

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ STRUKTURNJE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Nataša DEBELJAK

**VPLIV SELENA NA PRIVZEM IN PORAZDELITEV  
ŽIVEGA SREBRA PRI KORUZI**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2.stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ STRUKTURNJE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Nataša DEBELJAK

**VPLIV SELENA NA PRIVZEM IN PORAZDELITEV ŽIVEGA  
SREBRA PRI KORUZI**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2.stopnja

**INFLUENCE OF SELENIUM ON UPTAKE AND DISTRIBUTION OF  
MERCURY IN CORN**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek Univerzitetnega študija 2. bolonjske stopnje Strukturna in funkcionalna biologija. Opravljeno je bilo na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Priprava materiala za meritve elementov v poganjkih in koreninah koruze je potekala na Inštitutu Jožefa Stefana ter na Kemijskem Inštitutu. Meritve koncentracije elementov v koreninah in poganjkih smo izvedli v Laboratoriju za analizno kemijo na Kemijskem Inštitutu v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje oziroma Senat oddelka je dne 21. 2. 2014 odobrila naslov magistrske naloge. Za mentorja magistrskega dela je bila imenovana prof. dr. Katarina Vogel-Mikuš, za recenzentko pa prof. dr. Marjana Regvar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Mateja GERM  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

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

Datum zagovora:

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 pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Nataša Debeljak

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 582.546.61:543(497.4)(043.2)=163.6
KG	selen/živo srebro/arbuskularna mikoriza/Idrija/onesnaženost tal/akumulacija v rastlinah/koruza/elementi
AV	DEBELJAK, Nataša, dipl. biologinja (UN)
SA	VOGEL-MIKUŠ, Katarina (mentorica)/REGVAR Marjana (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije
LI	2015
IN	VPLIV SELENA NA PRIVZEM IN PORAZDELITEV ŽIVEGA SREBRA PRI KORUZI
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XIII, 104 str., 29 sl., 20 pregl., 1 pril., 188 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Onesnaženje s Hg danes velja za globalen, razširjen in kroničen problem. Hg in njegove spojine so zelo strupene za organizme. Ker so rastline primarni vir hrane, preko njih prehaja Hg v prehranjevalno verigo, kar predstavlja tveganje za zdravje ljudi in živali. Bioakumulacija Hg ni neodvisen proces, ampak nanj vplivajo številne sinergistične in antagonistične reakcije z drugimi snovmi, ki so prisotne v sistemu zemlja-korenine. Eden pomembnejših je nedvomno selen (Se). Selen lahko ščiti živali pred strupenimi učinki Hg. Vpliv Se na strupenost Hg pri rastlinah pa je slabo raziskan. Splošno znano dejstvo je, da je mikoriza prisotna pri večini rastlin, ki rastejo v naravnih pogojih v tleh. Tudi mikorizne glice pomembno vplivajo tudi na privzem težkih kovin v rastline. Namenske naloge je ugotoviti vpliv listnega tretiranja s Se (v obliki selenata) na privzem in razporeditev Hg v tkivih in organih koruze ter vpliv arbuskularno mikorizne simbioze na rast rastlin v kombinaciji s Hg in Se. S spektrofotometrom smo določili vsebnost fotosinteznih pigmentov in lipidno peroksidacijo membran. Koncentracije Se in Hg smo določili s pomočjo masne spektrometrije z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS), koncentracije S pa s pomočjo atomsko emisijske spektrometrije z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-AES). Razporeditev Hg na tkivnem nivoju smo določili z lasersko ablacijo in ICP-MS. Največjo biomaso rastlin so imele inokulirane rastline. Rastline, tretirane s selenatom, so imele večjo biomaso poganjkov kot kontrolne rastline. V koreninah so bile koncentracije Hg višje kot v poganjkih. Vezikli so bili prisotni le v koreninah inokuliranih rastlin, v koreninah neinokuliranih rastlin, pa jih nismo opazili. Arbuskule smo opazili v koreninah inokuliranih rastlin in v neinokuliranih koreninah tretiranih s Hg.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

DN Du2  
DC UDC 582.546.61:543(497.4)(043.2)=163.6  
CX selenium/mercury/arbuscular mycorrhiza/Idrija/soil pollution/plants accumulation/corn/elements  
AU DEBELJAK, Nataša  
AA VOGEL-MIKUŠ Katarina (supervisor)/REGVAR Marjana (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology  
PY 2015  
TI INFLUENCE OF SELENIUM ON UPTAKE OF MERCURY IN CORN  
DT M. SC. Thesis (Master study programmes)  
NO XIII, 104 p., 20 tab., 29 fig., 1 ann., 188 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Mercury pollution is today considered to be a global, diffuse and chronic problem. Hg and its compounds are highly toxic for living organisms. Since plants are the primary source of food, Hg can be transferred into the food webs through them and poses the risk to animal and human health. Bioaccumulation of Hg is not an independent process but it is influenced by a number of synergetic and antagonistic reactions with other substances present in the soil-root system. One of the most important is selenium (Se). It is known that Se can protect animals against Hg toxicity. Influence of Se on Hg toxicity in plants is poorly understood. It is known that most plants growing under natural conditions in the soil have mycorrhizae. Mycorrhizal fungi have also a significant impact on the uptake of heavy metals in plants. The aim of the master thesis is to determine the effect of leaf treatment with Se (in the form of selenate) on the uptake and distribution of Hg in the tissue and organ level of corn, and to investigate the impact of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth in combination with Hg and Se. Contents of photosynthetic pigments and the levels of membrane lipids were determined photometrically. The concentrations of Hg and Se were determined with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The concentrations of S were determined with inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). Hg distribution on tissue level was determined by laser ablation ICP-MS. Inoculated plants had the highest biomass. Plants treated with selenate had higher shoot biomass when compared to control plants. Root Hg concentrations were higher than in shoots. Vesicles were present only in the roots of the inoculated plants and were not observed in non inoculated plants. Arbuscules were observed in the roots of inoculated plants and also in non inoculated plants treated with Hg.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b>	<b>XI</b>
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN RAZISKAVE	2
1.2 OSNOVNE HIPOTEZE	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 TEŽKE KOVINE	3
<b>2.1.1 Kaj so težke kovine?</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 Viri onesnaženja s Hg</b>	<b>3</b>
<b>2.1.3 Onesnaženo območje Idrija</b>	<b>4</b>
<b>2.1.4 Živo srebro</b>	<b>5</b>
2.1.4.1 Lastnosti in kemijske oblike živega srebra	5
2.1.4.2 Vpliv živega srebra na organizme in njegova strupenost	6
2.1.4.3 Privzem, transport in strupeni učinki živega srebra v rastlinah	7
<b>2.1.5 Selen</b>	<b>9</b>
2.1.5.1 Nahajanje selena	9
2.1.5.2 Lastnosti in kemijske oblike selenia	10
2.1.5.3 Vpliv selenia na organizme	10
<b>2.1.6 Glavni mehanizem obrambe pred strupenimi učinki težkih kovin</b>	<b>13</b>
<b>2.1.7 Interakcije Hg – Se</b>	<b>13</b>
<b>2.2 MIKORIZA</b>	<b>16</b>
<b>2.2.1 Arbuskularna mikoriza</b>	<b>16</b>
<b>2.2.2 Arbuskularna mikoriza in živo srebro</b>	<b>17</b>
<b>2.2.3 Arbuskularna mikoriza in selen</b>	<b>19</b>
<b>2.3 FITOREMEDIACIJA</b>	<b>20</b>
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	<b>21</b>
<b>3.1 PRIPRAVA SUBSTRATA</b>	<b>21</b>

3.2	KORUZA	22
3.3	PRIPRAVA SEMEN IN GOJENJE KORUZE	22
3.4	DOLOČANJE BIOMASE RASTLIN	23
3.5	LIPIDNA PEROXIDACIJA (MDA ANALIZA)	24
3.6	DOLOČANJE FOTOSINTEZNIH PIGMENTOV	25
3.7	DOLOČANJE STOPNJE KOLONIZACIJE Z ARBUSKULARNO MIKORIZNIMI GLIVAMI	26
3.8	DOLOČANJE VSEBNOSTI ELEMENTOV V POGANJKIH IN KORENINAH KORUZE	30
<b>3.8.1</b>	<b>Priprava vzorcev</b>	<b>30</b>
<b>3.8.2</b>	<b>Priprava standardov</b>	<b>31</b>
<b>3.8.3</b>	<b>Masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS)</b>	<b>33</b>
<b>3.8.4</b>	<b>Atomsko emisijska spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo ICP-AES)</b>	<b>33</b>
3.9	MAPIRANJE PORAZDELITVE Hg V KORENINAH RASTLIN	35
3.10	STATISTIČNA ANALIZA	36
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>37</b>
4.1	BIOMASA RASTLIN	37
<b>4.1.1</b>	<b>Poganjki</b>	<b>37</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Korenine</b>	<b>39</b>
4.2	ANALIZA FOTOSINTEZNIH PIGMENTOV	41
4.3	LIPIDNA PEROXIDACIJA	44
4.4	MIKORIZNA INOKULACIJA	47
4.5	KONCENTRACIJE ELEMENTOV V KORENINAH IN POGANJKIH KORUZE	51
<b>4.5.1</b>	<b>Koncentracije živega srebra</b>	<b>51</b>
4.5.1.1	Poganjki	51
4.5.1.2	Korenine	52
<b>4.5.2</b>	<b>Koncentracije selena</b>	<b>54</b>
4.5.2.1	Poganjki	54
4.5.2.2	Korenine	55
<b>4.5.3</b>	<b>Koncentracija žvepla</b>	<b>57</b>
4.5.3.1	Poganjki	57
4.5.3.2	Korenine	58

4.6	PREGLED STATISTIČNO ZNAČILNIH VPLIVOV	60
4.7	MAPIRANJE PORAZDELITVE Hg V KORENINAH RASTLIN	61
<b>5</b>	<b>DISKUSIJA</b>	<b>64</b>
5.1	SUHA MASA	64
5.2	ANALIZA FOTOSINTEZNIH PIGMENTOV	66
5.3	LIPIDNA PEROKSIDACIJA (MDA)	68
5.4	MIKORIZNA KOLONIZACIJA	70
5.5	KONCENTRACIJE ELEMENTOV	72
<b>5.5.1</b>	<b>Koncentracija živega srebra</b>	<b>72</b>
<b>5.5.2</b>	<b>Koncentracija selena</b>	<b>76</b>
<b>5.5.3</b>	<b>Koncentracije žvepla</b>	<b>79</b>
5.5.3.1	Vpliv koncentracije Se na privzem S	79
5.5.3.2	Vpliv koncentracije Hg na privzem S	79
5.5.3.3	Vpliv mikorize na privzem S	80
<b>6</b>	<b>SKLEPI</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>VIRI</b>	<b>86</b>
8.1	CITIRANI VIRI	86
8.2	DRUGI VIRI – VIRI SLIK	104

## KAZALO SLIK

Sl. 1: Kroženje živega srebra v okolju (povzeto po Wang, 2004: 7)	4
Sl. 2: Kroženje Se v agrosistemu (povzeto po Gissel-Nielsen, 1998: 103)	9
Sl. 3: Vezikli in arbuskuli	17
Sl. 4: Gojenje koruze v rastni komori	23
Sl. 5: Določanje fotosintezih pigmentov	25
Sl. 6: Lestvica za določevanje splošne stopnje mikorizne kolonizacije (po metodi Trouvelot in sod., 1986)	26
Sl. 7: Lestvica za določevanje gostote arbuskulov, veziklov in svitkov v mikoriznem delu korenine (po metodi Trouvelot in sod., 1986)	27
Sl. 8: Mikrovalovka MarsExpress	30
Sl. 9: Shema potovanja vzorca po napravi ICP-OES	33
Sl. 10: LA-ICP-MS	35
Sl. 11: Suha masa poganjkov koruze v različnih tretmajih	37
Sl. 12: Suha masa korenin koruze v različnih tretmajih	39
Sl. 13: Koncentracija klorofila <i>a</i> , klorofila <i>b</i> in karotenoidov v poganjkih v različnih tretmajih	42
Sl. 14: Koncentracija MDA v poganjkih v različnih tretmajih	45
Sl. 15: Koncentracija MDA v koreninah v različnih tretmajih	46
Sl. 16: Mikorizni parametri F % v koreninah v različnih tretmajih	47
Sl. 17: Mikorizni parametri V %, M %, A %, Mis % v koreninah v različnih tretmajih	48
Sl. 18: Fragment korenine z arbuskularno mikorizno kolonizacijo	48
Sl. 19: Fragment korenine z arbuskularno mikoriznimi glivami.	49
Sl. 20: Mikrosklerociji	49
Sl. 21: Glivni spori	50
Sl. 22: Koncentracija živega srebra v poganjkih v različnih tretmajih	51
Sl. 23: Koncentracija živega srebra v koreninah v različnih tretmajih	53
Sl. 24: Koncentracija selena v poganjkih v različnih tretmajih	54
Sl. 25: Koncentracija selena v koreninah v različnih tretmajih	56
Sl. 26: Koncentracija žvepla v poganjkih v različnih tretmajih	57
Sl. 27: Koncentracija žvepla v koreninah v različnih tretmajih	59
Sl. 28: Prečni prerez korenine z oznakami	61
Sl. 29: Mapa kopičenja Hg v korenini z oznakami	61

**KAZALO PREGLEDNIC**

Pregl. 1: Oznake tretmajev (n=3 za vsak tretma)	21
Pregl. 2: Arbuskularno mikorizni parametri in njihova razlaga	28
Pregl. 3: Priprava standardnih raztopin za Hg (IS- interni standard)	31
Pregl. 4: Priprava standardnih raztopin za Se	32
Pregl. 5: Priprava standardnih raztopin za P	32
Pregl. 6: Rezultati faktorske ANOVA za suho maso poganjkov	38
Pregl. 7: Rezultati faktorske ANOVA za suho maso korenin	39
Pregl. 8: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo klorofila <i>a</i>	42
Pregl. 9: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo klorofila <i>b</i>	43
Pregl. 10: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo karotenoidov	43
Pregl. 11: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo MDA v poganjkih	45
Pregl. 12: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo MDA v koreninah	46
Pregl. 13: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo živega srebra v poganjkih	52
Pregl. 14: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo živega srebra v korenin	53
Pregl. 15: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo selena v poganjkih	55
Pregl. 16: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo selena v koreninah	56
Pregl. 17: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo žvepla v poganjkih	57
Pregl. 18: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo žvepla v koreninah	59
Pregl. 19: Pregled statistično značilnih vplivov obravnavanih spremenljivk	60
Pregl. 20: Prečni prerezi korenin različnih tretmajev in razporeditev živega srebra v njih	62

**KAZALO PRILOG**

Priloga A

Stopnja kolonizacije z AM glivami

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

a	gostota arbuskulov v delu korenine z mikorizno inokulacijo
A	gostota arbuskulov v koreninskem sistemu
Ag	srebro
Al	aluminij
AM	arbuskularna mikoriza
As	arzen
BA	bakterijski izvleček
CaCl <sub>2</sub>	kalcijev diklorid
CaCO <sub>3</sub>	kalcijev karbonat
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sup>2</sup> x 7 H <sub>2</sub> O	kalcijev nitrat heptahidrat
Cd	kadmij
(CH <sub>3</sub> ) <sup>2</sup>	dimetilni ion
CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup>	trimetil živosrebrov kation
CH <sub>3</sub> HgCl	metil živosrebrov klorid
CH <sub>3</sub> HgOH	metil živosrebrov hidroksid
Cl <sup>-</sup>	kloridni anion
Co	kobalt
Cr	krom
Cu	baker
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	bakrov (II) sulfat penta hidrat
Cys	aminokislina cistein
F	mikorizna frekvenca-frekvenca fragmentov z glivo
Fe	železo
FeNaEDTA	železo natrijev etilendiamintetraocetna kislina
Gd	gadolinij
Ge	germanij
Hg	živo srebro
Hg <sup>0</sup>	elementarno živo srebro
Hg <sup>1+</sup>	enovalentno živo srebro
Hg <sup>2+</sup>	dvovalentno živo srebro

Hg(II)	dvovalentno živo srebro
Hg(0)	elementarno živo srebro
Hg(OH) <sub>2</sub>	živosrebrov hidroksid
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	trivodikov borat
HgCl <sub>2</sub>	živosrebrov diklorid
HNO <sub>3</sub>	dušikova (V) kislina
H <sub>2</sub> O	voda
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodikov peroksid
HgS	živosrebrov sulfid
HgSe	živosrebrov selen
ICP-AES	atomsko emisijska spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo
ICP-MS	induktivno sklopljena plazma z masno spektrometrijo
K	kalij
KNO <sub>3</sub>	kalijev nitrat
K <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	dikalijev selenat
KOH	kalijev hidroksid
LA-ICP-MS	laserska ablacija z induktivno sklopljeno plazmo in masno spektrometrijo
M	splošna intenziteta mikorize - intenziteta mikorizne kolonizacije koreninskega sistema
m	intenziteta mikorize v koloniziranih koreninskih fragmentih
MDA	monoaldehid
MetSeCys	metionin seleno cistein
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	manganov sulfat
Mili Q	demineralizirana voda
Mis	gostota mikrosklerocijev v delu korenine z mikorizno kolonizacijo
mis	gostota mikrosklerocijev v koreninskem sistemu
Mn	mangan
NaCl	natrijev klorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	natrijev dihidrogen fosfat
(NH <sub>4</sub> ) <sup>6</sup> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	amonijev heptamolibdat
Ni	nikelj

O <sup>2-</sup>	superoksidni anion
OH <sup>-</sup>	hidroksilni anion
P	fosfor
Pb	svinec
Ph	mera za kislo/bazično
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	fosfat
ROS	prosti kisikovi radikali
RŽS	rudnik živega srebra
S	žveplo
Se	selen
Se <sup>0</sup>	elementarni selen
Se <sup>2+</sup>	dvovalentni selen
Se(IV)	štirivalentni selen
Se Met	seleno metionin
Se(0)	elementarni selen
Se-Cys	aminokislina cistein
SeO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	selenit
SeO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	selenat
SM	suha masa
STP	standardni pogoji
TBA	2-tiobarbitudna kislina
TCA	trikloroocetna kislina
Te	telur
TK	težke kovine
UV	ultravijolična svetloba
v	gostota veziklov v delu korenine z mikorizno kolonizacijo
V	gostota veziklov v koreninskem sistemu
WHO	svetovna zdravstvena organizacija
Y	itrij
Zn	cink
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	cink fosfat heptahidrat

## 1 UVOD

Zaradi petstoletnega rudarjenja v rudniku živega srebra se v Idriji in njeni širši okolici soočajo s problemom onesnaženosti z živim srebrom (Hg) (Cigale in sod., 2007). Onesnaženje s Hg danes velja za globalen, razširjen in kroničen problem. Hg in njegove spojine so zelostrupene za ljudi, živali in rastline (RŽS Idrija). Ker so rastline primarni vir hrane, preko njih prehaja Hg v prehranjevalno verigo, kar predstavlja tveganje za zdravje ljudi in živali, pri katerih se težke kovine kopičijo v tkivih in organih (Ling in sod., 2010). Vnos relativno nizkih odmerkov Hg v telo preko dolgega roka pripelje do okvare organov in lahko povzroči kronično strupenost (WHO, 1976), zato je zelo pomembno, da se zmanjšuje koncentracije Hg v rastlinah. Bioakumulacija Hg ni neodvisen proces ampak nanj vplivajo številne sinergistične in antagonistične reakcije z drugimi snovmi, ki so prisotne v sistemu zemlja-korenine (Shanker in sod., 1996).

Eden pomembnejših je nedvomno selen (Se). Močno korelacijo med Se in Hg so odkrili v morskih sesalcih in ribah. Dokazali so, da Se ščiti živali tako pred organskimi kot tudi anorganskimi oblikami Hg (Beijer in sod., 1978), saj preprečujejo njegovo bioakumulacijo, rakotvornost in strupenost (Shanker s sod, 1996). Vpliv Se na strupenost Hg pri rastlinah je slabo raziskan. Thangavel in sod. (1999) so s testiranjem vpliva različnih koncentracij Hg in Se na rastlino *Portulaca oleracea* ugotovili, da Se ščiti rastline pred strupenim Hg le pri zelo nizkih koncentracijah. Z nadaljnim višanjem koncentracije Se in Hg, se varovalni učinek Se zmanjšuje, strupenost pa povečuje.

V sistemu zemlja-korenine prihaja do interakcij z glivami. Odnos med rastlino in glivo, pri kateri imata obe korist, se imenuje mikoriza. Splošno znano dejstvo je, da je mikoriza prisotna pri večini rastlin, ki rastejo v naravnih razmerah v tleh (Smith in Reed, 1997). Privzem težkih kovin (TK) in toleranca (rastlin) je odvisna tako od rastline, kot tudi mikroorganizmov v tleh, zato je za razumevanje učinkov TK v tleh nujno potrebno poznavanje interakcij med koreninami rastlin in njihovimi simbionti, kot so arbuskularno mikorizne glive (Liao in sod., 2003). Ugotovili so, da se pri nizkih koncentracijah TK v tleh poveča privzem TK v rastline, zaradi povečane fitoekstrakcije TK v mikorizosferi. Pri visokih koncentracijah TK v tleh, se zaradi vezave kovin v glivah zniža biodostopnost TK (Audet in Charest, 2007).

Namen magistrske naloge je ugotoviti vpliv listnega tretiranja s selenom (v obliki selenata) na privzem in razporeditev Hg v tkivih in organih koruze ter vpliv arbuskularno mikorizne simbioze na rast rastlin v kombinaciji z živim srebrom in selenom. Za poskus smo izbrali koruzzo, ker je ena najpomembnejših kulturnih rastlin na svetu, je dober modelni organizem, saj raste hitro in jo je enostavno gojiti. Koruzzo kot modelni organizem v

raziskavah uporabljajo že skoraj stoletje (Strable in Scanlon, 2009). Rezultati magistrskega dela so pomembni za območje Idrije, ki je še vedno onesnaženo s Hg, na njem pa se ljudje ukvarjajo tudi s kmetijstvom.

## 1.1 NAMEN RAZISKAVE

- Proučiti vpliv Hg (kot  $HgCl_2$ ), Se (kot  $K_2SeO_4$ ) in kombinacije Hg+Se na rast in razvoj rastlin.
- Proučiti vpliv arbuskularne mikorize na rast in razvoj rastlin.
- Izmeriti koncentracije Hg, Se in drugih elementov v koreninah in poganjkih koruze tretiranih s Hg, Se in Hg+Se, ter določiti v katerem delu rastline so koncentracije Hg oz. Se najvišje.
- Določiti vzorce porazdelitve Hg in Se v koreninah rastlin tretiranih s Hg, Se in Hg+Se z lasersko ablacijsko spektrometrijo z induktivno sklopljeno plazmo.
- Izmeriti koncentracije fotosinteznih pigmentov (klorofil a, klorofil b, karotenoidi) v poganjkih koruze kot pokazatelj stresa zaradi strupenosti Hg.
- Določiti stopnjo lipidne peroksidacije kot odgovor rastline na stres.
- Določiti stopnjo mikorizne kolonizacije arbuskularno mikoriznih gliv pri koruzi.
- Ugotoviti, ali AM vplivajo na privzem in porazdelitev Hg in Se pri koruzi.

## 1.2 OSNOVNE HIPOTEZE

1. Rastline z arbuskularno mikoriznimi glivami bodo imele večjo biomaso kot rastline brez arbuskularne mikorize, saj mikorizne glice zmanjšajo biodostopen Hg in povečajo privzem ostalih nutrientov.
2. Pri rastlinah, ki bodo tretirane s kombinacijo  $HgCl_2$  in  $K_2SeO_4$ , bo stopnja stresa manjša kot pri rastlinah tretiranih s  $HgCl_2$ , zaradi vezave Hg v netopne HgSe komplekse.
3. Zaradi slabe mobilnosti Hg, se bo Hg večinoma akumuliral v koreninah, zato bodo njegove koncentracije tu višje kot v poganjkih.
4. Selenat ( $K_2SeO_4$ ) se bo presnavljal v listih rastlin in se v obliki seleno-aminokislin transportiral v korenine rastlin.
5. Tretiranje rastlin s kombinacijo  $HgCl_2$  in  $K_2SeO_4$  bo zaradi razlike v biodostopnosti in mobilnosti povzročilo razlike v razporeditvi Hg in Se v rastlinskih tkivih.
6. V rastlinah (koreninah) z arbuskularno mikorizno simbiozo bo koncentracija Hg manjša kot v rastlinah brez mikorizne simbioze.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 TEŽKE KOVINE

#### 2.1.1 Kaj so težke kovine?

Z izrazom težke kovine (TK) označujemo kateri koli kovinski element, ki ima relativno visoko gostoto in je strupen že pri nizkih koncentracijah (Lenntech Water Treatment and Air Purification, 2004). V splošnem izraz težke kovine uporabljamo za skupino kovin oz. polkovin z atomsko gostoto večjo od  $4 \text{ g/cm}^3$ . Med težke kovine uvrščamo npr. živo srebro (Hg), svinec (Pb), kadmij (Cd), nikelj (Ni), kobalt (Co), železo (Fe), arzen (As) in srebro (Ag). Težke kovine so pomembni onesnaževalci v okolju. Zaradi svoje strupenosti predstavljajo vedno večje probleme tako z vidika ekologije, evolucije, prehrane kot tudi okolja (Nagajyoti in sod., 2010).

#### 2.1.2 Viri onesnaženja s Hg

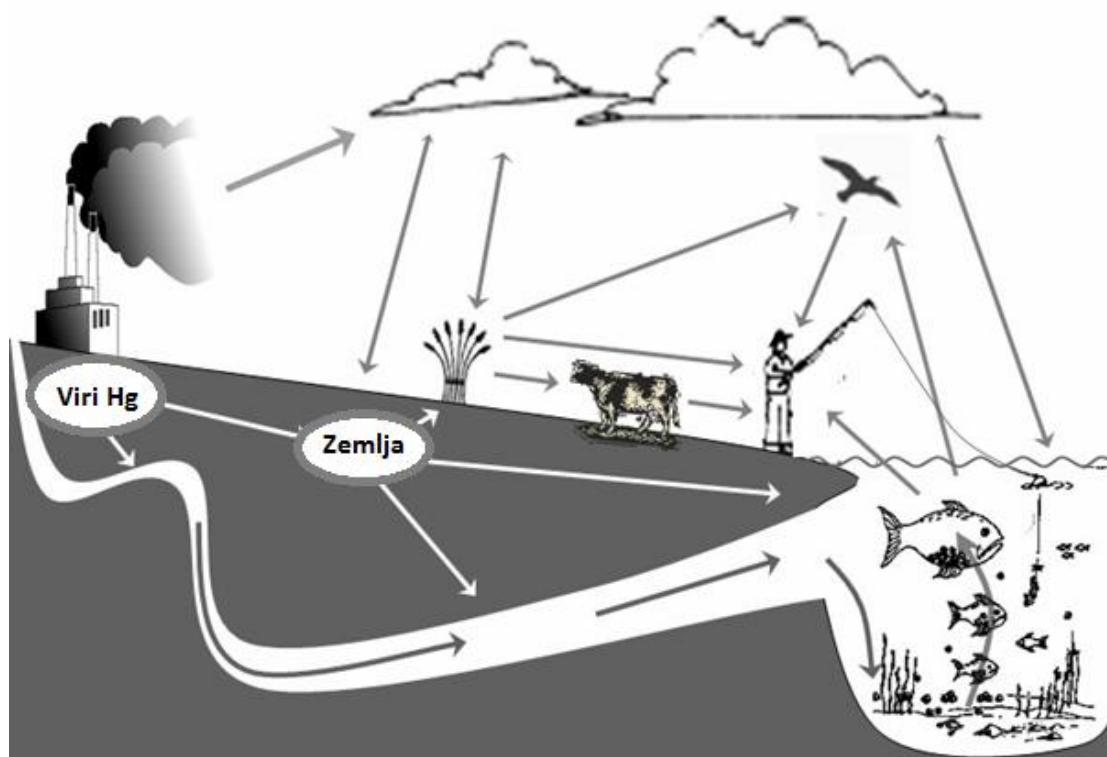
V osnovi ločimo sproščanje Hg v okolje zaradi naravnih procesov in antropogene dejavnosti (Khan in sod., 2000). Živo srebro je prisotno tako v tleh, zraku, vodi kot tudi v bioti (živih organizmih).

Naravni procesi kroženja Hg med zrakom, vodo in tlemi so:

- vetrna erozija in odplinjevanje iz tal in skal bogatih s Hg
- izbruhi vulkanov in druge geotermalne aktivnosti
- izhajanje Hg iz pod površinske skorje zemlje

Antropogeni izvori onesnaževanja s Hg pa so:

- Zgorevanje fosilnih goriv, lesa, odpadkov, blata iz čistilnih naprav in krematoriji
- Visokotemparurni procesi, npr. taljenje, izdelava cementa in lepil
- Proizvodne/komercialne dejavnosti: npr. obdelava kovin, ekstrakcija zlata, rudarjenje Hg, kloralkalne naprave, kemična in instrumentalna industrija (Hg kemikalije, barve, baterije, termometri, procesni reaktanti in katalizatorji)
- Ostali viri, npr. kmetijstvo (gnojila in pesticidi) (Wang, 2004)



Slika 1: Kroženje živega srebra v okolju (povzeto po Wang, 2004: 7)

Najbolj onesnažena področja z živim srebrom na svetu so Almadén (Španija), Idrija (Slovenija) in Monte Amiata (Italija). V severni Ameriki je s Hg močno onesnažena pokrajina Almaden v Kaliforniji in Pinchi Lake na zahodu Kanade (Schroeder in Munthes, 1998). V aziji so z živim srebrom najbolj onesnažene države Kitajska (npr. pokraine Guizhou, Shaanxi, Jiangxi, Jilin, Shanghai, Tianjin), Japonska (Kumamoto, Kagoshima, Niigata, itd.), Filipini (Mindanao) in Kazakistan (Qaraghandy, Pavlodar) (Li in sod., 2009).

### 2.1.3 Onesnaženo območje Idrija

Po legendi, odkritje živega srebra v Idriji sega v leto 1490, ko je škafar v studencu namakal leseno posodo, v katero se mu je natekla neznana svetleča snov, kasneje prepoznana kot živo srebro (Turistični rudnik živega srebra Idrija, Antonijev rov, 2015). V Idrijo so se začeli priseljevati Italijani, Nemci in Čehi, ki so zagnali pridobivanje živega srebra in njegovo prodajo. Z odkritjem bogate cinabaritne rude leta 1508, se je izkopavanje živo srebrne rude zelo povečalo. Rudarjenje je v Idriji potekalo skoraj pol tisočletja. V tem času so izkopali več kot tri milijone m<sup>3</sup> rude in jalovine ter pridobili 147 000 ton dragocene

kovine (Urbanc, 2010), od tega se je okoli 40 000 ton živega srebra izgubilo v procesu pridobivanja in močno onesnažilo okolje (Cigale in sod., 2007). Zaradi padca cene živega srebra, vse strožjih okoljevarstevih zahtev, vse večjih stroškov in težjih pogojev rudarjenja, ter vedno slabše kvalitete rude, so leta 1977 sprejeli sklep o postopnem zapiranju rudnika. Proizvodnjo so dokončno ustavili leta 1995. Rudnik živega srebra v Idriji danes velja za drugi največji rudnik Hg na svetu (Urbanc, 2010).

V Idriji onesnaženje z živim srebrom še naprej ostaja velik problem. Leta 2001 sta Grosar in Šajn izvedla meritve Hg na 51 km<sup>2</sup> velikem območju Idrije in ugotovila, da je na 17 km<sup>2</sup> velikem področju vsebnost Hg presegala kritično dovoljeno vrednost Hg v tleh (10 mg kg<sup>-1</sup>). Povprečna koncentracija Hg v tleh je znašala 8,6 mg kg<sup>-1</sup> (0,42-973 mg kg<sup>-1</sup>). Kar 3,6-krat več Hg kot v tleh pa sta izmerila v podstrešnem prahu. Povprečna koncentracija Hg v podstrešnem prahu je bila 43,5 mg kg<sup>-1</sup> (1,8-1055 mg kg<sup>-1</sup>). Vrednosti Hg so bile višje v dolini reke Idrijce in ob vznožju vzpetin, nižje pa na višjih delih in na obrobju obravnavanega ozemlja (Grosar in Šajn, 2001).

Posledice onesnaženja z živim srebrom so vidne v vseh sestavinah okolja, saj se povisane koncentracije Hg pojavljajo tako v vodi, zraku, vegetaciji kot tudi tleh. Zaradi žgalnih ostankov in erozije s Hg onesnaženih tal je s Hg močno onesnažena reka Idrijca, posledično tudi Soča in Tržaški zaliv (Cigale in sod., 2007).

## 2.1.4 Živo srebro

### 2.1.4.1 Lastnosti in kemijske oblike živega srebra

Živo srebro je edina tekoča kovina pri standardnih pogojih. Ima visoko površinsko napetost, visoko specifično težo, nizko električno upornost in konstantni volumen raztezanja v celotnem temperaturnem območju. Zaradi teh lastnosti se je tokom Industrijske revolucije uporaba živega srebra v komercialni industriji, metalurgiji, medicini, proizvodnji in zobozdravstvu hitro povečevala (Schroeder in Munthe, 1998).

V okolju najdemo živo srebro v različnih oblikah. Lahko se nahaja v enoatomski kovinski ( $Hg^0$ ) obliki, v ionski obliki ( $Hg^+$ ,  $Hg^{2+}$ ) kot sestavni del rud (npr. cinabarit) ali pa v metiliranih oblikah ( $CH_3Hg^+$ ,  $(CH_3)_2Hg$ ) (Carrasco-Gil in sod., 2013). Anorganski  $Hg^0$  se običajno nahaja v atmosferi. Redkeje ga najdemo tudi v naravnih vodnih ekosistemih.  $Hg^+$  in  $Hg^{2+}$  se lahko vežeta na različne komponente in tvorita različne anorganske in organske kemične snovi (Carrasco-Gil, 2011b). V agrikulturalnih tleh prevladuje ionska oblika  $Hg^{2+}$  (Han in sod., 2006).  $Hg^+$  je v primerjavi s  $Hg^{2+}$  manj stabilen in zato redkejši.

Najpogosteje anorganske oblike živega srebra v naravi so: živosrebrov klorid ( $HgCl_2$ ), živosrebrov hidroksid ( $Hg(OH)_2$ ) in živosrebrov sulfid ( $HgS$ ) (Carrasco-Gil, 2011b). Čeprav je spojina  $HgCl_2$  zelo hlapljiva in se hitro pretvarja v anorganski plinasti Hg, smo jo za tretiranje naših rastlin s Hg izbrali, ker se v primerjavi z elementarnim Hg dobro topi v vodi in je kemično zelo aktivna.

O organskih oblikah živega srebra govorimo, ko se živo srebro veže na ogljik (npr. metil živosrebrov klorid ( $CH_3HgCl$ ), metil živosrebrov hidroksid ( $CH_3HgOH$ ) ali pa na majhne frakcije organskih molekul, ki že vsebujejo Hg (dimetil-Hg in fenil-Hg) (Carrasco-Gil, 2011b). Na absorpcijo oz. izločanje Hg v tleh vplivajo številni kemični in biološki procesi pretvorbe, kot so oksidacija, redukcija, metilacija in kompleksacija. Na te procese vplivajo številni dejavniki v tleh, kot so npr. pH, tekstura, organske snovi, temperatura in kompleksni ligandi ( $OH^-$  in  $Cl^-$ ) (Yu in sod., 2010; Schuster, 1991).

#### 2.1.4.2 Vpliv živega srebra na organizme in njegova strupenost

Od oblike živega srebra v okolju je odvisna njegova strupenost za organizme. Za organizme so ponavadi manj škodljive anorganske oblike živega srebra, saj se ponavadi močno vežejo na komponente v tleh in posledično se zmanjša njihova razpoložljivost in absorpcija. Veliko bolj strupene so organske oblike živega srebra. Te imajo hidrofobne lastnosti, ki omogočajo prehajanje preko celičnih membran in kopiranje v membranskih organelih, kjer motijo oksidativne in fotosintezne procese (Ruiz in Daniell, 2009).

