

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Jasna BALOH

**PRIVZEM Cd, Zn IN Pb TER ARBUSKULARNA MIKORIZA
PRI RAZLIČNIH POPULACIJAH RANEGA MOŠNJAKA
(*Thlaspi praecox* Wulf.)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Jasna BALOH

**PRIVZEM Cd, Zn IN Pb TER ARBUSKULARNA MIKORIZA PRI
RAZLIČNIH POPULACIJAH RANEGA MOŠNJAKA (*Thlaspi praecox*
Wulf.)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE UPTAKE OF Cd, Zn AND Pb AND ARBUSCULAR MYCORRHIZA
IN DIFFERENT POPULATIONS OF EARLY PENNYCRESS (*Thlaspi*
praecox Wulf.)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za botaniko in rastlinsko fiziologijo na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Analize z atomsko absorpcijsko spektroskopijo so bile opravljene na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, analize z metodo rentgenske fluorescence so bile opravljene na Institutu Jožef Stefan, Ljubljana.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za biologijo je dne 1. 9. 2016 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Katarino Vogel-Mikuš in za recenzentko prof. dr. Marjano Regvar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Alenka GABERŠČIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Marjana REGVAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Katarina VOGEL-MIKUŠ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 27. 9. 2016 ob 12:00 v predavalnici B3

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Jasna Baloh

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 581.1:631.466(043.2)=163.6
KG	privzem kovin / arbuskularna mikoriza / <i>Thlaspi praecox</i> W. / <i>Noccaea praecox</i> / Zn / Cd / Pb
AV	BALOH, Jasna
SA	VOGEL-MIKUŠ, Katarina (mentorica)/REGVAR, Marjana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2016
IN	PRIVZEM Cd, Zn IN Pb TER ARBUSKULARNA MIKORIZA PRI RAZLIČNIH POPULACIJAH RANEGA MOŠNJAKA (<i>Thlaspi praecox</i> Wulf.)
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 42 s., 7 pregl., 14 sl., 65 vir, 9 pril.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Pri različnih populacijah ranega mošnjaka (<i>Noccaea (Thlaspi) praecox</i> Wulf.) in eni populaciji modrikastega mošnjaka (<i>Noccaea (Thlaspi) caerulescens</i>) smo preučevali privzem Zn, Cd in Pb ter stopnjo arbuskularne mikorize (AM). Vzorce smo nabrali na 10 lokacijah po Sloveniji. Dve lokaciji sta bili močno onesnaženi s Zn, Cd in Pb, 8 lokacij je bilo neonesnaženih. V rizosfernih tleh smo izmerili koncentracije skupnih kovin in koncentracije izmenljivih kovin, pH ter rastlinam dostopni P. Stopnjo AM smo ocenili po barvanju korenin s tripan modrim pod svetlobnim mikroskopom. V koreninah, rozetah in cvetnih poganjkih rastlinskih vzorcev smo z atomsko absorpcijsko spektrofotometrijo (AAS) določili koncentracije Zn, Cd in Pb. Koncentracije preučevanih kovin v tleh so presegale kritične meje pri populacijah iz Mežice in Žerjava. <i>N. caerulescens</i> je hiperakumuliral Zn in Cd ter izključeval Pb. Tri populacije <i>N. praecox</i> (Žerjav, Mežica in Lokovec) so hiperakumulirale Cd. Vse populacije so vzpostavile AM. Stopnja AM kolonizacije je bila višja na neonesnaženih lokacijah in tam, kjer je bilo v tleh manj rastlinam dostopnega P.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 581.1:631.466(043.2)=163.6
 CX metal accumulation / arbuscular mycorrhiza / *Thlaspi praecox* W. / *Noccaea praecox* / Zn / Cd / Pb /
 AU BALOH, Jasna
 AA VOGEL-MIKUŠ, Katarina (supervisor)/REGVAR, Marjana (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 BP University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
 PY 2016
 TI THE UPTAKE OF Cd Zn AND Pb AND ARBUSCULAR MYCORRHIZA IN DIFFERENT POPULATIONS OF EARLY PENNYCRESS (*Thlaspi praecox* Wulf.)
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO IX, 42 p., 7 tab., 14 fig., 65 ref, 9 ann.
 LA sl
 AL sl/en
 AB The levels of Zn, Cd and Pb accumulation and the degree of arbuscular mycorrhiza (AM) in different populations of early pennycress (*Noccaea (Thlaspi) praecox* Wulf.) and a population of alpine pennycress (*Noccaea (Thlaspi) caerulescens*) were analysed. The samples of plants were gathered from 10 locations across Slovenia. 2 of them were very polluted with Zn, Cd and Pb, while eight of them were non-polluted. Total and exchangeable metal concentrations were determined along with pH and P. In addition the degree of AM colonization of the roots stained with tripan blue was assessed and metal concentrations in roots, rosettes and flowers using atomic absorption spectrometry (AAS) were also determined. Metal concentrations in the soils were higher than maximal allowed concentrations at locations of Mežica and Žerjav. Population of *N. caerulescens* hyperaccumulates Zn and Cd and excluding Pb. Three populations of *N. praecox* (Žerjav, Mežica and Lokovec) hyperaccumulate Cd. All of the 10 populations were colonized with AM fungi. AM colonization rate was lower at polluted locations and higher at locations with small concentrations of phosphorus.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ROD <i>Noccaea</i> IZ DRUŽINE <i>Brassicaceae</i>	3
2.2 TEŽKE KOVINE KOT ONESNAŽEVALCI TAL.....	4
2.2.1 Kadmij.....	5
2.2.2 Cink	5
2.2.3 Svinec.....	6
2.3 STRATEGIJE PREŽIVETJA RASTLIN NA ONESNAŽENIH TLEH	6
2.3.1 Hiperakumulacija.....	7
2.4 ARBUSKULARNA MIKORIZA	8
2.4.1 Vpliv težkih kovin na arbuskularno mikorizo.....	9
3 MATERIAL IN METODE DELA.....	10
3.1 VZORČENJE	10
3.1.1 Mesta vzorčenja	10
3.2 PRIPRAVA STEKLOVINE IN VZORCEV ZA ANALIZE	12
3.3 ANALIZE RASTLINSKEGA MATERIALA	12
3.3.1 Koncentracije Zn, Cd in Pb v rastlinah	12
3.3.2 Ocena stopnje mikorizne kolonizacije.....	13
3.4 ANALIZE VZORCEV TAL	14
3.4.1 Koncentracije rastlinam dostopnih kovin.....	14
3.4.2 pH tal	14

3.4.3 Koncentracije skupnih kovin	14
3.4.4 Koncentracije rastlinam dostopnega fosforja.....	15
3.5 STATISTIČNE ANALIZE	16
4 REZULTATI	17
4.1 ANALIZE TAL.....	17
4.1.1 Skupne in izmenljive koncentracije Zn, Cd in Pb v tleh	17
4.1.2 pH tal in rastlinam dostopni fosfor	18
4.2 ANALIZE RASTLINSKEGA MATERIALA	19
4.2.1 Masa rastlinskih vzorcev	19
4.2.2 Koncentracije Zn, Cd in Pb v rastlinskih organih	20
4.2.3 Korelacije izmenljivih koncentracij Cd, Zn, Pb in P v tleh in pH tal ter koncentracije Cd, Zn in Pb v rastlinskih organih	23
4.2.4 Bioakumulacijski in translokacijski faktorji	25
4.2.5 Stopnja arbuskularne mikorize	28
4.2.6 Vpliv izmenljivih koncentracij Cd, Zn, Pb in P ter pH na stopnjo kolonizacije arbuskularne mikorize	29
5 RAZPRAVA	31
5.1 ANALIZE TAL.....	31
5.2 BIOMASA IN PRIVZEM KOVIN V RASTLINE.....	32
5.3 BIOAKUMULACIJSKI IN TRANSLOKACIJSKI FAKTORJI	33
5.4 ARBUSKULARNA MIKORIZA	34
6 SKLEPI	35
7 POVZETEK.....	36
8 VIRI.....	37

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Vzorčna mesta in njihove značilnosti.	11
Pregl. 2: Mejne, opozorilne in kritične vrednosti za Zn, Cd in Pb v tleh.....	17
Pregl. 3: Skupne kovine v rizosferni zemlji vzorcev <i>N. praecox</i> in <i>N. caerulescens</i> različnih populacij.	17
Pregl. 4: pH in dostopni P v rizosferni zemlji vzorcev <i>N. praecox</i> in <i>N. caerulescens</i> različnih populacij.....	19
Pregl. 5: Prispevek spremenljivk k funkciji F1 in F2(%) na sliki 8.	24
Pregl. 6: Prispevek spremenljivk k funkciji F1 in F2 (%) na sliki 12	27
Pregl. 7: Prispevek spremenljivk k funkciji F1 in F2 (%) na sliki 14	29

KAZALO SLIK

Sl. 1: Rani mošnjak (<i>N. praecox</i>)	3
Sl. 2: Modrikasti mošnjak (<i>N. caerulescens</i>)	4
Sl. 3: Koncentracija izmenljivih kovin v rizosfernih tleh vzorcev <i>N. praecox</i> in <i>N. caerulescens</i> različnih populacij	18
Sl. 4: SM vzorcev <i>N. praecox</i> in <i>N. caerulescens</i> različnih populacij	20
Sl. 5: Koncentracije kovin v koreninah vzorcev <i>N. praecox</i> in <i>N. caerulescens</i> različnih populacij.....	21
Sl. 6: Koncentracije kovin v rozetah vzorcev <i>N. praecox</i> in <i>N. caerulescens</i> različnih populacij.....	22
Sl. 7: Koncentracije kovin v cvetnih poganjkih vzorcev <i>N. praecox</i> in <i>N. caerulescens</i> različnih populacij.....	23
Sl. 8: Korelacije izmenljivih koncentracij Cd, Zn, Pb in P v tleh in pH tal in koncentracij Cd, Zn in Pb v rastlinskih organih po statistični metodi glavnih komponent	24
Sl. 9: BAF vzorcev <i>N. praecox</i> in <i>N. caerulescens</i> različnih populacij	25
Sl. 10: Translokacijski faktorji rozeta/korenine vzorcev <i>N. praecox</i> in <i>N. caerulescens</i> različnih populacij.....	26
Sl. 11: Translokacijski faktorji cvetni poganjki/rozeta vzorcev <i>N. praecox</i> in <i>N. caerulescens</i> različnih populacij.....	27
Sl. 12: Korelacije BAF in TF po statistični metodi glavnih komponent.....	28
Sl. 13: Mikorizni parametri (F%, M%, A%) vzorcev <i>N. praecox</i> in <i>N. caerulescens</i> različnih populacij.....	29
Sl. 14: Vpliv izmenljivih koncentracij Cd, Zn, Pb in P v tleh in pH tal na stopnjo AM kolonizacije po statistični metodi glavnih komponent.	30

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AAS	atomska absorpcijska spektrofotometrija
AM	arbuskularna mikoriza
BAF	bioakumulacijski faktor
Cd	kadmij
Co	kobalt
Cr	krom
Cu	baker
Fe	železo
K	kalij
Mg	magnezij
Mn	mangan
Ni	nikelj
Pb	svinec
Se	selen
SM	suha masa
TF	translokacijski faktor
TK	težke kovine
XRF	rentgenska fluorescenca
Zn	cink

1 UVOD

Človek ima velik vpliv na okolje, v katerem živi in deluje. Negativni vpliv je prav gotovo onesnaženje. Eden od onesnaževalcev okolja, predvsem tal, so težke kovine (TK). A tudi na takih tleh rastejo rastline, ki so tolerantne na TK. Razvile so fiziološke mehanizme, ki temeljijo na izključevanju ali aktivnem privzemu kovin v tkiva korenin in poganjkov (Baker, 1981). Ko je rastlina sposobna privzeti določene snovi v svoja tkiva v višjih koncentracijah, kot se pojavljajo v tleh, spada med hiperakumulatorje. Take rastline so zanimive predvsem zaradi možnosti uporabe v fitoremediaciji – uporabi hiperakumulacijskih rastlin za čiščenje onesnaženih tal ali voda (Zhao s sod., 2003). Koncept uporabe hiperakumulacijskih rastlin, ki s privzemanjem TK iz tal le-ta očistijo, je prvi omenil Chaney (1983).

Vrste iz rodu *Thlaspi*, ki se je pred kratkim preimenoval v rod *Noccaea* (Koch in German, 2013), uspevajo tudi v Sloveniji, med njimi *Noccaea caerulescens*, modrikasti mošnjak, ki je znana hiperakumulacijska vrsta (Reeves in Brooks, 1983a, Baker s sod., 1994b), in *N. praecox*, rani mošnjak, ki je prav tako dokazano hiperakumulacijska vrsta (Reeves in Brooks, 1983a; Vogel-Mikuš s sod., 2005). Šele v zgodnjih 90-tih letih prejšnjega stoletja so raziskovalci izvedli poskuse o potencialu fitoremediacije pri *N. caerulescens* (Baker s sod. 1994a). Medtem ko so prvi poskusi pokazali, da obstajajo dobre možnosti za dejansko uporabo *N. caerulescens* v fitoremediaciji, pa je Ernst (2000) podvomil v učinkovitost metode zaradi premajhne biomase te rastlinske vrste.

V tem diplomskem delu smo primerjali koncentracije kadmija (Cd), cinka (Zn) in svinca (Pb) pri različnih populacijah ranega mošnjaka (*N. praecox*) in edini populaciji modrikastega mošnjaka (*N. caerulescens*) v Sloveniji, nabranih v naravnem okolju. Opravili smo tudi analize tal in izračunali stopnjo transporta kovin iz korenin v poganjke in bioakumulacijski faktor, ki je razmerje med koncentracijo kovine v poganjkih rastline in tleh. Določili in primerjali smo tudi stopnjo arbuskularne mikorize.

1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE

V diplomski nalogi smo si zastavili sledeče cilje:

- vzorčiti rastline in rizosferno prst različnih populacij ranega mošnjaka in populacijo modrikastega mošnjaka na različnih lokacijah v Sloveniji. Lokacije se med seboj razlikujejo po stopnji onesnaženosti. Onesnaženo rastišče predstavljata populaciji iz Mežice in Žerjava. Rastišče v Lozicah je tik pod hitro cesto Ajdovščina – Razdrto, rastišče v Črnivcu je blizu nekdanje hitre ceste Tržič – Jesenice, ostala rastišča pa so, čeprav v bližini cest, bolj ali manj odmaknjena od glavnih prometnih poti. *Noccaea caerulescens* uspeva samo na eni lokaciji v Sloveniji in sicer v Lokovcu nad Čepovanom.

- določiti in primerjati koncentracije Cd, Zn in Pb v koreninah, listih in cvetnih poganjkih rastlin.
- določiti in primerjati koncentracije Cd, Zn in Pb v izmenljivi frakciji tal.
- določiti in primerjati stopnjo mikorizne kolonizacije rastlin.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Vse populacije ranega mošnjaka in populacija modrikastega mošnjaka bodo aktivno privzemale Zn in Cd ter izključevale Pb.
- Vse preiskovane populacije bodo tvorile arbuskularno mikorizo, vendar bo stopnja mikorizacije manjša na zelo onesnaženih področjih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ROD *Noccaea* IZ DRUŽINE *Brassicaceae*

Rod *Noccaea*, prej *Thlaspi*, (mošnjak) spada v družino *Brassicaceae* (križnice). Precej vrst iz rodu *Noccaea* raste tudi na območjih, ki so onesnažena z Zn, Pb, Cd, Ni, Cr ali Co (Reeves and Brooks 1983a).

Iz rodu *Noccaea* poznamo kar nekaj hiperakumulacijskih vrst. Najbolj raziskana vrsta je modrikasti mošnjak (*Noccaea caerulescens*), ki hiperakumulira Zn, Cd in Ni (Assaunção, 2003a). *N. praecox* hiperakumulira Zn (Reeves and Brooks 1983a) in Cd (Vogel-Mikuš, 2005). *N. rotundifolium ssp cepaeifolium* hiperakumulira Pb (Wenzel in Jockwer, 1999). *N. goesingense* hiperakumulira Ni in Zn (Wenzel in Jockwer, 1999).

V Mali flori Slovenije, ključu za določanje praprotnic in semenk, je zabeleženih 7 vrst tega rodu, ki rastejo v Sloveniji. Med njimi je tudi *Noccaea praecox*, rani mošnjak, za katerega je navedeno, da raste po suhih travnikih od nižine do subalpskega pasu po vsej Sloveniji. Je trajnica, ima značilno listno rozeto in navadno več nerazvejanih cvetnih poganjkov. Cveti od marca do junija. Venec je bel, čaša lahko rdečkasto nadahnjena, luščki razločno krilati (Martinčič s sod., 2007) (Slika 1).



Slika 1: Rani mošnjak (*N. praecox*) (foto: K.Vogel-Mikuš).

Noccaea caerulescens je vrsta, ki je značilna predvsem za Zahodno Evropo, a raste tudi v Sloveniji na samo enem znanem rastišču v vasi Lokovec nad Čepovanom. Od ranega mošnjaka se razlikuje po razpotegnjenih socvetjih, rahlo rožnato navdahnjenih cvetnih lističih in rdečkastih luščkih (Slika 2).



Slika 2: Modrikasti mošnjak (*N. caerulescens*) (foto: K.Vogel-Mikuš).

2.2 TEŽKE KOVINE KOT ONESNAŽEVALCI TAL

Poljudno se izraz težke kovine uporablja precej splošno, stroga definicija pa pravi, da je TK element s specifično težo nad 5 g cm^{-3} , ki hkrati lahko tvori sulfide (Adriano, 1986).

Rastline za normalen razvoj potrebujejo makroelemente in mikroelemente. Nekateri mikroelementi so tudi TK, to so npr. Fe, Cu, Zn, Mn in Ni, biološka vloga ostalih TK pa ni znana (Leyval s sod. 1997). V visokih koncentracijah so TK za rastline močan stresni dejavnik in lahko popolnoma zavrejo rast rastlin (Baker, 1987). TK, ki se nahajajo v tleh, so rastlinam manj ali bolj dostopne. Kovinski ioni so lahko raztopljeni v talni raztopini ali so vezani na adsorpcijska mesta talnih delcev. V taki obliki so lahko dostopni rastlinam. Če pa so vezani na mineralne komponente tal, fulvične kisline ali druge humusne komplekse oz. vključeni v biomaso talnih organizmov, pa so za rastlino težko ali celo nedostopni in tako manj nevarni (Adriano, 1986).

Ioni kovin po vstopu v rastlinska tkiva reagirajo z različnimi spojinami rastlinskih celic in tako porušijo celično homeostazo. Posledica sta upočasnjena rast in razvoj rastline. Stopnja poškodovanosti je odvisna od občutljivosti rastline, stopnje privzema in razporeditve TK v različna tkiva, celice in celične organele. Privzem kovin je povečan ob nizkem pH tal, ob nizki vsebnosti organskih snovi in nizki vsebnosti fosfatov (Bergmann, 1992).

2.2.1 Kadmij

Kadmij se v okolje sprošča naravno, z mineralizacijo matične kamnine, in pod vplivom človeka, kot posledica prometa, delovanja elektrarn in kovinske industrije, cementarn in z umetnimi gnojili (Sanita di Toppi in Gabrielli, 1999). Za rastline je v povečanih koncentracijah strupen. Povečane koncentracije Cd so kancerogene, mutagene in teratogene tudi za živali in ljudi (Degraeve, 1981).

