

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Mojca KOKOVNIK

**STRATEGIJE PRIVZEMA Cd, Zn IN Pb PRI POPULACIJAH RANEGA  
MOŠNJAKA (*Thlaspi praecox* Wulfen) Z ONESNAŽENAGA IN  
NEONESNAŽENEGA RASTIŠČA**

DIPLOMSKI DELO  
Univerzitetni študij

**Cd, Zn AND Pb UPTAKE STRATEGIES IN POPULATIONS OF *Thlaspi  
praecox* Wulfen FROM POLLUTED AND NON-POLLUTED SITE**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2007

*Diplomsko nalogo posvečam svojim staršem in možu,  
ki so mi omogočili študij in mi ves čas stali ob strani.*

*Hvala za vso podporo!*

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

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

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Predsednik: prof. dr. Damjana Drobne  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 12.10.2007

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mojca Kokovnik

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 581.1:549.25(043.2)=163.6
- KG privzem kovin / toleranca na kovine / hiperakumulacija / *Thlaspi praecox* / onesnaženost s kovinami / Cd / Zn / Pb / variabilnost
- AV KOKOVNIK, Mojca
- SA REGVAR, Marjana (mentor)
- KZ SLO, 1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2007
- IN STRATEGIJE PRIVZEMA Cd, Zn IN Pb PRI POPULACIJAH RANEGA MOŠNJAKA (*Thlaspi praecox* Wulfen) Z ONESNAŽENEGA IN NEONESNAŽENEGA RASTIŠČA
- TD Diplomaska naloga (univerzitetni študij)
- OP XI, 63 s., 2 tab., 21 sl., 72 vir.
- IJ sl
- JI sl / en
- AI V rastlinjaku smo vzgojili dve populaciji vrste *Thlaspi praecox* Wulfen z onesnaženega (Žerjav) in z neonesnaženega (Zaplana) rastišča, da bi določili razlike v lastnostih akumulacije Zn, Cd in Pb ter razlike v toleranci na kovine. Celokupne koncentracije Zn, Cd in Pb v tleh smo izmerili s pomočjo rentgenske fluorescenčne spektroskopije. Prav tako smo v talnih vzorcih izmerili tudi vsebnost organske snovi, pH in izmenljive koncentracije kovin s pomočjo amonijevega acetata. Koncentracije kovin v poganjkih in koreninah smo določali po razklopu z mešanico HNO<sub>3</sub> in HClO<sub>4</sub>. Ugotovili smo, da med populacijama ni bilo razlik v toleranci na kovine. Pri obeh populacijah smo potrdili hiperakumulacijo Cd in izključevanje Pb, medtem ko koncentracije Zn v rastlinskih delih pri nobeni od populacij niso dosegle meje določene za hiperakumulacijo Zn. Bile so opazne razlike v privzemu kovin. Sposobnost akumulacije Zn je bila višja pri populaciji z neonesnaženih tal, višja sposobnost akumulacije Cd pa je bila opazna pri populaciji z onesnaženih tal. Ni pa bilo razlik v izključevanja Pb. Populacija z onesnaženih tal je bila bolj uspešna pri transportu Cd iz korenin v poganjke, saj je imela višje vrednosti translokacijskih faktorjev (TF). Prav tako je imela populacija z onesnaženih tal tudi višje vrednosti bioakumulacijskih faktorjev (BAF), kar kaže na večjo uporabnost te populacije za fitoremediacijo s Cd onesnaženih tal. Obe populaciji sta si bili podobni v fitoekstrakcijski sposobnosti za Zn, populacija z onesnaženih tal pa je imela višjo sposobnost fitoekstrakcije Cd.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDK 581.1:549.25(043.2)=163.6
- CX metal uptake / metal tolerance / hyperaccumulation / *Thlaspi praecox* / metal pollution / Cd / Zn / Pb / variability
- AU KOKOVNIK, Mojca
- AA REGVAR, Marjana (supervisor)
- PP SLO, 1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2007
- TI Cd, Zn AND Pb UPTAKE STRATEGIES IN POPULATIONS OF *Thlaspi praecox* Wulfen FROM POLLUTED AND NONPOLLUTED SITE
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO XI, 63 p., 2 tab., 21 fig., 72 ref.
- LA sl
- Al sl / en
- AB In order to assess the differences in Zn, Cd, Pb accumulation and tolerance, two populations of *Thlaspi praecox* Wulfen from polluted (Žerjav) and non-polluted (Zaplana) site in a greenhouse were studied. Total soil metal concentrations of Zn, Cd and Pb were measured with X-Ray Fluorescence Spectroscopy. Organic matter, pH and the exchangeable concentrations of metals using extraction with ammonium acetate were also measured in soil samples. The plant samples were treated with a mixture of HNO<sub>3</sub> and HClO<sub>4</sub>. We found out that there were no differences in heavy metal tolerance between two populations of *T. praecox*. Cd hyperaccumulation and Pb exclusion were confirmed in both populations of *T. praecox*, meanwhile the concentrations of Zn in shoots did not exceed the limit defined for Zn hyperaccumulation in none of both populations. Differences in metal uptake were observed. Accumulation capacity for Zn tended to be higher in the non-polluted population, while the higher accumulation capacity for Cd was detected in population from polluted site. No differences in exclusion capacity for Pb were found. Root to shoot transport of Cd was higher in population from polluted site, because higher translocation factors (TF) were observed. Higher bioaccumulation factors (BAF) for Cd were also observed in population from polluted site, making it more appropriate for phytoremediation of Cd contaminated soils. Both populations were similar in Zn phytoextraction capacity, but a higher Cd phytoextraction capacity was detected in population from polluted site.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO TABEL	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>1</b>
2.1 HIPERAKUMULACIJA IN ZNAČILNOSTI HIPERAKUMULACIJSKIH RASTLIN	1
<b>2.1.1 Hiperakumulacijske značilnosti posameznih vrst rodu <i>Thlaspi</i></b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 Prednosti in omejitve hiperakumulacije pri fitoremediaciji</b>	<b>4</b>
2.2 STRATEGIJE PRIVZEMA KOVIN PRI RASTLINAH	6
2.3 VARIABILNOST V TOLERANCI IN V SPOSOBNOSTI AKUMULACIJE KOVIN	7
<b>2.3.1 Opredelitev tolerance pri populacijah z onesnaženih in neonesnaženih tal</b>	<b>7</b>
<b>2.3.2 Sposobnost akumulacije kovin pri populacijah z onesnaženih in z neonesnaženih tal ter korelacije med akumulacijo in toleranco na kovine</b>	<b>8</b>
2.3.2.1 Variabilnost v akumulaciji in toleranci na Zn	8
2.3.2.2 Variabilnost v akumulaciji in toleranci na Cd	10
2.3.2.3 Variabilnost v akumulaciji Ni	11
2.3.2.4 Variabilnost v akumulaciji Pb	11
<b>3 CILJI</b>	<b>12</b>
<b>4 HIPOTEZE</b>	<b>12</b>
<b>5 MATERIAL IN METODE</b>	<b>13</b>
5.1 PRIPRAVA POSKUSA	13
<b>5.1.1 Priprava semen</b>	<b>13</b>
<b>5.1.2 Priprava substrata in sejanje semen za testiranje tolerance in akumulacije Cd</b>	<b>13</b>

<b>5.1.3</b>	<b>Priprava substrata in sejanje semen za testiranje tolerance in akumulacije kovin (Zn, Cd, Pb) na onesnaženem (žerjavskem) substratu</b>	14
5.2	ANALIZE TALNIH VZORCEV	15
<b>5.2.1</b>	<b>Določanje organske snovi v talnih vzorcih</b>	15
5.2.1.1	Priprava standardov	15
5.2.1.2	Priprava vzorcev prsti	16
<b>5.2.2</b>	<b>Merjenje pH</b>	16
<b>5.2.3</b>	<b>Analiza celokupnih kovin v talnih vzorcih z XRF</b>	16
<b>5.2.4</b>	<b>Ocenjevanje biodostopnih koncentracij kovin v talnih vzorcih</b>	17
5.2.4.1	Priprava vzorcev prsti	17
5.3	ANALIZE RASTLIN	18
<b>5.3.1</b>	<b>Tehtanje</b>	18
<b>5.3.2</b>	<b>Določanje celokupnih koncentracij kovin v rastlinah z AAS – razklop z dušikovo in perklorno kislino</b>	18
<b>5.3.3</b>	<b>Analize fotosinteznih pigmentov</b>	19
5.4	STATISTIČNA ANALIZA	19
<b>6</b>	<b>REZULTATI</b>	20
6.1	TESTIRANJE TOLERANCE IN AKUMULACIJE Cd	20
<b>6.1.1</b>	<b>Lastnosti substrata</b>	20
<b>6.1.2</b>	<b>Analize rastlin</b>	20
6.1.2.1	Biomasa rastlin	20
6.1.2.2	Koncentracija klorofilov	21
6.1.2.3	Privzem Cd	22
6.1.2.4	Translokacijski faktor	23
6.1.2.5	Bioakumulacijski faktorji	24
6.1.2.6	Vsebnost Cd	25
6.1.2.7	Ocenjevanje fitoekstrakcijske sposobnosti z amonijevim acetatom	26
6.2	TESTIRANJE TOLERANCE IN AKUMULACIJE KOVIN (Zn, Cd, Pb) NA ONESNAŽENEM (ŽERJAVSKEM) SUBSTRATU	28
<b>6.2.1</b>	<b>Lastnosti substrata</b>	28
<b>6.2.2</b>	<b>Analize rastlin</b>	28
6.2.2.1	Biomasa rastlin	28

6.2.2.2	Koncentracija klorofilov	29
6.2.2.3	Privzem Zn	30
6.2.2.4	Privzem Cd	31
6.2.2.5	Privzem Pb	33
6.2.2.6	Translokacijski faktorji	34
6.2.2.7	Bioakumulacijski faktorji	36
6.2.2.8	Vsebnost Zn	40
6.2.2.9	Vsebnost Cd	41
6.2.2.10	Vsebnost Pb	42
6.2.2.11	Ocenjevanje fitoekstrakcijske sposobnosti z amonijevim acetatom	43
<b>7</b>	<b>RAZPRAVA</b>	<b>46</b>
7.1	TOLERANCA IN AKUMULACIJA Cd	46
7.1.1	Toleranca na Cd	46
7.1.2	Akumulacija Cd	47
7.1.3	Translokacijski faktor	47
7.1.4	Bioakumulacijski faktor	47
7.1.5	Vsebnost Cd	48
7.1.6	Ocenjevanje fitoekstrakcijske sposobnosti z amonijevim acetatom	49
7.2	TOLERANCA IN AKUMULACIJA KOVIN (Zn, Cd, Pb) NA ONESNAŽENEM (ŽERJAVSKEM) SUBSTRATU	49
7.2.1	Toleranca na kovine	49
7.2.2	Akumulacija in izključevanje kovin	50
7.2.3	Translokacijski faktorji	52
7.2.4	Bioakumulacijski faktorji	53
7.2.5	Vsebnost Zn, Cd in Pb	54
7.2.6	Ocenjevanje fitoekstrakcijske sposobnosti z amonijevim acetatom	55
<b>8</b>	<b>SKLEPI</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>57</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>59</b>
	<b>ZAHVALA</b>	



## KAZALO TABEL

- Tabela 1:** Lastnosti substrata (povprečje  $\pm$  se, n=2 kompozitna vzorca od 3 paralelnih vzorcev za vsako populacijo). Vrednosti predstavljajo meritve koncentracij kovin, pH in organske snovi kompozitnih vzorcev. **20**
- Tabela 2:** Lastnosti substrata (povprečje  $\pm$  se, n=2 kompozitna vzorca od 5 paralelnih vzorcev za vsako populacijo). Vrednosti predstavljajo meritve koncentracij kovin, pH in organske snovi kompozitnih vzorcev. **28**