Za organizme je organski metil-Hg zelo nevarna oblika živega srebra, saj zaradi lipofilnosti z lahkoto prehaja vanje (Rimmer in sod., 2010). Nastaja v anaerobnih sedimentih z metilacijo anorganskih oblik Hg, ki jo vršijo anaerobne sulfat-reducirajoče bakterije (Mathivanan in sod., 2010). V organizmih učinkuje kot nevrotoksin. Negativno deluje na naravne sisteme in populacije divjih živali (Rimmer in sod., 2010). Vsakršna izpostavljenost organizmov s Hg onesnaženim okoljem je tvegana in nevarna. Ker v organizmih prihaja do kopiranja Hg, se strupeni učinki Hg-ja stopnjujejo z naraščanjem trofičnega nivoja (Ruiz in Daniell, 2009). Posledica kopiranja Hg v organizmih oz. rastlinah je povečevanje koncentracije in strupenosti Hg z leti (Cooper in Gillespie, 2001).

Kopiranje Hg v organizmih povzroča resne poškodbe. Ljudje in živali ga prejemamo z dihanjem onesnaženega zraka in z zaužitjem onesnažene hrane (še posebej ribe). Posledice kopiranja Hg pa so lahko precej hude in sicer Hg lahko povzroči hude nevrološke poškodbe, poškodbe ledvic in celo smrt (Tchounwou in sod., 2003; WHO, 1976), zato je zelo pomembno, da varujemo okolje pred onesnaženjem s Hg in na tak način preprečujemo vnos strupenega Hg tudi v naša telesa. Ker so rastline primarni vir hrane in živo srebro

prav preko njih prehaja v prehranjevalno verigo, je prav, da naredimo vse, da preprečimo uživanje s Hg onesnaženih rastlin in da skušamo najti rešitve, s katerimi bi na onesnaženih območjih rastline sprejemale čim manj Hg. Živo srebro se v rastlinah ne le kopiči, ampak je tako kot za ostale organizme v povišanih koncentracijah strupeno.

#### 2.1.4.3 Privzem, transport in strupeni učinki živega srebra v rastlinah

Rastline živo srebro privzemajo iz tal s koreninami ali pa iz zraka preko listov. Absorpcija tako anorganskih kot tudi organskih oblik Hg iz tal je običajno majhna. To pomeni, da kljub velikemu povečanju koncentracije Hg v tleh, pride do majhnega povečanja koncentracije Hg v rastlini (kar se tiče direktnega privzema). Številne bariere v rastlini otežujejo prenos Hg iz korenin do poganjkov (Sharma in Subhadra, 2010; Patra in Sharma, 2000). Večina prejetega Hg ostane v koreninah, kar pomeni, da korenine služijo kot bariera, ki preprečuje prehod Hg v ostale dele rastlin (Gracey in Stewart, 1974). V koreninah so koncentracije živega srebra lahko do 20-krat večje kot v poganjkih (Linderberg in sod., 1979). Transport Hg po rastlini omogoča transpiracijski tok (Leonard in sod., 1998).

Veliko lažje pa Hg prehaja v rastline iz zraka. V zrak se Hg lahko sprošča iz tal, saj v njih potekajo različne biološke in kemične reakcije, v katerih nastaja hlapljiv elementaren Hg in hlapljive denaturirane spojine. To je pomembno zlasti za rastline, gojene v zaprtih prostorih kot so rastlinjaki in komore (naše rastline smo gojili v komori). Pri komercialnem gojenju se za zaščito rastlin uporablja razne fungicidne in pesticidne spreje z vsebnostjo Hg. Po škropljenju rastlin v zaprtih prostorih, Hg ostaja v zraku, zato lahko prehaja v rastline, ki jih kasneje zaužijemo ljudje (Sharma in Subhadra, 2010).

Kljub lažjemu prehajanju Hg v liste kot korenine, so koncentracije Hg v poganjkih ponavadi precej nižje. V zunanjem zraku je parcialni tlak Hg manjši kot v samem listu, zato se iz rastline v atmosfero izloča bistveno več Hg kot pa ga rastlina prejme iz zraka. To so dokazali Hanson in sodelavci leta 1995 na drevesnih vrstah *Picea abies* L., *Quercus alba* L. in *Acer rubrum* L.. Podobne rezultate so dobili tudi Erickson in Gustin (2004).

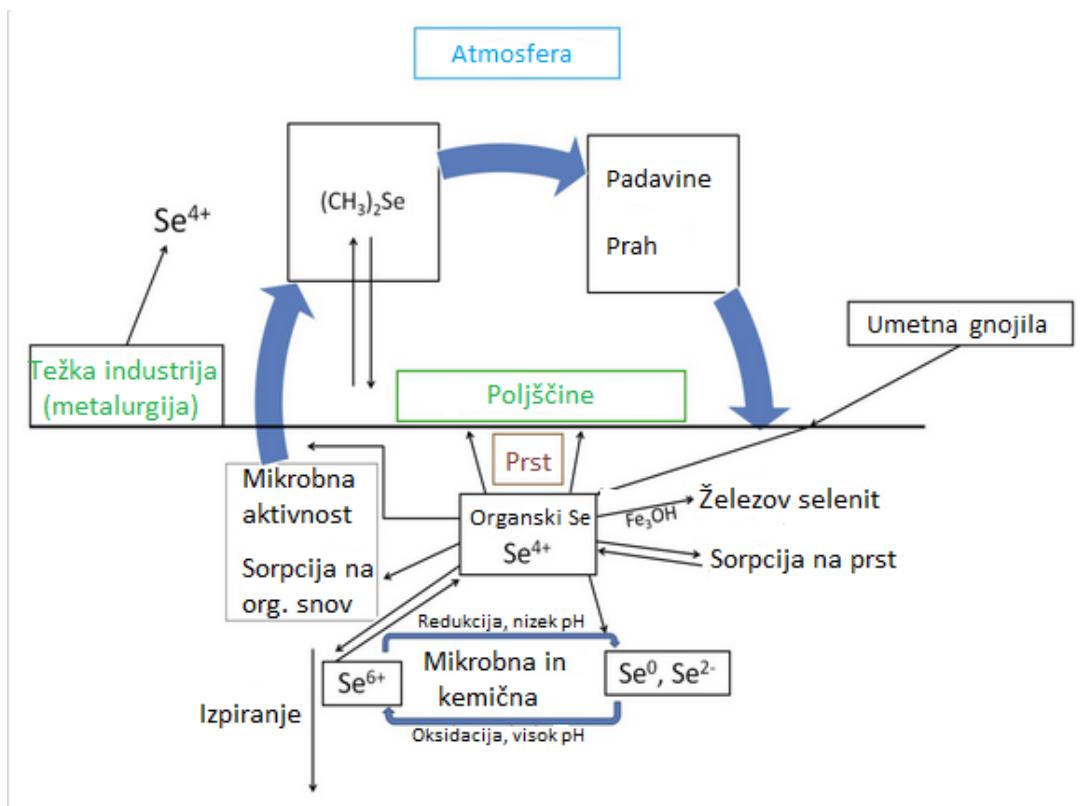
V rastlinah živo srebro negativno deluje na rast in metabolizem (Verma in Dubey, 2003; Patra in sod., 2004). Povzroči zmanjšanje fotosinteze, transpiracije, privzema vode, izgradnje klorofila (Godbold and Hüttermann, 1986) in poveča lipidno peroksidacijo (Cho in Park, 2000). Eden najpomembnejših vzrokov za njegovo strupenost je tvorba prostih kisikovih radikalov (ROS) kot so superoksidni anion ( $O_2^-$ ), singlet kisik ( $^1O_2$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) in hidroksidni radikal ( $OH^-$ ) (Cargnelutti in sod., 2006). ROS lahko povzročijo motnje lipidov v membrani in motnje celičnega metabolizma (Messer in sod.

2005; Cargnelutti in sod., 2006). Živo srebro lahko zmanjša delovanje encimov različnih metabolnih poti (Morch in sod., 2002; Lenti in sod., 2002. Basak in sod., 2001, Shaw in sod., 2002). Znaki zastrupitve rastline z živim srebrom so odmetavanje starejših listov, počasnejši razvoj novih listov in korenin, nižja vsebnost klorofila in zmanjšana aktivnost nitrat reduktaze (Vyas in Puranik, 1993).

## 2.1.5 Selen

### 2.1.5.1 Nahajanje selena

Selen (Se) je eden izmed najbolj razširjenih koristnih elementov na zemlji (Kopsell in Kopsell, 2006). Prisoten je v ozračju, vodnem sistemu, tleh in sedimentih. Lahko je naravnega ali antropogenega izvora (Pyrzyńska K, 2001). Najpogostejsi vzrok antropogenega onesnaževanje je sproščaje Se iz razpadajočih odpadnih materialov rudarstva, kmetijstva, petrokemikalij in industrijskih dejavnosti (Limly, 2003). V nekaterih področjih sveta (npr. Kitajska) je v tleh prisoten v prenizkih, v nekaterih pa v previsokih koncentracijah (npr. zahodna ZDA). Visoke koncentracije Se običajno vsebujejo tla iz skrilavca (Minorsky, 2003). Najstarejša kamnina idrijskega hribovja je poleg karbonskega peščenjaka prav temno sivi skrilavec (Geologija, 2015).



Slika 2: Kroženje Se v agrosistemu (povzeto po Gissel-Nielsen, 1998: 103)

### 2.1.5.2 Lastnosti in kemijske oblike selena

Selen je polkovina (metaloид), saj ima tako kovinske kot tudi nekovinske lastnosti. Uvrščamo ga v šesto skupino periodnega sistema (Kopsell in Kopsell, 2006) med žveplo (S) in telur (Te). To pomeni, da imajo Se, S in Te podobne lastnosti. Ločimo anorganske in organske oblike Se. Anorganske oblike selena se pojavljajo v petih valenčnih stanjih: selenid (2-), elementarni Se (0), tioselenat (2+), selenit (4+) in selenat (6+) (Lauchli, 1993; Pyrzynska, 2001). V kateri obliki se bo nahajal Se v okolju, je odvisno od redoks pogojev in pH. V aerobnih in nevtralnih, pa tudi v alkalnih okoljih prevladuje selenat, medtem ko v anaerobnih sistemih prevladujeta selenid in elementarni Se (Terry in sod., 2000). Nahaja se lahko tudi v hlapljivih spojinah kot so DMS: npr. dimetildiselednid (DMDSe), dimetil selenon, dimetil selenilsulfid in metanselenol (Fan in sod., 1997; Reamer in Zoller, 1980). Organske oblike selena se najpogosteje nahajajo v bioloških sistemih. Prisotne so v obliki produktov encimskih reakcij, ki so vpletene v izgradnjo seleno aminokislin. V naravnih ciklih prihaja do vezave Se(IV) in Se(VI) z bolj kompleksnimi selenoproteini (Pyrzynska, 2001). V rastlinah prihaja tudi do pretvorbe anorganskih oblik Se v organske, so pa pretvorbe odvisne od vrste rastline (Pedrero in Madrid, 2009).

### 2.1.5.3 Vpliv selena na organizme

Za mnoge organizme, vključno z živalmi in ljudmi, je Se esencialen mikroelement. Organizmom je koristen le v majhnih koncentracijah, v velikih koncentracijah pa je strupen. Še vedno potekajo znanstvene razprave ali je selen esencialen element tudi za višje rastline (Minorsky, 2003). V nizkih koncentracijah pozitivno vpliva na zdravje ljudi in živali. Deluje kot antioksidant in preprečuje nastanek različnih vrst raka in ostalih bolezni (npr. ateroskleroze, artritisa in spremenjenih imunoloških funkcij) (Pedrero in Madrid, 2009; Germ in Stibilj, 2007).

Omogoča pravilno delovanje selenoproteinov, ki imajo v telesu zaščitno vlogo. Selenoproteini so proteini, ki potrebujejo selen za katalitično aktivnost (Pedrero in Madrid, 2009). Glavni vrok za strupenost Se je njegova kemična podobnost z žveplom. Encimi, ki so vključeni v metabolizem žvepla, katalizirajo tudi analogne reakcije z ustreznimi Se snovmi. Afiniteta teh encimov za Se in S je podobna, zaradi česar lahko ob povišanih koncentracijah Se pride do vključitve Se na mesto v molekuli, kjer je običajno vezano S. Na tak način pogosto prihaja do zamenjave cisteina (Cys) s Se-Cys (Minorsky, 2003). Posledica zamenjave žvepla v aminokislinah je lahko nepravilno zvijanje proteinov in posledično nefunkcionalnost proteinov in encimov (Germ in Stibilj, 2007).

Glavni prehrambeni vir selena za ljudi in živali so rastline, zato je pomembno dobro poznavanje metabolizma selena v rastlinah (Zhu in sod., 2009). Rastline lahko privzemajo Se v anorganskih oblikah kot selenat ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) in selenit ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) ali pa v obliki organskih spojin kot npr. selenoaminokisline in selenometionin (Mikkelsen in sod., 1989; Zayed in sod., 1998). Največ Se se v tleh se nahaja v obliki soli natrijev selenat in natrijev selenit ter aminokisline selenocistein. To so tudi glavne oblike Se, ki jih živali ob pomanjkanju Se privzemajo za produkcijo selenoproteinov (Pedrero in Madrid, 2009).

Poleg oblike, koncentracije Se in pH tal, na privzem Se vplivajo še vsebnost  $\text{CaCO}_3$ , slanost, koncentracija in vrsta kompetativnih ionov v tleh, ter sposobnost rastline za absorpcijo in metabolizem Se (Germ in Stibilj, 2007). Rastline največ Se privzamejo v obliki selenata, saj je dobro topen v vodi in rastlinam lahko dostopen (Ježek in sod., 2012). Prenos selenata v rastlinske celice poteka z aktivnim transportom od nižjega proti višjemu elektrokemijskemu potencialu. Ker ima selenat podobne kemijske lastnosti kot sulfat, njegov privzem in akumulacija potekata preko sulfatnih prenašalcev v plazemski membrani celic korenin. Tudi drugi organizmi (npr. živali, mikroorganizmi,...) privzemajo selenat s sulfatnimi transporterji (Terry in sod., 2000). Ko rastline privzamejo selen, ne glede na to ali je v organski ali anorganski obliki, se ta v celicah vključi v metabolne poti, ki vodijo v nastanek končnega produkta, namenjenega prenosu in akumulaciji v različna rastlinska tkiva (Zayed in sod., 1998). Kako se bo Se porazdelil v rastlini, je odvisno od vrste, razvojne faze in fiziološkega stanja rastline (Terry in sod., 2000).

Tudi oblika selena močno vpliva na prenos selena iz korenin v poganjke. Selenat se prenaša bistveno lažje kot selenit ali pa organske oblike selena (npr. Se-Met) (Terry in sod., 2000). Selenat se prenaša brez kemijskih sprememb v liste po ksilemu in nato vstopa v kloroplaste, kjer ga encimi metabolizirajo z asimilacijo sulfata (De Souza in sod.; Zayed in sod., 1998). V liste se prenese in akumulira več selenata, medtem ko večina selenita in selenometionina ostane v koreninah (Terry in sod., 2000). Razlog za slabši prenos selenita je lahko ta, da se selenit v rastlinah zelo hitro pretvori v organske oblike selena, ki ostajajo v koreninah (Zayed in sod., 1998).

Rastline lahko sprejemajo selen tudi iz ozračja preko površine listov (Terry in sod., 2000). Zieve in Peterson (1984) sta izvedla poskus s štirimi rastlinami: z lasasto šopuljo (*Agrostis tenuis*), ječmenom (*Hordeum vulgare*), paradižnikom (*Lycopersicon esculentum*) in redkvico (*Raphanus sativus*), ki sta jih gojila na hidroponskem gojišču v zaprti komori, kjer je bila koncentracija dimetil selenida v zraku  $8 \mu\text{g m}^{-3}$ . Dimetil selenid, ki je iz zraka prehajal v liste, se je v obliki anorganskega selenita, selenoglutationa, selenometionina in protein-selenometionin kompleksov akumuliral v koreninah. Rastline običajno akumulirajo več selena v poganjkih in listih kot v koreninah (Zayed in sod., 1998). Organske oblike Se lahko hlapijo iz rastline. Izhlapi pa bistveno več Se iz korenin kot iz poganjkov (Zayed in

sod., 1998), in dvakrat več Se iz rastlin, ki akumulirajo selenit v primerjavi s selenatom (De Souza in sod., 1998).

Wang in sod. (2013) so izvedli poskus s koruzo, ki so jo gojili v substratu z dodanim Se in koruzo, ki so jo škropili z raztopino Se. V obeh primerih se je povečala vsebnost Se v zrnu, so pa bile koncentracije v primeru foliarnega nanosa višje. Prav foliarni nanos selena je najpogosteje uporabljena metoda v poljedelstvu za bogatenje rastlin s Se. Povečevanje vsebnosti selena v kulturnih rastlinah je pomembno zlasti v pokrajinh s prenizkimi koncentracijami Se v tleh, saj uživanje takih pridelkov zmanjšuje oz. preprečuje razvoj bolezni povezanih s pomanjkanjem Se pri ljudeh in živalih (Kopsell in sod., 2009).

Razlike med za življenje koristnih oz. nujno potrebnih koncentracij Se in koncentracij Se, ki so strupene za rastline, so majhne (Tan in sod., 2002; Fargašová, 2004; Fargašová in sod., 2006). V majhnih koncentracijah Se deluje kot antioksidant (Xue in sod., 2001; Djanaguiram in sod., 2005) in inhibira lipidno peroksidacijo (Hartikainen in sod., 2000).

Selen poveča odpornost rastlin na oksidativni stres povzročen z UV svetlobo, upočasni staranje, pospeši rast dozorevajočih sadik in pozitivno vpliva na biomaso rastlin (Xue in sod., 2001; Pennanen in sod., 2002, Hartikainen in sod. 2000). Hartikainen in sod. (2000) so ugotovili, da Se pospešuje rast ljljke (*Lolium perenne*). Selen v rastlinah krompirja (*Solanum tuberosum* L.) izboljša presnovo ogljikovih hidratov, zato so gomolji po tretiranju večji (Turkainen, 2004). V času suše omogoča uravnavanje količine vode v rastlini (Kuznetsov in sod., 2003). Selen v mnogih rastlinah zmanjšuje dostopnost težkih kovin (tudi Hg) in ščiti rastline pred poškodbami zaradi oksidativnega stresa, ki ga povzročijo težke kovine (Thangavel in sod., 1999; Muñoz in sod. 2007; Pedrero in sod., 2008).

Visoke koncentracije Se rastlinam škodujejo. Kot smo že omenili, je glavni vzrok za strupenost Se, njegova zamenjava s S v molekulah. Znaki zastrupitve so upočasnjena rast, ovenelost listov, zmanjšana sinteza proteinov in hitrejši propad rastline (Terry in sod., 2000). Selen v visokih koncentracijah deluje kot prooksidant in pospešuje nalaganje produktov lipidne peroksidacije (Hartikainen in sod., 2000).

### 2.1.6 Glavni mehanizem obrambe pred strupenimi učinki težkih kovin

Mehanizmi obrambe rastlin pred strupenimi učinki težkih kovin še niso povsem znani. Najverjetnejši mehanizem obrambe je znižanje koncentracije selenocisteina in selenometionina v intracelularnem prostoru, s čimer se prepreči njuno vezavo v proteine. To nekatere vrste rastlin, npr. rod *Astragalus*, dosežejo z vezavo na selenoaminokisline ali pa dipeptide, ki jih akumulirajo. Pretvorbo omogoča encim selenocistein metil transferaza (Nigam in sod., 1969). Lahko pa rastline koncentracijo selenocisteina in selenometionina znižajo z nalaganjem selena v vakuole v obliki selenata ali pa neproteinskih seleno-aminokislín (Terry in sod., 2000).

### 2.1.7 Interakcije Hg – Se

Znanstveniki so že v večih študijah poročali o zaščitni vlogi Se pred strupenimi učinki Hg v organizmih (Parizek in sod., 1969, Duffield-Lillico in sod., 2003, Xue in sod., 2001; Pennanen in sod., 2002). Večina raziskav je potekala na živalih. Prvi dokazi o vplivu Se na zmanjševanje strupenih učinkov Hg segajo v leto 1969, ko so Parizek in sod. na podganah dokazali, da selenit ščiti podgane pred odpovedjo ledvic, ki jo povzroča vbrizgani  $HgCl_2$ . Podobne učinke selena so kasneje odkrili tudi v številnih drugih vrstah organizmov, npr. bakterijah, zooplanktonu, enodnevnicah, postranicah, ostrižih, prepelicah, piščancih, racah, miših in pujsih. Zaradi tako širokega spektra organizmov se zdi, da v organizmih obstaja nek univerzalen mehanizem obrambe z antagonističnim delovanjem Se in Hg (McNear in sod., 2012).

Velikim koncentracijam Hg so izpostavljeni morski sesalci, ki imajo razvite dobre razstrupljevalne mehanizme. Pri njih se večina zaužitega Hg v jetrih pretvori v nestrupeno spojino HgSe (Nakazawa in sod., 2011). Večina raziskav o tvorbi kompleksa HgSe je potekalo na jetrih, zelo malo raziskav pa je potekalo v ostalih organih morskih sesalcev. Nakazawa in sod. (2011) so prvi jasno dokazali prisotnost HgSe poleg jeter tudi v vranici. Nima pa Se vedno zaščitne vloge. Huckabee in Griffith (1974) sta ugotovila, da sta Se in Hg skupaj za jajca krapov veliko bolj strupena kot Hg sam.

V rastlinah je vpliv selena na strupenost živega srebra slabo raziskan. Shanker in sod. (1996) so izvedli poskus na redkvicah (*Raphanus sativus*), ki so jih gojili v dveh različnih substratih, v prsti in v pesku, z dodanim selenatom in selenitom. Ugotovili so, da se s povečevanjem selenita in selenata v redkvici zmanjša privzem Hg. (Akumulacija Hg in Se je odvisna od različnih faktorjev v okolju, npr. hlapljivost, koncentracija posameznih oblik delcev, biometilacija in redoks sistem). Do znižanja koncentracije Se v substratu je prišlo,

ker sta se selenat in selenit reducirala do elementarnega Se. Glavni vzrok za njuno redukcijo je verjetno znižan pH okoli korenin, ki ga povzroči sproščanje organskih kislin (kot eksudatov) iz korenin. Koncentracije teh eksudatov so nizke, kar pomeni, da se v neposredni bližini korenin lahko reducira le malo selenita in selenata. Nastali elementarni selen ( $\text{Se}^0$ ) se nato poveže s  $\text{Hg}^{2+}$  in nastane kompleks  $\text{HgSe}$ . Elementarni Se pa se lahko še naprej reducira v  $\text{Se}^{2-}$  in reagira s  $\text{Hg}^{2+}$ , kjer ponovno nastane kompleks  $\text{HgSe}$ . Kompleks  $\text{HgSe}$  je zelo stabilen, netopen in zato rastlinam nedostopen. Privzem Hg je bil kljub enakim koncentracijam selenita in selenata v substratu bistveno manjši pri redkvicah, ki so rasle v pesku kot pri redkvicah, ki so rasle v zemlji. Predvidevajo, da je zaradi grobega peska nastalo več poškodb korenin v pesku kot v zemlji, zato se je iz korenin izločalo več eksudatov, ki so omogočili tvorbo  $\text{HgSe}$  kompleksov in tako znižali biodostopnost Hg in Se. Privzem Hg je linearno padal s povečevanjem koncentracije selenita in selenata. Ni pa bilo nobene bistvene razlike v vplivu selenita in selenata na sam privzem Hg (Shanker in sod., 1996). Vendar tudi v rastlinah selen nima vedno zaščitne vloge. Thangavel in sodelovci (1996) so na navadnem tolščaku (*Portulaca oleracea*) ugotovili, da selen ščiti rastlino pred strupenimi učinki Hg le pri nizkih koncentracijah (do  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Z nadaljnjim povečevanjem koncentracije tako Se kot tudi Hg, se manjšajo zaščitni, naraščajo pa strupeni učinki.

Mounicou in sodelavci (2006) so naredili poskus z indijsko gorčico (*Brassica juncea*), ki je hiperakumulacijska rastlina za Se. Rastline gorčice so izpostavljeni različnim koncentracijam tako Hg kot tudi Se. Po končanem poskusu so naredili tri različne ekstrakcije snovi, s katerimi so ugotovljali prisotnost in oblike Hg in Se v koreninah, poganjkih in listih. Prvi ekstrakt je vseboval v vodi topne snovi s Hg in Se (npr. proteini, polisaharidi, amino kisline, polipeptidi). V drugem ekstraktu so se nahajali v vodi topni Hg in Se proteinski kompleksi. Tretja ekstrakcija je vsebovala v vodi netopne Se in Hg komplekse. Prva ekstrakcija je pokazala, da se Se in Hg v koreninah vežeta na nekatere vodotopne biomolekule, ki so po vsej verjetnosti polisaharidne ali pa proteinske. Teh kompleksov niso našli v steblih in listih. Ugotovili so tudi, da se je več Hg nalagalo v korenine rastlin, tretiranih s Hg in Se kot pa v rastline tretirane le s Hg. Za višje koncentracije Hg v rastlinah tretiranih z obema elementoma, so najbrž krive prav vezave teh dveh elementov na biomolekule, ki pa preprečujejo prenos v poganjke in liste.

Pri drugi ekstrakciji so v koreninah odkrili še dodatne vodotopne proteine z vezanim Se in Hg. Teh proteinov pa niso našli v steblih in listih. S tem so dokazali, da se v vodi topni proteini z vezanim Hg in Se nahajajo le v koreninah. S tretjo ekstrakcijo so iz rastline izločili v vodi netopne proteinske komplekse. Ugotovili so, da se večina Se in Hg v koreninah nahaja prav v vodi netopnih kompleksih. Komplekse s Hg in Se so v majhnih koncentracijah našli tudi v stebli. Glede na precejšno razliko med vrhovoma za Se in Hg na kromatogramu, so sklepali, da sta Se in Hg v steblih vezana na druge biomolekule kot

pa v koreninah. Se pa kompleksi s Hg in Se očitno ne prenašajo v liste, saj jih v njih niso našli. Analizirali so tudi eksudate iz korenin in hlapo iz listov. Rezultati so pokazali, da je rastlina vsebovala bistveno več molekul z vsebnostjo Se v primeru tretiranja rastline z obema elementoma. V hlapih rastlin niso našli spojin, ki bi hkrati vsebovale oba elementa (Mounicou in sod., 2006).

## 2.2 MIKORIZA

Mikoriza je simbolični odnos med glivnimi hifami in koreninami rastlin (Agarwal in Sah, 2009). Prisotna je pri približno 95 % vseh rastlinskih vrst in v večini primerov rastline ne bi preživele brez nje (Barker in sod., 1998). Najdemo jo tako pri kulturnih (žita, grah, paradižnik, čebula, jabolka, jagode, itd.) kot pri divje rastočih rastlinah (Muchovej, 2001). Obstaja že zelo dolgo, saj so jo našli pri nekaterih najstarejših fosilnih kopenskih rastlin. Nekateri znanstveniki so prepričani, da je prav pojav (razvoj) mikorize omogočil prehod rastlin na kopno. Tekom evolucije kopenskih rastlin se je mikoriza razvila večrat neodvisno (Agarwal in Sah, 2009).

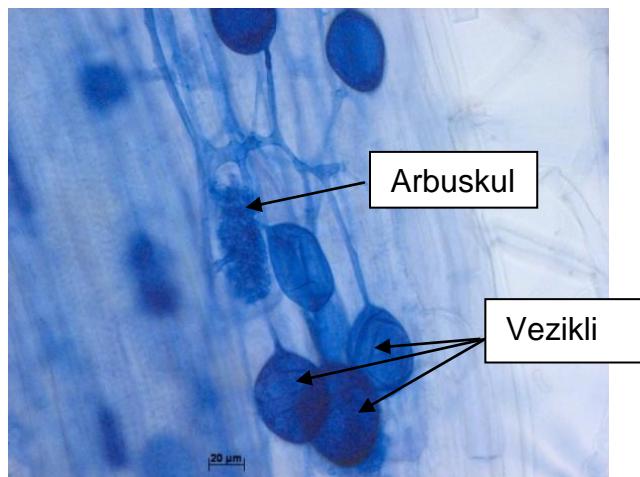
Mikoriza je mutualističen odnos, kar pomeni, da imata oba organizma koristi. Gliva od rastline prejema fotosinteze produkte, zato ji ni potrebno iskati lastnih virov energije. Rastlina pa od glive prejema nutiente, predvsem fosfor in dušik. Glivne hife se razraščajo v tleh in na tak način močno povečajo površino rastlin za koriščenje nutrientov.

V mikorizne povezave se vključujejo različne skupine gliv. Glede na vrsto gostiteljske rastline in simbiotske glive ločimo več tipov mikorize. Najpogosteje so arbuskularna mikoriza, ektomikoriza in erikoidna mikoriza. Arbuskularno mikorizo večinoma tvorijo zelnate (okoli 80 % vseh rastlinskih vrst), ektomikorizo pa drevesne vrste. Erikoidno mikorizo večinoma znotraj rodu Ericales (Cairney, 1999).

### 2.2.1 Arbuskularna mikoriza

Arbuskularna mikoriza (AM) je najpogosteja in najbolj razširjena oblika mikorize, saj so jo našli pri 80 % vseh rastlinskih vrst (Cairney, 1999). Tvorijo jo glive iz debla *Glomeromycota* (Göhre in Paszkowski, 2006). Pojavlja se pri kritosemenkah, golosemenkah in praprotnicah. Našli so jo v gametofitih nekaterih mahov, v lisičjakinah in pri rodu *Psilotales*, ki nimajo razvitih korenin ter pri vodnih rastlinah (Mosse in sod., 1981; Pocock in Duckett, 1985). Uvrščamo jo med endomikorizo. V primerjavi z ektomikorizo, kjer gliva nikoli ne prodre plazmaleme rastlinske celice, čeprav se razrašča med celicami znotraj koreninske skorje, pa pri endomikorizi prihaja do prodora in razraščanja gliv tako zunaj kot tudi v notranjosti celic koreninske skorje. Arbuskularno mikorizne glive v koreninah tvorijo specifične strukture arbuskule in vezikle, po katerih je tudi dobila ime. Arbuskuli so razvezani, drevesasto razrasli haustoriji, ki se tvorijo znotraj celic koreninske skorje. Vezikli so zadebelitve hif, ki opravljam založno vlogo. Vsebujejo

lipide in citoplazmo. Prvi vezikli so se pojavili kmalu za razvojem prvih arbuskulov (Quilambo, 2003).



Slika 3: Vezikli in arbuskuli

Arbuskularno mikorizne glive imajo na rastline številne pozitivne učinke. Eden najpomembnejših je zagotovo izboljšana oskrba s hranili (Leyval in sod., 1997).

AM omogoča bolj produktivno rast rastlin v slabo rodovitnih tleh, saj izboljša privzem počasi difundirajočih ionov (npr.  $\text{PO}_4^{3-}$ ), nemobilnih (npr. P, Zn in Cu) in ostalih nutrientov (npr. Cd). Zaradi boljše preskrbe z nutrienti, so rastline bolj odporne in lažje prenašajo stresne razmere (npr. sušo) (Quilambo, 2003). Arbuskularna mikoriza pa vpliva tudi na privzem težkih kovin. Mikoriza je namreč prisotna tudi v tleh, onesnaženih s težkimi kovinami, vendar pa je na onesnaženih področjih diverziteta arbuskularno mikoriznih spor običajno nižja kot na neonesnaženih (Regvar in sod., 2001). Kolonizacija rastlin z arbuskularnimi glivami lahko zmanjša privzem in strupene učinke težkih kovin v rastlinah (Vogel-Mikuš in sod., 2006).

### 2.2.2 Arbuskularna mikoriza in živo srebro

Vpliv arbuskularne mikorize na privzem Hg je slabo raziskan, saj je do sedaj poteklo le nekaj raziskav na to temo. Yu in sodelovci (2010) so izvedli poskus s koruzzo, v katerem so proučili vpliv arbuskularno mikoriznih gliv *Glomus mosseae* na obnašanje Hg v sistemu

zemlja-rastlina pri različnih dodanih koncentracijah Hg v tleh (0, 1, 2, 3, 4 mg Hg kg<sup>-1</sup>). Koncentracije Hg so bile pri tretmajih 2-4 mg kg<sup>-1</sup> bistveno nižje v mikoriznih kot pa v nemikoriznih koreninah. Ker so nemikorizne koruze privzemale več Hg, so pričakovali, da bo v tleh brez mikorize manj biodostopnega Hg. Vendar pa so po ekstrakciji zemlje s CaCl<sub>2</sub> ugotovili, da je bilo v mikorizni zemlji manj biodostopnega Hg. Padec biodostopnega Hg v tretmajih z mikorizo dokazuje, da so glive tiste, ki omogočajo močnejšo vezavo Hg na delce v tleh. Na sorbcijo/desorbcijo Hg v tleh vplivajo na več načinov, npr. s pH. Izločajo lahko protein glomalin, ki se veže s težkimi kovinami kot so Cu, Cd, Zn, Pb in Mn v komplekse, ki so talnim mikroorganizmom in rastlinam nedostopni ter na tak način znižajo biodostopnost težkih kovin (Yu in sod., 2010; González-Chávez in sod., 2004). Predvidevajo, da glomalin lahko vpliva tudi na biodostopnost Hg. Na sorbcijo nekaterih kovin (Cu, Zn in Cd) vpliva tudi obsežen ekstraradikalni micelij AM gliv z visoko kationsko izmenjevalno kapaciteto (Joner in sod., 2000; Chen in sod., 2001; González-Chávez in sod., 2002). Z imobilizacijo Hg z glivami v tleh, se zmanjša tveganje za prenos Hg v prehranjevalno verigo (Yu in sod., 2010). Vnos Hg v korenine lahko znižajo tudi hife AM gliv, ki vsebujejo amino, hidroksilne in ostale skupine (Smith in Read, 1997). Te lahko prodrejo v notranjost rastlinskih celic, spremenijo sestavne dele celične stene in povečajo vezavo Hg na površino hif in korenin (Yu in sod., 2010). Ne glede na koncentracijo dodanega Hg v tleh in izmerjeno koncentracijo Hg v koreninah, so bile koncentracije Hg v poganjkih precej nižje kot v koreninah. Te se tudi niso bistveno razlikovale med posameznimi tretmaji z različno vsebnostjo Hg in mikorizno kolonizacijo. Končna koncentracija Hg v tleh je bila nižja v mikoriznih tretmajih v primerjavi z nemikoriznimi, čeprav mikorizne koruze akumulirajo manj Hg kot nemikorizne. Do upada koncentracije Hg v tleh z mikorizno inokulacijo prihaja, ker mikorizne glive povečajo mikrobično aktivnost v rizosferi, pri čemer prihaja do redukcije Hg(II) v Hg(0), ki pa izhlapeva iz tal (Wu in sod., 2008; Huang in sod., 2009).

Jean-Philippe in sod. (2011) so raziskovali vpliv Hg na drevesne vrste in njihove mikorizne glive na s Hg onesnaženem področju v rezervatu Oak Ridge v ZDA. Na raziskovalni površini je rastlo 20 različnih vrst lesnatih rastlin. Da lesene vrste tvorijo simbiozo z ektomikoriznimi glivami, je že dobro poznano dejstvo (Agarwal in Sah, 2009). Jean-Philippe in sod. (2011) pa so poročali, da večina lesnatih vrst, ki so jih uporabili v poskusu, tvorijo simbiozo z endomikoriznimi glivami. Z analizo prsti so ugotovili, da so v tleh prisotne poleg ektomikorizne tudi endomikorizne glive. Ugotovili so, da koncentracije Hg v tleh ne vplivajo na raznolikost drevesnih vrst. Sklepali so, da glive ščitijo korenine dreves pred strupenimi učinki Hg s kemično imobilizacijo Hg. Opazili pa so, da z višanjem koncentracije Hg v tleh prihaja do upada endomikoriznih gliv, medtem ko se prisotnost ektomikoriznih gliv ni bistveno spremenila. O upadu mikorizne kolonizacije v tleh onesnaženih s Cu, Pb in Cr so poročali že v predhodnih raziskavah (Bell in sod., 1998). Rezultati raziskave Del Val in sod. (1999) so pokazali negativno korelacijo ( $P < 0,001$ ) med

sporami arbuskularnih gliv in vsebnostjo težkih kovin v tleh. Niso pa v vseh raziskavah dobili takih rezultatov. Griffioen in sod. (1994) ter Weissenhorn in sod. (1994) niso našli nobene korelacije med koncentracijo kovin v tleh in populacijo arbuskularno mikoriznih gliv. Obstaja tudi možnost, da mikorizne glive povečajo privzem Hg v rastline (Gabriel in sod., 1994), kar se je pokazalo tudi v poskusu Jean-Philippe in sod. (2011). Ti so sterilizirana semena platane *Platanus occidentalis* posejali v s Hg onesnaženo zemljo, ki je vsebovala ekto- in endo-mikorizne glive. Po 14 dneh so poželi rastline in ugotovili, da se je v koreninah platan nakopičilo precej Hg. O povečani akumulaciji težkih kovin v rastlinah so poročale tudi druge raziskave. Pacovsky (1986) je poročal o povečanem privzemu Zn in Cu ob prisotnosti arbuskularne mikorize pri soji, kar je potrdil tudi Fattah (2013). Slednji je poročal tudi o povečanem privzemu Mn in Fe v mikorizne rastline. Rastline, ki privzemajo povečane koncentracije težke kovin (hiperakumulacijske rastline) so zanimive zlasti zaradi možnosti uporabe za fitoremediacijo.

