

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Darka RAVLAN

**POMEN MIKORIZE RANEGA MOŠNJAKA (*Thlaspi praecox* Wulfen) ZA  
MOBILIZACIJO CINKA**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**IMPORTANCE OF MYCORRHIZA FOR Zn MOBILIZATION IN  
PENNYCRESS *Thlaspi praecox* Wulfen**

GRADUATION THESIS

University studies

**Ljubljana, 2009**

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin in na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Marjano Regvar in za somentorico dr. Paulo Pongrac.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Članica: doc. dr Jasna Dolenc Koce  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Članica: dr. Paula Pongrac  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

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.

Diploma je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Darka RAVLAN

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
DK UDK 581.1:546.3:582.683(043.2)=163.6  
KG mikoriza / hiperakumulacija kovin / *Thlaspi praecox* / Zn / P  
AV Ravlan, Darka  
SA REGVAR, Marjana (mentor), PONGRAC, Paula (somentor)  
KZ SLO, 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2009  
IN Pomen mikorize ranega mošnjaka (*Thlaspi praecox* Wulfen) za mobilizacijo cinka  
TD Diplomska naloga (univerzitetni študij)  
OP X, 47 str., 1 pregl., 12 sl., 11 pril., 59 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Namen naloge je bil preučiti vpliv arbuskularno mikoriznih (AM) gliv na privzem Zn pri hiperakumulacijski rastlinski vrsti za Zn in Cd rani mošnjak (*Thlaspi praecox* Wulfen). V rastlinjaku smo v substratu Biobrazda v koncentracijski vrsti Zn (0, 100, 250 in 500 mg/kg) vzgojili rastline vrste *T. praecox*, ki smo jih predhodno inokulirali z avtohtonimi in alohtonimi AM glivami. V substratu smo izmerili koncentracije dostopnega Zn po ekstrakciji z amonijevim acetatom, vrednost pH in organsko snov. Rastline vrste *T. praecox* z dveh različnih območij (onesnaženo – Žerjav in neonesnaženo – Zaplana) smo v kontroliranih pogojih gojili 5 mesecev in nato izmerili suho maso korenin in poganjkov, stopnjo kolonizacije z AM glivami, koncentracijo Zn v koreninah in v poganjkih (po mineralizaciji s HNO<sub>3</sub> in HClO<sub>4</sub>) smo meritve izvedli s pomočjo atomskega absorbcijskega spektrofotometra in koncentracijo P v koreninah in poganjkih (po mineralizaciji s HNO<sub>3</sub> in HClO<sub>4</sub>) smo meritve izvedli s spektrofotometrom pri 400 nm). Rezultati so pokazali, da se z dodajanjem Zn v substrat povečuje tudi koncentracija dostopnega Zn v substratu, posledično pa tudi koncentracija Zn v koreninah in poganjkih obeh populacij rastlin. Rastline populacije z onesnaženega območja so imele večjo biomaso kot rastline populacije z onesnaženega območja, ki pa je imela večjo koncentracijo Zn v poganjkih. Vpliva AM gliv na biomaso korenin in poganjkov nismo zaznali, smo pa potrdili njihov učinek pri privzemuh Zn v koreninah in poganjkah. Pri majhni koncentraciji Zn v substratu je glivna kolonizacija povečala koncentracijo in količino Zn v rastlini, medtem ko je pri velikih koncentracijah Zn v substratu povzročala njegovo imobilizacijo. Razlik med alohtonim in avtohtonim inokulumom nismo zaznali. Rezultati kažejo na pozitiven odnos med AM glivami in privzemom Zn pri majhnih koncentracijah Zn v substratu pri preučevanih populacijah vrste *T. praecox*.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDK 581.1:546.3:582.683(043.2)=163.6  
CX mycorhizza/ metal hyperaccumulation/ *Thlaspi praecox* / Zn / P  
AU Ravlan, Darka  
AA REGVAR, Marjana (supervisor), PONGRAC, Paula (co-supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikerjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology  
PY 2009  
TI Imoprtance of mycorhiza for Zn mobilization in pennicress *Thlaspi praecox* Wulfen  
DT Graduation thesis (University studies)  
NO X, 47 p., 1 tab., 12 fig., 11 ann., 59 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Plants from two populations (from polluted site – Žerjav and from non-polluted site – Zaplana) of Zn/ Cd hyperaccumulator *Thlaspi praecox* Wulfen were inoculated with indigenous and non-indigenous arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and grown in increasing Zn concentrations (0, 100, 250 and 500 mg/kg) in a glasshouse for five months in order to study the influence of indigenous and non-indigenous AM fungi on Zn uptake. Soil ammonium extractable concentration of Zn, pH and organic mater were measured. At the end of the experiment root and shoot dry weights and AM fungal root colonisation levels were noted, Zn concentrations in roots and shoots were measured using atomic absorption spectrometry and P concentrations using spectrophotometer after wet digestion with HNO<sub>3</sub> and HClO<sub>4</sub>. With increasing Zn added to the substrate, an increase in extractable Zn concentration was observed as well as Zn concentrations in roots and shoots of studied *T. praecox* populations. The population from non-polluted site (Zaplana) had higher shoot biomass but lower concentration of Zn in the shoots than the population from polluted site (Žerjav). Influence of AM fungi on dry weight of roots and shoots was not seen. There was no clear functional difference between the AM inocula used. However, inoculation led to an increase in Zn uptake in roots and shoots in low Zn concentrations in the substrate whereas in high concentrations of Zn in the substrate Zn immobilization occurred. These results indicate improved Zn in *T. praecox* with AM fungi especially in low concentrations of Zn the substrate.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO TABEL</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PRILOG</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
2.1 KOVINE	2
<b>2.1.1 Biodostopnost kovin</b>	2
<b>2.1.2 Cink</b>	3
<b>2.1.3 Vloga Zn v rastlini in simptomi poškodb</b>	3
<b>2.1.4 Privzem in transport Zn v rastlini</b>	4
2.2 TOLERANCA RASTLIN NA KOVINE	4
2.3 HIPERAKUMULACIJA	4
<b>2.3.1 Hiperakumulacija rodu <i>Thlaspi</i></b>	5
2.4 FENOTIPSKE RAZLIKE MED POPULACIJAMI HIPERAKUMULACIJSKIH RASTLIN	6
2.5 MIKORIZA	7
<b>2.5.1 Arbuskularna mikoriza (AM)</b>	7
<b>2.5.2 Kovine in AM</b>	8
<b>2.5.3 AM pri hiperakumulacijskih rastlinah</b>	9
<b>3 NAMEN RAZISKAV</b>	<b>11</b>
<b>4 OSNOVNE HIPOTEZE</b>	<b>11</b>
<b>5 MATERIAL IN METODE</b>	<b>12</b>
5.1 PRIPRAVA INOKULUMA ZA POSKUS	12
5.2 PRIPRAVA POSKUSA	12
5.3 ANALIZE TAL	12

<b>5.3.1 Določanje koncentracije dostopnega Zn v substratu</b>	12
<b>5.3.2 Določanje organske snovi s kromovo metodo</b>	13
<b>5.3.3 pH tal</b>	14
<b>5.4 ANALIZA RASTLINSKEGA MATERIALA</b>	14
<b>  5.4.1 Mineralizacija rastlinskih vzorcev z dušikovo in peroklorno kislino</b>	14
<b>  5.4.2 Koncentracija Zn v rastlinskem tkivu</b>	15
<b>  5.4.3 Določanje fosforja v rastlinskih vzorcih</b>	15
<b>5.5 KOLONIZACIJA KORENIN Z AM GLIVAMI</b>	16
<b>  5.5.1 Vzorčenje in barvanje koreninskih fragmentov</b>	16
<b>  5.5.2 Ocenjevanje kolonizacije z AM glivami</b>	16
<b>5.6 STATISTIČNA ANALIZA</b>	17
<b>6 REZULTATI</b>	18
<b>  6.1 ANALIZA TAL</b>	18
<b>  6.2 KOLONIZACIJA RASTLIN Z AM GLIVAMI</b>	18
<b>  6.3 ANALIZA RASTLIN</b>	19
<b>    6.3.1 Biomasa korenin</b>	19
<b>    6.3.2 Biomasa poganjkov</b>	20
<b>    6.3.3 Koncentracija Zn v koreninah</b>	21
<b>    6.3.4 Koncentracija Zn v poganjkih</b>	22
<b>    6.3.5 Translokacijski faktor za Zn</b>	23
<b>    6.3.6 Vsebnost Zn v koreninah</b>	24
<b>    6.3.7 Vsebnost Zn v poganjkih</b>	25
<b>    6.3.8 Koncentracija P v koreninah</b>	26
<b>    6.3.9 Koncentracija P v poganjkih</b>	27
<b>    6.3.10 Vsebnost P v koreninah</b>	28
<b>    6.3.11 Vsebnost P v poganjkih</b>	29
<b>7 RAZPRAVA</b>	30
<b>  7.1 BIOMASA RASTLIN</b>	30
<b>  7.2 PRIVZEM Zn V RASTLINE</b>	30

<b>7.2.1 Vpliv talnih parametrov na privzem Zn v rastline:</b>	30
<b>7.2.2 Koncentracije Zn v koreninah in poganjkih</b>	32
<b>7.2.3 Vpliv populacije na privzem Zn v rastline</b>	33
<b>7.2.4 Translokacijski faktor</b>	33
<b>7.3 ARBUSKULARNA MIKORIZA</b>	34
<b>    7.3.1 Kolonizacija z AM glivami</b>	34
<b>    7.3.2 Vpliv inokuluma na koncentracijo in vsebnost Zn v rastlini</b>	35
<b>    7.3.3 Pomen izvora glivnega inokuluma na privzem in vsebnost Zn v rastlinah</b>	35
<b>    7.3.5 Vpliv inokuluma na privzem P v rastlino</b>	36
<b>7.4 UPORABA VRSTE <i>T. praecox</i> PRI FITOREMEDIACIJI</b>	37
<b>8 SKLEPI</b>	38
<b>9 POVZETEK</b>	39
<b>10 LITERATURA</b>	41
<b>ZAHVALA</b>	47
<b>PRILOGE</b>	48

## KAZALO TABEL

<b>Tabela 1:</b> Koncentracija dostopnega Zn (mg/kg), pH vrednost in delež organske snovi (%) v substratu, ki smo mu dodali različne koncentracije Zn	18
---	----

## KAZALO SLIK

Slika 1: Kolonizacija korenine vrste <i>T. praecox</i>	18
Slika 2: Suha masa korenin	<b>Napaka! Zaznamek ni definiran.</b>
Slika 3: Suha masa poganjkov	20
Slika 4: Koncentracija Zn v koreninah	21
Slika 5: Koncentracija Zn v poganjkih	22
Slika 6: TF pri različnih inokulacijah	23
Slika 7: Vsebnost Zn v koreninah	24
Slika 8: Vsebnost Zn v poganjkih	25
Slika 9: Koncentracija P v koreninah	26
Slika 10: Koncentracija P v poganjkih	27
Slika 11: Vsebnost P v koreninah	28
Slika 12: Vsebnost P v poganjkih	29

## KAZALO PRILOG

Priloga 1: Umeritvena krivulja za organsko snov in fosfor	48
Priloga 2: Koncentracija Zn, pH vrednost pred in po poskusu ter delež organske snovi v substratu	49
Priloga 3: Enosmerna ANOVA pH vrednost pred in po poskusu, Zn v substratu in delež organske snovi	50
Priloga 4: Suha masa korenin in poganjkov, koncentracija Zn v koreninah in poganjkih, TF, vsebnost (VS) Zn v koreninah in poganjkih, koncentracija P v koreninah in poganjkih in vsebnost P v koreninah in poganjkih	51
Priloga 5: Dvosmerna in enosmerna ANOVA za suho maso korenin in poganjkov	53
Priloga 6: Dvosmerna in enosmerna ANOVA za koncentracijo Zn v koreninah in poganjkih	54
Priloga 7: Dvosmerna in enosmerna ANOVA za Translokacijski faktor Zn	55
Priloga 8: Dvosmerna in enosmerna ANOVA za vsebnost Zn v koreninah in poganjkih	56
Priloga 9: Dvosmerna in enosmerna ANOVA za koncentracijo P v koreninah in poganjkih	57
Priloga 10: Dvosmerna in enosmerna ANOVA za vsebnost P v koreninah in poganjkih	58

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

**AM** arbuskularna mikoriza

**F%** mikorizna frekvenca

**SM** suha masa

**TF** translokacijski faktor

**onm** obrati na minuto

## 1 UVOD

Onesnaženje tal s kovinami kot posledica intenzivne človeške aktivnosti je že od nekdaj problematična okoljska tema po celotnem svetu. Ko so kovine enkrat vnesene v okolje, v majhnih ali v velikih koncentracijah, jih ne moremo več popolnoma odstraniti iz okolja (Ogundiran in Osibanjo, 2008). Na tleh, onesnaženih s kovinami, so rastline tekom evolucije razvile različne strategije, ki jim omogočajo preživetje. Lahko tvorijo simbiozo z glivami, ki pri velikih koncentracijah kovin v tleh povzročajo njihovo imobilizacijo in s tem zmanjšujejo strupen učinek kovin na rastline (Audet in Charest, 2006), lahko kovine izločajo ali pa jih shranjujejo v različnih rastlinskih tkivih (hiperakumulacija) (Baker, 1981). V zadnjem času so odkrili, da se lahko rastlina poslužuje več mehanizmov hkrati. Tako lahko poleg hiperakumulacije kovin tvori tudi simbiozo z arbuskularno mikoriznimi (AM) glivami (Vogel-Mikuš in sod., 2005).

Z našo diplomsko nalogo smo želeli pojasniti vpliv alohtonih in avtohtonih AM gliv na privzem Zn pri ranem mošnjaku (*Thlaspi praecox* Wulf.), rastlinski vrsti, ki je sposobna hiperakumulacije Cd in Zn (Vogel-Mikuš in sod., 2005). Vrsta *T. praecox* uspeva tako na tleh onesnaženih s kovinami, kot tudi na neonesnaženih tleh (Vogel-Mikuš in sod., 2005). Pod kontroliranimi pogoji smo v komercialnem substratu Biobrazda v naraščajoči koncentracijski vrsti Zn (0, 100, 250 in 500 mg Zn/kg) iz semen nabranih z onesnaženega (Žerjav) in z neonesnaženega (Zaplana) območja vzgojili rastline in jih inokulirali z avtohtonimi in alohtonimi AM glivami, ki uspevajo v rizosferi rastlin iz obeh omenjenih lokacij in smo jih predhodno vzgojili z glivnimi pastmi na koruzi. Preučevali smo razlike med populacijama in vpliv inokulacije na biomaso korenin in poganjkov, koncentracijo Zn v koreninah in poganjkih, translokacijske faktorje za Zn, vsebnost Zn v koreninah in poganjkih, koncentracijo P v koreninah in poganjkih ter vsebnost P v koreninah in poganjkih. Naredili smo tudi analize: pH vrednost pred in po poskusu, organska snov, dostopen Zn v substratu, ter ocenili stopnjo mikorizne infekcije.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 KOVINE

Onesnaževanje tal, vode in zraka se močno povečuje vse od industrijske revolucije naprej. Velik problem pri tem je predvsem onesnaževanje tal s težkimi kovinami, ki je lahko posledica človeškega delovanja (rudarjenje, plavžarjenje, gorenje fosilnih goriv, gnojila, pesticidi,...) ali naravnih aktivnosti (Gaur in Adholeya, 2004). Značilnost težkih kovin v tleh je, da so stabilni, obstojni in trajni onesnaževalci okolja. Težke kovine so definirane kot tiste, ki imajo specifično težo večjo od  $5 \text{ g/cm}^3$  oziroma atomsko število nad 20 (Gasic in Korban, 2006). Vse niso strupene, nekatere od teh spojin so mikronutrienti, nujno potrebni za rast rastlin (Zn, Fe, Mn, Ni, Cu, Mo, Co) in so vključeni v delovanje številnih proteinov, vzdržujejo rast in razvoj živečih organizmov, medtem ko druge nimajo posebne biološke funkcije, npr. Cr, Pb, Cd in Hg (Gaur in Adholeya, 2004). Zaradi tega se večkrat uporablja izraz elementi v sledoveh (Gaur in Adholeya, 2004), ali samo kovina, kar bomo uporabljali tudi v naši nalogi. Uničujoče posledice za živeče organizme pa lahko prav tako imajo tudi prekomerne koncentracije mikronutrientov (Gasic in Korban, 2006).

#### 2.1.1 Biodostopnost kovin

Biodostopnost kovin je odvisna od fizikalnih, kemičnih in bioloških talnih dejavnikov. Fizikalni (struktura in dostopnost) in kemični dejavniki (kationska izmenjevalna kapaciteta, vrednost pH, koncentracija kovine, delež organske snovi) so osnova, v kateri lahko biološki dejavniki modificirajo dostopnost kovin s sproščanjem kisika, protonov, organskih kislin (Ernst, 1996). Pomembni biološki dejavniki so značilnosti rastline, talni mikroorganizmi in interakcije med slednjimi in koreninami rastlin. Vse to vpliva na morfologijo korenin, fiziologijo rastlin in frakcijo kovin. Močna interakcija med rizosfernimi bakterijami in glivami s koreninami tako spremeni kapaciteto absorpcije kovin z rastlinami. Med talnimi mikroorganizmi je zelo raziskana simbioza med rastlinami in talnimi glivami, mikoriza, saj pomaga rastlinam pri premagovanju stresnih razmer (Leyval in Joner., 2001; Redon in Beguiristain, 2009).

### 2.1.2 Cink

Zn je med 30 elementi 23. najbolj zastopan element v tleh (Broadley in sod., 2007). Naravni vir Zn je kemično in fizikalno spreminjanje matične kamnine, ki je odvisno od njene mineralne sestave. Drugi izvori Zn so atmosfera (vulkani, gozdni požari, prah) in biotski procesi (dekompozicija, spiranje z listnih površin) (Broadley in sod., 2007). Razpolovna doba za Zn je od 70 do 510 let in je odvisno od vrste tal, vsebnosti organske snovi in padavin (Kabata-Pendias in Pendias, 1984).

Zn uporabljam v avtomobilski industriji (antikorozijsko sredstvo), farmacevtski industriji (mazila in zdravila), kemični industriji (belila), kmetijstvu (za varstvo rastlin in v mineralnih gnojilih) in je stranski proizvod pri galvanizaciji in metalurških procesih (Kabata-Pendias in Pendias, 1984). Pri pridobivanju in predelavi Zn predstavlja največji problem tudi hkratno onesnaževanje s Cd, ki je za okolje bolj obremenilen in bolj strupen kot Zn. Povprečna celokupna koncentracija Zn v tleh je med 10 in 300 mg/kg (Broadley in sod., 2007). K bistveno večim koncentracijam Zn v tleh pa prispevajo tudi prej našteti antropogeni vplivi. Tako lahko količina Zn na industrijskih območjih naraste do 12500 mg/kg. V Žerjavu, Mežiška dolina, se koncentracije Zn v tleh gibljejo med 400 in 1800 mg/kg in so posledica dolgotrajnega rudarjenja (Leštan in Grčman, 2001). Z zakonom določene dovoljene koncentracije so opredeljene z mejno vrednostjo Zn v tleh (200 mg/kg), opozorilno vrednostjo (300 mg/kg) in kritično vrednostjo (720 mg/kg) (Ur. I. RS 68/96).

### 2.1.3 Vloga Zn v rastlini in simptomi poškodb

Zn je takoj za Fe najbolj zastopan prehodni element v organizmih in edini, ki je zastopan pri vseh šestih encimskih razredih (oksidoreduktazah, transferazah, hidrolazah, liazah, izomerazah, ligazah). Zn ima pri rastlinah katalitično, regulatorno, strukturno in transportno vlogo. Minimalna koncentracija Zn, ki je potrebna za preživetje vrste, je med 15 in 20 mg/kg (Marschner, 1995). Pri večini rastlin se koncentracije Zn v poganjkih gibljejo med 70 in 400 mg/kg, pri rastlinah, ki Zn hiperakumulirajo pa so vrednosti večje kot 10000 mg/kg (Adriano, 2001).

