

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Teja BIZJAK

**VPLIV RAZLIČNIH OBLIK ŽVEPLA NA
PRIVZEM KADMIJA PRI RANEM MOŠNJAKU
(*Noccaea (Thlaspi) praecox*)**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Teja BIZJAK

**VPLIV RAZLIČNIH OBLIK ŽVEPLA NA PRIVZEM KADMIJA
PRI RANEM MOŠNJAKU (*Noccaea (Thlaspi) praecox*)**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**INFLUENCE OF SULPHUR NUTRITION ON CADMIUM UPTAKE
IN *Noccaea (Thlaspi) praecox***

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2017

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologije. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin, Oddelka za Biologijo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. XRF analize so bile opravljene v Laboratoriju za rentgensko fluorescenčno spektrometrijo Odseka za fiziko nizkih in srednjih energij Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biotehnologijo je dne 24.3.2016 za mentorico magistrske naloge imenovala prof. dr. Katarino Vogel-Mikuš, za recenzentko pa prof. dr. Alenko Gaberščik.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

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

Datum zagovora:

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

Teja Bizjak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠD Du2
- DK 581.5: 581.1: 546.48: 546.22 (043.2)
- KG rani mošnjak/potencialno strupene kovine/kadmij/žveplo/razstrupljevalni procesi/cistein
- AV BIZJAK, Teja, univ. dipl. biologinja (UN)
- SA VOGEL-MIKUŠ, Katarina (mentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Magistrski študijski program 2. stopnje Biotehnologije
- LI 2017
- IN VPLIV RAZLIČNIH OBLIK ŽVEPLA NA PRIVZEM KADMIJA PRI RANEM MOŠNJAKU (*Noccaea (Thlaspi) praecox*)
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
- OP XIII, 69, [12] str., 30 pregl., 20 sl., 6 pril., 83 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Rani mošnjak (*Noccaea (Thlaspi) praecox* Wulfen), ki spada v družino križnic (Brassicaceae), je znan po sposobnosti hiperakumulacije Cd in Zn. Najbolj znana hiperakumulacijska populacija raste v Žerjavu na območju Mežiške doline, kjer so tla zaradi kopanja in taljenja svinčeve rude v preteklosti, onesnažena s Pb, Zn in Cd. V raziskavi smo preučili vpliv različnih virov in koncentracij S na privzem Cd in fiziološke lastnosti ranega mošnjaka, izpostavljenega različnim kombinacijam S in Cd. Testne rastline smo gojili na hidroponski tekočini. Kot anorganski vir S smo uporabili 250 in 500 μM MgSO_4 , kot organski vir pa mešanico 250 μM MgSO_4 in 250 μM cisteina. Rastline smo izpostavili 100 in 300 μM koncentracijam CdCl_2 . Merili smo fotokemično učinkovitost fotosistema II, suho maso, koncentracijo fotosinteznih pigmentov, malondialdehida ter koncentracijo in vsebnost Cd, S in nekaterih drugih elementov. Ugotovili smo, da je 300 μM koncentracija Cd negativno vplivala na fotokemično učinkovitost fotosistema II in koncentracijo fotosinteznih pigmentov, ko so imele rastline na voljo anorganski vir S. V primeru, ko so imele rastline na voljo organski vir S, nismo izmerili strupenega učinka na ta dva parametra. Prišli smo do zaključka, da je cistein kot organski vir S pripomogel k zmanjšanju strupenega učinka Cd v primeru fotokemične učinkovitosti fotosistema II in pri koncentraciji klorofilov, tako da je večino Cd zadržal v koreninah in zmanjšal možnost prenosa v poganjke. Z dodajanjem cisteina smo ranemu mošnjaku povečali strpnost na Cd.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

ND Du2

DC 581.5: 581.1: 546.48: 546.22 (043.2)

CX *Noccaea (Thlaspi) praecox* Wulfen/toxic metals/cadmium/sulphur/cysteine/detoxification

AU BIZJAK, Teja

AA VOGEL-MIKUŠ, Katarina (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology

PY 2017

TI INFLUENCE OF SULFUR NUTRITION ON CADMIUM UPTAKE IN *Noccaea (Thlaspi) praecox*

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO XIII, 69, [12] p., 30 tab., 20 fig., 6 ann., 83 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Early penny-cress (*Noccaea (Thlaspi) praecox* Wulfen) from family Brassicaceae is well known for its ability to hyperaccumulate toxic metals such as zinc and cadmium. The population with hyperaccumulation capabilities grows mostly in Žerjav in Mežica Valley in North Slovenia. Due to lead ore mining and smelting in past centuries, area remain contaminated with lead, zinc and cadmium. The purpose of our research was to evaluate the influence of sulphur nutrition on cadmium uptake and measure consequential physiological properties in early penny-cress after exposing it to different treatments with sulphur and cadmium. Plants were grown in hydroponic solution. 250 and 500 μM MgSO_4 concentration were used as inorganic and mixture of 250 μM MgSO_4 with 250 μM cysteine as organic source of sulphur. Plants were exposed to 100 in 300 μM concentrations of CdCl_2 . Efficiency of photosystem II, dry biomass, photosynthetic pigments concentration and rate of lipid peroxidation by malondialdehyde test were measured as well as concentration and content of cadmium, sulphur and various other elements. The 300 μM concentration of cadmium had negative effect on efficiency of photosystem II and photosynthetic pigments concentration in case of inorganic sulphur nutrition. Cysteine as organic source of sulphur decreased toxic effect of cadmium on photosystem efficiency of photosystem II and chlorophyll concentrations. It helped to retain most of cadmium in roots of tested plants, enabled its translocation to shoots and increased tolerance of early penny-cress to toxic cadmium effects.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIKI	XI
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 CILJI	3
1.2 HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 VPLIV POTENCIALNO STRUPENIH KOVIN NA RASTLINE	4
2.2 KADMIJ IN NJEGOV VPLIV NA RASTLINE	4
2.3 PRENOS POTENCIALNO STRUPENIH KOVIN PO RASTLINI	5
2.3.1 Kovinski prenašalci	5
2.3.2 Strategije privzema kovin	6
2.4 ŽVEPLO	7
2.5 PROCES RAZSTRUPLJANJA	8
2.6 HIPERAKUMULACIJSKE RASTLINE	9
2.6.1 Uporabna vrednost hiperakumulacijskih rastlin	11
3 MATERIAL IN METODE	12
3.1 RANI MOŠNJAK	12

3.2	VZGOJA SEJANK	12
3.3	GOJENJE RASTLIN NA HIDROPONSKI TEKOČINI	12
3.4	IZPOSTAVITEV RASTLIN RAZLIČNIM VIROM IN KONCENTRACIJAM ŽVEPLA TER RAZLIČNIM KONCENTRACIJAM KADMIJA	14
3.5	MERJENJE FOTOKEMIČNE UČINKOVITOSTI FOTOSISTEMA II	14
3.6	KONEC POSKUSA NA HIDROPONIKI IN PRIPRAVA RASTLIN ZA NADALNJE POSKUSE	14
3.7	DOLOČANJE FOTOSINTEZNIH PIGMENTOV	15
3.8	DOLOČANJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE Z MALONDIALDEHIDNIM TESTOM (MDA)	16
3.9	DOLOČANJE ELEMENTOV V SUHI BIOMASI RASTLIN S POMOČJO RENTGENSKE FLUORESCENČNE SPEKTROMETRIJE (XRF)	17
3.10	ANALIZA PODATKOV	18
4	REZULTATI	19
4.1	SUHA BIOMASA RASTLIN	19
4.1.1	Korenine	19
4.1.2	Poganjki	20
4.2	FOTOKEMIČNA UČINKOVITOST FOTOSISTEMA II	22
4.3	FOTOSINTEZNI PIGMENTI	24
4.3.1	Klorofil <i>a</i>	24
4.3.2	Klorofil <i>b</i>	25
4.3.3	Karotenoidi	27
4.4	KONCENTRACIJA MDA KOT POKAZATELJ LIPIDNE PEROKSIDACIJE	28
4.4.1	Koncentracija MDA v koreninah	28
4.4.2	Koncentracija MDA v poganjkih	30

4.5	ELEMENTI	31
4.5.1	Kadmij	31
4.5.1.1	Koncentracija kadmija v koreninah	31
4.5.1.2	Koncentracija kadmija v poganjkih	33
4.5.1.3	Primerjava koncentracij kadmija v koreninah in v poganjkih	34
4.5.1.4	Vsebnost kadmija v koreninah	35
4.5.1.5	Vsebnost kadmija v poganjkih	36
4.5.1.6	Primerjava vsebnosti kadmija v koreninah in poganjkih	38
4.5.1.7	Prenosni faktor za kadmij	39
4.5.2	Žveplo	40
4.5.2.1	Koncentracija žvepla v koreninah	40
4.5.2.2	Koncentracija žvepla v poganjkih	42
4.5.2.3	Primerjava koncentracij žvepla v koreninah in poganjkih	43
4.5.2.4	Vsebnost žvepla v koreninah	44
4.5.2.5	Vsebnost žvepla v poganjkih	45
4.5.2.6	Primerjava vsebnosti žvepla v koreninah in v poganjkih	46
4.5.2.7	Vpliv kadmija na ostale elemente	46
4.6	ANALIZA GLAVNIH KOMPONENT	47
4.6.1	Korenine	47
4.6.2	Poganjki	48
4.7	PREGLED STATISTIČNO ZNAČILNIH VPLIVOV	51
5	RAZPRAVA	52
5.1	SUHA BIOMASA POGANJKOV IN KORENIN	52
5.2	FOTOKEMIČNA UČINKOVITOST FOTOSISTEMA II	53
5.3	FOTOSINTEZNI PIGMENTI	54

5.4	KONCENTRACIJA MDA KOT POKAZATELJ LIPIDNE PEROKSIDACIJE	55
5.5	KONCENTRACIJE IN VSEBNOSTI ELEMENTOV	56
5.5.1	Kadmij	56
5.5.2	Žveplo	57
5.6	KORELACIJA KADMIJA Z OSTALIMI ELEMENTI	58
5.7	ANALIZA GLAVNIH KOMPONENT	59
6	SKLEPI	60
7	POVZETEK	61
8	VIRI	62
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Spojine za pripravo modificirane hidroponske tekočine	13
Preglednica 2: Načrt izpostavitve rastlin (n=5 za vsako izpostavitve).....	14
Preglednica 3: Rezultati faktorske ANOVE za suho maso korenin pri ranem mošnjaku	19
Preglednica 4: Rezultati faktorske ANOVE za suho maso poganjkov pri ranem mošnjaku.....	21
Preglednica 5: Rezultati faktorske ANOVE za potencialno fotokemično učinkovitost (Fv/Fm) fotosistema II pri ranem mošnjaku.....	22
Preglednica 6: Rezultati faktorske ANOVE za dejansko fotokemično učinkovitost (Y) fotosistema II pri ranem mošnjaku	23
Preglednica 7: Rezultati faktorske ANOVE za klorofil <i>a</i> pri ranem mošnjaku	24
Preglednica 8: Rezultati faktorske ANOVE za klorofil <i>b</i> pri ranem mošnjaku	26
Preglednica 9: Rezultati faktorske ANOVE za karotenoide pri ranem mošnjaku	27
Preglednica 10: Rezultati faktorske ANOVE za koncentracijo MDA v koreninah ranega mošnjaka.....	29
Preglednica 11: Rezultati faktorske ANOVE za koncentracijo MDA v poganjkih ranega mošnjaka.....	30
Preglednica 12: Rezultati faktorske ANOVE za koncentracijo Cd v koreninah ranega mošnjaka.....	32
Preglednica 13: Rezultati faktorske ANOVE za koncentracijo Cd v poganjkih ranega mošnjaka.....	33
Preglednica 14: Rezultati t-testa za koncentracijo Cd v koreninah in poganjkih ranega mošnjaka.....	35
Preglednica 15: Rezultati faktorske ANOVE za vsebnost Cd v koreninah ranega mošnjaka.....	36
Preglednica 16: Rezultati faktorske ANOVE za vsebnost Cd v poganjkih ranega mošnjaka.....	37
Preglednica 17: T-test za primerjavo vsebnosti Cd v koreninah in poganjkih ranega mošnjaka.....	38
Preglednica 18: Rezultati faktorske ANOVE za prenosni faktor Cd pri ranem mošnjaku	39
Preglednica 19: Rezultati faktorske ANOVE za koncentracijo S v koreninah ranega mošnjaka.....	41
Preglednica 20: Rezultati faktorske ANOVE za koncentracijo S pri ranem mošnjaku .	42
Preglednica 21: T-test za koncentracije S v koreninah in poganjkih ranega mošnjaka .	43
Preglednica 22: Rezultati faktorske ANOVE za vsebnost S v koreninah ranega mošnjaka.....	44

Preglednica 23: Rezultati faktorske ANOVE za vsebnost S v poganjkih ranega mošnjaka.....	45
Preglednica 24: T-test za vsebnost S v koreninah in poganjkih pri ranem mošnjaka	46
Preglednica 25: Rezultati korelacij koncentracije Cd s koncentracijami ostalih elementov pri ranem mošnjaku.....	46
Preglednica 26: Rezultati analize glavnih komponent (PCA) šestih spremenljivk korenin ranega mošnjaka	47
Preglednica 27: Korelacijski koeficienti med prvima dvema osema analize glavnih komponent (PCA) in šestih spremenljivk korenin ranega mošnjaka	47
Preglednica 28: Rezultati analize glavnih komponent (PCA) šestih spremenljivk poganjkov ranega mošnjaka	49
Preglednica 29: Korelacijski koeficienti med prvima dvema osema analize glavnih komponent (PCA) in dvanajstih spremenljivk poganjkov ranega mošnjaka	49
Preglednica 30: Povzetek statistično značilnih vplivov faktorske ANOVE za posamezne spremenljivke	51

KAZALO SLIK

Str.

Slika 1: Rastline na začetku gojenja na hidroponiki in po presaditvi na nove plovce ...	13
Slika 2: Povprečna suha masa korenin ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah	20
Slika 3: Povprečna suha masa poganjkov ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah	21
Slika 4: Povprečna potencialna in dejanska fotokemična učinkovitost fotosistema II ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah	23
Slika 5: Koncentracija klorofila <i>a</i> pri ranem mošnjaku pri različnih izpostavitvah.....	25
Slika 6: Koncentracija klorofila <i>b</i> pri ranem mošnjaku pri različnih izpostavitvah.....	26
Slika 7: Koncentracija karotenoidov pri ranem mošnjaku pri različnih izpostavitvah...	28
Slika 8: Povprečna koncentracija MDA v koreninah ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah.....	29
Slika 9: Povprečna koncentracija MDA v poganjkih ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah.....	31
Slika 10: Koncentracija Cd v koreninah ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah..	32
Slika 11: Koncentracija Cd v poganjkih ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah..	34
Slika 12: Vsebnost Cd v koreninah ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah.....	36
Slika 13: Vsebnost Cd v poganjkih ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah.....	38
Slika 14: Prenosni faktor za Cd pri ranem mošnjaku pri različnih izpostavitvah	40
Slika 15: Koncentracija S v koreninah ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah ...	41
Slika 16: Koncentracija S v poganjkih ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah	43
Slika 17: Vsebnost S pri koreninah ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah.....	44
Slika 18: Vsebnost S v poganjkih ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah	45
Slika 19: Ordinacijski diagram analize glavnih komponent (PCA) korenin ranega mošnjaka.....	48
Slika 20: Ordinacijski diagram analize glavnih komponent (PCA) poganjkov ranega mošnjaka.....	50

KAZALO PRILOG

Priloga A: Izmerjene suhe mase ranega mošnjaka [g]

Priloga B: Meritve fotokemične učinkovitosti fotosistema II pri ranem mošnjaku [relativne enote]

Priloga C: Meritve fotosinteznih pigmentov pri ranem mošnjaku [mg/g SVM]

Priloga D: Izmerjene koncentracije MDA v koreninah in poganjkih ranega mošnjaka [nmolMDA/g SVM]

Priloga E: Koncentracija elementov v koreninah ranega mošnjaka [mg/kg SM]

Priloga F: Koncentracija elementov v poganjkih ranega mošnjaka [mg/kg SM]

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

²⁴¹ Am	radioizotop americija	org.	organski
A	absorbanca	P	fosfor
anorg.	anorganski	Pb	svinec
As	arzen	PCA	Principal Component Analysis oz. analiza glavnih komponent
Ca	kalcij	S	žveplo
Cd	kadmij	S ²⁻	sulfid
CdCl ₂	kadmijev klorid	SM	suha masa
Chla	klorofil <i>a</i>	SO ₂	žveplov dioksid
Chlb	klorofil <i>b</i>	SO ₃ ²⁻	sulfit
Cl	klor	SO ₄ ²⁻	sulfat
Cu	baker	SVM	sveža masa
CYS	aminokislina cistein	TBA	tiobutirična kislina
Fe	železo	TF	traslokacijski oz. prenosni faktor
Fv/Fm	potencialna fotokemična učinkovitost fotosistema II	XRF	X-ray fluorescence oz. rentgenska fluorescenčna spektrometrija
H ₂ S	vodikov sulfid	Y	dejanska fotokemična učinkovitost fotosistema II
Hg	živo srebro	Zn	cink
K	kalij		
MDA	malondialdehid		
Mg	magnezij		
MgSO ₄	magnezijev sulfat		
Mn	mangan		
Mo	molibden		
N	dušik		
Ni	nikelj		

1 UVOD

Potencialno strupene kovine so danes eden najpogostejših onesnažil. Naravno so prisotne v kamninah, kjer se večinoma nahajajo v stabilni in netopni obliki. Manjša količina teh kovin z biogeokemičnimi procesi prehaja v vodo, sedimente, tla in zrak, zato so v manjših koncentracijah ves čas prisotne v ekosistemu. Do onesnaženosti, ko se potencialno strupene kovine pojavljajo skoncentrirano na omejenem območju, privedejo antropogeni dejavniki kot so rudarjenje, taljenje rude, industrija, kmetijstvo, promet in odlaganje odpadkov. S kopanjem rud, skupaj s taljenjem in drugimi metodami čiščenja, se namreč kovine iz stabilne oblike pretvarjajo v manj stabilno, topno obliko in se sproščajo v okolje (Koren in sod., 2013). Sheoran in sod. (2016) poročajo, da na svetovni ravni v zadnjih desetletjih letno odložimo 22 000 t Cd, 939 000 t Cu, 783 000 t Pb in 1 350 000 t Zn.

V Sloveniji so s potencialno strupenimi kovinami in polkovinami najbolj onesnažena območja: Jesenice z okolico, kjer beležimo povečane koncentracije Cd, Zn, Fe in As, Mežiška dolina in Celjska kotlina, kjer so tla onesnažena s Zn, Cd in Pb ter Idrija z okolico, kjer so tla onesnažena z Hg. Zaradi izpušnih plinov so s Pb in Cd onesnažena tudi območja poleg večjih vpadnic v mesta (Zupan in sod., 2008).

Kulturne rastline, ki rastejo na tleh, onesnaženih s Cd, zlahka privzemajo Cd v dele, ki jih za prehrano uporabljamo ljudje. Na svetovni ravni je tako najbolj kritičen riž, saj predstavlja osnovno živilo skoraj polovici prebivalcev (Ueno in sod., 2011), v Sloveniji pa so najbolj problematični krompir in korenovke ter zeljnata zelenjava kot so solatnice (ARSO, 2016). Potencialno strupene kovine vplivajo tudi na manjše donose kmetijsko pomembnih rastlin (Sheoran in sod., 2016).

Povečane koncentracije potencialno strupenih kovin v okolju predstavljajo grožnjo prisotnim organizmom, saj motijo osnovne življenjske procese kot sta celično dihanje in fotosinteza. V funkcionalnih organskih molekulah, predvsem encimih lahko zamenjujejo esencialne minerale, se vežejo na proste tiolne in amino skupine proteinov ali sprožijo tvorbo prostih radikalov. S tem povzročijo nepravilno delovanje biološko pomembnih molekul in oksidativni stres (Koren in sod., 2013). Rastline lahko preživijo koncentracije Cd, ki dosegajo 5-10 µg/g SM, vendar obstajajo tudi rastline, ki so sposobne preživeti ob koncentracijah Cd, ki dosegajo 100 µg/g SM ali več (Zemanova in sod., 2016). Nekatere rastline niso le strpne do večjih koncentracij potencialno strupenih kovin, ampak so jih celo sposobne prekomerno kopičiti v svojih nadzemnih delih. Imenujemo jih hiperakumulacijske rastline. Za hiperakumulacijo Cd je značilno, da rastline v poganjkih kopičijo Cd v koncentracijah, ki so večje od 100 µg/g SM. Najbolj znana hiperakumulacijska rastlina za Cd je modrikasti mošnjak (*Noccaea (Thlaspi) caerulescens* (J.Presl & C.Presl) F.K.Mey), v Sloveniji pa rani

mošnjak (*Noccaea (Thlaspi) praecox* Wulfen). Čeprav je vrsta zelo razširjena, je hiperakumulacijska populacija omejena na območje Žerjava in Mežice v Mežiški dolini. Območje je bilo od 15. stoletja naprej izpostavljeno aktivnostim povezanim s kopanjem in taljenjem svinčeve rude, zato je močno onesnaženo s Pb, Cd in Zn. Na opustošenje tamkajšnje vegetacije so dodatno vplivale emisije SO₂ (Regvar in sod., 2006). Vogel-Mikuš in sod. (2005) so ugotovili, da lahko rani mošnjak prekomerno kopiči do 0,6 % Cd v svojih nadzemnih delih. Zaradi te lastnosti ima potencialne možnosti za uporabo v fitoremediaciji.

Fitoremediacija je v zadnjih dvajsetih letih postala zanimiva kot cenovno ugodna, neinvazivna alternativa ostalim metodam remediacije okolja kot so: izkopavanje onesnaženih tal, spiranje ali sežiganje tal, ter metode povezane z izkopavanjem, *ex situ* postopki čiščenja in vračanjem tal na prvotno mesto. Da bi izboljšali učinkovitost fitoremediacije, je pomembno, da podrobneje preučimo vse fiziološke procese, predvsem privzem kovin, prenos potencialno strupenih kovin po rastlini in mehanizme strpnosti ter interakcije rastlin z mikroorganizmi in drugimi procesi v rizosferi (Nečemer in sod., 2008).

Z našo raziskavo o vplivu različnih oblik S na privzem Cd smo želeli prispevati še en delček k razumevanja fiziologije privzemanja in hiperakumulacije potencialno strupenih kovin pri ranem mošnjaku. Cd je neesencialna kovina, ki je potencialno strupena za večino organizmov (Lovy in sod., 2013). Žveplo je za rastline esencialni element. Rastline ga iz tal privzemajo v obliki sulfata (SO₄²⁻) in ga nato v kloroplastih reducirajo in pretvorijo v fiziološko uporabno obliko S (tiolne skupine -SH), ki se nato vgrajuje v aminokislini cistein in metionin (Jez in sod., 2016). Žveplo ima pomembno vlogo tudi kot sestavni del molekul kot so glutation, sulfolipidi, fitokelatini in metalotioneini, ki so udeleženi pri procesih razstrupljanja, ko so rastline izpostavljene strupenemu učinku potencialno strupenih kovin. Pri križnicah (Brassicaceae) in njim sorodnih družinah je S gradnik sekundarnih metabolitov, glukozinolatov, ki rastline ščitijo pred herbivori in patogeni (Pongrac in sod., 2013).

V nekaj dosedanjih raziskavah (Khan in sod., 2016; Erdal in Turk, 2016) so ugotovili, da dodajanje S rastlinam, ki so izpostavljene Cd, pripomore k ublažitvi stresa, ki nastane ob strupenih učinkih Cd, saj lahko rastlina ob ustrezni žveplovi mineralni prehrani sintetizira večje količine zaščitnih molekul (glutation, cistein, fitokelatini). Dokazano je bilo, da tioli povečajo privzem kovin (npr. Cd in Pb) v korenine (Vadas in Ahner, 2009), kar je pomembno z vidika razvoja tehnologije fitoekstrakcije, vendar o vplivu dodajanja tiolov v substrat na prenos kovin v poganjke ni podatkov. Prav tako je le malo znanega o vplivu žveplove prehrane na privzem Cd pri hiperakumulacijskih rastlinah.

1.1 CILJI

Cilj magistrske naloge je ugotoviti, kako anorganski vir S pri dveh različnih koncentracijah ($c=250\ \mu\text{M}$ in $c=500\ \mu\text{M}$) in organski vir S (aminokislina cistein pri $c=250\ \mu\text{M}$) skupaj z anorganskim virom S ($c=250\ \mu\text{M}$) vplivajo na privzem Cd pri izpostavitvi rastlin 100 in $300\ \mu\text{M}$ koncentraciji Cd ter kako se pri tem spreminjajo fiziološke lastnosti ranega mošnjaka.

Po izpostavitvi Cd in S smo spremljali:

- suho biomaso rastlin,
- fotokemično aktivnost rastlin,
- razlike v koncentraciji fotosinteznih pigmentov,
- stopnjo lipidne peroksidacije, ki je pokazatelj poškodb membran v koreninah in poganjkih z malondialdehidnim testom,
- razlike v koncentracijah privzetega Cd v odvisnosti od različnih virov in koncentracij S,
- razmerje med koncentracijo Cd v koreninah in poganjkih – translokacijski oz. prenosni faktor (TF).

1.2 HIPOTEZE

- Večjo koncentracijo Cd pričakujemo v nadzemnih delih rastlin kot v koreninah.
- Večja koncentracija Cd bo bolj strupena in bo bolj negativno vplivala na fiziološke in produkcijske parametre (biomasa, fotosintezna učinkovitost, koncentracija fotosinteznih pigmentov) kot manjša koncentracija Cd.
- Večja koncentracija anorganskega S bo imela večji učinek pri ublažitvi stresa kot manjša koncentracija anorganskega S.
- Opazna bo razlika pri privzemu Cd in fizioloških parametrih rastlin, glede na izpostavitve rastlin anorganskim in organskim virom S.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VPLIV POTENCIALNO STRUPENIH KOVIN NA RASTLINE

Potencialno strupene kovine kot so kadmij (Cd), živo srebro (Hg), svinec (Pb), nikelj (Ni) in polkovini arzen (As) in selen (Se) niso esencialni elementi in nimajo znane fiziološke vloge pri rastlinah. So pa za rastline v manjših koncentracijah esencialni elementi kot so baker (Cu), železo (Fe), mangan (Mn), molibden (Mo) in cink (Zn) (Rascio in Navari-Izzo, 2010; Iqbal in sod., 2012). Ti elementi imajo vlogo kofaktorjev pri različnih encimih (Sheoran in sod., 2016), zato jih rastline potrebujejo za normalno rast in metabolizem (Rascio in Navari-Izzo, 2010; Iqbal in sod., 2012). Tako neesencialni kot tudi esencialni elementi lahko postanejo potencialno strupeni, kadar presežejo določeno kritično koncentracijo (Iqbal in sod., 2012), saj imajo negativni učinek na ključne procese v celici, ki rastlinam omogočajo normalno delovanje in preživetje.

2.2 KADMIJ IN NJEGOV VPLIV NA RASTLINE

Cd se v tleh naravno nahaja v majhnih koncentracijah, večje količine so posledica geogenih procesov in antropogenih dejavnikov (Stritsis in Claasen, 2013). Navadno se pojavlja v večini cinkovih rud in je stranski produkt pri proizvodnji Zn. Uporablja se za baterije, pri galvaniziranju in v elektronskih napravah (Sharma in Archana, 2016), najdemo pa ga tudi v fosfatnih gnojilih (Lovy in sod., 2013), saj je manjši delež Cd prisoten že v fosforjevi rudi (Roberts, 2014). Cd je neesencialna, potencialno strupena kovina, ki jo rastline zlahka privzemajo iz tal, od kjer prehaja v njihove nadzemne dele (Lovy in sod., 2013; Sharma in Archana, 2016).

Cd je ena najbolj potencialno strupenih kovin, ker se dobro topi v vodi. Za organizme je strupen že v zelo majhnih koncentracijah, saj lahko moti več procesov v celici tako na tkivni kot tudi na celični ravni (Liptakova in sod., 2013). Vodi v morfološke, fiziološke, biokemijske in strukturne spremembe preko več specifičnih mehanizmov: 1) poškoduje encime preko vezave Cd na tiolno oz. sulfidrilno skupino, 2) kovina v metabolitih ali metaloencimih se zamenja s Cd, 3) povzroči senescenco in proteolizo proteinov, 4) ob vstopu Cd se poveča tvorba reaktivnih kisikovih spojin v celici (Zemanova in sod., 2015). Zunanji znaki na rastlinah, ki so posledica stresa zaradi vstopa Cd, so kratke in rjavkaste korenine, kloroze, manj poganjkov, pospešeno staranje ter okrnjena rast in biomasa (Cosio in sod., 2006; Quezada-Hinojosa in sod., 2015).

Cd ima tudi negativen vpliv na privzem, prenos in uporabo esencialnih elementov (Quezada-Hinojosa in sod., 2015) - še posebej negativno vpliva na privzem kationov kot so Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} in Mn^{2+} (Iqbal in sod., 2012). Poleg tega zavira respiracijo, fotosintezo, privzem vode, celično delitev in pospeši nastajanje genetskih

napak (Quezada-Hinojosa in sod., 2015). Cd sproži tvorbo reaktivnih kisikovih spojin, zaradi katerih se razvijejo simptomi strupenosti. Kopičenje reaktivnih kisikovih radikalov povzroči poškodbe celice zaradi oksidacije proteinov in lipidne peroksidacije. V končni fazi so lahko poškodbe tako močne, da vodijo v celično smrt (Boominathan in Doran, 2003; Rascio in Navari-Izzo, 2010; Iqbal in sod., 2012; Liptakova in sod., 2013).