Najbrž bo potrebno narediti še veliko raziskav, da bomo razumeli vpliv mikorizne inokulacije na privzem živega srebra v rastline.

### **2.2.3 Arbuskularna mikoriza in selen**

Do sedaj so naredili le nekaj raziskav o vplivu AM gliv na akumulacijo in speciacijo Se (Yu in sod., 2011). Larsen in sod. (2006) so poročali, da mikorizna inokulacija za desetkrat poveča vsebnost Se v česnu. Tudi druge raziskave so poročale o povečanem privzemu Se v mikorizne rastline v primerjavi z nemikoriznimi (Dúran in sod., 2013; Wanek in sod., 1995). Munier-Lamy in sod. (2007) pa so dobili ravno nasprotne rezultate. Ugotovili so, da mikorizna inokulacija za 30 % zmanjša privzem Se v ljulko.

Mikorizna inokulacija pa vpliva tudi na oblike Se v rastlini. V mikoriznih tretmajih se je v primerjavi z nemikoriznimi nahajal več Se(VI) in manj organskih oblik Se (SeCys, SeMet, in MetSeCys) (Yu in sod., 2011).

Ne vplivajo pa samo glive na privzem Se. Durán in sodelovci (2013) so testirali tudi učinek glive *Glomus claroideum* na privzem Se skupaj z mešanico selenobakterij (*Stenotrophomonas* sp. B19, *Enterobacter* sp. B16, *Bacillus* sp. R12 in *Pseudomonas* sp. R8) in ugotovili značilno večji privzem Se v primerjavi z nemikoriznimi rastlinami, kar nakazuje na sinergistično delovanje mešanice selenobakterij in *G. claroideum*. To je uporabna kombinacija za biofortifikacijo žit.

### 2.3 FITOREMEDIACIJA

Fitoremediacija je proces, v katerem uporabljamo rastline za odstranjevanje nehlapljivih ogljikovodikov in nemobilnih anorganskih snovi iz tal. Rastline lahko uporabimo za odstranjevanje, prenos, stabilizacijo in/ali razgradnjo težkih kovin na onesnaženih tleh (Anderson in Plašči, 1994; Baker in sod., 1994; Markert, 1994; Raskin in sod., 1994; Salt in sod., 1995; Kumar in sod., 1995; Negri in Hinchman, 1996; Kling, 1997). Uporablja se kot alternativna metoda. Ohranja biološke lastnosti in fizično zgradbo tal. Pomembna je, ker je okolju prijazna in poceni metoda. Za fitoremediacijo se uporablja rastline, ki so za preživetje na onesnaženih področjih razvile različne mehanizme obrambe pred strupenimi kovinami. Ti mehanizmi delujejo na osnovi preprečevanja akumulacije težkih kovin v rastline ali pa kopiranja velikih količin težkih kovin v tkivih rastline. Rastline, ki kopirajo velike količine težkih kovin v tkivih, pravimo, da so hiperakumulacijske rastline (Khan in sod., 2000). Le redke rastline imajo takšne lastnosti (Cunningham in Ow, 1996). Trenutno je poznanih okoli 400 hiperakumulacijskih vrst rastlin (Kramer in sod., 1997).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 PRIPRAVA SUBSTRATA

Za substrat smo zmešali pesek in organski substrat za rože (Tonsubstrat) v razmerju 8:2 (4:1). Zatehtali smo 3204 g pripravljenega substrata. 160,8 mg HgCl<sub>2</sub> (Merck, Nemčija) smo s pomočjo magnetnega mešala raztopili v 700 mL vode. Z raztopino HgCl<sub>2</sub> smo po vsej površini prelili pripravljen substrat in ga dobro premešali. Končna koncentracija Hg v substratu je bila 50 mg kg<sup>-1</sup>. Pripravili smo tudi substrat brez dodanega HgCl<sub>2</sub> (kontrola), ki smo ga zalili samo z vodo in ga dobro premešali. Oba pripravljeni substrata smo zaprli v močni črni vrečki za smeti in pustili stati 10 dni, da bi se HgCl<sub>2</sub> čim bolj enakomerno porazdelil po pripravljenem substratu. Vmes smo pripravljena substrata še dvakrat dobro premešali.

Pripravili smo 24 lončkov s podstavkom (stekleni kozarček). Polovico lončkov smo napolnili s substratom brez HgCl<sub>2</sub>, ostalo polovico pa s substratom s HgCl<sub>2</sub>. V polovico lončkov, napolnjenih s substratom brez HgCl<sub>2</sub> in polovico lončkov, napolnjenih s substratom s HgCl<sub>2</sub>, smo zamešali komercialni inokulum Symbvit (Češka Republika), in sicer v vsak lonček posebej smo dali žličko in pol komercialnega inokuluma in ga dobro premešali s substratom. Lončke brez komercialnega inokuluma smo zalili z bakterijskim izvlečkom (BA). Bakterijski izvleček smo pripravili tako, da smo v sito s porami velikosti 45 µm dali 18 žlic komercialnega inokuluma in ga prelili z 2 L vode. Na tak način smo iz poskusa izločili glive, bakterije pa so nam ostale. V vsak lonček brez komercialnega inokuluma smo vlili približno 1,25 dcL bakterijskega izvlečka. Polovico lončkov vsake kombinacije smo namenili za tretiranje s selenom. Oznake in tretmaji so prikazani v Preglednici 1.

Preglednica 1: Oznake tretmajev (n = 3 za vsak tretma). V preglednici so izpisane oznake, ki smo jih uporabili, za označitev posameznega tretmaja. Legenda: AM – mikorizna inokulacija, c – kontrolne rastline, Hg – rastline tretirane z živim srebrom (v obliki HgCl<sub>2</sub>), Se – rastline tretirane s selenom (v obliki K<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>), BA – bakterijski izvleček

	Kontrola (brez HgCl <sub>2</sub> )	HgCl <sub>2</sub>	Kontrola+K <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> (brez HgCl <sub>2</sub> )	HgCl <sub>2</sub> + K <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>
<b>Kontrola (BA)</b>	c	Hg	cSe	HgSe
<b>AM</b>	AMc	AMHg	AMcSe	AMHgSe

### 3.2 KORUZA

Koruza je enoletna rastlina, ki spada v skupino trav Andropogoneae v družino Gramineae (Poaceae) (Strable in sod., 2009). Izvira iz Amerike, s Perujskega višavja v Andih. Večina sort v višino zraste do 2,5 metra, nekatere pa celo do 7 metrov. Steblo je okroglo, ravno in votlo ter sestavljeni iz 8-21 členkov. Iz vsakega členka izraščata 2 nasprotne ozke in proti koncu zašiljena lista. Listi so vzporedno ožiljeni. Cvetove delimo na moške in ženske. Moški cvetovi se nahajajo na vrhu rastline, ženski pa se razvijejo pri kolencih najnižjih listov. Oplojeni ženski cvetovi razvijejo zrna, ki so zbrana v strok. En strok običajno vsebuje od 30 do 1000 semen (Koruza, 2015).

Koruza je ena najpomembnejših kulturnih rastlin, rastlin na svetu. Skoraj že celo stoletje se uporablja tudi kot modelni organizem za bazične raziskave (Strable in sod., 2009).

### 3.3 PRIPRAVA SEMEN IN GOJENJE KORUZE

Iz 20 mL varekine (Pejo Sampionka) in 90 mL vode smo pripravili raztopino, v kateri smo sterilizirali semena koruze. Semena smo v raztopini varekine namakali 10 minut, nato pa smo jih 20 minut spirali pod tekočo vodo. Na koncu smo semena dobro sprali še z destilirano vodo. Ker vsa semena niso nujno viabilna, smo v vsak lonček posadili 6 semen koruze, na koncu pa pustili rasti 3 enako velike rastline. Odvečne koruze smo odrezali s škarjami in zavrgli. Ker so iz odrezanih stebel koruze pognali novi listi, smo postopek rezanja poganjkov nekajkrat ponovili, dokler porezane koruze niso propadle.

Ko so bili poganjki koruze veliki okoli 10 cm, smo jih začeli zalivati s Hoaglandovo hranilno raztopino. Hoaglandovo hranilno raztopino smo pripravili tako, da smo v 1 L vode zatehtali 4,044 g  $\text{KNO}_3$ , 9,442 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ , 0,208 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  in 3,677 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,22 g FeNa EDTA in dodali 10 mL A raztopine in 1 mL B raztopine. Raztopino A smo pripravili tako, da smo v 500 mL vode zatehtali 0,85 g  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 0,13 g  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , 0,15 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 1,55 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$  in 2,95 g  $\text{NaCl}$ . Za raztopino B pa smo v 200 mL vode zatehtali 0,176 g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ .

Pripravljena Hoaglandova hranilna raztopina vsebuje manj fosforja, zaradi česar glive bolje rastejo. 1dCL pripravljene Hoaglandove hranilne raztopine smo zmešali z 9 dCL vode in z njo zalivali koruze na vsakih 10 dni. Po potrebi smo rastline zalivali z vodo iz pipe.

Ko so bile koruzice velike okoli 10 cm, smo liste poškropili z raztopino  $\text{K}_2\text{SeO}_4$  (Alfa Aesar). Koncentracija tretiranja je bila 10 mg  $\text{K}_2\text{SeO}_4 \text{ m}^{-2}$ . Raztopino  $\text{K}_2\text{SeO}_4$  smo dobili

tako, da smo v 4 dcL destilirane H<sub>2</sub>O raztopili 1,6 mg K<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> in nekaj kapljic detergenta Kemex. Uporabili smo 2 dcL pripravljene raztopine K<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>, jo prelili v razpršilko in v digestoriju poškropili koruze tretirane s selenom z vseh strani. Kontrolne rastline smo poškropili z destilirano vodo, v katero smo kanili nekaj kapljic detergenta Kemex. Rastline so rasle en mesec.



Slika 4: Gojenje koruze v rastni komori

### 3.4 DOLOČANJE BIOMASE RASTLIN

Koruze smo vzeli iz lončka, otresli pesek, dobro oprali korenine, da smo odstranili ostanke substrata. Iz vsake posodice smo ločili vse tri koruze in jih obravnavali vsako posebej. Oprane in ločene koruze smo zavijali v papirnate brisače z ustreznimi oznakami. Koruze smo osušili, jih ločili na poganjke in korenine ter jih stehtali. Tako smo dobili svežo maso koruz. Za analizo monoaldehida (MDA) smo na sredini poganjkov odrezali približno 0,5 g listov. Ostali poganjek smo ponovno stehtali, zavili v folijo in zamrznili v tekočem dušiku. Korenine smo razdelili na dva približno enaka dela. Sredinski del korenin smo prenesli v petrijevke z destilirano vodo, ostali del korenin pa smo stehtali, zavili v folijo, zamrznili v tekočem dušiku ter prenesli v zamrzovalno skrinjo. Zmrznjene vzorce poganjkov in korenin smo liofilizirali (liofilizer Alpha 2-4 Christ). Suhe poganjke in korenine smo stehtali in določili suho maso.

### 3.5 LIPIDNA PEROXIDACIJA (MDA ANALIZA)

Lipidno peroksidacijo smo izvajali po prirejenem protokolu Heath in Packer (1968) po Du in Bramlage (1992).

Na sredini poganjkov smo odrezali približno 0,5 gramov lista in ga strli v terilnici s pomočjo tekočega dušika. V epico smo zatehtali 100 mg strtega materiala in ga takoj prenesli v zamrzovalno skrinjo. Po enakem postopku smo pripravili koreninski material.

Epice smo nato prenesli na led in vzorcem dodali 2 mL 5 % TCA (trikloroocenta kislina; Merck, Nemčija). Vzorce smo dobro zvorteksirali, nato pa jih 10 minut centrifugirali pri 12000 g pri 4 °C v centrifugi. Ker je nekaj koščkov rastlinskega tkiva po centrifugiranju še vedno plavalo na površini tekočine, smo vzorce prefiltrirali skozi 0,22 µm filtre (Millipore, Irska) s pomočjo injekcijske brizge. Nato smo v nove epice z luknjastim pokrovčkom odpipetirali iz vsakega vzorca 2-krat po 800 µl prefitriranega supernatanta. V vsako epico smo dodali še 800 µl raztopine 20 % TBA (2-tiobarbitudna kislina; Merck, Nemčija) + TCA. Pripravili smo tudi slepe vzorce. Ti niso vsebovali rastlinskega materiala, ampak samo 800 µl 5 % TCA in 800 µl 20 % TBA + TCA.

Raztopino 5 % TCA smo pripravili tako, da smo v 180 mL destilirane H<sub>2</sub>O raztopili 9 g TCA. Za raztopino 20 % TBA + TCA pa smo v 180 mL raztopili 1,206 g TBA in 36 g TCA. Soli smo raztopili s pomočjo magnetnega mešala in segrevanja. Nato smo raztopino prenesli v hladilnik, da se je ohladila.

Preluknjane epice z vsebino smo prenesli v pečico segreto na 95 °C za pol ure. Po končani inkubaciji smo jih prenesli na led, da so se na hitro ohladile. Sledilo je eno minutno centrifugiranje pri 12000 g pri 4 °C. Potem smo s pomočjo spektrofotometra 8452A (HP-Hewlett-Packard) pomerili absorpcijo pri 532 in 600 nm. Za vsak vzorec posebej smo uporabili novo čisto kiveto, ki smo jo po uporabi zavrgli. S pomočjo predhodno narejene umeritvene krivulje, dobljene iz razlike absorpcij, smo izračunali koncentracijo lipida MDA v vzorcu (enačba 1). Nato smo izračunali koncentracijo MDA na svežo maso vzorca (enačba 2).

Opomba: A = absorbanca

$$(A(532 \text{ nm}) - A(600 \text{ nm})) / 155 * 1000 \quad \dots (1)$$

$$\text{Koncentracija MDA (nM)} / 0,1 \text{ g} \quad \dots (2)$$

### 3.6 DOLOČANJE FOTOSINTEZNIH PIGMENTOV

Analizo fotosinteznih pigmentov smo naredili po sledečem postopku. V čiste centrifugirke smo zatehtali 30 mg uprašenih liofiliziranih poganjkov in dolili 5 mL 80% acetona (Empatra ASC, Nemčija) ter dobro zvorteksirali. Centrifugirke smo pokrili z gumijastimi pokrovčki. Označili smo nivo acetona in centrifugirke shranili čez noč v hladilniku. Naslednji dan smo dopolnili do označene črte izhlapeli aceton. Vzorce smo zvorteksirali in centrifugirali 2 minuti pri 2500 obratih/minuto pri sobni temperaturi. Absorbanco smo izmerili na spektrofotometru 8452A (HP-Hewlett Packard) pri valovnih dolžinah 647 nm, 664 nm in 470 nm. Za kalibracijo smo namesto vzorca vstavili kiveto z 80% acetonom, pomerili absorbanco in nastavili program tako, da je od vsakega izmerjenega vzorca odštel izmerjeno vrednost slepega vzorca.

Za izračun koncentracije pigmentov v  $\mu\text{mol/L}$ , smo uporabili naslednje enačbe:  
enačba 3 za koncentracijo klorofila *a*, 4 za klorofil *b* in 5 za karotenoide. Z uporabo enačbe 6 smo koncentracije pigmentov pretvorili v enoto  $\text{mg g}^{-1}$  (Graan in Ort, 1984).

$$chl_a \left( \frac{\mu\text{mol}}{l} \right) = 13,19 * A_{664} - 2,57 * A_{647} \quad \dots (3)$$

$$chl_b \left( \frac{\mu\text{mol}}{l} \right) = 22,10 * A_{647} - 5,26 * A_{664} \quad \dots (4)$$

$$\Sigma \text{karotenoidov} \left( \frac{\mu\text{mol}}{l} \right) = \frac{1000 * A_{470} - 1,82 * chl_a - 85,02 * chl_b}{198} \quad \dots (5)$$

$$\times \left( \frac{\text{mg}}{g} \right) = \frac{konc_{pigmenta} * V_{ekstrakta}}{m_{poganjkov} * 1000} \quad \dots (6)$$

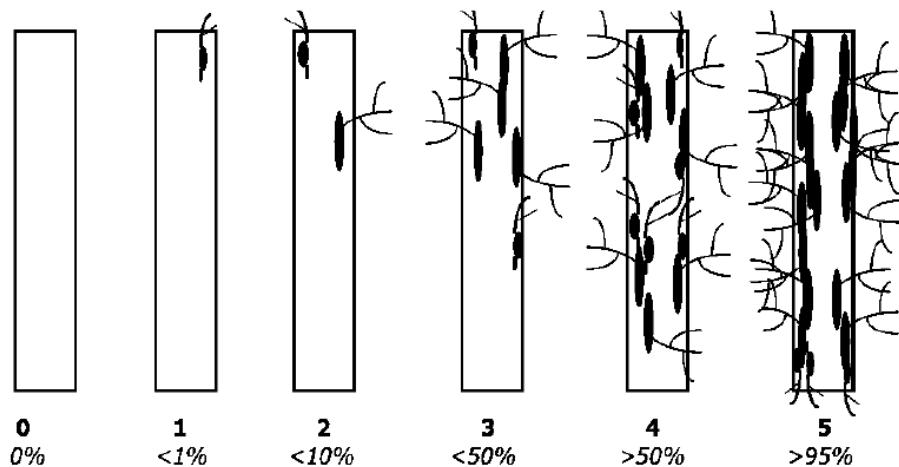


Slika 5: Določanje fotosinteznih pigmentov

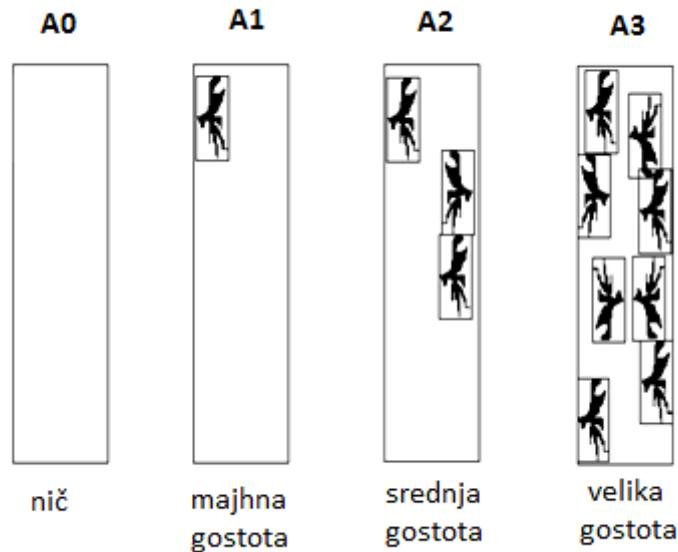
### 3.7 DOLOČANJE STOPNJE KOLONIZACIJE Z ARBUSKULARNO MIKORIZNIMI GLIVAMI

Za določanje prisotnosti mikorizne kolonizacije smo izbrali dele korenin, ki so rasli v substratu v lončku. Te smo shranili v epruvetah z ravnim dnem in jih zalili z 96% denaturiranim etilnim alkoholom (Stella). Čez dva dni smo korenine obarvali s tripan modrim po sledečem postopku. Najprej smo iz epruvet odlili alkohol, nato smo korenine 3-krat sprali z vodo iz pipe in na koncu še z destilirano vodo. Korenine smo prelili z 10% KOH in jih za 30 minut prenesli v pečico segreto na 90 °C. Nato smo iz epruvet odlili KOH in korenine 3-krat sprali z destilirano vodo. Korenine smo prekrili z barvilom tripan modrim in jih za 15 minut postavili v pečico segreto na 90 °C. Tripansko modro smo odlili, korenine pa 3-krat sprali z destilirano vodo. Korenine smo razrezali na 1 cm dolge fragmente in jih prenesli na objektna stekelca. Na vsako objektino steklce smo dali 10-15 fragmentov, nanesli nekaj kapljic laktoglicerola in jih pokrili s krovnimi stekelci. Iz vsakega poskusnega lončka sem pripravila 3-4 objektna steklca.

Fragmente korenin smo nato pregledali pod svetlobnim mikroskopom (Zeiss, binokularni mikroskop standard KF2). Za vsak fragment posebej smo ocenili splošno stopnjo mikorizne kolonizacije s pomočjo šest stopnjske lestvice (Slika 6) in gostoto struktur (veziklov, arbuskulov, svitkov) na podlagi 4 stopnjske lestvice (Slika 7). Iz podatkov smo izračunali arbuskularno mikorizne parametre po enačbah 7-16.



Slika 6: Lestvica za določevanje splošne stopnje mikorizne kolonizacije (po metodi Trouvelot in sod., 1986)



Slika 7: Lestvica za določevanje gostote arbuskulov, veziklov in svitkov v mikoriznem delu korenine (po metodi Trouvelot in sod., 1986)

Preglednica 2: Arbuskularno mikorizni parametri in njihova razlaga

<b>AM parameter</b>	<b>Razlaga parametrov, ki se nanašajo na celoten koreninski sistem</b>
F %	mikorizna frekvenca – frekvenca fragmentov z glivo
M %	splošna intenziteta mikorize – intenziteta mikorizne kolonizacije koreninskega sistema
A %	gostota arbuskulov v koreninskem sistemu
V %	gostota veziklov v koreninskem sistemu
MiS %	gostota mikrosklerocijev v koreninskem sistemu

<b>AM parameter</b>	<b>Razlaga parametrov, ki se nanašajo le na koloniziran del koreninskega sistema</b>
m %	intenziteta mikorize v koloniziranih koreninskih fragmentih
a %	gostota arbuskulov v delu korenine z mikorizno kolonizacijo
v %	gostota veziklov v delu korenine z mikorizno kolonizacijo
mis %	gostota mikrosklerocijev v delu korenine z mikorizno kolonizacijo

Formule za izračun arbuskularno mikoriznih parametrov:

Mikorizna frekvenca:

$$F \% = (\text{št. mikoriznih korenin}/\text{št. vseh korenin}) * 100 \quad \dots (7)$$

Splošna inteziteta mikorize:

$$M \% = (95n5 + 70n4 + 30n3 + 5n2 + n1)/\text{št. vseh korenin} \quad \dots (8)$$

Inteziteta mikorize v koloniziranih koreninskih odsekih (ko je F % nizek):

$$m \% = M * (\text{št. vseh korenin})/(\text{št. mikoriznih korenin}) = M * 100/F \quad \dots (9)$$

Gostota arbuskulov v koreninskem sistemu:

$$A \% = a * (M/100) \quad \dots (10)$$

Gostota veziklov v koreninskem sistemu:

$$V \% = v * (M/100) \quad \dots (11)$$

Gostota mikroskerocijev v koreninskem sistemu:

$$MiS \% = mis * (M/100) \quad \dots (12)$$

Gostota arbuskulov v delu skorje z mikorizno kolonizacijo:

$$a \% = (100mA3 + 50mA2 + 10mA1)/100 \quad \dots (13)$$

Gostota veziklov v delu skorje z mikorizno kolonizacijo:

$$v \% = (100mV3 + 50mV2 + 10mV)/100 \quad \dots (14)$$

Gostota mikrosklerocijev v delu skorje z mikorizno kolonizacijo:

$$mis \% = (100mMS3 + 50mMS2 + 10mMS)/100 \quad \dots (15)$$

### 3.8 DOLOČANJE VSEBNOSTI ELEMENTOV V POGANJKIH IN KORENINAH KORUZE

#### 3.8.1 Priprava vzorcev

Tehtanje in razklop vzorcev smo izvedli na Inštitutu Jožef Stefan, meritve elementov pa na Oddelku za analizno kemijo na Kemijskem inštitutu.

Liofilizirane korenine in poganjke smo strli s pomočjo tekočega dušika. Nato smo v teflonke natehtali 100 mg suhega materiala vsakega vzorca. V digestoriju smo v vsako teflonko z našim vzorcem dolili 3 mL 65% HNO<sub>3</sub> (Sigma aldrich). Teflonke smo dobro zaprli in prenesli v mikrovalovko MarsExpress, kjer je potekal razklop materiala po programu Solata. Program Solata vsebuje 30 minutno segrevanje do 180 °C, 30 minutni razklop na 180 °C, na koncu pa še 30 minut ohlajanja. Teflonke smo nato pustili čez noč v mikrovalovki, da so se ohladile. Naslednji dan smo vzorec iz teflonk prelili v falkonke. Delo smo nadaljevali na Kemijskem inštitutu. Za merjenje koncentracije Hg smo v nove plastične epruvete s pokrovčkom odpipetirali 1 mL našega razklopljenega vzorca, ter mu dodali 1 mL HCl, 50 µL internega standarda (IS) (Y, Se, Ge, Gd, 10 mg kg<sup>-1</sup>) ter do oznake 10 mL na epruvet dolili bidestilirano vodo Mili Q. Za merjenje ostalih elementov smo pripravili vzorce po enakem postopku kot za Hg, le da tu nismo dodali HCl. Vse pripravljene vzorčke smo na koncu dobro premešali.



Slika 8: Mikrovalovka MarsExpress

### 3.8.2 Priprava standardov

Pripravili smo založne raztopine za Hg s koncentracijo 0,2, 1 in 5 mg kg<sup>-1</sup>. Za 0,2 mg kg<sup>-1</sup> raztopino smo odpipetirali 2 µL, za 1 mg kg<sup>-1</sup> 10 µL raztopine Hg (1000 mg kg<sup>-1</sup>, Merck, Nemčija), za 5 mg kg<sup>-1</sup> pa 50 µL 1000 mg kg<sup>-1</sup> raztopine Hg. Vse tri raztopine smo redčili z bdestilirano vodo do končnega volumna 10 mL.

Založne raztopine smo uporabili za pripravo standardnih raztopin za merjenje koncentracije Hg (Preglednica 3) in Se (Preglednica 4). Za pripravo standardov za S smo vzeli ICP elementne standarde s koncentracijo 1000 mg kg<sup>-1</sup> (Merck, Nemčija) (Preglednica 5).

Preglednica 3: Priprava standardnih raztopin za Hg (IS - interni standard). Vsak standard (0,01-100 µg kg<sup>-1</sup> Hg) smo pripravili tako kot piše v tabeli. Končni volumen 10 mL smo dobili tako, da smo raztopini na koncu dolili bdestilirano vodo do oznake 10 mL na epruveti.

Koncentracija Hg (µg kg <sup>-1</sup> )	V Hg (0,2 mg kg <sup>-1</sup> ) (µL)	IS (Ge, Y, Ga, Sc) (µL)	V HNO <sub>3</sub> (µL)	V HCl (µL)	Končni volumen (mL)
0,01	0,5	50	250	750	10
0,05	2,5	50	250	750	10
Koncentracija Hg (µg kg <sup>-1</sup> )	V Hg (1 mg kg <sup>-1</sup> ) (µL)	IS (Ge, Y, Ga, Sc) (µL)	V HNO <sub>3</sub> (µL)	V HCl (µL)	Končni volumen (mL)
0,1	1	50	250	750	10
0,25	2,5	50	250	750	1
0,5	5	50	250	750	10
Koncentracija Hg (µg kg <sup>-1</sup> )	V Hg (5 mg kg <sup>-1</sup> ) (µL)	IS (Ge, Y, Ga, Sc) (µL)	V HNO <sub>3</sub> (µL)	V HCl (µL)	Končni volumen (mL)
0	0	50	250	750	10
1	2	50	250	750	10
5	10	50	250	750	10
10	20	50	250	750	10
20	40	50	250	750	10
50	100	50	250	750	10
100	200	50	250	750	10

Preglednica 4: Priprava standardnih raztopin za Se. Vsak standard ( $1\text{-}10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) smo pripravili tako kot piše v tabeli. Končni volumen 10 mL smo dobili tako, da smo na koncu raztopini dolili bidestilirano vodo do oznake 10 mL na epruveti.

Koncentracija ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	V IV ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) uL	IS (Ge, Y, Ga, Sc) (uL)	Končni V (mL)
1	2	50	10
2,5	5	50	10
5	10	50	10
10	20	50	10

Pripravili smo  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  in  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  založne raztopine, ki smo jih uporabili za pripravo standardov za merjenje S in Se.

- Za založno raztopino IV ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) smo 10 uL standardne raztopine IV ( $1000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) dolili 2%  $\text{HNO}_3$  (0,2 mL  $\text{HNO}_3$  + MiliQ do 10 mL) do končnega volumna 10 mL.
- Za založno raztopino IV ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) smo 10 uL standardne raztopine IV ( $1000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) dolili 2%  $\text{HNO}_3$  (0,2 mL  $\text{HNO}_3$  + MiliQ do 10 mL) do končnega volumna 10 mL.

Preglednica 5: Priprava standardnih raztopin za S. Za merjenje koncentracij žvepla smo pripravili standarde  $0\text{-}10 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Standarde smo pripravili tako kot piše v tabeli. Končni volumen 10 mL smo dobili tako, da smo raztopini na koncu dolili bidestilirano vodo do oznake 10 mL na epruveti.

Standardi za S			
Koncentracija S ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	V od S ( $1000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ( $\mu\text{L}$ )	IS ( $\text{Y, Sc } 100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ( $\mu\text{L}$ )	Končni V
0	0	100	10
0,5	5	100	10
1	10	100	10
5	50	100	10
10	100	100	10

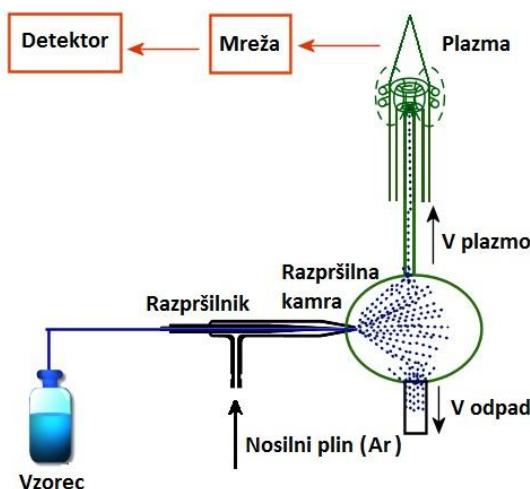
Standarde raztopine smo uporabili za kalibracijo. Koncentracijo Hg in Se smo izmerili s pomočjo masne spektrometrije z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS), koncentracije S pa s pomočjo atomsko emisijske spektrometrije z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-AES, 2013).

### 3.8.3 Masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS)

Masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS) je vrsta masne spektrometrije, ki se uporablja za zaznavo kovin in nekaterih nekovin v nizkih koncentracijah ( $1\text{-}0,01\mu\text{g g}^{-1}$ ). Vzorec najprej potuje v razpršilnik, kjer se razprši na majhne kapljice (aerosole), nato pa ga argon ali helij odnese v induktivno sklopljeno plazmo. Ta ima zelo visoko temperaturo (okoli  $8000\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ki povzroči ionizacijo vzorca. Ione odnese skozi serijo močnih magnetov, imenovanih masni spektrometer. Masni spektrometer loči posamezne ione na podlagi razmerja med maso in nabojem. Ioni potujejo do detektorja, ki prepozna vrste ionov (Inductively...atomic emission spectroscopy...., 2015; Inductively... Mass Spectrometry, 2015).

### 3.8.4 Atomsko emisijska spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-AES)

Atomsko emisijska spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-AES) oz. optična emisijska spektrometrija (ICP-OES) je analizna tehnika, ki se uporablja za določevanje kovin. Metoda se rutinsko uporablja za analizo elementov. Temelji na uporabi induktivno sklopljene plazme s katero se vzbuja atome in ione. Posledično ti pridobijo lastnosti elektromagnetnega sevanja z valovnimi dolžinami, ki so značilne za vsak element posebej. Od koncentracije elementa v vzorcu je odvisno, kakšna bo intenziteta te emisije. Spodnja meja detekcije elementa je navadno  $1\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$  (Inductively...atomic...spectroscopy, 2015)



Slika 9: Shema potovanja vzorca po napravi ICP-AES

Vzorčna raztopina potuje v razpršilnik, kjer se razprši na majhne kapljice (tako kot v megli). Ta oblak kapljic tok argona odnese v argonovo plazmo. Plazma (ioniziran argon) doseže temperature do okoli  $7000^{\circ}\text{C}$ , zaradi česar pride do vzbujanja elektronov v zunanjih orbitalah elementov. Medtem ko se vzbujeni elektroni vračajo nazaj v prvotno (nevzbujeno) stanje, se sprostijo fotoni (svetloba) z energijo, ki je značilna za vsak element posebej. Ker vzorec vsebuje mešanico elementov in ker se sproščajo fotoni iz vseh elementov istočasno, dobimo spekter valovnih dolžin. V spektrometu je vstavljena disperzijska mreža, ki razprši svetlobo, da se ločijo emisije elementov, ki potujejo do detektorja. Močnejša kot je intenziteta svetlobe, večja je koncentracija elementa. Računalnik pretvori elektronske dražljaje iz detektorja v koncentracije posameznih elementov (ICP-AES, 2013).

### 3.9 MAPIRANJE PORAZDELITVE Hg V KORENINAH RASTLIN

Razporeditev živega srebra v korenini smo določevali s pomočjo laserske ablacie z induktivno sklopljeno plazmo in masno spektrometrijo (LA-ICP-MS).

Pri tej metodi trden vzorec direktno obsevamo s pulzirajočim laserskim žarkom, pri čemer nastajajo aerosoli. Aerosoli se prenesejo v induktivno sklopljeno argonsko plazmo z temperaturo okoli  $8000^{\circ}\text{C}$ . V plazmi prihaja do tvorbe ionov, ki jih odnese v masni spektrometer, kjer se ponovno ločijo na podlagi mase in naboja (Laser Ablation..., 2015).

Očiščene, z destilirano vodo oprane korenine, smo razrezali na fragmente, dolge okoli 5 centimetrov. Vstavili smo jih v igle, jih potopili v sredstvo za zamrzovanje (Tissue Freezing Medium, Leica) ter jih zamrznili v propanu ohljenem s tekočim dušikom. S pomočjo kriotoma smo jih razrezali na rezine debeline 35  $\mu\text{m}$ . Rezine smo prenesli v posebne aluminjaste posodice in jih 3 dni liofilizirali. Suhe vzorce smo prenesli na objektna steklca. Vzorce smo nato analizirali s pomočjo LA-ICP-MS. Pri analizi smo uporabili 213 nm Nd: YAG laser (New Wave Research, Fremont, CA) povezan s kvadropolnim ICP-MS (Agilent 7500ce, Agilent technologies, Palo Alto, CA). Delali smo z 10 mL super celico. Premer žarka je znašal 15  $\mu\text{m}$ , premik 15  $\mu\text{m}/\text{s}$ , pretok energije je bil  $2,5 \text{ J cm}^{-2}$  in frekvenca 10 Hz.



Slika 10: LA-ICP-MS

### 3.10 STATISTIČNA ANALIZA

Za analizo podatkov smo uporabili standardne statistične metode. Podatke smo obdelali v programu MS Excel 2007 in programu Statistica (Statsoft 7.0.61.0.). Statistično značilne razlike smo določili z Duncanovim testom v programu enosmerna ANOVA. Elementne mape za Hg smo pripravili v programu PyMCA software (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, Francija).