Zn se večkrat pojavlja v strupenih koncentracijah, le malokrat je za rastline omejujoč dejavnik. Simptomi se kažejo kot nekroze vršička korenin, medžilne kloroze, krajšanje členkov, epinastije, zvijanje listne ploskve, zmanjšana velikost lista (Broadley in sod., 2007), inhibicija fotosinteze in upočasnitev rasti rastline (Toler in sod., 2005).

#### **2.1.4 Privzem in transport Zn v rastlini**

Začetna faza privzema Zn predstavlja hiter vstop  $Zn^{2+}$  v medcelične prostore parenhimske skorje in vezavo na celične stene. Sprejem Zn v rastlino je odvisen predvsem od rastlinske vrste, od reakcije tal in prisotnosti antagonističnih ionov v tleh, kot so  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $PO_4$ , in Ni. Pozneje sledi počasna faza, kjer poteka simlastni in transmembranski transport znotraj koreninskega sistema in transport v ksilem, transport preko membrane listnih celic, in skladiščenje v listnih vakuolah (Lasat in sod., 1996).

### **2.2 TOLERANCA RASTLIN NA KOVINE**

Rastline brez razvoja tolerance na močno onesnaženih tleh zaradi strupenih koncentracij kovin ne bi mogle preživeti. V skladu s tem sta se razvili dve osnovni tolerančni strategiji: izključevanje in akumulacija (Baker, 1981). Izključevalske rastline s fiziološkimi mehanizmi aktivno preprečujejo privzem kovin iz tal in njihov nadaljnji transport po rastlini, akumulacijske rastline pa kovine pospešeno privzemajo iz tal v korenine in jih transportirajo v nadzemne dele, kjer se kovine koncentrirajo. Odnos med koncentracijo kovin v tleh in rastlino lahko pri prvih opišemo z eksponentno funkcijo, pri drugih pa z logaritemsko (Baker, 1981).

### **2.3 HIPERAKUMULACIJA**

Hiperakumulacija je genetska in fiziološka sposobnost rastline, da akumulira večje količine kovin na onesnaženih tleh (Brooks, 1998). Na začetku raziskav so hiperakumulacijske rastline definirali glede na vsebnost kovine v poganjkih ( $Mn, Zn > 10000 \text{ mg/kg}$ ;  $Ni, Co, Cu > 5000 \text{ mg/kg}$ ;  $Pb \text{ in } Se > 1000 \text{ mg/kg}$  in  $Cd > 100 \text{ mg/kg}$ ) (McGrath in sod., 2001). V primerjavi z neakumulacijskimi rastlinami je koncentracija kovin v hiperakumulacijskih rastlinah lahko 1 do 3- krat večja (McGrath in sod., 2001). Kasneje so definiciji dodali tudi kriterij, ki opisuje

kopičenje kovin v nadzemnih delih t.i. translokacijski faktor (TF) (Reeves, 2006). Hiperakumulacijske rastline imajo namreč za razliko od neakumulatorjev izjemno učinkovit ksilemski transport iz korenin v poganjke, ter zmanjšano kopičenje kovin v vakuolah koreninskih celic (McGrath in sod., 2001). Značilnost hiperakumulacijskih rastlin je torej, da je njihov TF faktor večji kot 1, kar pomeni, da imajo hiperakumulacijske rastline večje koncentracije kovin v poganjkih kot v koreninah (Baker in sod., 1994). Danes je poznanih več kot 450 hiperakumulacijskih vrst (Shah in Nongkynrih, 2007). Večina teh lahko hiperakumulira le eno vrsto kovine (Kamnev in sod., 2000), kar nekaj pa je takšnih, ki imajo sposobnost tudi privzema različnih kovin (Baker in sod., 1981).

Območja onesnažena s kovinami predstavljajo zatočišča za kompetitivno šibke rastlinske vrste, ki so na teh območjih sposobne razviti toleranco na kovine (Pawlovska in sod., 1996). V tem okolju so hiperakumulacijske in tolerančne rastline kompeticijsko uspešnejše, s tem pa so si zagotovile novo ekološko nišo. Poleg tega so tudi ugotovili, da je zaradi visokih vsebnosti kovin v poganjkih pritisk herbivorov manjši, kljub temu da je tudi vložek v obrambne snovi manjši (Dechamps in sod., 2007).

Na začetku so za Zn tolerantne rastline pripadale družinam Poaceae, Caryophyllaceae in Lamiaceae, vendar nedavne genetske študije niso pokazale filogenetske predispozicije za njihovo evolucijsko Zn hiperakumulacijo (Broadley in sod., 2007). Danes so zato k temu seznamu dodali tudi družine Violaceae, Polygonaceae in Brassicaceae. V slednji zasledimo dva zelo pomembna roduva *Thlaspi* in *Arabidopsis* (Reeves, 2006).

### **2.3.1 Hiperakumulacija rodu *Thlaspi***

Veliko vrst v rodu *Thlaspi* je bilo spoznanih za hiperakumulatorje Ni, Zn (Brooks, 1998), Cd (Lombi in sod., 2000) in Pb (Reeves, 2006). Večina študij privzema kovin, transporta, akumulacije in tolerance je bila opravljena pri vrsti *T. caerulescens*, ki je sposobna hiperakumulacije Cd, Zn in Ni (Brooks, 1998). Nedavno pa je bila odkrita druga hiperakumulacijska vrsta rani mošnjak (*Thlaspi praecox*), ki na najbolj onesnaženih območjih

lahko hiperakumulira tudi do 1.5 % Zn in 0.6% Cd (Vogel-Mikuš in sod., 2005). Vrsta *T. praecox* je trajnica, ki raste na suhih in kamnitih karbonatnih travnikih od južne Avstrije, do Italije in Balkana. Je majhna, rozetasta rastlina iz katere marca in aprila požene več stebel, ki razvijejo socvetja (Mathe-Gaspar in Anton A., 2002). Najdemo jo na onesnaženih kot tudi na neonesnaženih območjih (je t.i. psevdometalofit) (Vogel-Mikuš in sod., 2005), kot tudi nekatere njegove bližnje sorodnike npr. vrsto *T. caerulescens* (Escarré in sod., 2000).

#### 2.4 FENOTIPSKE RAZLIKE MED POPULACIJAMI HIPERAKUMULACIJSKIH RASTLIN

Pri pritrjenih organizmih, kot so tudi rastline, pogosto zasledimo (odvisno od razlik v mikrohabitatih) vzpostavitev različnih morfoloških in/ali fizioloških oblik imenovanih ekotipi. Prav tako lahko rastlinske vrste, ki kolonizirajo različna okolja, razvijejo genetsko različne populacije, če je genski pretok med temi populacijami omejen. Genetska diferenciacija med populacijama je lahko rezultat naravne selekcije (Dechamps in sod., 2007). Dechamps in sod. (2007) so za vrsto *T. caerulescens* pokazali, da obstajajo fenotipske razlike med populacijami, ki rastejo na onesnaženih tleh (s povečanimi vsebnostmi Zn, Cd in Pb) in na neonesnaženih območjih, ki naj bi temeljile na genetski osnovi. Populacije z neonesnaženih območij so pokazale trend cvetenja v drugem letu starosti, medtem ko so populacije z onesnaženih območij cvetele že prvo leto. Poleg tega se je pri slednjih kazala višja tolerantnost in večja kapaciteta akumulacije kovin kot pri drugih populacijah (Vosatka in sod., 2006) in kot zadnje, populacije z onesnaženih območij so vedno tvorile manjše koncentracije obrambnih substanc (glukozinolatov) proti herbivorom kot populacije z neonesnaženih območij (Dechamps in sod., 2007). Tako je bil delež rastlin brez poškodb pri rastlinah z onesnaženega območja približno 50%, pri rastlinah z neonesnaženega območja pa komaj 25%.

Kljub temu da so imele rastline tolerantne na kovine višjo stopnjo rasti, je vidno, da so tudi netolerantne populacije še vedno sposobne uspevati na območjih, s povečano koncentracijo kovine. To bi mogoče lahko vodilu k temu, da si populacije iz onesnaženih in neonesnaženih območij lahko delijo skupno osnovno toleranco na kovine (Escarré in sod., 2000).

Poskusi iz narave se razlikujejo od poskusov pod kontroliranimi pogoji. Vogel-Mikuš in sod. (2005) so v naravi izmerili največjo koncentracijo Zn v poganjkih 14590 mg/kg, medtem ko pod kontroliranimi pogoji le 3220 mg Zn/kg (Vogel-Mikuš in sod., 2006). Ne vemo, ali so razlike v privzemu zaradi različnih koncentracij kovin v tleh, ali pa na to vplivajo drugi oziroma ekološki dejavniki (AM glive).

## 2.5 MIKORIZA

Mikoriza je simbioza med različnimi vrstami gliv in koreninami rastlin. Odnos se je razvijal od prihoda rastlin na kopno (pred 460 milijoni let) in ga lahko zasledimo v vseh ekosistemih in pri skoraj vseh kopenskih rastlinah. Odsotna je le pri nekaterih vodnih vrstah, epifitih in tistih rastlinah, ki rastejo na mineralno bogatih tleh (Wang in Qui, 2006).

### 2.5.1 Arbuskularna mikoriza (AM)

AM je najpogosteji tip mikorize pri zelnatih rastlinah, saj jo tvori več kot 80% kopenskih rastlinskih vrst, vključno z mahovi in praprotmi (Wang in Qui, 2006). Talne AM glive tvorijo obligatno simbiozo z rastlino in so vezni člen med tlemi in koreninami rastlin (Christie in sod., 2004). Tvorijo jo samo glive iz debla Glomeromycota (Schüsler in sod., 2001). Pri tem nastajajo neseptirane hife, ki se zadebeljujejo in tvorijo vezikle ali pa se dihotomno znotrajcelično razcepljajo in tvorijo arbuskule (Gurevitch in sod., 2002). Ti so ključni za delovanje celotne simbioze, saj so mesta izmenjave med rastlino in glivo, pri čemer rastlina glivo oskrbuje s fotosinteznimi produkti, ki so edini vir ogljika za glivo, gliva pa rastlini pomagajo pri preživetju ob neugodnih abiotiskih in biotskih dejavnikov. S tvorbo hif izboljšujejo strukturo rizofsere (glive tvorijo snovi, ki povezujejo delce zemlje in tvorijo trdne aggregate, s tem pa zmanjšujejo erozijo tal), poleg tega pa povečajo absorpcijsko površino korenin (Gaur in Adholeya, 2004). S tem povečajo dostop vode in hrani, ki so drugače za rastlino manj dostopna in s tem olajšajo razvoj in preživetje populacije v stresnih razmerah. Absorpcija teh snovi se pri mikoriznih koreninah lahko poveča tudi do 47-krat (Turnau in sod., 2006). Poleg povečane preskrbe z vodo lahko AM glive ščitijo rastlino tudi pred prevelikimi količinami vode, stresom zaradi slanosti in kovin. Med biotskimi dejavniki je pomembno

omeniti zaščito rastline pred herbivori (nematodi), paraziti ter bakterijskimi in glivnimi boleznimi (Gurevitch in sod., 2002).

Privzem snovi iz zemlje poteka preko micelijev gliv in se transportira preko glivnih celic do korenin celic gostiteljske rastline (Zhu in sod., 2001). Pri tem sodeluje veliko encimskih procesov, ki zvišujejo učinkovitost. Proces poteka tako, da glice sprostijo encime v okolico, ki trdno vezane snovi sprostijo v okolico in tako postanejo dostopne. Te snovi nato gliva črpa in kolikor jih ne potrebuje, jih transportira v rastlino. Nekatere glive so bolj uspešne pri privzemu snovi kot druge, vendar so pri tem pomembni tudi drugi okoljski dejavniki (Zhu in sod., 2001).

### **2.5.2 Kovine in AM**

Rastline kolonizirane z AM glivami so navadno bolj tolerantne na povečane ali zmanjšanje koncentracije kovin kot rastline brez simbiontov (Gaur in Adholeya, 2004), vendar so mehanizmi, ki to omogočajo v veliki meri še neznani. Raziskave so pokazale, da pri majhnih koncentracijah kovin v tleh AM glive pomagajo privzemati in akumulirati kovine, ki so nujno potrebne za rast in razvoj rastline, pri velikih koncentracijah kovin v zemlji pa omejiti privzem kovin in njihovo translokacijo (Audet in Charest, 2006). Pomembno vlogo pri teh procesih pa imajo tudi vsi ostali v tleh prisotni organizmi (Bi in sod., 2003).

Onesnaženje tal s kovinami vpliva tudi na kolonizacijo rastlin z AM glivami. V nekaterih študijah (Vogel-Mikuš in sod., 2005; Vosatka in sod., 2006; Regvar in sod., 2006) so ugotovili, da onesnaženje tal s kovinami zmanjšuje vrstno diverzitetu in kolonizacijo z AM glivami v primerjavi z neonesnaženimi območji. Okoljska onesnaženost namreč lahko vodi k propadu glive in povečani motnji za populacijo gliv (Gadd, 2007). Na glivno populacijo na onesnaženih tleh vpliva več parametrov:

- vrsta onesnažila,
- koncentracija onesnažila in razporeditev v tleh,
- biodostopnost onesnažila,

- vpliv onesnažila na rastlino in neposreden vpliv le-tega na glivo,
- koncentracija onesnažila, ki vpliva na glivno populacijo (Gadd, 2007),
- fiziološke in genetske adaptacije gliv (Christie in Chen, 2004),
- prisotnost drugih talnih organizmov, ki spreminja lastnosti tal (Gadd, 2007).

Biološki mehanizmi, ki temeljijo na preživetju gliv v onesnaženih območjih, vsebujejo ekstracelularno precipitacijo, kompleksacijo in kristalizacijo, transformacijo kovin z oksidacijo, redukcijo, metilacijo in dealkalizacijo, bioabsorbcijo v celične stene, pigmente in ekstracelularne polisaharide, zmanjšan transport ali neprepustnost membran, intracelularno kompartmentizacijo in na koncu precipitacijo in/ali ločevanje (Gadd, 2007).

Pri nekaterih študijah so pokazali, da AM glive privzemajo kovine iz tal in jih skladiščijo v koreninah, vendar je nadaljnji transport onemogočen zaradi imobilizacije (Gaur in Adholeya, 2004). Kovine, ki dosežejo notranjost korenin se koncentrirajo večinoma v celicah parenhima korenin, kjer se nahaja tudi večina glivnih struktur. Nedavne raziskave so s pomočjo rentgenskih žarkov (EDXA) pokazale, da se Zn, Cu in Cd akumulirajo v celičnih stenah in v obliki granul v citoplazmi gliv, medtem ko je citoplazma celic korenine prosta teh elementov (González Guerrero in sod., 2001). Poleg tega lahko tudi vezikli služijo kot skladišče za kovine (Turnau, 1998).

### **2.5.3 AM pri hiperakumulacijskih rastlinah**

Le za nekatere družine (Brassicaceae, Proteaceae, Amaranthaceae, Caryophylaceae) velja, da ne tvorijo AM, vendar so intenzivne raziskave v zadnjem času pokazale, da temu ni tako. Za vrsti *T. praecox* (Vogel-Mikuš in sod., 2006; Pongrac in sod., 2007) in *Biscutella laevigata* (Orłowska in sod., 2005) je bilo namreč pokazano, da tvorita AM le v reproduktivnem obdobju življenjskega cikla, kjer izboljšajo mineralno prehrano rastline tako, da zmanjšajo količine kovin, kar ima za posledico bolj viabilna semena in boljše pogoje za kalitev in preživetje potomcev (Regvar in Vogel-Mikuš, 2008). AM glive tudi povečajo privzem nutrientov v kontroliranih pogojih (Vogel-Mikuš in sod., 2006) in privzem Fe v naravnem

okolju (Pongrac in sod., 2007). Raziskava Vogel-Mikuš in sod (2006) pa je bila tudi prvi primer, kjer so uspeli vzgojiti hiperakumulacijsko rastlino, ki je tvorila AM glivno simbiozo. AM glivne vrste, ki kolonizirajo vrsto *T. praecox* so tudi identificirali (Pongrac in sod., 2009). Pri tem pa so tudi pokazali, da so AM glice, ki kolonizirajo vrsto *T. praecox* na onesnaženem območju zelo tolerantne glice, ker se kolonizacija v kontroliranem okolju povečuje s stopnjo onesnaženja. Mehanizmi, s katerimi rastlina pridobiva kovine iz tal in njihova odvisnost od rizosfernih organizmov (tudi AM gliv), so poznani (Leyval in sod., 1997), ni pa jasno, kako to poteka pri hiperakumulacijskih rastlinah, ki so dolgo veljale kot nemikorizne (Vogel-Mikuš in sod., 2005). Vendar so Vogel-Mikuš in sod. (2005) pokazali, da je bila pri vrsti *T. praecox* AM kolonizacijska raven prisotna, vendar je nižja ali pa tudi manjka pri populacijah, ki so uspevale na območju močno onesnaženim z Zn, Cd in Pb. Razlog lahko iščemo v tem, da je vegetacija na tem območju uničena, prisotna je zelo močna erozija in prihaja do velike izgube AM glivnih propagulov ali pa populacija ne uspeva dolgo na tem območju. Za razliko od tega je na neonesnaženem območju rastlinska skupnost stabilna in pestra, kar omogoča razvoj in zato je številčnost in diverziteta AM gliv večja (Regvar, 2001).

Različni ekotipi ali genetsko različne populacije se lahko razvijejo tudi pri mikoriznih glivah, ki kolonizirajo rastline (Redon in Beguiristain, 2009). Tako je toleranca hiperakumulacijskih rastlin, ki tvorijo simbiozo, odvisna ne samo od rastlinske vrste in njenega ekotipa, pač pa tudi od glivne vrste in njenega ekotipa, ter seveda od kovine in njene dostopnosti ter talnih razmer (Pawłowska in Charvat, 2004). Ekotipi gliv in rastlin so rezultat dolgoletne adaptacije na onesnažena tla, zato so na teh območjih lahko bolj učinkoviti pri fitoremediaciji, kot tiste, iz neonesnaženih območij (Gaur in Adholeya, 2004; Orlowska in sod., 2005).

### 3 NAMEN RAZISKAV

V kontroliranih pogojih vzgojiti rastline vrste *T. praecox*, ki je sposobna hiperakumulacije Cd in Zn; in sicer dve različni populaciji z onesnaženega (Žerjav) in neonesnaženega območja (Zaplana) in jih inokulirati z avtohtonimi in neavtohtonimi arbuskularno mikoriznimi (AM) glivami ob dodatku Zn (0, 100, 250, 500 mg/kg) v komercialnem substratu. Ugotavljeni smo:

- pomen inokulacije z AM glivami za biomaso rastlin,
- privzem Zn v poganjke in korenine v odvisnosti od AM in koncentracijske vrste Zn,
- privzem P v poganjke in korenine v odvisnosti od AM in koncentracijske vrste Zn.

### 4 OSNOVNE HIPOTEZE

Na osnovi informacij iz literature smo postavili naslednje hipoteze, ki smo jih v nalogi testirali:

1. Biomasa rastlin populacije iz Žerjava bo manjša od biomase rastlin populacije iz Zaplane.
2. Populacija iz Žerjava bo imela večji privzem Zn kot Zaplanska populacija.
3. Z večanjem koncentracije Zn v substratu bo naraščala koncentracija in vsebnost Zn v rastlini.
4. Translokacijski faktor Zn bo večji kot ena, kar je značilnost hiperakumulacijskih rastlin.
5. AM glive bodo pri majhnih koncentracijah Zn v tleh pomagale rastlini privzeti Zn, pri velikih pa ga bodo imobilizirale.
6. AM glive bodo pomagale rastlinam pri privzemu P.
7. Inokulirane rastline z avtohtonimi AM glivami bodo imele večjo sposobnost privzema Zn kot rastline inokulirane z alohtonin inokulumom.