## KAZALO SLIK

- Slika 1:** *Thlaspi praecox* slikan 3.5.2006 4
- Slika 2:** Biomasa poganjkov in korenin pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (povprečje  $\pm$  se, n=3). Različne črke označujejo statistično značilno razliko  $p < 0,05$ . 21
- Slika 3:** Koncentracija klorofilov pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (povprečje  $\pm$  se, n=3). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko  $p < 0,05$ . 22
- Slika 4:** Koncentracija Cd v a) poganjkih in b) koreninah pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (n=12). 23
- Slika 5:** Translokacijski faktor (TF) za Cd pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (n=12). 24
- Slika 6:** Bioakumuacijski faktor (BAF) a) poganjkov in b) korenin za Cd pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (n=12). 25
- Slika 7:** Vsebnost Cd v poganjkih in koreninah pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (povprečje  $\pm$  se, n=3). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko  $p < 0,05$ . 26
- Slika 8:** Izmenljive frakcije Cd pred in po poskusu pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (povprečje  $\pm$  se, n=2). Zvezdice označujejo statistično značilno razliko  $p < 0,05$ . 27
- Slika 9:** Biomasa poganjkov in korenin pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (povprečje  $\pm$  se, n=5). Različne črke označujejo statistično značilno razliko  $p < 0,05$ . 29
- Slika 10:** Koncentracija klorofilov pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (povprečje  $\pm$  se, n=5). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko  $p < 0,05$ . 30
- Slika 11:** Koncentracija Zn v a) poganjkih in b) koreninah pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (n=25). 31
- Slika 12:** Koncentracija Cd v a) poganjkih in b) koreninah pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (n=25). 32

- Slika 13:** Koncentracija Pb v a) poganjkih in b) koreninah pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (n=25). **34**
- Slika 14:** Translokacijski faktor (TF) za a) Zn, b) Cd in c) Pb pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (n=25). **36**
- Slika 15:** Bioakumuacijski faktor (BAF) a) poganjkov in b) korenin za Zn pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (n=25). **37**
- Slika 16:** Bioakumuacijski faktor (BAF) a) poganjkov in b) korenin za Cd pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (n=25). **38**
- Slika 17:** Bioakumuacijski faktor (BAF) a) poganjkov in b) korenin za Pb pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (n=25). **40**
- Slika 18:** Vsebnost Zn v poganjkih in koreninah pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (povprečje ± se, n=5). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko  $p < 0,05$ . **41**
- Slika 19:** Vsebnost Cd v poganjkih in koreninah pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (povprečje ± se, n=5). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko  $p < 0,05$ . **42**
- Slika 20:** Vsebnost Pb v poganjkih in koreninah pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (povprečje ± se, n=5). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko  $p < 0,05$ . **43**
- Slika 21:** Izmenljive frakcije a) Zn, b) Cd in c) Pb pred in po poskusu pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (povprečje ± se, n=2). Zvezdice označujejo statistično značilno razliko  $p < 0,05$ . **45**

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b>AAS</b>	atomski absorpcijski spektrofotometer
<b>Ag</b>	srebro
<b>Au</b>	zlato
<b>BAF</b>	bioakumulacijski faktor
<b>Ca</b>	kalcij
<b>Cd</b>	kadmij
<b>Co</b>	kobalt
<b>Cr</b>	krom
<b>Cu</b>	baker
<b>Fe</b>	železo
<b>Hg</b>	živo srebro
<b>K</b>	kalij
<b>Mg</b>	magnezij
<b>Mn</b>	mangan
<b>Mo</b>	molibden
<b>N</b>	dušik
<b>Ni</b>	nikelj
<b>P</b>	fosfor
<b>Pb</b>	svinec
<b>PC</b>	fitohelatini
<b>Se</b>	selen
<b>SM</b>	suha masa
<b>TF</b>	translokacijski faktor
<b>XRF</b>	X-Ray Fluorescence – rentgenska fluorescenca
<b>Zn</b>	cink

## 1 UVOD

Dandanes vse bolj narašča zanimanje za rastline, ki so sposobne hiperakumulacije kovin. Te rastline so posebno zanimive zaradi njihove potencialne uporabe pri fitoremediaciji s kovinami onesnaženih tal (Zhao s sod., 2003). Fitoremediacija je čedalje bolj aktualna raziskovalna tema, zato je pomembno tudi znanje o obsegu variabilnosti v sposobnosti akumulacije kovin tako znotraj kot tudi med populacijami različnih hiperakumulacijskih rastlinskih vrst.

S pričujočo diplomsko nalogo smo poskušali določiti razlike v sposobnosti akumulacije treh kovin (Zn, Cd in Pb) pri populacijah ranega mošnjaka (*Thlaspi praecox* Wulf.) z onesnaženega in neonesnaženega rastišča. Prav tako smo določali tudi razlike v toleranci na kovine. Želeli smo ugotoviti, katera populacija bi bila potencialno bolj uporabna pri fitoremediaciji.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 HIPERAKUMULACIJA IN ZNAČILNOSTI HIPERAKUMULACIJSKIH RASTLIN

Hiperakumulacija kovin je naravna sposobnost rastlin, ki lahko akumulirajo velike količine kovin v poganjke in liste (Reeves in Brooks, 1983), medtem ko v koreninah kopičijo nižje koncentracije, tako da je ponavadi razmerje koncentracije kovin poganjki : korenine  $> 1$  (Baker, 1981; Macnair, 2003). To razmerje navadno definiramo kot translokacijski faktor (TF).

Pojem hiperakumulacija se je v znanstvenih krogih prvič uveljavil po zaslugi Brooks s sod. (1977) in sicer ob odkritju neobičajne akumulacije Ni pri vrsti *Alyssum bertolonii*. Posušeni listi vrste *A. bertolonii* so vsebovali več kot 1000 mg kg<sup>-1</sup> (=0,1%) Ni. Šlo je za koncentracije, ki so bile za velikostni razred večje od tistih pri neakumulacijskih rastlinah (Reeves in Baker, 2000).

Da lahko govorimo o hiperakumulacijski rastlini mora ta izpolnjevati tri pogoje: uspešen privzem preko korenin, uspešen transport iz korenin v poganjke in močno povečana toleranca na račun notranje detoksifikacije kovin (McGrath s sod., 2002; Pollard s sod., 2002). Hiperakumulacijske rastline so sposobne akumulacije potencialno fitotoksičnih elementov v koncentracijah, ki so 100-krat večje v primerjavi z rastlinami, ki ne akumulirajo kovin (Salt s sod., 1998; Chaney s sod., 1997; Raskin in Ensley, 2000). Za njih je značilno, da koncentracije kovin v njihovih tkivih nekajkrat presegajo koncentracije v tleh (Brooks, 2000). Te rastline imajo močno izražene sekvestracijske mehanizme za akumulirane kovine in imajo pogosto večje zahteve za specifične esencialne kovine kot je npr. Zn (Shen s sod., 1997). Nekatere vrste so sposobne privzema kovin iz manj topnih frakcij tal v primerjavi z nehiperakumulacijskimi vrstami (McGrath s sod., 1997). Koncentracija kovin v poganjkih hiperakumulacijskih vrst je ponavadi višja od koncentracij v koreninah. Chaney s sod. (1997) meni, da naj bi to bil zaščitni mehanizem rastlin pred okužbo z glivami in pred objedanjem žuželk, vendar ekološki pomen hiperakumulacije še ni jasen.

Rastline označujemo kot hiperakumulacijske, če se v poganjkih kopiči več kot  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$  Ni, Cu oz. Co,  $10000 \text{ mg kg}^{-1}$  Zn oz. Mn in  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  Cd (Baker s sod., 1994; Brooks, 1998). Po Brooks (2000) je mejna koncentracija kovin kot so Ni, Co oz. Cu nad  $5000 \text{ mg kg}^{-1}$ , mejna vrednost za Se in Pb pa znaša  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$ . Rastline morajo doseči mejne vrednosti kovin, da jih lahko uvrstimo med hiperakumulacijske vrste. V "normalnih" razmerah se v rastlinah pojavlja  $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$  Cd oz. Se,  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  Pb,  $3,1 \text{ mg kg}^{-1}$  Ni oz. Co,  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  Cu,  $70 \text{ mg kg}^{-1}$  Zn in  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  Mn. Najpogosteje rastline akumulirajo le eno kovino, nekatere pa celo dve ali tri. Selekcija tistih populacij, ki so sposobne hiperakumulacije večih kovin, bi bile v praksi zelo primerne za dekontaminacijo onesnaženih tal, kajti onesnažena tla so le redko kontaminirana le z eno kovino (McGrath, 1998).

Hiperakumulacija se pojavlja predvsem pri predstavnikih družine križnic in sicer sta v tej družini dva rodova, ki imata številne hiperakumulacijske vrste. To sta rod *Alyssum* in *Thlaspi*. Vrste znotraj rodu *Thlaspi* so sposobne hiperakumulacije Zn, Ni, Cd in Pb (Baker

in Brooks, 1989). Naglo se dopolnjuje tudi seznam hiperakumulacijskih vrst iz družin Euphorbiaceae in Asteraceae. Te vrste so pretežno tropske (Pollard in Baker., 1996).

Za hiperakumulacijske rastline je značilna majhna produkcija semen. Raznašanje semen je lokalno zelo omejeno (Koch s sod., 1998). Imajo kratek življenjski cikel in sposobnost samoopraševanja, kar pojasnjuje razvoj različnih ekotipov z vidika morfoloških in fizioloških značilnosti (Baker in Proctor, 1990). Samoopraševanje še dodatno povečuje razlike med lokalnimi populacijami (Jain, 1976).

### 2.1.1 Hiperakumulacijske značilnosti posameznih vrst rodu *Thlaspi*

Poznanih je kar nekaj hiperakumulacijskih vrst, ki spadajo v rod *Thlaspi*. Najbolj raziskana vrsta iz tega rodu je *Thlaspi caerulescens* J&C Presl iz družine križnic (Brassicaceae) (Assaunção s sod., 2003). *T. caerulescens* hiperakumulira Zn in Cd (Baker s sod., 1994) ter Ni (Reeves in Brooks, 1983). *Thlaspi rotundifolium* ssp. *cepaefolium* hiperakumulira Pb (Brooks, 1998; Wenzel in Jockwer, 1999), *T. praecox* pa hiperakumulira Zn (Reeves and Brooks, 1983a) in Cd (Vogel-Mikuš s sod., 2005). *Thlaspi goesingense* hiperakumulira Ni in Zn (Reeves in Baker, 1984; Wenzel in Jockwer, 1999). Znano je, da je *T. caerulescens* sposoben v naravnih razmerah v poganjke akumulirati več kot 21000 mg kg<sup>-1</sup> Zn, 660 mg kg<sup>-1</sup> Pb in 164 mg kg<sup>-1</sup> Cd (preračunano na suho maso rastline) (Baker s sod., 1994). V pogojih hidroponske raztopine je koncentracija Cd narasla na 14187 mg kg<sup>-1</sup>, koncentracija Zn pa tudi do 30000 mg kg<sup>-1</sup> ne da bi rastlina pri tem kazala kakršne koli simptome zastrupitve (Lombi s sod., 2000; Assaunção s sod., 2003). *T. rotundifolium* ssp. *cepaefolium* je sposoben akumulirati več kot 1934 (Avstrija) in 8200 mg kg<sup>-1</sup> Pb (Italija) (Reeves in Brooks, 1983b; Wenzel and Jockwer, 1999). Izkazalo se je, da v naravnih razmerah znašajo maksimalne koncentracije kovin v poganjkih ranega mošnjaka (*T. praecox* Wulf.) 14590 mg kg<sup>-1</sup> za Zn, 5960 mg kg<sup>-1</sup> za Cd in 3500 mg kg<sup>-1</sup> za Pb. Razmerje akumuliranega Zn med poganjki in koreninami znaša 9,6, razmerje akumuliranega Cd pa 5,6. Ta razmerja nakazujejo na to, da se ti dve kovini pri ranem mošnjaku pretežno transportirata v poganjke. Bioakumulacijski faktorji poganjkov 75-krat presežejo celokupni nivo Cd v tleh in 20-krat presežejo celokupni nivo Zn v tleh, kar nakazuje na izredne hiperakumulacijske sposobnosti ranega mošnjaka v primeru Zn in Cd ter njegovo

potencialno uporabo pri fitoremediacijskih študijah. 80% Pb se akumulira v koreninah. Takšen rezultat nakazuje na izključevanje kot tolerančno strategijo za Pb (Vogel-Mikuš s sod., 2005).