Še posebej je na potencialno strupene kovine občutljiv fotosintezni aparat. Razlog za to je najverjetneje interakcija Cd z mikroelementi kot so Fe, Mn in Zn, ki ne morejo več sodelovati kot kofaktorji encimov, pigmentov in strukturnih komponent fotosinteznega aparata (Khan in sod., 2013). Zmanjšanje vsebnosti fotosinteznih pigmentov in intenzitete fotosinteze pa vodi v manjšo rast rastlin (Li in sod., 2016).

2.3 PRENOS POTENCIALNO STRUPENIH KOVIN PO RASTLINI

2.3.1 Kovinski prenašalci

Privzem Zn in Cd naj bi bil pri hiperakumulacijskih rastlinah povezan s prekomernim izražanjem genov iz ZIP (Zinc-Iron Permease) družine, ki kodirajo kationske prenašalce, nameščene v celični membrani. Kodirajo proteina ZRT1 in ZRT2, ki sta udeležena pri privzemu Zn ter IRT1 prenašalec, ki je udeležen pri privzemanju Fe (Assuncao in sod., 2001; Hall and Williams, 2003; Yang in sod., 2005). Zhao in sod. (2002) poročajo, da naj bi Cd pri rastlinah, ki niso hiperakumulacijske, prehajal v rastlino preko prenašalcev ostalih divalentnih ionov kot so Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} ali preko kationskih kanalčkov za Ca^{2+} in Mg^{2+} . Rascio in Navari-Izzo (2010) pa menita, da Cd prehaja v rastlino preko prenašalcev za Zn. Kadar sta v okolju Zn in Cd, ti prenašalci preferenčno izbirajo Zn pred Cd. Kovine se iz korenin prenesejo tudi v druge dele rastlin, pri čemer prečkajo tako plazmalemo kot tudi membrane organelov, pri čemer so udeleženi še mnogi drugi prenašalci (Guerinot, 2000). Pri prehodu v vakuolo so udeleženi geni iz družine Nramp, CDF in kationski/ H^+ antiporterji. Pri prenosu kompleksov fitokelatin-Cd in glutation-Cd pa so udeleženi ABC prenašalci (Hall in Williams, 2003). Pri hiperakumulacijskih rastlinah so opazili do 200-krat večje izražanje genov, ki kodirajo membranske prenašalce kot pri rastlinah, ki niso sposobne prekomernega kopičenja potencialno strupenih rastlin (Leitenmaier in Küpper, 2013).

2.3.2 Strategije privzema kovin

Potencialno strupene kovine pridejo v rastlino preko korenin. Poznamo dve strategiji privzema kovin v rastline, in sicer izključevanje in hiperakumulacijo (Baker, 1981). Pri izključevanju se kovine ujamejo v apoplast in se vežejo z izločenimi organskimi kislinami ali na aninoske skupine celične stene. Večina potencialno strupenih kovin tako ostane ujeta v koreninskih celicah, kjer se vršijo razstrupljevalni procesi z aminokislinami, organskimi kislinami ali kovinskimi peptidi; ali pa se prenesejo v vakuole. Tako rastlina zaščiti nadzemne dele, predvsem liste in metabolno aktivne fotosintezne celice, pred poškodbami s strani potencialno strupenih kovin (Baker, 1981).

Pri hiperakumulacijskih rastlinah se kovine po ksilemu hitro in učinkovito prenašajo iz korenin do nadzemnih delov (Rascio in Navari-Izzo, 2010). Ta proces imenujemo prenos ali translokacija. Za prenos iz korenin v poganjke je potreben simplastni prehod in aktivno nalaganje v ksilem (Verbruggen in sod., 2009). V koreninah hiperakumulacijskih rastlin je prisotno veliko majhnih organskih molekul, ki delujejo kot ligandi, na katere se vežejo potencialno strupene kovine. Med njimi sta najbolj pogosta malat in citrat (Haydon in sod., 2007). V primeru Ni imata pomembno vlogo tudi histidin in nikotianamin, ki tvorita stabilne komplekse z bivalentnimi kationi (Challahan in sod., 2006). Ko potencialno strupene kovine pridejo do listov, morajo zaobiti fotosintezno aktivne dele, zato so razvile različne mehanizme, ki kontrolirajo privzem, akumulacijo in translokacijo nevarnih elementov in vršijo razstrupljanje tako, da izključijo proste ionske oblike iz citoplazme (Verbruggen in sod., 2009). Nadaljnje razstrupljanje poteka s pomočjo antioksidantov, ki nevtralizirajo oksidativni stres (Rascio in Navari-Izzo, 2010). V primeru, da pride do prenosa potencialno strupene kovine do poganjkov, pa jih rastline shranjujejo na mestih kot so listna povrhnjica, trihomi in celo v kutikuli. To so mesta, kjer povzročijo najmanj škode na fotosinteznem aparatu. V mnogih primerih so izključene tudi iz celic, ki sestavljajo listno režo. Mehanizem razstrupljanja v nadzemnih organih hiperakumulatorjev poteka tako, da se potencialno strupene kovine vežejo na ligande ali se umaknejo iz metabolno aktivnih mest v citoplazmi, najpogosteje v celično steno ali vakuolo (Rascio in Navari-Izzo, 2010). Kovine, ki jih rastline nakopičijo, so vezane na ligande kot so organske kisline, aminokisline, peptidi in proteini (Verbruggen in sod., 2009).

Vogel-Mikuš in sod. (2008) so s pomočjo micro-PIXE ugotovili, da se Cd v listih ranega mošnjaka v največjih koncentracijah nahaja v spodnji povrhnjici, lahko pa se kopiči tudi v žilah in zgornji povrhnjici, ki so metabolno manj aktivni deli lista. Kljub temu so precejšnje koncentracije Cd izmerili tudi v stebričastem tkivu. Vogel-Mikuš in sod. (2007) so pred tem ugotovili, da se Cd pri ranem mošnjaku v večjih koncentracijah kopiči tudi v semenih, kar nakazuje na to, da njegov prenos poteka tudi po floemu. Raziskave o razporejanju elementov v listih ranega mošnjaka s

pomočjo micro-PIXE so nadaljevali Pongrac in sod. (2010). Največje koncentracije Zn, Cd, Ni, Cu, Pb, Fe in Mn so izmerili v povrhnjici na obeh straneh listne površine. Podrobnejše raziskave so pokazale, da je bilo največ Zn v celicah povrhnjice, največ Cd in Mn se je nakopičilo v stebričastem tkivu, Fe pa se je nakopičil tako v povrhnjici kot tudi v stebričastem tkivu. Ugotovili so, da prenos Cd poteka ne samo po ksilemu, ampak tudi po floemu.

Poleg začetne koncentracije Cd v tleh in biogeokemičnih razmer, na proces akumulacije, prenosa in porazdelitve Cd znotraj rastline, vplivajo tudi: vrsta rastline, morfologija korenin, adsorpcija Cd na kelatorje in peptide, izmenjava Cd s Zn, Ca in Mn ter stopnja transpiracije v listih (Quezada-Hinojosa in sod., 2015). Na privzem Cd lahko vplivajo tudi rizosferne bakterije. Bakterije, ki so odporne na visoke koncentracije Cd, lahko spodbujajo rast rastlin v tleh, onesnaženih s Cd. Da lahko zaščitijo rastlino pred stresom, morajo biti na prvem mestu same odporne na Cd, sposobne morajo biti vezave Cd^{2+} , aktivno kolonizirati površino korenin in rizosfero, poleg tega pa morajo imeti tudi genetske značilnosti, ki jim omogočajo, da se spopadajo s stresom, ki ga v celici povzroči Cd (Pishchnik in sod., 2002). Poleg bakterij so za hiperakumulacijske rastline pomembne tudi glive, s katerimi tvorijo arbuskularno mikorizo in tako pripomorejo k zmanjšanju stresa, ki nastane ob vstopu potencialno strupenih kovin v rastlino (Hildebrandt in sod., 2007).

2.4 ŽVEPLO

Žveplo je esencialni makroelement. Rastline ga iz tal privzemajo v obliki sulfata (SO_4^{2-}) in ga po vstopu v rastlino asimilirajo v cistein. Ta se nahaja v križišču primarnega metabolizma, sinteze proteinov in tvorbe obrambnih molekul z majhno molekulsko maso. Sulfat se mora najprej aktivirati, da lahko tvori fosfoadenozin fosfosulfat, donor S pri sulfonatnih reakcijah. Paralelne reakcije asimilaciji žvepla so disimilacijske reakcije kot je npr. sproščanje vodikovega sulfida (H_2S) iz cisteina (Rauscht in Wachter, 2005). Žveplo se nahaja v aminokislinah cisteinu in metioninu, ki sta ključna pri strukturi in biološki aktivnosti proteinov in koencimov ter prostetičnih skupin kot so povezave kovina-S, lipoijska kislina, tiamin in koencim A (Davidian in Kopriva, 2010). Spojine, ki vsebujejo S, so ključne za preživetje rastlin v primerih biotskega in abiotskega stresa. Take molekule so H_2S , glutation, fitokelatini, mnogi sekundarni metaboliti in proteini bogati z S (Rauscht in Wachter, 2005). Po izpostavitvi biotskemu in abiotskemu stresu, se žveplove spojine začnejo sintetizirati bolj pospešeno, njihovo sintezo lahko spodbudi jasmonska kislina (Rauscht in Wachter, 2005).

Pod stresom, ki ga v rastlini povzroči Cd, S izboljša rast, pripomore k povečanju koncentracije antioksidantov in zmanjša tvorbo reaktivnih kisikovih radikalov (ROS) ter stopnjo lipidne peroksidacije (Na in Salt, 2011). Liang in sod. (2016) poročajo, da pri rastlinah, ki niso zmožne prekomernega kopičenja potencialno strupenih kovin

(npr. riž), S zmanjša privzem Cd, pripomore k povečanju biomase in sproži sintezo neproteinskih tiolnih komponent z namenom ublažitve strupenosti Cd.

Privzem S v korenine se poveča ob stresu rastlin, ki ga povzročijo potencialno strupene kovine in polkovine. Notranje koncentracije žveplovih metabolitov in metabolne potrebe po S regulirajo sulfatne prenašalce. Prepisovanje genov za sulfatne prenašalce se poveča, ko je koncentracija sulfatov v tkivu majhna ali ko je koncentracija O-acetilserina visoka, medtem ko novo sintetizirana cistein in glutation zmanjšata izražanje sulfatnih prenašalcev (Schiavon in Malagoli, 2008; Na in Salt, 2011).

Privzem sulfata (SO_4^{2-}) v celico poteka skupaj s 3 H^+ . Proces katalizirajo permeaze, ki se nahajajo v plazmalemi. Po tistem, ko sulfat vstopi skozi korenine v rastlino, se prenese v nadzemne dele, kjer v kloroplastih poteče asimilacija S. Čeprav tudi plastidi v koreninah vsebujejo vse encime potrebne za redukcijo sulfata, večinoma redukcija poteka v listih. Sulfat se najprej aktivirati preko encima ATP sulfurilaze, ki vodi v nastanek adenozin 5'-fosfosulfata (APS) in pirofosfata (PP_i). Da se lahko S vključi v biološke molekule kot so aminokisline, poteče transformacija sulfata in APS v sulfit (SO_3^{2-}), in nato v sulfid (S^{2-}) (Mendoza-Cozatl in sod., 2005). Naslednji korak je sinteza cisteina, ki je prekurzor za ostale žveplove spojine kot so glutation, metionin in fitokelatini. Pri procesu sta udeležena encima serin acetiltransferaza in O – acetilserin (tiol) liaza (Na in Salt, 2011).

2.5 PROCES RAZSTRUPLJANJA

Hiperakumulacijske rastline se od rastlin, ki niso sposobne hiperakumulacije potencilano strupenih rastlin, razlikujejo predvsem po učinkovitih razstrupljevalnih procesih, ki obsegajo vezavo potencialno strupene kovine na različne ligande in specifičen način razporejanje kovin po rastlini, pri čemer imajo ključno vlogo membranski prenašalci (Leitenmaier in Küpper, 2013). Molekule, ki vsebujejo S, imajo ključno vlogo pri obrambi rastline pred Cd (Tolra in sod., 2006).

Cistein je najpomembnejši aminokislinski del proteinov, na katerega se vežejo potencialno strupene kovine. Je tudi prekurzor ostalih obrambnih molekul kot so glutation in fitokelatini (Leitenmaier in Küpper, 2013).

Glutation (GSH) je esencialni metabolit z različnimi funkcijami v rastlini (Schiavon in Malagoli, 2008). Je ena najbolj pogostih molekul z majhno molekulsko maso, ki vsebuje S in ima težnjo do interakcij s kovinskimi ioni. Glutation ima osem možnih vezavnih mest, Cd^{2+} se lahko veže na dve od njih (Glušič in sod., 2013). V večini celic ga najdemo v milimolarnih koncentracijah. Je pomembna obrambna molekula proti reaktivnim kisikovim radikalom, ksenobiotikom in potencialno strupenim kovinam ter preprečuje prekomerno oksidacijo občutljivih celičnih komponent (Rauscht in Wachter, 2005). Glutation je nepogrešljiv pri mnogih drugih

fizioloških procesih v rastlinah kot so: shranjevanje in prenos neproteinskega reduciranega S, regulacija žveplovega metabolizma, sinteza proteinov in nukleinskih kislin, regulacija izražanja genov, razvoj embrijev in meristemov, signaliziranje v rastlinah in interakcija z rastlinskimi patogeni, vezava potencialno strupenih kovin itd. (Glušič in sod., 2013). Pri rastlinah in nekaterih kvasovkah je glutation prekurzor za sintezo fitokelatinov (Mendoza-Cozatl in sod., 2005).

Glukozinolati so sekundarni metaboliti, ki so značilni predvsem za družino križnic (*Brassicaceae*). Njihova sinteza poteka iz aminokislin. Navadno vsebujejo najmanj dva S atoma; eden izvira od cisteina, drugi pa od fosfoadenozin fosfosulfata. Glukozinolati, ki izvirajo iz metionina, imajo dodaten reduciran S atom (Rauscht in Wachter, 2005).

Procesi razstrupljanja pri hiperakumulacijskih rastlinah večinoma potekajo s pomočjo glutathiona, ki ima v primerjavi s fitokelatini manjšo molekulsko maso. Sinteza tako velikih molekul kot so fitokelatini je namreč za celice precej potratna (Rascio in Navari-Izzo, 2010). Schiavon in Malagoli (2008) sta ugotovila, da se s kopičenjem določene potencialno strupene kovine, poveča potreba rastlin po aminokislinah, zato se povečata privzem in asimilacija S.

2.6 HIPERAKUMULACIJSKE RASTLINE

Rastline, ki so sposobne v svojih tkivih kopičiti večje koncentracije potencialno strupenih kovin, imenujemo hiperakumulacijske rastline (Baker, 1981; Baker, 1987). Hiperakumulacijske rastline so strpne do večje koncentracije potencialno strupenih kovin in imajo poleg tega sposobnost kopičenja teh elementov v nadzemnih delih (Verbruggen in sod., 2009), pri čemer ne pride do večjih poškodb celic (Boominathan in Doran, 2003). Ena od definicij pravi, da so hiperakumulacijske rastline tiste, ki lahko kopičijo več kot 10 mg/g Zn ali Mn, 1 mg/g Co, Cu, Ni in As ter 0,1 mg/g Cd v suhi biomasi, ko rastejo v svojem naravnem habitatu (Na et Salt, 2011). Druga definicija pa pravi, da so hiperakumulacijske tiste rastline, pri katerih izmerimo 1-5% potencialno strupenih kovin v celotni biomasi (Wojcik in sod., 2005). Te rastline so pogosto endemične vrste, ki rastejo na naravno mineraliziranih tleh in kopičijo velike koncentracije kovin v svojih nadzemnih delih (Bhargava in sod., 2012) ne da bi bili podvrženi njihovem strupenemu učinku (Pongrac in sod., 2010). Poleg hiperakumulacijskih rastlin poznamo tudi izključevalce. Te rastline so strpne do večjih koncentracij potencialno strupenih kovin, ki so za večino rastlin strupene. Njihova strategija temelji na tem, da čim več potencialno strupenih kovin zadržijo in razstrupijo v koreninskih tkivih, prenos v nadzemne dele pa zmanjšajo oz. izničijo, saj so celice v nadzemnih delih še vedno zelo občutljive na stres povezan s potencialno strupenimi kovinami (Rascio in Navari-Izzo, 2010).

Za razliko od izključevalcev, hiperakumulacijske rastline aktivno privzemajo večje koncentracije ene ali več potencialno strupenih kovin iz tal. V tem primeru potencialno strupene kovine ne ostanejo v koreninah, ampak se prenesejo v nadzemne dele in se nakopičijo predvsem v listih (v 100-1000x večjih koncentracijah kot pri rastlinah, ki niso sposobne hiperakumulacije). Kljub zaščitnim mehanizmom, ki jih imajo, nekaj kovinskih ionov vseeno ostane v citoplazmi in preko tvorbe reaktivnih kisikovih spojin sproži oksidativni stres, kar negativno vpliva na celični metabolizem (Pongrac in sod., 2010).

Znanih je okoli 450 hiperakumulacijskih vrst rastlin (Ravanbakhsh in sod., 2016), od tega le 5 vrst, ki prekomerno kopičijo Cd. Med slednje spadajo *Alyssum halleri*, *Sedum alfredii*, *Noccaea (Thlaspi) caerulescens* (J.Presl & C.Presl) F.K.Mey, *Noccaea (Thlaspi) praecox* Wulfen, *Arabidopsis halleri* in *Solanum nigrum* (Rascio in Navari Izzo, 2010). Stopnja hiperakumulacije se lahko razlikuje znotraj ekotipov iste vrste (Roosens in sod., 2003; Verbruggen in sod., 2009).

Basic in sod. (2006) predlagajo 4 hipoteze, ki pojasnjujejo, zakaj nekatere rastline prekomerno kopičijo potencialno strupene kovine: 1) hipoteza o suši, 2) interferenčna hipoteza, 3) hipoteza o obrambi pred herbivori in patogenimi organizmi, 4) strpnost/izključevanje potencialno strupenih kovin. Prva hipoteza predpostavlja, da kovina, ki jo rastlina kopiči, pomaga rastlini preživeti sušo s tem, da zmanjša transpiracijo skozi kutikulo ali s povečanjem osmolarnosti znotraj celice. Veliko hiperakumulacijskih rastlin lahko najdemo v suhih mediteranskih podnebjih ali na območjih, kjer v tleh ni dostopne vode. Dokazov, ki bi potrjevala to hipotezo, skoraj ni. Druga hipoteza predpostavlja, da hiperakumulacijske trajnice s tem, ko odvržejo liste, v katerih so shranjene potencialno strupene kovine, preprečijo razširjanje ostalih rastlinskih vrst, ki niso strpne do potencialno strupenih kovin, na tem območju. Tretja hipoteza predpostavlja, da potencialno strupene kovine, ki jih rastline kopičijo v svojih tkivih, varujejo te rastline pred herbivori in patogeni. Ta je od vseh predlaganih najbolj verjetna. Četrta hipoteza pa predpostavlja, da je hiperakumulacija mehanizem za povečanje strpnosti, ki obsega nalaganje kovin v tkiva in se kasneje izloči tako, da rastlina odvrže liste. Mehanizem hiperakumulacije z notranjimi mehanizmi razstrupljanja omogoča rastlinam strpnost do potencialno strupenih kovin (Basic in sod., 2006).

Homeostaza kovin je pri hiperakumulacijskih rastlinah posledica več reakcij, ki vodijo v povečano privzemanje potencialno strupenih kovin preko korenin, manjše nalaganje v koreninah in povečan prenos teh kovin iz korenin v nadzemne dele, kjer se lahko kopičijo v večjih koncentracijah kot pri rastlinah, ki niso strpne na potencialno strupene kovine. Poleg tega imajo hiperakumulacijske rastline tudi bolj učinkovite razstrupljevalne mehanizme (Lovy in sod., 2013).

2.6.1 Uporabna vrednost hiperakumulacijskih rastlin

Odkar so pred štiridesetimi leti začeli poglobljeno preučevati hiperakumulacijske rastlinske vrste (Brooks in sod., 1977), se je začel uveljavljati pojem fitoremediacija, ki označuje uporabno vrednost rastlin pri čiščenju tal, onesnaženih s potencialno strupenimi kovinami.

Idealna rastlina, ki bi jo lahko uporabili v postopkih fitoremediacije, bi morala biti strpna do večjih koncentracij kovinskih onesnažil, prilagojena bi morala biti na lokalne okoljske razmere, imeti bi morala obsežen in močan koreninski sistem ter sposobnost hitre rasti. Hkrati bi morala biti odporna na bolezni in škodljivce. Zelo pomemben faktor je tudi sposobnost prenosa potencialno strupenih kovin iz korenin v nadzemne dele (Mahar in sod., 2016). Večina do sedaj znanih hiperakumulacijskih vrst ne proizvede dovolj velike biomase, zato so iz tega vidika bolj primerna drevesa kot so topoli (*Populus* spp.) in vrbe (*Salix* spp.) (Pulford in Watson, 2003).

Biomaso hiperakumulacijskih rastlin bi lahko povečali z naravno selekcijo, gentskim inženiringom ali dovajanjem primerne gnojila (Wojcik in sod., 2005; Bhargava in sod., 2012; Sheoran in sod., 2016). Wojcik in sod. (2005) predlagajo, prenos genov iz ranega mošnjaka v rastlino, ki ima večjo biomaso (z geneskim inženiringom ali preko somatskih hibridov). Schiavon in Malagoli (2008) kot eno od možnosti genskega inženiringa z namenom povečanja akumulacije in strpnosti rastlin na potencialno strupene kovine predlagata: 1) prekomerno izražanje sulfatnih prenašalcev, 2) prekomerno izražanje encimov, ki so udeleženi pri asimilaciji sulfata in 3) prekomerno izražanje encimov, ki so udeleženi pri sintezi glutationa, fitokelatinov in metalotionenov. Tudi Sheoran in sod. (2016) povzemajo strategije, ki bi pripomogle k izboljšanju fitoekstrakcije. Ena od njih je dodajanje naravnih ali sintetičnih kelatorjev v tla. Fitoekstrakcijo bi lahko izboljšali z različnimi kmetijskimi praksami kot so gnojenje s kombinacijo N, P in K, dodajanjem anorganskih kislin in elementarnega S.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RANI MOŠNJAK

Rani mošnjak (*Noccea (Thlaspi) praecox* Wulfen) spada v družino križnic (Brassicaceae). V Sloveniji raste na suhih travnikih od nižine do subalpinskega pasu. Je trajnica, ki cveti od marca do junija. Ima značilno rozeto in večinoma več cvetočih stebel. Čaša je pogosto rdečkasta, venec bel, luščki pa so razločno krilati (Martinčič in sod., 2007). Poleg populacije ranega mošnjaka iz Žerjava, so prekomernega kopičenja Cd sposobne tudi populacije iz Mežice in Lokovca (Likar in sod., 2009). Potencialno strupene kovine prekomerno kopiči tudi modrikasti mošnjak (*Noccaea (Thlaspi) caerulescens* (J.Presl & C.Presl) F.K.Mey). V Sloveniji ga poznamo pod imenom gozdni mošnjak (*T. sylvestre* Jord) in raste samo na Lokovcu nad Čepovanom na planoti Banjščice (Martinčič in sod., 2007). Kljub temu da lahko obe vrsti prekomerno kopičita potencialno strupene kovine, je rani mošnjak primernejši kandidat za fitoekstrakcijo kot modrikasti mošnjak. Ima naravne mikrobne simbiote, ki povečajo njegove preživitvene zmožnosti tako v kontroliranih kot tudi v naravnih razmerah, predvsem v primerih, ko so tla onesnažena s potencialno strupenimi kovinami (Vogel-Mikuš in sod., 2005; Regvar in sod., 2006).

3.2 VZGOJA SEJANK

Semena ranega mošnjaka smo nabrali na območju nekdanje topilnice v Žerjavu v zgornji Mežiški dolini. Posadili smo jih na vermikulit (Agra-vermiculite) in korito postavili v rastno komoro (Siop elektronika) s temperaturo 21,2°C in 53% relativno zračno vlago. Redno smo jih vlažili z vodo, kasneje pa tudi s hranilno tekočino (Koren in sod., 2013). Po 30 dneh, ko je večina sejank razvila vsaj 4 liste, smo jih presadili na plovce iz stiropora in jih predstavili v čaše (V=1l) s hidroponsko tekočino (Preglednica 1). Na vsak plovec smo vsadili po pet rastlin. Za poskus smo skupaj pripravili 18 čaš.

3.3 GOJENJE RASTLIN NA HIDROPONSKI TEKOČINI

Mlade rastline smo 30 dni gojili na modificirani hidroponski tekočini (Preglednica 1), da so se prilagodile na hidroponski način rasti. Vse založne raztopine smo zaradi možnih okužb predhodno avtoklavirali. Rastline so rastle v kontroliranem okolju v rastni komori (Siop elektronika) pri temperaturi 20,3°C in 43% relativni zračni vlagi. V tem obdobju so rastline dosegle zelo različne velikosti, nekatere med njimi so propadle, na večini plovcev pa so se razrasle tudi alge. Presadili smo jih na nove plovce, tako da so bile na vsakem zastopane vse velikosti (Slika 1).

Preglednica 1: Spojine za pripravo modificirane hidroponske tekočine

	Spojina	Koncentracija	Proizvajalec
MAKROELEMENTI	KNO ₃	0,6 mM	Merck, Nemčija
	Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	0,28 mM	Merck, Nemčija
	NH ₄ H ₂ PO ₄	0,1 mM	Merck, Nemčija
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,5 mM	Merck, Nemčija
MIKROELEMENTI	Fe ₂ (C ₄ H ₄ O ₆) ₃	4,75 µM	Sigma - aldrich
	H ₃ BO ₃	4,6 µM	Merck, Nemčija
	MnCl ₂ *4H ₂ O	0,5 µM	Kemika
	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	10 µM	Merck, Nemčija
	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,03 µM	Sigma - aldrich
	Na ₂ Mo ₄ * 2 H ₂ O	0,01 µM	Sigma – aldrich
	dd H ₂ O	/	/



Slika 1: Rastline na začetku gojenja na hidroponiki in po presaditvi na nove plovce

3.4 IZPOSTAVITEV RASTLIN RAZLIČNIM VIROM IN KONCENTRACIJAM ŽVEPLA TER RAZLIČNIM KONCENTRACIJAM KADMIJA

Poskus smo načrtovali tako, da smo imeli 9 različnih izpostavitvev, vsakega v dveh paralelkah po 5 rastlin. Za vsako izpostavitvev smo pripravili modificirano hidroponsko tekočino (Preglednica 1) in nadomestili koncentracije MgSO_4 iz Preglednice 1 z ustreznimi novimi koncentracijami MgSO_4 , MgCl_2 in cisteina (Sigma-aldrich) podanimi v Preglednici 2. Kot je prikazano v Preglednici 2, smo dodali 100 ali 300 μM koncentracijo CdCl_2 (Zorka Šabac).

Enkrat tedensko smo v celoti zamenjali hidroponsko tekočino v vseh čašah. Preostale dni smo dolivali hidroponsko tekočino do najvišje oznake v čaši ($V = 800\text{ml}$) in tako nadomeščali izhlapelo tekočino. Poskus je trajal 30 dni.

Preglednica 2: Načrt izpostavitve rastlin ($n=5$ za vsako izpostavitvev)

	KONTROLA	100 μM Cd	300 μM Cd
ANORGANSKI VIR ŽVEPLA	500 μM MgSO_4	500 μM MgSO_4 + 100 μM CdCl_2	500 μM MgSO_4 + 300 μM CdCl_2
ANORGANSKI VIR ŽVEPLA	250 μM MgSO_4 250 μM MgCl_2	250 μM MgSO_4 + 250 μM MgCl_2 + 100 μM CdCl_2	250 μM MgSO_4 + 250 μM MgCl_2 + 300 μM CdCl_2
ORGANSKI VIR ŽVEPLA	250 μM MgSO_4 + 250 μM MgCl_2 + 250 μM CYS	250 μM MgSO_4 + 250 μM MgCl_2 + 250 μM CYS + 100 μM CdCl_2	250 μM MgSO_4 + 250 μM MgCl_2 + 250 μM CYS + 300 μM CdCl_2

3.5 MERJENJE FOTOKEMIČNE UČINKOVITOSTI FOTOSISTEMA II

Dan pred zaključkom poskusa smo z modulacijskim fluorometrom (tip OS-500, Opti-Sciences) izmerili učinkovitost fotosistema II. Zanimali sta nas tako potencialna kot tudi dejanska fotokemična učinkovitost. Na vsako rastlino smo najprej namestili dve ščipalki za svetlobno adaptacijo in izmerili dejansko fotokemično učinkovitost. Na enak način smo namestili še ščipalki za temotno adaptacijo, zaprli pokrovček na ščipalki in počakali 20 min, nato pa izmerili še potencialno fotokemično učinkovitost. Vrednosti so bile izražene v relativnih enotah od 0 do 1 (Murchie in Lawson, 2013).

3.6 KONEC POSKUSA NA HIDROPONIKI IN PRIPRAVA RASTLIN ZA NADALJNJE POSKUSE

Po 30 dneh izpostavitve rastlin različnim koncentracijam in virom S ter različnim koncentracijam Cd, smo poskus zaključili. Od vsake rastline smo zatehtali (tehnica Scaltec) 100 mg svežih korenin in 100 mg svežih poganjkov, jih hitro zamrznili v tekočem dušiku in do nadaljnjega shranili v zamrzovalniku. Preostanek korenin in

poganjkov smo ločeno stehtali (tehnica Sartorius handy) in zapakirali v aluminijasto folijo. Zamrznili smo jih v tekočem dušiku in jih shranili v zamrzovalniku (Gorenje). Kasneje smo jih pod tlakom, na temperaturi -96°C pet dni liofilizirali (liofilizator CoolSafe) in na koncu določili še suho maso rastlin. Vse posušene korenine in nadzemne dele smo s pomočjo tekočega dušika strli v terilnicah in pospravili za nadaljnje poskuse.