## 5 MATERIAL IN METODE

### 5.1 PRIPRAVA INOKULUMA ZA POSKUS

Na lokacijah Zaplane (neonesnažena lokacija) in Žerjava (onesnažena lokacija) smo nabrali odrasle rastline vrste *Thlaspi praecox* Wulfen in jih prenesli v laboratorij. Korenine nabranih rastlin smo ločili od poganjkov, korenine smo na drobno narezali ter jih z rizosferno zemljo temeljito vmešali v steriliziran (avtoklaviranje eno uro pri 121°C in po 48 urah ponovno avtoklaviranje) substrat (komercialna zemlja Biobrazda:pesek 2:1 v/v). Na substrat smo posejali semena koruze (*Zea mays*) in rastline gojili v rastlinjaku (23°C in 16:8 urni dnevno:nočni cikel) štiri mesece. Korenine koruze so predstavljale past za AM glice, ki so bile prisotne v koreninah in v rizosfernji zemlji vrste *T. praecox*. Inokulum, ki smo ga uporabili v našem poskusu, so predstavljale drobno narezane korenine koruze.

### 5.2 PRIPRAVA POSKUSA

V poskusu smo imeli štiri različne tretmaje (naraščajoča koncentracija dodanega Zn v substratu) in sicer 0, 100, 250 in 500 mg dodanega Zn/kg. Zn smo v substrat zamešali v obliki sulfata ( $\text{ZnSO}_4$ ). En set tako pripravljene zemlje smo inokulirali z glivno pastjo z Zaplane, en set z glivno pastjo iz Žerjava, en set je ostal neinokuliran. Za vsako koncentracijo in inokulum smo napolnili 6 lončkov. Skupaj smo imeli 72 lončkov. V polovico lončkov smo posejali semena vrste *T. praecox* z Zaplane (populacija z neonesnažene lokacije) in v drugo polovico semena vrste *T. praecox* iz Žerjava (populacija z onesnažene lokacije).

### 5.3 ANALIZE TAL

#### 5.3.1 Določanje koncentracije dostopnega Zn v substratu

V čiste steklene čaše smo zatehtali 1 g vzorca tal, dodali 20 ml 1 M amonijevega acetata (Merck), zatesnili z plastično vrečko ter zatesnili z elastiko. Čaše z vzorci smo zložili v stresalnik in stresali dve uri pri sobni temperaturi (200 rpm). Po končanem stresanju smo počakali, da se je zemlja posedla, nato pa smo supernatant s pomočjo 5 ml brizgalk filtrirali skozi 0,45 µm filtrirni papir (Milipore) v 20 ml epruvete. Epruvete smo zatesnili s pokrovčki,

ter jih do meritve shranili v hladilniku. Meritve smo opravljali na atomskem absorpcjskem spektrometru (AAS).

### **5.3.2 Določanje organske snovi s kromovo metodo**

Celokupno organsko snov smo določali s kromovo metodo povzeto po Kandeler (1995), ki je primerna za tla, ki vsebujejo do 8 % organske snovi in ni primerna za določanje organskih snovi v humusnih gozdnih tleh. Organska snov se v tleh oksidira s pomočjo mešanice kalijevega dikromata ( $K_2Cr_2O_7$ ) in žveplene kisline ( $H_2SO_4$ ). Pri tem se tvori krom (Cr III), ki ga določimo kalorimetrično in je ekvivalent organski snovi, ki je prisotna v tleh.

Za pripravo potrebne količine raztopine kalijevega dikromata smo zatehtali 98,06 g  $K_2Cr_2O_7$  (Alkaloid, Skopje) in ga raztopili v 1000 ml bidestilirane vode. Pri tem smo raztopino segrevali, da se je kalijev dikromat popolnoma raztopil.

#### **5.3.2.1 Priprava standardov**

Vzeli smo pet 10 ml steklenih bučk. V posamezno bučko smo zatehtali 0; 0,058; 0,116; 0,174 in 0,232g mioizitola (Serva). V digestoriju smo vsaki dodali 2 ml raztopine  $K_2Cr_2O_7$  in nato še 1,5 ml koncentrirane žveplene kisline (Merck). Raztopino smo pustili stati 2 uri, nato ji dodali 10 ml bidestilirane vode, dobro premešali in pustili stati čez noč. Za fotometrično analizo pri 570 nm smo vzeli 1 ml standardne raztopine, jo razredčili z bidestilirano vodo do 25 ml in rahlo premešali. Iz dobljenih podatkov smo izrisali umeritveno krivuljo (Priloga 1). Na podlagi začetne mase standardov, vrednosti mioinozitola ustrezajo 0, 2, 4, 6 in 8 % organske snovi v tleh.

#### **5.3.2.2 Priprava vzorcev tal**

V 10 ml bučke smo zatehtali 0,2 g substrata posušenega na zraku. Dodali smo 2 ml kalijevega dikromata in 1,5 ml žveplene kisline ter pustili stati 2 uri. Nato smo dodali bidestilirano vodo do oznake 10 ml, premešali in raztopino pustili stati čez noč. Za spektrofotometrično analizo smo vzeli 0,3 ml vzorčne raztopine in 7,5 ml bidestilirane vode ter rahlo premešali. Iz vsakega

vzorca smo naredili tri podvzorce in vsakemu izmerili absorbcojo pri valovni dolžini 570 nm. Organsko snov v tleh smo izrazili kot % tal, ki se jo izračuna iz umeritvene krivulje standarda po formuli:

$$S^*2/SW = \% \text{ organske snovi} \quad \dots(1)$$

S = organska snov vzorca (%)

2 = koeficient pretvorbe

SW = začetna masa na zraku posušene prsti

### 5.3.3 pH tal

Vzeli smo čiste steklene čaše v katerih smo zmešali substrat in bidestilirano vodo (1:2 w/v) in 20 minut stresali pri sobni temperaturi pri 200 onm. Ko se je vsebina posedla, smo s pomočjo pH metra izmerili pH raztopine.

## 5.4 ANALIZA RASTLINSKEGA MATERIALA

Poskus smo zaključili po 5 mesecih rasti. Iz lončkov smo pobrali rastline, jih temeljito oprali pod tekočo in bidestilirano vodo in ločili poganjke in korenine. Del korenin smo uporabili za oceno kolonizacije z AM glivami (glej poglavje 5.5.). Preostali rastlinski material smo sušili do konstantne mase pri 60°C in ga stehtali (suha masa, SM). Suh rastlinski material smo s pomočjo tekočega dušika uprašili v fin prah.

### 5.4.1 Mineralizacija rastlinskih vzorcev z dušikovo in peroklorno kislino

Pripravili smo 16 cm visoke epruvete in v njih zatehtali 100 mg suhega rastlinskega materiala (poganjke in korenine), na njih pa v digestoriju s stekleno pipeto odpipetirali 3 ml HNO<sub>3</sub>/HClO<sub>4</sub> (65% HNO<sub>3</sub>: koncentrirana HClO<sub>4</sub> 7:1 v/v (Vogel-Mikuš in sod., 2005)). Raztopino smo dobro premešali, pokrili z aluminijasto folijo in pustili stati čez noč, da se je material dobro prepojil. Naslednji dan smo vsebino dobro pretresli, odprli, epruvete zložili v termoblok, ki je bil nameščen na grelniku in jih postopoma segrevali do končne temperature. To segrevanje je trajalo približno osem ur. Približno dve uri smo vzdrževali temperaturo, pri kateri pare HNO<sub>3</sub> kondenzirajo k zgornjem robu epruvete, in kislina steče nazaj v epruveto. V

tej fazi poteka mineralizacija najbolj učinkovito. Ker mineralizacije nismo dokončali v enem dnevu smo nadaljevali tudi naslednji dan. Postopoma smo zviševali temperaturo dokler  $\text{HNO}_3$  ni popolnoma izhlapela. Na koncu smo naredili tulec iz aluminijaste folije ter ovili termoblok. Izolacija je preprečila kondenzacijo kislina na zgornjem delu epruvet in omogočila, da je kislina popolnoma odparela. Mineraliziran material smo postavili v stojalo za epruvete in shranili do meritev.

#### **5.4.2 Koncentracija Zn v rastlinskem tkivu**

Koncentracijo Zn v poganjkih in koreninah smo merili s pomočjo atomskega absorpcijskega spektofotometra (AAS). En dan pred meritvami smo v vse epruvete odpipetirali 5 ml 0,2 %  $\text{HNO}_3$ , dobro premešali, pokrili s plastičnim pokrovčkom in postavili v hladilnik. Pred meritvami smo vzorce segreli na sobno temperaturo. Iz standardnih koncentracij Zn smo naredili umeritveno krivuljo. Po potrebi smo vzorce redčili z 0,2 %  $\text{HNO}_3$ .

#### **5.4.3 Določanje fosforja v rastlinskih vzorcih**

Koncentracijo P v rastlinskem materialu smo merili s pomočjo spektrofotometra pri valovni dolžini 400 nm (Olsen, 1982). Pripravili smo umeritveno krivuljo v razponu od 0,1 do 2 mg/l P (Priloga 1). Meritve smo izvedli tako, da smo 1 ml tako pripravljenim standardom dodali 2 ml reagenta MoV (amonijev monovanadat - Merck) in dopolnili z 0,2 %  $\text{HNO}_3$  do 10 ml. Iz mineraliziranih vzorcev rastlinskega materiala smo vzeli 2 ml raztopine, dodali 2 ml MoV reagenta in 6 ml 0,2 %  $\text{HNO}_3$ .

Meritve smo začeli s slepim vzorcem, ki je vseboval 2 ml reagenta MoV in 8 ml 0,2 %  $\text{HNO}_3$ . Pri meritvah smo iz vsakega rastlinskega vzorca naredili tri podvzorce in vsakemu posebej izmerili absorpcijo. Iz umeritvene krivulje smo odčitali koncentracijo P v izmerjenem vzorcu in jo preračunali na maso in volumen vzorca. Po naslednji enačbi smo izračunali koncentracijo P v naših vzorcih:

$$\text{Fosfor (mg/g)} = (\text{fosfor (mg/l)}_{\text{iz UK}} * \text{V}_{\text{vzorca}}) / \text{m}_{\text{vzorca}} \quad \dots(2)$$

## 5.5 KOLONIZACIJA KORENIN Z AM GLIVAMI

### 5.5.1 Vzorčenje in barvanje koreninskih fragmentov

Opazovanje glivnih struktur pod svetlobnim mikroskopom nam omogoča selektivno barvanje hitina, ki je sestavina celične stene simbiotske glive. To smo dosegli z barvilo tripan modro, postopek pa smo povzeli po Philipsu in Haymanu (1970). Iz vseh inokuliranih korit smo povzročili del koreninskega sistema in ga sprali pod tekočo in destilirano vodo. Korenine smo razporedili v označene epruvete in jih prelili z 10% KOH, ki smo ga pripravili iz 1 l destilirane vode in 100 g KOH (Merck) in jih v sušilniku 20 min segrevali pri 90°C. Nato smo iz epruvet odlili 10% KOH in koreninice večkrat sprali pod tekočo vodo. V epruvete smo dolili 0,05% tripan modro, ki smo ga pripravili iz 40 g destilirane vode, 40 g mlečne kisline (Kemika), 80 g glicerola (Kemika) in 0,08 g tripan modrega (Fluka) in jih sušili v sušilniku 15 min pri 90°C.

### 5.5.2 Ocenjevanje kolonizacije z AM glivami

Ocenjevanje kolonizacije je povzeto po Trouvelot in sod. (1986) in temelji na opazovanju 30 naključno izbranih koreninskih odsekov, obarvanih s tripan modrim. Koreninske odseke smo pregledovali s svetlobnim mikroskopom (Axioskop, Opton Feintechnik GmbH) in pri vsakem odseku ocenili stopnjo mikorizne kolonizacije na osnovi 6 stopenjske lestvice, pri kateri razred 0 predstavlja 0% kolonizacija, razred 1 do 1% kolonizacija, razred 2 od 1 do 10% kolonizacija, razred 3 od 10 do 50% kolonizacija, razred 4 od 50 do 90% kolonizacija in razred 5 več kot 90% kolonizacija. Mikorizna frekvenca predstavlja frekvenco fragmentov z glivo in je povezana s številom in homogenostjo razporeditve AM propagulov v tleh. Izračunali smo jo po naslednji enačbi:

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

Preparate smo tudi fotografirali s fotoaparatom znamke Canon, ki je bil pritrjen na mikroskop. Uporabili smo film znamke Konica (100 ASA).

## 5.6 STATISTIČNA ANALIZA

Translokacijski faktor smo izračunali kot razmerje koncentracije Zn v poganjkih in koreninah, vsebnost Zn in P ( $\mu\text{g}$ ) v poganjkih pa kot produkt biomase poganjkov rastline (g) in koncentracije Zn oziroma P v poganjkih (mg/kg).

Vpliv tretmajev na vse preučevane parametre (biomasa korenin, biomasa poganjkov, koncentracija Zn v koreninah, koncentracija Zn v poganjkih, koncentracija P v koreninah, koncentracija P v poganjkih, TF, vsebnost Zn v koreninah in poganjkih, vsebnost P v koreninah in poganjkih) smo ovrednotili z dvosmerno ANOVO pri čemer smo za neodvisna faktorja uporabili populacijo (Zaplana, Žerjav) in inokulacijo (neinokuliran = kontrola, neonesnažen, onesnažen inokulum). Vpliv vrste inokulacije (brez, žerjavski, zaplanski inokulum) na preučevane parametre pri posameznem tretmaju in posamezni populaciji pa smo ovrednotili z enosmerno ANOVO in posthoc Tukey-evim testom ( $p<0,05$ ). Odvisnost posameznih parametrov od Zn v substratu smo analizirali z multiplo regresijo. Za statistične analize smo uporabili računalniški program StatSoft 6.0. Grafe smo izrisali v programu Microsoft Office Excel 2003.

## 6 REZULTATI

Populacijo vrste *T. praecox* z neonesnaženega območja (Zaplana) smo označili z »N«, z onesnaženega območja (Žerjav) pa z »O«. Rastline, ki jih nismo inokulirali z AM glivami smo označili s »k«, rastline inokulirane z inokulumom z neonesnaženega območja z »n« in rastline inokulirane z inokulumom z onesnaženega območja z »o«.

### 6.1 ANALIZA TAL

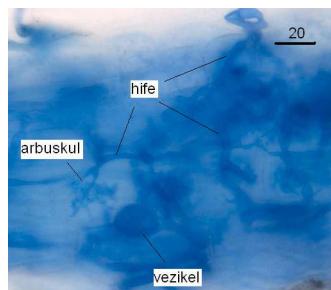
Z dodajanjem Zn v substrat se je povečala koncentracija dostopnega Zn, pH vrednost pa se je zmanjševala (Tabela 1; Priloga 3). Povprečna vrednost pH se je med poskusom povečala in sicer je bila pred poskusom med 6,7 in 7,2 in po poskusu med 7,0 in 7,5 (Priloga 3). Vsebnost organske snovi je naraščala s povečano koncentracijo Zn v substratu (Tabela 1).

**Tabela 1:** Koncentracija dostopnega Zn (mg/kg), pH vrednost in organska snov (%) v substratu, ki smo mu dodali različne koncentracije Zn. Podane so povprečne vrednosti  $\pm$  standardna napaka (n=6). Različne črke označujejo statistično značilno razliko med posameznimi tretmaji (Tukey-ev posthoc test,  $p<0,05$ ).

	Koncentracija Zn dodana substratu			
	0 (mg/kg)	100 (mg/kg)	250 (mg/kg)	500 (mg/kg)
<b>Koncentracija dostopnega Zn</b>	$2,62 \pm 0,52$ (a)	$41,60 \pm 5,17$ (b)	$88,52 \pm 33,98$ (b)	$114,50 \pm 7,79$ (c)
<b>pH pred poskusom</b>	$7,1 \pm 0,0$ (c)	$7,0 \pm 0,0$ (a)	$6,9 \pm 0,0$ (a)	$6,8 \pm 0,0$ (b)
<b>pH po poskusu</b>	$7,3 \pm 0,0$ (a)	$7,2 \pm 0,1$ (a)	$7,2 \pm 0,1$ (ab)	$7,1 \pm 0,1$ (b)
<b>organska snov (%)</b>	$0,67 \pm 0,05$ (a)	$1,79 \pm 0,22$ (a)	$3,72 \pm 0,99$ (b)	$4,15 \pm 0,51$ (b)

### 6.2 KOLONIZACIJA RASTLIN Z AM GLIVAMI

Korenine obeh populacij, inokulirane tako z avtohtonim kot alohtonim inokulumom, so bile le v majhni meri kolonizirane z AM glivami, in sicer smo v povprečju le v 10% korenin opazili prisotnost AM gliv (Slika 1). Pri tem ni bilo niti razlik med populacijama niti nismo opazili vpliva koncentracije dodanega Zn v substratu na stopnjo kolonizacije.



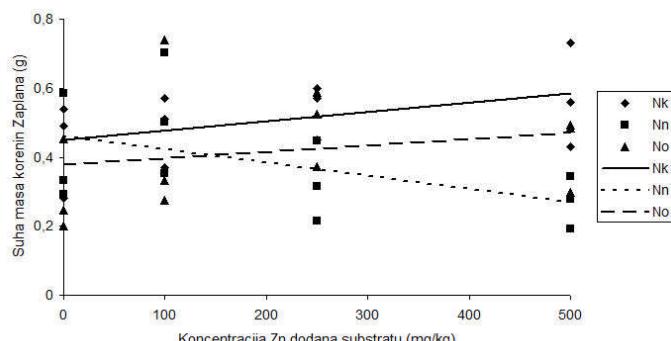
Slika 1: Kolonizacija korenine vrste *T. praecox* z arbuskularno mikoriznimi glivami. Merilce predstavlja  $20 \mu\text{m}$ .