V rodu *Thlaspi* najdemo še 23 vrst, ki hiperakumulirajo Ni (*T. alpestre* Jacq., *T. montanum* L., *T. pindicum* Hausskn...) (Brooks, 2000; Psaras in Manetas, 2001), 7 vrst, ki hiperakumulirajo Zn (*T. caerulescens*, *T. praecox*...) (Brooks, 2000) in 1 vrsto, ki hiperakumulira Pb (*Thlaspi cepaeifolium* (Wulfen) W.D.J.Koch) *ssp. cepaeifolium*) (Reeves in Brooks, 1983b).

*T. praecox* ali rani mošnjak raste na suhih travnikih od nižine do subalpinskega pasu. Je trajnica, ki cveti od marca do junija. Ima značilno rozeto in večinoma več cvetočih stebel. Čaša je pogosto rdečkasto nadahnjena. Venec je bel. Luščki so razločno krilati (Martinčič s sod., 1999).



Slika 1: *Thlaspi praecox* slikan 3.5.2006

### 2.1.2 Prednosti in omejitve hiperakumulacije pri fitoremediaciji

Onesnažena tla lahko čistimo s kemičnimi, fizikalnimi in biološkimi tehnikami (Khan s sod., 2000). Imobilizacija in ekstrakcija kovin s fizikalno-kemijskimi metodami je precej draga metoda in je pogosto primerna samo za manjša onesnažena področja, kjer je potrebna popolna in hitra dekontaminacija (Martin in Bardos, 1996). Fitoremediacija pa je



okolju prijazna, poceni in vizualno prijetna. Še posebej je privlačna zato, ker je z njo mogoča obnova onesnaženega območja, delna dekontaminacija, ohranitev biološke aktivnosti in fizikalne strukture tal, je potencialno poceni, na videz nevsiljiva metoda in ponuja možnost biološkega pridobivanja kovin (Baker s sod., 1991). Kljub temu pa ima tudi fitoremediacija svoje omejitve.

Izkoriščanje metode privzema kovin v rastlinsko biomaso je omejeno s produktivnostjo rastlin in s količino kovin, ki jih le-te lahko kopičijo v rastlinske dele (Baker s sod., 1991). Ena možnost pri fitoekstrakciji kovin je uporaba takih vrst, ki sicer dosežejo nizko biomaso, vendar kopičijo visoke koncentracije kovin v poganjke (Reeves in Baker, 2000). Druga možnost pa je uporaba rastlin, ki so običajno nespecifične za določeno kovino in kopičijo nizke koncentracije kovin, vendar dosežejo visoko biomaso. Vrsta *T. caerulescens* je znana kot hiperakumulator Zn, Cd in Ni, ampak njena uporaba v naravnih razmerah je omejena z nizko biomaso in počasno rastjo (Ebbs in Kochian, 1997). Toda kljub nizki biomasi je sposobna akumulirati izredne količine kovin, tako da je poleg biomase potrebno upoštevati še vsebnosti kovin na rastlino (masa rastline \* koncentracija kovine), ki so v določenih primerih precej višje v primerjavi z vrstami, ki dosežejo večjo biomaso. Mnogi so mnenja, da bi bile idealne rastlinske vrste, primerne za čiščenje onesnaženih tal take, ki lahko dosežejo veliko biomaso in hkrati tolerirajo in akumulirajo onesnažila (Ebbs in Kochian., 1997). Takšna kombinacija je skoraj nemogoča.

Omejeno uporabo hiperakumulacijskih rastlin pri fitoremediaciji predstavlja tudi dejstvo, da običajno kopičijo le en element in da je zelo malo znanega o agronomskih zahtevah teh rastlin. Da bo hiperakumulacija postala splošno uveljavljena tehnika fitoremediacije bodo potrebne še številne raziskave. Raziskave že tečejo v tej smeri, da bi določili obseg naravne variabilnosti v sposobnosti hiperakumulacije kovin. S tem bi lahko lažje razrešili vprašanje o genetskih temeljih hiperakumulacije. Smiselno bi bilo proučiti različne genotipe znotraj tistih vrst, ki so že uvrščene med hiperakumulacijske vrste. Na ta način bi lahko selekcionirali najbolj učinkovite hiperakumulacijske rastline, ki bi bile v končni fazi sposobne hiperakumulirati tudi multiple kovine (Escareé s sod., 2000; McGrath s sod., 2001).

## 2.2 STRATEGIJE PRIVZEMA KOVIN PRI RASTLINAH

Akumulacija in izključevanje sta dve pomembni strategiji, s katerima rastline odgovarjajo na povečano koncentracijo kovin. Pri rastlinah, ki akumulirajo kovine je razmerje koncentracij kovin med poganjki in koreninami ponavadi večje od 1 ( $TF > 1$ ), medtem ko pri rastlinah, ki izključujejo kovine, je to razmerje ponavadi nižje od 1 ( $TF < 1$ ). Za akumulacijske rastline je značilno, da so koncentracije kovin v nadzemnih delih višje od koncentracij kovin v tleh ( $BAF > 1$ ) (Baker, 1981; Baker s sod., 1994). Za izključevanje pa je značilno, da so koncentracije kovin v nadzemnih delih rastlin nižje kot v tleh ( $BAF < 1$ ) (Baker s sod., 1994).

Pri izključevalcih ostajajo koncentracije kovin v rastlini nizke preko večjega koncentracijskega območja v tleh vse do kritične koncentracije, ko mehanizmi izključevanja popustijo in se prične неконтролиран privzem kovin v rastlino (Baker, 1981). Izključevanje kovin iz rastlinskih organov je povezano z omejevanjem privzema kovin v korenine (**rezistenca**) s pomočjo povečane tvorbe sluzi in odpadanja celic koreninske čepice (Llugany s sod., 2003). Lahko pride tudi do inducirane celične smrti epidermalnih celic korenin in tvorbe zaščitnih mejnih plasti, ki ščitijo globlje meristemske in elongacijske cone korenin (Delisle s sod., 2001). Omejevanje privzema nekaterih kovin lahko poteka tudi na račun sekrecije organskih kislin (malat, citrat) (Briat in Lebrun, 1999; Hall, 2002). Omejevanje transporta kovin iz korenin v poganjke (**toleranca**) je povezano s sekvestracijo kovin v koreninskih celičnih stenah in vakuolah in s tem z omejevanjem nalaganja kovin v ksilem (Lasat 2002; Hall 2002).

Na drugi strani pa je za rastline, ki akumulirajo značilno, da kovine pospešeno privzemajo iz tal v korenine, jih nalagajo v ksilem in jih transportirajo v nadzemne dele, kjer se kovine koncentrirajo (Baker, 1981; Shen s sod., 1997). Obstajajo številni za kovino specifični mehanizmi translokacije iz korenin v poganjke. Ti mehanizmi so specifični za določeno populacijo. Narava teh mehanizmov je zelo nejasna (Assunção s sod., 2003). Zelo verjetno gre za različne koncentracije helatorjev v citoplazmi in vakuolah koreninskih celic kot so histidin (Krämer s sod., 1996) in druge amino ter organske kisline (Lasat s sod., 1998). Skrajna oblika akumulacije je hiperakumulacija. Hiperakumulacijske rastline so morale kot

odgovor na povečano koncentracijo kovin v tkivih razviti posebne prilagoditve. Prevladujoča mehanizma teh prilagoditev sta vezava kovin na celično steno in helacija. Pri helaciji pride do indukcije nastanka peptidov z vezavnim mestom za kovine in nato do nastanka kovinsko-proteinskega kompleksa (Zenk, 1996). Biosinteza proteinskih kompleksov je inducirana s številnimi kovinami ko so Cd, Hg, Ag, Cu, Ni, Au, Pb in Zn. Cd je poznan kot najmočnejši povzročitelj nastanka zaščitnih proteinskih kompleksov. Kot helatorji kovin pogosto nastopajo tudi organske kisline (npr. malat, citrat), toda vloga le-teh v toleranci na kovine še ni pojasnjena. Pomembno vlogo v rezistenčnih mehanizmih igra tudi glutation (GSH). Eden od načinov rezistence je tudi aktivno črpanje toksičnih kovin iz celice, drug možen način pa je detoksifikacija kovin s pomočjo encimov, kjer encimi spremenijo toksične ione v manj toksično obliko. Detoksifikacija kovin poteka z nastankom proteinskih kompleksov, ki so bogati z aminokislino cistein in jih najdemo v živalih, višjih rastlinah, enoceličnih evkariontih in nekaterih prokariontih (Hamer, 1986). Lahko pa pride tudi do bioakumulacije ali sekvestracije kovin, kar pomeni, da kovine preidejo v fiziološko nedostopno obliko (Silver, 1996). Geni, ki kodirajo rezistenčne mehanizme so največkrat locirani na plazmidih in transpozonih.

## 2.3 VARIABILNOST V TOLERANCI IN V SPOSOBNOSTI AKUMULACIJE KOVIN

### 2.3.1 Opredelitev tolerance pri populacijah z onesnaženih in neonesnaženih tal

Toleranca na kovine je definirana kot sposobnost preživetja in razmnoževanja nekaterih rastlin na območjih, ki so neugodna za rast večine drugih rastlin, saj tla vsebujejo povišane koncentracije ene izmed kovin. Večina rastlin bi na takih tleh prenehala z normalno rastjo in bi kazala simptome zastrupitve (Macnair in Baker, 1994).

Toleranca na kovine je bila v večini raziskav opredeljena kot primer **naravne selekcije** pri rastlinah (Bert, 2000). Antonovics s sod., (1971) poudarja, da ni nobenih dokazov, da bi neka vrsta imela razvito konstitutivno toleranco na kovine: razvoj tolerance (evolucija) se pojavi takrat, ko rastline kolonizirajo onesnažena področja. V nasprotju s to trditvijo pa obstaja fenomen konstitutivne tolerance na kovine in je prisotna pri vseh populacijah neke

vrste, ki uspevajo bodisi na onesnaženih bodisi na neonesnaženih tleh (Baker in Proctor, 1990). Bilo je narejenih kar nekaj raziskav pri različnih vrstah iz družine križnic (*A. halleri*, *T. caerulescens*, *T. latifolia*,...), pri katerih se je izkazalo, da je toleranca na kovine konstitutivna prednost določenih vrst. To je tudi v nasprotju s trditvijo, da so populacije, ki rastejo na s kovinami onesnaženih tleh, genetsko drugačne od populacij iste vrste, ki rastejo na neonesnaženih rastiščih (Antonovics s sod., 1971).

### **2.3.2 Sposobnost akumulacije kovin pri populacijah z onesnaženih in z neonesnaženih tal ter korelacije med akumulacijo in toleranco na kovine**

Genetika in ekološki pomen akumulacije kovin še vedno odpirata mnogo vprašanj. V zadnjem času se je izkazalo, da obstaja različna stopnja variabilnosti v sposobnosti akumulacije kovin tako znotraj populacij kot tudi med populacijami (Dechamps s sod., 2005). Največ je bilo narejenih študij pri populacijah vrste *T. caerulescens* različnega izvora.

#### **2.3.2.1 Variabilnost v akumulaciji in toleranci na Zn**

Meerts in Van Isacker (1997) sta bila prva, ki sta pri vrsti *T. caerulescens* pokazala, da imajo populacije (subsp. *caerulescens*) z neonesnaženih tal (Luxemburg) nižjo toleranco in višjo sposobnost akumulacije Zn kot pa populacije (subsp. *calaminare*) z onesnaženih tal (Belgija). Višja sposobnost akumulacije Zn pri populacijah z neonesnaženih tal v primerjavi s populacijami z onesnaženih tal je bila potrjena tudi s strani Assunção s sod. (2003) ter Escareé s sod. (2000). Vrsta *T. caerulescens* ima po vsej verjetnosti povečane potrebe po Zn in močne sekvestracijske mehanizme (Shen s sod., 1997). Mehanizem, ki naj bi bil povezan z večjim privzemom Zn pri vrsti *T. caerulescens*, je višja ekspresija Zn transporterjev (Lasat s sod., 2000). Poleg Zn transporterjev so za višjo stopnjo akumulacije Zn pri populacijah z neonesnaženih tal odgovorni tudi drugi dejavniki kot so; višje razmerje korenine/poganjki, večja specifična dolžina korenin in povečana translokacija Zn iz korenin v poganjke. Na podlagi vsega naštetega domnevajo, da naj bi se v procesu naravne selekcije povečala sposobnost privzema Zn pri populacijah, ki uspevajo na s Zn revnih tleh, zato da izravnajo primanjkljaj Zn v substratu (Meerts s sod., 2003). Podobno

kot pri *T. caerulescens* se je pri vrsti *A. halleri* izkazalo, da so populacije z neonesnaženih tal v primerjavi s populacijami z onesnaženih tal sposobne večje in hitrejše akumulacije Zn (Bert s sod., 2000). Te ugotovitve kažejo na to, da so populacije z neonesnaženih tal razvile višjo sposobnost privzema Zn in hkrati tudi višjo sposobnost kopičenja Zn v manj topni obliki. Tu se pojavi paradoks, saj bi bile potemtakem populacije z neonesnaženih tal bolj primerne za fitoremediacijo tal kot pa njihovi sorodniki z onesnaženih tal (Meerts s sod., 2003). Razlog za nižjo hiperakumulacijo kovin pri populacijah z onesnaženih tal bi lahko bil tudi redčitveni efekt, saj imajo te populacije ponavadi višjo biomaso v primerjavi s populacijami z neonesnaženih tal (Dechamps s sod., 2005).