Višje rastline Cd privzemajo v odvisnosti od koncentracij Cd v tleh in njegove biodosegljivosti, ki je odvisna od prisotnosti organskih snovi, pH, redox potenciala, temperature in koncentracije drugih elementov. Zdi se, da privzem Cd ionov poteka preko istih mehanizmov kot privzem mineralnih hranil, kot so npr. K, Ca, Mg in Zn (Sanita di Toppi in Gabrielli, 1999).

Cd vpliva na sintezo RNA, zmanjša absorpcijo nitrata in prenos nitrata iz korenin v poganjke, negativno vpliva na fotosintezo, saj lahko zamenjuje Mg ion v klorofilni molekuli. Navzven se simptomi strupenosti kažejo kot zvijanje listov in kloroze ter zmanjšana rast tako koreninskega sistema kot poganjkov (Sanita di Toppi in Gabrielli, 1999).

V Sloveniji je mejna vrednost koncentracij Cd v tleh 1 mg kg^{-1} , opozorilna vrednost 2 mg kg^{-1} in kritična vrednost 12 mg kg^{-1} (Ur.I.RS, 68/96).

2.2.2 Cink

Zn je v tleh prisoten zaradi naravnih procesov, v večji meri pa zaradi delovanja človeka. Spiranje iz matične kamnine, vulkanski izbruhi, gozdni požari, razkroj organske snovi so naravni procesi, antropogeni pa rudarska in kovinska industrija, izgorevanje fosilnih goriv, gnojila, odplake čistilnih naprav in drugo (Broadley s sod., 2007).

Zn je esencialno mikrohranilo, vendar je v povečanih koncentracijah strupen. V celicah je pomemben kofaktor za več encimov, pri celičnem razmnoževanju, fotosintezi, sintezi avksinov (Rout in Das, 2003).

Pomanjkanje Zn vodi v zmanjšano sintezo proteinov. Znaki pomanjkanja so medžilne kloroze in krajši internodiji. Simptomi prekomernih koncentracij Zn pa so izguba turgorja, nekroze na starejših listih ali zmanjšana rast (Hagemeyer, 1999).

V Sloveniji je mejna vrednost koncentracij Zn v tleh 200 mg kg^{-1} , opozorilna vrednost 300 mg kg^{-1} in kritična vrednost 720 mg kg^{-1} (Ur.I.RS, 68/96).

2.2.3 Svinec

Svinec je znan kot najpogostejša TK, ki se pojavlja kot onesnažilo v okolju (Watanabe, 1997). Koncentracija svinca v tleh je precej narasla kot posledica industrializacije in urbanega življenja (Singh s sod., 1997). Razpolovna doba svinca je 150 – 5000 let, ena od najdaljših razpolovnih dob med kovinami, zato so onesnaženja s svincem dolgotrajna (Kumar s sod., 1995).

Svinec se v tleh pojavlja v obliki topnih in netopnih soli. Največkrat se veže na organske delce v tleh (Kumar s sod., 1995; Singh s sod., 1997), kar zmanjšuje njegovo mobilnost in tako je manj dostopen rastlinam (Salim s sod., 1993; Kumar s sod., 1995; Cooper s sod., 1999).

Svinec je strupen za veliko metabolnih procesov, ki so nujni za rast in razvoj rastlin, kot so fotosinteza, transpiracija, sinteza DNK in mitoza (Wierzbicka, 1999). Med temi procesi je fotosinteza najbolj občutljiva na zastrupitev s svincem (Singh s sod., 1997).

V Sloveniji je mejna vrednost koncentracij Pb v tleh 85 mg kg^{-1} , opozorilna vrednost 100 mg kg^{-1} in kritična vrednost 530 mg kg^{-1} (Ur.l.RS, 68/96).

2.3 STRATEGIJE PREŽIVETJA RASTLIN NA ONESNAŽENIH TLEH

Na onesnaženih območjih so se rastline prilagodile na strupenost TK tako, da so razvile dve osnovni strategiji: akumulacijo in izključevanje kovin (Baker, 1981). Rastline, ki so izključevalci, kopičijo večino težkih kovin v koreninah in le malo kovine se translocira v poganjke. Zato sta translokacijski faktor ali TF (razmerje med koncentracijo kovine v poganjkih in koreninah) in bioakumulacijski faktor ali BAF (razmerje med koncentracijo v poganjkih in tleh) navadno <1 . Rastline, ki so razvile strategijo akumulacije oz. hiperakumulacije, pa kopičijo večino kovine v poganjkih, zato so vrednosti TF in BAF navadno >1 (Baker, 1981).

Izključevalci delujejo na dva načina. Privzem TK v korenine lahko omejujejo s tvorjenjem sluzi, z odpadanjem celic s koreninske čepice (Llugany s sod., 2003), lahko pride do inducirane celične smrti celic koreninskega epidermisa in tvorbe zaščitnih mejnih plasti, ki ščitijo meristem in elongacijske cone korenin (Delisle s sod., 2001). Lahko pa ne omejujejo privzema TK v koreninski sistem, temveč transport TK v nadzemne dele rastlin, pri čemer kovine navadno kopičijo v vakuolah celic koreninske skorje (Lasat s sod., 1998). Seveda ti mehanizmi zdržijo le do neke kritične koncentracije TK v tleh, ob prekoračeni koncentraciji pa se mehanizmi porušijo in sledi neomejen transport TK tudi v poganjke (Baker, 1981).

Akumulacijske rastline pa TK privzemajo ne glede na koncentracije TK v tleh. Privzete kovine nalagajo v ksilem in jih transportirajo v nadzemne dele, kjer se kovine kopičijo

(Baker, 1981; Shen s sod., 1997). Mehanizmi transporta TK so specifični za posamezne kovine in za določene populacije rastlin (Assunção s sod., 2003b).

Toleranca je dedna lastnost rastline, ki ji omogoča preživetje na tleh, onesnaženih s TK (Macnair in Baker, 1994). Rastline že imajo mehanizme, ki so del celične homeostaze, ki so s prilagoditvami postali tudi mehanizmi tolerance na TK in tako zmanjšali stres za rastlino. Rastline se tako raje izogibajo kopičenju visokih koncentracij TK v občutljivih delih celice, kot pa da bi sintetizirale proteine, ki bi stres zaradi TK omilili (Hall, 2002).

Najzanimivejša strategija pa je hiperakumulacija.

2.3.1 Hiperakumulacija

Brooks (1977) je prvi uporabil izraz hiperakumulacijska rastlina za vrste, ki so bile sposobne akumulirati več kot $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ Ni v njihovem naravnem okolju (Brooks s sod., 1977).

Da je rastlina označena kot hiperakumulacijska, mora akumulirati $>10000 \mu\text{g g}^{-1}$ Zn in Mn, $>1000 \mu\text{g g}^{-1}$ Pb, Ni in Cu ter $>100 \mu\text{g g}^{-1}$ Cd (Brooks, 2000), pomemben je uspešen prenos TK iz korenin v poganjke in toleranca na TK (McGrath s sod., 2002; Pollard s sod., 2002).

Koncentracije TK v hiperakumulatorjih so 100 – 1000x višje kot pri rastlinah, ki rastejo na neonesnaženih tleh in 10 – 100x višje kot pri rastlinah, ki rastejo na onesnaženih tleh (MacGrath s sod., 2002). Učinkovit transport večjih koncentracij TK iz korenin v nadzemne dele rastline je en od glavnih znakov hiperakumulatorja (MacGrath s sod., 2002).

Hiperakumulacija je redek pojav, značilen le za okrog 400 rastlinskih vrst, kar predstavlja le 0,2% vseh rastlinskih vrst (Brooks, 2000).

Pogostejše so rastline, ki hiperakumulirajo le eno kovino, nekatere rastline pa hiperakumulirajo dve ali tri in take so mnogo bolj zanimive v raziskavah o fitoremediaciji, saj so v naravi tla le redko onesnažena le z eno težko kovino (McGrath, 1998).

Ekološki pomen hiperakumulacije še ni znan, vendar je Chaney (1997) mnenja, da naj bi povečane koncentracije težkih kovin v listih in poganjkih služile kot obrambni mehanizem proti okužbam z glivami ali objedanjem žuželk (Chaney s sod., 1997). Boyd (2000) je predstavil šest hipotez o pozitivnih posledicah hiperakumulacije na samo rastlino: a) hipoteza nenamerega privzema pravi, da je hiperakumulacija posledica pospešenega privzema ionov iz tal; b) tolerančna hipoteza pravi, da se kovine kopičijo v neaktivnih delih rastline; c) odlagalna hipoteza trdi, da se kovine kopičijo v delih rastline, ki jih ta nato odvrže; č) hipoteza odpornosti na sušo, ker višje koncentracije Ni omogočajo lažje preživetje rastline v sušnih razmerah; d) hipoteza interference trdi, da se ob propadu hiperakumulacijske rastline v tla sprostijo nakopičene kovine in tako okolje postane neugodno za druge rastlinske vrste, kar

daje hiperakumulacijski vrsti kompetitivno prednost; in e) obrambna hipoteza, ki trdi, da kopičenje kovin v tkivih veča obrambno sposobnost proti herbivorom in patogenom (Boyd, 2000).

Za hiperakumulacijske rastline je značilen kratek življenjski cikel, sposobnost samoopraševanja (Baker in Proctor, 1990), manjša količina semen in lokalno omejeno širjenje semen (Koch s sod., 1998). Predvsem samoopraševanje dodatno povečuje razlike med populacijami (Jain, 1976).

Hiperakumulatorji so razvili posebne mehanizme, s katerimi zmanjšajo vpliv TK na rastlinska tkiva. Glavni mehanizmi so sekvestracija TK v celični vakuoli, vezava TK na celično steno in nastanek kompleksov z nizko molekularnimi ligandi (Leitenmaier in Küpper, 2011, Zenk, 1996).

N. caerulea hiperakumulira Zn, Cd (Baker s sod., 1994b) in Ni (Reeves in Brooks, 1983a), *N. praecox* pa Zn (Reeves in Brooks, 1983a) in Cd (Vogel-Mikuš s sod., 2005).

2.4 ARBUSKULARNA MIKORIZA

Arbuskularna mikoriza (v nadaljevanju AM) je simbiotski odnos med rastlino in glivo. Spada med endomikorize, saj hife gliv vstopajo v celice korenin. Izraz AM je delno grškega, delno latinskega izvora. Latinska beseda »arbusculum« pomeni majhno drevo ali grm in se nanaša na drevesu podobne strukture, ki jih gliva tvori v notranjosti celic, »mycos« v grščini pomeni gliva, »rhiza« pa korenine (Parniske, 2008). Predvidoma 70 – 90% kopenskih rastlinskih vrst lahko tvori AM, simbiotske glive pa spadajo v deblo Glomeromycota (Parniske, 2008).

AM je izredno nespecifična, lahko združljiva in dolgotrajna medsebojna odvisnost, pri kateri imata korist oba partnerja. Rastlina glivo oskrbuje z ogljikom, od katerega je ta v celoti odvisna. Prispevek glive k simbiozi pa je precej bolj kompleksen. Jasno je, da gliva pripomore k boljšemu privzemu fosfatov in drugih mineralnih hranil, vpliva tudi na odpornost rastline proti patogenom (Harrison, 1998).

V tleh najdemo AM gliv v različnih oblikah: spore, delce hif ali kolonizirane dele korenin. Vsi ti propaguli so lahko vir inokulacije, večinoma pa je glavni vir izvenkoreninski micelij (Duponnois s sod., 2001). Izločki korenin delujejo spodbujevalno na kalitev spor in rast hif v smeri koreninskega sistema rastline. Hife na površini korenin tvorijo apresorije, preko katerih vstopijo v rastlinske elice. V korteksu se hife razraščajo po apoplastu, v notranjost celic pa tvorijo le različne strukture (Parniske, 2008): (i) arbuskule, drevesasto razvejane strukture, na katerih poteka izmenjava fosfatov med glivo in rastlino, (ii) vezikle, v katerih se shranjujejo lipidi in ogljik (Hodge, 2000), (iii) svitki, ki nastanejo, ko se hifa v celici večkrat zavije. Na svitkih lahko nastanejo tudi arbuskuli (Smith in Read, 1997).

Že leta 1905 je Gallaud opisal dva tipa arbuskularne mikorize. Imenoval ju je po rastlinah, kjer ju je našel; tip Paris in tip Arum. Večina kulturnih rastlin tvori tip Arum, ki sestoji pretežno iz intracelularnih hif in arbuskulov, tip Paris pa je pogost pri gozdnih vrstah rastlin in sestoji pretežno iz intracelularnih hif ter svitkov (Dickson, 2004).

Prednosti AM so očitne v okoljih, kjer so koncentracije mineralnih hranil v tleh nizke, v tleh, bogatih s hranili pa kolonizacija AM gliv v koreninah rastlin upade (Parniske, 2008).

Rod *Noccaea* spada v družino križnic (Brassicaceae), ki v splošnem velja za nemikorizno, saj imajo rastline izredno fin koreninski sistem in s tem veliko površino, s katero uspešno črpajo mineralne snovi iz tal. AM kolonizacija je bila pri prvič potrjena pri *N. praecox*, ki je bil vzorčen na s Pb, Zn in Cd onesnaženem območju v Žejavu (Regvar s sod., 2003). Kasneje je bila AM potrjena tudi pri populaciji iz neonesnaženega območja na Zaplani (Vogel-Mikuš s sod., 2005). Kasnejše raziskave so pokazale, da so rastline ranega mošnjaka mikorizne večinoma le v obdobju cvetenja, medtem ko so v vegetativni fazi razvoja večinoma nekolonizirane (Pongrac s sod., 2008). AM kolonizacija je povezana s profilom glukozinolatov, to je sekundarnih metabolitov, ki jih sintetizirajo križnice in so bogati z žveplom, saj se v fazi cvetenja sintetizirajo taki, ki spodbujajo simbiozo med obema partnerjema, v vegetativni fazi razvoja, pa je nabor glukozinolatov tak, da zavira AM kolonizacijo (Pongrac s sod., 2008).

2.4.1 Vpliv težkih kovin na arbuskularno mikorizo

Tako AM kot AM glive se pojavljajo v vseh habitatih, tudi v tistih, onesnaženih s TK. Onesnaženost vpliva na diverzitetu in koncentracijo AM gliv v tleh. Preživetje teh gliv je odvisno od genetskih in fizioloških prilagoditev samih gliv, okolje pa vpliva na metabolizem in rast glive (Vodnik, 1998). TK lahko upočasnijo, zmanjšajo ali popolnoma ustavijo kalitev spor AM gliv in kolonizacijo rastlin tudi v koncentracijah, ki za rastline še niso strupene (Del Val s sod., 1999).

V tleh, onesnaženih s TK, lahko mikorizne glive vplivajo na privzem in transport TK, tako da nadzorujejo prehajanje TK preko membrane ali jih kopičijo v miceliju, kar je tudi oblika obrambe, ki rastlini poveča odpornost na TK (Vodnik, 1998).

Mikoriza predstavlja prednost pri nižjih koncentracijah TK, saj z vplivom na privzem rastlino zaščiti, ob visokih koncentracijah pa se v primerjavi z nemikoriznimi rastlinami ta prednost izgubi (Galli in sod., 1994).

Pri ranem mošnjaku so bile rastline vzorčene na neonesnaženem rastišči v Zaplani bolj mikorizirane od tistih vzorčenih v Žerjavu (Vogel-Mikuš s sod., 2005), kar kaže na to, da onesnaženost negativno vpliva na stopnjo kolonizacije z AM.

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 VZORČENJE

Vzorke smo nabrali spomladi 2006 na različnih lokacijah, ki so med seboj oddaljene dovolj, da smo vzorce lahko obravnavali kot ločene populacije. En vzorec je predstavljala ena rastlina, ki smo jo izkopal z lopatko tako, da smo zajeli tudi prst okrog korenin. Na vsaki lokaciji smo pobrali po 5 vzorcev, ki so rastle blizu skupaj. Vzorce smo označili, da ni prišlo do zamenjav. Vzorce smo do nadaljnje obdelave shranili v odprtih plastičnih vrečkah z jasnimi oznakami.

Ker se je v času vzorčenja rod *Noccaea* še imenoval *Thlaspi*, smo vzorce *N. praecox* z lokacije Lokovec označili z »Lokovec«, vzorce *N. caerulescens* pa z »Lokovec-T.c.«. Ti oznaki sta uporabljeni tudi v tem diplomskem delu.

3.1.1 Mesta vzorčenja

Lokacije vzorcev smo poznali vnaprej, saj smo se opirali na nahajališča *N. praecox*, ki jih je v diplomski nalogi opisala Irgel (2003). Te lokacije so bile Mežica, Zaplana, Črnivec, Lozice, Komen in Lokovec. Poleg teh lokacij smo izbrali še eno dodatno na Zaplani, v Žerjavu in v Štanjelu. Značilnosti vzorčnih mest so v preglednici 1.

Preglednica 1: Vzorčna mesta in njihove značilnosti.

Nahajališče	Geografske koordinate	Datum Vzorčenja	Faza razvoja	Opis nahajališča	Nabral in določil	Vrsta
Mežica	46°30'27"N 14°52'07"E	17.5.2006	cvetenje	Travnik ob reki Meži	Vogel Mikuš	<i>N. praecox</i>
Žerjav	45°28'37"N 14°52'02"E	17.5.2006	cvetenje	Travnik, P3 (Vogel-Mikuš s sod. 2005)	Vogel Mikuš	<i>N. praecox</i>
Zaplana 1	45°58'25"N 14°14'25"E	3.5.2006	cvetenje	Travnik ob cesti	Vogel Mikuš	<i>N. praecox</i>
Zaplana 2	45°57'08"N 14°13'50"E	3.5.2006	cvetenje	Travnik ob cesti	Vogel Mikuš	<i>N. praecox</i>
Črnivec	46°20'02"N 14°13'25"E	7.5.2006	cvetenje semenenje	Rob travnika, blizu ceste	Baloh	<i>N. praecox</i>
Lozice	45°46'45"N 14°13'25"E	11.5.2006	cvetenje	Opuščen travnik, tik pod glavno cesto Razdrto - Ajdovščina	Baloh, Vogel Mikuš	<i>N. praecox</i>
Komen	45°48'51"N 13°44'11"E	11.5.2006	cvetenje, semenenje	Rob travnika, tik ob cest, peščena tla	Baloh, Vogel Mikuš	<i>N. praecox</i>
Štanjel	45°49'10"N 13°50'47"E	11.5.2006	cvetenje, semenenje	Rob travnika, ob cesti, peščena tla	Baloh, Vogel Mikuš	<i>N. praecox</i>
Lokovec	46°03'68"N 13°46'93"E	11.5.2006	cvetenje	Rob pašnika, peščena tla	Baloh, Vogel Mikuš	<i>N. praecox</i>
Lokovec-T.c.	46°03'68"N 13°46'93"E	11.5.2006	cvetenje	Stma brežina ob cesti, porasla z mahom,	Baloh, Vogel Mikuš	<i>N. caerulescens</i>

3.2 PRIPRAVA STEKLOVINE IN VZORCEV ZA ANALIZE

Vso steklovino, ki smo jo potrebovali za pripravo vzorcev in analize, smo po predhodnem pomivanju sprali najprej z 0,2% raztopino HNO₃, ki smo jo pripravili iz 1 litra bidestilirane vode (Milipore Q-185, 18,2 MΩ/cm), v katero smo odpipetirali 3,1ml 65% raztopine HNO₃ (Merck). Nato smo jo sprali še z bidestilirano vodo. Steklovino smo sušili 30 minut pri 105°C.