## 6.3 ANALIZA RASTLIN

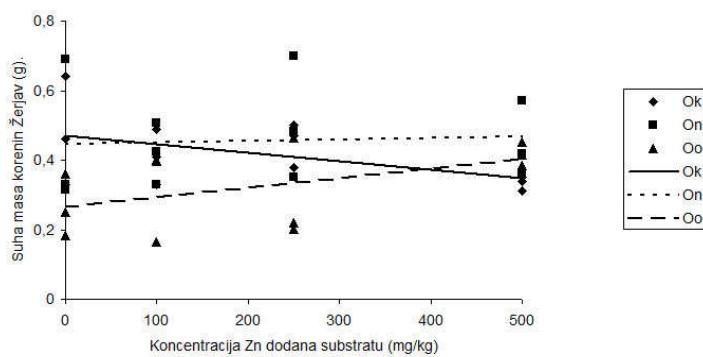
### 6.3.1 Biomasa korenin

Suha masa korenin ni bila odvisna od koncentracije Zn v substratu (Slika 2; Priloga 5a). Populaciji se med seboj nista razlikovali (Priloga 5a). Inokulacija je vplivala na suho maso korenin v interakciji s populacijo (Priloga 5a). Najmanjša biomasa korenin je bila pri zaplanski populaciji inokulirani z inokulumom z neonesnaženega območja (Nn), večja pri inokulaciji z inokulumom z onesnaženega območja (No) in največja pri neinokuliranih rastlinah (Nk). Pri žerjavski populaciji pa je bila najmanjša biomasa korenin pri neinokuliranih raslinah (Ok), večja pri inokulaciji z inokulumom z neonesnaženega območja (On) in največja pri inokulaciji z inokulumom z onesnaženega območja (Oo) (Slika 2; Priloga 5a).

a)



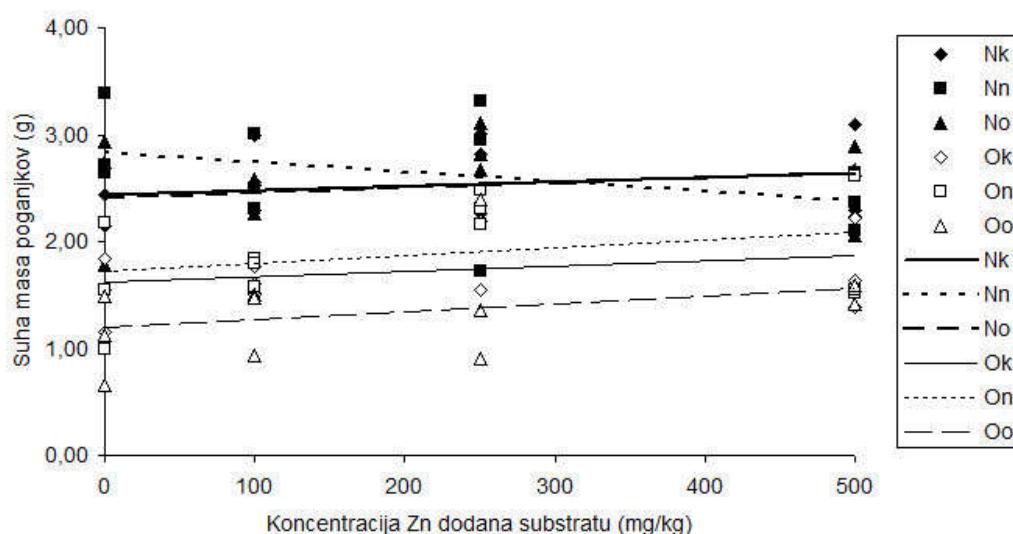
b)



Slika 2: Suha masa korenin (g) populacije vrste *T. praecox* v odvisnosti od koncentracije Zn dodanega substratu (mg/kg). Velike tiskane črke pomenijo izvor rastline (N=rastline z Zaplane, O=rastline iz Žerjava), male pisane črke pomenijo izvor inokuluma (k=neinokulirane rastline, n=inokulum z Zaplane, o=inokulum iz Žerjava).

### 6.3.2 Biomasa poganjkov

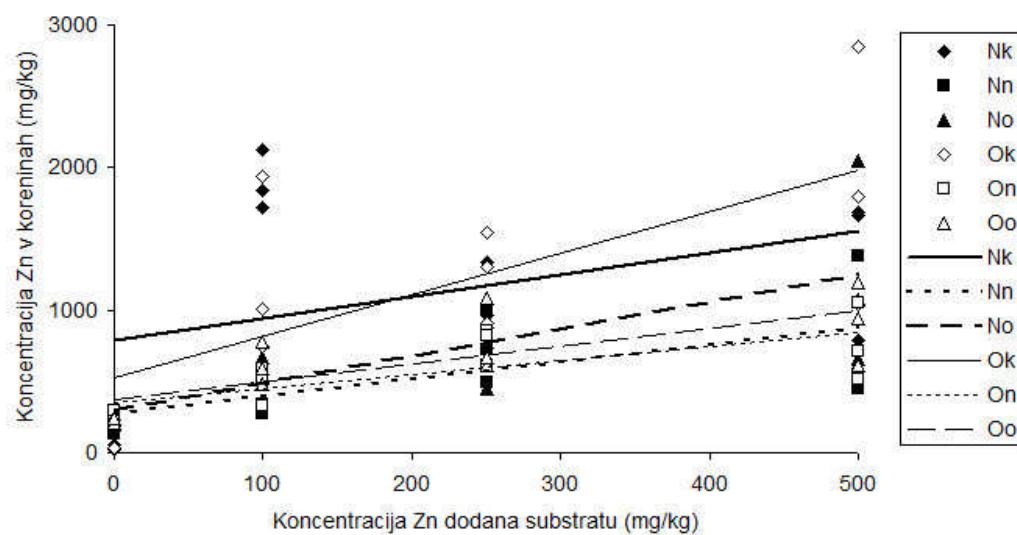
Biomasa poganjkov pri obeh populacijah ni bila odvisna od koncentracije Zn v substratu (Slika 3; Priloga 5a). Biomasa poganjkov rastlin vrste *T. praecox* je bila manjša pri populaciji iz Žerjava (Ok, On, Oo) kot z Zaplane (Nk, Nn, No) (Slika 3; Priloga 5a). Inokulacija z AM glivo je vplivala na biomaso poganjkov in sicer so imele rastline inokulirane z inokulumom z onesnaženega območja (No, Oo) najmanjšo biomaso poganjkov, nekoliko večjo biomaso poganjkov so imele neinokulirane rastline (Nk, Ok) in največjo biomaso rastline inokulirane z inokulumom z neonesnaženega območja (Nn, On) (Slika 3; Priloga 5a).



Slika 3: Suha masa poganjkov (g) populacije vrste *T. praecox* v odvisnosti od koncentracije Zn dodanega substratu (mg/kg). Velike tiskane črke pomenijo izvor rastline (N=rastline z Zaplane, O=rastline iz Žerjava), male pisane črke pomenijo izvor inokuluma (k=neinokulirane rastline, n=inokulum z Zaplane, o=inokulum iz Žerjava).

### 6.3.3 Koncentracija Zn v koreninah

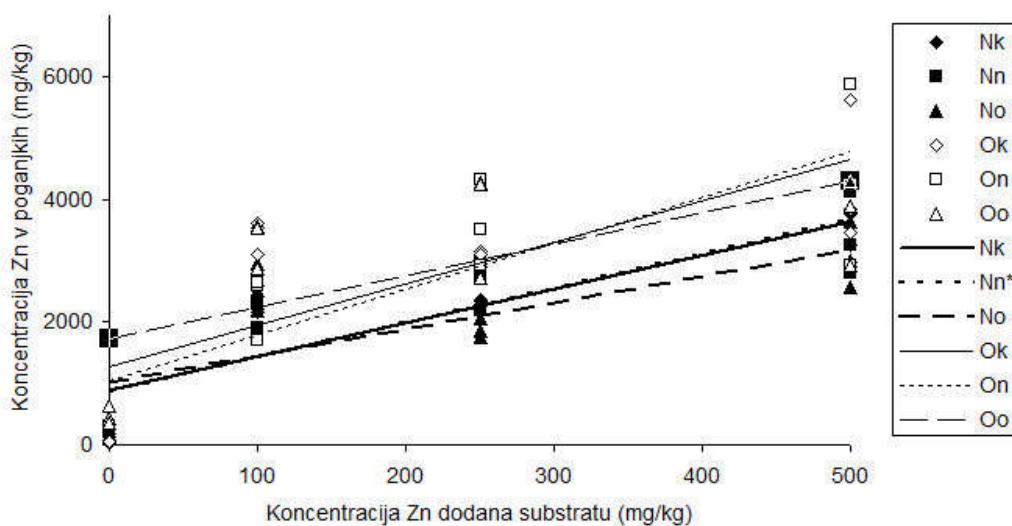
Največja izmerjena koncentracija Zn v koreninah je bila 1194 mg/kg, najmanjša pa 25 mg/kg (Priloga 4). Koncentracija Zn v koreninah je naraščala z večanjem koncentracije Zn v substratu (Slika 4; Priloga 6a). Populaciji se v koncentraciji Zn v koreninah med seboj nista razlikovali (Slika 4; Priloga 6a). Inokulacija je vplivala na koncentracijo Zn v koreninah in sicer so imele pri majhnih koncentracijah Zn v substratu neinokulirane rastline (Nk, Ok) manjšo koncentracijo Zn v koreninah kot inokulirane rastline (Nn, No, On, Oo), pri velikih koncentracijah Zn v substratu pa so imele neinokulirane rastline (Nk, Ok) večjo koncentracijo Zn v koreninah kot inokulirane rastline (Nn, No, On, Oo) (Slika 4; Priloga 6a,b).



Slika 4: Koncentracija Zn v koreninah (mg/kg) vrste *T. praecox* v odvisnosti od koncentracije Zn dodanega substratu (mg/kg). Velike tiskane črke pomenijo izvor rastline (N=rastline z Zaplane, O=rizoma), male pisane črke pomenijo izvor inokuluma (k=neinokulirane rastline, n=inokulum z Zaplane, o=inokulum iz Žerjava).

### 6.3.4 Koncentracija Zn v poganjkih

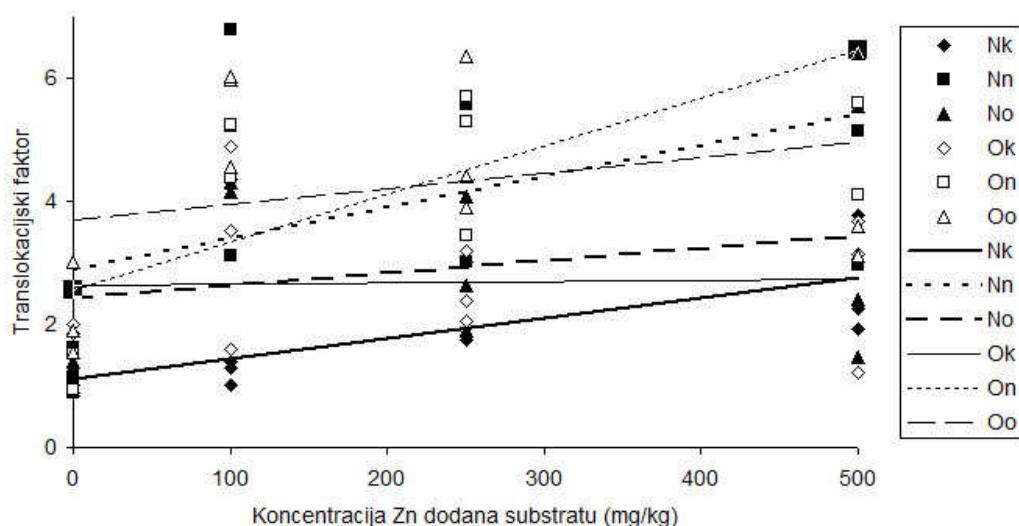
Največja izmerjena koncentracija Zn v poganjkih je bila 5869 mg/kg, najmanjša pa 25 mg/kg (Priloga 4). Koncentracija Zn v poganjkih je naraščala z večanjem koncentracije Zn v substratu (Slika 5; Priloga 6a). Populacija vrste *T. praecox* iz Žerjava (Ok, On, Oo) je nakopičila več Zn v poganjkih kot populacija z Zaplane (Nk, Nn, No) (Slika 5; Priloga 6a). Inokulacija ni vplivala na koncentracijo Zn v poganjkih (Slika 5; Priloga 6a,b).



Slika 5: Koncentracija Zn v poganjkih (mg/kg) vrste *T. praecox* v odvisnosti od koncentracije Zn v substratu (mg/kg). Velike tiskane črke pomenijo izvor rastline (N=rastline z Zaplane, O=rastline iz Žerjava), male pisane črke pomenijo izvor inokuluma (k=neinokulirane rastline, n=inokulum z Zaplane, o=inokulum iz Žerjava).

### 6.3.5 Translokacijski faktor za Zn

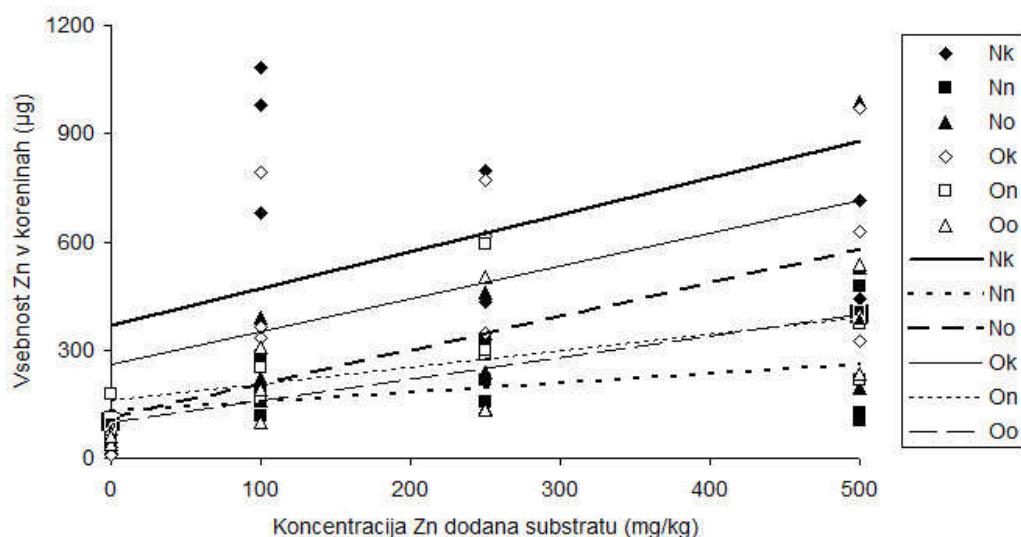
Vsi translokacijski faktorji (TF) za Zn pri obeh populacijah so presegli mejno vrednost hiperakumulacije ( $TF > 1$ ) in sicer največji je bil 5,98, najmanjši pa 1,13 (Slika 6; Priloga 4). Translokacijski faktor za Zn se je povečeval z večanjem koncentracije Zn v substratu (Slika 6; Priloga 7a). Rastline populacije iz Žerjava (Ok, On, Oo) so imele večji TF kot rastline populacije z Zaplane (Nk, Nn, No). Inokulirane rastline (Nn, No, On, Oo) so imele večji TF kot neinokulirane rastline (Nk, Ok) (Slika 6; Priloga 7a,b).



Slika 6: TF za Zn vrste *T. praecox* v odvisnosti od koncentracije Zn dodanega rastnemu substratu (mg/kg). Velike tiskane črke pomenijo izvor rastline (N=rastline z Zaplane, O=rastline iz Žerjava), male pisane črke pomenijo izvor inokuluma (k=neinokulirane rastline, n=inokulum z Zaplane, o=inokulum iz Žerjava).

### 6.3.6 Vsebnost Zn v koreninah

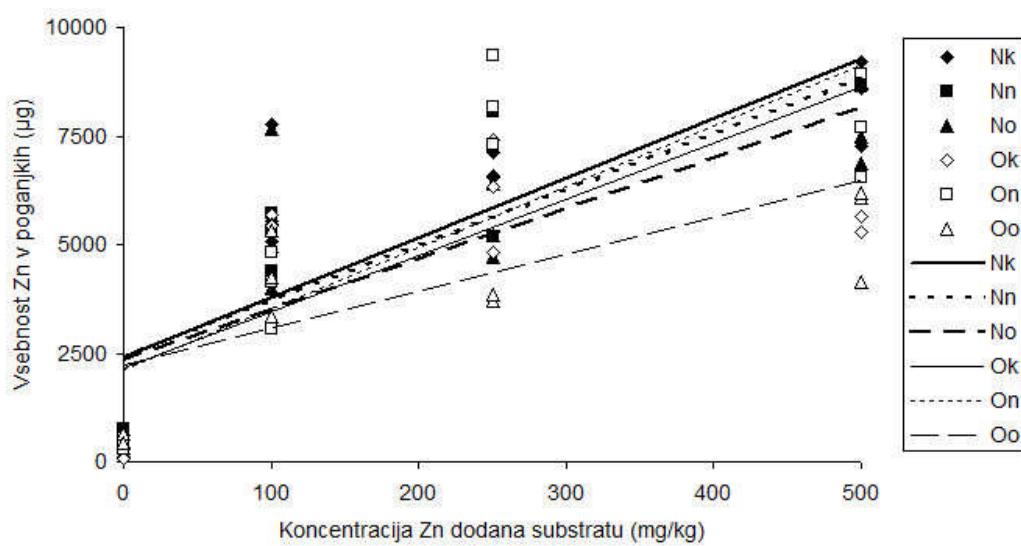
Najmanjša vsebnost Zn v koreninah je bila 7 µg, največja pa 1228 µg (Priloga 4). Vsebnost Zn v koreninah je naraščala z večanjem koncentracije Zn v substratu (Slika 7; Priloga 8a). Populaciji se v vsebnosti Zn v koreninah med seboj nista razlikovali (Slika 7; Priloga 8a). Inokulacija je vplivala na vsebnost Zn v koreninah in sicer so imele pri majhnih koncentracijah Zn v substratu inokulirane rastline (Nn, No, On, Oo) večje vsebnosti Zn v koreninah kot neinokulirane (Nk, Ok), pri večjih koncentracijah Zn v substratu pa so imele inokulirane rastline (Nn, No, On, Oo) manjše vsebnost Zn v koreninah kot neinokulirane rastline (Nk, Ok) (Slika 7; Priloga 8a,b).



Slika 7: Vsebnost Zn v koreninah ( $\text{mg korenino}^{-1}$ ) vrste *T. praecox* v odvisnosti od koncentracije Zn dodanega rastnemu substratu (mg/kg). Velike tiskane črke pomenijo izvor rastline (N=rastline z Zaplane, O=rastline iz Žerjava), male pisane črke pomenijo izvor inokuluma (k=neinokulirane rastline, n=inokulum z Zaplane, o=inokulum iz Žerjava).

### 6.3.7 Vsebnost Zn v poganjkih

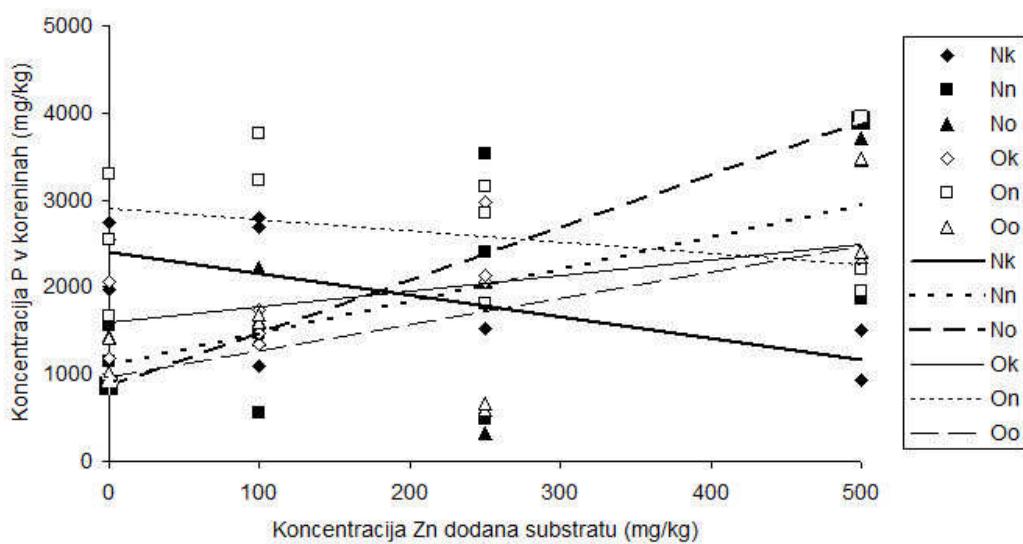
Najmanjša vsebnost Zn v poganjkih je bila 64 µg, največja pa 12491 µg (Priloga 4). Vsebnost Zn v poganjkih je naraščala z večanjem koncentracije Zn v substratu (Slika 8; Priloga 8a). Populaciji se v vsebnosti Zn v poganjkih med seboj nista razlikovali (Slika 8; Priloga 8a). Inokulacija ni vplivala na vsebnost Zn v poganjkih (Slika 8; Priloga 8a,b). Pri rastlinah obeh populacij inokuliranih z inokulumom z onesnaženega območja (No, Oo) smo pri večjih koncentracijah Zn v substratu opazili trend manjših vsebnosti Zn v poganjkih, vendar tega nismo statistično potrdili (Slika 8; Priloga 8a,b).