Kljub temu pa ne kažejo vsi hiperakumulatorji razlik v akumulacijskih sposobnostih kovin. Vogel-Mikuš s sod. (2005) so na primeru dveh različnih populacij vrste *T. praecox* dokazali, da ni nobenih razlik v sposobnosti akumulacije Zn.

Stopnja tolerance na Zn pri populacijah vrste *A. halleri* z neonesnaženih tal je nekoliko nižja v primerjavi s populacijami z onesnaženih tal (Bert s sod., 2000). Podobno sta pokazala tudi Meerts in Van Isacker, (1997) pri vrsti *T. caerulescens*, kjer so bile populacije z neonesnaženih tal manj tolerantne kot pa populacije z onesnaženih tal. Večja toleranca na Zn pri populacijah z onesnaženih tal je verjetno posledica sposobnosti rastlin, da upočasnijo hitrost akumulacije Zn in da imajo večje sposobnosti sekvestracije Zn, pri čemer je zadnja možnost bolj verjetna (Assunção s sod., 2003). Avtorja (Meerts in Van Isacker, (1997)) sta zaključila, da se je višja stopnja tolerance pri populacijah z onesnaženih tal razvila iz že obstoječe konstitutivne tolerance. Višja pa je zaradi tega, ker na onesnaženih področjih vladajo večji selekcijski pritiski (=izpostavljenost večjim koncentracijam kovin v tleh). Populacije vrste *A. halleri* in *T. caerulescens* naj bi imele poglobitve tolerančne gene, le da so populacije, ki rastejo na onesnaženih tleh, razvile nekatere druge gene ali modifikatorje, ki povečujejo stopnjo tolerance (Bert s sod., 2000). Številne študije populacij in ekotipov vrste *T. caerulescens* kažejo na to, da obstaja negativna korelacija med akumulacijo Zn in toleranco na Zn (Meerts in Van Isacker, 1997; Escareé s sod., 2000). Mcnair in sod. (1999) so s poskusi križanj F<sub>2</sub> generacij med *A. halleri* in *A. petraea* dokazali neodvisno segregacijo genov odgovornih za toleranco na Zn in genov odgovornih za akumulacijo Zn, kar jasno kaže na to, da gre za dva mehanizma, ki

sta pod neodvisno genetsko kontrolo. Podobno so dokazali tudi Assunção s sod. (2003) na primeru vrste *T. caerulescens*. Obstoj hiperakumulacijskih sposobnosti pri populacijah iz »normalnih« tal kažejo na to, da sta hiperakumulacija in toleranca na kovine dve različni prednosti, ki sta se tekom evolucije razvili neodvisno druga od druge (Assunção s sod., 2003).

#### 2.3.2.2 Variabilnost v akumulaciji in toleranci na Cd

Razlike v sposobnosti akumulacije kovin med različnimi populacijami so veliko manj raziskane za Cd kot pa za Zn. Najbolj izrazite razlike so bile pokazane na populacijah vrste *T. praecox* iz južne Francije. Te populacije so imele izredno visoko kapaciteto privzema Cd (Escareé s sod., 2000; Lombi s sod., 2000). Študije za Cd so pokazale tudi nekaj nasprotnojučih si tez (Dechamps s sod., 2005). Assunção s sod. (2003) je dokazal višjo sposobnost akumulacije Cd pri populacijah z neonesnaženih tal (Lellingen - Luxemburg) v primerjavi s populacijami z onesnaženih tal (La Calamine - Belgija). Medtem ko je Escareé s sod. (2000) na populacijah iz južne Francije pokazal ravno nasprotno. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Vogel-Mikuš s sod. (2005), ki so dokazali višjo sposobnost akumulacije Cd pri populacijah vrste *T. praecox* z onesnaženih tal (Žerjav) in nižjo sposobnost akumulacije Cd pri populacijah z neonesnaženih tal (bližina Vrhnike).

Roosens s sod., (2003) je primerjal sposobnost privzema Zn in Cd pri 7 populacijah vrste *T. caerulescens* z onesnaženih tal. Vse populacije so bile sposobne hiperakumulirati Cd, toda povezava med hiperakumulacijo in toleranco na Cd se je izkazala za zelo kompleksno. Tako kot pri študijah tolerance in akumulacije Zn, se je tudi pri poskusih privzema Cd pri večini populacij (5) izkazalo, da gre pri toleranci in akumulaciji Cd za inverzno povezavo. Za razliko od tega pa je imela populacija iz Gangesa poleg visoke stopnje akumulacije Cd tudi visoko stopnjo tolerance. S poskusom so pokazali tudi pozitivno korelacijo privzema Zn in Cd. Pozitivna korelacija kaže na to, da si Cd in Zn delita določen del komponent mehanizmov privzema in akumulacije kovin (Roosens s sod., 2003).

### 2.3.2.3 Variabilnost v akumulaciji Ni

Kot je že bilo omenjeno, ne kažejo vse hiperakumulacijske rastline razlik v sposobnosti akumulacije kovin. Serpentinske in neserpentinske populacije hiperakumulatorjev Ni vrst *T. goesingense* in *T. montanum* var. *montanum* akumulirajo podobne vendar zelo visoke količine Ni (Boyd in Martens, 1998). Prav tako tudi Taylor in Macnair (2006) nista dokazala nobenih genetskih razlik znotraj populacij hiperakumulatorjev Ni *T. pindicum* in *T. alpinum* var. *sylvium*. Izkazalo pa se je, da obstaja variabilnost v sposobnosti akumulacije Ni med populacijami vrste *T. pindicum*. Pomanjkanje genetskih variabilnosti v sposobnosti hiperakumulacije kovin je zelo verjetno povezano z inbridinom, ki je zelo pogost pojav pri hiperakumulacijskih rastlinah.

### 2.3.2.4 Variabilnost v akumulaciji Pb

V primeru Pb so Vogel-Mikuš s sod. (2005) pokazali, da med populacijama vrste *T. praecox* z onesnaženih tal in neonesnaženih tal ni nobenih razlik v privzemu tega elementa.

Populacije iz »normalnih« tal, ki imajo visoko sposobnost akumulacije kovin in so genetsko zelo variabilne, igrajo pomembno vlogo v programih vzgoje rastlin z boljšimi fitoekstrakcijskimi sposobnostmi (Molitor s sod., 2005). Vendar pa bi morale biti rastline z visokimi fitoekstrakcijskimi sposobnostmi tudi dovolj tolerantne, kar pa bi lahko dosegli le s križanji s takimi populacijami, ki to sposobnost imajo. Meerts in Van Isacker (1997) ter Escareé s sod. (2000) so pokazali, da imajo populacije vrste *T. caerulescens* z neonesnaženih tal v primerjavi s populacijami z onesnaženih tal za polovico nižjo biomaso nadzemnih delov. Idealna fitoekstrakcijska rastlina bi bila taka, ki bi imela visoke akumulacijske sposobnosti (takšno sposobnost imajo ponavadi rastline z neonesnaženih tal) in pa da bi hkrati dosegla takšno biomaso, kot jo dosežejo rastline z onesnaženih tal. Tako idealno kombinacijo bi lahko dosegli le s kontroliranimi križanji populacij, ki izvirajo iz različnih področij (Frérot s sod., 2002).

### **3 CILJI**

Namen te naloge je bil v kontroliranih razmerah vzgojiti dve populaciji vrste *T. praecox* iz različnih področij. Želeli smo ugotoviti:

- a) kakšne so razlike v privzemu Zn, Cd in Pb
- b) kakšne so razlike v toleranci na Zn, Cd in Pb
- c) oceniti primernost populacij za fitoremediacijo onesnaženih tal.

### **4 HIPOTEZE**

Predvidevamo, da bo populacija z onesnaženih tal v večji meri akumulirala Cd in bo bolj tolerantna na kovine v primerjavi s populacijo z neonesnaženih tal. Populacija z neonesnaženih tal naj bi v večji meri akumulirala Zn, kazala pa bi nižjo stopnjo tolerance na kovine. Pričakujemo tudi, da bosta obe populaciji izključevali Pb.



## **5 MATERIAL IN METODE**

### **5.1 PRIPRAVA POSKUSA**

#### **5.1.1 Priprava semen**

Eno zbirko semen smo nabrali na onesnaženem rastišču v Žerjavu in sicer na vzorčnem mestu P3. Vzorčno mesto P3 je locirano na robu doline z zaprto vegetacijo, približno 500 m stran od talilnice (Regvar s sod., 2006). Druga zbirka semen pa je izhajala z neonesnaženega rastišča na Zaplani. Semena obeh populacij smo sterilizirali z 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Najprej smo jih 10 min namakali v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nato pa smo jih sprali s 40 ml sterilne vode. Ta postopek smo ponovili trikrat.

#### **5.1.2 Priprava substrata in sejanje semen za testiranje tolerance in akumulacije Cd**

Pripravili smo mešanice komercialne zemlje Biobrazda z ustreznimi količinami vodne raztopine 3CdSO<sub>4</sub> \* 8H<sub>2</sub>O, tako da smo dobili naslednje koncentracije Cd v substratu; 0, 50, 100 in 250 mg kg<sup>-1</sup>. S tako pripravljenim substratom smo napolnili 24 lončkov. Prvih 6 lončkov zemlje smo uporabili za kontrolo. Ostale šesterice lončkov pa smo napolnili z mešanico zemlje in 3CdSO<sub>4</sub> \* 8H<sub>2</sub>O ustrezne koncentracije. V vsakem lončku je bilo približno po 0,5 kg zemlje. Vsako šesterico lončkov smo razdelili tako, da smo v tri posejali semena zaplanske populacije in v tri semena žerjavske populacije. Vsako trojico lončkov s semeni določene populacije smo označili s črkami od A-C in s koncentracijo dodanega Cd. Iz vsakega lončka smo s pomočjo plutovrta odvzeli del substrata in ga shranili v polivinilaste vrečke, ki smo jih označili na enak način kot lončke. Ta substrat smo shranili za kasnejše analize talnih vzorcev. Lončke s semeni smo pokrili s polivinilom in jih postavili v klimatiziran rastlinjak, kjer smo gojili semena pri 20°C, 16 urni svetlobi in 8 urni temi, 80% zračni vlagi in svetlobni intenziteti, ki je znašala 250 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Rastline smo gojili 1 mesec (razviti 3-4 listi).

Ko so bile rastlinice dovolj velike (po 1 mesecu) smo jih razredčili, tako da sta bili po 2 rastlinici na en lonček. Tako pripravljene lončke s po dvema rastlinama smo dali za 3 mesece v klimatiziranem rastlinjak (razmere v rastlinjaku so bili enake, kot je opisano zgoraj).

