

**UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO**

Helena ČRTALIČ

**SEZONSKA DINAMIKA GLIVNE KOLONIZACIJE IN
PRIVZEMA KOVIN PRI RANEM MOŠNJAKU
(*Thlaspi praecox*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**SEASONAL DYNAMICS OF FUNGAL COLONISATION
AND METAL UPTAKE IN PENNYCRESS *Thlaspi praecox***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomska naloga je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljena je bila na Katedri za rastlinsko fiziologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer je bila izvedena tudi večina poskusov. Meritve so bile opravljene na Odseku za fiziko nizkih in srednjih energij Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomske naloge imenovala doc. dr. Marjano Regvar.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Članica: doc. dr. Barbara Vilhar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Marjana Regvar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 26.9.2007

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

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Helena Črtalič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK UDK 581.13:582.683(043.2)=863

KG hiperakumulacija / sezonske spremembe / *Thlaspi praecox* / privzem elementov / mikoriza

AV ČRTALIČ, Helena

SA REGVAR, Marjana (mentor)

KZ SLO, 1000 Ljubljana, Večna pot 111

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2007

IN SEZONSKA DINAMIKA GLIVNE KOLONIZACIJE IN PRIVZEMA KOVIN PRI RANEM MOŠNJAKU (*Thlaspi praecox*)

TD Diplomatska naloga (univerzitetni študij)

OP IX, 34 s., 6 tab., 6 sl., 6 pril., 62 vir.

IJ sl

JI sl / en

AI Na terenu nabrane rastline *Thlaspi praecox* iz bližine topilnice in predelovalnice svinca MPI d.o.o. v Žerjavu smo analizirali v laboratoriju. Proučili smo sezonske spremembe mikorizne kolonizacije in privzema elementov v rastlino. Koncentracije elementov v talnih in rastlinskih vzorcih smo izmerili z različnimi metodami rentgenske fluorescenčne spektroskopije in atomske absorpcijske spektrometrije. V talnih vzorcih smo izmerili celotne koncentracije Zn, Cd in Pb, vsebnost organske snovi in pH ter ocenjevali biodostopne koncentracije Zn, Cd in Pb z ekstrakcijo z amonijevim acetatom in vodo. Koncentracije elementov v koreninah in poganjkih smo določali po razklopu z HNO₃. Ocenjevali smo vitalno in totalno mikorizno kolonizacijo z metodo barvanja sukcinat dehidrogenaze. Potrdili smo hiperakumulacijo Cd in Pb, vendar je strategija tolerance vrste *T. praecox* na Pb izključevanje, saj ostane večina Pb vezanega v koreninah. Ugotovili smo, da so koncentracije Cd v listih najnižje v reproduktivni fazi, koncentracije Zn se skozi sezono značilno ne spreminjajo, koncentracije Pb pa tekom sezone padajo. Koncentracije ostalih elementov v listih so najnižje v reproduktivni fazi, saj se večina nutrientov transportira v cvetne poganjke. Verjetna je tudi povezava privzema, transporta in/ali akumulacije Fe, Cu, Cd in Zn. Ugotovili smo, da je stopnja mikorizne kolonizacije največja v reproduktivnem obdobju rastline, kar omogoča večji dostop do nutrientov, predvsem Fe, ter zavira dostop Cd v rastlino.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDK 581.13:582.683(043.2)=863

CX metal hyperaccumulation / seasonal dynamics / *Thlaspi praecox* / element uptake / mycorrhiza

AU ČRTALIČ, Helena

AA REGVAR, Marjana (supervisor)

PP SLO, 1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2007

TI SEASONAL DYNAMICS OF FUNGAL COLONISATION AND METAL UPTAKE
IN PENNYCRESS *Thlaspi praecox*

DT Graduation Thesis (University studies)

NO IX, 34 p., 6 tab., 6 fig., 6 ann., 62 ref.

LA sl

AL sl / en

AB Pennycress *Thlaspi praecox* was collected on the field near smelter MPI d.o.o. in Žerjav (Slovenia). Dynamics of element uptake and arbuscular mycorrhizal (AM) colonization during the life cycle were studied. Soil element concentrations and element concentrations in plant material were measured with different methods of X-Ray Fluorescence Spectroscopy. Total Zn, Cd and Pb concentrations, organic matter and pH were measured in soil samples. The exchangeable metal concentrations were estimated, using extraction with ammonium acetate and water. Plant material was treated with HNO₃. Vital and total mycorrhizal colonization was assessed by succinate dehydrogenase staining method. We confirmed Cd hyperaccumulation and Pb exclusion as tolerance strategies in *Thlaspi praecox*. There were no significant changes in Zn concentrations in plant material, while Pb concentrations seem to decrease during the life cycle. Lowest Cd concentration in leaves was measured during the seeding phase. Concentrations of others elements in leaves were lowest in the reproductive phase due to translocation to stalks. The positive correlation between concentrations of Fe, Cu, Cd and Zn in plant tissues suggests that uptake, transport and/or accumulation are linked. AM colonization was discovered to be at its peak during the flowering phase, probably due to enhanced nutrient uptake (especially Fe) and reduced Cd uptake it provides.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO TABEL	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 Dinamika elementov v rastlinah	2
2.1.1 Razdelitev elementov	2
2.1.2 Privzem elementov v rastline	3
2.2 Hiperakumulacija v rastlinah	3
2.2.1 Uporaba hiperakumulacijskih vrst	4
2.2.2 Lasnosti rodu <i>Thlaspi</i>	5
2.2.3 Vrsta <i>Thlaspi praecox</i>	5
2.3 Arbuskularna mikoriza	6
3 NAMEN RAZISKAV	7
4 MATERIAL IN METODE	8
4.1 Vzorčenje in priprava rastlinskega materiala	8
4.2 Priprava steklovine za analize	9
4.3 Analize tal	9
4.3.1 Organske snovi v talnih vzorcih	9
4.3.2 Celotne koncentracije Zn, Cd in Pb v talnih vzorcih z metodo rentgenske fluorescence	9
4.3.3 Biodostopne koncentracije Zn, Cd in Pb v talnih vzorcih z amonijevim acetatom ter pH	10
4.3.3.1 Priprava vzorcev tal	10
4.3.4 Rastlinam dostopni fosfor v tleh	10
4.4 Koncentracije elementov v rastlini	11
4.4.1 Priprava rastlinskega materiala, predrazklop in razklop	11
4.4.2 Priprava vzorcev za meritve	11
4.4.3 Merjenje – rentgenska fluorescenčna spektroskopija (RFS)	11
4.4.3.1 Priprava vzorcev	12
4.4.3.2 Opis meritve	13

4.4.3.3	<i>Analiza spektra in kvantitativna analiza</i>	13
4.5	Ocenjevanje kolonizacije arbuskularne mikorize	13
4.5.1	Vzorčenje in barvanje koreninskih fragmentov	13
4.5.2	Ocenjevanje stopnje kolonizacije AM	14
4.6	Statistika	15
5	REZULTATI	16
5.1	Analize tal	16
5.1.1	Koncentracije Zn, Cd in Pb	16
5.2	Analize rastlin	17
5.2.1	Biomasa	17
5.2.2	Koncentracije elementov v rastlini	17
5.2.2.1	<i>Koncentracije elementov v posamezni razvojni fazi in translokacijski faktor</i>	17
5.2.2.2	<i>Bioakumulacijski faktorji</i>	18
5.2.3	Koncentracija elementov glede na ontogeno starost	19
5.3	Arbuskularna mikoriza	20
5.3.1	Kolonizacija rastlin	20
5.3.1.1	<i>Koncentracije elementov in mikorizna kolonizacija</i>	20
6	RAZPRAVA	22
6.1	Tolerančne strategije na Zn, Cd in Pb	22
6.2	Mikoriza	24
7	SKLEPI	26
8	POVZETEK	27
9	LITERATURA	28
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO TABEL

Tabela 1: Arbuskularno mikorizni parametri in njihova razlaga	15
Tabela 2: Celotne koncentracije Zn, Cd in Pb v talnih vzorcih	16
Tabela 3: Pearsonovi korelacijski koeficienti dostopnih koncentracij Zn, Cd in Pb s celotnimi koncentracijami Zn, Cd in Pb v tleh	16
Tabela 4: Koncentracije elementov v mladih, zrelih in starih listih	19
Tabela 5: Pearsonovi korelacijski koeficienti celotnih koncentracij in dostopnih koncentracij kovin v tleh s kolonizacijo rastlin	20
Tabela 6: Pearsonovi korelacijski koeficienti elementov v koreninah in poganjkih s kolonizacijo rastlin	21

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz razvojnih faz	8
Slika 2: Shematski prikaz razdelitve rastline na mlade, zrele in stare liste	8
Slika 3: Rastlinska biomasa korenin in poganjkov v posamezni razvojni fazi življenjskega cikla <i>T. praecox</i>	17
Slika 4: Koncentracije Zn, Cd, Pb, Ni in Fe v koreninah, poganjkih in cvetnih steblih v posamezni razvojni fazi življenjskega cikla	18
Slika 5: Bioakumulacijski faktorji Cd in Pb korenin in poganjkov glede na rastno sezono	19
Slika 6: Delež kolonizacije celotne in vitalne mikorizna koloniziranosti glede na rastno sezono.	20

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ag	srebro
Am	americij
As	astat
B	bor
Ca	kalcij
Cu	baker
Cd	kadmij
Cr	krom
Co	kobalt
Cl	klor
F%	mikorizna frekvenca
Fe	železo
K	kalij
M%	mikorizna inteziteta
Mg	magnezij
Mn	mangan
Mo	molibden
Na	natrij
Ni	nikelj
P	fosfor
Pb	svinec
RFS	rentgenska fluorescenčna spektroskopija
S	žveplo
SM	suha masa
SN	standardna napaka
Si	silicij
Se	selen
TF	translokacijski faktor
TXRF	Total X-Ray Fluorescence – rentgenska fluorescenca s popolnim odbojem
V	vanadij
XRF	X-Ray Fluorescence – rentgenska fluorescenca
Zn	cink

1 UVOD

Rastline, ki uspevajo na tleh onesnaženih z visokimi koncentracijami nekaterih elementov, kot so Zn, Cd, Pb..., morajo biti tolerantne. Elemente lahko izključujejo ali pa akumulirajo (Baker, 1981). Skrajna stopnja akumulacije je hiperakumulacija, ki je lastnost rastline, da kopiči v tkiva visoke koncentracije nekega elementa, višje od koncentracij v tleh.

Mikoriza je mutualističen odnos med glivami in rastlinami, kjer gliva poveča absorpcijsko površino za privzem vode in omogoča privzem težje mobilnih elementov, v zameno pa dobi ogljikove hidrate. Mikoriza se pojavlja na več kot 80% rastlinskih vrst, kljub temu pa spada družina križnic (Brassicaceae) med nemikorizne, izjema te družine je vrsta *Thlaspi praecox*, ki je mikorizna hiperakumulacijska vrsta. Mikorizne hiperakumulatorske vrste niso pogoste, saj je do sedaj znano le nekaj primerov (Turnau in Mejasz-Prybylowicz, 2003; Vogel-Mikuš s sod., 2005). Hiperakumulacijske rastline se lahko uporabljajo pri fitoremediaciji, čiščenju onesnaženih območij (Brooks, 1998). Rastlinske potrebe se skozi rastno sezono spreminjajo, zaradi tega se tudi elementi v listih ne kopičijo enakomerno, mesta kopičenja pa se spreminjajo v odvisnosti od stadija rastline. Z rastlinskimi potrebami po nutrientih se spreminja tudi mikorizna kolonizacija.

Z diplomsko nalogo smo poskušali ugotoviti privzem kovin v poganjke, korenine in cvetne poganjke v odvisnosti od sezone, preučiti sezonsko dinamiko glivne kolonizacije ter ugotoviti ali obstaja odvisnost med mikorizno kolonizacijo in privzemom elementov pri ranem mošnjaku (*Thlaspi praecox* Wulfen).

Na terenu nabrane rastline *Thlaspi praecox* iz bližine topilnice in predelovalnice svinca MPI d.o.o. v Žerjavu smo analizirali v laboratoriju. Izvedli smo kvantitativne analize tal, celotne koncentracije kovin v tleh smo izmerili z rentgensko fluorescenco, dostopne koncentracije pa z ekstrakcijo kovin z amonijevim acetatom in vodo ter meritvami na atomskem absorpcijskem spektrometru. Koncentracije elementov v rastlinah smo določili z rentgensko fluorescenco s popolnim odbojem. Mikorizno kolonizacijo smo ocenjevali pod svetlobnim mikroskopom, nato pa smo proučevali privzem Zn, Cd in Pb v korenine in poganjke ter ostalih elementov in mikorizno kolonizacijo glede na razvojni stadij rastline.

2 PREGLED OBJAV

2.1 Dinamika elementov v rastlinah

2.1.1 Razdelitev elementov

Elementi, ki so prisotni v tleh se delijo na esencialne in neesencialne. Esencialni elementi so vsi tisti elementi, ki so potrebni rastlini, da zaključi rastni cikel (Arnon in Stout, 1939). Ob prisotnosti teh elementov in svetlobe lahko rastlina sintetizira vse potrebne snovi za rast. H, C in O rastlina pridobiva iz CO₂ in H₂O, zato ne spadajo pod mineralne nutiente. Elementi, ki jih rastlina pridobiva s črpanjem iz tal, pa so razdeljeni na makro- in mikroelemente. Razdelitev je določena glede na njihovo relativno koncentracijo v rastlinskih tkivih, prisotnost makroelementov je vsaj 10 krat večja. Makroelementi prisotni v rastlinah so N, K, Ca, Mg, P, S, Si, mikroelementi pa Cl, Fe, B, Mn, Na, Zn, Cu, Ni, Mo (Taiz in Zeiger, 2002). Rastlina pa lahko črpa tudi neesencialne elemente, kot so Pb, Cd, As, Ag..., med katerimi sta najbolj razširjena Cd in Pb (Brooks, 1998).

Prisotnost elementov in njihova lokacija v rastlini je odvisna od njihove mobilnosti. Mobilni elementi so N, K, Mg, P, Cl, Na, Zn, Mo in Cd, nemobilni pa Ca, S, Fe, B, Cu in Pb (Taiz in Zeiger, 2002). Koncentracije nemobilnih elementov v starejših listih naraščajo, saj se ves čas nalagajo, lahko pa se zadržujejo v visokih koncentracijah v koreninah kot npr. Pb (Ernst s sod., 1992), medtem ko lahko rastlina mobilne elemente premešča glede na potrebe. Večinoma so v starejših listih prisotne visoke koncentracije tistih elementov, ki jih rastlina ne potrebuje (Fricks s sod., 2001). Velika sezonska nihanja v koncentracijah nutrientov so prisotna pri listopadnih drevesih, saj rastlina pred abscizijo listov premesti mobilne elemente v deblo za spomladanski razvoj listov. Najpomembnejša elementa za fiksacijo ogljikovega dioksida ter za razvoj rezerv ogljikovih hidratov sta Mg in K, ker sta mobilna elementa se njuna koncentracija pred abscizijo listov običajno zmanjša (Ericsson in Kähr, 1995). Raziskave so pokazale, da koncentracija K v listih ne niha skozi sezono, če je koncentracija v tleh dovolj visoka, vseeno pa je koncentracija K višja v mlajših listih. P je tudi zelo mobilen element, katerega koncentracija v listih se proti koncu rastne sezone zniža in ga rastlina razporeja glede na njene potrebe (Fricks s sod., 2001). Koncentracija S v listih tudi upade, če je koncentracija le-tega v tleh nizka (Ericsson T., 1994). Koncentracija Cd je najvišja v mlajših listih, medtem ko je koncentracija Zn višja v starejših listih (Perronet s sod., 2003), vendar pa je vsebnost Cd in Zn v starejših listih visoka, saj se z odpadanjem starih listov rastlina znebi vsaj dela nakopičenih kovin (Ernst s sod., 1992). Privzem Ca, ki je nemobilen element, v rastlino je v glavnem pasiven in narašča skozi celo sezono, s staranjem listov (Fricks s sod., 2001). Podobno naraščata tudi Cu in Cr, ki sta razmeroma nemobilna ter večinoma vezana na organsko snov ali pa

železove in manganove okside (Berti s sod., 1998). Pb ostaja večinoma vezan v koreninah, njegove koncentracije v starih listih pa ostajajo skozi leto konstantne (Ernst s sod., 1992).