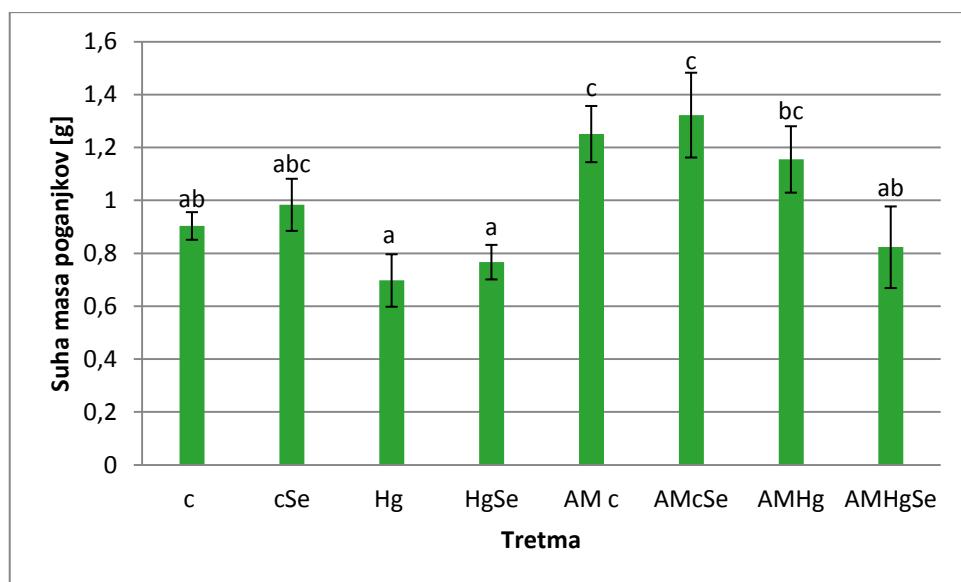
## 4 REZULTATI

### 4.1 BIOMASA RASTLIN

#### 4.1.1 Poganjki

Faktorska analiza ANOVA je pokazala statistično značilen vpliv arbuskularne mikorize in živega srebra na suho maso poganjkov (Preglednica 6).

Suhi masi poganjkov inokuliranih kontrolnih rastlin (AMc) in inokuliranih rastlin z dodanim selenom (AMcSe) sta bili statistično značilno večji od suhih mas poganjkov inokuliranih rastlin tretiranih s Hg in Se (AMHgSe), neinokuliranih rastlin tretiranih s Hg in Se (HgSe), kontrolnih rastlin (c) in rastlin, tretiranih s Hg (Hg). Suha masa poganjkov inokuliranih rastlin tretiranih s Hg (AMHg) je bila statistično značilno večja od suhe mase poganjkov rastlin tretiranih s Hg in Se (HgSe) in rastlin tretiranih s Hg (Hg). Največjo biomaso so imele inokulirane rastline tretirane s selenom (AMcSe), najmanjšo pa rastline tretirane z živim srebrom (Hg). Med ostalimi tretmaji ni statistično značilnih razlik (Slika 11).



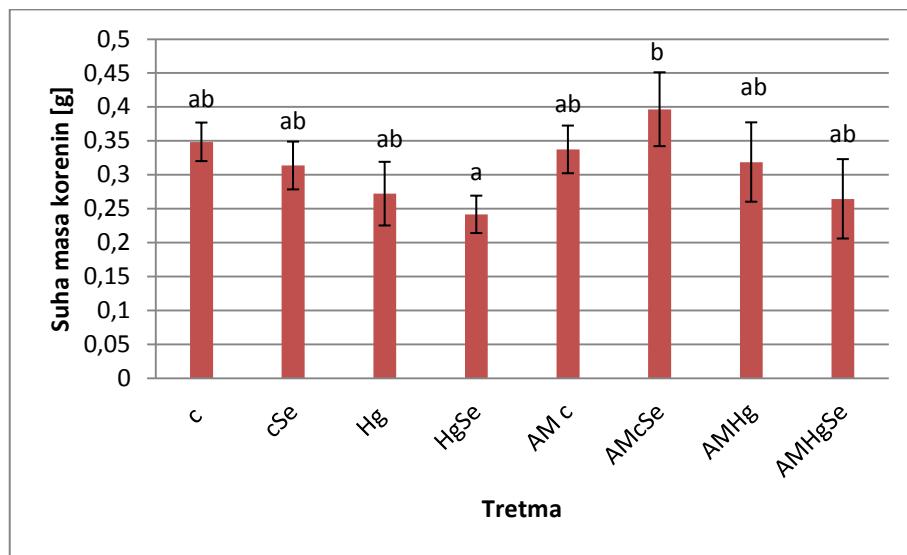
Slika 11: Suha masa poganjkov koruze v različnih tretmajih. Legenda: AM – mikorizna inokulacija, c – kontrolne rastline, Hg – rastline tretirane z živim srebrom (v obliki  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s selenom (v obliki  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ). Povprečje  $\pm$  standardna napaka, N = od 8 do 9. Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, Duncanov test,  $p < 0,05$ ).

Preglednica 6: Rezultati faktorske ANOVA za suho maso poganjkov. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ( $p < 0,05$ ). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $HgCl_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $K_2SeO_4$ ).

	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Intercept</b>	<b>69,18779</b>	<b>1</b>	<b>69,18779</b>	<b>619,2120</b>	<b>0,000000</b>
<b>AM</b>	<b>1,59702</b>	<b>1</b>	<b>1,59702</b>	<b>14,2929</b>	<b>0,000350</b>
<b>Hg</b>	<b>1,14862</b>	<b>1</b>	<b>1,14862</b>	<b>10,2798</b>	<b>0,002114</b>
Se	0,01363	1	0,01363	0,1220	0,728047
<b>AM*Hg</b>	0,03300	1	0,03300	0,2953	0,588749
<b>AM*Se</b>	0,18574	1	0,18574	1,6623	0,202009
<b>Hg*Se</b>	0,18990	1	0,18990	1,6995	0,197092
<b>AM*Hg*Se</b>	0,17127	1	0,17127	1,5328	0,220282
<b>Napaka</b>	7,03932	63	0,11174		

#### 4.1.2 Korenine

Faktorska analiza ANOVA je pokazala statistično značilen vpliv živega srebra na suho maso korenin (Preglednica 7).



Slika 12: Suha masa korenin koruze v različnih tretmajih. Legenda: AM – mikorizna inokulacija, c – kontrolne rastline, Hg – rastline tretirane z živim srebrom (v obliki  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s selenom (v obliki  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ). Povprečje ± standardna napaka, N = od 8 do 9. Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmajmi (enosmerna ANOVA, Duncanov test,  $p < 0,05$ ).

Preglednica 7: Rezultati faktorske ANOVA za suho maso korenin. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ( $p < 0,05$ ). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ).

	SS	df	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>6,880849</b>	<b>1</b>	<b>6,880849</b>	<b>390,977</b>	<b>0</b>
<b>AM</b>	0,022134	1	0,022134	1,2577	0,266345
<b>Hg</b>	<b>0,099163</b>	<b>1</b>	<b>0,099163</b>	<b>5,6346</b>	<b>0,020671</b>
<b>Se</b>	0,004052	1	0,004052	0,2302	0,633016
<b>AM*Hg</b>	0,000006	1	0,000006	0,0003	0,985397
<b>AM*Se</b>	0,005486	1	0,005486	0,3117	0,578614
<b>Hg*Se</b>	0,013198	1	0,013198	0,75	0,389778
<b>AM*Hg*Se</b>	0,015405	1	0,015405	0,8753	0,353063
<b>Napaka</b>	1,108744	63	0,017599		

Največjo suho maso korenin so imele inokulirane rastline tretirane s Se (AMcSe), najmanjšo pa neinokulirane rastline tretirane s Hg in Se (HgSe). Suhu masi korenin obeh tretmajev sta se statistično značilno razlikovali. Med ostalimi tretmaji ni bilo statistično značilnih razlik (Slika 12). Če primerjamo inokulirane z neinokuliranimi rastlinami, je razviden trend povečanja suhe mase korenin v vseh inokuliranih tretmajih razen v kontrolnem tretmaju, ki ni bil tretiran s Hg in Se (AM c).

## 4.2 ANALIZA FOTOSINTEZNIH PIGMENTOV

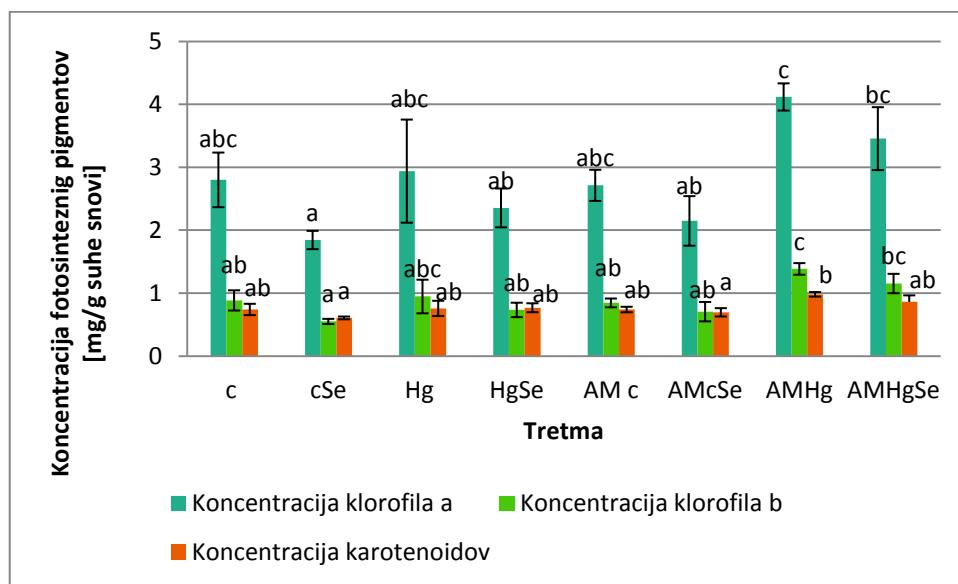
Faktorska analiza ANOVA je pokazala statistično značilen vpliv živega srebra in selena na koncentracijo klorofila *a* (Preglednica 8), statistično značilen vpliv arbuskularne mikorize, živega srebra in selena na koncentracijo klorofila *b* (Preglednica 9) ter statistično značilen vpliv živega srebra na koncentracijo karotenoidov (Preglednica 10) v poganjkih.

Med neinokuliranimi rastlinami ni bilo statistično značilnih razlik v koncentraciji klorofila *a* (Slika 13). Med inokuliranimi rastlinami so se koncentracije klorofila *a* statistično značilno razlikovale med rastlinami tretiranimi s Hg (AMHg) in rastlinami tretiranimi s Se (AMcSe). Tretma AMHg se je v koncentracijah klorofila *a* statistično značilno razlikovala tudi od neinokuliranih rastlin tretiranih s selenom (cSe) in neinokuliranih rastlin tretiranih s Hg in Se (HgSe). Ostali tretmaji se med seboj niso statistično razlikovali. Največjo koncentracijo klorofila *a* je imel tretma AMHg, najmanjšo pa cSe.

Najvišje koncentracije klorofila *b* (Slika 13) smo izmerili v inokuliranih rastlinah tretiranih s Hg (AMHg), ki so bile statistično značilno višje od koncentracij vseh tretmajev, razen od koncentracij v neinokuliranih rastlinah tretiranih s Hg (Hg) in inokuliranih rastlinah tretiranih s Hg in Se (AMHgSe). Najnižje koncentracije klorofila *b* smo izmerili v rastlinah tretiranih s Se (cSe), ki se je poleg koncentracij klorofila *b* v inokuliranih rastlinah, tretiranih s Hg (AMHg), statistično značilno razlikovala še od koncentracij klorofila *b* v inokuliranih rastlinah tretiranih s Hg in Se (AMHgSe). Med ostalimi tretmaji ni bilo statistično značilnih razlik.

Najvišje koncentracije karotenoidov (Slika 13) so imele inokulirane rastline tretirane s Hg (AMHg), ki so se statistično značilno razlikovale od izmerjenih koncentracij karotenoidov v inokuliranih rastlinah tretiranih s Se (AMcSe) in neinokuliranih rastlinah tretiranih s Se (cSe), kjer je bila koncentracija karotenoidov najmanjša. Med ostalimi tretmaji ni bilo statistično značilnih razlik.

Ob primerjavi rezultatov inokuliranih in neinokuliranih tretmajev so bile koncentracije tako klorofila *a*, klorofila *b* kot tudi karotenoidov v neinokuliranem kontrolnem tretmaju (c) in inokuliranem kontrolnem tretmaju (AMc) zelo podobne, pri vseh ostalih tretmajih pa so bile višje v inokuliranih rastlinah (Slika 13).



Slika 13: Koncentracija klorofila *a*, klorofila *b* in karotenoidov v poganjkih v različnih tretmajih. Legenda: AM – mikorizna inokulacija, c – kontrolne rastline, Hg – rastline tretiranje z živim srebrom (v obliki  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s selenom (v obliki  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ). Povprečje  $\pm$  standardna napaka, N = od 8 do 9. Statistična analiza ANOVA je narejena za vsak pigment posebej (enosmerna ANOVA, Duncanov test, p <0,05).

Preglednica 8: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo klorofila *a*. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom (p <0,05). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ).

	SS	df	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>176,6197</b>	<b>1</b>	<b>176,6197</b>	<b>334,1526</b>	<b>0,000000</b>
<b>AM</b>	2,1968	1	2,1968	4,1562	0,059512
<b>Hg</b>	<b>3,9849</b>	<b>1</b>	<b>3,9849</b>	<b>7,5392</b>	<b>0,015014</b>
<b>Se</b>	<b>2,7012</b>	<b>1</b>	<b>2,7012</b>	<b>5,1104</b>	<b>0,039082</b>
<b>AM*Hg</b>	1,5020	1	1,5020	2,8416	0,112536
<b>AM*Se</b>	0,0344	1	0,0344	0,0651	0,802007
<b>Hg*Se</b>	0,0265	1	0,0265	0,0501	0,825857
<b>AM*Hg*Se</b>	0,0775	1	0,0775	0,1465	0,707241
<b>Napaka</b>	7,9284	15	0,5286		

Preglednica 9: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo klorofila *b*. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ( $p < 0,05$ ). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $HgCl_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $K_2SeO_4$ ).

	SS	Df	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>18,32367</b>	<b>1</b>	<b>18,32367</b>	<b>291,8557</b>	<b>0,000000</b>
<b>AM</b>	<b>0,33454</b>	<b>1</b>	<b>0,33454</b>	<b>5,3285</b>	<b>0,035643</b>
<b>Hg</b>	<b>0,53550</b>	<b>1</b>	<b>0,53550</b>	<b>8,5293</b>	<b>0,010547</b>
<b>Se</b>	<b>0,29783</b>	<b>1</b>	<b>0,29783</b>	<b>4,7439</b>	<b>0,045772</b>
<b>AM*Hg</b>	0,19432	1	0,19432	3,0951	0,098904
<b>AM*Se</b>	0,01097	1	0,01097	0,1747	0,681865
<b>Hg*Se</b>	0,00027	1	0,00027	0,0044	0,948263
<b>AM*Hg*Se</b>	0,01624	1	0,01624	0,2587	0,618443
<b>Napaka</b>	0,94175	15	0,06278		

Preglednica 10: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo karotenoidov. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ( $p < 0,05$ ). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $HgCl_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $K_2SeO_4$ ).

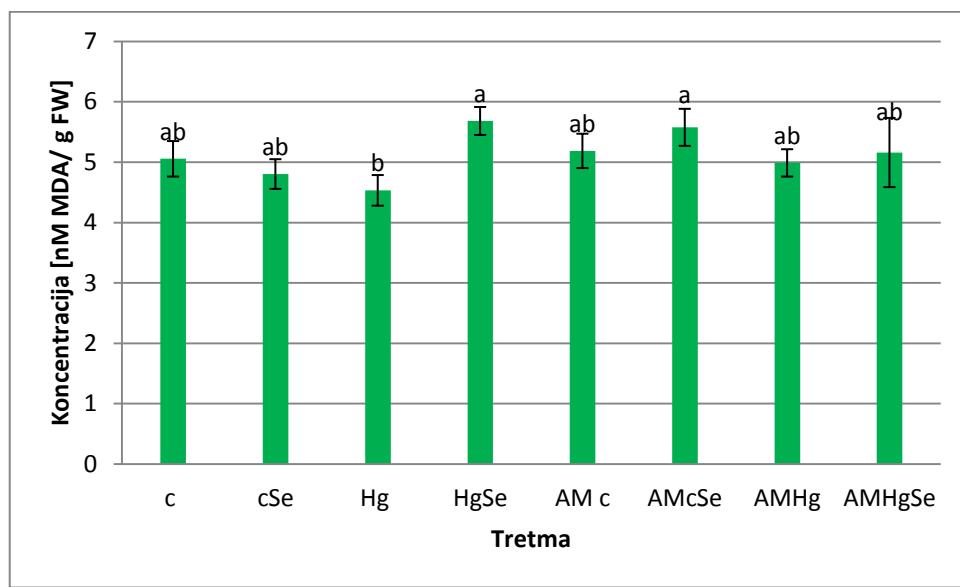
	SS	df	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>13,35891</b>	<b>1</b>	<b>13,35891</b>	<b>788,7395</b>	<b>0,000000</b>
<b>AM</b>	0,05757	1	0,05757	3,3993	0,085067
<b>Hg</b>	<b>0,12044</b>	<b>1</b>	<b>0,12044</b>	<b>7,1112</b>	<b>0,017595</b>
<b>Se</b>	0,02949	1	0,02949	1,7410	0,206798
<b>AM*Hg</b>	0,01845	1	0,01845	1,0892	0,313173
<b>AM*Se</b>	0,00060	1	0,00060	0,0352	0,853681
<b>Hg*Se</b>	0,00166	1	0,00166	0,0979	0,758693
<b>AM*Hg*Se</b>	0,01722	1	0,01722	1,0169	0,329247
<b>Napaka</b>	0,25406	15	0,01694		

#### 4.3 LIPIDNA PEROXIDACIJA

Faktorska analiza ANOVA je pokazala statistično značilen vpliv kombinacije arbuskularne mikorize, živega srebra in selena na koncentracijo MDA v poganjkih (Preglednica 11). Pokazala je tudi statistično značilen vpliv mikorize, selena ter kombinacije živega srebra in selena na koncentracijo MDA v koreninah (Preglednica 12).

V poganjkih so se v koncentraciji MDA (Slika 14) med seboj razlikovale neinokulirane rastline tretirane samo s Hg (Hg) (najnižja koncentracija MDA) od inokuliranih rastlin tretiranih s Se (AMcSe), ter neinokuliranih rastlin tretiranih s Hg in Se (HgSe) (najvišje koncentracije MDA). Ostali tretmaji se med seboj niso značilno razlikovali. V inokuliranih tretmajih je v primerjavi z neinokuliranimi opaziti trend povečevanja koncentracije MDA.

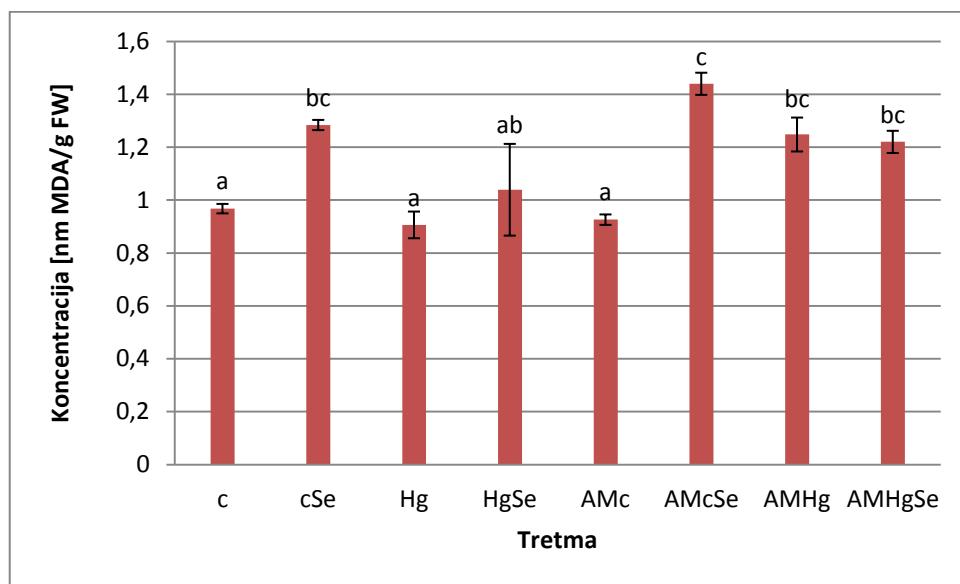
V koreninah so imeli neinokulirani kontrolni tretma (c), neinokuliran tretma s Hg (Hg) in inokuliran kontrolni tretma (AMc) (najnižje koncentracije MDA), statistično značilno nižje koncentracije MDA v primerjavi z vsemi ostalimi tretmaji, razen neinokuliranega tretmaja tretiranega s Hg in Se (HgSe) (Slika15). Tretma HgSe je imel statistično značilno nižje koncentracije MDA kot inokuliran tretiran s Se (AMcSe). Med ostalimi tretmaji ni bilo statistično značilnih razlik. Če primerjamo inokulirane tretmaje z neinokuliranimi, ugotovimo, da so koncentracije MDA statistično značilno višje v inokuliranih tretmajih tretiranih s Hg (AMHg in AMHgSe) v primerjavi s kontrolnim tretmajem Hg. Tudi neinokuliran kontrolni tretma tretiran s Hg in Se (HgSe) je imel nižjo koncentracijo MDA v primerjavi s tretmajema AMHg in AMHgSe, vendar pa razlike niso bile statistično značilne. Inokulacija ni vplivala na koncentracijo MDA v kontrolnem tretmaju (AMc) in tretmaju tretiranim s Se (AMcSe) glede na kontrolna tretmaja (c in cSe).



Slika 14: Koncentracija MDA v poganjkih v različnih tretmajih. Legenda: AM – mikorizna inokulacija, c – kontrolne rastline, Hg – rastline tretirane z živim srebrom (v obliki  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s selenom (v obliki  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ). Povprečje ± standardna napaka, N = 3. Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmajmi (enosmerna ANOVA, Duncanov test, p <0,05).

Preglednica 11: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo MDA v poganjkih. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom (p <0,05). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ).

	SS	df	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>3721,044</b>	<b>1</b>	<b>3721,044</b>	<b>2576,228</b>	<b>0,000000</b>
<b>AM</b>	1,543	1	1,543	1,068	0,303223
<b>Hg</b>	0,153	1	0,153	0,106	0,745108
<b>Se</b>	4,696	1	4,696	3,251	0,073613
<b>AM*Hg</b>	2,101	1	2,101	1,454	0,229965
<b>AM*Se</b>	0,253	1	0,253	0,175	0,676071
<b>Hg*Se</b>	3,091	1	3,091	2,140	0,145851
<b>AM*Hg*Se</b>	<b>5,830</b>	<b>1</b>	<b>5,830</b>	<b>4,036</b>	<b>0,046546</b>
<b>Napaka</b>	193,547	134	1,444		



Slika 15: Koncentracija MDA v koreninah v različnih tretmajih. Legenda: AM – mikorizna inokulacija, c – kontrolne rastline, Hg – rastline tretirane z živim srebrom (v obliki  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s selenom (v obliki  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ). Povprečje ± standardna napaka, N = 3. Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmajmi (enosmerna ANOVA, Duncanov test, p <0,05).

Preglednica 12: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo MDA v koreninah. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom (p <0,05). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ).

	SS	df	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>54,36554</b>	1	<b>54,36554</b>	<b>1630,460</b>	<b>0,000000</b>
<b>AM</b>	<b>0,27041</b>	1	<b>0,27041</b>	<b>8,110</b>	<b>0,007231</b>
<b>Hg</b>	0,02772	1	0,02772	0,831	0,367926
<b>Se</b>	<b>0,58247</b>	1	<b>0,58247</b>	<b>17,469</b>	<b>0,000178</b>
<b>AM*Hg</b>	0,11124	1	0,11124	3,336	0,076068
<b>AM*Se</b>	0,00090	1	0,00090	0,027	0,870450
<b>Hg*Se</b>	<b>0,35012</b>	1	<b>0,35012</b>	<b>10,500</b>	<b>0,002571</b>
<b>AM*Hg*Se</b>	0,08552	1	0,08552	2,565	0,118003
<b>Napaka</b>	1,20037	36	0,03334		

#### 4.4 MIKORIZNA INOKULACIJA

Faktorska analiza ANOVA je pokazala statistično značilen vpliv inokulacije z AM inokulumom

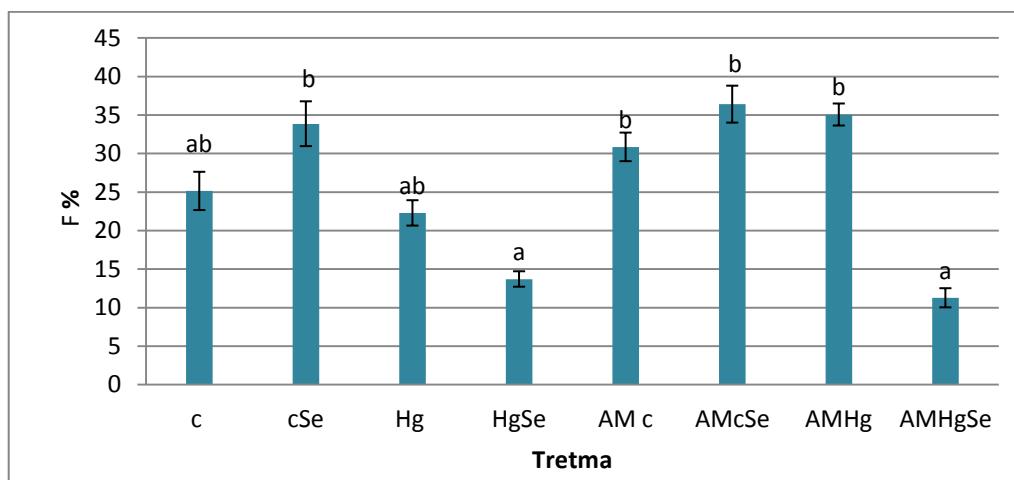
na mikorizne parametre:

- gostoto arbuskulov v delu korenine z mikorizno inokulacijo (a %)
- gostoto arbuskulov v koreninskem sistemu (A %)
- gostoto veziklov v delu korenine z mikorizno inokulacijo (v %)
- gostoto veziklov v koreninskem sistemu (V %)

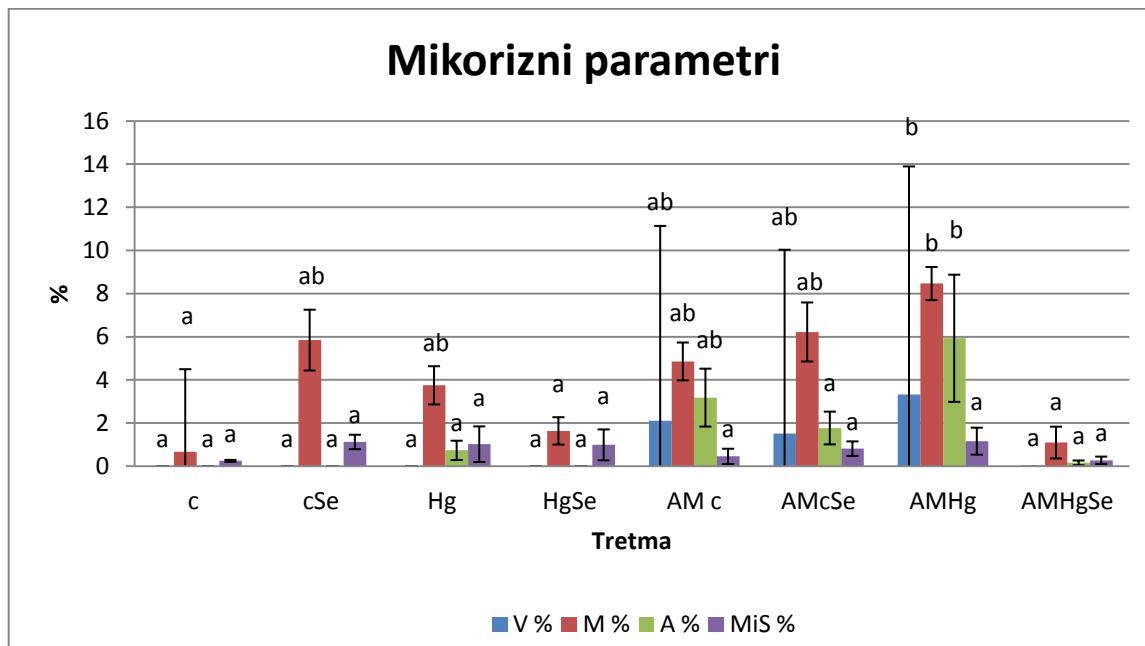
Na ostale mikorizne parametre (F %, M %, MiS %, m %, mis% (razlaga oznak v Preglednici 2) pa ni statistično značilno vplivala (Priloga A).

Vezikli so bili prisotni le v koreninah inokuliranih rastlin, v koreninah neinokuliranih rastlin, pa jih nismo opazili. Največjo gostoto veziklov je imel inokuliran tretma tretiran s Hg (AMHg), ki se je statistično značilno razlikoval od inokuliranega tretmaja tretiranega s Hg in Se (AMHgSe), ki je imel najmanjšo gostoto veziklov (Slika 17).

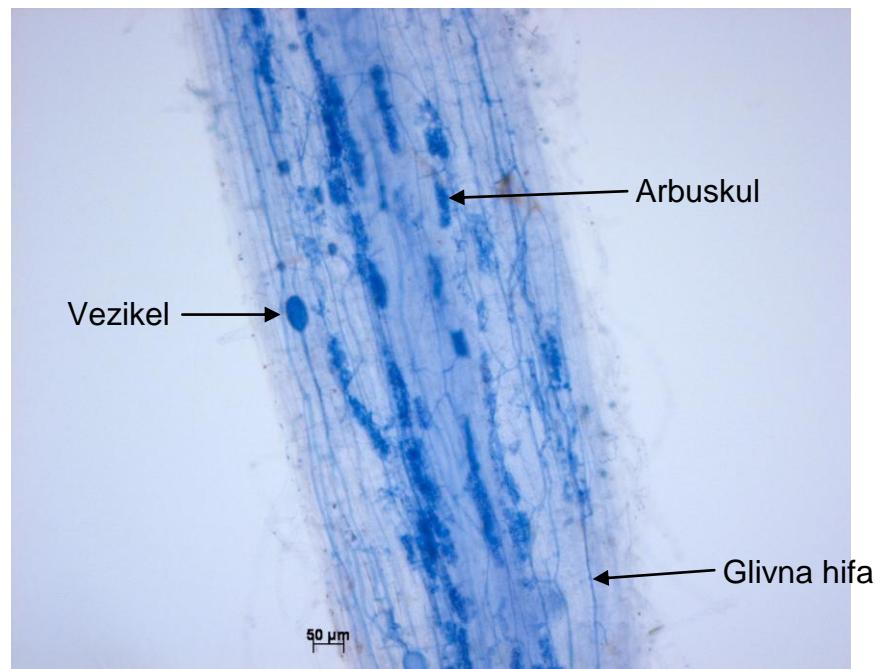
Arbuskule smo opazili v koreninah inokuliranih rastlin in v neinokuliranih koreninah tretiranih s Hg (Slika 17). Inokuliran tretma tretiran s Hg (AMHg) je imel največjo gostoto arbuskulov. Statistično se je razlikoval od inokuliranega tretmaja tretiranega s Se (AMcSe), neinokuliranega tretmaja tretiranega s Hg (Hg) in inokuliranega tretmaja tretiranega s Hg in Se (AMHgSe) (najmanjša gostota arbuskulov).



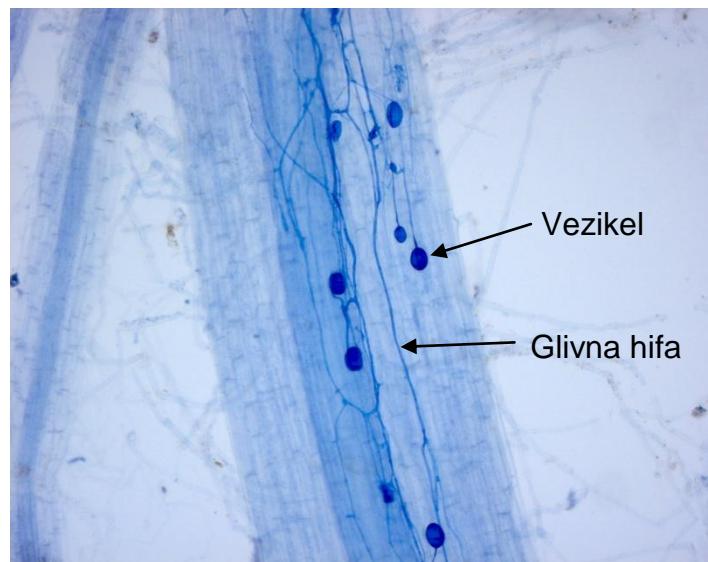
Slika 16: Mikorizni parameter F % v koreninah v različnih tretmajih. Legenda: AM – mikorizna inokulacija, c – kontrolne rastline, Hg – rastline tretirane z živim srebrom (v obliki  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s selenom (v obliki  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ). Povprečje ± standardna napaka, N = 3. Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmajmi (enosmerna ANOVA, Duncanov test, p <0,05).



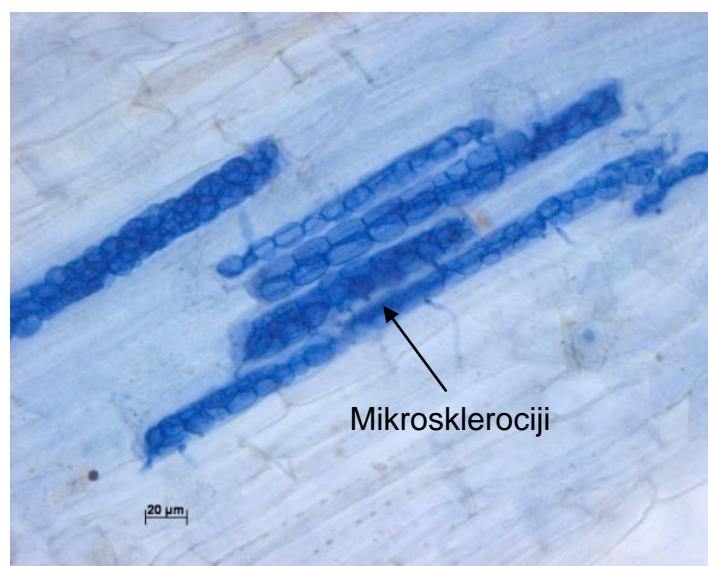
Slika 17: Mikorizni parametri V %, M %, A %, Mis % v koreninah v različnih tretmajih. Legenda: AM – mikorizna inokulacija, c – kontrolne rastline, Hg – rastline tretirane z živim srebrom (v obliki  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s selenom (v obliki  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ). Povprečje ± standardna napaka, N = 3. Faktorska analiza ANOVA je bila delana za vsak mikorizni parameter posebej (enosmerna ANOVA, Duncanov test, p < 0,05).



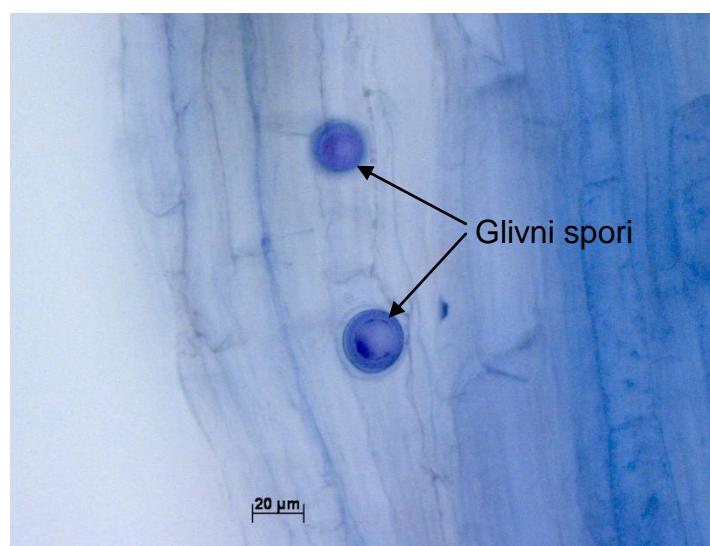
Slika 18: Fragment korenine z arbuskularno mikorizno kolonizacijo. Na sliki je lepo vidno omrežje arbuskulov. Vidna sta tudi vezikla.



Slika 19: Fragment korenine z arbuskularno mikoriznimi glivami. Na sliki so lepo vidni vezikli.