### **5.1.3 Priprava substrata in sejanje semen za testiranje tolerance in akumulacije kovin (Zn, Cd, Pb) na onesnaženem (žerjavskem) substratu**

S Pb, Zn in Cd onesnažena zemlja je bila nabrana v Žerjavu (vzorčno mesto P3). Neonesnažena zemlja pa je bila nabrana na Zaplani. Vso zemljo smo presejali skozi 0,5 cm sito, zato da smo odstranili večje kamne. Substrat za rastline smo pripravili z mešanjem nabrane zemlje, kremenčevega peska in vermikulita, v razmerju 10:1:2. Razmerja med onesnaženo in neonesnaženo zemljo smo spreminjali tako, da smo dobili 0%, 25%, 50%, 75% in 100% onesnažen (žerjavski) substrat. Mešanice smo avtoklavirali dvakrat po dve uri pri 121°C v razmaku 48 ur. Nato smo z mešanicami določenih koncentracij napolnili lončke po sledečem vrstnem redu. Mešanica z 0% onesnaženim substratom nam je služila kot kontrola. S to mešanico smo napolnili dvakrat po pet plastičnih lončkov (skupaj torej deset lončkov). Vsako peterico lončkov smo označili s črkami od A do E. V vsakem lončku je bilo približno po 0,5 kg zemlje. Iz vsakega lončka smo s pomočjo plutovrta odvzeli del substrata in ga shranili v polivinilaste vrečke, ki smo jih označili na enak način kot lončke. Ta substrat smo shranili za kasnejše analize talnih vzorcev.

Sterilizirana semena smo posejali v dve koriti napolnjeni z vermikulitom. V eno korito smo posejali semena zaplanske populacije in v drugo semena žerjavske populacije. Obe koriti smo pokrili s polivinilom in ju postavili v klimatiziran rastlinjak (20°C, 16 urna svetloba, 8 urna tema, 80% zračna vlaga in svetlobna intenziteta, ki je znašala 250  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Rastline smo gojili 1 mesec (razviti 3-4 listi). Nato smo v lončke z različno onesnaženim substratom prenesli mlade rastlinice, ki so 1 mesec uspevale v rastlinjaku. V prvih pet lončkov smo posadili po 3-4 mlade rastlinice žerjavske populacije, v drugih pet pa rastlinice zaplanske populacije. Na enak način smo napolnili lončke s 25%, 50%, 75% in 100% onesnaženim substratom. Skupaj je to znašalo 50 lončkov. Lončke smo pokrili s polivinilom in jih postavili v klimatiziran rastlinjak. Mlade rastlinice v lončkih smo gojili v enakih razmerah kot prej semena v koritih z vermikulitom. Rastline smo zalivali z destilirano vodo in hranilno raztopino za *Thlaspi*. Ko so bile dovolj velike, smo jih razredčili, tako da sta bili v vsakem lončku po 2 (skupaj je to znašalo 100 rastlin; 50 žerjavske in 50 zaplanske populacije). Rastline smo v klimatiziranem rastlinjaku gojili še 3 mesece.

## 5.2 ANALIZE TALNIH VZORCEV

Vzorci prsti smo sušili en teden pri 30°C. Po končanem sušenju smo jih presejali skozi <2 mm gosto sito. Nato smo z mešanjem substrata istih koncentracij pripravili kompozitne vzorce. Pri poskusu testiranja tolerance in akumulacije Cd smo pripravili po 2 kompozitna vzorca od treh paralelnih vzorcev. Tako smo naredili za obe populaciji. Tudi pri poskusu testiranja tolerance in akumulacije kovin (Zn, Cd, Pb) na onesnaženem (žerjavskem) substratu smo pripravili po 2 kompozitna vzorca od petih paralelnih za obe populaciji. Vzorce smo hranili pri sobni temperaturi v zatemnjenem prostoru.

### 5.2.1 Določanje organske snovi v talnih vzorcih

Organsko snov v substratu smo določali s kromovo metodo (povzeto po Kandeler, 1995). Ta metoda je primerna za tla, ki vsebuje do 8% organske snovi in ni primerna za določanje organske snovi v humusnih gozdnih tleh. Organska snov v tleh se oksidira s pomočjo mešanice  $K_2Cr_2O_7$  in  $H_2SO_4$ . Cr (III), ki se pri tem tvori, določamo kalorimetrično in je ekvivalent organski snovi prisotni v tleh.

Za pripravo potrebne količine raztopine  $K_2Cr_2O_7$  smo zatehtali 2,94 g  $K_2Cr_2O_7$  in ga razredčili s 30 ml bidestilirane vode.

#### 5.2.1.1 Priprava standardov

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

Za fotometrično analizo smo 1 ml standardne raztopine razredčili z bidestilirano vodo do 25 ml in rahlo premešali. S fotometrom smo merili absorpcijo standardnih raztopin pri 570 nm.

Na podlagi začetne mase standardov vrednosti absorpcije mioinozitola ustrezajo 0%, 2%, 4%, 6% in 8% organski snovi v prsti.

#### 5.2.1.2 Priprava vzorcev prsti

V devet 10 ml sterilnih bučk (4 iz poskusa testiranja tolerance in akumulacije Cd in 5 iz poskusa testiranja tolerance in akumulacije kovin na onesnaženem substratu) smo zatehtali 0,2 g posušene prsti, dodali 2 ml raztopine  $K_2Cr_2O_7$  in v digestoriju še 1,5 ml koncentrirane  $H_2SO_4$  ter pustili stati 3 ure. Nato smo dodali bidestilirano vodo do oznake 10 ml, premešali in pustili stati čez noč.

Za fotometrično analizo smo 1 ml vzorčne raztopine razredčili z bidestilirano vodo do 25 ml in rahlo premešali. Absorpcijo smo merili pri 570 nm. Organsko snov v vzorcih prsti smo izrazili kot % prsti in se jo izračuna iz umeritvene krivulje standarda po formuli 1:

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

$S$  – organska snov vzorca (%)

2 – faktor pretvorbe

$SW$  – začetna masa posušene prsti

#### 5.2.2 Merjenje pH

Za merjenje pH vzorcev prsti smo v čaše zatehtali po 1 g posušene prsti in dolili 12,5 ml bidestilirane vode. Tako pripravljene vzorce smo pokrili s folijo, jih zatesnili z elastiko in stresali 2 uri pri 200 obratih/min. Po stresanju smo merili pH s pomočjo pH metra 28 (Radiometer Copenhagen) (McLean, 1982).

#### 5.2.3 Analiza celokupnih kovin v talnih vzorcih z XRF

Analizo celokupnih kovin v talnih vzorcih smo opravljali v XRF laboratoriju na inštitutu Jožef Stefan. Posušene talne vzorce smo zmleli in homogenizirali v mehničnem mlinu

(Fritch, Idar-Oberstein, Nemčija) z volfram/ogljikovim terilcem. S pomočjo hidravlične stiskalnice smo iz uprašenih talnih vzorcev z maso 0,5 – 1 g stisnili tabletko. Za fluorescenčno ekscitacijo smo uporabili Am-241 (750 MBq), Cd-109 (300 MBq) in Fe-55 (370 MBq) obročasti radioizotopni vir (Isotope Products Laboratories, U.S.A.) (Vogel-Mikuš s sod., 2006).

#### **5.2.4 Ocenjevanje biodostopnih koncentracij kovin v talnih vzorcih**

Biodostopne kovine v substratu smo ocenjevali z ekstrakcijo z amonijevim acetatom (Baker s sod., 1994; Vogel-Mikuš s sod., 2005) pred (preden smo na substrat posejali semena) in po poskusu (po odstranitvi odraslih rastlin iz substrata). Ekstrakcija z amonijevim acetatom je dobro merilo dostopne frakcije kovin v tleh (Ernst, 1996).

Pripravili smo 1M raztopino amonijevega acetata. Za pripravo le-tega smo zatehtali 77,08 g amonijevega acetata in ga raztopili v 1l bidestilirane vode.

##### **5.2.4.1 Priprava vzorcev prsti**

V steklene čaše smo zatehtali po 1 g posušene prsti (30°C, 1 teden). V vsako čašo smo dodali 20 ml 1M amonijevega acetata, ki smo ga z bidestilirano vodo umerili na pH 7. Čaše s prstjo in amonijevim acetatom smo pokrili s folijo, zatesnili z elastiko in stresali dve uri pri 200 obratih/min pri 23°C. Po stresanju smo vsebine iz čaš prelili v centrifugirke in jih centrifugirali pri 400 rpm 10 minut. Nato smo ekstrakte s pomočjo 5 ml brizgalk prefiltrirali v 20 ml epruvete skozi 0,44 µm filter (Milipore). Epruvete smo pred tem temeljito oprali pod tekočo vodo, jih sprali z 0,2% HNO<sub>3</sub> in še z bidestilirano vodo. 0,2% HNO<sub>3</sub> smo pripravili tako, da smo v liter bidestilirane vode (Milipore Q-185, 18,2 MΩ/cm) odpipetirali 3,1 ml 65% HNO<sub>3</sub>. Epruvete smo sušili pol ure pri 105°C. Epruvete s filtrati smo pokrili z zamaški in jih do meritev z AAS hranili v hladilniku pri 4°C.

## 5.3 ANALIZE RASTLIN

### 5.3.1 Tehtanje

Iz vseh lončkov smo pobrali rastline, jih temeljito oprali pod tekočo vodo ter ločili nadzemne dele od podzemnih. Tako poganjke kot korenine smo stehtali, da smo dobili svežo maso rastlin. Nato smo posamezne poganjke in korenine zavili v ovitke iz aluminijaste folije, jih označili in za nekaj sekund potopili v tekoči dušik. Tako pripravljene rastlinske vzorce smo sušili en teden v liofilizerju (Christ, model Alpha 2-4 z zračnim hlajenjem). Ko so bili vzorci suhi smo ponovili tehtanje, da smo dobili suho maso rastlin. Posušene rastlinske dele smo zavili nazaj v folijo in jih shranili v posodo na suh prostor.

### 5.3.2 Določanje celokupnih koncentracij kovin v rastlinah z AAS – razklop z dušikovo in perklorno kislino

Posušen rastlinski material smo s pomočjo tekočega dušika strli v terilnici v droben prah. Prah smo shranili v označene plastične lončke in jih shranili v skrinjo za nadaljnje analize.

Epruvete, ki smo jo uporabljali za razklop in za merjenje koncentracij kovin, smo temeljito oprali pod tekočo vodo, jih sprali z 0,2% HNO<sub>3</sub> in še z bidestilirano vodo. Epruvete smo sušili pol ure pri 105°C. V tako očiščene epruvete smo zatehtali po 30 mg uprašenih nadzemnih delov in po 30 mg uprašenih korenin. Na zatehtane vzorce smo odpipetirali 2 ml kislinske mešanice za razklop. Mešanico za razklop smo pripravili iz 65% HNO<sub>3</sub> in koncentrirane HClO<sub>4</sub> v razmerju 7:1 (Vogel-Mikuš s sod., 2005), tako da smo zmešali 70 ml HNO<sub>3</sub> in 10 ml HClO<sub>4</sub>. Epruvete z rastlinskimi vzorci in kislinsko mešanico smo pokrili in jih en dan hranili v digestoriju pri sobni temperaturi, da se je rastlinski material dobro prepojil z mešanico kislin. Po enem dnevu smo namočene rastlinske vzorce dobro premešali na vorteksu in jih premestili v termoblok. Termoblok je bil nameščen na grelec, s katerim smo segrevali mešanico rastlinskega materiala in kislin. Segrevali smo tako dolgo, dokler niso kisline povsem izhlapele oz. so bili vzorci povsem suhi. Razklop smo izvajali v digestoriju. Epruvete z razklopljenim materialom smo pokrili s pokrovčki in jih do meritev hranili v zatemnjenem prostoru. Tik pred merjenjem smo vzorce raztopili v 5ml

0,2% HNO<sub>3</sub>. Pred merjenjem koncentracij Cd in Zn z AAS je bilo potrebno vzorce ustrezno redčiti. Koncentracije Pb smo merili iz neredčenih vzorcev.

### **5.3.3 Analize fotosinteznih pigmentov**

V centrifugirke smo zatehtali po 30 mg uprašenih poganjkov, dolili 5 ml 80% acetona, jih premešali na vorteksu in za eno noč shranili v hladilnik. Naslednji dan smo v acetonu namočene vzorce zopet premešali na vorteksu in jih scentrifugirali. Centrifugirali smo jih 5 minut pri 2500 obratih /min. Absorpcijo smo merili na spektrofotometru pri valovnih dolžinah 664 nm, 647 nm in 653 nm. Iz izmerjenih absorpcij smo izračunali koncentracijo klorofilov.

## **5.4 STATISTIČNA ANALIZA**

Podatke smo analizirali s standardnimi statističnimi metodami. Uporabili smo MS Excel 2002 in programski komplet Statistica (Statsoft 6.0) z analizami multiple regresije in programom enosmerna ANOVA, LSD test ( $p < 0,05$ ) in unequal N HSD test.

