

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Diana MARGUČ

**VPLIV KADMIJA, CINKA IN SVINCA NA PRIVZEM MINERALNIH
HRANIL IN SINTEZO ŠKROBA PRI POPULACIJAH RANEGA
MOŠNJAKA Z ONESNAŽENEGA IN NEONESNAŽENEGA
RASTIŠČA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECTS OF CADMIUM, ZINC AND LEAD ON THE UPTAKE OF
MINERAL NUTRIENTS AND STARCH SYNTHESIS ON
POPULATIONS OF THLASPI PREACOX WULFEN FROM
POLLUTED AND UNPOLLUTED SITES**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer je bila izvedena večina poskusov. Meritve so bile opravljene tudi na Inštitutu Jožef Stefan, na Odseku za fiziko nizkih in srednjih energij (F2) v Ljubljani in na Kemijskem inštitutu v Laboratoriju za strukturo biomolekul (L14) v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Katarino Vogel-Mikuš in za recenzentko prof. dr. Marjano Regvar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Jasna DOLENC KOCE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

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

Datum zagovora: 21. 9. 2016

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.

Diana Marguč

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 581.5(043.2)=163.6
KG *Noacca preacox* Wulfen/Cd/ Zn/Pb/mineralna prehrana/sinteza škroba/ogljikovi hidrati/hiperakumulacija/primerjava populacij
AV MARGUČ, Diana
SA VOGEL-MIKUŠ Katarina (mentor)/REGVAR, Marjana (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2016
IN VPLIV KADMIJA, CINKA IN SVINCA NA PRIVZEM MINERALNIH HRANIL
IN SINTEZO ŠKROBA PRI POPULACIJAH RANEGA MOŠNJAKA Z
ONESNAŽENEGA IN NEONESNAŽENEGA RASTIŠČA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XVI, 124 str., 21 pregl., 37 sl., 4 pril., 104 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Namen raziskave je bila primerjava odziva dveh populacij ranega mošnjaka iz s Cd, Pb in Zn onesnaženega (Žer.) in neonesnaženega (Zap.) območja na povečevanje izpostavljenosti onesnaženi žerjavski prsti (izpostavitve 0 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %). Opazovali smo biokemijske in morfološke spremembe rastlin. Biomasa rastlin je pri obeh populacijah z večanjem izpostavljenosti onesnaženja naraščala do vključno izpostavitve 75 %, nato je upadla. Populaciji se po sveži biomasi nista razlikovali. Zap. je imela večjo suho biomaso poganjkov, Žer. pa je vsebovala večji delež vode v poganjkih in koreninah. Delež vode se po izpostavitvah ne spreminja, le pri izpostavitvi 0 % je manjši. V poganjkih smo določili vsebnosti fotosinteznih pigmentov in sladkorjev. Koncentracije klorofila a in karotenoidov so naraščale z večanjem izpostavljenosti. Večje koncentracije klorofila a, b in karotenoidov je vsebovala Žer. Z metodama AACC 76.13 in FTIR-ATR smo določali vsebnost sladkorjev v poganjkih. Z naraščanjem onesnaženja (izpostavitve 50 %, 75 %) se je pri Zap. pričel kopičiti škrob v poganjkih. Medtem, ko tega pri Žer. nismo opazili. Pri izpostavitvi 100 % je prišlo do upadanja vsebnosti škroba. Z naraščanjem onesnaženja se je dvignila produkcija pektinov in lignina. Hitrejši odziv je značilen za Žer. Z XRF metodo smo izmerili vsebnost elementov (Cd, Pb, Zn, Ca, K, Mn, Fe) v rastlinskem materialu ter substratu. Zanimala nas je sposobnost akumulacije Cd, Pb in Zn v rastlini ter vpliv na privzem esencialnih elementov v rastlino. Obe populaciji sta se izkazali za hiperakumulatorja Cd. Večje koncentracije Pb je v poganjkih kopičila Žer., Zap. pa več Zn v koreninah. Elementna sestava substrata se je po izpostavitvah razlikovala, kar zmanjša kredibilnost rezultatov o vplivu izpostavljenosti onesnaženja na mineralno prehrano, vendar še vedno so bile mogoče primerjave populacij znotraj posamezne izpostavitve. Pri koncentraciji K in Ca ni bilo razlik med populacijama. Žer. je kopičila več Mn v poganjkih, Zap. pa več Mn in Fe v koreninah. Za Žer. so značilni višji TF za Fe, Mn, Ca, K in Zn, medtem ko za Zap. večji BAF za Fe in Mn.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 581.5(043.2)=163.6
CX *Noacca preacox* Wulfen/Cd/Zn/Pb/mineral nutrition/starch
synthesis/carbohydrates/hyperaccumulation/comparison of populations
AU MARGUČ, Diana
AA VOGEL-MIKUŠ, Katarina (supervisor)/REGVAR, Marjana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2016
TI EFFECTS OF CADMIUM, ZINC AND LEAD ON THE UPTAKE OF MINERAL
NUTRIENTS AND STARCH SYNTHESIS ON *Thlaspi preacox* Wulfen FROM
POLLUTED AND UNPOLLUTED SITES
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XVI, 124 p., 21 tab., 37 fig., 4 ann., 104 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The main goal of this thesis was comparison of two populations of pennycress (*Noccea preacox* Wulfen) from with Cd, Pb and Zn polluted (Žer.) and unpolluted (Zap.) site, and observation of their response to different percentage of exposure to polluted soil from Žerjav (0 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 % exposure). We observed plant's biochemical and morfological changes. An increase of plant biomass with higher percentage of exposure was shown for both populations, all until 100 % of exposure when the biomass decreased. There was no difference between populations when it comes to fresh biomass, but higher shoot dry biomass was characteristic for Zap. Žer. had higher content of water in both shoots and roots than Zap. The content of water didn't change between different exposures except for 0 % exposure where it was the lowest. Photosynthetic pigments and sugars were also measured in plant shoots. Concentrations of chlorophyll a and carotenoids increased with pollution. Concentrations of chlorophylls a, b and carotenoids were higher in Žer. Content of shoot sugars were measured with FTIR-ATR and AACC 76.13 method. With increased exposure to pollution the content of shoot starch increased (50 % and 75 % exposure) in Zap. The same effect wasn't observed for Žer. The content of shoot starch has decreased for 100 % exposure. With XRF the concentrations of elements (Cd, Pb, Zn, Ca, K, Mn, Fe) in plants and soil was measured. We were wondering about the difference in plant accumulation capability of Cd, Pb and Zn and their effect on the plant uptake of other essential elements. Both populations proved to be good hyperaccumulators of Cd. Žer. accumulated higher shoot concentrations of Pb, while higher concentrations of root Zn were characteristic for Zap. The elemental concentration between different percentages of exposure differed, that is why the results of the effect on mineral nutrition between different exposures can't be trusted. Still the elemental structure between two populations inside the same exposure was similar enough that we can compare effects on the population. There was no difference between concentrations of Ca and K between two populations. But when it comes to Mn Žer. had higher shoot concentrations, while Zap. had higher root concentrations. Zap. had as well higher root Fe concentration. The TF for Fe, Mn, Ca, K and Zn were higher for Žer., while BAF for Fe and Mn were higher for Zap.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	X
Kazalo slik	XII
Kazalo prilog	XV
Okrajšave in simboli	XVI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 Topnost kovin v tleh ter njihov privzem in transport po rastlini	4
2.2 Toleranca	6
2.2.1 Strategije privzema in toleranca kovin	6
2.3 HIPERAKUMULACIJSKE RASTLINE	8
2.3.1 Razvoj hiperakumulacije	9
2.4 FITOREMEDIACIJA	10
2.5 RANI MOŠNJAK (<i>Noccaea (Thlaspi) precox</i> Wulfen)	12
2.5.1 Uvrstitev v sistem	12
2.5.2 Opis vrste	12
2.5.3 Akumulacija kovin	13
2.6 NEGATIVNI UČINKI KOVIN NA RASTLINE	13
2.6.1 Oksidativni stres	14
2.6.2 Kadmij	15
2.6.3 Svinec	16
2.6.4 Cink	18
2.6.5 Vpliv Cd, Pb in povišanih koncentracij Zn na mineralno prehrano rastline	19
2.6.6 Vpliv Cd, Pb in povišanih koncentracij Zn na fotosintezo	19

2.6.7	Vpliv Cd, Pb in povišanih koncentracij Zn na metabolizem ogljikovih hidratov	21
2.7	Shranjevanje in razstrupitev kovin	23
3	MATERIAL IN METODE	26
3.1	OPIS LOKACIJ	26
3.1.1	S Cd, Pb in Zn onesnaženo območje Žerjava	26
3.1.2	S Cd, Pb in Zn neonesnaženo območje Zaplane	27
3.2	NASTAVITEV POSKUSA	27
3.2.1	Priprava substrata	27
3.2.2	Sajenje in vzgoja rastlin	28
3.3	POBIRANJE MATERIALA	29
3.3.1	Pospravljanje, merjenje in tehtanje materiala	29
3.3.2	Predpriprava rastlinskega materiala za analizo	30
3.3.3	Predpriprava substrata za analizo	30
3.4	Analizne metode	30
3.4.1	Rentgensko fluorescenčna spektroskopija (XRF)	30
3.4.2	Osnove infrardeče spektrometrije s Fourierjevo transformacijo	33
3.4.2.1	Potek analize vzorca z metodo FTIR	33
3.4.2.2	FTIR-ATR	35
3.5	ANALIZA VZORCEV TAL	36
3.5.1	Določanje pH prsti	36
3.5.2	Določanje skupne organske snovi po Kromu	37
3.5.3	Določanje celokupnih koncentracij elementne sestave v vzorcih zemlje z metodo XRF	38
3.6	ANALIZE VZORCEV RASTLINSKEGA MATERIALA	38
3.6.1	Analiza fotosinteznih pigmentov	38
3.6.2	Analiza vsebnosti škroba v poganjkih po metodi AACC 76.13	39
3.6.2.1	Priprava spojin	40
3.6.2.2	Priprava vzorcev	41
3.6.2.3	Potek meritev	41
3.6.3	Določanje sladkorjev v poganjkih s FTIR metodo	42

3.6.4	Določanje celokupnih koncentracij elementov v rastlinskem materialu z metodo XRF	43
3.6.5	Računanje mobilnosti elementov v rastlini	43
3.7	STATISTIČNA ANALIZA	44
4	REZULTATI	45
4.1	ANALIZA SUBSTRATA	45
4.2	ANALIZA RASTLINSKEGA MATERIALA	46
4.2.1	Morfologija	46
4.2.2	Biomasa rastlin	48
4.2.2.1	Sveža masa korenin	48
4.2.2.2	Suha masa	50
4.2.2.3	Delež vode v koreninah	53
4.2.3	Biokemijske analize	55
4.2.3.1	Fotosintezni pigmenti	55
4.2.3.2	Vsebnost škroba	58
4.2.3.2.1	AACC metoda 76.13	58
4.2.3.2.2	FTIR-ATR analiza ogljikovih hidratov	60
4.2.4	Elementna sestava rastlinskega materiala	63
4.2.4.1	Koncentracije Cd v rastlinah	63
4.2.4.2	Koncentracije Zn v rastlinah	66
4.2.4.3	Koncentracije Pb v rastlinah	68
4.2.4.4	Koncentracije K v rastlinah	71
4.2.4.5	Koncentracije Ca v rastlinah	73
4.2.4.6	Koncentracije Mn v rastlinah	73
4.2.4.7	Koncentracije Fe v rastlinah	76
4.2.5	Mobilnost elementov	78
4.2.5.1	Mobilnost Cd	79
4.2.5.2	Mobilnost Zn	80
4.2.5.3	Mobilnost Pb	81
4.2.5.4	Mobilnost Mn	82
4.2.5.5	Mobilnost Fe	83
5	RAZPRAVA	84

5.1	SESTAVA SUBSTRATA	84
5.1.1	Primerjava substrata po izpostavitvah onesnaženosti	84
5.1.2	Vrednost pH in organska snov	85
5.1.3	Primerjava substratov znotraj enake izpostavitve onesnaženja med populacijama	86
5.2	BIOMASA RASTLIN	87
5.2.1	Vpliv povečanja koncentracije Zn, Cd in Pb v substratu na biomaso rastlin	87
5.2.2	Vpliv populacije na biomaso rastlin iz s Cd, Zn in Pb onesnaženega substrata	88
5.3	DELEŽ VODE V RASTLINI	90
5.3.1	Vpliv povečanja koncentracije Cd, Zn in Pb v substratu na delež vode v rastlini	90
5.3.2	Vpliv populacije na delež vode v rastlinah	91
5.4	FOTOSINTEZNI PIGMENTI	92
5.4.1	Vpliv povečanja koncentracije Cd, Zn in Pb v substratu na klorofil a in b	92
5.4.2	Vpliv populacije na klorofil a in b v rastlinah, ki so rasle na s Cd, Pb in Zn onesnaženih tleh	93
5.4.3	Vpliv deleža onesnaženosti substrata na koncentracijo karotenoidov	94
5.4.4	Vpliv populacij na koncentracijo karotenoidov	95
5.5	SLADKORJI	95
5.5.1	Vpliv deleža onesnaženja na produkcijo in transport sladkorjev	95
5.5.2	Vpliv populacije na sintezo in transport sladkorjev	97
5.5.3	Vpliv deleža onesnaženja s Cd, Pb in Zn ter populacije na strukturne sladkorje	97
5.6	ELEMENTNA SESTAVA RASTLINSKEGA MATERIALA	98
5.6.1	Kadmij	99
5.6.1.1	Akumulacija Cd, Zn in Pb po izpostavitvah	99
5.6.1.2	Sposobnost hiperakumulacije Cd pri obeh ekotipih <i>N. preacox</i>	100
5.6.2	Cink	101
5.6.2.1	Sposobnost hiperakumulacije Zn pri obeh ekotipih <i>N. preacox</i>	101
5.6.2.2	Vpliv deleža onesnaženja na privzem Zn	102
5.6.2.3	Vpliv populacije na koncentracijo Zn v rastlini	103

5.6.2.4	Primerjava razvoja hiperakumulacije Zn in tolerance za TK med populacijama	105
5.6.3	Svinec	106
5.6.3.1	Sposobnost hiperakumulacije Pb pri obeh ekotipih <i>N. preacox</i>	106
5.6.3.2	Vpliv deleža onesnaženja na koncentracije Pb v rastlinah.	106
5.6.3.3	Vpliv populacije na koncentracijo Pb v rastlinah	107
5.6.4	Kalij	107
5.6.4.1	Vpliv koncentracije Cd, Pb in Zn v substratu na koncentracijo K v rastlini	107
5.6.4.2	Vpliv populacije na koncentracijo K v rastlini	108
5.6.5	Kalcij	109
5.6.5.1	Vpliv koncentracije Cd, Pb in Zn v substratu ter populacije na koncentracijo Ca v rastlini	109
5.6.6	Mangan	109
5.6.6.1	Vpliv koncentracije Cd, Pb in Zn na koncentracijo Mn v rastlini	109
5.6.6.2	Vpliv populacije na koncentracijo Mn v rastlini	110
5.6.7	Železo	111
5.6.7.1	Vpliv koncentracije Cd, Pb in Zn v substratu na koncentracijo Fe v rastlini	111
5.6.7.2	Vpliv populacije na koncentracijo Fe v rastlini	112
6	SKLEPI	113
7	POVZETEK	115
8	VIRI	117

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Lastnosti substrata zaplanske populacije pri različnih izpostavitvah onesnaženju.	45
Preglednica 2: Lastnosti substrata žerjavske populacije pri različnih izpostavitvah onesnaženju.	46
Preglednica 3: Prikaz faktorske analize za svežo maso korenin in poganjkov med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije.	49
Preglednica 4: Rezultat faktorske analize suhe biomase korenin in poganjkov med žerjavsko in zaplansko populacijo.	51
Preglednica 5: Prikaz faktorske analize za delež vode v koreninah in poganjkih med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije.	53
Preglednica 6: Prikaz faktorske analize rastlinskih pigmentov klorofila a, klorofila b in kartenoidov pri različnem deležu onesnaženosti med rastlinami žerjavske populacije in zaplanske populacije.	56
Preglednica 7: Prikaz faktorske analize deleža škroba na suho in svežo maso poganjkov žerjavske in zaplanske populacije rastlin, ki so rastle na substratih z različnim onesnaženjem.	58
Preglednica 8: Prikaz faktorske analize koncentracije Cd (mg/kg) v koreninah in poganjkih pri različnih deležih onesnaženja substrata med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije.	64
Preglednica 9: Prikaz faktorske analize koncentracije Zn (mg/kg) v koreninah in poganjkih pri različnih deležih onesnaženja substrata med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije.	67
Preglednica 10: Prikaz faktorske analize koncentracije Pb (mg/kg) v koreninah in poganjkih pri različnih deležih onesnaženja substrata med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije.	69
Preglednica 11: Prikaz faktorske analize koncentracije K (mg/kg) v koreninah in poganjkih pri različnih deležih onesnaženja substrata med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije.	72

Preglednica 12: Prikaz factorske analize koncentracije Mn (mg/kg) v koreninah in poganjkih pri različnem deležu onesnaženja substrata med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije.	74
Preglednica 13: Prikaz factorske analize koncentracije Fe (mg/kg) v koreninah pri različnih deležih onesnaženja substrata med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije.	76
Preglednica 14: Primerjava bioakumulacijskega faktorja elementov pri različnem deležu onesnaženosti substrata med zaplansko in žerjavsko populacijo.	78
Preglednica 15: Primerjava translokacijskega faktorja elementov pri različnem deležu onesnaženosti substrata med zaplansko in žerjavsko populacijo.	79
Preglednica 16: Prikaz factorske analize translokacijskega faktorja za Cd (mg/kg) med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije pri substratih z različnim deležem onesnaženja.	80
Preglednica 17: Prikaz factorske analize bioakumulacijskih faktorjev in translokacijskega faktorja za Zn med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije.	81
Preglednica 18: Prikaz factorske analize bioakumulacijskih faktorjev in translokacijskega faktorja za Pb med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije.	82
Preglednica 19: Prikaz factorske analize bioakumulacijskih faktorjev in translokacijskega faktorja za Mn med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije.	83
Preglednica 20: Prikaz factorske analize bioakumulacijskih faktorjev in translokacijskega faktorja za Fe med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije.	84
Preglednica 21: Preglednica značilnih razlik v mobilnosti in koncentraciji elementov, fotosintetskih pigmentov, vsebnosti škroba ter biomase rastlin po izpostavitvah med populacijama <i>N. preacox</i> iz onesnaženega (Žerjav) in neonesnaženega (Zaplana) rastišča.	99

KAZALO SLIK

str.

Slika 1: Shematska ponazoritev privzema in transporta kovin v in po rastlini	5
Slika 2: Krivulje odvisnosti koncentracije kovin v tkivih od koncentracije kovin v tleh pri rastlinah z različnimi strategijami privzema kovin	8
Slika 3: Rani mošnjak <i>Nocceae (Thlaspi) preacox</i> Wulfen	13
Slika 4: Rast rastlin v rastni komori	29
Slika 5: Princip vzbujanja elektronov rentgenske fluorescenčne spektrometrije	31
Slika 6: Slika delovanja rentgenske fluorescenčne spektroskopije	32
Slika 7: Shematičen prikaz poteka FTIR meritve	35
Slika 8: Slika večkratnega odboja sistema ATR	36
Slika 9: Primer poganjka, korenine ter zemeljskega substrata	38
Slika 10: Uprašeni poganjki v 80 % acetonu po vorteksiranju.	39
Slika 11: Prikaz razlike v barvnih odtenkih med populacijama.	39
Slika 12: Obarvanost vzorcev s kinoniminom.	42
Slika 13: Prikaz rasti ranega mošnjaka pred pobiranjem materiala.	47
Slika 14: Pobran in očiščen rastlinski material, pripravljen za ločevanje poganjkov in korenin.	47
Slika 15: Sveža masa korenin pri populacijah ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	49
Slika 16: Sveža masa poganjkov pri populacijah ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	50
Slika 17: Suha masa korenin pri populacijah ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	52
Slika 18: Suha masa poganjkov pri populacijah ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	52
Slika 19: Delež vode v koreninah rastlin pri populacijah ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	54
Slika 20: Delež vode v poganjkih rastlin pri populacijah ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	55

Slika 21: Primerjava koncentracij fotosinteznih pigmentov (mg/g) pri populacijah ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	57
Slika 22: Primerjava deleža škroba v suhi masi poganjkov rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	59
Slika 23: Primerjava deleža škroba v sveži masi poganjkov rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	59
Slika 24: FTIR-ATR spekter primerjave ogljikovih hidratov v poganjkih ranega mošnjaka zaplanske in žerjavske populacije po izpostavitvah 0 %, 50 %, 100 %.	63
Slika 25: Primerjava koncentracij Cd (mg/kg) v koreninah rastlin populacij ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	65
Slika 26: Primerjava koncentracij Cd (mg/kg) v poganjkih rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	65
Slika 27: Primerjava koncentracij Zn (mg/kg) v koreninah rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	67
Slika 28: Primerjava koncentracij Zn (mg/kg) v poganjkih rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	68
Slika 29: Primerjava koncentracij Pb (mg/kg) v koreninah rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	70
Slika 30: Primerjava koncentracij Pb (mg/kg) v poganjkih ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	70
Slika 31: Primerjava koncentracije K (mg/kg) v koreninah rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	72
Slika 32: Primerjava koncentracij K (mg/kg) v poganjkih rastlin vrste ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	73
Slika 33: Primerjava koncentracij Mn (mg/kg) v koreninah rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	75
Slika 34: Primerjava koncentracij Mn (mg/kg) v poganjkih rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	75
Slika 35: Primerjava koncentracij Fe (mg/kg) v koreninah rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	77
Slika 36: Primerjava koncentracij Fe (mg/kg) v poganjkih rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja.	77

Slika 37: Barvni diagram lastnosti tal (pH, organske snovi, koncentracije elementov) pri različnih izpostavitvah z dodanimi drevesi podobnosti na osnovi analize grozdov.

86

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Faktorska analiza in grafični prikaz koncentracije Ca (mg/kg) v poganjkih in koreninah

PRILOGA A1: Faktorska analiza koncentracije Ca (mg/kg) rastlin

PRILOGA A2: Koncentracije Ca (mg/kg) v koreninah

PRILOGA A3: Koncentracija Ca (mg/kg) v poganjkih

PRILOGA B: Faktorska analiza koncentracije Fe (mg/kg) v koreninah

PRILOGA C: Faktorska analiza BAF za Cd

PRILOGA D: Koncentracije elementov substrata in rastlinskega materiala ter koncentracije pigmentov in sladkorjev

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

3P	trioza fosfat
AACC metoda 76.13	amiloglukozidazna/ α -amilazna metoda
AAS	atomska absorpcijska spektrometrija
AK	amino kisline
ALA	alfalinolenska kislina
AM	arbuskularna mikoriza
ATR	oslabljen popolni odboj
Au	zlato
BAF	bioakumulacijski faktor
Ca, Ca²⁺	kalcij, kalcijev ion
Cd, Cd²⁺	kadmij, kadmijev ion
CHO	ogljikovi hidrati
Fe, Fe²⁺	železo, železov ion
FSI	fotosistem I
FSII	fotosistem II
FTIR	infrardeča spektroskopija z uporabo Fourierjeve transformacije
H⁺	proton
HMA	prenašalci težkih kovin (angl. heavy metal associated protein)
Mg, Mg²⁺	magnezij, magnezijev ion
Mn, Mn²⁺	mangan, manganov ion
NK	nukleinske kisline
NRAMP	prenašalci družine NRAMP (angl. natural resistance associated macrophage protein)
Pb	svinec
ROS	reaktivne kisikove spojine
RUBISCO	ribuloza – 1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza
SOD	superoksid dismutaza
TF	translokacijski faktor
TK	težke kovine

XRF	standardna rentgenska fluorescenčna spektrometrija
ZIP	prenašalci družine ZIP (angl. zinc-regulated and iron regulated transporter-like proteins)
YSL	prenašalci družine YSL (ang. yellow stripe-like)

1 UVOD

Eden izmed pomembnih okoljskih problemov v današnjem času je onesnaževanje tal s težkimi kovinami (Gosh in Singh, 2005). Z izrazom »težke kovine« (TK) označujemo elemente s kovinskimi lastnostmi, ki imajo atomsko maso med 63,54 in 200,59, atomsko število večje od 20 ter specifično težo večjo od 4. Mednje uvrščamo svinec (Pb), kadmij (Cd), nikelj (Ni), kobalt (Co), železo (Fe), cink (Zn), krom (Cr), arzen (As), srebro (Ag), živo srebro (Hg), antimon (Sb), baker (Cu), mangan (Mn), molibden (Mo) ter platinoide (Ru, Rh, Pd, Os, Ir, Pt) (Gosh in Singh, 2005; Nagajyoti in sod., 2010).

V Sloveniji so glavni vzroki antropogenega vnosa kovin v okolje rudarstvo in predelava rude, promet in kmetijstvo (Šajn in Gosar, 2004). Emisije, predvsem Pb, Zn in Cd, so se nakopičile v tleh, od koder so dostopne rastlinam, s tem pa vstopajo v prehranjevalne spletke in so nevarne tudi za zdravje živali in ljudi (Svet za varstvo okolja RS, 2009). Onesnaženje prsti zaradi industrije se navadno kaže v onesnaženju površinskih delov prsti in sega le nekaj centimetrov v globino (Vreča in sod., 2001). Eno izmed najbolj onesnaženih okolij v Sloveniji je Žerjav v Mežiški dolini. V 19. stol. je postal središče metalurške dejavnosti, kar je negativno vplivalo na okolje. Prišlo je do onesnaženja z žveplovim dioksidom (SO₂), Pb, Cd in Zn. Na tako onesnaženih območjih lahko življenjski cikel zaključijo le tiste rastline, ki so evolucijsko prilagojene (tolerantne) na povečano koncentracijo teh kovin v tleh (Reeves, 2006). Rani mošnjak (*Noccaea (Thlaspi) preacox* Wulfen) iz družine križnic (*Brassicaceae*) je trajnica, ki je sposobna hiperakumulirati Cd, Zn in Pb (Pongrac in sod., 2008).

Kljub temu, da so nekatere kovine esencialne, pa so v visokih koncentracijah vse strupene, saj povzročajo oksidativni stres s tvorbo prostih radikalov. Obenem lahko pride do zamenjave esencialnih kovin v pigmentih in encimih z neesencialnimi, kar povzroča motnje v njihovem delovanju (Gosh in Singh, 2005).

Kadmij in svinec v rastlinah nimata nobene znane biološke funkcije oz. sta za rastlino celo strupena. Kadmij negativno vpliva na kalitev semen, rast rastline, tvorbo sladkorjev in sintezo klorofila, prav tako pa ovira transport esencialnih elementov, kot so Ca, Mg, K, Fe, Zn in Mn v rastlino, saj se prenaša preko istih transmembranskih prenašalcev (Shukla in sod., 2003; Küpper in Kochain, 2010).

Svinec bistveno zmanjša odstotek kaljivosti semen, dolžino rastnega vršička poganjka in korenin, zmanjšuje učinkovitost fotosinteze in izrabe vode ter povečuje stopnjo transpiracije. Zaradi tekmovanja pri privzemu naj bi zmanjševal koncentracijo K, Ca, Cu in Mg v rastlini (Adriano, 2001).

Cink je za rastline esencialni element, saj je strukturna komponenta ali kofaktor v mnogih encimih. Ima pa tudi pomembno vlogo pri metabolizmu DNA in RNA (Marschner, 1995).

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bil v kontroliranem okolju vzgojiti in primerjati dve različni populaciji hiperakumulacijske vrste ranega mošnjaka (*Noccea (Thlaspi) precox* Wulfen), eno iz s težkimi kovinami (Pb, Zn, Cd) onesnaženega območja v Žerjavu in drugo iz neonesnaženega območja na Zaplani (Vogel-Mikuš in sod., 2005). Zanimal nas je odziv rastlin obeh populacij na rast v istem substratu pod nadzorovanimi pogoji. Opazovali smo njune biokemijske in morfološke spremembe pod vplivom različnih koncentracij TK (Cd, Zn in Pb) v tleh in kako so te vplivale na mineralno sestavo, biomaso, tvorbo klorofila in vsebnost sladkorjev v rastlinah obeh populacij.

Izmerili smo koncentracijo TK in ostalih elementov v rastlinskem materialu ter substratu, v katerem so rastline rasle. Poleg ugotavljanja vpliva različnih koncentracij Cd, Zn in Pb na samo rast rastline, vsebnost klorofila in sladkorjev v rastlini, nas je zanimal tudi vpliv na privzem esencialnih elementov v rastlino. Opazovali smo tudi vpliv lastnosti substrata (vrednost pH in količina organske snovi) na privzem elementov v rastlino.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Predvidevamo, da bo žerjavsko populacija ranega mošnjaka v substratu z večjo koncentracijo TK (Cd, Pb, Zn) bolje uspevala kot zaplanska, saj je prva izvirno iz onesnaženega okolja in tako prilagojena na povečane koncentracije kovin v tleh.
- Predvidevamo, da bo žerjavsko populacija akumulirala večje količine Cd, Zn in Pb v korenine in poganjke kot zaplanska populacija.
- Predvidevamo, da bo večja koncentracija Zn, Cd in Pb negativno vplivala na privzem ostalih esencialnih elementov, kot so K, Ca, Fe in Mn, kar se bo odrazilo v motnjah rastlinskega metabolizma.
- Prisotnost Cd, Zn in Pb bo vplivala na zmanjšano tvorbo klorofila, s tem pa na fotosintezno aktivnost in tvorbo sladkorjev. Predvidevamo, da bodo pri tem negativni vplivi na zaplansko populacijo večji od vplivov na žerjavsko populacijo.

2 PREGLED OBJAV

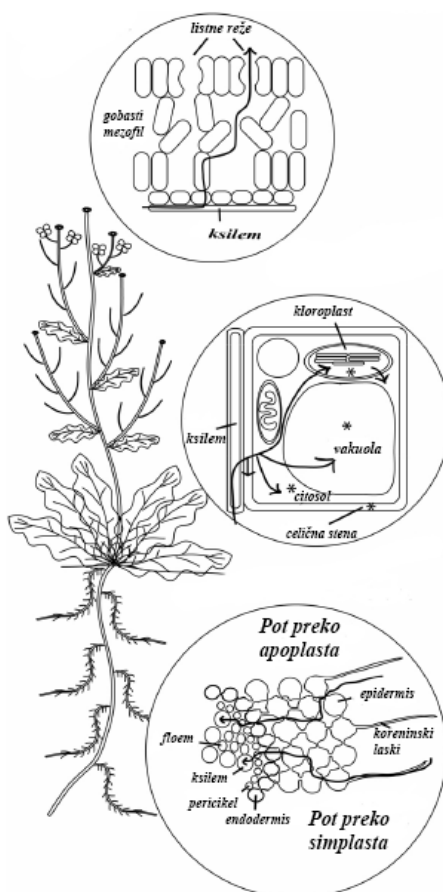
2.1 TOPNOST KOVIN V TLEH TER NJIHOV PRIVZEM IN TRANSPORT PO RASTLINI

Kovine so del zemeljske skorje. Do sproščanja visokih vsebnosti v okolje pride preko naravnih procesov preperevanja matične podlage ali pa zaradi človeške dejavnosti (Šajn in Gosar, 2004; Nagajyoti in sod., 2010).

Kovine v tleh obstajajo v različnih frakcijah. Za rastline najlažje dostopni so prosti kovinski ioni in topni kovinski kompleksi v zemeljski raztopini. Kovinski ioni, ki se specifično vežejo na anorganske zemeljske delce, so rastlinam delno dostopni. Nekatere frakcije kovin so vezane na organsko snov, lahko pa se v tleh kovine nahajajo tudi v obliki oborjene oz. netopne zmesi oksidov, karbonatov in hidroksidov (Salt in sod., 1995). Topnost kovin v tleh in vodi je odvisna od pH, količine same kovine, kationsko izmenjevalne kapacitete tal, vsebnosti organskega ogljika oz. organske snovi, oksidacijskega stanja mineralnih komponent in redoks potenciala sistema (Gosh in Singh, 2005). Največji vpliv na samo topnost in zadrževanje kovin v tleh ima pH. Pri nevtralnem in bazičnem pH so kationi kovin močno vezani na glinene frakcije ali pa vodne okside Fe, Al in Mn. Kisel pH pa doseže ravno obraten učinek, njihovo sprostitve v vodno raztopino (Salt in sod., 1995; Sheoran in sod., 2011).

Rastline so razvile dva načina desorpcije oz. sprostitve netopnih oblik zanje potrebnih kovin iz tal, in sicer z zakisanjem rizosfere ter z izločanjem ligandov s sposobnostjo kelacije. Stranski učinek desorpcije pa je tudi sprostitve za rastlino neesencialnih kovin (Peer in sod., 2005). Kelacija je proces, kjer se kovinski ioni vežejo na ligand oz. kelator (molekulo) in z njim tvorijo stabilen kompleks (Lawrence, 2005). Kovinsko-kelatni kompleksi preprečujejo precipitacijo in absorpcijo kovin na talne delce, s tem pa vzdržujejo njihovo razpoložljivost v zemlji (Salt in sod., 1995). Zakisanje tal pa rastline dosežejo z izločanjem H^+ v rizosfero. To naredijo s pomočjo aktivacije protonskih črpalk in H^+ ATP-az v plazmalemi (Salt in sod., 1995; Sheoran in sod., 2011).

Topne kovine vstopajo v rastlino preko koreninske povrhnjice (rizodermis) in koreninskih laskov do kortikalnih celic. Preko apoplastne, transmembranske in simplastne poti potujejo do žilnega sistema korenine (Vogel-Mikuš in sod., 2008; Sherameti in Varma, 2011). Za vstop kovine v koreninski ksilem morajo topljenci prečkati kasparijeve trakove, to so za topljence nepropustne prevleke iz suberina (Peer in sod., 2005; Batty in Hallberg, 2010), ki omejujejo prenos preko apoplasta (Sherameti in Varma, 2011). Kasparijevi trakovi so značilni za endodermis, pas celic med koreninsko skorjo in periciklom. Prek celic endodermisa topljenci prehajajo z aktivacijo membranskih črpalk ali kanalčkov. Strupene kovine naj bi prehajale preko črpalk in kanalčkov za esencialne kovine (Peer in sod., 2005). Po ksilemu se nato transportirajo v poganjke (Rascio in Navari-Izzo, 2011). Tam se v listne in stebelne celice razporedijo zopet preko apoplasta in simplasta (Sherameti in Varma, 2011).



Slika 1: Shematska ponazoritev privzema in transporta kovin v in po rastlini
(Prirejeno po Peer in sod., 2005: 300).

2.2 TOLERANCA

Nekatere kovine so za delovanje organizma nujno potrebne oz. esencialne (npr. Cu, Zn, Fe, Mn, Mo, Ni in Co). Brez njih rastlina ne more zaključiti življenjskega cikla (Raven in sod., 2004). Imajo pomembne biokemijske in fiziološke funkcije, saj sodelujejo v redoks reakcijah, prenosu elektronov, strukturnih funkcijah pri metabolizmu nukleinskih kislin (NK), so kofaktorji in aktivatorji encimskih reakcij, del metalo-proteinov, itd. V primeru, če presežejo mejo potrebne koncentracije, pa imajo lahko na organizem tudi negativen, strupen učinek (Nagajyoti in sod., 2010).

Neesencialne kovine (As, Sb, Cd, Cr, Hg, Pb itd.) niso nujno potrebne za delovanje in zaključek življenjskega kroga rastline (Gosh in Singh, 2005). Za organizem so celo strupene (Shukla in sod., 2003; Küpper in Kochain, 2010).

Toleranca na kovine je sposobnost preživetja in uspešnega razmnoževanja rastline, brez znakov strupenosti na za večino rastlin neprimernih oz. strupenih območjih (Hall, 2002; Bert in sod., 2000). Rast rastlin na s kovinami onesnaženih območjih je lahko rezultat podedovane oz. prirojene tolerance na kovine. Ta je prisotna pri vseh osebkih vrste, ne glede na to, ali izvirajo iz onesnaženih ali neonesnaženih območij. Lahko pa se toleranca razvije kot posledica naravne selekcije danega okolja, ta pa je značilna le za določene ekotipe oz. populacije vrste (Bert in sod., 2000).

2.2.1 Strategije privzema in toleranca kovin

Rastline, tolerantne na povišano koncentracijo kovin, se na onesnaženje odzivajo na dva načina.

Izključevalci kovin so na kovine tolerantne, neakumulacijske rastline, katerih glavna naloga je preprečitev vstopa kovin v zračna tkiva rastline (Gosh in Singh, 2005; Peer in sod., 2005; Vogel-Mikuš in sod., 2008; Memon in Schröder, 2009). To preprečijo z vzdrževanjem stalne koncentracije kovine znotraj koreninskega sistema, kar pa dosežejo s spremembo prepustnosti membrane, z vezavo kovin na celično steno, s shranjevanjem v

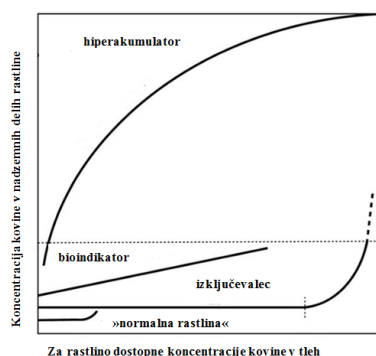
vakuolah koreninske skorje in s sproščanjem kelatnih snovi v rizosfero (Gosh in Sinhg, 2005; Peer in sod., 2005; Vogel-Mikuš in sod., 2008; Memon in Schröder, 2009). Izključevalske rastline so uspešne vse do nastopa kritične koncentracije kovine v tleh (Hall, 2002). Po nastopu te pa mehanizmi izključevanja popustijo, kar vodi v nekontroliran privzem kovin v rastlinska tkiva (Vogel-Mikuš, 2006), slednje pa navadno v smrt rastline (Van der Ent in sod., 2013).

Odnos med koncentracijami kovin v tleh in v rastlinah opiše eksponentna krivulja (Slika 2). Značilno za izključevalske rastline je, da imajo tako translokacijski (TF) kot bioakumulacijski (BAF) faktor manjši od 1. TF nam pove razmerje v koncentracijah kovine med poganjki in koreninami, BAF pa med tlemi ter nadzemnimi deli rastline in nam pokaže učinkovitost privzema kovin iz substrata (Vogel-Mikuš, 2006).

Kovinski akumulatorji so v nadzemne dele sposobni akumulirati esencialne (Fe, Mn, Zn, Cu, Mo in Ni), nekateri pa tudi za večino rastlin strupene kovine (Cd, Cr, Pb, Co, Ag in Hg), katerih biološka funkcija še ni znana (Memon in Schröder, 2009). Odnos med koncentracijami kovin v tleh in rastlinah za akumulacijske rastline najbolje opiše potenčna oz. logaritemska krivulja. Tako TF kot BAF naj bi bila večja od 1 (Vogel-Mikuš, 2006). Med akumulatorje kovin uvrščamo kovinske indikatorje ter hiperakumulatorje (Peer in sod., 2005).

Indikatorske rastline kažejo na prisotnost določenega elementa v tleh (Peer in sod., 2005). Koncentracije kovin, ki jih kopičijo v svojih nadzemnih tkivih, navadno izražajo koncentracijo teh v tleh (Memon in Schröder, 2009). Zato jih uporabljajo tudi v biogeokemijskih raziskavah (Peer in sod., 2005). Toleranco na obstoječo koncentracijo kovin pridobijo s tvorbo kelatov, ali pa s shranjevanjem kovin v neobčutljivih delih celice (Gosh in Singh, 2005).

Hiperakumulatorji so manjša skupina rastlin s sposobnostjo akumulacije ekstremno visokih koncentracij različnih kovin znotraj poganjkov. Prvi, ki je podal izraz hiperakumulacija, je bil Brooks s sodelavci že leta 1977 (Vogel-Mikuš in sod., 2012).



Slika 2: Krivulje odvisnosti koncentracije kovin v tkivih od koncentracije kovin v tleh pri rastlinah z različnimi strategijami privzema kovin (Prirejeno po Van der Ent in sod., 2013: 329).

2.3 HIPERAKUMULACIJSKE RASTLINE

Hiperakumulatorji so rastline, ki lahko absorbirajo visoke koncentracije strupenih onesnaževalcev, ki jih kopičijo v svojih poganjkih, koreninah in listih tekom rasti in reprodukcije. Najpogosteje so ti onesnaževalci kovine in nekovine (Gosh in Singh, 2005; Peer in sod., 2005). Koncentracija kovine ali nekovine, ki jo mora biti rastlina sposobna akumulirati, da jo označimo za hiperakumulatorja, je odvisna od vrste kovine oz. nekovine (Peer in sod., 2005). Baker in Brooks sta za hiperakumulatorje definirala rastline, ki vsebujejo več kot 0,1 % ($1000 \mu\text{g/g}$) Cu, Cd, Cr, Pb, Ni, Co ali 1 % ($>10\,000 \mu\text{g/g}$) Zn in Mn v suhi masi (Gosh in Singh, 2005). Kljub kopičenju presenetljivo visokih koncentracij kovin oz. katerih koli drugih elementov v svojih nadzemnih delih pri hiperakumulatorjih ni vidnih simptomov strupenosti (Verbruggen in sod., 2009).

Večina hiperakumulatorjev je endemična za tla, bogata s kovinami in se obnašajo kot **strogi metalofiti**. Za metalofite je značilno, da živijo striktno na podlagi z visoko koncentracijo določene kovine in jih ne najdemo na območjih brez njih (Baumbach, 2012).

V okolici talilnic se je po več letih onesnaževanja s kovinami pri nekaterih populacijah razvila omejena kovinska rezistenca. Te rastline imajo večjo rezistenco na kovine kot rastline iste vrste, ki rastejo na neonesnaženem območju. Imenujemo jih **psevdo-metalofiti** oz. **fakultativni metalofiti**. Zanje je značilno, da poseljujejo tako s kovinam onesnažena, kot s kovinami neonesnažena območja (Whiting in sod., 2004; Batty in Hellberg, 2010; Rascio in Navari-Izzo, 2011; Baumbach, 2012).

In zato predstavljajo najprimernejše modelne organizme za preučevanje razlik v evoluciji ekotipov oz. različnih populacij (Bert in sod., 2000).

Poznamo več kot 450 vrst hiperakumulacijskih rastlin, med katerimi pa kar $\frac{3}{4}$ hiperakumulira Ni (Verbruggen in sod., 2009). Hiperakumulatorjev Zn je v primerjavi s hiperakumulatorji Ni mnogo manj, in sicer poznamo le okoli 15 vrst rastlin. Med njimi je kar 11 vrst iz rodu *Noccaea* (*Thlaspi*). Večina jih raste na tleh, bogatih s kovinami oz. dodatno onesnaženih s Pb, Zn in Cd zaradi rudarske in talilniške aktivnosti (Assunção in sod., 2003). Hiperakumulacija Cd je znana samo za 4 vrste, ki prav tako tudi hiperakumulirajo Zn. Prav zaradi tega naj bi sposobnost hiperakumulacije Cd in Zn temeljila na skupnem genetskem zapisu. Hiperakumulacija teh dveh kovin je omejena na družino *Brassicaceae*, posebno še na rod *Noccaea* (*Thlaspi*) (Verbruggen in sod., 2009). Glavne značilnosti hiperakumulatorjev so močno povečana stopnja privzema TK, hitrejša translokacija teh iz korenin v poganjke ter povečana sposobnost razstrupitve in sekvestracije TK v listih. Pri vseh teh procesih imajo pomembno vlogo transmembranski prenašalci za TK, ki pripadajo družinam ZIP, HMA (ATP-aze), MATE, YSL in MTP (Riscio in Navari-Izzo, 2011). Odnos med koncentracijo elementa v tleh in elementa v nadzemnih delih rastline opiše potenčna krivulja, torej razmerje je večje od 1 (Slika 2).

2.3.1 Razvoj hiperakumulacije

Obstaja več hipotez, ki razlagajo, zakaj je pri rastlinah prišlo do razvoja hiperakumulacije. (1) Najbolj verjetna je hiperakumulacija določenih elementov, npr. Zn, za obrambo pred herbivori in patogeni (Assunção in sod., 2003; Verbruggen in sod., 2009). (2) Poleg tega naj bi povečala tudi toleranco na kovine in sušne razmere, (3) omogočila elementarno alelopatijo (preko izločanja določene kovine v okolje, prepreči rast ostalim rastlinam v svoji bližnji okolici) (Prasad in de Oliveira Freitas, 2003; Verbruggen in sod., 2009; Riscio in Navari-Izzo, 2011), (4) obrambo pred nenamernim privzemom elementov (Verbruggen in sod., 2009) ter (5) odpornost proti glivnim okužbam (Prasad in de Oliveira Freitas, 2003). Rastlinska odpornost na sušo naj bi bila posledica osmolitske vloge kovin znotraj celice, ki naj bi imele vlogo zadrževanja vode (Riscio in Navari-Izzo, 2011).

Hiperakumulacijske rastline lahko uporabljamo za fitoremediacijo, fitorudarjenje, kot bio-utrditev hrane (ang. biofortification) (Verbruggen in sod., 2009) oz. izboljšanje hranilne vrednosti hrane. Cilj slednjega je razviti take rastline, ki bi vsebovale večje koncentracije hranil v svojih užitnih delih. Dobro znano je pomanjkanje Zn, Fe in vitamina A v prehrani ljudi, predvsem v slabo razvitih državah. Posledica pomanjkanja esencialnih hranil je njihov slab prenos v užitne dele rastlin. Z raziskovanjem hiperakumulacijskih rastlin in njihovih mehanizmov lahko povečamo stopnjo njihovega prenosa v užitne dele, predvsem z manipulacijo njihovih prenašalcev ali pa s selektivnim križanjem rastlin (Assunção in sod., 2003; Palmgren in sod., 2008).

2.4 FITOREMEDIACIJA

V splošnem izraz fitoremediacija izhaja iz grške predpone *fito-*, ki pomeni rastlina, in latinske korenine *-remedium*, ki pomeni popraviti oz. odstraniti zlo (Gosh in Singh, 2005). Predstavlja skupino tehnologij, ki uporabljajo rastline in z njimi povezane mikroorganizme za izolacijo, zmanjševanje, odstranjevanje, razgradnjo ali pa imobilizacijo različnih vrst okoljskih onesnaževalcev iz voda, sedimentov, tal in zraka (Peer in sod., 2005; Memon in Schröder, 2009; Mench in sod., 2009). Ti onesnaževalci so lahko organski ali anorganski (Cunningham in Ow, 1996) in so večinoma antropogenega izvora. Njen namen je obnovitev območij, vsaj do take mere, da so varna za javno ali privatno uporabo (Peer in sod., 2005).