Slika 20: Mikrosklerociji



Slika 21: Glivni spori

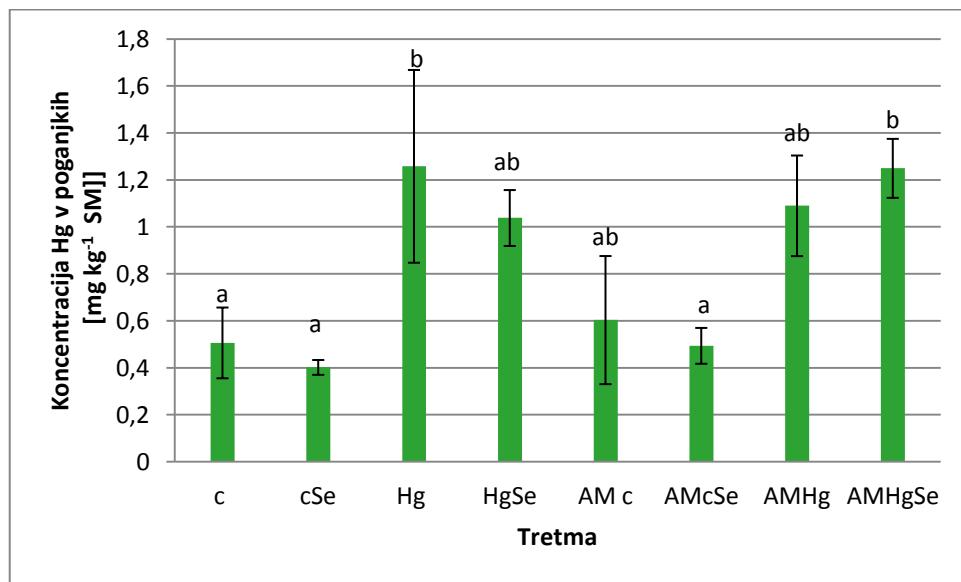
## 4.5 KONCENTRACIJE ELEMENTOV V KORENINAH IN POGANJKIH KORUZE

### 4.5.1 Koncentracije živega srebra

#### 4.5.1.1 Poganjki

Faktorska analiza ANOVA je pokazala statistično značilen vpliv Hg na koncentracijo Hg v poganjkih (Preglednica 13).

Živo srebro je bilo prisotno v poganjkih vseh tretmajev. Največ Hg so vsebovali poganjki neinokuliranih rastlin tretiranih s Hg (Hg) in inokuliranih rastlin tretiranih s Hg in Se (AMHgSe), katerih koncentracije Hg so bile statistično značilno višje od koncentracij v poganjkih rastlin tretiranih s Se (cSe in AMcSe) in neinokuliranih kontrolnih rastlin. Koncentracije Hg v pogankih ostalih tretmajev se statistično značilno niso razlikovale. Iz Slike 22 je razviden trend, da so vsi tretmaji tretirani s Hg so vsebovali več Hg kot tretmaji brez Hg.



Slika 22: Koncentracija živega srebra v poganjkih v različnih tretmajih. Legenda: AM – mikorizna inokulacija, c – kontrolne rastline, Hg – rastline tretirane z živim srebrom (v obliki  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s selenom (v obliki  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ). Povprečje ± standardna napaka, N = od 4 do 6. Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, Duncanov test, p < 0,05).

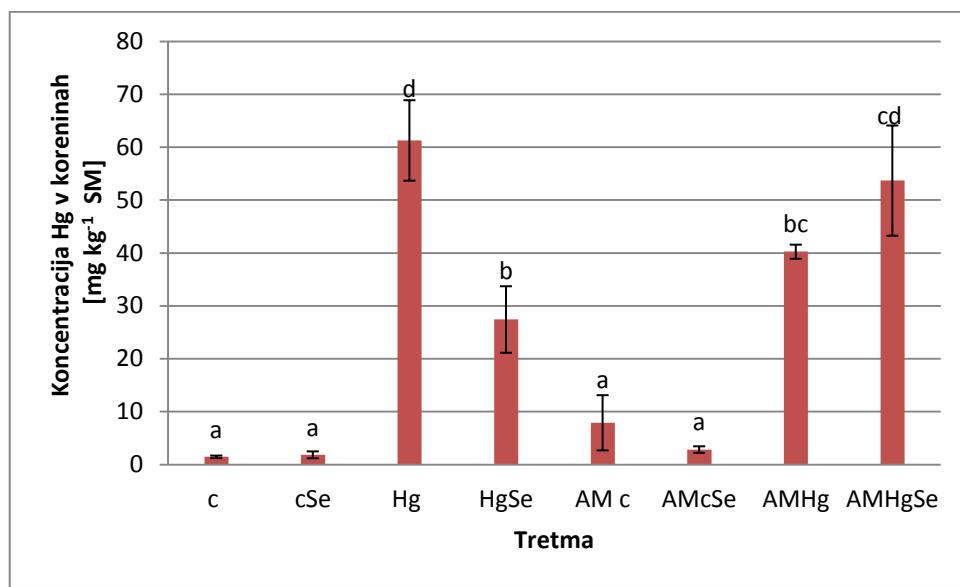
Preglednica 13: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo živega srebra v poganjkih. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ( $p < 0,05$ ). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $HgCl_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $K_2SeO_4$ ).

	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Intercept</b>	<b>28,05794</b>	<b>1</b>	<b>28,05794</b>	<b>125,8482</b>	<b>0,000000</b>
<b>AM</b>	0,00069	1	0,00069	0,0031	0,955856
<b>Hg</b>	<b>5,77690</b>	<b>1</b>	<b>5,77690</b>	<b>25,9111</b>	<b>0,000011</b>
<b>Se</b>	0,00007	1	0,00007	0,0003	0,985519
<b>AM*Hg</b>	0,00970	1	0,00970	0,0435	0,835935
<b>AM*Se</b>	0,28089	1	0,28089	1,2599	0,268907
<b>Hg*Se</b>	0,00842	1	0,00842	0,0378	0,846949
<b>AM*Hg*Se</b>	0,01004	1	0,01004	0,0450	0,833142
<b>Napaka</b>	8,24917	37	0,22295		

#### 4.5.1.2 Korenine

Faktorska analiza ANOVA je pokazala statistično značilen vpliv Hg, Se, kombinacije arbuskularne mikorize in Se ter kombinacije arbuskularne mikorize, Hg in Se na koncentracijo Hg v koreninah (Preglednica 14).

Vsi tretmaji, ki so bili tretirani s Hg, so imeli statistično značilno višje koncentracije Hg v koreninah v primerjavi s tretmaji brez dodanega Hg. Koncentracija Hg je bila statistično značilno večja v neinokuliranih rastlinah tretiranih s Hg (Hg) v primerjavi z neinokuliranimi rastlinami tretiranimi s Hg in Se (HgSe). Razlika med inokuliranimi rastlinami tretiranimi s Hg (AMHg) in inokuliranimi rastlinami tretiranimi s Hg in Se (AMHgSe) ni bila statistično značilna, so pa bile koncentracije Hg višje v tretmaju AMHgSe. Koncentracija Hg je bila največja v tretmaju tretiranem samo s Hg (Hg).



Slika 23: Koncentracija živega srebra v koreninah v različnih tretmajih. Legenda: AM – mikorizna inokulacija, c – kontrolne rastline, Hg – rastline tretirane z živim srebrom (v obliki  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s selenom (v obliki  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ). Povprečje ± standardna napaka, N = 3. Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmajmi (enosmerna ANOVA, Duncanov test, p <0,05).

Preglednica 14: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo živega srebra v korenin. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom (p <0,05). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretirane s  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ).

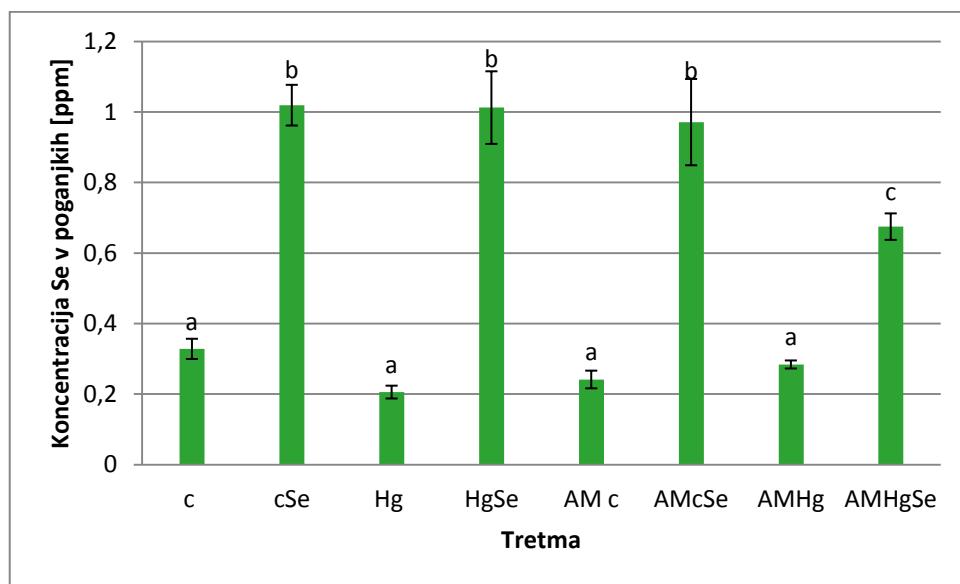
	SS	df	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>14506,62</b>	<b>1</b>	<b>14506,62</b>	<b>164,0657</b>	<b>0,000000</b>
<b>AM</b>	60,17	1	60,17	0,6805	0,421531
<b>Hg</b>	<b>10656,29</b>	<b>1</b>	<b>10656,29</b>	<b>120,5195</b>	<b>0,000000</b>
Se	235,90	1	235,90	2,6680	0,121905
<b>AM*Hg</b>	1,84	1	1,84	0,0208	0,887180
<b>AM*Se</b>	<b>656,56</b>	<b>1</b>	<b>656,56</b>	<b>7,4255</b>	<b>0,014984</b>
<b>Hg*Se</b>	92,79	1	92,79	1,0495	0,320871
<b>AM*Hg*Se</b>	<b>1042,67</b>	<b>1</b>	<b>1042,67</b>	<b>11,7922</b>	<b>0,003407</b>
<b>Napaka</b>	1414,71	16	88,42		

#### 4.5.2 Koncentracije selena

##### 4.5.2.1 Poganjki

Faktorska analiza ANOVA je pokazala statistično značilen vpliv arbuskulane mikorize, Hg, Se, kombinacije arbuskularne mikorize in Se ter kombinacije arbuskularne mikorize, Se in Hg na koncentracijo selena v poganjkih (Preglednica 15).

Rastline tretirane s selenom, so vsebovale statistično značilno višje koncentracije selena v poganjkih kot pa rastline, ki niso bile tretirane s selenom. Inokulirane rastline se v koncentraciji selena v poganjkih niso bistveno razlikovale od neinokuliranih rastlin, razen inokuliranih rastlin tretiranih s Hg in Se (AMHgSe). Rastline iz tretmaja AMHgSe so imele statistično značilno nižje koncentracije Se v poganjkih kot pa neinokulirane kontrolne rastline tretirane s Hg in Se (HgSe), neinokulirane rastline tretirane s Se (cSe) in inokulirane rastline tretirane s Se (AMHgSe).



Slika 24: Koncentracija selena v poganjkih v različnih tretmajih. Legenda: AM – mikorizna inokulacija, c – kontrolne rastline, Hg – rastline tretirane z živim srebrom (v obliki  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s selenom (v obliki  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ). Povprečje ± standardna napaka, N= 6. Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, Duncanov test, p <0,05).

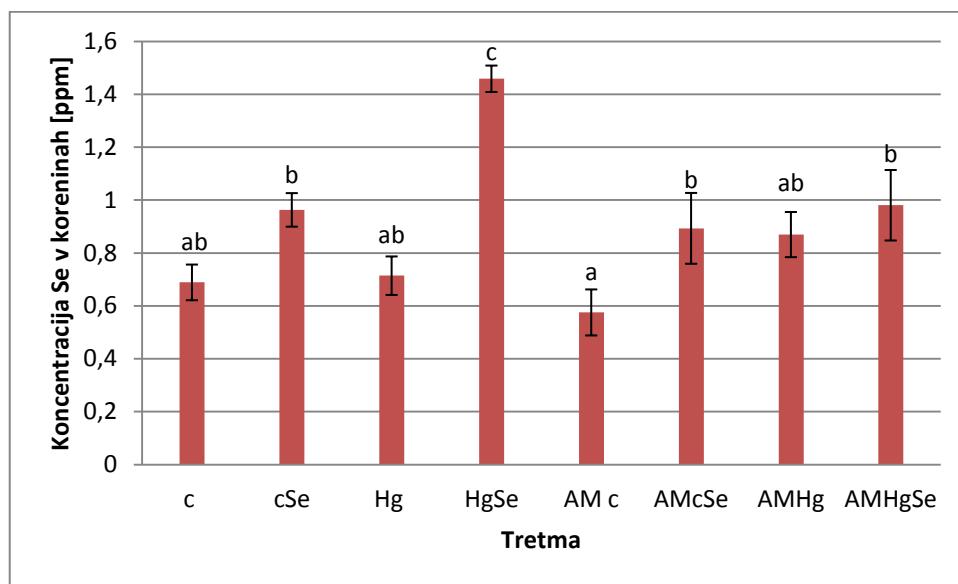
Preglednica 15: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo selena v poganjkih. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ( $p < 0,05$ ). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $HgCl_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $K_2SeO_4$ ).

	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Intercept</b>	<b>16,83110</b>	<b>1</b>	<b>16,83110</b>	<b>696,5109</b>	<b>0,000000</b>
<b>AM</b>	<b>0,11642</b>	<b>1</b>	<b>0,11642</b>	<b>4,8178</b>	<b>0,034032</b>
<b>Hg</b>	<b>0,11012</b>	<b>1</b>	<b>0,11012</b>	<b>4,5572</b>	<b>0,038960</b>
<b>Se</b>	<b>5,14185</b>	<b>1</b>	<b>5,14185</b>	<b>212,7819</b>	<b>0,000000</b>
<b>AM*Hg</b>	0,01160	1	0,01160	0,4800	0,492441
<b>AM*Se</b>	<b>0,10659</b>	<b>1</b>	<b>0,10659</b>	<b>4,4108</b>	<b>0,042065</b>
<b>Hg*Se</b>	0,03741	1	0,03741	1,5482	0,220645
<b>AM*Hg*Se</b>	<b>0,15501</b>	<b>1</b>	<b>0,15501</b>	<b>6,4146</b>	<b>0,015345</b>
<b>Napaka</b>	0,96660	40	0,02416		

#### 4.5.2.2 Korenine

Faktorska analiza ANOVA je pokazala statistično značilen vpliv Hg, Se, kombinacije arbuskularne mikorize in Se ter kombinacije arbuskularne mikorize, Hg in Se na koncentracijo selena v koreninah (Preglednica 16). Koncentracije Se v koreninah in poganjkih so bile podobne.

Najvišje koncentracije Se v koreninah so imele neinokulirane rastline tretirane s Hg in Se ( $HgSe$ ), ki so se statistično značilno razlikovale od koncentracij v vseh ostalih tretmajih (Slika 25). Najnižjo koncentracijo Se v koreninah so dosegla inokulirane kontrolne rastline (AMc), ki so se statistično značilno razlikovale poleg koncentracij Se v tretmaju  $HgSe$  še od koncentracij v neinokuliranih rastlinah tretiranih s Se (cSe), inokuliranih rastlinah tretiranih s Se (AMcSe) in inokuliranih rastlinah tretiranih s Hg in Se (AMcHgSe). V koncentraciji Se v koreninah med ostalimi tretmajimi ni bilo statistično značilnih razlik. Opazimo tudi trend povečevanja koncentracije Se v koreninah tako inokuliranih kot tudi neinokuliranih rastlin v smeri od kontrolnega tretmaja ((AM)c), tretmaja tretiranega s Hg ((AM)Hg), tretmaja tretiranega s Se ((AM)cSe) do tretmaja tretiranega s Hg in Se ((AM)HgSe).



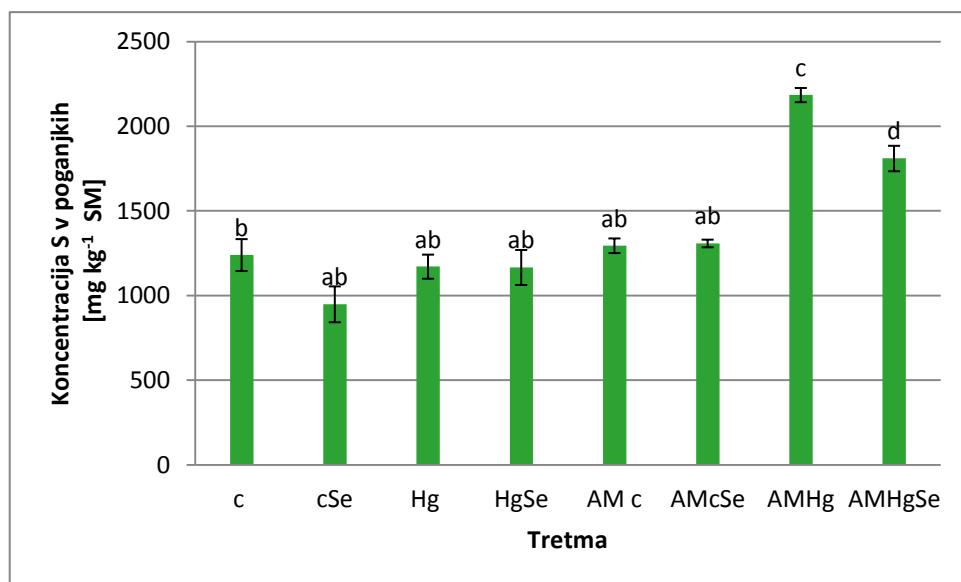
Slika 25: Koncentracija selena v koreninah v različnih tretmajih. Legenda: AM – mikorizna inokulacija, c – kontrolne rastline, Hg – rastline tretirane z živim srebrom (v obliki  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s selenom (v obliki  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ). Povprečje ± standardna napaka, N = 3. Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmajmi (enosmerna ANOVA, Duncanov test, p <0,05).

Preglednica 16: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo selena v koreninah. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom (p<0,05). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ).

	SS	df	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>19,13368</b>	<b>1</b>	<b>19,13368</b>	<b>762,5806</b>	<b>0,000000</b>
<b>AM</b>	0,09601	1	0,09601	3,8266	0,068134
<b>Hg</b>	<b>0,30558</b>	<b>1</b>	<b>0,30558</b>	<b>12,1792</b>	<b>0,003028</b>
<b>Se</b>	<b>0,78570</b>	<b>1</b>	<b>0,78570</b>	<b>31,3143</b>	<b>0,000040</b>
<b>AM*Hg</b>	0,00728	1	0,00728	0,2901	0,597565
<b>AM*Se</b>	<b>0,13040</b>	<b>1</b>	<b>0,13040</b>	<b>5,1971</b>	<b>0,036677</b>
<b>Hg*Se</b>	0,02601	1	0,02601	1,0368	0,323721
<b>AM*Hg*Se</b>	<b>0,17206</b>	<b>1</b>	<b>0,17206</b>	<b>6,8575</b>	<b>0,018620</b>
<b>Napaka</b>	0,40145	16	0,02509		

### 4.5.3 Koncentracija žvepla

#### 4.5.3.1 Poganjki



Slika 26: Koncentracija žvepla v poganjkih v različnih tretmajih. Legenda: AM – mikorizna inokulacija, c – kontrolne rastline, Hg – rastline tretirane z živim srebrom (v obliki  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s selenom (v obliki  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ). Povprečje ± standardna napaka, N = 6. Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmajmi (enosmerna ANOVA, Duncanov test, p <0,05).

Preglednica 17: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo žvepla v poganjkih. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom (p <0,05). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ).

	SS	df	MS	F	p
Intercept	<b>92813147</b>	1	<b>92813147</b>	<b>2709,154</b>	<b>0,000000</b>
AM	<b>3219505</b>	1	<b>3219505</b>	<b>93,975</b>	<b>0,000000</b>
Hg	<b>1780965</b>	1	<b>1780965</b>	<b>51,985</b>	<b>0,000000</b>
Se	<b>323771</b>	1	<b>323771</b>	<b>9,451</b>	<b>0,003793</b>
AM*Hg	<b>1158335</b>	1	<b>1158335</b>	<b>33,811</b>	<b>0,000001</b>
AM*Se	3216	1	3216	0,094	0,760894
Hg*Se	7808	1	7808	0,228	0,635685
AM*Hg*Se	<b>341292</b>	1	<b>341292</b>	<b>9,962</b>	<b>0,003034</b>
Napaka	1370364	40	34259		

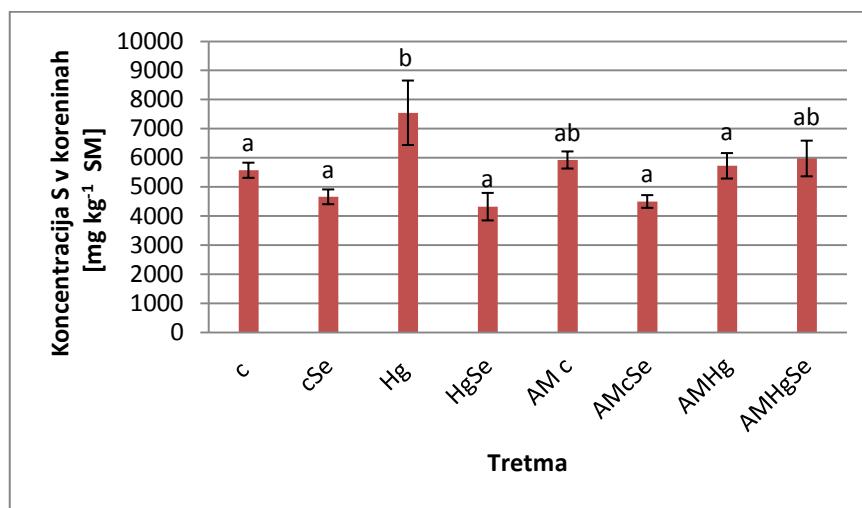
Faktorska analiza ANOVA je pokazala statistično značilen vpliv arbuskulane mikorize, Hg, Se, kombinacije arbuskularne mikorize in Se ter kombinacije arbuskularne mikorize, Se in Hg na koncentracijo žvepla v poganjkih (Preglednica 17).

Statistično značilno višje koncentracije žvepla v poganjkih v primerjavi s koncentracijami v ostalih tretmajih so imele le inokulirane rastline tretirane s Hg (AMHg) in inokulirane rastline tretirane s Hg in Se (AMHgSe). V ostalih tretmajih se koncentracije S niso statistično razlikovale (Preglednica 17).

#### 4.5.3.2 Korenine

Faktorska analiza ANOVA je pokazala statistično značilen vpliv selena ter kombinacije arbuskularne mikorize, Se in Hg na koncentracijo žvepla v koreninah (Preglednica 18). Višje koncentracije S so v poganjkih kot v koreninah.

Najvišje koncentracije žvepla v koreninah so dosegle neinokulirane rastline tretirane s Hg (Hg), ki so se statistično značilno razlikovale od koncentracij v vseh ostalih tretmajih razen od koncentracij v inokuliranem kontrolnem tretmaju (AMc) in inokuliranem tretmaju tretiranim s Hg in Se (AMHgSe). Ostali tretmaji se v koncentracijah S niso statistično značilno razlikovali. Koncentracije S v neinokuliranih rastlinah (HgSe) so bile nižje od koncentracij v inokuliranih rastlinah (AMHgSe). Koncentracije v neinokuliranih rastlinah tretiranih s Hg (Hg), pa so bile statistično značilnovišje kot v inokuliranih rastlinah, tretiranih s Hg (AMHg). Med koncentracijami S v ostalih inokuliranih in neinokuliranih tretmajih ni velikih razlik.



Slika 27: Koncentracija žvepla v koreninah v različnih tretmajih. Legenda: AM – mikorizna inokulacija, c – kontrolne rastline, Hg – rastline tretirane z živim srebrom (v obliki  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s selenom (v obliki  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ). Povprečje  $\pm$  standardna napaka, N = 3. Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, Duncanov test, p <0,05).

Preglednica 18: Rezultati faktorske ANOVA za koncentracijo žvepla v koreninah. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom (p <0,05). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $\text{HgCl}_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretrirane s  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ).

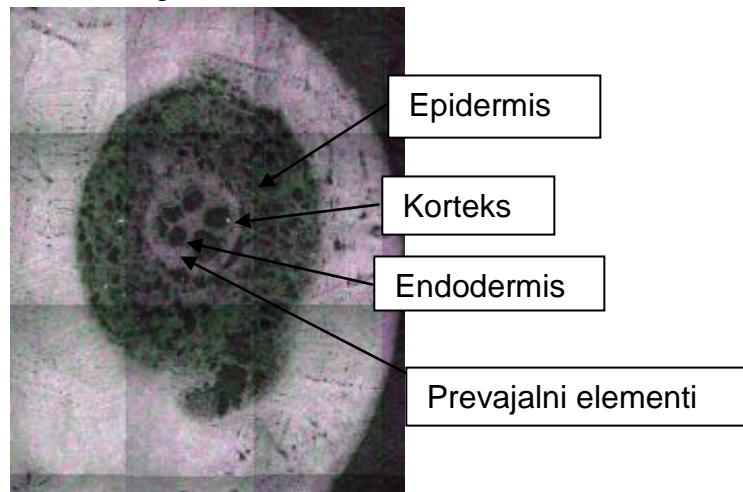
	SS	df	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>733260215</b>	<b>1</b>	<b>733260215</b>	<b>855,9254</b>	<b>0,000000</b>
<b>AM</b>	270	1	270	0,0003	0,986064
<b>Hg</b>	3188592	1	3188592	3,7220	0,071630
<b>Se</b>	<b>10586237</b>	<b>1</b>	<b>10586237</b>	<b>12,3572</b>	<b>0,002869</b>
<b>AM*Hg</b>	48908	1	48908	0,0571	0,814191
<b>AM*Se</b>	3294552	1	3294552	3,8457	0,067519
<b>Hg*Se</b>	151964	1	151964	0,1774	0,679233
<b>AM*Hg*Se</b>	<b>5972851</b>	<b>1</b>	<b>5972851</b>	<b>6,9720</b>	<b>0,017812</b>
<b>Napaka</b>	13706993	16	856687		

#### 4.6 PREGLED STATISTIČNO ZNAČILNIH VPLIVOV

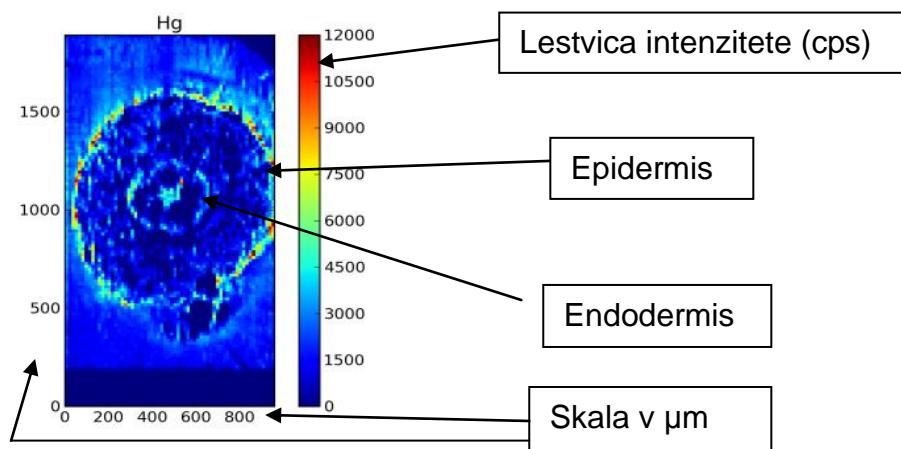
Preglednica 19: Pregled statistično značilnih vplivov obravnavanih spremenljivk. Prikazane so vse obravnavane spremenljivke s statistično značilnimi vplivi. Legenda: AM - arbuskularna mikoriza, c - kontrola, P - poganjki, K - korenine, MDA - monoaldehid.

		AM	Hg	Se	AMHg	AMcSe	HgSe	AMHgSe
Biomasa	<b>suha masa v P</b>	x	x					
	<b>suha masa v K</b>		x					
	<b>klorofil a</b>		x	x				
	<b>klorofil b</b>	x	x	x				
	<b>karotenoidi</b>		x					
Koncentracija MDA	<b>MDA v P</b>							x
	<b>MDA v K</b>	x		x	x		x	
Mikorizni parametri	<b>F %</b>		x				x	
	<b>M %</b>						x	
	<b>m %</b>						x	
	<b>a %</b>	x		x				
	<b>A %</b>	x		x				
	<b>mis %</b>							
	<b>Mis %</b>							
	<b>v %</b>	x						
	<b>V %</b>	x						
	<b>Hg v P</b>		x					
Koncentracije elementov	<b>Hg v K</b>		x			x		x
	<b>Se v P</b>	x	x	x		x		x
	<b>Se v K</b>		x	x		x		x
	<b>S v P</b>	x	x	x	x			x
	<b>S v K</b>			x				x

#### 4.7 MAPIRANJE PORAZDELITVE Hg V KORENINAH RASTLIN



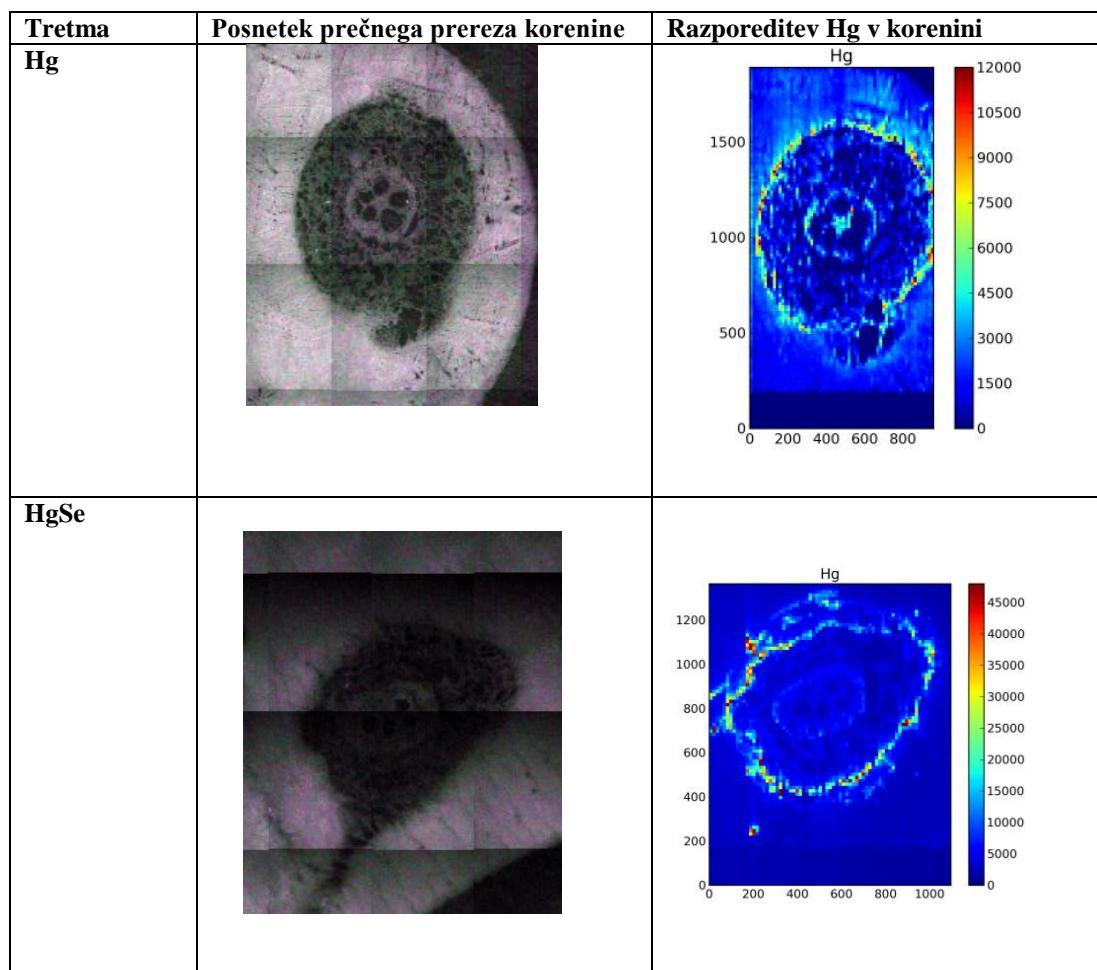
Slika 28: Prečni prerez korenine z oznakami



Slika 29: Mapa kopiranja Hg v korenini z oznakami

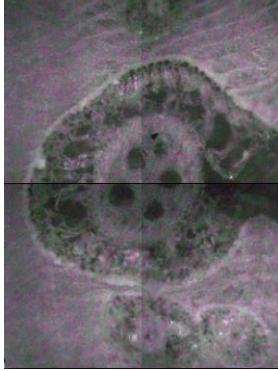
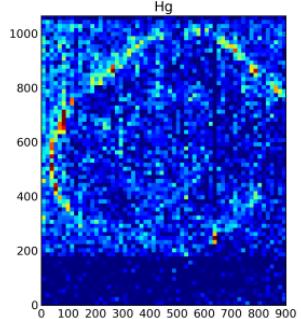
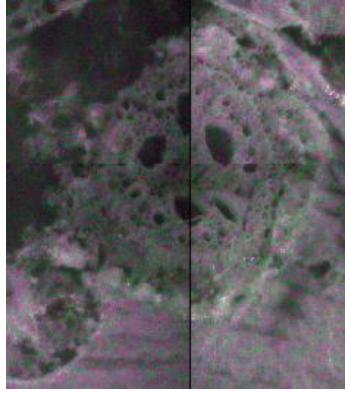
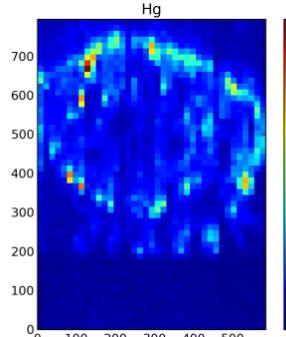
Razporeditev Hg v koreninah različnih tretmajev je prikazana v Preglednici 20. V neinokuliranih koreninah rastlin tretiranih s Hg (Hg) se je največ Hg nahajalo v povrhnjici korenine (epidermisu), sledil ji je endodermis in korteks. V neinokuliranih koreninah tretiranih s Hg in Se hkrati (HgSe) se je večina Hg prav tako nahajala v epidermisu, medtem ko ga v notranjosti korenine skoraj ni bilo. Tudi v inokuliranih koreninah tretiranih s Hg (AMHg) se je večina Hg nahaja v epidermisu korenin. V inokuliranih koreninah tretiranih s Hg in Se (AMHgSe) je bila razporeditev Hg zelo podobna kot pa v neinokuliranem tretmaju tretiranim le s Hg.

Preglednica 20: Prečni prerezi korenin različnih trertmajev in razporeditev živega srebra v njih



se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 20: Prečni prerezi korenin različnih trertmajev in razporeditev živega srebra v njih

Tretma	Posnetek prečnega prereza korenine	Razporeditev Hg v korenini
AMHg		 Hg 225 200 175 150 125 100 75 50 25 0
AMHgSe		 Hg 6400 5600 4800 4000 3200 2400 1600 800 0

## 5 DISKUSIJA

### 5.1 SUHA MASA

Rezultati so potrdili našo hipotezo, da bodo imele inokulirane rastline večjo suho maso poganjkov in korenin kot neinokulirane rastline. Naši rezultati so pokazali statistično značilen vpliv arbuskularne mikorize na suho maso poganjkov, niso pa pokazali statistično značilnega vpliva arbuskularne mikorize na suho maso korenin, čeprav je bila masa inokuliranih korenin večja kot pri neinokuliranih. Vpliv arbuskularno mikorizne glive *Glomus mosseae* na rast koruz v s Hg onesnaženih tleh so že proučevali Yu in sod. (2010). Tudi njihovi rezultati niso pokazali statistično značilnega vpliva arbuskularno mikoriznih gliv na maso korenin, pa tudi na maso poganjkov ne. Poudariti je potrebno, da njihovi rezultati niso povsem primerljivi z našimi (delali smo s koncentracijo Hg: 50 mg kg<sup>-1</sup>), saj so uporabili več kot 10-krat nižje koncentracije Hg (1, 2 in 4 mg kg<sup>-1</sup>).

Podobne rezultate našim pa so dobili Gildon in sod. (1983), ki so testirali vpliv mikorizne inokulacije na privzem bakra, ki ga tako kot živo srebro uvrščamo med težke kovine. Poskus so izvedli v substratu z enakim razmerjem pesek : prst = 1 : 4, kot smo ga uporabili v našem poskusu. Rezultati so pokazali, da mikorizna inokulacija z *Glomus mosseae* poveča suho maso rastlin v z bakrom onesnaženih tleh in zmanjša privzem bakra (Gildon in sod., 1983).