## 6 REZULTATI

### 6.1 TESTIRANJE TOLERANCE IN AKUMULACIJE Cd

#### 6.1.1 Lastnosti substrata

Tabela 1: Lastnosti substrata (povprečje  $\pm$  se, n=2 kompozitna vzorca od 3 paralelnih vzorcev za vsako populacijo). Vrednosti predstavljajo meritve koncentracij kovin, pH in organske snovi kompozitnih vzorcev.

		Vsebnost Cd ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) v substratu			
		0	50	100	250
Izmenljive frakcije ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Cd	0,9 $\pm$ 0,0	4,4 $\pm$ 0,0	8,2 $\pm$ 0,1	14,3 $\pm$ 0,1
	pH	7,7 $\pm$ 0,1	7,6 $\pm$ 0,1	7,6 $\pm$ 0,2	7,6 $\pm$ 0,1
	Organska snov (%)	26,4 $\pm$ 0,1	22,5 $\pm$ 0,3	20,3 $\pm$ 0,2	23,6 $\pm$ 0,1

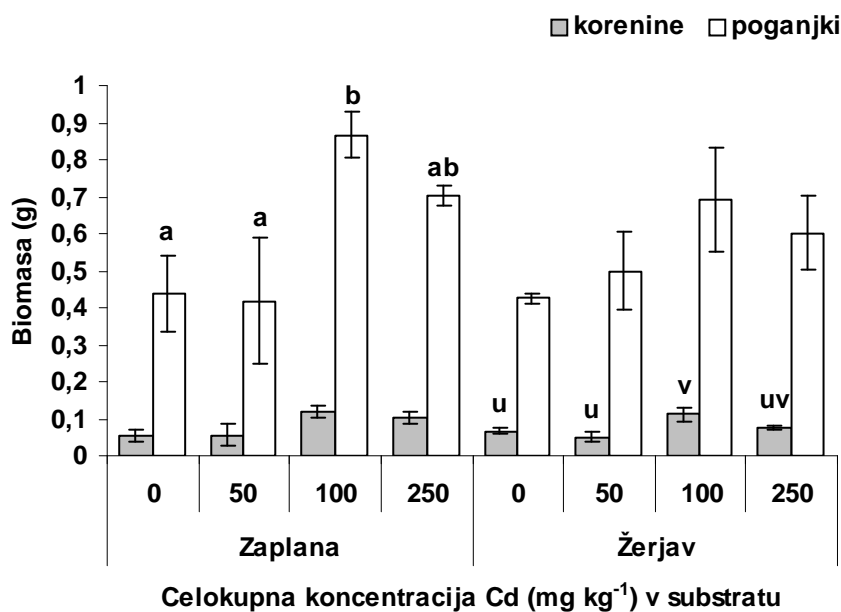
Izmenljive koncentracije Cd so predstavljale od 0,9 do 8,6% celokupnega Cd v substratu. Talni vzorci so vsebovali od 20,3 do 26,4% organske snovi. Meritve pH pa so bile rahlo nad nevtralnimi območjem (7,6 – 7,7) (tabela 1).

#### 6.1.2 Analize rastlin

##### 6.1.2.1 Biomasa rastlin

Z analizo variance in LSD testom ( $p < 0,05$ ) smo ugotovili, da med populacijama ni bilo statistično značilnih razlik v biomasi tako poganjkov kot tudi korenin. Zaplanska populacija je imela najvišjo biomaso poganjkov pri celokupni koncentraciji 100  $\text{mg Cd kg}^{-1}$ , pri koreninah pa ni bilo razlik v biomasi. Znotraj žerjavske populacije ni bilo značilnih razlik v biomasi poganjkov, najvišjo biomaso korenin pa je dosegla pri koncentraciji 100  $\text{mg Cd kg}^{-1}$  (slika 2).

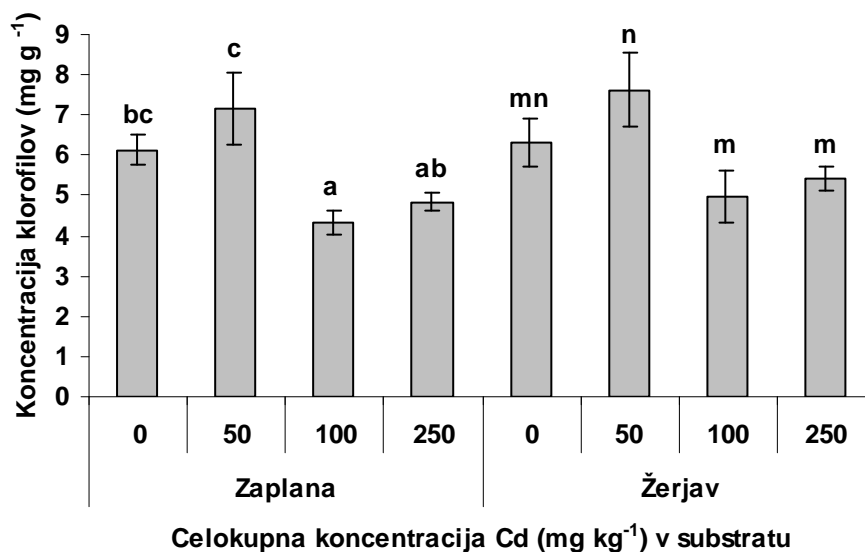




Slika 2: Biomasa poganjkov in korenin pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (povprečje ± se, n=3). Različne črke označujejo statistično značilno razliko  $p < 0,05$ .

#### 6.1.2.2 Koncentracija klorofilov

Poleg biomase nam je koncentracija klorofilov služila kot pokazateljica tolerance na onesnaženost substrata s kovinami. Populaciji se v koncentraciji klorofilov nista statistično značilno razlikovali. Pri koncentraciji 50 mg Cd kg<sup>-1</sup> v substratu lahko pri obeh populacijah opazimo povišano koncentracijo klorofilov. Pri višjih koncentracijah Cd v substratu pa so koncentracije klorofilov nekoliko upadle (slika 3).

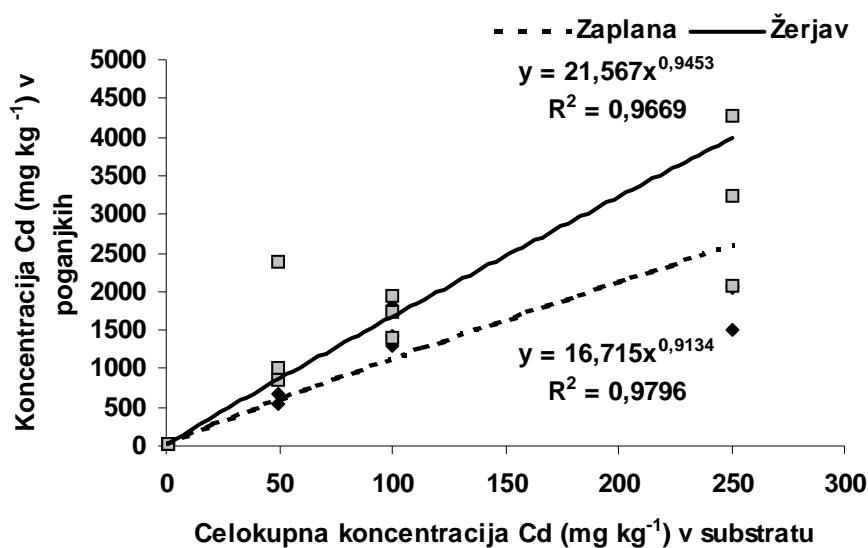


Slika 3: Koncentracija klorofilov pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (povprečje±se, n=3). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko  $p < 0,05$ .

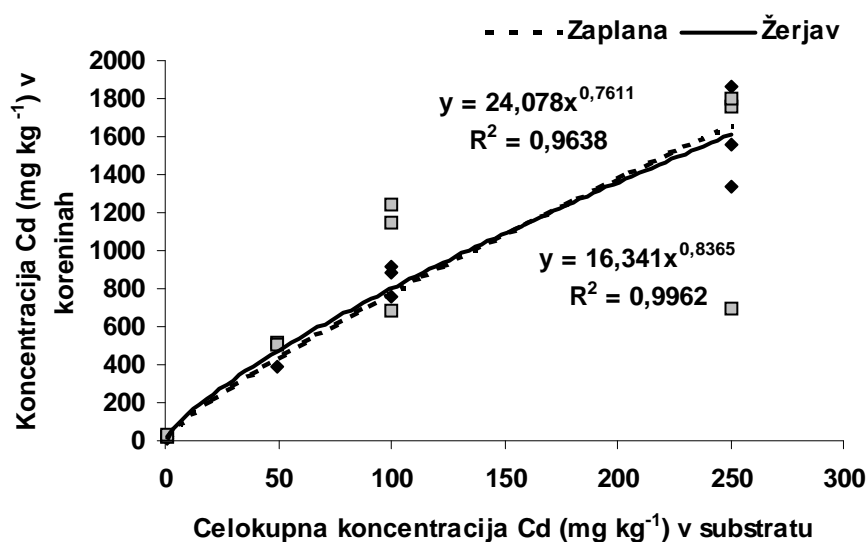
### 6.1.2.3 Privzem Cd

Koncentracije Cd v poganjkih zaplanske populacije so znašale od 14 do 2077 mg kg<sup>-1</sup>, v poganjkih žerjavske pa od 21 do 4286 mg kg<sup>-1</sup> (slika 4a). V koreninah zaplanske populacije smo namerili od 15 do 1858 mg kg<sup>-1</sup>, v koreninah žerjavske pa od 19 do 1799 mg kg<sup>-1</sup> (slika 4b). Najvišje izmerjene koncentracije Cd pri obeh populacijah so precej nad mejo določeno za hiperakumulacijo (>100 mg Cd kg<sup>-1</sup> Baker s sod., 1994; Brooks, 2000). Z analizo variance in LSD testom ( $p < 0,05$ ) smo ugotovili, da je imela žerjavska populacija v primerjavi z zaplansko populacijo statistično značilno višje koncentracije Cd v poganjkih. Pri koreninah ni bilo značilnih razlik v privzemu Cd med obema populacijama.

a)



b)

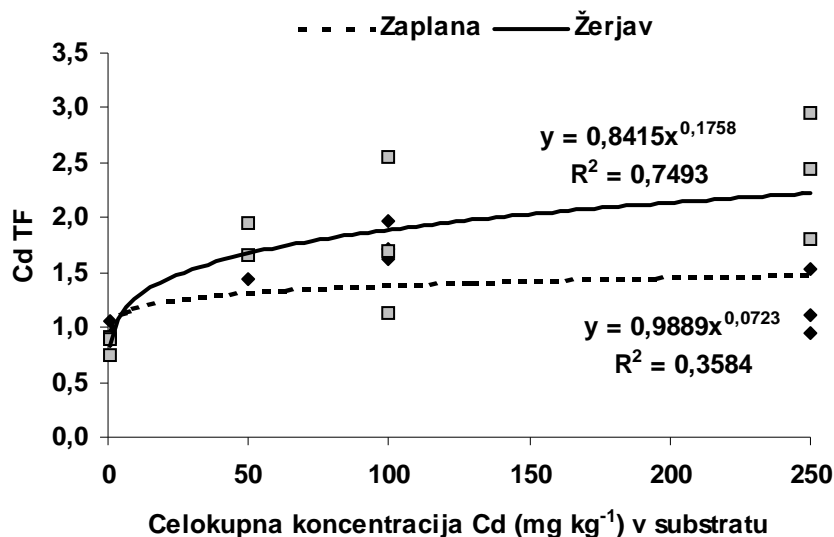


Slika 4: Koncentracija Cd v a) poganjkih in b) koreninah pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (n=12).

#### 6.1.2.4 Translokacijski faktor

Translokacijski faktor (TF) pomeni razmerje med koncentracijo določene kovine v poganjkih in koreninah. TF za Cd pri zaplanski populaciji so znašali od 0,9 do 2,0

(povprečje=1,3), pri žerjavski pa od 0,7 do 2,9 (povprečje=1,7). Žerjavska populacija je imela v primerjavi z zaplansko statistično značilno višje vrednosti TF za Cd (slika 5).