2.1.2 Privzem elementov v rastline

Privzem elementov v rastline je odvisen od njihove biodostopnosti, lastnosti tal, količine padavin, lastnosti rastline in prisotnost gliv. Biodostopnost je definirana kot zmožnost elementov, da se prenašajo iz substrata v organizme (Joner in Leyval, 2001). Talni dejavniki pomembni za dostopnost elementov so pH, ter s tem njihova topnost, kationsko izmenjevalna kapaciteta, vsebnost organske snovi, na katero so lahko vezani, mikroorganizmi v tleh, struktura tal in prisotnost drugih ionov ter tako vezani npr. z manganovimi ali železovimi oksidi ali pa so del mineralnih struktur (Marschner, 1995). Rastlina lahko s svojimi potrebami vpliva na topnost in mobilnost elementov. Pomembna sta predvsem razvojni stadij rastline in vrsta le-te. Nekatere rastline lahko sproščajo specifične kovinske kelate ali reducirajoče spojine v rizosfero, da povečajo absorpcijo Fe in Zn, kadar je dostopnost teh mikronutrientov nizka (Marschner, 1995) ali pa znižajo pH (Adriano, 2001). Prisotnost gliv omogoča večji privzem P (Smith in Read, 1997), S, Ni, Cu, K in Ca (Killham in Firestone, 1983; Turnau in Mesjasz-Przybylowicz, 2003).

Koncentracije nekaterih neesencialnih elementov in tudi Zn v veliko rastlinskih vrstah jeseni rahlo upadejo brez posebnih trendov (Kim in Ferguson, 1994). Cd je slabo mobilni element, saj je na kalcitnih tleh vezan na karbonate (Fricks s sod., 2001) in v rastlini ostaja relativno stabilen oz. naraste v senescenci (Gjengedal, 1996). Glavni razlog za upad koncentracij elementov po koncu zime s ponovnim zvišanjem na koncu rastne sezone je dilucijski efekt (Rains, 1971). Čeprav rastline bolj ali manj enakomerno kopičijo Cd in Zn v tkiva, je spomladi privzem počasnejši od rasti rastline, v senescenci pa ne prihaja več do velikih sprememb v biomasi, ter koncentracija kovin v rastlini naraste (Rains, 1971). Pb je razmeroma nemobilni element, ki se pogosto veže na organsko snov ali pa na železove in manganove okside (Berti s sod., 1998).

2.2 Hiperakumulacija v rastlinah

Negativen vpliv na rastlino imajo prenizke ali previsoke koncentracije esencialnih elementov in previsoke koncentracije neesencialnih elementov, ker pride do metabolnih motenj ali pa do zastrupitve (Teiz in Zeiger, 2002). Previsoka koncentracija neesencialnih elementov v tleh omogoča rast samo tolerantnim rastlinam. Toleranca pri rastlinah je dedna sposobnost rastlin, ki omogoča preživetje v tleh, kjer so koncentracije previsoke in zaradi tega strupene za druge rastline (Hall, 2002). Rastlinska odziva na takih tleh sta akumulacija ali izključevanje (Baker, 1981). Izključevanje je mehanizem rastline s katerim ta aktivno preprečuje privzem nekaterih elementov iz tal z različnimi fiziološkimi ovirami,

vendar se te ob previsokih koncentracijah podrejo in tako pride do neomejenega transporta kovin v korenine. Včasih pa obstaja še dodatna ovira na tkivnem nivoju korenin, ki onemogoča transport teh elementov iz korenin v poganjke. Rastline pa lahko akumulirajo nekatere elemente. Aktivno privzemajo elemente v svoja tkiva in jih kopičijo, tudi če so v tleh nizke koncentracije. Preživetje tem rastlinam omogočajo različni razstrupljevalni mehanizmi, kot so skladiščenje v celičnih stenah, kjer se imobilizirajo s pektini, tvorba spojin z organskimi in anorganskimi kislinami ter fenolnimi derivati, tvorba kelatov v citoplazmi, tako pride do vezave na proteine z SH skupino ali pa nalaganje v vakuolah s pomočjo translokacije. Skrajna stopnja akumulacije je hiperakumulacija (Hall, 2002). To je redek pojav v rastlinskem svetu, saj je sposobnost hiperakumulacije do sedaj odkrita pri 400 vrstah višjih rastlin. Večina teh rastlin hiperakumulira Ni, ostale pa Zn, Cd, Pb, Co, Cu ali Se (Brooks, 1998). Lastnost teh rastlin je, da akumulirajo visoke koncentracije teh elementov v poganjkih, brez simptomov strupenosti (Baker, 1981). Koncentracija elementov v poganjkih, ki je potrebna za potrditev hiperakumulacije pri rastlinski vrsti znaša za Zn 10000 mg/kg (1%), za Cd 100 mg/kg (0,01%) in za Pb 1000 mg/kg (0,1%) (Brooks, 1998). Translokacijski faktor, razmerje med koncentracijo kovin v poganjkih in koncentracijo v koreninah, mora biti višji od 1. Visok pa mora biti tudi bioakumulacijski faktor (BAF), ki je razmerje med koncentracijo kovin v poganjkih in koncentracijo v tleh. Odnos med hiperakumulacijo in toleranco rastlin, še ni popolnoma definiran, saj nekateri avtorji pravijo, da ni korelacije med njima (Baker s sod., 1994), drugi pa, da mora imeti hiperakumulacijska rastlina razvito visoko stopnjo tolerance, najverjetneje je mehanizem tolerance kompartmentacija na kovine (Reeves in Brooks, 1983). Strategija tolerance kovin se kaže tudi pri zmanjšanju translokacijskega faktorja tekom rastne sezone, kar omeji transport strupenih koncentracij kovin iz korenin v poganjke ter omogoči nižje koncentracije npr. Cd v poganjkih med zorenjem semen (Brekken in Steinnes, 2004).

2.2.1 Uporaba hiperakumulacijskih vrst

Zanimanje za hiperakumulacijske rastline narašča, saj bi bile cenovno ugoden vir za čiščenje onesnaženih tal (Zhao s sod., 2003). Fitoremediacija tal s pomočjo rastlin poteka na tri različne načine. Fitostabilizacija je tehnika s katero s pomočjo rastlinskih korenin pride do zmanjšane mobilnosti kovin. Lahko s pomočjo zmanjšanja erozije ali pa se kovine vežejo na korenine. Rastline lahko povečajo hlapnost kovin – fitovolatizacija ali pa privzemajo kovine, jih transportirajo in kopičijo v nadzemnih poganjkih – fitoekstrakcija (Brooks, 1998). Fitoekstrakcija je poceni in okolju prijazna. Rastline, ki so uporabne za odstranjevanje kovin iz tal morajo koncentrirati elemente v biomasi, biti odporne na kovine in imeti čim bolj razvejane korenine (Brooks, 1998). Lahko se uporabijo hiperakumulacijske rastline, ki pa imajo počasno rast in majhno biomaso, ali pa rastline z veliko biomaso, kot so koruza, grah ali riž (Brooks, 1998).

2.2.2 Lasnosti rodu *Thlaspi*

Rod *Thlaspi* že dolgo časa zanima botanike, saj raste tudi na območjih onesnaženih z Zn, Pb in Cd, Ni, Cr ter včasih s Co (Windsor, 1866; Reeves in Brooks, 1983). Do sedaj je bilo odkritih več hiperakumulacijskih vrst iz rodu *Thlaspi*. Te so: *T. caerulescens*, ki hiperakumulira Zn, Cd in Ni (Baker in sod., 1994), *T. rotundifolium* ssp. *cepaefolium* hiperakumulira Pb (Brooks, 1998) ter *T. praecox*, ki hiperakumulira Zn in Cd (Vogel-Mikuš s sod., 2005). Značilnost tega rodu je, da akumulacija v poganjkih sledi v značilnem zaporedju Zn > Cd >> Pb (Baker s sod., 1994). Privzem, transport in/ali akumulacija Cd, Fe, Zn in Cu pri vrsti *T. caerulescens* so v pozitivni korelaciji (Zha s sod., 2004), saj transport različnih elementov poteka preko istega transportnega sistema. Cd vstopa v celice s pomočjo visoko afinitetnih transporterjev za Fe (Lombi s sod., 2001) ali pa nizko afinitetnih transporterjev za Ca ali Zn (Baker s sod., 1994), večina Pb pa ostaja imobiliziranega v koreninah (Dahmani-Muller s sod., 2000). Vrsta *T. caerulescens* je tolerantna na Zn, Cd in Ni, jih imobilizira, kompartmentira in/ali razstruplja. Zn shranjuje v vakuole, kjer se veže na malat (Tolrà s sod., 1996) Cd pa z vezavo na celične stene (Hall, 2002).

2.2.3 Vrsta *Thlaspi praecox*

Vrsta *Thlaspi praecox* uspešno kolonizira območja onesnažena s Pb, Cd in Zn (Regvar s sod., 2006) in je izjemna hiperakumulacijska vrsta, ki je sposobna v svojih poganjkih kopičiti kar tri kovine in to do 1,5 % Zn, 0,6% Cd in 0,4% Pb (Vogel-Mikuš s sod., 2005). Ima zelo učinkovit transportni sistem, saj je translokacijski faktor večji od 1. Vrednosti Pb v poganjkih so višje od kriterija za hiperakumulacijo, vendar ostaja 80% Pb imobiliziranega v koreninah, kar kaže na izključevanje kot strategijo tolerance na Pb (Vogel-Mikuš s sod., 2005). Nedavno pa so tudi ugotovili, da vrsta hiperakumulira Cd tudi v semenih (Vogel-Mikuš s sod., 2007).

Vrsta *T. praecox* spada v družino križnic (Brassicaceae), katere predstavniki večinoma niso kolonizirani z mikoriznimi glivami, sedem predstavnikov te družine pa lahko razvije mikorizno kolonizacijo, le če rastejo v bližini kolonizirane rastline (Hirrel s sod., 1978). Tudi ostale hiperakumulacijske rastline so večinoma znane kot nemikorizne (Pawlowska s sod., 1996), izjeme so *Berkheya codii* (Asteraceae) in še nekatere hiperakumulacijske rastline za Ni v Južno Afriški Republiki (Turnau in Mesjasz-Przybylowicz, 2003) ter *T. praecox* (Regvar s sod., 2003; Vogel-Mikuš s sod., 2005).

2.3 Arbuskularna mikoriza

Arbuskularna mikoriza (AM) je mutualističen odnos med glivami iz debla Glomeromycota in večino rastlinskih vrst. Simbiotska povezava omogoča rastlini boljšo rast tako, da se poveča absorpcijska površina za privzem vode, poveča se privzem in transport težko mobilnih elementov ter zmanjša se možnost patogenih infekcij (Koide, 1991). Gliva pa v zameno pridobi ogljikove hidrate, ki so potrebni za njeno izgradnjo (Smith in Read, 1997). Glavni element, ki se prenaša je P (Smith in Read, 1997). Prehod elementov je najučinkovitejši skozi arbuskule, ki so mesta razvejitve hife v rastlinski celici, kjer pride do puščanja membran, saj na membranah ni več prisotnih H⁺ATP-az, večja pa je tudi encimska aktivnost (Bonfante in Perotto, 1995). Na razvoj AM vplivajo edafski faktorji, količine posameznih elementov v tleh ter v sami rastlini (Mullen in Schmidt, 1993). K stimulacijsko vpliva na razvoj mikorize, vendar pa je potrebno upoštevati tudi prisotnost ostalih elementov kot npr. Ca (Mullen in Schmidt, 1993), ki je s K v antagonističnem odnosu. Negativen vpliv na razvoj AM pa ima visoka koncentracija P v tleh in v rastlini (Ruotsalainen in sod., 2002), ter same potrebe rastline po AM, ki se spreminjajo skozi sezono (Fitter, 1991). Prisotnost mikorizne kolonizacije je vrstno specifična. Pri alpskih rastlinah npr. celotna kolonizacija AM naraste proti koncu rastne sezone, število arbuskulov se zmanjša, velikost veziklov pa naraste (Baikalova in Onipchenko, 1998).

Za mikorizno kolonizacijo pri *T. praecox* je značilna tvorba intraradikalnih hif, svitkov ter občasnih interkalarnih arbuskulov, oblikovanih v notranjih kortikalnih celičnih plasteh ter občasni spor na terminalnih hifah. Svitki so vedno na zunanjih kortikalnih celicah in so vedno brez arbuskulov. Kolonizacija ni prisotna, če je v tleh previsoka koncentracija Zn, Cd in Pb (Regvar, 2003; Vogel-Mikuš s sod., 2005). Pri koloniziranih rastlinah je koreninska biomasa značilno manjša, saj se nekaj ogljika porabi za rast gliv (Vogel-Mikuš s sod., 2006), vendar pa je privzem nekaterih elementov zmanjšan, drugih pa povečan. Pride do omejevanja privzema predvsem Cd in Zn, kar potrjuje zaščitno vlogo AM na onesnaženih tleh in poveča možnost rasti. AM velja tudi za tolerančno strategijo *T. praecox* na onesnaženih tleh (Vogel-Mikuš s sod., 2006). Poveča se privzem P, Cu, S, Ni v korenine in poganjke, K in Ca pa v poganjke (Vogel-Mikuš s sod., 2005). Novejše raziskave tudi kažejo, da se AM pri *T. praecox* pojavlja, ko rastlina potrebuje več elementov, najbolj v reproduktivni periodi (Vogel-Mikuš s sod., 2006). Velika količina esencialnih elementov je namreč pomembna za nastanek bolj kvalitetnih semen, kar je pomembno na apnenčastih tleh in onesnaženih območjih (Marschner, 1995). Semena *T. praecox* hiperakumulirajo visoke količine Cd, kar negativno vpliva na biomaso in viabilnost (Vogel-Mikuš s sod., 2007), zato je bistvenega pomena, da se zmanjša privzem Cd s pomočjo AM v reprodukcijski periodi (Vogel-Mikuš s sod., 2006).