Izboljšano rast mikoriznih rastlin lahko pripisemo boljši oskrbi z nutrienti, ki jih preko zunaj koreninskega micelija mikorizne glive črpajo iz tal in jih prenesejo v rastline (Yu in sod., 2010). Poleg tega glive lahko imobilizirajo težke kovine v rizosferi in na tak način preprečijo njihov vnos v rastline. To lahko naredijo na več načinov (Göhre in Paszkowski, 2006): z izločanjem težkih kovin, ki se nato usedajo na polifosfatne granule v tleh, z vezavo težkih kovin na celično steno in s helacijo težkih kovin, ki jo povzročijo njihovi izločki (Gaur in Adholeya, 2004). Glive lahko v tla izločajo netopni glikoprotein glomalin, na katerega se vežejo težke kovine (Gonzalez-Chavez in sod., 2004). Težke kovine se lahko vežejo v celično steno gliv, s čimer se zmanjša njihova biodostopnost (Göhre in Paszkowski, 2006). Vendar pa je od vrste gliv in od rastline odvisno, kako bodo glive vplivale na biomaso rastlin. Razlike so lahko že samo v tem ali so rastline neakumulacijske ali pa hiperakumulacijske. Hiperakumulacijske rastline imajo v primerjavi z neakumulacijskimi razvite mehanizme, ki jim omogočajo preživetje v tleh z visokimi koncentracijami težkih kovin. Koruza ni hiperakumulacijska vrsta. Vogel-Mikuš in sod. (2006) so testirali vpliv mešanice arbuskularno mikoriznih gliv na rast rastlin v substratu z različnimi dodanimi koncentracijami Cd, Zn in Pb na hiperakumulacijsko vrsto *Thlaspi praecox*. Njihovi rezultati so pokazali ravno obraten vpliv mikorize na biomaso rastlin kot

naši. Biomasa inokuliranih korenin je bila manjša kot pa pri neinokuliranih. Biomasi poganjkov inokuliranih in neinokuliranih rastlin pa se nista statistično značilno razlikovali; so pa rezultati pokazali manjšo biomaso poganjkov inokuliranih rastlin.

Naši rezultati so pokazali statistično značilen vpliv koncentracije Hg v substratu na suho maso poganjkov in korenin. Rastline, tretirane s Hg, so imele manjšo maso korenin in poganjkov v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. O negativni korelaciji med koncentracijo Hg v substratu in suho maso korenin različnih rastlinskih vrst je leta 2004 poročal Wang. Ti rezultati kažejo na strupenost Hg. Ena od možnosti zmanjšane rasti korenin je, da Hg sproži tvorbo etilena, ki zavira rast korenin (Delachiave in sod., 1990).

Rezultati našega poskusa pa se ne ujemajo z že prej omenjeno raziskavo, ki so jo opravili Yu in sod. (2010), v kateri so preučevali vpliv arbuskularno mikorizne glive *Glomus mosseae* v tleh z različnimi koncentracijami Hg ( $0\text{--}4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) na privzem in akumulacijo Hg v koruzi. Rezultati te analize niso pokazali statistično značilnega vpliva koncentracije Hg na biomaso rastlin, vendar pa so uporabili več kot 10-krat nižje testne koncentracije Hg v substratu kot pa smo jih v našem poskusu.

Ravno nasprotne rezultate o biomasi korenin v primerjavi z našim poskusom so dobili Cargnelutti in sod. (2006), ki so sadike kumar (*Cucumis sativus* L.) za 10-15 dni izpostavljeni različnim koncentracijam  $\text{HgCl}_2$  ( $0\text{--}500 \mu\text{M}$ ). Njihovi rezultati so pokazali, da se z večanjem koncentracije Hg v substratu, veča tudi suha masa korenin. Sklepali so, da Hg inducira njegovo kopiranje v rastlinskih tkivih, zaradi česar se v rastlini sproži nenormalna proliferacija koreninskih celic. Ravno tako kot v našem poskusu, so tudi oni dobili rezultate, ki so pokazali, da se z večanjem koncentracije Hg, manjša biomasa poganjkov (Cargnelutti in sod., 2006).

Naši rezultati niso pokazali statistično značilnega vpliva selena na biomaso poganjkov in korenin. Tudi rezultati Longchamp in sod. (2013), ki so testirali vpliv selena (selenata in selenita) na rast koruze v hidroponiki, niso dobili statistično značilnega vpliva Se na biomaso rastlin pri nizkih koncentracijah. Za nizke koncentracije Se so smatrali  $10 \mu\text{g/L}$  (i.e.  $0,12 \mu\text{M}$ ) in  $50 \mu\text{g/L}$  (i.e.  $0,63 \mu\text{M}$ ), zato so rezultati popolnoma primerljivi z našimi, saj smo tudi v našem poskusu rastline tretirali z nizkimi koncentracijami Se ( $10 \text{ mg m}^{-2}$  lista). Da smo izbrali nizko koncentracijo Se se vidi po tem, ker koncentracija v našem poskusu ni imela strupenih učinkov na biomaso koruz. Tudi Xue in sod. (2001) niso odkrili nobenega učinka nizkih koncentracij Se ( $0,01\text{--}1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ H}_2\text{SeO}_4$ ) na suho maso mladih rastlin solate, so pa odkrili, da nizke koncentracije Se statistično značilno povečajo rast senescenčnih rastlin (za 14 %). Torej lahko zaključimo, da je od starosti rastlin in od koncentracije Se odvisno, kakšne učinke bo imel Se na rastline. Visoke koncentracije Se so

strupene za rastline ne glede na njeno starost. Kakšne koncentracije so za rastlino stupene, je odvisno od vrste rastline in oblike Se. Dimkovikj in Van Hoewyk (2014) sta v poskusu, v katerem sta s koncentracijami 0, 20, 50, 100 in 250  $\mu\text{M}$  selenita, tri dni tretirala rastline (*Brassica napus*), ugotovila, da je koncentracija 50  $\mu\text{M}$  selenita za rastline že stupena, saj zmanjša rast korenin, čeprav pa ne spremeni razmerja med svežo in suho maso korenin in ne vpliva na viabilnost koreninskih celic. Koncentracija 250  $\mu\text{M}$  selenita, pa je bila za rastline zelo stupena, saj je zelo znižala razmerje med svežo in suho maso korenin in pa viabilnost koreninskih celic. Selenit je v visokih koncentracijah stupen zato, ker povzroča zamenjavo žvepla v cisteinu (Cys) in metioninu (Met) s selenom, pri čemer nastane selencistein (Se-Cys) in selenometionin (Se-Met), in s tem spremenijo vlogo proteinov (Dimkovikj in Van Hoewyk, 2014). Nizke koncentracije Se pa lahko pozitivno vplivajo na rast. Pri rastlinah krompirja so ugotovili, da nizke koncentracije selena povečajo kopiranje ogljikovih hidratov v listih in gomoljih, kar pozitivno vpliva na biomaso. Poleg tega nizke koncentracije selena izboljšajo antioksidativne sposobnosti rastline, ter na tak način zaščitijo rastline proti različnim oblikam abiotičnega stresa (UV, suša, slanost, težke kovine, itd.), kar pozitivno vpliva na biomaso rastlin (Saffaryazdi in sod., 2012). Han in sod. (2013) so pri preučevanju vpliva Se na rast tobaka (*Nicotiana tabacum* L.) odkrili, da nizke koncentracije Se ( $\leq 4,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) izboljšajo rast rastlin, visoke pa jo zavirajo.

## 5.2 ANALIZA FOTOSINTEZNIH PIGMENTOV

Eden najpomembnejših metabolnih procesov v rastlini je fotosinteza. Fotosintezo omogočajo fotosintezni pigmenti, med katerimi največjo vlogo odigrajo klorofili (Han in sod., 2013). Klorofilni status je eden ključnih pokazateljev fotosintezne učinkovitosti in vpliva okoljskega stresa (Zhu in sod., 2012).

Rezultati faktorske analize ANOVA so pokazali statistično značilen vpliv živega srebra in selena na koncentracijo klorofila *a* in klorofila *b*. Rezultati enosmerne ANOVA (Ducanov test,  $p < 0,05$ ) pa niso pokazali statistično značilnih razlik o vplivu živega srebra in selena na koncentracijo klorofila *a* in klorofila *b*. Kljub temu lahko iz Slike 13 v rastlinah tretiranih s Hg razberemo trend povišanja koncentracije klorofila *a* in *b* glede na kontrolne rastline. Naš vzorec je bil majhen ( $N = 8 - 9$ ), zaradi česar se s statistično analizo pridobi manj zanesljive rezultate. Za boljše in zanesljivejše statistične rezultate, bi bilo potrebno poskus ponoviti z večjim številom poskusnih rastlin. Na tak način bi lažje ugotovili, ali živo srebro statistično značilno vpliva na povečanje koncentracije klorofila *a* in klorofila *b*. Naši rezultati se ne ujemajo z rezultati raziskave Cargnelutti in sod. (2006), kjer so preučevali vpliv Hg na koncentracijo fotosinteznih pigmentov v kotiledonih mladih kumar (*Cucumis sativus* L.) po 10-ih in 15-ih dneh izpostavitve različnim koncentracijam  $\text{HgCl}_2$  (do 500  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$ ). Ugotovili so, da z večanjem koncentracije Hg, linearno upadajo

vsebosti klorofila v kotiledonih. Kako bodo upadale koncentracije klorofila je odvisno od časa izpostavitve in od koncentracije  $\text{HgCl}_2$ . V njihovem poskusu so bile koncentracije klorofilov po 10 dnevni izpostaviti rastlini  $500 \mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  za 59 % nižje, po 15 dneh pa za 94 % nižje (Carnelutti in sod., 2006). Živo srebro se lahko zamenja s kovinskimi ioni v fotosinteznih pigmentih in zniža stopnjo fotosinteze (Xylander in sod., 1996). Prasad in Prasad (1987) sta poročala, da Hg znižuje sintezo klorofilov.

Naši rezultati se ne ujemajo z rezultati drugih avtorjev, ki so ugotovili, da težke kovine kot so kadmij (Filek in sod., 2009), svinec, baker, cink (Fargašová in sod., 2006) in arzen (Malik in sod., 2012) zavirajo fotosintezo in znižajo vsebnost klorofila (Feng in sod., 2013). Naše rastline so bile veliko dlje izpostavljene Hg, zato bi po njegovih ugotovitvah pričakovali, da se bodo koncentracije klorofilov ob izpostaviti  $\text{HgCl}_2$  znižale. Koncentracije in vsebnost Hg so bile namreč v vseh poganjkih tretiranih s Hg višje glede na kontrolne tretmaje, ki niso bili tretirani s Hg.

Selen pomembno vpliva na fotosnitezno aktivnost rastlin, saj rastline asimilirajo selenat po poti sulfatnega transporta v kloroplaste, kjer se zamenjuje z žveplom v cisteinu in metioninu v proteinih (Guerrero in sod., 2014), vpliva pa tudi na strukturo kloroplastov (Feng in sod., 2013).

V rastlinah, tretiranih s Se, je opazen trend znižja koncentracije klorofila *a* in klorofila *b* glede na kontrolne rastline. Da bi ugotovili, ali opaženi trend dejansko drži, bi morali poskus ponoviti na večjem številu vzorcev. Naši rezultati se ne ujemajo z raziskavo Xue in sod. (2001), kjer so ugotovili, da dodatek selena poveča koncentracijo klorofila v mladih in tudi v senescenčnih listih solate. Selen, ki v nizkih koncentracijah pripomore k izboljšani rasti rastlin, ne vpliva neposredno na koncentracijo klorofilov, ampak s svojimi antioksidativnimi lastnostmi vpliva na stopnjo lipidne peroksidacije v rastlini, ter prek nje na koncentracijo klorofila (Xue in sod., 2001). Po tem takem je mogoče naša koncentracija selena povečala stopnjo lipidne peroksidacije (manjši porast je viden v rezultatih) in zato znižala koncentracijo klorofila v rastlini. Han in sod. (2013) so ugotovili, da je dodatek selena v koncentraciji do  $4,4 \text{ mg kg}^{-1}$  povečeval vsebnost klorofila v listih tobaka, z nadaljnjim večanjem koncentracije Se pa je vsebnost klorofila upadala. Možno je, da v našem poskusu nismo izbrali optimalne koncentracije selena za tretiranje mladih koruz in smo izbrali koncentracijo, ki ima na rast še vedno pozitiven vpliv, na vsebnost klorofilov pa ne. To našo hipotezo potrjujejo rezultati raziskave Hawrylak-Nowak in sod. (2015), kjer so ugotovili, da je do upada klorofilov prišlo pri nižji koncentraciji Se, kot pa do zmanjšanja biomase. Znižanje koncentracije fotosinteznih pigmentov zato velja za primarni bioindikator elementov v sledeh. V njihovem poskusu tretiranje s selenatom do koncentracije  $40 \mu\text{M}$  ni značilno vplivalo na koncentracijo fotosinteznih pigmentov, z

višjimi koncentracijami, pa je prihajalo do upada koncentracije fotosinteznih pigmentov. Višanje koncentracije je povzročilo upad koncentracij klorofilov, ne pa karotenoidov. Ugotovili so, da je selenit bolj strupen in poleg nižanja koncentracij klorofilov niža tudi koncentracije karotenoidov. Ugotovili so tudi, da selen bolj vpliva na koncentracijo klorofila *b*, kakor pa na koncentracijo klorofila *a* (Hawrylak-Nowak in sod., 2015). V našem poskusu pa nismo opazili bistvenih razlik o vplivu selena na koncentracijo klorofila *a* in *b*.

Rezultati faktorske analize ANOVA so pokazali statistično značilen vpliv koncentracije Hg na koncentracijo karotenoidov. Rezultati enosmerne ANOVA (Ducanov test,  $p < 0,05$ ) niso pokazali statistično značilnih razlik glede vpliva koncentracije Hg na koncentracijo karotenoidov. Kljub temu je tako kot v primeru klorofila *a* in *b* opazen trend povečanja koncentracije karotenoidov. Za bolj natančne statistične rezultate bi bilo potrebno poskus ponoviti z večjim številom vzorcev. Da tretiranje s  $\text{HgCl}_2$  poveča vsebnost karotenoidov v koruzi sta v svoji raziskavi ugotovila tudi Kalimuthu in Sivasubramanian (1990). Do povečanja koncentracije karotenoidov v tretmajih tretiranih s Hg, bi lahko prišlo zaradi koncentracijskega efekta, ki nastane zaradi zmanjšane biomase v tretmajih tretiranih s Hg.

Na koncentracijo klorofila *b* je statistično značino vplivala tudi arbuskularna mikoriza, ki je povečala njegovo koncentracijo. Rezultati se ujemajo z rezultati raziskave Zhu in sod. (2012), ki so pri koruzi proučevali vpliv arbuskularne mikorize na fotosintezne pigmente v primeru stresa, ki ga povzroča suša. Ugotovili so, da so v primeru normalnega vodnega statusa, ki rastlinam ne predstavlja stresa, bile koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* in klorofila *a* in *b* skupaj zelo podobne tako v mikoriznih kot nemikoriznih rastlinah, kar velja tudi za naše kontrolne rastline (c in AMc), ki prav tako niso bile izpostavljene stresnemu faktorju, ki ga v našem primeru predstavlja Hg (in Se) (vodo so imele konstantno na razpolago). V primeru suše (stresa) pa so se v mikoriznih rastlinah koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* ter klorofila *a* in *b* povečale, kar pa je primerljivo tudi z odzivom naših poskusnih rastlin na stresni faktor Hg (in Se) (Zhu in sod., 2012). To je še en dokaz, da AM glive povečajo rezistenco na drastične okoljske strese. To lahko pripišemo izboljšani okrbi rastlin z nutrienti zaradi arbuskularnih mikoriznih gliv, kar zniža stres (Smith in Read, 2008).

### 5.3 LIPIDNA PEROKSIDACIJA (MDA)

Malondialdehid (MDA) je skupen produkt lipidne peroksidacije. Predstavlja občutljiv diagnostičen indeks za merjenje poškodb, ki jih povzroča oksidativni stres (Janero, 1990). Večji ko je oksidativni stres, več MDA bo rastlina vsebovala.

V našem poskusu koncentracija Hg ni statistično značilno vplivala na koncentracijo MDA v poganjkih in koreninah. Vpliv Hg na koncentracijo MDA je odvisen od njegove koncentracije v tleh in časa izpostavitve. V svojih raziskavah so Cargnelutti in sod. (2006) ugotovili, da je  $\text{HgCl}_2$  v sadikah kumar (*Cucumis sativus L.*) statistično značilno povišal koncentracijo MDA šele pri koncentraciji 500  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$ . Povišana koncentracija MDA pri 500  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$ , pomeni, da so kumare utrpele veliko oksidativnih poškodb, ki jih je povzročil strupeni Hg. Iz tega lahko sklepamo, da je bila naša koncentracija  $\text{HgCl}_2$  (50 mg  $\text{kg}^{-1}$ ) prenizka in v koruzi ni povzročila velikega oksidativnega stresa in s tem večjih sprememb v koncentraciji MDA.

V koreninah koruz, tretiranih s selenom, smo zaznali povečanje koncentracije MDA glede na kontrolo v tretmajih, ki niso bili tretirani s Hg (cSe in AMcSe). Tudi Han in sod. (2013) so preučevali vpliv selena na koncentracijo MDA v rastlinah navadnega tobaka. Ugotovili so, da nizke koncentracije selena (2,2 mg  $\text{kg}^{-1}$ ) značilno znižajo, visoke koncentracije pa dramatično dvignejo vsebnost MDA v rastlinah tobaka. S tem so dokazali, da nizke koncentracije selena izboljšajo antioksidativno sposobnost rastline tobaka in zmanjšajo lipidno peroksidacijo celičnih membran. Ravno obratno pa učinkujejo visoke koncentracije selena. Te namreč povečajo oksidativni stres in lipidno peroksidacijo celičnih membran (Han in sod., 2013). Glede na njihove rezultate lahko zaključimo, da je bila v našem poskusu uporabljena koncentracije selena že strupena za rastline v tretmajih, ki niso bili tretirani s Hg. V koreninah koruz, tretiranih s selenom in brez tretiranja s Hg (cSe in AMcSe), je povečala koncentracijo MDA in s tem pokazala na povečan oksidativni stres. Inokulirane in neinokulirane korenine tretiranih s Hg in Se (AMHgSe in HgSe) se statistično značilno niso razlikovale od kontrolnih korenin, ki niso bile tretirane s Se (AMHg in Hg), zato smo ovrgli našo hipotezo, da bo v rastlinah, tretiranih s Se in Hg hkrati, stopnja stresa manjša kot pri rastlinah tretiranih le s Hg.

Mikorizna inokulacija ni bistveno vplivala na koncentracijo MDA v poganjkih in koreninah koruze, ki niso bili tretirani s Hg. Koncentracija MDA se je povečala v inokuliranih koreninah tretiranih s Hg (AMHg, AMHgSe), glede na neinokulirano kontrolo tretirano s Hg (Hg, HgSe). Mikorizna inokulacija je v našem poskusu povečala privzem Hg v korenine (Slika 22), povečana koncentracija Hg pa je povečala stopnjo oksidativnega stresa, zato smo izmerili povišano koncentracijo MDA. Da lahko mikorizna inokulacija vpliva na koncentracijo MDA v koruzah v stresnem okolju, ki ga je pri njih predstavljala suša, so ugotovili Zhu in sod. (2011). Arbuskularno mikorizne glive so znižale vsebnost MDA in prepustnost membrane, povečale vsebnost prolina in povečale aktivnosti antioksidativnih encimov rastlin izpostavljenih suši.

#### 5.4 MIKORIZNA KOLONIZACIJA

V našem primeru smo vezikle in arbuskule opazili v inokuliranih koreninah, neinokulirane korenine pa jih niso imele (razen tretma Hg). Med neinokuliranimi koreninami smo v rastlinah tretiranih s Hg (tretma Hg) opazili arbuskule. Mikrosklerociji so bili prisotni tako v neinokuliranih kot tudi v inokuliranih koreninah. Arbuskularno mikorizne glive ne tvorijo mikrosklerocijev. Mikrosklerocije tvorijo temnoseptirani endofiti (DSE). V poskusu Rivera-Becerril in sod. (2001), kjer so proučevali stopnjo kolonizacije arbuskularno mikoriznih gliv *Glomus intraradices* v koreninah treh genotipov graha cv. Frisson, VIR4788 in VIR7128 (*Pisum sativum L.*), ki so jih gojili v substratu z dodanim Cd in brez Cd, mikoriznih gliv niso našli v koreninah neinokuliranih rastlin. Mikorizne glive pa so bile prisotne v koreninah inokuliranih rastlin. Tudi v poskusu Vogel-Mikuš in sod. (2006), kjer so preučevali vpliv težkih kovin Zn, Cd in Pb na stopnjo mikorizne kolonizacije v rastilni *Thlaspi praecox*, je bila mikorizna kolonizacija prisotna le v inokuliranih rastlinah, medtem ko je v neinokuliranih ni bilo. Predvidevamo, da so opaženi arbuskuli v našem neinokuliranem tretmaju Hg posledica kontaminacije našega poskusa z arbuskularno mikoriznimi glivami. Lahko je bil uporabljen substrat kontaminiran z DSE glivami in mogoče tudi z arbuskularno-mikoriznimi glivami. Do kontaminacije bi lahko prišlo tudi pri pripravi bakterijskega izvlečka, če je bil npr. filter slabo umit, ali pa je prišlo do kontaminacije orodja s sporami arbuskularno mikoriznih gliv, ko smo porezovali koruze.

V poskusu Rivera-Becerril in sod. (2001) so po šestih tednih gojenja rastlin graha, v koreninah glive že razvile vezikle in arbuskule, zato lahko naše rezultate primerjamo z njihovimi glede mikoriznih parametrov. Rastline vseh treh genotipov graha, ki so rastle v substratu brez dodanega Cd, se med seboj niso razlikovale glede stopnje mikorizne kolonizacije (cv. Frisson ( $M\% = 50$ ), VIR4788 ( $M\% = 39$ ) in VIR7128 ( $M\% = 39$ )). Tudi naše koruze, ki so rastle v substratu brez dodanega Hg, se v stopnji kolonizacije med sabo niso razlikovale. Rastline graha, ki so rastle v substratu z dodanim Cd, se niso bistveno razlikovale v stopnji kolonizacije korenin. Vsi trije genotipi graha se niso značilno razlikovali v stopnji mikorizne kolonizacije ( $M\% = 41-52$ ,  $A\% = 23-38$ ,  $V\% = 24-30$ ). Tudi naši tretmaji z dodanim Hg se niso med sabo statistično značilno razlikovali v stopnji kolonizacije korenin glede na kontrolni tretma brez dodanega Hg. So pa bile stopnje splošnje intenzitete korenine ( $M\% = 1-9$ ), gostote arbuskulov ( $A\% = 0,2-5,9$ ) in veziklov ( $V\% = 0-3,3$ ) v koreninskem sistemu bistveno nižje kot v koreninah graha. V rastlinah graha ni bilo večjih razlik v gostoti arbuskulov in veziklov, pri nas pa je bila večja gostota arbuskulov kot pa veziklov.

Če primerjamo naše mikorizne parametre z mikoriznimi parametri poskusa Vogel-Mikuš in sod. (2006) v rastlini *Thlaspi praecox* ugotovimo sledeče. V našem poskusu je bila mikorizna frekvence ( $F\% = 11-36\%$ ) nižja kot v rastlini *Thlaspi praecox* (20-87%). Naša

splošna mikorizna intenziteta je imela prav tako nižji razpon ( $M\% = 0,7-8,5$ ) kot v rastlini *Thlaspi praecox* (0,5-0,44 %). V našem poskusu je bila gostota veziklov v koreninskem sistemu (V %) bistveno manjša (do 3,3 %) kot pa v rastlini *Thlaspi praecox* (do 30 %). V rastlini *Thlaspi praecox* so se arbuskuli le redko pojavili (redkeje kot vezikli). V našem poskusu, pa so bile gostote arbuskulov (A %) v koreninskem sistemu višje kot pa gostote veziklov (A % = do 6 %).

## 5.5 KONCENTRACIJE ELEMENTOV

### 5.5.1 Koncentracija živega srebra

Rezultati so potrdili našo hipotezo, da se bo večina Hg akumuliralo v koreninah, zato so bile njegove koncentracije v koreninah višje kot v poganjkih. Tudi druge raziskave so pokazale, da se bistveno več Hg akumulira v koreninah kot pa v poganjkih (Yu in sod., 2010; Moreno in sod., 2006; Schwesig in Krebs, 2003; Carrasco-Gil in sod., 2011a). V naših rastlinah tretiranih s Hg je bilo v poganjkih le do 4 % Hg v primerjavi s koncentracijami Hg v koreninah. Podobne rezultate so dobili tudi v drugih raziskavah. Carrasco-Gil in sod. (2011a) so poročali, da je bilo v poganjkih le 2 % Hg v primerjavi s tistim, ki se je nahajal v koreninah lucerne (*Medicago sativa* cv. Aragon), koruze (*Zea mays* cv. Dekalb Paolo) in ječmena (*Hordeum vulgare*), ki so jih za 7 dni izpostavili koncentraciji 30 µM HgCl<sub>2</sub>. Tudi Wang (2004) poroča, da se je v vrbi (*Salix* spp.) večino Hg akumuliralo v koreninah in se ga je v poganjke preneslo le 0,5-0,6 %. To je dokaz, da korenine delujejo kot neke vrste bariera, ki preprečujejo prenos težkih kovin v nadzemne dele (Poschenrieder in Barceló, 2004). Večina nakopičenega Hg v koreninah je vezanega na proteine in ogljikove hidrate v celičnih stenah (80%) in bioloških membranah koreninskih celic (Wang in Greger, 2004; Hall, 2002). Epidermis korenine deluje kot dobra bariera, ki preprečuje vnos Hg v korenine. To lahko razberemo tudi iz naših elementarnih map, ki ponazarjajo porazdelitev Hg na tkivnem nivoju, iz katerih je lepo vidno, da večina Hg ostane v epidermisu (Preglednica 20). V koreninah rastlin, tretiranih s Hg, je opazna povečana koncentracija Hg v epidermisu, sledi pa mu endodermis. Naše rezultati so primerljivi z rezultati, ki so jih dobili Debeljak in sod. (2013). V endodermisu je bila opazna povišana koncentracija Hg v krogu, ki se najbrž tvori okoli kasparijevega traka. Kasparijev trak je najpomembnejše območje, ki varuje rastlino pred privzemom slabo mobilnih ionov v korenine. Izoblikuje se v coni diferenciacije korenin, torej takoj za meristemom. Sestavlajo ga močno suberinizirane celice endodermisa, ki so neprepustne za vodo in zato preprečujejo pasivni transport ionov v stelo, kar povzroči akumulacijo Hg pred njim. Ko se v območju kasparijevega traku oblikuje suberinizirana lamela, je naprej mogoč le simplasten transport (transport znotraj celic) iz kortikalnih celic v stelo (Wang, 2004). V elementni mapi tretmaja Hg je lepo vidna zelena cona v sredini korenine, ki pripada steli, kar pomeni, da je nekaj Hg prišlo tudi do prevajalnih elementov (Preglednica 20). Ti so se lahko prenesli v notranjost korenine iz koreninskega vršička. V koreninskem vršičku se namreč nahajajo celice, ki se še delijo in niso diferencirane. Te celice še niso suberinizirane, zato lahko v njih kovinski ioni po apoplastu prehajajo do stele korenin. Koliko ionov težke kovine se bo preneslo v poganjke je odvisno od razdalje med koreninskim vršičkom in suberinizirano lamelo (Wang, 2004).

Živo srebro smo izmerili v koreninah in listih tako kontrolnih kot tudi tretiranih rastlin. V koreninah kontrolnih rastlin so bile koncentracije Hg glede na tretirane rastline zelo majhne. Glede na rezultate sklepamo, da je bilo nekaj živega srebra prisotnega že v samem substratu. Ta se je lahko transportiral v poganjke in zato smo izmerili določeno koncentracijo Hg v poganjkih kontrolnih rastlin. Druga možnost onesnaženja kontrolnih rastlin pa je, da je prihajalo do izhlapevanja živega srebra iz substrata. Kontrolne rastline in rastline, tretirane s Hg, so rastle v isti rastni komori, zato se je izhlapeli Hg kopičil v majhnem zračnem prostoru komore. Poskusne rastline so lahko sprejemale Hg iz zraka preko listov. Nekaj Hg je lahko ostalo v listih, nekaj pa se ga je preneslo v korenine. Da lahko Hg hlapi iz tal in ga rastline prejemajo iz zraka so ugotovili že Suszczynsky in Shann (1995) ter Schwesig in Krebs (2003). Da pa se lahko Hg, ki ga rastlina prejme iz zraka prenese v steblo in korenine, pa so dokazali Gaggi in sod. (1991) pri azeleji ter Browne in Fang (1978) pri pšenici.

Naši rezultati niso pokazali statistično značilnega vpliva arbuskularne mikorize na koncentracijo Hg v poganjkih in se ujemajo z rezultati raziskave Yu in sod. (2010). Ti so ugotovili, da se koncentracije Hg v poganjkih z arbuskularno mikoriznimi glivami inokuliranih in neinokuliranih koruz niso bistveno razlikovale. Naši rezultati tudi niso pokazali statistično značilnega vpliva arbuskularne mikorize na koncentracijo Hg v koreninah. Zato smo ovrgli našo hipotezo, da bo v inokuliranih koreninah koncentracija Hg manjša kot v neinokuliranih koreninah. Na pravilnost naše hipoteze nakazuje le trend viden v primeru rastlin tretiranih s Hg, kjer je arbuskularna mikoriza nekoliko zmajšala koncentracijo Hg v koreninah in v poganjkih. To se ujema z rezultati raziskave Yu in sod. (2010), ki so prav tako ugotovili, da arbuskularna mikoriza nekoliko zmanjša koncentracijo Hg v koreninah in poganjkih koruze. Ker so v tleh, kjer so raste mikorizne rastline, po ekstrakciji z  $\text{CaCl}_2$  našli manj biodostopnega Hg, so sklepali, da arbuskularne glive vplivajo na biodostopnost Hg, saj v rastlinah koncentracije niso bile povečane (Yu in sod., 2010). AM glive lahko zmanjšajo dostopnost Hg s spremembom pH tal in s sorbcijo/desorbcijo delcev na snovi v substratu (Li in Christie, 2001; Solaiman in Abbott, 2004). Poleg tega pa se lahko zmanjša koncentracija Hg v tleh tudi z pretvorbo v hlapno obliko (Yu in sod., 2010), ki jo povzročajo mikroorganizmi v tleh. Možno je tudi, da so arbuskularno mikorizne glive s svojo aktivnostjo povečale izhlapevanje Hg iz substrata.

Naši rezultati so pokazali statistično značilen vpliv živega srebra na koncentracijo selena ter selena na koncentracijo živega srebra v rastlini. Zanimivo pa je, da je v primeru tretiranja s Hg in Se hrati, prišlo v inokuliranih rastlinah (AMHgSe) do povečanja koncentracije Hg tako v poganjkih kot tudi koreninah ter znižanja koncentracije Se v poganjkih in v koreninah glede na neinokulirano kontrolo (HgSe). Elementna mapa za Hg je pokazala, da je njegova razporeditev v koreninah tretmaja AMHgSe zelo podobna

razporeditvi Hg v koreninah neinokuliranega tretmaja tretiranega le s Hg (Hg), kjer je tretiranje s Hg prav tako povzročilo dvig koncentracije Hg v koreninah in poganjkih. K podobni razporeditvi živega srebra v obeh tretmajih je najbrž prispevala prisotnost arbuskularno mikoriznih gliv v obeh tretmajih. Čeprav v tretmaju Hg nismo pričakovali arbuskularno mikoriznih gliv, smo opazili arbuskule. To pomeni, da je bil tretma Hg kontaminiran z arbuskularno mikoriznimi glivami. V elementni mapi prečnega prereza inokulirane korenine tretirane s Hg (AMHg) je razvidno, da se največ Hg kopiči v epidermisu, v notranjosti pa je razprt šen po celotni korenini, a verjetno v zelo nizkih koncentracijah. To lahko razložimo z rezultati raziskav Hildebrant in sod. (2007). Ti so poročali, da se težke kovine, ki prodrejo v notranjost korenine, večinoma nahajajo v notranjih parenhimatskih celicah, kjer se nahaja tudi večina glivnih struktur (intraradikalne hife, arbuskuli in vezikli). Nedavne raziskave so pokazale, da se Zn, Cu in Cd akumulirajo v celične stene in v granule v citoplazmi gliv (González-Guerrero in sod., 2008). Poleg tega so znanstveniki poročali, da bi lahko vezikli kopičili težke kovine (Turnau, 1998; Weiersbye in sod., 1999).

De Souza in sod. (1999) so preučevali vpliv rizosfernih bakterij na akumulacijo selena in živega srebra v močvirnatih rastlinah in ugotovili, da bakterije povečajo privzem Hg in Se v korenine trave *Scirpus robustus* Pursh in trave *Polypogon monspeliensis* (L.) Desf. Vendar pa bakterije niso vplivale na koncentracijo Hg in Se v poganjkih. Ena izmed možnosti, zakaj bakterije povzročijo večjo akumulacijo strupenih elementov, ki se nahajajo v sledovih je, da jih pretvorijo v oblike, ki jih rastline lažje privzemajo. Npr. bakterije lahko selen pretvorijo iz anorganske v organsko obliko selenia (npr. SeMet), ki pa ga rastline veliko lažje prevzemajo kot pa anorganske oblike (Zayed in sod., 1998). Prav tako kot bakterije imajo lahko tudi mikorizne glive razvite mehanizme, ki jim omogočajo spremembo oblike selenia in s tem spremembo dostopnosti za rastline. V našem poskusu smo sicer raztopino selenia nanašali na liste, zato arbuskularne glive niso bile v neposrednem stiku z apliciranim selenom, kar pomeni, da so rastline večino selenia privzele iz listne površine. Poudariti pa moramo, da ko smo porezali rastlinice, nismo oprali listov, zato je lahko prišlo do napake pri naših rezultatih, saj je precej vрjetno, da je nekaj selenia ostalo na površini listov, zato naši rezultati niso zanesljivi. Do povečane koncentracije Hg in znižane koncentracije Se v mikoriznih tretmaju AMHgSe glede na kontrolni nemikorizni tretma HgSe je lahko prišlo, ker so rastline privzemale večino živega srebra iz korenin, selenia pa preko površine listov, zato je v tem primeru prišlo v listih do reakcije med Hg in Se ter do tvorbe netopnih kompleksov Hg-Se (Mounicou in sod., 2006), ki pa so se kopičili v listih. Vendar pa bi za potrditev te hipoteze morali narediti dodatne analize, kjer bi določali ligandno okolje Hg.

V poganjkih ni bilo bistvene razlike v koncentraciji Hg v poganjkih, tretiranih s Hg (Hg) in poganjkih, tretiranih s Hg in Se skupaj (HgSe). V koreninah so bile koncentracije Hg v tretmaju HgSe bistveno nižje kot pa v tretmaju Hg. V koreninah je prišlo v neinokuliranem tretmaju tretiranem s Se in Hg (HgSe) do statistično značilnega povečanja koncentracije selena glede na kontrolo (cSe). V ostalih tretmajih tretiranih s Hg pa je glede na kontrolne tretmaje, ki niso tretirani s Hg opaziti trend povečevanja koncentracije selena v koreninah ne glede na prisotnost mikorizne inokulacije. V koreninah lahko nastanejo slabo topni, za rastlino nenavarni kompleksi Hg-Se, ki zato ostanejo v rastlini in posledično imamo visoko koncentracijo Hg in Se v korenini. Hg in Se se vežeta na določene biomolekule (topne in netopne v vodi) v koreninah, ki preprečujejo njuno translokacijo v višje dele rastlin. Večina Hg in Se je v korenini vezanega na komplekse z veliko molekularno težo, ki so v vodi netopni (Mounicou in sod., 2006). V naših elementnih mapah je vidna visoka koncentracija Hg v epidermisu korenin, zato sklepamo, da se kompleksi z visoko molekularno težo nahajajo v epidermisu. V neinokuliranih koreninah, tretiranih s Hg in Se (HgSe), je zelo velika koncentracija Hg opazna le v epidermisu, ki pa očitno deluje kot odlična bariera, saj je v notranjosti korenine višje koncentracije Hg opaziti le v nekaj zelo majhnih točkah.