Predstavlja dolgotrajno in poceni čiščenje (Memon in Schröder, 2009), uporabno na večjih območjih ter za širok spekter onesnažil (Tangahu in sod., 2011). Rastline bodisi vežejo onesnaževalce v lastno biomaso, jih razgradijo ali pa jih le zadržujejo in preprečijo njihovo širjenje (Vrhovšek in Vovk Korže, 2007). Po zasaditvi so potrebni le stranski stroški za žetje in organizacijo na terenu (Memon in Schröder, 2009). Predstavlja nov pristop k čiščenju tal v tretjem svetu (Do Nascimento in Xiang, 2006). Požeto biomaso navadno sežgejo ali pa uporabijo za produkcijo bioenergije (npr. biodizel) (Memon in Schröder, 2009). Možno je tudi kompostiranje in reciklaža kovin (Vrhovšek in Vovk Korže, 2007). Prednosti fitoremediacije so poleg remediacije še estetski izgled (Peer in sod., 2005), povečana količina organskega ogljika v tleh, kar stimulira mikrobno aktivnost, zmanjšuje

globalno segrevanje in odstranjuje odvečna hranila. Vzpostavitev globokega koreninskega sistema pomaga pri stabilizaciji tal, s tem se zmanjša erozija, kar pa posledično zmanjša možnost inhalacije onesnaženega prahu in zaužitja z zemljo onesnažene hrane. Rastline tudi transpirirajo precejšno količino vode v okolje (Schnoor in sod., 1995; Mench in sod., 2009), s čimer prispevajo k lokalnemu zadrževanju vode. Fitoremediacija za razliko od ostalih fizikalno-kemijskih tehnik remediacije nima negativnih vplivov na rodovitnost tal (Gosh in Singh, 2005).

Fitoremediacija je najuspešnejša na območjih s plitko onesnaženostjo (Schnoor in sod., 1995; Mench in sod., 2009), saj je za čiščenje nujen kontakt koreninskega sistema z onesnaženo zemljo, torej lahko poteka le do globine, kamor sežejo korenine uporabljene rastline. Slabost fitoremediacije predstavlja možnost zaužitja onesnažene biomase s strani ostalih organizmov in posledičen vstop onesnažil v prehranske spletke. Poleg tega lahko z vnosom tujerodnih hiperakumulacijskih rastlin na določeno onesnaženo območje vplivamo na samo biodiverziteto območja (Tangahu in sod., 2011). Je dolgotrajen proces, saj je za zadovoljivo očiščenje nekega območja potrebnih vsaj nekaj let. Poleg tega pa je omejena z rastno sezono in stopnjo rasti rastline. Velik vpliv na rast rastline imajo abiotični dejavniki. Visoke koncentracije onesnaževalcev lahko vodijo do citotoksičnosti rastlin, kar negativno vpliva na samo rast in delovanje rastline, s čimer pa se proces fitoremediacije še upočasni. Na uspešnost vpliva tudi s starostjo povezana fiziološka aktivnost rastline, ki slabi (Peer in sod., 2005).

Poznamo več vrst fitoremediacije. Fitoekstrakcija vključuje odstranitev kovin iz tal ter transport v nadzemne dele rastline. Fitodegradacija – rastline pretvorijo strupena onesnažila v manj strupena. V okviru fitovoltizacije rastline privzamejo strupene snovi skupaj z vodo in jih preko listnih rež sproščajo v ozračje. V primeru fitostabilizacije pa gre za vezavo kontaminantov na rastlinske korenine ali pa talne delce, kar povzroči zmanjšanje njihove dostopnosti in mobilnosti (Peer in sod., 2005).

2.5 RANI MOŠNJAK (*Noccaea (Thlaspi) Preacox* Wulfen)

2.5.1 Uvrstitev v sistem

Spada v družino križnic (*Brassicaceae*). Do nedavnega je spadal v rod *Thlaspi*, kamor uvrščamo približno 70 vrst iz celega sveta. Večina je skoncentrirana na območju Evrazije (Mummenhoff in Zunk, 1991). Vključuje sorodnike modelnega organizma *Arabidopsis thaliana* in zajema številne vrste hiperakumulatorjev TK, kot so *Thlaspi caerulescens*, *T. geosingense*, *T. calminare*, ... (Regvar in sod., 2003).

Na podlagi morfologije semen, razlik v ribuloze-1,5-bifosfat karboksilaze/oksigenaze (RUBISKO), jederne ribosomske DNA (ITS) ter variacij na podlagi restrikcijskih mest DNA kloroplasta so razdelili rod *Thlaspi* na več rodov oz. kladov. In sicer *Thlaspi*, *Microthlaspi* ter *Nocceae*. Pri čemer vrsto *Thlaspi preacox* Wulfen uvrščamo v rod *Noccaea*, prav tako kot vse ostale hiperakumulatorje, razen *Thlaspi arvense* (Mummenhoff in Zunk, 1991; Likar, 2010).

2.5.2 Opis vrste

Rani mošnjak (*Nocceae preacox* Wulfen) je prva hiperakumulacijska rastlinska vrsta, odkrita v Sloveniji (Vogel-Mikuš in sod., 2005). Prvič je to rastlinsko vrsto opisal Wulfen leta 1788. Zaradi zgodnjega časa cvetenja, od marca do junija, ga je poimenoval rani mošnjak. Pri nas dosega severozahodno mejo svoje zahodnobalkanske oz. ilirske razširjenosti (Vogel-Mikuš, 2006). Raste pretežno na suhih, toplejših, razmeroma plitkih tleh, pustih traviščih, med grmovjem (Seliškar in Wraber, 1986) in na kamnitih travnikih od nižin, pa vse do subalpinskega pasu. Gre za trajnico, ki ima liste razporejene v izrazito pritlično rozeto (Vogel-Mikuš, 2006). Listi so pecljati, podolgovate do široko jajčaste oblike, na spodnji strani so vijoličasto obarvani. Stebelni listi so objemajoči, jajčasti s tipičnimi ušesci. Vsi listi so celi, redko nazobčani in usnjati (Seliškar in Wraber, 1986). Tvori večje število pokončnih sinjemodrih cvetočih stebel (Vogel-Mikuš, 2006), visokih od 10 do 20 cm. Cvetovi rastejo v obliki grozdastih socvetij. Čaša in venec sta štirilistna, čaša je dolga od 3 do 3,5 cm, venec pa od 6 do 8 cm (Seliškar in Wraber, 1986).

Cvetni venci so bele barve, čaša pa je pogosto rdečkasto navdahnjena. Prašnice so rumene barve. Po cvetenju se razvijejo plodovi srčaste oblike, imenovani luščki. *N. preacox* je diploiden (Vogel-Mikuš, 2006).



Slika 3: Rani mošnjak *Nocceae (Thlaspi) preacox* Wulfen (foto: Diana Marguč).

2.5.3 Akumulacija kovin

Izmed vseh znanih rastlin, ki imajo sposobnost kovinske remediacije, poznamo le 25 vrst, ki lahko akumulirajo tri ali več kovin. Eden izmed njih je prav *N. preacox* Wulfen, ki raste v bližini svinčeve talilnice v Mežiški dolini. Sposoben je akumulirati 1,5 % Zn, 0,6 % Cd in 0,4 % Pb, kar kaže na izjemno hiperakumulacijsko sposobnost za tri kovine. Še posebej je pomembna sposobnost hiperakumulacije Cd, saj sta do sedaj tega sposobni samo še *Arabidopsis halleri* in *N. caerulescens*. V naravi lahko *N. preacox* hiperakumulira več kot 5000 µg Cd/g suhe mase listov (Vogel-Mikuš in sod., 2005).

Za rastline *N. preacox* je značilna tolerančna strategija hiperakumulacije Zn in Cd (Vogel-Mikuš in sod., 2005). Baker je za Pb pri *N. preacox* predlagal strategijo izključevanja. V nekaterih primerih pa so koncentracije Pb v poganjkih presegle hiperakumulacijsko mejo 1000 µg/g, kar bi lahko *N. preacox* uvrstilo tudi med hiperakumulatorje za Pb (Vogel-Mikuš in sod., 2005).

2.6 NEGATIVNI UČINKI KOVIN NA RASTLINE

Kot že predhodno navedeno, imajo previsoke koncentracije esencialnih kovin in prisotnost neesencialnih kovin v tleh lahko negativne, celo strupene učinke na rastline (Shukla in sod. 2003, Küpper in Kochain, 2010; Nagajyoti in sod., 2010).

Posledica fitotoksičnosti kovin na rastline so spremembe v številnih fizioloških procesih, tako na celičnem kot molekularnem nivoju. Povzročijo deaktivacijo encimov, blokirajo funkcionalne skupine metabolno pomembnih molekul, zamenjajo esencialne elemente ter ovirajo membransko integriteto (Rascio in Navari-Izzo, 2011), povzročajo obširno škodo na membranah ter z njimi povezanih molekulah, vključno s klorofilnimi pigmenti (Zengin in Munzuroglu, 2005). Pogosta posledica zastrupitve s TK je tvorba reaktivnih kisikovih radikalov (ROS), še posebej na membranah kloroplastov, in sicer zaradi motenj v aktivnosti elektronskega transporta. Izpostavljenost celic oksidativnemu stresu zaradi ROS povzroči peroksidacijo lipidov, okvare bioloških makromolekul, razpad membran, cepitev DNA in uhajanje ionov (Rascio in Navari-Izzo, 2011).

2.6.1 Oksidativni stres

Vsi aerobni organizmi, ki pridobivajo energijo preko kisika, so posledično izpostavljeni oksidativnemu stresu. Sprožijo ga številni zunanji dejavniki, kot so različne vrste sevanja, kemikalije, virusi, bakterije (Osredkar, 2012) in tudi težke kovine (Benavides in sod., 2005). Je posledica tvorbe presežka reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) in prostih kisikovih radikalov, obenem zmanjšanja delovanja antioksidativnih obrambnih sistemov (Apel in Hirt, 2004; Osredkar, 2012).

Reaktivne kisikove vrste ali ROS so visoko reaktivne spojine, ki lahko oksidirajo katerokoli molekulo organizma (lipidne molekule, proteine, ogljikove hidrate, NK) (Blokhina in sod., 2003; Osredkar, 2012). ROS so lahko radikalske in neradikalske. Neradikalske vrste (npr. singletni kisik ($1O_2^{\bullet}$), ozon (O_3), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroperoksid ($ROOH$)) so močni oksidanti. Za radikalske vrste (npr. superoksidni anion ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal ($-OH^{\bullet}$)) je na zunanji orbitali značilen vsaj en nesparjen elektron. Primanjkljaj elektronov in težnja po zapolnitvi vrzeli v orbitali je razlog za njihovo kratkoživost, nestabilnost in visoko reaktivnost. Pri reakciji med radikalom in neradikalom vedno nastane nov radikal, kar pripelje do obsežne verižne reakcije tvorbe radikalov (Osredkar, 2012).

V organizmu ROS neprekinjeno nastajajo v obliki stranskih produktov pri presnovnih procesih, kot sta fotosinteza in celično dihanje (Apel in Hirt, 2004; Benavides in sod., 2005). Štirje glavni ROS, ki nastajajo v rastlinskem tkivu, so superoksidni radikal, vodikov peroksid, hidroksi radikal in singletni kisik (Gallego in sod., 1996). Nastajajo znotraj kloroplastov, mitohondrijev in peroksisomov. V fiziološko stabilnih razmerah presežek radikalov lovijo predstavniki antioksidativnega obrambnega sistema (Osredkar, 2012).

Antioksidantni obrambni sistem sestavljajo molekule in spojine, ki preprečujejo nastanek radikalov, jih nevtralizirajo oz. popravijo z njihove strani povzročene poškodbe. Z vezavo na radikal so sposobni znatno upočasniti ali zaustaviti verižno radikalsko reakcijo ter oksidacijo celičnih sestavin. Vsebujejo vsaj en reaktiven vodik, ki ga lahko odcepijo in vežejo na radikal, s tem ta postane stabilnejši in manj reaktiven. Encimski antioksidanti (SOD-superoksidna dizmutaza) katalitično odstranjujejo radikale in ROS. Lovilci radikalov (glutation, askorbinska kislina, β -karoteni, tokoferol-vitamin E) radikale nevtralizirajo, s tem pa oni prevzamejo njihove lastnosti. Nastanek hidroksilnega radikala in razgradnjo lipidnih peroksidov pa preprečijo proteini, ki reagirajo s prooksidanti (Fe, Cu) s čimer se zmanjša njihova razpoložljivost (Osredkar, 2012).

V normalnih koncentracijah imajo ROS vlogo signalnih molekul pri obrambnem sistemu rastlin pred patogenimi organizmi (Schützendübel in Polle, 2001).

2.6.2 Kadmij

Cd je neesencialen element, ki negativno vpliva na rast in razvoj rastline. Je onesnaževalec z visoko strupenostjo in izjemno topnostjo v vodi. V naravnem okolju se nikoli ne pojavlja sam, ampak v povezavi z Zn in Pb. Nima znane biološke funkcije, razen v primeru morske diatomeje *Thalassiosira weissflogi*, ki ga vključuje v encim Cd-ogljikovo anhidrazo (Benavides in sod., 2005; Koren, 2013). Povprečna biološka razpolovna doba Cd v okolju je ocenjena na 18 let (Yang in sod., 2005). Naravni vir kadmija poleg matične podlage predstavljajo še vulkanski izbruhi in gozdni požari (Meyer in Verbruggen, 2012). V Sloveniji glavni vir onesnaženja okolja s Cd predstavljata rudarjenje in taljenje cinkove rude (Šajn in Gosar, 2004).

Kemijsko je Cd zelo podoben Zn, zaradi česar ga rastline z lahkoto privzemajo vase. Zaradi visoke afinitete za vezavo na sulfidne in fosfatne skupine številnih sestavin, vključenih v pomembne metabolne procese, so strupeni učinki na rastline tako močni (Balsberg Páhlsson, 1989).

Po rastlini se Cd privzema in prenaša predvsem z Zn prenašalci iz družine ZIP proteinov (ang. Zinc-Iron permeasa), kamor spadajo tudi IRT prenašalci (Lombi in sod., 2002; Yung in sod., 2005; Küpper in Kochain, 2010), z NARMP prenašalci (ang. Natural-resistance-associated protein) in YLS (ang. Yellow stripe like proteins) v obliki Cd-kelatov (Meyer in Verbruggen, 2012). Zelo pomembne za prenos Cd pa so ATP-aze za TK (CPx-tip ATPase) ter CDF proteini ki imajo vlogo pospeševalcev difuzije kationov (Yang in sod., 2005). Po netolerantnih rastlinah pa prehaja preko Ca^{2+} kanalčkov (Lombi in sod., 2002).

Simptomi strupenosti se kažejo v zavrti rasti, tj. zmanjšanju biomase, majhnih nakodranih listih, pojavu kloroz, rjavkasto-rdeči obarvanosti listnih robov in žil (Balsberg Páhlsson, 1989). Fiziološko kovine vplivajo na aktivnost encimov, in sicer povečujejo aktivnost peroksidaz, ribonukleaz in deoksiribonukleaz, spreminjajo lipidni profil (Siedlecka in Krupa, 1999; Sherameti in Varma, 2011), zaviralno učinkujejo na transpiracijo in fotosintezo (Balsberg Páhlsson, 1989). Vplivajo na aktivnost listnih rež, kar posledično zmanjša vsebnost vode v rastlini, iztok kationov ter produkcijo kisikovih radikalov (Sherameti in Varma, 2011). S tvorbo blokad v ksilemskih elementih vpliva tudi na sam transport vode po rastlini (Balsberg Páhlsson, 1989), pospešuje senescenco (Siedlecka in Krupa, 1999). S tvorbo stabilnih kompleksov s fosfati vpliva tudi na tvorbo ATP, pomanjkanje katerega se preko oksidativne fosforilacije kaže v obliki povečanja respiracije rastline (Balsberg Páhlsson, 1989).

2.6.3 Svinec

Pb je za rastline neesencialna kovina in je manj strupen od Cd (Balsberg Páhlsson, 1989). Glavni vir sproščanja Pb v okolje predstavljajo svinčene barve ter stara razlitja osvinčenega bencina, ki predstavljajo kontaminacijo tal in prahu, posredno pa tudi hrane in vode. Območja z visoko koncentracijo Pb vključujejo še rudnike in talilnice, strelišča ter

deponije baterij (Peer s sod, 2005). V okolje prehaja tudi v obliki gnojil in pesticidov (Ghani, 2010). Za svinec je značilno, da je njegova zadrževalna doba v tleh od 150–5000 let (Yang in sod., 2005).

Elementarni Pb ni topen, večina vodotopnih oblik Pb vsebuje svinčev acetat, svinčev klorid ali pa svinčev nitrat. Zanj je značilna omejena dostopnost za rastline iz tal in talne raztopine. Le 0,1 % Pb v tleh je dostopnega za ekstrakcijo (Peer in sod., 2005). Korenine sicer lahko privzamejo velike količine Pb iz tal, vendar pa je zaradi slabe mobilnosti njegova translokacija v poganjke močno omejena. Velik del Pb se veže na površino korenin in v celično steno koreninskih celic (Peer in sod., 2005). Na površini korenin se veže na karboksilne skupine sluzi, ki jo korenine izločajo v rizosfero in sestoji iz uronske kisline (Seregin in Ivanov, 2001) in pektinov. Če Pb že vstopa v poganjke, se nahaja predvsem v steblu (Peer in sod., 2005).

Prav tako kot Cd, Pb vstopa v rastlino preko prenašalcev za esencialne kovine, in sicer prek prenašalcev družine NARMP, ATP-aze za težke kovine (MTP in HMA družina), CDF proteini (Yang in sod., 2005; Meyer in Verbruggen, 2012).

Ob prisotnosti visokih koncentracij Pb se pri rastlinah pojavijo simptomi strupenosti. Kažejo se v zaviranju rasti, majhnih klorotičnih listih, rdečkastih listih z nekrozami, počrnjenih koreninah (Balsberg Páhlsson, 1989). Pb bistveno zmanjša odstotek kaljivosti semen, dolžino rastnega vršička poganjkov in korenin ter vrednost suhe in sveže mase (Adriano, 2001; Ghani, 2010). Za Pb je značilno, da inhibira številne fiziološke procese. S povišanjem koncentracije Pb upade stopnja fotosinteze in transpiracije (Seregin in Ivanov, 2001). Odziv je lahko direktno ali indirektno povezan s spremembami upornosti listnih rež za CO₂ ter difuzijo vode (Balsberg Páhlsson, 1989). Zaviralno deluje tudi na metabolne aktivnosti rastline. V celici Pb ioni reagirajo s funkcionalnimi skupinami proteinov, NK, polisaharidov itd. in zamenjajo že predhodno vezane ione (Seregin in Ivanov, 2001). Z vezavo na tiolne (–SH) skupine encimov, Pb inhibira njihovo aktivnost in poruši njihovo terciarno strukturo (Seregin in Ivanov, 2001). Spodbuja nastanek ROS. Znano je, da Pb močno inhibira delovanje napetostno odvisnih Ca-kanalčkov plazmaleme (Adriano, 2001).

2.6.4 Cink

Je esencialno mikrohranilo, odgovorno za rast, diferenciacijo ter preživetje celic organizma (Sherameti in Varma, 2011). Sodeluje v številnih pomembnih metabolnih procesih, in sicer sproža aktivacijo encimov, je del metaloencimov, ki sodelujejo pri transportnem sistemu elektronov, pomembno vlogo igra pri sami sintezi proteinov, kot tudi pri metabolizmu ogljikovih hidratov (COH), NK in lipidov. Tvori komplekse z DNA in RNA in vpliva na njuno stabilnost (Balsberg Páhlsson, 1989).

Le majhen delež Zn se v tleh nahaja v prosti kationski obliki. Ocenjeno je, da je v vodi na območju rizosfere raztopljenega med 0,4 nM in 4 µM (značilno za nižji pH). Pri sami absorpciji in transportu Zn po rastlini sodelujejo številni tipi membranskih prenašalcev, kot so ZIP proteini, proteini iz MTP družine, HMA encimi ter prenašalci iz CDF družine, ki prenašajo kovine v vakuolo (Peer in sod., 2005; Sherameti in Varma, 2011).

Do onesnaženja s Zn pride zaradi rudarjenja in taljenja Zn rude (Finžgar in Leštan, 2008). Zakisanje tal povzroči sproščanje Zn^{2+} iz talnih delcev in s tem večjo dostopnost za rastline. Prav tako se sprošča v okolje z gnojenjem (Balsberg Páhlsson, 1989).

Pomanjkanje Zn se pojavi, kadar njegova koncentracija v rastlini pade pod 15–20 µg/g suhe mase (Sherameti in Varma, 2011). Pomanjkanje Zn v rastlini povzroča zaostanek v rasti (krajšanje internodijev, zmanjšanje velikosti listov), pojav kloroz in nekroz itd. (Marchner, 1986; Blasberg Páhlsson, 1989). Zmanjša se sam doprinos pridelka (semena, plodovi), saj Zn igra pomembno vlogo pri razmnoževanju rastlin (Marchner, 1986).

O previsokih koncentracijah Zn, ki na rastlino prav tako negativno učinkujejo, govorimo pri pojavu koncentracij, višjih od 100–300 µg/g suhe mase (Sherameti in Varma, 2011). Te koncentracije imajo negativen vpliv na rast rastline, povzročajo kloroze (Balsberg Páhlsson, 1989; Sherameti in Varma, 2011), lignifikacijo korenin in epidermalnih celic. Prekomerne koncentracije Zn vplivajo na vodno razmerje rastline, kar povzroča vodni stres in venenje. Negativno učinkuje na dušikov metabolizem in posledično na vsebnost proteinov (Blosberg Páhlsson, 1989).

Tako ob pomanjkanju kot ob presežku Zn v rastlini pa zaradi interference v respiratorni verigi znotraj mitohondrijev pride do tvorbe ROS (Sherameti in Varma, 2011).

2.6.5 Vpliv Cd, Pb in povišanih koncentracij Zn na mineralno prehrano rastline

Neesencialni kovini, kot sta Cd^{2+} in Pb^{2+} v ravnem mediju, zaradi kemijske podobnosti esencialnim kationom (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} in Fe^{2+}) negativno vplivata na njihov privzem (Seregin in Ivanov, 2001; Küpper in Kochain, 2010). Podobnost v ionskem premeru omogoča tekmovanje Cd^{2+} in Pb^{2+} za vezavo na prenašalce esencialnih kovin (npr. Cd^{2+} (1,03 Å) tekmuje za prenašalce Zn^{2+} (0,83Å)). Kadmij in Pb lahko povzročita inhibicijo privzema zgoraj navedenih elementov tudi preko motenj ekspresije genov za njihove prenašalce (Küpper in Kochain, 2010).

Do tekmovanja za vezavna mesta na encimih in proteinih lahko pride tudi med esencialnimi elementi. Npr. Zn^{2+} se lahko veže na vezavno mesto za Mg^{2+} , Fe^{2+} ali Mn^{2+} , s čimer zavre delovanje encima (Sherameti in Varma, 2011). Prevelike koncentracije Zn^{2+} lahko s tem negativno vplivajo na fotosintezo (Blasberg Páhlsson, 1989) in zavirajo absorpcijo Fe^{2+} in Ca^{2+} (Sherameti in Varma, 2011). Strupene koncentracije Zn^{2+} lahko povečajo prepustnost membran, kar lahko vodi v iztok hranil (npr. K^+) (Blasberg Páhlsson, 1989).

2.6.6 Vpliv Cd, Pb in povišanih koncentracij Zn na fotosintezo

Cd^{2+} , Pb^{2+} in Zn^{2+} povzročajo številne motnje v procesu fotosinteze, kar se odraža v njeni inhibiciji. Prav tak učinek imajo tudi na sintezo klorofila, plastokinona, ferodoksina in karotenoidov (Gallego in sod., 1996; Seregin in Ivanov, 2001; Manios in sod., 2003; Sherameti in Varma, 2011). Kadmij in Pb povzročata spremembe v strukturi kloroplastov, zmanjšujeta produkcijo klorofila in glutationa v rastlini (Gallego in sod., 1996; Seregin in Ivanov, 2001; Manios in sod., 2003). Cd povzroča upad razmerja klorofila a in b, obenem pa povzroča lipidno peroksidacijo ter aktivnost lipoksigenaze (Gallego in sod., 1996; Manios in sod., 2003).

Kadmij povzroča hude motnje v strukturi in funkciji kloroplastov. Povzroča povečano količino prostih maščobnih kislin v tilakoidnih membranah, motnje v strukturi grana tilakoid, povečanje velikosti in količine plastoglobulov. Vpliva na oba fotosistema (FSI in FSII) (Siedlecka in Krupa, 1999). Povzroča poškodbe antenskih pigmentov in reakcijskega centra FSII ter katalitičnega kompleksa za cepitev vode (ang. oxygen evolving kompleks). Oba fotosistema sta zelo občutljiva tudi na povišane koncentracije Zn (Sherameti in Varma, 2011). Poleg strukturnih poškodb kloroplastov Cd vpliva tudi na aktivnost sinteznih encimov klorofila ter preprečuje pravilno tvorbo pigmentno proteinskega kompleksa fotosistemov (Zhou in Qiu, 2005). Z nadomestitvijo ostalih kovin v encimih vplivata na njihovo delovanje. Tvorita stabilne komplekse z nekaterimi proteini in imata visoko afiniteto po vezavi na metaloproteine v citoplazmi (Balsberg Páhlsson, 1989; Seregin in Ivanov, 2001).

Znotraj klorofila lahko pride do zamenjave Mg s Cd, kar znova povzroča motnje v fotosintezi. Večina klorofilov, ki vsebuje »TK« namesto Mg, ob relaksaciji energijo sprostijo v obliki toplote. Tako je onemogočen prenos energije iz antenskega pigmentnega kompleksa na akcijski center tilakoid. V primeru substitucije Mg s Cd pride do popolne razgradnje klorofila (Küpper in sod., 1998).

Kadmij in Pb tudi posredno, s povzročanjem upada koncentracije Fe v rastlini vplivata na fotosintezo (Balsberg Páhlsson, 1989; Seregin in Ivanov, 2001). Železo je sestavni del hemoproteinov (kot je citokrom oksidaza, katalaza in peroksidaza) in prenašalcev elektronov (feredoksin, plastokinona) (Marschner, 1986). Pomanjkanje slednjih zmanjša aktivnost NADP oksireduktaze in ATP sintaze (Siedlecka in Krupa, 1999; Seregin in Ivanov, 2001). Železo je pomembno tudi v biosintezi klorofila (Marschner, 1986; Blasberg Páhlsson, 1989; Pongrac in sod., 2009), zato je inhibicija nastanka klorofila lahko tudi posledica njegovega pomanjkanja. Na splošno se največ Fe kopiči v kloroplastih. Njegovo pomanjkanje tako vpliva na volumen kloroplastov in strukturo membran grana (Marschner, 1986). Fe je pomemben tudi za aktivacijo encimov, vključenih v proces respiracije in fotosinteze. Pomanjkanje Fe tako vpliva tudi na vsebnost klorofila (Blasberg Páhlsson, 1989). Kritična meja pomanjkanja Fe za rastline je med 50 in 150 mg/kg suhe mase (Marschner, 1986).

Vmešavanje Zn v metabolizem Fe povzroči tudi inhibicijo reducirajoče kapacitete korenin, kar povzroči pomanjkanje Fe in nastanek kloroz (Blosberg Pålsson, 1989).

Kadmij, Pb in Zn z motnjami v metabolizmu kloroplasta zavirajo biosintezo klorofila (Blosberg Pålsson, 1989). Z vezavo na sintezni encim za alfa-aminolenskno kislino (ALA) Cd in Pb blokirata delovanje encima (Öncel in sod. 2000; Seregin in Ivanov, 2001; Pongrac in sod., 2009) s tem pa preprečujeta sintezo ALA, ki je glavni prekursor za sintezo klorofila in sintezo hema (Marschner, 1986; Nishihara in sod., 2003; Zhou in Qiu, 2005).

Cd in Pb vplivata tudi na nižje koncentracije Mn v rastlini (Sergin in Ivanov, 2001), s tem pa posredno na stopnjo fotosinteze (Blasbergh Pålsson, 1989). Mn sodeluje pri ciklu cepitve vode, in sicer je del katalitičnega kompleksa. FSII vsebuje Mn-protein, ki katalizira začetne faze O₂ razvoja. Reakcijski center pigmenta P680 zahteva najmanj 4 atome Mn. Ob pomanjkanju Mn je prvi korak elektronske transportne verige oslavljen, kar ima negativne vplive na naslednje stopnje fotosinteze – fotofosforilacija, redukcija CO₂, nitratov in sulfatov. To negativno vpliva na fotosintezo in samo morfologijo kloroplastov, predvsem lamelnega sistema (Marschner, 1986). Vpliv Cd na zmanjšanje Mn ima slab vpliv tudi na zaščito fotosinteznega aparata, saj zmanjša aktivnost SOD, ki vsebuje atom Mn. S tem oslabi zaščito pred prostimi radikali. Kritična vsebnost Mn v rastlini je med 10–20 mg/kg suhe mase (Marschner, 1986).

Kadmij, Pb in Zn negativno učinkujeta tudi na Calvinov cikel in encime, povezane z nefotokemičnimi reakcijami fotosinteze (Siedlecka in Krupa, 1999; Sergin in Ivanov, 2001; Sherameti in Varma, 2011).

2.6.7 Vpliv Cd, Pb in povišanih koncentracij Zn na metabolizem ogljikovih hidratov

Ogljik se v procesu fotosinteze vgrajuje v dve glavni obliki ogljikovih hidratov, saharozo in škrob (Verma in Dubey, 2001; Taiz in Zeiger, 2006). Saharoza je glavni transportni sladkor rastlin, služi kot hranilo in signalna molekula (Winter in Huber, 2000). Nastaja v citosolu, čez dan iz trioze fosfata (3P) (Taiz in Zeiger, 2006), ki iz kloroplastov prehaja prek trioza fosfatnih prenašalcev (Winter in Huber, 2000). Nočni vir saharoze pa

predstavlja glukoza, ki se s procesom razgradnje založnega škroba sprošča v citosol prek heksoznih prenašalcev iz kloroplastov (Winter in Huber, 2000). Prehodni škrob predstavlja začasno založno obliko ogljika in se čez dan nalaga v obliki škrobnih zrn znotraj kloroplastov (Verma in Dubey, 2001; Taiz in Zeiger, 2006).

Prenos saharoze med celicami lahko poteka po dveh poteh, in sicer po simplastni poti preko plazmodezem ali pa preko apoplastne poti (Winter in Huber, 2000), vzporedno s koncentracijskim gradientom (Marschner, 1986). Nalaganje saharoze v floem poteka proti koncentracijskemu gradientu, torej gre za aktiven transport. Nalaganje saharoze poteka prek ATP-azne protonske črpalke v plazmalemi sitk in gre za H^+ /saharoza ko-transport (Marschner, 1986; Winter in Huber, 2000). Lahko je zraven prisoten še H^+/K^+ antiport, kar lahko razloži visoko koncentracijo K v floemu. Transport saharoze iz fotosinteznih tkiv (listi, steblo) v ponorna tkiva (korenine, vršički, semena, plodovi) (Marschner, 1986) poteka po floemu na principu osmoze (Winter in Huber, 2000). Saharoza pasivno, glede na gradient, zapusti floem na območju ponornih tkiv. Tu predstavlja vir energije za rast ali pa gradbene enote za shranjevanje polisaharidov (Taiz in Zeiger, 2006).

Za kovini, kot sta Cd in Pb je značilno, da povzročata peroksidacijo membran (Gallego in sod., 1996; Seregin in Ivanov, 2001; Manois in sod., 2003). Ta prepreči prenos nastalih sladkorjev (trioza fosfat, glukoza) prek kloroplastne membrane v citosol, kar povzroči akumulacijo škroba v kloroplastih (Verma in Dubey, 2001). S pomanjkanjem gradnikov je v citosolu preprečena sama sinteza saharoze. Poškodbe membran vplivajo na sam prenos saharoze v floem in njegov transport v ponorna tkiva. Pomanjkanje »hrane« v ponornih tkivih pa vodi k zaviranju njihove rasti (Taiz in Zeiger, 2006).

Strupene koncentracije Zn povečajo prepustnost membran, kar povzroči izhod hranil iz rastline. Če pride do upada K v floemu, to posredno vpliva na sam transport sladkorjev in akumulacijo ogljikovih hidratov (CHO). Previsoke koncentracije Zn povzročajo odlaganje kaloze v floemu, kar še bolj omeji transport CHO. Posledica je nalaganje sladkorjev in škroba v listih, saj je transport v preostale dele omejen (Blosberg Phálsson, 1989).

Previsoke koncentracije kovin povzročajo tudi poškodbe na strukturi in metabolizmu kloroplastov (Gallego in sod., 1996; Seregin in Ivanov, 2001; Manios in sod., 2003). Povzročajo pomanjkanje klorofila, glikolipidov in polinenasičenih MK (Marschner, 1986). S samim negativnim vplivom na fotosintezo posredno vplivajo na samo produkcijo sladkorjev. Kadmij, Pb in Zn negativno učinkujeta na Calvinov cikel in njegove encime (npr. rubisco) (Siedelcka in Krupa, 1999; Seregin in Ivanov, 2001; Sherameti in Varma, 2011), s čimer zmanjšajo stopnjo fiksacije CO₂ (Seregin in Ivanov, 2001; Benavides in sod., 2005). Motnje necikličnega transporta elektronov še dodatno zavrejo fiksacijo CO₂ (Blosberg Phálsson, 1989; Seregin in Ivanov, 2001). Cd povzroča vodni stres in zapiranje listnih rež, kar še omeji privzem CO₂ iz okolja (Perfus-Barbeoch in sod., 2002). Neposredno vplivajo tudi na proteine, ki so vključeni v sam nastanek in razgradnjo CHO. Npr. Saharoza-6-fosfat sintaza, saharoza-6-fosfat fosfataza, ki sodelujeta pri sintezi saharoze in saharoza sintaza ter kisle invertaze, ki saharozo razgrajujejo (Winter in Huber, 2000; Verma in Dubey, 2001; Taiz in Zaiger, 2006). Cd inhibira tudi glicerolaldehid-3-fosfat kinazo, fruktoza-6-fosfat kinazo, fruktoza-1,6-bifosfatazo, aldolazo, ... (Siedlecka in Krupa, 1999).

2.7 SHRANJEVANJE IN RAZSTRUPITEV KOVIN

Prekomerne koncentracije kovin v rastlinskih celicah lahko povzročijo številne poškodbe. Ker rastline ne morejo ubežati stresu, so razvile številne obrambne mehanizme. Ti mehanizmi jim omogočajo preživetje na s kovinami močno onesnaženih tleh (Krzelowska, 2010). Kadar koli med transportom po rastlini lahko pride do pretvorbe kovine v manj strupeno obliko preko procesa kemične konverzije ali pa tvorbe kompleksov z ligandi (Sheron in sod., 2011). Gre za razstrupljanje, ki poleg sekvestracije hiperakumulatorjem zagotavlja kopičenje velike količine kovin v nadzemni biomasi brez fitotoksičnih posledic. Večinoma se kovine akumulirajo v listih rastline, kjer potekajo življenjsko pomembni procesi fotosinteze. Prav ti pa so tudi najbolj občutljivi na strupene učinke kovin (Rascio in Navari-Izzo, 2011).

Sekvestracija je razstrupitev, kjer se s tvorbo kovinskih kompleksov z ligandi kovine odstranijo iz metabolno aktivnih tkiv v neaktivne. Najpogosteje se nalagajo v celicah epidermisa, trihomih in tudi kutikuli, kjer so najmanj škodljive fotosinteznemu aparatu. Navadno so kovine izključene tudi iz celic listnih rež in njihovih spremljevalk, kar omogoča njihovo nemoteno delovanje. Znotraj mezofila pa se kovine nalagajo predvsem v manj aktivnih delih celice, kot so celična stena in vakuole (Peer in sod., 2005; Sheoran in sod., 2011; Rascio in Navari-Izzo, 2011). Na teh mestih imajo kovine najmanjši vpliv na občutljive fotosintetske procese. Nekatere snovi se lahko sproščajo v okolje preko listnih rež s procesom voltizacije oz. hlapenja (Peer in sod., 2005).

Različna oksidacijska stanja strupenih elementov imajo različen privzem, transport, sekvestracijo in strupenost za rastlino. Organski ligandi so pomembni faktorji razstrupljanja, saj preprečujejo obstanek prostih kovinskih ionov v citoplazmi in omogočajo njihovo odlaganje v vakuolah (Rascio in Navari-Izzo, 2011). Kovine, ki zreagirajo s tiolnimi skupinami, se lahko sekvestrirajo s cisteinom bogatimi peptidi (metalotioneini in fitohelatini). Metalotioneini so proteini, katere kodirajo geni. Sestavljeni so iz 60–80 AK ter 9–16 cisteinskih ostankov, na katere se navadno vežejo kovine, kot je Cd. Fitohelatini pa so encimsko sintetizirani in sodelujejo pri toleranci na Cd in Cu. Sestavljajo jih le tri AK in sicer glutamat, cistein in glicin. Pojav Cd, Zn, Pb v celici zelo hitro sproži njihovo tvorbo. Fitohelatini tvorijo komplekse s kovinami, s čimer jih inaktivirajo ter shranijo v vakuolo, obenem pa so pomembni za prenos esencialnih kovin (Zn in Cu) na novo sintetizirane apoencime za katalitsko delovanje (Sheoran in sod., 2011).

Opazili so, da za razliko od nehiperakumulacijskih vrst za razstrupitev hiperakumulatorji ne uporabljajo ligandov z visoko molekulsko maso (fitohelatini), saj bi bila produkcija mase zaradi velike količine akumulirane kovine energetsko prepotratna. Zatorej uporabljajo male organske ligande (Rascio in Navari-Izzo, 2011). Večinoma gre za male organske molekule, kot so malat, citrat in oksalna kislina, ki so shranjene v vakuolah, ter histidin nikotianamin, fitinska kislina in tioli z nizko molekulsko maso, kot so glutation, cistein in ostali (Rascio in Navari-Izzo, 2011; Koren in sod., 2013). Tudi žveplo (S) je aktivno vključeno v razstrupljanje Cd znotraj rastlinskih hiperakumulatorjev. Velik del Cd

se veže na tiolne skupine, še posebej v mladih listih, koreninah in semenih. Kot obrambni odziv *N. caerulea* Ganges na visoke koncentracije Cd je povečan privzem S v rastlino. Prav tako povečan privzem Mg in Ca omili strupene učinke Cd (Küpper in Kochain, 2010).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 OPIS LOKACIJ

3.1.1 S Cd, Pb in Zn onesnaženo območje Žerjava

Območje Žerjava se nahaja znotraj Mežiške doline, v enem najbolj onesnaženih območij Slovenije s TK (Šajn in Gosar, 2004; Svet za varstvo okolja RS, 2009). Onesnaženje Mežiške doline je posledica 300-letnega rudarjenja in predelave svinčeve (Šajn in Gosar, 2004) ter cinkove rude (Finžgar in Leštan, 2008). Glavni vir onesnaženja so predstavljale emisije žveplovega dioksida (SO_2) in TK. Emisije SO_2 so povzročile popolno uničenje vegetacije v okolici talilnice, posledično je prišlo do erozijskih procesov in nastanka t. i. Doline smrti (Svet za varstvo okolja RS, 2009).

Nadmorska višina okolice Žerjava sega med 600–700 m (Vogel-Mikuš in sod., 2005). Geološka podlaga Mežiške doline je pretežno sestavljena iz triasnih sedimentnih kamnin. Večinoma gre za apnenec in dolomit, ki vsebujeta rudninske delce Pb in Zn. Koncentracija večine elementov se povečuje z globino prsti, za nekatere elemente (Pb in Zn) pa je značilna akumulacija v organskem horizontu (Vreča in sod., 2001). Organski horizont predstavlja sveža ali delno razkrojena organska snov (Mršič, 1997). Izvorna sestava mežiške rude je galenit (svinčev sijaj ali siva ruda) in sfalerit (cinkova ruda). Prevladujoča prst je rendzina z raznolikimi humusnimi plastmi, onesnaženimi s TK, predvsem s Cd, Pb in Zn (Regvar in sod., 2006). Manjši del Pb in Zn je posledica mineralne strukture matične podlage (Vreča in sod., 2001). Na območju Žerjava izstopajo predvsem visoke vsebnosti Pb (povprečna vsebnost je 878 mg/kg (216–27122 mg/kg) – do 20-krat višja od slovenskega povprečja) in Cd (povprečna vsebnost je 6,2 mg/kg (1,4–71 mg/kg), kar je 12-krat več od slovenskega povprečja), ki presegajo opozorilno imisijsko vrednost. To pomeni, da so škodljivi učinki za človeka pri določenih vrstah rabe tal že škodljivi (Šajn in Gosar, 2004). Kritična imisijska vrednost nam pove gostoto posamezne nevarne snovi v tleh, kjer zaradi škodljivih učinkov na človeško zdravje in okolje tla niso več primerna za pridelavo rastlin, namenjenih prehrani živali in ljudi, ter zadrževanje ali filtriranje vode. Vrednosti kritične imisijske vrednosti v tleh za Cd so 12 mg/kg, za Pb 720 mg/kg in za Zn 200 mg/kg (Šajn in Gosar, 2004).

3.1.2 S Cd, Pb in Zn neonesnaženo območje Zaplane

Območje Zaplane se nahaja v Notranjski regiji Slovenije, med Vrhniko in Logatcem. Predstavlja stik dinarskega sveta in nižje ležečega Ljubljanskega barja (Gustinčič, 2009). Nadmorska višina je okoli 600 m (Vogel-Mikuš in sod., 2005). Večji del zaplanskega območja predstavlja apnenčasti kras, za del pa je značilen dolomitni kras. Prsti so plitke, nekoliko debelejšje so na dnu kraških kotanj. Območje preraščajo mešani gozdovi. Prisotno je tudi pašno-košno kmetijstvo (Gustinčič, 2009). Gre za s težkimi kovinami neonesnaženo območje. Geološka podlaga je nastala v obdobju Triasa (Regvar in sod., 2006).

3.2 NASTAVITEV POSKUSA

Poskus smo opravljali na dveh populacijah ranega mošnjaka (*N.preacox* Wulfen), pri čemer smo uporabljali zemljo iz dveh različnih lokacij Slovenije. S težkimi kovinami (Pb, Zn, Cd) onesnažena zemlja je bila nabrana v Žerjavu na vzorčnem mestu P3 (N: 46° 28' 26.5" E: 14° 51' 56.0"), ki se nahaja na robu Mežiške doline, ok. 500 m od talilnice (Regvar in sod., 2006). Od tu izhajajo tudi semena žerjavske populacije (nabrana julija 2009). Neonesnaženo zemljo in semena zaplanske populacije pa smo nabrali na območju Zaplane (N: 45° 58' 25.0" E: 14° 14' 25.0"), dne 19. 6. 2005 (Vogel-Mikuš in sod., 2005).

3.2.1 Priprava substrata

Nabrano zemljo smo presejali skozi 0,5-centimetersko sito in s tem odstranili večje kamne. Nato smo pripravili substrat za rastline, in sicer tako, da smo nabrano zemljo mešali s kremenčevim peskom in vermikulitom v razmerju 10 : 1 : 2 (volumno razmerje). Substrat smo z lopatko dobro premešali, da so se sestavine enakomerno porazdelile, in ga nato še enkrat presejali preko sita. Žerjavsko in zaplansko zemljo smo nato med seboj zmešali v različnih razmerjih, tako da smo pridobili substrat za 5 izpostavitev:

- izpostavitev 0 % je vsebovala samo zaplansko zemljo in je predstavljala kontrolo poskusa,
- izpostavitev 25 % je vsebovala $\frac{1}{4}$ žerjavske zemlje in $\frac{3}{4}$ zaplanske zemlje,
- izpostavitev 50 % je vsebovala $\frac{1}{2}$ žerjavske in $\frac{1}{2}$ zaplanske zemlje,

- izpostavitvev 75 % je vsebovala $\frac{3}{4}$ žerjavske zemlje in $\frac{1}{4}$ zaplanske zemlje in
- izpostavitvev 100 % je vsebovala samo žerjavsko zemljo.

Mešanice substrata smo avtoklavirali dvakrat po dve uri pri 121 °C v razmiku 48 ur, da smo izničili vplive talnih mikroorganizmov na privzem mineralnih snovi. Nato smo z njimi napolnili lončke velikosti 9 x 9 x 9,5 cm. Za vsako koncentracijo smo napolnili 8 lončkov, po štiri za vsako populacijo in tako pridobili po 20 lončkov za vsako populacijo, skupaj torej 40 lončkov. Lopatko za polnjenje lončkov smo po vsaki uporabi umili in s tem preprečili kontaminacijo. Zemlja je v lončkih segala 1 cm pod rob. Ostanek zemlje smo spakirali v polivinilaste vrečke in ustrezno označili.

Četverico lončkov vsake izpostavitve smo za posamezno populacijo označili s črkami od A do D, pred črko pa je stala še kratica, ki je označevala rastlinsko populacijo (ŽER – za žerjavsko populacijo in ZA – za zaplansko populacijo).

Iz vsakega pripravljenega lončka smo z žličko vzeli vzorec zemlje in ga shranili v posodicah, označenih na enak način kot lončki. Zemljo smo poskušali zajemati preko celotne globine lončka, da bi dobili čim bolj reprezentativne rezultate. Žličko smo po vsaki uporabi sprali z destilirano vodo, da bi preprečili kontaminacijo.

Zaradi osiromašenosti zemlje smo v vsak lonček dodali še 2 g gnojila (Plantella, Unichem), ki smo ga vmešali v spodnjo tretjino lončka, da bo na voljo rastlinskim koreninam. Za nadaljnje analize smo vzeli tudi dva vzorca gnojila. Gnojilo je vsebovalo 5 % celokupnega dušika, 3 % fosforjevega pentoksida, 2 % kalijevega oksida, 9 % kalcijevega oksida in 2 % magnezijevega oksida.

3.2.2 Sajenje in vzgoja rastlin

Po končani pripravi substrata smo v 20 lončkov dali po 10 semen ranega mošnjaka zaplanske populacije. V drugih 20 lončkov pa po 10 semen žerjavske populacije in jih zalili. Za večje število semen smo se odločili zaradi njihove starosti in na ta način povečali verjetnost, da vzklijejo vsaj štiri rastline na lonček.

V primeru, da ne bi vzkliklo zadostno število rastlin, smo ostanek semen posadili še v dve posodi, napolnjeni z vermikulitom – v eno semena zaplanske populacije in v drugo semena žerjavske populacije.

Rastline so rastle 3 mesece v komori (20 °C, 16-urna svetloba, 80 % zračna vlaga in svetlobna jakost 250 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$). Zalivali smo jih 2-krat tedensko z vodovodno vodo in kasneje tudi s hranilno raztopino za *Thlaspi* (Koren, 2013).



Slika 4: Rast rastlin v rastni komori (foto: Diana Marguč).