3.7 DOLOČANJE FOTOSINTEZNIH PIGMENTOV

V steklene centrifugirke ($V=10\text{ml}$) smo zatehtali ločeno po 30 mg predhodno liofiliziranih in strtih nadzemnih delov rastlin iz vsake izpostavitve. Vzorcem smo dodali 5 ml 80 % acetona (Empatra ASC, Nemčija) in dobro premešali na stresalu (EV-100 Tehnica, Železniki). Označili smo raven tekočine v centrifugirki, jih zaprli z gumijastim pokrovčkom in jih preko noči postavili v hladilnik. Naslednji dan smo dolili aceton do oznake in ponovno dobro premešali na stresalu. Vzorce smo nato 3 min centrifugirali na 2500 obratih (centrifuga Haldenwanger).

Tako pripravljenim vzorcem smo izmerili absorpcijo pri valovnih dolžinah 470 nm, 647 nm in 664 nm (spektrofotometer tipa 8452A, HP-Hewlett Packard). Spektrofotometer smo umerili z 80 % acetonom.

Iz dobljenih absorpcij smo po spodnjih enačbah izračunali koncentracijo posameznih pigmentov na $\mu\text{mol/l}$. Izračune smo povzeli po Lichtenthaler in Buschmann (2001).

$$Chla \left(\frac{\mu\text{mol}}{l} \right) = 12,25 * A_{664} - 2,79 * A_{647} \quad \dots (1)$$

$$Chlb \left(\frac{\mu\text{mol}}{l} \right) = 21,50 * A_{647} - 5,10 * A_{664} \quad \dots (2)$$

$$Chlab \left(\frac{\mu\text{mol}}{l} \right) = 7,15 * A_{647} + 18,71 * A_{664} \quad \dots (3)$$

$$\Sigma\text{karotenoidi} \left(\mu \frac{\text{mol}}{l} \right) = \frac{1000 * A_{470} - 1,82 * Chla - 85,02 * chlb}{198} \quad \dots (4)$$

Iz njih pa še vsebnost:

$$X \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{\text{konc.pigmenta} * \text{Vekstrakta}}{m \text{ poganjkov} * 1000} \quad \dots (5)$$

3.8 DOLOČANJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE Z MALONDIALDEHIDNIM TESTOM (MDA)

Pri izvedbi poskusa smo se držali prirejenega protokola po Hodges in sod. (1999). 80 mg svežega rastlinskega materiala smo homogenizirali v 2 ml mešanici etanola in vode (razmerje (v/v) etanol:voda= 80:20) ter vse skupaj dobro premešali na stresalu, nato pa centrifugirali 10 min na 3000 obratih (centrifuga tip 3K30, Sigma). Po 800 µl vzorca smo ločeno prenesli v dve novi centrifugirki. V eno smo dodali 800 µl plus TBA, v drugo pa 800 µl minus TBA. Plus TBA je sestavljala mešanica 20 % (w/v) trikloroocetne kisline (Merck, Nemčija), 0,01 % butiliranega hidroksitoluena (Merck, Nemčija) in 0,65 % tiobarbitudne kisline (Merck, Nemčija). Minus TBA pa je sestavljala mešanica 20 % tiobutirične kisline in 0,01 % butiliranega hidroksitoluena.

Vzorci smo ponovno premešali na stresalu. Mikrocentrifugirke smo na vrhu preluknjali in jih 25 min segrevali na 95°C (pečica Semlab). Po hlajenju na ledu smo jih ponovno centrifugirali 10 min na 3000 obratih in na koncu s pomočjo spektrofotometra pomerili absorbanco pri valovnih dolžinah 440 nm, 532 nm in 600 nm. Spektrofotometer smo pred merjenjem vzorcev »minus TBA« umerili s slepim vzorcem, ki je vseboval 800 µl etanola in vode v razmerju 80:20 ter 800 µl mešanice minus TBA. Pred merjenjem vzorcev »plus TBA« pa smo spektrofotometer umerili s slepim vzorcem, ki je vseboval 800 µl etanola in vode v razmerju 80:20 ter 800 µl plus TBA.

Iz dobljenih absorbanc smo nato po spodnjih formulah izračunali še MDA ekvivalent:

$$A = (Abs_{532+TBA} - Abs_{600+TBA}) - (Abs_{532-TBA} - Abs_{600-TBA}) \quad \dots (6)$$

$$B = (Abs_{440+TBA} - Abs_{600+TBA}) * 0,0571 \quad \dots (7)$$

$$MDA \text{ ekvivalent } \left(\frac{nmol}{ml} \right) = \left(A - \frac{B}{155000} \right) * 1000000 \quad \dots (8)$$

$$Koncentracija \left(\frac{nmol \text{ MDA}}{mg \text{ WT}} \right) = \left(A - \frac{B}{155000} \right) * 1000000 \quad \dots (9)$$

3.9 DOLOČANJE ELEMENTOV V SUHI BIOMASI RASTLIN S POMOČJO RENTGENSKE FLUORESCENČNE SPEKTROMETRIJE (XRF)

Rentgenska fluorescenčna spektroskopija (XRF) je pojav, ki temelji na vzbujanju atomov, ki so trdno vezani v K in L lupinah atoma. Atome lahko vzbujamo s fotoni rentgenske svetlobe, pri čemer elektroni preidejo v vzbujeno stanje. Verjetnost za vzbujanje je največja takrat, kadar je vzbujevalna energija podobna vezavni energiji elektronov v posamezni lupini. Vzbujeni elektroni pri prehodu v osnovno stanje oddajo odvečno energijo v obliki fluorescenčnega sevanja, na podlagi karakterističnega sevanja lahko identificiramo atome v vzorcu. Na podlagi intenzitete oddanega sevanja pa lahko določimo koncentracijo elementov (Nečemer in sod., 2011).

Za naš poskus smo liofiliziran in strt rastlinski material v hidravlični stiskalnici oblikovali v 0,5 – 1,5 g pelete in jih tako pripravili za meritve s pomočjo XRF. Posebej za korenine in posebej za poganjke smo določili koncentracije elementov: S, Cd, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn. Kot primarni vir sevanja (radioaktivni izvor) za določanje koncentracije Cd smo uporabili radioizotop Am^{241} (Isotope Products Laboratories, ZDA), za ostale elemente pa prenosni rentgenski spektrometer z rodijevo cevjo (Nečemer in sod., 2011).

Oddano fluorescenčno sevanje smo izmerili z rentgenskim spektrometrom, ki je sestavljen iz Si(Li) detektorja (Canberra) in elektronskega sistema: predojačevalnik, ojačevalnik (Canberra M2024), analogno digitalni pretvornik (Canberra M2024) in večkratni analizator z računalnikom (S-100, Canberra). Spektrometer je bil opremljen z vakuumsko komoro. Energijska resolucija spektrometra je znašala 175 eV do 5900 eV. Analizo spektra smo izvedli v programu za analizo spektrov AXIL, kvantitativno analizo pa s programom QUAES (Quantitative Analysis of Environmental Samples) (Nečemer in sod., 2008). S pomočjo teh podatkov smo določili koncentracije elementov v mg/kg suhe mase rastline.

Iz dobljenih koncentracij smo izračunali translokacijski ali prenosni faktor za Cd (Vogel-Mikuš in sod., 2005) in vsebnost elementov:

$$TF = \frac{\text{koncentracija(poganjki)}}{\text{koncentracija(korenine)}} \quad \dots (10)$$

$$m = c \left[\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right] * m(\text{poganjkov oz. korenin}) [\text{g}] \quad \dots (11)$$

3.10 ANALIZA PODATKOV

Za statistične analize (korelacije, t-test, faktorska ANOVA, enosmerna ANOVA in Duncanov post-hoc test) smo uporabljali program Statistica (Statsoft 7.0.61.0.), grafične prikaze pa smo naredili v Microsoft Excel 2010. Analizo glavnih komponent ali PCA (Principal components analysis) smo naredili v programu StatistiXL (software package 1.8), za grafični prikaz pa smo uporabili Microsoft Excel 2010.

Analiza glavnih komponent (PCA) je ena od multivariatnih statističnih metod, ki se poslužuje ortogonalne linearne transformacije, da predela niz spremenljivk, ki so v korelaciji, v niz ortogonalnih osi, ki niso v korelaciji, in ki jih imenujemo glavne komponente. Metoda nam omogoča, da vse rezultate prikažemo strnjene v večdimenzionalnem prostoru. Nove spremenljivke oz. glavne komponente so linearna kombinacija oblikovanih spremenljivk in so urejene po deležu pojasnjene variance. Prva glavna komponenta opisuje največji del celokupne variabilnosti oz. največji del skupne variance (Janžekovič in Novak, 2012).

4 REZULTATI

4.1 SUHA BIOMASA RASTLIN

4.1.1 Korenine

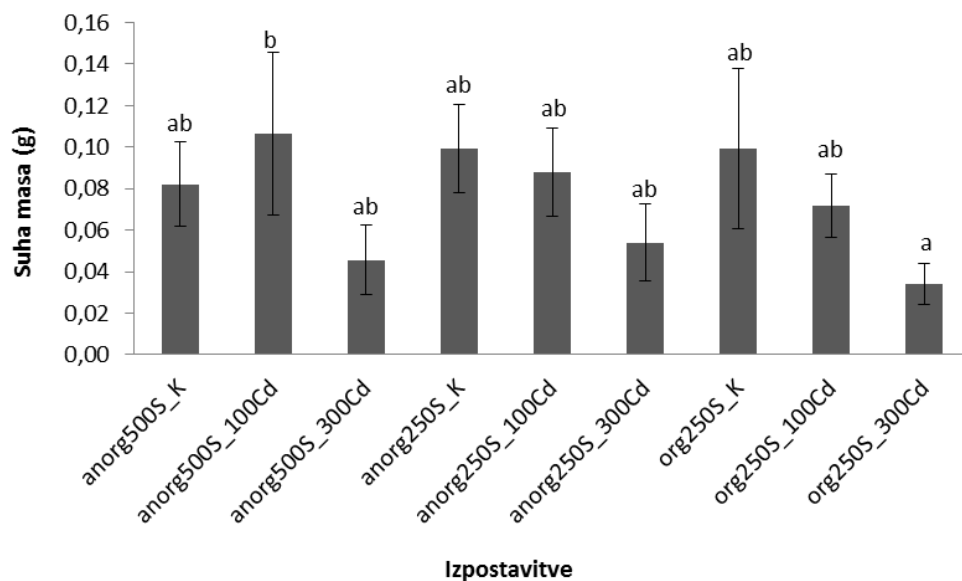
Rezultati faktorske ANOVE so pokazali, da Cd statistično značilno vpliva na suho maso korenin, S ali kombinacija obojega pa ne (Preglednica 3).

Povprečne suhe mase korenin so bile med 0,034 g in 0,106 g. Največjo maso so dosegle rastline, ki so imele na voljo 500 μM koncentracijo anorganskega S in smo jih izpostavili 100 μM koncentraciji Cd (anorg500S_300Cd), najmanjšo pa rastline, ki so imele na voljo organski vir S in smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd (org250S_300Cd). Pri ostalih izpostavitvah se rastline statistično značilno niso razlikovale med seboj razlikovale, saj so bile mase pri posameznih izpostavitvah zelo variabilne (Slika 2).

Preglednica 3: Rezultati faktorske ANOVE za suho maso korenin pri ranem mošnjaku

	SS	df	MS	F	p
Intercept	0,365709	1	0,365709	94,37913	<0,001
žveplo	0,001686	2	0,000843	0,21754	ns
kadmij	0,032859	2	0,016429	4,23996	<0,05
žveplo*kadmij	0,005404	4	0,001351	0,34863	ns
Napaka	0,220869	57	0,003875		

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: SS - vsota kvadratov, df - stopinje prostosti, MS - povprečje kvadratov, F - F-test, ns - statistično neznačilno



Povprečje $\pm$ standardna napaka, N = 6 do 10. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$). Legenda: anorg500S – 500 μM MgSO_4 , anorg25 – 250 μM MgSO_4 , org250S – 250 μM MgSO_4 + 250 μM CYS, K – kontrola, 100Cd – 100 μM CdCl_2 , 300Cd – 300 μM CdCl_2

Slika 2: Povprečna suha masa korenin ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah

4.1.2 Pogankji

Faktorska ANOVA je pokazala, da S in Cd statistično značilno vplivata na suho maso poganjkov, kombinacija obojega pa ne (Preglednica 4).

Povprečne suhe mase poganjkov so bile med 0,088 g in 0,503 g (Slika 3).

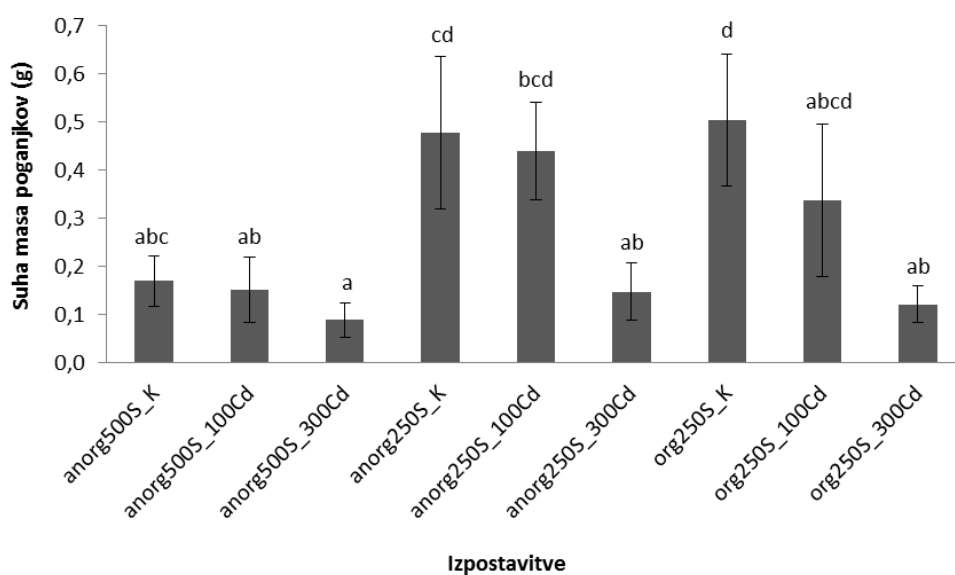
Mase poganjkov rastlin, ki so imele na voljo 500 μM koncentracijo anorganskega S, se med seboj statistično značilno niso razlikovale. Pri rastlinah, ki so imele na voljo 250 μM koncentracijo anorganskega S, so bile mase rastlin, ki smo jih izpostavili 300 μM Cd, statistično značilno manjše kot pri kontrolnih rastlinah. Mase rastlin, ki smo jih izpostavili 100 μM koncentraciji Cd, se niso razlikovale niti od kontrolnih rastlin niti od rastlin pri drugi izpostavitvi s Cd. Pri rastlinah, ki so imele na voljo organski vir S, so imele v primerjavi s kontrolo najmanjšo maso rastline, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd. Rastline, ki smo jih izpostavili 100 ali 300 μM koncentraciji Cd, se med seboj statistično značilno niso razlikovale (Slika 3).

Mase poganjkov se med rastlinami, ki smo jih izpostavili 100 μM koncentraciji Cd, niso statistično značilno razlikovale glede na vir S. Prav tako se mase niso razlikovale med rastlinami, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd (Slika 3).

Preglednica 4: Rezultati faktorске ANOVE za suho maso poganjkov pri ranem mošnjaku

	SS	df	MS	F	p
Intercept	4,940205	1	4,940205	64,74208	<0,001
žveplo	0,616652	2	0,308326	4,04066	<0,05
kadmij	0,869418	2	0,434709	5,69692	<0,005
žveplo*kadmij	0,225982	4	0,056496	0,74038	ns
Napaka	4,578356	60	0,076306		

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: SS – vsota kvadratov, df – stopinje prostosti, MS – povprečje kvadratov, F – F-test, ns – statistično neznačilno



Povprečje $\pm$ standardna napaka, N = 6 do 10. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$). Legenda: anorg500S – 500 μM MgSO_4 , anorg250S – 250 μM MgSO_4 , org250S – 250 μM MgSO_4 + 250 μM CYS, K – kontrola, 100Cd – 100 μM CdCl_2 , 300Cd – 300 μM CdCl_2

Slika 3: Povprečna suha masa poganjkov ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah

4.2 FOTOKEMIČNA UČINKOVITOST FOTOSISTEMA II

Faktorska ANOVA je pokazala, da S, Cd ali kombinacija obojega statistično značilno vplivajo tako na potencialno (Preglednica 5) kot tudi na dejansko fotokemično učinkovitost (Preglednica 6).

Vrednosti potencialne fotokemične učinkovitosti so bile med 0,316 in 0,812, vrednosti pri dejanski fotokemični učinkovitosti pa med 0,267 in 0,763 (Slika 4).

Pri rastlinah, ki so imele na voljo bodisi 500 μM koncentracijo anorganskega S bodisi 250 μM koncentracijo anorganskega S, je bila tako potencialna kot tudi dejanska fotokemična učinkovitost največja pri kontrolnih rastlinah, ob izpostavitvi rastlin 100 ali 300 μM koncentraciji Cd, pa sta vrednosti upadli. Pri rastlinah, ki so imele na voljo organski vir S, ni bilo statistično značilnih razlik med potencialno in dejansko fotokemično učinkovitostjo (Slika 4).

Pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 100 μM koncentraciji Cd, je bila potencialna fotokemična učinkovitost pri rastlinah, ki so imele na voljo eno od koncentracij anorganskega S, manjša kot pri rastlinah, ki so imele na voljo organski vir S. Dejanska fotokemična učinkovitost je bila najmanjša pri rastlinah, ki so imele na voljo 250 μM koncentracijo anorganskega S (anorg250S_100Cd), pri ostalih dveh izpostavitvah pa se vrednosti med seboj statistično značilno niso razlikovale. Pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd, sta bili tako potencialna kot tudi dejanska fotokemična učinkovitost manjši pri rastlinah, ki so imele na voljo anorganski vir S (Slika 4).

Preglednica 5: Rezultati faktorske ANOVE za potencialno fotokemično učinkovitost (F_v/F_m) fotosistema II pri ranem mošnjaku

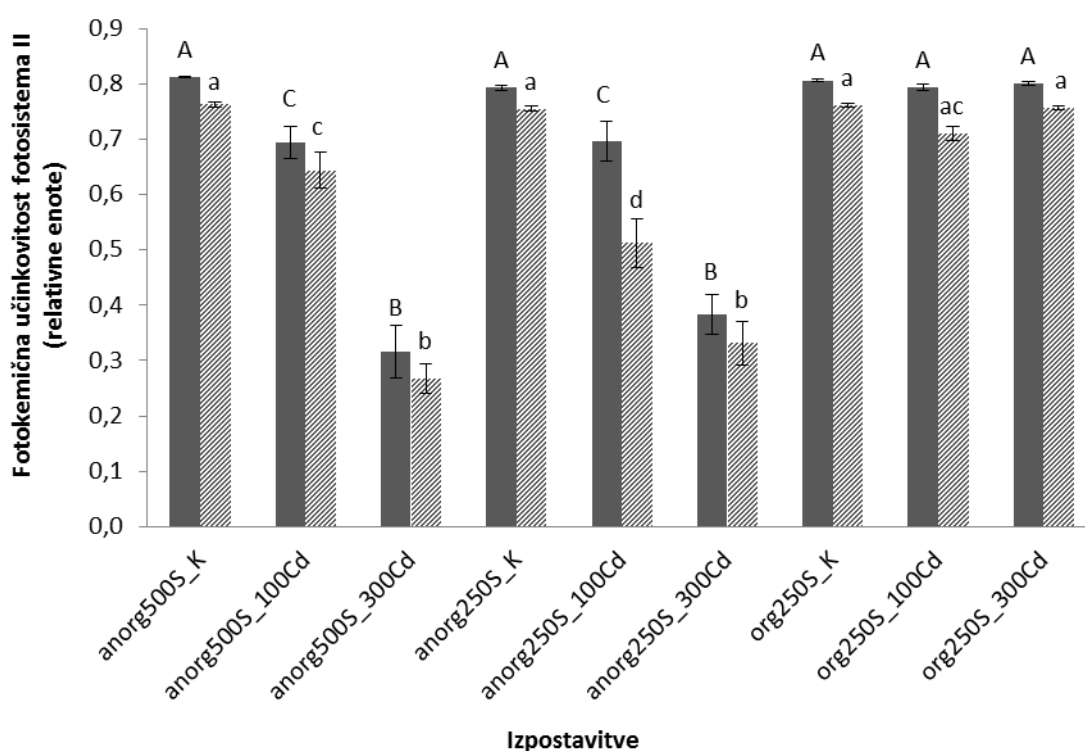
	SS	df	MS	F	p
Intercept	59,70702	1	59,70702	5947,984	<0,001
žveplo	0,95087	2	0,47544	47,363	<0,001
kadmij	2,07562	2	1,03781	103,386	<0,001
žveplo*kadmij	1,05339	4	0,26335	26,235	<0,001
Napaka	1,25477	125	0,01004		

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: SS – vsota kvadratov, df – stopinje prostosti, MS – povprečje kvadratov, F – F-test

Preglednica 6: Rezultati factorske ANOVE za dejansko fotokemično učinkovitost (Y) fotosistema II pri ranem mošnjaku

	SS	df	MS	F	p
Intercept	49,21529	1	49,21529	5412,593	<0,001
žveplo	1,08817	2	0,54408	59,837	<0,001
kadmij	2,01167	2	1,00583	110,620	<0,001
žveplo*kadmij	1,15658	4	0,28914	31,800	<0,001
Napaka	1,15478	127	0,00909		

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: SS – vsota kvadratov, df – stopinje prostosti, MS – povprečje kvadratov, F – F-test



Povprečje $\pm$ standardna napaka, N = 11 do 20. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$). Legenda: Fv/Fm - potencialna fotokemična učinkovitost, Y - dejanska fotokemična učinkovitost, anorg500S – 500 μM MgSO_4 , anorg250S – 250 μM MgSO_4 , org250S – 250 μM MgSO_4 + 250 μM CYS, K – kontrola, 100Cd – 100 μM CdCl_2 , 300Cd – 300 μM CdCl_2

Slika 4: Povprečna potencialna in dejanska fotokemična učinkovitost fotosistema II ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah

4.3 FOTOSINTEZNI PIGMENTI

4.3.1 Klorofil *a*

Faktorska ANOVA je pokazala, da na koncentracijo klorofila *a* (Preglednica 7) statistično značilno vplivata tako Cd in S kot tudi kombinacija obojega.

Povprečne koncentracije klorofila *a* so bile med 1,73 in 3,9 mg/g SVM (Slika 5).

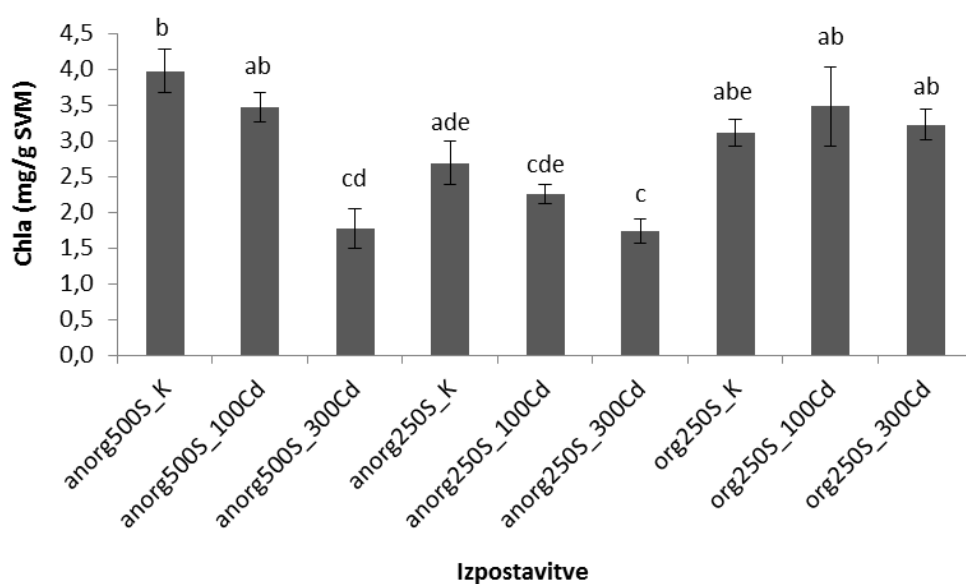
V primeru, ko so imele rastline na voljo 500 μM koncentracijo anorganskega S, je koncentracija klorofila *a* ob dodatku 300 μM Cd statistično značilno upadla v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Kontrolne rastline in rastline, izpostavljene 100 μM koncentraciji Cd, se statistično značilno niso razlikovale. V primeru, ko so imele rastline na voljo 250 μM koncentracijo anorganskega S, je v primerjavi s kontrolnimi rastlinami statistično značilno upadla koncentracija klorofila *a* pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd. Rastline izpostavljene 100 μM koncentraciji Cd in kontrolne rastline se statistično značilno niso razlikovale. V primeru, ko so imele rastline na voljo organski vir S, med njimi ni bilo statistično značilnih razlik (Slika 5).

Med rastlinami, ki smo jih izpostavili 100 μM koncentraciji Cd, so imele statistično značilno najmanjšo koncentracijo klorofila *a* rastline, ki so imele na voljo 250 μM koncentracijo anorganskega S, pri ostalih dveh izpostavitvah se med seboj statistično značilno niso razlikovale. Med rastlinami, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd, so imele največjo koncentracijo klorofila *a* rastline, ki so imele na voljo organski vir S, pri ostalih dveh izpostavitvah so imele statistično značilno manjšo koncentracijo klorofila *a* (Slika 5).

Preglednica 7: Rezultati faktorske ANOVE za klorofil *a* pri ranem mošnjaku

	SS	df	MS	F	p
Intercept	333,0514	1	333,0514	777,4300	<0,001
žveplo	7,9548	2	3,9774	9,2843	<0,001
kadmij	8,1902	2	4,0951	9,5590	<0,001
žveplo*kadmij	6,7214	4	1,6803	3,9224	<0,01
Napaka	14,1372	33	0,4284		

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: SS – vsota kvadratov, df – stopinje prostosti, MS – povprečje kvadratov, F – F-test



Povprečje $\pm$ standardna napaka, N = 3 do 5. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$). Legenda: SVM – sveža masa, Chla – klorofil *a*, anorg500S – 500 μM MgSO_4 , anorg250S – 250 μM MgSO_4 , org250S – 250 μM MgSO_4 + 250 μM CYS, K – kontrola, 100Cd – 100 μM CdCl_2 , 300Cd – 300 μM CdCl_2

Slika 5: Koncentracija klorofila *a* pri ranem mošnjaku pri različnih izpostavitvah

4.3.2 Klorofil *b*

Faktorska ANOVA je pokazala, da na koncentracijo klorofila *b* (Preglednica 8) statistično značilno vplivata tako Cd in S kot tudi kombinacija obojega.

Povprečne koncentracije klorofila *b* so bile med 0,65 in 1,55 mg/g SVM (Slika 6).

Pri rastlinah, ki so imele na voljo 500 μM koncentracijo anorganskega S, smo najmanjšo koncentracijo klorofila *b* izmerili v primeru, ko smo rastline izpostavili 300 μM koncentraciji Cd. Koncentracija klorofila *b* se pri rastlinah, izpostavljenih 100 μM koncentraciji Cd, statistično značilno ni razlikovala od kontrolnih rastlin. Pri rastlinah, ki so imele na voljo 250 μM koncentracijo anorganskega S, se je koncentracija klorofila *b* v primerjavi s kontrolnimi zmanjšala, ko smo rastline izpostavili 300 μM koncentraciji Cd. Pri ostalih dveh izpostavitvah se rastline med seboj statistično značilno niso razlikovale. Tudi rastline, ki so imele na voljo organski vir S, se med seboj niso statistično značilno razlikovale (Slika 6).

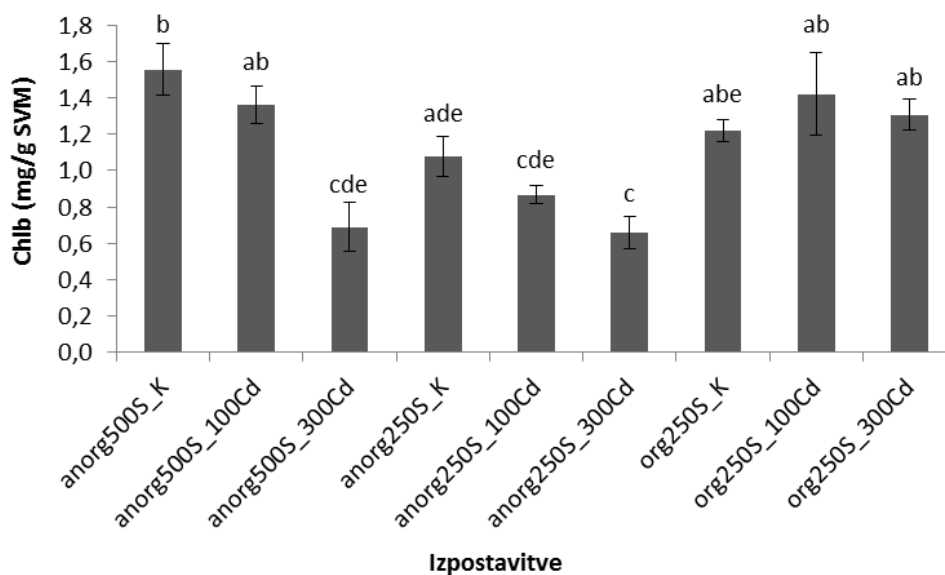
Pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 100 μM koncentraciji Cd, smo najmanjšo koncentracijo klorofila *b* izmerili pri rastlinah, ki so imele na voljo 250 μM koncentracijo anorganskega S. Med rastlinami ostalih dveh izpostavitv ni bilo statistično značilnih razlik. Pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd, smo največjo koncentracijo klorofila *b* izmerili pri tistih, ki so imele na voljo organski

vir S. Rastline, ki so imele na voljo anorganski vir S, se med seboj statistično značilno niso razlikovale (Slika 6).

