic Press.: 6-77
- Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Ravnik V., Turk B., Vreš B., Frajman B., Strgulc-Krajšek S., Trčak B., Bačič T., Fischer M., Eler K., Surina B. 2007. Mala flora Slovenije: ključ za določanje praprotnic in semenk. 4., dopolnjena in spremenjena izd. Ljubljana: Tehniška založba Slovenije: 967 str.
- Maruthi Sridhar B.B., Diehl S.V., Han F.X., Monts D.L., Su Y. 2005. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environmental and experimental botany*, 54: 131-141
- Maruyama-Nakashita A., Inoue E., Watanabe-Takahashi A., Yamaya T., Takahashi H. 2003. Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in *Arabidopsis* reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant Physiology*, 132: 597-605
- Mäser P., Thomine S., Schroeder J.I., Ward J.M., Hirschi K., Sze H., Talke I.N., Amtmann A., Maathuis F.J., Sanders D., Harper J.F., Tchieu J., Gribskov M., Persans M.W., Salt D.E., Kim S.A., Guerinot M.L. 2001. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 26, 4: 1646-1667
- McCann M.C., Hammouri M., Wilson R., Belton P., Roberts K. 1992. Fourier transform infrared microspectroscopy is a new way to look at plant cell walls. *Plant Physiology*, 100: 1940-1947

- Mechora Š., Stibilj V., Radešček T., Gaberščik A., Germ M. 2011. Impact of Se (VI) fertilization on Se concentration in different parts of red cabbage plants. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 9: 357-361
- Mehne-Jakobs B. 1995. The influence of magnesium deficiency on carbohydrate concentrations in Norway spruce (*Picea abies*) needles. *Tree Physiology*, 15: 577-584
- Merhaut D.J. 2006. Chapter 6: Magnesium. In: *Handbook of Plant Nutrition*. Barker, A.V., Pilbeam D.J. (eds). Florida, CRC Press: 145-182
- Mishra S., Dubey R.S. 2005. Heavy Metal Toxicity Induced Alterations in Photosynthetic Metabolism in Plants. In: *Handbook of Photosynthesis*, Second Edition. Pessarakli M. (ed.). University of Arizona, Tucson, USA, CRC Press: 845-863
- Misson J., Raghothama K.G., Jain A., Jouhet J., Block M.A., Bligny R., Ortet P., Creff A., Somerville S., Rolland N., Doumas P., Nacry P., Herrerra-Estrella L., Nussaume L., Thibaud M.C. 2005. A genomewide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102: 11934-11939
- Mobin M., Khan N.A. 2007. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *Journal of Plant Physiology*, 164: 601-610
- Monni S., Uhlig C., Junttila O., Hansen E., Hynynen J. 2001. Chemical composition and ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to above ground element application. *Environmental Pollution*, 112: 417-426
- Morel M., Crouzet J., Gravot A., Auroy P., Leonhardt N., Vavasseur A., Richaud P. 2009. AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149: 894-904
- Morrissey J., Guerinot M.L. 2009. Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chemical Reviews*, 109, 10: 4553-4567
- Nagajyoti P.C, Lee K.D, Sreekanth T.V.M. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8: 199-216
- Nägele T., Kander A.K., Frana S., Meißner M., Heyer A.G. 2011. A systems biology approach for the analysis of carbohydrate dynamics during acclimation to low temperature in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal*, 278: 506-518
- Nečemer M., Kump P., Vogel-Mikuš K. 2011. Use x-ray fluorescence-based analytical techniques in phytoremediation. In: *Handbook of phytoremediation (Environmental science, engineering and technology)*. Golubev I.A. (ed.). New York, Nova Science Publishers cop.: 331-358

- Newville M. 2004. Fundamentals of XAFS. Revision 1.6. Consortium for Advanced Radiation Sources. Chicago, Illinois, University of Chicago: 41 str.
- Ozkutlu F., Ozturk L., Erdem H., McLaughlin M.J., Cakmak I. 2007. Leaf-applied sodium chloride promotes cadmium accumulation in durum wheat grain. *Plant and Soil*, 290: 323-331
- Ozturk L., Karanlik S., Ozkutlu F., Cakmak I., Kochian L.V. 2003. Shoot biomass and zinc/cadmium uptake for hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species in response to growth on a zinc-deficient calcareous soil. *Plant Science*, 164: 1095-1101
- Pence N.S., Larsen P.B., Ebbs S.D., Letham D.L., Lasat M.M., Garvin D.F., Eide D., Kochian L.V. 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 4956-4960
- PerkinElmer instruments. 2000. Analytical methods for atomic absorption spectrometry. Release E. Singapore. 300 str.
- Pilbeam D.J., Morley P.S. 2006. Chapter 5: Calcium. V: *Handbook of Plant Nutrition*. Barker A.V., Pilbeam D.J. (eds). Florida, CRC Press: 121-144
- Pilon-Smits E.A., Quinn C.F., Tapken W., Malagoli M., Schiavon M. 2009. Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 267-74
- Pongrac P., Zhao F.J., Razinger J., Zrimec A., Regvar M. 2009. Physiological responses to Cd and Zn in two Cd/Zn hyperaccumulating *Thlaspi* species. *Environmental and Experimental Botany*, 66: 479-486
- Pongrac P., Vogel-Mikuš K., Vavpetič P., Tratnik J., Regvar M., Simčič J., Grlj N., Pelicon P. 2010. Cd induced redistribution of elements within leaves of the Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi praecox* as revealed by micro-PIXE. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, 268: 2205-2210
- Pongrac P., Vogel-Mikuš K., Kavčič M., Koren Š., Arčon I. 2011. Sub-cellular localization of Cd in plant tissues. S. l.: European Synchrotron Radiation Facility - ESRF, 28.2.2011: 3 str.
- Przedpeńska-Wąsowicz E., Polatajko A., Wierzbicka M. 2012. The Influence of Cadmium Stress on the Content of Mineral Nutrients and Metal-Binding Proteins in *Arabidopsis halleri*. *Water, Air & Soil Pollution*, 223: 5445-5458
- Qiu Q., Wang Y., Yang Z., Yuan J. 2011. Effects of phosphorus supplied in soil on subcellular distribution and chemical forms of cadmium in two Chinese flowering cabbage (*Brassica parachinensis* L.) cultivars differing in cadmium accumulation. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 2260-2267
- Ranwala A.P., Miller W.B. 1998. Sucrose cleaving enzymes and carbohydrate pools in *Lilium longiflorum* floral organ. *Physiologia Plantarum*, 103: 541-550