3.3 POBIRANJE MATERIALA

3.3.1 Pospravljanje, merjenje in tehtanje materiala

Po 3 mesecih rasti v komorah smo rastline poželi. Najprej smo s spatulo razrahljali zemljo okoli rastline in nato iz lončka vzeli rastlino. Vso zemljo, ki je ostala v lončku, smo prenesli v označeno polivinilasto vrečko in jo pri 50–60 °C posušili v sušilcu (Heraeus Instruments).

Rastline smo sprali pod tekočo vodo in tako odstranili zemljo ter druge delce s korenin. Spiranje je bilo zelo težavno, saj se je med korenine ujelo veliko delcev vermikulita. Na koncu smo rastline sprali še z bidestilirano vodo in jih na papirnatih brisačah osušili. S škarjami smo ločili korenine od poganjkov. Poganjke in korenine smo ločeno stehali in s tem določili njihovo svežo maso, nato smo jih ločeno zavili v primerno označeno aluminijasto folijo, zamrznili s tekočim dušikom in liofilizirali (Alpha 2-4 z zračnim hlajenjem, Christ). Pred sušenjem smo zavitke folije na eni strani malce odvili, da je bilo sušenje učinkovitejše. Po končanem sušenju smo vzorce ponovno stehali in s tem dobili suho maso rastlin. Posušene vzorce smo zapakirali nazaj v folijo in shranili v suhem prostoru.

3.3.2 Predpriprava rastlinskega materiala za analizo

Vzorci rastlinskih poganjkov in korenin smo v terilnici s pomočjo tekočega dušika strli v prah. Za vsak vzorec smo vzeli novo očiščeno terilnico in s tem preprečili kontaminacijo materiala. Dobljeni prah smo nato spravili v ustrezno označene plastične posodice in jih shranili v suhem prostoru.

3.3.3 Predpriprava substrata za analizo

Vzorci zemlje so bili vzeti pred začetkom poskusa. Prst smo posušili v sušilniku pri temperaturi 50–60 °C. Posušeno zemljo smo nato presejali skozi gosto sito, s porami velikosti 630 µm. S tem smo odstranili grudice zemlje, ki bi potencialno lahko motile nadaljnje meritve. Sejanje smo opravili tako, da smo sito postavili na prepognjen filtrirni papir in vanj stresli zemljo, ki smo jo presejali na filtrirni papir. Z roko smo poskušali streti čim več grudic in s tem zagotoviti čim manjšo spremembo razmerja med žerjavsko in zaplansko prstjo. Opazili smo, da je bila zaplanska prst bolj grudičasta in je zato težje prehajala preko sita, medtem ko je bila žerjavsko prst bolj peščene strukture. Filtrirni papir smo menjali med različnimi izpostavitvami, znotraj enake izpostavitve pa smo ga le dobro spihali in očistili.

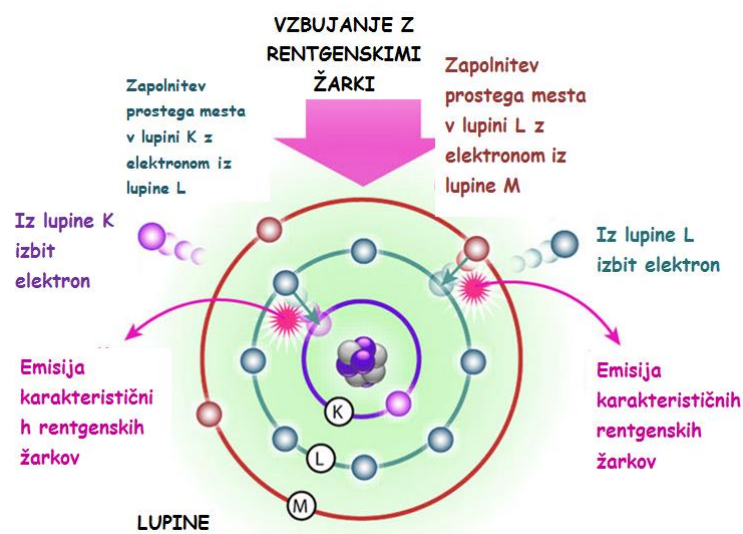
3.4 ANALIZNE METODE

3.4.1 Rentgensko fluorescenčna spektroskopija (XRF)

Je nedestruktivna multielementna analizna metoda, s katero določamo elementno sestavo v različnih vzorcih, tudi okoljskih (npr. zemlja in rastlinski material). Metoda je hitra, direktna, poceni in okolju prijazna. Omogoča hkratno analizo več elementov v širokem koncentracijskem območju, od nekaj deset % do nekaj ppm (Vogel-Mikuš, 2006). Vzorec pripravimo tako, da zmeljemo od 0,5 do 1 g materiala, ki ga stisnemo v tableto. Dobljeno tableto položimo na XRF-spektrometer in pomerimo XRF-spekter, iz spektra pa izračunamo koncentracije elementa v vzorcu na osnovi fundamentalnih parametrov. S tem se izognemo zamudni pripravi vzorca s kislinskim razklopom, ki je nujen pri ostalih analitskih metodah ICP-OES in AAS (Gangl, 1997; Vogel-Mikuš, 2006).

XRF temelji na vzbujanju elementov v vzorcu z rentgenskim sevanjem iz radioaktivnega vira ali rentgenske cevi na osnovi fotoefekta (izbijanje elektronov). Vzbujena rentgenska fluorescenca elementov iz vzorca se detektira s polprevodniškim detektorjem (Vogel-Mikuš, 2006).

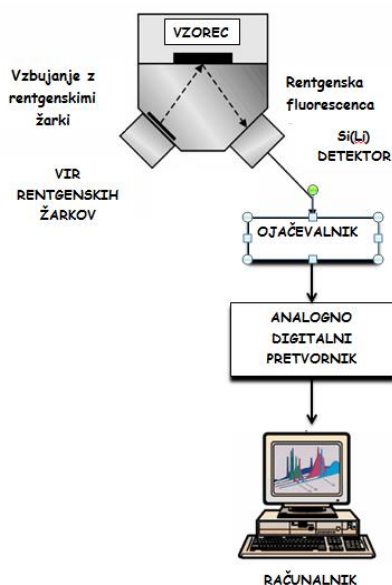
Pri XRF metodi kot glavni vzbujevalni vir uporabljamo kadmijev (^{109}Cd), železov (^{55}Fe) ali americijev (^{241}Am) radioaktivni vir (Nečemer in sod., 2008). Rentgenska svetloba iz vira vzbuja vzorec (Vogel-Mikuš in sod., 2012) na osnovi fotoefekta, to je interakcije fotona rentgenske svetlobe z vezanim elektronom atoma v vzorcu. Energija fotona se absorbira in porabi za ionizacijo oz. vzbujanje atoma. Atom preide v vzbujeno stanje po izbitju elektrona iz ene izmed atomskih lupin (K, L, M). Prazno mesto na atomski lupini se nato zapolni s preskokom elektrona iz bolj oddaljene/višje ležeče lupine, za katero je značilno manj vezano stanje. Pride do procesa relaksacije in vzpostavitve energetske stabilnosti atoma. Pri prehodu elektrona med stanjema se sprošča energija, ki se izseva kot rentgensko fluorescenčni foton ali sekundarni sproščeni X-žarek (Vogel-Mikuš, 2012).



Slika 5: Princip vzbujanja elektronov rentgenske fluorescenčne spektrometrije (prirejeno po Oxford X-ray Fluorescence Ltd., 2009).

Za vsak element se pri procesu rentgenske fluorescence sprosti različna vezavna energija pri preskoku elektronov med lupinami (K, L, M), s tem pa izseva tudi za določen element karakteristične rentgenske žarke, na podlagi katerih ločimo elemente med seboj (Vogel-Mikuš in sod., 2012). Oddano fluorescenčno sevanje izmerimo z energijsko disperzijskim

spektrometrom, ki ga sestavljajo polprevodniški Si (Li) detektor (Canberra), ki zazna rentgensko fluorescenčne fotone, spektroskopski ojačevalec (Canberra M2024), ki te fotone okrepi ter posreduje na analogno digitalni pretvornik (Canberra M8075) in večkanalni analizator z računalnikom (S-100, Canberra) (Nečemer in sod., 2008). Rezultat analize je spekter, to je intenziteta sunkov na kanal v odvisnosti od energije karakterističnega rentgenskega sevanja (Kambič in Hrobat, 2007). Jakost izbranega vrha določenega elementa v spektru je enaka številu izmerjenih značilnih fotonov v določenem časovnem obdobju (Gangl, 1997). Intenziteta posameznega vrha pa je osnova za izračun koncentracije posameznega elementa v vzorcu. Analiza spektrov je potekala v računalniškem programu AXIL, kvantitativna analiza pa v programu QAES (Kvantitativna analiza za okoljske vzorce), kateri je razvil dr. Peter Kump (IJS) (Nečemer in sod., 2008).



Slika 6: Slika delovanja rentgenske fluorescenčne spektroskopije (Humphrey in sod., 1998).

V primeru, ko je energija električnega polja ioniziranega atoma dovolj velika, lahko atom odda odvečno energijo tudi z nastankom dodatnega fotona, ki izbije še en elektron iz višjih orbital (npr. M, L). Izbit elektron imenujemo Augerjev elektron, sam proces pa Augerjev efekt (Gangl, 1997). Ta konkurira rentgenski fluorescenci (Vogel-Mikuš, 2006). Zaradi prevladujočega Augerjevega efekta pri elementih z atomskim številom pod 20 na tem območju rentgenska fluorescenca ni učinkovita (Gangl, 1997).

3.4.2 Osnove infrardeče spektrometrije s Fourierjevo transformacijo

Infrardeča (IR) spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (FTIR) je ena izmed najpomembnejših in hkrati najpogosteje uporabljenih analitskih metod znotraj infrardeče spektrometrije (Introduction to FT-IR ..., 2001; Tomšič in sod., 2007). Gre za hitro, zanesljivo in nedestruktivno metodo. Uporablja se za kvalitativno in kvantitativno določitev sestavin snovi v osrednji IR-regiji ($\lambda=2,5\text{--}50\text{ }\mu\text{m}$) (Tucker in sod., 2001; Introduction to FT-IR ..., 2001). Njena občutljivost omogoča zaznavo še tako majhnih koncentracij kontaminantov v vzorcu (Introduction to FT-IR ..., 2001), poleg tega nam omogoča razlago kemijske strukture snovi ter določa njene funkcionalne skupine (Tomšič in sod., 2007).

Pri IR-spektrometriji infrardeči žarek pade na vzorec, del sevanja se absorbira, del pa preseva prek vzorca. Dobimo infrardeči spekter, ki predstavlja edinstven odtis vzorca z absorpcijskimi vrhovi. Slednji ustrezajo frekvencam vibracij med vezmi, ki povezujejo atome znotraj molekul. Vsako snov namreč sestavljajo edinstvene kombinacije atomov, zato ni dveh spojin, ki bi tvorile enak infrardeči spekter. Velikost vrhov spektra nam poda količino prisotne snovi v vzorcu (Introduction to FT-IR ..., 2001).

3.4.2.1 Potek analize vzorca z metodo FTIR

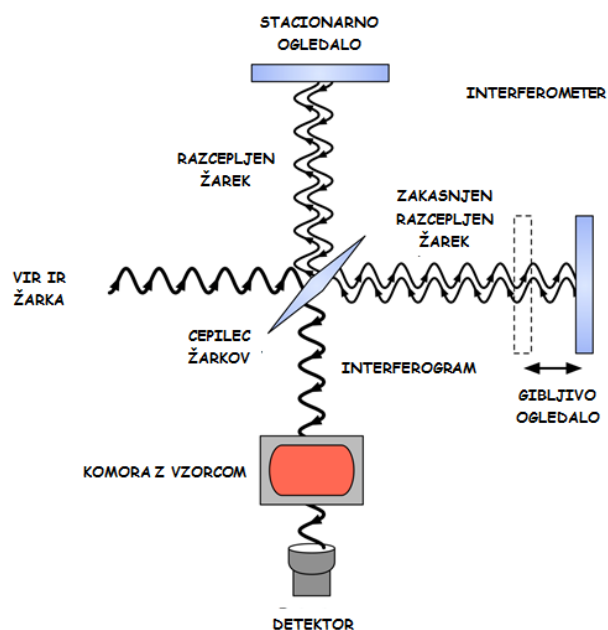
Kot izvor infrardečega elektromagnetnega valovanja lahko uporabljamo navadno žareče črno telo ali laser. IR žarek potuje preko zaslonke, s katero lahko kontroliramo količino svetlobe/energije, ki bo osvetlila vzorec in posredno detektor (Introduction to FT-IR ..., 2001). Žarek vstopa v interferometer, ki ustvarja edinstven tip signala, imenovan interferogram. Signal lahko izmerimo zelo hitro, običajno v obdobju ene sekunde. Večina interferometrov vsebujejo cepilec žarkov (ang. beam splitter), ki prihajajoči infrardeči žarek razdeli na dva dela. Oba žarka se odbijeta od svojega pripadajočega ogledala, ki sta postavljena pravokotno na smer žarka (Michelsonov interferometer). En žarek se odbije od gibljivega ploskega ogledala, ki se premika večinoma za razdaljo nekaj mm stran od cepilca žarkov, drugi pa od fiksnega ogledala. Oba se pred izhodom iz interferometra združita na cepilcu žarkov in tvorita signal, imenovan interferogram. Interferogram je

rezultat interference med tema dvema žarkoma, saj je dolžina prepotovane poti enega izmed žarkov fiksna, druga pa se stalno spreminja zaradi gibanja ogledala. Za interferogram je značilno, da vsaka točka podatka (funkcija lokacije gibajočega se ogledala), ki tvori signal, vsebuje informacijo o frekvenci IR, ki izhaja iz izvora. To pomeni, da se z merjenjem interferograma hkrati merijo tudi vse ostale frekvence IR žarka (Introduction to FT-IR ..., 2001).

FTIR inštrumenti vsebujejo NeHe laser, ki služi kot notranji kalibracijski standard za valovno dolžino infrardeče svetlobe. Žarek, ki ga oddaja ta laser, potuje preko interferometra in se uporablja za kalibracijo valovnih dolžin, kontrolo pozicije ogledal ter zbiranje podatkov proženja spektrometra. S tem se inštrument sam kalibrira (Introduction to FT-IR ..., 2001).

Žarek iz izvora vstopa v komoro z vzorcem, od koder se posreduje preko ali pa se odbije od vzorca, odvisno od vrste analize, ki jo opravljamo. V stiku z vzorcem, specifične vezi med atomi molekul absorbirajo fotone specifične valovne dolžine IR žarka. Absorpcija fotona spodbudi vibriranje vezi med atomoma. Razpršen signal se iz vzorca zbere na detektorju, kjer se sprejmejo vse informacije o vseh valovnih dolžinah IR žarka hkrati. Uporabljeni detektorji so specifično zasnovani za merjenje signalov interferograma. Izmerjen signal se digitalizira ter pošlje na računalnik. Za interpretacijo in identifikacijo signala interferograma s pomočjo Fourierjeve transformacije na računalniku določimo frekvence oz. valovne dolžine, zastopane v tem signalu, ter njihove količine. S tem dobimo želeno spektralno informacijo, potrebno za analizo. Dobljeni infrardeči spekter pa lahko naprej manipuliramo (Introduction to FT-IR ..., 2001).

Pri analizi potrebujemo še relativno skalo intenzitete absorpcije, za kar moramo izmeriti spekter ozadja. Meritev ozadja poteka na enak način, le da je komora, kamor navadno vstavimo vzorec, prazna (Introduction to FT-IR ..., 2001). Spekter ozadja primerjamo s spektri vzorca, s tem pa dobimo odstotek prepustnosti (Introduction to FT-IR ..., 2001) oz. delež absorpcije določenih valovnih dolžin, ki nam povedo količino in prisotnost molekul v analiziranem vzorcu, s tem pa celotno strukturo posameznega vzorca.



Slika 7: Shematičen prikaz poteka FTIR meritve (prirejeno po Wikipedia, 2016).

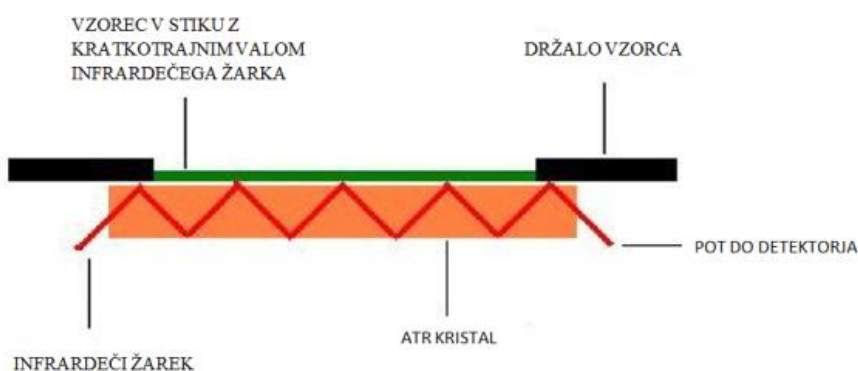
3.4.2.2 FTIR-ATR

Infrardeča spektroskopija z oslabljenim popolnim odbojem (FTIR-ATR) je podskupina infrardeče spektroskopije, ki omogoči merjenje vzorcev direktno v trdni ali tekoči obliki, brez predhodne priprave (Mistry, 2010).

V preteklosti FTIR analize vzorcev, ki so vsebovali vodo, zaradi visoke absorbance IR ozadja niso bile mogoče (Tucker in sod., 2001). Molekule vode (H_2O) zaradi visoke absorbance povzročajo saturacijo signala, kar vodi v popolno zabrisan oz. zatemnjen spekter (Grdadolnik, 2002). ATR metoda je to spremenila. Visoko absorbanco vodnega ozadja lahko deloma kontroliramo z izborom ATR celic, ki vključujejo enkratne ali pa mnogokratne odboje v kristalu. To omogoča slabljenje vpadnega sevanja, pri čemer dobimo srednji IR spekter brez visoke absorbance ozadja. Trenutni razvoj ATR celic in sond je povečal aplikacijo srednje IR spektroskopije na kvalitativne in kvantitativne analize mokrih in abrazivnih ostankov trdnin (Tucker in sod., 2001).

Tesni stik med vzorcem in kristalom omogoča snemanje spektrov z visoko intenziteto. Zadostni pritisk vzorca ob kristal še poveča stično površino med njima (Tomšič in sod., 2007). Zaradi majhne globine prodora svetlobe v vzorec (nekaj μm), je ATR tehnika idealna za meritve visoko absorpcijskih vzorcev, njihove površine in meritve tankih filmov (Grdadolnik, 2002; Tomšič in sod., 2007). Poleg odboja IR žarkov pride tudi do prodora v vzorec, kar signal še dodatno ojača (Tomšič in sod., 2007).

FTIR-ATR analiza poteka enako kot vsaka FTIR analiza, le da tu žarek potuje še preko ATR kristala, ki je na vrhnji strani prekrit z vzorcem v trdnem ali tekočem stanju. Žarek IR svetlobe se naključno odbije preko kristala tako, da tvori kratkotrajen val, ki se posledično prenese na vzorec. Ko žarek zapusti kristal, tega zbere detektor in ga analizira ter pokaže podatke v obliki ATR-IR spektra (Mistry, 2010).



Slika 8: Slika večkratnega odboja sistema ATR (Mistry, 2010).

3.5 ANALIZA VZORCEV TAL

3.5.1 Določanje pH prsti

Za merjenje vrednosti pH zemlje po končanem poskusu smo uporabili prirejen postopek po Öhlingerju (1995). V velike epruvete smo zmešali 1 g posušene zemlje in 5 mL destilirane vode (razmerje 1 : 5). Vse skupaj smo pokrili z Al-folijo in čez noč inkubirali na sobni temperaturi. Naslednji dan smo izmerili pH vzorcev. Skupaj smo imeli 30 vzorcev in sicer 15 vzorcev zemlje zaplanske populacije in 15 vzorcev zemlje žerjavske populacije. Znotraj ene populacije smo imeli 5 izpostavitvev, za vsako izpostavitvev oz. delež onesnaženosti substrata pa po tri paralelke.

3.5.2 Določanje skupne organske snovi po Kromu

Za določanje skupne organske snovi smo uporabili metodo po Kromu (Kandeler, 1995). V velike epruvete smo zatehtali po 0,2 g posušene prsti. Skupaj smo imeli 30 vzorcev in glede na to število smo rabili 100 mL raztopine kalijevega dikromata. Zato smo v čašo zatehtali 9,86 g K_2CrO_7 in dolili 100 mL bidestilirane vode. Vse skupaj smo s stekleno palčko dobro premešali, da se je kalijev dikromat popolnoma raztopil. Za lažje raztapljanje bi raztopino lahko tudi segrevali. Dobili smo raztopino oranžne barve, od katere smo dodali vsakemu vzorcu po 2 mL. V digestoriju smo nato v epruveto dodali še 1,5 mL koncentrirane H_2SO_4 in vzorce inkubirali od 1 do 2 uri. Na koncu smo v epruveto dodali bidestilirano vodo do oznake 10 mL in vsebino premešali. Vzorce smo pokrili z Al-folijo in jih čez noč pustili na sobni temperaturi.

Hkrati smo pripravili še standarde. V pet 10 mL sterilnih bučk smo zatehtali po 0 mg, 5,8 mg, 11,6 mg, 17,4 mg in 23,2 mg mioinozitola. V vsako bučko posebej smo dodali 2 mL raztopine $K_2Cr_2O_7$ in v digestoriju še 1,5 mL koncentrirane H_2SO_4 . Raztopino smo pustili stati 3 ure, nato smo dodali bidestilirano vodo do oznake 10 mL, dobro premešali in pustili stati čez noč.

Naslednji dan smo za fotometrično analizo iz epruvete vzeli 1 mL vzorčne raztopine in jo razredčili s 24 mL bidestilirane vode. Absorbcijsko razredčenih vzorcev smo izmerili na spektrofotometru 8452 A (HP-Hewlett Packard) pri valovni dolžini 570 nm. Za umerjanje spektrofotometra smo uporabili raztopino iz 2 mL $K_2Cr_2O_7$, 6,5 mL bidestilirane vode in 1,5 mL koncentrirane H_2SO_4 .

Na podlagi začetne mase prsti, dane vrednosti mioinozitola ustrezajo 0 %, 2 %, 4 %, 6 % in 8 % organske snovi v prsti. Organsko snov smo izrazili kot delež prsti (%) in jo izračunali iz umeritvene krivulje standarda po enačbi (1):

$$\% \text{ organske snovi} = \frac{S \cdot 2}{SW} \quad \dots (1)$$

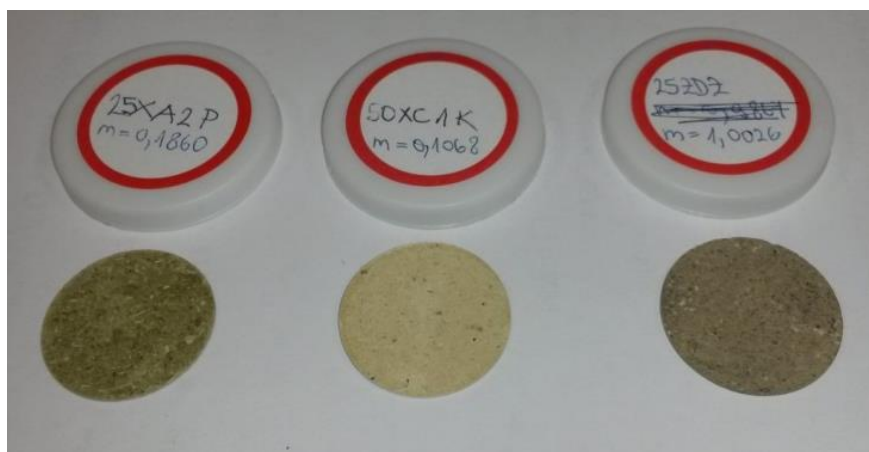
S – organska snov vzorca (%)

2 – faktor pretvorbe (0,2 g)

SW – začetna masa posušene prsti

3.5.3 Določanje celokupnih koncentracij elementne sestave v vzorcih zemlje z metodo XRF

Iz presejane prsti, v katero smo posadili vzorčene rastline, smo naredili tablete s pomočjo hidravlične stiskalnice. Od 46 tablet jih je 24 pripadalo žerjavski populaciji in 22 zaplanski populaciji. Vse tablete smo stehali in izmerili na ^{214}Am in ^{109}Cd izvoru. Merjenje ene tabletke je trajalo 1000 s.



Slika 9: Primer poganjka, korenine ter zemeljskega substrata (foto: Diana Marguč).

3.6 ANALIZE VZORCEV RASTLINSKEGA MATERIALA

3.6.1 Analiza fotosinteznih pigmentov

V očiščene centrifugirke smo zatehtali po 30 mg poganjkov, ki smo jih predhodno uprašili v terilnici s pomočjo tekočega dušika. Nato smo v vsako centrifugirko dodali še 5 mL 80 % acetona in jih zaprli s plastičnimi pokrovčki. Vsebino smo nato dobro pretresli na vorteks-mešalcu in s flomastrom označili spodnji meniskus. Vse vzorce smo pustili stati čez noč v hladilniku, da smo zmanjšali hlapnost acetona.

Naslednji dan smo vzorce zopet vorteksirali in v centrifugirko dolili sveži 80 % aceton do narisane oznake. Dobro premešane vzorce smo centrifugirali vsaj dve minuti na 2500 obratov/min. Nato smo na spektrofotometru 8452A (HP-Hewlett Packard) izmerili absorpcijo bistre tekočine vzorcev pri treh valovnih dolžinah (664 nm, 647 nm, 470 nm). Za umerjanje spektrofotometra smo uporabili 80 % aceton. Iz izmerjenih absorpcij smo preračunali koncentracije pigmentov po enačbah 2, 3, 4:

- Za klorofil a: $chl_a (\mu mol/L) = 13,19 \times A_{664} - 2,57 \times A_{647}$... (2)

- Za klorofil b: $chl_b (\mu mol/L) = 22,10 \times A_{647} - 5,26 \times A_{664}$... (3)

- Za karotenoide: $\sum kar (\mu mol/L) = \frac{1000 \times A_{470} - 1,82 \times chl_a - 85,02 \times chl_b}{198}$... (4)

Dobljene rezultate smo na koncu izrazili glede na suho maso (mg/g) z enačbo 5:

$$X = \frac{conc\ pigmenta \times V\ ekstrakta}{m\ poganjkov \times 1000} \quad \dots (5)$$

Imeli smo 50 vzorcev poganjkov, in sicer 25 za zaplansko populacijo ter 25 za žerjavsko populacijo. Znotraj populacije smo imeli po 5 vzorcev za vsak delež onesnaženja substrata oz. posamezno izpostavitvev.



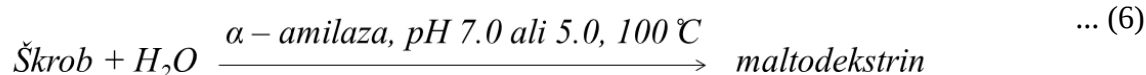
Slika 10: Uprašeni poganjki v 80 % acetonu po vorteksiranju. Na spektrofotometru smo izmerili absorpcijo bistre tekočine vzorcev, iz katere smo določili koncentracijo fotosinteznih pigmentov (foto: Diana Marguč).



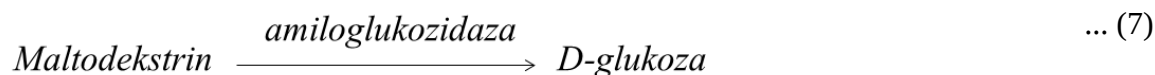
Slika 11: Prikaz razlike v barvnih odtenkih med populacijama. Na levi strani slika prikazuje razliko v barvnih odtenkih med izpostavitvama 0 % in 100 %, desna slika pa prikazuje barvne razlike med vsemi izpostavitvami za žerjavsko populacijo (foto: Diana Marguč).

3.6.2 Analiza vsebnosti škroba v poganjkih po metodi AACC 76.13

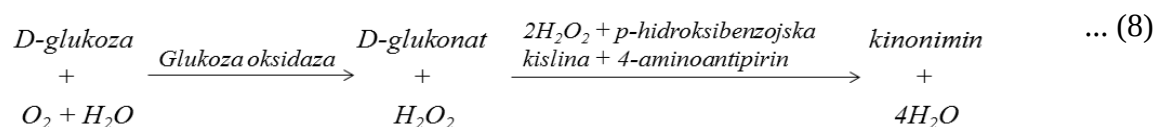
Za merjenje sladkorjev v poganjkih smo s pomočjo Megazyme kita opravili analizo skupnega škroba v poganjkih. Amiloglukozidazna/ α -amilazna metoda AACC 76.13 nam omogoča meritve škroba v širokem spektru hrane, krme in v rastlinskih oz. žitnih proizvodih. Termostabilna α – amilaza v prvem koraku hidrolizira škrob v topno obliko razvejanih in nerazvejanih maltodekstrinov (6).



V drugi stopnji dodatek amiloglukozidaze povzroči hidrolizo maltodekstrina do D-glukoze (7).



D-glukoza se po dodatku reagenta GOPOD oksidira do D-glukonata s sprostitvijo 1 mola vodikovega peroksida (H_2O_2). Vrednosti tega kvantitativno določimo v barvni reakciji, pri kateri se porabi peroksidaza za produkcijo barvila kinonimina (8).



(Megazyme International Ireland Limited, 2009).

3.6.2.1 Priprava spojin

Analizo vsebnosti totalnega škroba v rastlini smo opravljali po s strani proizvajalca priloženem protokolu – AACC 76.13 (Megazyme International Ireland Limited, 2009).

Najprej je bilo potrebno pripraviti vse potrebne spojine in reagente.

Reagent 1: ni bil priložen kitu, zato ga je bilo potrebno posebej pripraviti. V 900 mL destilirane vode smo zatehtali 0,557 g CaCl_2 in dobro premešali. Nato smo raztopini v digestoriju dodali še 5,8 mL led očetne kisline ter umerili pH raztopine na 5,0 z dodajanjem 1 M raztopine NaOH.

Spojina 1: 1,0 mL vsebine stekleničke 1 (vsebuje termostabilno α – amilazo) smo raztopili v 30 mL reagenta 1.

Spojina 2: steklenička 2 – amiloglukozidaza.

Spojina 3: razredčili smo vsebino stekleničke 3 (GOPOD reagent pufer) z 1 L destilirane vode.

Spojina 4: raztopili smo vsebino stekleničke 4 (GOPOD reagent encimi) v 20 mL raztopine 3. Posodo smo prekrili z aluminijasto folijo, da smo preprečili dostop svetlobe. To je reagent za določanje glukoze – GOPOD REAGENT.

Spojina 5: steklenička 5 – standardna raztopina D – glukoze v 0,2 % benzojski kislini.

Spojina 6: steklenička 6 – standardizirana kontrola navadnega koruznega škroba.

3.6.2.2 Priprava vzorcev

Označili smo 50 steklenih epruvet: 25 vzorcev poganjkov za zaplansko populacijo in 25 vzorcev za žerjavsko populacijo. Znotraj posamezne populacije je bilo 5 podvzorcev za posamezen tretma. V vsako epruveto smo zatehtali po 100 mg vzorca poganjkov, ki smo ga predhodno uprašili s tekočim dušikom. Vsako paralelko je sestavljalo 7 vzorcev poganjkov in dodatni vzorec iz 100 mg standardizirane kontrole navadnega koruznega škroba. Omenjeni vzorec smo potrebovali pri preračunavanju škroba v vzorcih.

3.6.2.3 Potek meritev

Vsak vzorec smo raztopili v 0,2 mL 80 % etanola. Vsebinsko epruvete smo s pomočjo vorteks mešalca premešali in nato dodali še 1,5 mL termostabilne α -amilaze (Spojina 1) ter inkubirali vsako epruveto v vreli vodi 6 min. V tem času smo vsake 2 min vsebinsko vorteksirali in s tem zagotovili popolno homogenost zmesi vzorca ter preprečili izgubo vzorca z izparevanjem etanola. Epruvete smo nato namestili v vodno kopel s temperaturo 50 °C in dodali 0,1 mL amiloglukozidaze (Spojina 2) ter inkubirali 30 min.

Na centrifugirke smo s flomastrom označili volumen 10 mL in vanje prenesli celotno vsebinsko posamezne epruvete. Vzorcju smo dolili destilirano vodo do narisane oznake na način, da smo s sten epruvete poskušali izprati še ostali vzorec. Pomagali smo si s kapalko. Vzorec smo dobro premešali z vorteks mešalnikom in centrifugirali 10 min pri 3000 obratov/min. Za nadaljnjo analizo smo uporabili čisto raztopino supernatanta.

Med centrifugiranjem smo pripravili 2 kontroli reagentov in 2 kontroli D-glukoze. Kontrolo D-glukoze smo pripravili iz 0,1 mL standardne raztopine D-glukoze (Spojina 5) in 3 mL GOPOD reagenta. Kontrolo reagentov pa iz 0,1 ml destilirane vode in 3 mL GOPOD reagenta.

Po koncu centrifugiranja smo iz vsake centrifugirke vzeli dvakrat po 0,1 mL supernatanta posameznega vzorca in vsakega posebej prenesli v novo stekleno epruveto, v katero smo dodali še 3 mL GOPOD reagenta. Vzorce in kontrole smo inkubirali pri temperaturi 50 °C za 20 min. Barva se formira že po 15 min in ohrani stabilnost okoli 60 min.

Po končani inkubaciji smo izmerili absorbanco posameznega vzorca ter kontrole D-glukoze na UV/VIS spektrofotometru 8452A (HP-Hewlett Packard) pri valovni dolžini 510 nm. Spektrofotometer smo umerili s kontrolo za reagente.



Slika 12: Obarvanost vzorcev s kinoniminom. Temneje obarvani vzorci vsebujejo višjo koncentracijo glukoze (foto: Diana Marguč).

3.6.3 Določanje sladkorjev v poganjkih s FTIR metodo

V Laboratoriju za strukturo biomolekul na Kemijskem inštitutu smo izmerili infrardeče spektre uprašenega liofiliziranega materiala poganjkov z Bruker Vertex FT infrardečim spektrometrom, ki uporablja eno samo ATR celico (Specac), opremljeno s Tip IIIA monolitnim diamantom in KRS-5 lečo. Spekter je bil posnet pri sobni temperaturi v območju med 7000 cm^{-1} in 370 cm^{-1} . Za hlajenje MCT detektorja se je uporabil tekoč dušik. Tipično smo posneli 256 skenov, jih povprečili in spremenili obliko signala (apodization) s funkcijo Happ-Genzel. Spektrometer smo med meritvami očistili s suhim dušikom. Uporabiti smo morali pravilno količino vzorca, da je pokrival celotno površino

diamanta ($\sim 1,5 \text{ mm}^2$). Optimalni kontakt med vzorcem in diamantom smo zagotovili s safirnim nakovalom, ki sam uravnava pritisk (Nečemer in sod., 2013). Izmerili smo po tri neodvisne vzorce izpostavitve 0 %, 50 % in 100 %. Spektre 3 ponovitve smo na koncu povprečili in analizirali s programom OPUS (Bruker).

3.6.4 Določanje celokupnih koncentracij elementov v rastlinskem materialu z metodo XRF

Na Oddelku za fiziko nizkih in srednjih energij (F-2) na Inštitutu Jožef Stefan smo iz uprašenega materiala s pomočjo hidravlične stiskalnice naredili tablete. Površina ene tabletke je merila $4,9 \text{ cm}^2$. Tablete smo nato stehali in jim izmerili koncentracijo elementov po metodi XRF na americijevem (^{214}Am) in kadmijevem (^{109}Cd) izvoru. Merjenje ene tabletke je trajalo 1000 s.

3.6.5 Računanje mobilnosti elementov v rastlini

Mobilnost elementov iz prsti v rastline določa bioakumulacijski faktor (BAF). Izračunali smo ga kot količnik med koncentracijo elementa v poganjkih rastline in koncentracijo istega elementa v rastnem substratu. Vrednosti nad 1 kažejo intenzivni privzem in transport v poganjke, če so vrednosti nižje od 1, pa je privzem in transport omejen. Če se izračunani BAF nahaja nad vrednostjo 1, to pomeni, da so bile koncentracije tega elementa večje v poganjkih v primerjavi s substratom in obratno, če so vrednosti pod vrednostjo 1, pomeni, da so koncentracije elementov v poganjkih nižje od koncentracije v zemlji.

Mobilnost elementov iz korenin v poganjke pa določa translokacijski faktor (TF). Tega smo izračunali kot količnik med koncentracijo elementa v poganjkih in koncentracijo istega elementa v koreninah. Če je dobljena vrednost nad 1, pomeni, da je element dobro mobilen znotraj rastline, če pa je vrednost manjša od 1, pomeni, da je element slabo mobilen.

3.7 STATISTIČNA ANALIZA

Podatke, pridobljene v poskusu, smo obdelali s pomočjo računalniškega sistema Microsoft Excel 2010. Izračunali smo povprečne vrednosti, standardno deviacijo, standardno napako in vse dobljeno prikazali v obliki preglednic ter stolpčnih grafov.

Rezultate meritev smo statistično obdelali s pomočjo programa StatSoft, Statistica verzija 7.0. Za izračun statistično značilnih razlik znotraj ene populacije smo uporabili enosmerno ANOVA, za primerjavo obeh populacij pa FAKTORSKO ANOVA. V obeh primerih smo naredili Duncanov test, katerega rezultate v obliki črk smo izrisali na vrhu stolpčnih grafov. Te črke nam povedo statistično značilno razliko med vrednostmi koncentracij elementov, klorofila, sladkorjev v posameznem vzorcu, pri čemer je statistično značilna razlika pri vrednosti $p < 0,05$.

Dobljene rezultate za strukturo substrata smo prikazali v obliki barvnega diagrama. Izrisali smo ga z dvosmernim grozdenjem Pearsonovega korelacijskega koeficienta s programom R i386 3.0.2. Za osnovo barvnega diagrama smo podatke za vse parametre posebej povprečili in naredili z-transformacijo, kjer je x-izvoren podatek (9).

$$y = \frac{(x - \text{povprečje})}{stdev} \dots (9)$$

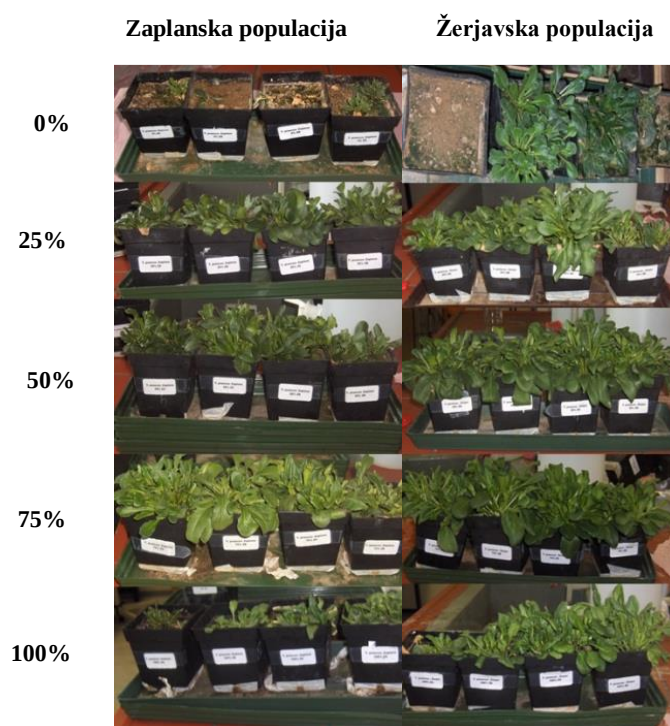
Preglednica 2: Lastnosti substrata žerjavske populacije pri različnih izpostavitvah onesnaženju. Vrednosti predstavljajo meritve koncentracij elementov (povprečje $\pm$ se, enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$; $n=2-3$), pH in organske snovi (povprečje $\pm$ se, enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$; $n=3$).

IZPOSTAVITEV ONESNAŽENJU - ŽERJAVSKA POPULACIJA						
	0%	25%	50%	75%	100%	
Cd (mg/kg)	3,32 $\pm$ 0,496 a	12,9 $\pm$ 2,29 ab	23,6 $\pm$ 2,34 b	43,8 $\pm$ 4,26 c	64,5 $\pm$ 2,22 d	
Zn (mg/kg)	94,3 $\pm$ 9,05 a	494 $\pm$ 14,7 b	913 $\pm$ 23,05 c	1240 $\pm$ 42,9 d	1850 $\pm$ 18,03 e	
Pb (mg/kg)	72,5 $\pm$ 6,63 a	3640 $\pm$ 112 b	6920 $\pm$ 104 c	10880 $\pm$ 224 d	16200 $\pm$ 300 e	
K (mg/kg)	14500 $\pm$ 794 b	12900 $\pm$ 412 b	12700 $\pm$ 894 b	7910 $\pm$ 701 a	6750 $\pm$ 606 a	
Ca (mg/kg)	8830 $\pm$ 537 a	21800 $\pm$ 734 b	46700 $\pm$ 733 c	62300 $\pm$ 3860 d	97200 $\pm$ 3004,3 e	
Mn (mg/kg)	759 $\pm$ 58,7 a	756 $\pm$ 24,5 a	570 $\pm$ 32,8 a	573 $\pm$ 61,7 a	648 $\pm$ 71,2 a	
Fe (mg/kg)	30800 $\pm$ 989 c	27900 $\pm$ 850 bc	27800 $\pm$ 891 bc	25300 $\pm$ 583 b	21400 $\pm$ 654 a	
pH	7,21 $\pm$ 0,0245 a	7,38 $\pm$ 0,0136 b	7,41 $\pm$ 0,0152 b	7,38 $\pm$ 0,0191 b	7,67 $\pm$ 0,00544 c	
Org. snov	5,55 $\pm$ 2,56 a	2,46 $\pm$ 0,243 a	4,51 $\pm$ 1,062 a	3,56 $\pm$ 0,382 a	5,31 $\pm$ 0,316 a	

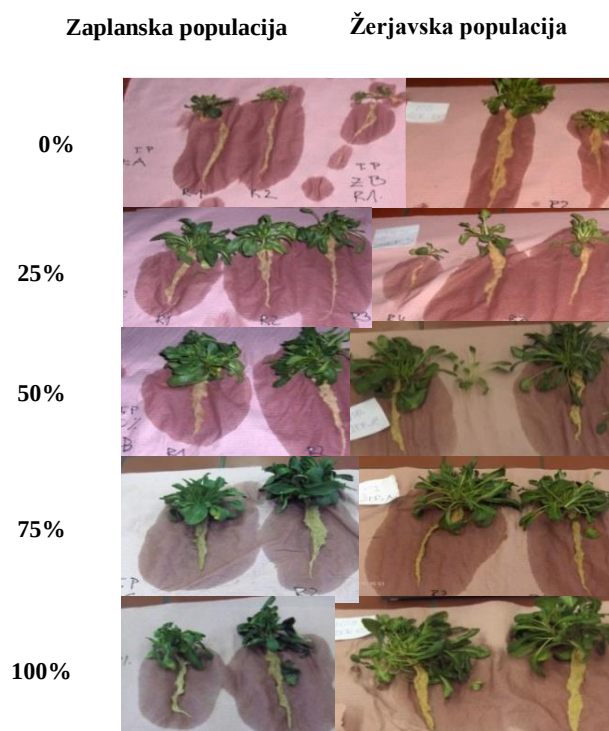
4.2 ANALIZA RASTLINSKEGA MATERIALA

4.2.1 Morfologija

Iz Slike 13 in 14 je razvidno, da je bila rast rastlin izpostavitve 0 % slaba. Še posebej pri rastlinah iz zaplanske populacije. Z večanjem deleža onesnaženja substrata se je biomasa rastlin povečevala. Najbolj uspešno so rasle rastline obeh populacij na izpostavitvah 50 % in 75 %. Na substratu s 100 % onesnaženjem je bila rastlinska rast za obe populaciji ponovno manjša glede na predhodne izpostavitve. Močnejši učinek na upad biomase je viden pri zaplanski populaciji. Iz Slike 14 so razvidne tudi razlike v velikosti rastlin znotraj istega lončka.



Slika 13: Prikaz rasti ranega mošnjaka pred pobiranjem materiala.



Slika 14: Pobran in očiščen rastlinski material, pripravljen za ločevanje poganjkov in korenin.

4.2.2 Biomasa rastlin

4.2.2.1 Sveža masa korenin

Faktorska analiza variance je pokazala, da je na svežo biomaso korenin in poganjkov statistično značilno vplivala izpostavljenost onesnaženju substrata. Populacija po faktorski analizi ni imela vpliva na svežo biomaso rastline (Preglednica 3).

Iz grafa (Slika 15), ki nam prikazuje svežo maso korenin glede na povečevanje izpostavljenosti onesnaženju, je za obe rastlinski populaciji razvidna zvonasta krivulja. Isto velja za svežo biomaso poganjkov (Slika 16). Iz obeh grafov je razviden trend naraščanja tako sveže biomase korenin kot poganjkov rastlin z večanjem onesnaženja substrata, do vključno izpostavitve 75 %. Pri rastlinah, ki so rasle na izpostavitvi 100 %, pa je sveža biomasa korenin in poganjkov znova manjša od predhodnje izpostavitve.

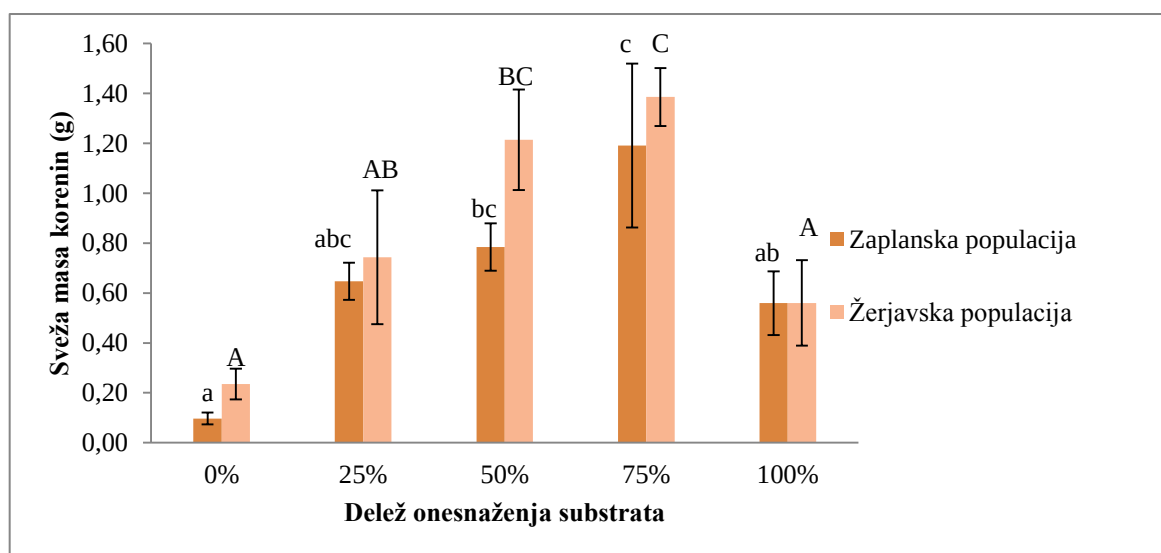
Znotraj zaplanske populacije so imele korenine rastlin s substrata s 50 % in 75 % onesnaženostjo statistično značilno večjo svežo biomaso kot rastline iz neonesnaženega substrata (0 %). Prav tako je bila statistično značilno večja sveža masa korenin s substrata s 75 % onesnaženjem v primerjavi s koreninami rastlin s substrata s 100 % onesnaženostjo. Pri žerjavski populaciji se je pojavila statistično značilna razlika med koreninami rastlin s substrata s 50 % in 75 % onesnaženjem, ki so imele večjo svežo biomaso od korenin rastlin iz neonesnaženega substrata (izpostavitev 0 %). Prav tako so imele rastline s substrata s 75 % onesnaženjem statistično značilno večjo svežo biomaso korenin od rastlin, ki so rasle na substratu s 25 % in 100 % onesnaženjem.