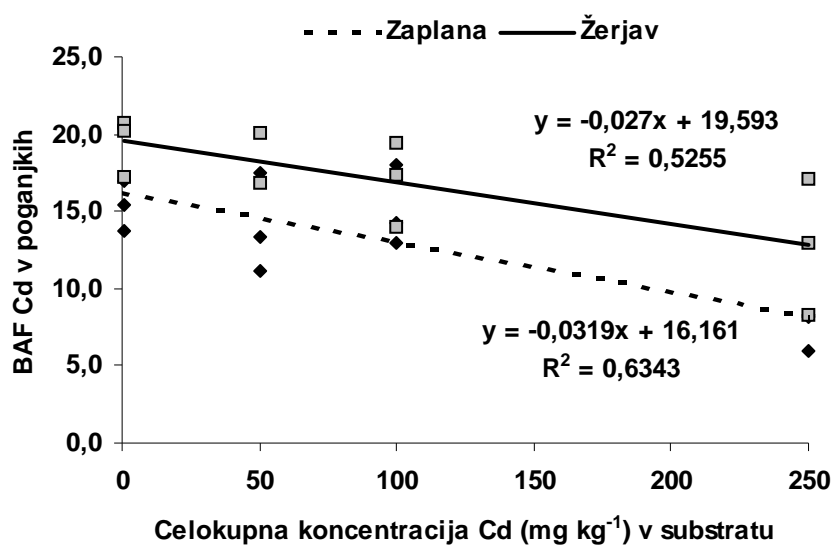
Slika 5: Translokacijski faktor (TF) za Cd pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (n=12).

#### 6.1.2.5 Bioakumulacijski faktorji

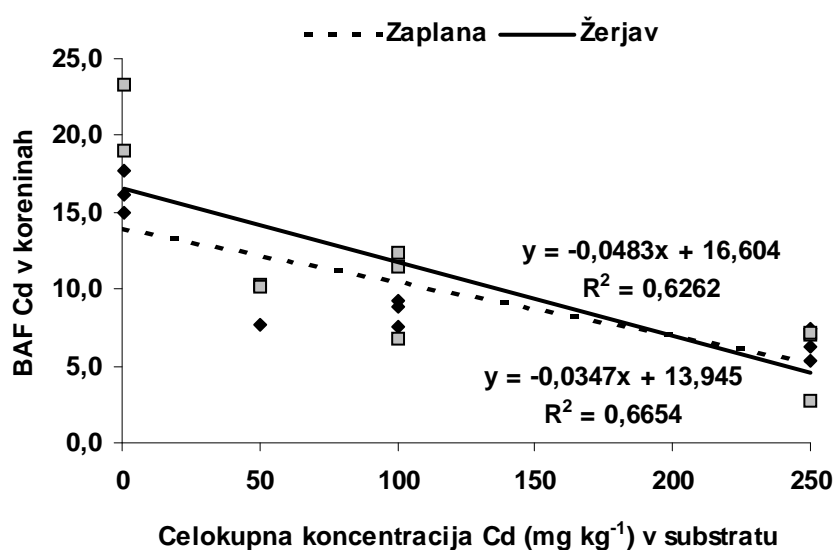
Bioakumulacijske faktorje (BAF) smo izračunali kot razmerje med koncentracijami kovin v poganjkih oz. koreninah in celokupnimi koncentracijami kovin v substratu (Baker s sod., 1994).

Koncentracije Cd v poganjkih zaplanske populacije so bile pri nižjih koncentracijah Cd v substratu do 18-krat višje od celokupnih koncentracij Cd, pri žerjavski pa do 21-krat (slika 6a). Koncentracije Cd v koreninah pa so bile pri zaplanski populaciji do 18-krat višje od celokupnih koncentracij Cd v substratu, pri žerjavski pa do 23-krat (slika 6b). Žerjavska populacija je imela v primerjavi z zaplansko statistično značilno višje vrednosti BAF Cd tako v poganjkih kot tudi v koreninah.

a)



b)



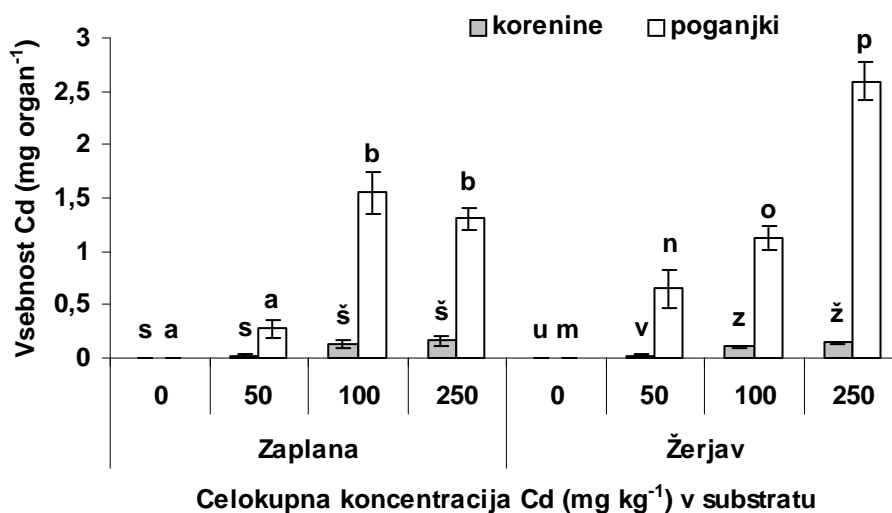
Slika 6: Bioakumuacijski faktor (BAF) a) poganjkov in b) korenin za Cd pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (n=12).

#### 6.1.2.6 Vsebnost Cd

Vsebnost določene kovine v rastlini izračunamo kot produkt biomase te rastline (g) in koncentracije kovine ( $\text{mg kg}^{-1}$ ). V tej nalogi smo določali vsebnost kovin v posameznem

poganjku oz. korenini, ki jo izračunamo kot produkt biomase poganjka oz. korenine (g) in koncentracije kovine ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) v poganjku oz. korenini.

Vsebnost Cd je v poganjkih zaplanske populacije znašala od 0 do 1,5 mg, v koreninah pa od 0 do 0,2 mg. Pri žerjavski populaciji je vsebnost Cd v poganjkih znašala od 0 do 2,6 mg, v koreninah pa od 0 do 0,1 mg (slika 7). Vsebnost Cd je pri zaplanski populaciji naraščala do koncentracije  $100 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ , medtem ko pri žerjavski populaciji je vsebnost Cd naraščala s koncentracijo Cd v substratu (velja tako za poganjke kot za korenine). Žerjavska populacija je imela v primerjavi z zaplansko populacijo statistično značilno višje vsebnosti Cd v poganjkih. Pri koreninah pa med populacijama ni bilo opaznih značilnih razlik v vsebnostih Cd.

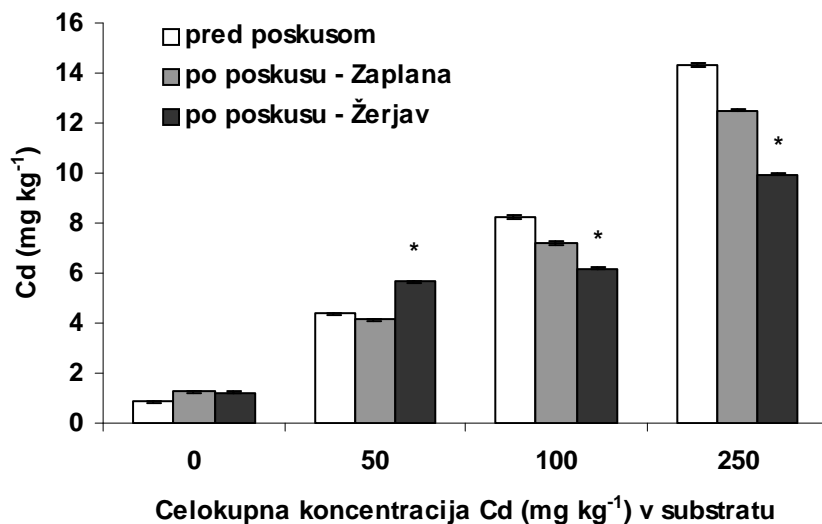


Slika 7: Vsebnost Cd v poganjkih in koreninah pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (povprečje  $\pm$  se,  $n=3$ ). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko  $p<0,05$ .

#### 6.1.2.7 Ocenjevanje fitoekstrakcijske sposobnosti z amonijevim acetatom

Frakcije biodostopnih kovin v talnih vzorcih smo ocenjevali pred in po poskusu z ekstrakcijo z amonijevim acetatom. Po odstranitvi odraslih rastlin po poskusu so bile opazne statistično značilno nižje biodostopne koncentracije Cd samo pri žerjavski populaciji (slika 8). Pri koncentraciji  $50 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  je pri žerjavski populaciji prišlo do

napake, saj bi morala biti po poskusu nižja koncentracija Cd v substratu v primerjavi s pred poskusom. Do napake je najbrž prišlo zaradi nenatančnosti pri delu.



Slika 8: Izmenljive frakcije Cd pred in po poskusu pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (povprečje ± se, n=2). Zvezdice označujejo statistično značilno razliko  $p < 0,05$ .

## 6.2 TESTIRANJE TOLERANCE IN AKUMULACIJE KOVIN (Zn, Cd, Pb) NA ONESNAŽENEM (ŽERJAVSKEM) SUBSTRATU

### 6.2.1 Lastnosti substrata

Tabela 2: Lastnosti substrata (povprečje  $\pm$  se, n=2 kompozitna vzorca od 5 paralelnih vzorcev za vsako populacijo). Vrednosti predstavljajo meritve koncentracij kovin, pH in organske snovi kompozitnih vzorcev.

		% onesnaženega substrata				
		0	25	50	75	100
Celokupna koncentracija (mg kg <sup>-1</sup> )	Zn	207 $\pm$ 115	348 $\pm$ 145	722 $\pm$ 128	961 $\pm$ 144	1440 $\pm$ 168
	Cd	2,5 $\pm$ 1,0	14,2 $\pm$ 4,4	32,9 $\pm$ 4,8	46,2 $\pm$ 5,0	61,0 $\pm$ 6,9
	Pb	112 $\pm$ 43,4	3220 $\pm$ 256	4970 $\pm$ 370	7995 $\pm$ 690	10020 $\pm$ 738
Izmenljiva frakcija (mg kg <sup>-1</sup> )	Zn	1,3 $\pm$ 0,4	10,9 $\pm$ 2,4	13,7 $\pm$ 2,8	26,9 $\pm$ 1,1	39,5 $\pm$ 3,1
	Cd	0,2 $\pm$ 0,1	5,8 $\pm$ 0,1	9,0 $\pm$ 0,6	15,0 $\pm$ 0,6	19,6 $\pm$ 1,3
	Pb	1,5 $\pm$ 0,3	852 $\pm$ 26	1199 $\pm$ 79	1751 $\pm$ 138	1762 $\pm$ 63
pH		7,0 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,2	6,8 $\pm$ 0,2	6,9 $\pm$ 0,4	7,0 $\pm$ 0,2
Organska snov (%)		3,4 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1	7,3 $\pm$ 0,3	4,4 $\pm$ 0,1	4,4 $\pm$ 0,1

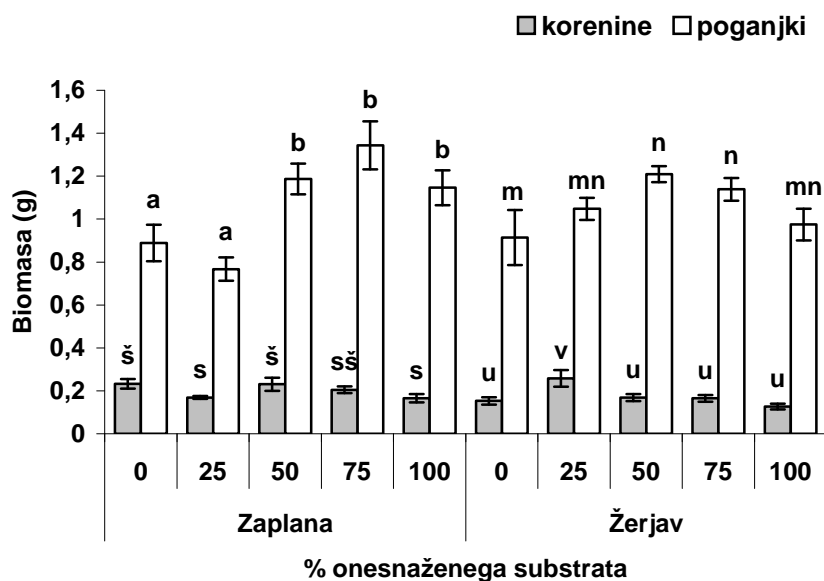
Talni vzorci so vsebovali od 207 do 1440 mg Zn kg<sup>-1</sup>, od 2 do 61 mg Cd kg<sup>-1</sup> in od 112 do 10020 mg Pb kg<sup>-1</sup>. Izmenljive koncentracije Zn, Cd in Pb ekstrahirane z amonijevim acetatom so znašale od 0,6 do 3,1% celokupnega Zn, od 8,0 do 40,8% celokupnega Cd in od 1,3 do 26,5% celokupnega Pb. V talnih vzorcih je bilo od 2,5 do 7,3% organske snovi, pH v vseh talnih vzorcih pa je bil blizu nevtralnega (6,8 - 7,0) (tabela 2).