- Rascio N., Navari-Izzo F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? and what makes them so interesting?, Plant science Shannon Ireland, Volume: 180, Issue: 2, Publisher: Elsevier Ireland Ltd, Pages: 169-181
- Ravel B., Newville M. 2005. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. Journal of Synchrotron Radiation, 12: 537-541
- Redjala T., Sterckeman T., Morel J.L. 2009. Cadmium uptake by roots: Contribution of apoplast and of high- and low-affinity membrane transport systems. Environmental and Experimental Botany, 67: 235-242
- Reeves R.D., Baker A.J.M. 2000. Metal-accumulating Plants. In: Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment. Raskin I., Ensley B.D. (eds.). New York, USA, John Wiley and Sons Inc.: 193-229
- Reeves R.D., Schwartz C., Morel J.L., Edmondson J. 2001. Distribution and metal-accumulating behavior of *Thlaspi caerulescens* and associated metallophytes in France. International Journal of Phytoremediation, 3: 145-172
- Regvar M., Eichert D., Kaulich B., Gianoncelli A., Pongrac P., Vogel-Mikuš K. 2013. Biochemical characterization of cell types within leaves of metalhyperaccumulating *Nocca praecox* (Brassicaceae). Plant and Soil (sprejeto). DOI: 10.1007/s11104-013-1768-z
- Reid R.J., Dunbar K.R., McLaughlin M.J. 2003. Cadmium loading into potato tubers: the roles of the periderm, xylem and phloem. Plant, Cell & Environment 26: 201-206
- Römheld V., Nikolic M., 2006. Chapter 11: Iron. In: Handbook of Plant Nutrition. Barker A.V., Pilbeam D.J. (eds). Florida, CRC Press: 329-350
- Roosens N., Verbruggen N., Meerts P., Ximénez-Embún P., Smith J.A.C. 2003. Natural variation in cadmium tolerance and its relationship to metal hyperaccumulation for seven populations of *Thlaspi caerulescens* from Western Europe. Plant, Cell & Environment, 26: 1657-1672
- Rosa M., Prado C., Podazza G., Interdonato R., González J.A., Hilal M., Prado F.E. 2009. Soluble sugars—Metabolism, sensing and abiotic stress. A complex network in the life of plants. Plant Signaling & Behavior, 4, 5: 388-393
- Rufty T.W., Huber S.C., Volk R.J. 1988. Alterations in Leaf Carbohydrate Metabolism in Response to Nitrogen Stress 1. Plant Physiology, 88: 725-730
- Salt D.E., Krämer U. 2000. Mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. V: Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment. Raskin I., Ensley B.D. (eds.). New York, John Wiley & Sons: 231-245
- Sancenón V., Puig S., Mateu-Andres I., Dorcsey E., Thiele D.J., Penarrubia L. 2004. The *Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. The Journal of Biological Chemistry, 279: 15348-15355

- Sarwar N., Saifullah, Malhi S.S., Zia M.H., Naeem A., Bibi S., Farid G. 2010. Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 925-937
- Schöffl F., Prandl R., Reindl A. 1999. Molecular responses to heat stress. V: *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants*. Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (eds.). Austin, Texas, R.G. Landes Co.: 81-98
- Schreiber U., Bilger W., Neubauer C. 1995. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: *Ecophysiology of Photosynthesis*. Schulze E.D., Caldwell M.M. (eds.). Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag: 49-70
- Seregin I.V., Ivanov V.B. 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian journal of plant physiology*, 48: 523-544
- Sinniah U.R., Ellis R.H., John P. 1998. Irrigation and Seed Quality Development in Rapid-cycling *Brassica*: Soluble Carbohydrates and Heat-stable Proteins. *Annals of Botany*, 82: 647-655
- Small J.A. 1993. Electron-induced X-ray emission. In: *Handbook of X-ray spectrometry*. Van Grieken R.E., Markowicz A.A. (eds.). New York, Marcell Dekker: 583-656
- Sonneveld C., Voogt W. 2009. *Plant nutrition of greenhouse crops*: Heidelberg, Springer Verlag: 446 str.
- Stobrawa K., Lorenc-Plucińska G. 2007 Changes in carbohydrate metabolism in fine roots of the native European black poplar (*Populus nigra* L.) in a heavy-metal-polluted environment. *The Science of the Total Environment*, 373: 157-165
- Stoehr J. 1992. *NEXAFS Spectroscopy*. Springer series in surface sciences Vol. 25. Heidelberg, Springer-Verlag: 403 str.
- Storey J.B. 2006. Zinc. In: *Handbook of Plant Nutrition*. Barker A.V., Pilbeam D.J. (eds.). Florida, CRC Press: 411-436
- Strand A., Hurry V., Gustafsson P., Gardeström P. 1997. Development of *Arabidopsis thaliana* leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates. *The Plant Journal*, 12: 605-614.
- Strand A., Hurry V., Henkes S., Huner N., Gustafsson P., Gardeström P., Stitt M. 1999. Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiology*, 119: 1387-1397
- Stuart B.H. 2004. *Industrial and Environmental Applicati*. In: *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Ltd: 224 str.

- Sun R., Zhou Q., Jin C. 2006. Cadmium accumulation in relation to organic acids in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator. *Plant and Soil*, 285: 125-134
- Surewicz W.K., Mantsch H.H., Chapman D. 1993. Determination of Protein Secondary Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A Critical Assessment. *Biochemistry*, 32: 389-393
- Suzuki N. 2005. Alleviation by calcium of cadmium-induced root growth inhibition in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Biotechnology*, 22: 19-25
- Takeda K., Kariuda M., Itoi H. 1985. Blueing of sepal colour of *Hydrangea macrophylla*. *Phytochemistry*, 24: 2251-2254
- Thomine S., Lelièvre F., Debarbieux E., Schroeder J.I., Barbier-Brygoo H. 2003. AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *The Plant Journal*, 34: 685-695
- Thomine S., Wang R., Ward J.M., Crawford N.M., Schroeder J.I. 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 4991-4996
- Tolrà R.P., Poschenrieder C., Barcelo J. 1996. Zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. I. Influence on growth and mineral nutrition. *Journal of Plant Nutrition*, 19, 12: 1531-1540
- Tolrà R., Pongrac P., Poschenrieder C., Vogel-Mikuš K., Regvar M., Barceló J. 2006. Distinctive effects of cadmium on glucosinolate profiles in Cd hyperaccumulator *Thlaspi praecox* and non-hyperaccumulator *Thlaspi arvense*. *Plant and Soil*, 288: 333-341
- Torabi M., Mokhtarzadeh A., Mahlooji M. 2012. The role of hydroponics technique as a standard methodology in various aspects of plant biology researches. In: *Hydroponics - A Standard Methodology for Plant Biological Researches*. Toshiki A. (ed.). Croatia, InTech.: 244 str.
- Tymowska-Lalanne Z., Kreis M. 1998. The plant invertases: physiology, biochemistry, and molecular biology. *Advances in Botanical Research*, 28: 71-117
- Ueno D., Ma J.F., Iwashita T., Zhao F.J., McGrath S.P. 2005. Identification of the form of Cd in the leaves of a superior Cd-accumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens* using ¹¹³Cd-NMR. *Planta*, 221: 928-936
- Van den Ende E.W., Michiels A., Le-Roy K., Van-Laere A. 2002. Cloning of a vacuolar invertase from Belgian endive leaves (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum*, 115: 504-512