Slika 8: Vsebnost Zn v poganjkih (mg) vrste *T. praecox* v odvisnosti od koncentracije Zn dodanega rastnemu substratu (mg/kg). Velike tiskane črke pomenijo izvor rastline (N=rastline z Zaplane, O=rastline iz Žerjava), male pisane črke pomenijo izvor inokuluma (k=neinokulirane rastline, n=inokulum z Zaplane, o=inokulum iz Žerjava).

### 6.3.8 Koncentracija P v koreninah

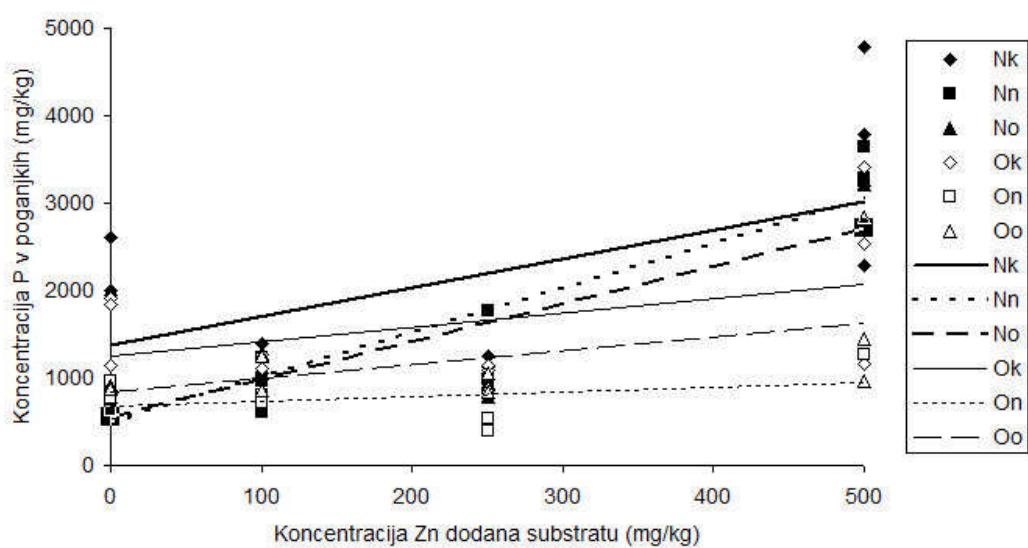
Največja koncentracija P v koreninah je bila 5727 mg/kg, najmanjša pa 324 mg/kg (Priloga 4). Koncentracija P v koreninah ni bila odvisna od koncentracije Zn v substratu (Priloga 9). Populaciji se med seboj nista razlikovali (Priloga 9a). Inokulacija ni vplivala na koncentracijo P v koreninah (Slika 9; Priloga 9a,b). Pri manjših koncentracijah Zn v substratu smo opazili trend večjih koncentracij P v koreninah neinokuliranih (Nk) kot inokuliranih rastlin (No, Nn) populacije z Zaplane, pri večjih koncentracijah Zn v substratu pa ravno obraten trend, vendar tega nismo statistično potrdili (Slika 9; Priloga 9a,b).



Slika 9: Koncentracija P v koreninah (mg/kg) vrste *T. praecox* v odvisnosti od koncentracije Zn dodanega substratu (mg/kg). Velike tiskane črke pomenijo izvor rastline (N=rastline z Zaplane, O=rastline iz Žerjava), male pisane črke pomenijo izvor inokuluma (k=neinokulirane rastline, n=inokulum z Zaplane, o=inokulum iz Žerjava).

### 6.3.9 Koncentracija P v poganjkih

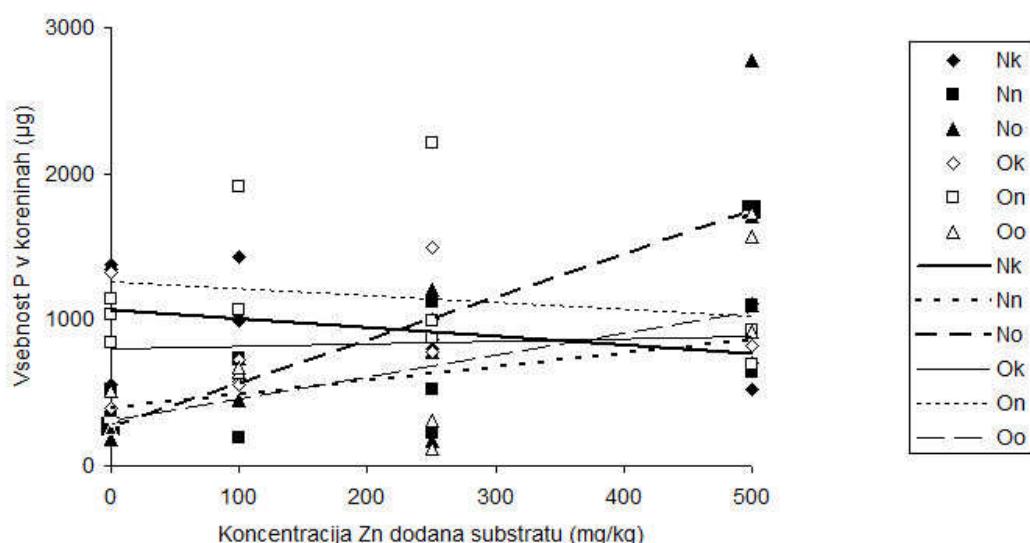
Največja koncentracija P v poganjkih je bila 4782 mg/kg, najmanjša pa 389 mg/kg (Priloga 4). Koncentracija P v poganjkih se je povečevala z večanjem koncentracije Zn v substratu (Slika 9; Priloga 9a). Rastline vrste *T. praecox* iz Žerjava so imele manjšo koncentracijo P v poganjkih kot rastline vrste *T. praecox* z Zaplane (Slika 10; Priloga 9a). Inokulacija je negativno vplivala na koncentracijo P v poganjkih, saj smo pri neinokuliranih rastlinah (Nk, Ok) izmerili večjo koncentracijo P v poganjkih kot pri inokuliranih rastlinah (Nn, No, On, Oo) (Slika 10; Priloga 8a,b).



Slika 10: Koncentracija P v poganjkih (mg/kg) vrste *T. praecox* v odvisnosti od koncentracije Zn dodanega substratu (mg/kg). Velike tiskane črke pomenijo izvor rastline (N=rastline z Zaplane, O=rastline iz Žerjava), male pisane črke pomenijo izvor inokuluma (k=neinokulirane rastline, n=inokulum z Zaplane, o=inokulum iz Žerjava).

### 6.3.10 Vsebnost P v koreninah

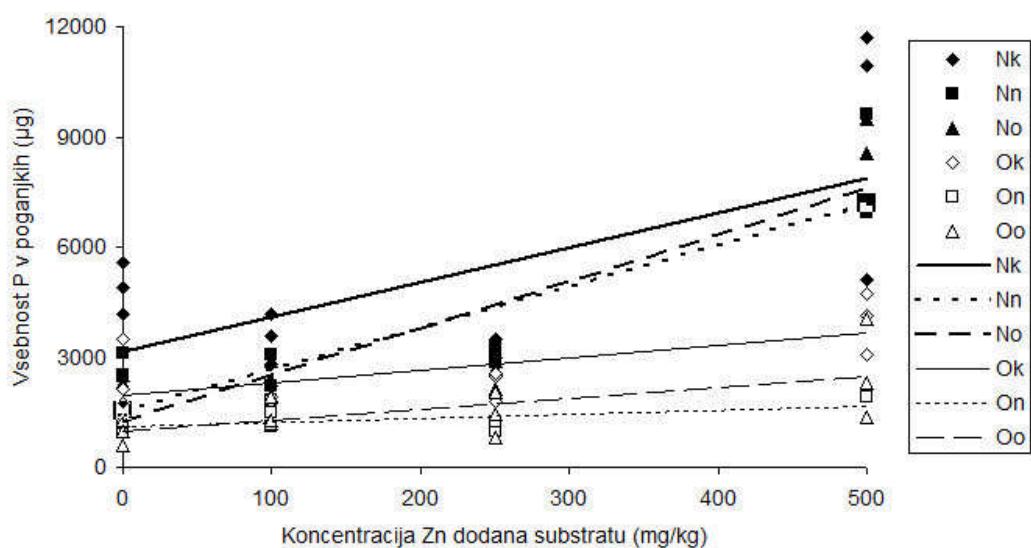
Največja vsebnost P v koreninah je bila 2772 µg, najmanjša pa 120 µg (Priloga 4). Vsebnost P v koreninah ni bila odvisna od koncentracije Zn v substratu (Priloga 10). Med populacijama ni bilo statistično značilnih razlik (Priloga 10a). Inokulacija je vplivala na vsebnost P v koreninah in sicer so imele neinokulirane rastline populacije z Zaplane (Nk) pri majhnih koncentracijah Zn v substratu večje vsebnosti P v koreninah kot inokulirane rastline (Nn, No), pri velikih koncentracijah Zn v substratu pa je bilo ravno obratno (Slika 11; Priloga 10a,b).



Slika 11: Vsebnost P v koreninah (µg) vrste *T. praecox* v odvisnosti od koncentracije Zn dodanega substratu (mg/kg). Velike tiskane črke pomenijo izvor rastline (N=rastline z Zaplane, O=rastline iz Žerjava), male pisane črke pomenijo izvor inokuluma (k=neinokulirane rastline, n=inokulum z Zaplane, o=inokulum iz Žerjava).

### 6.3.11 Vsebnost P v poganjkih

Največja vsebnost P v poganjkih je bila 11687 µg, najmanjša pa 605 µg (Priloga 4). Vsebnost P v poganjkih se je povečevala z večanjem koncentracije Zn v substratu (Slika 12; Priloga 10a). Rastline populacije z Zaplane (Nk, Nn, No) so imele večjo vsebnost P v poganjkih kot rastline populacije iz Žerjava (Ok, On, Oo) (Slika 12; Priloga 10a). Inokulacija je vplivala na vsebnost P v poganjkih in sicer so imele neinokulirane rastline (Nk, Ok) večje vsebnosti P v poganjkih kot inokulirane rastline (Nn, No, On, Oo) (Slika 12; Priloga 10a,b).



Slika 12: Vsebnost P v poganjkih (µg) vrste *T. praecox* v odvisnosti od koncentracije Zn dodanega substratu (mg/kg). Velike tiskane črke pomenijo izvor rastline (N=rastline z Zaplane, O=rastline iz Žerjava), male pisane črke pomenijo izvor inokuluma (k=neinokulirane rastline, n=inokulum z Zaplane, o=inokulum iz Žerjava).

## 7 RAZPRAVA

V kontroliranih pogojih smo v koncentracijski vrsti Zn (0, 100, 250 in 500 mg/kg) uspeli vzgojiti rastline vrste *T. praecox* in sicer populaciji iz Žerjava (onesnaženo območje) in z Zaplane (neonesnaženo območje), ki smo ju uspešno inokulirali z avtohtonim in alohtonim inokulumom. Gre za prvo poročilo o uspešni inokulaciji populacije vrste *T. praecox* z Zaplane.

### 7.1 BIOMASA RASTLIN

V našem poskusu se biomasa korenin med populacijama ni razlikovala (Slika 2), biomasa poganjkov pa je bila pri populaciji iz Žerjava značilno manjša kot pri populaciji z Zaplane (Slika 3; Priloga 5a). To razliko lahko pripisemo temu, da rastline vrste *T. praecox* iz Žerjava porabijo več energije za vzdrževanje obrambnih mehanizmov, ki jim omogočajo preživetje neugodnih razmer, s tem pa omejijo energijo za izgradnjo nadzemnih delov rastline.

Pri vseh rastlinah je bila biomasa korenin manjša kot biomasa poganjkov (Priloga 4). AM glive s tvorbo hif povečujejo površino skozi katero poteka privzem ionov v koreninski sistem in s tem zmanjšujejo energetski vložek rastline pri izgradnji korenin, zato je lahko biomasa korenin manjša kot biomasa poganjkov in tudi biomasa korenin inokuliranih rastlin manjša kot biomasa korenin neinokuliranih rastlin (Turnau in sod., 2006). Manjšo biomaso korenin inokuliranih rastlin pri rastlinah populacije iz Žerjava smo opazili tudi v našem poskusu (Slika 2; Priloga 5a), pri populaciji z Zaplane pa ne. Da inokulacija vpliva na biomaso korenin žerjavske populacije so pokazali že Vogel-Mikuš in sod. (2006) in sklepali, da je bila večina ogljika, ki se sicer porabi za izgradnjo korenin, porabljen za izgradnjo glivne biomase.

### 7.2 PRIVZEM Zn V RASTLINE

#### 7.2.1 Vpliv talnih parametrov na privzem Zn v rastline:

Izbrane koncentracije Zn za tretmaje v koncentracijski vrsti Zn smo izbrali glede na z zakonom opredeljene vrednosti (Ur. I. RS 68/96). Tako tretmaja 0 in 100 mg/kg spadata pod mejno vrednost, tretma 250 mg/kg med mejno in opozorilno vrednostjo in tretma 500 mg/kg med opozorilno in kritično vrednostjo za Zn.

Koncentracija Zn v koreninah in poganjkih je pri vseh rastlinah naraščala z večanjem koncentracije Zn v substratu (Slika 4, 5). Da na koncentracijo kovin v rastlini vplivajo celokupne koncentracije kovin v substratu in njihova biodostopnost je potrdil že Ernst (1996). Sicer pa je biodostopnost elementov v tleh odvisna od kemičnih (kationska izmenjevalna kapaciteta, vrednost pH, koncentracija kovine, delež organske snovi), fizikalnih (struktura in dostopnost kovin) in bioloških dejavnikov (modificirajo dostopnost kovin s sproščanjem kisika, protonov, organskih kislin) (Ernst, 1996). Vendar izmerjene koncentracije Zn v rastlinah v našem poskusu niso neposredno primerljive s tistimi dobljenimi v naravi, saj so se koncentracije Zn v substratu iz našega poskusa in koncentracijami Zn v tleh v naravi bistveno razlikovale. Celokupna koncentracija Zn v substratu v našem poskusu, ki jo predstavlja dodana koncentracija Zn v substratu, je bila pri vseh tretmajih manjša kot izmerjene celokupne koncentracije Zn v tleh na lokacijah v Žerjavu, ki se gibljejo od 1000 do 5290 mg/kg (Vogel-Mikuš in sod. 2005; Pongrac in sod. 2007). Tudi dostopna koncentracija Zn v substratu pri tretmaju 500 mg/kg v našem poskus je bila manjša kot izmerjene dostopne koncentracije Zn v Žerjavu, ki se gibljejo do 280 mg/kg (Vogel-Mikuš in sod. 2005; Pongrac in sod. 2007). Poleg teh razlik smo opazili tudi spremembo vrednosti pH v naših substratih, za katero vemo, da vpliva tudi na spremembo biodostopnosti Zn, in sicer se z večanjem vrednosti pH manjša dostopnost Zn (Vogel-Mikuš in sod., 2005; Broadley in sod., 2007). Pri velikih vrednosti pH se Zn namreč veže na minerale glin in na organske komponente tal, s katerimi tvori topne in netopne komplekse. Rezultati iz našega poskusa kažejo manjšanje vrednosti pH skladno s povečevanjem koncentracije Zn v substratu in večanje vrednosti pH med samim poskusom (Tabela 1). To potrjuje, da je bila dostopnost kovin pri večji koncentraciji Zn v substratu večja, zato so lahko bile posledično tudi koncentracije Zn v rastlinskem tkivu večje (Vogel-Mikuš in sod., 2005; Audet in Charest, 2006). Sprememba vrednosti pH med samim poskusom nakazuje tudi na delovanje prisotnih rizosfernih organizmov, kot so za AM glice že pokazali (Ernst, 1996). Verjetno je, da se imobilizacija Zn z glivno aktivnostjo deloma pojavi zaradi sprememb v vrednosti pH tal, kar lahko prispeva k zmanjšanemu privzememu Zn v mikorizne rastline pri onesnaženju s Zn (Christie in sod., 2004).

Na koncentracijo Zn v rastlini vpliva tudi organska snov v tleh, in sicer gre za pozitivno odvisnost. Tako se z večanjem koncentracije Zn v substratu povečuje količina organske snovi, kajti kovine se vežejo na organske snovi (Vogel-Mikuš in sod., 2005). To smo potrdili tudi v naši nalogi (Tabela 1; Priloga 3).

### **7.2.2 Koncentracije Zn v koreninah in poganjkih**

Koncentracije Zn v koreninah in poganjkih so bile v našem poskusu manjše v primerjavi s koncentracijami, ki so bile izmerjene pri rastlinah iz naravnega okolja. Tako so bile pri naši nalogi največje koncentracije Zn v koreninah 1194 mg/kg, v poganjkih 5869 mg/kg, medtem ko so vrednosti v naravi dosegle maksimalno vrednost 14590 mg/kg (Vogel-Mikuš in sod., 2005). Manjše koncentracije Zn v rastlinah so pri poskusu v laboratoriju ugotovili tudi Vogel-Mikuš in sod. (2006) verjetno iz enakih razlogov kot pri naši nalogi: krajša rastna sezona kot je v naravi in manjše koncentracije dostopnega Zn v substratu. Tako pri rastlinah vrste *T. praecox* iz našega poskusa nismo izmerili hiperakumulacijske koncentracije za Zn, ki znaša 10000 mg/kg. Opazili smo tudi, da je koncentracija Zn v koreninah in poganjkih naraščala z večanjem Zn v substratu. Zviševanje se je kazalo tako pri mikoriznih kot tudi nemikoriznih rastlinah, kar sta pokazala tudi Audet in Charest (2006) v svojih poskusih.

Največja izmerjena vsebnost Zn v koreninah je bila v našem poskusu 1228 µg, najmanjša 7 µg, v poganjkih pa 12491 µg in 64 µg. Pongrac in sod. (2009) so pri populaciji z Žerjava pod kontroliranimi pogoji pri koncentraciji 250 in 500 mg Zn/kg v substratu ugotovili manjše vsebnosti Zn v koreninah (največ 117 µg) in poganjkih (največ 3045 µg). Prav tako so bile biomase korenin pri našem poskusu med 0,191 g in 0,699 g in biomase poganjkov med 1 in 1,5 g, pri poskusu Pongrac in sod. (2009) pa so bile biomase korenin med 0,06 g in 0,11 g, biomase poganjkov pa med 0,5 in 0,8 g, kar je verjetno posledica daljšega trajanja našega poskusa (pet mesecev) v primerjavi s trajanjem njihovega poskusa (tri mesece). Prav tako pa pri poskusu Pongrac in sod. (2009) vsebnost Zn v poganjkih ni naraščala s večanjem koncentracije Zn v substratu, kot smo ugotovili pri našem poskusu. Vsebnost Zn se spreminja

tudi tekom rastne sezone in sicer se povečuje vse do faze cvetenja, nato pa se začne zmanjševati (Pongrac in sod., 2007). V našem poskusu faze cvetenja nismo dosegli.

### **7.2.3 Vpliv populacije na privzem Zn v rastline**

V našem poskusu so imele rastline vrste *T. praecox* iz Žerjava in z Zaplane podobne koncentracije Zn v koreninah, kar pomeni, da se populaciji v privzemu Zn v korenine nista razlikovali (Slika 4; Priloga 6a). V poganjkih so bile koncentracije Zn pri populaciji iz Žerjava večje kot pri populaciji z Zaplane (Slika 5; Priloga 6a), vendar pa se populaciji v vsebnosti Zn v poganjkih nista razlikovali, kar je posledica večje biomase poganjkov populacije z Zaplane. Na podlagi tega sklepamo, da se populaciji razlikujeta v mehanizmih prilagajanja na povečane koncentracije Zn in sicer pri populaciji z neonesnaženega okolja prihaja do redčitvenega efekta, pri populaciji z onesnaženega okolja pa razviti mehanizmi transporta in tolerance zahtevajo velik energetski vložek za vzdrževanje normalnega fiziološkega stanja, imajo manj energije za rast, zato so rastline populacije iz Žerjava manjše (Slika 3; Priloga 5a).