Preglednica 8: Rezultati faktorske ANOVE za klorofil *b* pri ranem mošnjaku

	SS	Df	MS	F	p
Intercept	51,94930	1	51,94930	662,3503	<0,001
žveplo	1,38604	2	0,69302	8,8359	<0,001
kadmij	1,27854	2	0,63927	8,1507	<0,01
žveplo*kadmij	1,15279	4	0,28820	3,6745	<0,05
Napaka	2,58825	33	0,07843		

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: SS – vsota kvadratov, df – stopinje prostosti, MS – povprečje kvadratov, F – F-test



Povprečje $\pm$ standardna napaka, $N = 3$ do 5 . Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$). Legenda: SVM- sveža masa, Chlb – klorofil *b* anorg500S – $500 \mu\text{M}$ MgSO_4 , anorg250S – $250 \mu\text{M}$ MgSO_4 , org250S – $250 \mu\text{M}$ $\text{MgSO}_4 + 250 \mu\text{M}$ CYS, K – kontrola, 100Cd – $100 \mu\text{M}$ CdCl_2 , 300Cd – $300 \mu\text{M}$ CdCl_2

Slika 6: Koncentracija klorofila *b* pri ranem mošnjaku pri različnih izpostavitvah

4.3.3 Karotenoidi

Faktorska ANOVA je pokazala, da na koncentracijo karotenoidov vpliva S ter kombinacija S in Cd (Preglednica 9).

Povprečne koncentracije karotenoidov so bile med 0,49 in 0,87 mg/g SVM (Slika 7).

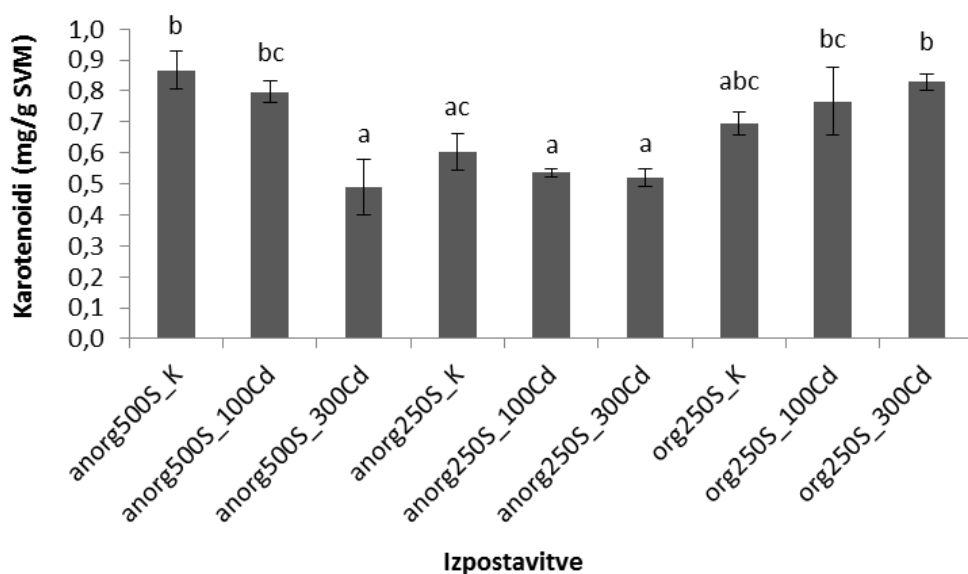
Pri rastlinah, ki so imele na voljo 500 μM koncentracijo anorganskega S, smo najmanjšo koncentracijo karotenoidov izmerili pri tistih, ki so bile izpostavljene 300 μM koncentraciji Cd. Koncentracija karotenoidov se pri rastlinah, izpostavljenih 100 μM koncentraciji Cd, ni razlikovala od kontrolnih rastlin. Med rastlinami, ki so imele na voljo 250 μM anorganski vir S ni bilo statistično značilnih razlik v koncentraciji karotenoidov, prav tako pri rastlinah, ki so imele na voljo organski vir S (Slika 7).

Pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 100 μM koncentraciji Cd, smo največjo koncentracijo karotenoidov izmerili pri tistih, ki so imele na voljo 500 μM koncentracijo anorganskega S in tistih, ki so imele na voljo organski vir S. Rastline pri teh dveh izpostavitvah se med seboj statistično značilno niso razlikovale. V primerjavi z njimi smo pri izpostavitvi, kjer so imele rastline na voljo 250 μM koncentracijo anorganskega S, izmerili statistično značilno manjšo koncentracijo karotenoidov. Pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd, smo največjo koncentracijo karotenoidov izmerili v primeru, ko so imele na voljo organski vir S. Rastline, ki so imele na voljo anorganski vir S, se med seboj statistično značilno niso razlikovale (Slika 7).

Preglednica 9: Rezultati faktorске ANOVE za karotenoide pri ranem mošnjaku

	SS	df	MS	F	p
Intercept	17,57659	1	17,57659	886,4560	<0,001
žveplo	0,29171	2	0,14585	7,3560	<0,01
kadmij	0,08329	2	0,04164	2,1002	ns
žveplo*kadmij	0,31877	4	0,07969	4,0192	<0,01
Napaka	0,61467	31	0,01983		

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: SS – vsota kvadratov, df – stopinje prostosti, MS – povprečje kvadratov, F – F-test, ns – statistično neznačilno



Povprečje $\pm$ standardna napaka, N = 3 do 5. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$). Legenda: anorg500S – 500 μM MgSO_4 , anorg250S – 250 μM MgSO_4 , org250S – 250 μM MgSO_4 + 250 μM CYS, K – kontrola, 100Cd – 100 μM CdCl_2 , 300Cd – 300 μM CdCl_2

Slika 7: Koncentracija karotenoidov pri ranem mošnjaku pri različnih izpostavitvah

4.4 KONCENTRACIJA MDA KOT POKAZATELJ LIPIDNE PEROKSIDACIJE

4.4.1 Koncentracija MDA v koreninah

Faktorska ANOVA je pokazala, da na koncentracijo MDA v koreninah statistično značilno vplivata tako Cd in S kot tudi kombinacija obojega (Preglednica 10).

Povprečne koncentracije MDA so bile pri koreninah med 2,10 in 5,98 nmol MDA/g SVM (Slika 8).

Pri rastlinah, ki so imele na voljo 500 μM koncentracijo anorganskega S, smo največjo koncentracijo izmerili pri kontrolnih rastlinah, najmanjšo pa pri tistih, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd. Rastline, izpostavljene 100 μM koncentraciji Cd, se statistično značilno niso razlikovale v koncentraciji MDA od rastlin pri ostalih dveh izpostavitvah. Med rastlinami, ki so imele na voljo 250 μM koncentracijo anorganskega S, ni bilo statistično značilnih razlik v koncentraciji MDA. Pri rastlinah, ki so imele na voljo organski vir S, so imele največjo koncentracijo MDA rastline, izpostavljene 100 μM koncentraciji Cd. Rastline pri ostalih dveh izpostavitvah se med seboj statistično značilno niso razlikovale v koncentraciji MDA (Slika 8).

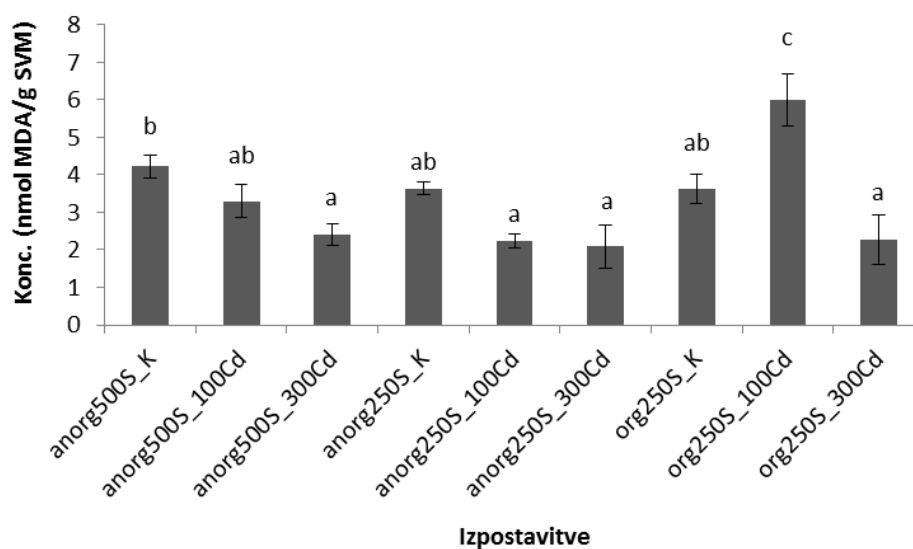
Pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 100 μM koncentraciji Cd, so imele največjo koncentracijo MDA tiste, ki so imele na voljo organski vir S. Med rastlinami, ki so

imele na voljo anorganski vir S, ni bilo statistično značilnih razlik v koncentraciji MDA. Prav tako ni bilo statistično značilnih razlik v koncentraciji MDA med rastlinami, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd (Slika 8).

Preglednica 10: Rezultati faktorske ANOVE za koncentracijo MDA v koreninah ranega mošnjaka

	SS	df	MS	F	p
Intercept	465,9487	1	465,9487	439,8250	<0,001
žveplo	11,7674	2	5,8837	5,5538	<0,01
kadmij	24,2891	2	12,1445	11,4637	<0,001
žveplo*kadmij	24,8288	4	6,2072	5,8592	<0,001
Napaka	36,0194	34	1,0594		

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: SS – vsota kvadratov, df – stopinje prostosti, MS – povprečje kvadratov, F – F-test



Povprečje $\pm$ standardna napaka, N = 4 do 5. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Duncanov test). Legenda: Konc. - koncentracija, SVM - sveža masa, anorg500S – 500 μM MgSO_4 , anorg250S – 250 μM MgSO_4 , org250S – 250 μM MgSO_4 + 250 μM CYS, K – kontrola, 100Cd – 100 μM CdCl_2 , 300Cd – 300 μM CdCl_2

Slika 8: Povprečna koncentracija MDA v koreninah ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah

4.4.2 Koncentracija MDA v poganjkih

Faktorska ANOVA je pokazala, da Cd statistično značilno vpliva na koncentracijo MDA v poganjkih, S ali kombinacija obojega pa ne (Preglednica 11).

Povprečne koncentracije MDA so bile pri poganjkih med 13,34 in 35,69 nmol MDA/g SVM (Slika 9).

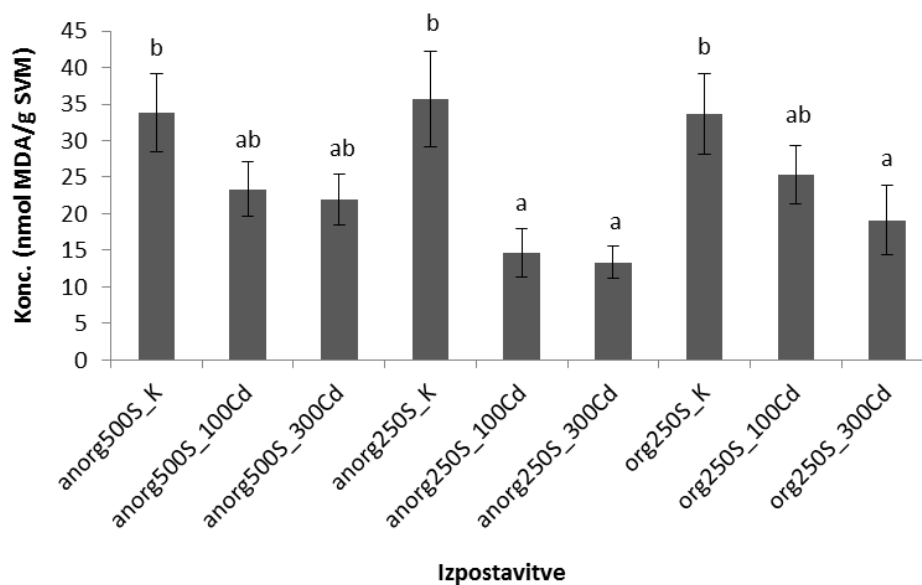
Med rastlinami, ki so imele na voljo 500 μM koncentracijo anorganskega S, ni bilo statistično značilnih razlik v koncentraciji MDA. Pri rastlinah, ki so imele na voljo 250 μM koncentracijo anorganskega S, smo največjo koncentracijo MDA izmerili pri kontrolnih rastlinah. Rastline pri ostalih dveh izpostavitvah se med seboj statistično značilno niso razlikovale in so imele v primerjavo s kontrolnimi rastlinami manjšo koncentracijo MDA. Pri rastlinah, ki so imele na voljo organski vir S, so imele rastline, izpostavljene 300 μM koncentraciji Cd, statistično značilno manjšo koncentracijo MDA kot kontrolne rastline. Rastline, izpostavljene 100 μM koncentraciji Cd, se statistično značilno niso razlikovale v koncentraciji MDA od kontrolnih rastlin, niti od rastlin izpostavljenih 300 μM koncentraciji Cd (Slika 9).

Med rastlinami, ki smo jih izpostavili 100 μM koncentraciji Cd in med tistimi, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd, ni bilo statistično značilnih razlik (Slika 9).

Preglednica 11: Rezultati faktorske ANOVE za koncentracijo MDA v poganjkih ranega mošnjaka

	SS	df	MS	F	p
Intercept	22882,25	1	22882,25	271,0474	<0,001
žveplo	212,52	2	106,26	1,2587	ns
kadmij	1905,06	2	952,53	11,2830	<0,001
žveplo*kadmij	238,43	4	59,61	0,7061	ns
Napaka	2532,65	30	84,42		

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: SS – vsota kvadratov, df – stopinje prostosti, MS – povprečje kvadratov, F – F-test, ns – statistično neznačilno



Povprečje $\pm$ standardna napaka, N = 3 do 5. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Duncanov test). Legenda: konc. – koncentracija, SVM – sveža masa, anorg500S – 500 μ M MgSO_4 , anorg250S – 250 μ M MgSO_4 , org250S – 250 μ M MgSO_4 + 250 μ M CYS, K – kontrola, 100Cd – 100 μ M CdCl_2 , 300Cd – 300 μ M CdCl_2

Slika 9: Povprečna koncentracija MDA v poganjkih ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah

4.5 ELEMENTI

4.5.1 Kadmij

4.5.1.1 Koncentracija kadmija v koreninah

Faktorska ANOVA je pokazala, da koncentracija Cd in S v hidroponski tekočini ter kombinacija obojega statistično značilno vplivajo na koncentracijo Cd v koreninah (Preglednica 12).

Ne glede na koncentracijo in vir S, ki so ga imele rastline na voljo, se je koncentracija Cd v rastlinah v primerjavi s kontrolnimi rastlinami večala z izpostavitvami rastlin večjim koncentracijam Cd. Povprečne koncentracije pri kontrolnih rastlinah so bile med 0,02 in 0,53 mg/g SM. Pri izpostavitvah 100 μ M koncentracijam Cd so bile pri rastlinah, ki so imele na voljo anorganski vir S med 4,15 in 4,21 mg/g SM, pri tistih, ki so imele na voljo organski vir S, pa je povprečna koncentracija Cd znašala 8,52 mg/g SM. Pri izpostavitvi 300 μ M koncentraciji Cd so bile vrednosti med 12, 98 in 15,98 mg/g SM.

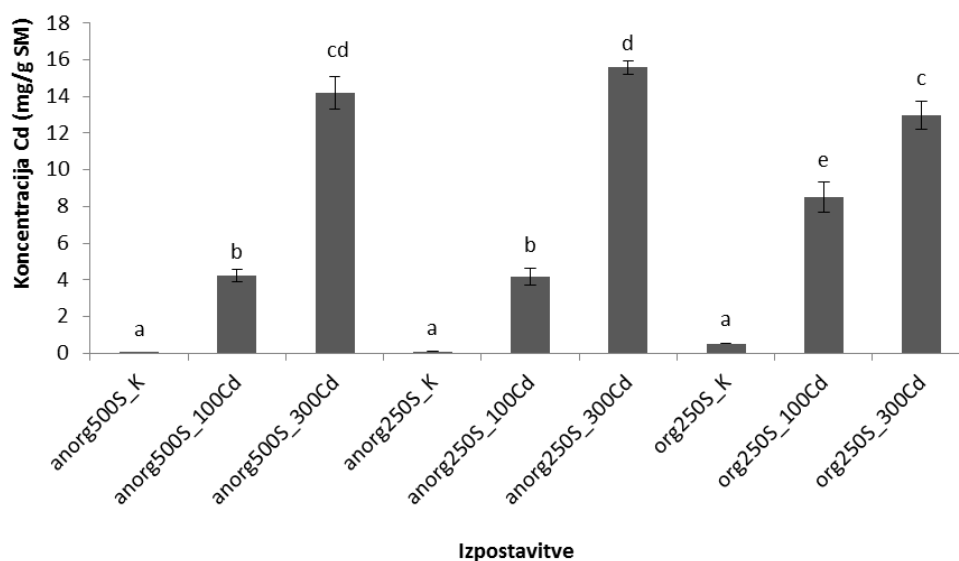
Pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 100 μ M koncentraciji Cd, ni bilo statistično značilnih razlik v koncentracijami Cd pri tistih rastlinah, ki so imele na voljo anorganski vir S. V primerjavi z njima je bila koncentracija Cd pri tistih, ki so imele na voljo organski vir S,

večja. Pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd, so se v koncentraciji Cd med seboj statistično značilno razlikovale rastline, ki so imele na voljo 250 μM koncentracijo anorganskega S in rastline, ki so imele na voljo organski vir S. Rastline, ki so imele na voljo 500 μM koncentracijo anorganskega S, se statistično značilno niso razlikovale od rastlin pri ostalih izpostavitvah (Slika 10).

Preglednica 12: Rezultati faktorske ANOVE za koncentracijo Cd v koreninah ranega mošnjaka

	SS	df	MS	F	p
Intercept	1910,096	1	1910,096	1341,870	<0,001
žveplo	10,582	2	5,291	3,717	<0,05
kadmij	1388,689	2	694,344	487,787	<0,001
žveplo*kadmij	66,862	4	16,716	11,743	<0,001
Napaka	48,398	34	1,423		

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: SS – vsota kvadratov, df – stopinje prostosti, MS – povprečje kvadratov, F – F-test



Povprečje $\pm$ standardna napaka, N = 4 do 5. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Duncanov test). Legenda: SM – suha masa, anorg500S – 500 μM MgSO_4 , anorg250S – 250 μM MgSO_4 , org250S – 250 μM MgSO_4 + 250 μM CYS, K – kontrola, 100Cd – 100 μM CdCl_2 , 300Cd – 300 μM CdCl_2

Slika 10: Koncentracija Cd v koreninah ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah

4.5.1.2 Koncentracija kadmija v poganjkih

Faktorska ANOVA je pokazala, da koncentracija Cd in S v hidroponski tekočini statistično značilno vplivata na koncentracijo Cd v koreninah, medtem ko kombinacija obojega nima statistično značilnega vpliva (Preglednica 13).

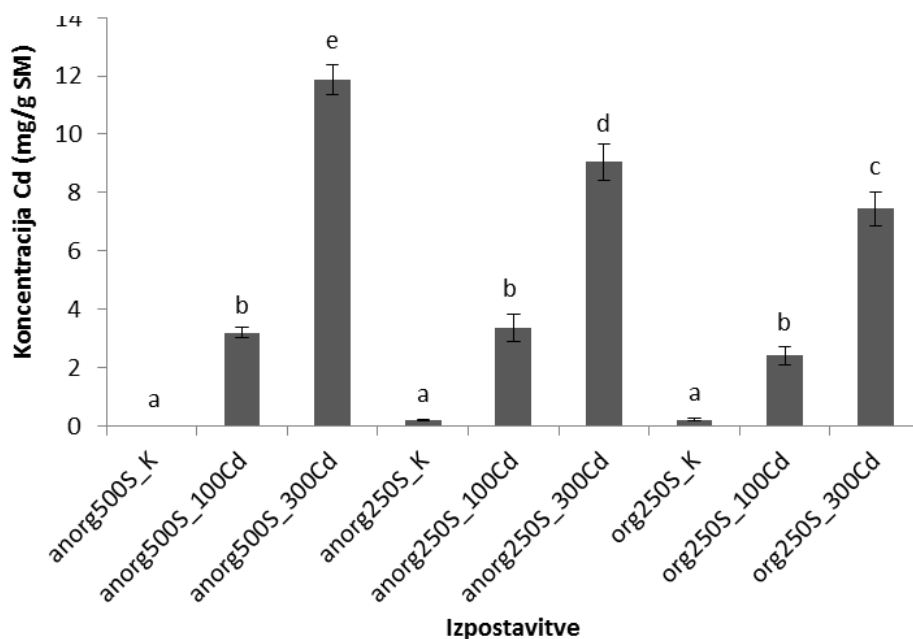
Tako kot pri koreninah je tudi pri poganjkih, ne glede na koncentracijo ali vir S, ki so ga imele rastline na voljo, koncentracija Cd v primerjavi s kontrolnimi rastlinami naraščala z izpostavitvami rastlin večjim koncentracijam Cd. Koncentracije Cd pri kontrolnih rastlinah so bile med 0,01 in 0,22 mg/g SM, med 2,41 in 3,21 mg/g SM pri izpostavitvah s 100 μ M koncentracijo Cd in med 7,44 in 11,87 mg/g SM pri izpostavitvah s 300 μ M koncentracijo Cd (Slika 11).

Rastline, ki smo jih izpostavili 100 μ M koncentraciji Cd, se med seboj statistično značilno niso razlikovale v koncentraciji Cd. Smo pa izmerili statistično značilne razlike pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 300 μ M koncentraciji Cd. Rastline, ki so imele na voljo 500 μ M koncentracijo anorganskega S, so imele največjo koncentracijo Cd, malo manjšo so imele rastline, ki so imele na voljo 250 μ M koncentracijo S in najmanj rastline, ki so imele na voljo organski vir S (Slika 11).

Preglednica 13: Rezultati faktorske ANOVE za koncentracijo Cd v poganjkih ranega mošnjaka

	SS	df	MS	F	p
Intercept	701,4427	1	701,4427	988,0827	<0,001
žveplo	17,5178	2	8,7589	12,3381	<0,001
kadmij	584,6328	2	292,3164	411,7696	<0,001
žveplo*kadmij	24,6052	4	6,1513	8,6650	<0,001
Napaka	22,7169	32	0,7099		

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: SS – vsota kvadratov, df – stopinje prostosti, MS – povprečje kvadratov, F – F-test



Povprečje $\pm$ standardna napaka, N = 3 do 5. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Duncanov test). Legenda: SM – suha masa, anorg500S – 500 μ M MgSO_4 , anorg250S – 250 μ M MgSO_4 , org250S – 250 μ M MgSO_4 + 250 μ M CYS, K – kontrola, 100 Cd – 100 μ M CdCl_2 , 300Cd – 300 μ M CdCl_2

Slika 11: Koncentracija Cd v poganjkih ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah

4.5.1.3 Primerjava koncentracij kadmija v koreninah in v poganjkih

V večini primerov smo izmerili statistično značilno večjo koncentracijo Cd v koreninah kot v poganjkih (Preglednica 14). Statistično značilnih razlik v koncentraciji Cd v koreninah in poganjkih ni bilo pri kontrolnih rastlinah, ki so rastle na 250 μ M anorganskem viru S. Prav tako ni bilo statistično značilnih razlik pri kontrolnih rastlinah, ki so rastle na 500 μ M anorganskem viru S in v isti skupini tudi pri tistih, ki smo jih izpostavili 300 μ M Cd (Preglednica 14).

Preglednica 14: Rezultati t-testa za koncentracijo Cd v koreninah in poganjkih ranega mošnjaka

	KK	KP	t	p	n
anorg500S_K	24 ±9	11±5	2,32	ns	5
anorg500S_100Cd	4208±733	3556±848	3,92	p<0,05	5
anorg500S_300Cd	14180±2014	11244±4094	1,21	ns	5
anorg250S_K	75±18	188±46	4,17	p<0,05	5
anorg250S_100Cd	4152±1020	3374±1045	1,57	ns	5
anorg250S_300Cd	16220±1563	9040±1369	6,35	p<0,01	5
org250S_K	567±82	288±167	3,26	p<0,05	5
org250S_100Cd	8518±1815	2418±679	5,54	p<0,01	5
org250S_300Cd	12980±1675	7442±1315	6,41	p<0,01	5

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: t – rezultat t-testa, n – število vzorcev, ns – statistično neznačilno, KK – koncentracija Cd v koreninah, KP – koncentracija Cd v poganjkih. Legenda izpostavitvev: anorg500S – 500 μM MgSO_4 , anorg250S – 250 μM MgSO_4 , org250S – 250 μM MgSO_4 + 250 μM CYS, K – kontrola, 100Cd – 100 μM CdCl_2 , 300Cd – 300 μM CdCl_2

4.5.1.4 Vsebnost kadmija v koreninah

Faktorska ANOVA je pokazala, da Cd v hidroponski tekočini statistično značilno vpliva na vsebnost Cd v koreninah (Preglednica 15).

Povprečne vsebnosti Cd pri koreninah so bile v primeru kontrol med 2 in 93 mg, v primeru izpostavitve s 100 μM koncentracijo Cd med 343 in 855 mg, v primeru izpostavitve s 300 μM koncentracijo Cd pa med 674 in 1341 mg (Slika 12).

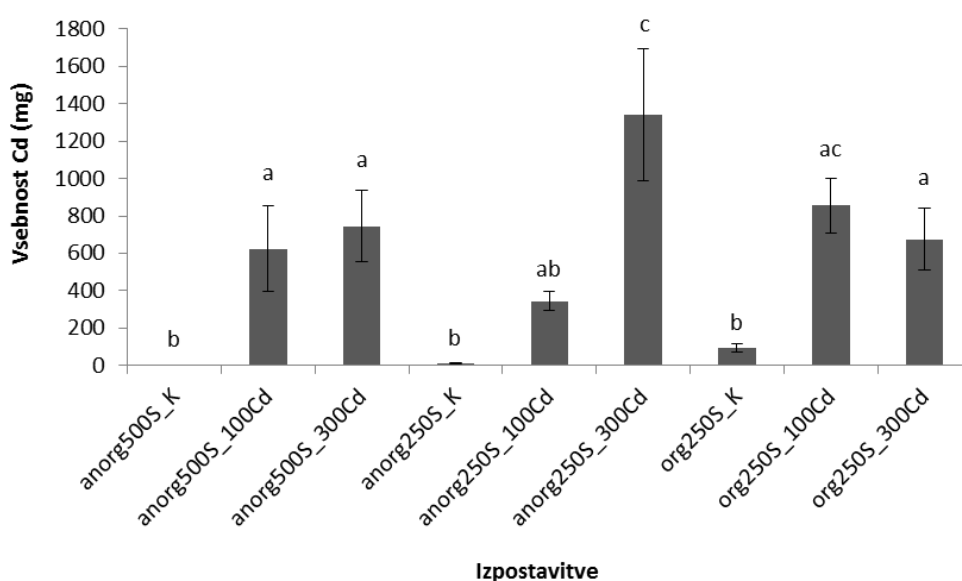
Pri rastlinah, ki so imele na voljo 500 μM koncentracijo anorganskega S, sta imeli obe skupini rastlin, izpostavljeni s Cd, statistično značilno večjo vsebnost Cd kot kontrolne rastline, med seboj pa se statistično značilno niso razlikovale. Pri rastlinah, ki so imele na voljo 250 μM koncentracijo anorganskega S, se rastline, izpostavljene 100 μM koncentraciji Cd, niso razlikovale od kontrolnih rastlin; rastline, izpostavljene 300 μM koncentraciji Cd, pa so imele večjo vsebnost Cd v koreninah v primerjavi z rastlinami obeh izpostavitvev. Pri rastlinah, ki so imele na voljo organski vir S, sta imeli obe skupini rastlin, izpostavljeni Cd, večjo vsebnost Cd kot kontrolne rastline. Skupini rastlin, izpostavljeni Cd, se med seboj statistično značilno nista razlikovali (Slika 12).

Rastline, ki smo jih izpostavili 100 μM koncentraciji Cd, se med seboj statistično značilno niso razlikovale v vsebnosti Cd ne glede na vir S. Pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd, so imele največjo vsebnost Cd rastline, ki so imele na voljo le 250 μM koncentracijo anorganskega S. Rastline, pri ostalih dveh izpostavitvah se med seboj statistično značilno niso razlikovale (Slika 12).

Preglednica 15: Rezultati faktorske ANOVE za vsebnost Cd v koreninah ranega mošnjaka

	SS	df	MS	F	p
Intercept	12317369	1	12317369	76,39841	<0,001
žveplo	33194	2	16597	0,10294	ns
kadmij	6206043	2	3103022	19,24647	<0,001
žveplo*kadmij	1326223	4	331556	2,05647	ns
Napaka	4997989	31	161225		

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: SS – vsota kvadratov, df – stopinje prostosti, MS – povprečje kvadratov, F – F-test, ns – statistično neznačilno



Povprečje $\pm$ standardna napaka, $N = 3$ do 5 . Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Duncanov test). Legenda: anorg500S – $500 \mu\text{M}$ MgSO_4 , anorg250S – $250 \mu\text{M}$ MgSO_4 , org250S – $250 \mu\text{M}$ MgSO_4 + $250 \mu\text{M}$ CYS, K – kontrola, 100 Cd – $100 \mu\text{M}$ CdCl_2 , 300Cd – $300 \mu\text{M}$ CdCl_2

Slika 12: Vsebnost Cd v koreninah ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah

4.5.1.5 Vsebnost kadmija v poganjkih

Faktorska ANOVA je pokazala, da Cd iz hidroponske tekočine statistično značilno vpliva na vsebnost Cd v poganjkih, S ali kombinacija obojega pa nimata statistično značilnega vpliva (Preglednica 16).