- van der Ent A., Baker A.J.M., Reeves R.D., Pollard A.J., Schat H. 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant and Soil*, 362: 319-334
- Vázquez M.D., Barceló J., Poschenrieder C., Mádico J., Hatton P., Baker A.J.M., Cope G.H. 1992. Localization of Zinc and Cadmium in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), a metallophyte that can hyperaccumulate both metals. *Journal of Plant Physiology*, 140: 350-355
- Vekemans B., Janssens K., Vincze L., Adams F., Van Espen P. 1994. Analysis of X-ray spectra by iterative least squares (AXIL): new developments. *X-ray Spectrometry* 23: 278-285
- Verbruggen N., Hermans C., Schat H. 2009. Mechanisms to copewith arsenic or cadmium excess in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 364-372
- Verma S., Dubey R.S. 2001. Effect of cadmium on soluble sugars and enzymes of their metabolism in rice. *Biologia Plantarum*, 44: 117-123
- Vert G., Grotz N., Dédaldéchamp F., Gaymard F., Guerinot M.L., Briat J.F., Curie C. 2001. IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell*, 14: 1223-1233
- Vitória A.P., Lea P.J., Azevedo R.A. 2001. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry*, 57: 701-710
- Vitória A.P., Rodriguez A.P.M., Cunha M., Lea P.J., Azevedo R.A. 2003. Structural changes in radish seedlings (*Raphanus sativus*) exposed to cadmium. *Biologia Plantarum*, 47: 561-568
- Vitória A.P., Cunha M., Azevedo R.A. 2006. Ultrastructural changes of radish leaf exposed to cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 58: 47-52
- Voet D., Voet J.G. 2010. *Biochemistry*, 4th ed. New York, John Wiley & Sons: 916 str.
- Vogel-Mikuš K., Drobne D., Regvar M. 2005. Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. *Environmental Pollution*, 133: 233-242
- Vogel-Mikuš K., Pongrac P., Kump P., Nečemer M., Regvar M. 2006. Colonisation of a Zn, Cd and Pb hyperaccumulator *Thlaspi praecox* Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake. *Environmental Pollution*, 139: 362-371
- Vogel-Mikuš K., Pongrac P., Kump P., Nečemer M., Simčič J., Pelicon P., Budnar M., Povh B., Regvar M. 2007. Localisation and quantification of elements within seeds of Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi praecox* by micro-PIXE. *Environmental pollution*, 147: 50-59

- Vogel-Mikuš K., Regvar M., Mesjasz-Przybyłowicz J., Przybyłowicz W.J., Simčič J., Pelicon P., Budnar M. 2008a. Spatial distribution of cadmium in leaves of metal hyperaccumulating *Thlaspi praecox* using micro-PIXE. *New Phytologist*, 179: 712-721
- Vogel-Mikuš K., Simčič J., Pelicon P., Budnar M., Kump P., Nečemer M., Mesjasz-Przybyłowicz J., Przybyłowicz W.J., Regvar M. 2008b. Comparison of essential and non-essential element distribution in leaves of the Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi praecox* as revealed by micro-PIXE. *Plant, Cell & Environment*, 10: 1484-96
- Vogel-Mikuš K., Pelicon P., Vavpetič P., Kreft I., Regvar M., 2009. Elemental analysis of edible grains by micro-PIXE: common buckwheat case study. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, 17, 267: 2884-2889
- Vogel-Mikuš K., Arčon I., Kodre A. 2010. Complexation of cadmium in seeds and vegetative tissues of the cadmium hyperaccumulator *Thlaspi praecox* as studied by X-ray absorption spectroscopy. *Plant and Soil*, 331: 439-451
- Vogel-Mikuš K., Arčon I., Kump P., Pelicon P., Nečemer M., Vavpetič P., Koren Š., Regvar M. 2012. Analytical tools for exploring metal accumulation and tolerance in plants. V: *Phytotechnologies: remediation of environmental contaminants*. Anjum N.A. (ed.). Boca Raton (FL), Taylor & Francis: 443-495
- Wei Z.L., Dong L., Tian Z.H. 2009. Fourier transform infrared spectrometry study on early stage of cadmium stress in clover leaves. *Pakistan Journal of Botany*, 41: 1743-1750
- Whiting S.N., Leake J.R., McGrath S.P., Baker A.J.M. 2000. Positive responses to Zn and Cd by roots of the Zn and Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, 145: 199-210
- Whiting S.N., Reeves R.D., Richards D., Johnson M.S., Cooke J.A., Malaisse F., Paton A., Smith J.A.C., Angle J.S., Chaney R.L., Ginocchio R., Jaffré T., John D.R., McIntyre T., Purvis O.W., Salt D.E., Schat H., Zhao F.J., Baker A.J.M.. 2004. Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. *Restoration Ecology*, 12: 106-116
- Williams L., Salt D.E. 2009. The plant ionome coming into focus. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 247-249
- Winter H., Huber S.C. 2000. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 253-289
- Wójcik M., Vangronsveld J., D'Haen J., Tukiendorf A. 2005. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens* II. Localization of cadmium in *Thlaspi caerulescens*. *Environmental and Experimental Botany*, 53: 163-171
- Wong, J., Lytle F.W., Messmer R.P., Maylotte D.H. 1984. K-edge spectra of selected vanadium compounds. *Physical Review B*, 30: 5596-5610

- Wraber T. 2005. O verjetni nesamoniklosti nekaterih semenk, primerov za florulo castrensis, v flori Slovenije. On the probable non-native occurrence of some spermatophytes, examples of the florula castrensis, in the flora of Slovenia. Hladnikia, 18: 3-10
- Xing J.P., Jiang R.F., Ueno D., Ma J.F., Schat H., McGrath S.P., Zhao F.J. 2008. Variation in root-to-shoot translocation of cadmium and zinc among different accessions of the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi praecox*. New Phytologist, 178: 315-325
- Yemm E.W., Willis J. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. Biochemical Journal, 57: 508-514
- Ying R.R., Qiu R.L., Tang Y.T., Hu P.J., Qiu H., Chen H.R., Shi T.H., Morel J.L. 2010. Cadmium tolerance of carbon assimilation enzymes and chloroplast in Zn/Cd hyperaccumulator *Picris divaricata*. Journal of Plant Physiology, 15: 81-87
- Zhao F.-J., Hamon R.E., Lombi E., McLaughlin M.J. & McGrath S.P. 2002. Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Journal of Experimental Botany, 53: 535-543
- Zhou R., Silcher R.C., Quebedeaux B. 2002. Apple leaf sucrose phosphate synthase is inhibited by sorbitol-6-phosphate. Functional Plant Biology, 29: 569-574

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Marjani Regvar se zahvaljujem za vse nasvete, pomoč pri raziskovalnem delu in ponujeno mesto mladega raziskovalca.

Somentorici doc. dr. Katarini Vogel-Mikuš se zahvaljujem za vso strokovno pomoč, nasvete in znanstvene pogovore.

Članici komisije prof. dr. Alenki Gabersčik za vse nasvete in spodbudne besede.

Hvala doc. dr. Primožu Peliconu za vse meritve in analize, ki so bile opravljene v okviru njegove raziskovalne skupine ter za pregled doktorskega dela.

Hvala dr. Petru Kumpu in dr. Marijanu Nečemru z Inštituta Jožef Stefan za izvedbo meritev in analiz z rentgensko fluorescenco.

Hvala prof. dr. Iztoku Arčonu za pomoč pri meritvah ter inštrukcijah o sinhrotronih tako in drugače.

Hvala dr. Diane Eichert in dr. Lisi Vaccari iz sinhrotrona Elettra v Italiji ter doc. dr. Jožetu Grdadolniku iz Kemijskega Inštituta za opravljene meritve ter izobraževanje o IR.

Hvala prof. dr. Stanleyu Luttsu, da me je sprejel v svoj laboratorij v Belgiji ter dr. Isabelle Lefevre za vso strokovno pomoč.

Hvala vsem sodelavcem razširjene Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin za vso pomoč in konstruktivne pogovore. Posebna zahvala gre Pauli, Matevžu, Mileni in Evi.