Iz Slike 16 je znotraj zaplanske populacije razvidna statistično značilna razlika med svežo biomaso poganjkov neonesnaženega substrata (0 %) in poganjkov iz substrata s 25 %, 50 % in 75 % onesnaženostjo, pri čemer so imeli slednji večjo svežo maso. Večja sveža biomasa je bila statistično značilna tudi za poganjke, izpostavljene 75 % onesnaženju, v primerjavi s poganjki iz izpostavitve 100 %.

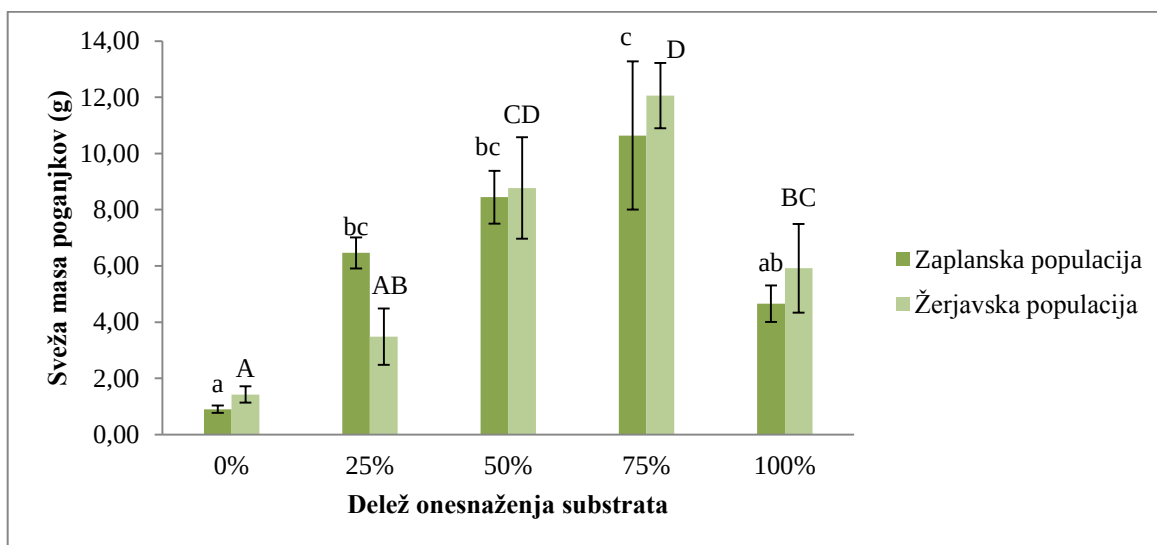
Pri žerjavski populaciji so imeli poganjki neonesnaženega substrata (0 %) statistično značilno manjšo svežo maso od poganjkov iz substrata s 50 %, 75 % in 100 % onesnaženjem. Prav tako je bila sveža biomasa poganjkov s 75 % onesnaženega substrata statistično značilno večja od poganjkov izpostavitve s 25 % in 100 %.

Preglednica 3: Prikaz factorske analize za svežo maso korenin in poganjkov med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije, ki smo jo opravili s programom Statistica 7, factorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

Korenine					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	8,17680	4	2,04420	6,5238	0,000174
Populacija	0,48630	1	0,48630	1,5520	0,217248
Delež onesnaženosti substrata (%)*Populacija	0,40613	4	0,10153	0,3240	0,860896
Napaka	20,68074	66	0,31334		
Poganjki					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	694,463	4	173,616	11,8501	0,000000
Populacija	0,208	1	0,208	0,0142	0,905546
Delež onesnaženosti substrata (%)*Populacija	57,171	4	14,293	0,9755	0,426980
Napaka	966,965	66	14,651		



Slika 15: Sveža masa korenin pri populacijah ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med svežo maso korenin po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n = 3-12$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko.



Slika 16: Sveža masa poganjkov pri populacijah ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med svežo maso poganjkov po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n = 3-12$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko.

4.2.2.2 Suha masa

Faktorska analiza variance (Preglednica 4) je pokazala, da je na suho biomaso korenin in poganjkov vplival delež onesnaženja substrata. Pri koreninah populacija ni imela statistično značilnega vpliva na suho biomaso, pri pogankih pa.

Iz grafov (Slika 17, 18) lahko razberemo trend naraščanja suhe biomase korenin in poganjkov z večanjem deleža onesnaženja substrata v obliki zvonaste krivulje za obe populaciji. Suha masa korenin je naraščala z naraščanjem deleža onesnaženja, vse do vključno substrata s 75 % onesnaženjem. Za rastline, ki so rasle na substratu s 100 % onesnaženjem, pa je bila suha biomasa korenin in poganjkov zopet manjša od izpostavitve 75 %. Največjo suho biomaso so potemtakem dosegle korenine in poganki, ki so rasli na substratu s 25 %, 50 % in 75 % onesnaženjem.

Slika 17 v okviru zaplanske populacije prikazuje statistično značilno večjo suho biomaso korenin rastlin, ki so rasle na substratu s 25 %, 50 % in 75 % onesnaženjem v primerjavi z rastlinami iz neonesnaženega substrata (0 %). Rastline s substrata s 50 % in 75 % onesnaženjem pa so imele statistično večjo suho biomaso tudi od rastlin iz substrata s

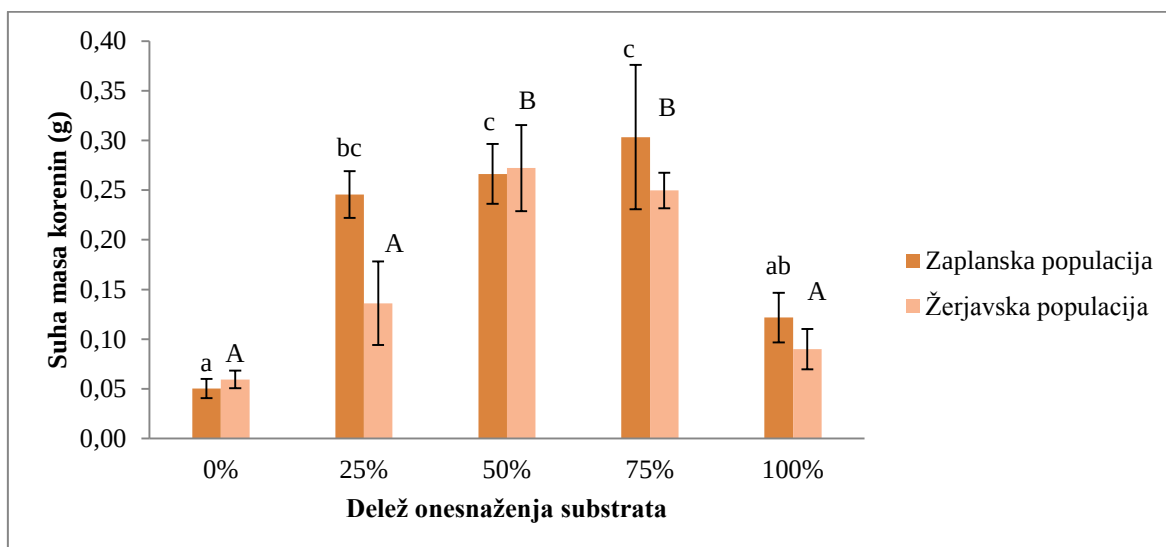
100 % onesnaženostjo. V okviru žerjavske populacije pa so korenine s 50% in 75% deležem onesnaženja imele statistično značilno večjo suho biomaso od ostalih izpostavitvev.

V okviru zaplanske populacije je za rastline iz substrata s 25 %, 50 % in 75 % onesnaženjem vidno statistično značilno povečanje suhe biomase poganjkov, v primerjavi z rastlinami neonesnaženega substrata (0 %) (Slika 18). Prav tako je bila statistično značilno večja suha biomasa poganjkov rastlin iz substrata s 75 % onesnaženjem od poganjkov rastlin, ki so rasle na substratu s 100 % onesnaženjem. Pri žerjavski populaciji pa so statistično značilno večjo suho biomaso poganjkov dosegale rastline iz substrata s 50 % in 75 % deležem onesnažene zemlje od rastlin neonesnaženega (0 %) ter substrata s 25 % onesnaženjem.

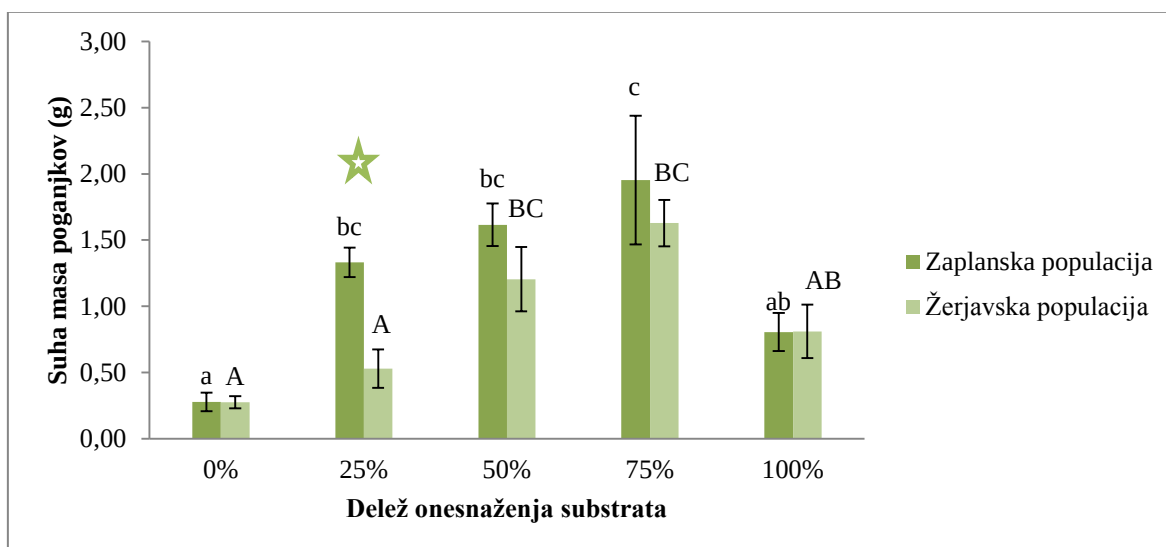
Iz grafa poganjkov rastlin, rastočih na substratu s 25 % onesnaženjem je viden vpliv populacije na suho biomaso. Rastline zaplanske populacije so tvorile večjo suho biomaso kot rastline žerjavske populacije (Slika 18).

Preglednica 4: Rezultat faktorske analize suhe biomase korenin in poganjkov med žerjavsko in zaplansko populacijo, ki smo jo opravili s programom Statistica 7, faktorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

Korenine					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	0,449416	4	0,112354	10,1486	0,000002
Populacija	0,021260	1	0,021260	1,9204	0,170481
Delež onesnaženja substrata (%)*Populacija	0,039620	4	0,009905	0,8947	0,472238
Napaka	0,730680	66	0,011071		
Poganjki					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	15,35427	4	3,83857	11,2923	0,000000
Populacija	1,55251	1	1,55251	4,5672	0,036300
Delež onesnaženja substrata (%)*Populacija	1,69495	4	0,42374	1,2466	0,299973
Napaka	22,43514	66	0,33993		



Slika 17: Suha masa korenin pri populacijah ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med suho maso korenin po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n = 3-12$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko.



Slika 18: Suha masa poganjkov pri populacijah ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med suho maso poganjkov po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n = 3-12$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko. * nad stolpci označuje statistično značilno razliko med populacijama znotraj posameznega odstotka onesnaženega substrata (izpostavitve) (faktorska ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$; $n = 3-12$).

4.2.2.3 Delež vode v koreninah

Faktorska analiza variance je pokazala, da na delež vode v koreninah in poganjkih vplivata tako delež onesnaženja substrata kot populacija (Preglednica 5). Vpliv deleža onesnaženja na delež vode v koreninah je viden iz Slike 19. V koreninah zaplanske populacije je bil statistično značilno največji za rastline s substrata s 75 % in 100 % onesnaženjem. Statistično značilno manjši delež vode so vsebovale korenine rastlin s substrata s 25 % in 50 % onesnaženjem, medtem ko so se od vseh, s statistično najmanjšim deležem vode v koreninah, razlikovale rastline neonesnaženega substrata (0 %). V primeru žerjavske populacije pa se statistično značilno od ostalih razlikujejo le korenine iz kontrolnega rastišča (0 %), za katere je statistično značilen najmanjši delež vode. Pri obeh populacijah je bil opazen trend naraščanja deleža vode v koreninah z večanjem deleža onesnaženja.

Pri poganjkih se pri obeh populacijah delež vode statistično značilno razlikuje le pri rastlinah iz neonesnaženega substrata (0 %), in sicer je zanj značilen najmanjši delež. Med rastlinami iz ostalih substratov ni statistično značilne razlike (Slika 20).

Rastline žerjavske populacije v svojih poganjkih in koreninah vsebujejo več vode v primerjavi z rastlinami zaplanske populacije (Slika 19, 20). Statistično značilna razlika v deležu vode znotraj posamezne izpostavitve je bila vidna pri rastlinah substrata z 0 %, 25 %, 50 % in 75 % onesnaženjem.

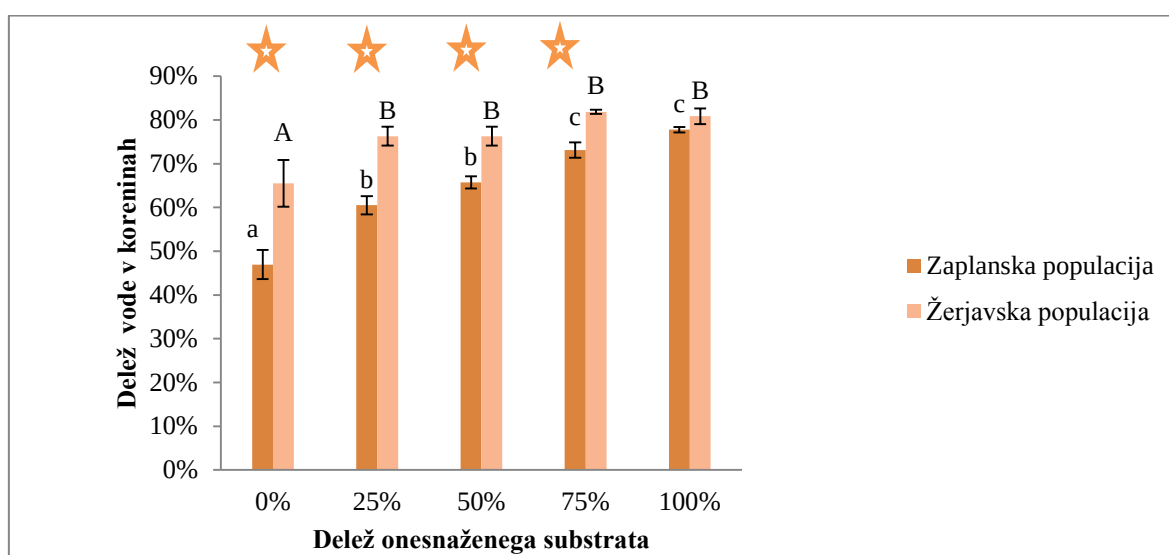
Preglednica 5: Prikaz factorske analize za delež vode v koreninah in poganjkih med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije, ki smo jo opravili s programom Statistica 7, factorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

Korenine					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	0,34443	4	0,08611	15,467	0,000000
Populacija	0,20426	1	0,20426	36,690	0,000000
Delež onesnaženja substrata (%)**Populacija	0,04619	4	0,01155	2,074	0,094101
Napaka	0,36743	66	0,00557		

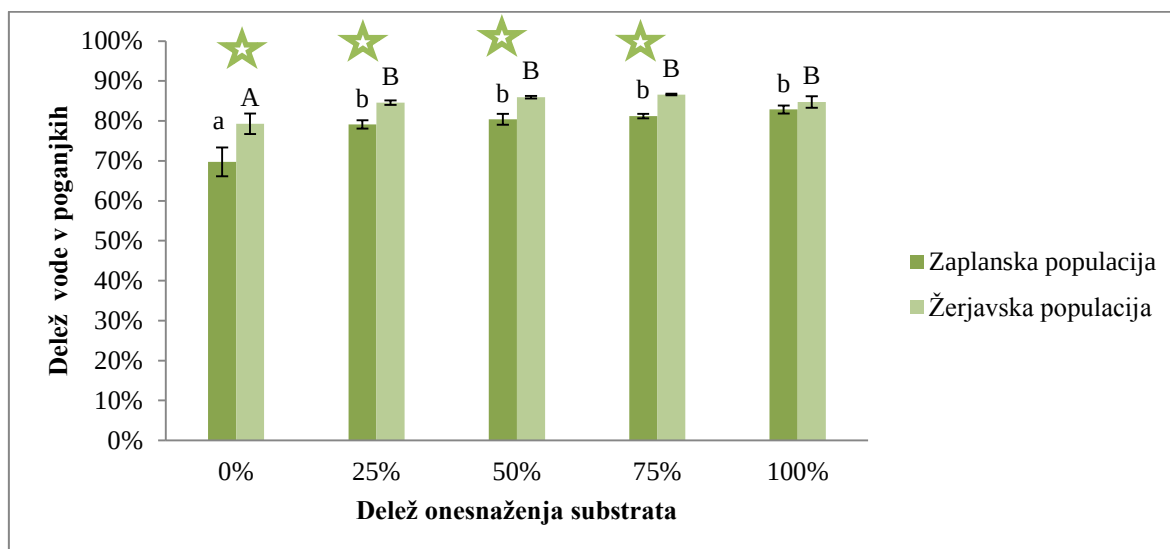
se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 5: Prikaz factorske analize za delež vode v koreninah in poganjkih med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije, ki smo jo opravili s programom Statistica 7, factorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistični značilne vplive.

Poganjki					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	0,06026	4	0,01507	12,26	0,000000
Populacija	0,05088	1	0,05088	41,39	0,000000
Delež onesnaženja substrata (%)**Populacija	0,00758	4	0,00189	1,54	0,200529
Napaka	0,08113	66	0,00123		



Slika 19: Delež vode v koreninah rastlin pri populacijah ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med deležem vode v koreninah po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n = 3-12$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko. * nad stolpci označuje statistično značilno razliko med populacijama znotraj posameznega odstotka onesnaženega substrata (factorska ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n = 3-12$).



Slika 20: Delež vode v poganjkih rastlin pri populacijah ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med deležem vode v poganjkih po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n = 3-12$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko. * nad stolpci označuje statistično značilno razliko med populacijama znotraj posameznega odstotka onesnaženega substrata (faktorska ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n = 3-12$).

4.2.3 Biokemijske analize

4.2.3.1 Fotosintezni pigmenti

Ne glede na populacijo in delež onesnaženja substrata je bila v vseh rastlinah največja koncentracija klorofila a, sledil ji je klorofil b, najmanjše koncentracije pa so dosegali karotenoidi (Slika 21).

Faktorska analiza variance je pokazala, da je na koncentracijo klorofila a (mg/g) in klorofila b statistično značilno vplivala populacija, medtem ko delež onesnažene zemlje v rastišču ni imel vpliva. Na koncentracijo karotenoidov (mg/kg) v poganjkih pa je faktorska analiza variance pokazala statistično značilen vpliv populacije in tudi deleža onesnaženosti substrata (Preglednica 6).

V okviru zaplanske populacije je bila statistično značilno večja koncentracija klorofila a pri rastlinah iz substrata s 25 % in 75 % onesnaženjem glede na neonesnažen substrat (0 %).

To kaže na dvig koncentracije klorofila a s povečanjem onesnaženja s težkimi kovinami. Znotraj žerjavske populacije pa ni bilo statistično značilnih razlik po izpostavitvah.

Po izpostavitvah za obe populaciji v koncentraciji klorofila b ni bilo statistično značilnih razlik (Slika 21).

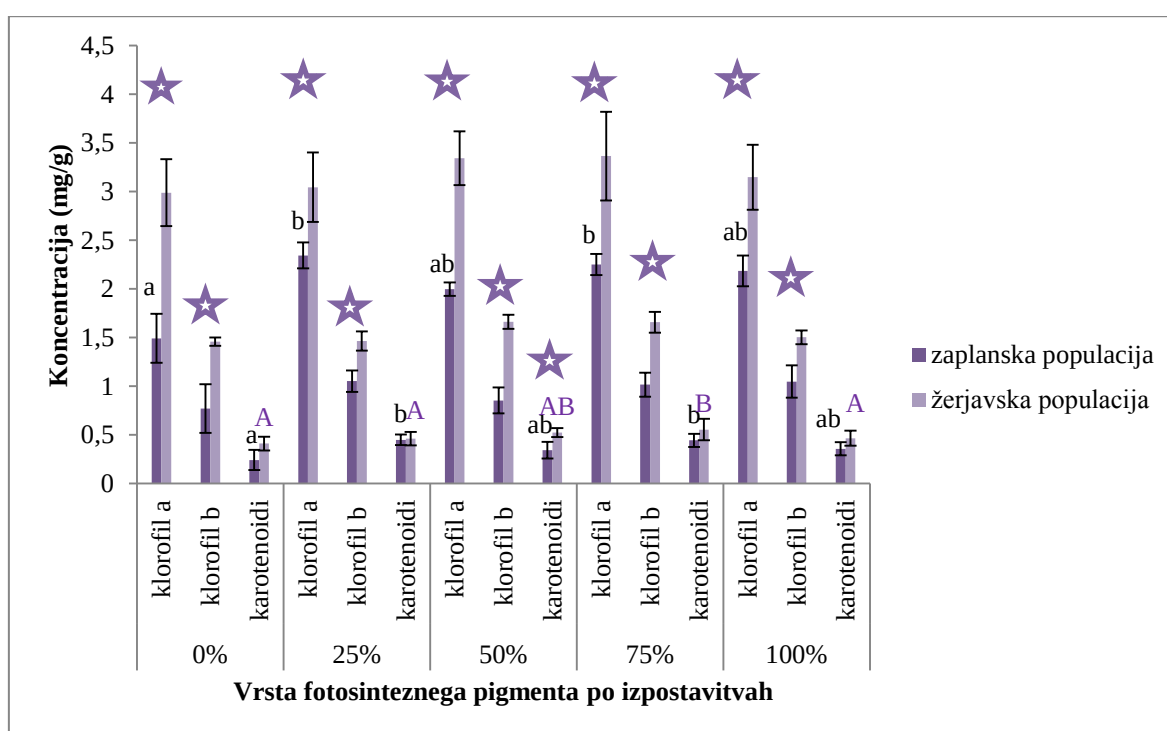
Vpliv deleža onesnaženja na koncentracijo karotenoidov zaplanske populacije se kaže v statistično značilno večji koncentraciji pri poganjkih iz substrata s 25 % in 75 % onesnaženjem v primerjavi z rastlinami neonesnaženega substrata (0 %). Rastline žerjavske populacije iz substrata s 75 % onesnaženjem so vsebovale statistično značilno večje koncentracije karotenoidov od rastlin iz substratov z 0 %, 25 % in 100 % deležem onesnaženja. V obeh populacijah vidimo trend naraščanja koncentracij karotenoidov pri 25 %, 50 % in 75 % izpostavljenosti in nato pri izpostavitvi 100 % ponovno zmanjšanje koncentracije (Slika 21). Koncentracije klorofila a in b so pri vseh izpostavitvah statistično značilno večje za žerjavsko populacijo v primerjavi z zaplansko. Prav tako pa imajo rastline žerjavske populacije tudi statistično značilno večjo koncentracijo karotenoidov. Statistično značilno je bilo to le pri rastlinah iz substrata s 50 % deležem onesnaženja (Slika 21).

Preglednica 6: Prikaz faktorske analize rastlinskih pigmentov klorofila a, klorofila b in karotenoidov pri različnem deležu onesnaženosti med rastlinami žerjavske populacije in zaplanske populacije, ki smo jo opravili s programom Statistica 7, faktorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

Klorofil a					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	1,4663	4	0,3666	2,496	0,075467
Populacija	11,8298	1	11,8298	80,558	0,000000
Delež onesnaženja substrata (%) * Populacija	0,5624	4	0,1406	0,957	0,452104
Napaka	2,9370	20	0,1468		
Klorofil b					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	0,22869	4	0,05717	1,881	0,153234
Populacija	3,30639	1	3,30639	108,779	0,000000
Delež onesnaženja substrata (%) * Populacija	0,11150	4	0,02788	0,917	0,473295
Napaka	0,60791	20	0,03040		
se nadaljuje					

Nadaljevanje preglednice 6: Prikaz factorske analize rastlinskih pigmentov klorofila a, klorofila b in kartenoidov pri različnem deležu onesnaženosti med rastlinami žerjavske populacije in zaplanske populacije, ki smo jo opravili s programom Statistica 7, factorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično različne vplive.

Karotenoidi					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	0,144234	4	0,036059	6,0670	0,002297
Populacija	0,112835	1	0,112835	18,9850	0,000305
Delež onesnaženja substrata (%) * Populacija	0,032193	4	0,008048	1,3542	0,284987
Napaka	0,118867	20	0,005943		



Slika 21: Primerjava koncentracij fotosinteznih pigmentov (mg/g) pri populacijah ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med koncentracijami fotosinteznih pigmentov v poganjkih po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n=5$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko. * nad stolpci označuje statistično značilno razliko med populacijama znotraj posameznega deleža onesnaženega substrata (factorska ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n=5$).

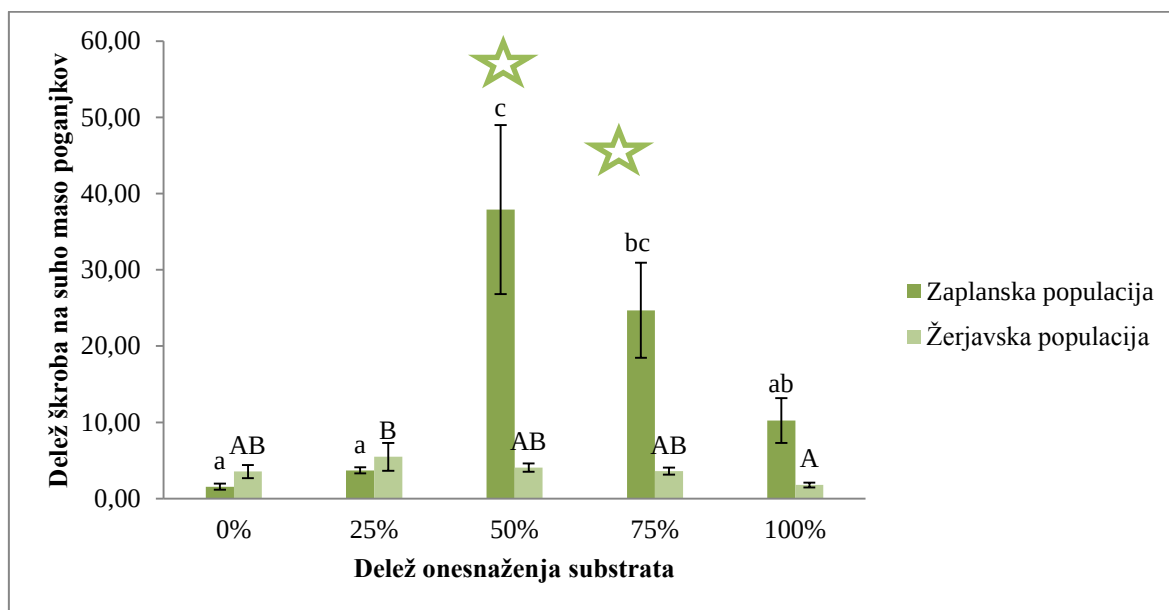
4.2.3.2 Vsebnost škroba

4.2.3.2.1 AACC metoda 76.13

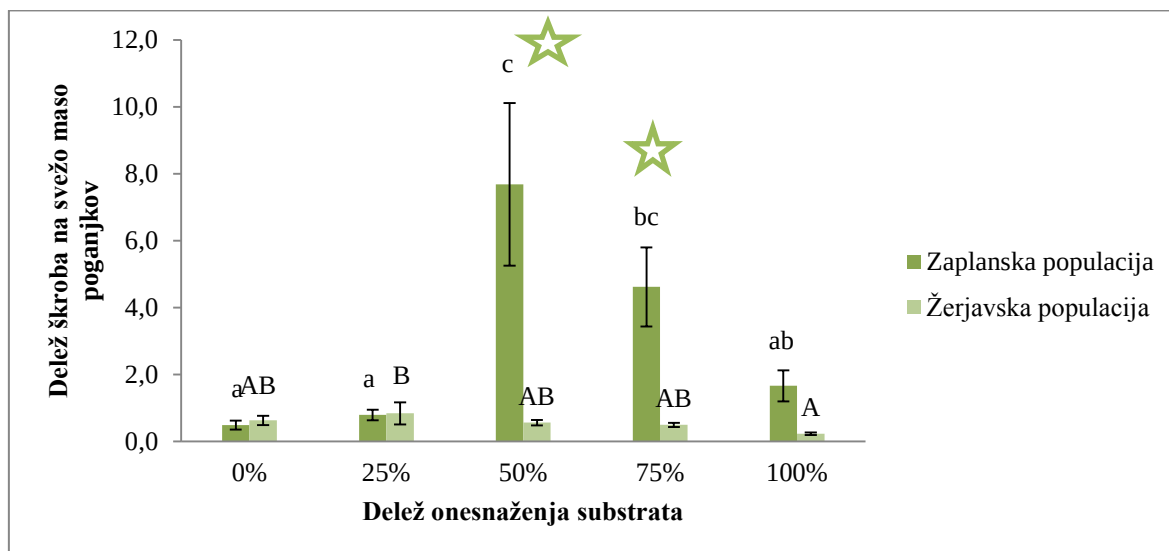
Faktorska analiza variance kaže, da so na delež škroba v sveži in suhi masi poganjkov statistično značilno vplivali delež onesnaženja substrata, populacija in kombinacija obeh parametrov (Preglednica 7). Viden je trend naraščanja vsebnosti škroba v poganjkih zaplanske populacije do vključno rastlin na substratu s 50 % onesnaženjem. Nato vsebnost škroba začne ponovno upadati. Delež škroba v sveži in suhi masi poganjkov zaplanske populacije iz substrata s 100 % onesnaženjem se statistično značilno ne razlikuje od deleža škroba v poganjkih iz substrata z 0 % in 25 % onesnaženjem. Statistično značilno večji delež škroba od poganjkov iz substrata z 0 % in 25 % deležem onesnaženja je bil značilen za poganjke substrata s 50 % in 75 % onesnaženjem (Slika 22, 23). V okviru žerjavske populacije ni bilo velikih statistično značilnih razlik glede na spreminjanje deleža onesnaženja. Edina statistično značilna razlika je vidna med poganjki iz substrata s 25 % onesnaženjem, ki je bil večji od deleža škroba pri poganjkih iz popolnoma onesnaženega substrata (100 %). Kar kaže na trend upadanja deleža škroba z naraščanjem deleža onesnaženja substrata. Vpliv populacije na delež škroba v sveži in suhi masi poganjkov je pokazal, da so rastline zaplanske populacije iz substrata s 50 % in 75 % onesnaženjem vsebovale statistično značilno večji delež škroba kot rastline žerjavske populacije (Slika 22, 23).

Preglednica 7: Prikaz factorske analize deleža škroba na suho in svežo maso poganjkov žerjavske in zaplanske populacije rastlin, ki so rastle na substratih z različnim onesnaženjem. Faktorsko analizo smo opravili s programom Statistica 7, factorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

Delež škroba v suhi masi poganjkov					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata	2381,372	4	595,343	6,78964	0,000287
Populacija	1776,521	1	1776,521	20,26047	0,000057
Delež onesnaženja substrata (%)*Populacija	2393,104	4	598,276	6,82309	0,000276
Napaka	3507,363	40	87,684		
Delež škroba v sveži masi poganjkov					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	92,0891	4	23,0223	5,97259	0,000726
Populacija	78,0143	1	78,0143	20,23901	0,000058
Delež onesnaženja substrata (%)*Populacija	96,5271	4	24,1318	6,26043	0,000521
Napaka	154,1860	40	3,8547		



Slika 22: Primerjava deleža škroba v suhi masi poganjkov rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med deležem škroba v poganjkih po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n = 5$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko.* nad stolpci označuje statistično značilno razliko med populacijama znotraj posameznega odstotka onesnaženega substrata (faktorska ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n = 5$).



Slika 23: Primerjava deleža škroba v sveži masi poganjkov rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med deležem škroba v poganjkih po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n = 5$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko.* nad stolpci označuje statistično značilno razliko med populacijama znotraj posameznega deleža onesnaženega substrata (faktorska ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n = 5$).

4.2.3.2.2 FTIR-ATR analiza ogljikovih hidratov

Za določanje ogljikovih hidratov v poganjkih smo vzorce pomerili tudi s FTIR-ATR, pri čemer smo primerjali le tri izpostavitve za vsako populacijo, in sicer 0 %, 50 % in 100 %. FTIR spektri rastlinskih vzorcev so zelo kompleksni. Njihova interpretacija je otežena zaradi pogostega prekrivanja absorpcijskih trakov, značilnih za posamezne skupine molekul. Vrhovi FTIR spektra navadno ponazarjajo vibracijo določene kemijske vezi ali posamezne funkcionalne skupine, njihova višina pa količino teh molekul v vzorcu. Vibracijska gibanja kemijskih vezi vseh molekul segajo v območje med 2,5 in 25 μm valovne dolžine oz. 400 cm^{-1} – 4000 cm^{-1} (recipročnih centimetrov) (Kovačec, 2012).

Pri naši analizi smo se osredotočili na ogljikove hidrate (CHO) v poganjkih ranega mošnjaka. Prvi vrh v ATR grafih (1735 cm^{-1}) prikazuje absorpcijski trak za lignin, pektin in različne polisaharide (Regvar in sod., 2013) v poganjkih po različnih izpostavitvah. V okviru zaplanske populacije so koncentracije teh snovi pri izpostavitvi 0 % in 50 % podobne. Pri izpostavitvi 100 % pa so opazne manjše koncentracije.

Pri žerjavski populaciji so največje koncentracije značilne za izpostavitvev 50 %, manjše koncentracije za izpostavitvev 0 %, najmanjše pa za izpostavitvi 100 %. Če primerjamo populaciji med seboj, vidimo, da ima pri vseh izpostavitvah nižjo koncentracijo zaplanska populacija, pri čemer je največja razlika opazna prav pri izpostavitvi 50 % (Slika 24).

Drugi vrh (1631 cm^{-1}) predstavlja absorpcijski trak za pektin, proteine in aromatske snovi, kot je lignin (Regvar in sod., 2013). Ta vrh je pri obeh populacijah največji pri izpostavitvi 0 %. V vseh primerih večje koncentracije pektina dosega zaplanska populacija v primerjavi z žerjavsko (Slika 24).

Tretji vrh (1600 cm^{-1}) predstavlja karboksilno/kislo skupino pektina in aromatskih snovi, kot je lignin (Regvar in sod., 2013). V tem primeru se trakova zaplanske populacije med izpostavitvama 50 % in 100 % ne razlikujeta, izpostavitvev 0 % je malce manjša od ostalih dveh. V okviru žerjavske populacije je opazna porast pektina in lignina s povečanjem izpostavljenosti onesnaženju. In sicer največje koncentracije so vsebovali poganjki

izpostavitve 100 %, sledi izpostavitvev 50 %, najmanjše koncentracije pa so bile značilne za neonesnažen substrat (0 %). Primerjava populacij je pokazala najvišje koncentracije pri izpostavitvi 100 % žerjavske populacije, sledila je zaplanska populacija z izpostavitvami 100 % in 50 %. Slednji sta bili zelo podobni izpostavitvi 50 % žerjavske populacije. Malce manjše koncentracije so bile značilne za izpostavitve 0 % zaplanske populacije, najmanjše koncentracije pa so dosegale rastline žerjavske populacije izpostavitve 0 % (Slika 24).

Četrty vrh (1390 cm^{-1}) predstavlja absorpcijske trakove za pektin in lignin ter različne polisaharide (npr. celuloza in hemiceluloza) (Regvar in sod., 2013). Pri obeh populacijah je koncentracija teh naraščala z izpostavljenostjo onesnaženju. Pri čemer so koncentracije v okviru zaplanske populacije izpostavitve 100 % mnogo večje od izpostavitve 50 %. Pri žerjavski populaciji pa ni neke razlike med izpostavitvama 50 % in 100 %. Najmanjše koncentracije pektina in lignina so bile značilne za izpostavitvev 0 % in 50 % zaplanske populacije, mnogo večje od vseh ostalih pa so bile značilne za izpostavitvev 100 % zaplanske populacije (Slika 24).

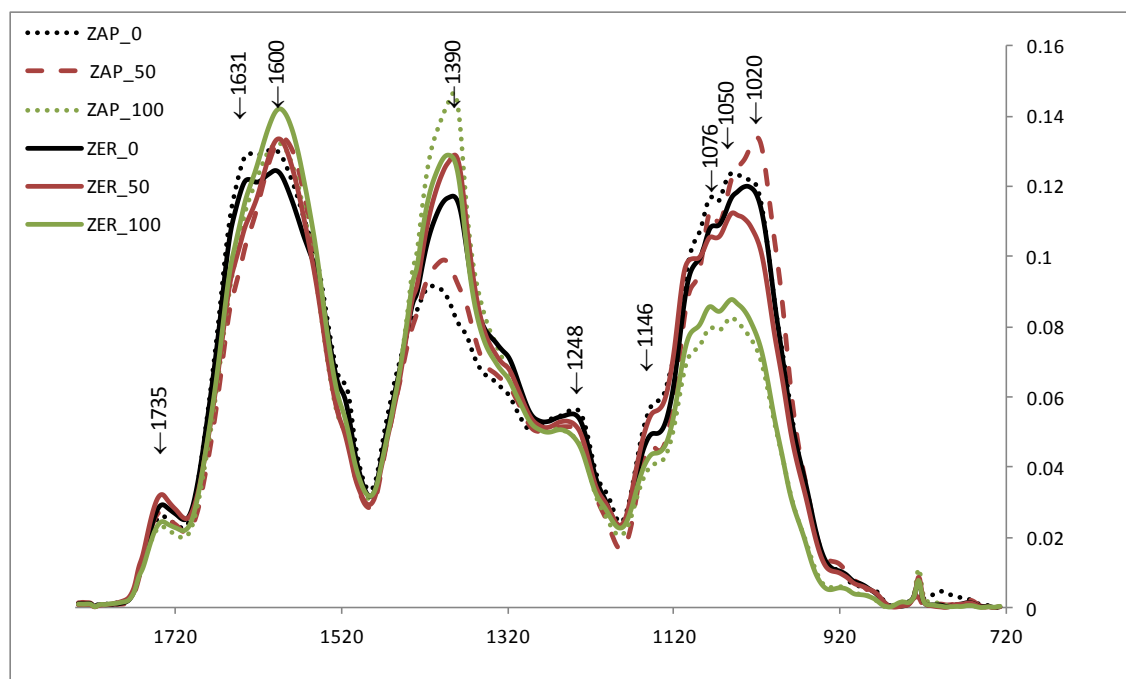
Peti vrh (1248 cm^{-1}) predstavlja absorpcijske trakove za lignin in različne polisaharide (Regvar in sod., 2013). Pri obeh populacijah so bile največje koncentracije značilne za izpostavitvev 0 %, sledile sta izpostavitvi 50 %, najnižje koncentracije pa so bile značilne za izpostavitvev 100 %. Razlike med populacijama niso očitne (Slika 24).

Šesti vrh (1146 cm^{-1}) predstavlja vzdolžno nihanje vezi za različne polisaharide (Regvar in sod., 2013). Pri zaplanski populaciji koncentracije teh upadejo s povečevanjem onesnaženja ($0\% > 50\% > 100\%$). Pri žerjavski populaciji pa so koncentracije različnih polisaharidov največje za izpostavitvev 50 %, sledi ji izpostavitvev 0 %, najmanjše koncentracije pa so značilne za izpostavitvev 100 %. Primerjava populacij je pokazala največje koncentracije, značilne za izpostavitvev 0 % zaplanske populacije, sledili sta ji izpostavitvi 50 % in 0 % žerjavske populacije. Izpostavitvi 50 % zaplanske populacije in 100 % žerjavske populacije se nista razlikovali, medtem ko so najnižje koncentracije značilne za izpostavitvev 100 % zaplanske populacije (Slika 24).

Prav tako tudi sedmi vrh (1076 cm^{-1}) predstavlja polisaharide, predvsem hemicelulozo (Regvar in sod., 2013). Pri obeh populacijah je upadala z naraščanjem onesnaženja. Primerjava populacij je pokazala največje koncentracije, značilne za poganjke zaplanske populacije izpostavitve 0 %, sledile so izpostavitve 50 % zaplanske ter 0 % in 50 % žerjavske populacije. Najmanjšo vrednost sta dosegali izpostavitvi 100 %, pri čemer so bile manjše značilne za zaplansko populacijo (Slika 24).

Osmi vrh (1050 cm^{-1}) predstavlja pektine in različne polisaharide (celuloza, hemiceluloza in beta-glukan) (Regvar in sod., 2013). Pri obeh populacijah so njihove koncentracije upadale z naraščanjem onesnaženja substrata. Največje koncentracije so vsebovali poganjki zaplanske populacije, izpostavitve 0 % in 50 %, sledile so izpostavitve 0 % in 50 % žerjavske populacije, najmanjše koncentracije pa so bile značilne za izpostavitve 100 %, in sicer so bile manjše koncentracije pri zaplanski populaciji (Slika 24).

Deveti vrh (1020 cm^{-1}) predstavlja pektine, polisaharide, lignin in pa tudi škrob (Regvar in sod., 2013). Ti rezultati potrjujejo rezultate, dobljene po metodi AACC 76.13 za določanje škroba. Pri zaplanski populaciji je prišlo do povišanja vsebnosti škroba pri izpostavitvi 50 % glede na izpostavitve 0 %. Najmanjša vsebnost je bila značilna za izpostavitve 100 %. Pri žerjavski populaciji je prišlo do upadanja škroba s povečanjem onesnaženja substrata. Primerjava populacij je pokazala, da so največ škroba vsebovali poganjki zaplanske populacije iz substrata s 50 % onesnaženjem, sledi neonesnažen substrat (0%) obeh populacij, še manj škroba so vsebovali poganjki žerjavske populacije iz 50 % onesnaženega substrata, kateremu je sledil 100 % onesnažen substrat iste populacije. Najmanj škroba so vsebovali poganjki zaplanske populacije iz 100 % onesnaženega substrata (Slika 24).



Slika 24: FTIR-ATR spekter primerjave ogljikovih hidratov v poganjkih ranega mošnjaka zaplanske in žerjavske populacije po izpostavitvah 0 %, 50 %, 100 %.

4.2.4 Elementna sestava rastlinskega materiala

V poganjkih in koreninah smo določili koncentracijo kadmija Cd, Zn, Pb, K, Ca, Mn in Fe. Izračunali smo tudi BAF in TF faktor.

4.2.4.1 Koncentracije Cd v rastlinah

Faktorska analiza variance je pokazala, da na koncentracijo Cd v koreninah in poganjkih vpliva le delež onesnažene zemlje v substratu (Preglednica 8).

V primeru žerjavske populacije so imele korenine iz substrata s 75 % in 100 % deležem onesnaženja statistično značilno večje koncentracije Cd kot korenine neonesnaženega substrata (0 %). Statistično značilno največje koncentracije Cd so vsebovale korenine substrata s 100 % onesnaženjem. V okviru zaplanske populacije je bila statistično značilno najmanjša koncentracija Cd v koreninah iz neonesnaženega substrata (0 %), sledile so korenine iz substrata s 25 % in 50 % onesnaženjem. Največjo koncentracijo so vsebovale

korenine iz substrata s 75 % onesnaženjem in so se statistično značilno ločile od korenin neonesnaženega substrata (0 %) ter substrata s 25 % onesnaženjem (Slika 25).

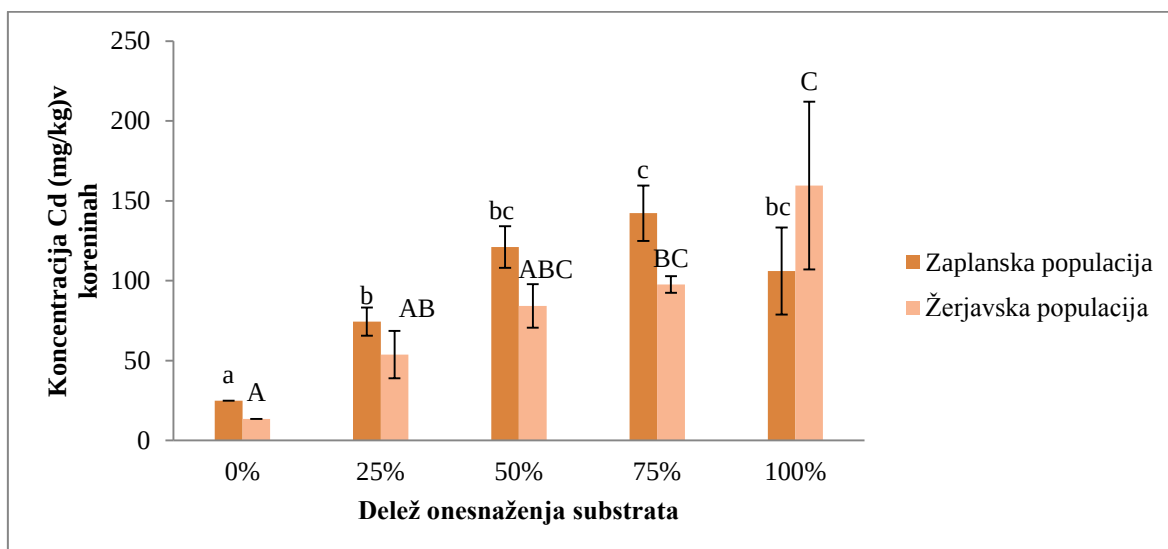
Pri rastlinah žerjavske populacije je bila statistično značilno najmanjša koncentracija Cd v poganjkih iz neonesnaženega substrata (0 %), večja koncentracije Cd se je nahajala v poganjkih iz substratov s 25 %, 50 % in 75 % onesnaženjem. Največjo koncentracijo Cd so vsebovali poganjki iz substrata s 100 % onesnaženjem. Pri zaplanski populaciji so imeli statistično značilno največjo koncentracijo Cd poganjki rastlin substrata s 100 % onesnaženjem. Ostale izpostavitve se med seboj statistično značilno ne razlikujejo (Slika 26).