3 NAMEN RAZISKAV

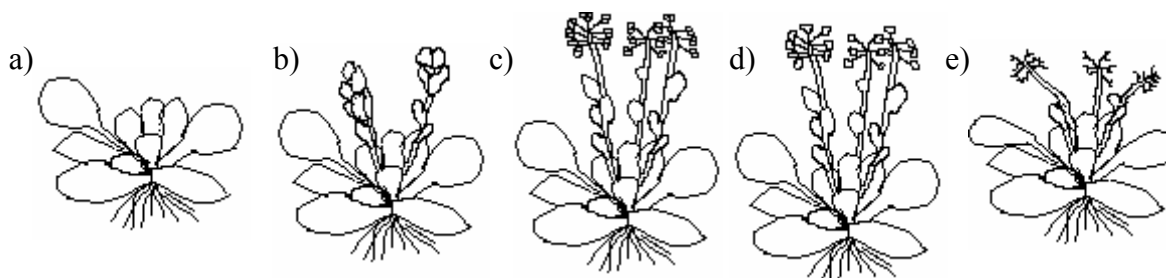
Glavni namen te naloge so bili:

1. Preučiti sezonske spremembe privzema elementov v korenine, poganjke in cvetna stebela pri hiperakumulacijski vrsti rani mošnjak (*Thlaspi praecox* Wulf.).
2. Preučiti sezonsko dinamiko sprememb glivne kolonizacije pri hiperakumulacijski vrsti rani mošnjak (*Thlaspi praecox* Wulf.).
3. Ugotoviti ali obstaja povezava med stopnjo kolonizacije z arbuskularno mikoriznimi glivami in vsebnostjo preučevanih elementov pri hiperakumulacijski vrsti rani mošnjak (*Thlaspi praecox* Wulf.).
4. Ugotoviti, kako je kopičenje preučevanih elementov odvisno od starosti listov v rozeti vrste *T. praecox*.

4 MATERIAL IN METODE

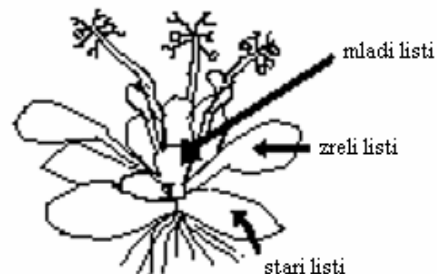
4.1 Vzorčenje in priprava rastlinskega materiala

Rastlinski material smo nabrali v Žerjavu v neposredni bližini topilnice in predelovalnice svinca MPI d.o.o. in sicer na vzorčnem mestu 3, ki je 500 metrov oddaljena od vira onesnaževanja (Regvar s sod., 2006), v rastni sezoni 2005. V življenjskem ciklu rastline smo ločili 5 razvojnih faz in sicer: vegetativno fazo (VP) in fazo indukcije cvetenja (FI), rastline smo nabrali konec aprila, fazo cvetenja (FP) konec maja, fazo semenitve (SP) začetek julija ter fazo senescence (SC) začetek septembra (slika 1). V vsaki razvojni fazi smo povzorčili po 5 rastlin, razen v VP in FI. V le-teh smo morali zaradi majhnosti rozet rastline združiti tako, da smo dobili po 3 vzorce. V VP smo združili po 3 rastline, v FI pa po 2 rastlini. Rastline smo nabirali s pomočjo lopatke in jih posamezno spravili v plastične vrečke, ki smo jih zavihali, da so rastline lahko dihale. Po prihodu s terena smo vsaki rastlini povzorčili rizosferna tla, ki se nahajajo v okolici korenin, in jo sušili 5 dni na 105°C. Koreninski sistem smo sprali pod tekočo vodo, nato pa še z bidestilirano vodo. Rastlino smo razdelili na korenine, poganjke in cvetna stebela (v FP in SP), del korenin smo povzorčili za oceno mikorizne kolonizacije, jih zavili v folijo in sušili 48 ur pri 60°C, posušen rastlinski material smo stehali.



Slika 1: Shematski prikaz razvojnih faz a) vegetativna faza (VP), b) indukcija cvetenja (FI), c) faza cvetenja (FP), d) faza semenitve (SP), e) faza senescence (SC).

Za namen analize mesta kopičenja kovin glede na starost listov smo v SC (le takrat so bile rozete dovolj velike) posebej povzorčili še 5 rastlin. V laboratoriju smo kot že opisano ločili korenine od poganjkov, med le-temi pa smo ločili mlade (svetlo zeleni, najmanjši in najvišje ležeči listi), zrele (optimalno razviti, nepoškodovani in na sredini ležeči listi) in stare (temno zeleni, najnižje ležeči listi) liste (slika 2).



Slika 2: Shematski prikaz razdelitve rastline na mlade, zrele in stare liste.

4.2 Priprava steklovine za analize

Vso steklovino, ki smo jo uporabljali za merjenje kovin, smo temeljito oprali pod tekočo vodo, nato sprali z 0,2% HNO₃. Pred uporabo smo jo sprali še z bidestilirano vodo (Milipore Q-185, 18,2 MΩ/cm) in jo sušili pol ure pri 105°C. 0,2% HNO₃ smo pripravili tako, da smo v liter bidestilirane vode odpipetirali 3,1 ml 65% HNO₃ (Merck).

Vso drugo steklovino, ki smo jo uporabljali pri analizah smo temeljito oprali, jo sprali pod tekočo vodo in nato še z bidestilirano vodo ter sušili v sušilniku pol ure pri 105°C.

4.3 Analize tal

Posušena tla smo presejali skozi 1 mm gosto sito in jo do analiz hranili v temnem prostoru pri sobni temperaturi.

4.3.1 Organske snovi v talnih vzorcih

Organsko snov v tleh smo določali s kromovo metodo povzeto po Kandeler (1995), pri kateri se organska snov oksidira s pomočjo mešanice kalijevega dikromata in žveplene kisline. Pri tem se tvori krom (Cr III), katerega smo kalorimetrično določili in je ekvivalent organski snovi v tleh.

Za pripravo potrebne količine raztopine kalijevega dikromata smo zatehtali 60,8 g kalijevega dikromata (alkaloid, Skopje) in ga raztopili v 650 ml bidestilirane vode.

Pripravili smo 5 steklenih čaš v katere smo za standardne raztopine zatehtali po 0.58 g, 1.16 g, 1.74 g in 2.32 g mioinozitola (Serva) ter eno čašo brez mioinozitola oz. za naše vzorce 2 g posušenih tal, v vsako dodali po 20 ml raztopine kalijevega dikromata in v digestoriju še po 15 ml koncentrirane H₂SO₄ (Merck). Raztopine smo pustili stati 3 ure, jim nato dodali bidestilirano vodo do 100 ml, premešali in pustili stati čez noč. Za fotometrično analizo smo 1 ml standardne raztopine oz. vzorca razredčili z bidestilirano vodo do 25 ml in rahlo premešali. S spektrofotometrom smo merili absorbcijo pri 570 nm. Vrednosti absorbcije mioinozitola na podlagi začetne mase standardov ustrezajo 0%, 2%, 4%, 6% in 8% organske snovi v tleh. Organsko snov v vzorcih smo izrazili kot % tal in jo izračunali iz umeritvene krivulje standarda.

4.3.2 Celotne koncentracije Zn, Cd in Pb v talnih vzorcih z metodo rentgenske fluorescence

Posušena tla smo v mehničnem mlinu zmleli v droben prah (Fritsch, Idar-Oberstein, Nemčija) z volfram/ogljikovim terilcem in jo dodobra premešali. S pomočjo hidravlične stiskalnice smo iz prahu stisnili tabletko s površino 4,9 cm², jih stehali in jim v 2000

sekundah izmerili koncentracije Zn, Cd in Pb. Metoda je povzeta po Nečemer s sod. (2003) (opis meritve glej 4.4.3).

4.3.3 Biodostopne koncentracije Zn, Cd in Pb v talnih vzorcih z amonijevim acetatom ter pH

Biodostopne kovine v tleh smo ocenjevali z ekstrakcijo z amonijevim acetatom (Baker s sod., 1994), ker je zelo dobro merilo dostopne frakcije kovin v tleh (Ernst, 1996).

Za pripravo 1 molarne (M) raztopine amonijevega acetata smo zatehtali 40,08 g amonijevega acetata (Merck) in ga raztopili v 520 ml bidestilirane vode.

4.3.3.1 Priprava vzorcev tal

V čaše smo zatehtali po 1 g posušenih rizosfernih tal. Polovici čaš smo dodali 20 ml bidestilirane vode, preostalim pa 20 ml 1 M raztopine amonijevega acetata. Vse steklene čaše smo pokrili s plastično folijo, jih zatesnili z elastiko in pri sobni temperaturi stresali dve uri (200 rpm). Po koncu stresanja smo počakali, da se zemlja posede, nato pa smo supernatant s pomočjo 5 ml brizgalk filtrirali skozi 0,45 µm filter (Milipore) v 20 ml epruvete. Epruvete s filtrati smo zatesnili s pokrovčkom in jih do meritev hranili v hladilniku, da bi zmanjšali izhlapevanje. Nato smo z atomskim absorpcijskim spektrometrom (AAS) izmerili koncentracije Cd, Pb in Zn v posameznih frakcijah.

V filtratih z vodo smo s pomočjo umerjenega (pufer, pH 7) pH metra 28 (radiometer Copenhagen) izmerili tudi pH (McLean, 1982; Öhlinger, 1995).

4.3.4 Rastlinam dostopni fosfor v tleh

Rastlinam dostopni fosfor v tleh smo izmerili s pomočjo molibdat metode (ÖNORM, 1993). (Podrobnejša priprava raztopin je v prilogi 1). V čaše smo zatehtali po 5 g suhih tal in dodali 100 ml delovne raztopine za ekstrakcijo (5x redčena raztopina kalcijevega laktata, kalcijevega acetata in očetne kisline; pH 4,1). Vzorce smo dve uri stresali (180 rpm) pri sobni temperaturi in nato prefiltrirali z nagubanim filtrom (modri trak; Macherey-Nageb GmbH, Germany), pri čemer smo prvi del filtrata zavrgli. Standard za umeritveno krivuljo smo pripravili iz standardne raztopine 100 ml/l PO₄-P, ki smo jo redčili z založno raztopino za ekstrakcijo tako, da smo dobili naslednje končne koncentracije 0,5 ml/l, 2 ml/l, 3 ml/l, 4 ml/l in 5 ml/l (0,5 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml in 5 ml delovne raztopine smo dopolnili do 100 ml). Za fotometrično analizo smo v 1 ml standardne raztopine oz. vzorcev dodali 16 ml delovne raztopine amonijevega heptamolibdata (10x redčena raztopina amonijevega heptamolibdata, H₂SO₄ in kalijevega antimon(III)oksidtartrata) in 2 ml raztopine askorbinske kisline. Počakali smo pol ure in nato izmerili absorbcijo pri 660 nm.

4.4 Koncentracije elementov v rastlini

Vse meritve koncentracij elementov v rastlinskih vzorcih smo izvajali z rentgensko fluorescenco s popolnim odbojem (total X-ray fluorescence - TXRF) na Institutu Jožefa Stefana v laboratoriju dr. Petra Kumpa. Meritve koncentracij Cd smo zaradi večje občutljivosti tehnike izvedli z AAS.

4.4.1 Priprava rastlinskega materiala, predrazklop in razklop

Posušene vzorce smo s pomočjo tekočega dušika strli v terilnici. V očiščene epruvete smo zatehtali 100 mg suhega rastlinskega materiala in nanje odpipetirali po 3 ml koncentrirane 65% HNO₃ (Merck), premešali, pokrili s folijo in pustili stati čez noč v digestoriju, da se je rastlinski material dobro prepojil s kislino. Po predrazklopu smo epruvete nameščene v termoblok postopno segrevali 8 ur do 150°C. Med segrevanjem smo epruvete večkrat premešali, da smo s sten epruвет sprali prilepljen rastlinski material, dokler ni vsa kislina odparela. Suhe vzorce smo nato pokrili s pokrovčki in jih do meritev hranili v hladilniku.

4.4.2 Priprava vzorcev za meritve

En dan pred merjenjem koncentracij elementov smo na popolnoma suhe vzorce nalili 5 ml 0,2% HNO₃, vzorce dobro premešali z vorteksom in čez noč dali v hladilnik.

Epruvete z vzorci smo naslednji dan ponovno zvorteksirali in odpipetirali po 2 ml vzorca v nove epruvete. V te smo nato odpipetirali 10 µl internega standarda V (vanadij) in pustili stati 15 minut. Nato smo dodali 3 ml bidestilirane vode in pustili 1 uro. Kvarčna stekelca, predhodno namočena v segreti mešanici HNO₃:H₂O = 1:3, smo očistili z acetonom, nato pa na sredino odpipetirali 10 µl ponovno premešanega vzorca. Kapljice smo pol ure sušili v sušilniku na 30°C in do meritve naslednji dan shranili v plastičnih posodicah.

Vzorce iz razklopa smo za analizo Cd z AAS po potrebi redčili z 0,2% HNO₃.

4.4.3 Merjenje – rentgenska fluorescenčna spektroskopija (RFS)

Kvalitativne in kvantitativne analize talnih vzorcev in rastlinskega materiala smo izvajali z rentgensko fluorescenčno spektroskopijo. Osnova metode RFS je vzbujanje (ionizacija) atomov (predvsem v K in L lupini) in nato relaksacija vzbujenega (ioniziranega) atoma. V procesu relaksacije (prehod atoma v osnovno stanje) odda vzbujen atom odvečno energijo kot fluorescenčno oz. karakteristično sevanje, ki neposredno služi za določanje kvalitativne in kvantitativne sestave vzorcev. Za vzbujanje atomov v močno vezanih elektronskih nivojih (lupine K in L1 – L3) je več možnosti. Na podlagi načina vzbujanja obstajajo naslednje metode rentgenske spektrometrije:

Pri rentgenski fluorescenci (RF) atome vzbujamo s fotoni in razlikujemo po vzbujanju:

- a. RF z radioizotopskim vzbujanjem (XRF), pri čemer atome vzbujamo z radioaktivnimi izvori, kot so npr. ^{55}Fe , ^{109}Cd , ^{241}Am (monokromatsko vzbujanje).
- b. RF po vzbujanju z rentgenskimi žarki, ki izhajajo iz rentgenske cevi (polikromatsko vzbujanje).

Ob vzbujanju atomov s fotoni najpogosteje pride do fotoefekta – interakcije med fotonom in vezanim elektronom v atomu. V tem procesu se foton absorbira, del njegove energije se porabi za ionizacijo atoma, preostanek pa obdrži izbiti elektron kot kinetično energijo. Po izbitju elektrona (fotoelektrona) postane atom nestabilen, saj mu na eni izmed lupin manjka elektron. Ta primanjkljaj se nadomesti z elektroni iz višjih orbital v procesu, ki ga imenujemo radiacijski prehod. Razlike v energiji se izsevajo kot karakteristični fotoni rentgenske svetlobe, ki jo imenujemo rentgenska fluorescenčna svetloba.

Pri relaksaciji vzbujenega atoma pa radiacijskemu prehodu konkurira Augerjev prehod. Ta proces se pojavi zaradi dovolj velike energije električnega polja ioniziranega atoma, ki lahko odvečno energijo odda z izbitjem šibkeje vezanih elektronov. Gre za emisijo elektrona iz atoma s kinetično energijo, ki je določena z razliko med razpoložljivo energijo vzbujenega atoma in vezano energijo elektrona. RF zaradi možnosti Augerjevega prehoda, ki konkurira radiacijskemu prehodu, ni učinkovita za določanje elementov z atomskim (vrstnim) številom pod 20, še posebej tistih z atomskim številom pod 10, ker pri lažjih atomih Augerjev prehod prevladuje nad radiacijskim prehodom.