Hvala vsem mojim zdajšnjim in bivšim cimrom v pisarni ob stopnišču za vse življenjske debate, smeh, nasvete in podporo. Posebna zahvala gre Silvi, Sašotu, Ani, Cenetu in Mateju.

Hvala sošolkam in prijateljicam iz faksa Tini J., Barbari, Meti, Tini M. in Sari za vse pogovore ob kavicah.

Posebej in iskreno se zahvaljujem Katji in Katji, ki tvorita podporna stebra KKŠKL, za vso podporo, smeh in dogodivščine.

Nazadnje, a najbolj srčno...

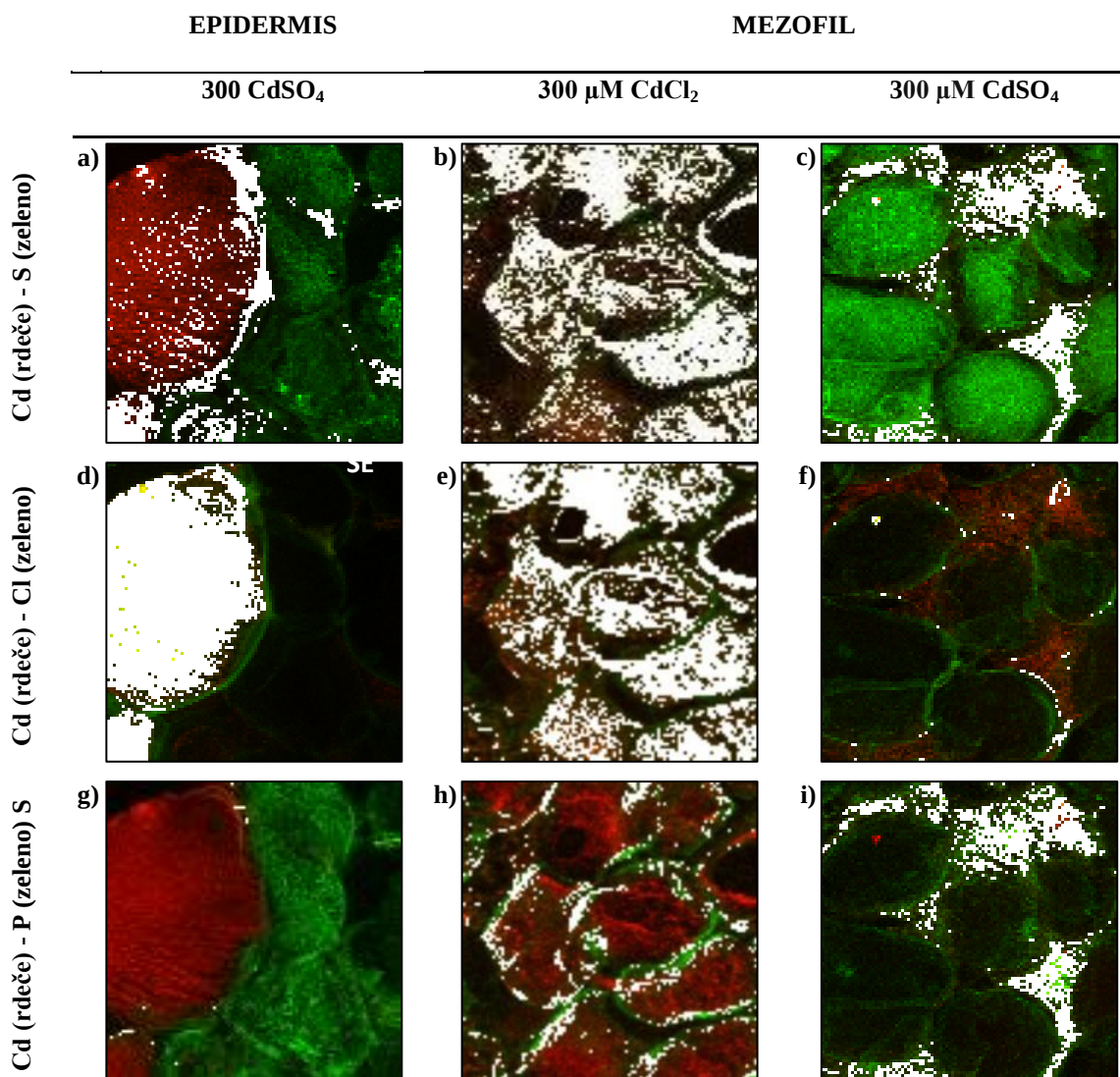
... se zahvaljujem svoji mami Alenki in sestri Maji za vso podporo, razumevanje in pomoč tekom študija

...ter mojemu sopotniku skozi življenje, Bačotu, za vso brezmejno podporo in ljubezen.

PRILOGE

PRILOGA A

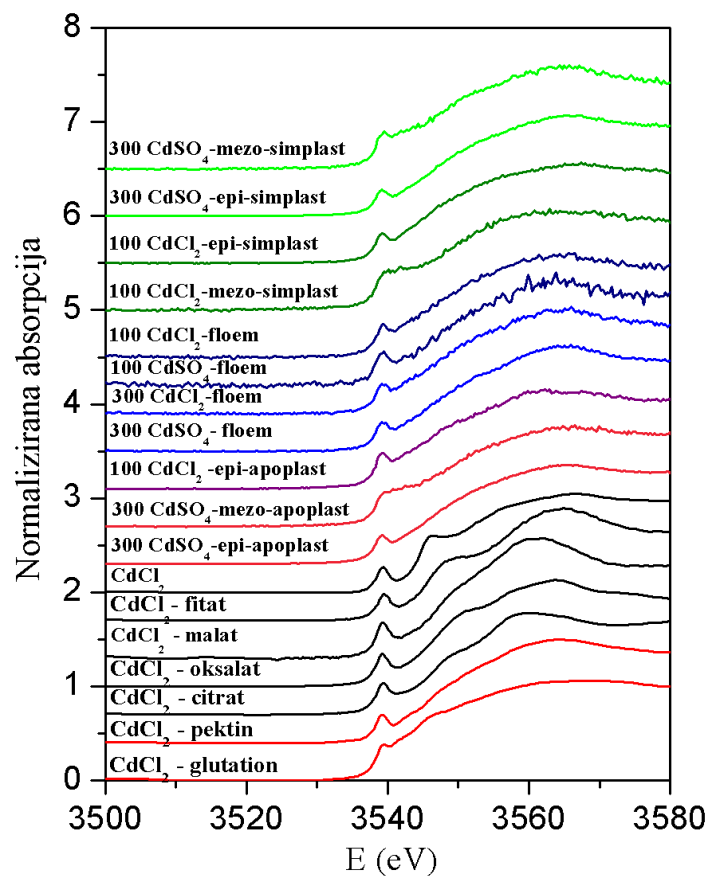
PRILOGA A1



Mape s kolokalizacijo **a-c)** Cd-S, **d-f)** Cd-Cl in **g-i)** Cd-P posnete v področju zgornjega epidermisa/sub-epidermisa rastlin 300 μM CdSO₄ (**1. stolpec**) ter stebričastega mezofila listov 300 μM CdCl₂ (**2. stolpec**) in 300 μM CdSO₄ (**3. stolpec**) rastlin ranega mošnjaka (*T. praecox*) v epidermisu/sub-epidermisu zrelih listov. Cd-rdeče barve, S,Cl,P-zelene barve, bela barva nakazuje točke kolokalizacije.