Rastline obeh populacij so kopičile večje koncentracije Cd v poganjkih v primerjavi s koreninami. Koncentracije Cd se med populacijama znotraj izpostavitve ne razlikujejo.

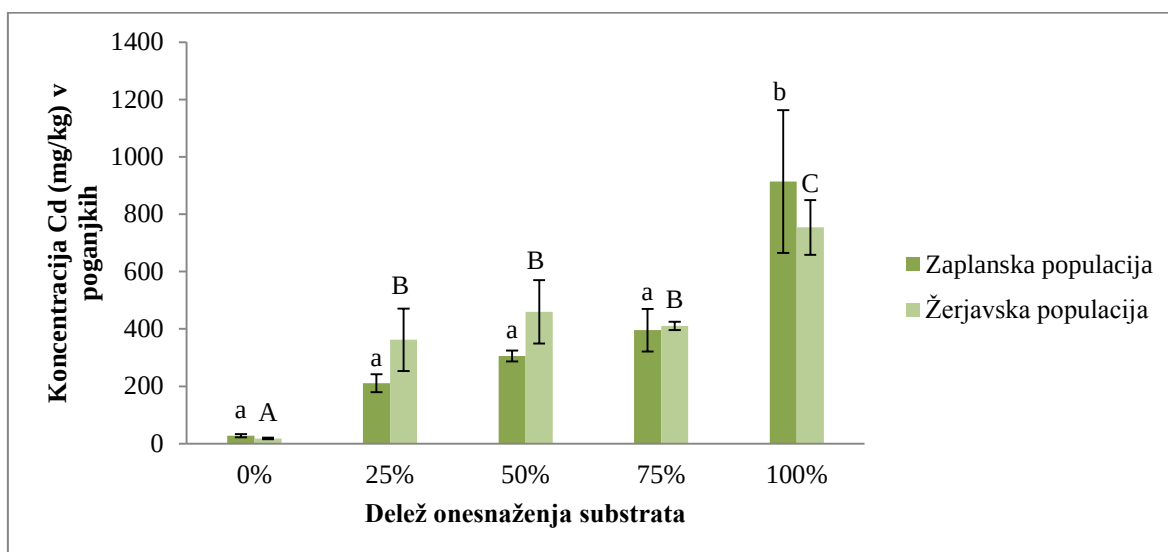
Preglednica 8: Prikaz faktorske analize koncentracije Cd (mg/kg) v koreninah in poganjkih pri različnih deležih onesnaženja substrata med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije, ki smo jo opravili s programom Statistica 7, faktorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

Koncentracije Cd (mg/kg) v koreninah					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	52793,7	4	13198,4	9,1994	0,000261
Populacija	913,7	1	913,7	0,6368	0,434716
Delež onesnaženja substrata (%) * Populacija	9095,0	4	2273,8	1,5848	0,219079
Napaka	27259,4	19	1434,7		

Koncentracija Cd (mg/kg) v poganjkih					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	2089327	4	522332	16,9586	0,000003
Populacija	7149	1	7149	0,2321	0,635202
Delež onesnaženja substrata (%) * Populacija	101726	4	25432	0,8257	0,524276
Napaka	616007	20	30800		



Slika 25: Primerjava koncentracij Cd (mg/kg) v koreninah rastlin populacij ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med koncentracijami Cd v koreninah po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n = 3$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko.



Slika 26: Primerjava koncentracij Cd (mg/kg) v poganjkih rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med koncentracijami Cd v poganjkih po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n = 3$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko.

4.2.4.2 Koncentracije Zn v rastlinah

Faktorska analiza variance kaže, da so na koncentracijo Zn (mg/kg) v koreninah vplivali delež onesnaženja substrata, populacija in oba parametra v kombinaciji. Na koncentracije Zn v poganjkih pa vpliva le delež onesnaženja substrata, populacija ni imela nobenega vpliva (Preglednica 9).

V okviru žerjavske populacije so bile statistično značilno najmanjše koncentracije Zn v koreninah neonesnaženega substrata (0 %) in substrata s 25 % onesnaženjem. Korenine, ki so rasle na substratu s 50 % in 75 % onesnaženjem, so imele že statistično značilno večje koncentracije od predhodnih, medtem ko so bile največje koncentracije Zn v koreninah substrata s 100 % onesnaženjem. Pri zaplanski populaciji so prav tako statistično značilno najmanjše koncentracije Zn dosegale korenine neonesnaženega substrata (0 %) in substrata s 25 % onesnaženjem, večje koncentracije so vsebovale korenine iz substrata s 50 % onesnaženjem, statistično značilno največje koncentracije Zn pa so kopičile korenine iz substrata s 75 % onesnaženjem (Slika 27). Med koreninami iz substrata s 75 % onesnaženjem in 100 % onesnaženjem ni bilo statistično značilnih razlik.

V primeru poganjkov žerjavske populacije je bila statistično značilno najmanjša koncentracija Zn značilna za rastline neonesnaženega substrata (0 %) in substrata s 75 % onesnaženjem. Koncentracija Zn teh dveh izpostavitv sta se statistično značilno razlikovala le od poganjkov, ki so rasli na substratu s 100 % onesnaženjem. V okviru zaplanske populacije je bila koncentracija Zn statistično značilno večja v poganjkih iz substrata s 100 % onesnaženjem v primerjavi z ostalimi izpostavitvami (Slika 28).

Pri obeh populacijah se je Zn v večjih koncentracijah zadrževal v poganjkih kot v koreninah.

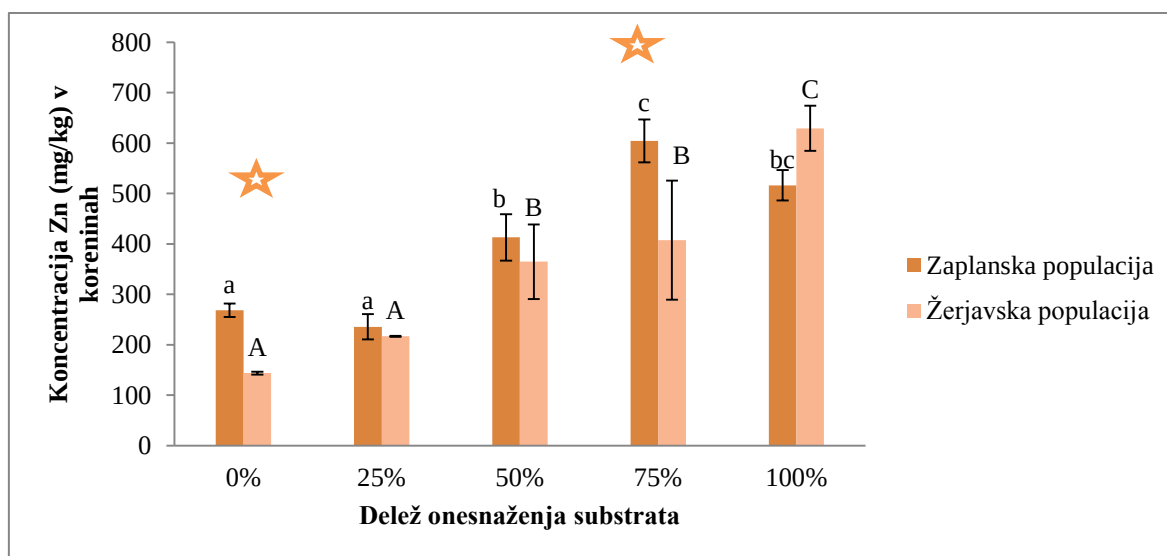
Na koncentracijo Zn v koreninah vpliva tudi populacija. Korenine zaplanske populacije rastlin, ki so rasle na substratu s 75 % onesnaženjem in na neonesnažene substratu (0 %), so v primerjavi z žerjavsko populacijo kopičile statistično značilno večje koncentracije Zn

(Slika 27). Pri koncentraciji Zn v poganjkih pa ni statistično značilnih razlik med populacijama.

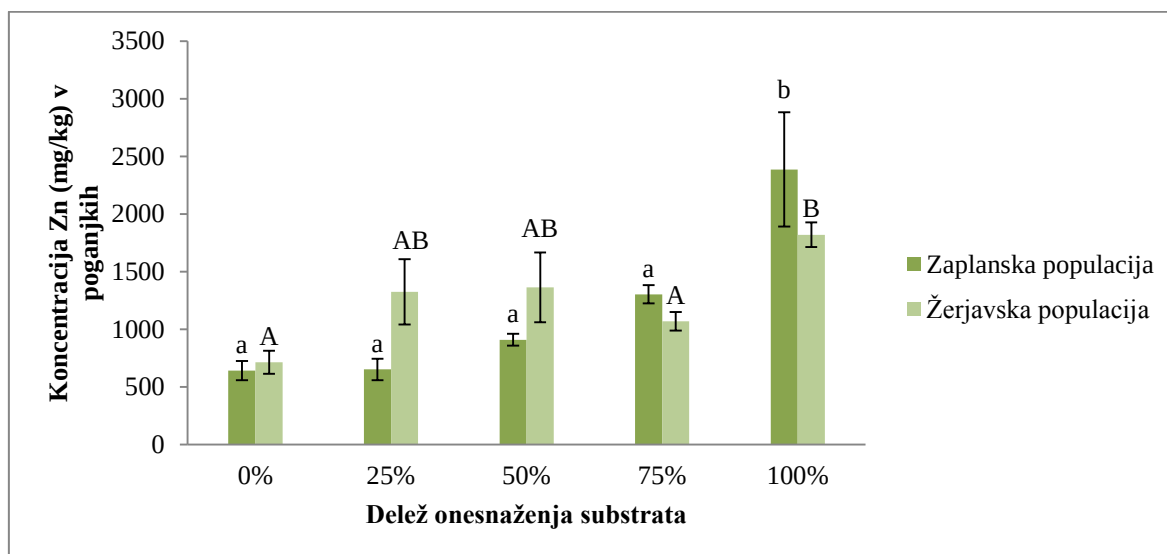
Preglednica 9: Prikaz faktorske analize koncentracije Zn (mg/kg) v koreninah in poganjkih pri različnih deležih onesnaženja substrata med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije, ki smo jo opravili s programom Statistica 7, faktorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

Koncentracija Zn (mg/kg) v koreninah					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	603652	4	150913	36,2852	0,000000
Populacija	21686	1	21686	5,2141	0,034089
Delež onesnaženja substrata (%) * Populacija	80369	4	20092	4,8309	0,007377
Napaka	79023	19	4159		

Koncentracija Zn (mg/kg) v poganjkih					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	6815296	4	1703824	11,5669	0,000050
Populacija	46966	1	46966	0,3188	0,578585
Delež onesnaženja substrata (%) * Populacija	1511853	4	377963	2,5659	0,069774
Napaka	2946044	20	147302		



Slika 27: Primerjava koncentracij Zn (mg/kg) v koreninah rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med koncentracijami Zn v koreninah po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n = 3$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko. * nad stolpci označuje statistično značilno razliko med populacijama znotraj posameznega deleža onesnaženega substrata (faktorska ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$; $n = 3$).



Slika 28: Primerjava koncentracij Zn (mg/kg) v poganjkih rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med koncentracijami Zn v poganjkih po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n = 3$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko.

4.2.4.3 Koncentracije Pb v rastlinah

Iz factorske analize variance vidimo, da sta na koncentracijo Pb (mg/kg) v koreninah vplivala tako delež onesnaženja substrata kot populacija. Na koncentracijo Pb v poganjkih pa so vplivali delež onesnaženja substrata, populacija ter kombinacija obeh parametrov skupaj (Preglednica 10).

Statistično značilno za obe populaciji je, da se je koncentracija Pb v koreninah povečevala z naraščanjem deleža onesnaženja v substratu. Le v primeru zaplanske populacije ni statističnih razlik v koncentraciji Pb med substratoma s 75 % in 100 % onesnaženjem (Slika 29).

Pri poganjkih žerjavske populacije je bila statistično značilno večja koncentracija Pb značilna za rastline substrata s 75 % onesnaženjem v primerjavi z neonesnaženim substratom (0 %). Poganjki, ki so rasli na substratu s 100 % onesnaženjem, pa so imeli statistično značilno največje koncentracije Pb. V okviru zaplanske populacije je bila statistično značilno najmanjša koncentracija Pb v poganjkih neonesnaženega substrata (0 %), statistično značilno večja je bila v poganjkih iz substrata s 50 % in 75 %

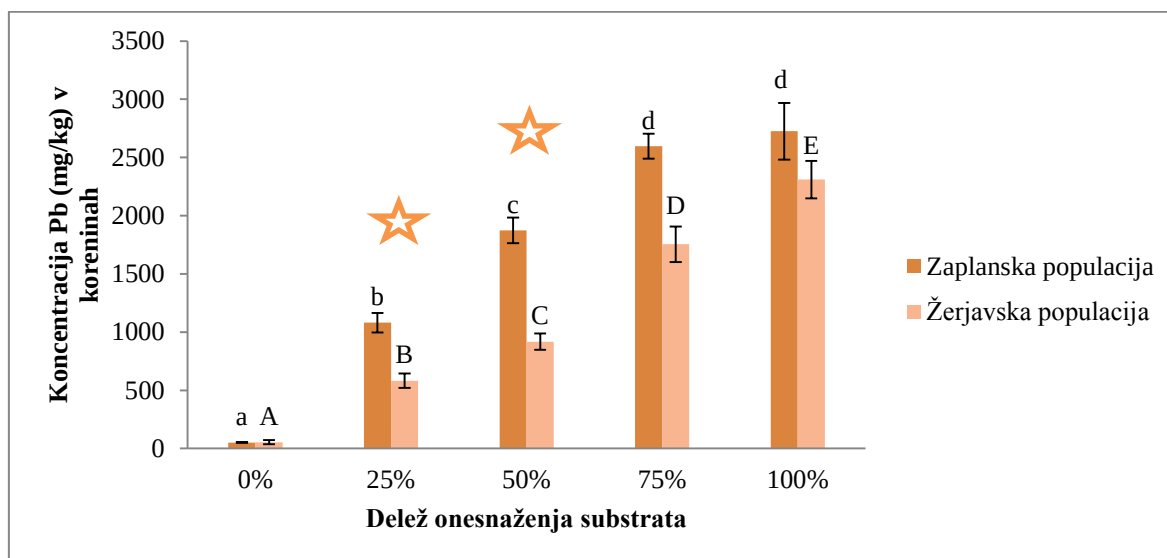
onesnaženjem, največja pa v poganjkih s 100 % onesnaženjem. Koncentraciji Pb v poganjkih iz substrata z 0 % in 25 % onesnaženja se statistično značilno nista razlikovali (Slika 30).

Korenine rastlin obeh populacij so kopičile večje koncentracije Pb kot poganjki. Korenine zaplanske populacije so kopičile večje koncentracije Pb od žerjavske. Statistično značilno je bilo to pri rastlinah iz substrata s 25 % in 50 % onesnaženjem (Slika 30). Žerjavška populacija pa je v primerjavi z zaplansko kopičila večje koncentracije Pb v poganjkih. Statistično značilno se je to pokazalo pri rastlinah iz substrata z 0 % in 100% onesnaženjem (Slika 30).

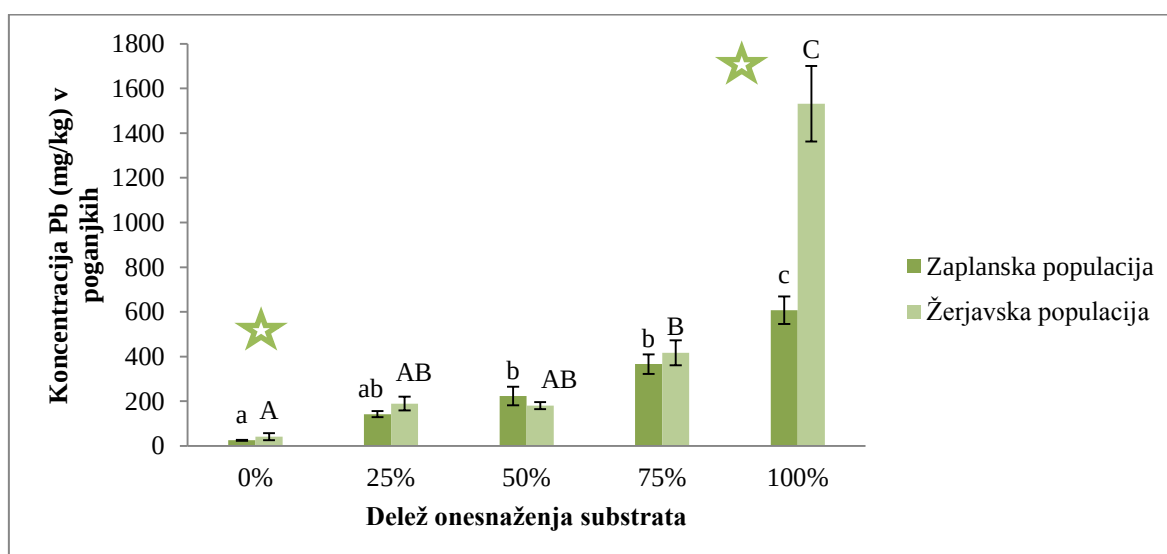
Preglednica 10: Prikaz factorske analize koncentracije Pb (mg/kg) v koreninah in poganjkih pri različnih deležih onesnaženja substrata med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije, ki smo jo opravili s programom Statistica 7, factorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

Koncentracija Pb v koreninah					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	26204123	4	6551031	97,439	0,000000
Populacija	1540437	1	1540437	22,912	0,000128
Delež onesnaženja substrata (%)*Populacija	525926	4	131482	1,956	0,142502
Napaka	1277416	19	67232		

Koncentracija Pb v poganjkih					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	4710092	4	1177523	33,5544	0,000000
Populacija	338693	1	338693	9,6513	0,005560
Delež onesnaženja substrata (%)*Populacija	1161881	4	290470	8,2772	0,000415
Napaka	701858	20	35093		



Slika 29: Primerjava koncentracij Pb (mg/kg) v koreninah rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med koncentracijami Pb v koreninah po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p<0,05$, $n=3$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko. * nad stolpci označuje statistično značilno razliko med populacijama znotraj posameznega deleža onesnaženega substrata (faktorska ANOVA, Duncanov test, $p<0,05$; $n=3$).



Slika 30: Primerjava koncentracij Pb (mg/kg) v poganjkih ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med koncentracijami Pb v poganjkih po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p<0,05$, $n=3$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko. * nad stolpci označuje statistično značilno razliko med populacijama znotraj posameznega odstotka onesnaženega substrata (faktorska ANOVA, Duncanov test, $p<0,05$; $n=3$).

4.2.4.4 Koncentracije K v rastlinah

Faktorska analiza variance prikazuje, da je na koncentracijo K (mg/kg) v koreninah in poganjkih vplival delež onesnaženja substrata. Na koncentracijo K (mg/kg) v poganjkih pa je vplivala še populacija v kombinaciji z deležem onesnaženja substrata (Preglednica 11).

Pri žerjavski populaciji ni bilo statistično značilnih razlik v koncentraciji K v koreninah po izpostavitvah onesnaženju. Pri zaplanski populaciji pa je bila koncentracija K v koreninah iz substrata s 100 % onesnaženjem statistično značilno manjša od korenin iz substrata z 0 %, 25 % in 50 % onesnaženjem (Slika 31).

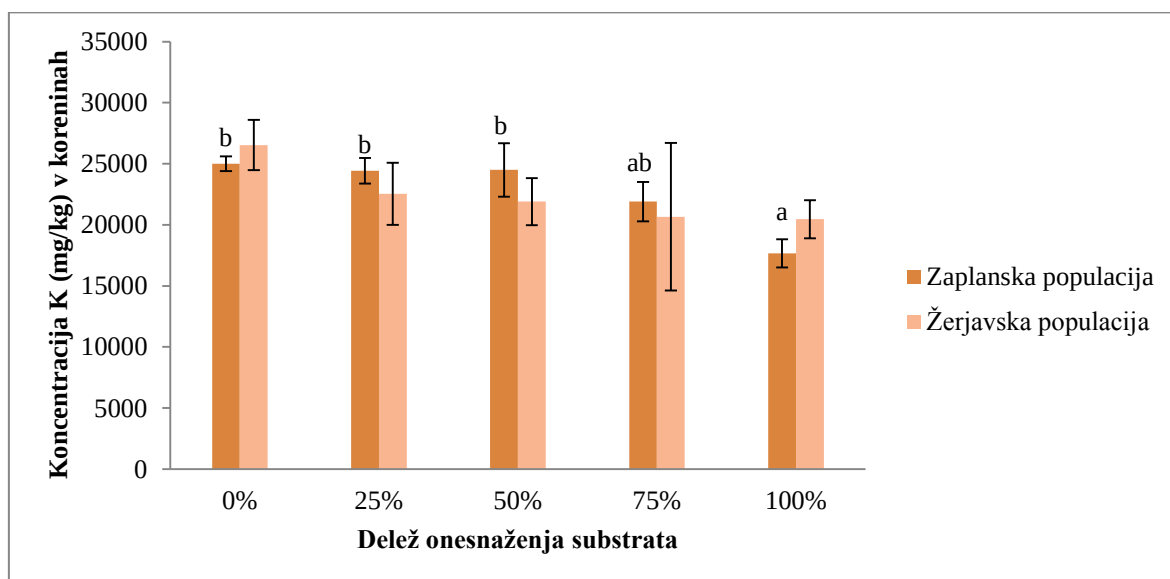
V primeru žerjavske populacije so imeli poganjki vseh substratov statistično značilno večjo koncentracijo K od poganjkov iz neonesnaženega substrata (0 %). Poganjki iz substrata s 50 % onesnaženjem so imeli največjo koncentracijo K, ki se je statistično značilno razlikovala od poganjkov iz substrata s 75 % in 100 % onesnaženjem (Slika 32). Pri poganjkih zaplanske populacije so bile koncentracije K rastlin iz substrata s 75 % in 100 % onesnaženjem statistično značilno večje od koncentracij rastlin neonesnaženega substrata (0 %).

Rastline obeh populacij so kopičile večje koncentracije K v poganjkih v primerjavi s koreninami. Glede vpliva populacije na koncentracijo K se je izkazalo, da so rastline žerjavske populacije iz substrata s 50 % onesnaženostjo vsebovale statistično značilno večje koncentracije K v poganjkih od rastlin zaplanske populacije (Slika 32).

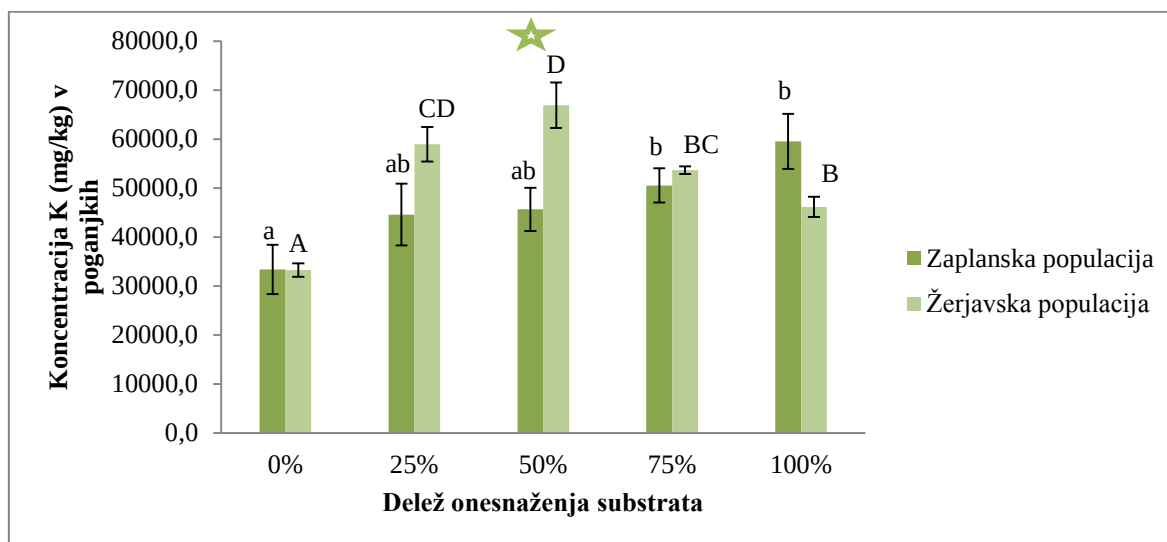
Preglednica 11: Prikaz factorske analize koncentracije K (mg/kg) v koreninah in poganjkih pri različnih deležih onesnaženja substrata med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije, ki smo jo opravili s programom Statistica 7, factorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

Kalij v koreninah					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	1,394153E+08	4	3,485382E+07	3,946	0,016998
Populacija	5,600000E+05	1	5,600000E+05	0,063	0,803914
Delež onesnaženja substrata (%) * Populacija	3,150778E+07	4	7,876944E+06	0,892	0,487980
Napaka	1,678400E+08	19	8,833684E+06		

Kalij v poganjkih					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	1,978151E+09	4	4,945378E+08	9,282	0,000207
Populacija	1,905120E+08	1	1,905120E+08	3,576	0,073199
Delež onesnaženja substrata (%) * Populacija	1,081278E+09	4	2,703195E+08	5,074	0,005477
Napaka	1,065533E+09	20	5,327667E+07		



Slika 31: Primerjava koncentracije K (mg/kg) v koreninah rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med koncentracijami K v koreninah po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n = 3$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko.



Slika 32: Primerjava koncentracij K (mg/kg) v poganjkih rastlin vrste ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med koncentracijami K v poganjkih po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n = 3$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko. * nad stolpci označuje statistično značilno razliko med populacijama znotraj posameznega odstotka onesnaženega substrata (faktorska ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$; $n = 3$).

4.2.4.5 Koncentracije Ca v rastlinah

Iz faktorske analize variance lahko razberemo, da tako populacija kot sam delež onesnaženja substrata nista imela vpliva na vsebnost Ca v rastlinskih organih (Priloga A).

4.2.4.6 Koncentracije Mn v rastlinah

Faktorska analiza variance je pokazala, da je na koncentracijo Mn v koreninah vplivala samo populacija. Pri poganjkih pa so na koncentracijo Mn vplivali populacija, delež onesnaženja substrata ter kombinacija obeh parametrov (Preglednica 12).

V okviru žerjavske populacije so imele korenine iz neonesnaženega substrata (0 %) statistično značilno večje koncentracije Mn od rastlin ostalih substratov. Znotraj zaplanske populacije pa po izpostavitvah ni bilo statistično značilnih razlik v koncentraciji Mn v koreninah (Slika 33).

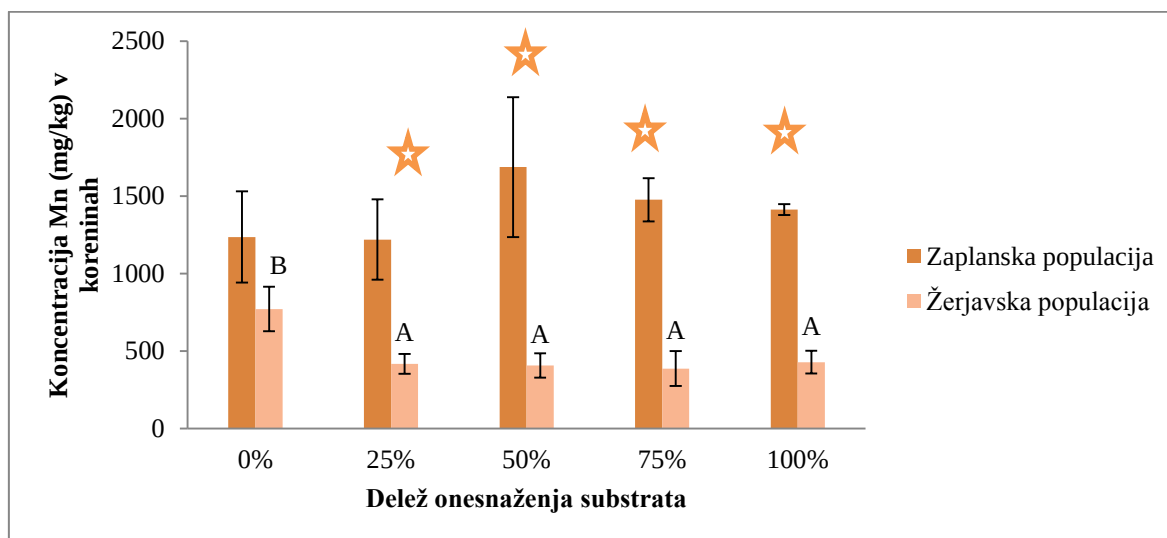
Pri poganjkih žerjavske populacije so imele rastline iz substrata s 50 % in 75 % onesnaženjem statistično značilno manjše koncentracije Mn kot poganjki iz neonesnaženega substrata (0 %). Pri zaplanski populaciji pa so poganjki iz substrata s 100 % onesnaženjem vsebovali statistično značilno večje koncentracije Mn od poganjkov ostalih substratov (Slika 34).

Korenine zaplanske populacije so vsebovale statistično značilno večje koncentracije Mn od žerjavske. Pri substratih s 25 %, 50 %, 75 % in 100 % onesnaženjem je to statistično značilno (Slika 33). Večje koncentracije Mn v poganjkih so bile značilne za žerjavsko populacijo. Statistično značilno večje so pri 0 %, 25 %, 50 % in 75 % onesnaženju (Slika 34). Pri primerjavi koncentracij Mn v različnih rastlinskih organih opazimo, da rastline žerjavske populacije vsebujejo večje koncentracije Mn v poganjkih. Koncentracije znotraj korenin ne zaostajajo veliko za poganjki. Pri zaplanski populaciji pride do ravno obratnega pojava. Veliko večje koncentracije Mn se nahajajo v koreninah (Slika 33, 34).

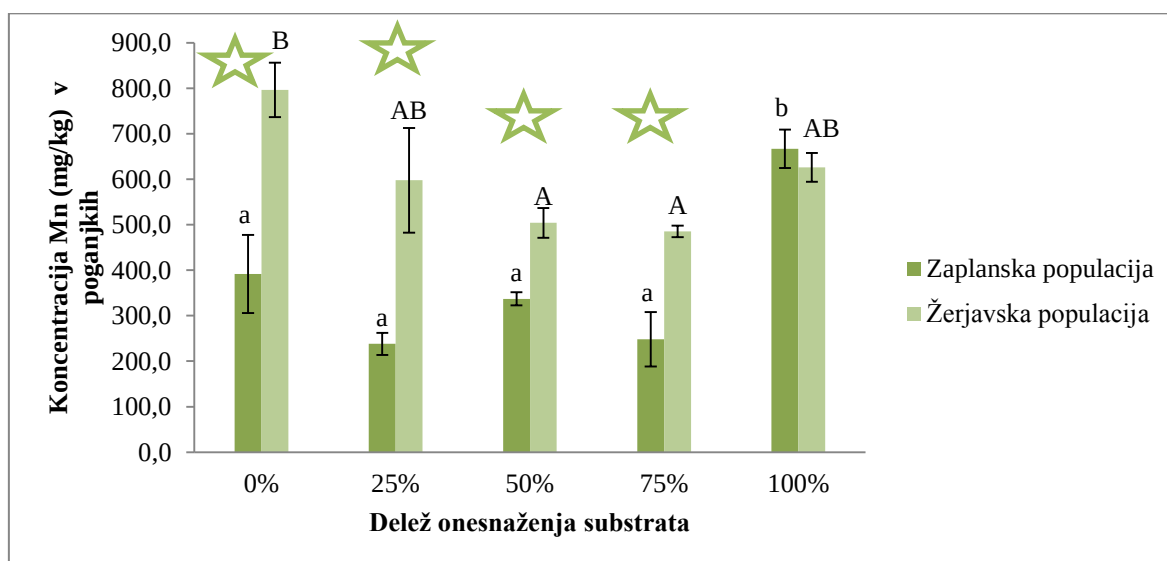
Preglednica 12: Prikaz factorske analize koncentracije Mn (mg/kg) v koreninah in poganjkih pri različnem deležu onesnaženja substrata med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije, ki smo jo opravili s programom Statistica 7, factorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

Koncentracije Mn (mg/kg) v koreninah					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	176056	4	44014	0,3756	0,822985
Populacija	5656896	1	5656896	48,2775	0,000002
Delež onesnaženja substrata (%)*Populacija	506145	4	126536	1,0799	0,395652
Napaka	2109141	18	117174		

Koncentracije Mn (mg/kg) v poganjkih					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	363077	4	90769	8,7525	0,000297
Populacija	381264	1	381264	36,7637	0,000006
Delež onesnaženja substrata (%)*Populacija	187017	4	46754	4,5083	0,009283
Napaka	207413	20	10371		



Slika 33: Primerjava koncentracij Mn (mg/kg) v koreninah rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med koncentracijami Mn v koreninah po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p<0,05$, $n=3$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko. * nad stolpci označuje statistično značilno razliko med populacijama znotraj posameznega deleža onesnaženega substrata (faktorska ANOVA, Duncanov test, $p<0,05$; $n=3$).



Slika 34: Primerjava koncentracij Mn (mg/kg) v poganjkih rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med koncentracijami Mn v poganjkih po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p<0,05$, $n=3$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko. * nad stolpci označuje statistično značilno razliko med populacijama znotraj posameznega odstotka onesnaženega substrata (faktorska ANOVA, Duncanov test, $p<0,05$; $n=3$).

4.2.4.7 Koncentracije Fe v rastlinah

Faktorska analiza variance kaže, da sta na koncentracijo Fe (mg/kg) v koreninah vplivala tako delež onesnaženja substrata kot sama populacija (Preglednica 13). Na koncentracije Fe v poganjkih pa ni bilo vpliva (Priloga B).

Pri obeh populacijah bi lahko govorili o dvigu koncentracije Fe v koreninah iz substrata s 25 % onesnaženjem v primerjavi s koreninami kontrolnih rastlin (0 %). Pri čemer je bil ta dvig koncentracije statistično značilen samo pri žerjavski populaciji. Koncentracije Fe v koreninah rastlin s 25 %, 50 % in 75 % onesnaženim substratom se med seboj statistično značilno niso razlikovale. Pri koreninah s 100 % onesnaženim substratom je prišlo do ponovnega zmanjšanja koncentracije Fe. V primeru obeh populacij je bila koncentracija Fe v koreninah s 100 % onesnaženim substratom statistično značilno manjša od korenin s 25 % onesnaženim substratom (Slika 35).

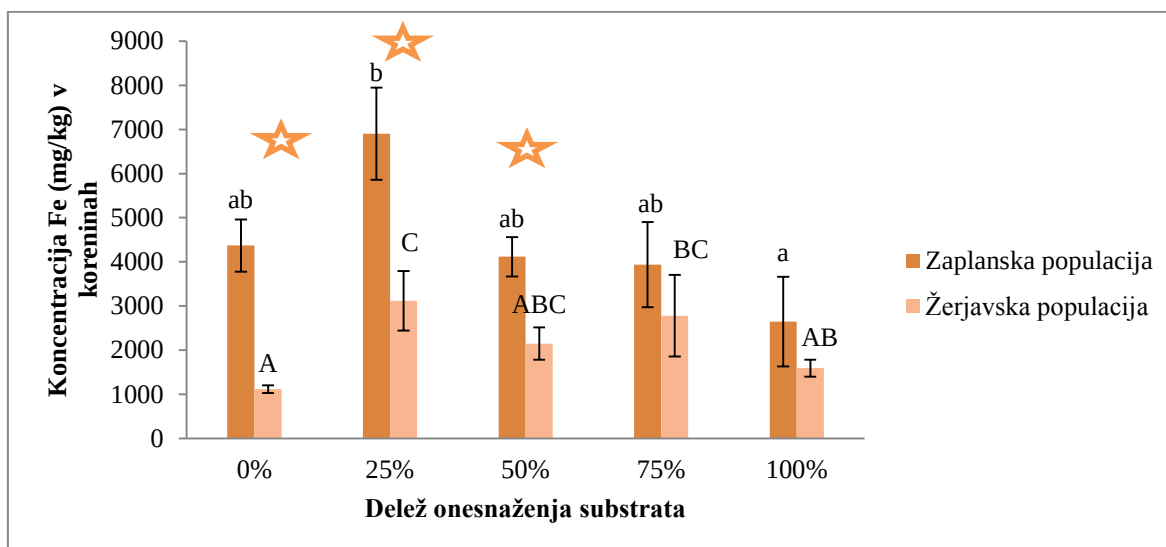
Poganjki žerjavske populacije iz substrata s 75 % in 100 % onesnaženjem so vsebovali statistično značilno manjše koncentracije Fe kot poganjki iz neonesnaženega substrata (0 %), medtem ko pri zaplanski populaciji ni bilo statistično značilnih razlik med substrati (Slika 36).

Večje koncentracije Fe so kopičile korenine zaplanske populacije v primerjavi z žerjavsko. Statistično značilno so bile večje koncentracije Fe vidne pri substratih z 0 % in 25 %, 50 % onesnaženjem (Slika 35). Pri poganjkih ni bilo razlik med populacijama (Slika 36).

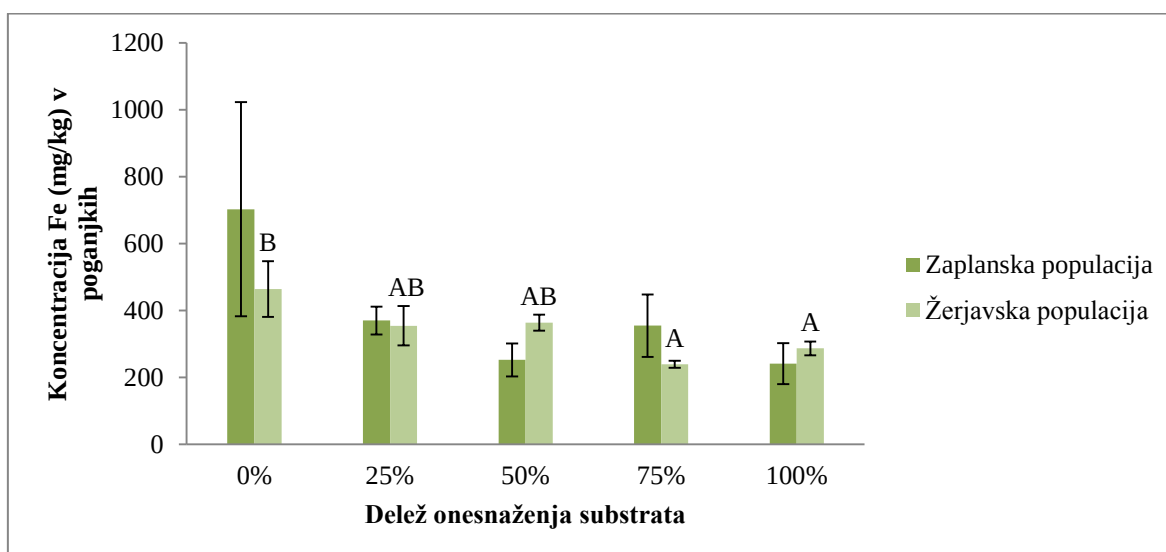
Višje koncentracije Fe se pri obeh populacijah kopičijo v koreninah v nasprotju s poganjki.

Preglednica 13: Prikaz factorske analize koncentracije Fe (mg/kg) v koreninah pri različnih deležih onesnaženja substrata med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije, ki smo jo opravili s programom Statistica 7, factorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

Koncentracija Fe (mg/kg) v koreninah					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	27529700	4	6882425	5,0559	0,006028
Populacija	35904029	1	35904029	26,3754	0,000059
Delež onesnaženja substrata (%) * Populacija	8770167	4	2192542	1,6107	0,212576
Napaka	25864133	19	1361270		



Slika 35: Primerjava koncentracij Fe (mg/kg) v koreninah rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja ± se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med koncentracijami Fe v koreninah po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n = 3$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko. * nad stolpci označuje statistično značilno razliko med populacijama znotraj posameznega deleža onesnaženega substrata (faktorska ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$; $n = 3$).



Slika 36: Primerjava koncentracij Fe (mg/kg) v poganjkih rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja ± se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med koncentracijami Fe v poganjkih po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n = 3$). Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko.

Elementi	0%		25%		50%		75%		100%											
	Zaplena	Žerjav	Zaplena	Žerjav	Zaplena	Žerjav	Zaplena	Žerjav	Zaplena	Žerjav										
Cd	nd	/	nd	/	10,5 ± 1,47	a	44,9 ± 17,8	B	12,1 ± 2,34	a	18,3 ± 4,49	AB	9,08 ± 2,64	a	8,70 ± 0,487	A	11,9 ± 3,29	a	11,7 ± 1,30	a
Zn	7,077 ± 1,58	b	8,46 ± 2,56	B	1,09 ± 0,125	a	2,83 ± 0,672	A	1,15 ± 0,0298	a	1,45 ± 0,308	A	1,04 ± 0,0774	a	0,859 ± 0,130	A	1,29 ± 0,258	a	0,973 ± 0,103	a
Pb	0,279 ± 0,0279	b	nd	/	0,0385 ± 0,00279	a	0,0597 ± 0,0117	A	0,0400 ± 0,0104	a	0,0291 ± 0,00232	A	0,0367 ± 0,00931	a	0,0441 ± 0,00527	A	0,0404 ± 0,00578	a	0,100 ± 0,0185	a
Ph	1,99 ± 0,223	a	2,45 ± 0,276	A	3,30 ± 0,759	ab	4,79 ± 0,188	AB	4,30 ± 0,808	b	5,86 ± 0,109	BC	5,36 ± 0,324	b	6,79 ± 0,957	BC	9,12 ± 0,775	c	8,78 ± 1,81	a
Ca	4,24 ± 0,750	b	3,02 ± 0,321	C	0,704 ± 0,0769	a	1,06 ± 0,0629	B	0,482 ± 0,0460	a	0,469 ± 0,0462	A	0,266 ± 0,0549	a	0,351 ± 0,0367	A	0,241 ± 0,0359	a	0,260 ± 0,00207	a
Mn	0,0133 ± 0,00288	a	0,913 ± 0,108	A	0,00770 ± 0,000739	a	0,821 ± 0,157	A	0,0120 ± 0,000540	a	0,802 ± 0,0692	A	0,00959 ± 0,00231	a	0,822 ± 0,0121	A	0,0299 ± 0,00175	b	0,797 ± 0,0619	a
Fe	1,19 ± 0,598	a	0,0152 ± 0,00372	A	0,436 ± 0,328	a	0,0132 ± 0,00213	A	0,407 ± 0,0920	a	0,0123 ± 0,00109	A	0,577 ± 0,141	a	0,00910 ± 0,000172	A	0,407 ± 0,0599	a	0,0129 ± 0,00147	a

Preglednica 15: Primerjava translokacijskega faktorja elementov pri različnem deležu onesnaženosti substrata med zaplansko in žerjavsko populacijo (povprečje $\pm$ se, enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$; $N=3$). Črke prikazujejo statistično značilne razlike med vrednostmi TF za elemente po izpostavitvah znotraj posamezne populacije. Male tiskane črke označujejo zaplansko populacijo, velike tiskane pa žerjavsko. Oznaka nd- pomeni, da vrednost ni bila določena, ker je bila prenizka

% onesnaženja substrata	0%		25%		50%		75%		100%	
Populacija Elementi	Zaplana	Žerjav	Zaplana	Žerjav	Zaplana	Žerjav	Zaplana	Žerjav	Zaplana	Žerjav
Cd	nd	nd	2,98 $\pm$ 0,678	a	2,58 $\pm$ 0,322	a	2,74 $\pm$ 0,169	a	8,58 $\pm$ 0,360	b
Zn	2,31 $\pm$ 0,617	a	2,86 $\pm$ 0,606	ab	2,28 $\pm$ 0,359	a	2,18 $\pm$ 0,201	a	4,72 $\pm$ 1,15	b
Pb	nd	nd	0,148 $\pm$ 0,0336	a	0,141 $\pm$ 0,0422	a	0,142 $\pm$ 0,0465	a	0,221 $\pm$ 0,0107	a
K	1,16 $\pm$ 0,158	a	1,85 $\pm$ 0,332	b	1,88 $\pm$ 0,204	b	2,31 $\pm$ 0,0109	b	3,36 $\pm$ 0,170	c
Ca	4,20 $\pm$ 0,164	a	2,56 $\pm$ 0,412	a	2,57 $\pm$ 0,485	a	2,39 $\pm$ 0,787	a	2,97 $\pm$ 0,532	a
Mn	0,305 $\pm$ 0,0475	a	0,209 $\pm$ 0,0323	a	1,43 $\pm$ 0,189	a	0,167 $\pm$ 0,0303	a	0,472 $\pm$ 0,0312	b
Fe	0,0963 $\pm$ 0,0463	a	0,0587 $\pm$ 0,0172	a	0,117 $\pm$ 0,015	a	0,0965 $\pm$ 0,0329	a	0,131 $\pm$ 0,0522	a

4.2.5.1 Mobilnost Cd

Vse vrednosti za BAF so bile višje od 1. Povprečja za zaplansko populacijo se gibljejo med 9,1–12,1, za žerjavsko pa med 8,7–44,9. Najvišjo vrednost BAF so dosegle rastline žerjavske populacije 72,7 (25%). Največja dosežena vrednosti zaplanske populacije je bila 18 (100 %) (Priloga D, Preglednica 14). Prav tako so bile vse vrednosti TF višje od 1. Povprečne vrednosti TF za Cd so se gibale med 2,6–8,6 za zaplansko populacijo in med 4,2–7,0 za žerjavsko (Preglednica 15). Največja TF sta bila pri obeh populacijah dosežena na substratu s popolnim onesnaženjem (100 %), in sicer za zaplansko populacijo 9, za žerjavsko pa 12 (Priloga D).

Faktorska analiza je pokazala, da na BAF za Cd ni bilo vpliva (Priloga C). Na TF za Cd pa je vplival le delež onesnaženja substrata (Preglednica 16).

Pri zaplanski populaciji po izpostavitvah ni bilo statistično značilnih razlik za BAF. Pri žerjavski populaciji pa so bile vrednosti BAF pri substratu s 25 % onesnaženjem večje od vrednosti s 75 % in 100 % izpostavljenostjo onesnaženju (Preglednica 14). Pri TF so bile v okviru obeh populacij statistično značilno največje vrednosti značilne za rastline iz popolnoma onesnaženega substrata (100 %). Ostale izpostavitve se med seboj niso statistično značilno razlikovale (Preglednica 15).