Povprečne vsebnosti Cd so bile pri poganjkih v primeru kontrolnih vzorcev med 6 in 154 mg, v primeru izpostavitve s $100 \mu\text{M}$ koncentracijo Cd med 1221 in 2761 mg, v primeru izpostavitve s $300 \mu\text{M}$ koncentracijo Cd pa med 1256 in 4156 mg (Slika 13).

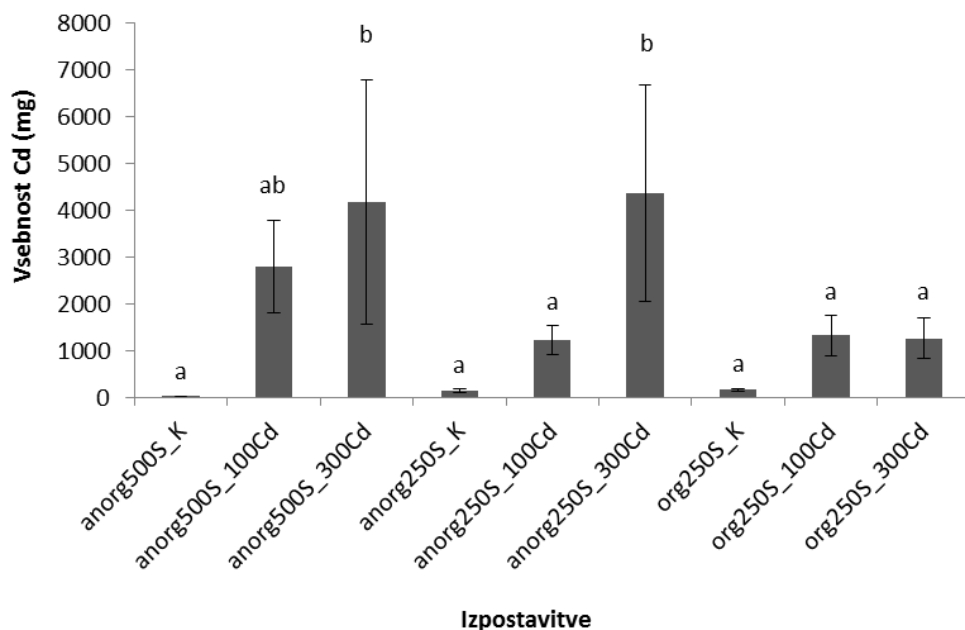
Pri rastlinah, ki so imele na voljo 500 μM koncentracijo anorganskega S, se rastline, izpostavljene 100 μM Cd, statistično značilno niso razlikovale od kontrolnih rastlin. Rastline, izpostavljene 300 μM Cd, so imele statistično značilno večjo vsebnost Cd kot kontrolne rastline, od rastlin, izpostavljenih 100 μM koncentraciji Cd, pa se statistično značilno niso razlikovale. Pri rastlinah, ki so imele na voljo 250 μM koncentracijo anorganskega S, se rastline, izpostavljene 100 μM koncentraciji Cd, med seboj statistično značilno niso razlikovale; rastline, izpostavljene 300 μM koncentraciji Cd, pa so imele statistično značilno največjo vsebnost Cd. Rastline, ki so imele na voljo organski vir S, se med seboj statistično značilno niso razlikovale (Slika 13).

Rastline, ki smo jih izpostavili 100 μM koncentraciji Cd, se med seboj statistično značilno niso razlikovale. Rastline, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd, se v primeru, ko so imele na voljo anorganski vir S, med seboj statistično značilno niso razlikovale. Izpostavitev, pri kateri so imele rastline na voljo organski vir S, pa je imela od ostalih dveh statistično značilno manjšo vsebnost Cd (Slika 13).

Preglednica 16: Rezultati faktorske ANOVE za vsebnost Cd v poganjkih ranega mošnjaka

	SS	Df	MS	F	p
Intercept	106,8348	1	106,8348	32,97563	<0,001
žveplo	13,1959	2	6,5980	2,03653	ns
kadmij	57,7807	2	28,8903	8,91729	<0,001
žveplo*kadmij	18,2909	4	4,5727	1,41142	ns
Napaka	93,9545	29	3,2398		

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: SS – vsota kvadratov, df – stopinje prostosti, MS – povprečje kvadratov, F – F-test, ns – statistično neznačilno



Povprečje $\pm$ standardna napaka, N = 3 do 5. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Duncanov test). Legenda: anorg500S – 500 μ M $MgSO_4$, anorg250S – 250 μ M $MgSO_4$, org250S – 250 μ M $MgSO_4$ + 250 μ M CYS, K – kontrola, 100Cd – 100 μ M $CdCl_2$, 300Cd – 300 μ M $CdCl_2$

Slika 13: Vsebnost Cd v poganjkih ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah

4.5.1.6 Primerjava vsebnosti kadmija v koreninah in poganjkih

Statistično značilne razlike v vsebnosti Cd med koreninami in poganki smo izmerili samo v treh primerih (Preglednica 17).

Preglednica 17: T-test za primerjavo vsebnosti Cd v koreninah in poganjkih ranega mošnjaka

Izpostavitve	KK (mg/g SM)	KP (mg/g SM)	t	p	n
anorg500S_K	0,005 $\pm$ 0,02	0,004 $\pm$ 0,004	0,675196	ns	3
anorg500S_100Cd	2,859$\pm$2,324	2,361$\pm$1,954	2,82964	p<0,05	5
anorg500S_300Cd	6,875 $\pm$ 5,783	4,150 $\pm$ 3,649	1,3901	ns	4
anorg250S_K	0,060 $\pm$ 0,040	0,139 $\pm$ 0,086	2,37458	ns	5
anorg250S_100Cd	1,606 $\pm$ 1,074	1,221 $\pm$ 0,700	1,33241	ns	5
anorg250S_300Cd	6,625$\pm$4,905	3,810$\pm$3,046	2,98362	p<0,05	5
org250S_K	0,387$\pm$0,104	0,188$\pm$0,095	2,92246	p<0,05	5
org250S_100Cd	4,385 $\pm$ 3,897	1,318 $\pm$ 0,980	2,1148	ns	5
org250S_300Cd	2,251 $\pm$ 1,680	1,256 $\pm$ 0,981	2,67555	ns	5

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p<0,05$). Simboli: t – rezultat t-testa, n – število vzorcev, ns – statistično neznačilno, KK – koncentracija Cd v koreninah, KP – koncentracija Cd v poganjkih. Legenda izpostavitvev: anorg500 – 500 μ M $MgSO_4$, anorg250S – 250 μ M $MgSO_4$, org250S – 250 μ M $MgSO_4$ + 250 μ M CYS, K – kontrola, 100Cd – 100 μ M $CdCl_2$, 300Cd – 300 μ M $CdCl_2$

4.5.1.7 Prenosni faktor za kadmij

Analiza faktorske ANOVE je pokazala, da S iz hidroponske tekočine statistično značilno vpliva na prenosni faktor za Cd (Tabela 18).

Vrednosti TF so bile med 0,34 in 0,86 (Slika 14).

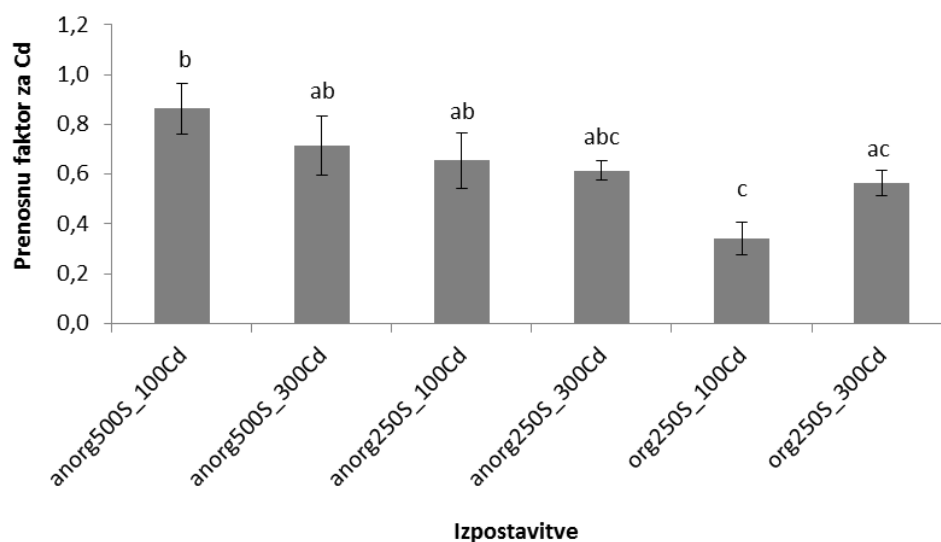
Rastline, ki so imele na voljo bodisi 500 μM bodisi 250 μM koncentracijo anorganskega S, se niso statistično značilno razlikovale v vrednosti prenosnega faktorja. Prav tako se med seboj niso razlikovale rastline, ki so imele na voljo organski vir S (Slika 14).

Pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 100 μM koncentraciji Cd, je prenosni faktor dosegel največjo vrednost pri rastlinah, ki so imele na voljo 500 μM koncentracijo anorganskega S, najmanjšo pa pri rastlinah, ki so imele na voljo organski vir S. Vrednosti pri rastlinah, ki so imele na voljo 250 μM koncentracijo anorganskega S, se niso statistično značilno razlikovale od vrednosti pri rastlinah, ki so imele na voljo 500 μM koncentracijo anorganskega S, niti od rastlin, ki so imele na voljo organski vir S. Rastline, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd se med seboj statistično značilno niso razlikovale v vrednosti prenosnega faktorja (Slika 14).

Preglednica 18: Rezultati faktorske ANOVE za prenosni faktor Cd pri ranem mošnjaku

	SS	df	MS	F	p
Intercept	8,545783	1	8,545783	305,2116	<0,001
žveplo	0,360470	2	0,180235	6,4371	<0,01
kadmij	0,001541	1	0,001541	0,0550	ns
žveplo*kadmij	0,152378	2	0,076189	2,7211	ns
Napaka	0,447993	16	0,028000		

Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: SS – vsota kvadratov, df – stopinje prostosti, MS – povprečje kvadratov, F – F-test, ns – statistično nezačilno



Povprečje $\pm$ standardna napaka, $N = 5$. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$). Legenda: anorg500 – 500 μM MgSO_4 , anorg250S – 250 μM MgSO_4 , org250S – 250 μM MgSO_4 + 250 μM CYS, K – kontrola, 100Cd – 100 μM CdCl_2 , 300Cd – 300 μM CdCl_2

Slika 14: Prenosni faktor za Cd pri ranem mošnjaku pri različnih izpostavitvah

4.5.2 Žveplo

4.5.2.1 Koncentracija žvepla v koreninah

Faktorska ANOVA je pokazala, da Cd in S iz hidroponske tekočine ter oba skupaj statistično značilno vplivajo na koncentracijo S v koreninah (Preglednica 19).

Povprečne koncentracije v koreninah so bile pri kontrolnih rastlinah med 5,73 in 7,16 mg/g SM, pri izpostavitvah 100 μM koncentraciji Cd med 7,71 in 11,57 mg/g SM, pri izpostavitvi 300 μM koncentraciji Cd pa med 11,13 in 17,82 mg/g SM (Slika 15).

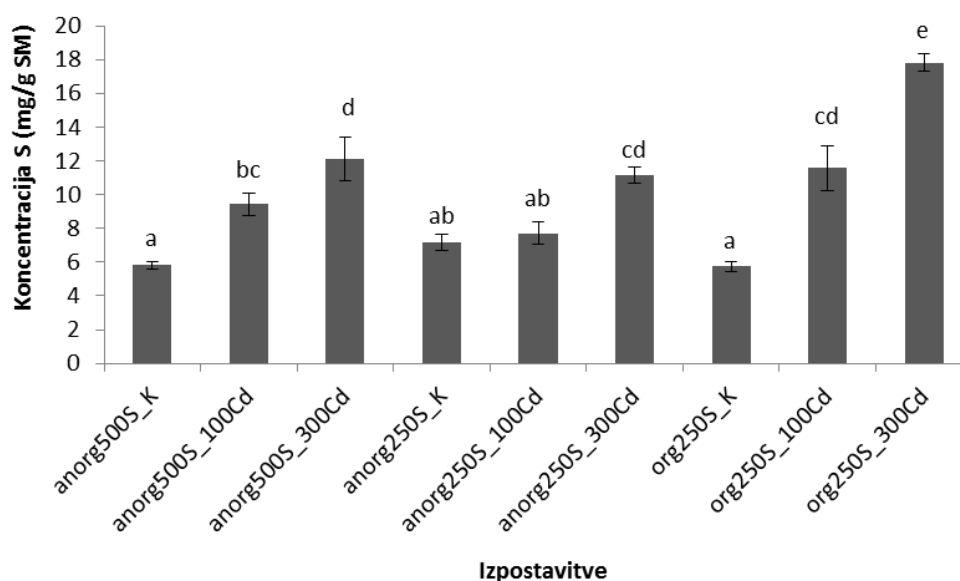
Pri rastlinah, ki so imele na voljo 500 μM koncentracijo anorganskega S, je bila koncentracija S najmanjša pri kontrolnih rastlinah, pri obeh izpostavitvah s Cd pa je bila koncentracija S večja. Pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd, je bila koncentracija S večja kot pri tistih, ki smo jih izpostavili 100 μM koncentraciji Cd. Pri rastlinah, ki so imele na voljo 250 μM koncentracijo anorganskega S, je bila vsebnost Cd največja pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd. Koncentracije S pri kontrolnih rastlinah in tistih, izpostavljenih 100 μM Cd, se med seboj statistično značilno niso razlikovale. Pri rastlinah, ki so imele na voljo organski vir S, je bila koncentracija S najmanjša pri kontrolnih rastlinah; pri obeh izpostavitvah s Cd pa je bila koncentracija S večja. Pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd, je bila koncentracija S večja kot pri tistih, ki smo jih izpostavili 100 μM koncentraciji Cd (Slika 15).

Pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 100 μM koncentraciji Cd, so se v koncentraciji S statistično značilno razlikovale tiste rastline, ki so imele na voljo 250 μM koncentracijo S in tiste, ki so imele na voljo organski vir S. Rastline, ki so imele na voljo 500 μM koncentracijo anorganskega S, se statistično značilno niso razlikovale od ostalih. Pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd, so imele največjo koncentracijo S rastline, ki so imele na voljo organski vir S. Pri ostalih dveh izpostavitvah se v koncentraciji S statistično značilno niso razlikovale med seboj (Slika 15).

Preglednica 19: Rezultati faktorske ANOVE za koncentracijo S v koreninah ranega mošnjaka

	SS	df	MS	F	p
Intercept	4013,453	1	4013,453	1327,953	<0,001
žveplo	73,846	2	36,923	12,217	<0,001
kadmij	371,927	2	185,964	61,531	<0,001
žveplo*kadmij	81,323	4	20,331	6,727	<0,001
Napaka	99,735	33	3,022		

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: SS – vsota kvadratov, df – stopinje prostosti, MS – povprečje kvadratov, F – F-test



Povprečje $\pm$ standardna napaka, N = 4 do 5. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Duncanov test). Legenda: SM – suha masa, anorg500 – 500 μM MgSO_4 , anorg250S – 250 μM MgSO_4 , org250S – 250 μM MgSO_4 + 250 μM CYS, K – kontrola, 100Cd – 100 μM CdCl_2 , 300Cd – 300 μM CdCl_2

Slika 15: Koncentracija S v koreninah ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah

4.5.2.2 Koncentracija žvepla v poganjkih

Faktorska ANOVA je pokazala, da Cd in S iz hidroponske tekočine statistično značilno vplivata na vsebnost S poganjkih, kombinacija obojega pa ne (Preglednica 20).

Povprečne koncentracije pri poganjkih so bile v primeru kontrolnih rastlin med 1,36 in 4,15 mg/g SM, pri izpostavitvah s 100 μM koncentraciji Cd med 1,60 in 5,82 mg/g SM, pri izpostavitvi s 300 μM Cd pa med 10,37 in 11,72 mg/g SM (Slika 16).

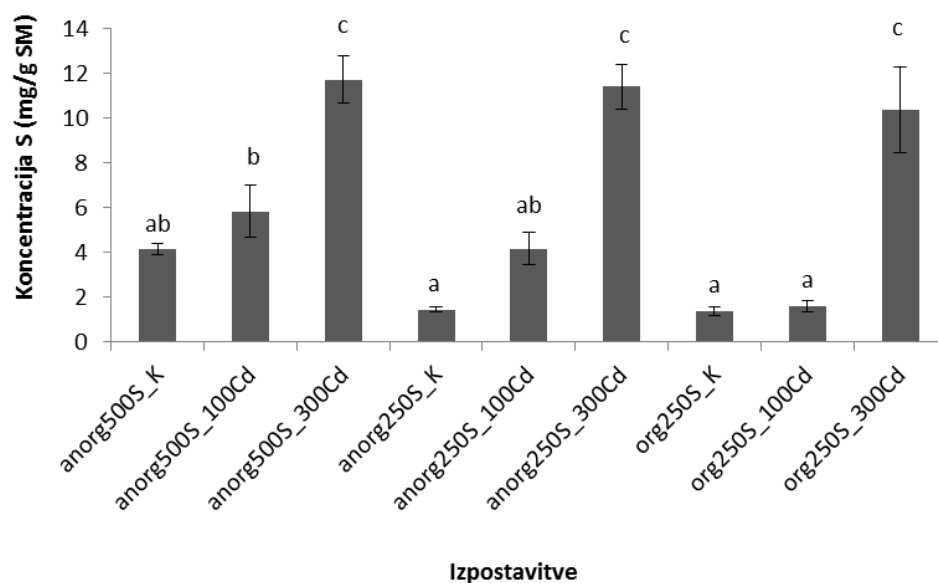
Pri vseh rastlinah, ne glede na koncentracijo in vir S, ki so ga imele na voljo, so imele največjo koncentracijo S rastline, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd. Kontrolne rastline in rastline, izpostavljene 100 μM koncentraciji Cd, se med seboj statistično značilno niso razlikovale (Slika 16).

Pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 100 μM koncentraciji Cd, je bila koncentracija S najmanjša pri tistih, ki so imele na voljo organski vir S. Rastline, ki so imele na voljo enega od anorganskih virov S, se po koncentraciji S med seboj statistično značilno niso razlikovale. Rastline, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd, se med seboj statistično značilno niso razlikovale (Slika 16).

Preglednica 20: Rezultati factorske ANOVE za koncentracijo S pri ranem mošnjaku

	SS	df	MS	F	p
Intercept	1423,815	1	1423,815	309,1904	<0,001
žveplo	55,905	2	27,953	6,0701	<0,01
kadmij	643,556	2	321,778	69,8761	<0,001
žveplo*kadmij	16,016	4	4,004	0,8695	ns
Napaka	156,569	34	4,605		

Z rdečo barvo so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: SS – vsota kvadratov, df – stopinje prostosti, MS – povprečje kvadratov, F – F-test, ns – statistično neznačilno



Povprečje $\pm$ standardna napaka, N = 4 do 5. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Duncanov test). Legenda: SM – suha masa, anorg500S – 500 μ M $MgSO_4$, anorg250S – 250 μ M $MgSO_4$, org250S – 250 μ M $MgSO_4$ + 250 μ M CYS, K – kontrola, 100Cd – 100 μ M $CdCl_2$, 300Cd – 300 μ M $CdCl_2$

Slika 16: Koncentracija S v poganjkih ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah

4.5.2.3 Primerjava koncentracij žvepla v koreninah in poganjkih

V vseh primerih, razen pri izpostavitvi anorg500S_300Cd, je bila koncentracija S statistično značilno večja v koreninah kot v poganjkih (Preglednica 21).

Preglednica 21: T-test za koncentracije S v koreninah in poganjkih ranega mošnjaka

Izpostavitve	KK (mg/g SM)	KP (mg/g SM)	t	p	n
anorg500S_K	5826 $\pm$ 511	4530 $\pm$ 969	2,95	p<0,05	5
anorg500S_100Cd	9434 $\pm$ 1476	5824 $\pm$ 2642	2,91	p<0,05	5
anorg500S_300Cd	12094 $\pm$ 2901	11726 $\pm$ 2379	0,19	ns	5
anorg250S_K	6594 $\pm$ 1485	1670 $\pm$ 565	6,36	p<0,01	5
anorg250S_100Cd	7712 $\pm$ 1447	4156 $\pm$ 1591	5,31	p<0,01	5
anorg250S_300Cd	11960 $\pm$ 2046	11398 $\pm$ 2218	1,33	p<0,05	5
org250S_K	6208 $\pm$ 1182	1364 $\pm$ 419	8,38	p<0,01	5
org250S_100Cd	11570 $\pm$ 3014	1604 $\pm$ 551	7,79	p<0,01	5
org250S_300Cd	17820 $\pm$ 1143	10370 $\pm$ 4286	3,70	p<0,05	5

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: t – rezultat t-testa, n – število vzorcev, ns – statistično neznačilno, KK – koncentracija S v koreninah, KP – koncentracija S v poganjkih. Legenda izpostavitve: anorg500S – 500 μ M $MgSO_4$, anorg250S – 250 μ M $MgSO_4$, org250S – 250 μ M $MgSO_4$ + 250 μ M CYS, K – kontrola, 100Cd – 100 μ M $CdCl_2$, 300Cd – 300 μ M $CdCl_2$

4.5.2.4 Vsebnost žvepla v koreninah

Faktorska ANOVA je pokazala, da Cd in S iz hidroponske tekočine niti kombinacija obojega ne vplivajo na vsebnost S v koreninah (Preglednica 22).

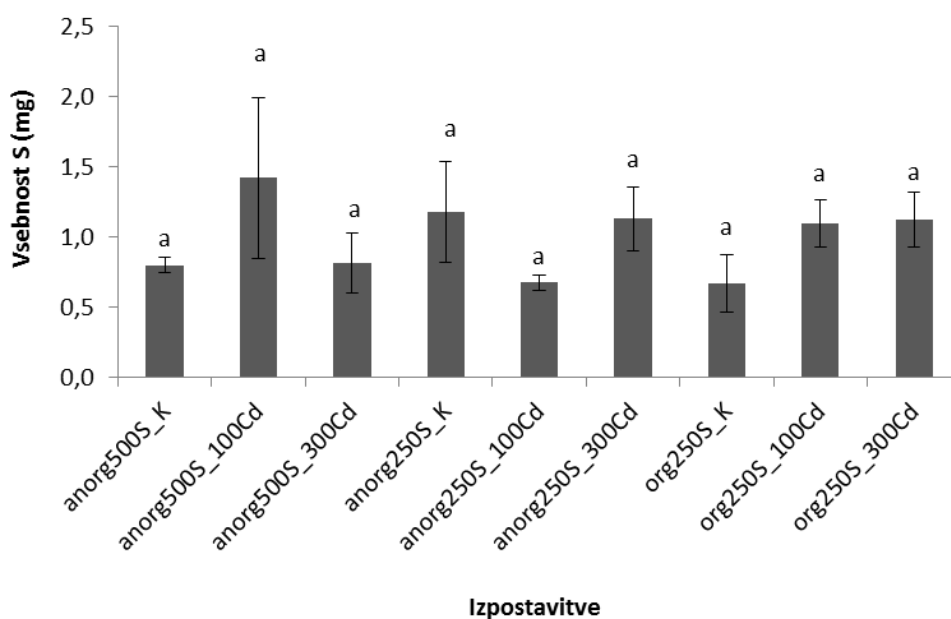
Vsebnosti S v koreninah so bile med 0,67 in 1,41 mg (Slika 17).

Povprečne vsebnosti S v koreninah se med posameznimi izpostavitvami statistično značilno niso razlikovale (Slika 17).

Preglednica 22: Rezultati faktorske ANOVE za vsebnost S v koreninah ranega mošnjaka

	SS	df	MS	F	p
Intercept	35,89205	1	35,89205	121,5882	<0,001
žveplo	0,03176	2	0,01588	0,0538	ns
kadmij	0,30480	2	0,15240	0,5163	ns
žveplo*kadmij	1,65072	4	0,41268	1,3980	ns
Napaka	8,26542	28	0,29519		

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: SS – vsota kvadratov, df – stopinje prostosti, MS – povprečje kvadratov, F – F-test, ns- statistično neznačilno



Povprečje $\pm$ standardna napaka, N = 3 do 5. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Duncanov test). Legenda: anorg500S – 500 μ M MgSO_4 , anorg250S – 250 μ M MgSO_4 , org250S – 250 μ M MgSO_4 + 250 μ M CYS, K – kontrola, 100Cd – 100 μ M CdCl_2 , 300Cd – 300 μ M CdCl_2

Slika 17: Vsebnost S pri koreninah ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah

4.5.2.5 Vsebnost žvepla v poganjkih

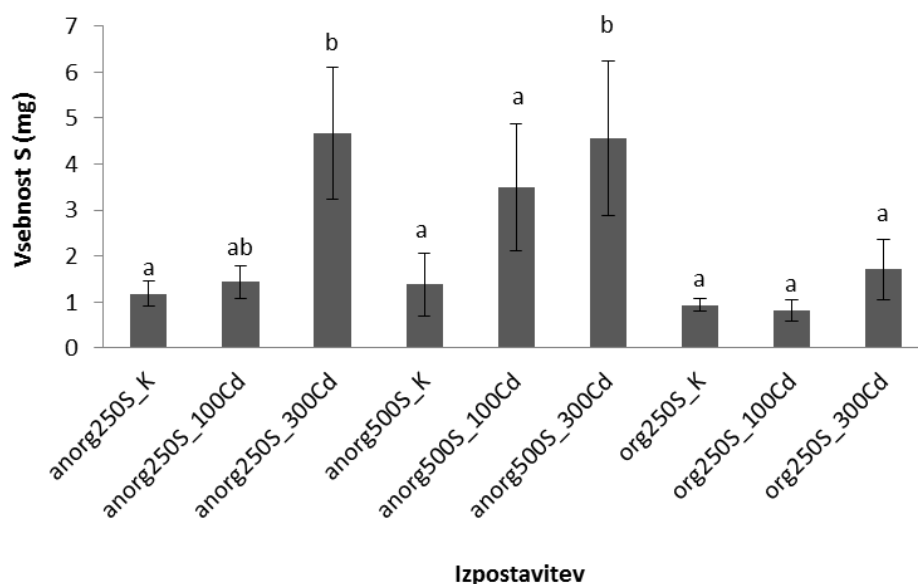
Rezultati faktorske ANOVE so pokazali, da Cd in S iz hidroponske tekočine statistično značilno vplivata na vsebnost S v poganjkih (Preglednica 23).

Povprečne vsebnosti S pri poganjkih so bile med 0,82 in 4,58 mg (Slika 18). Po vsebnosti S v poganjkih so izstopale rastline, ki so imele na voljo anorganski vir S in smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd. V primerjavi z ostalimi je bila vsebnost S pri njih največja. Rastline, ki so imele na voljo organski vir S, se med seboj statistično značilno niso razlikovale v vsebnosti S. Prav tako se med seboj niso razlikovale rastline vseh ostalih izpostavitvev (Slika 18).

Preglednica 23: Rezultati faktorske ANOVE za vsebnost S v poganjkih ranega mošnjaka

	SS	df	MS	F	p
Intercept	205,0532	1	205,0532	52,39197	<0,001
žveplo	27,4177	2	13,7088	3,50267	<0,05
kadmij	43,1291	2	21,5646	5,50984	<0,01
žveplo*kadmij	16,5766	4	4,1441	1,05884	ns
Napaka	129,1564	33	3,9138		

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: SS – vsota kvadratov, df – stopinje prostosti, MS – povprečje kvadratov, F – F-test, ns – statistično neznačilno



Povprečje $\pm$ standardna napaka, N = 3 do 5. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Duncanov test). Legenda: anorg500S – 500 μM MgSO_4 , anorg250S – 250 μM MgSO_4 , org250S – 250 μM MgSO_4 + 250 μM CYS, K – kontrola, 100Cd – 100 μM CdCl_2 , 300Cd – 300 μM CdCl_2

Slika 18: Vsebnost S v poganjkih ranega mošnjaka pri različnih izpostavitvah

4.5.2.6 Primerjava vsebnosti žvepla v koreninah in v poganjkih

Vsebnost S je bila v koreninah statistično značilno večja kot v poganjkih samo pri štirih izpostavitvah (Preglednica 24).

Preglednica 24: T-test za vsebnost S v koreninah in poganjkih pri ranem mošnjaku

Izpostavitve	VK (mg)	VP (mg)	t	p	n
anorg500S_K	1,51±1,13	1,38±1,18	4,51468	p<0,05	3
anorg500S_100Cd	6,46±5,34	3,49±3,08	2,2105	ns	5
anorg500S_300Cd	5,85±4,79	4,56±3,35	1,03438	ns	4
anorg250S_K	5,23±3,51	1,18±0,63	2,97954	p<0,05	5
anorg250S_100Cd	3,14±2,29	1,44±0,80	2,35895	ns	5
anorg250S_300Cd	4,87±3,51	4,67±3,19	0,955786	ns	5
org250S_K	4,40±2,11	0,93±0,33	3,95735	p<0,05	5
org250S_100Cd	5,50±3,75	0,82±0,52	3,19558	p<0,05	5
org250S_300Cd	3,19±2,44	1,71±1,45	2,08485	ns	5

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: t – rezultat t-testa, df – stopinje prostosti, n – število vzorcev, ns – statistično neznačilno, VK – vsebnost S v koreninah, VP – vsebnost S v poganjkih. Legenda izpostavitvev: anorg500S – 500 μM MgSO_4 , anorg250S – 250 μM MgSO_4 , org250S – 250 μM MgSO_4 + 250 μM CYS, K – kontrola, 100Cd – 100 μM CdCl_2 , 300Cd – 300 μM CdCl_2

4.5.2.7 Vpliv kadmija na ostale elemente

Koncentracija privzetega Cd v koreninah ($r=0,78$, $p<0,001$, $n=45$) in v poganjkih ($r=0,85$, $p<0,001$, $n = 45$) je bila v statistično značilni pozitivni korelaciji s koncentracijo privzetega S (Preglednica 25).