Co-localisation maps of **a-c)** Cd-S, **d-f)** Cd-Cl and **g-i)** Cd-P recorded in epidermal/sub-epidermal region of 300 μM CdSO₄ plants (**1st column**), palisade mesophyll of 300 μM CdCl₂ (**2nd column**) and 300 μM CdSO₄ (**3rd column**) *T. praecox* plants. Cd-marked red, S,Cl,P-marked green, white areas denote colocalization points. UE-upper epidermis, LVC-large vacuolized cells, SE-sub-epidermis, PM-palisade mesophyll.

PRILOGA A2

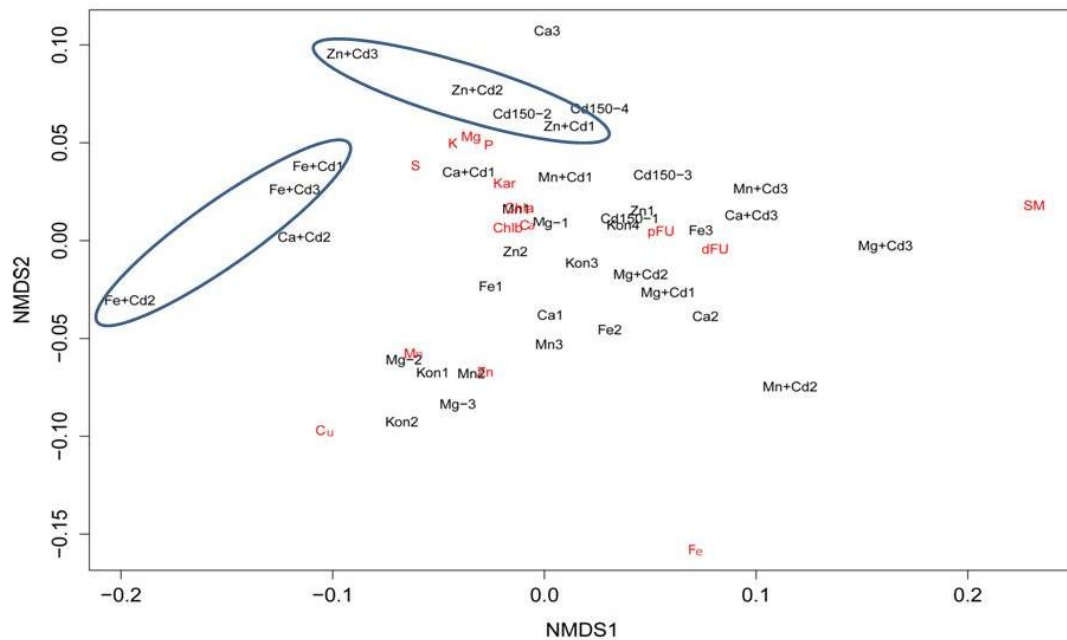


Mikro-XANES spektri posneti na Cd-L₃ v epidermisu lista rastlin izpostavljenih 100 μ M CdCl₂ ali 300 μ M CdSO₄ in v floemu rastlin, izpostavljenih 100 ali 300 μ M CdCl₂ ali CdSO₄ in mikro-XANES spektri na Cd-L₃ robu različnih modelnih spojin (CdCl₂, Cd-fitat, Cd-malat, Cd-oksalat, Cd-citrat, Cd-pektin in Cd-glutation).

Cd-L₃ edge micro-XANES spectra recorded in leaf epidermis, in the mesophyll of plants treated with 100 μ M of CdCl₂ and 300 μ M of CdSO₄, and in phloem of plants treated with 100 μ M and 300 μ M of CdCl₂ and CdSO₄, and Cd-L₃ edge micro-XANES spectra of model compounds (CdCl₂, Cd-phytate, Cd-malate, Cd-oxalate, Cd-citrate, Cd-pectin, and Cd-glutathione).

PRILOGA B

PRILOGA B1



Graf nemetričnega večrazsežnostnega lestvičenja (nMDS), ki kaže grupiranje vseh rastlin *T. praecox* kontrole ter rastlin, ki so rastle v pomanjkanju oz. v pomanjkanju z dodanim Cd. Vnesli smo podatke o koncentracijah makro in mikro elementov v poganjkih ter vse izmerjene rastne in biokemijske parametre. Ugotovili smo, da se podatki izrazito grupirajo le pri tretmaju –Fe+Cd in delno pri –Zn+Cd, ki pa se že prekriva s tretmajem Cd (na sliki označen Cd150). Obkrožena sta tretmaja, ki se najbolj ločita od ostalih. Plot of non-metric multidimensional scaling (nMDS) which shows grouping of control plants, plants grown in mineral deficiency or in mineral deficiency with addition of Cd. In analysis included the data of micro- and macronutrient concentrations in shoots and all growth and biochemical parameters. We noticed that only data from –Fe+Cd and –Zn+Cd treatment formed a distinct group, the latest did already overlapped with +Cd treatment (on plot marked as Cd150). The treatments that form the groups that are separated the most from the others are encircled.

PRILOGA B2

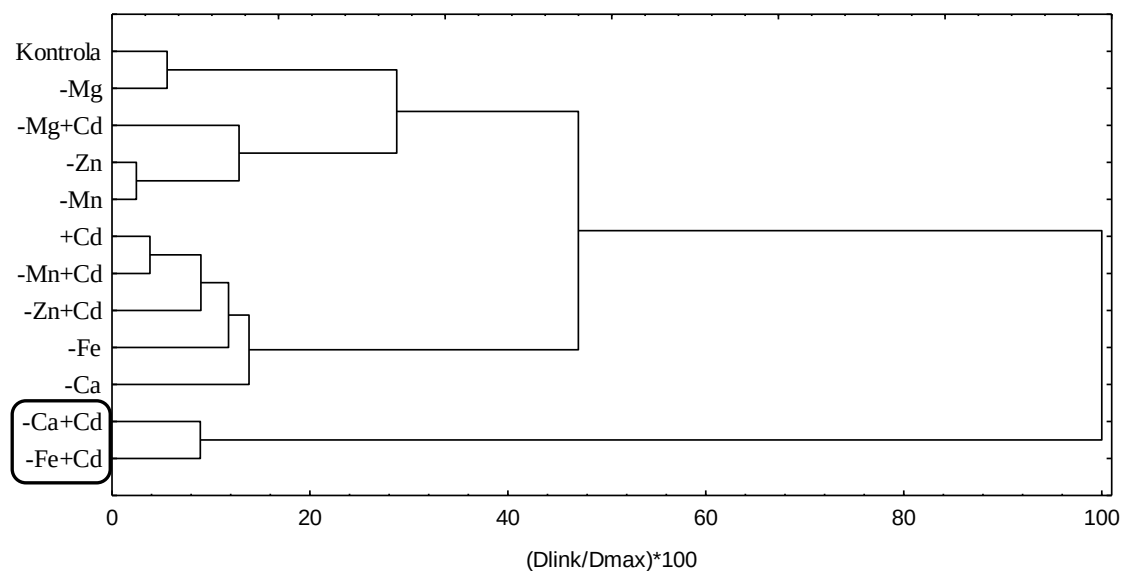


Diagram drevesaste strukture, ki kaže grupiranje rastlin *T. praecox* kontrole ter rastlin, ki so rastle v pomanjkanju oz. v pomanjkanju z dodanim Cd. Analiza je bila opravljena z Wardovo metodo na podlagi koncentracij vseh pomerjenih elementov v poganjkih brez Cd ter vsemi izmerjenimi rastnimi parametri. Obkrožena sta tretmaja, ki se najbolj ločita od ostalih.