Preglednica 16: Prikaz faktorjske analize translokacijskega faktorja za Cd (mg/kg) med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije pri substratih z različnim deležem onesnaženja. Analize smo opravili s programom Statistica 7, faktorjska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija onesnažene zemlje (%)	106,3492	4	26,5873	4,90778	0,008940
Populacija	8,4799	1	8,4799	1,56532	0,228874
Koncentracija onesnažene zemlje (%) * Populacija	30,8731	4	7,7183	1,42473	0,271000
Napaka	86,6780	16	5,4174		

4.2.5.2 Mobilnost Zn

Povprečne vrednosti BAF za Zn pri zaplanski populaciji so se gibale med 1,0–7,1. Pri žerjavski populaciji pa med 0,9–8,5 (Preglednica 14). Povprečja TF za Zn so se gibala med 2,2–4,7 za zaplansko populacijo in 2,6–6,1 za žerjavsko (Preglednica 15). Vse povprečne vrednosti so nad vrednostjo 2. Dejanske vrednosti za zaplansko populacijo so med 1,69–6,93, za žerjavsko pa med 2,28–8,43 (Priloga D).

Faktorjska analiza prikazuje, da je na BAF vrednosti za Zn vplival delež onesnaženja substrata. Na TF Zn pa sta vplivala tako populacija kot kombinacija populacije in odstotka onesnaženja substrata (Preglednica 17).

Vrednosti BAF za Zn pri obeh populacijah so statistično značilno najvišje pri kontrolnem substratu (0 %). Vrednosti ostalih substratov se med seboj ne razlikujejo (Preglednica 14). Vrednosti TF za Zn rastlin žerjavske populacije iz substrata z 0 % in 25 % onesnaženjem so bile statistično značilno večje od vrednosti rastlin substrata s 75 % onesnaženjem. Prav tako so bile vrednosti substrata s 25 % onesnaženjem statistično značilno večje od substrata s 50 % in 75 % onesnaženjem. V okviru zaplanske populacije ni statističnih razlik po izpostavitvah (Preglednica 15).

Žerjavsko populacijo dosega večje vrednosti TF od zaplanske znotraj neonesnaženega substrata (0 %) in substrata s 25 % onesnaženjem (Preglednica 21).

Preglednica 17: Prikaz factorske analize bioakumulacijskih faktorjev in translokacijskega faktorja za Zn med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije pri substratih z različnim deležem onesnaženja. Analize smo opravili s programom Statistica 7, factorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

Bioakumulacijski faktor					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	202,2744	4	50,5686	17,34843	0,000003
Populacija	2,5570	1	2,5570	0,87723	0,360136
Delež onesnaženja substrata (%)*Populacija	5,1685	4	1,2921	0,44329	0,775914
Napaka	58,2976	20	2,9149		

Translokacijski faktor					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	15,1397	4	3,7849	2,7186	0,060531
Populacija	10,1581	1	10,1581	7,2962	0,014154
Delež onesnaženja substrata (%)*Populacija	23,5338	4	5,8834	4,2259	0,012959
Napaka	26,4527	19	1,3922		

4.2.5.3 Mobilnost Pb

Vrednosti BAF za Pb so bile izjemno nizke. Pri zaplanski populaciji so se gibale med 0,04–0,28, medtem ko pri žerjavski med 0,9–8,5 (Preglednica 14). Tudi vrednosti TF za Pb so bile zelo nizke, gibale so se med 0,14–0,22 za zaplansko populacijo in med 0,17–0,65 za žerjavsko (Preglednica 15).

Iz factorske analize je razvidno, da sta na BAF in TF za Pb vplivala delež onesnaženja substrata ter kombinacija populacije in deleža onesnaženja (Preglednica 18).

Zaplanska populacija je na neonesnaženem substratu (0 %) dosegala statistično značilno največje vrednosti BAF od vseh ostalih substratov. Pri žerjavski populaciji ni bilo statistično značilnih razlik med izpostavitvami (Preglednica 14). Statistično značilno največje vrednosti TF je zaplanska populacija dosegala na neonesnaženem substratu (0 %), medtem ko so vrednosti TF za žerjavsko populacijo statistično značilno največje pri 100 % onesnaženem substratu (Preglednica 15).

Pri izpostavitvi 0 % so bile za zaplansko populacijo značilne večje vrednosti BAF. Prav tako v okviru neonesnaženega in 100 % onesnaženega substrata prihaja do statističnih

razlik v populaciji TF. In sicer, na neonesnaženem substratu (0 %) so bile vrednosti TF statistično značilno večje za zaplansko populacijo, pri 100 % onesnaženem substratu pa so bile vrednosti večje za žerjavsko populacijo (Preglednica 21).

Preglednica 18: Prikaz factorske analize bioakumulacijskih faktorjev in translokacijskega faktorja za Pb med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije pri substratih z različnim deležem onesnaženja. Analize smo opravili s programom Statistica 7, factorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

Bioakumulacijski faktor					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija onesnažene zemlje (%)	0,085070	4	0,021267	12,8190	0,000025
Populacija	0,004579	1	0,004579	2,7602	0,112235
Koncentracija onesnažene zemlje (%)*Populacija	0,062062	4	0,015516	9,3520	0,000198
Napaka	0,033181	20	0,001659		

Translokacijski faktor					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija onesnažene zemlje (%)	0,283499	4	0,070875	5,7103	0,004730
Populacija	0,009763	1	0,009763	0,7866	0,388270
Koncentracija onesnažene zemlje (%)*Populacija	0,342866	4	0,085717	6,9061	0,001986
Napaka	0,198587	16	0,012412		

4.2.5.4 Mobilnost Mn

V vseh primerih so vrednosti BAF zaplanske populacije blizu vrednosti 0 (0,008–0,030), medtem ko se pri žerjavski populaciji gibljejo blizu vrednosti 1 (0,8–0,9) (Preglednica 14). Vrednosti TF žerjavske populacije so v vseh primerih višje od 1, medtem ko so pri zaplanski populaciji vse vrednosti nižje od 1 (Preglednica 15).

Iz factorske analize variance vidimo, da je na BAF in TF Mn vplivala populacija. Delež onesnaženja substrata ni imel statistično značilnega vpliva (Preglednica 19).

V primeru enosmerne ANOVE zaplanske populacije so statistično značilno največje vrednosti za BAF in TF prisotne pri rastlinah, ki so rasle na substratu s 100 % onesnaženjem, vrednosti ostalih izpostavitvev se med seboj statistično značilno ne razlikujejo. Znotraj žerjavske populacije ni statistično značilnih razlik (Preglednica 14, 15).

Pri primerjavi vrednosti TF in BAF med populacijama se je v vseh primerih izkazalo, da so bile vrednosti statistično značilno večje za žerjavsko populacijo (Preglednica 21).

Preglednica 19: Prikaz factorske analize bioakumulacijskih faktorjev in translokacijskega faktorja za Mn med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije pri substratih z različnim deležem onesnaženja. Analize smo opravili s programom Statistica 7, factorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

Bioakumulacijski faktor za Mn					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	0,012440	4	0,003110	0,2301	0,918232
Populacija	5,001956	1	5,001956	370,0453	0,000000
Delež onesnaženja substrata	0,015038	4	0,003759	0,2781	0,888637
(%)*Populacija					
Napaka	0,270343	20	0,013517		

Translokacijski faktor za Mn					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	0,32585	4	0,08146	0,8261	0,524804
Populacija	8,16178	1	8,16178	82,7676	0,000000
Delež onesnaženja substrata	0,08761	4	0,02190	0,2221	0,922734
(%)*Populacija					
Napaka	1,87361	19	0,09861		

4.2.5.5 Mobilnost Fe

Iz Preglednice 14 za BAF je razvidno, da so bile vse vrednosti za BAF močno manjše od 1 oz. blizu 0. Gibale so se med 0,4–1,2 za zaplansko populacijo in 0,009–0,015 za žerjavsko populacijo. V primeru rastlin zaplanske populacije, ki so rasle na neonesnaženem substratu, so povprečne vrednosti celo presegle vrednost 1. Vrednosti TF za Fe so manjše od 1.

Faktorska analiza variance je pokazala, da je imela na BAF vpliv le populacija. Na vrednosti TF za Fe pa je vplival delež onesnaženja substrata, populacija ter kombinacija obeh parametrov (Preglednica 20).

Vrednosti BAF se med seboj po izpostavitvah pri obeh populacijah niso razlikovale (Preglednica 14). Prav tako je bilo tudi pri vrednostih TF za zaplansko populacijo. V primeru žerjavske populacije so dosegale statistično značilno najvišje vrednosti TF rastline neonesnaženega substrata (0 %). Med vsemi ostalimi substrati ni bilo razlik (Preglednica

15). Vrednosti BAF so bile statistično značilno večje za zaplansko populacijo, medtem ko žerjavsko populacija dosega večje vrednosti TF (Preglednica 21).

Preglednica 20: Prikaz faktorjeve analize bioakumulacijskih faktorjev in translokacijskega faktorja za Fe med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije pri substratih z različnim deležem onesnaženja. Analize smo opravili s programom Statistica 7, faktorjeva ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

Bioakumulacijski faktor za Fe					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	0,677644	4	0,169411	1,44390	0,256363
Populacija	2,614606	1	2,614606	22,28437	0,000131
Delež onesnaženja substrata (%)*Populacija	0,668538	4	0,167135	1,42449	0,262302
Napaka	2,346583	20	0,117329		

Translokacijski faktor za Fe					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Delež onesnaženja substrata (%)	0,097102	4	0,024276	5,6941	0,003470
Populacija	0,083822	1	0,083822	19,6613	0,000285
Delež onesnaženja substrata (%)*Populacija	0,080781	4	0,020195	4,7370	0,008036
Napaka	0,081003	19	0,004263		

5 RAZPRAVA

5.1 SESTAVA SUBSTRATA

5.1.1 Primerjava substrata po izpostavitvah onesnaženosti

Analiza tal je pokazala, da z naraščanjem deleža onesnažene žerjavske zemlje s Cd, Zn in Pb v substratu naraščajo tudi koncentracije Cd, Zn in Pb v njem, kar je bilo seveda pričakovano. Če izpostavitve 0 % predstavlja neonesnaženo zaplansko prst in izpostavitve 100 % predstavlja žerjavsko prst, nam njuna primerjava povprečnih koncentracij Cd, Zn in Pb (Preglednica 1 in 2) pokaže značilno manjše koncentracije Cd, Zn in Pb za zaplansko prst. Pri substratu zaplanske populacije je koncentracija Cd izpostavitve 0 % celo pod mejo detekcije. Povprečne koncentracije Cd v žerjavski prsti se gibljejo med 65–71 mg/kg, kar je zgornja meja Cd, zaznanega v raziskavi Šajn in Gosar (2004). Povprečne koncentracije Zn (89–94 mg/kg) in Pb (73–81 mg/kg) v zaplanski prsti so statistično značilno veliko manjše od koncentracije Zn (1778–1850 mg/kg) in Pb (16200–16200 mg/kg) v žerjavski prsti. Z mešanjem zaplanske in žerjavske prsti v različnem razmerju smo tako pričakovano dobili večje koncentracije Cd, Zn in Pb v substratu z naraščanjem deleža onesnažene žerjavske prsti.

Opazno se z onesnaženjem veča tudi koncentracija Ca. Ravno obraten pojav, torej padec koncentracije z večanjem onesnaženja substrata, pa je značilen za K in Fe, medtem ko se koncentracije Mn pri različnih izpostavitvah statistično značilno ne razlikujejo. To je zopet tesno povezano s samo sestavo zaplanske in žerjavske prsti. Večje povprečne koncentracije Ca so značilne za izvorno žerjavsko prst, in sicer dosega med 97200–103000 mg/kg, medtem ko se koncentracije v zaplanski prsti gibljejo med 7280–8830 mg/kg. Za zaplansko prst pa so značilne večje povprečne koncentracije K (14500–16100 mg/kg) in Fe (29000–30800 mg/kg) od koncentracije K (6750–7360 mg/kg) in Fe (21300–21400 mg/kg) v žerjavski prsti. Povprečne koncentracije Mn pa se med zaplansko (641–759 mg/kg) in žerjavsko (579–648 mg/kg) prstjo statistično značilno ne razlikujeta (Slika 37).

S tem, ko smo mešali različna razmerja med zaplansko in žerjavsko prstjo, nismo vplivali le na spreminjanje koncentracije Cd, Zn in Pb, ampak tudi na koncentracije ostalih

elementov. Različne koncentracije esencialnih elementov (Ca, K, Fe in Mn) v substratu po izpostavitvah z različnim onesnaženjem onemogočijo opazovanje vpliva TK na privzem esencialnih elementov v rastlino, saj že sama njihova koncentracija v tleh vpliva na privzem v rastlino (Gosh in Singh, 2005). Zato za nadaljnje raziskave vpliva koncentracij TK na mineralno prehrano in privzem esencialnih elementov v rastlino svetujemo drugače zastavljen poskus. In sicer bi bilo bolje, če bi vzeli enoten neonesnažen substrat (npr. zaplansko prst), s čemer bi zagotovili enakomerno razporeditev in dostopnost esencialnih rastlin v substratu. Temu substratu bi nato dodajali različne koncentracije Zn, Cd in Pb in s tem povečevali onesnaženost po tretmajih. Tako bi lahko nadzorovano opazovali vpliv koncentracije Zn, Cd in Pb na privzem esencialnih elementov.

5.1.2 Vrednost pH in organska snov

Za rastlinski privzem elementov je zelo pomembna njihova biodostopnost oz. topnost kovin v vodni fazi, ki pa je odvisna od zadrževalnega časa in interakcij z ostalimi elementi v substratu (Tangahu in sod., 2011). Sproščanje kovin iz talnih delcev je odvisna od pH, same količine elementa v tleh, kationsko izmenjevalne kapacitete, vsebnosti organske snovi, oksidacijskega stanja mineralnih komponent in redoks potenciala (Gosh in Singh, 2005).

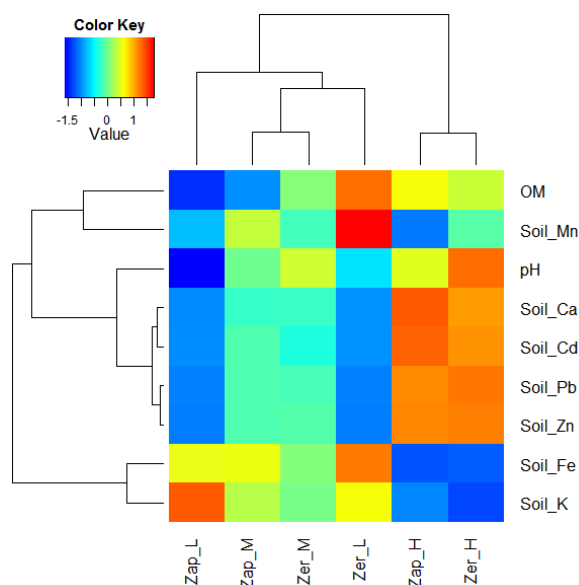
Največji vpliv na biodostopnost ima pH zemlje (Tangahu in sod., 2011). V našem primeru se je pH substrata gibal med 7,02 in 7,67. To pomeni zmanjšano dostopnost Mn in Zn, v manjši meri tudi K in Fe. Zanje je ugodnejši bolj kisel pH (Taiz in Zeiger, 2006). Pri nevtralnem in rahlo bazičnem pH, ki je tipičen za večino tal, so kationi kovin močno vezani na glinene frakcije, lahko pa tudi na vodne okside Fe, Al in Mn, ki so prisotni v mineralni obliki v tleh (Gosh in Singh, 2005). Glede na povprečne vrednosti pH je opazno večanje pH z večanjem deleža onesnaženja substrata. Kar bi imelo še dodaten vpliv na omejevanje privzema Mn in K ter Fe, katerih koncentracija se je z deležem onesnaževanja že tako zmanjševala.

Organska snov izboljšuje fizikalne lastnosti tal v smislu zračnosti in vodne kapacitete, predstavlja rezervo dušika in preprečuje izpiranje mineralnih snovi (Mršić, 1997). V našem

poskusu se z večanjem deleža onesnaženja povečuje delež organske snovi pri substratih za zaplansko populacijo, kar dodatno vpliva na dostopnost elementov za privzem v rastlino, saj imajo TK visoko afiniteto za vezavo na organsko snov (Gosh in Singh, 2005).

5.1.3 Primerjava substratov znotraj enake izpostavitve onesnaženja med populacijama

Glede na problem, ki se je pojavil med izpostavitvami znotraj iste populacije, so si substrati enake onesnaženosti oz. izpostavitve za obe populaciji po mineralni sestavi zelo podobni (Slika 37). Kar pomeni, da so rezultati vpliva populacije za privzem TK in esencialnih elementov verodostojni. To velja za vse izpostavitve, edina razlika v substratu med populacijama se pojavlja pri kontrolnem oz. neonesnaženem substratu (0 %). Substrata se med populacijama razlikujeta predvsem po koncentraciji Mn in organski snovi (Slika 37), kar je posledica nehomogenosti substrata. Zato je primerjava med populacijama vsaj v privzemu in akumulaciji Mn pri tej izpostavitvi neverodostojna. Verjetno pa je prisoten vpliv še na privzem ostalih elementov, glede na to, da kationi med seboj tekmujejo za vezavna mesta (Gosh in Singh, 2005).



Slika 37: Barvni diagram lastnosti tal (pH, organske snovi, koncentracije elementov) pri različnih izpostavitvah z dodanimi drevesi podobnosti na osnovi analize grozdov. Podatke za vzorce izpostavitve 0 % smo označili kot L, vzorce izpostavitve 25 % in 50 % kot M in vzorce izpostavitve 75 % in 100 % kot H. Oznaki za populacijo *N. preacox* sta Zer – žerjavsko populacijo, Zap – Zaplansko populacijo. Barvna skala v levem zgornjem kotu diagrama nam prikazuje, ali so vrednosti nad- ali podpovprečne. Pomen oznak: OM-organska snov, Soil_X-koncentracija elementa v substratu.

5.2 BIOMASA RASTLIN

5.2.1 Vpliv povečanja koncentracije Zn, Cd in Pb v substratu na biomaso rastlin

En izmed ciljev našega lončnega poskusa je bil določiti vpliv deleža onesnažene zemlje s Cd, Pb in Zn na produkcijo sveže in suhe biomase korenin ter poganjkov pri dveh ekotipih *N. preacox* v obdobju 3 mesecev.

Predhodne raziskave na različnih rastlinah kažejo na negativen vpliv TK, še posebno Cd, na rast in razvoj rastlin. Posledično to pomeni manjšo biomaso korenin in poganjkov (Öncel in sod., 1999; Perfus-Barbeoch in sod., 2002; Benavides in sod., 2005; Zhou in Qui, 2005). V našem poskusu se je izkazalo ravno obratno. Povečanje deleža onesnaženosti substrata je vplivalo na povečanje sveže in suhe biomase rastlin. Največjo svežo in suho biomaso so dosegale rastline iz substrata s 25 %, 50 % in 75 % onesnažene zemlje. Pri rastlinah iz 100 % onesnaženega substrata sta se sveža in suha biomasa rastlin zopet zmanjšali. Torej prisotnost nižjih koncentracij Cd, Pb in Zn deluje spodbujajoče na samo rast rastline. Lahko bi celo trdili, da je za uspešno rast *N. preacox* potrebna določena koncentracija Cd, Pb in Zn v substratu. Kar pomeni, da imata lahko Cd in Pb kljub vsemu neko fiziološko funkcijo v rastlini. Za *N. caerulea* je bila predlagana fiziološka vloga Cd kot ojačevalca aktivnosti nekaterih encimov, ki sprožijo antioksidativni odgovor na stres, povzročen s strani kovin (Pongrac in sod., 2009). Spodbujanje delovanja encimov je lahko posledica spodbude njihove sinteze ali zaviranja njihovih inhibitorjev (Sergin in Ivanov, 2001).

Podoben pozitiven vpliv na biomaso rastlin je v svoji raziskavi vpliva Cd na *N. preacox* in *N. caerulea* ugotovila tudi Pongrac in sod. (2009). Povečanje biomase rastline je lahko posledica hormoneze. Pri tem pojavu prisotnost nižjih koncentracij onesnažila (v našem primeru TK) spodbudi rast rastline. S povečanjem rastlinskega volumna se razredči koncentracija TK v rastlini, kar zmanjša strupen učinek TK in omogoča normalen potek metabolnih procesov (Koren, 2013; Krzslowska, 2010). Prav tako je zaradi vsebnosti TK v rastnem gojišču prišlo do stimulacije rasti alge *Selenastrum capricornutum* in male vodne leče *Lemna minor* (Vidic in sod., 2008).

Podobne pozitivne vplive na biomaso je dobil tudi Sun in sod. (2009), ki je preučeval hiperakumulacijsko sposobnost vrste *Bidens pilosa*. Ugotovil je, da Cd v substratu povečuje biomaso poganjkov in korenin do določene meje, po prekoračitvi te meje pa je biomasa manjša od predhodnje, kar smo ugotovili tudi v našem poskusu. Verjetno so koncentracije TK v substratu s 100 % onesnaženjem že presegale mejo, katere strupenih učinkov rastlinski razstrupljevalni mehanizmi niso bili več sposobni omejevati, zato je prišlo do razvoja manjše biomase. V našem primeru ne moremo točno vedeti, katera izmed TK je imela največji vpliv, vendar glede na večjo mobilnost Zn in Cd (Blosberg in Phalson, 1989; Barcelo in Postschraider, 1990), ta dva bolj vplivata na biomaso poganjkov, medtem ko se zaradi slabe mobilnosti večje koncentracija Pb kopičijo v koreninah (Peer in sod., 2005; Barcelo in Postschneider, 1990).

V našem primeru so kontrolne rastline (izpostavitve 0 %) slabo rastle, prišlo je do sušenja listov in končno zelo nizke biomase. Po vsej verjetnosti je to posledica pomanjkanja Zn (Blosberg Phalson, 1989; Taiz in Zaiger, 2006). Zn je esencialni element, pomemben za rastlinski metabolizem. Njegovo pomanjkanje lahko vpliva na inhibicijo fotosinteze, s tem pa na produkcijo sladkorjev, kar posledično vodi v zakrnelo rast rastline (Vidic in sod., 2008).

5.2.2 Vpliv populacije na biomaso rastlin iz s Cd, Zn in Pb onesnaženega substrata

Ena izmed naših hipotez je bila, da naj bi žerjavsko populacija ranega mošnjaka, ki izvira iz onesnaženega območja, bolje uspevala na substratu s povečano onesnaženostjo kot zaplanska populacija, kar pomeni, da naj bi bila biomasa poganjkov in korenin večja. V našem poskusu se populaciji oz. ekotipa po sveži biomasii poganjkov in korenin znotraj substrata z istim deležem onesnažene zemlje ne razlikujeta. Torej ni statistično značilnih razlik med populacijama glede sveže mase rastlin. Iz tega lahko razberemo, da sta obe populaciji uspešno prilagojeni na povišane koncentracije TK in imata obe dobro razvite razstrupljevalne mehanizme. Prav tako ni bilo razlike med populacijama po suhi masi korenin znotraj enake izpostavitve.

Pri suhi masi poganjkov rastlin iz substrata s 25 % deležem onesnažene zemlje je suha masa poganjkov zaplanske populacije statistično značilno večja od žerjavske. Razlik znotraj ostalih izpostavitvev ni. Iz tega lahko razberemo, da so bile rastne razmere za rastline zaplanske populacije optimalne že pri substratu s 25 % onesnaženjem, kar se tiče koncentracije TK, tu imamo v mislih predvsem esencialni Zn. Medtem, ko se optimalne koncentracije TK za žerjavsko populacijo pojavijo šele pri substratu s 50 % onesnaženjem. Pri sveži biomasi rastlin in suhi biomasi poganjkov pride do statistično značilnega naraščanja biomase zaplanske populacije že pri izpostavitvi 25 % onesnaženosti, medtem ko pri žerjavski populaciji ta porast nastopi šele v primeru 50 % onesnaženja. To lahko razložimo s tem, da žerjavsko populacijo, ki izhaja iz onesnaženega območja s Cd, Pb in Zn, zaradi visokih koncentracij v tleh lažje dostopa do Zn. Mehanizmi za njegov privzem niso tako dobro razviti kot pri zaplanski populaciji, ki raste na neonesnaženih tleh in mora zaradi nižje koncentracije Zn v tleh za njegov privzem razviti učinkovitejše mehanizme (Meertens, 2003).

Lahko pa rastline žerjavske populacije za svojo uspešno rast celo potrebujejo Cd in Pb. V nekaterih primerih so ugotovili, da nizke koncentracije Cd^{2+} in Pb^{2+} celo spodbudijo rast koreninskega sistema (Sergin in Ivanov, 2001). Manjša suha biomasa poganjkov rastlin iz 100 % onesnaženega substrata je glede na izpostavitve 75 % statistično značilna le za rastline zaplanske populacije. Obenem se sveža in suha biomasa poganjkov zaplanske populacije kontrole (0 %) statistično značilno ne razlikuje od poganjkov 100 % substrata. To kaže na slabšo toleranco za TK v primerjavi z žerjavsko populacijo, kjer upad suhe biomase ni statistično značilen. Sveža biomasa poganjkov izpostavitve s 100 % onesnaženjem pa je značilno večja od kontrole. Raziskave na ekotipih iz onesnaženega in neonesnaženega območja so pokazale, da so navadno za onesnaženje bolj tolerantni ekotipi iz onesnaženih območij (Sun in sod., 2013).

5.3 DELEŽ VODE V RASTLINI

5.3.1 Vpliv povečanja koncentracije Cd, Zn in Pb v substratu na delež vode v rastlini

Izmerili smo tudi delež vode v rastlini. Navadno Pb in Cd povzročata upad transpiracije in vsebnosti vode v rastlini (Schat in sod., 1997; Sergin in Ivanov, 2001; Perfus-Barbeoch in sod., 2002; Benavides in sod., 2005; Sherameti in Varma, 2011). Zmanjšujeta tudi vsebnost snovi, ki vzdržujejo turgor in plastičnost celice, kar povzroči nižanje vodnega potenciala, to pa zopet vodi v upočasnitev rasti (Sergin in Ivanov, 2001; Sherameti in Varma, 2011). Zmanjšana rast korenin povzroča motnje v privzemu in transportu vode po rastlini (Zhou in Qui, 2005). Cd in Pb povečujeta vsebnost ABA, kar povzroča zapiranje listnih rež (Sergin in Ivanov, 2001; Sherameti in Varma, 2011). Cd^{2+} ima tudi sposobnost posnemanja Ca^{2+} , s čemer si zagotovi vstop v celice spremljevalke preko Ca^{2+} kanalčkov, medtem ko so se K^{+} kanalčki izkazali za nepropustne pri raziskavi na *A. thaliana*. Znotraj celic spremljevalk zaviralno vpliva na odpiranje listnih rež čez dan. S tem se zmanjša transpiracija, kar pa vpliva na pretok vode po rastlini (Perfus-Barbeoch in sod., 2002).

V našem primeru je prišlo do ravno obratnega pojava. Delež vode je bil v koreninah in poganjkih obeh populacij v primerjavi s kontrolnimi rastlinami statistično značilno večji. Verjetno je manjša vsebnost vode rastlin kontrole posledica pomanjkanja Zn, kar povzroča slabo rast, s tem pa manjše površine listov. Ti predstavljajo glavni transpiracijski organ, kar pa vpliva na samo vsebnost vode v rastlini (Sergin in Ivanov, 2001). Med poganjki obeh populacij in koreninami žerjavske populacije ostalih substratov se niso kazale nobene razlike v deležu vode.

Za korenine zaplanske populacije je opazno naraščanje deleža vode z naraščanjem onesnaženosti substrata. Zanimivo je, da delež vode pri 100 % onesnaženem substratu ni upadel, kot sta upadli sveža in suha biomasa. Lahko je to posledica obrambnega mehanizma, saj se z večanjem deleža vode v rastlini koncentracije TK manjšajo. Kar spet potrjuje teorijo hormoneze (Kreżsłowa, 2010; Koren, 2013).

Eden izmed glavnih razstrupljevalnih mehanizmov za TK pri rastlinah je njihova sekvestracija v vakuolah (Sergin in Ivanov, 2001; Krezslowa, 2010). Večja, kot je koncentracija snovi (v našem primeru TK) v vakuoli, večji je vstop vode v celico zaradi osmoze (Raven in sod., 2005). Zato lahko predvidevamo, da z višjo vsebnostjo TK v vakuolah prihaja tudi do višje vsebnosti vode v celici. Voda vstopa v vakuolo, dokler ji turgor to dopušča, s tem pa lahko s svojim povečevanjem vpliva tudi na večanje celice. Turgor je odvisen tudi od togosti celične stene (Raven in sod., 2005). Celična stena je še eno mesto, kjer se kopičijo TK v visokih koncentracijah, in sicer se vežejo na karboksilne skupine pektinov. Depoziti Pb, Cd in Zn povzročajo zadebelitve celične stene in povečajo njeno togost, kar naj bi omejevalo rast. Obenem pa lahko TK povzročijo nastanek $\text{OH}^\bullet$, ki zaradi oksidativnega delovanja povzroča cepitev polisaharidov in s tem rahljanje celične stene. To pa spodbudi podaljševanje celice (Krzslowa, 2010), kar je tudi lahko razlog za povečanja vsebnosti vode v celici in biomase rastline.

5.3.2 Vpliv populacije na delež vode v rastlinah

Rastline žerjavske populacije (znotraj izpostavitve 25 %, 50 % in 75 %) imajo statistično značilno večji delež vode od rastlin zaplanske populacije. Te ugotovitve kažejo na povečano kopičenje vode znotraj žerjavskega ekotipa. To nam razloži tudi, zakaj se populaciji po sveži biomasi poganjkov in korenin ne razlikujeta, medtem ko pri suhi biomasi se. Suha biomasa poganjkov žerjavske populacije se manjša, večja pa se njen delež vode.

Za hiperakumulatorje je značilna večja toleranca za sušne razmere kot za nehiperakumulacijske rastline. Nekateri celo trdijo, da akumulacija TK doprinese k odpornosti proti suši, saj TK vplivajo na delovanje listnih rež, naj bi pa tudi povečevale osmolarnost znotraj celice (Whiting in sod., 2003; Bhatia in sod., 2005). Zadnje ni bilo dokazano, a opazni so trendi. Tla, bogata s TK, so pogostejše bolj skeletna in porozna, kar pomeni, da voda zelo hitro odteka. Torej lahko zelo hitro nastopijo sušne razmere za rastlino (Bhatia in sod., 2005; Whiting in sod., 2003). Zatorej morajo imeti rastline, ki rastejo na takih tleh, večjo sposobnost zadrževanja vode in zmanjšanja njihove izgube. Glede na to, da je žerjavsko populacijo izhajala iz onesnaženega območja z zrnato strukturo

tal, lahko predvidevamo, da so njeni mehanizmi zadrževanja in privzema vode bolj razviti kot pri zaplanski populaciji, ki izhaja iz za vodo ugodnejših glinenih tal. Zato je tudi vsebnost vode večja pri žerjavski populaciji.

5.4 FOTOSINTEZNI PIGMENTI

V vseh rastlinah našega poskusa, ne glede na populacijo in odstotek onesnaženosti substrata, je med fotosinteznimi pigmenti v poganjkih najvišjo koncentracijo dosegal klorofil a. Sledila je koncentracija klorofila b, najnižje koncentracije v poganjkih pa so dosegali karotenoidi, kar se načeloma pričakuje pri rastlinah v optimalnem okolju. Klorofil a je glavni fotosintezni pigment, medtem ko so klorofil b in karotenoidi pomožni fotosintezni pigmenti (Taiz in Zeiger, 2006).

5.4.1 Vpliv povečanja koncentracije Cd, Zn in Pb v substratu na klorofil a in b

Naša hipoteza je trdila, da se bo koncentracija celokupnega klorofila z naraščanjem onesnaženosti substrata zmanjševala, saj predvsem Cd in Pb povzročata poškodbe antenskih pigmentov (Siedlecka in Krupa, 1999), poleg tega pa še motnje v sintezi obeh klorofilov in karotenoidov (Sergin in Ivanov, 2001; Zeniwig in Munzuroglu, 2005). Motnje v sintezi povzročata z inhibicijo sinteznih encimov (vežeta se na –SH skupino) za klorofil, kot je aminolevulonska kislinska dehidrogenaza oz. ALA dehidrogenaza (Sergin in Ivanov, 2001; Blasberg Phálsson, 1989). Z vplivom na ta encim je preprečena sinteza ALA (δ -linolenske kisline), ki je glavni prekursor klorofila in sinteze hema (Zhou in Qui, 2005, Marschner, 1986). Cd tudi preprečuje tvorbo protoklorofil-reduktaznega kompleksa, kar tudi negativno vpliva na sintezo klorofila (Öncel in sod., 1999; Pongrac in sod., 2009b). TK sprožijo tvorbo radikalov, ki poškodujejo membrane ter z njimi povezane molekule, vključno s klorofilnimi pigmenti (Zeniwig in Munzuroglu, 2005). Obenem Pb in Cd povzročata tudi pomanjkanje Zn, Fe in Mg. (Sergin in Ivanov, 2001; Blasberg Phálsson, 1989). Zmanjšanje Fe vpliva na tvorbo ALA in povzroča motnje v sintezi proteinov (zmanjšanje števila ribosomov), kar zmanjša sintezo klorofila in povzroči upad karotenoidov (Marschner, 1986). Lahko pride do zamenjave Mg^{2+} z Cd ali Zn znotraj

klorofila. V tem primeru klorofil ob relaksaciji sprosti energijo v obliki toplote in onemogoči prenos energije na akcijski center tilakoid. Večinoma pa pri zamenjavi s Cd pride do razgradnje klorofila (Küpper in sod., 1998).

V okviru našega poskusa smo pričakovali upad klorofila a z naraščanjem onesnaženja, vendar se koncentracija z naraščanjem onesnaženja ni vidno spremenila. Nekaj podobnega je pri vrsti *N. preacox* ugotovila tudi Pongrac in sod. (2009). Kar kaže na dobro razvite razstrupljevalne mehanizme in dobro toleranco na TK. Možno je tudi, da koncentracije TK niso še presegle koncentracij, ki bi povzročile upad klorofila a. Le kontrolne rastline (0 % delež onesnaženja) zaplanske populacije so vsebovale nižje koncentracije klorofila a kot rastline vseh ostalih substratov. To lahko razložimo s pomanjkanjem Zn v rastlini, kar je vplivalo na zakrnelo rast in drastično zmanjšanje listov ter na zmanjšanje koncentracije klorofila (Marschner, 1986). Zakaj pa do tega ni prišlo pri žerjavski populaciji, lahko razložimo s primerjavo neonesnaženih substratov med populacijama. Iz barvnega diagrama (Slika 37) razberemo, da so bile koncentracije Zn in Mn v neonesnaženem substratu zaplanske populacije nižje kot v substratu žerjavske populacije. Obenem je bila v koreninah iz neonesnaženega substrata zaplanske populacije statistično značilno manjša koncentracija Zn kot pri žerjavski populaciji.

Prav tako kot za klorofil a, ni bilo nobenega vpliva zaradi onesnaženosti substrata na koncentracijo klorofila b. Kljub temu, da klorofil b velja za bolj občutljivega na Cd in Pb od klorofila a (Gallego in sod., 1996; Sergin in Ivanov, 2001; Manois in sod., 2003; Zeniwig in Munzuroglu, 2005), se njegova koncentracija z naraščanjem onesnaženja ni spreminjala.

5.4.2 Vpliv populacije na klorofil a in b v rastlinah, ki so rasle na s Cd, Pb in Zn onesnaženih tleh

Dober razvoj razstrupljevalnih mehanizmov (Krzyszowska, 2010) in prilagojenost obeh populacij na onesnaženje s TK potrjuje tudi odsotnost upada koncentracij klorofila a in b. Kljub temu pa se ekotipa po koncentracijah med seboj močno razlikujeta. Rastline žerjavske populacije vsebujejo statistično značilno večje koncentracije klorofila a in b v

primerjavi z rastlinami zaplanske populacije. Iz tega lahko sklepamo, da je večja koncentracija klorofila posledica boljše prilagoditve žerjavske populacije v primerjavi z zaplansko populacijo. Mogoče celo TK doprinesejo k sami sintezi klorofila, a mehanizma ne poznamo. Žerjavsko populacijo že več generacij raste na s TK onesnaženih tleh. Kratek življenjski cikel *N. preacox* je lahko omogočil razvoj novih morfoloških in fizioloških prilagoditev na take razmere, kot je bilo predlagano že s strani Lombi in sod. (1999) za *N. caerulea* in *N. goesingense*. Ena izmed prilagoditev je lahko tudi povečanje koncentracije klorofila za vzdrževanje stopnje fotosinteze. Glede na to, da se lahko Cd, Pb in Zn vgradijo v klorofil namesto Mg (Küpper in sod., 1998), bi se lahko koncentracija klorofila povečala tudi zato, ker so nastali klorofili s TK manj učinkoviti. To pa povzroči, da rastlina še naprej vlaga v večjo produkcijo klorofila, da zadosti potrebam po fotosintezi.

5.4.3 Vpliv deleža onesnaženosti substrata na koncentracijo karotenoidov

Na koncentracijo karotenoidov v rastlinah vpliva delež onesnaženosti substrata. In sicer, v okviru žerjavske populacije je lepo vidno naraščanje koncentracije karotenoidov do substrata s 75 % onesnaženjem, nato pa se koncentracija zmanjša nazaj na koncentracijo kontrole. Najvišjo koncentracijo karotenoidov vsebujejo rastline substrata s 75 % deležem onesnaženja. Karotenoidi so lovilci prostih radikalov (nastanejo tudi zaradi TK) in so del antioksidantnega sistema, ki ščiti rastlino (Gallego in sod., 1996). Povečanje karotenoidov imamo lahko za pokazatelja aktivacije antioksidativnega sistema v rastlini. V primeru rastlin iz popolnoma onesnaženega substrata koncentracija karotenoidov upade na koncentracijo pri kontrolnih rastlinah, iz česar lahko sklepamo, da je koncentracija TK že presegla mejo tolerance in antioksidantni sistem ne more več omejiti vseh strupenih učinkov, kar se kaže tudi na produkciji biomase. Kot že zgoraj omenjeno, TK povzročajo upad same sinteze karotenoidov (Siedlecka in Krupa, 1999; Sergin in Ivanov, 2001; Zeniwig in Munzuroglu, 2005). Znotraj zaplanske populacije je trend naraščanja koncentracije karotenoidov manjši, vendar še vedno vsebujejo rastline iz substrata 25 % in 75 % večje koncentracije od kontrole.

5.4.4 Vpliv populacij na koncentracijo karotenoidov

Med ekotipi se populaciji v koncentraciji karotenoidov statistično značilno razlikujeta le pri substratu s 50 % deležem onesnaženja, in sicer v tem primeru so koncentracije karotenoidov večje pri žerjavski populaciji. Verjetno zaradi istega razloga kot oba klorofila, torej rastlina vlaga več energije v tvorbo pomožnih pigmentov, da bi povečala učinkovitost fotosinteze in obrambe pred TK.

5.5 SLADKORJI

Cilj raziskave je bil tudi preveriti, kako povišane koncentracije Cd, Pb in Zn vplivajo na metabolizem ogljikovih hidratov (COH). Zanimal nas je tudi vpliv populacije oz. ekotipa na sam odziv metabolizma COH. Pričakovali smo, da se bo v kloroplastih obeh ekotipov pojavilo kopičenje fotosinteznega škroba. TK so znane po tem, da povzročajo inhibicijo fotosinteze in s tem sinteze sladkorjev. Obenem pa zaradi poškodb membran omejujejo prenos COH iz izvornih tkiv, kot je mezofil, v ponorna tkiva, torej v fotosintezno neaktivne korenine (Marschner, 1986; Verma in Dubey, 2001). Torej naj bi delež škroba v poganjkih naraščal z naraščanjem deleža onesnaženosti substrata oz. deležem koncentracije TK v poganjkih, v koreninah pa naj bi potemtakem upadal (Blasberg Phálsson, 1989). Obenem smo pričakovali, da bo zaradi slabše prilagoditve na onesnaženje s TK učinek kopičenja škroba v poganjkih toliko večji pri zaplanski populaciji.

5.5.1 Vpliv deleža onesnaženja na produkcijo in transport sladkorjev

V okviru žerjavske populacije se vsebnost skupnega škroba v poganjkih po AACC metodi ne spreminja glede na delež onesnaženosti substrata, kar kaže na boljšo toleranco za TK od zaplanske populacije, za katero je značilno spreminjanje v koncentraciji sladkorjev po izpostavitvah.

Edina statistično značilna razlika pri rastlinah žerjavske populacije je med popolnoma onesnaženim substratom (100 %), kjer je vsebnost skupnega škroba manjša od vsebnosti poganjkov izpostavitve 25 %. To kaže na trend upadanja vsebnosti sladkorja z naraščanjem

koncentracije TK v substratu. To bi lahko razložili s strupenimi učinki TK na metabolizem rastlin pri izpostavitvi 100 %, kar nam podkrepi tudi upad koncentracije karotenoidov in biomase rastlin te izpostavitve. Koncentracije TK so bile pri tej izpostavitvi že tako velike, da so prekoračile razstrupljevalne mehanizme in vplivale na rastlinski metabolizem. Z zmanjšanjem fotosinteze se zmanjša sama produkcija COH, kar pomeni, da se zmanjša vsebnost skupnega škroba v poganjkih. S tem, ko ni novo nastajajočega škroba, predhoden pa se porablja za normalno delovanje celice, se sam delež škroba zmanjša (Taiz in Zaiger, 2006). Podobne ugotovitve upadanja škroba so potrdili tudi rezultati, dobljeni z metodo FTIR-ATR.

Pri zaplanski populaciji pri obeh metodah delež škroba v poganjkih ekstremno naraste pri rastlinah substrata s 50 % deležem onesnaženja. Porast razlagamo s prekoračenjem sposobnosti razstrupljevalnih mehanizmov, kar vodi v poškodbe membran zaradi peroksidacije (Sergin in Ivanov, 2001; Verma in Dubey, 2001; Manios in sod., 2003). Peroksidacija membran kloroplastov omeji oz. prepreči izstop trioza fosfatov v citosol. S tem je omejena sinteza saharoze, ki je glavni transportni sladkor po rastlini. Zaradi kopičenja trioza fosfatov znotraj kloroplastov pride do njihove pretvorbe v tranzitni škrob in njegovega porasta. TK povzročajo tudi poškodbe membran, kar omejuje prenos nastale saharoze med celicami in v ponorna tkiva. Kar še dodatno pripomore h kopičenju sladkorjev v poganjkih (Varma in Dubey, 2001). Podobne rezultate akumulacije škroba v poganjkih *N. preacox* iste populacije je dobila tudi Koren (2013).

Z nadaljnjim povečevanjem deleža onesnaženja substrata (75 % in 100 %) se delež škroba v poganjkih zaplanske populacije statistično značilno manjša glede na predhodno izpostavitve. Do tega verjetno pride zaradi upada fotosinteze in s tem sinteze sladkorjev (Taiz in Zeiger, 2006). Iz rezultatov za fotosintezne pigmente vidimo, da ni prišlo do motenj njihove sinteze. Lahko pa so TK povzročale motnje v prenosu elektronov in zaradi vpliva na Mn na cikel cepitve vode (Marschner, 1986), kar negativno vpliva na stopnjo fotosinteze (Blosberg Phálsón, 1989; Sergin in Ivanov, 2001). Če bi želeli zagotovo videti vpliv na stopnjo fotosinteze, bi se morali poslužiti meritev fotosintezne aktivnosti. Znan je tudi negativen vpliv TK na nefotokemične reakcije (Sidelcka in Krupa, 1999; Sergin in Ivanov, 2001; Sheraleti in Varma, 2011) in fiksacijo dušika (Sergin in Ivanov, 2001;

Benvides in sod., 2005), kar povzroči upad sinteze sladkorjev. Zaradi porabe že nastalega škroba se njegova koncentracija v poganjkih začne zmanjševati. Pomanjkanje in omejen transport sladkorjev v ponorna tkiva tudi vpliva na zaviranje rasti in s tem manjšo biomaso (Taiz in Zeiger, 2006; Vidic in sod., 2008).

Iz tega lahko razberemo, da je vpliv TK prej viden iz produkcije sladkorjev kot iz fotosinteznih pigmentov, kar kaže na to, da so karbonske reakcije fotosinteze bolj občutljive na TK od svetlobnih.

5.5.2 Vpliv populacije na sintezo in transport sladkorjev

Pri primerjavi ekotipov so bile opazne velike razlike pri deležu skupnega škroba glede na svežo maso poganjkov. Pri izpostavitvah 0 % in 25 % onesnaženega substrata ni vidnih večjih razlik, medtem ko pri izpostavitvah 50 % in 75 % zaplanska populacije vsebuje večji delež škroba od žerjavske. TK so imele večji vpliv na membrane in s tem na transport COH v ponorna tkiva pri zaplanski populaciji (Verma in Dubey, 2001), kar kaže na slabšo prilagoditev zaplanske populacije na visoke koncentracije Cd, Zn in Pb v tleh. Žerjavska populacija se je izkazala za bolj prilagojeno na kovinski stres, kar se tiče metabolizma COH, katerega učinkovitost je nujna za preživetje (Koren, 2013).

5.5.3 Vpliv deleža onesnaženja s Cd, Pb in Zn ter populacije na strukturne sladkorje

S pomočjo FTIR-ATR analize smo lahko zaznali še produkcijo ostalih strukturnih sladkorjev ter aromatskih snovi, predvsem lignina v poganjkih. Iz spektra lahko v splošnem razberemo, da pride s pojavom onesnaženja do povečanja predvsem pektina in lignina v poganjkih ter v določeni meri tudi ostalih strukturnih polisaharidov, kot sta celuloza in hemiceluloza. Podobne ugotovitve so v svojih raziskavah dobili tudi Koren (2013) in Regvar in sod. (2013). Da rastline zmanjšajo strupen učinek Cd, se ta v listih veže v komplekse z O-ligandi, eden izmed teh ligandov je prav pektin (Koren, 2013). Tako povečanje koncentracije pektina v poganjkih lahko predstavlja obrambni mehanizem rastline pred kovinskim stresom. Povečanje koncentracije lignina pa pomeni povečano

lignifikacijo. Regvar in sod. (2013) so ugotovili, da gre predvsem za povečano lignifikacijo epidermisa. S tem rastlina prepreči izhod TK iz manj aktivnih rastlinskih tkiv (epidermisa) v bolj aktivne (mezofil). V grobem bi lahko rekli, da se žerjavska populacija hitreje odziva na kovinski stres kot zaplanska. Saj vidimo, da pri izpostavitvi 50 % (predvsem vrh 1390 cm^{-1}) žerjavska populacija že poveča produkcijo pektina in lignina, medtem ko se ta pojavi pri zaplanski populaciji šele zakasnelo pri izpostavitvi 100 %, a je potem mnogo večja od žerjavske. S tem, ko je žerjavska populacija omejila strupene učinke Cd, Zn in Pb, je zmanjšala vpliv na membrane in omogočila normalno produkcijo in transport sladkorja po celici (Varma in Dubey, 2001).