Vzorci smo v laboratoriju pripravili za shranjevanje. Najprej smo odstranili prst od korenin, jo presejali skozi 0,5 cm sito, da smo ločili pesek od prsti, in jo shranili v označene vrečke ter jo v sušilniku sušili na 60°C več ur do konstantne mase. Tako pripravljeno prst smo shranili za nadaljnjo pripravo na analize. Prst smo dodatno osušili, nato smo je presejali skozi 2 mm sito. Določeni vzorci so vsebovali zelo malo prsti, *N. praecox* namreč dobro uspeva tudi v bolj peščenih tleh, *N. caerulescens* pa je rasel v tleh, na debelo poraslih z mahom. Zato smo za analizo koncentracij rastlinam dostopnih kovin uporabili prst vseh posameznih vzorcev, za vse nadaljnje analize pa smo prst združili v 2 vzorca na posamezno lokacijo.

Posamezne rastline smo očistili najprej s tekočo, potem pa še z destilirano vodo. Vsako rastlino smo razdelili na tri dele: korenine, rozeto in cvetove s cvetnimi stebli. Pri koreninah smo del tanjših koreninic namenili oceni stopnje mikorizne kolonizacije. Primerno razvrščen in označen rastlinski material smo zavili v alufolijo in sušili v sušilniku pri 60°C do konstantne mase.

3.3 ANALIZE RASTLINSKEGA MATERIALA

3.3.1 Koncentracije Zn, Cd in Pb v rastlinah

Sprva smo posušen rastlinski material zmelili v fin prah. Za to smo uporabili terilnico s pestilom in tekoči dušik. Med trenjem različnih vzorcev smo terilnico in pestilo dobro očistili z 0,2% raztopino HNO₃ in bidestilirano vodo. Nato smo v steklene epruvete natehtali po 30 mg finega prahu rozet in cvetov ter po 10 mg finega prahu korenin. V vsako epruveto smo dolili 3,5 mL mešanice 65% HNO₃ in koncentrirane HClO₄ v razmerju 1:7 (Vogel-Mikuš, 2005). Epruvete, pokrite z alufolijo, smo pustili 24 ur, nato smo naredili razklop: epruvete, nameščene v termobloku z grelcem, smo segrevali na 150°C. HNO₃ se je uparila, se na vrhu epruвет kondenzirala in ponovno stekla nazaj v vzorec. Tako smo dosegli počasno izparevanje HNO₃, ki je trajalo 1 dan. Naslednji dan smo povečali temperaturo, odparili vso HNO₃, nato pa ob še višji temperaturi še HClO₄. Suhe vzorce smo shranili kar v epruветah v temnem prostoru.

Dan pred meritvijo na atomskem absorpcijskem spektrofotometru (AAS) smo vzorce zalili z 10 mL 0,2% HNO₃, jih pretresli na vorteksu, zatesnili in shranili v hladilniku. Na AAS smo merili vzorce, ogrete na sobno temperaturo in jih po potrebi ustrezno redčili z 0,2% HNO₃.

3.3.2 Ocena stopnje mikorizne kolonizacije

Kot že omenjeno, smo dobro opranim koreninam rastlinskih vzorcev odvzeli del koreninskih laskov in tankih koreninic za oceno stopnje mikorizne kolonizacije. Najprej smo koreninice presvetlili, tako da smo v posamezne označene epruvete nalili 10% KOH in dodali koreninice. Epruvete smo segrevali na 90°C 15 minut. Nato smo koreninice večkrat temeljito sprali s tekočo in na koncu še z bidestilirano vodo. Nato je sledilo barvanje z barvilom tripan modro, (pripravljeno iz 40 g destilirane vode, 40 g mlečne kisline, 80 g glicerina in 0,08 g Trypan blue (Merck)). V epruvete smo dolili 0,05% barvilo tripan modro, tako da so bile vse koreninice prekrivane z barvilom. Epruvete smo nato sušili 20 minut na 90°C. Po končanem sušenju smo koreninice ponovno večkrat sprali s tekočo vodo in na koncu še z bidestilirano vodo.

Obarvane koreninice smo razrezali na 1 cm dolge fragmente. Na objektno stekelce smo zložili po 30 fragmentov za vsak vzorec in jih pokrili s krovnim stekelcem. Tako pripravljene preparate smo pregledali s svetlobnim mikroskopom (Axioskop, Opton Feintechnik GmbH). Stopnjo mikorizne kolonizacije smo določili pri vsakem fragmentu posebej po 6-stopenjski lestvici.

Izračunali smo vrednosti treh AM parametrov po naslednjih formulah (Trouvelot, 1986):

1.) Mikorizna frekvenca F%

$$F\% = \frac{\text{št. mikoriznih korenin}}{\text{št. vseh korenin}} \times 100 \quad \dots(1)$$

2.) Splošna intenziteta mikorize M%, pri čemer so n1, n2, n3, n4 in n5 št. fragmentov z gostoto mikorizne kolonizacije v posameznih razredih

$$M\% = \frac{95n5 + 70n4 + 30n3 + 5n2 + n1}{\text{št. vseh korenin}} \quad \dots(2)$$

3.) Gostota posameznih struktur (arbuskuli – A%, vezikli – V%, svitki – S% in temno septirani endofiti – D%) v koreninah, pri čemer je a (oz. v, s in d) gostota arbuskulov (oz. veziklov, svitkov in temno septiranih endofitov)

$$A\% = a \times \frac{M\%}{100} \quad \dots(3)$$

V vzorcih smo opazili samo arbuskule, zato gostote ostalih struktur nismo predstavljali.

3.4 ANALIZE VZORCEV TAL

3.4.1 Koncentracije rastlinam dostopnih kovin

V steklene čaše smo zatehtali po 1 g prsti. Dodali smo 20 mL 1M raztopine amonijevega acetata (NH_4Ac), ki smo jo pripravili tako, da smo v 1 L bidestilirane vode raztopili 77,08 g NH_4Ac . Z bidestilirano vodo smo raztopino umerili na pH 7. Čaše smo zatesnili s pomočjo plastične folije in elastik. Nato smo jih stresali na stresalniku 2 uri na 200 obratih/min pri sobni temperaturi. Vzorce smo nato centrifugirali in uporabili le supernatant, ki smo ga s 5 mL brizgalko filtrirali skozi 0,45 μm filter (Milipore) v epruvete. Do meritev smo vzorce hranili v hladilniku. Koncentracije Zn, Cd in Pb smo izmerili z atomskim absorpcijskim spektrometrom (Perkin Elmer Analyst 100).

3.4.2 pH tal

V čaše smo zatehtali po 1 g prsti in dodali po 5 ml bidestilirane vode. Čaše smo zatesnili s plastično folijo in elastikami in jih na stresalniku stresali 2 uri pri 200 obratih/min na sobni temperaturi. pH smo izmerili z umerjenim pH metrom. Ker je veliko vzorcev rastlin rastlo na peščenih tleh in so bile količine presejane prsti majhne, smo za analizo pH in rastlinam dostopnega P vzorce združevali, tako da smo za vsako lokacijo dobili po 2 vzorca.

3.4.3 Koncentracije skupnih kovin

Meritve koncentracij skupnih kovin v tleh smo opravili v Laboratoriju za rentgensko fluorescenčno spektroskopijo, Odseka za fiziko nizkih in srednjih energij Inštituta Jožef Stefan (IJS). Najprej smo vzorce prsti v mlinu z volfram-karbidnim terilcem zmleli v prah, nato smo s hidravlično stiskalnico vzorce stisnili v tableto s površino 4,9 cm^2 . Vsako tabletko smo stehali. Z metodo rentgensko fluorescenčne spektrometrije (XRF) smo izmerili koncentracije skupnih kovin (Nečemer s sod., 2003). Pri tej metodi vzorce vzbujamo s fotoni rentgenske svetlobe, ki jo oddaja vir sevanja (v našem primeru radioizotopski izvor Am-241), ki reagirajo z elektroni atomov v notranjih K in L lupinah, pri čemer pride do ionizacije atomov. Vrzeli, ki so nastale v notranjih K in L lupinah po izbitju elektronov, se nato v procesu relaksacije zapolnijo z elektroni zunanjih lupin. Nastala razlika v energiji se izseva v obliki karakterističnih rentgensko fluorescenčnih žarkov, ki jih zberemo s pomočjo detektorja. Eksperimentalni sistem XRF na IJS je sestavljen iz petih enot:

- Si(Li) detektor (EG&G ORTEC)
- Spektroskopski ojačevalec (M 2024, Canberra)
- Analogno-digitalni pretvornik (M8075, Canberra)

- Večkanalni analizator (S100, Canberra)
- Računalniški program za zbiranje spektra

Za vzbujanje atomov smo uporabili americijev (Am-241) obročasti radioizotopni vir (Isotope Products Laboratories, USA). Energijska ločljivost spektrometra je bila 175 eV pri 5.9 keV. Analizo spektrov smo izvedli z AXIL, kvantitativno analizo pa z QUAES računalniškim programom, ki je bil razvit na IJS.

3.4.4 Koncentracija rastlinam dostopnega fosforja

Za določanje koncentracije rastlinam dostopnega fosforja (P) v tleh smo uporabili molibdatno metodo (ÖNORM, 1993). Najprej smo pripravili potrebne raztopine:

- 1) Pripravili smo založno raztopino za ekstrakcijo tako, da smo 78,6 g kalcijevega laktata ($C_6H_{10}CaO_6 + 5H_2O$) raztopili v vroči vodi, prav tako smo v vroči vodi raztopili 40,3 g kalcijevega acetata ($(CH_3COO)_2Ca + H_2O$) in nato oboje združili. Dodali smo 91,3 mL očetne kisline in dopolnili do volumna 1020 mL z bidestilirano vodo.
- 2) Delovno raztopino za ekstrakcijo smo pripravili tako, da smo 5x redčili založno raztopino za ekstrakcijo. 520 mL založne raztopine za ekstrakcijo smo tako dodali 2080 mL bidestilirane vode.
- 3) Pripravili smo založno raztopino amonijevega heptamolibdata za analizo, tako da smo v 20 mL vroče vode raztopili 0,63 g amonijevega heptamolibdata ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} + 4H_2O$). Raztopino smo delno ohladili in dodali 7 mL H_2SO_4 . Nato smo dodali distilirano vodo do skupnega volumna 45 mL. 0,025 g kalijevega antimon(III)oksitartrata ($K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot 0,5H_2O$) raztopimo v vroči vodi, primešamo prejšnji zmesi in dopolnimo skupni volumen do 50 mL z bidestilirano vodo.
- 4) Da smo dobili delovno raztopino za analizo, smo 10x redčili založno raztopino amonijevega heptamolibdata, tako da smo 50 mL založne raztopine dodali 450 mL bidestilirane vode.
- 5) Pripravili smo raztopino askorbinske kisline tako, da smo 0,273 g askorbinske kisline ($C_6H_8O_6$) raztopili v vodi in dopolnili z bidestilirano vodo do skupnega volumna 62 mL.

Nato smo pripravili vzorce. Najprej smo v čaše odtehtali 1,5 g suhe prsti in ji dodali 100 mL delovne raztopine za ekstrakcijo. Vzorce smo stresali 2 uri na 180 obratih pri sobni temperaturi. Nato smo vzorce filtrirali in prvi del filtrata zavrgli, preostanek pa uporabili za analize na spektrofotometru pri 660 nm. Umeritveno krivuljo smo pridobili z meritvami na spektrofotometru iz standardne raztopine PO_4^{3-} (Merck), ki smo jo ustrezno redčili.

3.5 STATISTIČNE ANALIZE

Zbrane podatke smo ovrednostili s programoma Microsoft Excel 2007 (analiza glavnih komponent) in Statistica 10 (Statsoft) (ANOVA in Duncanov post hoc test).

4 REZULTATI

4.1 ANALIZE TAL

4.1.1 Skupne in izmenljive koncentracije Zn, Cd in Pb v tleh

Z metodo rentgenske fluorescence smo izmerili skupne vrednosti Zn in Pb, vrednosti Cd pa so bile pod mejo detekcije za metodo XRF. Z AAS pa smo izmerili koncentracije izmenljivega Zn, Cd in Pb v rizosfernih tleh. Izmerjene vrednosti skupnega Zn in Pb ter izmenljiva vrednost Cd z lokacij v Mežici in Žerjavu presegajo kritične vrednosti, ki jih določa Zakon o varstvu okolja (Preglednici 2 in 3). Vse izmerjene vrednosti z ostalih lokacij so nižje od kritičnih (Priloga A).

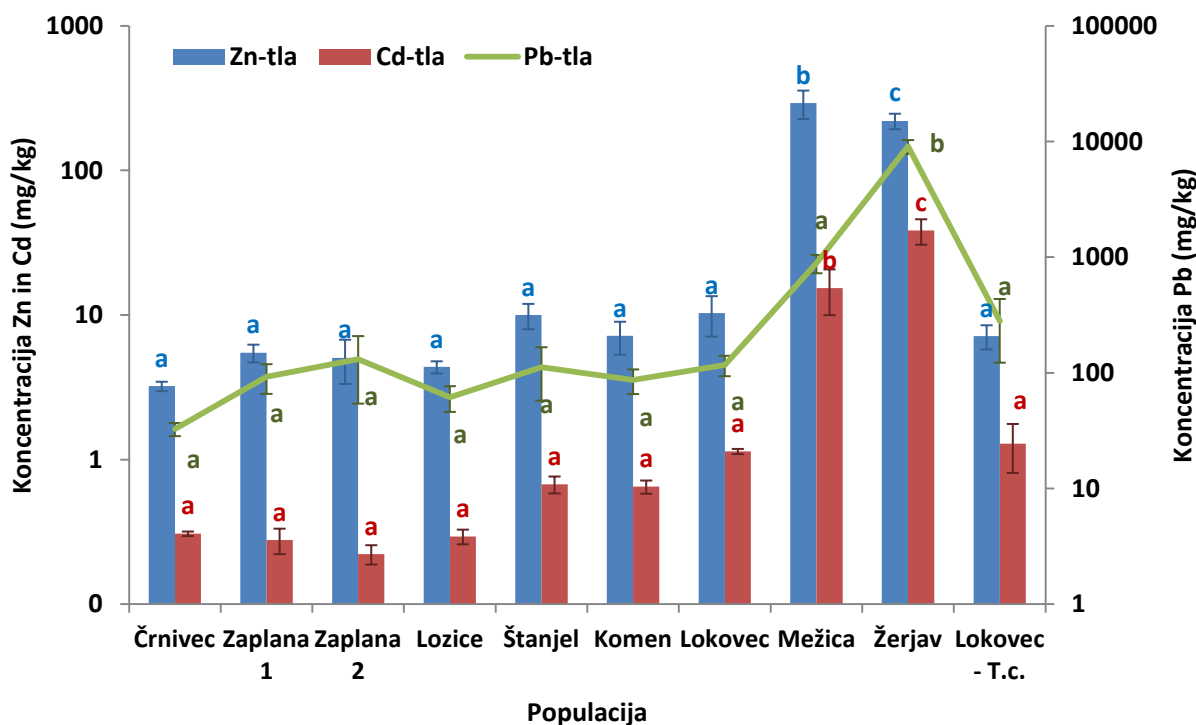
Preglednica 2: Mejne, opozorilne in kritične vrednosti za Zn, Cd in Pb v tleh, povzeta po Uredbi o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh (Ur.l.RS, 68/96).

Nevarna snov	Mejna vrednost (mg kg ⁻¹ SM)	Opozorilna vrednost (mg kg ⁻¹ SM)	Kritična vrednost (mg kg ⁻¹ SM)
kadmij in njegove spojine, izražene kot Cd	1	2	12
svinec in njegove spojine, izražene kot Pb	85	100	530
cink in njegove spojine, izražene kot Zn	200	300	720

Preglednica 3: Skupne koncentracije kovin v rizosfernih tleh vzorcev *N. praecox* in *N. caerulescens* različnih populacij. Podano je povprečje ± standardna napaka, SM – suha masa, n = 5.

SKUPNA KONCENTRACIJA KOVIN V TLEH (mg kg ⁻¹ SM)		
	Zn	Pb
Zaplana 1	103,7 ± 25,3	29,65 ± 4,5
Zaplana 2	152,5 ± 45,5	76,55 ± 26,5
Lozice	226 ± 20	89,45 ± 34,6
Lokovec	331 ± 0	50,7 ± 0
Štanjel	393,5 ± 36,5	118 ± 45
Komen	160 ± 16	49,35 ± 2,5
Črnivec	121,85 ± 24,2	144 ± 16
Mežica	11550 ± 3150	5575 ± 1075
Žerjav	3060,5 ± 2929,5	32405 ± 31095
Lokovec-T.c.	276 ± 26	140 ± 8

Po koncentraciji izmenljivih kovin v tleh lokaciji Mežica in Žerjav odstopata od ostalih, ki smo jih obravnavali kot neonesnažene (Slika 3). Pri vzorcih populacije iz Mežice smo izmerili vrednosti 187 do 547,1 mg kg⁻¹ Zn, 6 do 30,6 mg kg⁻¹ Cd in 574,6 do 1454,5 mg kg⁻¹ Pb, pri vzorcih populacije iz Žerjava pa vrednosti 141,6 do 294,5 mg kg⁻¹ Zn, 18,8 do 56,4 mg kg⁻¹ Cd in kar 6077 do 12010 mg kg⁻¹ Pb (Priloga B).



Slika 3: Koncentracija izmenljivih kovin v rizosfernih tleh vzorcev *N. praecox* in *N. caerulescens* različnih populacij. Podano je povprečje ± standardna napaka, n = 5. Različne črke ob vrednostih izmenljivih kovin označujejo statistično razliko (enosmerna ANOVA, Duncanov test, p < 0,05).

4.1.2 pH tal in rastlinam dostopni fosfor

Pri vzorcih rizosferne zemlje smo izmerili najnižji pH 5,9 pri vzorcu Lokovec-T.c. in najvišji pH 8 pri vzorcu Črnivec. Vrednosti rastlinam dostopnega P so se gibale od 3,93 mg kg⁻¹ pri vzorcu Lozice ter 80,15 mg kg⁻¹ pri vzorcu Lokovec (Preglednica 4).