Tree diagram representing grouping of control plants, plants grown in mineral deficiency or in mineral deficiency with addition of Cd. The analysis was performed with Ward's method with the data on the concentrations of all measured elements without Cd and, all the measured growth parameters. The treatments that form the group that is separated the most from the others is encircled.

PRILOGA B3

Rezultati linearne diskriminantne analize za koncentracije elementov Mg, P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe in Zn, pomerenih v celotni liofilizirani prečni rezini zrelega lista ranega mošnjaka (*T. praecox*) z metodo mikro-PIXE po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg, -Ca, -Fe), dodatkom 150 μM CdSO_4 (+Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom Cd (-Mg+Cd, -Ca+Cd, Fe+Cd) (povprečje $\pm$ SE; n=6-8).

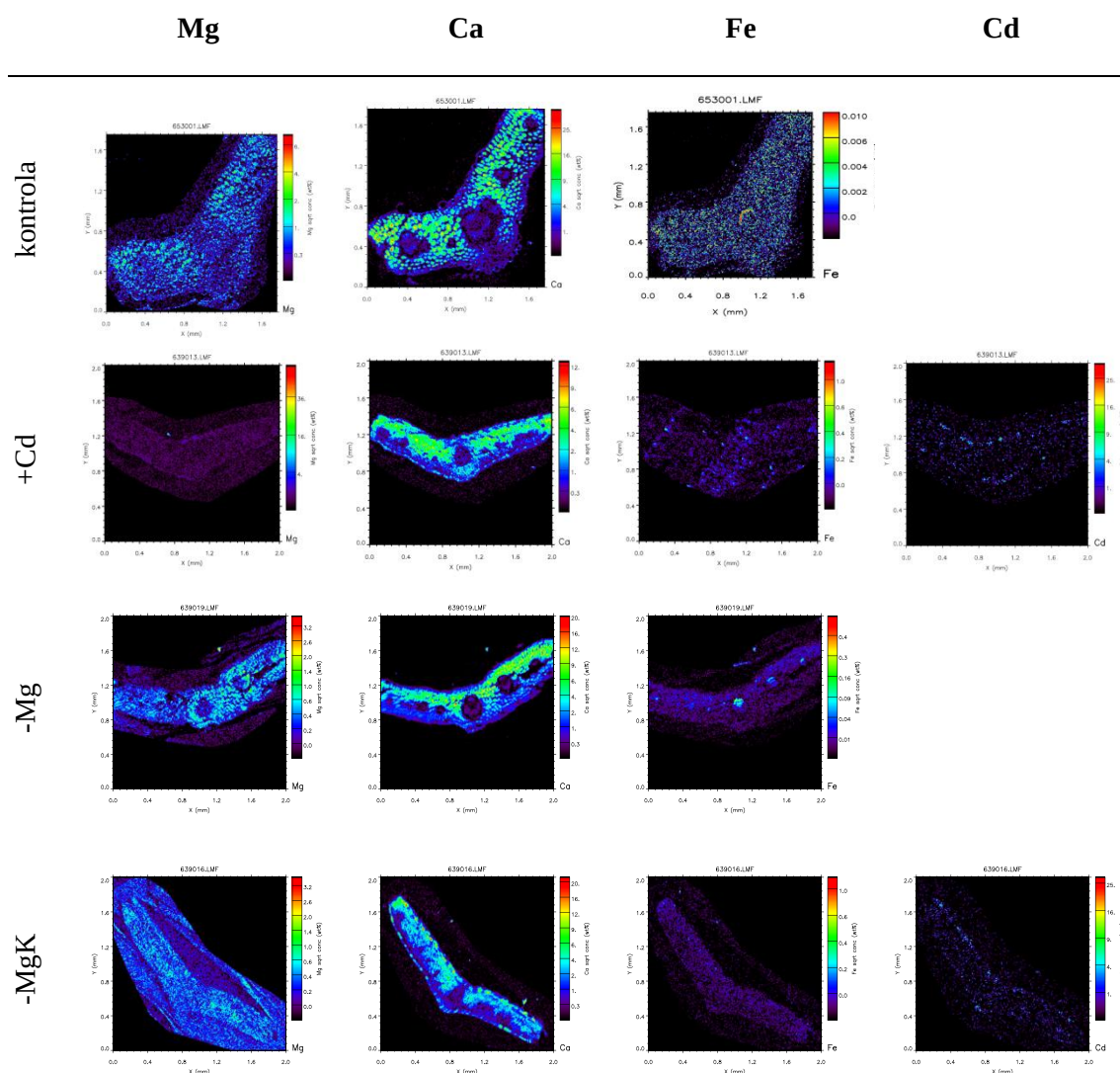
Linear discriminant analysis results for concentrations of Mg, P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe and Zn, measured on whole freeze-dried cross section of mature leaf of pennycress (*T. praecox*) on freeze-dried cross sections with micro-PIXE after 8 weeks of growth in mineral solution with mineral deficiency of particular mineral (-Mg, -Ca, -Fe), or addition of 150 μM CdSO_4 (+Cd) or mineral deficiency of particular mineral with addition of Cd (-Mg+Cd, -Ca+Cd, -Fe+Cd) (mean $\pm$ SE; n=6-8).

Lastne vrednosti	Funkcija 1	Funkcija 2	Funkcija 3
Eigenvalue	10,64	6,856	4,616
% relativna pomembnost	40,32	25,98	17,49
Kumulativa %	40,32	65,98	82,49
Kanonična korelacija	0,956	0,934	0,907

Wilksova lambda	Funkcija 1	Funkcija 2	Funkcija 3
Wilksova lambda	0,000	0,002	0,013
Hi-kvadrat	493,5	357,2	242,8
SP	63	48	35
p-vrednosti	0,000	0,000	0,000