### **7.2.4 Translokacijski faktor**

Veliko raziskav je že bilo narejenih na akumulaciji kovin v rastlinah. Pri modelni hiperakumulacijski vrsti *T. caerulescens* so ugotovili, da se elementi Cr, Cu, Al, Pb in Fe kopijo v koreninah, medtem ko se elementi Co, Ni, Zn in Cd transportirajo in kopijo v poganjkih (Baker in sod., 1994). Za nekatere od teh elementov (Cd, Zn) so enako potrdili tudi za vrsto *T. praecox* (Vogel-Mikuš in sod., 2005, 2006). Za translokacijo Zn smo to potrdili tudi v naši nalogi, saj je bil translokacijski faktor (TF), ki predstavlja razmerje koncentracije Zn med poganjki in koreninami, večji od ena pri vseh tretmajih in vseh rastlinah. To pomeni, da se Zn pri majhnih in velikih koncentracijah z vstopom v rastlino v veliki meri transportira v poganjke, kjer se skladišči v vakuolah epidermalnih celic (Vogel-Mikuš in sod. 2008a, b). Ugotovili smo, da ima populacija iz Žerjava večji TF za Zn, kar pomeni, da ima bolje razvit transport iz korenin v poganjke kot populacija z Zaplane (Slika 6; Priloga 7a). Meritve pri populaciji iz Žerjava, vzorčeni v naravi, pa so pokazale tudi 2 krat večje vrednosti TF za Zn (Vogel-Mikuš in sod., 2005) kot tiste iz našega poskusa. Pri isti populaciji so pokazali, da so

tekom življenjskega cikla spremembe v TF za Zn le minimalne (Pongrac in sod., 2007). Struktura našega poskusa je omogočala, da smo lahko preučevali vpliv različnih koncentracij Zn v substratu na TF in opazili smo, da je TF naraščal z naraščanjem koncentracije Zn v substratu. Ta rezultat je v nasprotju z rezultati, ki so jih dobili Pongrac in sod. (2009), vendar ni presenetljiv, saj smo v našem poskusu opazili značilen vpliv inokulacije na TF pri obeh populacijah. Pri tem so imele neinokulirane rastline manjše vrednosti TF (okoli 2) kot inokulirane rastline (med 3 in 6). To so za žerjavsko populacijo pokazali tudi Vogel-Mikuš in sod. (2006), pri čemer so imele inokulirane rastline TF za Zn med 10 in 12, neinokulirane pa le okoli 2.

### 7.3 ARBUSKULARNA MIKORIZA

#### 7.3.1 Kolonizacija z AM glivami

Stopnja kolonizacije rastlin je odvisna od številnih dejavnikov. Nanjo naj bi vplivala vegetacijska faza rastline, saj naj bi se v fazi reprodukcije stopnja kolonizacije povečala, zaradi večje potrebe rastline po hranilih (Vogel-Mikuš in sod., 2006; Pongrac in sod., 2007), in koncentracija kovin (tudi Zn) v substratu. Pri slednji se z večanjem koncentracije Zn v substratu povečuje tudi aktivnost glivne simbioze, kajti gostiteljska rastlina vлага bolj v simbiozo kot v izključevanje kovin (Audet in Charest, 2006). V naši raziskavi vpliva koncentracije Zn v substratu na mikorizno intenziteto ni bilo (Tabela 1). Kolonizacija z AM glivami je bila pri našem poskusu zelo majhna, kar je tipičen problem pri delu v laboratoriju, še posebej z rastlinami, kot je tudi vrsta *T. praecox*, ki imajo že po naravi nizko afiniteto do tvorbe simbioze z AM glivami (Regvar, 2003; Vogel-Mikuš in sod., 2005; Pongrac in sod., 2007). Mikorizna frekvenca pri vrsti *T. praecox* iz narave se giblje večinoma med 20 in 30% (Regvar in sod. 2006), maksimalno pa do 70% (Vogel-Mikuš in sod. 2005). Funkcionalnost simbioze so potrdili v kontroliranem poskusu, saj so imele inokulirane rastlin večje koncentracije esencialnih elementov od neinokuliranih (Vogel-Mikuš in sod., 2006). Pokazali so tudi, da se simbioza tvori v času reprodukcije, medtem ko je v drugih fazah niso opazili (Vogel-Mikuš in sod., 2006), največjo stopnjo kolonizacije so v času cvetenja pri vrsti *T. praecox* opazili tudi v naravnem okolju (Pongrac in sod. 2007). Mikorizna frekvenca je bila v

našem poskusu, manjša kot v poskusu Vogel-Mikuš in sod. (2006), kar je lahko posledica uporabe manjših korit pri nas in tega, da rastline niso cvetale.

### **7.3.2 Vpliv inokuluma na koncentracijo in vsebnost Zn v rastlini**

V našem poskusu inokulacija z AM glivami ni vplivala ne na koncentracijo ne na vsebnost Zn v poganjkih, pri koncentraciji in vsebnosti Zn v koreninah pa smo opazili vpliv (Priloga 6a). Pri majhnih koncentracijah Zn v substratu so inokulirane rastline privzele več Zn v korenine kot neinokulirane rastline, pri večjih koncentracijah Zn v substratu pa so več Zn v korenine privzele neinokulirane rastline (Slika 4; Priloga 6a). To sta pokazala in razložila tudi Audet in Charest (2006), ki sta raziskovala nehiperakumulacijsko vrsto divji tobak (*Nicotiana rustica*). Ugotovila sta, da pri majhnih koncentracijah Zn v substratu AM gliva pomaga pri privzemu Zn, ki je za rastlino esencialen element, pri velikih koncentracijah pa postane strupen, zato ga AM gliva imobilizira (ga veže na komponente celične stene hif) in tako je njegova dostopnost za rastlino manjša in tudi manj strupena. To je ključna pridobitev rastline v simbiotskem odnosu na tleh onesnaženimi s kovinami. V našem poskusu se tako pri hiperakumulacijski vrsti *T. praecox* pri privzemu Zn v rastline kljub nizki stopnji kolonizacije z AM glivami lepo vidi pozitiven vpliv AM gliv. Seveda ne smemo pozabiti, da pri teh procesih sodelujejo tudi drugi rizosferni organizmi, ki smo jih vnesli v substrat z inokulumom.

### **7.3.3 Pomen izvora glivnega inokuluma na privzem in vsebnost Zn v rastlinah**

AM glive so, tako kot drugi organizmi, sposobne razvijati toleranco na kovine, kar ima za posledico različne biokemijske in fiziološke adaptacije (Pawlovska in sod., 1996). Vpliv adaptacije rastlinske vrste in AM gliv na onesnaženo in neonesnaženo okolje je zanimal tudi nas. Tako smo populacijo rastlin z Zaplane (neonesnaženo območje) in populacijo iz Žerjava (onesnaženo območje) inokulirali z avtohtonim in alohtonim inokulumom, ter ugotavliali ali se pri kateri od njih vidi odpornost in prilagojenost na tla onesnažena s kovinami. Statistično značilnega vpliva posameznega inokuluma na privzem in transport Zn nismo nikjer potrdili, smo pa zaznali trend povečane koncentracije Zn v koreninah rastlin inokuliranih z inokulumom z onesnaženega območja za razliko od rastlin inokuliranih z inokulumom z

neonesnaženega območja (Slika 4; Priloga 6a). Prav tako pa smo pri vsebnosti Zn v poganjkih ugotovili, da imajo rastline obeh populacij inokulirane z inokulumom z onesnaženega območja pri večjih koncentracijah Zn v substratu najmanjšo vsebnost Zn v poganjkih, vendar tega prav tako nismo statistično potrdili (Slika 8; Priloga 8a). Iz tega lahko sklepamo, da se združbi gliv z onesnaženega in neonesnaženega območja, ki smo ju pomnožili v glivni pasti, ne razlikujejo bistveno v stopnji mobilizacije Zn v substratu, ki bi nato vodil v povečan privzem Zn v posamezno populacijo hiperakumulacijske vrste, ki smo jo proučevali. Ne smemo pa izključiti pomena simbioze za druge fiziološke parametre, ki jih v našem poskusu nismo obravnavali.

Na to tematiko o AM glivah še ni podrobnih raziskav, so pa se na področju rastlin s tem problemom ukvarjali Escarré in sod. (2000). Ugotovili so, da se jasna razlika med rastlinami razvije na nivoju družin, medtem ko na nivoju rodu ali vrste o tem težko govorimo. Kljub temu, da bi na nekaterih območjih lahko govorili o tolerantnih populacijah na kovine je vidno, da so populacije iz neonesnaženih območij še vedno sposobne uspevati na območjih, ki so onesnažene s kovinami. To vodi k temu, da imajo posamezne vrste znotraj rodu še vedno precej enako dedno zasnova, zato delijo skupno toleranco na kovine (Escarré, 2000).

### **7.3.5 Vpliv inokuluma na privzem P v rastlino**

Poleg obrambe pred kovinami je glavna pozitivna lastnost za rastlino, ki je v simbiontskem odnosu z AM glivo, povečevanje privzema hranil na račun povečane absorpcijske površine, ki je posledica obsežnega sistema hif (Christie in sod., 2004). Tako imajo rastline, ki tvorijo simbiozo, v primerjavi s tistimi rastlinami, ki je ne, prednost na območjih onesnaženimi s kovinami, saj ta območja načeloma veljajo za hranilno revna (Pawlovska in sod., 1996). V številnih raziskavah so pokazali negativen odnos med Zn in vsebnostjo P v rastlinah, ki je posledica vezave Zn na fosfatne ligande v tleh (Audet in Charest, 2006; Christie in sod., 2004). Tega pa v našem poskusu nismo uspeli pokazati. Pri privzemu P v korenine in poganjke naj bi na onesnaženih tleh imele ključno vlogo AM glice (Vogel-Mikuš in sod., 2006). AM glice naj bi aktivno privzemale P iz tal in ga tudi uspešno translocirale v poganjke. Tako naj bi imele inokulirane rastline z AM glivami povečane koncentracije P v koreninah in

poganjkih za razliko od neinokuliranih. V našem poskusu izboljšanega privzema P v korenine in poganjke zaradi prisotnosti AM gliv nismo potrdili. Ravno nasprotno smo pri koncentraciji in vsebnosti P v poganjkih ugotovili, da so pri majhnih koncentracijah Zn v substratu imele neinokulirane rastline večje koncentracije in vsebnosti P v poganjkih, pri večjih koncentracijah Zn v substratu pa razlike niso bile več tako velike, kljub temu, da so še vedno največ P vsebovale neinokulirane rastline. Iz tega bi lahko sklepali, da gliva oskrbuje rastlino, s katero je v simbiontskem odnosu bolj intenzivno, ko je ta v stresnem položaju.

#### 7.4 UPORABA VRSTE *T. praecox* PRI FITOREMEDIACIJI

Ko so enkrat kovine prisotne v okolju v majhnih ali v velikih koncentracijah, jih iz njega ne morejo več popolnoma odstraniti (Ogundiran in Osibanjo, 2008). Delno odstranjevanje kovin lahko poteka na mehanski (neuporaben za velike površine), kemični (ni univerzalen, odstranjujemo le eno kovino) ali biološki način. Pri slednjem lahko uporabljamo hiperakumulacijske rastline, ki nakopičijo presežne koncentracije kovin iz tal v svoje nadzemne dele, ki pa jih ob koncu rastne sezone odstranimo in s tem odstranimo tudi kovine iz tal. To tehniko imenujemo fitoekstrakcija in je ena izmed tehnik fitoremediacij, ki je bila razvita kot potencialna remediacijska rešitev na tisočih kontaminiranih tleh (Raskin in sod., 1997).

Rastline, primerne za fitoremediacijo morajo izpolnjevati številne pogoje: globoke korenine, veliko biomaso, hitro rast, enostavno žetev ter toleranco in hiperakumulacijo kovin. Ni znano, da bi katerakoli od naravnih rastlin imela vse te pogoje. Večina hiperakumulacijskih rastlin, vključno z vrsto *T. praecox* imajo majhno biomaso, počasno rast in slabo razvit koreninski sistem, zato je zmotno pričakovati, da bi z njimi lahko drastično spremojali okolje. Kakorkoli, kljub tem neustreznim lastnostim, je to za zdaj edina možnost za fitoremediacijo močno onesnaženih območij, dokler ne bodo izolirali in prenesli genov, odgovornih za akumulacijo in toleranco na kovine v druge rastline (razvoj transgenih rastlin) (Ernst, 1996).

## 8 SKLEPI

- V kontroliranih pogojih smo v koncentracijski vrsti Zn (0, 100, 250 in 500 mg/kg) uspeli vzgojiti rastline vrste *T. praecox* in sicer populaciji iz Žerjava in z Ziplane, ki smo ju uspešno inokulirali z avtohtonim in alohtonim inokulumom.
- Dostopen Zn v substratu se je povečeval z večanjem dodane koncentracije Zn v substrat, prav tako pa tudi koncentracija Zn v koreninah in poganjkih.
- Suha masa poganjkov je bila pri populaciji iz Žerjava manjša kot pri populaciji z Ziplane.
- Koncentracija Zn v koreninah se med populacijama ni razlikovala, v poganjkih pa je populacija iz Žerjava nakopičila več Zn kot populacija z Ziplane.
- Zn se pri obeh populacijah vrste *T. praecox* transportira in kopiči v poganjkih ( $TF > 1$ ).
- Rastline populacije vrste *T. praecox* iz Žerjava so imele večji TF kot rastline z Ziplane.
- Hiperakumulacijskega nivoja za Zn 10000 mg/kg, zaradi prekratke rastne dobe in manjših dostopnih koncentracij kovin kot so v naravi, ni presegla nobena populacija vrste *T. praecox*.
- Pri majhnih koncentracijah Zn v substratu so AM glive povečevale privzem Zn v korenine in poganke, pri velikih koncentracijah Zn v substratu pa so ga imobilizirale.
- Koncentracija P v koreninah se ne spreminja v odvisnosti od koncentracije Zn dodanega substratu za razliko od koncentracije P v poganjkih.
- AM gliva oskrbuje rastlino s P bolj intenzivno pri velikih koncentracijah Zn v substratu, ko je ta v stresnem položaju.
- Populacija iz Žerjava je imela manjšo koncentracijo in vsebnost P v poganjkih kot populacija z Ziplane.
- Izvor AM gliv ni vplival na privzem Zn v rastline.

## 9 POVZETEK

Čiščenje onesnaženih območij, obremenjenih s kovinami zaradi vse večjega zavedanja o strupenih učinkih na vsa živa bitja, pridobiva na veljavi po vsem svetu. Edini za zdaj potencialno učinkovit in finančno ugoden način je biološki, kjer uporabljamo rastline (fitoremediacija) tolerantne na dane okoljske razmere in so hkrati sposobne akumuliranja večjih količin kovin (hiperakumulatorji). Ker so onesnažena območja tudi revna s hranili, je dobro, da rastline tvorijo simbiozo z (AM) glivami, ki zaradi povečane absorpcijske površine koreninskega sistema zagotovijo njihovo zadostno količino, hkrati pa ščitijo rastlino pred prevelikimi količinami kovin tako, da le-te vežejo presežek kovin na celične stene hif. Funkcionalna interakcija med AM glivami in hiperakumulacijsko rastlino rani mošnjak (*Thlaspi praecox* Wulfen), ki je sposobna hiperakumulacije Cd in Zn, je prvi tovrsten. Mehanizmi, s katerimi poteka privzem Zn iz tal in vpliv AM gliv na ta proces, smo preučevali v naši nalogi.

V koncentracijski vrsti Zn (0, 100, 250 in 500 mg Zn /kg) smo vzgojili rastline dveh populacij vrste *T. praecox* (Zaplana – z neonesnaženega območja in Žerjav – z onesnaženega območja) in ju inokulirali z avtohtonimi in alohtonimi AM glivami. Preučevali smo talne parametre (pH vrednost, Zn v substratu, organsko snov), stopnjo kolonizacije z AM glivami, koncentracijo in vsebnost Zn in P v rastlini ter translokacijski faktor za Zn.

Populaciji sta se razlikovali v biomasi in koncentraciji Zn v poganjkih, medtem ko inokuluma nista razlikovala bistveno pri vplivu na preučevane parametere. Inokulacija rastlin je pri majhnih koncentracijah Zn v substratu, ki je limitirajoč dejavnik za rastlino, vplivala na povečan privzem Zn v rastline, pri velikih pa njegovo imobilizacijo. Hiperakumulacije Zn pri vrsti *T. praecox* nismo potrdili v opisanem kontroliranem poskusu, kar pripisujemo krajsi rastni sezoni, kot je v naravi in majhni vsebnosti kovin v substratu, ki ne dosegajo vrednosti v naravi. Smo pa pri vseh rastlinah določili TF za Zn >1, kar je prav tako značilnost rastlin, ki

hiperakumulirajo kovine. Koncentracije P v koreninah in poganjkih nakazujejo, da AM gline oskrbujejo rastline na tleh, ki so onesnažena s kovinami, vendar je pri majhni koncentraciji kovin v tleh manjša, kot pri veliki.

## 10 LITERATURA

- Adriano D.C. 2001. Trace elements in terrestrial environments – Biochemistry, Bioavailability and risks of metals. Springer Verlag, Berlin: 10-11, 264-349, 349-410.
- Audet P., Charest C. 2006. Effects of AM colonization on "wild tobacco" plants grown in zinc-contaminated soil. Mycorrhiza 16: 277-283.
- Baker, A.J.M., 1981. Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. Journal of Plant Nutrition 3 (1–4): 643–654.
- Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Hajar, A.S.M., 1994. Heavy metal accumulation and tolerance in British population of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl (Brassicaceae). New Phytologist 127: 61–68
- Bi Y.L., Li X.L., Christie P. 2003. Influence of early stages of arbuscular mycorrhiza on uptake of zinc and phosphorus by red clover from a low-phosphorus soil amended with zinc and phosphorus. Chemosphere 50: 831–837.
- Broadley M.B. , White P.J., Hammond J.P., Zelko I., Lux A. 2007. Zinc in plants. New phytologist 173: 677-702.
- Brooks, R.R., 1998. Geobotany and hyperaccumulators. In: Brooks, R.R. (Ed.), Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals, their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining, first ed. CAB International, Wallingford, UK, str.: 55-94.
- Christie P., Li X., Chen B. 2004. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. Plant Soil 261: 209–217.
- Dechamps C., Noret N., Mozek R., Escarré J., Lefebvre C., Gruber W., Meerts P. 2007. Cost of adaptation to a metalliferous environment for *Thlaspi caerulescens*: a field reciprocal transplantation approach. New phytologist 177: 167-177.
- Ernst .W.H.O. 1996. Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. Applied Geochemistry 11: 163-167.