Koncentracija privzetega Cd v koreninah ($r=-0,6159$, $p<0,001$, $n=45$) je bila v statistično značilni negativni korelaciji s koncentracijo privzetega Fe (Preglednica 25).

Preglednica 25: Rezultati korelacij koncentracije Cd s koncentracijami ostalih elementov pri ranem mošnjaku

KORENINE					POGANJKI		
		r	p	n	r	p	n
Cd	S	0,7786	p<0,001	45	0,8517	p<0,01	45
Cd	Zn	0,2243	ns	45	0,296	p<0,05	45
Cd	Cu	0,2729	ns	45	0,2254	ns	45
Cd	Fe	-0,6159	p<0,001	45	-0,1005	ns	45
Cd	Mn	0,2495	ns	45	0,0139	ns	45
Cd	Ca	-0,018	ns	45	0,7474	p<0,01	45
Cd	K	0,7765	p<0,001	45	0,7897	p<0,01	45
Cd	Cl	0,0955	ns	45	0,7764	p<0,01	45

Z odebeljenimi črkami so označeni vzorci s statistično značilnim vplivom ($p < 0,05$). Simboli: r- Pearsonov koeficient korelacij, n – število vzorcev, ns - statistično neznačilno

4.6 ANALIZA GLAVNIH KOMPONENT

4.6.1 Korenine

V analizo glavnih komponent (PCA) so bile vključene povprečne vrednosti šestih meritev pri devetih izpostavitvah.

S pomočjo analize glavnih komponent smo na podlagi parametrov, ki smo jih spremljali posredno ali neposredno, ugotavljali podobnosti oz. razlike med posameznimi izpostavitvami. Funkcija 1 je pojasnila 59,7 % variance, Funkcija 2 pa 20,2 % variance, skupno sta pojasnili 79,9 % variance (Preglednica 26).

Rezultat analize glavnih komponent je bil razporeditev izpostavitv v tri skupine vzdolž primarne osi 1 (PC 1) glede na dodan kadmij (kontrola, 100 μ M in 300 μ M koncentracijo Cd) (Slika 19).

Pri koreninah so se vzdolž prve osi jasno oblikovale tri skupine glede na koncentracijo Cd. Razlike so pojasnjene predvsem na podlagi koncentracije (CdK) in vsebnosti Cd (VCd) ter koncentracije S (SK), ki so v pozitivni korelaciji s prvo osjo ter suho maso korenin (SMK), ki je v negativni korelaciji s prvo osjo. Vsebnost S (VSK) in koncentracija malondialdehida (MDAK) pa je v pozitivni korelaciji z drugo osjo (Preglednica 27).

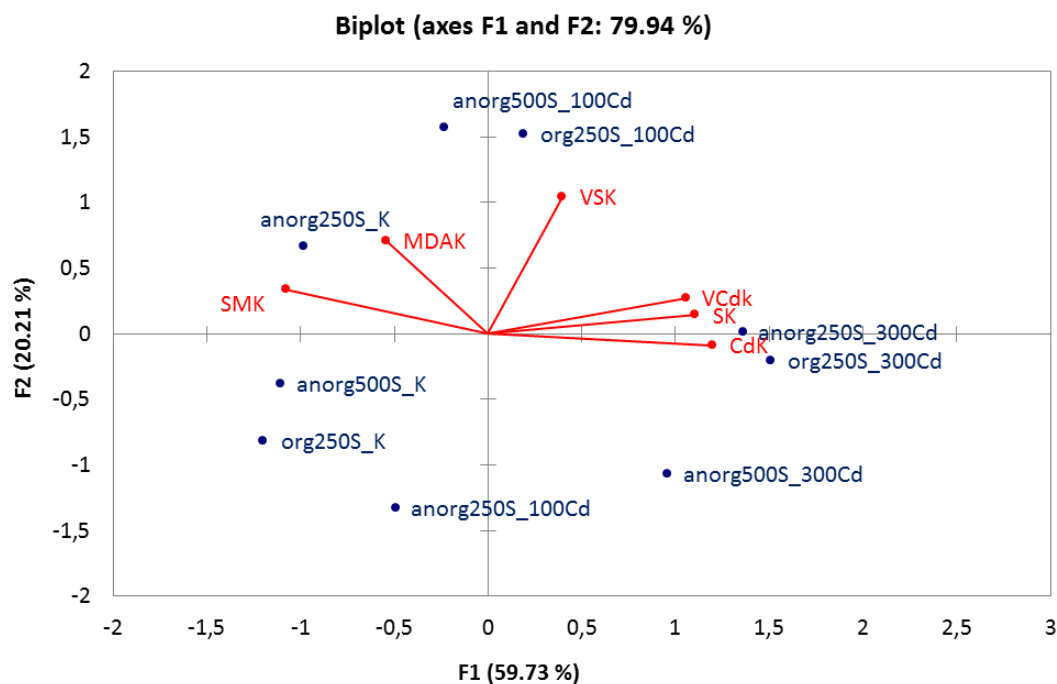
Preglednica 26: Rezultati analize glavnih komponent (PCA) šestih spremenljivk korenin ranega mošnjaka

Os	Funkcija 1	Funkcija 2
Lastna vrednost	3,584	1,213
Odstotek pojasnjene variance (%)	59,733	20,209
Kumulativni odstotek pojasnjene variance (%)	59,733	79,942

Preglednica 27: Korelacijski koeficienti med prvima dvema osemima analize glavnih komponent (PCA) in šestih spremenljivk korenin ranega mošnjaka

Merjene spremenljivke	Funkcija 1	Funkcija 2
SMK	-0,88	0,278
MDAK	-0,445	0,583
CdK	0,977	-0,071
SK	0,902	0,118
VCdk	0,86	0,224
VSK	0,322	0,852

Legenda: SMK – suha masa korenin, MDAK – koncentracija malondialdehida v koreninah, CdK – koncentracija Cd v koreninah, SK – koncentracija S v koreninah, VCdk – vsebnost Cd v koreninah, VSK – vsebnost S v koreninah



Z modro barvo so označeni različni parametri: SMK – suha masa korenin, MDAK – koncentracija malondialdehida v koreninah, CdK – koncentracija Cd v koreninah, SK – koncentracija S v koreninah VCdK – vsebnost Cd v koreninah, VSK – vsebnost S v koreninah

Z rdečo barvo so označene različne izpostavitve: anorg500S – 500 μM MgSO_4 , anorg250S – 250 μM MgSO_4 , org250S – 250 μM MgSO_4 + 250 μM CYS, K – kontrola, 100Cd – 100 μM CdCl_2 , 300Cd – 300 μM CdCl_2

Slika 19: Ordinacijski diagram analize glavnih komponent (PCA) korenin ranega mošnjaka

4.6.2 Poganjki

V analizo glavnih komponent (PCA) so bile vključene povprečne vrednosti dvanajstih meritev pri devetih izpostavitvah.

Funkcija 1 je pojasnila 70,99 %, Funkcija 2 pa 18,2 % variance, skupno pa sta pojasnili 89,2 % variance (Preglednica 28).

Izpostavitve s 300 μM koncentracijo Cd so se glede na prvo os ločile na anorganski in organski vir S. Kontrole so tvorile eno skupino na skrajni desni strani prve osi. Na sredini primarne osi skupino tvorijo rastline, ki smo jih izpostavili 100 μM koncentraciji Cd (Slika 20).

Razlike so pojasnjene predvsem na podlagi potencialne (F_v/F_m) in dejanske fotokemične učinkovitosti (Y), klorofila a (Chl_a), klorofila b (Chl_b), skupnih klorofilov ($SChl$), karotenoidov (Car) in koncentracije malondialdehida (MDAP), ki so v pozitivni korelaciji s prvo osjo ter na podlagi koncentracije S (SP), vsebnosti Cd (VCdP) in

vsebnosti S (VSP), ki so s prvo osjo v negativni korelaciji. Suha masa (SMP) pa je v pozitivni korelaciji z drugo osjo (Preglednica 29).

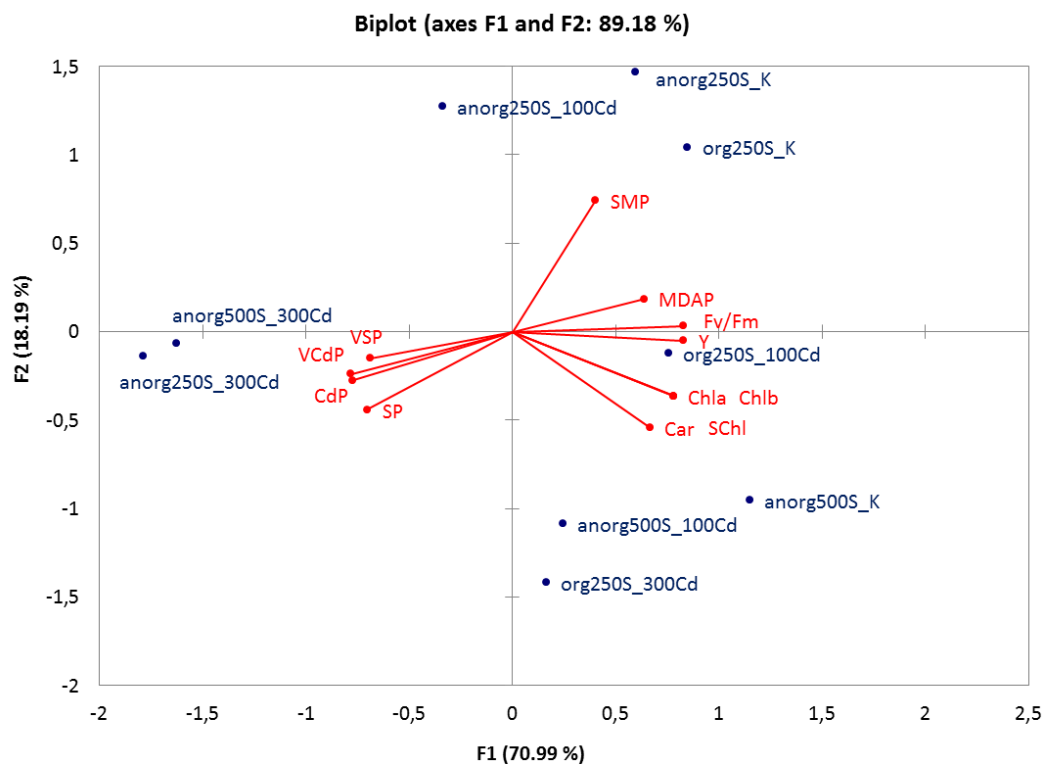
Preglednica 28: Rezultati analize glavnih komponent (PCA) šestih spremenljivk poganjkov ranega mošnjaka

Os	Funkcija 1	Funkcija 2
Lastna vrednost	8,519	2,182
Odstotek pojasnjene variance (%)	70,99	18,187
Kumulativni odstotek pojasnjene variance (%)	70,99	89,177

Preglednica 29: Korelacijski koeficienti med prvima dvema osema analize glavnih komponent (PCA) in dvanajstih spremenljivk poganjkov ranega mošnjaka

Merjene spremenljivke	Funkcija 1	Funkcija 2
SMP	0,465	0,857
Fv/Fm	0,953	0,036
Y	0,958	-0,058
Chla	0,900	-0,421
Chlb	0,901	-0,422
SChl	0,901	-0,421
Car	0,771	-0,629
MDAP	0,738	0,214
CdP	-0,892	-0,318
SP	-0,812	-0,511
VCdP	-0,903	-0,277
VSP	-0,796	-0,175

Legenda: SMP – suha masa poganjkov, Fv/Fm – potencialna fotokemična učinkovitost, Y – dejanska fotokemična učinkovitost, Chla – koncentracija klorofila *a*, Chlb – koncentracija klorofila *b*, SChl – skupna koncentracija klorofila *a* in *b*, Car – koncentracija karotenoidov, MDAP – koncentracija malondialdehida v poganjkih, CdP – koncentracija Cd v poganjkih, SP – koncentracija S v poganjkih, VCdP – vsebnost Cd v poganjkih, VSP – vsebnost S v poganjkih



Z modro barvo so označeni različni parametri: SMP – suha masa poganjkov, Fv/Fm – potencialna fotokemična aktivnost, Y – dejanska fotokemična aktivnost, Chla – klorofil *a*, Chlb – klorofil *b*, Car – karotenoidi, MDAP – koncentracija malondialdehida v poganjkih, CdP – koncentracija Cd v poganjkih, SP – koncentracija S v poganjkih, VCdP – vsebnost Cd v poganjkih, VSP – vsebnost S v poganjkih

Z rdečo barvo so označene različne izpostavitve: anorg500S – 500 μM MgSO_4 , anorg250S – 250 μM MgSO_4 , org250S – 250 μM MgSO_4 + 250 μM CYS, K – kontrola, 100Cd – 100 μM CdCl_2 , 300Cd – 300 μM CdCl_2

Slika 20: Ordinacijski diagram analize glavnih komponent (PCA) poganjkov ranega mošnjaka

4.7 PREGLED STATISTIČNO ZNAČILNIH VPLIVOV

Preglednica 30: Povzetek statistično značilnih vplivov factorske ANOVE za posamezne spremenljivke

Merjeni parametri		kadmij	žveplo	kadmij*žveplo
SUHA BIOMASA	K	*		
	P	*	*	
FOTOKEMIČNA UČINKOVITOST	potencialna	*	*	*
	dejanska	*	*	*
FS PIGMENTI	Chla	*	*	*
	Chlb	*	*	*
	karotenoidi		*	*
MDA	K	*	*	*
	P	*		
KADMIJ	konc. K	*	*	*
	konc. P	*	*	*
	TF za Cd		*	
	vsebnost K	*		
	vsebnost P	*		
ŽVEPLO	konc. K	*	*	*
	konc. P	*	*	
	vsebnost K			
	vsebnost P	*		

Statistično značilni vplivi so označeni z *. Simboli: K-korenine, P-poganjki, Chla – klorofil *a*, Chlb – klorofil *b*, konc. – koncentracija, TF – translokacijski oz. prenosni faktor, FS – fotosintenzni, MDA – malondialdehid

5 RAZPRAVA

5.1 SUHA BIOMASA POGANJKOV IN KORENIN

Različni viri poročajo, da Cd negativno vpliva na rast in biomaso rastlin (Iqbal in sod., 2010; Gomes in sod., 2013). Korenine so bolj občutljive na potencialno strupene kovine kot poganjki (Seregin in Ivanov, 2001), saj so prvi organ, ki pride v stik s kovino. Poleg tega se večina potencialno strupenih kovin kopiči ravno v koreninah. V našem primeru so korenine dosegle manjšo maso, vendar je za rani mošnjak to običajno.

Rezultati pri suhi biomasi rastlin so bili v našem primeru precej variabilni, na kar je vplival že sam izbor semen, ki so bila produkt naravnih populacij ranega mošnjaka iz onesnaženega območja in so zato že sama po sebi vsebovala nekaj Cd. Vsaka posamezna rastlina izrazi nekoliko drugačne fenotipske lastnosti, zato se drugače odzivajo tudi na potencialno strupene kovine kot je Cd. Da so rastline zelo variabilne smo opazili že v fazi sejank, ko so se prilagajale na hidroponski način rasti in so v enem mesecu, ko jih še nismo izpostavili Cd, dosegle različne velikosti. Glede na to, da smo imeli majhen nabor rastlin, ki smo jim določali maso po različnih izpostavitvah s Cd in S, bi lahko rezultate pripisali tudi dejstvu, da že na začetku nismo imeli enakomerno razporejenih enakomerno velikih rastlin.

Vpliv različnih koncentracij Cd na biomaso ranega mošnjaka so preučevali tudi Koren in sod. (2013). Ugotovili so, da se je masa rastlin ob dodatku 100 μM koncentracije Cd, povečala v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Da se ob dodatku Cd poveča masa, so pred tem ugotovili tudi Liu in sod. (2008) in Pongrac in sod. (2009). Liu in sod. (2008) so mnenja, da Cd, kadar je prisoten v velikih količinah, zamenja Zn, kar naj bi bil pri hiperakumulacijskih rastlinah razlog za povečevanje rasti. Koren in sod. (2013) pojasnjujejo, da lahko manjše koncentracije strupenih snovi kot so potencialno strupene kovine stimulirajo rast rastlin. Temu pojavu rečemo hormoneza, namen povečanja rasti pa je, da se strupena snov v rastlini razredči, njen strupen učinek pa se na tak način ublaži. V našem primeru se povprečna masa poganjkov ni povečala, je bila pa primerljiva z maso poganjkov pri kontrolnih rastlinah. V primerjavi s kontrolnimi rastlinami so upadle mase rastlin, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd, pri čemer ni bilo pomembno, kateri vir S so imele rastline na voljo. Pri 250 μM koncentraciji S je bil namreč upad biomase večji, kar pomeni, da pomanjkanje S poveča strupene učinke Cd. Velike koncentracije povzročijo zastrupitev in imajo tako negativen učinek na biomaso rastlin. Povečevanje mase rastlin ob izpostavitvi Cd bi lahko podprlo hipotezo o tem, da Cd spodbuja rast različnih ekotipov hiperakumulacijskih rastlin iz rodu *Noccaea*, čeprav je mehanizem še razmeroma nepoznan (Koren in sod. 2013).

Iqbal in sod. (2010) povezujejo katerikoli strupen učinek Cd na rast rastlin z delovanjem Cd na fotosintezne pigmente. V naši raziskavi tega nismo mogli potrditi, saj so bili rezultati mas poganjkov zelo variabilni. Smo pa pri biomasi poganjkov potrdili, da je rani mošnjak strpen do večjih koncentracij potencialno strupenih kovin, vendar samo do določene koncentracije, saj je bila pri 300 μM koncentraciji Cd v dveh primerih masa rastlin manjša kot pri kontrolnih rastlinah. Do podobne ugotovitve so prišli tudi Koren in sod. (2013).

5.2 FOTOKEMIČNA UČINKOVITOST FOTOSISTEMA II

Cd bodisi direktno bodisi indirektno vpliva na mnoge metabolne aktivnosti v različnih delih celice, še posebej v kloroplastih. Med drugim vpliva tudi na zmanjšanje fotokemične učinkovitosti fotosistema II (Li in sod. 2012). Zasede vezavna mesta drugih elementov v metaloproteinih (npr. Fe, Zn ali Ca), kritična je tudi zamenjava Mg v klorofilu (Zemanova in sod., 2015). Wodala in sod. (2012) izpostavljajo, da so na Cd zelo občutljivi proteini, ki sodelujejo pri elektronski prenašalni verigi.

Razmerje F_v/F_m pri vitalnih rastlinah, ki rastejo v ugodnih razmerah, dosega vrednosti do 0,83 in se zmanjša, kadar so rastline izpostavljene stresu. Dejanska fotokemična učinkovitost je malo manjša ali pa enaka potencialni. Ob izpostavljenosti stresu, se prav tako zmanjša (Murchie in Lawson, 2013). Vrednosti potencialne fotokemične učinkovitosti od 0,7 do 0,83 predstavljajo normalne vrednosti, kritične pa so tiste, ki padejo pod 0,6 (Ritchie, 2005).

V našem primeru so izmerjene vrednosti F_v/F_m in Y pri kontrolnih rastlinah nakazovale, da pri teh rastlinah ni prišlo do stresnega odziva. Pri rastlinah, ki so imele na voljo anorganski vir S, so se vrednosti potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti zmanjšale ob izpostavitvi 100 μM , še bolj pa ob izpostavitvi 300 μM koncentraciji Cd. Pri izpostavitvi 100 μM koncentraciji Cd so vrednosti potencialne fotokemične učinkovitosti padle le malo pod 0,7, kar nakazuje na to, da je prišlo le do manjših fotooksidativnih poškodb, medtem ko so bile vrednosti ob izpostavitvi 300 μM koncentraciji Cd okoli 0,3, kar nakazuje na večje poškodbe fotosistema II.

Pri rastlinah, ki so imele na voljo organski vir S, se vrednosti potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti fotosistema II pri izpostavitvah s 100 in 300 μM koncentracijo Cd nista razlikovali od kontrolnih rastlin. Nobena vrednost potencialne fotokemične učinkovitosti ni padla pod 0,7, kar pomeni, da pri teh rastlinah ni prišlo do fotooksidativne poškodbe fotosistema II. To bi lahko pripisali učinkovitejšemu mehanizmu razstrupljanja, k čemer je pripomogel cistein, ki so ga imele rastline na voljo kot organski vir S.

Pri primerjavi rezultatov fotokemične učinkovitosti fotosistema II in koncentracije Cd v poganjkih vidimo, da so vrednosti potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti v primeru, ko smo rastline izpostavili 100 ali 300 μM Cd in so imele hkrati na voljo anorganski vir S, padale. V primerih, ko smo rastline izpostavili 300 μM koncentraciji Cd, smo najmanjšo koncentracijo Cd izmerili pri rastlinah, ki so imele na voljo organski vir S, iz česar sklepamo, da je v tem primeru cistein zadržal Cd v koreninah. Podobno kot pri koncentracijah Cd, so bile tudi vsebnosti Cd v poganjkih pri skupini rastlin, ki so imele na voljo organski vir S, manjše v primerjavi s poganjki rastlin, ki so imele na voljo anorganski vir S. O primeru, ko S zadrži Cd v koreninah poročajo tudi Liang in sod. (2016).

5.3 FOTOSINTEZNI PIGMENTI

Cd zavira fotosintezne procese in razvoj kloroplastov. Negativno vpliva na organiziranost grana tilakoid in na sintezo klorofilov. Spremeni razporejenost in razmerje fotosinteznih pigmentov (Iqbal in sod., 2010; Tauqeer in sod. 2016).

V poskusu smo ugotovili, da se je pri izpostavitvi 300 μM koncentraciji Cd koncentracija klorofilov zmanjšala, ko so imele rastline na voljo anorganski vir S. V primeru, ko so imele rastline na voljo organski vir S, pa se njihova koncentracija klorofilov ni veliko zmanjšala v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Tako kot pri fotokemični učinkovitosti fotosistema II bi tudi v primeru klorofilov lahko sklepali, da je cistein, ki smo ga dodali kot organski vir S, pripomogel k ublažitvi stresa, ki ga je povzročil Cd. Če rezultate povežemo z vsebnostjo Cd v tej skupini rastlin, opazimo, da je bila vsebnost pri teh rastlinah manjša v primerjavi s tistimi, ki so imele na voljo anorganski vir S, zato v tej skupini rastlin ni prišlo do poškodb fotosinteznih pigmentov.

Naši rezultati so podobni rezultatom do katerih sta prišla Erdal in Turk (2016), ki sta preučevala učinek cisteina na koruzo, ko je bila ta pod stresom zaradi izpostavitve Cd. Vsebnost klorofilov je bila v primeru, ko so rastline izpostavili samo Cd, manjša kot pri kontrolnih rastlinah. V primeru, ko so jih izpostavili samo cisteinu, je bila vsebnost klorofilov nekoliko večja kot pri kontrolnih rastlinah in le nekoliko manjša, ko so jih izpostavili Cd in cisteinu skupaj.

Pongrac in sod. (2010) so v podobni raziskavi ugotovili, da se s povečevanjem koncentracije Cd v hidroponski tekočini pri ranem mošnjaku zmanjša koncentracija klorofilov. Zmanjšanje klorofilov je lahko ena od indikacij za neuspešno razstrupljanje, ki vodi v spremembe fizioloških procesov pri rastlinah. Po njihovem mnenju naj bi do zmanjšanja koncentracije klorofilov pri ranem mošnjaku prišlo zaradi zmanjšane privzema Fe^{2+} , saj naj bi do prenosa Cd prišlo preko IRT1 prenašalcev. Enako trdijo tudi Martinez-Alcala in sod. (2013) in dodajajo, da lahko na zmanjšanje klorofilov vpliva tudi manjša aktivnost encimov povezanih s sintezo klorofilov ali zamenjava Mg,

ki je del klorofilne molekule, s Cd. V našem primeru se je koncentracija klorofilov prav tako zmanjšala ob izpostavitvi rastlin večjim koncentracijam Cd, hkrati pa smo potrdili negativno korelacijo Cd z Fe^{2+} .

5.4 KONCENTRACIJA MDA KOT POKAZATELJ LIPIDNE PEROKSIDACIJE

Oksidativni stres je glavni odgovor rastlin na abiotški in biotski stres. Reaktivni kisikovi radikali lahko poškodujejo celično membrano, pri čemer pride do lipidne peroksidacije. Pokazatelj lipidne peroksidacije je malondialdehid (MDA), ki je sekundarni produkt lipidne peroksidacije.

Koncentracija MDA se povečuje z daljšo izpostavljenostjo rastlin Cd, kar so dokazali Li in sod. (2012) s poskusi na enoletnem pelinu (*Artemisia annua*) in Anjum in sod. (2015) s poskusi na koruzi. Tudi Lefevre in sod. (2016) so pri večjih koncentracijah Cd ali Zn v rastnem mediju izmerili večje koncentracije MDA v sicer na potencialno strupene kovine strpni rastlini *Zygophyllum fabago*. Razlike v primerjavi s kontrolnimi rastlinami v njihovem primeru niso bile zelo velike.

Hiperakumulacijske rastline kot je rani mošnjak lahko v svojih nadzemnih delih brez večjih posledic kopičijo večje koncentracije potencialno strupenih kovin kot rastline, ki niso sposobne prekomerno kopičiti potencialno strupenih kovin (Llugany in sod., 2016). Llugany in sod. (2016) predpostavljajo, da ima Cd pri ranem mošnjaku zaščitno vlogo pri biotskem stresu, saj je ta zelo občutljiv na glivna obolenja, kadar ni izpostavljen potencialno strupenim kovinam in nadaljujejo, da ob okužbi ranega mošnjaka z glivo, Cd sproži sintezo jasmonske kisline. Ta je pomembna signalna molekula, ki sproži sintezo genov povezanih z obrambo pri biotskem stresu. Zaključujejo, da je zato velika verjetnost, da Cd poleg direktne strupenosti, prispeva tudi k obrambi rastline pred infekcijskimi boleznimi, tako da spodbudi gene za sintezo jasmonske kisline.

Tauqeer in sod. (2016), ki so za svoj poskus izbrali hiperakumulacijsko rastlino *Alternanthera bettzickiana*, so izmerili večjo koncentracijo MDA v kontrolnih rastlinah kot pri tistih, ki so bile izpostavljene potencialno strupenim kovinam. Oksidativni stres se je zmanjšal z večanjem koncentracije potencialno strupenih kovin v gojitvenem mediju, kar ponovno nakazuje, da hiperakumulacijske rastline potrebujejo potencialno kovine za normalno delovanje.

Zanimivo je, da smo tudi v našem primeru največje koncentracije MDA pri poganjkih izmerili v kontrolnih rastlinah. Te niso bile izpostavljene Cd, so pa manjšo koncentracijo Cd vsebovala njihova semena, ki smo jih nabrali na območju, onesnaženim s potencialno strupenimi kovinami. Pri izpostavitvah rastlin 100 in 300 μM koncentraciji Cd, se je koncentracija MDA zmanjšala v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. To nakazuje na to, da se je v rastlinah ob dodanem Cd zmanjšala stopnja lipidne peroksidacije, s čimer bi se približali ugotovitvam

Llugany in sod. (2016) in Tauqeer in sod. (2016). Na podlagi teh rezultatov bi lahko sklepali, da rani mošnjak potrebuje določeno koncentracijo Cd za normalno delovanje. Če rezultate MDA primerjamo še z rezultati fotokemične učinkovitosti fotosistema II in koncentracijo klorofilov, lahko sklepamo, da ob izpostavitvi rastlin Cd ni prišlo do lipidne peroksidacije, ampak ravno obratno. Sklepamo, da do zmanjšanja vrednosti fotokemične učinkovitosti in koncentracij klorofilov ni prišlo zaradi lipidne peroksidacije, ampak najverjetneje zaradi zamenjava Fe in Ca vezavnih mest s Cd.

Tako kot Lefevre in sod. (2016) smo ugotovili, da so bili poganjki rastlin bolj podvrženi lipidni peroksidaciji kot korenine, saj so bile v poganjkih koncentracije MDA 10x večje kot pri koreninah. To naj bi nakazovalo na to, da imajo rastline zelo učinkovit sistem razstrupljanja.

5.5 KONCENTRACIJE IN VSEBNOSTI ELEMENTOV

5.5.1 Kadmij

Koncentracija Cd v rastlinah se je tako kot so že poročali v podobnih raziskavah (Koren in sod., 2013; Tauqeer in sod., 2016) povečevala z večjimi koncentracijami Cd v hidroponski raztopini. Manjše koncentracije Cd smo izmerili tudi pri kontrolnih rastlinah, saj so že semena sama po sebi vsebovala nekaj Cd, ker smo jih nabrali na območju onesnaženim s potencialno strupenimi kovinami. Rani mošnjak namreč kopiči potencialno strupene kovine tudi v semenih (Vogel-Mikuš in sod., 2007).

Ugotovili smo, da različni viri in koncentracije S niso imeli vpliva na koncentracijo Cd v rastlinah. Večjo koncentracijo pri izpostavitvah s 300 μM koncentracijo Cd lahko pripišemo manjši masi rastlin pri teh izpostavitvah. Glede na to, da je rani mošnjak hiperakumulacijska rastlina, smo pričakovali, da bomo v poganjkih izmerili večjo koncentracijo Cd kot v koreninah. Lefevre in sod. (2016) pojasnjujejo, da so pri višjih rastlinah korenine prve, ki so izpostavljene potencialno strupenim elementom, zato je pri njih koncentracija potencialno strupenih kovin večja kot v poganjkih. Tudi Seregin in Ivanov (2001) sta v svoji raziskavi ugotovila, da je koncentracija Cd večja v koreninah kot v poganjkih, kar je običajno za večino rastlinskih vrst. To pa ni značilno za hiperakumulacijske rastline, pri katerih se pričakovano potencialno strupene kovine kopičijo v nadzemnih delih. Tudi mi smo izmerili večjo koncentracijo Cd v koreninah kot v poganjkih, kar je posledica gojenja rastlin v hidroponski raztopini. V raztopini je bil skoraj ves Cd v ionski obliki (kot Cd^{2+}) in se je pospešeno vezal na površino korenin. Korenin pred analizami nismo desorbirali, ampak smo pustili intaktne. Sprali smo jih le z destilirano vodo. Pravo stanje nam zato razkrijejo vsebnosti, izračunane iz mase rastline in koncentracije Cd v tej rastlini. Povprečne vsebnosti Cd so bile pri vseh izpostavitvah večje pri poganjkih kot koreninah, statistično večje pa le v nekaterih

primerih. S tem smo deloma potrdili, da je rani mošnjak sposoben prekomerno kopičiti Cd v poganjkih.