V nekaterih raziskavah pa so dobili ravno nasprotne rezultate kot mi in sicer, da z večanjem koncentracije selena, upada koncentracija živega srebra v koreninah (Falnoga in sod., 2003; Shanker in sod., 1996). V tem primeru najbrž do tvobe netopnih kompleksov Hg-Se prihaja že v rizosferi in se na tak način zmanjša količina dostopnega Hg in Se (Shanker in sod., 1996).

Tako v koreninah kot tudi v poganjkih inokuliranih in neinokuliranih rastlin, tretiranih s Hg in Se (AMHgSe in HgSe), je glede na kontrolne tretmaje (AMHg in Hg) prišlo do povečanja koncentracije selena. Da je prišlo do povečanja koncentracije selena tako v poganjkih kot koreninah tretmajev AMHgSe in HgSe, je logično, saj smo liste obeh tretmajev pošpricali z raztopino selena (liste kontrol pa ne), kar je povzročilo dvig koncentracije selena v okolini rastline in posledično večji privzem selena v rastline.

Tudi koncentracija živega srebra statistično značilno vpliva na koncentracijo selena v poganjkih in koreninah. V inokuliranem tretmaju, tretiranem s Hg in Se (AMHgSe), je koncentracija selena nižja v poganjkih in koreninah glede na kontrolo (AMcSe), v drugih primerih pa v poganjkih ni bilo statistično značilnih razlik med tretmaji teritanimi s Hg in kontrolnimi tretmaji.

### 5.5.2 Koncentracija selena

Od oblike selena je odvisno koliko selena bodo rastline privzele. Za tretiranje smo uporabili oksigenirano obliko selena-selenat ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ), saj je topen v vodi, dobro mobilen in zato lažje prehaja v rastline kot pa npr. selenit. Koliko selena bo rastlina privzemala je odvisno od vrste rastline. Glede na koncentracijo selena v rastlinah jih lahko razdelimo v več razredov. Prvi razred so »normalne« rastline, ki običajno kopičijo od 50-100 mg kg<sup>-1</sup>. Drugo skupino sestavljajo rastline (npr. trave, nekatera žita, itd.), ki vsebujejo manj kot 50 mg kg<sup>-1</sup> selena. V tretjo skupino pa uvrščamo hiperakumulacijske rastline (teh je malo), ki lahko kopičijo visoke koncentracije selena (tudi nad 1000 mg kg<sup>-1</sup>) (Wanek in sod., 1995; Lindblom in sod., 2014). Glede na te kriterije naše koruze spadajo v skupino rastlin, ki kopičijo zelo malo selena (manj kot 3 mg kg<sup>-1</sup>). Najprej moram poudariti, da v našem poskusu pred pripravo materiala za analizo elementov, poganjkov koruz nismo oprali z vodo, zato so lahko izmerjene koncentracije selena v poganjkih nekoliko višje, saj je lahko nekaj selena ostalo tudi na površini listov.

V našem poskusu je mikoriza statistično značilno vplivala na koncentracijo selena v poganjkih, ne pa v koreninah. Koncentracije selena v poganjkih in koreninah inokuliranega tretmaja AMHgSe so bile statistično značilno nižje kot pa v kontrolnem tretmaju (HgSe). Do upada koncentracije Se tako v poganjkih in koreninah inokuliranega tretmaja AMHgSe, je najbrž prišlo, zaradi dviga koncentracije žvepla tako v koreninah kot tudi v poganjkih inokuliranega kontrolnega tretmaja AMHgSe glede na kontrolni tretma HgSe. Poleg tega je prišlo do dviga koncentracije žvepla tudi v inokuliranih poganjkih, tretiranih s Hg (AMHg) glede na neinokuliran kontrolni tretma tretiran s Hg (Hg). To pomeni, da so arbuskularno mikorizne glive izboljšale preskrbo rastlin s žveplom ob kombinaciji tretiranja s Hg. Žveplo in selenat sta si kemijsko precej podobna in se prenašata z istimi membranskimi transporterji. Delujeta kot antagonista, zato je v našem primeru povečanje privzema žvepla, zmanjšalo privzem selena v rastline (McNear in sod., 2012). Mikorizna inokulacija pa v mikoriznih tretmajih brez tretiranja s Hg (AMc in AMcSe) ni bistveno vplivala na koncentracijo S v poganjkih glede na neinokulirane kontrole (c in cSe). Možno je, da je v substratu prosti Hg reagiral s S v kompleks HgS. Ti so se preko gliv prenašali v rastline, zato smo poleg povečane koncentracije Hg dobili tudi povečano koncentracijo S v mikoriznih rastlinah tretiranih s Hg. Da so nevtralni HgS kompleksi lahko biodostopni za mikoorganizme, so dokazali pri Hg-metilirajočih bakterijah (Benoit in sod., 1999).

Med ostalimi inokuliranimi in kontrolnimi tretmajmi pa ni bilo statistično značilnih razlik, ki bi jih povzročila arbuskularna mikoriza. V našem poskusu smo selen aplicirali folirano, živo srebro pa smo pomešali s substratom. Arbuskularno mikorizne glive zato niso bile direktno v stiku z apliciranim selenom in zato tudi v večini tretmajev najbrž ni prišlo do

statistično značilnih vplivov mikorize na koncentracijo selena tako v poganjkih kot tudi koreninah. Možno je, da v našem poskusu arbuskularna mikoriza sploh ni vplivala na koncentracijo selena v poganjkih in je znižana koncentracija selena v poganjkih tretmaja AMHgSe posledica napak pri delu. V raziskavah, kjer so selen dodajali v substrat in so lahko mikorizne glive prišle v fizični stik z njim, so dobili drugačne rezultate. Npr. Wanek in sod. (1995), so ugotovili, da vezikularno-arbuskularne mikorizne glive povečajo privzem selena v korenine rastlin *Artiplex canescens* in *Melilotus officinalis* iz tal, kar so pripisali povečani absorpcijski površini korenin zaradi povezave korenin z micelijem glive. Tudi v poskusu Larsen in sod. (2006) so selen aplicirali v substrat. Ugotovili so, da tretiranje rastlin česna poveča privzem selena v glavico česna za 10-krat.

Ugotovili smo, da tretiranje s selenom poveča koncentracijo selena tako v koreninah kot tudi v poganjkih. Podobne rezultate so dobili tudi v drugih raziskavah. Longchamp in sod. (2013) ter Smolen in sod. (2014) so z gojenjem koruze in solate dokazali, da povečevanje koncentracije selena v hidroponičnem gojišču povzroči povečanje koncentracije selena v poganjkih in koreninah. Koncentracije selena pa so bile v našem poskusu za 1,5-3,5-krat višje v koreninah kot v poganjkih v vseh tretmajih razen v tretmajih cSe in AMcSe, kjer pa so bile za 8 % in 5 % nižje v koreninah kot v poganjkih. Koruza spada med neakumulacijske vrste. Za večino neakumulacijskih vrst je značilno, da se večina selena v rastlini nahaja v koreninah in semenih in le majhne koncentracije v poganjkih in listih (Sors in sod., 2005). Glede na večjo koncentracijo selena v koreninah v primerjavi z poganjki in glede na to, da inokulacija z mikoriznimi glivami v večini tretmajev ni imela večjega vpliva na koncentracijo selena v rastlini, sklepamo, da so rastline selen prevzemale preko listov in ga prenesle v korenine. S tem smo tudi potrdili našo hipotezo, da se bo selenat presnavljal v listih in se transportiral v korenine. Da je to možno, potrjujejo rezultati raziskav Asher in sod. (1977) ter Gissel-Nielsen (1979), ki so pokazali, da se ioni selenata absorbirajo in prenašajo po rastlini brez metaboličnih zapletov. Da foliarno tretiranje rastlin s selenom poveča koncentracijo selena v koreninah, so v svojem poskusu na solati ugotovili tudi Smoleń in sod. (2014). Tudi Klusonova in sod. (2015) so ugotovili, da foliarno apliciranje selenata poveča koncentracijo selena v črni detelji (*Trifolium pratense*). Da se lahko selenat prenaša iz poganjkov v korenine so ugotovili tudi Kápolna in sod. (2009) na korenju (*Daucus carota*). Liste korenja so poškropili z raztopino selenata (0, 10 in 100  $\mu\text{g Se mL}^{-1}$ ). Povišane koncentracije selena so izmerili tako v poganjkih kot tudi v koreninah tretiranih z 10  $\mu\text{g Se mL}^{-1}$  (več kot 50-krat višje v poganjkih, več kot 10-krat višje v koreninah v primerjavi s kontrolo) in 100  $\mu\text{g Se mL}^{-1}$  (več kot 1700-krat višje v poganjkih in skoraj 50-krat višje v koreninah glede na kontrolo). Iz rezultatov je razvidno, da se s povečevanjem koncentracije apliciranega selena povečuje koncentracija selena tako v poganjkih kot koreninah. V naših koruzah so bile kljub foliarnem aplikiraju-

konzentracije selena višje v koreninah kot v poganjkih (izjema tretmaja cSe in AMcSe), v korenju pa je bilo ravno obratno (Kápolna in sod., 2009).

### 5.5.3 Koncentracije žvepla

#### 5.5.3.1 Vpliv koncentracije Se na privzem S

V rastlinah koruze je dodatek selena povzročil upad koncentracije žvepla v koreninah vseh tretmajev, razen v inokuliranem tretmaju tretiranim s Hg in Se hkrati (AMHgSe). Tudi rezultati drugih raziskav so pokazali, da dodatek selena povzroči upad koncentracije žvepla v rastlinah (Guerrero in sod., 2014; Bell in sod., 1992). Ker je selenat kemijsko podoben sulfatu, se po rastlini transportira s sulfatnimi transporterji, ki se nahajajo v plazemski membrani. Zaradi transportiranja z enakimi transportji, prihaja med njima do tekmovanja za vezavo nanje in zato delujeta kot antagonista (Feng in sod., 2013). Tretiranje s selenatom je povečalo njegovo koncentracijo v okolini rastline, zato se je na sulfatne transporterje vezalo več selenata. Vezava selenata na sulfatne transporterje je preprečila vezavo sulfata nanje in zato se je v rastline preneslo manj sulfata, kar zaznamo kot upad koncentracije žvepla v rastlini. Rios in sod. (2013) med selenatom in sulfatom niso odkrili antagonističnega delovanja ampak sinergističnega. Koncentracija žvepla v listih solate se je namreč povečevala z naraščanjem koncentracije selenata.

#### 5.5.3.2 Vpliv koncentracije Hg na privzem S

Tretiranje s Hg je v poganjkih naših koruz (še posebej v inokuliranih rastlinah) in *Chilopsis linearis* (Rodríguez in sod., 2009) povzročilo dvig koncentracije S. V koreninah naših koruz nismo zaznali pomembnega vpliva Hg na koncentracijo S. So pa vpliv zaznali v *Chilopsis linearis*. Pri 50 µM Hg je v *Chilopsis linearis* prišlo do upada, pri 100 µM Hg pa do zvišanja koncentracije S (Rodríguez in sod., 2009). Ena izmed možnosti povečanja S koncentracije v rastlinah trtiranih s Hg je, da se Hg in S skupaj prenašata v rastline vezana na spojine, kot je npr. Hg-tiosulfat. Kompleks Hg-tiosulfat lahko ob prisotnosti prostih protonov znotraj plazemske membrane razpade na živo srebrov in sulfatni ion. Sulfatni ion se pretvoriti v sulfat, živo srebrov ion pa reagira s S(2-) in nastanejo β-HgS kompleksi. Največ živega srebra se v rastlinskih celicah nahaja vezanega na žveplo prav v obliki β-HgS (66-94 %). Ostale oblike nahajanja Hg v rastlinskih celicah pa so še Hg-cistein (1-10 %) in Hg-dicistein (8-28 %). Aminokislina cistein pa prav tako vsebuje S (Wang in sod., 2012).

### 5.5.3.3 Vpliv mikorize na privzem S

Žveplo se v rastline absorbira v obliki sulfatnega aniona s sulfatnimi transporterji. Koncentracije sulfatnega aniona v tleh so običajno majhne. V tleh z nizko koncentracijo biodostopnega S, pomembno vlogo igrajo mikorizne glive, ki lahko izboljšajo oskrbo rastlin z žveplom. Arbuskularno mikorizne glive pozitivno vplivajo na koncentracijo žvepla v koruzi (Banerjee in sod., 2003) in čebuli (Guo in sod., 2007). Tudi v poganjkih naših koruz je mikorizna inokulacija povzročila dvig koncentracije S. V poskusu Vogel-Mikuš in sod. (2006) je mikorizna inokulacija prav tako povzročila dvig koncentracije žvepla v poganjkih *Thlaspi praecox*. Povzročila pa je tudi dvig koncentracije Hg v koreninah *Thlaspi praecox*, kar pa ne velja za naš poskus, saj v naših koruzah nismo zaznali vpliva mikorizne inokulacije na koncentracijo S v koreninah.

Da bomo razumeli vpliv selena ter arbuskularne mikorize na privzem in porazdelitev živega srebra v rastlinah, bo najbrž potrebno narediti še kar nekaj raziskav.

## 6 SKLEPI

- Inokulirane rastline so imele večjo suho maso korenin in poganjkov kot pa neinokulirane rastline.
- Rastline tretirane s Hg so imele manjšo suho maso poganjkov in korenin kot kontrolne rastline.
- Prisotnost arbuskularne mikorize je povečala koncentracijo klorofila *b*, kar lahko pripišemo izboljšani oskrbi rastlin z nutrienti, ki so potrebni za sintezo fotosinteznih pigmentov.
- Vezikli in arbuskuli so bili prisotni v inokuliranih koreninah, v neinokuliranih pa so bili arbuskuli prisotni le v koreninah tretiranih s Hg. V neinokuliranih koreninah veziklov nismo našli.
- Elementarne mape so razkrile, da se večina Hg kopiči v epidermisu korenin.
- Tretiranje s Hg ni bistveno vplivalo na koncentracijo Hg v poganjkih, v koreninah pa je prišlo do povečanja Hg, saj je Hg slabo mobilen, poleg tega pa korenine delujejo kot bariera, zato se ga le malo prenese v poganjke.
- Koncentracije težke kovine Hg so bile višje v koreninah kot pa v poganjkih.
- Arbuskularno mikorizne glive niso vplivale na koncentracijo Hg.
- Ugotovili smo, da koruza ni hiperakumulacijska rastlina za Se in Hg, saj kopiči zelo malo Se (manj kot  $3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) in Hg (manj kot  $70 \text{ mg kg}^{-1}$ ).
- Ugotovili smo, da tretiranje s selenom povečuje njegovo koncentracijo tako v poganjkih kot tudi v koreninah rastlin.
- Glede na večjo koncentracijo selena v koreninah v primerjavi z poganjki kljub folarnemu tretiranju s selenatom, sklepamo, da so rastline selen prevzemale preko listov in ga prenesle v korenine.
- Večje koncentracije Se so bile prisotne poganjkih inokuliranih ter neinokuliranih rastlin tretiranih s Hg in Se (HgSe in AMHgSe) v primerjavi z rastlinami tretiranimi s Hg in brez Se (Hg in AMHg).
- Tretmaji tretirani s Hg in mikorizno inokulacijo (AMHg in AMHgSe) so imeli statistično značilno višje koncentracije žvepla v primerjavi z vsemi ostalimi tretmaji
- Tretiranje s selenom je povzročilo upad koncentracije žvepla tako v koreninah, kot v poganjkih.

## 7 POVZETEK

Živo srebro je kovina, ki jestrupena za ljudi, živali in tudi rastline. Kopičenje Hg v organizmih povzroča resne poškodbe. Pri ljudeh kopičenje Hg povzroča resne nevrološke poškodbe, poškodbe ledvic in celo smrt, zato je pomembno, da omejimo njegov vnos v naše telo. Ljudje in živali ga lahko zaužijemo preko onesnažene hrane. Ker so rastline primarni vir hrane, prav preko njih prehaja Hg v prehranjevalno verigo, zato je prav, da skušamo najti rešitve, s katerimi bi zmanjšali vnos Hg v rastline ter njegov prenos iz korenin v poganjke. Vnos škodlivega Hg bi lahko zmanjšali z vezavo biodostopnega Hg na delce v tleh. Rastline prejemajo Hg iz tal preko korenin, pa tudi iz zraka preko listov.

Selen je eden izmed najbolj razširjenih koristnih elementov na Zemlji. Za mnoge organizme je selen esencialen mikronutrient. Organizmom je koristen le v nizkih koncentracijah, v visokih pa je strupen. Selen je pomemben, ker omogoča pravilno delovanje selenoproteinov. Ti imajo v organizmih zaščitno vlogo. Razlike med zaživljeno in potrebnimi koncentracijami Se in koncentracijami, ki so strupene, so majhne. Selen pri rastlinah v majhnih koncentracijah deluje kot antioksidant in inhibira lipidno peroksidacijo. V visokih koncentracijah pa je selen strupen. Glavni vzrok za njegovo strupenost je podobnost s S. Encimi, ki so vključeni v metabolizem žvepla, katalizirajo tudi analogne reakcije z ustreznimi Se snovmi. Afiniteta teh encimov za Se in S je podobna, zaradi česar lahko ob povišanih koncentracijah Se prihaja do vključitve selena na mesto v molekuli, kjer je običajno vezano žveplo. Posledica zamenjave S s Se v aminokislinah je lahko nepravilno zvijanje proteinov in posledično nefunkcionalnost proteinov ter encimov. Rastline največ selena privzamejo v obliki selenata, saj se ta dobro topi v vodi in je zato rastlinam lahko dostopen.

Znanstveniki so že večkrat poročali o zaščitni vlogi selena v živalih. Vpliv selena na privzem Hg v rastlinah pa je slabo raziskan. Shanker in sod. (1996) so v poskusu z redkvico ugotovili, da se s povečevanjem koncentracije selena in selenita, zmanjšuje privzem Hg. Ugotovili so, da korenine izločajo eksudate (ki nižajo pH), ki sprožijo pretvorbo Se v elementarni selen. Ta lahko reagira s  $Hg^{2+}$  in nastane zelo stabilen kompleks  $HgSe$ , ki pa je za rastline nedostopen. Kompleksi  $HgSe$  se tvorijo tudi znotraj korenin. Večina Hg in Se je vezanega na visokomolekularne v vodi netopne komplekse, ki zato ostajajo v korenini. Korenine delujejo kot bariera, ki preprečujejo prenos Hg v ostale dele rastlin.

Arbuskularna mikoriza je simbiozni odnos med glivnimi hifami in koreninami rastlin. Prisotna je pri približno 80 % vseh rastlinskih vrst. Glivne hife arbuskularno mikoriznih gliv se široko razraščajo v tleh in tvorijo obsežen izven koreninski micelij. Glivne hife pa segajo tudi v notranjost koreninskih celic, kjer tvorijo arbuskule in vezikle, strukture po

katerih je arbuskularna vezikularna mikoriza dobila ime. Med arbuskularno mikoriznimi glivami in rastlino prihaja do izmenjave snovi. Glive rastlini posredujejo predvsem hranila. Ker glive tvorijo v tleh obsežen micelij, se na tak način močno poveča površina v tleh iz katere rastline pridobivajo hranila. Arbuskularna mikoriza vpliva tudi na privzem težkih kovin. Od vrste arbuskulare glive in pa rastline je odvisno ali bodo te povečale privzem težkih kovin v rastlino ali zmanjšale. Arbuskulare glive lahko imobilizirajo Hg z izločanjem proteina glomalina, na katerega se veže Hg. Glive pa lahko kopijo težke kovine tudi v vakuolah, kjer tako kot v rastlinah, potekajo razstrupljevalni mehanizmi (Göhre in Paszkowski, 2006). Poleg tega lahko Hg vežejo tudi na metalotionine, spojine, ki vsebujejo žveplo in služijo razstrupljevanju težkih kovin v organizmih (Hall in sod., 2002; Oae in sod., 1992). Glive lahko zmanjšajo privzem Hg tudi s povečano mikoribno aktivnostjo v tleh in pa vezavo Hg v celične stene gliv. Mikorizna inokulacija naj bi povečevala privzem Se v rastline.

Semena koruze smo sterilizirali in en mesec gojili v substratu z  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  Hg in v substratu brez Hg. Rastline smo foliarno tretirali s selenom in sicer  $10 \text{ mg m}^{-2}$  lista (uporabili smo  $\text{K}_2\text{SeO}_4$ ). Po enem mesecu smo jih očistili in ločili na poganjke in korenine. Določili smo suho maso poganjkov in korenin. S pomočjo spektrofotometra smo pri valovnih dolžinah 647 nm, 664 nm in 470 nm izmerili absorpcijo in določili koncentracijo klorofila *a*, klorofila *b* in karotenoidov. S pomočjo spektrofotometra smo določili tudi stopnjo lipidne peroksidacije v koreninah in poganjkih. Po kislinskem razklopu liofiliziranega materiala, smo izmerili koncentracije elementov v poganjkih in koreninah. Koncentracije Hg in Se smo izmerili s pomočjo masne spektrometrije z induktivno sklopljeno plazemo (ICP-MS). Koncentracije elementov S smo izmerili s pomočjo atomsko emisijske spektrometrije z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-AES). Razporeditev živega srebra v korenini smo določevali s pomočjo laserske ablacije z induktivno sklopljeno plazmo in z masno spektrometrijo (LA-ICP-MS). Z barvanjem korenin in pregledom pod svetlobnim mikroskopom smo določili stopnjo mikorizne kolonizacije.

Naši rezultati so pokazali, da imajo inokulirane rastline večjo suho maso korenin in poganjkov kot pa neinokulirane rastline. Izboljšano rast rastlin pripisujemo izboljšani oskrbi rastlin z mikronutrienti. Izboljšana oskrba s hranili pozitivno vpliva tudi na obrambni sistem rastline.

V rastlinah tretiranih s Se je opazen trend znižanja koncentracije klorofila *a* in *b* v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Ker je koncentracija Se povečala tudi stopnjo lipidne peroksidacije, je to znak, da je bila naša koncentracija  $\text{K}_2\text{SeO}_4$  za rastlino že strupena, kljub temu, da je ta koncentracija imela pozitivni vpliv na biomaso rastlin.

V rastlinah, tretiranih s Hg, je opazen trend povečanja koncentracije karotenoidov v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, ki niso tretirane s Hg.

Prisotnost arbuskularne mikorize je pozitivno vplivala na koncentracijo klorofila *b*, kar lahko pripisemo izboljšani oskrbi rastlin s hranili, ki so potrebni za sintezo fotosinteznih pigmentov.

Vezikli in arbuskuli so bili prisotni v inokuliranih koreninah, v neinokuliranih pa so bili arbuskuli prisotni le v koreninah tretiranih s Hg. V neinokuliranih koreninah veziklov nismo našli. Da bomo odkrili vezikle in arbuskule v inokuliranih tretmajih je bilo pričakovano, saj je komercialni inokulum, ki smo ga vmešali v substrat, vseboval spore arbuskularno mikoriznih gliv. Neinokulirane tretmaje smo zalili le z bakterijskim izvlečkom komercialnega inokuluma, ki naj ne bi vseboval spor arbuskularno mikoriznih gliv, zato razvoj arbuskulov v neinokuliranem tretmaju Hg pripisujemo kontaminaciji substrata tega tretmaja s sporami AM gliv.

Elementarne mape so razkrile, da se večino Hg kopiči v epidermisu korenine. To je dokaz, da korenine delujejo kot bariera, ki preprečujejo privzem Hg. Večina Hg v koreninah (80 %) je vezanega na proteine in ogljikove hidrate v celičnih stenah koreninskih celic.

Tretiranje s Hg ni bistveno vplivalo na koncentracijo Hg v poganjkih, v koreninah pa je prišlo do povečanja Hg, saj je Hg slabo mobilen, poleg tega pa korenine delujejo kot bariera in preprečijo njegov prenos v poganjke.

Koncentracije težke kovine Hg so bile višje v koreninah kot pa v poganjkih. Živo srebro se močno veže na nemobilne ligande v koreninah, kjer tudi ostane. V ostale dele rastlin se ga prenese le malo.

Arbuskularno mikoriznen glive niso vplivale na koncentracijo Hg v poganjkih in koreninah.

Ugotovili smo, da koruza ni hiperakumulacijska rastlina za Se in Hg, saj kopiči zelo malo Se (manj kot  $3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) in Hg (manj kot  $70 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

Ugotovili smo, da tretiranje s Se povečuje njegovo koncentracijo tako v poganjkih kot tudi v koreninah rastlin, kar je logično, saj višja ko je koncentracija Se v okolju, več Se bodo rastline privzele.

Povečane koncentracije Se so bile v koreninah in poganjkih inokuliranih ter neinokuliranih rastlin tretiranih s Hg in Se (HgSe in AMHgSe) v primerjavi z rastlinami tretiranimi s Hg in brez Se (Hg in AMHg). Do povišane koncentracije tako v poganjkih kot tudi v koreninah je najbrž prišlo zato, ker so rastline Se prejemale preko površine listov, Hg pa skozi korenine. Nekaj Hg se je preneslo tudi v nadzemne dele, kjer je prišel v stik s Se, kar

je najbrž povzročilo tvorbo kompleksov HgSe. Selen se je iz poganjkov prenašal tudi v korenine, kjer je ravno tako prišlo do tvorbe kompleksov HgSe, ki so v vodi netopni in so zato ostali na mestih nastanka.

Koncentracije selena so bile od 1,5-3,5-krat višje v koreninah kot pa v poganjkih (izjema so bili tretma cSe in AMcSe, kjer so bile koncentracije selena za 8 in 5 % nižje kot v poganjkih). Koruza spada med neakumulacijske vrste. Za večino neakumulacijskih vrst je značilno, da se večina selena v rastlini nahaja v koreninah in semenih in le majhne koncentracije v poganjkih in listih. Glede na večjo koncentracijo selena v koreninah v primerjavi s poganjki in glede na to, da inokulacija z mikoriznimi glivami v večini tretmajev ni imela večjega vpliva na koncentracijo selena v rastlini, sklepamo, da so rastline selen prevzemale preko listov in ga prenesle v korenine.

Tretiranje s selenom je povzročilo upad koncentracije žvepla tako v koreninah, kot v poganjkih. Ker je selenat kemijsko podoben sulfatu, se po rastlini transportira s sulfatnimi transporterji, ki se nahajajo v plazemski membrani. Zaradi transportiranja z enakimi transportnimi potmi, prihaja med njima do tekmovanja za vezavo nanje in zato delujeta kot antagonista (Feng in sod., 2013). Povečan privzem S je dokaz, da arbuskularno mikorizne glive dejansko vplivajo na privzem hranil v rastline.

Da bomo razumeli vpliv selena ter arbuskularne mikorize na privzem in porazdelitev živega srebra v rastlinah, bo najbrž potrebno narediti še kar nekaj raziskav.

## 8 VIRI

### 8.1 CITIRANI VIRI

- Anderson T.A., Coats J.R. 1994. Bioremediation Through Rhizosphere Technology. Washington, American Chemical Society: 563 str.
- Agarwal P., Sah P. 2009. Ecological Importance of Ectomycorrhizae in World Forest Ecosystems. *Nature and Science*, 7, 2: 107-116
- Asher C.J., Butler G.W., Peterson P.J. 1977. Selenium transport in root systems of tomato. *Journal of Experimental Botany*, 28, 103: 279-291
- Audet P., Charest C. 2007. Dynamics of arbuscular mycorrhizal symbiosis in heavy metal phytoremediation: Meta-analytical and conceptual perspectives. *Environmental Pollution*, 147, 3: 609–614
- Azcón R., Ambrosano E., Charest C. 2003. Nutrient acquisition in mycorrhizal lettuce plants under different phosphorus and nitrogen concentration. *Plant Science*, 165: 1137-1145
- Baker A.J.M., McGrath S.P., Sidoli C.D.M., Reeves R.D. 1994. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resources, Conservation and Recycling*, 11: 41-49
- Barker S.J., Tagu D., Delp G. 1998. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology*, 116: 1201-1207
- Banerjee R., Evande R., Kabil O., Ojha S., Taoka S. 2003. Reaction mechanism and regulation of cystathionine beta-synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1647: 30–35
- Benoit J.M., Gilmour C.C., Mason R.P., Heyes A. 1999. Sulfide Controls on Mercury Speciation and Bioavailability to Methylating Bacteria in Sediment Pore Waters. *Environmental Science and Technology*, 33: 951–957
- Basak M., Sharma M., Chakraborty U. 2001. Biochemical responses of *Camellia sinensis* (L.) O. Kutenze to metal stress. *Journal of Environmental Biology*, 22, 1: 29-36

Beijer K., Jenelov A. 1978. Ecological aspects of mercury-selenium interactions in the marine environment. *Environmental Health Perspect*, 25: 43-45

Bell P.F., Parker D.R., Page A.L. 1992. Contrasting selenate sulfate interactions in selenium-accumulating and non accumulating plant-species. *Soil Science Society of America Journal*, 56, 6: 1818-1824

Bell R., Evans C.X., Roberts E.R. 1998. Decreased incidence of mycorrhizal roots tips associated with the soil heavy-metal enrichment. *Plant and Soil*, 106: 143-145

Browne C.L., Fang C.S. 1978. Uptake of mercury vapor by wheat. An assimilation model. *Plant Physiology*, 61: 430-433

Cairney J.W.G. 1999. Mycorrhizal associations. V: Plants in Action. 1<sup>st</sup> ed. Part II, Chapter 3. Atwell B.J., Kriedemann P.E., Colin G.N. (eds.). Melbourne, Macmillan Education Australia Pty Ltd: 1-7

Cargnelutti D., Tabaldi L.A., Spanevello R.M., Jucoski G.O., Battisti V., Redin M., Linares C.E.B., Dressler V.L., Flores M.M., Nicoloso F.T., Morsch V.M., Schetinger M.R.C. 2006. Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings. *Chemosphere*, 65, 6: 999-1006

Carrasco-Gil S., Álvarez-Fernández A., Sobrino-Plata J., Millán R., Carpena-Ruiz R.O., Leduc D.L., Hernández L.E. 2011a. Complexation of Hg with phytochelatins is important for plant Hg tolerance. *Plant, Cell and Environment*, 34, 5: 778-791

Carrasco-Gil S. 2011b. Speciation and distribution of mercury in plants as scientific bases for phytotechnology. Tesis doctoral. Madrid, Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología: 128 str.

Carrasco-Gil S., Siebner H., LeDuc D.L., Webb S.M., Millán R., Andrews J.C., Hernández L.E. 2013. Mercury Localization and Speciation in Plants Grown Hydroponically or in a Natural Environment. *Environmental Science and Technology*, 47, 7: 3082-3090

Chen B.D., Christie P., Li X.L. 2001. A modified glass bead compartment cultivation system for studies on nutrient and trace metal uptake by arbuscular mycorrhiza. *Chemosphere*, 42: 185-192

Cho U., Park J.O. 2000. Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Science*, 156, 1: 1-9

Cigale M., Dizdarevič T., Režun B., Likar J., Čadež J., Horvat M., Kotnik J., Janež J., Pisk A. 2007. Monitoring vplivnega območja rudnika živega srebra Idrija po končanih zapisnih delih. V: Zbornik Strokovnega posvetovanja rudarjev in geotehnologov ob 40. Skoku čez kožo, Ljubljana, 30. marec 2007. Kortnik J., Likar J., Hafner G., Jelen G. (ur.). Ljubljana, Slovensko rudarsko društvo inženirjev in tehnikov – SRDIT: 89-95.  
<http://www.srdit.si/40skok/40skokClanki.html> (28. 12. 2013)

Cooper C.M., Gillespie W.B. 2001. Arsenic and mercury concentrations in major landscape components of an intensively cultivated watershed. Environmental Pollution, 111: 67–74

Cunningham S.D., Ow D.W. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. Plant Physiology, 110: 715-719

Debeljak M., van Elteren J.T., Vogel-Mikuš K. 2013. Development of a 2D laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry mapping procedure for mercury in maize (*Zea mays* L.) root cross-sections. Analytica Chimica Acta, 787: 155-162

Delachiauve M.E.A., Pedras J.F., Rodrigues J.D., Moraes J.A.P.V., Rodrigues S.D., Boaro C.S.F., Moraes M.A. 1990. Seed germination of *So, losanthes guianensis*, Ilk Fungicide concentration in relation to germination and cell size at different water potentials. Cientifica Jaboticabal, 18: 27-34

De Souza M.P., Pilon-Smits E.A.H., Mel Lytle C., Hwang S., Tai J., Honma T.S.U., Yeh L., Terry N. 1998. Rate-Limiting steps in selenium assimilation and volatilization by Indian Mustard. Plant Physiology, 117: 1487–1494

De Souza M. P., Huang C. P., Chee N., Terry N. 1999. Rhizosphere bacteria enhance the accumulation of selenium and mercury in wetland plants. Planta, 209, 2: 259–263

Del Val C., Barea J.M., Azcon-Aguilar C. 1999. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. Applied and Environmental Microbiology, 65: 718-723

Dimkovicj A., Van Hoewyk D. 2014. Selenite activates the alternative oxidase pathway and alters primary metabolism in *Brassica napus* roots: evidence of a mitochondrial stress response. BMC Plant Biology, 14: 1-15

Djanaguiram M., Durga Dev-i D., Shanker A.K., Sheeba J.A., Nangarusamy U. 2005. Selenium - an antioxidant protectant in soyabean during senescence. Plant and Soil, 272: 77-87

Duffield-Lillico A.J., Dalkin B.L., Reid M.E., Turnbull B.W., Slate E.H., Jacobs E.T., Marshall J.R., Clark L.C. 2003. Selenium supplementation, baseline plasma selenium status and incidence of prostate cancer: an analysis of the complete treatment period of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. BJU International, 91: 608-612

Durán P., Acuña J.J., Jorquera M.A., Azcón R., Borie F., Cornejo P., Mora M.L. 2013. Enhanced selenium content in wheat grain by co-inoculation of selenobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi: A preliminary study as a potential Se biofortification strategy. Journal of Cereal Science, 57: 275-280

Du Z., Bramlage W.J. 1992. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipidoxidation in sugar-rich plant tissue extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40: 1556-1570

Erickson J.A., Gustin M.S. 2004. Foliar exchange of mercury as a function of soil and air mercury concentrations. Science of the Total Environment, 324: 271–279

Falnoga I., Jereb V., Horvat M., Stibilj V., Jaćimović R., Jeran Z., Milačič R. 2003. Potential human exposure to Pb, Cd, Zn, As and Hg through consumption of foodstuffs grown or bred near mining areas in Slovenia. V: Report on the first research co-ordination meeting, (NAHRES, 75), Co-ordinated research project on use of nuclear and related analytical techniques in studying human health impacts of toxic elements consumed through foodstuffs contaminated by industrial activities, Vienna, 18-22 March, 2002. Vienna, IAEA: 137-142

Fargašová A. 2004. Toxicity comparison of some possible toxic metals (Cd, Cu, Pb, Se, Zn) on young seedlings of *Sinapis alba* L. Plant, Soil and Environment, 50: 33–38

Fargašová A., Pastierová J., Svetková K. 2006. Effect of Se-metal pair combinations (Cd, Zn, Cu, Pb) on photosynthetic pigments production and metal accumulation in *Sinapis alba* L. seedlings. Plant, Soil and Environment, 52: 8–15

Fan T.W.M., Lune A.N., Higashi R.M. 1997. Selenium biotransformations by a euryhaline microalga isolated from a saline evaporation pond. Environment Science Tehnology, 31: 569-576

- Feng R., Wei C., Tu S. 2013. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany*, 87: 58–68
- Filek M., Keskinen R., Hartikainen H., Szarejko I., Janiak A., Miszalski Z., Golda A. 2008. The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress. *Journal of Plant Physiology*, 165, 8: 833–844
- Fattah O.A. 2013. Effect of Mycorrhiza and phosphorus on micronutrients uptake by soybean plant grown in acid soil, 4, 3: 429–437
- Gabriel J., Mokrejš M., Bílý J., Rychlovský P. 1994. Accumulation of heavy metals by some wood-rotting fungi. *Folia Microbiologica*, 39: 115-118
- Gaggi C., Chemello G., Bacci E. 1991. Mercury-vapor accumulation in azalea leaves. *Chemosphere*, 22: 869–872
- Gaur A., Adholeya A. 2004. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science*, 86: 528–534
- Geologija. Geopark Idrija  
<http://www.geopark-idrija.si/si/geopark/92/geologija/> (16. 2. 2015).
- Germ M., Stibilj V. 2007. Selenium and plants. *Acta agriculturae Slovenica*, 89, 1: 65–71
- Gildon A. Tinker P.B. 1983. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. *New Phytologist*, 95: 263-268
- Gissel-Nielsen G. 1979. Uptake and translocation of selenium-75 in *Zea mays*. V: International Symposium on the Use of Isotopes and Radiation in Research on Soil-Plant Relationships. Proceedings series, 11. 12. 1978, Colombo. Vienna, IEAE: 427-436
- Godbold D.L., Hüttermann A. 1986. The uptake and toxicity of mercury and lead to spruce seedlings. *Water, Air and Soil Pollution*, 31: 509–515
- Göhre V., Paszkowski U. 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta*, 223, 6: 1115–1122
- González-Chávez C., D'Haen J., Vangronsveld J., Dodd J.C. 2002. Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. *Plant and Soil*, 240: 287–297