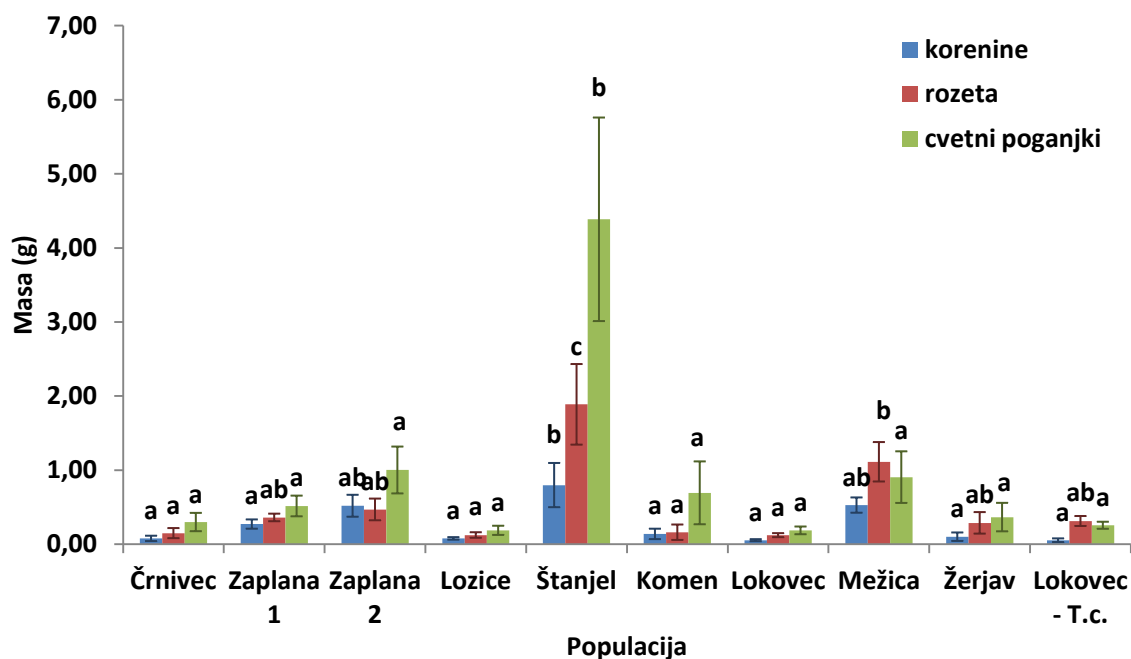
Preglednica 4: pH in dostopni P v rizosferni zemlji vzorcev *N.praecox* in *N.caerulescens* različnih populacij. Podano je povprečje \pm standardna napaka, SM – suha masa, n = 2. Različne črke ob vrednostih pH in rastlinam dostopnega P označujejo statistično razliko (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).

	pH		Rastlinam dostopni P (mg kg ⁻¹ SM)	
Zaplana 1	7,6 \pm 0,02	ef	11,1 \pm 0,17	cd
Zaplana 2	7,9 \pm 0,01	fg	16,8 \pm 0,5	c
Črnivec	8,0 \pm 0,02	g	18,9 \pm 0,2	c
Komen	7,6 \pm 0,01	e	5,0 \pm 0,85	d
Štanjel	6,7 \pm 0,00	c	12,2 \pm 4,18	cd
Lozice	7,7 \pm 0,02	ef	3,93 \pm 3,47	d
Lokovec	6,2 \pm 0,02	b	80,15	a
Žerjav	7,1 \pm 0,01	d	32,4 \pm 1,8	b
Mežica	7,2 \pm 0,02	d	40,2 \pm 0,2	b
Lokovec-T.c.	5,9 \pm 0,00	a	18,0 \pm 2,12	c

4.2 ANALIZE RASTLINSKEGA MATERIALA

4.2.1 Masa rastlinskih vzorcev

Populacije so se med seboj razlikovale tudi po masi rastlinskih vzorcev (Slika 4). Vzorčenje smo na vseh lokacijah opravili v predvidenem času cvetenja, saj nas je zanimala tudi translokacija kovin v cvetne poganjke. Vse populacije so bile v fazi cvetenja, populacije iz Črnivca, Štanjela in Komna pa so že delno semenile. Medtem ko so bili vzorci z večine lokacij majhni, rastline enostavne z eno rozeto in malo cvetnimi poganjki, pa je zelo odstopala populacija iz Štanjela, kjer je iz enega koreninskega sistema poganjalo več rozet s številnimi cvetnimi poganjki. To je razvidno tudi iz Slike 4. Suha masa (SM) korenin te populacije je v povprečju znašala 0,80 g, rozet 1,89 g in cvetnih poganjkov 4,39 g. Najmanjše vzorce smo nabrali na lokaciji Lokovec, SM korenin je znašala 0,05 g, SM rozet 0,12 g in SM cvetnih poganjkov 0,19 g, in lokaciji Lozice, SM korenin je znašala 0,08 g, SM rozet 0,12 g, SM cvetnih poganjkov 0,19 g (Priloga C).



Slika 4: Suha masa (SM) vzorcev *N. praecox* in *N. caerulescens* različnih populacij. Podano je povprečje \pm standardna napaka, $n = 5$. Različne črke ob vrednostih izmenljivih kovin označujejo statistično razliko (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).

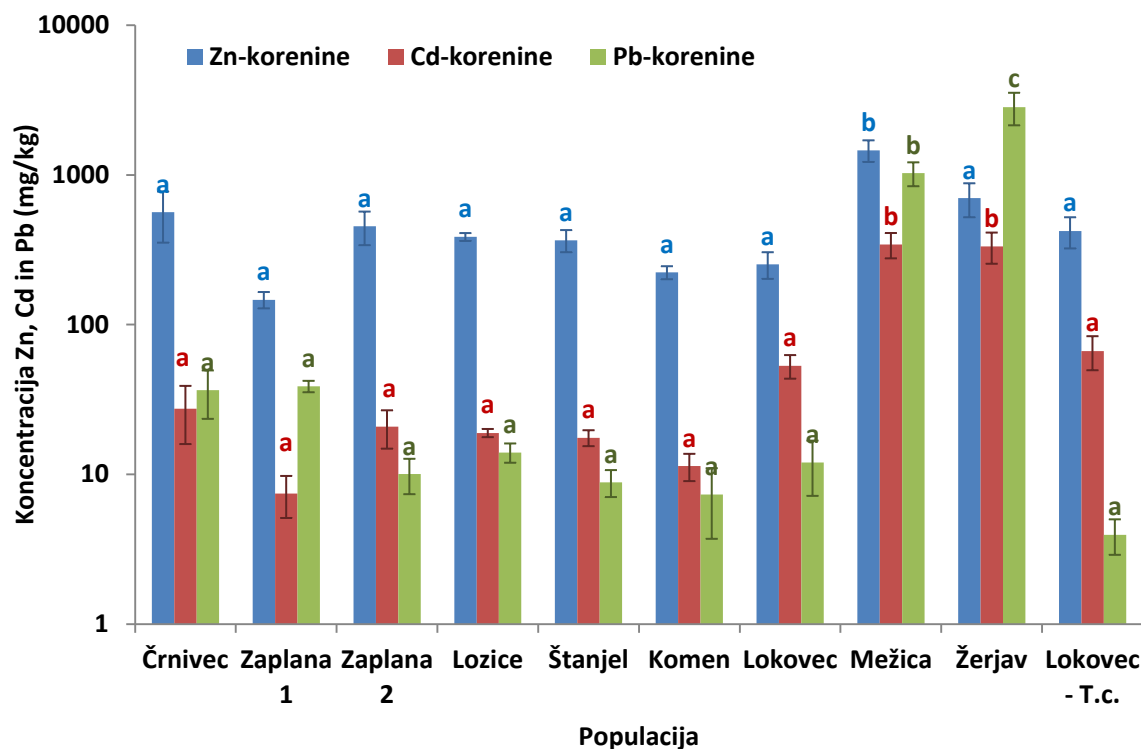
4.2.2 Koncentracije Zn, Cd in Pb v rastlinskih organih

Največje koncentracije Zn v koreninah smo izmerili pri vzorcih populacije v Mežici (od 531 mg kg^{-1} do 1906 mg kg^{-1}), najmanjše pa pri populaciji Zaplana 2 (od $120,7 \text{ mg kg}^{-1}$ do 201 mg kg^{-1}) (Priloga D).

Največje koncentracije Cd v koreninah smo izmerili pri vzorcih populacije v Mežici (od $125,4 \text{ mg kg}^{-1}$ do $491,5 \text{ mg kg}^{-1}$), najmanjše pa pri populaciji Zaplana 2 (od $3,4 \text{ mg kg}^{-1}$ do $12,1 \text{ mg kg}^{-1}$) (Priloga E).

Največje koncentracije Pb v koreninah smo izmerili pri vzorcih populacije v Žerjavu (od 1293 mg kg^{-1} do 4528 mg kg^{-1}), najmanjše pa pri populaciji Lokovec-T.c. (od 2 mg kg^{-1} do $7,6 \text{ mg kg}^{-1}$) (Priloga F).

Populacije z neonesnaženih lokacij so se po koncentracijah Zn, Cd in Pb statistično značilno razlikovale od populacij z onesnaženih lokacij (Slika 5).



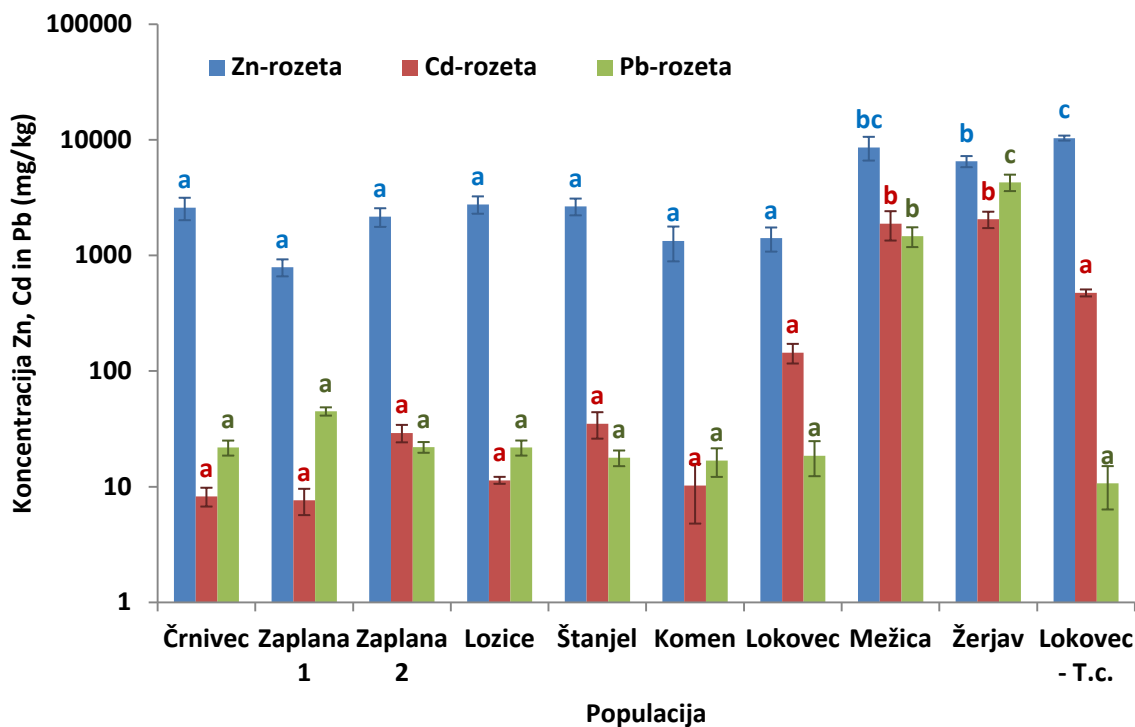
Slika 5: Koncentracije kovin v koreninah vzorcev *N. praecox* in *N. caerulescens* različnih populacij. Podano je povprečje ± standardna napaka, n = 5. Različne črke ob vrednostih izmenljivih kovin označujejo statistično razliko (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).

Največje koncentracije Zn v rozetah smo izmerili pri vzorcih populacije Lokovec-T.c. (*N. caerulescens*, od 8866 mg kg^{-1} do 11480 mg kg^{-1}), najmanjše pa pri populaciji Zaplana 1 (od $419,2 \text{ mg kg}^{-1}$ do 1195 mg kg^{-1}) (Priloga D).

Največje koncentracije Cd v rozetah smo izmerili pri vzorcih populacije v Žerjavu (od 1194 mg kg^{-1} do 2904 mg kg^{-1}), najmanjše pa pri populaciji Zaplana 1 (od $4,7 \text{ mg kg}^{-1}$ do $15,3 \text{ mg kg}^{-1}$) (Priloga E).

Največje koncentracije Pb v rozetah smo izmerili pri vzorcih populacije v Žerjavu (od 2614 mg kg^{-1} do 6255 mg kg^{-1}), najmanjše pa pri populaciji Lokovec-T.c. (od $3,3 \text{ mg kg}^{-1}$ do $27,8 \text{ mg kg}^{-1}$) (Priloga F).

Populacije z neonesnaženih lokacij so se po koncentracijah Zn, Cd in Pb v rozetah statistično značilno razlikovale od populacij z onesnaženih lokacij. Izstopa le vrednost Zn v rozeti vzorcev Lokovec-T.c. pri populaciji *N. caerulescens*, ki je izjemen hiperakumulator Zn (Slika 6).



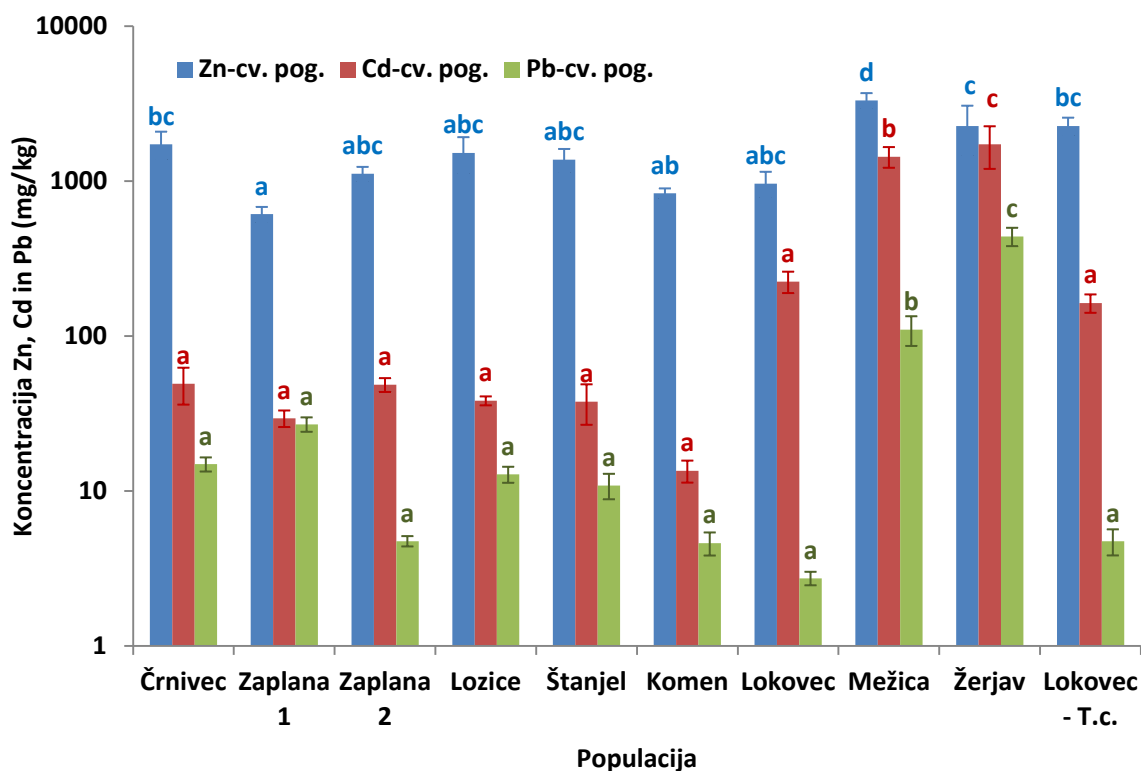
Slika 6: Koncentracije kovin v rozetah vzorcev *N. praecox* in *N. caerulescens* različnih populacij. Podano je povprečje \pm standardna napaka, $n = 5$. Različne črke ob vrednostih izmenljivih kovin označujejo statistično razliko (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).

Največje koncentracije Zn v cvetnih poganjkih smo izmerili pri vzorcih populacije Lokovec-T.c. (*N. caerulescens*, od 1176 mg kg^{-1} do 2845 mg kg^{-1}), najmanjše pa pri populaciji Zaplana 1 (od $398,2 \text{ mg kg}^{-1}$ do $785,4 \text{ mg kg}^{-1}$) (Priloga D).

Največje koncentracije Cd v cvetnih poganjkih smo izmerili pri vzorcih populacije v Žerjavu (od 784 mg kg^{-1} do 3012 mg kg^{-1}), najmanjše pa pri populaciji Komen (od $8,1 \text{ mg kg}^{-1}$ do $21,1 \text{ mg kg}^{-1}$) (Priloga E).

Največje koncentracije Pb v cvetnih poganjkih smo izmerili pri vzorcih populacije v Žerjavu (od $318,8 \text{ mg kg}^{-1}$ do $579,9 \text{ mg kg}^{-1}$), najmanjše pa pri populaciji Lokovec (od $2,2 \text{ mg kg}^{-1}$ do $3,7 \text{ mg kg}^{-1}$) (Priloga F).

Populacije z neonesnaženih lokacij so se po koncentracijah Zn, Cd in Pb v cvetnih poganjkih statistično značilno razlikovale od populacij z onesnaženih lokacij (Slika 7).



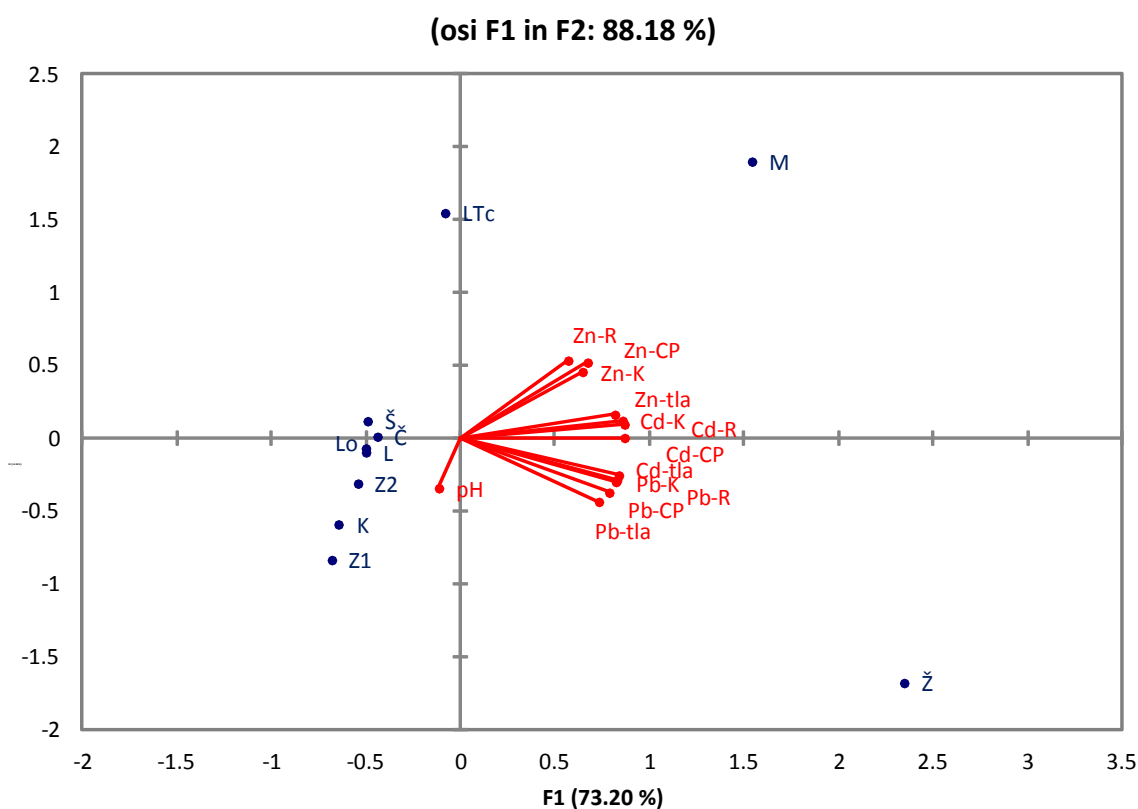
Slika 7: Koncentracije kovin v cvetnih poganjkih vzorcev *N. praecox* in *N. caerulescens* različnih populacij. Podano je povprečje ± standardna napaka. Različne črke ob vrednostih izmenljivih kovin označujejo statistično razliko (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).