Kot je bilo že omenjeno, je za hiperakumulacijske rastline značilno, da je razmerje koncentracije kovin med poganjki in koreninami (oz. TF) > 1 (Baker, 1989), zato smo TF izračunali tudi za naše rastline. Likar in sod. (2009) so med drugim v svoji raziskavi izračunali tudi TF za naravno populacijo ranega mošnjaka iz Žerjava, ki je v njihovem primeru znašal $6,61 \pm 0,87$. V našem poskusu prenosni faktor v nobenem primeru ni presegel vrednosti 1, kar pomeni, da je več Cd ostalo v koreninah. Prenosni faktor je pomemben faktor pri ugotavljanju, ali je rastlina primerna za fitoremediacijo ali ne. Z njim določimo, kolikšna je učinkovitost rastline pri prenosu kovine iz korenin v nadzemne dele (Li in sod., 2016). Glede na naše rezultate tega ne bi mogli potrditi. Na naše rezultate je vplivalo gojenje na hidroponiki. Korenine so bile namreč ves čas v stiku s hidroponsko tekočino in so se zato nanje pospešeno vezali Cd ioni.

5.5.2 Žveplo

O vplivu žveplove prehrane na privzem Cd pri hiperakumulacijskih rastlinah je le malo znanega. Nekaj dokazov priča o tem, da so tioli udeleženi v prenosu kovin. Eden od načinom naj bi bil direktni prenos kompleksa tiola in kovine, drugi način pa je indirektni prenos preko aktivacije prenašalnega sistema (Vadas in Ahner, 2009). Vadas in Ahner (2009) sta dokazala, da cistein poveča privzem kovin v korenine.

Znano je tudi, da ima S ključno vlogo pri ublažitvi stresa, ki ga v rastlini povzroči Cd, vendar celoten mehanizem še ni povsem raziskan (Liang in sod., 2016). Liang in sod. (2016) so dokazali, da se vsebnost glutationa v rastlini poveča ob dodajanju S rastlinam, ki so hkrati izpostavljene Cd. Sinteza glutationov je odvisna od asimilacije S. Sinteza glutationov in fitokelatinov pa pripomore k strpnosti rastlin na potencialno strupene kovine in hkrati tudi na akumulacijo te kovine v svojih tkivih.

Sinteza S spojin je energijsko potratna in zahteva ogromne količine S in N. Posledično imajo te rastline manjšo biomaso. Na in Salt (2011) sta zapisala, da se privzem sulfata in asimilacija S v koreninah poveča, ko so te izpostavljene potencialno strupenim kovinam. V nekaj raziskav so se celo osredotočili na vpliv cisteina ob izpostavitvi rastlin Cd (Khan in sod., 2015; Erdal in Turk, 2016) in ugotovili, da ta pripomore k zmanjšanju strupenega učinka Cd na fotosintezni aparat.

V našem poskusu smo ugotovili, da so se v koreninah koncentracije S povečevale z večjimi koncentracijami Cd v hranilni raztopini. V primeru poganjkov so bile razlike med izpostavitvami bolj zabrisane, vendar smo kljub temu lahko razbrali, da se je koncentracija S povečala pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd. Vsebnost S se tako pri koreninah kot tudi pri poganjkih statistično značilno ni razlikovala med različnimi izpostavitvami.

Zanimivo je, da različne oblike in koncentracije S niso vplivale na koncentracijo ali vsebnost S pri kontrolnih rastlinah. Iz tega sklepamo, da je ključna izpostavitve s Cd. To je v skladu z rezultati Schiavon in Malagoli (2008), ki sta zapisala, da s povečevanjem akumulacije potencialno strupene kovine, rastlina potrebuje vedno več aminokislin, še posebej cisteina, ki je prekurzor za fitokelatine in metalotionene.

Če primerjamo koncentracije S s suho biomaso, lahko opazimo, da so te pri izpostavitvah 300 μM koncentracijam Cd manjše, zato so koncentracija S pri teh rastlinah večje.

Primerjava rezultatov koncentracije S z rezultati fotokemične učinkovitosti in klorofilov *a* in *b* nam razkriva, da je Cd najverjetneje ostal v koreninah vezan v komplekse s cisteinom. Tako ni prišlo to strupenih učinkov Cd na fotosintezni aparat v poganjkih. To lahko potrdimo tudi z rezultati izračuna prenosnega faktorja, ki so bili manjši v primeru, ko so imele rastline na voljo organski vir S kot pri tistih, ki so imele na voljo anorganski vir S. Iz tega sklepamo, da ni prišlo do učinkovitega prenosa Cd iz korenin v poganjke. Do podobnih ugotovitev so v svoji raziskavi prišli tudi Liang in sod. (2016).

5.6 KORELACIJA KADMIJA Z OSTALIMI ELEMENTI

V večini primerov Cd omejuje privzem in prenos ostalih elementov v rastline, predvsem kationov K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} in Fe^{2+} ter anionov kot je NO_3^- (Seregin in Ivanov, 2001). Zemanova in sod. (2016) so ugotovili, da je Cd pri ranem mošnjaku negativno vplival na Ca, K, Na in Fe.

Cd tekmuje z ostalimi mineralnimi hranili za vezavna mesta v različnih delih celice kot so celična stena ali plazmalema. Cd, ki pride v liste preko Ca^{2+} kanalčkov do listov, poruši ravnovesje vode v celici, kar povzroči zapiranje listnih rež. Zato je transpiracijska stopnja manjša, kar posledično privede do inhibicije fotosinteze. V končni fazi to vodi v inhibicijo rasti in neravnovesje mikronutrientov v rastlini. Manjše koncentracije Mn, Fe, Mg, S in P, ko so rastline izpostavljene stresu, vodijo v zmanjšanje fotosinteze. Eden od razlogov inhibicije fotosinteze je tudi ta, da Cd inhibira aktivnost encimov, ki so udeleženi v Calvinovem ciklu in elektronski prenašalni verigi. Cd lahko vpliva tudi na prepustnost plazmaleme, kar lahko povzroči izhajanje elementov iz celice ali v celico (Nazar in sod., 2012).

V naši raziskavi smo potrdili pomembno negativno korelacijo Cd z Fe, iz česar sklepamo, da je Cd za prenos uporabil železove IRT1 prenašalce. Pomanjkanje Fe v celici pa bi bilo lahko povezano z upadom fotokemične učinkovitosti in zmanjšanjem koncentracije klorofilov. Fe je pomemben del encima, ki je nujen za sintezo 5-aminolevulininske kisline, ki je prekurzor klorofilov, poleg tega pa je del feredoksina, ki prenaša elektrone v elektronski prenašalni verigi in del kompleksa Fe-S, ki se nahaja v fotosistemu I (Hall in Williams, 2003).

Ker smo pri izpostavitvah uporabili Cd v obliki soli CdCl_2 , so se pri nekaterih izpostavitvah s povečevanjem koncentracije CdCl_2 v hranilni raztopini, povečevale tudi koncentracije in vsebnosti Cl^- .

5.7 ANALIZA GLAVNIH KOMPONENT

Analizo glavnih komponent smo naredili posebej za korenine in poganjke.

Izpostavitve pri koreninah rastlin, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd, so se grupirale predvsem na podlagi koncentracije Cd in S ter na podlagi vsebnosti Cd. Kontrolne rastline, ki so imele na voljo anorganski ali organski vir S so se v primeru korenin grupirale na podlagi suhe mase.

Pri poganjkih rastlin, ki so imele ob izpostavitvi 100 in 300 μM koncentraciji Cd, na voljo organski vir S, so se izrazili podobni fiziološki odzivi kot pri poganjkih rastlin iz kontrolnih skupin in kot poganjki rastlin, ki so imele ob izpostavitvi 100 μM koncentraciji Cd, na voljo anorganski vir S. Grupirale so se predvsem na podlagi fotokemične učinkovitosti fotosistema II, koncentracije klorofilov in koncentracije MDA.

Poganjki rastlin, ki so imele ob izpostavitvi 300 μM koncentraciji Cd na voljo le anorganski vir S, so se grupirali predvsem na podlagi koncentracije in vsebnosti Cd ter na podlagi koncentracije in vsebnosti S.

Iz teh ugotovitev sklepamo, da je cistein kot organski vir S ublažil stres ob izpostavitvi rastlin 100 in 300 μM koncentraciji Cd. V primeru, ko so imele rastlina na voljo anorganski vir S, je bila 100 μM koncentracija Cd manj strupena za rastline kot 300 μM koncentracija Cd. Ublažitev stresa je bila opazna v primeru fotokemične učinkovitosti fotosistema II in pri koncentraciji klorofilov *a* in *b*. Iz rezultatov koncentracije MDA sklepamo, da rani mošnjak potrebuje Cd za normalno delovanje celice, saj je bila koncentracija MDA največja pri kontrolnih rastlinah in se je zmanjšala ob dodajanju Cd.

6 SKLEPI

Glede na rezultate analiz spremljanih parametrov pri rastlinah, izpostavljenih različnim koncentracijam Cd, ob hkratnim različnim razpoložljivim virom S, smo prišli do naslednjih sklepov:

- Merjeni parametri so se spreminjali od izpostavitvi rastlin različnim koncentracijam Cd z izjemo pri rastlinah, ki so imele na voljo organski vir S.
- Suha masa korenin se pri različnih izpostavitvah ni spreminjala.
- Suha masa poganjkov se ob izpostavitvi 100 μM koncentraciji Cd ni spremenila v primerjavi z maso kontrolnih rastlin; pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentraciji Cd, pa je masa v dveh primerih v primerjavi s kontrolnimi rastlinami nekoliko upadla.
- Koncentracija MDA v poganjkih je bila največja pri kontrolnih rastlinah.
- Koncentracija Cd se je tako v poganjkih kot tudi v koreninah povečevala s koncentracijo CdCl_2 v hidroponski tekočini.
- Vrednosti TF niso presegle vrednosti 1 in se med različnimi izpostavitvami niso bistveno razlikovale.
- Koncentracija Cd je bila pri večini izpostavitvev večja v koreninah kot pri poganjkih.
- Koncentracija S je bila pri večini izpostavitvev večja v koreninah kot pri poganjkih.
- Koncentracije S so bile največje pri rastlinah, ki smo jih izpostavili 300 μM koncentracijam Cd.
- V poganjkih smo izmerili večjo vsebnost Cd kot pri koreninah.
- Cd je bil v negativni korelaciji z Fe^{2+} .
- Večja koncentracija anorganskega vira S (500 μM) v primerjavi z manjšo koncentracijo anorganskega vira žvepla (250 μM) ob izpostavitvi rastlin 100 ali 300 μM koncentraciji Cd ni pripomogla k ublažitvi stresa (fotokemična učinkovitost fotosistema II in fotosintezni pigmenti).
- Cistein kot organski vir S je pripomogel k ublažitvi strupenega učinka Cd, kar se je najbolj odražalo na ravni fotosinteznega aparata.

7 POVZETEK

Rani mošnjak (*Noccaea (Thlaspi) praecox* Wulfen) je modelna rastlina za preučevanje fiziologije hiperakumulacije potencialno strupenih kovin kot sta Cd in Zn. V Sloveniji raste na suhih travnikih od nižine do subalpinskega pasu, sposobnost hiperakumulacije pa imajo samo populacije, ki rastejo na s potencialno strupenimi kovinami onesnaženimi območjih Mežiške doline in na območju Lokovca na območju Banjske planote. Ugotovili so, da lahko največje količina Cd prekomerno kopiči populacija iz Žerjava iz Mežiške doline. V povezavi z ranim mošnjakom je bilo narejenih že kar nekaj raziskav, medtem ko vpliv S na privzem in strupenost Cd še ni bil dobro raziskan. V naši raziskavi smo preučili, kako anorganski oz. organski vir S različnih koncentracij vpliva na privzem Cd ter na fiziološki odziv ranega mošnjaka, ko je ta izpostavljen 100 ali 300 μM koncentraciji Cd.

Rezultati suhe mase korenin in poganjkov so bili zelo variabilni, zato nismo mogli niti potrditi niti ovreči vpliva Cd na maso pri ranem mošnjaku, ki je imel na voljo različne vire in koncentracije S. Iz rezultatov koncentracije MDA sklepamo, da pri ranem mošnjaku prihaja do lipidne peroksidacije kadar ta ni izpostavljen Cd. Po izpostavitvi Cd, se je koncentracija MDA v ranem mošnjaku zmanjšala.

Ugotovili smo, da je Cd negativno vplival na fotokemično učinkovitost fotosistema II in koncentracijo klorofilov *a* in *b*, ko so imele rastline na voljo le anorganski vir S. Sklepamo, da je Cd zasedel vezavna mesta za Fe^{2+} na IRT1 prenašalcih in preko njih prehajal v rastlino, kar je povzročilo pomanjkanje Fe v fotosinteznem aparatu in je zato prišlo do zmanjšanja fotokemične učinkovitosti fotosistema II in do zmanjšanja koncentracije klorofilov. Rezultati se v primeru, ko so imele rastline na voljo organski vir S, niso razlikovali od kontrol. Potrdili smo, da je imel cistein kot organski vir S pomembno vlogo pri ublažitvi strupenih učinkov Cd pri ranem mošnjaku. Cistein najverjetneje zadrži večino Cd v koreninah, pri čemer se zmanjša prenos v poganjke in tako ne pride do poškodb fotosinteznega aparata. Ranemu mošnjaku smo z dodajanjem organskega S v obliki cisteina povečali strpnost na Cd.

Izsledke naše raziskave bi lahko v prihodnje nadgradili in implementirali v prakso, saj je bilo že večkrat dokazano, da ima rani mošnjak potencial za uporabo v fitoremediaciji. Z nadaljnjimi raziskavami bi lahko preučili tvorbo kompleksov Cd s cisteinom ali drugimi ligandi, ki bi pripomogli k bolj učinkovitemu privzemanju Cd v rastlino. Poleg tega bi lahko naše ugotovitve uporabili in nadgradili pri rastlinah, ki so manj strpne do Cd. Z namenom preprečevanje erozije bi jih nato lahko zasadili na degradiranih območjih, ki so posledica onesnaženja s potencialno strupenimi kovinami.

8 VIRI

- Anjum S.A., Tanveer M., Hussain S., Bao M., Wang L., Khan I., Ullah E., Tung S.A., Samad R.A., Shahzad B. 2015. Cadmium toxicity in maize (*Zea mays* L.): consequences on antioxidative systems, reactive oxygen species and cadmium accumulation. *Environmental Science and Pollution Research*, 22: 17022-17030
- ARSO. 2016. Kazalci okolja v Sloveniji. Vnos kovin v človeško telo. http://kazalci.arso.gov.si/?data=indicator&ind_id=665&lang_id=302 (24.11.2016)
- Assuncao A.G.L., Martins P.D.C., Folter S.D., Vooijs R., Schat H., Aarts M.G.M. 2001. Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell and Environment*, 24: 217-226
- Baker A.J.M. 1981. Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*, 3: 643-654
- Baker A.J.M. 1987. Metal tolerance. *New Phytologist*, 106: 93-111
- Baker A.J.M. Brooks R.R. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, 1: 81-126
- Basic N., Keller C., Fontannillas P., Vittoz P., Besnard G., Galland N. 2006. Cadmium hyperaccumulation and reproductive traits in natural *Thlaspi caerulescens* populations. *Plant Biology*, 8: 64-72
- Bhargava A., Carmona F.F., Bhargava M., Srivastava S. 2012. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Journal of Environmental Management*, 105: 103-120
- Boominathan R., Doran P.M. 2003. Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnology and Bioengineering*, 83, 2: 158-167
- Brooks R.R., Lee J., Reeves R.D., Jaffre T. 1977. Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal of Geochemical Exploration*, 7: 49-57
- Challahan D.L., Baker A.J.M., Kolev S.D., Wedd A.G., 2006 Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11: 2-12

- Cosio C., Vollenweider P., Keller C. 2006. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.) I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 58: 64-74
- Davidian J.C., Kopriva S. 2010. Regulation of sulfate uptake and assimilation – the same or not the same? *Molecular Plant*, 3: 314-325
- Erdal S., Turk H. 2016. Cysteine-induced upregulation of nitrogen metabolism-related genes and enzyme activities enhance tolerance of maize seedlings to cadmium stress. *Environmental and Experimental Botany*, 132: 92-99
- Glušič M., Ropert P., Vogel-Mikuš K., Grdadolnik J. 2013. The binding sites of cadmium to a reduced form of glutathione. *Acta chimica Slovenica*, 60: 61-69
- Gomes M.P., Marques T.C.L.L.S.M., Soares A.M. 2013. Cadmium effects on mineral nutrition of the Cd-hyperaccumulator *Pfaffia glomerata*. *Biologia*, 68: 223-230
- Guerinot M.L. 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465: 190-198
- Hall J.L., Williams L.E. 2003. Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany*, 54, 393: 2601-2613
- Haydon M.J., Cobbett C.S. 2007. Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytologist*, 174: 499-506
- Hildebrandt U., Regvar M., Bothe H. 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 68: 139 – 146
- Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F., Prange R.K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207: 609-611
- Iqbal N., Khan N.A. 2010. Variation in growth, photosynthesis functions and yield of five mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars under high cadmium stress. *Plant Stress*, 4: 87-93
- Iqbal N., Khan N.A., Khan I.R., Nazar R., Masood A., Syeed S. 2012. Sulfur in the alleviation of cadmium-induced oxidative stress in plants. V: *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*. Ahmad P. and Prasad M.N.V. (ur.), Springer: 429-446
- Janžekovič F., Novak T. (2012). PCA – A Powerful method for analyze ecological niches. V: *Principal component analysis - multidisciplinary applications*. Dr. Parinya Sanguansat (ur.). Rijeka, InTech: 127-142

- Jez J.M., Raviliolus G.E., Herrman J. 2016. Structural biology and regulation of the plant sulfation pathway. *Chemico-Biological Interactions*, 259: 31-38
- Khan M.D., Mei L., Ali B., Chen Y., Cheng X., Zhu S.J., 2013. Cadmium-induced upregulation of lipid peroxidation and reactive oxygen species caused physiological, biochemical and ultrastructural changes in upland cotton seedlings. *BioMed Research International*, 2013: 374063 , doi: 10.1155/2013/374063: 10 str.
- Khan M.I.R., Iqbal N., Masood A., Mobin M., Anjum N.A., Khan N.A. 2016. Modulation and significance of nitrogen and sulfur metabolims in cadmium challenged plants. *Plant Growth Regulation*, 78, 1: 1-11
- Koren Š., Arčon I., Kump P., Nečemer M., Vogel-Mikuš K. 2013. Influence of CdCl₂ and CdSO₄ supplementation on Cd distribution and ligand environment in leaves of the Cd hyperaccumulator *Noccaea (Thlaspi) praecox*. *Plant and Soil*, 370, 1: 125-148
- Lefevre I., Vogel-Mikuš K., Arčon I., Lutts S. 2016. How do roots of the metal-resistant perennial bush *Zygophyllum fabago* cope with cadmium and zinc toxicities? *Plant and Soil*, 404, 1: 193-207
- Leitenmaier B., Küpper H. 2013. Compartmentation and complexation of metals in hyperaccumulator plants. *Frontiers in Plant Science*, 4: 1-13
- Li S., Chen J., Islam E., Wang Y., Wu J., Ye Z., Yan W., Peng W., Liu D. 2016. Cadmium-induced oxidative stress, response of antioxidants and detection of intracellular cadmium in organs of moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) seedlings. *Chemosphere*, 153: 107-114
- Li X., Zhao M.,Guo L., Huang L. 2012. Effects of cadmium on photosynthetic pigments, lipid peroxidation and artemisin in hydroponically grown *Artemisia annua*. *Journal of Environmenta Sciences*, 24, 8: 151-1518
- Liang T., Ding H., Wang G., Kang J., Pang H., Lv J. 2016. Sulfur decreases cadium translocation and enhances cadium tolerance by promoting sulfur assimilation and glutathione metabolism in *Brassica chinensis* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 124: 129-137
- Lichtenhaler H.K., Buschmann C., 2001. Extraction of photosynthetic tissues: chlorophyllsand carotenoids. V: *Current protocol in food analytical chemistry*. John Wiley New York, F4.2.1.-F.4.2.6.
- Likar M., P. Pongrac, K. Vogel-Mikuš & M. Regvar 2009. Molecular diversity and metal accumulation of different *Thlaspi praecox* populations from Slovenia. *Plant and Soil*, 330, 1-2: 195-205

- Liptakova L., Huttova J., Mistrik I., Tamas L. 2013. Enhanced lipoxygenase activity is involved in the stress response but not in the harmful lipid peroxidation and cell death of short term cadmium treated barley root tip. *Journal of Plant Physiology*, 170, 7: 646-652
- Liu M.Q., Yanai J., Jiang R.F., Zhang F., McGrath S.P., Zhao F.J. 2008. Does cadmium play a physiological role in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*? *Chemosphere*, 71, 7: 1276-1283
- Llugany M., Martin S.R., Barcelo J., Poschenrieder C. 2013. Endogenous jasmonic and salicylic acid levels in the Cd-hyperaccumulator *Noccea (Thlaspi) praecox* exposed to fungal infection and/or mechanical stress. *Plant Cell Reports*, 32: 1243-1249
- Lovy L., Latt D., Sterckeman T. 2013. Cadmium uptake and partitioning in the hyperaccumulator *Noccea caerulescens* exposed to constant Cd concentrations throughout complete growth cycles. *Plant Soil*, 365: 345-354
- Mahar A., Wang P., Ali A., Awasthi M.K., Lahori A.H., Wang Q., Li R., Zhang Z. 2016. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126: 111-121
- Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Turk B., Vreš B., Ravnik V., Frajman B., Strgulc Krajšek S., Trčak B., Bačič T., Fischer M.A., Eler K., Surina B. 2007. *Mala flora Slovenije, Ključ za določanje praprotnic in semenk*. 4. izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije, d.d.: 447 str.
- Martinez-Alcala I., Hernandez L.E., Estaban E., Walker D.J., Bernal M.P. 2013. Responses of *Noccea caerulescens* and *Lupinus albus* in trace elements-contaminated soils. *Plant Physiology and Biochemistry*, 66: 47-55
- Mendoza-Cozatl D., Loza-Tavera H., Hernandez-Navarro A., Moreno-Sanchez R. 2005. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 653-671
- Murchie E.H., Lawson T. 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new application. *Journal of Experimental Botany*: 1-16
- Na G., Salt D.E. 2011. The role of sulfur assimilation and sulfur-containing compounds in trace element homeostasis in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 72: 18-25
- Nazar R., Iqbal N., Masood A., Khan M.I.R., Syseed S., Khan N.A. 2012. Cadmium toxicity in plants and role of mineral nutrients in its alleviation. *American Journal of Plant Science*, 3: 1476-1489

- Nečemer M., Kump P., Ščančar J., Jačimović R., Simčič J., Pelicon P., Budnar M., Jeran Z., Pongrac P., Regvar M., Vogel-Mikuš K. 2008. Application of X-ray fluorescence analytical techniques in phytoremediation and plant biology studies. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 63, 11: 1240-1247
- Nečemer M., Kump P., Vogel-Mikuš K. 2011. Use of x-ray fluorescence-based analytical techniques in phytoremediation. V: *Handbook of phytoremediation*. Golubev I.A. (ur.). New York, Nova Science Publishers: 1-28
- Pishchnik V.N., Vorobyev N.I., Chernyaeva I.I., Timofeeva S.V., Kozhemyakov A.P., Alexeev Y.V., Lukin S.M. 2002. Experimental and mathematical simulation of plant growth promoting rhizobacteria and plant interaction under cadmium stress. *Plant and Soil*, 243: 173-186
- Pongrac P., Vogel-Mikuš K., Kump P., Nečemer M., Tolra R., Poschenrieder C., Barcelo J., Regvar M., 2007. Changes in elemental uptake and arbuscularmycorrhizal colonisation during life cycle of *Thlaspi praecox* Wulfen. *Chemosphere*, 69: 1602-1609
- Pongrac P., Vogel-Mikuš K., Poschenrieder C., Barcelo J., Tolra R., Regvar M. 2013. Arbuscular mycorrhiza in glucosinolate-containing plants: the story of the metal hyperaccumulator *Noccaea (Thlaspi) praecox* (Brassicaceae). V: *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*. Bruijn F.J. (ur.). Willey Online Library: 1023-1032
- Pongrac P., Vogel-Mikuš K., Vavpetič P., Tratnik J., Regvar M., Simčič J., Grlj N., Pelicon P. 2010. Cd induced redistribution of elements within leaves of the Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi praecox* as revealed by micro-PIXE. *Nuclear instruments and methods in physics research B: Beam interactions with materials and atoms*, 268 (11-12): 2205-2210
- Pongrac P., Zhao F., Razinger J., Zrimec A., Regvar M. 2009. Physiological responses to Cd and Zn in two Cd/Zn hyperaccumulating *Thlaspi* species. *Environmental and Experimental Botany*, 66: 479-486
- Pulford I.D., Watson C. 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees – a review. *Environment International*, 29: 529-540
- Quezada-Hinojosa R., Föllmi K.B., Gillet F., Matera V. 2015. Cadmium accumulation in six common plant species associated with soils containing high geogenic cadmium concentrations at Le Gurnigel, Swiss Jura Mountains. *Catena*, 124: 85-96
- Rascio N., Navari-Izzo F. 2010. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, 180: 169-181

- Rauscht T., Wachter A. 2005. Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends in Plant Science*, 10, 10: 503-509
- Ravanbakhsh M., Ronaghi A., Taghavi S.M., Jousset A. 2016. Screening for the next generation heavy metal hyperaccumulators for dryland decontamination. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4: 2350-2355
- Regvar M., Vogel-Mikuš K., Kugonič N., Turk B., Batič F. 2006. Vegetational and mycorrhizal successions at a metal polluted site: Indications for the direction of phytostabilisation? *Environmental Pollution*, 144: 974-984
- Ritchie G.A. 2005. Chlorophyll fluorescence: What is it and what do the numbers mean? V: *National Proceedings: forestand conservation nursery associations—2005*. Riley L.E., Dumroese R.K., Landis T.D. (ur.). Rocky mountin research station: 34-43
- Roberts T.L. 2014. Cadmium and phosphorous fertilizers: The issues and the Science. *Procedia Engineering*, 83: 52-59
- Roosens N., Verbruggen N., Meerts P., Ximenez-Embun P., Smith J.A.C. 2003. Natural variation in cadmium tolerance and its relationship to metal hyperaccumulation for seven population of *Thlaspi caerulescens* from western Europe. *Plant, Cell and Environment*, 26: 1657-1672
- Schiavon M., Malagoli M. 2008. Role of sulfate and S-rich compounds in heavy metal tolerance and accumulation. V: *Sulfur assimilation and abiotic stress in plants*. Khan N.A., Singht S., Umar S. (ur.). Springer Link: 253-269
- Seregin I.V. in Ivanov V.B. 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48, 4: 523-544
- Sharma R.K., Archana G. 2016. Cadmium minimization in food crops by cadmium resistant plant growth promoting rhizobacteria. *Applied Soil Ecology*, 107: 66-78
- Sheoran V., Sheoran A.S., Poonia P. 2016. Factors affecting phytoextraction. *Pedosphere*, 26, 2: 148-166
- Stritsis C., Claassen N. 2012. Cadmium uptake kinetics and plants factors of shoot Cd concentration. *Plant and Soil*, 367: 591-603
- Tauqeer H.M., Ali S., Rizwan M., Ali Q., Saeed R., Iftikhar U., Ahmad R., Farid M., Abbasi G.H. 2016. Phytoremediation of heavy metals by *Alternanthera bettzickiana*: Growth and physiologicigal response. *Ecotoxicology and Environmental Safetly*, 126: 138-146
- Tolra R., Pongrac P., Poschenrieder C., Vogel-Mikuš K., Regvar M., Barcelo J. 2006. Distinctive effects of cadmium on glucosinolate profiles in Cd hyperaccumulator

- Thlaspi praecox and non-hyperaccumulator Thlaspi arvense. Plant and Soil, 288: 333-341
- Ueno D., Koyama E., Yamaji N., Ma J.F. 2010. Physiological, genetic, and molecular characterization of high Cd accumulating rice cultivar, Jarjan. Journal of Experimental Botany, 62, 7: 2265-2272
- Vadas T.M., Ahner B. A. 2009. Cysteine- and glutathione-mediated uptake of lead and cadmium into Zea mays and Brassica napus roots. Environmental Pollution, 157, 8-9: 2558-2563
- Verbruggen N., Hermans C., Schat H. 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. New Phytologist, 181: 759-776
- Vogel-Mikuš K., Pongrac P., Kump P., Nečemer M., Regvar M. 2006. Colonisation of Zn, Cd and Pb hyperaccumulator Thlaspi praecox Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induced changes in heavy metal and nutrient uptake. Environmental Pollution, 139: 362-371
- Vogel-Mikuš K., Pongrac P., Kump P., Nečemer M., Simčič J., Pelicon P., Budnar M., Povh B., Regvar M. 2007. Localization and quantification of elements within seeds of Cd/Zn hyperaccumulator Thlaspi praecox by micro-PIXE. Environmental Pollution, 147: 50-59
- Vogel-Mikuš K., Regvar M., Mesjasz-Przybyłowicz J., Przybyłowicz W.J., Simčič J., Pelicon P., Budnar P. 2008. Spatial distribution of cadmium in leaves of metal hyperaccumulating Thlaspi praecox using micro-PIXE. New Phytologist, 179: 712-721
- Vogel-Mikuš, K., Drobne, D., Regvar, M., 2005. Zn Cd and Pb accumulation and arbuscularmycorrhizal colonisation of pennycress Thlaspi praecox Wulf. (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. Environmental Pollution, 133: 233-242
- Wodala B., Eitel G., Gyula T.N., Ordog A., Horvath F. 2012. Monitoring moderate Cu and Cd toxicity by chlorophyll fluorescence and P₇₀₀ absorbance in pea leaves. Photosynthetica, 50, 3: 380-386
- Wojcik M., Vangrosveld J., Tukiendorf A. 2005. Cadmium tolerance in Thlaspi caerulescens I. Growth parameters, metal accumulation and phytochelatin synthesis in response to cadmium. Environmental and Experimental Botany, 53: 151-161

- Yang X., Feng Y., He Z., Stoffella P.J. 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18: 339-353
- Zemanova V., Pavlik M., Kyjakova P., Pavlikova D. 2015. Fatty acid profiles of ecotypes of hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* growing under cadmium stress. *Journal of Plant Physiology*, 180: 27-34
- Zemanova V., Pavlik M., Pavlikova D., Hnilička F., Vondračková S. 2016. Responses to Cd stress in two *Noccaea* species (*Noccaea praecox* and *Noccaea caerulescens*) originating from two contaminated sites in Mežica, Slovenia and Redlschlag, Austria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 70: 464 – 474
- Zhao F.J., Hamon R.E., Lombi E., McLaughlin M.J., McGrath S.P. 2002. Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany*, 53, 368: 535-543
- Zupan M., Grčman H., Lobnik F. 2008. Raziskave onesnaženosti tal Slovenije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Center za pedologijo in varstvo okolja: 63 str.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Katarini Vogel-Mikuš za pomoč pri zasnovi eksperimentalnega dela naloge, za gradivo, napotke in usmerjanje pri pisanju naloge.