Ena od tehnik je tudi tehnika rentgenske fluorescence s totalnim odbojem (TXRF). Izredno majhen (nekaj μg) vzorec na optično gladki podlagi (kvarz) vzbujamo pod kotom manjšim od kritičnega kota za totalni odboj na podlagi ($\alpha \leq 1,8$ mrad). Vpadno sevanje iz rentgenske cevi vzbuja fluorescenco le v vzorcu, večina vpadnega sevanja pa se totalno odbije (sistem zato deluje kot monokromatski). Tako se v rentgenskem spektru močno zmanjša ozadje zaradi sipanja na podlagi in je občutljivost tehnike precej boljša kot pri standardni rentgenski fluorescenci (pod 10^{-12}g).

4.4.3.1 Priprava vzorcev

Za vsako metodo RFS je potrebna posebna priprava vzorca:

- metoda XRF: priprava tabletk (glej 4.3.2 Določanje celotnih koncentracij kovin v tleh - priprava tabletk)
- metoda TXRF: razklop (glej 4.4.1.3 Razklop rastlinskega materiala za metodo TXRF – v 1 ml vzorca smo dodali 10 μl internega standarda V ter dobro premešali; po 10 μl vzorca z V smo kanili na očiščeno kvartz stekelce in sušili v sušilniku do suhega)

4.4.3.2 Opis meritve

Eksperimentalni sistem XRF je sestavljen iz

- Si(Li) detektorja (EG&G ORTEC)
- spektroskopskega ojačevalca (M 2024, Canberra)
- analogno digitalnega pretvornika (M 8075, Canberra)
- večkanalnega analizatorja (S100, Canberra)
- računalniškega programa za zbiranje spektra

Meritve smo izvajali v vakuumski komori. Za fluorescenčno ekscitacijo smo uporabili americijev (^{241}Am ; 750 MBq) obročasti radioizotopni vir (Isotope Products Laboratories, U.S.A.). Energijska ločljivost spektrometra je bila 175 eV pri 5.9 keV.

Eksperimentalni sistem TXRF je sestavljen iz

- rentgenske cevi (AEG, Nemčija) z anodo iz molibdena (napetost 40 kV in tok 30 mA), ki je vir rentgenskega sevanja
- totalno refleksijskega modula, ki ga sestavljata fokusni sistem in monokromator, ki nam omogoča pravilno oblikovanje rentgenskega sevanja in natančno nastavitve vpadnega kota
- rentgenskega spektrometra, ki temelji na visoko ločljivostnem polprevodniškem Si (Li) detektorju (Princeton Gamma Tech Co, ZDA, FWHM). Elektronski sistem detektorja sestavljajo visoko napetostni vir, ojačevalnik, analogno digitalni pretvornik (ADC) in večkanalski analizator. Vse enote se združene v integriranem signalnem procesorju M 1520 in MCA računalniški kartici S100 (Canberra). Ločljivost je 140 keV pri energiji 5,9 keV.

4.4.3.3 Analiza spektra in kvantitativna analiza

- metoda XRF: analizo spektrov smo izvedli z AXIL, kvantitativno analizo pa z QUAES računalniškim programom. Kvantitativna analiza temelji na izmerjeni absorpciji Mo, ki predstavlja matriko za obdelavo spektra
- metoda TXRF: analizo spektrov smo izvedli z AXIL, kvantitativno analizo pa z QUAES računalniškim programom. Kvantitativna analiza temelji na internem standardu (V)

4.5 Ocenjevanje kolonizacije arbuskularne mikorize

4.5.1 Vzorčenje in barvanje koreninskih fragmentov

Opazovanje glivnih struktur pod svetlobnim mikroskopom nam omogoča selektivno barvanje hitina, ki je sestavni del celične stene simbiotske glive. Metoda je povzeta po Schaeffer in Peterson (1993).

Oprane sveže vzorce korenin smo razporedili v označene epruvete. Korenine smo prelili z raztopino A, ki smo jo pripravili tako, da smo za 100 ml končne raztopine vmešali 25 ml 0,2 M Tris pufra (pH 7,4), 25 ml (4mg/ml) nitroblue tetrazolium soli (NBT), 10 ml 0,05 M magnezijevega diklorida ($MgCl_2$), 30 ml bidestilirane vode in 10 ml 2,5 M Na sukcinata (diNa sukcinat * $6H_2O$). Namočene korenine smo čez noč pustili v temi na sobni temperaturi. Korenine smo nato trikrat sprali z bidestilirano vodo in fiksirali najmanj eno uro v temi v raztopini formol-saline. 100 ml raztopine smo pripravili tako, da smo v 90 ml destilirane vode odpipetirali 10 ml formaldehida (37-40%) ter dodali 0,9 g NaCl.

Korenine smo nato trikrat sprali z bidestilirano vodo in jih presvetlili z 5% KOH v 24 urah na 55°C. Nato smo trikrat sprane korenine zakisali v 1% HCl v 3 min. Za barvanje celotne kolonizacije smo korenine pustili 1 uro na 55°C v raztopini C, ki smo jo pripravili tako, da smo za 100 ml končne raztopine vmešali 87,4 ml 85% mlečne kisline, 6,3 ml glicerina, 6,3 ml bidestilirane vode in 0,01 g kislega fuksina. Korenine smo nato dvakrat sprali z vodo, jih stresli v petrijevko in narezali na 1 cm dolge fragmente in jih 30 zložili na objektna stekelca.

Vse korenine smo na stekelcih pokapali z laktofenolom brez fenola in pokrili s krovnim stekelcem. Nevitalni del arbuskularno mikoriznih gliv je bil tako obarvan svetlo roza v vitalnih delih pa so temno vijolične oborine formazana. Korenine smo nato takoj pregledali, saj formazan na svetlobi razpada.

4.5.2 Ocenjevanje stopnje kolonizacije AM

Ocenjevanje stopnje kolonizacije AM (Trouvelot s sod. 1986) smo izvedli na 30 naključno izbranih koreninskih odsekov, ki smo jih pregledali pod svetlobnim mikroskopom (Axioskop, Opton Feintechnik GmbH) in ocenili stopnjo mikorizne kolonizacije s 6 stopenjsko lestvico. AM parametre, katerih pomeni so razloženi v tabeli 1, smo izračunali s formulami.

Mikorizna frekvenca:

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

Splošna inteziteta mikorize:

$$M\% = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / \text{št. vseh korenin} \quad \dots(2)$$

Kjer je $n_1, n_2 \dots n_5$ – št.odsekov z gostoto mikorizne kolonizacije v posameznih razredih

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

$$m\% = M * (\text{št. vseh korenin}) / (\text{št. mikoriznih korenin}) = M * 100 / F \quad \dots(3)$$

Tabela 1: Arbuskularno mikorizni parametri in njihova razlaga

AM parameter	Razlaga
F%	mikorizna frekvenca – predstavlja frekvenco fragmentov z glivo in je povezana s številom in homogenostjo razporeditve AM propagulov v tleh
M%	splošna inteziteta mikorize – splošna ocenitev mikorizne infekcije koreninskega sistema
m%	inteziteta mikorize v koloniziranih koreninskih odsekih – inficiranost koreninskega sistema, ko je glivnega inokuluma v tleh malo (F% je nizek)

4.6 Statistika

Podatke smo obdelali z neparametrično statistiko s Kruskal – Wallis testom. Razlike med povprečji smo testirali z Mann-Whitney U testom ter tako določili podobnost ali različnost med razvojnimi stadiji rastline $p < 0,05$. Za izračun korelacij smo uporabili Pearsonov korelacijski koeficient (r). Vse statistične teste smo izvedli s pomočjo Statistica Statsoft® (verzija 6.0).

5 REZULTATI

5.1 Analize tal

5.1.1 Koncentracije Zn, Cd in Pb

Visoke vrednosti celotnih koncentracij Zn, Cd in Pb smo izmerili v vseh vzorcih tal z najvišjimi vrednostmi 2700 mg Zn/kg, 150 mg Cd/kg in 37600 mg Pb/kg (tabela 2). Povprečne koncentracije Zn, Cd in Pb ekstrahirane z amonijevim acetatom predstavljajo 3,3-11,3% celotnega Zn, 14,5-40,4% celotnega Cd in 5,0-19,3% celotnega Pb (tabela 2; priloga 2). Koncentracije dostopnih Zn, Cd in Pb v tleh statistično značilno ($p < 0,05$) pozitivno korelirajo z naraščajočimi celotnimi koncentracijami (tabela 3).

Tabela 2: Celotne koncentracije Zn, Cd in Pb (mg/kg SM) v talnih vzorcih, izmerjene z metodo XRF. Prikazane so vrednosti, ki smo jih dobili po obdelavi spektra 2000 s dolge meritve ene tabletko tal na vzorec ter dostopne koncentracije kovin (mg/kg SM) v talnih vzorcih, ekstrahirane z amonijevim acetatom in izmerjeno povprečje \pm standardna napaka. VP – vegetativna faza, FI – faza indukcije cvetenja, FP – faza cvetenja, SP – faza semenitve, SC – faza senescence; SM – suha masa

Razvojne faze	Celotna koncentracija v tleh			Dostopna koncentracija v tleh		
	Zn (mg/kg SM)	Cd (mg/kg SM)	Pb (mg/kg SM)	Zn (mg/kg SM)	Cd (mg/kg SM)	Pb (mg/kg SM)
VP	1067 \pm 380	79 \pm 26	9227 \pm 2870	37 \pm 11	16 \pm 6	557 \pm 110
FI	928 \pm 112	62 \pm 5	21797 \pm 8454	42 \pm 4	15 \pm 2	938 \pm 305
FP	1221 \pm 363	84 \pm 24	17018 \pm 4303	107 \pm 46	30 \pm 11	2648 \pm 766
SP	1438 \pm 494	99 \pm 18	12240 \pm 3511	99 \pm 30	28 \pm 4,4	1306 \pm 443
SC	1393 \pm 433	90 \pm 20	20280 \pm 4165	72 \pm 20	22 \pm 6,8	2233 \pm 472

Večina izmerjenih koncentracij Zn, Cd in Pb močno presega z zakonom določene kritične vrednosti kovin v tleh za Slovenijo (720 mg/kg Zn, 12 mg/kg Cd, 530 mg/kg Pb), kar je posledica dolgoletnega delovanja predelovalnice in topilnice svinca v Žerjavu.

Tabela 3: Pearsonovi korelacijski koeficienti dostopnih koncentracij (dost.) Zn, Cd in Pb s celotnimi koncentracijami (tot.) Zn, Cd in Pb v tleh. ns – ni statistično značilno, $p < 0,001$ ***.

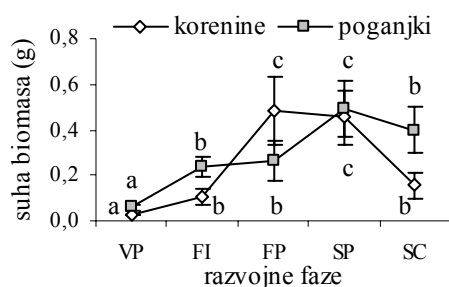
koncentracija v tleh	Zn celotna	Cd celotna	Pb celotna
Zn dostopna	$r = 0,79$ ***	$r = 0,74$ ***	ns
Cd dostopna	$r = 0,74$ ***	$r = 0,85$ ***	ns
Pb dostopna	ns	ns	$r = 0,80$ ***

V talnih vzorcih smo izmerili 10-50% organske snovi, pH (5,9-7,5) in od 0,3-4,8 mg/kg dostopnega fosforja (priloga 2).

5.2 Analize rastlin

5.2.1 Biomasa

Rastlinska biomasa korenin je naraščala do faze cvetenja, biomase rastlin v fazi senescence pa so bile manjše, medtem ko je biomasa rozete dosegla vrh v fazi semenitve (slika 3; priloga 2).



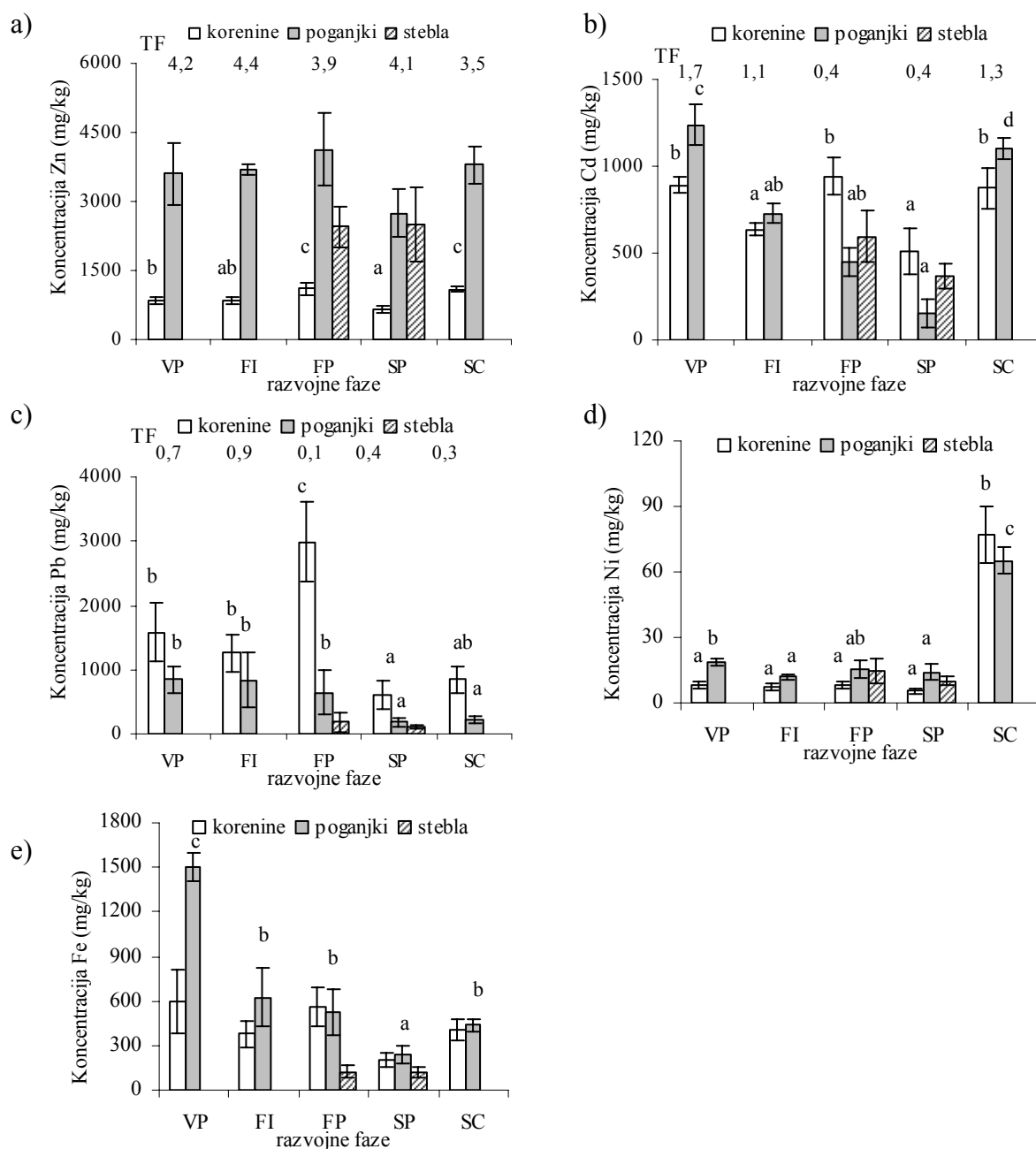
Slika 3: Rastlinska biomasa (g) korenin in poganjkov v posamezni razvojni fazi življenjskega cikla *T. praecox* (povprečje \pm standardna napaka, $n=3-5$). Različne črke označujejo statistično razliko Mann-Whitney U test.