- Escarré J., Lefebvre C., Gruber W., Leblanc M., Lepart J., Rievire Y., Delay B. 2000. Zinc and cadmium hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites in the Mediterranean area: implications for phytoremediation. *New Phytology* 145: 429-437.
- Gadd G.M. 2007. Fungi and industrial pollutants. *The mycota* 4: 69-84.
- Gasic K., Korban S.S. 2006. Heavy metal stress. *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*: 219-254.
- Gaur A., Adholeya A. 2004. Prospects of arbusular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current science* 86 (4).
- González-Guerrero, M., Melville, L.-H., Ferrol, N., Azcon-Aguilar, C., Peterson, R.-L., 2001. Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*.
- Gurevitch J., Scheiner S., Fox G. 2002. *The Ecology of Plants*. Sinauer Associates, ZDA, 77-84.
- Kabata-Pendias A., Pendias H., 1984. *Trace elements in Soil and Plants*. Boca Raton, Florida, CRC Press: 315 str.
- Kamnev A.A. in van der Lelie D. 2000. Chemical and biological parameters as tools to evaluate and improve heavy metal phytoremediation. *Biosci. Rep.* 20: 239–258.
- Kandeler E., 1995. Organic matter by wet combustion. V: Schinner, F., Ohlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (Ur.), *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, str. 397–398.
- Lasat M.M., Baker A.J.M., Kochian L.V. 1996. Physiological Characterization of Root Zn<sup>2+</sup> Absorption and Translocation to Shoots in Zn Hyperaccumulator and Nonaccumulator Species- of *Thlaspi*. *Plant Physiology* 112: 1715-1722.
- 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.

- Leštan D., Grčman H. 2001. Speciation of lead, zinc and cadmium in contaminated soils from Mežica valley. Zbornik Biotehniške Fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo 77, 2: 205-214.
- Leung H.M., Ye Z.H., Wong M.H. 2006. Survival strategies of plants associated with arbuscular mycorrhizal fungi on toxic mine tailings. Chemosphere 66: 905–915.
- Leyval C., Turnau K., Haselwandter K. 1997. Effect of heavy metal pollution on Mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. Mycorrhiza 7:139-153.
- Leyval, C., Joner, E.J., 2001. Bioavailability of heavy metals in the mycorrhizosphere. In: Gobran, R.G., Wenzel, W.W., Lombi, E. (Eds.), Trace Metals in the Rhizosphere. CRC Press, Florida, USA, str. 165–185.
- Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants, 2nd edn. London, UK: Academic Press.
- Mathe-Gaspar G., Anton A. 2002. Heavy metal uptake by two radish varieties. Acta Biologica Szegediensis 46 (3-4): 113-114.
- McGrath S.P., Zhao F.J., Lombi E. 2001. Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. Plant and Soil 232: 207–214.
- Ogundiran B.M., Osibanjo O. 2008. Heavy metal concentrations in soils and accumulation in plants growing in a desert slag dumpside in Nigeria. African journal of biotechnology vol.17: 3053-3060.
- Olsen S.R, Sommers L.E. 1982. Phosphorus. V: Methods of soil analysis, part 2. Chemical and microbiological properties 2nd edition.
- Orlowska E., Ryszka P., Jurkiewicz A., Turnau K. 2005. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) strains in colonisation of plants involved in phytostabilisation of zinc wastes. Geoderma 129: 92-98
- Pawłowska T.E., Blaskowski J., Ruhling A. 1996. The mycorrhizal status of plants colonizing a calamine spoil mound in southern Poland. Mycorrhiza 6 :499–505.
- Pawłowska T.E., Charvat I. 2004. Heavy-Metal Stress and Developmental Patterns of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Applied and environmental microbiology 70: 6643–6649.

- Philips, J.M., Haymann, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55, 158–160.
- Pongrac P., Vogel-Mikuš K., Kump P., Nečemer M., Tolra R., Poschenrieder C., Barcelo J., Regvar M. 2007. Changes in elemetal uptake and arbuscular mycorrhizal colonization during the life cycle of *Thlaspi praecox* Wulfen. *Chemosphere* 69:1602-1609.
- Pongrac P., Sonjak S., Vogel-Mikuš K., Kump P., Nečemer M., Regvar M. 2009. Roots of metal hyperaccumulating population of *Thlaspi praecox* (Brassicaceae) harbour arbuscular mycorrhizal and other fungi under experimental conditions. *International journal of phytoremedeiation* 11: 4,347-359.
- Quilambo O.A. 2003. The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *African Journal of Biotechnology* Vol. 2 (12): 539-546.
- Rashid A., Ayub N., Ahmad T., Gul J., Khan A.G. 2009. Phytoaccumulation prospects of cadmium and zinc by mycorrhizal plant species growing in industrially polluted soils. *Environ geochem health* 31: 91-98.
- Raskin I., Smith R.D., Salt D. 1997 Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current opinion in biotechnology* 8: 221-226.
- Redon P.O., Beguiristain T. 2009. Differential effects of AM fungal isolates on *Medicago truncatula* growth and metal uptake in a multmetallic (Cd, Zn, Pb) contaminated agricultural soil. *Mycorrhiza*.
- Reeves R.D. 2006. Hyperaccumulation of trace elememnts by plants. *Nato science series IV: Earth and environmental science* 68: 25-52.
- Regvar M. 2001. Diversity of arbuscular mycorrhizal funghi at various differentially managed ecosystem in Slovenia. *Acta Biologica Slovenica* 44 (3): 27-34.
- Regvar M. 2003. Colonization of pennycresses (*Thlaspi* sp.) of the Brassicaceae by arbuscular mycorrhizal funghi. *Journal of Plant Physiology*160: 615-626.
- Regvar M., Vogel-Mikuš K., Kugonič N., Turk B., Batič F. 2006. Vegetational and mycorrhizal succesions at a metal polluted site: Indications for the direction of phytostabilization. *Environmental pollution* 144: 976-984.

- Regvar M., Vogel-Mikuš K., 2008. Arbuscular mycorrhiza in metal hyperaccumulating plants. Mycorrhiza.
- Schüsler A., Schwarzott D., Walker C. 2001. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105: 1413-1421
- Shah K., Nongkynrih J.M. 2007. Metal hyperaccumulation and bioremediation. *Biologia plantarum* 51: 618-634.
- Toler H.D., Morton J.B., Cumming J.R. 2005. Growth of metal accumulation of mycorrhizal Sorghum exposed to elevated copper and zinc. *Water, air and soil pollution* 164: 155-172.
- Trouvelot, A., Kough, J.L., Gianinazzi-Pearson, V., 1986. Mesure du taux de mycorhization VA dun systeme radiculaire. Recherche de methodes destimation ayant une significationfonctionnelle Mycorrhizae, physiology and genetic, pp. 216–222.
- Turnau, K., 1998. Heavy metal uptake and arbuscular mycorrhiza development of *Euphorbia cyparissias* on zinc wastes in South Poland. *Acta Soc. Bot. Pol.* 67, 105–113.
- Turnau. K., Orlowska E., Ryszka P., Zubek S., Anielska T., Gawronski S., Jurkiewicz A. 2006. Role of mycorrhizal fungi in phytoremediation and toxicity monitoring of heavy metal rich industrial wastes in southern Poland. *Soil and water pollution monitoring, protection and remediation* 3-23.
- Ur. I. RS št. 68-5773/96. Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih emisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh.
- 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. 2008a. Comparison of essential and non-essential element distribution in leaves of the Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi praecox* as revealed by micro-PIXE. Cell and Environment 31: 1484-1496.
- Vogel-Mikuš K., Regvar M., Mesjasz-Przybylowicz J., Przybylowicz W. J., Simčič J., Pelicon P., Budnar M., 2008b. Spatial distribution of cadmium in leaves of metal hyperaccumulating *Thlaspi praecox* using micro-PIXE. New phytologist 179: 712–721.
- Vosatka M., Rydlova J., Sudova R., Vohnik M. 2006. Mycorrhizal fungi as helping agents in phytoremediation of degraded and contaminated soils. Phytoremediation Rhizoremediation. Institute of Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic : 237-257.
- Wang B., Qiu Y.-L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. Mycorrhiza 16: 299-363
- Zhu Y.G., Christie P., Laidlaw A.S. 2001. Uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal white clover from Zn-contaminated soil. Chemosphere 42: 193-199.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Marjani Regvar za strokovno svetovanje in potrpežljivost.

Posebna zahvala gre dr. Pauli Pongrac, ki mi je izvrstno svetovala, me s svojimi napotki usmerjala, optimistično spodbujala ter mi pomagala na vsakem koraku.

Hvala Mileni za pomoč pri delu v laboratoriju, dobre besede in optimizem.

Hvala družini, ki mi je ves čas stala ob strani, me vselej podpirala ter po potrebi tudi svetovala.

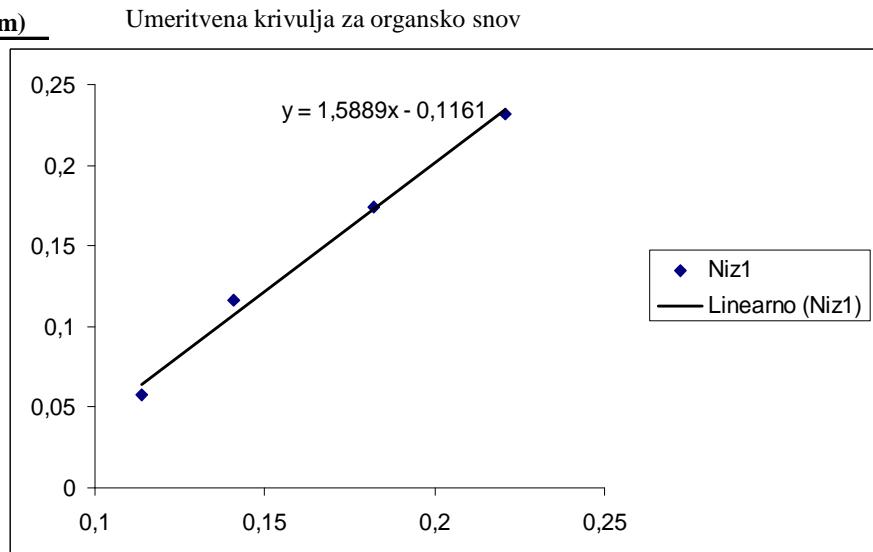
Najlepša hvala vsem

## PRILOGE

### Priloga 1: Umeritvena krivulja za organsko snov in fosfor

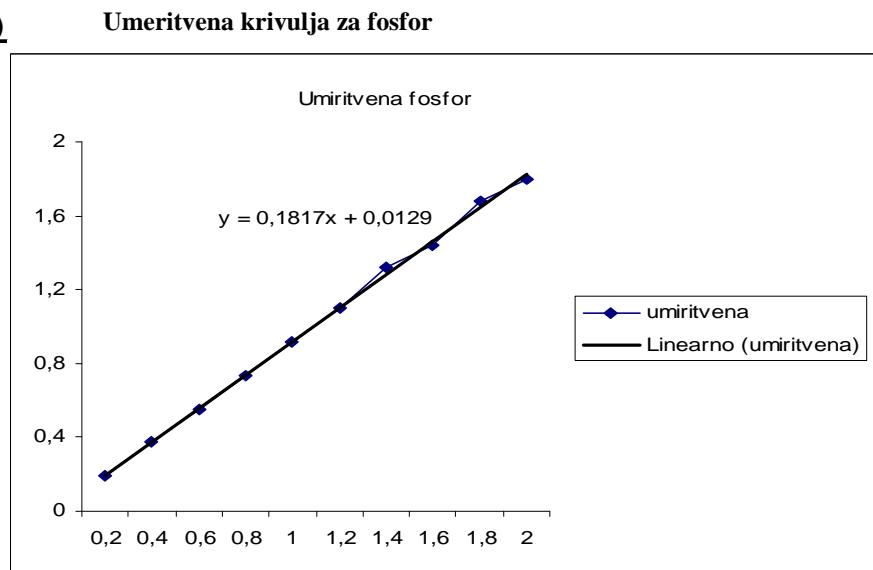
#### Organska snov:

dodan mionizitol (g)	absorbcijski (570nm)
0,058	0,1168
0,058	0,11297
0,058	0,11136
0,116	0,14073
0,116	0,14133
0,116	0,14061
0,174	0,1804
0,174	0,18178
0,174	0,18356
0,232	0,22112
0,232	0,22101
0,232	0,22041



#### Fosfor:

dodan fosfor (ml)	absorbcijski (400 nm)
0,2	0,1924
0,4	0,3752
0,6	0,5549
0,8	0,7363
1	0,9192
1,2	1,1014
1,4	1,3186
1,6	1,4410
1,8	1,6819
2	1,8000



**Priloga 2: Koncentracija Zn, pH vrednost pred in po poskusu ter delež organske snovi v substratu**

Tabela: Koncentracija Zn, pH vrednost pred in po poskusu ter organska snov v substratu (N-neonesnaženo območje, O-onesnaženo območje)

	Zn-zemlja B (mg/kg)	pH pred	pH po	% org snovi
N - 0	2,24			0,79
N - 0	4,22	7,20	7,32	0,66
N - 0	2,12	7,08	7,32	0,73
O - 0	3,11			0,64
O - 0	1,79	7,12	7,27	0,59
O - 0	2,22	7,14	7,18	0,60
N - 100	22,36			1,52
N - 100	171,98	7,02	7,28	1,52
N - 100	162,85	6,99	7,22	1,53
O - 100	21,80			1,20
O - 100	51,99	7,05	7,33	1,72
O - 100	100,16	6,90	7,06	3,27
N - 250	28,35			4,96
N - 250	46,14	6,92	7,14	4,85
N - 250	39,17	6,96	7,19	4,99
O - 250	41,84	6,90	7,28	2,09
O - 250	52,49	6,94	7,09	2,64
O - 250				2,74
N - 500	99,17			3,52
N - 500	110,92	6,84	7,05	3,47
N - 500	96,54	6,79	7,13	3,60
O - 500	129,78			2,63
O - 500	111,77	6,85	7,01	5,57
O - 500	117,33	6,84	7,20	6,10

### Priloga 3: Enosmerna ANOVA pH vrednost pred in po poskusu, Zn v substratu in delež organske snovi

Odebeljene vrednosti pomenijo statistično značilno razliko

Tabela: Enosmerna ANOVA pH vrednost pred in po poskusu in primerjava med posameznimi tretmaji (B-pred poskusom/A-po poskusu)

primerjava posameznih tretmajev

pH (B)	SP	F	p
tretma	3	<b>56,7</b>	<b>0,000000</b>
napaka	43		
pH (A)	SP	F	p
tretma	3	<b>6,2</b>	<b>0,001288</b>

primerjava pH pred in po poskusu

pH-0	SP	F	p
B/A	1	<b>18,5</b>	<b>0,00287</b>
napaka	22		
pH-100	SP	F	p
B/A	1	<b>29</b>	<b>0,000024</b>
napaka	21		
pH-250	SP	F	p
B/A	1	<b>62,9</b>	<b>0,000000</b>
napaka	22		
pH-500	SP	F	p
B/A	1	<b>79,4</b>	<b>0,000000</b>
napaka	22		

primerjava posameznih tretmajev

Zn v substratu	SP	F	p
tretma	3	<b>36,0599</b>	<b>0,000000</b>
napaka	58		

primerjava posameznih tretmajev

Organska snov	SP	F	p
tretma	3	<b>15,1608</b>	<b>0,000022</b>
napaka	20		

**Priloga 4: Suha masa korenin in poganjkov, koncentracija Zn v koreninah in poganjkih, TF, vsebnost (VS) Zn v koreninah in poganjkih, koncentracija P v koreninah in poganjkih in vsebnost P v koreninah in poganjkih**

Tabela: Suha masa (SM) korenin (kor) in poganjkov (pog), koncentracija Zn v koreninah in poganjkih, TF, vsebnost (VS) Zn v koreninah in poganjkih, koncentracija P v koreninah in poganjkih, vsebnost P v koreninah in poganjkih v odvisnosti od koncentracije Zn dodanega substratu (N-neonesnaženo območje (Zaplane), O-onesnaženo območje (Žerjav), k-neinokulirane rastline, n-inokulum z Zaplane, o-inokulum iz Žerjava).

	SM kor (g)	SM pog (g)	Zn kor (mg/kg)	Zn pog (mg/kg)	TF	VS Zn pog µg	VS Zn kor µg	P kor (mg/kg)	P pog (mg/kg)	VS P kor (µg)	VS P pog (µg)
Nk0	0,49	2,14	30,34	33,84	1,12	72,42	14,87	2744,56	2611,30	1344,83	5588,17
Nk0	0,54	2,44	52,52	67,4	1,28	164,46	28,36	2541,30	2007,16	1372,30	4897,47
Nk0	0,28	2,14	25,32	25,44	1,00	54,44	7,09	1973,69	1940,86	552,63	4153,45
Nn0	0,334	2,638	275,6	248,0	0,90	654,22	92,05	1553,49	619,24	518,87	1633,56
Nn0	0,585	3,381	192,1	218,3	1,14	738,07	112,38		923,79		3123,35
Nn0	0,293	2,716	127,9	207,5	1,62	563,57	37,47	1138,01	917,60	333,44	2492,20
No0	0,452	2,741	271,1	269,6	0,99	738,97	122,54		922,56		2528,73
No0	0,248	1,78	194,9	271,6	1,39	483,45	48,34	1439,70	887,74	357,05	1580,19
No0	0,2	2,935	235,1	220,9	0,94	648,34	47,02	931,44	779,94	186,29	2289,12
Ok0	0,46	1,55		51,28		79,48			1138,03		1763,94
Ok0	0,64	1,84	31,19	62,58	2,01	115,15	19,96	2065,25	1902,47	1321,76	3500,55
Ok0	0,33	1,15	30,55	56,42	1,85	64,88	10,08	1186,20	1848,14	391,45	2125,36
On0	0,690	2,169	258,8	244,7	0,95	530,75	178,57	1662,63	616,48	1147,22	1337,14
On0	0,314	1,000	298,9	281,1	0,94	281,10	93,85	3288,59	961,31	1032,62	961,31
On0	0,331	1,543	194,3	295,2	1,52	455,49	64,31	2546,84	765,23	843,00	1180,76
Oo0	0,361	1,484	234,0	442,3	1,89	656,37	84,47	1419,87	872,88	512,57	1295,35
Oo0	0,184	0,664	210,7	637,9	3,03	423,57	38,77		911,63		605,32
Oo0	0,25	1,129	238,0	366,6	1,54	413,89	59,50	1014,05	879,63	253,51	993,11
Nk100	0,57	2,29	1721	2207	1,28	5054,03	980,97	1097,56	1219,05	625,61	2791,62
Nk100	0,51	2,56	2121	2162	1,02	5534,72	1081,71	2799,56	1401,55	1427,78	3587,97
Nk100	0,37	3	1842	2586	1,40	7758,00	681,54	2680,22	1387,96	991,68	4163,88
Nn100	0,703	2,303	271,5	1910	7,03	4398,73	190,86		967,05		2227,12
Nn100	0,352	2,498	336,5	2288	6,80	5715,42	118,45	554,54	1231,23	195,20	3075,61
Nn100	0,501	3,013	562,8	1761	3,13	5305,89	281,96	1473,71	609,27	738,33	1835,73
No100	0,741	2,269	527,8	2195	4,16	4980,46	391,10	1400,94	1058,65	1038,09	2402,07
No100	0,334	2,579	663,9	2964	4,46	7644,16	221,74	2220,03	1127,63	741,49	2908,16
No100	0,275	1,583	587,2	2528	4,31	4001,82	161,48	1617,59		444,84	
Ok100	0,33	1,6	1005	3549	3,53	5678,40	331,65	1732,93	1111,59	571,87	1778,55
Ok100	0,41	1,77	1936	3093	1,60	5474,61	793,76	1347,57		552,50	
Ok100	0,49	1,5	739,2	3622	4,90	5433,00	362,21	1475,80	1267,29	723,14	1900,94
On100	0,423	1,843	593,9	2609	4,39	4808,39	251,22		800,67		1475,63
On100	0,508	1,789	326,2	1703	5,22	3046,67	165,71	3759,24		1909,69	
On100	0,329	1,571	502	2637	5,25	4142,73	165,16	3233,55	707,33	1063,84	1111,22
Oo100	0,164	0,937	594,7	3565	5,99	3340,41	97,53		1269,47		1189,50
Oo100	0,399	1,509	775,7	3535	4,56	5334,32	309,50	1598,79	1256,11	637,92	1895,47
Oo100	0,397	1,471	477,5	2888	6,05	4248,25	189,57	1681,58	854,80	667,59	1257,40