Prof. dr. Alenki Gaberščik se zahvaljujem za hitro recenzijo naloge in koristne komentarje.

Prav tako se zahvaljujem vsem sodelavcem na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin za prijetno vzdušje in vso pomoč med laboratorijsko izvedbo magistrske naloge.

Posebna zahvala pa gre mojemu najljubšemu biologu, Marijanu Govediču, za pomoč pri statistični obdelavi in interpretaciji rezultatov ter spodbudo in motiviranje pri pisanju naloge.

PRILOGA A

Izmerjene suhe mase ranega mošnjaka [g]

KORENINE		POGANJKI	
Izpostavitev	Suha masa (g)	Izpostavitev	Suha masa (g)
anorg500S_K	0,1	anorg500S_K	0,221
anorg500S_K	0,175	anorg500S_K	0,194
anorg500S_K	0,131	anorg500S_K	0,279
anorg500S_K	0,02	anorg500S_K	0,009
anorg500S_K	0,005	anorg500S_K	0,448
anorg500S_K	0,145	anorg500S_K	0,119
anorg500S_K	0,042	anorg500S_K	0,031
anorg500S_K	0,141	anorg500S_K	0,057
anorg500S_K	0,007	anorg500S_100Cd	0,254
anorg500S_K	0,054	anorg500S_100Cd	0,006
anorg500S_100Cd	0,123	anorg500S_100Cd	0,129
anorg500S_100Cd	0,003	anorg500S_100Cd	0,512
anorg500S_100Cd	0,046	anorg500S_100Cd	0,059
anorg500S_100Cd	0,297	anorg500S_100Cd	0,067
anorg500S_100Cd	0,17	anorg500S_100Cd	0,031
anorg500S_100Cd	0,093	anorg500S_300Cd	0,218
anorg500S_100Cd	0,013	anorg500S_300Cd	0,058
anorg500S_300Cd	0,135	anorg500S_300Cd	0,04
anorg500S_300Cd	0,067	anorg500S_300Cd	0,223
anorg500S_300Cd	0,017	anorg500S_300Cd	0,019
anorg500S_300Cd	0,005	anorg500S_300Cd	0,016
anorg500S_300Cd	0,077	anorg500S_300Cd	0,043
anorg500S_300Cd	0,055	anorg250S_K	1,167
anorg500S_300Cd	0,006	anorg250S_K	0,523
anorg500S_300Cd	0,003	anorg250S_K	0,294
anorg250S_K	0,095	anorg250S_K	0,032
anorg250S_K	0,131	anorg250S_K	0,013
anorg250S_K	0,073	anorg250S_K	1,279
anorg250S_K	0,011	anorg250S_K	0,409
anorg250S_K	0,135	anorg250S_K	0,562
anorg250S_K	0,151	anorg250S_K	0,019
anorg250S_100Cd	0,133	anorg250S_100Cd	0,713
anorg250S_100Cd	0,076	anorg250S_100Cd	0,42
anorg250S_100Cd	0,052	anorg250S_100Cd	0,362
anorg250S_100Cd	0,189	anorg250S_100Cd	0,151
anorg250S_100Cd	0,071	anorg250S_100Cd	0,819
anorg250S_100Cd	0,075	anorg250S_100Cd	0,73

KORENINE		POGANJKI	
Izpostavitev	Suha masa (g)	Izpostavitev	Suha masa (g)
anorg250S_100Cd	0,02	anorg250S_100Cd	0,258
anorg250S_300Cd	0,093	anorg250S_100Cd	0,057
anorg250S_300Cd	0,082	anorg250S_300Cd	0,354
anorg250S_300Cd	0,133	anorg250S_300Cd	0,39
anorg250S_300Cd	0,016	anorg250S_300Cd	0,091
anorg250S_300Cd	0,032	anorg250S_300Cd	0,042
anorg250S_300Cd	0,014	anorg250S_300Cd	0,112
anorg250S_300Cd	0,007	anorg250S_300Cd	0,025
org250S_K	0,061	anorg250S_300Cd	0,018
org250S_K	0,099	org250S_K	0,537
org250S_K	0,006	org250S_K	0,528
org250S_K	0,213	org250S_K	0,585
org250S_K	0,21	org250S_K	0,042
org250S_K	0,005	org250S_K	0,996
org250S_100Cd	0,075	org250S_K	0,808
org250S_100Cd	0,101	org250S_K	0,024
org250S_100Cd	0,013	org250S_100Cd	0,273
org250S_100Cd	0,116	org250S_100Cd	0,466
org250S_100Cd	0,081	org250S_100Cd	0,023
org250S_100Cd	0,045	org250S_100Cd	1,05
org250S_300Cd	0,071	org250S_100Cd	0,197
org250S_300Cd	0,035	org250S_100Cd	0,014
org250S_300Cd	0,007	org250S_300Cd	0,236
org250S_300Cd	0,018	org250S_300Cd	0,237
org250S_300Cd	0,08	org250S_300Cd	0,04
org250S_300Cd	0,065	org250S_300Cd	0,025
org250S_300Cd	0,012	org250S_300Cd	0,032
org250S_300Cd	0,012	org250S_300Cd	0,287
org250S_300Cd	0,006	org250S_300Cd	0,285
		org250S_300Cd	0,026
		org250S_300Cd	0,036
		org250S_300Cd	0,008

PRILOGA B

Meritve fotokemične učinkovitosti fotosistema II [relativne enote] pri ranem mošnjaku

Izpostavitev	Fv/Fm	Izpostavitev	Y
anorg500S_K	0,809	anorg500S_K	0,746
anorg500S_K	0,818	anorg500S_K	0,76
anorg500S_K	0,818	anorg500S_K	0,768
anorg500S_K	0,815	anorg500S_K	0,782
anorg500S_K	0,811	anorg500S_K	0,764
anorg500S_K	0,81	anorg500S_K	0,757
anorg500S_K	0,811	anorg500S_K	0,788
anorg500S_K	0,797	anorg500S_K	0,755
anorg500S_K	0,823	anorg500S_K	0,744
anorg500S_K	0,821	anorg500S_K	0,806
anorg500S_K	0,81	anorg500S_K	0,741
anorg500S_K	0,814	anorg500S_K	0,745
anorg500S_K	0,806	anorg500S_K	0,751
anorg500S_K	0,809	anorg500S_K	0,746
anorg500S_K	0,818	anorg500S_K	0,79
anorg500S_K	0,809	anorg500S_K	0,735
anorg500S_K	0,809	anorg500S_K	0,774
anorg500S_100Cd	0,734	anorg500S_K	0,761
anorg500S_100Cd	0,817	anorg500S_K	0,764
anorg500S_100Cd	0,662	anorg500S_K	0,784
anorg500S_100Cd	0,812	anorg500S_100Cd	0,578
anorg500S_100Cd	0,416	anorg500S_100Cd	0,753
anorg500S_100Cd	0,787	anorg500S_100Cd	0,781
anorg500S_100Cd	0,799	anorg500S_100Cd	0,781
anorg500S_100Cd	0,492	anorg500S_100Cd	0,661
anorg500S_100Cd	0,799	anorg500S_100Cd	0,659
anorg500S_100Cd	0,566	anorg500S_100Cd	0,767
anorg500S_100Cd	0,794	anorg500S_100Cd	0,771
anorg500S_100Cd	0,729	anorg500S_100Cd	0,395
anorg500S_100Cd	0,653	anorg500S_100Cd	0,354
anorg500S_100Cd	0,575	anorg500S_100Cd	0,743
anorg500S_100Cd	0,776	anorg500S_100Cd	0,522
anorg500S_100Cd	0,783	anorg500S_100Cd	0,597
anorg500S_100Cd	0,718	anorg500S_100Cd	0,775
anorg500S_100Cd	0,578	anorg500S_100Cd	0,726
anorg500S_300Cd	0,322	anorg500S_100Cd	0,539
anorg500S_300Cd	0,282	anorg500S_100Cd	0,492
anorg500S_300Cd	0,168	anorg500S_100Cd	0,691

Izpostavitev	Fv/Fm	Izpostavitev	Y
anorg500S_300Cd	0,099	anorg500S_300Cd	0,345
anorg500S_300Cd	0,278	anorg500S_300Cd	0,238
anorg500S_300Cd	0,13	anorg500S_300Cd	0,174
anorg500S_300Cd	0,087	anorg500S_300Cd	0,174
anorg500S_300Cd	0,124	anorg500S_300Cd	0,346
anorg500S_300Cd	0,251	anorg500S_300Cd	0,2
anorg500S_300Cd	0,358	anorg500S_300Cd	0,248
anorg500S_300Cd	0,32	anorg500S_300Cd	0,147
anorg500S_300Cd	0,592	anorg500S_300Cd	0,286
anorg500S_300Cd	0,439	anorg500S_300Cd	0,38
anorg500S_300Cd	0,339	anorg500S_300Cd	0,261
anorg500S_300Cd	0,747	anorg500S_300Cd	0,22
anorg500S_300Cd	0,523	anorg500S_300Cd	0,189
anorg250S_K	0,79	anorg500S_300Cd	0,545
anorg250S_K	0,805	anorg500S_300Cd	0,248
anorg250S_K	0,796	anorg250S_K	0,717
anorg250S_K	0,813	anorg250S_K	0,754
anorg250S_K	0,766	anorg250S_K	0,785
anorg250S_K	0,782	anorg250S_K	0,759
anorg250S_K	0,816	anorg250S_K	0,737
anorg250S_K	0,806	anorg250S_K	0,75
anorg250S_K	0,758	anorg250S_K	0,747
anorg250S_K	0,805	anorg250S_K	0,774
anorg250S_K	0,803	anorg250S_K	0,726
anorg250S_K	0,789	anorg250S_K	0,75
anorg250S_K	0,766	anorg250S_K	0,757
anorg250S_K	0,775	anorg250S_K	0,768
anorg250S_K	0,806	anorg250S_K	0,735
anorg250S_K	0,812	anorg250S_K	0,774
anorg250S_100Cd	0,818	anorg250S_K	0,768
anorg250S_100Cd	0,434	anorg250S_K	0,775
anorg250S_100Cd	0,812	anorg250S_100Cd	0,362
anorg250S_100Cd	0,746	anorg250S_100Cd	0,627
anorg250S_100Cd	0,805	anorg250S_100Cd	0,625
anorg250S_100Cd	0,381	anorg250S_100Cd	0,275
anorg250S_100Cd	0,814	anorg250S_100Cd	0,467
anorg250S_100Cd	0,584	anorg250S_100Cd	0,593
anorg250S_100Cd	0,637	anorg250S_100Cd	0,601
anorg250S_100Cd	0,72	anorg250S_100Cd	0,165
anorg250S_100Cd	0,833	anorg250S_100Cd	0,432
anorg250S_100Cd	0,497	anorg250S_100Cd	0,731
anorg250S_100Cd	0,759	anorg250S_100Cd	0,284

Izpostavitev	Fv/Fm	Izpostavitev	Y
anorg250S_100Cd	0,765	anorg250S_100Cd	0,68
anorg250S_100Cd	0,828	anorg250S_100Cd	0,38
anorg250S_100Cd	0,71	anorg250S_100Cd	0,733
anorg250S_300Cd	0,352	anorg250S_100Cd	0,553
anorg250S_300Cd	0,277	anorg250S_100Cd	0,682
anorg250S_300Cd	0,383	anorg250S_300Cd	0,332
anorg250S_300Cd	0,304	anorg250S_300Cd	0,135
anorg250S_300Cd	0,529	anorg250S_300Cd	0,342
anorg250S_300Cd	0,275	anorg250S_300Cd	0,227
anorg250S_300Cd	0,469	anorg250S_300Cd	0,237
anorg250S_300Cd	0,289	anorg250S_300Cd	0,268
anorg250S_300Cd	0,59	anorg250S_300Cd	0,464
anorg250S_300Cd	0,246	anorg250S_300Cd	0,425
anorg250S_300Cd	0,491	anorg250S_300Cd	0,54
org250S_K	0,792	anorg250S_300Cd	0,204
org250S_K	0,824	anorg250S_300Cd	0,466
org250S_K	0,8	org250S_K	0,755
org250S_K	0,826	org250S_K	0,755
org250S_K	0,797	org250S_K	0,765
org250S_K	0,816	org250S_K	0,763
org250S_K	0,803	org250S_K	0,753
org250S_K	0,81	org250S_K	0,774
org250S_K	0,813	org250S_K	0,778
org250S_K	0,801	org250S_K	0,748
org250S_K	0,802	org250S_K	0,758
org250S_K	0,809	org250S_K	0,746
org250S_K	0,787	org250S_K	0,779
org250S_K	0,809	org250S_K	0,772
org250S_K	0,796	org250S_K	0,752
org250S_K	0,815	org250S_K	0,756
org250S_100Cd	0,808	org250S_100Cd	0,756
org250S_100Cd	0,803	org250S_100Cd	0,747
org250S_100Cd	0,814	org250S_100Cd	0,771
org250S_100Cd	0,799	org250S_100Cd	0,744
org250S_100Cd	0,796	org250S_100Cd	0,605
org250S_100Cd	0,812	org250S_100Cd	0,719
org250S_100Cd	0,766	org250S_100Cd	0,724
org250S_100Cd	0,811	org250S_100Cd	0,754
org250S_100Cd	0,794	org250S_100Cd	0,699
org250S_100Cd	0,8	org250S_100Cd	0,625
org250S_100Cd	0,758	org250S_100Cd	0,74
org250S_100Cd	0,756	org250S_100Cd	0,676

Izpostavitev	Fv/Fm	Izpostavitev	Y
org250S_300Cd	0,784	org250S_100Cd	0,686
org250S_300Cd	0,803	org250S_100Cd	0,691
org250S_300Cd	0,81	org250S_300Cd	0,743
org250S_300Cd	0,813	org250S_300Cd	0,752
org250S_300Cd	0,799	org250S_300Cd	0,737
org250S_300Cd	0,8	org250S_300Cd	0,767
org250S_300Cd	0,813	org250S_300Cd	0,756
org250S_300Cd	0,796	org250S_300Cd	0,76
org250S_300Cd	0,785	org250S_300Cd	0,76
org250S_300Cd	0,804	org250S_300Cd	0,757
org250S_300Cd	0,799	org250S_300Cd	0,746
org250S_300Cd	0,8	org250S_300Cd	0,754
		org250S_300Cd	0,778
		org250S_300Cd	0,772

PRILOGA C

Meritve fotosinteznih pigmentov [mg/g SVM] pri ranem mošnjaku

Izpostavitev	Klorofil a	Klorofil b	Karotenoidi
anorg500S_K	4,222	1,635	0,946
anorg500S_K	4,025	1,570	0,857
anorg500S_K	3,470	1,315	0,762
anorg500S_K	3,205	1,215	0,720
anorg500S_K	4,946	2,040	1,048
anorg500S_100Cd	3,880	1,603	0,897
anorg500S_100Cd	2,811	1,074	0,686
anorg500S_100Cd	3,319	1,221	0,764
anorg500S_100Cd	3,924	1,581	0,831
anorg500S_100Cd	3,384	1,317	0,805
anorg500S_300Cd	1,959	0,810	0,542
anorg500S_300Cd	2,668	1,106	0,752
anorg500S_300Cd	1,125	0,305	0,212
anorg500S_300Cd	1,853	0,701	0,535
anorg500S_300Cd	1,262	0,529	0,398
anorg250S_K	1,853	0,746	0,448
anorg250S_K	3,317	1,319	0,723
anorg250S_K	2,073	0,902	0,471
anorg250S_K	2,900	1,164	0,641
anorg250S_K	3,313	1,264	0,731
anorg250S_100Cd	2,135	0,820	0,542

Izpostavitev	Klorofil a	Klorofil b	Karotenoidi
anorg250S_100Cd	2,517	0,970	0,554
anorg250S_100Cd	2,097	0,814	0,512
anorg250S_100Cd	1,276	0,485	0,346
anorg250S_100Cd	3,620	1,444	0,830
anorg250S_300Cd	1,416	0,372	0,256
anorg250S_300Cd	2,207	0,832	0,589
anorg250S_300Cd	1,938	0,778	0,541
anorg250S_300Cd	1,286	0,526	0,469
anorg250S_300Cd	1,811	0,774	0,477
org250S_K	2,841	1,077	0,644
org250S_K	2,822	1,137	0,644
org250S_K	3,784	1,415	0,824
org250S_K	2,883	1,168	0,640
org250S_K	3,247	1,287	0,720
org250S_100Cd	2,521	1,111	0,547
org250S_100Cd	4,812	1,912	1,007
org250S_100Cd	2,639	0,969	0,609
org250S_100Cd	2,581	1,078	0,606
org250S_100Cd	4,848	2,028	1,064
org250S_300Cd	2,632	1,088	0,603
org250S_300Cd	3,574	1,430	0,864
org250S_300Cd	3,529	1,448	0,848
org250S_300Cd	4,465	1,901	1,058
org250S_300Cd	3,158	1,260	0,776

PRILOGA D

Izmerjena koncentracija MDA v koreninah in poganjkih ranega mošnjaka [nmolMDA/gSVM]

KORENINE		POGANJKI	
Izpostavitev	MDA	Izpostavitev	MDA
anorg500S_K	5,000	anorg500S_K	24,274
anorg500S_K	3,548	anorg500S_K	48,629
anorg500S_K	4,839	anorg500S_K	23,387
anorg500S_K	3,548	anorg500S_K	44,758
anorg500S_K	4,194	anorg500S_K	28,065
anorg500S_100Cd	3,468	anorg500S_100Cd	17,903
anorg500S_100Cd	2,339	anorg500S_100Cd	16,532
anorg500S_100Cd	4,758	anorg500S_100Cd	32,581
anorg500S_100Cd	2,419	anorg500S_100Cd	26,371
anorg500S_100Cd	3,468	anorg500S_300Cd	25,645
anorg500S_300Cd	2,903	anorg500S_300Cd	12,823
anorg500S_300Cd	3,226	anorg500S_300Cd	33,226
anorg500S_300Cd	2,177	anorg500S_300Cd	18,629
anorg500S_300Cd	1,935	anorg500S_300Cd	19,032
anorg500S_300Cd	1,774	anorg250S_K	25,242
anorg250S_K	4,032	anorg250S_K	46,774
anorg250S_K	3,629	anorg250S_K	46,935
anorg250S_K	3,226	anorg250S_K	23,790
anorg250S_K	3,629	anorg250S_100Cd	17,661
anorg250S_100Cd	2,419	anorg250S_100Cd	22,661
anorg250S_100Cd	1,774	anorg250S_100Cd	10,081
anorg250S_100Cd	2,581	anorg250S_100Cd	8,306
anorg250S_100Cd	2,177	anorg250S_300Cd	9,435
anorg250S_300Cd	0,484	anorg250S_300Cd	10,806
anorg250S_300Cd	1,129	anorg250S_300Cd	9,758
anorg250S_300Cd	2,500	anorg250S_300Cd	20,484
anorg250S_300Cd	2,661	anorg250S_300Cd	16,210
anorg250S_300Cd	3,710	org250S_K	44,355
org250S_K	4,919	org250S_K	42,016
org250S_K	2,823	org250S_K	23,065
org250S_K	3,468	org250S_K	25,323
org250S_K	2,903	org250S_100Cd	28,710
org250S_K	4,032	org250S_100Cd	25,565
org250S_100Cd	7,581	org250S_100Cd	17,984
org250S_100Cd	7,581	org250S_100Cd	16,210
org250S_100Cd	5,323	org250S_100Cd	38,387

KORENINE		POGANJKI	
org250S_100Cd	5,323	org250S_300Cd	27,581
org250S_100Cd	4,113	org250S_300Cd	18,548
org250S_300Cd	1,129	org250S_300Cd	11,290
org250S_300Cd	0,565		
org250S_300Cd	2,500		
org250S_300Cd	2,742		
org250S_300Cd	4,355		

PRILOGA E

Koncentracija elementov v koreninah ranega mošnjaka [mg/kg SM]

Izpostavitve	S	Cl	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Cd
anorg500S_K	6350	1440	32800	6580	65,5	4150	34,7	876	29,7
anorg500S_K	5270	1480	30800	7350	81,1	5200	57,2	825	37,3
anorg500S_K	5320	996	27500	4210	36,2	2650	28,8	619	19,7
anorg500S_K	6270	1100	27500	6050	33	2400	37,6	923	13,6
anorg500S_K	5920	981	26300	5940	46,5	4600	44,3	549	21,8
anorg500S_100Cd	7230	2320	26600	6200	55	3100	114	1190	3210
anorg500S_100Cd	9050	1640	25300	6210	44,7	7400	144	1050	4630
anorg500S_100Cd	11100	2960	41000	6390	126	5200	42,8	1770	5090
anorg500S_100Cd	10400	3130	34300	8730	195	9050	113	7410	4330
anorg500S_100Cd	9390	2100	34000	7710	62	6090	145	1280	3780
anorg500S_300Cd	11100	4690	32400	4320	39,8	5860	34,8	1290	15100
anorg500S_300Cd	15800	7720	49400	6010	75,8	5100	45,1	1930	16800
anorg500S_300Cd	9360	4280	47400	7340	117	7820	64,4	839	12100
anorg500S_300Cd	14500	9390	51000	8850	111	7290	40,4	1550	14700
anorg500S_300Cd	9710	5440	60100	8030	109	3750	45,3	1170	12200
anorg250S_K	8280	17400	41600	4350	32,7	2990	28,9	710	103
anorg250S_K	7530	13800	56200	5020	65,2	3880	32,5	1410	82,1
anorg250S_K	6390	13200	22100	5040	32	2630	20,3	629	58,8
anorg250S_K	6420	10400	22700	5270	33,9	1750	17,4	297	62,2
anorg250S_K	4350	15600	25300	5820	36,9	1910	22,3	428	70,3
anorg250S_100Cd	6070	3740	19700	3780	50,1	2950	26,3	654	3340
anorg250S_100Cd	7190	2380	28500	4990	49,5	8650	31,1	1010	3010
anorg250S_100Cd	6900	7930	29600	7260	101	7850	62,7	2320	4830
anorg250S_100Cd	8800	2790	21200	5170	72,4	8880	53	1060	4110
anorg250S_100Cd	9600	4330	26200	4960	90,2	5590	39,7	1410	5470
anorg250S_300Cd	10100	5360	52700	3900	56	5180	42,8	1490	15400
anorg250S_300Cd	10500	4180	50600	5340	51,7	8760	56,3	1970	15100
anorg250S_300Cd	11900	8080	69200	5440	79,4	10500	56	2310	16600
anorg250S_300Cd	12000	7290	53000	3500	46,1	5650	42,3	1450	18800
anorg250S_300Cd	15300	9600	72100	4940	69,6	7810	57,8	1380	15200
org250S_K	6410	4100	23800	2170	47,9	868	12,8	578	713
org250S_K	5420	7030	26300	3420	46,9	2510	30,5	1190	528
org250S_K	5990	3230	20900	3700	35,8	2640	22,2	740	519
org250S_K	8120	1060	12500	4180	44	2440	23,9	660	540
org250S_K	5100	965	12200	4340	38	2420	20,3	505	533
org250S_100Cd	10600	2660	26800	3310	43,5	5800	38,4	1360	6380
org250S_100Cd	16200	4710	36100	5190	69,5	4690	53,5	1240	7700
org250S_100Cd	10200	2470	27900	4350	45	5980	48,9	1680	7780
org250S_100Cd	12600	3850	40200	3680	49,3	5330	69,5	1330	10900
org250S_100Cd	8250	3370	38300	2940	42,4	4490	51,1	1540	9830
org250S_300Cd	19300	5010	56600	4530	56,1	8260	97,1	924	12600
org250S_300Cd	16200	5420	49700	4580	76,7	9420	83,3	1170	11000
org250S_300Cd	17400	5410	48400	4410	60,4	12400	71	1040	11900
org250S_300Cd	17900	7460	57900	4600	62,1	8140	75,4	1120	14900
org250S_300Cd	18300	6790	63400	4890	87,7	14100	97,9	1370	14500

PRILOGA F

Koncentracije elementov v poganjkih ranega mošnjaka [mg/kg SM]

Izpostavitve	S	Cl	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Cd
anorg500S_K	3500	994	38000	6310	65,8	148	11,6	1200	6,8
anorg500S_K	4380	1230	54500	9230	140	287	11	1770	11,7
anorg500S_K	4080	1280	48600	8630	101	198	16	1110	12,7
anorg500S_K	6100	1620	69200	11600	124	412	15,3	2180	19,2
anorg500S_K	4590	1490	66400	12100	178	317	17,3	2590	5,5
anorg500S_100Cd	4550	1890	53200	8690	76,7	239	10,8	901	2730
anorg500S_100Cd	4490	1860	46600	7650	73	400	11,1	1540	3520
anorg500S_100Cd	7290	3880	75600	9440	77,1	270	15,1	1590	4960
anorg500S_100Cd	3100	2790	57200	11000	99,5	201	16,7	1020	3480
anorg500S_100Cd	9690	2920	64900	11600	106	361	22,8	1290	3090
anorg500S_300Cd	10600	10200	81500	13800	95,9	122	13,3	1310	11500
anorg500S_300Cd	8430	3200	98000	8380	98,2	207	13,6	1440	4720
anorg500S_300Cd	13000	10500	87700	16100	97,8	168	13	1780	11200
anorg500S_300Cd	14700	12200	106000	16800	99	169	11,5	1970	15900
anorg500S_300Cd	11900	10000	96000	16200	105	134	12,6	1520	12900
anorg250S_K	1200	2460	16800	4460	44,6	81,6	6,26	624	116
anorg250S_K	1320	3850	34300	11300	89,1	465	8,07	1170	221
anorg250S_K	2620	1820	59500	10700	161	348	11,3	2370	209
anorg250S_K	1710	2180	35700	5380	105	319	15,3	1200	223
anorg250S_K	1500	2710	36300	10000	99,6	239	8,19	1180	169
anorg250S_100Cd	2000	8850	56100	9720	78,4	113	13,5	990	2930
anorg250S_100Cd	3780	4640	40300	12600	132	174	12,4	2030	3780
anorg250S_100Cd	5730	6590	45800	11600	84,9	133	13,6	973	3080
anorg250S_100Cd	3540	7100	42900	10600	105	212	11,7	1540	2150
anorg250S_100Cd	5730	7880	38000	6370	82,9	144	14,3	1580	4930
anorg250S_300Cd	9910	10600	97800	12900	97	383	10,6	1540	9530
anorg250S_300Cd	8980	9070	74400	12400	75,6	153	12,5	1380	7800
anorg250S_300Cd	10800	13800	80300	13400	102	161	12,9	1320	10200
anorg250S_300Cd	12900	17300	117000	15500	101	220	14,5	1700	7370
anorg250S_300Cd	14400	14300	107000	18900	101	252	24,5	2430	10300
orgS250_K	2000	5050	40800	6020	93,7	178	12,2	923	291
orgS250_K	1000	2370	31200	8770	90,3	198	9,61	1250	163
orgS250_K	1100	7300	36900	8160	79,5	176	9,56	1350	555
orgS250_K	1140	1040	23600	8010	82,4	252	14,6	1110	132
orgS250_K	1580	2420	34500	7480	96,7	154	9,53	958	300
orgS250S_100Cd	1250	6540	43000	7310	76,9	123	11,2	873	2900
orgS250S_100Cd	2100	2920	32000	9230	86,8	152	11,1	641	2910
orgS250S_100Cd	2300	1470	44400	8350	61,6	189	10,6	826	2930
orgS250S_100Cd	1130	1640	31900	5750	63,3	122	11,5	622	1630
orgS250S_100Cd	1240	966	26000	4770	54,8	98,8	16,1	559	1720
org250S_300Cd	5040	5110	62500	15300	132	246	18,3	1650	7930
org250S_300Cd	6810	4160	67200	11100	99,3	288	26,8	1270	6840
org250S_300Cd	12000	5330	67600	9310	59,6	164	9,85	1060	7550
org250S_300Cd	15300	15800	82600	12800	116	477	12,9	1820	9220
org250S_300Cd	12700	5490	78700	10900	94,5	174	19,3	1250	5670