5.2.2 Koncentracije elementov v rastlini

5.2.2.1 Koncentracije elementov v posamezni razvojni fazi in translokacijski faktor

Koncentracije Cd, Pb in Ni v koreninah in poganjkih, Zn v koreninah in Fe v poganjkih so se značilno spreminjale skozi rastni cikel *T. praecox* ($p < 0,05$). Najnižje koncentracije Zn, Cd, Pb, v koreninah ter najnižje koncentracije Cd, Pb in Fe v poganjkih so bile v fazi semenitve, medtem ko so koncentracije Cd in Fe v listih dosegle svoj vrh v vegetativni fazi, Ni pa v fazi senescence (slika 4; priloga 3). Med razvojnimi stadiji pa se niso značilno spreminjale koncentracije P, S, Cu, K, Ca in Mn. Med koncentracijami Zn, Cd in Pb v poganjkih in koreninah ter celotnimi koncentracijami teh elementov v talnih vzorcih ni statistično značilne odvisnosti ($p > 0,05$). Obstajala pa je statistično značilna korelacija ($p < 0,05$) med koncentracijami le-teh v koreninah in poganjkih, za Zn $r = 0,55$, za Cd $r = 0,49$ in za Pb $r = 0,47$.

Mobilnost elementa v rastlini smo določili z razmerjem poganjki/korenine – translokacijski faktor (TF). Vrednosti razmerja za Zn so se gibale med 2,5 in 5,5 (povprečno 4,0), za Cd med 0,2 in 2,3 (povprečno 0,9) in za Pb med 0,04 in 1,5 (povprečno 0,4). Povprečna vrednost razmerja poganjki/korenine > 1 za Zn kaže na učinkovit transport privzetega Zn v poganjke. V koreninah je bilo nakopičeno povprečno 81% Pb (slika 4; priloga 3). Med razmerji koncentracij poganjki/korenine kovin in celotnih koncentracij Zn, Cd in Pb v talnih vzorcih ni bilo statistično značilne korelacije ($p > 0,05$), kot tudi med razmerji koncentracij poganjki/korenine kovin in topnih koncentracij Zn, Cd in Pb v talnih vzorcih.

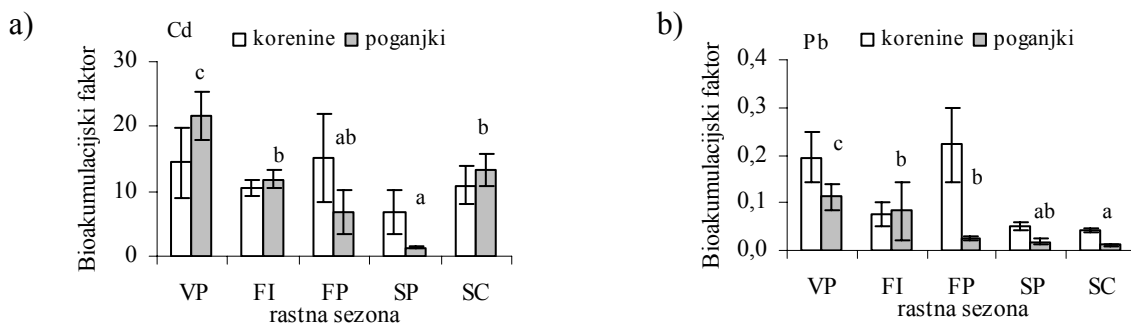


Slika 4: Koncentracije a) Zn, b) Cd, c) Pb, d) Ni in e) Fe (mg/kg SM) v koreninah, poganjkih in cvetnih steblih v posamezni razvojni fazi življenjskega cikla *T. praecox*. TF – translokacijski faktor (razmerje koncentracij poganjki/korenine) za elemente v posamezni fazi. (povprečja ± standardna napaka, n=3-5). Različne črke nad stolpci označujejo statistično razliko Mann-Whitney U test.

5.2.2.2 Bioakumulacijski faktorji

Bioakumulacijske faktorje (BAF) smo izračunali kot razmerje med koncentracijami kovin v koreninah oz. poganjkih ter celotnimi koncentracijami kovin v talnih vzorcih. Bioakumulacijski faktor nam pove, za koliko se koncentracije kovin v koreninah oz. poganjkih razlikujejo od koncentracij kovin v talnih vzorcih. Koncentracije Zn v poganjkih in koreninah so bile višje od celotnih koncentracij v talnih vzorcih do 2,5-krat za korenine

in do 8,8-krat za poganjke. Koncentracije Cd v koreninah so bile do 35,7-krat, v poganjkih pa do 28,7-krat višje od celotnih koncentracij Cd v talnih vzorcih. Koncentracije Pb v koreninah in poganjkih so bile nižje od celotnih koncentracij kovin v talnih vzorcih do 0,4-krat za korenine in 0,2 za poganjke. Bioakumulacijski faktor poganjkov se je glede na rastno sezono spreminjal pri Cd in Pb (slika 5; priloga 3).



Slika 5: Bioakumulacijski faktorji (BAF) a) Cd, in b) Pb korenin in poganjkov glede na rastno sezono *T. praecox*. (povprečja ± standardna napaka, n=3-5). Različne črke nad stolpci označujejo statistično razliko Mann-Whitney U test.

5.2.3 Koncentracija elementov glede na ontogenezo starost

Med koncentracijami elementov v mladih, zrelih in starih listih ni bilo statistično značilnih razlik $p > 0,05$ (tabela 4; priloga 4).

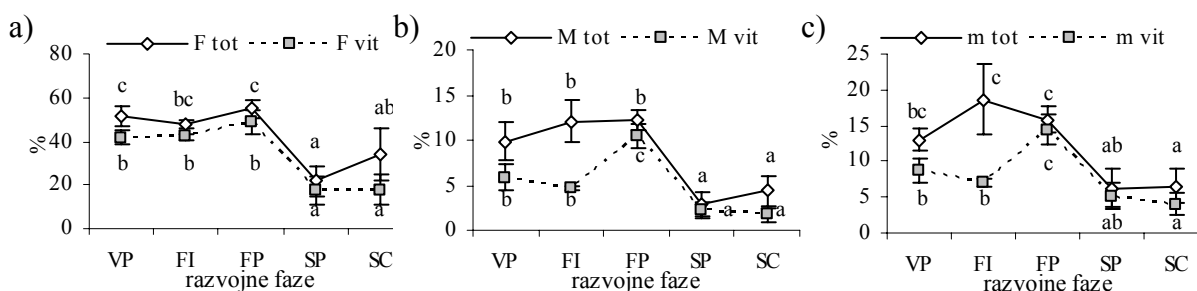
Tabela 4: Koncentracije elementov (mg/kg SM) v mladih, zrelih in starih listih, izmerjene z metodo TXRF. Prikazano je izmerjeno povprečje ± standardna napaka.

koncentracija (mg/kg SM)	mladi listi	zreli listi	stari listi
Zn	3406 ± 755	3657 ± 549	3759 ± 546
Cd	1038 ± 233	1119 ± 295	994 ± 229
Pb	100 ± 28	106 ± 37	200 ± 65
Ni	76 ± 31	53 ± 35	35 ± 8,4
Fe	1064 ± 459	630 ± 405	443 ± 143
P	3753 ± 1012	2636 ± 561	2948 ± 593
S	7213 ± 1476	6540 ± 1481	5037 ± 1166
Ca	13770 ± 2439	17300 ± 2648	19390 ± 3669
K	13858 ± 3066	13086 ± 2517	11546 ± 3236
Cu	46 ± 19	32 ± 19	24 ± 7,9
Mn	108 ± 29	89 ± 32	62 ± 25

5.3 Arbuskularna mikoriza

5.3.1 Kolonizacija rastlin

Frekvenca mikorizne kolonizacije (F%) se je gibala med 0 in 62%, frekvenca vitalne mikorizne kolonizacije pa od 0 do 61%, splošne intezitete mikorizne kolonizacije (M%) do 16,5%, vitalne intezitete mikorizne kolonizacije (M vit %) pa do 10,5%, intezitete mikorizne kolonizacije v koloniziranih odsekih (m%) do 18,7%, vitalne inteziteta mikorizne kolonizacije v koloniziranih odsekih pa do 14,5%. Največja kolonizacija AM gliv je bila v fazi cvetenja (F=55%), nato je upadla. Splošna inteziteta mikorize je naraščala do faze cvetenja (M=12%) in upadla v SP fazi, inteziteta mikorize v koloniziranih odsekih je bila najvišja v fazi indukcije cvetenja, vitalna inteziteta v koloniziranih odsekih pa je dosegla vrh v fazi cvetenja (slika 6).



Slika 6: Delež kolonizacije celotne in vitalne a) mikorizna frekvenca (F%), b) splošna inteziteta mikorize (M%) ter c) inteziteta mikorize v koloniziranih koreninskih odsekih (m%) glede na rastno sezono. (povprečja ± standardna napaka, n=3-5). Različne črke nad točkami označujejo statistično razliko Mann-Whitney U test.

AM parametri in celotna ter dostopna koncentracija kovin v tleh so statistično značilno ($p < 0,05$) negativno korelirali (tabela 4).

Tabela 5: Pearsonovi korelacijski koeficienti celotnih koncentracij in dostopnih koncentracij kovin v tleh s kolonizacijo rastlin. tot – celotna mikorizna kolonizacija, vit – vitalna mikorizna kolonizacija, ns – ni statistično značilno, $p < 0,05$.

	F% tot	m% tot	F% vit	M% vit
celoten Cd	$r = -0,51^*$	ns	$r = -0,54^*$	$r = -0,47^*$
dostopen Cd	$r = -0,43^*$	ns	$r = -0,45^*$	ns
dostopen Zn	ns	ns	$r = -0,51^*$	ns

5.3.1.1 Koncentracije elementov in mikorizna kolonizacija

AM parametri so statistično pozitivno ($p < 0,05$) korelirali s koncentracijo Cd v koreninah, koncentracijo Pb v koreninah in poganjkih, koncentracijo Ca v koreninah in koncentracijo Fe v koreninah in poganjkih (tabela 5).

Tabela 6: Pearsonovi korelacijski koeficienti koncentracij elementov v koreninah in poganjkih s kolonizacijo rastlin. ns – ni statistično značilno, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$.

koncentracije	F% tot	M% tot	m% tot	F% vit	M% vit	m% vit
Korenine Cd	$r = 0,45^*$	ns	ns	ns	ns	ns
Korenine Pb	$r = 0,70^{***}$	$r = 0,75^{***}$	$r = 0,65^{**}$	$r = 0,74^{***}$	$r = 0,77^{***}$	$r = 0,60^{**}$
Korenine Ca	$r = 0,54^*$	ns	ns	$r = 0,54^*$	ns	ns
Korenine Fe	$r = 0,45^*$	ns	ns	ns	ns	ns
Poganjki Pb	$r = 0,56^{**}$	$r = 0,74^{***}$	$r = 0,68^{***}$	$r = 0,58^{**}$	$r = 0,61^{**}$	ns
Poganjki Fe	$r = 0,69^{***}$	$r = 0,48^*$	ns	$r = 0,56^{**}$	ns	ns

6 RAZPRAVA

6.1 Tolerančne strategije na Zn, Cd in Pb

Koncentracije elementov v rastlinskih vzorcih so odvisne od celotne vsebnosti v tleh. Ker so elementi v tleh dostopni, vezani na organske snovi, vezani z manganom in železovimi oksidi ter del mineralnih struktur, je njihova dostopnost posledica dinamičnega ravnotežja (Adriano, 2001). V rizosfernih tleh vrste *Thlaspi praecox* smo opazili pozitivno korelacijo med dostopnimi koncentracijami in celotnimi koncentracijami Zn, Cd in Pb v tleh. Tolerančna strategija *T. praecox* na povišane koncentracije Zn, Cd in Pb v tleh je po Baker (1981) akumulacija Zn in Cd, potrdili smo tudi hiperakumulacijo Cd, ter izključevanje Pb. *T. praecox* nabran na lokaciji P3 je kopičil 0,6% Zn, 0,2% Cd in 0,1% Pb, nabran na lokaciji z bistveno višjimi celotnimi koncentracijami kovin v tleh pa je sposoben kopičiti do 1,5% Zn, 0,6% Cd in 0,4% Pb v poganjkih (Vogel-Mikuš s sod., 2005). Nižje koncentracije v rastlinah v tem diplomskem delu si razlagamo z nižjimi koncentracijami kovin v tleh, ki smo jih izmerili na ploskvi P3, saj so maksimalne koncentracije manj onesnaženega območja znašale 2700 mg/kg Zn, 150 mg/kg Cd in 37600 mg /kg Pb, bolj onesnaženega pa 5490 mg/kg Zn, 390 mg/kg Cd in 67940 mg/kg Pb (Vogel-Mikuš s sod., 2005). Tudi dostopna frakcija kovin je bila nižja. Translokacijska faktorja *T. praecox* za Zn in Cd sta večja od 1, kar kaže na zelo učinkovit transportni sistem za Zn in Cd, ki je verjetno podoben *T. caerulescens* (Lasat s sod, 2000; Lombi s sod., 2000). Izmerjene koncentracije kovin v poganjkih ne presegajo mejne hiperakumulacijske koncentracije za Zn, koncentracije Cd in Pb pa presegajo vrednosti za hiperakumulacijo, vendar je po Baker (1981) izključevanje tolerančna strategija za Pb, saj ga ostaja 81% imobiliziranega v koreninah, kar je značilnost tudi ostalih vrst rodu *Thlaspi* (Dahmani-Muller s sod., 2000).

Bioakumulacijski faktorji so pomembnejši za ocenjevanje potencialne vrednosti za fitoremediacijo kot koncentracije kovin v poganjkih (Zhao s sod., 2003), pomembna pa je tudi stopnja onesnaženosti tal. Vrednosti BAF pri *Thlaspi praecox* so znašale za Zn do 9, Cd do 29 in pod 1 za Pb. Ti rezultati so nižji od vrednosti za *T. caerulescens*, ki so Zn 40, Cd 75 ter pod 1 za Pb (Zhao s sod., 2003). Zaradi velike mobilnosti Cd so bile prisotne hiperakumulacijske koncentracije Cd tudi v cvetnih steblih. BAF vrednosti v glavnem padajo z naraščanjem koncentracij kovin v tleh (Zhao s sod, 2003). Padeč v akumulaciji je lahko posledica nasičenja privzema in/ali transporta iz korenin v poganjke, ko je koncentracija v rastlini visoka. BAF so odvisni od celotne koncentracije kovin v tleh, saj obstaja statistično značilna korelacija za Zn in Cd. Pri *T. caerulescens* pride pri visokih koncentracijah kovin v tleh do aktivacije transportnega sistema Zn/Cd z nizko afiniteto (Lasat s sod., 1996).