se nadaljuje

### nadaljevanje

	SM kor (g)	SM pog (g)	Zn kor (mg/kg)	Zn pog (mg/kg)	TF	VS Zn pog µg	VS Zn kor µg	P kor (mg/kg)	P pog (mg/kg)	VS P kor (µg)	VS P pog (µg)
Nk250	0,57	3,01		2370		7133,70		1518,93	990,54	865,79	2981,52
Nk250	0,6	2,82	1331	2332	1,75	6576,24	798,60		1242,19		3502,98
Nk250	0,45	2,26	960,1	2902	3,02	6558,52	432,05	1786,50	1133,04	803,92	2560,67
Nn250	0,447	3,32	726,4	2192	3,02	7277,44	324,70	491,85	981,58	219,86	3258,86
Nn250	0,216	1,723	996,5	3000	3,01	5169,00	215,24	2405,36	1759,54	519,56	3031,69
Nn250	0,316	2,945	490,2	2741	5,59	8072,25	154,90	3536,23	974,83	1117,45	2870,87
No250	0,374	2,665	921,4	1764	1,91	4701,06	344,60	2071,93	790,58	774,90	2106,90
No250	0,525	2,813	454	1849	4,07	5201,24	238,35	324,37	949,93	170,30	2672,16
No250	0,587	3,104	779	2063	2,65	6403,55	457,27	2054,87	928,47	1206,21	2881,96
Ok250	0,38	2,19	908,3	2896	3,19	6342,24	345,15	2057,53	1121,62	781,86	2456,34
Ok250	0,5	2,34	1543	3169	2,05	7415,46	771,50	2983,80	1097,79	1491,90	2568,83
Ok250	0,47	1,55	1307	3114	2,38	4826,70	614,29	2128,95	1146,55	1000,61	1777,15
On250	0,699	2,482	850,5	2937	3,45	7289,63	594,50	3160,14	389,37	2208,93	966,41
On250	0,35	2,156	815,8	4334	5,31	9344,10	285,53	2842,16		994,76	
On250	0,481	2,313	618,6	3523	5,70	8148,70	297,55	1810,64	536,27	870,92	1240,40
Oo250	0,221	1,362	617,9	2720	4,40	3704,64	136,56		1051,21		1431,74
Oo250	0,203	0,902	670,1	4270	6,37	3851,54	136,03	594,72	894,50	120,73	806,84
Oo250	0,463	2,396	1088,0	4242	3,90	10163,83	503,74	671,47	847,64	310,89	2030,95
Nk500	0,43	2,29	1659	3755	2,26	8598,95	713,37		4782,47		10951,85
Nk500	0,73	2,24	1683	3250	1,93	7280,00	1228,59	1513,76	2280,40	1105,04	5108,09
Nk500	0,56	3,09	790,8	2981	3,77	9211,29	442,85	930,05	3782,50	520,83	11687,93
Nn500	0,191	2,366	543,6	2803	5,16	6631,90	103,83				
Nn500	0,278	2,64	451,1	3270	7,25	8632,80	125,41	3968,01	3650,87	1103,11	9638,29
Nn500	0,345	2,104	1383	4118	2,98	8664,27	477,14	1869,51	3287,60	644,98	6917,10
No500	0,493	2,671	1073	2577	2,40	6883,17	528,99	3462,48	3206,90	1707,00	8565,64
No500	0,484	2,896	2044	3003	1,47	8696,69	989,30	5727,88	3271,39	2772,30	9473,95
No500	0,297	2,052	655,6	3647	5,56	7483,64	194,71	3714,49		1103,20	
Ok500	0,35	2,22	1792	5627	3,14	12491,94	627,20	2356,17		824,66	
Ok500	0,31	1,38	1042	3839	3,68	5297,82	323,02	2270,98	3415,17	704,00	4712,94
Ok500	0,34	1,63	2849	3459	1,21	5638,17	968,66		2544,59		4147,69
On500	0,571	2,619	715,3	2934	4,10	7684,15	408,44		1168,44		3060,14
On500	0,356	1,518	1046	5869	5,61	8909,14	372,38	1961,64	1273,64	698,34	1933,39
On500	0,419	1,55	514,6	4235	8,23	6564,25	215,62	2204,16		923,54	
Oo500	0,415	1,409	939,2	2938	3,13	4139,64	389,77		962,55		1356,23

## Priloga 5: Dvosmerna in enosmerna ANOVA za suho maso korenin in poganjkov

P-populacija, I-inokulacija, T-tretma  
 Odebeljene vrednosti pomenijo statistično značilno razliko.

Tabela 1: Dvosmerna in enosmerna ANOVA za suho maso (SM) korenin in poganjkov

### a) Dvosmerna ANOVA

Vpliv tretmaja na SM kor in pog

SM kor	SP	F	p
P	1	1,2043	0,276569
T	3	0,4675	0,705968
P X T	3	0,5304	0,663066
napaka	64		

SM pog	SP	F	p
P	1	75,517	0,000000
T	3	2,788	0,047654
P X T	3	0,73	0,537591
napaka	64		

Vpliv inokulacije na SM kor in pog

SM kor	SP	F	p
P	1	1,4112	0,239112
I	2	2,9093	0,061537
P X I	62	3,3418	0,041453
napaka	10		

SM pog	SP	F	p
P	1	76,734	0,000000
I	2	3,397	0,039423
P X I	2	1,482	0,234673
napaka	66		

### b) Enosmerna ANOVA

#### Zaplana

SM kor - 0	SP	F	p
I	2	0,74023	0,516022
napaka	6		

SM kor - 100	SP	F	p
I	2	0,10016	0,906172
napaka	6		

SM kor - 250	SP	F	p
I	2	3,6036	0,093763
napaka	6		

SM kor - 500	SP	F	p
I	2	5,0251	0,052241
napaka	6		

SM pog - 0	SP	F	p
I	2	1,7948	0,244942
napaka	6		

SM pog - 100	SP	F	p
I	2	1,2521	0,351189
napaka	6		

SM pog - 250	SP	F	p
I	2	0,1122	0,897515
napaka	6		

SuM pog - 500	SP	F	p
I	2	0,1765	0,842426
napaka	6		

#### Žerjav

SM kor - 0	SP	F	p
I	2	1,51708	0,292949
napaka	6		

SM kor - 100	SP	F	p
I	2	1,12138	0,385688
napaka	6		

SM kor - 250	SP	F	p
I	2	1,96275	0,2209
napaka	6		

SM kor - 500	SP	F	p
I	2	2,3163	0,17969
napaka	6		

SM pog - 0	SP	F	p
I	2	0,9725	0,430696
napaka	6		

SM pog - 100	SP	F	p
I	2	1,7015	0,259808
napaka	6		

SM pog - 250	SP	F	p
I	2	1,6969	0,260574
napaka	6		

SM pog - 500	SP	F	p
I	2	0,7082	0,529517
napaka	6		

## Priloga 6: Dvosmerna in enosmerna ANOVA za koncentracijo Zn v koreninah in poganjkih

P-populacija, I-inokulacija, T-tretma  
 Odebeljene vrednosti pomenijo statistično značilno razliko.

### a) Dvosmerna ANOVA

Vpliv tretmaja na konc. Zn v kor. in pog.

Konc. Zn v kor.	SP	F	p
P	1	0,002	0,988629
T	3	<b>13,3023</b>	<b>0,000001</b>
P X T	3	0,3101	0,81798
napaka	64		

Konc. Zn v pog.	SP	F	p
P	1	<b>27,609</b>	<b>0,000002</b>
T	3	<b>127,029</b>	<b>0</b>
P X T	3	2,622	0,058197
napaka	64		

Vpliv inokulacije na konc. Zn v kor. in pog.

Konc. Zn v kor.	SP	F	p
P	1	0,0204	0,886739
I	2	<b>7,8546</b>	<b>0,00089</b>
P X I	2	0,1129	0,893438
napaka	64		

Konc. Zn v pog.	SP	F	p
P	1	<b>4,0316</b>	<b>0,048753</b>
I	2	0,0043	0,99568
P X I	2	0,0659	0,936254
napaka	66		

### b) Enosmerna ANOVA

#### Zaplana

Konc. Zn v kor. - 0	SP	F	p
I	2	<b>13,99714</b>	<b>0,005498</b>
napaka	6		

Konc. Zn v kor. - 100	SP	F	p
I	2	<b>85,5427</b>	<b>0,00039</b>
napaka	6		

Konc. Zn v kor. - 250	SP	F	p
I	2	2,10142	0,217581
napaka	5		

Konc. Zn v kor. - 500	SP	F	p
I	2	0,83473	0,478805
napaka	6		

Konc. Zn v pog. - 0	SP	F	p
I	-	-	-
napaka	-		

Konc. Zn v pog. - 10	SP	F	p
I	-	-	-
napaka	-		

Konc. Zn v pog. - 25	SP	F	p
I	-	-	-
napaka	-		

Konc. Zn v pog. - 50	SP	F	p
I	-	-	-
napaka	-		

#### Žerjav

Konc. Zn v kor. - 0	SP	F	p
I	2	<b>27,416</b>	<b>0,002019</b>
napaka	5		

Konc. Zn v kor. - 100	SP	F	p
I	2	<b>12,98654</b>	<b>0,01047</b>
napaka	5		

Konc. Zn v kor. - 250	SP	F	p
I	2	3,6855	0,090355
napaka	6		

Konc. Zn v kor. - 500	SP	F	p
I	2	3,47399	0,099506
napaka	6		

Konc. Zn v pog. - 0	SP	F	p
I	-	-	-
napaka	-		

Konc. Zn v pog. - 100	SP	F	p
I	-	-	-
napaka	-		

Konc. Zn v pog. - 250	SP	F	p
I	-	-	-
napaka	-		

Konc. Zn v pog. - 500	SP	F	p
I	-	-	-
napaka	-		

### Priloga 7: Dvosmerna in enosmerna ANOVA za Translokacijski faktor Zn

P-populacija, I-inokulacija, T-tretma  
 Odebeljene vrednosti pomenijo statistično značilno razliko.

#### a) Dvosmerna ANOVA

Vpliv tretmaja na TF

TF za Zn	SP	F	p
P	1	4,2473	0,043513
T	3	11,2092	0,000006
P X T	3	0,0546	0,983054
napaka	62		

Vpliv inokulacije na TF

TF za Zn	SP	F	p
P	1	4,1142	0,04669
I	2	6,8937	0,001944
P X I	2	0,6384	0,531471
napaka	64		

#### b) Enosmerna ANOVA

Zaplana

TF - 0	SP	F	p
I	2	0,1387	0,87317
napaka	6		
TF - 100	SP	F	p
I	2	9,50426	0,01381
napaka	6		
TF - 250	SP	F	p
I	2	0,96478	0,44224
napaka	5		
TF - 500	SP	F	p
I	2	1,52413	0,29158
napaka	6		

Žerjav

TF - 0	SP	F	p
I	2	2,8979	0,145979
napaka	5		
TF - 100	SP	F	p
I	2	3,1297	0,117234
napaka	6		
TF - 250	SP	F	p
I	2	4,6095	0,061276
napaka	6		
TF - 500	SP	F	p
I	2	2,6694	0,148166
napaka	6		

### Priloga 8: Dvosmerna in enosmerna ANOVA za vsebnost Zn v koreninah in poganjkih

P-populacija, I-inokulacija, T-tretma  
 Odebeljene vrednosti pomenijo statistično značilno razliko.

#### a) Dvosmerna ANOVA

Vpliv tretmaja na VS Zn v kor in pog

VS Zn kor	SP	F	p
P	1	0,651	0,423158
T	3	<b>9,804</b>	<b>0,000022</b>
P X T	3	0,5954	0,620377
napaka	62		

VS Zn pog	SP	F	p
P	1	1,5458	0,218296
T	3	<b>87,8011</b>	<b>0</b>
P X T	3	1,1051	0,35364
napaka	64		

Vpliv inokulacije na VS Zn v kor in pog

VS Zn kor	SP	F	p
P	1	0,4595	0,500286
I	2	<b>8,9038</b>	<b>0,000388</b>
P X I	2	0,8533	0,430796
napaka	64		

VS Zn pog	SP	F	p
P	1	0,3127	0,577904
I	2	0,3759	0,688155
P X I	2	0,0781	0,924918
napaka	66		

#### b) Enosmerna ANOVA

Zaplana

Vsebnost Zn kor - 0	SP	F	p
I	2	5,77338	0,05019
napaka	5		
Vsebnost Zn kor - 100	SP	F	p
I	2	<b>22,1906</b>	<b>0,00169</b>
napaka	6		
Vsebnost Zn kor - 250	SP	F	p
I	2	4,23319	0,084
napaka	5		
Vsebnost Zn kor - 500	SP	F	p
I	2	1,96905	0,22006
napaka	6		
Vsebnost Zn pog - 0	SP	F	p
I	2	<b>31,57</b>	<b>0,00066</b>
napaka	6		
Vsebnost Zn pog - 100	SP	F	p
I	2	0,3553	0,71475
napaka	6		
Vsebnost Zn pog - 250	SP	F	p
I	2	1,7881	0,24597
napaka	6		
Vsebnost Zn pog - 500	SP	F	p
I	2	0,3249	0,73458
napaka	6		

Žerjav

Vsebnost Zn kor - 0	SP	F	p
I	2	3,57681	0,108558
napaka	5		
Vsebnost Zn kor - 100	SP	F	p
I	2	3,0392	0,136846
napaka	5		
Vsebnost Zn kor - 250	SP	F	p
I	2	<b>39,8231</b>	<b>0,006916</b>
napaka	3		
Vsebnost Zn kor - 500	SP	F	p
I	2	1,75178	0,251649
napaka	6		
Vsebnost Zn pog - 0	SP	F	p
I	2	<b>12,0208</b>	<b>0,007967</b>
napaka	6		
Vsebnost Zn pog - 100	SP	F	p
I	2	3,2615	0,109982
napaka	6		
Vsebnost Zn pog - 250	SP	F	p
I	2	0,90741	0,452581
napaka	6		
Vsebnost Zn pog - 500	SP	F	p
I	2	0,82365	0,482982
napaka	6		

### Priloga 9: Dvosmerna in enosmerna ANOVA za koncentracijo P v koreninah in poganjkih

P-populacija, I-inokulacija, T-tretma  
 Odebeljene vrednosti pomenijo statistično značilno razliko.

#### a) Dvosmerna ANOVA

Vpliv tretmaja na konc. P v kor. in pog.

Konc. P v kor.	SP	F	p
P	1	0,0319	0,858959
T	3	2,4933	0,070669
P X T	3	0,6439	0,590464
napaka	50		

Konc. P v pog.	SP	F	p
P	1	13,117	<b>0,000631</b>
T	3	32,452	0
P X T	3	5,618	<b>0,001939</b>
napaka	56		

Vpliv inokulacije na koc. P v kor. in pog.

Konc. P v kor.	SP	F	p
P	1	0,0152	0,902263
I	2	0,6327	0,535196
P X I	2	2,3278	0,107589
napaka	52		

Konc. P v pog.	SP	F	p
P	1	3,7005	0,059308
I	2	<b>4,1758</b>	<b>0,020217</b>
P X I	2	0,3115	0,733569
napaka	58		

#### b) Enosmerna ANOVA

##### Zaplana

Konc. P v kor. - 0	SP	F	p
I	-	-	-
napaka	-		
Konc. P v kor. - 100	SP	F	p
I	-	-	-
napaka	-		
Konc. P v kor. - 250	SP	F	p
I	-	-	-
napaka	-		
Konc. P v kor. - 500	SP	F	p
I	-	-	-
napaka	-		
Konc. P v pog. - 0	SP	F	p
I	2	<b>27,9307</b>	<b>0,001935</b>
napaka	5		
Konc. P v pog. - 100	SP	F	p
I	2	3,4105	0,136643
napaka	4		
Konc. P v pog. - 250	SP	F	p
I	2	4,3809	0,079568
napaka	5		
Konc. P v pog. - 500	SP	F	p
I	2	2,8134	0,172647
napaka	4		

##### Žerjav

Konc. P v kor. - 0	SP	F	p
I	-	-	-
napaka	-		
Konc. P v kor. - 100	SP	F	p
I	-	-	-
napaka	-		
Konc. P v kor. - 250	SP	F	p
I	-	-	-
napaka	-		
Konc. P v kor. - 500	SP	F	p
I	-	-	-
napaka	-		
Konc. P v pog. - 0	SP	F	p
I	2	<b>9,0542</b>	<b>0,015415</b>
napaka	6		
Konc. P v pog. - 100	SP	F	p
I	2	1,33247	0,343679
napaka	5		
Konc. P v pog. - 250	SP	F	p
I	2	<b>38,2703</b>	<b>0,000931</b>
napaka	5		
Konc. P v pog. - 500	SP	F	p
I	2	3,43621	0,167512
napaka	3		

### Priloga 10: Dvosmerna in enosmerna ANOVA za vsebnost P v koreninah in poganjkih

P-populacija, I-inokulacija, T-tretma  
 Odebeljene vrednosti pomenijo statistično značilno razliko.

#### a) Dvosmerna ANOVA

Vpliv tretmaja na vsebnost P v kor. in pog.

VS P kor	SP	F	p
P	1	0,071	0,790956
T	3	1,39	0,256676
P X T	3	0,9012	0,44721
napaka	50		

VS P pog	SP	F	p
P	1	<b>76,929</b>	<b>0</b>
T	3	<b>39,2127</b>	<b>0</b>
P X T	3	<b>13,9474</b>	<b>0,000001</b>
napaka	56		

Vpliv inokulacije na vsebnost P v kor. in pog.

VS P kor	SP	F	p
P	1	0,0873	0,768846
I	2	0,2752	0,761542
P X I	2	<b>4,34598</b>	<b>0,017976</b>
napaka	52		

VS P pog	SP	F	p
P	1	<b>18,5747</b>	<b>0,000064</b>
I	2	<b>2,7788</b>	<b>0,020398</b>
P X I	2	0,0463	0,954832
napaka	58		

#### b) Enosmerna ANOVA

##### Zaplana

Konc. P v kor. - 0	SP	F	p
I	2	<b>64,5328</b>	<b>0,003424</b>
napaka	3		

Konc. P v kor. - 100	SP	F	p
I	2	1,41722	0,325391
napaka	5		

Konc. P v kor. - 250	SP	F	p
I	2	0,19773	0,830489
napaka	3		

Konc. P v kor. - 500	SP	F	p
I	2	2,08683	0,239489
napaka	4		

Konc. P v pog. - 0	SP	F	p
I	2	<b>15,5938</b>	<b>0,0042</b>
napaka	6		

Konc. P v pog. - 100	SP	F	p
I	2	2,7378	0,157389
napaka	5		

Konc. P v pog. - 250	SP	F	p
I	2	1,6529	0,268043
napaka	6		

Konc. P v pog. - 500	SP	F	p
I	2	0,07765	0,926652
napaka	4		

##### Žerjav

Konc. P v kor. - 0	SP	F	p
I	2	1,8775	0,266047
napaka	5		

Konc. P v kor. - 100	SP	F	p
I	2	5,5742	0,069542
napaka	4		

Konc. P v kor. - 250	SP	F	p
I	2	2,969	0,141282
napaka	5		

Konc. P v kor. - 500	SP	F	p
I	2	1,7416	0,314768
napaka	4		

Konc. P v pog. - 0	SP	F	p
I	2	<b>6,0058</b>	<b>0,036966</b>
napaka	6		

Konc. P v pog. - 100	SP	F	p
I	2	1,7112	0,290418
napaka	4		

Konc. P v pog. - 250	SP	F	p
I	2	4,1057	0,088116
napaka	5		

Konc. P v pog. - 500	SP	F	p
I	2	2,3066	0,21567
napaka	4		