5.6 ELEMENTNA SESTAVA RASTLINSKEGA MATERIALA

Kot že prej navedeno, rezultati vpliva Cd, Pb in Zn na privzem K, Ca, Mn in Fe zaradi neenakomerne razporeditve teh v substratu ni realna. Prav tako ne bi mogli trditi, katera izmed treh težkih kovin je imela vpliv na privzem ostalih esencialnih kovin.

Preglednica 21: Preglednica značilnih razlik v mobilnosti in koncentraciji elementov, fotosintetskih pigmentov, vsebnosti škroba ter biomase rastlin po izpostavitvah med populacijama *N. preacox* iz onesnaženega (Žerjav) in neonesnaženega (Zaplana) rastišča. Rdeča barva predstavlja najvišje značilne vrednosti vseh parametrov, modra barva pa najnižje vrednosti (Duncanov test, $p < 0,05$). Majhne črke predstavljajo zaplansko populacijo, velike pa žerjavsko populacijo.

	IZPOSTA VITEV	ZNOTRAJ POPULACIJE										MED POPULACIJAMA									
		ZAPLANSKA POPULACIJA					ŽERJAVSKA POPULACIJA					ZAPLANSKA POPULACIJA					ŽERJAVSKA POPULACIJA				
		0%	25%	50%	75%	100%	0%	25%	50%	75%	100%	0%	25%	50%	75%	100%	0%	25%	50%	75%	100%
korenine	Cd	a	b	bc	c	bc	A	AB	ABC	BC	C										
	Zn	a	a	b	c	bc	A	A	B	B	C										
	Pb	a	b	c	d	d	A	B	C	D	E										
	K	b	b	b	ab	a	A	A	B	B	A										
	Ca	a	a	a	a	a	A	A	A	A	A										
	Mn	a	a	a	a	a	B	A	A	A	A										
	Fe	ab	b	ab	ab	a	A	CD	ABC	BC	AB										
poganjki	Cd	a	a	a	a	b	A	B	B	B	C										
	Zn	a	a	a	a	b	A	AB	ABC	A	B										
	Pb	a	ab	b	b	c	A	AB	ABC	B	C										
	K	a	ab	ab	b	b	A	CD	D	BC	B										
	Ca	a	a	a	a	a	A	A	A	A	A										
	Mn	a	a	a	a	b	B	ab	A	A	ab										
	Fe	a	a	a	a	a	B	AB	ABC	A	A										
BAF	Cd	a	a	a	a	a	/	B	AB	A	A										
	Zn	b	a	a	a	a	B	A	A	A	A										
	Pb	b	a	a	a	a	A	A	A	A	A										
	K	a	ab	b	b	c	A	AB	BC	BC	C										
	Ca	b	b	a	a	a	C	B	A	A	A										
	Mn	a	a	a	a	b	A	A	A	A	A										
	Fe	a	a	a	a	a	A	A	A	A	A										
TF	Cd	/	a	a	a	b	/	A	A	A	B										
	Zn	a	ab	a	a	ab	BC	C	AB	A	AB										
	Pb	b	a	a	a	a	A	A	A	A	B										
	K	a	b	b	b	c	A	BC	C	BC	B										
	Ca	a	a	a	a	a	B	A	AB	A	AB										
	Mn	a	a	a	a	b	A	A	A	A	A										
	Fe	a	a	a	a	a	B	A	A	A	A										
kornine	sveža masa	a	abc	bc	c	ab	A	AB	BC	C	A										
	suha masa	a	bc	c	c	ab	A	ABC	BC	C	AB										
	% vode	a	b	b	c	c	A	B	B	B	B										
poganjki	sveža masa	a	bc	bc	c	ab	A	AB	CD	D	BC										
	suha masa	a	bc	bc	c	ab	A	A	BC	BC	AB										
	% vode	a	b	b	b	b	A	B	B	B	B										
pigmenti	klorofil a	a	b	ab	b	ab	A	A	A	A	A										
	klorofil b	a	a	a	a	a	A	A	A	A	A										
	karotenoidi	a	b	ab	b	ab	A	A	AB	B	A										
poganjki	% škroba v suhi masi	a	a	c	bc	ab	AB	B	AB	AB	A										
	% škroba v sveži masi	a	a	c	bc	ab	AB	B	AB	AB	A										

5.6.1 Kadmij

5.6.1.1 Akumulacija Cd, Zn in Pb po izpostavitvah

Koncentracije Cd, Zn in Pb v rastlinskih poganjkih in koreninah pri obeh ekotipih so vidno naraščale s povečanjem deleža onesnaženosti substrata, kar smo pričakovali. Iz Preglednic 1 in 2 je vidno, da koncentracija Cd, Zn in Pb v zemlji z večanjem deleža onesnaženja substrata tudi statistično značilno narašča. S tem, ko se v tleh nahaja večja koncentracija Cd, Zn in Pb, pomeni, da je večja možnost do njegovega dostopanja (Gosh in Singh, 2005),

obenem pa je možnost tekmovanja za vezavna mesta bolj v prid Cd (Pongrac in sod., 2009b), Zn in Pb.

5.6.1.2 Sposobnost hiperakumulacije Cd pri obeh ekotipih *N. preacox*

Koncentracija akumuliranega Cd v poganjkih, katero mora rastlina preseči, da jo lahko označimo za hiperakumulatorja, je bila po Baker in Brooks določena na 1000 mg Cd/kg suhe mase poganjkov (Gosh in Singh, 2005). Vendar je Baker in sod. (1994) zaradi nasploh nizke koncentracije Cd v tleh (0,03–5,0 mg/kg) znižal to mejo na 100 mg/kg (Van der Ent in sod., 2013). V našem primeru *N. preacox* sta obe populaciji v poganjkih akumulirali koncentracije, višje od 100 mg/kg. In sicer je zaplanska populacija akumulirala do 1410 mg/kg, žerjavska populacija pa do 932 mg/kg Cd (Priloga D), kar obe populaciji uvršča med hiperakumulatorje za Cd. Hiperakumulacijo Cd za *N. preacox* potrjujeta tudi faktorja BAF in TF, ki sta pri vseh rastlinah, razen kontrolnih, večja od 1 (Vogel-Mikuš, 2006; Van der Ent in sod., 2013). Za kontrolne rastline nismo mogli izračunati faktorjev, saj so bile vsebnosti Cd v substratu in nekaterih koreninah pod mejo detekcije, kar je logično, saj naj neonesnažena zemlja ne bi vsebovala Cd. Prisotnost Cd v kontrolnih rastlinah je bila verjetno posledica njegove prisotnosti v semenih (Pongrac, 2009). V povprečju naj bi semena žerjavske populacije vsebovala 1000 µg/g Cd (Vogel-Mikuš in sod., 2006).

Najvišja dosežena vrednost BAF pri žerjavski populaciji je bila 73 (izpostavitv 25 %), pri zaplanski pa 18 (izpostavitv 100 %). Najvišja TF sta bila pri obeh populacijah dosežena na substratu s popolnim (100 %) onesnaženjem (zaplanska: 9, žerjavska: 12) (Priloga D). Hiperakumulacijo *N. preacox* nam potrdijo tudi ostale raziskave (Vogel-Mikuš in sod., 2005; Pongrac in sod., 2007; Vidic in sod., 2006).

Predvidevali smo, da bo imela žerjavska populacija sposobnost akumulacije večjih koncentracij Cd, kar so dognali tudi Kokovnik (2007) v kontroliranem laboratorijskem poskusu, Vogel-Mikuš in sod. (2005) ter Likar in sod. (2010) pri rastlinah, vzetih iz narave. Vendar pa naši rezultati kažejo ravno obratno, in sicer, da populacija ni imela nobenega vpliva na sposobnost akumulacije Cd v rastlino. Prav tako ni bilo statistično

značilnih razlik v BAF in TF med populacijama. Kar pomeni, da obe populaciji aktivno privzemata Cd v svoja tkiva in imata zato obe dober potencial za fitoremediacijo Cd (Preglednica 21). Pri koncentraciji Cd v poganjkih so sicer vidni trendi višjih koncentracij Cd pri žerjovski populaciji znotraj vseh izpostavitvev, razen 100 %. Podobno velja tudi za povprečja BAF in TF. Verjetno pa zaradi premajhnega vzorca rastlin in prevelikih napak to ni statistično značilno.

Glede na to, da se *N. preacox* obnaša glede akumulacije Cd podobno kot *N. caerulea*, ekotip Ganges, je Pongrac in sod. (2009) ugotovila, da lahko tudi zanj velja razvoj novega sistema za privzem Cd.

Če primerjamo najvišje dosežene koncentracije Cd v poganjkih, so bile te dosežene pri rastlinah žerjavske populacije iz 100 % onesnaženega substrata. Zaplanska populacija je akumulirala višjo koncentracijo (do 1410 mg/kg Cd) od žerjavske (do 932 mg/kg Cd). Žerjavska populacija je zaradi boljše prilagoditve na višje koncentracije Cd sposobna omejiti privzem Cd, ko koncentracije presežejo sposobnost razstrupljevalnih mehanizmov. Ob previsoki koncentraciji Cd pri zaplanski populaciji pa pride do nenadzorovanega privzema Cd, kar povzroči večje koncentracije Cd v poganjkih najbolj onesnaženega substrata. Povečan transport Cd iz korenin v poganjke nam potrdi TF, ki iz vrednosti 2,74 (izpostavitvev 75 %) poskoči na 8,58 (izpostavitvev 100 %) (Preglednica 14).

5.6.2 Cink

5.6.2.1 Sposobnost hiperakumulacije Zn pri obeh ekotipih *N. preacox*

Glede na koncentracije Zn v poganjkih obeh populacij ne moremo govoriti o hiperakumulatorjih Zn, vsaj kar se tiče uspešnosti za fitoremediacijo, saj vrednosti niso presegale meje 10 000 mg/kg, ki sta jo podala Baker in Brooks (1989). Van der Ent in sod. (2013) je sicer predlagal, da bi bila za hiperakumulacijo Zn dovolj že koncentracija nad 3000 mg/kg. A tudi v tem primeru je bila vrednost presežena le v primeru zaplanske populacije 100 % onesnaženega substrata (3370 mg/kg), medtem ko je največja vrednost žerjavske populacije segala do 2180 mg/kg (izpostavitvev 100 %). V predhodni raziskavi je

Vogel-Mikuš in sod. (2005) pri pobiranju iz narave ugotovila, da je *N. preacox* iz območja Žerjava kopičil do 14 500 mg/kg suhe mase Zn, kar ga uvršča med hiperakumulatorje Zn. Pri našem lončnem poskusu je lahko nizka koncentracija Zn v rastlini posledica slabe biodostopnosti Zn v rastline. Ali pa je višja akumulacija Zn v poganjkih predhodne raziskave Vogel-Mikuš posledica prašnih delcev iz ozračja, saj so rastline pobirali iz narave (Vidic in sod., 2006). Lahko pa na samo koncentracijo akumuliranega Zn vpliva tudi čas rasti na onesnaženem območju.

Likar in sod. (2010) je potrdil akumulacijo Zn za konstantno lastnost *N. preacox* različnih populacij v Sloveniji, a tudi v njegovi raziskavi so koncentracije Zn, razen v enem primeru nižje od hiperakumulacijske meje.

5.6.2.2 Vpliv deleža onesnaženja na privzem Zn

Izkazalo se je, da ima večanje deleža onesnaženja substrata vpliv na večjo koncentracijo Zn tako v koreninah kot v poganjkih. Kar je pričakovano, saj se z večanjem deleža onesnaženja večajo koncentracije Zn v substratu, kar omogoči lažji in boljši privzem (Gosh in Singh, 2005).

Statistično značilno naraščanje privzetega Zn v korenine nastopi pri obeh populacijah šele pri rastlinah iz substrata s polovičnim onesnaženjem (50 %). Kar bi lahko pomenilo, da je pri manjšem onesnaženju prišlo do pomanjkanja Zn in da so rastline dosegle optimalne koncentracije biodostopnega Zn v tleh šele pri polovičnem onesnaženju. Pri kontrolah nam to pomanjkanje kaže sama biomasa rastlin, ki pa je pri izpostavitvi 25 % onesnaženju že »normalna«. Torej pri 25 % onesnaženju substrata so bile koncentracije Zn v tleh že optimalne za rast rastlin, vendar pa koncentracija Zn v koreninah ni bila statistično značilno večja od kontrolnih rastlin. Koncentracija Zn v poganjkih se pri obeh populacijah statistično značilno poveča šele pri 100 % deležu onesnaženja, čeprav je pri žerjavski populaciji nakazan trend povečevanja koncentracije Zn že pri 25 % onesnaženju. To bi lahko nakazovalo boljšo hiperkumulacijo Zn za žerjavsko populacijo, kar je v nasprotju z ugotovitvijo Kokovnik (2007). Potrjuje pa ugotovitev Likarja in sod. (2010), ki trdi, da so boljši akumulatorji populacije iz onesnaženih območij.

BAF za Zn je najvišji za obe populaciji pri kontrolnih rastlinah (zaplanska populacija 10; žerjavsko populacijo 13), nato pa v obeh primerih upade (Preglednica 21). Rastline, ki jim na rastišču primanjkuje esencialen element, v našem primeru Zn, so lahko izjemno uspešne pri njegovi sekvestraciji in privzemu. To rezultira v visoki vrednosti BAF, a nižji absolutni koncentraciji v rastlinskih organih (Van der Ent in sod., 2013). Tak je primer pri naših kontrolnih rastlinah. V tleh so bile nizke vrednosti Zn, glede na samo slabo rast biomase je razvidno, da so bile rastline v pomanjkanju Zn. A so zaradi dobro razvitih mehanizmov privzema imele zato toliko večji BAF.

Vrednosti BAF za ostale rastline se v večini primerov gibljejo okoli vrednosti 1 (Preglednica 14), kar pomeni, da je privzem uspešen. Pri žerjavski populaciji s substrata s 75 % in 100 % onesnaženjem padejo povprečne vrednosti pod 1. Visoke koncentracije elementa v tleh lahko vodijo do nižjega BAF od 1, kljub temu, da se v poganjkih akumulirajo visoke koncentracije elementa (Van der Ent in sod., 2013). To razloži nizke vrednosti BAF v našem primeru, kljub najvišjim koncentracijam akumuliranega Zn v teh rastlinah.

Lahko pa privzem in transport Zn po rastlini ovira prisotnost Cd in Pb v substratu. Znano je, da je dodatek Zn v substratu povečal samo ekstrakcijo Cd in s tem vsebnost Cd v poganjkih. Ravno obratno pa je nastopilo zmanjšanje Zn (Pongrac in sod., 2009a).

5.6.2.3 Vpliv populacije na koncentracijo Zn v rastlini

Razlika med populacijama se je pokazala pri koreninah, in sicer naj bi zaplanska populacija v korenine privzemala večje koncentracije Zn od žerjavsko populacije. To velja predvsem za rastline iz kontrole in 75 % onesnaženega substrata (Preglednica 21). Kar kaže na to, da ima zaplanska populacija večjo sposobnost privzema Zn iz tal v korenine od žerjavsko. Tudi Kokovnik (2007) je v svoji raziskavi ugotovila, da ima zaplanska populacija v primerjavi z žerjavsko večjo sposobnost akumulacije Zn. Večja sposobnost akumulacije Zn pri zaplanski populaciji je lahko posledica selekcijskega pritiska rasti na s Zn revnih tleh (Meerts in sod., 2003). Kopičenje večjih koncentracij Zn v koreninskih

tkivih zaplanske populacije od žerjavske kaže podobnost izključevalcem. To potrjujejo tudi TF, saj so višji za žerjavsko populacijo, kar tudi kaže na boljšo hiperakumulacijsko sposobnost v primerjavi z zaplansko populacijo.

Na koncentracijo Zn v poganjkih pa populacija nima vpliva. Razlike v koncentracijah Zn v prid zaplanski populaciji, ki so se pokazale pri koreninah, za poganjke niso več značilne. Viden je celo trend višje koncentracije Zn v poganjkih žerjavske populacije (25 %, 50 %). To lahko razložimo s pomočjo TF, ki so v vseh primerih, razen pri rastlinah iz popolno onesnaženega substrata (100 %), večje za žerjavsko populacijo (Preglednica 15, 21). Kar pomeni, da ima žerjavsko populacijo bolj razvit transport Zn v poganjke v primerjavi z zaplansko. To je lahko posledica boljše prilagoditve žerjavske populacije na kopičenje večjih koncentracij Zn v nadzemnih delih, saj v naravi prejemajo kovine vase ne le prek koreninskega sistema, ampak tudi preko prašnih delcev iz ozračja (Vidic in sod., 2006). Kar pomeni, da morajo imeti še bolj prilagojene mehanizme razstrupljanja v poganjkih od ekotipov neonesnaženega območja. Večje koncentracije Zn v rastlinah iz onesnaženih območji so bile prisotne tudi pri raziskavah Likar in sod. (2010). Naše kontrolne rastline obeh populacij so imele zelo nizko biomaso in vsebnost fotosinteznih pigmentov. Vendar je bila rast kontrolnih rastlin zaplanske populacije slabša od žerjavske. Listi so se sušili in postajali klorotični, do česar je lahko prišlo prav zaradi slabšega prenosa Zn v poganjke zaplanske populacije. Lahko pa je tudi posledica razlike v koncentracije Zn v substratu kontrolnih rastlin (Slika 37).

Podobno kot pri Cd je tudi tu opazen trend upada koncentracije Zn v koreninah zaplanske populacije popolnoma onesnaženega substrata (100 %) ter porast koncentracije Zn v poganjkih istih rastlin. To potrjujejo tudi TF. Torej tako kot pri Cd do statistično značilno večje koncentracije Zn v poganjkih pride šele pri najbolj onesnaženem substratu. Vrednosti TF se podvojijo glede na predhodne izpostavitve (iz 2,18 (75 %) skoči na 4,72 (100 %)). To kaže, da se je močno povečal tudi sam transport privzetega Zn v poganjke. Pri ostalih izpostavitvah pa ima zaplanska populacija slabšo sposobnost transporta Zn iz korenin v poganjke, saj so TF večji za žerjavsko populacijo. To lahko zopet razložimo s podprtjem mehanizmov razstrupljanja in nenadzorovanim privzemom Zn v poganjke pri zaplanski

populaciji. Glede na to lahko sklepamo, da je žerjavsko populacija sposobna prenašati večje toksične koncentracije Zn.

5.6.2.4 Primerjava razvoja hiperakumulacije Zn in tolerance za TK med populacijama

Substrat izpostavitve 0 % je predstavljal pomanjkanje Zn, ker gre za esencialen element, je to imelo vpliv na samo rast rastline. To je razvidno iz biomase rastlin in deleža vode, ki sta značilno nižja od ostalih izpostavitvev pri obeh populacijah (Preglednica 21). Isto velja za karotenoide in klorofil a zaplanske populacije, pri katerih ima Zn tudi pomembno vlogo. Značilno je, da hiperakumulatorske rastline vsebujejo večjo število prenašalcev MTP1 za Zn v tonoplastu vakuol od nehiperakumulatorskih rastlin, kar jim omogoča bolj uspešno sekvestracijo in nastanek večje zaloge Zn v vakuolah. Z bolj učinkovito sekvestracijo je tudi toleranca za povečane koncentracije Zn večja (Ricachenevsky in sod., 2013).

Ob pomanjkanju Zn se navadno v koreninah poveča njegov privzem v koreninski simplast, poveča se remobilizacija Zn iz vakuol in njegovo nalaganje v ksilem. Povečana je stopnja transkripcije transporterjev za njegov privzem, transport in remobilizacijo iz vakuol (npr. ZIP, IRT1, HMA4, HMA2, MTP1, MTP3). V poganjkih lahko pride do remobilizacije Zn iz epidermisa in trihomov preko floema. Vakuole predstavljajo glavno založno mesto za Zn ter glavni vir Zn v času pomanjkanja (Sinclair in Krämer, 2012). Glede na to, da se ob pomanjkanju Zn ali pa tudi Fe pojavi povečana transkripcija in s tem število prenašalcev kovin, lahko sklepamo, da se je hiperakumulacija razvila na neonesnaženih območjih zaradi pomanjkanja določne kovine (npr. Zn, Mn, Fe). S tem se je povečala ekspresija transporterjev za kovine in, če se je obdržala, je to predstavljalo evolucijsko prednost na teh območjih. Ko so se te rastline znašle na s TK onesnaženih rastiščih, so zaradi lažje dostopnosti privzemale večje koncentracije teh elementov vase, a so zato morale razviti boljše tolerančne mehanizme. Hiperakumulacija je torej posledica fenotipa korenin, ki omogoča velik privzem kovine v rastlino, hipertoleranca pa je vodena s strani poganjkov, kjer sta pomembna razstrupljanje in sekvestracija (Ricachenevsky in sod., 2013). Boljše tolerančne strategije omogočajo tudi večjo možnost translokacije v poganjke, kar je v našem primeru razvidno tudi iz TF za Zn, ki je večji za žerjavsko populacijo. Boljša toleranca za TK v poganjkih je razvidna tudi iz koncentracij fotosintetskih pigmentov, ki so večje za žerjavsko populacijo. Večja toleranca in boljši razstrupljevalni mehanizmi pri

žerjavski populaciji so razvidni iz vsebnosti sladkorjev. Pri zaplanski populaciji se pri izpostavitvah 50 % in 75 % že začne zastajanje sladkorjev v poganjkih, medtem ko transport in produkcija sladkorja pri žerjavski populaciji še normalno funkcionirata (Preglednica 21).

Zaplanska populacija kopiči večje koncentracije Zn, Pb, Mn in Fe v koreninah. Poganjki žerjavske populacije pa vsebujejo večje koncentracije Pb, K in Mn. Kar zopet kaže na boljšo translokacijo Mn, Zn, K in Pb v poganjke pri žerjavski populaciji (Preglednica 21).

5.6.3 Svinec

5.6.3.1 Sposobnost hiperakumulacije Pb pri obeh ekotipih *N. preacox*

Meja za hiperakumulatorja Pb, predlagana s strani Reeves in Brooks (1983), je 1000 mg/kg Pb (Van der Ent in sod., 2013). V našem primeru je zaplanska populacija akumulirala do 827 mg/kg Pb v poganjkih, kar je pod mejo hiperakumulacije (Priloga D), zato ta populacija ni hiperakumulator Pb. V primeru rastlin žerjavske populacije pa so koncentracije Pb rastlin iz popolnoma onesnaženega substrata (100 %) akumulirale do 2130 mg/kg Pb (Priloga C). To presega mejo za hiperakumulacijo, kar uvršča žerjavsko populacijo *N. preacox* med hiperakumulatorje Pb. Tudi pri raziskavah Likar in sod. (2010) in Vogel-Mikuš in sod. (2005) so koncentracije Pb žerjavske populacije presegale mejo hiperakumulacije. Vrednosti BAF in TF so manjše od 1, kar pomeni, da se pri obeh populacijah višje koncentracije Pb kopičijo v koreninah glede na poganjke. To je pričakovano zaradi slabe mobilnosti Pb (Barcelo in Postschreider, 1990; Peer, 2005;). Zaradi česar lahko obe populaciji uvrstimo med izključevalce Pb (Gosh in Singh, 2005; Vogel-Mikuš in sod., 2005; Van der Ent in sod., 2013).

5.6.3.2 Vpliv deleža onesnaženja na koncentracije Pb v rastlinah.

Z večanjem deleža onesnaženja se tako kot pri Cd in Zn tudi koncentracije Pb v koreninah in poganjkih povečujejo. Saj se z večjo koncentracijo v tleh zaradi večje konkurence na vezavna mesta Pb lažje privzema v rastlino (Gosh in Singh, 2005).

5.6.3.3 Vpliv populacije na koncentracijo Pb v rastlinah

Kljub vsemu pa se populaciji med seboj razlikujeta po akumulaciji Pb. In sicer, korenine zaplanske populacije kopičijo večje koncentracije Pb kot korenine žerjavske populacije (Preglednica 21). Statistično značilno se je to pokazalo znotraj izpostavitve s 25 % in 50 % onesnaženjem substrata. Žerjavsko populacija pa glede na zaplansko populacijo akumulira večje koncentracije Pb v poganjkih. Statistično značilna razlika je vidna pri kontroli in 100 % onesnaženju. Iz česar lahko razberemo, da je zaplanska populacija boljša pri privzemu Pb iz tal v korenine, vendar pa ima slabše razvit transport v nadzemne dele. V obeh primerih pa se še vedno večje koncentracije Pb nahajajo v koreninah, zaradi njegove slabe mobilnosti (Blasberg Phálsson, 1989). Bolje razvit transport Pb v poganjke pri žerjavski populaciji nam potrjuje tudi višje vrednosti TF, v primerjavi z zaplansko (Preglednica 15). Rastline žerjavske populacije izhajajo iz okolja, onesnaženega s Pb. Glede na to, da ne pridobivajo vase Pb samo iz tal, ampak tudi iz zraka (prašni delci) (Likar in sod., 2010), so verjetno bolj prilagojene na višje koncentracije Pb v poganjkih. Torej lahko iz TF sklepamo, da ima žerjavsko populacijo boljšo sposobnost transporta Pb v nadzemne dele in boljše mehanizme razstrupljanja od zaplanske populacije.

Iz vsega skupaj lahko sklepamo, da je sposobnost hiperakumulacije Cd, Zn in akumulacije Pb *N. preacox* zelo variabilna in odvisna od posamezne rastline in njenega genoma.

5.6.4 Kalij

5.6.4.1 Vpliv koncentracije Cd, Pb in Zn v substratu na koncentracijo K v rastlini

Pri žerjavski populaciji povišanje deleža onesnaženja sicer nima statistično značilnih vplivov na koncentracijo K v koreninah, je pa viden trend upadanja. Upadanje K pa je statistično značilno za korenine zaplanske populacije. Po vsej verjetnosti je to le odraz vsebnosti K v ravnem substratu, saj je iz Slike 37 in Preglednic 1, 2 razvidno, da se koncentracija K v substratu s povečanjem onesnaženja pri obeh populacijah zmanjšuje.

Pri poganjkih zaplanske populacije prihaja do naraščanja K z naraščanjem deleža onesnaženja s substratom, kar pomeni, da so rastline poskrbele za normalen potek

fotosinteze in vodnega potenciala v poganjkih (Marschner, 1986), lahko tudi na račun korenin. Podobno, kot pri vzdrževanju koncentracije fotosinteznih pigmentov, kljub večanju onesnaženja substrata. Povprečne vrednosti za TF pri zaplanski populaciji z večanjem deleža onesnaženja substrata naraščajo, kar pomeni, da se večja translokacija K iz korenin v poganjke. Sicer tudi BAF narašča z deležem onesnaženja, kar je pričakovano, saj koncentracija K v zemlji upada, potrebe rastline pa so enake (Van der Ent in sod., 2013). Naraščanje TF in BAF je značilno tudi za žerjavsko populacijo, a zanimivo, koncentracija K z onesnaženjem do izpostavitve 50 % onesnaženja narašča, potem pa z nadaljnjim povečanjem onesnaženosti zopet upade. To je lahko zopet posledica zmanjšane koncentracije K v substratu ali pa je posledica vezave Cd, Pb ali Zn na prenašalce za K, kar zmanjša prenos K v poganjke (Sergin in Ivanov, 2001).

5.6.4.2 Vpliv populacije na koncentracijo K v rastlini

Populaciji se po koncentraciji K v koreninah in poganjkih med seboj ne razlikujeta. Kar pomeni, da imata obe enako dobro razvite mehanizme privzema K iz tal in transporta po rastlini. Populaciji med seboj znotraj istih izpostavitvev lahko primerjamo, saj so koncentracije K po izpostavitvah podobne (Slika 37).

Najvišje koncentracije K v poganjkih dosegajo rastline žerjavske populacije znotraj 50 % izpostavitve, ki so statistično večje od zaplanske populacije iste izpostavitve. Večje koncentracije K pospešijo fotosintezo, saj K sodeluje pri fiksaciji CO₂ (Marschner, 1986). Iz česar lahko razložimo povečanje nastankov sladkorjev znotraj substrata s 25 % onesnaženjem pri žerjavski populaciji, s padcem koncentracije K v poganjkih je prišlo do ponovnega upada škroba, saj je pomemben pri regulatornih encimih metabolizma COH (Marschner, 1986).

5.6.5 Kalcij

5.6.5.1 Vpliv koncentracije Cd, Pb in Zn v substratu ter populacije na koncentracijo Ca v rastlini

Večje koncentracije Ca se nahajajo znotraj poganjkov v primerjavi s koreninami. Kljub temu, da je koncentracija Ca v tleh pred poskusom naraščala z deležem onesnaženja (Preglednica 1 in 2), se koncentracija Ca znotraj rastlin z naraščanjem deleža onesnaženja substrata ni spreminjala (Priloga A2, A3). Prav tako ni nobenih statistično značilnih razlik med populacijama. Iz tega bi lahko razbrali, da onesnaženje zaenkrat še ni bilo tako močno, da bi se rastlina branila s povečano koncentracijo Ca v kloroplastih (Küpper in Kochain, 2010). Razlik med populacijama ni, je pa značilen večji TF za žerjasko populacijo, kar lahko kaže že na začetek obrambe (Preglednica 21).

5.6.6 Mangan

5.6.6.1 Vpliv koncentracije Cd, Pb in Zn na koncentracijo Mn v rastlini

Če primerjamo koncentracije Mn v koreninah pri obeh populacijah, vidimo, da so žerjavske rastline kopičile statistično značilno največje koncentracije Mn v koreninah kontrolnih rastlin. Ostale izpostavitve se med seboj niso razlikovale. To lahko razložimo z vsebnostjo Mn v tleh, saj lahko iz barvnega diagrama (Slika 37) razberemo večje koncentracije Mn v kontrolnem substratu, kljub temu, da to ni statistično značilno (Preglednica 1 in 2).

Prav tako je opazen trend upada koncentracije Mn v poganjkih žerjavske populacije z naraščanjem deleža onesnaženja. To lahko zopet razložimo z upadom Mn v substratu (Slika 37). Lahko bi do upada prišlo tudi zaradi tekmovanja Mn in enega ali vseh TK (Cd, Pb in Zn) za vezavna mesta na prenašalce za Mn (Küpper in Kochain, 2010), kar vodi do upada koncentracije Mn v koreninah in poganjkih.

5.6.6.2 Vpliv populacije na koncentracijo Mn v rastlini

Populaciji se med seboj močno razlikujeta po tem, kje kopičita večje koncentracije Mn. Pri žerjavski populaciji je opazno, da se nekaj večje koncentracije Mn nahajajo v poganjkih rastline v primerjavi s koreninami. Medtem, ko je pri zaplanski populaciji opazno drugače, in sicer so večje koncentracije Mn v koreninah kot v poganjkih. To nam potrdijo tudi TF, ki so statistično značilno večji za žerjavsko populacijo v primerjavi z zaplansko. Tudi iz grafov za korenine je razvidno, da zaplanska populacija kopiči večje koncentracije Mn od žerjavske. Ravno obratno pa žerjavsko populacijo kopiči večje koncentracije Mn v poganjkih. Povprečne vrednosti BAF kažejo tudi na boljši privzem Mn iz tal pri žerjavski populaciji (Preglednica 14, 21).

Torej ima žerjavsko populacijo bolj razvite mehanizme privzema Mn iz zemlje in tudi boljši transport tega v poganjke. To ji omogoča vzdrževanje stopnje fotosinteze, saj je Mn zelo pomemben za njen potek (Marschner, 1986) in produkcijo sladkorjev. Zaplanska populacija pa večji del Mn, ki ga privzame vase, zadrži v koreninskem sistemu. To je lahko posledica slabše prilagoditve na onesnaženje s TK. Transport v poganjke je lahko omejen zaradi tekmovanja Cd, Pb in Zn za vezavna mesta na prenašalce za Mn, kar povzroči kopičenje Mn v koreninah. Upad sladkorjev je lahko tudi posledica zmanjšanja fotosinteze zaradi pomanjkanja Mn (Blasberg Phálsson, 1989; Sergin in Ivanov, 2001) v poganjkih in s tem vpliva na sintezo sladkorjev. Žerjavsko populacijo je lahko razvila boljši privzem in transport v rastlino zaradi stalnega tekmovanja Cd, Pb in Zn za prenašalce Mn. Lahko, da se Cd, Pb in Zn privzemajo in transportirajo po žerjavskem ekotipu preko prenašalcev za druge elemente (npr. Fe), ali pa je ta ekotip razvil nek nov mehanizem privzema, tako kot pri *N. caerulescens* Ganges (Pongrac in sod., 2009a).

Razlika med populacijama je lahko tudi posledica različnih koncentracij Mn v tleh, saj za razliko od ostalih elementov, ki so si znotraj enakih izpostavitve dokaj podobni, se koncentracije Mn v substratu med populacijama bolj razlikujejo (Slika 37). Pri nizki (0 % izpostavitve) in visoki (75 % in 100 % izpostavitve) koncentraciji Cd, Pb in Zn je koncentracija Mn večja v substratu žerjavske populacije. V primeru srednje onesnaženosti (25 % in 50 % izpostavitve) pa je za rahlo večja pri zaplanski populaciji. Vendar so kljub

vsemu koncentracije Mn v poganjkih še vedno večje za žerjavsko populacijo, zaradi česar lahko trdimo, da je prenos Mn v poganjke bolj uspešen za žerjavsko populacijo.

5.6.7 **Železo**

5.6.7.1 Vpliv koncentracije Cd, Pb in Zn v substratu na koncentracijo Fe v rastlini

Z naraščanjem deleža onesnaženja v substratu je opazen trend upadanja koncentracije Fe v koreninah in poganjkih, kar je lahko posledica upadanja same koncentracije Fe v substratu (Slika 37; Preglednica 1, 2). Pri obeh populacijah *N. preacox* se kopiči večji delež koncentracije v rastlino privzetega Fe v koreninah. Kar lahko kaže na prenos Cd, Pb in Zn v poganjke preko Fe prenašalcev (Küpper in Kochain, 2010). Zaradi tega Fe ostane v koreninah.

Pri koreninah zaplanske populacije je opazen trend upadanja koncentracije Fe z naraščanjem deleža onesnaženja substrata. Pri žerjavski populaciji pride do začetnega porasta koncentracije Fe (25 %, 50 %, 75 %), nato pri popolnoma onesnaženem substratu (100 %) pa do ponovnega upada. Do upada lahko pride zaradi nižje vsebnosti Fe v substratu (Preglednica 1 in 2), lahko pa je posledica povečane koncentracije Cd in Pb ter tekmovanja za železove prenašalce (Küpper in Kochain, 2010), saj nam TF pokaže, da pride do nenadnega poskoka translokacije teh dveh elementov (Preglednica 15).

Znotraj poganjkov je opazen trend upadanja koncentracije Fe z večanjem onesnaženja substrata. Pri žerjavski populaciji je upad statistično značilen. Znotraj zaplanske populacije pa je zaradi majhnega vzorca in velikih napak trend upadanja samo nakazan. Predvsem pri substratih s 50 %, 75 % in še posebej 100 % onesnaženjem je to lahko posledica zmanjšanja koncentracije Fe v substratu (Preglednica 1 in 2). Verjetno pa ima na to vpliv tudi vezava Cd in Pb na prenašalce za Fe. Pričakovali bi, da se upad Fe predvsem pri rastlinah s popolnim deležem onesnaženosti substrata kaže tudi v upadu klorofila, vendar to ni bilo tako. Kar pomeni, da je lahko prišlo do zamenjave Fe v hemu klorofila z enim izmed TK (Küpper in sod., 1998). Ali pa upad Fe ni bil zadosten, da bi to predstavljalo motnjo za fotosintezo.

5.6.7.2 Vpliv populacije na koncentracijo Fe v rastlini

Bioakumulacijski faktor kaže na boljši privzem Fe v rastlino pri zaplanski populaciji v primerjavi z žerjavsko. Kar se izrazi tudi pri sami primerjavi koncentracij Fe v koreninah (Preglednica 21). Statistično značilno vsebujejo korenine zaplanske populacije večje koncentracije Fe od žerjavske populacije (substrat z 0 %, 25 % in 50 % onesnaženjem). TF pa je v vseh primerih večji pri žerjavski populaciji. Zaradi tega se koncentraciji Fe v poganjkih rastlin znotraj posameznega substrata med populacijama ne razlikujeta. Glede na to lahko trdimo, da je dala žerjavaska populacija večji poudarek na boljši transport Fe iz korenin v poganjke in se s tem prilagodila na stres s strani TK. Kljub manjšemu privzemu Fe iz tal še vedno zagotavlja zadostno koncentracijo Fe v poganjkih, kjer je nujno potreben za normalno delovanje fotosinteze in sinteze klorofila (Marschner, 1986; Balsberg Páhlsson, 1989; Seregin in Ivanov, 2001; Pongrac in sod., 2009). Zaplanska populacija pa vloži več energije v boljši privzem Fe iz tal, s čemer tudi, vsaj v našem primeru, zagotovi zadostne koncentracije Fe za normalno sintezo klorofila.

6 SKLEPI

- Sveža in suha biomasa rastlin sta naraščali s povišanjem onesnaženja substrata vse do 100 % onesnaženega substrata, kjer pri zaplanski populaciji nastopi značilen upad biomase. Pri žerjavski populaciji upad biomase ni statistično značilen, kar potrjuje boljšo toleranco za povišane koncentracije Cd, Pb in Zn v substratu. Suha biomasa poganjkov je večja pri zaplanskem ekotipu.
- Delež onesnaženja ni imel vpliva na delež vode pri rastlinah žerjavskega ekotipa in pri poganjkih zaplanske populacije iz ostalih substratov. Pri koreninah zaplanske populacije pa se je delež vode višal z višanjem onesnaženja substrata. Znotraj izpostavitve je žerjavka populacija vsebovala večji delež vode od zaplanske.
- Koncentracija klorofila a in b se z naraščanjem deleža onesnaženja v poganjkih obeh populacij ni spreminjala. Nižja je bila le pri kontrolnih rastlinah zaplanske populacije, kar je verjetno odraz pomanjkanja Zn v substratu.
- Delež onesnaženja substrata ni imel večjega vpliva na vsebnost škroba v poganjkih žerjavske populacije. Vsebnost škroba je upadla le pri popolno onesnaženem substratu glede na poganjke iz substrata s 25 % onesnaženjem, kar kaže na to, da so koncentracije Cd, Pb in Zn prekoračile sposobnost razstrupljevalnih mehanizmov. Pri zaplanski populaciji pride do skokovitega porasta škroba v poganjkih iz substrata s 50 % onesnaženjem. Z višanjem deleža onesnaženja vsebnost škroba postopoma upada.
- FTIR-ATR analiza je pokazala povišanje produkcije pektina in lignina z naraščanjem deleža onesnaženja. Porast teh dveh nastopi hitreje pri žerjavski populaciji, kar kaže na bolj odziven obrambni sistem pred TK.
- Z naraščanjem deleža onesnaženja substrata so naraščale koncentracije Cd, Zn in Pb v rastlinah.
- Obe populaciji ranega mošnjaka sta se izkazali za uspešna hiperakumulatorja Cd. Kljub temu, da veljata za hiperakumulatorja Zn, nista presegli mejne koncentracije, določene za njegovo hiperakumulacijo, zadostili pa sta mejam, določenim za TF in BAF. Zaplanska populacija je kopičila večje koncentracije Zn v koreninah. Glede na akumulacijo Pb obe populaciji izključujeta Pb, saj so vsi TF in BAF >1.

- Žerjavsko populacija ima višjo sposobnost prenosa Pb v iz korenin v poganjke, saj je znotraj iste onesnaženosti (100 %) kopičila večje koncentracije Pb. Zaplanska populacija pa je vsebovala večje koncentracije v koreninah (25 %, 50 %).
- Kar se tiče vpliva deleža onesnaženja na privzem esencialnih elementov (K, Ca, Mn in Fe), ne moremo podati realnih ugotovitev, saj so se njihove koncentracije po izpostavitvah preveč razlikovale. Z deležem onesnaženja je v substratu upadala koncentracija K in Fe v tleh, medtem ko je vsebnost Ca naraščala.
- Pri privzemu in prenosu Mn po rastlini je žerjavsko populacija v primerjavi z zaplansko kopičila večje koncentracije Mn v poganjkih, ravno obratno pa se je izkazalo za koncentracije Mn v koreninah. Kar pomeni, da je prenos Mn v poganjke boljši za žerjavsko populacijo.
- Fe se znotraj obeh populacij v večji meri kopiči v koreninskem sistemu. Kljub temu je značilna večja koncentracija v koreninah za zaplansko populacijo. Prav tako je večji BAF značilen za zaplansko populacijo, medtem ko TF za žerjavsko.

7 POVZETEK

Namen diplomskega dela je bil vzgojiti in primerjati dve različni populaciji hiperakumulacijske vrste ranega mošnjaka (*Nocca (Thlaspi) preacox* Wulfen), eno iz s težkimi kovinami (Pb, Zn, Cd) onesnaženega območja v Žerjavu in drugo iz neonesnaženega območja na Zaplani. Zanimal nas je odziv rastlin obeh populacij na rast v istem substratu. Opazovali smo njune biokemijske in morfološke spremembe pod vplivom različnih koncentracij TK (Cd, Zn in Pb) v tleh in kako so te vplivale na mineralno sestavo, biomaso, tvorbo klorofila in vsebnost sladkorjev v rastlinah obeh populacij. Semena smo posejali na substrat, pripravljen z mešanjem žerjavske in zaplanske prsti v različnih razmerjih, tako da smo dobili 5 izpostavitvev: 0 %, 25 %, 50 %, 75 % in 100 % onesnažene žerjavske prsti z naraščajočimi koncentracijami Cd, Pb in Zn.

S tehtanjem smo določili svežo in suho biomaso, ki naraščata z večanjem izpostavljenosti vse do vključno izpostavitve 75 %. Pri izpostavitvi 100 % pride do upada biomase. To kaže na spodbujajoče delovanje nižjih koncentracij Zn, Cd in Pb na rast rastlin, ali pa je produkcija biomase posledica obrambnega odziva hormoneze, kjer rastlina s povečanjem volumna zmanjša koncentracijo onesnažila in njegovih strupenih učinkov. To potrjuje tudi porast vsebnosti vode v rastlinah z večanjem deleža onesnaženja. Koncentracija klorofila a pri žerjavski populaciji se po izpostavitvah ne spreminja, prav tako tudi koncentracija klorofila b za obe populaciji. Koncentracija klorofila a zaplanske populacije in karotenoidov je naraščala z večanjem deleža onesnaženja substrata.

Vsebnost sladkorjev v poganjkih smo določili z metodama FTIR-ATR in AACC 76.13. Slednja nam je omogočila meritev škroba, prva pa poleg škroba še koncentracijo strukturnih ogljikovih hidratov in lignina. Pri zaplanski populaciji je pri poganjkih izpostavitvev 50 % in 75 % prišlo do kopičenja škroba, pri izpostavitvi 100 % pa je vsebnost upadla. Pri žerjavski populaciji je bil viden trend upada škroba v poganjkih s povečanjem izpostavitve, kar kaže na vpliv TK na inhibicijo nove produkcije sladkorjev, medtem ko poraba še poteka. FTIR-ATR analiza je pokazala povišanje produkcije pektina in lignina z naraščanjem deleža onesnaženja. Pektin je zelo pomemben O-ligand za vezavo Cd. Lignin pa poveča lignifikacijo epidermisa in zmanjša prehod TK iz manj aktivnih

rastlinskih tkiv v bolj aktivna. Porast teh dveh nastopi hitreje pri žerjavski populaciji, kar kaže na bolj odziven obrambni sistem pred TK.

Z metodo XRF smo izmerili elementno sestavo rastlinskega materiala in rastnega substrata. Substrati se z naraščanjem deleža onesnaženja niso razlikovali le po koncentraciji TK, ampak tudi po ostalih esencialnih elementih. Kar onemogoči verodostojno opazovanje vpliva Cd, Pb in Zn na privzem ostalih elementov v rastlino. Substrati znotraj iste izpostavitve so si podobni, kar omogoča primerjavo privzema esencialnih elementov v rastlino med populacijama.

Obe populaciji sta uspešna hiperakumulatorja Cd in izključevalca Pb. Žerjavska populacija ima sposobnost kopičenja večjih koncentracij Pb v poganjkih. TF za Pb so bili večji za žerjavsko, a so bili pri obeh populacijah manjši od 1. Koncentracije Zn v poganjkih večinoma niso presegle hiperakumulacijske meje. Še vedno pa sta obe populaciji kopičili večje koncentracije Zn v poganjkih. Korenine zaplanske populacije so kopičile večje koncentracije Zn, njihov TF pa je bil manjši od žerjavske, kar kaže na izključevanje.

Žerjavska populacija je kopičila večje koncentracije Mn v poganjkih, medtem ko zaplanska mnogo večje koncentracije Mn v koreninah. Korenine zaplanske populacije so vsebovale tudi večje koncentracije Fe.