Nihanja koncentracij kovin v sezoni so različna pri različnih vrstah, saj na bioakumulacijo Cd vpliva fenologija, čas, koncentracija Cd v koreninah in dostopni Cd v tleh, ostale lastnosti tal in mikroflora (Deram s sod., 2006). Najboljša razlaga za akumulacijo v poganjkih je razvojni stadij rastline, potrebno pa je upoštevati tudi kinetiko translokacije in lokalizacijo elementov v rastlini (Kabata – Pendias s sod., 1993). Koncentracija Zn upade v fazi semenja, torej poleti, kot pri travah, kjer je koncentracija najnižja poleti in zopet naraste v fazi senescence (Deram s sod., 2006), koncentracija Cd v poganjkih pa upade že v fazi cvetenja. Padeč koncentracije elementov v rastlini je posledica dilucijskega efekta, zaradi pospešene rastlinske rasti poleti (Brekken in Steinnes, 2004; Rains, 1971), jeseni pa ne prihaja več do velikih sprememb v rastlinski biomasi in koncentracija kovin naraste (Gjengedal, 1996).

Zaradi dilucijskega efekta je potrebno upoštevati tudi vsebnost elementov, ki je produkt koncentracij v rastlini z maso rastlin v posamezni fazi. Vsebnost Zn v rastlini je skozi sezono ves čas naraščala kar kaže na stalno črpanje kovine v rastlino (Matthews in Thorton, 1982). Pri *T. praecox* se je translokacijski faktor za Cd v reprodukcijski fazi zmanjšal pod 1, kar kaže na omejen transport te kovine iz korenin v poganjke, ter s tem tudi v semena, kar je strategija tolerance težkih kovin (Brekken in Steinnes, 2004), tudi *T. caerulescens* ima visoko razvito stopnjo tolerance na Cd (Reeves in Brooks, 1983). Kot *T. caerulescens* ima tudi *T. praecox* restrikcijo privzema Pb in Zn v semena (Vogel-Mikuš s sod., 2007). Pb ostane v glavnem vezan v celičnih stenah in vakuolah korenin (Dahmani-Muller s sod., 2000), Zn pa je večinoma v vakuolah listnih epidermalnih celic (Frey s sod., 2000).

Organski fosfor v tleh variira skozi sezono. Količina fosforja narašča proti zimi in upade spomladi, ko pride do povečane mineralizacije, zaradi povečane aktivnosti mikroorganizmov, in velikega privzema P v rastlino (Chen s sod., 2003). Sezonska nihanja elementov so značilnejša za listopadna drevesa, da ne pride do prevelike izgube ob absciziji ter da se shranijo elementi pomembni za razvoj listov spomladi. *T. praecox* kot trajnica nima značilnega upada P in K (Fricks s sod., 2001), ki sta visoko mobilna, ampak sta v senescenci celo narastla, enakomerno porazdeljena ne glede na starost listov. Ca je nemobilni element, privzem je v glavnem pasiven in je odvisen od dostopnosti v tleh in transpiracije, njegova vsebnost v listih pa je naraščala skozi sezono (Fricks s sod., 2001). Večina Ca je bila prisotna v poganjkih z najvišjo koncentracijo v starih listih, najmanj pa v koreninah. Statistično značilne negativne korelacije med K in Ca v poganjkih, so verjetno odraz antagonističnega odnosa teh dveh nutrientov (Mullen in Schmidt, 1993). Zaradi pozitivne korelacije koncentracij Cd, Fe, Zn in Cu pri *T. praecox*, obstaja možnost povezave privzema, transporta in/ali akumulacije med temi kovinami kot je prisotna pri *T. caerulescens*, hiperakumulacija Cd pa je povezana z višjo koncentracijo Zn, Fe in Cu (Zha

s sod., 2004). Pri *T. caerulescens* Cd vstopa v celice s pomočjo visoko afinitetnih transporterjev za Fe (Lombi s sod., 2001), pozitivna korelacija kaže na to možnost tudi pri *T. praecox*. Prisotna je bila tudi pozitivna korelacija K in Mn s koncentracijami Cd in Zn v koreninah ter Ni s koncentracijami Cd in Zn v poganjkih. Obstaja tudi pozitivna korelacija med Cu, Pb z Fe in Mn, saj so Cu, Cr in Pb so razmeroma nemobilni elementi v tleh in večinoma vezani na organsko snov ali pa Fe in Mn okside (Berti s sod., 1998). Korelacija je tudi med koncentracijami Ca in Cd v cvetnih steblih, saj so nutrienti večinoma transportirani v semena iz listov po floemu, kar lahko omogoči tudi transport nekaterih kovin (Patrick, 1997).

6.2 Mikoriza

Lastnosti tal vplivajo na razvoj mikorize, saj visoke koncentracije P omejujejo ali zavrejo tvorbo arbuskularne mikorize. Lahko gre za neposredni vpliv P na zunanje hife ali pa posreden vpliv statusa P v rastlini (Ruotsalainen s sod., 2002). Ker je P glavni element, ki se prenaša skozi hife arbuskularne mikorize (Smith in Read, 1997), je P v tleh izbran kot glavni parameter. Sama kolonizacija ni korelirala s koncentracijami rastlinam dostopnega P v tleh, saj so verjetno rastline same pridobile P iz tal (Ruotsalainen s sod., 2002). Poleg P na mikorizo vplivajo tudi koncentracije kovin v tleh. Največja kolonizacija je navadno prisotna na manj onesnaženih lokacijah (Pawłowska s sod., 1996), tudi *T. praecox* ima najvišjo stopnjo kolonizacije na izbrani lokaciji, v primerjavi z ostalimi lokacijami, kjer so koncentracije Zn, Cd in Pb bistveno višje (Regvar s sod., 2006). Tudi ostali elementi v tleh vplivajo na razvoj, saj ima K stimulacijski vpliv na mikorizo, vendar pa je potrebno upoštevati tudi koncentracijo ostalih ionov kot je npr. Ca (Mullen in Schmidt, 1993).

Največja prednost AM je povečanje privzema esencialnih elementov z ekstraradikalnim micelijem, istočasno pa AM zmanjša rastlinski privzem in/ali fitotoksične efekte Zn, Cd in Pb (Gildon in Tinker, 1983; Vogel-Mikuš s sod., 2006) v drugih primerih pa se poveča privzem le-teh (Killham in Firestone, 1983). Razlika v rezultatih je posledica različnih dejavnikov kot so rastlinska kapaciteta za privzem elementov, gostota korenin, lastnosti glive, adsorbcija na hitin v stenah hif ter tal (Joner in Leyval, 2001). Prisotnost AM se spreminja glede na vrsto rastline, ter potreba rastlin po mikorizi skozi razvoj (Fitter, 1991). Novejše raziskave kažejo, da se AM *T. praecox* pojavlja, ko rastlina potrebuje več esencialnih elementov, najbolj v reproduktivni periodi (Vogel-Mikuš s sod., 2006). Frekvenca mikorize je najvišja v fazi cvetenja, saj je višji privzem esencialnih elementov v rastlino pomemben v reprodukcijski fazi za razvoj bolj kvalitetnih semen, kar je pomembno na apnenčastih tleh in onesnaženih območjih s Zn, Cd in Pb (Marschner, 1995). Mikorizni parametri so pozitivno statistično korelirali s privzemom Fe v korenine, kar je posledica povezanega mehanizma za privzem in transport kadmija (Zha s sod., 2004). Spremembe v privzemu Zn, Cd in Pb predstavljajo AM kot tolerančno strategijo na

onesnaženih tleh, saj ni bilo statistično značilnega višanja koncentracij kovin v rastlini pri naraščanju koncentracij kovin v tleh, ampak so koncentracije v rastlinah ostajale konstantne, kar poveča možnost rasti na kontaminiranih tleh (Vogel-Mikuš s sod., 2006). Tudi BAF faktor privzema Cd v rastlino je bil nizek v reproduktivni fazi. Prisotna pa je bila statistično značilna korelacija med mikorizo ter Cd v tleh in v koreninah, saj hife adsorbirajo Cd na površino mikrofibrilarne celične stene s procesi kot so ionska izmenjava, kompleksacija, precipitacija in kristalizacija (Joner s sod., 2000).

7 SKLEPI

- Potrdili smo hiperakumulacijo Cd in Pb, saj smo v poganjkih izmerili več kot 100 mg/kg SM Cd in več kot 1000 mg/kg SM Pb. Koncentracije Zn niso presegle mejnih hiperakumulacijskih koncentracij.
- Zn in Cd se v večji meri kopičita v poganjkih, Pb pa ostaja večinoma vezan v koreninah, zato je strategija privzema Pb izključevanje.
- Ugotovili smo, da rastlina hiperakumulira Cd tudi v cvetnih steblih.
- Obstaja možnost, da so privzem, transport in/ali akumulacija Cd, Fe, Zn in Cu povezani.
- Potrdili smo, da se mikorizna kolonizacija pojavlja na hiperakumulacijskih rastlinah, tudi predstavnikov družine križnic, ko rastlina potrebuje večji dostop do nutrientov. Največ v reproduktivni fazi kar omogoča nastanek kvalitetnejših semen.
- Arbuskularna mikoriza je tolerančna strategija na tleh obogatenih s težkimi kovinami, saj se ob višanju koncentracij kovin v tleh ne višajo koncentracije kovin v rastlini, ampak ostajajo konstantne.
- Mikoriza je vplivala tudi na koncentracije Fe v rastlini.

8 POVZETEK

Thlaspi praecox ima izredno sposobnost kopičenja Zn, Cd in Pb ta pa je odvisna od stadija rastline.

Rastline nabrane v Žerjavu smo analizirali v različnih stadijih. Izmerili smo povišane koncentracije kovin v talnih vzorcih in v rastlinskem materialu, koncentracije mineralov v rastlini in mikorizno kolonizacijo.

Celotne koncentracije kovin v tleh smo izmerili z različnimi metodami rentgenske fluorescenčne spektroskopije. V talnih vzorcih smo ocenjevali tudi izmenljive koncentracije kovin z ekstrakcijo z amonijevim acetatom in vodo, ki smo jih izmerili na atomskem absorpcijskem spektrometru, določali vsebnost organske snovi, pH in dostopnega fosforja. Rastlinske vzorce smo razklopili s HNO₃. Na fragmentih korenin smo selektivno pobarvali strukture hitina ter ocenili stopnjo mikorizne kolonizacije.

Proučili smo privzem Zn, Cd in Pb v rastlino ter potrdili hiperakumulacijo Cd in Pb, medtem ko koncentracije Zn niso dosegle mejnih hiperakumulacijskih koncentracij.

Proučili smo kopičenje Zn, Cd in Pb na organskem nivoju glede na razvojne stadije rastline. Ugotovili smo, da se večina Zn in Cd kopiči v poganjkih, Pb pa je več v koreninah. Glede na razvojne faze so koncentracije Cd v poganjkih najnižje v reprodukcijski fazi, koncentracije Zn se bistveno ne spreminjajo, Pb pa tekom sezone padajo.

Koncentracije nutrientov v listih v reprodukcijski fazi so nižje od ostalih faz, saj se večina nutrientov transportira v cvetne poganjke. Obstaja možnost, da imajo Fe, Cu, Cd in Zn skupni privzem, transport in/ali akumulacijo.

Proučili smo mikorizno kolonizacijo v različnih razvojnih fazah. Ugotovili smo, da je stopnja mikorizne kolonizacije največja v reprodukcijskem obdobju rastline, saj omogoča večji dostop do nutrientov ter zavira dostop Cd v rastlino.

9 LITERATURA

- Adriano D. C. 2001: *Trace elements in terrestrial environments. Biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals*. New York: Springer-Verlag.
- Arnon D. I., Stout R. R. 1939: *The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper*. *Plant Physiology* 14: 371 – 375.
- Baikalova A. S., Onipchenko V. G. 1988: *Mycosymbiotrophism of alpine species in the Teberda Reserve. V: Investigations of plant communities in the nature reserves*. Onipchenko V. G., Petelin D. A. (ur.). CNIL Glavokhoty RSFSR, Moscow.: 93 – 107.
- Baker A. J. M. 1981: *Accumulator and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals*. *Journal of plant nutrition* 3: 643 – 654.
- Baker A. J. M., Reeves R. D, Hajar A. S. M. 1994: *Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte Thlaspi caerulescens J. & C. Presl (Brassicaceae)*. *New Phytologist* 127: 61-68.
- Berti W. R., Cunnungham S. D., Cooper E. M. 1998: *Case studies in the field – in place inactivation and phytoremediation of Pb contaminated sites. V: Metal contaminated soils: in situ inactivation and phytoremediation*. Vangronsveld J., Cunningham S. D. (ur.). New York, Springer: 235 – 248.
- Bonfante P., Perotto S. 1995: *Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants*. *New Phytologist* 130: 3 – 21.
- Brekken A., Steinnes E. 2004: *Seasonal concentrations of cadmium and zinc in native pasture plants: consequences for grazing animals*. *Science of the Total Environment* 326: 181 – 195.
- Brooks R. R. 1998: *Geobotany and hyperaccumulators. V: Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals. Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining*. Brooks R. R. (ur.). NY, USA, CAB International.: 55 – 95.
- Chen C. R., Condrón L. M., Davis M. R., Sherlock R. R. 2003: *Seasonal changes in soil phosphorus and associated microbial properties under adjacent grassland and forest in New Zealand*. *Forest Ecology and Management* 177: 539 – 557.
- Dahmani-Muller H., van Oort F., Gélie B., Balabane M. 2000: *Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter*. *Environmental Pollution* 109: 231 – 238.
- Deram A., Denayer F. O., Petit D., Haluwyn C. 2006: *Seasonal variations of cadmium and zinc in Arrhenatherum elatius, a perennial grass species from highly contaminated soils*. *Environmental pollution* 140: 62 – 70.
- Ericsson T. 1994: *Nutrient dynamics and requirements of forest crops*. *New Zealand Journal of Forestry Science* 24: 133 – 68.

- Ericsson T., Kähr M. 1995: *Growth and nutrition of birch seedlings at varied relative addition rates of magnesium*. *Tree Physiology* 15: 85 – 93.
- Ernst W. H. O., Verkleij J. A. C., Schat H. 1992: *Metal tolerance in plants*. *Acta Botanica Neerlandica* 41: 229 – 248.
- Ernst W. H. O. 1996: *Bioavailability of heavy metals and decontamination of soil by plants*. *Applied Geochemistry* 11: 136-167.
- Fitter A. H. 1991: *Costs and benefits of mycorrhizas: implications for functioning under natural conditions*. *Experientia* 47: 350 – 355.
- Frey B., Keller C., Zierold K., Schulin R. 2000: *Distribution of Zn in functionally different leaf epidermal cells of the hyperaccumulator Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell and Environment* 23: 675 – 687.
- Fricks Y., Ericsson T., Sennerby-Forsse, L. 2001: *Seasonal variation of macronutrients in leaves stems and roots of Salix dasyclados Wimm. grown at two nutrient levels*. *Biomass and Bioenergy* 21: 321 – 334.
- Gildon A., Tinker P. B. 1983: *Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. I. The effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas*. *New Phytologist* 95: 247 – 261.
- Gjengedal E. 1996: *Effects of soil acidification on foliar leaching and retranslocation of metals in vascular plants*. *Water Air Soil Pollution* 86: 221 – 234.
- Hall J. L. 2002: *Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance*. *Journal of Experimental Biology* 53: 1 – 11.
- Hirrel M. C., Mehravaran H., Gerdemann J. W. 1978: *Vesicular-arbuscular mycorrhizae in the Chenopodiaceae and Cruciferae: do they occur?* *Canadian Journal of Botany* 56: 2813 – 2817.
- Joner E. J., Briones R., Leyval C. 2000: *Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium*. *Plant and Soil* 226: 227 – 234.
- Joner E. J., Leyval C. 2001: *Time course of heavy metal uptake in maize and clover as affected by root density and different mycorrhizal inoculation regimes*. *Biology and Fertility of Soils* 33: 351 – 357.
- Kabata-Pendias A., Pitrowska M., Dudka S., 1993: *Trace metals in legumes and monocotyledons and their suitability for the assessment of soil contamination*. V: *Plants as Biomonitors – Indicators for Heavy Metals in Terrestrial Environment*. Markert, B. (ur.). VCH, Weinheim.: 485 – 494.
- Kandeler E. 1995: *Organic matter by wet combustion*. V: *Methods in Soil Biology*. Schinner F., Kandeler E., Margesin R. (ur.). Springer Verlag, Berlin.: 397-398.
- Killham K., Firestone M. K. 1983: *Vesicular arbuscular mycorrhizal mediation of grass response to acidic and heavy metal deposition*. *Plant and Soil* 72: 39 – 48.