PRILOGA C

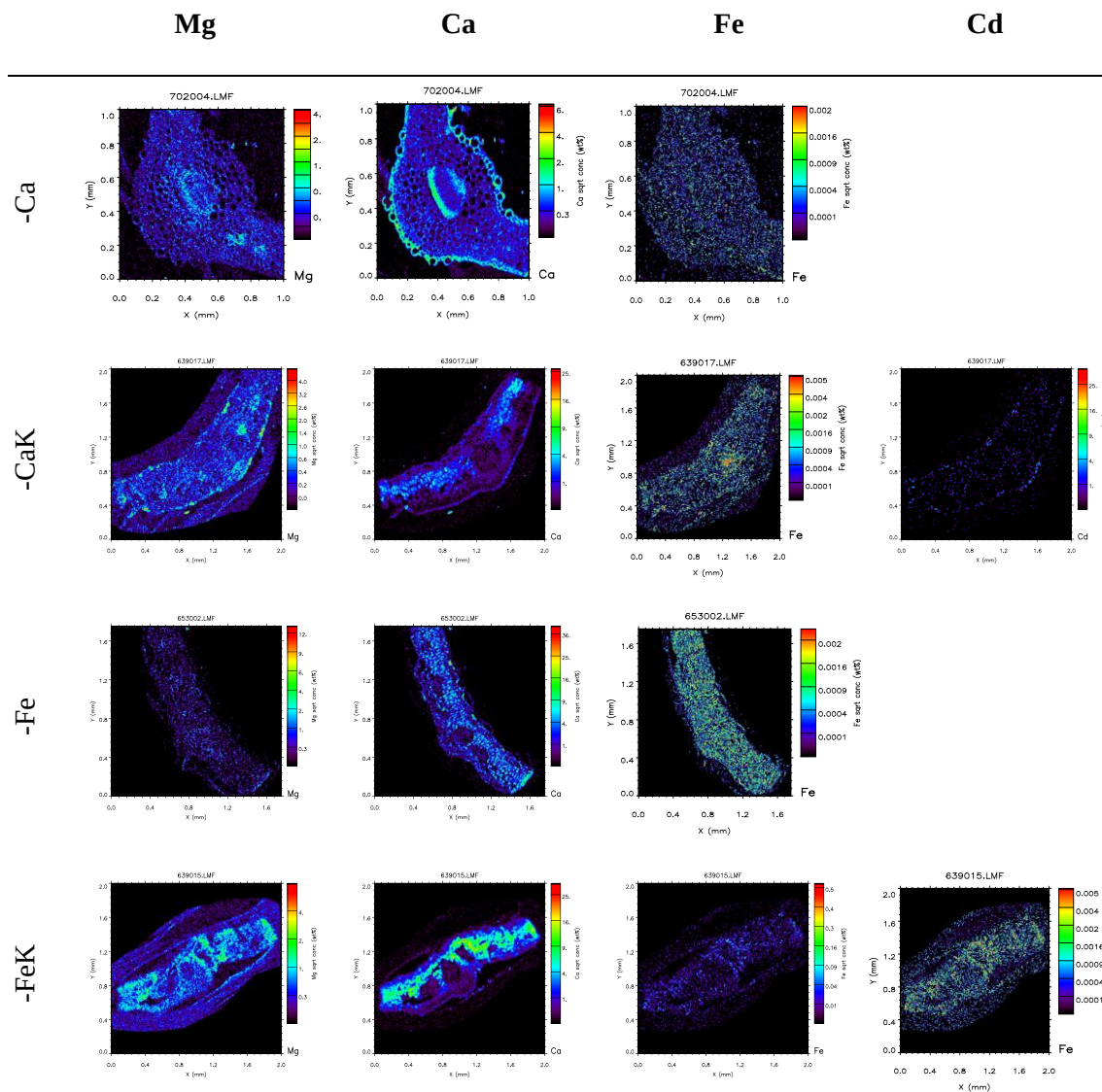
PRILOGA C1



Koncentracijske mape porazdelitve elementov Mg, Ca, Fe in Cd pomerjenih na liofiliziranih prečnih rezinah listov ranega mošnjaka (*T. praecox*) z metodo mikro-PIXE po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Mg), dodatkom 150 μM CdSO_4 (+Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom Cd (-Mg+Cd) (povprečje $\pm$ SE; n=2). Mape prečnih prerezov listov so orientirane tako, da je zgornja povrhnjica usmerjena navzgor.

Concentration maps for Mg, Ca, Fe and Cd measured in freeze-dried cross sections of pennycress (*T. praecox*) leaves after 8 weeks of growth in mineral solution with mineral deficiency of particular mineral (-Mg), or addition of 150 μM CdSO_4 (+Cd) or mineral deficiency of particular mineral with addition of Cd (-Mg+Cd) (mean $\pm$ SE; n=2). Concentration maps of leaf cross sections are oriented with upper epidermis pointed upwards.

PRILOGA C2



Koncentracijske mape porazdelitve elementov Mg, Ca, Fe in Cd pomerjenih na liofiliziranih prečnih rezinah listov ranega mošnjaka (*T. praecox*) z metodo mikro-PIXE po 8 tednih rasti v hranilni raztopini s pomanjkanjem določenega minerala (-Ca, -Fe), dodatkom 150 μM CdSO_4 (+Cd) oz. s pomanjkanjem določenega minerala in dodatkom Cd (-Ca+Cd, -Fe+Cd) (povprečje $\pm$ SE; n=2). Mape prečnih prereзов listov so orientirane tako, da je zgornja povrhnjica usmerjena navzgor.

Concentration maps for Mg, Ca, Fe and Cd measured in freeze-dried cross sections of pennycress (*T. praecox*) leaves after 8 weeks of growth in mineral solution with mineral deficiency of particular particular mineral (-Ca, -Fe), or addition of 150 μM CdSO_4 (+Cd) or mineral deficiency of particular mineral with addition of Cd (-Ca+Cd, -Fe+Cd) (mean $\pm$ SE; n=2). Concentration maps of leaf cross sections are oriented with upper epidermis pointed upwards.

PRILOGA D

PRILOGA D1

Rezultati faktorske analize variance za SM korenin in poganjkov ter vsebnosti klorofilov a in b ter karotenoidov v poganjkih, potencialne in dejanske FU ter koncentracije Cd v koreninah in poganjkih ranega mošnjaka pri kontrolnih rastlinah in rastlinah izpostavljenih 50 μM ali 150 μM CdSO_4 za 1 teden oz. 4 tedne. Statistično značilne vplive prikazujejo odebeljene črke. SM-suha masa, FU-fotokemična učinkovitost

Results of factorial analyses of variance for SM of shoots and roots, and content of chlorophylls a and b and carotenoids in shoots, potential and actual FU and concentration of Cd in roots and shoots of *T. praecox* of control and with 50 μM or 150 μM CdSO_4 treated plants after 1 week or 4 weeks. Statistically significant influence is marked as bold text. SM-dry mass, FU-photochemical efficiency

Izbran parameter	Faktor in napaka	SS	Prostostne st.	MS	F	p
Suha masa korenin	tretma	0,009	2	0,005	2,831	0,074
	št. tednov	0,015	1	0,015	9,475	0,004
	tretma*št. tednov	0,007	2	0,004	2,192	0,129
	napaka	0,050	31	0,002		
Suha masa poganjkov	tretma	0,336	2	0,168	6,297	0,005
	št. tednov	0,123	1	0,123	4,600	0,040
	tretma*št. tednov	0,269	2	0,135	5,053	0,013
	napaka	0,826	31	0,027		
Vsebnost klorofila a	tretma	33,91	2	16,95	11,12	0,001
	št. tednov	127,5	1	127,5	83,70	0,000
	tretma*št. tednov	53,76	2	26,88	17,64	0,000
	Napaka	21,33	14	1,524		
Vsebnost klorofila b	tretma	4,865	2	2,433	2,511	0,117
	št. tednov	30,69	1	30,69	31,67	0,000
	tretma*št. tednov	5,785	2	2,892	2,985	0,083
	napaka	13,56	14	0,969		
Vsebnost karotenoidov	tretma	211320	2	105660	10,75	0,001
	št. tednov	934463	1	934463	95,08	0,000
	tretma*št. tednov	315934	2	157967	16,07	0,000
	napaka	137589	14	9827		
Potencialna FU na zadnji dan poskusa	tretma	0,101	2	0,050	3,985	0,028
	št. tednov	0,270	1	0,270	21,202	0,000
	tretma*št. tednov	0,093	2	0,046	3,653	0,037
	napaka	0,408	32	0,012		
Dejanska FU na zadnji dan poskusa	tretma	0,075	2	0,037	4,962	0,013
	št. tednov	0,222	1	0,222	29,333	0,000
	tretma*št. tednov	0,062	2	0,031	4,089	0,026
	napaka	0,243	32	0,007		
Koncentracija Cd v koreninah	tretma	1116491460	2	558245730	27,31	0,000
	št. tednov	336251562	1	336251562	16,45	0,001
	tretma*št. tednov	615741170	2	307870585	15,06	0,000
	napaka	306547182	15	20436478		
Koncentracija Cd v poganjkih	tretma	31341281	2	15670640	124,7	0,000
	št. tednov	24971143	1	24971143	198,8	0,000
	tretma*št. tednov	12856569	2	6428284	51,18	0,000
	napaka	2135108	17	125594		

PRILOGA D2

Rezultati faktorske analize variance za vsebnost celotnih topnih sladkorjev in škroba v koreninah in poganjkih ter razmerje pog/kor pri kontrolnih rastlinah in rastlinah izpostavljenih 50 μM ali 150 μM CdSO_4 za 1 teden oz. 4 tedne. Statistično značilne vplive prikazujejo odebeljene črke.