4.2.3 Korelacije izmenljivih koncentracij Cd, Zn, Pb in P v tleh in pH tal in koncentracij Cd, Zn in Pb v rastlinskih organih

PCA analiza je pokazala, da koncentracije Cd, Pb in Zn v tleh korelirajo s koncentracijami v rastlinah, saj se populacije vzorčene na onesnaženih področjih grupirajo ločeno od populacij z neonesnaženih področij. Izjema je *N. caerulescens*, ki kopiči velike koncentracije Zn na neonesnaženem področju (Slika 8).

Preglednica 5: Prispevek spremenljivk k funkciji F1 in F2 (%) na sliki 8.

	F1	F2
Zn-tla	9,1	1,8
Cd-tla	9,6	4,3
Pb-tla	7,3	12,7
pH	0,2	7,8
Zn-K	5,7	13,9
Cd-K	10,0	1,0
Pb-K	9,3	5,6
Zn-R	4,4	19,0
Cd-R	10,3	0,6
Pb-R	9,2	6,0
Zn-CP	6,2	18,1
Cd-CP	10,3	0,0
Pb-CP	8,4	9,3



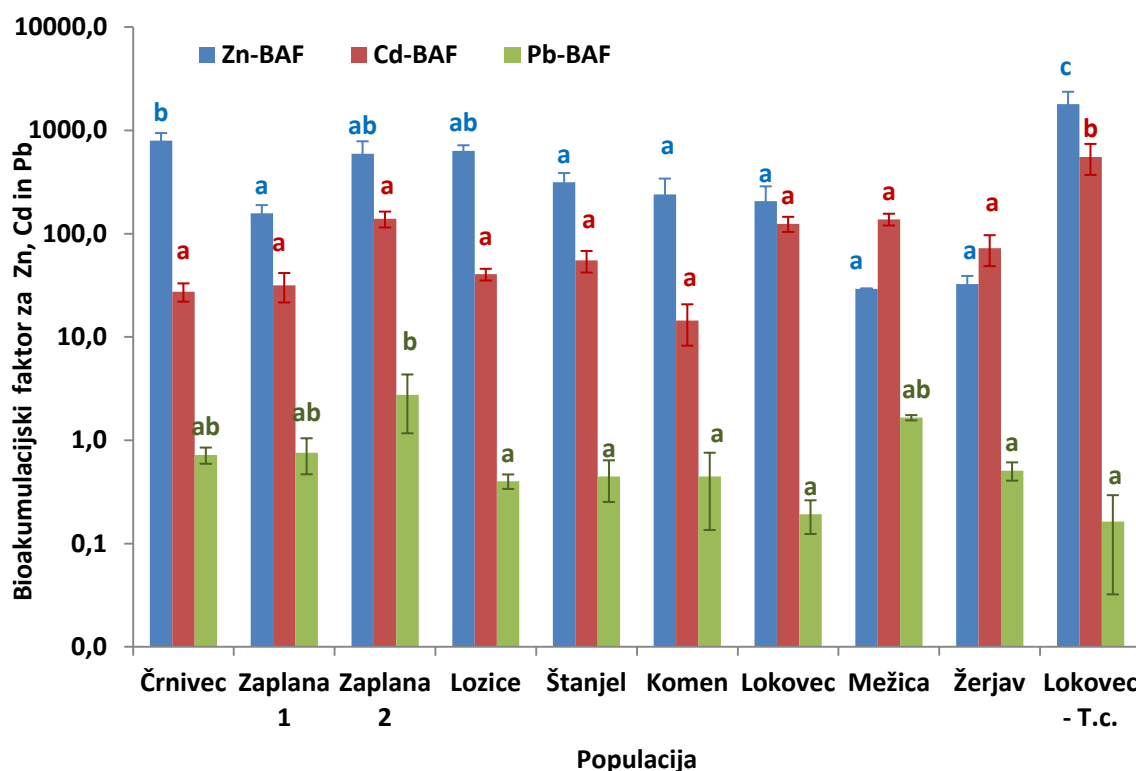
Slika 8: Statistična metoda glavnih komponent (angl. PCA), $p < 0,05$. Č- Črnivec, Lo-Lokovec, L-lozice, K-Komen, Š-Štanjel, LTc-Lokovec (*N. caerulescens*), Z1- Zaplana 1, Z2 - Zaplana 2, M-Mežica, Ž-Žerjav. Analiza je bila izvedena na povprečnih vrednostih merjenih parametrov. K- korenine, R- rozeta, CP-cvetni poganjek.

4.2.4 Bioakumulacijski in translokacijski faktorji

Bioakumulacijski faktor (BAF) smo izračunali kot razmerje med koncentracijo kovine v poganjku in koncentracijo kovine v tleh. Pove nam, za kolikokrat se koncentracija kovine v tleh poveča v poganjkih. Vsi izračunani BAF za Zn in Cd so bili večji od 1.

Najnižji Zn-BAF smo izračunali pri vzorcih populacije iz Mežice (od 26 do 30), najvišji Zn-BAF pa pri vzorcih populacije Lokovec-T.c. (*N. caerulescens*, od 1079,6 do 3490,4). Najnižji Cd-BAF smo izračunali pri vzorcih populacije iz Komna (od 5 do 38,6), najvišji Cd-BAF pa pri vzorcih populacije Lokovec-T.c. (*N. caerulescens*, od 184,3 do 1061,4). Najnižji Pb-BAF smo izračunali pri vzorcih populacije Lokovec-T.c. (*N. caerulescens*, od 0,01 do 0,55), najvišji Pb-BAF pa pri vzorcih populacije Zaplana 2 (od 0,03 do 6,65) (Priloga G).

Od ostalih populacij se po Zn-BAF in Cd-BAF najbolj loči Lokovec-T.c., po Pb-BAF pa Zaplana 2 (Slika 9).

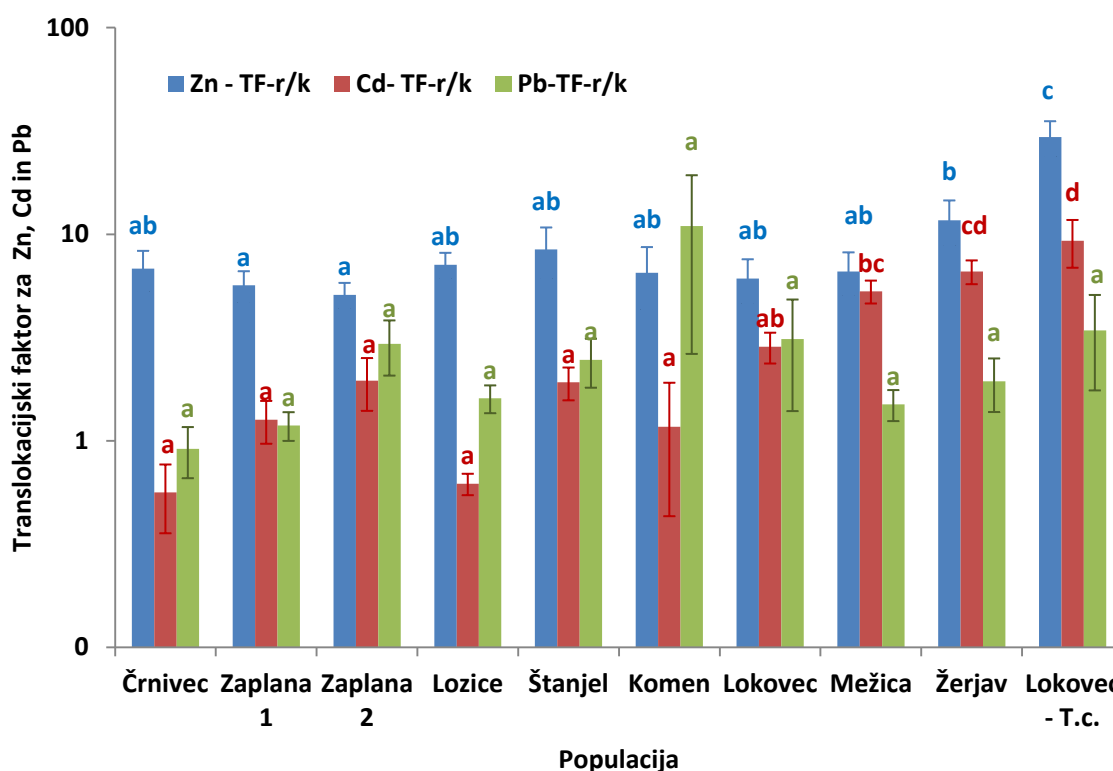


Slika 9: BAF vzorcev *N. praecox* in *N. caerulescens* različnih populacij. Podano je povprečje ± standardna napaka, n = 5. Različne črke ob vrednostih izmenljivih kovin označujejo statistično razliko (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).

Translokacijski faktor (TF) smo izračunali kot razmerje med koncentracijami kovin v rozeti in koncentracijo kovin v koreninah (TF-r/k) ter kot razmerje med koncentracijami kovin v cvetnih poganjkih in koncentracijo kovin v rozeti (TF-cv/r). TF nam pove, za kolikokrat se koncentracija kovin v koreninah poveča v rozeti oz. za kolikokrat se koncentracija kovin v rozeti poveča v cvetnih poganjkih.

Najnižji Zn-TF-r/k smo izračunali pri vzorcih populacije z Zaplane 2 (od 3,2 do 7,9), najvišji Zn-TF-r/k pa pri vzorcih populacije Lokovec-T.c. (*N. caerulescens*, od 11,1 do 43). Najnižji Cd-TF-r/k smo izračunali pri vzorcih populacije iz Črnivca (od 0,08 do 1,1), najvišji Cd-TF-r/k pa pri vzorcih populacije Lokovec-T.c. (*N. caerulescens*, od 4,3 do 16,4). Najnižji Pb-TF-r/k smo izračunali pri vzorcih populacije Črnivec (od 0,2 do 1,4), najvišji Pb-TF-r/k pa pri vzorcih populacije Komen (od 0,4 do 44,1) (Priloga H).

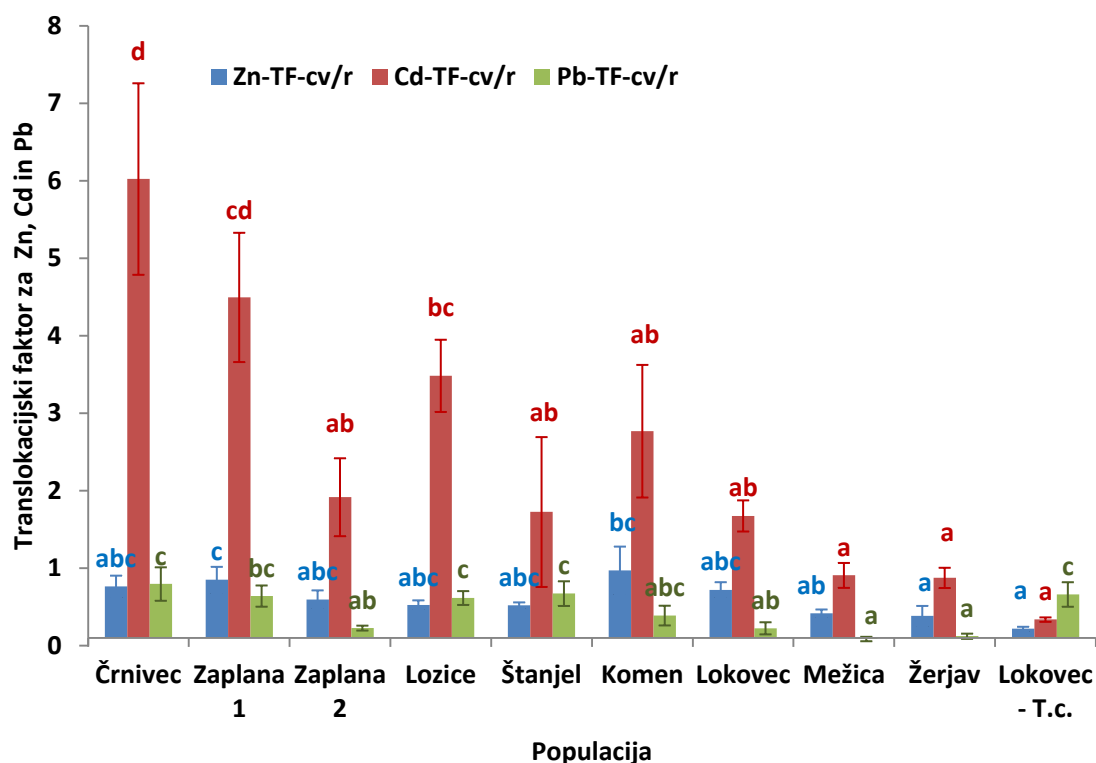
Po Zn-TF-r/k in Cd-TF-r/k statistično odstopa populacija Lokovec-T.c., po Pb-TF-r/k pa se populacije statistično ne razlikujejo (Slika 10).



Slika 10: Translokacijski faktorji (TF-r/k) vzorcev *N. praecox* in *N. caerulescens* različnih populacij. Podano je povprečje ± standardna napaka, n = 5. Različne črke ob vrednostih izmenljivih kovin označujejo statistično razliko (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).

Najnižji Zn-TF-cv/r smo izračunali pri vzorcih populacije Lokovec-T.c. (*N. caerulescens*, od 0,13 do 0,28), najvišji Zn-TF-cv/r pa pri vzorcih populacije Komen (od 0,24 do 2,10). Najnižji Cd-TF-cv/r smo izračunali pri vzorcih populacije Lokovec-T.c. (*N. caerulescens*, od 0,26 do 0,4), najvišji Cd-TF-cv/r pa pri vzorcih populacije Črnivec (od 3,3 do 9,3). Najnižji Pb-TF-cv/r smo izračunali pri vzorcih populacije Mežica (od 0,04 do 0,2), najvišji Pb-TF-cv/r pa pri vzorcih populacije Črnivec (od 0,4 do 1,6) (Priloga H).

Po Zn-TF-cv/r statistično odstopata populaciji Zaplana 1 in delno Komen, po Cd-TFcv/r statistično odstopa populacija Črnivec, po Pb-TFcv/r pa odstopata populaciji Mežica in Žerjav (Slika 11).

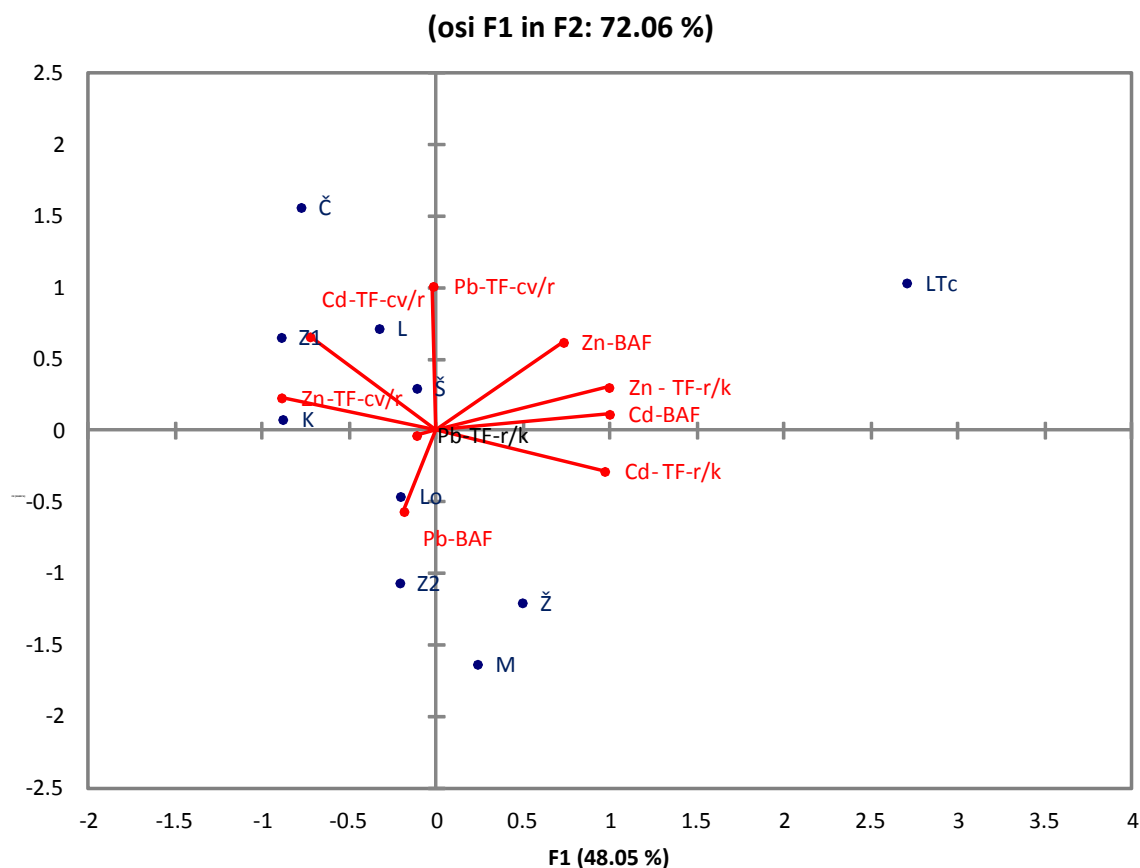


Slika 11: Translokacijski faktorji (TF-cv/r) vzorcev *N. praecox* in *N. caerulescens* različnih populacij. Podano je povprečje \pm standardna napaka, $n = 5$. Različne črke ob vrednostih izmenljivih kovin označujejo statistično razliko (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).

PCA analiza je pokazala, da so vrednosti BAF in TF-r/k pozitivno odvisne. TF-cv/r so negativno korelirani z BAF in TF-r/k faktorji. Populacije, vzorčene na onesnaženih področjih, se grupirajo ločeno od populacij z neonesnaženih področij. Izjema je *N. caerulescens*, ki je hiperakumulator za Zn in Cd (Slika 12).

Preglednica 6: Prispevek spremenljivk k funkciji F1 in F2 (%) na sliki 12.

	F1	F2
Zn - TF-r/k	20,4	39
Cd- TF-r/k	19,4	3,3
Pb-TF-r/k	0,3	0,0
Zn-TF-cv/r	16,6	2,2
Cd-TF-cv/r	11,0	18,1
Pb-TF-cv/r	0,0	42,6
Zn-BAF	11,1	16,0
Cd-BAF	20,5	0,6
Pb-BAF	0,7	13,2



Slika 12: Statistična metoda glavnih komponent (angl. PCA), $p < 0,05$. Č- Črnivec, Lo-Lokovec, L-lozice, K-Komen, Š-Štanjel, LTc-Lokovec (*N. caerulescens*), Z1- Zaplana 1, Z2 - Zaplana 2, M-Mežica, Ž-Žerjav. Analiza je bila izvedena na povprečnih vrednostih izračunanih TF in BAF. k = korenine, r = rozeta, cv = cvetni poganjek.