8 VIRI

- Adriano C.D. 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 2nd edition. New York, Springer-Verlag: 867 str.
- Apel K., Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signals transduction. Annual review of plant biology, 55: 373-399
- Assunção A.G.L., Schat H., Aarts M.G.M. 2003. *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. New phytologist, 159, 2: 351-360
- Balsberg Pålsson A.M. 1989. Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. Water, air and soil pollution, 47, 3: 287-319
- Barceló J., Poschenrieder Ch. 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review. Journal of plant nutrition, 13, 1: 1-37
- Batty L.C., Hallberg K.B. 2010. Ecology of industrial pollution. Cambridge, Cambridge University Press: 350 str.
- Baumbach H. 2012. Metallophytes and metalicolous vegetation: Evolutionary aspects, taxonomic changes and conservational status in central Europe. V: Perspectives on Nature Conservation – Patterns, Pressures and Prospects. Tiefenbacher J. (ur.). Rijeka, Bia: 94-118
- Benavides M.P., Gallego S.M., Tomaro M.L. 2005. Cadmium toxicity in plants. Brazilian journal of plant physiology, 17, 1: 21-34
- Bert V., Macnair M.R., De Laguerie P., Saumitou-Laprade P., Petit D. 2000. Zinc tolerance and accumulation in metalicolous and nonmetalicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). New Phytologist, 146, 2: 225-233
- Bhatia N.P., Baker A.J.M., Walsh K.B., Midmore D.J. 2005. A role for nickel in osmotic adjustment in drought-stressed plants of the nickel hyperaccumulator *Stackhousia tryonii* Bailey. Planta, 223, 1: 134-139
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annals of botany, 91, 2: 179-194
- Cunningham S.D. in Ow D.W. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. Plant physiology, 110, 3: 715-719
- Do Nascimento C.W.A., Xing B. 2006. Phytoextraction: A review on enhanced metal availability and plant accumulation. Scientia Agricola, 63, 3: 299-311

- Finžgar N., Leštan D. 2008. Ocena dostopnosti težkih kovin iz onesnaženih tal Mežiške doline. *Acta Agriculturae Slovenica*, 91, 1: 157-166
- Fourier transform infrared spectroscopy. Wikipedia (5. jun. 2016). https://en.wikipedia.org/wiki/Fourier_transform_infrared_spectroscopy (23. feb. 2016).
- Gallego S.M, Benavídes M.P., Tomaro M.L. 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involment of oxidative stress. *Plant science*, 121, 2: 151-159
- Gangl A.E. 1997. Ocena sistema za rentgensko fluorescenčno analizo. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 4-6
- Ghani A. 2010. Effect of lead toxicity on growth, chlorophyll and lead (Pb^{+}) contents of two varieties of maize (*Zea mays* L.). *Pakistan journal of nutrition*, 9, 9: 887-891
- Gosh M., Singh S.P. 2005. A Review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Asian Journal on Energy and Environment*. 6, 4: 214-131
- Grdadolnik J. 2002. ATR-FTIR spectroscopy: its advantages and limitations. *Acta Chimica Slovenica*, 49: 631-642
- Gustinčič M. Zaplana. Podnebje Zaplane. 2009. (30. jun. 2009) http://www.slometeo.net/zaplana/blog/?page_id=23 (15. jan. 2016)
- Hall J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of experimental botany*, 53, 366: 1-11
- Humphrey, G., Whitlock, R., Churchill, D. 1998. X-Ray Fluorescence Spectroscopy - The next generation of wear debris analysi. *Practicing Oil Analysis*. <http://www.machinerylubrication.com/Read/86/x-ray-fluorescence-spectroscopy> (3. mar. 2016)
- Introduction to Fourier Transform Infrared Spectroscopy. 2001. Thermo Nicolet. <http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf> (10. jul. 2016)
- Izhodišča za obravnavo problematike 'Nekatera onesnažena območja v Sloveniji in zdravje ljudi'. 2009. 87. seja. Ljubljana, Izvršni odbor za varstvo okolja Republike Slovenije: 7 str.
- Kambič M., Hrobat A. 2007. Spremljanje kontaminacije hidravličnih tekočin. Pogled v zakulisje – določanje vrste, količine in izvora kontaminantov. *Ventil* 13, 6: 414-418
- Kandeler E. 1995. Organic matter by wet combustion. V: *Methods in Soil Biology*. Schinner F., Kandeler E., Margesin R. (ur.). Berlin, Springer-Verlag: 397-398

- Kokovnik M. 2007. Strategije privzema Cd, Zn in Pb pri populacijah ranega mošnjaka (*Thlaspi praecox* Wulfen) z onesnaženega in neonesnaženega rastišča. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 65 str.
- Koren Š. 2013. Vpliv kadmija na mineralno prehrano in metabolizem ogljikovih hidratov pri ranem mošnjaku (*Thlaspi praecox* Wulf.). Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 133 str.
- Koren Š., Arčon I., Kump P., Nečemer M., Vogel-Mikuš K. 2013. Influence of CdCl₂ and Cd SO₄ supplementation on Cd distribution and ligand environment in leaves of the Cd hyperaccumulator *Noccaea (Thlaspi) praecox*. Plant and soil, 370, 1: 125-148
- Krzyszowska M. 2010. The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodelling and its role in defense strategy. Acta physiologiae plantarum, 33, 1: 35-51
- Küpper H., Küpper F., Spiller M. 1998. In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. Photosynthesis research, 58, 2: 123-133
- Küpper H., Kochain L.V. 2010. Transcriptional regulation of metal transport genes and mineral nutrition during acclimatization to cadmium and zinc in the Cd/Zn hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens* (Ganges population). New Phytologist, 185, 1: 114-129
- Lawrence E. 2005. Henderson's dictionary of biology. 13th edition. Essex, Pearson Education Limited: 748 str.
- Likar M., Pongrac P., Vogel-Mikuš K., Regvar M. 2010. Molecular diversity and metal accumulation of different *Thlaspi praecox* populations from Slovenia. Plant soil, 330, 1: 195-205
- Lombi E., Tearall K.L., Howarth J.R., Zhao F.J., Hawkesford M.J., McGarth S.P. 2002. Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Plant physiology, 128, 4: 1359-1367
- Manios T., Stentiford E.I. Millner P.A. 2003. The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typha latifolia* plants, growing in a substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferous water. Ecologica engineering, 20, 1: 65-74
- Marschner H. 1986. Mineral Nutrition of Higher Plants. 1th ed. Belfast, Academic press limited: 648 str.
- Marschner H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed. London, Academic press limited: 889 str.

- Meerts P., Duchêne Ph., Gruber W., Lefèbvre C. 2003. Metal accumulation and competitive ability in metallicolous and non-metallicolous *Thlaspi caerulescens* fed with different Zn salts. *Plant and soil*, 249, 1: 1-8
- Memon A.R., Schröder P. 2009. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environmental science and pollution research*, 16, 2: 162-175
- Mench M., Schwitzguébel J-P., Schroeder P., Bert V., Gawronski S., Gupta S. 2009. Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. *Environmental science and pollution research*, 16: 876-900
- Meyer C-L., Verbruggen N. 2012. The use of the model species *Arabidopsis halleri* towards phytoextraction of cadmium polluted soils. *New biotechnology*, 30, 1: 9-14
- Mistry, J. Review : ATR-IR Spectroscopy for the Coatings Industry. 2010. Missouri C & T Coatings Newsletter Volume 6 Issue 3, <http://coatings.mst.edu/v6i1/v6i3/> (3. mar. 2016).
- Mršić N. 1997. Živali naših tal: Uvod v pedozoologijo-sistematika in ekologija s splošnim pregledom talnih živali. 1. izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 416 str.
- Mummenhoff K., Zunk K. 1991. Should *Thlaspi* (*Brassicaceae*) be split? Preliminary evidence from isoelectric focusing analysis of Rubisco. *Taxon*, 40, 3: 427-434
- Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8, 3: 199-216
- Nečemer M., Kump P., Rajčević M., Jačimovič R., Budič B., Ponikvar M. 2003. Determination of sulphur and chlorine in fodder by X-ray Fluorescence spectral analysis and comparison with other analytical methods. *Spectrochimica Acta Part B* 58: 1367-1373
- Nečemer M., Kump P., Ščančar J., Jačimović R., Simčič J., Pelicon P., Budnar M., Jeran Z., Pongrac P., Regvar M., Vogel-Mikuš K. 2008. Application of X-ray fluorescence analytical techniques in phytoremediation and plant biology studies. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 63, 11: 1240-1247
- Nečemer M., Kump P., Šket P., Plavec J., Grdadolnik J., Žvanut M. 2013. A novel analytical technique suitable for the identification of plastics. *Acta Chimica Slovenica*, 60: 701-705
- Nishihara E., Kondo K., Parvez M.M., Takahashi K., Watanabe K., Tanaka K. 2003. Role of 5-aminolevulinic acid (ALA) on active oxygen-scavenging system in NaCl-treated spinach (*Spinacia oleracea*). *Journal of Plant physiology*, 160, 9: 1085-1091
- Öhlinger R. 1995. Acidity. V: *Methods in soil Biology*. Schinner F., Öhlinger R., Kandeler E., Margesin R., (ur.), Heidelberg, Springer-Verlag: 396 str.

- Öncel I., Kaleş Y., Üstün A.S. 2000. Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. *Environmental pollution*, 107, 3: 315-320
- Osredkar J. 2012. Oksidativni stres. *Zdravniški vestnik*, 81: 393-206
- Palmgren M.G., Clemens S., Williams L.E., Krämer U., Borg S., Schjørring J.K., Sanders D. 2008. Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. *Trends in plant science*, 13, 1: 464-473
- Peer W.A., Baxter I.R., Richards E.L., Freeman J.L., Murphy A.S. 2005. Phytoremediation and hyperaccumulator plants. V: *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification*. Tamás M.J. in Martinoia E. (ur.). Heidelberg, Bia: 299-340
- Perfus-Barbeoch L., Leonhardt N., Vavasseur A., Forestier C. 2002. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The plant journal*, 32, 4: 539-548
- Pongrac P., Brvar E., Regvar M. 2009a. Impact of simultaneous Cd and Zn substrate amendements on metal accumulation in two Cd/Zn hyperaccumulating *Thlaspi* species. *Acta biologica slovenica*, 52, 2: 61-71
- Pongrac P., Vogel-Mikuš K., Regvar M., Tolrá R., Poschenrieder C., Barceló 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
- Pongrac P., Zhao F-J., Razinger J., Zrimec A., Regvar M. 2009b. Physiological responses to Cd and Zn in two Cd/Zn hyperaccumulating *Thlaspi* species. *Environmental and experimental botany*, 66, 3: 479-486
- Prasad M.N.V., De Oliveira Freitas H.M. 2003. Metal hyperaccumulation in plants – Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6, 3: 285-321
- Rascio N., Navari-Izzo F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant science*, 180, 2: 169-181
- Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E. 2004. *Biology of plants*. 7th edition. New York, W.H. Freeman and company: 686 str.
- Reeves R.D. 2006. Hyperaccumulation of trace elements by plants. V: *Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils*. Morel J. - L. in sod. (ur.). Netherlands, Bia: 25-52
- Regvar M., Eichert D., Kaulich B., Gianoncelli A., Pongrac P., Vogel-Mikuš K. 2013. Biochemical characterization of cell types within leaves of metal-hyperaccumulating *Noctua praecox* (Brassicaceae). *Plant soil*, 373, 1: 157-171

- Regvar M., Vogel K., Irgel N., Wraber T., Hildebrandt U., Wilde P., Bothe H. 2003. Colonisation of pennycresses (*Thaspi* spp.) 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 successions at a metal polluted site: Indications for the direction of phytostabilisation? *Environmental Pollution*, 144, 3: 976-984
- Ricachenovski F.K., Menguer P.K., Sperotto R.A., Williams L.E., Fett J.P. 2013. Roles of plant metal tolerance proteins (MTP) in metal storage and potential use in biofortification strategies. *Frontiers in plant science*, 144, 4: 1-15
- Salt D.E., Blaylock M., Kumar N.P.B.A., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I., Raskin I. 1995. Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Nature Biotechnology*, 13: 468-474
- Schat H., Sharma S., Vooijs R. 1997. Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and notolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia plantarum*, 101, 3: 477-482
- Schnoor J.L., Licht L.A., McCutcheon S.C., Wolfe N.L., Carreira L.H. 1995. Phytoremediation of organic and nutrient contaminant Pilot and full-scale studies are demonstrating the promise and limitations of using vegetation for remediating hazardous wastes in soils and sediments. *Environmental science and technology*, 29, 7: 318-323
- Schützendübel A., Polle A. 2001. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of experimental botany* 53, 372: 1351-1365
- Seliškar A., Wraber T. 1986. Travniske rastline na Slovenskem: sto pogostih vrst. Ljubljana, Prešernova družba: 229 str.
- Seregin I.V., Ivanov V.B. 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian journal of plant physiology*, 48, 4: 523-544
- Sheoran V., Sheoran A.S., Poonia P. 2011. Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: A review. *Critical Reviews in environmental science and technology*, 41, 2: 168-214
- Sherameti I., Varma A. 2011. Detoxification of heavy metals. Heidelberg, Springer-Verlag: 447 str.
- Shukla U.C., Singh J., Joshi P.C, Kakkar P. 2003. Effect of bioaccumulation of cadmium on biomass productivity, essential trace elements, chlorophyll biosynthesis, and macromolecules of wheat seedlings. *Biological Trace Element research*, 92, 3: 257-273

- Siedlecka A., Krupa Z. 1999. Cd/Fe interaction in higher plants- its consequences for the photosynthetic apparatus. *Photosynthetica*, 36, 3: 321-331
- Sinclair S.A., Krämer U. 2012. The zinc homeostasis network of land plants. *Biochimica et biophysica acta*, 1823: 1553-1567
- Sun Y., Zhou Q., Wang L., Liu W. 2009. Cadmium tolerance and accumulation characteristics of *Bidens pilosa* L. as a potential Cd-hyperaccumulator. *Journal of hazardous materials*, 161, 2-3: 808-814
- Šajn R., Gosar M. 2004. Pregled nekaterih onesnaženih lokacij zaradi nekdanjega rudarjenja in metalurških dejavnosti v Sloveniji. *Geologija*, 47, 2: 249-258
- Taiz L., Zeiger E. 2006. *Plant physiology*. 4th edition. Sunderland Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.: 764 str.
- Tangahu B.V., Sheikh Abdullah S.R., Basri H., Idris M., Anuar N., Mukhlisin M. 2011. A review on heavy metal (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International journal of chemical engineering*, 2011: 1-31
- Tomšič B., Simončič B., Vince J., Orel B., Vilčnik A., Fir M., Šurca Vuk A., Jovanovski V. 2007. Uporaba ATR IR spektroskopije pri preučevanju strukturnih sprememb celuloznih vlaken. *Tekstilec*, 50, 1-3: 3-15
- Tucker M.P., Nguyen Q.A., Eddy F.P., Kadam K.L., Gedvilas L.M., Webb J.D. 2001. Fourier transform infrared quantitative analysis of shugars and lignin in pretreated softwood solid residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91-93: 51-61
- Van der Ent A., Baker A.J.M., Reeves R.D., Pollard A.J., Schat H. 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. *Plant soil*, 362, 1: 319-334
- Verbruggen N., Hermans C., Schat H. 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, 181, 4: 759-776
- Verma S., Dubey R.S. 2001. Effect of cadmium on soluble sugars and enzymes of their metabolism in rice. *Biologia planetarium*, 44, 1: 117-123
- Vidic T., Jogan N., Drobne D., Vilhar B. 2006. Natural revegetation in the vicinity of the former lead smelter in Žerjav, Slovenia. *Environmental science & technology*, 40, 13: 4119-4125
- Vidic T., Lah B., Berden-Zrimec M., Marinsek-Logar R. 2008. Bioassays for evaluating the water-extractable genotoxic and toxic potential of soils polluted by metal smelters. *Environmental toxicology*, 24, 5: 472-483

- Vogel-Mikuš K. 2006. Privzem Zn, Cd in Pb ter arbuskularna mikoriza pri Ranem mošnjaku *Thlaspi praecox* Wulfen (*Brassicaceae*). Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 124 str.
- Vogel-Mikuš K., Arčon I., Kump P., Pelicon P., Nečemer M., Vavpetič P., Koren Š., Regvar M. 2012. Analytical Tools for Exploring Metal Accumulation and Tolerance in Plants. V: Phytotechnologies: Remediation of Environmental Contaminants. Anjum N. A., Pereira M.E., Ahmad I., Duarte A.C. Umar S., Kahn N. A. (ur.) New York, CRS Press: 444-495
- Vogel-Mikuš K., Drobne D., Regvar M. 2005. Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (*Brassicaceae*) from the vicinity of a lead smelter in Slovenia. Environmental pollution, 133, 2: 233-242
- Vogel-Mikuš K., Pongrac P., Kump P., Nečemer M., Simčič J., Pelicon P., Budnar M., Povh B., Regvar M. 2006. Localisation and quantification of elements within seeds of Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi praecox* by micro-PIXE. Environmental pollution, 147, 1: 50-59
- Vogel-Mikuš K., Simčič J., Pelicon P., Budnar M., Kump P., Nečemer M., Mesjasz-Przybyłowicz J., Przybyłowicz W. J., Regvar M. 2008. Comparison of essential and non-essential element distribution in leaves of the Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi praecox* as revealed by micro-PIXE. Plant, Cell and Environment, 31, 10: 1484-1496
- Vreča P., Pirc S., Šajn R. 2001. Natural and anthropogenic influences on geochemistry of soils in terrains of barren and mineralized carbonate rocks in the Pb-Zn mining district of Mežica, Slovenia. Journal of Geochemical Exploration, 47: 99-108
- Vrhovšek D., Vovk Korže A. 2007. Ekoremediacije. Maribor, Filozofska fakulteta Maribor, Mednarodni center za ekoremediacije in Limnos d.o.o.: 128 str.
- Whiting S.N., Neumann P.M., Baker A.J.M. 2003. Nickel and zinc hyperaccumulation by *Alyssum murale* and *Thlaspi caerulescens* (*Brassicaceae*) do not enhance survival and whole-plant growth under drought stress. Plant, cell and environment, 26, 3: 351-360
- Whiting S.N., Reeves R.D., Richards D., Johnson M.S., Cooke J.A., Malaise F., Paton A., Smith J.A.C., Angle J.S., Chaney R.L., Ginocchio R., Jaffré T., Johns R., McIntyre T., Purvis O.W., Salt D.E., Schat H., Zhao F.J., Baker A.J.M. 2004. Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. Restoration ecology, 12, 1: 106-116
- Winter H., Huber S.C. 2000. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: Localization and regulation of activity of key enzymes. Critical reviews in plant science, 19, 1: 31-67
- X-ray Fluorescence. Oxford X-ray Fluorescence Ltd.
<http://oxford-labs.com/wp-content/uploads/2009/04/xrf-diag.jpg> (12. dec. 2014)

Yang X., Feng Y., He Z., Stoffella P.J. 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 18, 4: 339-353

Zengin F.K., Munzuroglu O. 2005. Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta biologica cracoviensia series botanica*, 47, 2: 157-164

Zhou W., Qiu B. 2005. Effects of cadmium hyperaccumulation on physiological characteristics of *Sedum alfredii* Hance (*Crassulaceae*). *Plant science*, 169, 4: 737-745

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem mentorici, prof. dr. Katarini Vogel-Mikuš, za vso strokovno pomoč, nasvete in vodenje pri nastajanju diplomskega dela.

Hvala recenzentki, prof. dr. Marjani Regvar, in predsednici komisije, doc. dr. Jasni Dolenc Koce.

Zahvaljujem se tudi dr. Marijanu Nečemru iz Inštituta Jožef Stefan za pomoč pri meritvah elementne sestave vzorcev z XRF metodo.

Hvala dr. Jožetu Grdadolniku iz Kemijskega inštituta za izvedbo meritev ogljikovih hidratov z metodo FTIR-ATR.

Za vso pomoč in nasvete se zahvaljujem dr. Špeli Koren. Mileni Kubelj hvala za pomoč pri laboratorijskem delu.

Za vlivanje poguma ter vso spodbudo in nasvete bi se rada zahvalila svojim prijateljicam Marti, Petri, Andreji, Ani in Mateji. Za pomoč pri razumevanju fizikalnega dela metod pa Tilnu in Črtu.

Najlepša hvala prijateljici Simoni za pomoč pri lektoriranju in oblikovanju besedila.

Posebna zahvala za vso podporo in spodbudo tekom mojega študija pa gre mojim staršem, mami Nuši in očetu Blažu ter starim staršem Vidi in Stanetu.

PRILOGE

PRILOGA A: Faktorska analiza in grafični prikaz koncentracije Ca (mg/kg) v poganjkih in koreninah

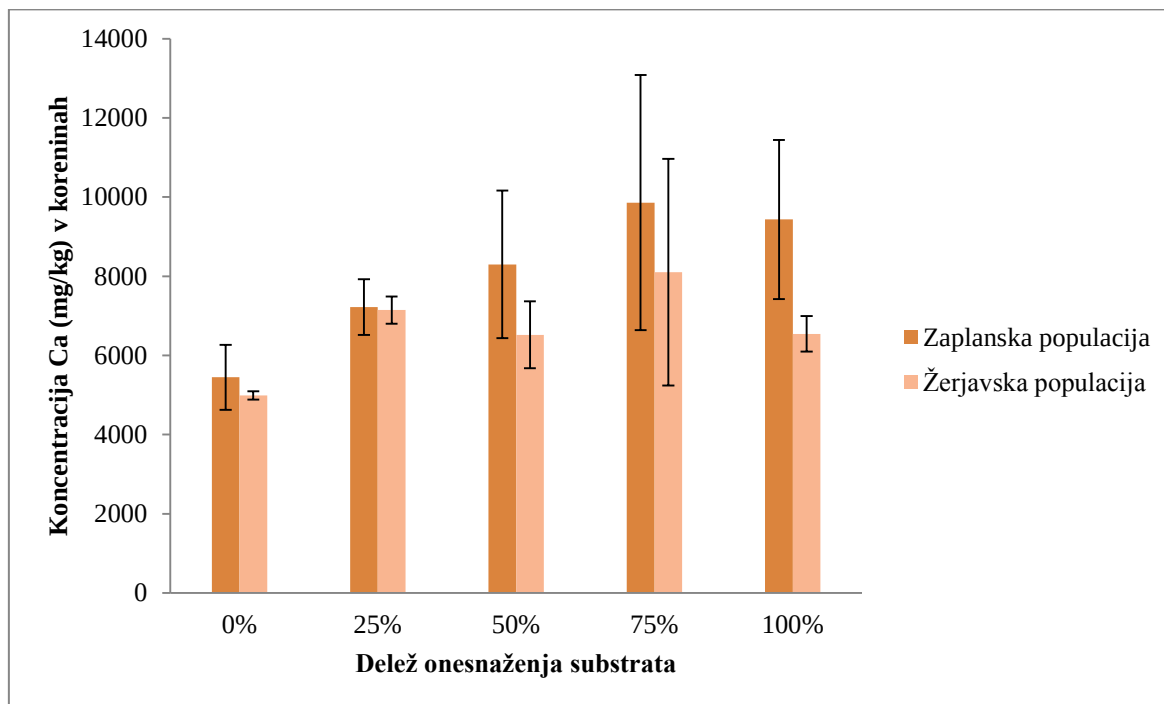
PRILOGA A 1: Faktorska analiza koncentracije Ca (mg/kg) rastlin

Preglednica: Prikaz faktorske analize koncentracije Ca (mg/kg) v koreninah in poganjkih pri različnih deležih onesnaženja substrata med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije, ki smo jo opravili s programom Statistica 7, faktorska ANOVA.

Koncentracija Ca (mg/kg) v koreninah					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija onesnažene zemlje (%)	4,015683E+07	4	1,003921E+07	1,3406	0,291341
Populacija	1,382720E+07	1	1,382720E+07	1,8465	0,190106
Koncentracija onesnažene zemlje (%)*Populacija	7,399730E+06	4	1,849932E+06	0,2470	0,907888
Error	1,422787E+08	19	7,488354E+06		

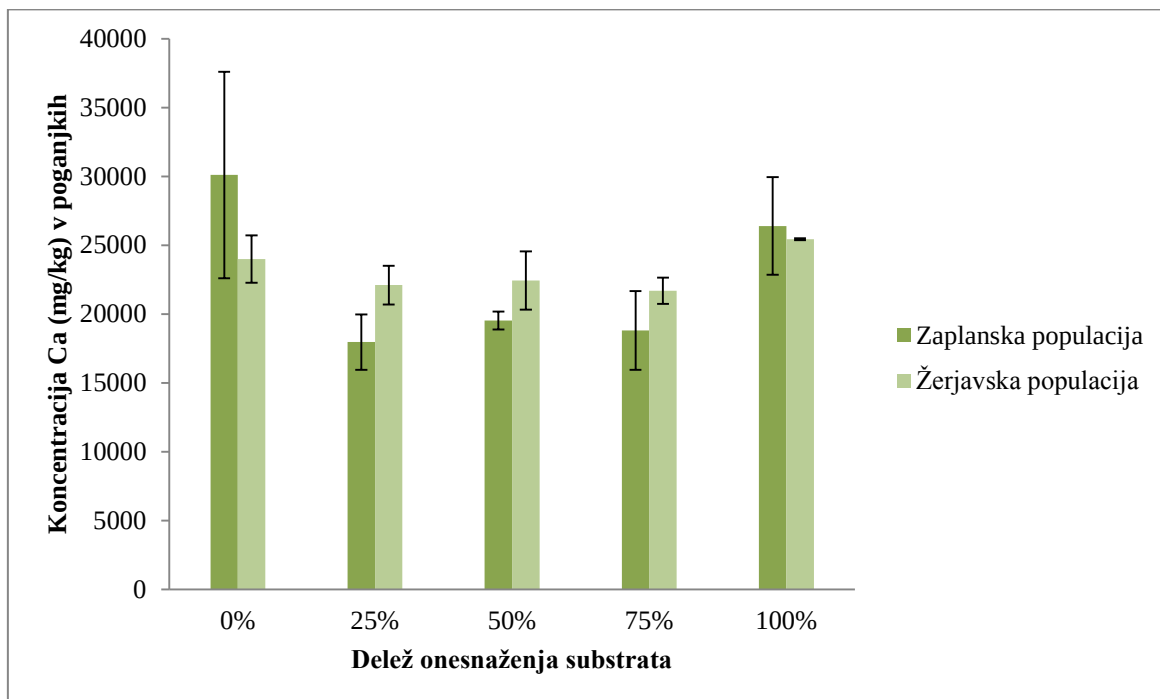
Koncentracija Ca (mg/kg) v poganjkih					
	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija onesnažene zemlje (%)	2,713347E+08	4	6,783367E+07	2,4641	0,078261
Populacija	2,465333E+06	1	2,465333E+06	0,0896	0,767834
Koncentracija onesnažene zemlje (%)*Populacija	1,056080E+08	4	2,640200E+07	0,9590	0,451306
Error	5,505867E+08	20	2,752933E+07		

PRILOGA A2: Koncentracije Ca (mg/kg) v koreninah



Slika: Primerjava koncentracij Ca (mg/kg) v koreninah rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med koncentracijami Ca v koreninah po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0.05$, $n=3$).

PRILOGA A3: Koncentracija Ca (mg/kg) v poganjkih



Slika: Primerjava koncentracij Ca (mg/kg) v poganjih rastlin ranega mošnjaka z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) območja, ki so bile izpostavljene različnim deležem onesnažene zemlje. Prikazana so povprečja $\pm$ se. Različne črke nad stolpci pomenijo statistično značilno razliko med koncentracijami Ca v poganjkih po izpostavitvah znotraj posamezne populacije (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$, $n=3$).

PRILOGA B: Faktorska analiza koncentracije Fe (mg/kg) v koreninah

Preglednica: Prikaz faktorske analize koncentracije Fe (mg/kg) v koreninah pri različnih deležih onesnaženja substrata med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije, ki smo jo opravili s programom Statistica 7, faktorska ANOVA.

	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija onesnažene zemlje (%)	394377	4	98594	2,5003	0,075125
Populacija	13611	1	13611	0,3452	0,563444
Koncentracija onesnažene zemlje (%)*Populacija	113828	4	28457	0,7216	0,587275
Error	788674	20	39434		

PRILOGA C: Faktorska analiza BAF za Cd

Preglednica: Prikaz faktorske analize BAF za Cd v koreninah pri različnih deležih onesnaženja substrata med rastlinami žerjavske in zaplanske populacije, ki smo jo opravili s programom Statistica 7, faktorska ANOVA.

	SS	Proste stopnje	MS	F	p
Koncentracija onesnažene zemlje (%)	1234,038	3	411,346	3,00336	0,061363
Populacija	600,781	1	600,781	4,38649	0,052499
Koncentracija onesnažene zemlje (%)*Populacija	1232,885	3	410,962	3,00056	0,061514
Error	2191,388	16	136,962		

PRILOGA D: Koncentracije elementov substrata in rastlinskega materiala ter koncentracije fotosinteznih pigmentov in sladkorjev

Preglednica: Zbrani izmerjeni podatki koncentracij elementov v rastlinskih organih in substratu ter klorofila in škroba v poganjkih obeh populacij.

				TLA								RASTLINA										RASTLINA																				
				ELEMENTI (mg/kg)						pH	Organska snov	MASA RASTLINSKEGA MATERIALA (g)				FS. PIGMENTI (mg/kg)				% škroba		ELAMENTI (mg/kg)						K (mg/kg)		Ca (mg/kg)		Mn (mg/kg)		Fe (mg/kg)		Zn (mg/kg)		Pb (mg/kg)		Cd (mg/kg)		
VZOREC	POP.	IZPOSTAV.	RAST. ORGAN	K	Ca	Mn	Fe	Zn	Pb	Cd	pH	Organska snov	Sveža masa	Suša masa	Masa vode	% vode (%)	Chl a	Chl b	Karotenoidi	na svežo maso	na suho maso	K	Ca	Mn	Fe	Zn	Pb	Cd	TF	BAF	TF	BAF	TF	BAF	TF	BAF	TF	BAF	TF	BAF	TF	BAF
0% Z A1	Zaplana	0%	poganjki	15800	6450	651	29800	108	95,1	1	7,06	2,03	2,109	0,515	1,594	75,58%	2,16	1,10	0,34	0,62	2,54	33800	25300	540	539	747	21,3	32,9	1,32	2,14	4,04	3,92	0,35	0,02	0,14	0,83	2,93	6,92	/	0,22	/	/
0% Z A2	Zaplana	0%	poganjki	15800	6450	651	29800	108	95,1	1	7,06	2,03	0,91	0,230	0,680	74,73%	1,21	0,68	0,18	0,42	1,68	24500	20200	243	248	478	28,1	np	1,00	1,55	4,36	3,13	0,26	0,01	0,05	0,38	1,70	4,43	0,54	0,30	0,00	/
0% Z B1	Zaplana	0%	poganjki	18400	7900	560	28900	71,1	83,5	1	7	2,316	1,121	0,418	0,703	62,71%	0,69	0,41	0,09	0,26	0,70	41900	44800	392	1320	703	26,4	22,1	/	2,28	/	5,67	/	0,01	/	2,36	/	9,89	/	0,32	/	
25% Z A1	Zaplana	25%	poganjki	17900	24800	714	30400	550	3960	19,6	7,27	2,204	6,628	1,814	4,814	72,63%	1,84	0,88	0,35	1,41	5,14	32500	17400	192	312	464	139	149	1,25	1,82	2,86	0,70	0,27	0,01	0,04	0,44	1,88	0,84	0,12	0,04	1,63	7,60
25% Z D1	Zaplana	25%	poganjki	12500	25900	916	31100	612	4240	20,2	7,3	3,12	7,4	1,369	6,031	81,50%	2,36	1,06	0,46	0,64	3,48	53800	14800	247	347	745	154	231	2,40	4,30	1,74	0,57	0,16	0,01	0,04	0,38	2,74	1,22	0,11	0,04	3,72	11,44
25% Z D2	Zaplana	25%	poganjki	12500	25900	916	31100	612	4240	20,2	7,35	2,405	9,767	1,839	7,928	81,17%	2,43	1,09	0,47	0,54	2,87	47400	21700	275	450	746	199	251	1,90	3,79	3,06	0,84	0,20	0,01	0,09	0,49	3,97	1,22	0,22	0,04	3,60	12,43
50% Z A1	Zaplana	50%	poganjki	15700	43300	593	28100	844	6790	20	7,32	2,865	8,574	1,849	6,725	78,43%	1,91	0,84	0,28	1,11	51,35	42800	20800	310	350	970	412	334	1,51	2,73	3,04	0,48	0,13	0,01	0,10	0,59	2,21	1,15	0,23	0,06	2,35	16,70
50% Z B1	Zaplana	50%	poganjki	11400	47700	696	27900	792	6910	29,3	7,29	2,55	13,552	2,436	11,116	82,02%	2,02	0,85	0,41	0,68	37,65	54300	19200	360	213	950	214	313	2,22	4,76	1,60	0,40	0,39	0,01	0,04	0,31	2,93	1,20	0,09	0,03	3,21	10,68
50% Z C3	Zaplana	50%	poganjki	7360	33100	597	28600	737	6700	30	7,35	2,94	11,31	2,076	9,234	81,64%	1,97	0,92	0,34	0,57	30,90	39800	18600	341	193	808	189	269	1,92	5,41	3,07	0,56	0,21	0,01	0,05	0,32	1,69	1,10	0,10	0,03	2,17	8,97
75% Z C1	Zaplana	75%	poganjki	9790	75700	581	25900	1270	10100	49,9	7,36	4,355	10,066	1,910	8,156	81,03%	2,45	1,10	0,49	0,37	19,39	46600	17400	213	171	1220	294	327	2,31	4,76	2,68	0,23	0,17	0,01	0,06	0,29	2,26	0,96	0,11	0,03	2,62	6,55
75% Z C2	Zaplana	75%	poganjki	9790	75700	581	25900	1270	10100	49,9	7,36	4,355	16,786	2,946	13,840	82,45%	2,21	0,99	0,46	0,52	2,97	57500	14700	167	413	1230	261	316	2,29	5,87	0,90	0,19	0,11	0,01	0,07	0,71	1,80	0,97	0,09	0,03	2,53	6,33
75% Z D2	Zaplana	75%	poganjki	8720	65000	660	25900	1220	10100	37,9	7,24	3,724	10,384	1,845	8,539	82,23%	1,86	0,83	0,33	0,55	31,11	47500	24300	365	479	1460	558	544	2,33	5,45	3,58	0,37	0,21	0,01	0,16	0,73	2,48	1,20	0,23	0,06	3,07	14,35
100% Z A1	Zaplana	100%	poganjki	6240	122000	412	21800	1800	16000	78,3	7,55	5,495	13,29	2,308	10,982	82,63%	1,92	0,88	0,29	0,18	10,36	54100	26700	631	124	1790	827	620	3,04	8,67	2,01	0,22	0,47	0,03	0,03	0,30	3,10	0,99	0,24	0,05	9,01	7,92
100% Z C1	Zaplana	100%	poganjki	6660	104000	651	22600	1870	16400	76,6	7,53	4,566	4,688	0,710	3,978	84,85%	1,82	0,95	0,28	0,08	5,53	70800	32400	751	268	3370	609	1410	3,61	10,63	3,84	0,31	0,53	0,03	0,18	0,41	6,93	1,80	0,22	0,04	8,87	18,41
100% Z C2	Zaplana	100%	poganjki	6660	104000	651	22600	1870	16400	76,6	7,34	5,631	6,856	1,344	5,512	80,40%	2,19	1,05	0,41	0,38	1,94	53700	20100	619	331	2000	533	712	3,44	8,06	3,06	0,19	0,42	0,03	0,19	0,51	4,12	1,07	0,21	0,03	7,87	9,30
0%ZA1K	Zaplana	0%	kornine	15800	6450	651	29800	108	95,1	1	7,06	2,03	0,272	0,122	0,150	55,1%						25600	6270	1530	3780	255	np	np														
0%ZA2K	Zaplana	0%	kornine	15800	6450	651	29800	108	95,1	1	7,06	2,03	0,141	0,069	0,072	51,1%						24400	4630	942	4960	282	52,4	24,9														
25%ZA1K	Zaplana	25%	kornine	17900	24800	714	30400	550	3960	19,6	7,27	2,204	0,642	0,277	0,365	56,9%						25900	6080	717	7700	247	1180	91,5														
25%ZD1K	Zaplana	25%	kornine	12500	25900	916	31100	612	4240	20,2	7,3	3,12	0,848	0,344	0,504	59,4%						22400	8510	1580	8170	272	1380	62,1														
25%ZD2K	Zaplana	25%	kornine	12500	25900	916	31100	612	4240	20,2	7,35	2,405	0,944	0,310	0,634	67,2%						25000	7080	1360	4830	188	924	69,7														
50%ZA1K	Zaplana	50%	kornine	15700	43300	593	28100	844	6790	20	7,32	2,865	0,838	0,285	0,553	66,0%						28300	6850	2480	3520	438	1830	142														
50%ZB1K	Zaplana	50%	kornine	11400	47700	696	27900	792	6910	29,3	7,29	2,55	1,258	0,393	0,865	68,8%						24500	12000	920	4990	324	2270	97,4														
50%ZC3K	Zaplana	50%	kornine	7360	33100	597	28600	737	6700	30	7,35	2,94	1,133	0,341	0,792	69,9%						20700	6050	1660	3840	477	1830	124														
75%ZC1K	Zaplana	75%	kornine	9790	75700	581	25900	1270	10100	49,9	7,36	4,355	0,903	0,246	0,657	72,8%						20200	6490	1220	2990	540	2760	125														
75%ZC2K	Zaplana	75%	kornine	9790	75700	581	25900	1270	10100	49,9	7,36	4,355	2,618	0,579	2,039	77,9%						25100	16300	1510	5860	684	3040	125														
75%ZD2K	Zaplana	75%	kornine	8720	65000	660	25900	1220	10100	37,9	7,24	3,724	1,196	0,254	0,942	78,8%						20400	6790	1700	2960	589	2380	177														
100%ZA1K	Zaplana	100%	kornine	6240	122000	412	21800	1800	16000	78,3	7,55	5,495	1,498	0,358	1,140	76,1%						17800	13300	1350	4670	577	3430	68,8														
100%ZC1K	Zaplana	100%	kornine	6660	104000	651	22600	1870	16400	76,6	7,53	4,566	0,662	0,141	0,521	78,7%						19600	8430	1420	1520	486	2820	159														
100%ZC2K	Zaplana	100%	kornine	6660	104000	651	22600	1870	16400	76,6	7,34	5,631	0,989	0,204	0,785	79,4%						15600	6570	1470	1750	486	2600	90,5														

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice: Zbrani izmerjeni podatki koncentracij elementov v rastlinskih organih in substratu ter klorofila in škroba v poganjkih obeh populacij.

VZOREC				TLA								RASTLINA								RASTLINA																						
				ELEMENTI (mg/kg)								pH	Organska snov	MASA RASTLINSKEGA MATERIALA (g)				FS. PIGMENTI (mg/kg)				% Skroba		ELAMENTI (mg/kg)								K (mg/kg)		Ca (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Cd (mg/kg)			
				K	Ca	Mn	Fe	Zn	Pb	Cd	Organska snov			Sveža masa	Suša masa	Masa vode	% vode (%)	Chl a	Chl b	Karotenoidi	na svežo maso	na suho maso	K	Ca	Mn	Fe	Zn	Pb	Cd	TF	BAF	TF	BAF	TF	BAF	TF	BAF	TF	BAF	TF	BAF	
0% X B2	Žerjav	0%	poganjki	16600	9170	841	31200	68,9	51,2	1	7,18	11,809	1,507	0,333	1,174	77,9%	2,46	1,30	0,40	0,25	3,19	31700	27400	907	455	892	np	21	1,39	1,91	5,64	2,99	1,87	1,08	0,35	0,01	6,42	12,95	0,00	0,00	/	/
0% X C4	Žerjav	0%	poganjki	12200	9180	989	35600	134	102	1	7,18	2,574	1,902	0,315	1,587	83,4%	3,42	1,54	0,32	0,53	3,23	32100	22700	701	324	546	np	15,1	1,19	2,63	4,61	2,47	0,76	0,71	0,32	0,01	3,66	4,07	/	0,00	/	/
0% X D1	Žerjav	0%	poganjki	12800	6110	821	27900	84	80,3	2,8	7,27	2,261	8,056	1,350	6,706	83,2%	3,03	1,46	0,44	0,53	3,19	36000	21900	781	612	703	16,4	np	1,20	2,81	4,22	3,58	0,86	0,95	0,58	0,02	4,88	8,37	/	0,20	0,00	0,00
25% X A2	Žerjav	25%	poganjki	13100	22000	723	28000	512	3840	142	7,35	1,937	31,525	3,687	27,838	88,3%	3,13	1,49	0,45	0,23	1,99	64700	23300	377	404	843	156	166	3,30	4,94	3,47	1,06	1,11	0,52	0,09	0,01	3,90	1,65	0,20	0,04	5,48	11,69
25% X B1	Žerjav	25%	poganjki	11900	20200	729	26000	458	3380	7,48	7,4	2,459	10,569	1,590	8,979	85,0%	2,92	1,45	0,41	0,76	5,03	52500	19300	651	237	1820	194	544	2,57	4,41	2,46	0,96	1,76	0,89	0,12	0,01	8,43	3,97	0,30	0,06	10,90	72,73
25% X B2	Žerjav	25%	poganjki	11900	20200	729	26000	458	3380	7,48	7,4	2,459	10,1	1,440	8,660	85,7%	2,91	1,48	0,42	0,47	3,32	59600	23700	765	421	1310	274	376	2,16	5,01	3,44	1,17	1,41	1,05	0,14	0,02	5,98	2,86	0,34	0,08	4,64	50,27
50% X A1	Žerjav	50%	poganjki	12000	47600	673	30300	967	7080	28,4	7,37	7,114	9,422	1,304	8,118	86,2%	3,11	1,53	0,50	0,50	3,60	70600	26200	450	338	898	212	265	3,21	5,88	3,90	0,55	1,81	0,67	0,22	0,01	3,44	0,93	0,18	0,03	4,27	9,33
50% X A2	Žerjav	50%	poganjki	12000	47600	673	30300	967	7080	28,4	7,37	7,114	8,539	1,168	7,371	86,3%	3,66	1,85	0,53	0,49	3,58	72400	22200	563	341	1930	231	648	2,87	6,03	2,82	0,47	1,13	0,84	0,12	0,01	3,80	2,00	0,19	0,03	5,94	22,82
50% X C1	Žerjav	50%	poganjki	10200	48400	554	28400	890	7000	20,4	7,42	3,269	12,543	1,584	10,959	87,4%	3,19	1,66	0,46	0,32	2,57	57700	18900	499	411	1260	173	465	3,12	5,66	3,80	0,39	1,05	0,90	0,19	0,01	3,88	1,42	0,14	0,02	5,70	22,79
75% X A1	Žerjav	75%	poganjki	6230	65800	597	26700	1380	11500	51,6	7,39	2,83	15,22	2,074	13,146	86,4%	3,00	1,52	0,52	0,52	3,85	53900	20100	489	252	982	588	403	2,85	8,65	3,84	0,31	1,26	0,82	0,10	0,01	2,28	0,71	0,32	0,05	4,15	7,81
75% X B1	Žerjav	75%	poganjki	8380	51000	629	24300	1100	9800	41,1	7,42	4,433	14,092	2,017	12,075	85,7%	4,10	2,07	0,74	0,34	2,37	52200	21600	505	218	1230	331	390	2,55	6,23	1,80	0,42	1,43	0,80	0,06	0,01	3,04	1,12	0,14	0,03	4,39	9,49
75% X D1	Žerjav	75%	poganjki	10000	72300	547	27800	1330	11300	49,9	7,34	3,414	15,664	2,150	13,514	86,3%	3,41	1,59	0,51	0,65	4,72	54800	23400	462	247	994	535	439	2,42	5,48	3,31	0,32	1,10	0,84	0,12	0,01	2,57	0,75	0,31	0,05	4,10	8,80
100% X C1	Žerjav	100%	poganjki	4660	96900	840	21600	1860	16400	65,7	7,66	4,807	13,967	1,918	12,049	86,3%	3,16	1,50	0,45	0,27	1,96	52400	25500	567	215	1700	2130	724	2,48	11,24	4,28	0,26	1,04	0,68	0,16	0,01	3,01	0,91	0,93	0,13	4,83	11,02
100% X C2	Žerjav	100%	poganjki	4660	96900	840	21600	1860	16400	65,7	7,66	6,07	11,167	1,441	9,726	87,1%	3,03	1,47	0,39	0,29	2,22	45900	25200	735	316	2180	1700	932	2,01	9,85	4,03	0,26	1,64	0,88	0,16	0,01	3,04	1,17	0,59	0,10	12,65	14,19
100% X D1	Žerjav	100%	poganjki	7650	100000	684	23400	1900	16800	61,7	7,68	5,053	14,464	1,717	12,747	88,1%	3,38	1,68	0,47	0,30	2,57	40100	25600	576	328	1580	1110	606	2,29	5,24	3,45	0,26	1,97	0,84	0,22	0,01	2,60	0,83	0,42	0,07	2,38	9,82
0%XB1K	Žerjav	0%	kornine	16600	9170	841	31200	68,9	51,2	1	7,18	11,809	0,18	0,087	0,093	51,7%						22800	4860	484	1290	139	23,2	np														
0%XC2K	Žerjav	0%	kornine	12200	9180	989	35600	134	102	1	7,18	2,574	0,304	0,085	0,219	72,0%						26900	4920	917	1010	149	np	np														
0%XD1	Žerjav	0%	kornine	12800	6110	821	27900	84	80,3	2,8	7,27	2,261	1,501	0,355	1,146	76,3%						29900	5190	911	1060	144	np	13,6														
25%XA2K	Žerjav	25%	kornine	13100	22000	723	28000	512	3840	142	7,35	1,937	3,85	0,715	3,135	81,4%						19600	6720	340	4370	216	770	30,3														
25%XB1K	Žerjav	25%	kornine	11900	20200	729	26000	458	3380	7,48	7,4	2,459	2,419	0,416	2,003	82,8%						20400	7830	369	2060	216	642	49,9														
25%XB2K	Žerjav	25%	kornine	11900	20200	729	26000	458	3380	7,48	7,4	2,459	2,738	0,405	2,333	85,2%						27600	6890	543	2920	219	811	81,1														
50%XA1K	Žerjav	50%	kornine	12000	47600	673	30300	967	7080	28,4	7,37	7,114	0,813	0,279	0,534	65,7%						22000	6710	249	1540	261	1150	62,1														
50%XA2K	Žerjav	50%	kornine	12000	47600	673	30300	967	7080	28,4	7,37	7,114	1,201	0,407	0,794	66,1%						25200	7880	497	2800	508	1230	109														
50%XC1K	Žerjav	50%	kornine	10200	48400	554	28400	890	7000	20,4	7,42	3,269	1,56	0,295	1,265	81,1%						18500	4970	474	2110	325	1200	81,6														
75%XA1K	Žerjav	75%	kornine	6230	65800	597	26700	1380	11500	51,6	7,39	2,83	1,57	0,270	1,300	82,8%						18900	5240	388	2420	431	1830	97														
75%XB1K	Žerjav	75%	kornine	8380	51000	629	24300	1100	9800	41,1	7,42	4,433	1,512	0,298	1,214	80,3%						20500	12000	352	3890	404	2390	88,9														
75%XD1K	Žerjav	75%	kornine	10000	72300	547	27800	1330	11300	49,9	7,34	3,414	1,944	0,321	1,623	83,5%						22600	7080	420	2030	387	1730	107														
100%XC1K	Žerjav	100%	kornine	4660	96900	840	21600	1860	16400	65,7	7,66	4,807	0,886	0,170	0,716	80,8%						21100	5960	545	1320	565	2280	150														
100%XC2K	Žerjav	100%	kornine	4660	96900	840	21600	1860	16400	65,7	7,68	6,07	1,661	0,240	1,421	85,6%						22800	6260	447	1970	716	2880	73,7														
100%XD1K	Žerjav	100%	kornine	7650	100000	684	23400	1900	16800	61,7	7,68	5,053	1,563	0,183	1,380	88,3%						17500	7420	293	1490	607	2620	255														

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Diana MARGUČ

**VPLIV KADMIJA, CINKA IN SVINCA NA PRIVZEM
MINERALNIH HRANIL IN SINTEZO ŠKROBA PRI
POPULACIJAH RANEGA MOŠNJAKA Z
ONESNAŽENEGA IN NEONESNAŽENEGA
RASTIŠČA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016