- Gonzalez-Chavez M.C., Carrillo-Gonzalez R., Wright S.F., Nichols K.A. 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. Environmental Pollution, 130: 317–323
- González-Guerrero M., Melville L.H., Ferrol N., Azco'n-Aguilar C., Peterson R.L. 2008. Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. Canadian Journal of Microbiology, 54, 2: 103-110
- Graan T., Ort D.R. 1984. Quantitation of the Rapid Electron Donors to P700, the Functional Plastoquinone Pool, and the Ratio of the photosystems in Spinach Chloroplasts. The Journal of Biological Chemistry, 259, 22: 14003-14010
- Gracey H.I., Stewart J.W.B. 1974. Distribution of mercury in Saskatchewan soils and crops. Canadian Journal of Soil Science, 51: 105-108
- Griffioen W.A.J., Ietswart J.H., Ernst W.H.O. 1994. Mycorrhizal infection of an *Agrostis capillaris* population on a copper contaminated soil. Plant and Soil, 158: 83-89
- Grosar M., Šajn R. 2001. Mercury in soil and attic dust as a reflection of Idrija mining and mineralization (Slovenia). Geologija, 44, 1: 137-159
- Guerrero B., Llugany M., Palacios O., Valiente M. 2014. Dual effects of different selenium species on wheat. Plant Physiology and Biochemistry, 83: 300–307
- Guo T., Zhang J.L., Christie P., Li X.L. 2007. Pungency of spring onion as affected by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and sulfur supply. Journal of Plant Nutrition, 30: 1023–1103
- Han F.X., Su Y., Monts D.L., Waggoner A.C., Plodinec J.M. 2006. Binding distribution, and plant uptake of mercury in a soil from Oak Ridge, Tennessee, USA. Science of The Total Environment, 368: 753–768
- Han D., Li X., Xiong S., Tu S., Chen Z., Li J., Xie Z. 2013. Selenium uptake, speciation and stressed response of *Nicotiana tabacum* L. Environmental and Experimental Botany, 95: 6–14
- Hanson P.J., Lindberg S.E., Tabberer T.A., Owens J.G., Kim K.H. 1995. Foliar exchange of mercury vapor: evidence for a compensation point. Water, Air and Soil Pollution, 80: 373–382

Hall J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal Experimental Botany*, 52: 631–640

Hartikainen H., Xue T., Piironen V. 2000. Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant and Soil*, 225: 193-200

Hawrylak-Nowak B., Matraszek R., Pogorzelec M. 2015. The dual effects of two inorganic selenium forms on the growth, selected physiological parameters and macronutrients accumulation in cucumber plants. *Acta Physiologiae Plantarum*: 37-41

Heatch R.L, Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125: 189-198

Hildebrandt U., Regvar M., Bothe H. 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 68, 1: 139–146

Huckabee J.W., Griffith N.A. 1974. Toxicity of mercury and selenium to the eggs of carp (*Cyprinus carpio*). *Transaction of the American Fish Society*, 103: 822-825

Huang H.L., Zhang S.Z., Wu N.Y., Luo L., Christie P. 2009. Influence of *Glomus etunicatum/Zea mays* mycorrhiza on atrazine degradation, soil phosphatase and dehydrogenase activities, and soil microbial community structure. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 726–734

ICP-AES Technique Description. 2013. USGS. Zadnja posodobitev 4. 3. 2013  
<http://minerals.cr.usgs.gov/gips/na/5process.html> (14. 8. 2015)

Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. 2015. Wikipedia. Datum zadnje spremembe 4. 6. 2015  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Inductively\\_coupled\\_plasma\\_atomic\\_emission\\_spectroscopy](https://en.wikipedia.org/wiki/Inductively_coupled_plasma_atomic_emission_spectroscopy) (14. 8. 2015)

Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. The Fieldmuseum.  
<http://www.fieldmuseum.org/science/special-projects/elemental-analysis-facility/inductively-coupled-plasma-mass-spectrometry> (14. 8. 2015)

Janero D.R. 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9: 515–540

Jean-Philippe S.R., Franklin J.A., Buckley D.S., Hughes K. 2011. The effect of mercury on trees and their mycorrhizal fungi. Environmental Pollution, 159, 10: 2733–2739

Ježek P., Škarpa P., Lošák T., Hlušek J., Jůzl M., Elzner P. 2012. Selenium – An Important Antioxidant in Crops Biofortification. V: Antioxidant Enzyme. El-Missiry M.A. (ed.). Brno, Mendel University in Brno, Department of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology: 343-368

Joner E.J., Briones R., Leyval C. 2000. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. Plant and Soil, 226: 227–234

Kalimuthu K., Sivasubramanian R. 1990. Physiological effects of heavy metals on *Zea mays* (maize) seedlings. Indian Journal of Plant Physiology, 33: 242-244

Kápolna E., Hillestrøm P.R., Laursen K.H., Husted S., Larsen E.H. 2009. Effect of foliar application of selenium on its uptake and speciation in carrot. Food Chemistry, 115, 4: 1357–1363

Khan A.G., Kuek C., Chaudhry T.M., Khoo C.S., Hayes W.J. 2000. Role of plants, Mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. Chemosphere, 41: 197-207

Kling J., 1997. Phytoremediation of organics moving rapidly into ®eld trials. Environmental Science Technology, 31: A129

Klusonova I., Skladanka J., Adam V., Škarpa P., Horky P., Hodulikova L., Kvasnovsky M. 2015. Uptake of Selenium of Red Clover (*Trifolium pratense* ), Mendel Net 2014: 50–52

Kopsell D.A., Kopsell D.E. 2006. Selenium. V: Handbook of plant nutrition. Barker A.V., Pilbeam D.J. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 515–549

Kopsell D.A., Sams C.E., Barickman T.C., Dennis E., Deyton D.E. 2009. Selenization of Basil and Cilantro Through Foliar Applications of Selenate-selenium and Selenite-selenium. HortScience, 44, 2: 438-442

Koruza. Wikipedia.

<https://sl.wikipedia.org/wiki/Koruza> (10. 8. 2015).

Kramer U., Smith R.D., Wenzel W.W., Raskin I., Salt D.E. 1997. The role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by *Thlapsi geoskingense* Halacsy. Plant Physiology, 115: 1641-1650

Kumar P.B.A.N., Dushenkov V., Motto H., Raskin I. 1995. Phytoextraction - the use of plants to remove heavy metals from soils. Environmental Science Technology, 29: 1232-1238

Kuznetsov V.V., Kholodova V.P., Kuznetsov V.I.V., Yagodin B.A. 2003. Selenium regulates the water status of plants exposed to drought. Doklady Biological Sciences, 390: 266-268

Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP MS). Evans Analytical Group.

<http://www.eag.com/mc/laser-ablation-inductively-coupled-plasma-mass-spectrometry.html> (14. 8. 2015)

Larsen E.H., Lobinski R., Burger-Meyer K. 2006. Uptake and speciation of selenium in garlic cultivated in soil amended with symbiotic fungi (mycorrhiza) and selenate. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 385: 1098-1108

Lauchli A. 1993. Selenium in Plants: Uptake, Functions, and Environmental Toxicity. Botanica Atra, 106: 455-468

Larsen E.H., Lobinski R., Burger-Meyer K., Hansen M., Ruzik R., Mazurowska L., Kik C. 2006. Uptake and speciation of selenium in garlic cultivated in soil amended with symbiotic fungi (mycorrhiza) and selenate. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 385, 6: 1098–1108

Lenntech Water Treatment and Air Purification. 2004. Water treatment. Lenntech, Rotterdamseweg, Netherlands.

<http://www.excelwater.com/thp/filters/Water-Purification.htm> (29. 1. 2015)

Leonard T.L., Taylor G.E., Gustin M.S., Fernandez G.C.J. 1998. Mercury and plants in contaminated soils: 2. Environmental and physiological factors governing mercury flux to the atmosphere. Environmental Toxicology and Chemistry, 17, 10: 2072–2079

Li X.L., Christie P. 2001. Changes in soil solution Zn and pH and uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal red clover in Zn contaminated soil. Chemosphere, 42: 201–207

Li P., Feng X.B., Qiu G.L., Shang L.H., Li Z.G. 2009. Mercury pollution in Asia: A review of the contaminated sites. *Journal of Hazardous Materials*, 168: 591–601

Liao J.P., Lin X.G., Cao Z.H., Shi Y.Q., Wong M.H. 2003. Interactions between arbuscular mycorrhizae and heavy metals under sand culture experiment. *Chemosphere*, 50: 847–853

Limly A.D. 2003. Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59, 1: 44-56

Leyval C., Turnau K., Haselwandter K. 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza*, 7, 3: 139-153

Lenti K., Fodor F., Boddi B. 2002. Mercury inhibits the activity of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase (POR). *Photosynthetica*, 40, 1: 145-151

Lindblom S.D., Fakra S.C., Landon J., Schulz P., Tracy B., Pilon-Smits E.A.H. 2014. Inoculation of selenium hyperaccumulator *Stanleya pinnata* and related non-accumulator *Stanleya elata* with hyperaccumulator rhizosphere fungi-investigation of effects on Se accumulation and speciation. *Physiologia Plantarum*, 150, 1: 107–118

Ling T., Fangke Y., Jun R. 2010. Effect of Mercury to Seed Germination, Coleoptile Growth and Root Elongation of Four Vegetables. *Research Journal of Phytochemistry*, 4: 225-233

Longchamp M., Angeli N., Castrec-Rouelle M. 2013. Selenium uptake in *Zea mays* supplied with selenate or selenite under hydroponic conditions. *Plant and Soil*, 362: 107–117

Malik J.A., Goel S., Kaur N., Sharma S., Singh I., Nayyar H. 2012. Selenium antagonises the toxic effects of arsenic on mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) plants by restricting its uptake and enhancing the antioxidative and detoxification mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*, 77: 242–248

Markert B. 1994. Plants as Biomonitor for Heavy Metal Pollution of the Terrestrial Environment. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft: 644 str.

Mathivanan K., Balasubramanian V., Rajaram R. 2010. Bacterial Resistance to Mercury Pollution Through Genetic Transformation. *World Applied Sciences Journal*, 8, 4: 400-403

- McNear D.H.Jr., Afton S.E., Caruso J.A. 2012. Exploring the structural basis for selenium/mercury antagonism in *Allium fistulosum*. *Metalomics*, 3: 267-276
- Messer R.L., Lockwood P.E., Tseng W.Y., Edwards K., Shaw M., Caughman G.B., Lewis J.B., Wataha J.C. 2005. Mercury (II) alters mitochondrial activity of monocytes at sublethal doses via oxidative stress mechanisms. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B, Applied biomaterials*, 75: 257–263
- Mikkelsen R.L., Page A.L., Bingham F.T. 1989. Factors affecting selenium accumulation by agricultural crops. V: Selenium in Agriculture and the Environment. Jacobs L.W. (ed.). Madison, SSSA Special Publication, 23: 65-94.
- Minorsky P.V. 2003. Selenium in plants. *Plant Physiology*, 133, 1: 14–15
- Morch V.M., Schetinges M.R.C., Martins A.F., Rocha J.B.T. 2002. Effects of cadmium, lead, mercury and zinc on delta amino levulinic acid dehydratase activity from radish leaves. *Biologia Plantarum*, 45, 1: 85-89
- Moreno-Jiménez E., Gamarra R., Carpena-Ruiz R.O., Millán R., Peñalosa J.M., Esteban E. 2006. Mercury bioaccumulation and phytotoxicity in two wild plant species of Almadén area. *Chemosphere*, 63, 11: 1969–1973
- Mosse B., Sibley D.P., Le Tacon F. 1981. Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. *Advances in Microbial Ecology*, 2: 137-210
- Mounicou S., Shah M., Meija J., Caruso J.A., Vonderheide A.P., Shann J. 2006. Localization and speciation of selenium and mercury in *Brassica juncea*—implications for Se–Hg antagonism. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21, 4: 404-412
- Muchovej R.M. 2001. Importance of Mycorrhizae for Agricultural Crops. *SS-AGR*, 170: 1-5
- Munier-Lamy C., Deneux-Mustin S., Mustin C. 2007. Selenium bioavailability and uptake as affected by four different plants in a loamy clay soil with particular attention to mycorrhizae inoculated ryegrass. *Journal of Environmental Radioactivity*, 97: 148-158
- Muñoz A.H.S., Wrobel K., Corona J.F.G., Wrobel K. 2007. The protective effect of selenium inorganic forms against cadmium and silver toxicity in mycelia of *Pleurotus ostreatus*. *Mycological Research*, 111: 626–632

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

Nakazawa E., Ikemoto T., Hokura A., Terada Y., Kunito T., Tanabe S., Nakai I. 2011. The presence of mercury selenide in various tissues of the striped dolphin: evidence from  $\mu$ -XRF-XRD and XAFS analyses. *Metallomics*, 3, 7: 719-725

Negri M.C., Hinchman R.R. 1996. Plants that remove contaminants from the environment. *Laboratory Medicine*, 27: 36-40

Nigam S.N., Tu J.I., McConnell W.B. 1969. Distribution of selenomethylselenocysteine and some other amino acids in species of *Astragalus*, with special reference to their distribution during the growth of *A. Bisulcatus*. *Phytochemistry*, 8: 1161-1165

Oae S., Okuyama T. 1992. *Organic Sulfur Chemistry: Biochemical Aspects*. Boca Raton, Florida, CRS Press: 43 str.

Pacovsky R.S. 1986. Micronutrient uptake and distribution in mycorrhizal or phosphorus-fertilized soybeans. *Plant and Soil*, 95, 3: 379-388

Patra M., Sharma A. 2000. Mercury toxicity in plants. *The Botanical Review*, 66, 3: 379-422

Patra M., Bhowmik N., Bandopadhyay B., Sharma A. 2004. Comparison of mercury systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 52: 199–223

Pedrero Z., Madrid-Albarrán Y., Hartikainen H., Cámara C. 2008. Protective effect of selenium in Broccoli (*Brassica olearacea*) plants subjected to cadmium exposure. *Journal of Agriculture and Food*, 56: 266-271

Pedrero Z., Madrid Y. 2009. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. *Analytica Chimica Acta*, 634: 135–152

Pennanen A., Xue T., Hartikainen H. 2002. Protective role of selenium in plant subjected to severe UV irradiation stress. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 76: 66–76

Pocock K., Duckett J.G. 1985. On the occurrence of the branched and swollen rhizoids in British hepatics: their relationships with the substratum and association with fungi. *New Phytologist*, 99: 281-304

- Poschenrieder C., Barceló J. 2004. Estrés por Metales Pesados. V: La Ecofisiología Vegetal. Reigosa M.J., Pedrol N., Sánchez A. (eds.). Madrid, Una Ciencia de Síntesis. Ed. Paraninfo: 413-442
- Prasad D.D., Prasad A.R. 1987. Effect of lead and mercury on chlorophyll synthesis in mung bean seedlings. *Phytochemistry*, 26: 881-883
- Pyrzyńska K. 2001. Analysis of selenium species by capillary electrophoresis. *Talanta*, 55: 657–667
- Quilambo O.A. 2003. Review. The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *African Journal of Biotechnology*, 2, 12: 539-546
- Raskin I., Kumar P.B.A.N., Dushenkov V., Salt D.E. 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants *Current Opinion in Biotechnology*, 5: 285-290
- Reamer D.C., Zoller W.H. 1980. Selenium biomethylation products from soil and sewage sludge. *Science*, 208: 500-502
- Regvar M., Groznik N., Goljevšček N., Gogala N. 2001. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi at various differentially managed ecosystems in Slovenia. *Acta Biologica Slovenica*, 44, 3: 27-34
- Rimmer C.C., Miller E.K., McFarland K.P., Taylor R.J., Faccio S.D. 2010. Mercury bioaccumulation and trophic transfer in the terrestrial food web of a montane forest. *Ecotoxicology*, 19, 4: 697–709
- Rios J.J., Blasco B., Leyva R., Sanchez-Rodriguez E., Rubio-Wilhelmi M.M., Romero L., Ruiz J.M. 2013. Nutritional Balance Changes in Lettuce Plant Grown Under Different Doses and Forms of Selenium. *Journal of Plant Nutrition*, 36, 9: 1344–1354
- Rivera-Becerril F., Calantzis C., Turnau K., Caussanel J.P., Belimov A.A., Gianinazzi S., Strasser R.J., Gianinazzi-Pearson V. 2002. Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *Journal of Experimental Botany*, 53, 371: 1177-1185
- Rodríguez E., Peralta-Videa J.R., Israr M., Sahi S.V., Pelayo H., Sánchez-Salcido B., Gardea-Torresdey J.L. 2009. Effect of mercury and gold on growth, nutrient uptake, and anatomical changes in *Chilopsis linearis*. *Environmental and Experimental Botany*, 65: 253–262

Ruiz O.N., Daniell H. 2009. Genetic engineering to enhance mercury phytoremediation. Current Opinion in Biotechnology, 20, 2: 213–219

Saffaryazdi A., Lahouti M., Ganjeali A., Bayat H. 2012. Impact of Selenium Supplementation on Growth and Selenium Accumulation on Spinach (*Spinacia oleracea* L.) plants. Notulae Scientia Biologicae, 4: 95-100

Salt D.E., Blaylock M., Kumar P.B.A.N., 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: 468-478

Schroeder W.H., Munthe J. 1998. Atmospheric mercury - an overview. Atmospheric environment, 32, 5: 809-822

Schuster E. 1991. The behavior of mercury in the soil with special emphasis on complexation and adsorption processes - a review of the literature. Water, Air and Soil Pollution, 56: 667–680

Schwesig D., Krebs O. 2003. The role of ground vegetation in the uptake of mercury and methylmercury in a forest ecosystem. Plant and Soil, 253, 2: 445–455

Shanker K., Mishra S., Srivastava S., Srivastava R., Dass S., Prakash S., Srivastava M.M. 1996. Study of mercury-selenium (Hg-Se) interactions and their impact on Hg uptake by the radish (*Raphanus sativus*) plant. Food and Chemical Toxicology, 34, 9: 883–886

Sharma J., Subhadra A.V. 2010. The effect of mercury on nitrate reductase activity in bean leaf segments (*Phaseolus vulgaris*) and its chelation by phytochelatin synthesis. Life Sciences, 13: 1–8

Smith S.E., Read D.J. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. 2<sup>rd</sup> ed. London. Academic Press: 605 str.

Smith S.E., Read D.J. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. 3<sup>rd</sup> ed. London. Academic Press: 800 str.

Smoleń S., Kowalska I., Sady W. 2014. Assessment of biofortification with iodine and selenium of lettuce cultivated in the NFT hydroponic system. Scientia Horticulturae, 166: 9–16

- Solaiman M.Z., Abbott L.K. 2004. Functional diversity of arbuscular mycorrhizal fungi on root surfaces. V: Plant surface microbiology. 1<sup>st</sup> ed. Varma A., Abbott L.K., Werner D., Hampp R. (eds.). Heidelberg, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 340–341
- Sors T.G., Ellis, D.R., Salt D.E. 2005. Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. Photosynthesis Research, 86, 3: 373–389
- Strable J., Scanlon M.J. 2009. Maize (*Zea mays*): A model organism for basic and applied research in plant biology. Cold Spring Harbor Protocols: 1-10
- Suszczynsky E.M., Shann J.R. 1995. Phytotoxicity and accumulation of mercury in tobacco subjected to different exposure routes. Environmental Toxicology Chemistry, 14: 61-67
- Shaw B.P., Rout N.P. 2002. Hg and Cd induced changes in proline content and activities of proline biosynthesizing enzymes in *Phaseolus aureus* and *Triticum aestivum*. Biologia Plantarum, 45, 2: 267-271
- Tan J., Zhu W., Wang W., Li R., Hou S., Wang D., Yang L. 2002. Selenium in soil and endemic diseases in China. Science of the Total Environment, 284: 227–235
- Tchounwou P.B., Ayensu W.K., Ninashvili N., Sutton D. 2003. Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. Environmental Toxicology, 18, 3: 149–175
- Terry N., Zayed A.M., de Souza M.P., Tarun A.S. 2000. Selenium in higher plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 51: 401-432
- Thangavel P., Sulthana A.S., Subburam V. 1999. Interactive effects of selenium and mercury on the restoration potential of leaves of the medicinal plant, *Portulaca oleracea* Linn. Science of The Total Environment, 1-8: 243-244
- Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V. 1986. Mesure de taux de mycorhization VA dun systeme radiculaire. Recherche de methodes destimation ayant une signification fonctionnelle. V: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae. Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (eds.). Paris, INRA Press: 217-221
- Turakainen M., Hartikainen H., Seppänen M.M. 2004. Effects of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and concentrations of soluble sugars and starch. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 17: 5378-5382

Turistični rudnik živega srebra Idrija, Antonijev rov.

<http://www.antonijevrov.si/index.php/sl/ali-ste-vedeli/odkritje-zivega-srebra-in-bogate-cinabaritne-rude> (29. 1. 2015)

Turnau K. 1998. Heavy metal content and localization in mycorrhizal *Euphorbia cyparissias* from zinc wastes in southern Poland. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 67: 105–113

Urbanc M. 2010. Idrijski rudnik živega srebra. DEDI - digitalna enciklopedija naravne in kulturne dediščine na Slovenskem  
<http://www.dedi.si/dediscina/220-idrijski-rudnik-zivega-srebra> (16. 2. 2015)

Verma S., Dubey R.S. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Science, 164: 645–655

Vogel-Mikuš K., Pongrac P., Kump P., Nečemer M., Regvar M. 2006. Colonisation of a Zn, Cd and Pb hyperaccumulator *Thlaspi praecox* Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake. Environmental Pollution, 139, 2: 362–371

Vyas J., Puranik R.M. 1993. Inhibition of nitrate reductase activity by mercury in bean leaf segments. Indian Journal of Plant Physiology, 36: 57-60

Wanek P.L., Vance G.F., Williams S.E. 1995. Selenium uptake by four-wing saltbush and yellow-blossom sweet clover as influenced by vesicular-arbuscular mycorrhizae.V: Decades Later: A Time for Reassessment. American Society for Surface Mining and Reclamation on Annual Meetings, Gillette, June 3-8, 1995. Schuman G.E., Vance G.F. (eds.). Wyoming, University of Wyoming: 309-316

Wang, Y. 2004. Phytoremediation of mercury by terrestrial plants. Doctoral thesis. Stockholm, Stockholm University, Department of Botany: 41 str.

Wang Y., Greger M., 2004. Clonal differences in mercury tolerance, accumulation, and distribution in willow. Journal of Environmental Quality, 33: 1779–1785

Wang J., Feng X., Anderson C.W., Wang H., Zheng L., Hu T. 2012. Implications of mercury speciation in thiosulfate treated plants. Environmental Science and Technology, 46, 10: 5361-5368

Wang J., Wang Z., Mao H., Zhao H., Huang D. 2013. Increasing Se concentration in maize grain with soil- or foliar-applied selenite on the Loess Plateau in China. *Field Crops Research*, 150: 83-90

Weiersbye I.M., Straker C.J., Przybylowicz W.J. 1999. Micro-PIXE mapping of elemental distribution in arbuscular mycorrhizal roots of the grass, *Cynodon dactylon*, from gold and uranium mine tailings. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, 158: 335–343

Weissenhorn I., Glashoff A., Leyval C., Berthelin J. 1994. Differential tolerance to Cd and Zn of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soils. *Plant and soil*, 167, 2: 189-196

WHO. 1976. Mercury. Environmental Health Criteria 1. Geneva, World Health Organization: 1–132

Wu N.Y., Zhang S.Z., Huang H.L., Shan X.Q., Christie P., Wang Y.S. 2008. DDT uptake by arbuscular mycorrhizal alfalfa and depletion in soil as influenced by soil application of a non-ionic surfactant. *Environmental Pollution*, 151: 569–575

Yu Y., Zhang S., Huang H. 2010. Behavior of mercury in a soil-plant system as affected by inoculation with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza*, 20, 6: 407–414

Yu Y., Zhang S., Wen B., Huang H., Luo L. 2011. Accumulation and Speciation of Selenium in Plants as Affected by Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae*. *Biological Trace Element Research*, 143, 3: 1789-1798

Xue T., Hartikainen H., Piironen V. 2001. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant and Soil*, 237, 1: 55–61

Xylander M., Hagen C., Braune W. 1996. Mercury increases light susceptibility in the green alga *Haematococcus lacustris*. *Botanica Acta*, 109: 222–228

Zayed A., Lytle C.M., Terry N. 1998. Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta*, 206, 2: 284–292

Zhu Y.G., Pilon-Smits E.A., Zhao F.J., Williams P.N. Meharg A.A. 2009. Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Plant Science*, 14, 8: 436-442

Zhu X., Song F., Liu S. 2011 . Arbuscular mycorrhiza impacts on drought stress of maize plants by lipid peroxidation, proline content and activity of antioxidant system. Journal of Food Agriculture and Environment, 9: 583-587

Zhu X., Song F., Liu S., Liu T., Zhou X. 2012. Arbuscular mycorrhizae improves photosynthesis and water status of *Zea mays* L. under drought stress. Plant, Soil and Environment: 186–191

Zieve R., Peterson P.J. 1984. The accumulation and assimilation of dimethyl selenide by four plant species. *Planta*, 160: 180-184

## 8.2 DRUGI VIRI – VIRI SLIK

Gissel-Nielsen G. 1998. Effects of selenium supplementation of field crops. V: Environmental chemistry of selenium. Frankenberger W.T., Engberg R.A. (eds.). New York, Marcel Dekker: 99-112

Wang, Y. 2004. Phytoremediation of mercury by terrestrial plants. Doctoral thesis. Stockholm. Stockholm University, Department of Botany: 7 str.

## ZAHVALA

Najprej se lepo zahvaljujem mentorici prof. dr. Katarini Vogel-Mikuš za vodenje, pomoč in razlage pri izdelavi magistrskega dela.

Zelo lepo se zahvaljujem tudi Marti Debeljak za vsestransko pomoč pri izdelavi magistrskega dela.

Zahvaljujem se tudi Mileni Kubelj, Špeli Križišnik, Mateji Potisek, Evi Kovačec in Leji Orožen za pomoč in usmeritve pri izvedbi poskusov.

Zahvaljujem se tudi dr. Alešu Kladniku za pomoč pri fotografiraju pod mikroskopom.

Zahvaljujem se vsem zaposlenim na IJS, ki so mi pomagali pri pripravi materiala za analizo elementov.

Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim na oddelku za analizno kemijo, ki so mi pomagali pri pripravi materiala za merjenje elementov in samem merjenju elementov.

Še posebej pa se lepo zahvaljujem moji družini za podporo, pomoč in razumevanje v vseh letih mojega šolanja. Hvala, ker ste mi vedno stali ob strani!

Hvala tudi vsem ostalim, ki ste mi kakor koli pomagali pri izvedbi mojega magistrskega dela.

**Priloga A****Stopnja kolonizacije z AM glivami**

Pregednica: Rezultati faktorske ANOVA za mikorizni parameter F %. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ( $p < 0,05$ ). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $HgCl_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $K_2SeO_4$ ).

F%	SS	df	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>47425,41</b>	<b>1</b>	<b>47425,41</b>	<b>205,3557</b>	<b>0,000000</b>
<b>AM</b>	376,70	1	376,70	1,6311	0,206159
<b>Hg</b>	<b>2104,78</b>	<b>1</b>	<b>2104,78</b>	<b>9,1139</b>	<b>0,003640</b>
Se	357,12	1	357,12	1,5464	0,218211
AM*Hg	4,70	1	4,70	0,0203	0,887029
AM*Se	368,61	1	368,61	1,5961	0,211036
Hg*Se	<b>2371,26</b>	<b>1</b>	<b>2371,26</b>	<b>10,2678</b>	<b>0,002112</b>
AM*Hg*Se	157,91	1	157,91	0,6838	0,411361
<b>Napaka</b>	14780,34	64	230,94		

Pregednica: Rezultati faktorske ANOVA za mikorizni parameter M %. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ( $p < 0,05$ ). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $HgCl_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $K_2SeO_4$ ).

M%	SS	df	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>1155,131</b>	<b>1</b>	<b>1155,131</b>	<b>41,19093</b>	<b>0,000000</b>
<b>AM</b>	83,252	1	83,252	2,96871	0,089718
<b>Hg</b>	7,682	1	7,682	0,27393	0,602518
Se	9,442	1	9,442	0,33669	0,563785
AM*Hg	0,160	1	0,160	0,00569	0,940099
AM*Se	89,584	1	89,584	3,19449	0,078622
Hg*Se	<b>279,981</b>	<b>1</b>	<b>279,981</b>	<b>9,98388</b>	<b>0,002412</b>
AM*Hg*Se	2,298	1	2,298	0,08195	0,775602
<b>Napaka</b>	1794,773	64	28,043		

Pregednica: Rezultati faktorske ANOVA za mikorizni parameter m %. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ( $p < 0,05$ ). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $HgCl_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $K_2SeO_4$ ).

m %	SS	df	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>10438,95</b>	<b>1</b>	<b>10438,95</b>	<b>57,87561</b>	<b>0,000000</b>
<b>AM</b>	2,82	1	2,82	0,01563	0,900904
<b>Hg</b>	207,44	1	207,44	1,15008	0,287624
<b>Se</b>	14,50	1	14,50	0,08038	0,777712
<b>AM*Hg</b>	125,30	1	125,30	0,69468	0,407724
<b>AM*Se</b>	440,05	1	440,05	2,43971	0,123308
<b>Hg*Se</b>	<b>1707,03</b>	<b>1</b>	<b>1707,03</b>	<b>9,46412</b>	<b>0,003099</b>
<b>AM*Hg*Se</b>	161,81	1	161,81	0,89711	0,347177
<b>Napaka</b>	11363,23	63	180,37		

Pregednica: Rezultati faktorske ANOVA za mikorizni parameter a %. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ( $p < 0,05$ ). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $HgCl_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $K_2SeO_4$ ).

a%	SS	df	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>19288,31</b>	<b>1</b>	<b>19288,31</b>	<b>30,66192</b>	<b>0,000001</b>
<b>AM</b>	<b>10684,98</b>	<b>1</b>	<b>10684,98</b>	<b>16,98553</b>	<b>0,000110</b>
<b>Hg</b>	215,83	1	215,83	0,34310	0,560103
<b>Se</b>	<b>5675,06</b>	<b>1</b>	<b>5675,06</b>	<b>9,02143</b>	<b>0,003805</b>
<b>AM*Hg</b>	433,59	1	433,59	0,68927	0,409500
<b>AM*Se</b>	1585,54	1	1585,54	2,52047	0,117306
<b>Hg*Se</b>	1224,66	1	1224,66	1,94680	0,167756
<b>AM*Hg*Se</b>	0,27	1	0,27	0,00043	0,983554
<b>Napaka</b>	40260,08	64	629,06		

Pregednica: Rezultati faktorske ANOVA za mikorizni parameter A%. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ( $p < 0,05$ ). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $HgCl_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $K_2SeO_4$ ).

A %	SS	df	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>151,1197</b>	<b>1</b>	<b>151,1197</b>	<b>11,42860</b>	<b>0,001237</b>
<b>AM</b>	<b>115,7533</b>	<b>1</b>	<b>115,7533</b>	<b>8,75398</b>	<b>0,004326</b>
<b>Hg</b>	3,8159	1	3,8159	0,28858	0,592992
<b>Se</b>	<b>68,3760</b>	<b>1</b>	<b>68,3760</b>	<b>5,17102</b>	<b>0,026329</b>
<b>AM*Hg</b>	0,1758	1	0,1758	0,01329	0,908575
<b>AM*Se</b>	45,3572	1	45,3572	3,43019	0,068628
<b>Hg*Se</b>	28,3838	1	28,3838	2,14656	0,147785
<b>AM*Hg*Se</b>	14,3902	1	14,3902	1,08828	0,300778
<b>Napaka</b>	846,2680	64	13,2229		

Pregednica: Rezultati faktorske ANOVA za mikorizni parameter mis %. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ( $p < 0,05$ ). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $HgCl_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $K_2SeO_4$ ).

mis %	SS	df	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>26112,05</b>	<b>1</b>	<b>26112,05</b>	<b>52,68984</b>	<b>0,000000</b>
<b>AM</b>	1223,10	1	1223,10	2,46801	0,121116
<b>Hg</b>	294,11	1	294,11	0,59346	0,443919
<b>Se</b>	296,90	1	296,90	0,59910	0,441773
<b>AM*Hg</b>	877,92	1	877,92	1,77150	0,187918
<b>AM*Se</b>	7,64	1	7,64	0,01541	0,901586
<b>Hg*Se</b>	947,47	1	947,47	1,91184	0,171565
<b>AM*Hg*Se</b>	368,87	1	368,87	0,74432	0,391502
<b>Napaka</b>	31717,14	64	495,58		

Pregednica: Rezultati faktorske ANOVA za mikorizni parameter Mis %. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ( $p < 0,05$ ). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $HgCl_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $K_2SeO_4$ ).

Mis %	SS	df	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>40,3565</b>	<b>1</b>	<b>40,35647</b>	<b>17,39232</b>	<b>0,000093</b>
<b>AM</b>	0,4979	1	0,49786	0,21456	0,644785
<b>Hg</b>	0,7021	1	0,70207	0,30257	0,584192
<b>Se</b>	0,1086	1	0,10863	0,04681	0,829389
<b>AM*Hg</b>	0,2467	1	0,24671	0,10633	0,745431
<b>AM*Se</b>	2,0642	1	2,06417	0,88959	0,349136
<b>Hg*Se</b>	5,0479	1	5,04794	2,17550	0,145127
<b>AM*Hg*Se</b>	0,1228	1	0,12283	0,05294	0,818763
<b>Napaka</b>	148,5031	64	2,32036		

Pregednica: Rezultati faktorske ANOVA za mikorizni parameter v %. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ( $p < 0,05$ ). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $HgCl_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $K_2SeO_4$ ).

v %	SS	df	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>5611,42</b>	<b>1</b>	<b>5611,416</b>	<b>15,22455</b>	<b>0,000232</b>
<b>AM</b>	<b>5611,42</b>	<b>1</b>	<b>5611,416</b>	<b>15,22455</b>	<b>0,000232</b>
<b>Hg</b>	782,77	1	782,771	2,12377	0,149919
<b>Se</b>	955,36	1	955,362	2,59203	0,112324
<b>AM*Hg</b>	782,77	1	782,771	2,12377	0,149919
<b>AM*Se</b>	955,36	1	955,362	2,59203	0,112324
<b>Hg*Se</b>	90,79	1	90,785	0,24631	0,621383
<b>AM*Hg*Se</b>	90,79	1	90,785	0,24631	0,621383
<b>Napaka</b>	23588,92	64	368,577		

Pregednica: Rezultati faktorske ANOVA za mikorizni parameter V %. Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ( $p < 0,05$ ). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopnje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test. Legenda: AM - mikorizna inokulacija (kontrolne rastline in rastline tretirane s komercialnim inokulumom), Hg – rastline tretirane s Hg (kontrolne in tretrirane s  $HgCl_2$ ), Se – rastline tretirane s Se (kontrolne in tretirane s  $K_2SeO_4$ ).

V %	SS	df	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>53,2553</b>	<b>1</b>	<b>53,25534</b>	<b>10,94724</b>	<b>0,001542</b>
<b>AM</b>	<b>53,2553</b>	<b>1</b>	<b>53,25534</b>	<b>10,94724</b>	<b>0,001542</b>
<b>Hg</b>	0,0653	1	0,06533	0,01343	0,908104
<b>Se</b>	16,3830	1	16,38303	3,36772	0,071133
<b>AM*Hg</b>	0,0653	1	0,06533	0,01343	0,908104
<b>AM*Se</b>	16,3830	1	16,38303	3,36772	0,071133
<b>Hg*Se</b>	7,9151	1	7,91514	1,62705	0,206723
<b>AM*Hg*Se</b>	7,9151	1	7,91514	1,62705	0,206723
<b>Napaka</b>	311,3426	64	4,86473		