4.2.5 Stopnja arbuskularne mikorize

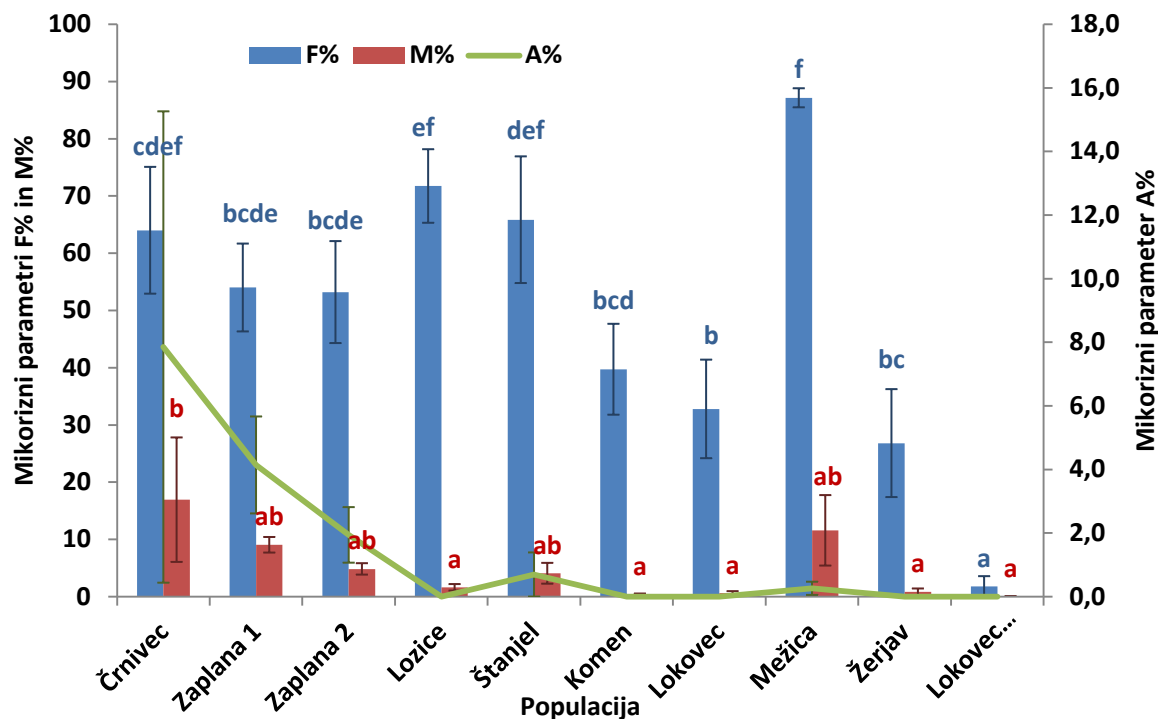
Splošna intenziteta mikorize (M%) je splošna ocena mikorizne infekcije korenin. Najnižje vrednosti M% smo ocenili pri vzorcih populacije Lokovec-T.c., kjer je bil koloniziran en sam vzorec (0,07%), najvišje pa pri vzorcih populacije Črnivec (od 1,4 do 60,1%).

Mikorizna frekvenca F% je frekvenca fragmentov, koloniziranih z glivo. Najnižje vrednosti F% smo izračunali pri vzorcih populacije Lokovec-T.c., kjer je bil koloniziran en sam vzorec (7,14%), najvišje pa pri vzorcih populacije Mežica (od 83 do 93%).

Gostota arbuskulov A% je gostota arbuskulov v koreninah. Arbuskulov sploh nismo opazili pri vzorcih populacij Lozice, Komen, Lokovec, Žerjav in Lokovec-T.c. (*N. caerulescens*). Najvišjo gostoto A% pa smo izračunali pri vzorcih populacije Črnivec (od 0,03 do 37,5%). Svitkov in veziklov nismo opazili pri nobenem vzorcu.

Izmerjene vrednosti mikoriznih parametrov so predstavljene v prilogi I.

Populacije se statistično razlikujejo. Glede na F% statistično odstopa populacija Mežica, glede na M% pa populacija Črnivec, glede A% se populacije statistično niso razlikovale (Slika 13).



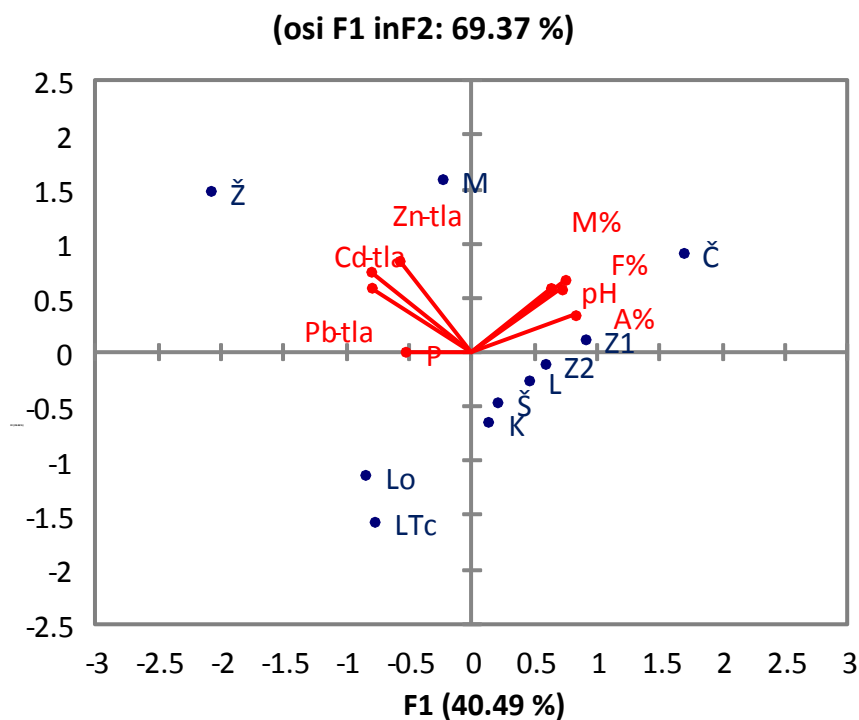
Slika 13: Mikorizni parametri (F%, M%, A%) vzorcev *N. praecox* in *N. caerulescens* različnih populacij. Podano je povprečje \pm standardna napaka, $n = 5$. Različne črke ob vrednostih izmenljivih kovin označujejo statistično razliko (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$). Populacije se glede na A% statistično niso razlikovale.

4.2.6 Vpliv izmenljivih koncentracij Cd, Zn, Pb in P ter pH na stopnjo AM kolonizacije

PCA analiza je pokazala, da je stopnja AM kolonizacije večja pri rastlinah, nabranih na neonesnaženih območjih, in večja, kjer je vsebnost P v tleh manjša (Slika 14).

Preglednica 7: Prispevek spremenljivk k funkciji F1 in F2 (%) na sliki 14.

	F1	F2
pH	12,7	11,8
P	7,0	0,0
Zn-tla	8,3	24,8
Cd-tla	16,0	19,2
Pb-tla	15,9	12,4
F%	9,7	12,3
M%	13,6	15,5
A%	16,8	4,1



Slika 14: Statistična metoda glavnih komponent (angl. PCA), $p < 0,05$. Č- Črnivec, Lo-Lokovec. L-lozice, K-Komen, Š-Štanjel, LTC-Lokovec (*N. caerulea*), Z1- Zaplana 1, Z2 - Zaplana 2, M-Mežica, Ž-Žerjav. Analiza je bila izvedena na povprečnih vrednostih merjenih parametrov.

5 RAZPRAVA

Vrsta *N. praecox* je hiperakumulator Zn (Reeves in Brooks, 1983a) in Cd (Vogel-Mikuš s sod., 2005), *N. caerulescens* pa je ena od najbolj raziskanih hiperakumulacijskih vrst v Evropi, ki tudi hiperakumulira Zn, Cd (Baker s sod., 1994b) ter Ni (Reeves in Brooks, 1983a). Obe vrsti dobro uspevata tudi na tleh, močno onesnaženih s težkimi kovinami, kot so Zn, Cd in Pb, *N. praecox* ponekod na onesnaženih območjih Mežiške doline uspeva skoraj kot monokultura. Edino znano rastišče *N. caerulescens* je v vasi Lokovec nad Čepovanom, ki ne spada med onesnažena območja, saj tam ni industrije ali rudarstva, vas je odmaknjena od glavnih prometnic. Obe vrsti sta sposobni tvoriti tudi arbuskularno mikorizo. V okviru te diplomske naloge smo preučevali razlike pri privzemu Zn, Cd in Pb med populacijami *N. praecox* in *N. caerulescens* in stopnjo AM.

5.1 ANALIZE TAL

Še pred vzorčenjem smo si izbrali populacije, ki se bodo med seboj razlikovale tudi po onesnaženju. Mežiška dolina je kot pretekli center rudarske in metalurške dejavnosti eden od najbolj onesnaženih območij tal v Sloveniji (Zupan s sod., 2008). Lokacije z Zaplane in s Krasa so umaknjene od glavnih prometnih poti in večjih krajev z industrijo, zato smo pričakovali, da bo onesnaženost tal tam nizka. Lokacija pri Črnicu je bila blizu takratne hitre ceste Tržič – Jesenice, pričakovali smo, da bo vsaj delno odstopala od lokacij z Zaplane in Krasa.

Nobena od lokacij, s katerih smo vzorčili, ne spada med kmetijske površine, zato smo se omejili na kritične vrednosti koncentracij kovin, kot jih določa Zakon o varstvu okolja. Tako izmerjene skupne koncentracije kovin kot izmerjene koncentracije izmenljivih kovin z lokacij Mežica in Žerjav presegajo te kritične vrednosti. Ti dve lokaciji upravičeno imenujemo onesnaženi lokaciji. To dokazuje tudi Duncanov test statistične razlike, ki lokaciji Mežica in Žerjav uvrsti v druge razrede kot neonesnažene lokacije.

Koncentracije TK v nerizosfernih in rizosfernih tleh se lahko razlikujejo. V rizosfernih tleh so lahko večje (Regvar s sod., 2006). Lokalno se v rizosferi hiperakumulatorskih rastlin lahko pojavijo visoke koncentracije TK, na kar vpliva življenjski cikel hiperakumulatorja (Vogel-Mikuš s sod., 2007).

Nizek pH tal vpliva na dostopnost TK, tako da povečuje topnost, onemogoča tvorbo kompleksov med TK in mineralno ali organsko snovjo (Gadd s sod., 2003). Najnižji pH 5,9 smo izmerili pri populaciji Lokovec-T.c. (*N. caerulescens*) in privzem kovin pri tej populaciji je bil res visok, vendar to prej pripišemo hiperakumulacijski sposobnosti vrste kot pH-ju.

5.2 BIOMASA IN PRIVZEM KOVIN V RASTLINE

Biomasa je parameter, ki kaže na toleranco rastlin na TK v tleh. Če je biomasa visoka kljub višjim koncentracijam TK v tleh, to nakazuje na toleranco na TK. Pri testu statistične razlike je najbolj izstopala populacija v Štanjelu, kjer so bile izmerjene biomase višje kot pri ostalih populacijah. Rahlo pozitivno je izstopala tudi populacija iz Mežice. Če primerjamo grafa koncentracij TK v tleh in mase rastlin, lahko opazimo le rahlo upadanje mase cvetnih poganjkov ob večanju koncentracije vseh treh TK. Kljub temu pa ni jasne korelacije med biomaso in koncentracijami kovin v rizosferni zemlji.

Koncentracija Zn v koreninah se je večala s koncentracijo Zn v rizosferni zemlji in jo je večkrat presegala. To nakazuje, da je akumulacija mehanizem tolerance na Zn pri obeh vrstah, *N. praecox* in *N. caerulescens*. Vrednosti, da populacijo označimo kot hiperakumulacijsko, pri akumulaciji Zn znašajo $>10000 \text{ mg kg}^{-1}$ (Reeves in Baker, 1999). Tako visoke vrednosti smo izmerili pri vzorcih rozet pri populaciji Lokovec-T.c. (*N. caerulescens*), pri ostalih pa ne. Če upoštevamo skupno koncentracijo kovin v nadzemnih delih rastline, potem to mejno vrednost preseže še populacija *N. praecox* iz Mežice. Ostale populacije sicer dosegajo visoke vrednosti skupne koncentracije Zn v nadzemnih delih, vrednosti za hiperakumulacijo pa ne presegajo, mejni vrednosti se približa le še populacija iz Žerjava. Ker je dostopnost Zn rastlinam odvisna od mnogih dejavnikov, kot so pH, delež organske snovi, delež gline, topnost, sposobnost bioakumulacije (Gobram s sod., 2001), lahko povzamemo, da so na akumulacijo Zn pri ostalih populacijah vplivali tudi ostali dejavniki in rastline niso izkoristile svojega bioakumulacijskega potenciala.

Tudi koncentracija Cd v koreninah se je večala s koncentracijo Cd v rizosferni zemlji. Da rastlinsko vrsto označimo za hiperakumulacijsko, mora v poganjke privzemati Cd v višjih koncentracijah od 100 mg kg^{-1} (Reeves in Baker, 1999). Tako visoke vrednosti smo izmerili pri štirih populacijah: pri obeh populacijah z onesnaženih lokacij ($>1800 \text{ mg kg}^{-1}$ v Mežici in $>2000 \text{ mg kg}^{-1}$ v Žerjavu), pri populaciji v Lokovcu ($>140 \text{ mg kg}^{-1}$) in pri populaciji *N. caerulescens* (Lokovec-T.c., $>470 \text{ mg kg}^{-1}$). Vrednosti koncentracije Cd v nadzemnih delih rastlin z ostalih lokacij so še vedno nekajkrat presegale koncentracije izmenljivega Cd v tleh, zato lahko zaključimo, da je mehanizem tolerance na Cd pri obeh vrstah hiperakumulacija.

Po vrednostih koncentracije Pb v tleh je močno izstopala lokacija v Žerjavu, kjer smo v tleh zmerili kar 9078 mg kg^{-1} izmenljivega Pb. Vrednosti nad zakonsko določeno kritično mejo smo izmerili še v Mežici (888 mg kg^{-1}). Ostale lokacije so si bile statistično podobne, koncentracije so se gibale od $32,7 \text{ mg kg}^{-1}$ pri populaciji s Črničva do $279,5 \text{ mg kg}^{-1}$ pri populaciji Lokovec-T.c. (*N. caerulescens*). Glede na koncentracijo izmenljivega Pb v tleh so bile vrednosti Pb v koreninah večinoma nižje, višje so bile le pri populaciji v Črničvu in pri populaciji iz Mežice. Koncentracije Pb v rozetah so bile višje od koncentracij v koreninah pri vseh populacijah, razen pri populaciji iz Črničva. Koncentracije v cvetnih poganjkih so bile pri vseh populacijah nižje od koncentracij v rozetah. Mejna vrednost v poganjkih, da

populacijo označimo za hiperakumulatorja Pb, znaša 1000 mg kg^{-1} (Brooks, 2000). Višje vrednosti od te smo izmerili pri vzorcih rozet populacij iz Mežice in Žerjava.

5.3 BIOAKUMULACIJSKI IN TRANSLOKACIJSKI FAKTORJI

Vsi izračunani BAF za Zn in Cd pri vseh populacijah so bili ne samo višji od 1, ampak celo višji od 10. To je eden od znakov za hiperakumulacijo, za nekatere avtorje celo pomembnejši od dejanske koncentracije TK v poganjkih (Zhao s sod, 2003). Koncentracije Zn v tleh očitno ne vplivajo na privzem, kar kaže na dobro razvite mehanizme privzema Zn pri obeh rastlinskih vrstah. Vrednosti Zn-BAF so se statistično razlikovale, najvišji Zn-BAF smo izračunali pri populaciji iz Črničca in Lokovec-T.c. (*N. caerulescens*). Cd-BAF je najbolj pozitivno odstopal pri vrsti *N. caerulescens*, pri vseh populacijah pa je bil visok. Vrednosti BAF za Pb pa so bile višje od 1 le pri populaciji Zaplana 2 in Mežica. Pri ostalih populacijah so bile vrednosti pod 1.

TF rozeta/korenine za Zn je bil pri vseh populacijah višji od 1, kar pomeni, da je bila stopnja transporta TK iz korenin v poganjke visoka. Še posebej izstopa *N. caerulescens* s TF $r/k > 29$. TF cvetni poganjki/rozeta za Zn pa so bili manjši od 1 povsod, razen pri populaciji Komen, kjer je Zn-TF_{cv}/r natanko 1. To pomeni, da se je Zn slabše prenašal v cvetne poganjke.

Vrednosti Cd-TF rozeta/korenine so pri vseh populacijah presegale 1, razen pri populaciji Črničec in Lozice. Vrednosti Cd-TF cvetni poganjki/rozeta pa so presegale 1 povsod, razen pri populacijah iz Mežice in Žerjava ter Lokovec-T.C. (*N. caerulescens*). Iz tega lahko sklepamo da se tudi Cd dobro transportira po rastlini.

Vrednosti Pb-TF rozeta/korenine so bile višje od 1 pri vseh populacijah, razen pri populaciji Črničec, vrednosti Pb-TF cvetni poganjki/rozeta pa nižje od 1 pri vseh populacijah. Iz tega lahko sklepamo, da se Pb sicer dobro prenaša iz korenin v rozeto, v cvetne poganjke pa se transportira precej slabše. To se ujema tudi s koncentracijami Pb v rastlinskih organih, saj je bilo Pb v cvetnih poganjkih nekajkrat manj kot v rozetah.

Z našim delom smo dokazali, da je populacija *N. caerulescens* iz Lokovca hiperakumulator za Zn in Cd, saj smo z izmerjenimi koncentracijami zadostili pogoju $>10000 \text{ mg kg}^{-1}$ in vrednosti BAF ter TF so bile >1 . Prav tako lahko zaključimo, da imajo potencial za hiperakumulacijo Zn vse populacije *N. praecox*, za hiperakumulacijo Cd pa vsaj obe populaciji z onesnaženega področja. Čeprav koncentracije niso presegale 10000 mg kg^{-1} za Zn, pa so bile vrednosti BAF in TF >1 , populaciji iz Žerjava in Mežice pa sta presegli mejo $>100 \text{ mg kg}^{-1}$ za hiperakumulacijo Cd. Zanimivo bi bilo preučiti predstavnike teh populacij v nadzorovanem okolju in ugotoviti, ali bi ob optimalnih pogojih dosegle vse pogoje za hiperakumulacijo.

Manjšo uganko so predstavljali tudi zbrani podatki privzema Pb pri populaciji *N. caerulescens* iz Lokovca, saj so vrednosti BAF < 1 , medtem ko so koncentracije Pb v rozetah in cvetnih poganjkih večje od tistih v koreninah. Predvidevamo, da gre za kontaminacijo nadzemnih delov rastlin s Pb s ceste. Da bi to potrdili, bi morali raziskati, kje v tkivih se Pb nahaja.

Zanimivi so tudi rezultati privzemanja Pb pri populaciji *N. praecox* iz Mežice. Koncentracije Pb v rozetah so presegale mejne koncentracije za hiperakumulacijo Pb, to je 1000 mg kg^{-1} , hkrati pa so bile vrednosti BAF in TF r/k > 1 . Biomasa vzorcev s te lokacije ni iztopala, sami primerki rastlin niso kazali vidnih znakov stresa, torej lahko zaključimo tudi, da ima ta populacija potencial hiperakumulacije Pb.