Results of factorial analyses of variance for total soluble sugars and starch in shoots and roots and their shoot/root ratio in of *T. praecox* of control and with 50 μM or 150 μM CdSO_4 treated plants after 1 week or 4 weeks. Statistically significant influence is marked as bold text.

Izbran parameter	Faktor in napaka	SS	Prostostne stopinje	MS	F	p
Vsebnost celotnih topnih sladkorjev v koreninah	tretma	3,219	2	1,610	1,629	0,231
	št. tednov	0,109	1	0,109	0,110	0,745
	tretma*št. tednov	12,92	2	6,461	6,539	0,010
	napaka	13,83	14	0,988		
Vsebnost celotnih topnih sladkorjev v poganjkih	tretma	215,1	2	107,5	10,29	0,001
	št. tednov	142,5	1	142,5	13,64	0,002
	tretma*št. tednov	97,62	2	48,81	4,670	0,024
	napaka	177,6	17	10,452		
Razmerje vsebnost celotnih topnih sladkorjev pog/kor	tretma	12,41	2	6,208	10,53	0,002
	št. tednov	24,42	1	24,42	41,46	0,000
	tretma*št. tednov	5,446	2	2,723	4,623	0,030
	napaka	7,658	13	0,589		
Vsebnost škroba v koreninah	tretma	3,650	2	1,825	0,225	0,801
	št. tednov	76,87	1	76,87	9,478	0,008
	tretma*št. tednov	88,95	2	44,47	5,484	0,017
	napaka	113,5	14	8,110		
Vsebnost škroba v poganjkih	tretma	16,29	2	8,148	0,940	0,414
	št. tednov	24,76	1	24,76	2,859	0,113
	tretma*št. tednov	24,67	2	12,33	1,424	0,274
	napaka	121,30	14	8,664		
Razmerje vsebnosti škroba pog/kor	tretma	0,344	2	0,172	1,730	0,213
	št. tednov	1,863	1	1,863	18,75	0,001
	tretma*št. tednov	2,333	2	1,166	11,73	0,001
	napaka	1,391	14	0,099		

PRILOGA D3

Rezultati faktorske analize variance za vsebnosti glukoze, saharoze in fruktoze v poganjkih ter aktivnost encimov saharoza sintaze, kislih in nevtralnih invertaz ter saharoza-6-fosfat sintaze v poganjkih pri kontrolnih rastlinah in rastlinah izpostavljenih 50 μM ali 150 μM CdSO_4 za 1 teden oz. 4 tedne. Statistično značilne vplive prikazujejo odebeljene črke.

Results of factorial analyses of variance for contents of glucose, fructose and, enzyme activity of sucrose synthase, acid and neutral invertases, and sucrose-6-phosphate in shoots of *T. praecox* of control and with 50 μM or 150 μM CdSO_4 treated plants after 1 week or 4 weeks. Statistically significant influence is marked as bold text.

Izbran parameter	Faktor in napaka	SS	Prostostne stopinje	MS	F	p
Vsebnost glukoze v koreninah	tretma	0,021	2	0,011	0,657	0,536
	št. tednov	0,004	1	0,004	0,247	0,628
	tretma*št. tednov	0,063	2	0,032	1,957	0,184
	napaka	0,194	12	0,016		
Vsebnost glukoze v poganjkih	tretma	2,580	2	1,290	8,743	0,003
	št. tednov	0,005	1	0,005	0,034	0,856
	tretma*št. tednov	9,537	2	4,768	32,31	0,000
	napaka	2,213	15	0,147		
Vsebnost saharoze v poganjkih	tretma	3,059	2	1,529	7,023	0,005
	št. tednov	0,356	1	0,356	1,634	0,218
	tretma*št. tednov	0,074	2	0,037	0,170	0,844
	napaka	3,703	17	0,217		
Vsebnost saharoze v koreninah	tretma	0,842	2	0,421	4,453	0,030
	št. tednov	0,269	1	0,269	2,843	0,112
	tretma*št. tednov	0,201	2	0,100	1,061	0,371
	napaka	1,419	15	0,095		
Vsebnost fruktoze v poganjkih	tretma	2,483	2	1,241	30,74	0,000
	št. tednov	4,995	1	4,995	123,6	0,000
	tretma*št. tednov	2,870	2	1,435	35,53	0,000
	napaka	0,565	14	0,0403		

PRILOGA D4

Rezultati faktorske analize variance za vsebnost proteinov ter aktivnost encimov saharoza sintaze, kislih in nevtralnih invertaz ter saharoza-6-fosfat sintaze v poganjkih pri kontrolnih rastlinah in rastlinah izpostavljenih 50 μM ali 150 μM CdSO_4 za 1 teden oz. 4 tedne. Statistično značilne vplive prikazujejo odebeljene črke.

Results of factorial analyses of variance for contents proteins, and enzyme activity of sucrose synthase, acid and neutral invertases, and sucrose-6-phosphate in shoots of *T. praecox* of control and with 50 μM or 150 μM CdSO_4 treated plants after 1 week or 4 weeks. Statistically significant influence is marked as bold text.

Izbran parameter	Faktor in napaka	SS	Prostostne stopinje	MS	F	p
Vsebnost proteinov v poganjkih	tretma	4,394	2	2,197	3,647	0,050
	št.tednov	44,30	1	44,30	73,54	0,000
	tretma*št.tednov	3,627	2	1,814	3,011	0,078
	napaka	9,639	16	0,602		
Aktivnost saharoza sintaze	tretma	595,3	2	297,6	1,815	0,194
	št. tednov	51,63	1	51,63	0,314	0,582
	tretma*št. tednov	1638	2	819,2	4,995	0,020
	napaka	2624	16	164,0		
Aktivnost kislih invertaz	tretma	1117	2	558,5	8,982	0,005
	št. tednov	3850	1	3850	61,91	0,000
	tretma*št. tednov	2207	2	1103	17,75	0,000
	napaka	621,8	10	62,18		
Aktivnost nevtralnih invertaz	tretma	296,2	2	148,1	1,076	0,369
	št. tednov	463,8	1	463,8	3,372	0,089
	tretma*št. tednov	125,6	2	62,81	0,456	0,643
	napaka	1787	13	137,5		
Aktivnost saharoza-6-fosfat sintaze	tretma	20,10	2	10,05	0,113	0,893
	št. tednov	9,426	1	9,426	0,106	0,749
	tretma*št. tednov	16,84	2	8,424	0,095	0,909
	napaka	1149	13	88,41		