- Kim N. D., Ferguson J. E. 1994: *Seasonal variations in the concentrations of cadmium, copper, lead and zinc in leaves of the horse chestnut (Aesculus hippocastanum L.)*. Environmental pollution 86: 89 – 97.
- Koide R. T. 1991: *Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection*. New Phytologist 117: 365 – 386.
- Lasat M. M., Baker A. J. M., Kochian L.V. 1996: *Physiological characterization of root Zn²⁺ absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and nonaccumulator species of Thlaspi*. Plant Physiology 112: 1715 – 1722.
- Lasat M. M., Pence N. S., Garvin D. F., Ebbs S. D., Kochian L. V. 2000: *Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator Thlaspi caerulescens*. Journal of Experimental Botany 342: 71 – 79.
- Lombi E., Zhao E. J., Dunham S. J., McGrath S. P. 2000: *Cadmium accumulation in populations of Thlaspi caerulescens and Thlaspi goesingense*. New Phytologist 145: 11 – 20.
- Lombi E., Zhao E. J., McGrath S. P., Young S. D., Sacchi G. A. 2001: *Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a Thlaspi caerulescens ecotype*. New Phytologist 149: 53 – 60.
- Marschner H. 1995: *Ion uptake of individual Cells and Roots: Short Distance Transport*. V: *Mineral nutrition of higher plants*. Marschner H. (ur.). London, UK, Academic Press.: 6-77.
- Matthews H., Thornton I. 1982: *Seasonal and species variation in the content of cadmium and associated metals in pasture plants at Shipham*. Plant and Soil 66: 181 – 193.
- McLean E. O. 1982: *Soil pH and lime requirement*. V: *Methods of soil analysis*. Schinner et al. (ur.): 199-224.
- Mullen R. B., Schmidt S. K. 1993: *Mycorrhizal infection, phosphorus uptake and phenology in Ranunculus adoneus: implications for the functioning of mycorrhizae in alpine systems*. Oecologia 94: 229 – 234.
- Nečemer M., Kump P., Rajčević M., Jačimović R., Budič B., Ponikvar M. 2003: *Determination of sulfur and chlorine in fodder by X-ray fluorescence spectral analysis and comparison with other analytical methods*. Spectrochimica Acta Part B 58: 1367-1373.
- Öhlinger R. 1995: *Acidity*. V: *Methods in Soil Biology*. Schinner F., Öhlinger R., Kandeler E., Margesin R. (ur.): 396.
- ÖNORM L. 1087 (1993): *Bestimmung von pflanzenverfügbarem Phosphat und Kalium nach der Calcium-Acetat-Lactat (CAL)-Methode*. Österreichisches Normungsinstitut Wien.
- Patrick J. W. 1997: *Phloem unloading: sieve element unloading and post-sieve element transport*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48: 191 – 222.

- Pawlowska T. E., Blaszkowski J., Rühling Å. 1996: *The mycorrhizal status of plants colonizing a calamine spoil mound in southern Poland*. Mycorrhiza 6: 499 – 505.
- Perronet K., Schwartz C., Morel J. L. 2003: *Distribution of cadmium and zinc in the hyperaccumulator Thlaspi caerulescens grown on multicontaminated soil*. Plant and Soil 249: 19 – 25.
- Rains D. W. 1971: *Lead accumulation by wild oats (Avena fatua) in a contaminated area*. Nature 233: 210 – 211.
- Reeves R. D., Brooks R. R. 1983: *European species of Thlaspi L. (Cruciferae) as indicators of nickel and zinc*. Journal of Geochemical Exploration 18: 275 – 283.
- Regvar M., Vogel-Mikuš K., Irgel N., Wraber T., Hildebrandt U., Wilde P., Bothe H. 2003: *Colonisation of pennycresses (Thlaspi sp.) of the Brassicaceae by arbuscular mycorrhizal fungi*. Journal of Plant Physiology 160: 615 – 626.
- Regvar M., Vogel-Mikuš K., Kugonič N., Turk B., Batič F. 2006: *Vegetational and mycorrhizal successions at a metal polluted site – indications for the direction of phytostabilization?* Environmental Pollution 144: 976 – 984.
- Ruotsalainen A. L., Väre H., Vestberg M. 2002: *Seasonality of root fungal colonization in low-alpine herbs*. Mycorrhiza 12: 29 – 36.
- Schaeffer G. F., Peterson R. L. 1993: *Modifications to clearing methods used in combination with vital staining of roots colonized with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi*. Mycorrhiza 4 (1): 29-35.
- Smith S. E., Read D. J. 1997: *Mycorrhizal symbiosis*. 2.izdaja. Academic Press, San Diego, London.: 11 – 160.
- Taiz L., Zeiger E. 2002: *Mineral nutrition*. V: *Plant physiology*. 3.izdaja. Sinauer associates, U.S.A: 68 – 84.
- Tolrà R. P., Poschenrieder C., Barceló J. 1996: *Zinc hyperaccumulation in Thlaspi caerulescens. II. Influence on organic acids*. Journal of Plant nutrition 19: 1541 – 1550.
- Trouvelot A., Kough J. L., Gianinazzi-Pearson V. 1986: *Mesure de taux de mycorhization VA dun systeme radicaire. Recherche de methods destination ayant une signification fonctionnelle*. Mycorrhizae: physiology and genetic: 216 – 222.
- Turnau K., Mesjasz-Przybyłowicz J. 2003: *Arbuscular mycorrhizal of Berkheya codii and other Ni-hyperaccumulating members of Asteraceae from ultramafic soils in South Africa*. Mycorrhiza 13: 185 – 190.
- Uradni list RS (1996): *Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednosti nevarnih snovi v tleh*. Uradni list; Vol. 68: 5773-5774.
- Vogel-Mikuš K., Drobne D., Regvar M. 2005: *Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonization of pennycress Thlaspi praecox Wulf. (Brassicaceae). from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia*. Environmental Pollution 133: 233 – 242.

- Vogel-Mikuš K., Pongrac P., Kump P., Nečemer M., Regvar M. 2006: *Colonization of a Zn, Cd and Pb hyperaccumulator Thlaspi praecox Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake*. Environmental Pollution 139: 362 – 371.
- Vogel-Mikuš K., Pongrac P., Kump P., Nečemer M., Simčič J., Pelicon P., Budnar M., Povh B., Regvar M. 2007: *Localisation and quantification of elements within seeds of Cd/Zn hyperaccumulator Thlaspi praecox by micro-PIXE*. Environmental Pollution 147: 50 – 59.
- Windsor J., 1866: *On some species of Thlaspi*. The Naturalist 2: 31 – 32.
- Zha H. G., Jiang R. F., Zhao F. J., Vooijs R., Schat H., Barker J. H. A., McGrath S.P. 2004: *Co-segregation analysis of cadmium and zinc accumulation in Thlaspi caerulescens interecotypic crosses*. New Phytologist 163: 229 – 312.
- Zhao F. J., Lombi E., McGrath S. P. 2003: *Assessing the potential for zinc and cadmium phytoremediation with the hyperaccumulator Thlaspi caerulescens*. Plant and Soil 249: 37 – 43.

ZAHVALA

Prof. dr. Marjani Regvar se zahvaljujem za mentorstvo ter celotni katedri za prijetno vzdušje.

Mileni Kubelj in Silvi Sonjak se zahvaljujem za zanimive ter produktivne pogovore.

Posebno se zahvaljujem Pauli Pongrac za pomoč pri delu, odgovore na moja nešteta vprašanja, strokovno vodenje pri izdelavi dela, prevoze na teren in za vse vzpodbudne besede.

Zahvaljujem se Marjanu Nečemru in Petru Kumpu iz Instituta Jožef Stefan za pomoč pri meritvah.

Zahvaljujem se tudi katedri za zoologijo za uporabo Atomskega absorpcijskega spektrofotometra.

Hvala mami, očetu in bratu, ki so mi omogočili študij, me med študijem prenašali in mi stali ob strani.

Hvala vsem prijateljem, znancem in vsej družini za prijaznost, kave in podporo.

PRILOGA 1: Priprava raztopin za določanje rastlinam dostopnega fosforja (ÖNORM)

Založna raztopina za ekstrakcijo

78,6 g kalcijevega laktata ($C_6H_{10}CaO_6 + 5H_2O$) raztopimo v vroči vodi
40,3 g kalcijevega acetata ($(CH_3COO)_2Ca + H_2O$) raztopimo v vroči vodi in združimo
dodamo 91,3 ml očetne kisline ter dopolnimo do 1020 ml z bidestilirano vodo

Delovna raztopina za ekstrakcijo

5 x redčena založna raztopina za ekstrakcijo (520 ml založne raztopine in bidestilirana voda do 2600 ml)

Založna raztopina za analizo

0,63 g amonijevega heptamolibdata ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} + 4H_2O$) zatopimo v 20 ml vroče vode
ohladimo in dodamo 7 ml H_2SO_4 ter ohladimo in dopolnimo do 45 ml z dH_2O
0,025 g kalijevega antimon(III)oksitartrata ($K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot 0,5H_2O$) raztopimo v vroči
vodi, zmešamo skupaj in dopolnimo do 50 ml z bidestilirano vodo

Delovna raztopina za analizo

10x redčena založna raztopina za analizo (50 ml založne raztopine in 450 ml delovne raztopine)

Raztopina askorbinske kisline

0,273 g askorbinske kisline ($C_6H_8O_6$) raztopimo v vodi in dopolnimo do 62 ml z bidestilirano vodo

Založna raztopina za standard

1,098 g KH_2PO_4 raztopimo v 50 ml bidestilirane vode

Delovna raztopina za standard

20x redčena založna raztopina za standard (50 ml založne raztopine in 200 ml založne raztopine za ekstrakcijo ter dopolnimo do 1000 ml z bidestilirano vodo)

PRILOGA 2: Celotne koncentracije Zn, Cd in Pb v talnih vzorcih; dostopne koncentracije ekstrahirane z amonijevim acetatom; organska snov, pH, dostopni P in biomasa rastlin

Tabela: Celotne koncentracije kovin (mg/kg SM) v talnih vzorcih, izmerjene z metodo XRF, izmenljive koncentracije kovin (mg/kg SM) ekstrahirane z amonijevim acetatom z izračunanim povprečjem (n = 21), najnižjo (min) in najvišjo (max) vrednostjo in organska snov. VP – vegetativna faza, FI – faza indukcije cvetenja, FP – faza cvetenja, SP – faza semenitve, SC – faza senescence; SM – suha masa, tot. – celotna vrednost, dost. - dostopna koncentracija ekstrahirana z amonijevim acetatom, pov. – povprečje, * - preveliko odstopanje

Razvojne faze	Zn tot.	Cd tot.	Pb tot.	Zn dost.	Cd dost.	Pb dost.	Zn % od tot.	Cd % od tot.	Pb % od tot.
VP	905	72	9600	34	13	629	3,7	18	6,6
VP	1790	126	14000	58	27	702	3,2	21	5,0
VP	505	38	4080	21	6,8	340	4,1	18	8,3
FI	757	55	37600	45	18	2646*	5,9	33	7,0*
FI	887	60	19100	34	12	1311	3,8	21	6,9
FI	1140	73	8690	48	15	564	4,2	21	6,5
FP	1030	78	18300	74	26	2646	7,2	33	15
FP	514	35	8070	21	7,5	727	4,1	22	9,0
FP	1880	128	11000	191	51	2125	10	40	19
FP	1880	125	21500	192	51	4088	10	40	19
FP	800	52	26200	57	17	3654	7,1	32	14
SP	610	52	17900	51	17	2042	8,4	33	11
SP	1280	151*	10000	93	27	903	7,2	18*	9,0
SP	2150	108	12200	150	34	1287	7,0	32	11
SP	660	115	3300	46	25	255	6,9	22	7,7
SP	2490	122	17800	154	36	2044	6,2	30	12
SC	1060	62	11400	120	18	1611	11,3	30	14
SC	1090	73	23700	39	11	1441	3,6	15	6,1
SC	2700	150	14200	284*	42	2058	10,5*	28	15
SC	1290	83	28700	61	18	2600	4,7	21	9,1
SC	824	81	23400	70	20	3454	8,5	24	15
						Pov.	6,1	27	11
						min	3,3	14	5,0
						max	11	40	19

Tabela: Vsebnost organske snovi (%), dostopni fosfor (mg/kg) pH in biomasa korenin in poganjkov (g)

Razvojne faze	Organska snov (%)	Dostopni P	pH	Biomasa korenin	Biomasa poganjkov
VP	32	0,4	7,3	0,02	0,08
VP	15	0,3	7,2	0,03	0,06
VP	12	0,3	7,2	0,03	0,04
FI	32	1,4	7,1	0,1	0,2
FI	22	0,9	7,4	0,2	0,3
FI	14	1,1	7,4	0,1	0,3
FP	21	1,6	6,3	0,9	0,3
FP	11	2,1	7,2	0,2	0,1
FP	14	1,6	7,2	0,4	0,5
FP	13	2,3	6,5	0,6	0,3
FP	50	*	5,9	0,4	0,2
SP	19	2,9	6,0	0,2	0,2
SP	11	4,8	7,1	0,6	0,4
SP	13	1,6	7,3	0,4	0,4
SP	14	1,7	7,5	0,7	0,6
SP	12	1,6	7,0	0,5	0,8
SC	17	2,9	*	0,1	0,4
SC	14	3,4	6,5	0,1	0,4
SC	9,9	3,4	7,0	0,1	0,3
SC	15	1,5	7,0	0,2	0,2
SC	21	1,5	6,7	0,3	0,7

PRILOGA 3: Koncentracije Zn, Cd in Pb v poganjkih in koreninah, razmerja poganjki/korenine in bioakumulacijski faktorji, koncentracije ostalih elementov v koreninah in poganjkih

Tabela: Koncentracije A – Zn, B – Cd in C – Pb (mg/kg SM) v poganjkih in koreninah, razmerja poganjki/korenine in bioakumulacijski faktorji (BAF) poganjkov in korenin v odvisnosti od celotnih koncentracij (mg/kg SM) kovin v talnih vzorcih ter D – koncentracije Zn, Cd in Pb v cvetnih steblih (mg/kg SM). E – koncentracije ostalih elementov v koreninah (mg/kg SM), F – koncentracije ostalih elementov v poganjkih (mg/kg SM) in G – koncentracije ostalih elementov v cvetnih steblih (mg/kg SM). VP – vegetativna faza, FI – faza indukcije cvetenja, FP – faza cvetenja, SP – faza semenitve, SC – faza senescence; * - preveliko odstopanje v poganjkih, / - preveliko odstopanje v tleh.