5.4 ARBUSKULARNA MIKORIZA

Mikorizna frekvenca F% je bila visoka, nad 50% pri večini populacij, nižja je bila le pri populacijah Komen in Lokovec ter zelo nizka (< 2) pri populaciji Lokovec-T.c. (*N. caerulescens*). Populacije so se med seboj statistično zelo razlikovale. Najvišja F% je bila izračunana pri populaciji Mežica.

Splošna intenziteta mikorize M% je bila najvišja pri populaciji Črnivec, pri kateri smo opazili tudi največ arbuskulov (A% > 7). Arbuskule smo opazili še pri populacijah Zaplana 1 in 2, Štanjel in Mežica.

Pričakovali smo, da bodo vse populacije tvorile arbuskularno mikorizo, saj smo vse populacije vzorčili v času cvetenja, ko je stopnja kolonizacije AM uspešnejša (Pongrac s sod., 2008) in to tudi dokazali. TK vplivajo na razvoj AM gliv (Del Val s sod., 1999), hkrati pa AM glive rastlino tudi ščitijo pred vplivi TK, saj zavirajo prehod TK preko membrane ali kopičijo TK v miceliju (Vodnik, 1998). Glede na raziskave Vogel-Mikuš s sod. (2005) smo pričakovali, da bo stopnja AM pri populacijah z onesnaženih lokacij nižja od tistih z neonesnaženih lokacij in to je pokazala tudi PCA analiza. Prednosti AM kolonizacije se kažejo v okolju, kjer so koncentracije rastlinam dostopnega P manjše (Parniske, 2008) in to se prav tako kaže s PCA analizo.

6 SKLEPI

- Vse populacije *N. praecox* so aktivno privzemale Zn, vendar niso dosegale meje za hiperakumulacijo 10000 mg kg^{-1} , so pa vrednosti BAF in TF rozeta/korenine bile >1 .
- Populacija *N. caerulescens* je hiperakumulirala Zn, kar dokazujejo koncentracije privzetega Zn v rozetah, ki so $>10000 \text{ mg kg}^{-1}$, in vrednosti BAF in TF rozeta/korenine, ki so >1 .
- Tri populacije *N. praecox* (Žerjav, Mežica in Lokovec) so aktivno privzemale Cd in presegle mejo za hiperakumulacijo 100 mg kg^{-1} , vrednosti BAF in TF rozeta/korenine bile >1 .
- Populacija *N. caerulescens* je hiperakumulirala Cd, kar dokazujejo koncentracije privzetega Cd v rozetah, ki so $>100 \text{ mg kg}^{-1}$, in vrednosti BAF in TF rozeta/korenine, ki so >1 .
- Populacija *N. praecox* z onesnaženega področja Mežice je aktivno privzemala Pb in presegla mejo za hiperakumulacijo 1000 mg kg^{-1} , vrednosti BAF in TF rozeta/korenine so bile >1 .
- Populacija *N. caerulescens* je privzemala Pb, koncentraciji v rozetah in cvetnih poganjkih sta bili višji od koncentracije v koreninah, vrednost BAF je bila <1 , TF rozeta/korenine pa >1 . Glede na vrednosti BAF lahko zaključimo, da populacija *N. caerulescens* izključuje Pb, kajti predvidevamo, da so visoke vrednosti Pb v rozeti in poganjkih posledica kontaminacije z bližnje ceste.
- Tako populacije *N. praecox* kot *N. caerulescens* so tvorile arbuskularno mikorizo, čeprav je bila kolonizacija pri *N. caerulescens* zelo šibka. Stopnja AM kolonizacije je bila nižja na onesnaženih lokacijah in višja tam, kjer so bile koncentracije rastlinam dostopnega P nižje.

7 POVZETEK

V tem diplomskem delu smo preučevali privzem Zn, Cd in Pb ter arbuskularno mikorizo pri različnih populacijah ranega mošnjaka (*Noccaea praecox* Wulf.) in pri eni populaciji modrikastega mošnjaka (*Noccaea caerulescens*). Zanimale so nas razlike v privzemu kovin, njihov vpliv na AM ter vpliv stopnje AM na privzem kovin.

Na desetih lokacijah smo vzorčili po 5 primerkov rastlinske vrste s pripadajočimi rizofernimi tlemi. V rizosfernih tleh smo izmerili pH, rastlinam dostopni P, skupne koncentracije Zn in Pb z XRF ter izmenljive koncentracije Zn, Cd in Pb z AAS. Rastlinske vzorce smo razdelili na korenine, rozete in cvetne poganjke, ter v teh tkivih izmerili koncentracije Zn, Cd in Pb z AAS. Del koreninic smo obarvali s tripan modrim in s pomočjo svetlobnega mikroskopa ocenili stopnjo AM.

V tleh smo izmerili večje koncentracije od dovoljenih vseh treh kovin pri populacijah iz Mežice in Žerjava, zato smo ti dve lokaciji obravnavali kot onesnaženi, ostalih osem pa kot neonesnažene. Pri vseh vzorcih se je izkazalo, da rastline ob večjih koncentracijah TK v tleh le-te tudi privzemajo v večjih koncentracijah. Populacija *N. caerulescens* se je izkazala kot hiperakumulator za Zn in Cd tako glede na privzete koncentracije kovin v rastlinskih tkivih kot glede BAF in TF. Glede na Pb-BAF bi zaključili, da *N. caerulescens* Pb izključuje, a so bile koncentracije v nadzemnih delih visoke, prdvidevamo kontaminacijo s Pb s ceste. Populacije *N. praecox* iz Mežice, Žerjava in Lokovca so se izkazale kot hiperakumulator Cd glede na koncentracijo kovin v rastlinskih tkivih in BAF ter TF. Populacija iz Mežice pa še kot hiperakumulator Pb glede na koncentracijo kovin v rastlinskih tkivih in BAF ter TF.

Kolonizacijo z AM glivami smo opazili pri vseh populacijah obeh rastlinskih vrst, pri *N. caerulescens* je bila kolonizacija nizka. Pri ostalih populacijah je bila F% pod 50% le pri treh lokacijah: Komen, Lokovec in Žerjav. Arbuskule smo opazili pri petih lokacijah: Črnivec, Zaplana 1, Zaplana 2, Štanjel in Mežica. Izkazalo se je, da stopnja AM kolonizacije narašča ob manjših koncentracijah dostopnega P v tleh. Na neonesnaženih lokacijah je bila stopnja AM kolonizacije višja kot na onesnaženih lokacijah.

8 VIRI

- Adriano D. C. 1986. Trace elements in the terrestrial environment. 2nd ed. New York, Springer: 867 str.
- Assunção A. G. L., Schat H., Aarts M. G. 2003a. *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, 159, 2: 351-360
- Assunção A. G. L., Bookum W. M., Nelissen H. J. M., Voojjs R., Schat H., Ernst W. H. O. 2003b. Differential metal-specific tolerance and accumulation patterns among *Thlaspi caerulescens* populations originating from different soil types. *New Phytologist*, 159, 2: 411-419
- Baker A. J. M. 1987. Metal tolerance. *New Phytologist*, 106, Issue Supplement s1: 93-111
- Baker A. J. M., McGrath S. P., Sidoli C. M. D., Reeves R. D. 1994a. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulation plants. *Resources, Conservation and Recycling*, 11, 1-4: 41-49
- Baker A. J. M., Proctor J. 1990. The influence of cadmium, copper, lead and zinc on the distribution and evolution of metallophytes in the British isles. *Plant Systematic and Evolution*, 173, 1-2: 91-108
- Baker A. J. M., Reeves R. D., Hajar A. S. M. 1994b. Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl. (Brassicaceae). *New Phytologist*, 127, 1: 61-68
- Baker, A. J. M. 1981. Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*, 3, 1-4: 643-654
- Bergmann W. 1992. Nutritional disorders in plants. Development, visual and analytical diagnosis. New York, Fischer: 742 str.
- Boyd R. S. 2000: Hyperaccumulation as a Plant Defensive Strategy. V: Plants, that Hyperaccumulate heavy Metals. Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Arvhaeology, Mineral Exploration and Phytomining. Brooks R. R. (ur.). 2nd ed. New York, CAB International: 380 str.
- Broadley M. R., White P. J., Hammond J. P., Zelko I., Luh, A. 2007. Zinc in plants. *New Phytologist*, 173, 4: 677-702

- Brooks R. R., Lee J., Reeves R. D., Jaffre T. 1977. Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal of Geochemical Exploration*, 7: 49-57
- Brooks R. R. 2000. General introduction V: Plants that hyperaccumulate heavy metals. Their role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining. Brooks R.R. (ur.). 2nd ed. New York, CAB International: 380 str.
- Chaney R. L. 1983. Plant uptake of inorganic waste constituents. V: Land treatment of hazardous wastes. Parr J. F., Marsh P. B., Kla J. M. (ur.). Park Ridge, Noyes Data Corporation: 76 str.
- Chaney R. L., Malik K. M., Li Y. M., Brown S. L., Brewer E. P., Angle J. S. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 8, 3: 279-284
- Cooper E. M., Sims J. T., Cunningham S. D., Huang J. W., Berti W. R. 1999. Chelate assisted phytoextraction of lead from contaminated soils. *Journal of Environmental Quality*, 28, 6: 1709-1719.
- Degraeve, N. 1981. Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. *Mutation Research*, 86, 1: 115-135
- Del Val C., Barea J. M., Azcón-Aguilar C. 1999. Assessing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils. *Applied Soil Ecology*, 11, 2-3: 261-269
- Delisle G., Champoux M., Houde M. 2001. Characterization of oxidase and cell death in Al-sensitive and tolerant wheat roots. *Plant Cell Physiology*, 42, 3: 324-333
- Dickson, S. 2004: The Arum-Paris Continuum of Mycorrhizal Symbioses. *New Phytologist*, 163, 1: 187-200
- Duponnois R., Plenchette C., Thioulouse J., Cadet P. 2001. The mycorrhizal soil infectivity and arbuscular mycorrhizal fungal spore communities in soils of different aged fallows in Senegal. *Applied Soil Ecology*, 17, 3: 239-251
- Ernst W. H. O. 2000. Evolution of metal hyperaccumulation and phytoremediation hype. *New Phytologist*, 146, 3: 357-358
- Gadd G. M., Bufford E. P., Fomina M. 2003. Biogeochemical activities of microorganisms in mineral transformations: consequences for metal and nutrient mobility. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13, 3: 323-332

- Galli U., Schüepp H., Brunold C. 1994. Heavy metal binding by micorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum*, 92, 4: 364-368
- Gobram R. G., Wenzel V. W., Lombi E. 2001. Trace metals in the Rhizosphere. Boca Raton, CRC Press: 344 str.
- Hagemeyer J. 1999. Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems. Prasad M. N. V., Hagemeyer J. (ur.). New York, Springer: 401 str.
- Hall J. L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53, 366: 1-11
- Harrison M. J. 1998. Development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 1, 4: 360-365
- Hodge A. 2000. Microbial ecology of the arbuscular mycorrhiza. *FEMS Microbiology Ecology*, 32, 2: 91-96
- Irgel N. 2003. Mikorizni status rodu *Thlaspi* L.: diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, BF, Odd. za biologijo: 69 str.
- Jain S. K. 1976. The evolution of inbreeding in plants. *Annual Reviews of Ecology, Evolution and Systematics*, 7: 469-495
- Koch M. A., German D. A. 2013. Taxonomy and systematics are key to biological information: *Arabidopsis*, *Entrena* (*Thellungiella*), *Noccaea* and *Schrenkiella* (Brassicaceae) as examples. *Frontiers in Plant Science*, v4: 267, doi: 10.3389/fpls.2013.00267: 15 str.
- Koch M. A., Mummenhoff K., Hurka H. 1998. Systematic and evolutionary history of heavy metal tolerant *Thlaspi caerulescens* in Western Europe: evidence from genetic studies based on isozyme analysis. *Biochemical Systematic and Ecology*, 26, 8: 823-838
- Kumar P., Dushenkov V., Motto H., Rashkin I. 1995. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology*, 29, 5: 1232-1238.
- Lasat, M. M., Baker A. J. M., Kochian L. V. 1998. Altered Zn compartementation in the root symplasm and stymulated 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 protoplasts of the Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell & Environment*, 34, 2: 208-219
- Leyval C., Tournau K., Haselwandter K. 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonisation and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza*, 7, 3: 139-153
- Llugany M., Lombini A., Poschenrieder C., Barcelo J. 2003. Different mechanisms account for enhanced copper resistance in *Silene armeria* from mine spoil and serpentine sites. *Plant and Soil*, 251, 1: 55-63
- Macnair M. R., Baker A. J. M. 1994. Metal tolerance in plants: evolutionary aspects. V: *Plants and the chemical elements*. Farago M. E. (ur.). Weinheim, VCH: 302 str.
- 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.A., Eler K., Surina B. 2007. Mala flora Slovenije: Ključ za določanje praprotnic in semenk. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 967 str.
- McGrath S. P. 1998. Phytoextraction for soil remediation. V: *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. Brooks R. R. (ur.). Wallingford, CAB International: 384 str.
- McGrath S. P., Zhao F. J., Lombi E. 2002. Phytoremediation of metals, metalloids and radionuclides. *Advances in Agronomy*, 75: 1-56
- Nečemer M., Kump P., Rajčević M., Jačimović R., Budič B., Ponikvar M. 2003. Determination of sulfur and chlorine in fodder by X-ray fluorescence spectral analysis and comparison with other analytical methods. *Spectrochimica Acta Part B*, 58, 7: 1367-1373
- ÖNORM L. 1087. 1993. Chemische Bodenuntersuchungen Bestimmung von pflanzenverfügbarem Phosphat und Kalium nach der Calcium-Acetat-Lactat(CAL)-Methode. Wien, Österreichisches Normungsinstitut: 4 str.
- Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 10: 763-775
- Pollard A. J., Powell K. D., Harper F. A., Smith J. A. C. 2002. The Genetic basic of metal hyperaccumulation in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21, 6: 539-566
- Pongrac P., Vogel-Mikuš K., Regvar M., Tolra R., Pochenrieder C., Barcelo J. 2008. Glucosinolate profiles change during the life cycle and mycorrhizal colonisation in a

- Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi praecox* (Brassicaceae). *Journal of Chemical Ecology*, 34, 8: 1038-1044
- Reeves R. D., Brooks R. R. 1983a. European species of *Thlaspi* L. (Cruciferae) as indicators of nickel and zinc. *Journal of Geochemical Exploration*, 18, 3: 275-283
- Reeves R. D., Baker A. J. M. 1999. Metal-accumulating plants. V: *Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment*. Raskin I., Ensley B. D. (ur.). New York, John Wiley & Sons Inc.: 304 str.
- Regvar M., Vogel K., Irgel N., Wraber T., Hildebrandt U., Wilde P., Bothe H. 2003. Colonization of pennycresses *Thlaspi* sp. of the Brassicaceae by arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology*, 160, 6: 615-626
- Regvar M., Vogel-Mikuš K., Kugonič N., Turk B., Batič F. 2006. Vegetational and mycorrhizal succession at a metal polluted site: Indications for the direction of phytostabilisation. *Environmental Pollution*, 144, 3: 976-984
- Rout G.R., Das P. 2003. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. V: *Sustainable Agriculture*. Lichtfouse E., Navarrete M., Debaeke P., Véronique S., Alberola C. (ur.). Neherlands, Springer Netherlands: 919 str.
- Sanità di Toppi L., Gabrielli R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41, 2: 105-130
- Shen Z. G., Zhao F. J., McGrath S. P. 1997. Uptake and transport of zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and the non-hyperaccumulator *Thlaspi ochroleucum*. *Plant, Cell & Environment*, 20, 7: 898-906
- Singh R. P., Tripathi R. D., Sinha S. K., Maheshwari R., Srivastava H. S. 1997. Response of higher plants to lead contaminated environments. *Chemosphere*, 34, 11: 2467-2493.
- Smith S.E., Read D.J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. 2nd ed. San Diego, Academic Press: 605 str.
- Trouvelot A., Kough J. L., Gianinazzi-Pearson V. 1986. Mesure de taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. V: *Physiological and Genetic Aspects of Mycorrhizae*. Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (ur.). Paris, INRA Press: 571 str.
- Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh. 1996. Ur. l. RS, št. 68/96

- Vodnik D. 1998. Vloga mikorize pri fitotoksičnem vplivu svinca: doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, BF, Odd. za biologijo: 292 str.
- Vogel-Mikuš K., Pongrac P., Kump P., Nečemer M., Simčič J., Pelicon P., Budnar M., Povh B., Regvar M. 2007. Localization and quantification of elements within seeds of Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi praecox* by micro-PIXE. *Environmental Pollution*, 147, 1: 50-59
- Vogel-Mikuš K., Drobne D., Regvar M. 2005. Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonization of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. *Environmental Pollution*, 133, 2: 233-242.
- Watanabe M. E. 1997. Phytoremediation on the brink of commercialization. *Environmental Science and Technology*, 31, 1: 182-186
- Wenzel W. W., Jockwer F. 1999. Accumulation of heavy metals in plants grown on mineralised soils of the Austrian Alps. *Environmental Pollution*, 104, 1: 145-155
- Zenk M. H. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene*, 179, 1: 21-30
- Zhao F. J., Lombi E., McGrath S. P. 2003. Assessing the potential for zinc and cadmium phytoremediation with hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant and Soil*, 249, 1: 37-43
- Zupan M., Grčman H., Lobnik F., Tič I., Šinkovec M., Žlebir S. 2008. Raziskave onesnaženosti tal Slovenije. Ljubljana. Agencija RS za okolje: 63 str.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Katarini Vogel-Mikuš za izjemno potrpežljivost in veliko pomoč tako pri raziskovalnem delu kot pri obdelavi podatkov in pisanju naloge.

Hvala prof. dr. Marjani Regvar za potrpežljivost, dosegljivost in recenzijo.

Hvala vsem na Katedri za botaniko in rastlinsko fiziologijo na Oddelku za biologijo – Skupina za fiziologijo rastlin za vso pomoč pri raziskovalnem delu.

Hvala Nevi, Barbari in Klemnu za hitro osvežitev znanja tik pred zdajci.

In hvala Binetu, Fedju ter Urbanu – vi ste veter pod mojimi krili.

PRILOGE

Priloga A: Koncentracije skupnega Zn in Pb v tleh, izmerjene z XFR (mg kg⁻¹).

POPULACIJA		Skupne koncentracije kovin v tleh (mg kg ⁻¹)	
		Zn	Pb
Črnivec	A	146	128
	B	97,7	160
Štanjel	C	357	73
	Č	430	163
Lozice	D	206	54,9
	E	246	124
Komen	F	176	46,9
	G	144	51,8
Mežica	H	8400	4500
	I	14700	6650
Lokovec	J	331	50,7
Žerjav	K	131	1310
	L	5990	63500
Lokovec – T.c.	M	302	148
	N	250	132
Zaplana 2	O	198	103
	P	107	50,1
Zaplana 1	R	78,4	25,2
	S	129	34,1

Priloga B: Koncentracije izmenljivega Zn, Cd in Pb v tleh, izmerjene z AAS (mg kg⁻¹).