A - Zn	BAF				
	Razvojne faze	poganjki (mg/kg)	Korenine (mg/kg)	Pog/kor	poganjki
VP	3515	737	4,8	3,9	0,8
VP	4825	984	4,9	2,7	0,6
VP	2475	823	3,0	4,9	1,6
FI	3635	968	3,8	4,8	1,3
FI	3555	765	4,7	4,0	0,9
FI	3885	801	4,9	3,4	0,7
FP	2700	973	2,8	2,6	0,9
FP	4540	1265	3,6	8,8	2,5
FP	6230	1215	5,1	3,3	0,7
FP	3330	1340	2,5	1,8	0,7
FP	3870	703	5,5	4,8	0,9
SP	3390	633	5,4	5,6	1,0
SP	2350	728	3,2	1,8	0,6
SP	1965	543	3,6	0,9	0,3
SP	2020	526	3,8	3,1	0,8
SP	3955	869	4,6	1,6	0,4
SC	4605	1220	3,8	4,3	1,2
SC	4220	1010	4,2	3,9	0,9
SC	3540	1141	3,1	1,3	0,4
SC	3855	1113	3,5	3,0	0,9
SC	2770	984	2,8	3,4	1,2
min	1965	526	2,5	0,9	0,3
max	6230	1340	5,5	8,8	2,5

B - Cd			BAF		
Razvojne faze	Poganjki (mg/kg)	Korenine (mg/kg)	Pog/kor	poganjki	korenine
VP	1386	799	1,7	19	11
VP	2130	919	2,3	17	7,3
VP	1092	955	1,1	29	25
FI	804	703	1,1	15	13
FI	622	574	1,1	11	9,7
FI	760	631	1,2	11	8,7
FP	326	814	0,4	4,2	10
FP	573	1248	0,5	16,4	36
FP	505	977	0,5	3,9	7,6
FP	232	904	0,3	1,9	7,2
FP	390	774	0,5	7,5	15
SP	*	794	*	*	15
SP	179	352	0,5	/	/
SP	103	331	0,3	1,0	3,1
SP	171	334	0,5	1,5	2,9
SP	158	731	0,2	1,3	6,0
SC	1083	1116	1,0	17,6	18
SC	1058	757	1,4	14,5	10
SC	927	797	1,2	6,2	5,3
SC	1061	649	1,6	13	7,8
SC	1208	1053	1,2	15	13
min	103	331	0,2	1,0	2,9
max	2130	1248	2,3	28,7	36

C - Pb			BAF		
Razvojne faze	Poganjki (mg/kg)	Korenine (mg/kg)	Pog/kor	poganjki	korenine
VP	*	2470	*	*	0,3
VP	1100	1295	0,9	0,08	0,1
VP	590	963	0,6	0,1	0,2
FI	314	1050	0,3	0,01	0,03
FI	2560	1815	1,4	0,1	0,1
FI	1360	914	1,5	0,2	0,1
FP	471	4360	0,1	0,03	0,2
FP	130	3105	0,04	0,02	0,4
FP	356	3445	0,1	0,03	0,3
FP	616	2600	0,2	0,03	0,1
FP	*	1425	*	*	0,1
SP	332	548	0,6	0,02	0,03
SP	49	504	0,1	0,01	0,05
SP	202	494	0,4	0,02	0,04
SP	130	210	0,6	0,04	0,1
SP	197	1231	0,2	0,01	0,1
SC	107	370	0,3	0,01	0,03
SC	220	1070	0,2	0,01	0,1
SC	233	654	0,4	0,02	0,1
SC	163	1320	0,1	0,01	0,1
SC	381	827	0,5	0,02	0,04
min	49	210	0,04	0,01	0,03
max	2560	4360	1,5	0,2	0,4

D – cvetna stebila (mg/kg SM)

Razvojne faze	Zn	Cd	Pb
FP	2255	424	114
FP	2230	431	33
FP	3260	941	104
FP	1415	391	35
FP	3075	797	628
SP	4585	*	194
SP	2525	475	70
SP	2245	450	84
SP	654	197	70
SP	2435	360	164

E – korenine (mg/kg SM)

	Ni	Fe	P	S	Ca	K	Cu	Mn
VP	11	1032	1730	17400	10600	5770	17	39
VP	8	420	1775	11800	6250	7090	9	12
VP	6	341	3325	10340	4085	7205	16	9
FI	7	512	1770	12800	6780	9700	14	18
FI	10	393	1680	12300	4120	5625	12	10
FI	4	223	1445	15400	4455	5040	6	7
FP	4	707	1450	23350	5310	4950	13	12
FP	8	828	3520	16850	14100	7445	15	26
FP	10	332	2730	17950	3765	12050	11	14
FP	11	622	2535	13150	5695	5785	9	28
FP	6	310	1805	13550	4555	5820	8	
SP	5	138	3385	13450	2795	8315	7	10
SP	6	209	3590	16850	4355	5715	11	13
SP	2	143	1056	8730	3170	4345	5	5
SP	9	340	2580	14300	4335	5960	8	9
SP	3	168	1925	16350	2990	7850	7	11
SC	151*	431	3450	10400	2740	19400	16	16
SC	35	193	1700	16700	3320	7010	7	4
SC	83	473	2460	13050	3680	7405	16	31
SC	44	420	2080	14450	4570	7825	12	29
SC	73	520	1915	9410	3985	8900	18	40

F – poganjki (mg/kg SM)

	Ni	Fe	P	S	Ca	K	Cu	Mn
VP	22	3060*	2820	23200*	34450*	5380	30*	76*
VP	17	846	3000	8770	22450	6475	16	26
VP	17	608	2610	7100	11800	7520	13	15
FI	14	436	3070	6960	16400	6395	16	26
FI	12	1020	3400	16950	19100	8420	15	53
FI	10	414	3545	15250	17800	8575	14	23
FP	10	301	3400	8480	18000	6715	7	24
FP	23	974	2735	4365	16350	6175	18	17
FP	23	320	2875	7535	13400	21450*	15	31
FP	9	448	2790	8620	10950	13750	10	37
FP	12	570	3395	11300	24550	5420	11	25
SP	21	358	2565	6495	18100	10315	15	39
SP	12	190	4650	8325	23200	8220	7	49
SP	8	136	1915	4150	15800	5475	8	20
SP	8	184	3135	4730	19150	5815	8	21
SP	20	322	1385	4160	12200	13050	14	27
SC	76	551	3440	5355	13100	36100*	25	34
SC	58	365	2725	8265	20050	8845	16	18
SC	73	393	4150	7990	25700	9045	11	36
SC	52	449	4235	9220	27000	8810	24	51
SC	67	439	2195	4505	15300	9015	15	93*

G – cvetna stebila (mg/kg SM)

	Ni	Fe	P	S	Ca	K	Cu	Mn
FP	6,6	91	3175	7575	16150	6665	5,6	19
FP	13	93	3990	7370	15100	9315	9,1	16
FP	10	108	3045	6495	10250	20600	11	12
FP	11	67	2225	5290	7005	14450	5,7	17
FP	31	263	3355	11150	19850	8260	8,0	19
SP	16	208	2570	4965	21550	3435	11	42
SP	8,5	95	2710	6275	21250	3135	8,3	20
SP	8,1	71	1860	4485	17550	3840	5,6	15
SP	7,9	139	1530	4515	9970	2730	15	9,8
SP	10	77	635	3075	4930	9925	7,3	11

PRILOGA 4: Koncentracije elementov v mladih, zrelih, starih listih in koreninah

Tabela: Koncentracije Zn, Cd in Pb ter P, S, Ni, Cu, K, Ca, Mn in Fe (mg/kg SM) v A – koreninah (K), B – listih; mladi (M), zreli (Z) in stari (S). 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka lokacije.

A – izmerjene koncentracije v koreninah

(mg/kg)	Zn	Cd	Pb	Ni	Fe	P	S	Ca	K	Cu	Mn
1	852	917	1500	43	431	1860	12450	4430	9605	11	23
2	749	548	423	49	389	1705	7600	4450	6800	9,4	26
3	1115	863	1595	60	366	4380	14400	2915	10005	11	23
4	980	424	1235	198	1200	2880	12385	4135	7955	41	75
5	935	428	1570	78	542	2805	15200	5265	6880	13	16

B – izmerjene koncentracije v poganjkih

(mg/kg)	Zn	Cd	Pb	Ni	Fe	P	S	Ca	K	Cu	Mn
M 1	3455	773	154	158	2196	4010	4390	13800	14150	96	151
M 2	2235	841	26	39	462	3225	7585	9800	21950	16	76
M 3	4075	1749	127	61	748	2760	6360	10500	10775	36	142
M 4	2065	865	103	25	340	2130	6430	14300	7765	22	37
M 5	5200	964	89	97	1573	6640	11300	20450	14650	62	138
Z 1	3400	830	103	21	283	1425	3005	12850	14050	15	51
Z 2	3240	782	27	28	376	2020	4960	15800	20000	22	64
Z 3	5300	2016	124	24	247	2555	7615	15000	12450	13	127
Z 4	3490	1045	199	34	365	3360	7555	24800	8900	18	39
Z 5	4340	1161	211	159	1881	3820	9565	18050	10030	91	166
S 1	2975	737	129	36	323	1885	3005	13850	13950	12	35
S 2	2905	658	57	26	368	2075	3105	16850	20300	16	56
S 3	5105	1613	259	60	884	4030	4900	15200	8775	48	139
S 4	2855	923	77	28	320	4005	6990	29500	6900	22	48
S 5	3470	800	347	25	320	2745	7185	21550	7805	24	35

PRILOGA 5: Mikorizni parametri

Tabela: mikorizni parametri izračunani iz pregledanih 30 koreninskih fragmentov ene rastline. F% - mikorizna frekvenca, M% - splošna inteziteta mikorize, m% - inteziteta mikorize na mikoriznih odsekih, tot – celotna mikoriza, vit – vitalna mikoriza; /-preveliko odstopanje

	F_{tot} %	M_{tot} %	m_{tot} %	F_{vit} %	M_{vit} %	m_{vit} %
VP	59	13	15	45	6,1	8,6
VP	43	5,6	9,8	35	3,3	5,7
VP	52	11,1	14	45	8,2	12
FI	45	8,1	12	43	4,4	6,5
FI	51	17	28	40	5,1	8,0
FI	47	12	16	43	4,4	6,5
FP	43	12	18	37	11	19
FP	61	9,6	11	61	8,4	9,6
FP	55	14	17	53	13,4	17
FP	53	14	18	41	7,7	12
FP	62	/	/	50	12	15
SP	29	4,6	9,5	29	4,1	8,4
SP	0	0	0	0	0	0
SP	27	4,4	10	21	3,0	5,7
SP	27	2,6	5,7	18	1,8	5,7
SP	27	/	/	18	1,8	5,7
SC	33	4,8	8,8	15	1,5	5,7
SC	41	5,2	8,0	29	/	5,7
SC	0	0	0	0	0	0
SC	47	4,2	5,7	27	2,6	5,7
SC	49	7,7	10	18	2,8	2,8

PRILOGA 6: Vsebnosti ostalih elementov v poganjkih in koreninah, razmerja poganjki/korenine

Tabela: Vsebnosti elementov v A – koreninah in B – poganjkih v (μg) v odvisnosti od posamezne razvojne. VP – vegetativna faza, FI – faza indukcije cvetenja, FP – faza cvetenja, SP – faza semenitve, SC – faza senescence; /-preveliko odstopanje.

A – korenine (μg)

	Zn	Cd	Pb	Ni	Fe	P	S	Ca	K	Cu	Mn
VP	15	17	51	0,2	21	36	360	219	119	0,4	0,8
VP	29	27	38	0,2	13	53	350	185	210	0,3	0,4
VP	25	29	29	0,2	10	101	314	124	219	0,5	0,3
FI	73	53	79	0,5	38	133	960	509	728	1,1	1,3
FI	137	103	325	1,8	70	301	2202	738	1007	2,1	1,8
FI	52	41	59	0,3	14	93	993	287	325	0,4	0,5
FP	842	705	3776	3,6	612	1256	20221	4599	4287	11	10,1
FP	282	278	692	1,9	185	785	3758	3144	1660	3,4	5,9
FP	456	366	1292	3,8	125	1024	6731	1412	4519	4,0	5,1
FP	803	542	1557	6,6	373	1519	7877	3411	3465	5,4	16,8
FP	250	276	507	2,2	110	643	4824	1622	2072	2,8	/
SP	97	121	84	0,8	21	518	2058	428	1272	1,1	1,5
SP	399	193	276	3,3	114	1967	9234	2387	3132	6,0	6,9
SP	194	119	176	0,9	51	378	3125	1135	1556	1,9	1,8
SP	356	226	142	6,3	230	1747	9681	2935	4035	5,7	6,3
SP	466	393	661	1,8	90	1034	8780	1606	4216	3,8	5,8
SC	81	74	24	10	29	228	686	181	1280	1,1	1,1
SC	141	106	150	4,9	27	238	2338	4645	981	1,0	0,6
SC	81	57	46	5,9	34	175	927	261	526	1,1	2,2
SC	227	132	269	8,9	86	424	2948	932	1596	2,5	5,9
SC	293	314	246	22	155	571	2804	1188	2652	5,4	11,8

B – poganjki (µg)

	Zn	Cd	Pb	Ni	Fe	P	S	Ca	K	Cu	Mn
VP	264	104	/	1,6	230	212	1740	2584	404	2,2	5,7
VP	307	136	70	1,1	54	191	558	1429	412	1,0	1,7
VP	89	39	21	0,6	22	94	256	425	271	0,5	0,5
FI	580	128	50	2,3	70	490	1110	2616	1020	2,6	4,1
FI	1081	189	778	3,7	310	1034	5153	5806	2560	4,5	16
FI	977	191	342	2,5	104	892	3835	4477	2157	3,6	5,9
FP	756	91	132	2,7	84	952	2374	5040	1880	1,9	6,7
FP	422	53	12	2,1	91	254	406	1521	574	1,7	1,6
FP	3171	257	181	11,6	163	1463	3835	6821	10918	7,6	16
FP	839	58	155	2,3	113	703	2172	2759	3465	2,5	9,3
FP	731	74	315	2,3	108	642	2136	4640	1024	2,0	4,8
SP	810	108	79	5,0	85	613	1552	4326	2465	3,6	9,2
SP	1036	79	22	5,3	84	2051	3671	10231	3625	2,9	22
SP	788	41	81	3,1	55	768	1664	6336	2196	3,0	7,9
SP	1153	98	74	4,8	105	1790	2701	10935	3320	4,4	12
SP	3216	126	157	16	258	1109	3332	9772	10453	11	22
SC	1644	387	38	27	197	1228	1912	4677	12888	8,9	12
SC	1739	436	90	24	150	1123	3405	8261	3644	6,6	7,4
SC	1012	265	67	21	112	1187	2285	7350	2587	3,2	10
SC	933	257	39	12	109	1025	2231	6534	2132	5,9	12
SC	1945	848	267	47	308	1541	3163	10741	6329	11	65