POPULACIJA		TLA - izmenljive k.		
		Zn	Cd	Pb
Črnivec	Č1	2,46	0,312	40,75
	Č2	3,188	0,282	26,39
	Č3	3,109	0,342	20,40
	Č4	3,952	0,284	32,82
	Č5	3,399	0,317	43,05
Zaplana 1	Z1	6,608	0,22	118,4
	Z2	2,908	0,238	23,64
	Z3	6,862	0,499	179,6
	Z4	6,52	0,207	61,76
	Z5	4,509	0,225	79,14
Zaplana 2	Za1	2,825	0,118	3,299
	Za2	4,875	0,331	81,81
	Za3	2,697	0,207	3,557
	Za4	3,152	0,223	148,1
	Za5	11,71	0,232	419,9
Lozice	L1	4,983	0,393	64,86
	L2	3,543	0,212	38,94
	L3	4,135	0,222	117,9
	L4	5,679	0,316	56,08
	L5	3,516	0,328	29,60
Štanjel	Š1	16,61	0,44	46,97
	Š2	6,159	0,74	39,57
	Š3	6,199	0,528	151,9
	Š4	8,781	0,962	309,5
	Š5	12,14	0,704	13,42
Komen	K1	3,649	0,796	146,4
	K2	8,961	0,593	100,4
	K3	4,761	0,829	20,07
	K4	4,907	0,524	68,05
	K5	13,56	0,506	97,73
Lokovec	Lk1	4,757	1,028	89,75
	Lk2	22,51	1,284	95,66
	Lk3	5,458	1,062	73,04
	Lk4	10,5	1,205	122,2
	Lk5	8,355	1,123	205,7
Mežica	M1	187	6,035	894,6
	M2	250,8	6,999	574,6
	M3	212,6	7,018	586,7
	M4	547,1	26,11	929,8
	M5	265	30,66	1454,5
Žerjav	Ž1	203,8	38,33	8321
	Ž2	141,6	18,77	6077
	Ž3	265,3	54,41	12010
	Ž4	294,5	56,41	11990
	Ž5	196,2	23,92	6994
Lokovec - T.c.	Lkc1	7,838	2,615	301,5
	Lkc2			
	Lkc3	9,707	1,024	715,0
	Lkc4	7,761	0,334	50,16
	Lkc5	3,289	1,179	51,13

Priloga C: Izmerjene vrednosti suhe biomase (g).

POPULACIJA		masa- kor.	masa- roz.	masa-cv. pog.
Črnivec	Č1	0,07	0,133	0,407
	Č2	0,053	0,134	0,228
	Č3	0,017	0,037	0,079
	Č4	0,218	0,408	0,725
	Č5	0,032	0,036	0,057
Zaplana 1	Z1	0,263	0,24	
	Z2	0,448	0,428	0,923
	Z3	0,114	0,482	0,359
	Z4	0,373	0,417	0,313
	Z5	0,161	0,238	0,469
Zaplana 2	Za1	0,852	0,274	0,327
	Za2	0,191	0,199	0,541
	Za3	0,139	0,22	0,615
	Za4	0,758	0,834	1,653
	Za5	0,654	0,819	1,872
Lozice	L1	0,065	0,055	0,064
	L2	0,053	0,038	0,073
	L3	0,105	0,146	0,225
	L4	0,13	0,248	0,404
	L5	0,038	0,133	0,169
Štanjel	Š1	0,521	1,666	4,446
	Š2	0,898	2,426	4,336
	Š3	0,457	1,02	3,078
	Š4	0,208	0,634	0,839
	Š5	1,906	3,693	9,228
Komen	K1	0,046	0,05	0,305
	K2	0,136	0,027	0,502
	K3	0,411	0,576	2,369
	K4	0,049	0,068	0,115
	K5	0,052	0,087	0,176
Lokovec	Lk1	0,086	0,202	0,373
	Lk2	0,087	0,173	0,224
	Lk3	0,023	0,074	0,129
	Lk4	0,025	0,084	0,085
	Lk5	0,048	0,077	0,121
Mežica	M1	0,293	0,68	0,388
	M2	0,448	0,735	0,47
	M3	0,403	0,653	0,576
	M4	0,609	1,933	2,268
	M5	0,887	1,562	0,824
Žerjav	Ž1	0,319	0,847	1,11
	Ž2	0,039	0,122	0,321
	Ž3	0,112	0,288	0,112
	Ž4	0,007	0,04	0,049
	Ž5	0,028	0,143	0,237
Lokovec - T.c.	Lkc1	0,038	0,235	0,23
	Lkc2	0,15	0,42	0,421
	Lkc3	0,017	0,166	0,157
	Lkc4	0,021	0,521	0,291
	Lkc5	0,042	0,223	0,178

Priloga D: Koncentracije Zn v rastlinskih tkivih (mg kg⁻¹).

POPULACIJA		Zn- korenine	Zn- rozeta	Zn- cv. poganjek
Črnivec	Č1	252,8	1757	1864
	Č2	391,8	3149	2961
	Č3	1186	3078	1627
	Č4	422,3	4072	1386
	Č5		858,8	823,2
Zaplana 1	Z1	201	1195	785,4
	Z2	133,3	744,8	526,3
	Z3	131,5	419,2	637,2
	Z4	120,7	954,6	716,3
	Z5		643,4	398,2
Zaplana 2	Za1	467,5	1824	1378
	Za2	211,1	886,2	857,9
	Za3	882,4	3270	1065
	Za4	360,1	2261	860,6
	Za5	348,1	2560	1412
Lozice	L1	434	1951	904,7
	L2	308,7	1637	778,3
	L3	407,9	3221	2250
	L4	420,1	4293	2712
	L5	355	2723	973,2
Štanjel	Š1	285,4	2107	995,1
	Š2	285,4	2658	1127
	Š3	414,5	2150	1154
	Š4	257,6	4362	2294
	Š5	587,2	2022	1320
Komen	K1	211,5	982,6	834,4
	K2	292,2	380,5	800,9
	K3	229,2	2929	703,2
	K4	229,4	784,3	773,5
	K5	152,9	1584	1067
Lokovec	Lk1	175,3	1181	516,4
	Lk2	180,3	886,5	681,8
	Lk3	237,9	2718	1591
	Lk4	219,4	1019	1048
	Lk5	452,3	1249	982,6
Mežica	M1	531,3	5349	2351
	M2	1625	7160	2585
	M3	1718	6225	3356
	M4	1520	16410	4372
	M5	1906	7885	3912
Žerjav	Ž1	479,6	8244	3914
	Ž2	359,2	6940	58,17
	Ž3	574,8	4180	2551
	Ž4	1377	5693	2535
	Ž5	707,8	7501	
Lokovec - T.c.	Lkc1	293,1	11390	2179
	Lkc2	404	9527	2669
	Lkc3	243,6	10480	2845
	Lkc4	802,2	8866	1176
	Lkc5	365,6	11480	2492

Priloga E: Koncentracije Cd v rastlinskih tkivih (mg kg⁻¹).

POPULACIJA		Cd- korenine	Cd- rozeta	Cd- cv. poganjek
Črnivec	Č1	10,93	11,87	61,75
	Č2	18,65	10,01	93,18
	Č3	61,52	4,914	42,09
	Č4	18,6	10,19	33,1
	Č5		4,3	16,35
Zaplana 1	Z1	10,78	15,29	28,38
	Z2	3,468	5,567	35,88
	Z3	3,392	5,582	32,6
	Z4	12,05	4,672	15,98
	Z5		7,024	34,59
Zaplana 2	Za1	3,944	15,89	62
	Za2	13,58	22,67	33,24
	Za3	22,29	45,9	53,11
	Za4	39,75	31,34	52,48
	Za5	24,36	30,15	41,94
Lozice	L1	18,54	12,73	43,16
	L2	15,9	12,94	30,38
	L3	21,35	8,551	44,35
	L4	21,82	11,04	37,36
	L5	16,8	11,58	36,08
Štanjel	Š1	13,06	30,07	28,48
	Š2	23,03	46,97	32,12
	Š3	17,54	19,93	20,04
	Š4	12,54	14,57	81,21
	Š5	21,56	63,58	27,06
Komen	K1	20,35	4,406	10,85
	K2	8,171	2,939	14,6
	K3	7,776	32,01	8,054
	K4	11,54	7,128	12,99
	K5	8,892	4,856	21,11
Lokovec	Lk1	50,91	84,71	162,9
	Lk2	70,94	230,8	214
	Lk3	29,86	134,6	213,6
	Lk4	35,19	89,35	173,8
	Lk5	78,18	180,1	360,3
Mežica	M1	311,4	1054	1334
	M2	125,4	742	625,6
	M3	316,7	1290	1670
	M4	491,5	3421	1738
	M5	469,3	2884	1827
Žerjav	Ž1	323,3	2223	2186
	Ž2	266,9	2566	3012
	Ž3	265,1	1384	784,3
	Ž4	177,6	1194	936,4
	Ž5	632,7	2904	
Lokovec - T.c.	Lkc1	29,45	481,9	134,9
	Lkc2	34,09	472,8	178,1
	Lkc3	88,59	547,9	207,2
	Lkc4	60,77	354,5	91,65
	Lkc5	120	516,6	205,7

Priloga F: Koncentracije Pb v rastlinskih tkivih (mg kg⁻¹).

POPULACIJA		Pb- korenine	Pb- rozeta	Pb- cv. poganjek
Črnivec	Č1	19,55	22,79	13,62
	Č2	28,53	23,96	10,52
	Č3	74,92	17,79	16,25
	Č4	22,65	31,89	14,25
	Č5		12,54	19,95
Zaplana 1	Z1	35,44	32,13	38,15
	Z2	41,56	43,64	24,54
	Z3	31,19	54,42	26,25
	Z4	46,56	48,88	24,38
	Z5		45,13	21,66
Zaplana 2	Za1	15,5	21,95	5,994
	Za2	3,803	22,96	4,324
	Za3	17,19	23,45	5,126
	Za4	7,548	27,94	3,955
	Za5	6,08	13,55	4,367
Lozice	L1	14,67	22,44	11,37
	L2	11,39	13,8	13,24
	L3	9,921	25,49	16,08
	L4	21,65	31,58	15,62
	L5	12,37	15,73	7,78
Štanjel	Š1	2,834	13,85	11,92
	Š2	9,804	25,18	11,63
	Š3	10,64	23,54	6,492
	Š4	7,339	11,54	6,774
	Š5	13,65	14,84	17,58
Komen	K1	21,34	9,031	5,328
	K2	6,796	7,917	6,066
	K3	0,766	33,79	2,899
	K4	4,779	14,85	2,574
	K5	3,029	18,41	6,218
Lokovec	Lk1	10,7	16,76	3,738
	Lk2	4,287	42,23	2,393
	Lk3	13,4	14,455	2,415
	Lk4	29,34	13,63	2,241
	Lk5	2,14	5,581	2,899
Mežica	M1	674,1	1623	111,8
	M2	800,9	997,8	81,07
	M3	1206	1011	200,4
	M4	772,4	1181	62,22
	M5	1676	2511	96,02
Žerjav	Ž1	1587	6255	494,8
	Ž2	1293	2614	579,9
	Ž3	2331	4591	367,1
	Ž4	4449	2828	318,8
	Ž5	4528	5181	
Lokovec - T.c.	Lkc1	2,379	6,897	7,562
	Lkc2	4,923	7,805	5,762
	Lkc3	7,635	7,7	4,743
	Lkc4	2,79	27,81	3,21
	Lkc5	2,01	3,297	2,465

Priloga G: Bioakumulacijski faktorji za Zn, Cd in Pb.

POPULACIJA		Zn-BAF	Cd-BAF	Pb-BAF
Črnivec	Č1	714,23	38,04	0,56
	Č2	987,77	35,50	0,91
	Č3	990,03	14,37	0,87
	Č4	1030,36	35,88	0,97
	Č5	252,66	13,56	0,29
Zaplana 1	Z1	180,84	69,50	0,27
	Z2	256,12	23,39	1,85
	Z3	61,09	11,19	0,30
	Z4	146,41	22,57	0,79
	Z5	142,69	31,22	0,57
Zaplana 2	Za1	645,66	134,66	6,65
	Za2	181,78	68,49	0,28
	Za3	1212,46	221,74	6,59
	Za4	717,32	140,54	0,19
	Za5	218,62	129,96	0,03
Lozice	L1	391,53	32,39	0,35
	L2	462,04	61,04	0,35
	L3	778,96	38,52	0,22
	L4	755,94	34,94	0,56
	L5	774,46	35,30	0,53
Štanjel	Š1	126,85	68,34	0,29
	Š2	431,56	63,47	0,64
	Š3	346,83	37,75	0,15
	Š4	496,75	15,15	0,04
	Š5	166,56	90,31	1,11
Komen	K1	269,28	5,54	0,06
	K2	42,46	4,96	0,08
	K3	615,21	38,61	1,68
	K4	159,83	13,60	0,22
	K5	116,81	9,60	0,19
Lokovec	Lk1	248,27	82,40	0,19
	Lk2	39,38	179,75	0,44
	Lk3	497,98	126,74	0,20
	Lk4	97,05	74,15	0,11
	Lk5	149,49	160,37	0,03
Mežica	M1	28,60	174,65	1,81
	M2	28,55	106,02	1,74
	M3	29,28	183,81	1,72
	M4	29,99	131,02	1,27
	M5	29,75	94,06	1,73
Žerjav	Ž1	40,45	58,00	0,75
	Ž2	49,01	136,71	0,43
	Ž3	15,76	25,44	0,38
	Ž4	19,33	21,17	0,24
	Ž5	38,23	121,40	0,74
Lokovec - T.c.	Lkc1	1453,18	184,28	0,02
	Lkc2			
	Lkc3	1079,63	535,06	0,01
	Lkc4	1142,38	1061,38	0,55
	Lkc5	3490,42	438,17	0,06

Priloga H: TF rozeta/korenine in TF cvetni poganjek/rozeta za Zn, Cd in Pb.

POPULACIJA		Zn TF- r/k	Zn TF- cv/r	Cd TF- r/k	Cd TF- cv/r	Pb TF- r/k	Pb TF- cv/r
Črnivec	Č1	6,95	1,06	1,09	5,20	1,17	0,60
	Č2	8,04	0,94	0,54	9,31	0,84	0,44
	Č3	2,60	0,53	0,08	8,57	0,24	0,91
	Č4	9,64	0,34	0,55	3,25	1,41	0,45
	Č5		0,96		3,80		1,59
Zaplana 1	Z1	5,95	0,66	1,42	1,86	0,91	1,19
	Z2	5,59	0,71	1,61	6,45	1,05	0,56
	Z3	3,19	1,52	1,65	5,84	1,74	0,48
	Z4	7,91	0,75	0,39	3,42	1,05	0,50
	Z5		0,62		4,92		0,48
Zaplana 2	Za1	3,90	0,76	4,03	3,90	1,42	0,27
	Za2	4,20	0,97	1,67	1,47	6,04	0,19
	Za3	3,71	0,33	2,06	1,16	1,36	0,22
	Za4	6,28	0,38	0,79	1,67	3,70	0,14
	Za5	7,35	0,55	1,24	1,39	2,23	0,32
Lozice	L1	4,50	0,46	0,69	3,39	1,53	0,51
	L2	5,30	0,48	0,81	2,35	1,21	0,96
	L3	7,90	0,70	0,40	5,19	2,57	0,63
	L4	10,22	0,63	0,51	3,38	1,46	0,49
	L5	7,67	0,36	0,69	3,12	1,27	0,49
Štanjel	Š1	7,38	0,47	2,30	0,95	4,89	0,86
	Š2	9,31	0,42	2,04	0,68	2,57	0,46
	Š3	5,19	0,54	1,14	1,01	2,21	0,28
	Š4	16,93	0,53	1,16	5,57	1,57	0,59
	Š5	3,44	0,65	2,95	0,43	1,09	1,18
Komen	K1	4,65	0,85	0,22	2,46	0,42	0,59
	K2	1,30	2,10	0,36	4,97	1,16	0,77
	K3	12,78	0,24	4,12	0,25	44,11	0,09
	K4	3,42	0,99	0,62	1,82	3,11	0,17
	K5	10,36	0,67	0,55	4,35	6,08	0,34
Lokovec	Lk1	6,74	0,44	1,66	1,92	1,57	0,22
	Lk2	4,92	0,77	3,25	0,93	9,85	0,06
	Lk3	11,42	0,59	4,51	1,59	1,08	0,17
	Lk4	4,64	1,03	2,54	1,95	0,46	0,16
	Lk5	2,76	0,79	2,30	2,00	2,61	0,52
Mežica	M1	10,07	0,44	3,38	1,27	2,41	0,07
	M2	4,41	0,36	5,92	0,84	1,25	0,08
	M3	3,62	0,54	4,07	1,29	0,84	0,20
	M4	10,80	0,27	6,96	0,51	1,53	0,05
	M5	4,14	0,50	6,15	0,63	1,50	0,04
Žerjav	Ž1	17,19	0,47	6,88	0,98	3,94	0,08
	Ž2	19,32	0,01	9,61	1,17	2,02	0,22
	Ž3	7,27	0,61	5,22	0,57	1,97	0,08
	Ž4	4,13	0,45	6,72	0,78	0,64	0,11
	Ž5	10,60		4,59		1,14	
Lokovec - T.c.	Lkc1	38,86	0,19	16,36	0,28	2,90	1,10
	Lkc2	23,58	0,28	13,87	0,38	1,59	0,74
	Lkc3	43,02	0,27	6,18	0,38	1,01	0,62
	Lkc4	11,05	0,13	5,83	0,26	9,97	0,12
	Lkc5	31,40	0,22	4,31	0,40	1,64	0,75

Priloga I: Mikorizni parametri.

POPULACIJA		F%	M%	A%
Črnivec	Č1	100	60,06	37,48
	Č2	53,33	7,33	0,47
	Č3	33,33	1,4	0,03
	Č4	60	5,8	1,23
	Č5	73,33	10,07	0,03
Zaplana 1	Z1	30	8,45	5,2
	Z2	45	6,2	6,3
	Z3	55	13,8	0
	Z4	68	10	1,2
	Z5	72	6,8	8
Zaplana 2	Za1	26	3,5	2,2
	Za2	75	5	3
	Za3	66	2,1	4,5
	Za4	59	5,6	0
	Za5	40	8	0
Lozice	L1	73,33	1,8	0
	L2	73,33	1	0
	L3	54,55	0,55	0
	L4	85,71	3,14	0
	L5			
Štanjel	Š1	100	9,93	3,47
	Š2	53,33	3	0
	Š3	69,23	6,38	0
	Š4	33,33	0,33	0
	Š5	73,33	0,73	0
Komen	K1	21,43	0,21	0
	K2	26,67	0,27	0
	K3	60	0,6	0
	K4	57,14	0,57	0
	K5	33,33	0,6	0
Lokovec	Lk1	33,33	0,33	0
	Lk2	30,77	0,31	0
	Lk3	54,55	1,64	0
	Lk4	12,5	0,13	0
	Lk5			
Mežica	M1	93,33	3,07	0
	M2	83,33	1,5	0
	M3	86,67	34,13	0
	M4	86,67	15,4	1,07
	M5	85,71	3,79	0,23
Žerjav	Ž1	40	2,6	0
	Ž2	40	0,4	0
	Ž3	27,27	0,27	0
	Ž4			
	Ž5	0	0	0
Lokovec - T.c.	Lkc1	0	0	0
	Lkc2	0	0	0
	Lkc3			
	Lkc4	0	0	0
	Lkc5	7,14	0,07	0