### 6.2.2 Analize rastlin

#### 6.2.2.1 Biomasa rastlin

Analiza variance in LSD test ( $p < 0,05$ ) sta pokazala, da se populaciji v biomasi tako poganjkov kot tudi korenin nista statistično značilno razlikovali. Zaplanska populacija je imela najvišjo biomaso poganjkov pri 50%, 75% in 100% onesnaženem substratu, žerjavška pa pri 50% in 75% onesnaženem substratu. Najvišjo biomaso korenin je zaplanska populacija dosegla pri 0% in 50% onesnaženem substratu, žerjavška pa pri 25% onesnaženem substratu (slika 9).

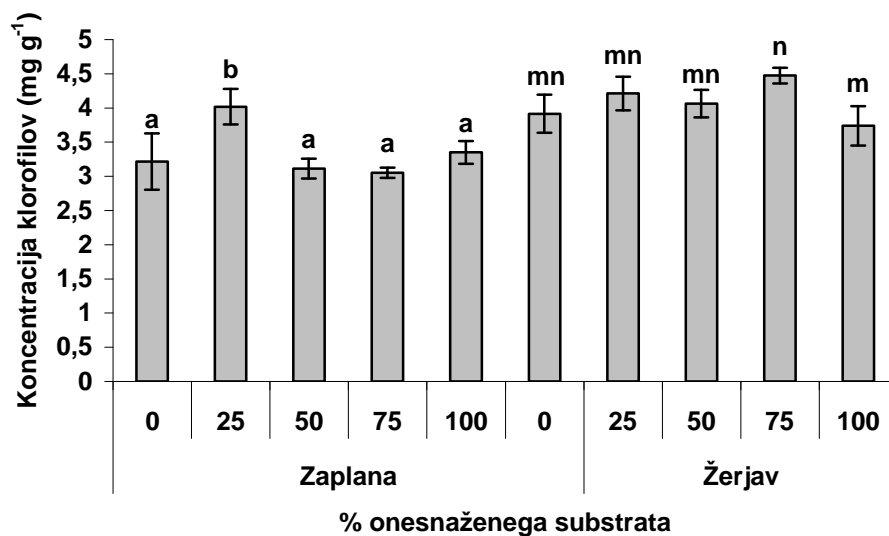




Slika 9: Biomasa poganjkov in korenin pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (povprečje ± se, n=5). Različne črke označujejo statistično značilno razliko  $p < 0,05$ .

#### 6.2.2.2 Koncentracija klorofilov

Ugotovili smo, da se populaciji v koncentraciji klorofilov bistveno ne razlikujeta in da ostajajo preko celega koncentracijskega območja onesnaženosti substrata dokaj stalne pri obeh populacijah. Žerjavska populacija je imela rahlo višje koncentracije klorofilov, toda razlike med populacijama v koncentraciji klorofilov niso bile statistično značilne. Nekoliko so izstopale koncentracije klorofilov pri 25% onesnaženem substratu pri zaplanski populaciji (slika 10).

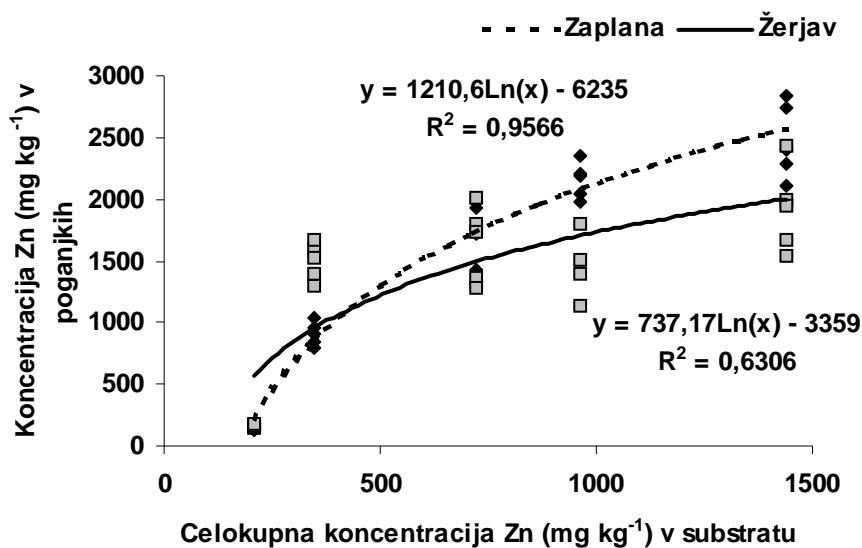


Slika 10: Koncentracija klorofilov pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (povprečje  $\pm$  se, n=5). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko  $p < 0,05$ .

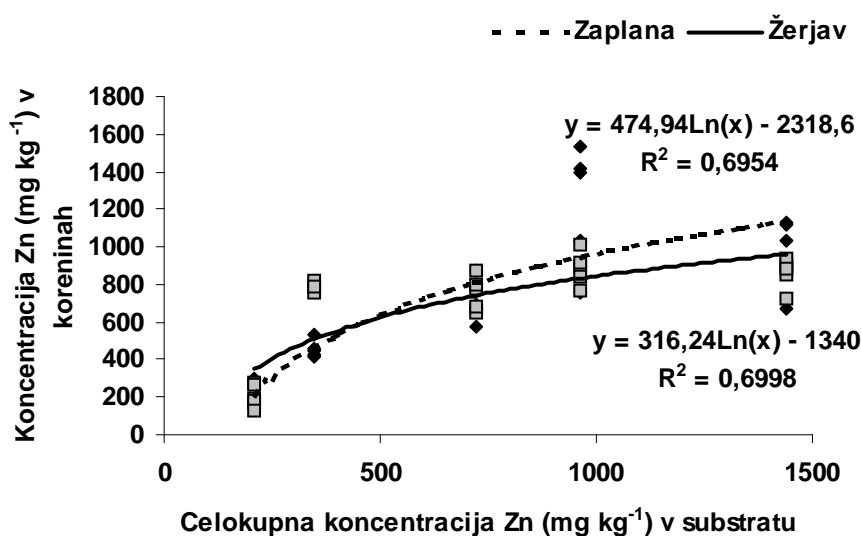
#### 6.2.2.3 Privzem Zn

Koncentracije Zn v poganjkih zaplanske populacije so znašale od 125 do 2831 mg kg<sup>-1</sup>, v poganjkih žerjavske pa od 153 do 2434 mg kg<sup>-1</sup> (slika 11a). V koreninah zaplanske populacije smo namerili od 143 do 1529 mg kg<sup>-1</sup>, v koreninah žerjavske pa od 128 do 1017 mg kg<sup>-1</sup> Zn (slika 11b). Najvišje izmerjene koncentracije Zn pri obeh populacijah so precej pod mejo določeno za hiperakumulacijo (>10000 mg Zn kg<sup>-1</sup>; Baker s sod.,1994; Brooks, 2000). Z analizo variance in LSD testom ( $p < 0,05$ ) smo ugotovili, da se populaciji statistično značilno razlikujeta v privzemu Zn v poganjke. Zaplanska populacija je imela značilno višje koncentracije Zn v poganjkih pri višjih celokupnih koncentracijah Zn v substratu. Populaciji pa se nista razlikovali v privzemu Zn v korenine.

a)



b)



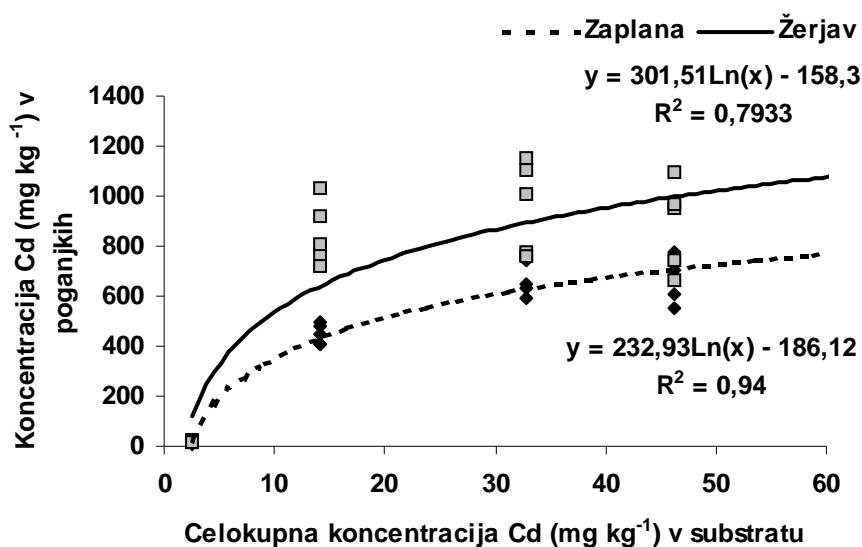
Slika 11: Koncentracija Zn v a) poganjkih in b) koreninah pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (n=25).

#### 6.2.2.4 Privzem Cd

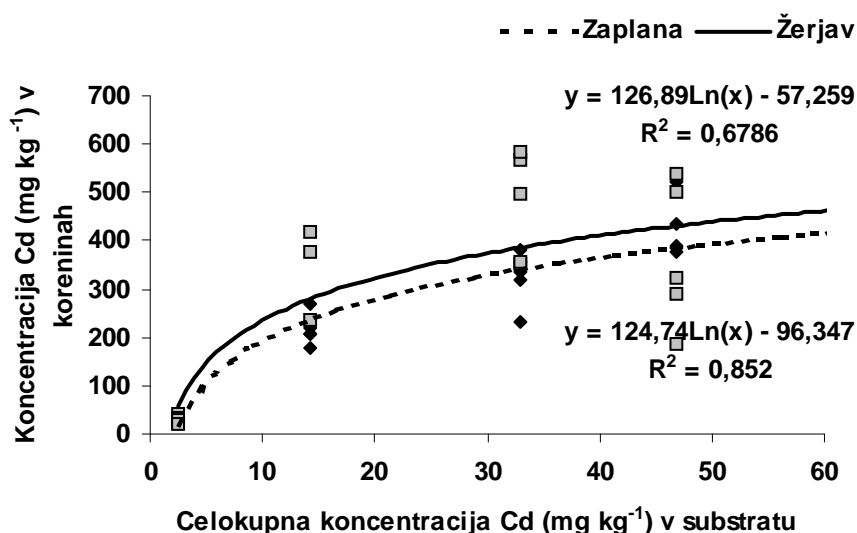
Koncentracije Cd v poganjkih zaplanske populacije so znašale od 10 do  $860 \text{ mg kg}^{-1}$ , v poganjkih žerjavske pa od 17 do  $1223 \text{ mg kg}^{-1}$  (slika 12a). V koreninah zaplanske populacije smo namerili od 21 do  $525 \text{ mg kg}^{-1}$  Cd, v koreninah žerjavske pa od 21 do 584

mg kg<sup>-1</sup> Cd (slika 12b). Najvišje izmerjene koncentracije Cd pri obeh populacijah so nad mejo določeno za hiperakumulacijo (>100 mg Cd kg<sup>-1</sup> Baker s sod.,1994; Brooks, 2000). Za razliko od zaplanske populacije je imela žerjavka populacija statistično značilno višje koncentracije Cd v poganjkih. Tudi v koreninah je imela žerjavka populacija značilno višje koncentracije Cd.

a)



b)

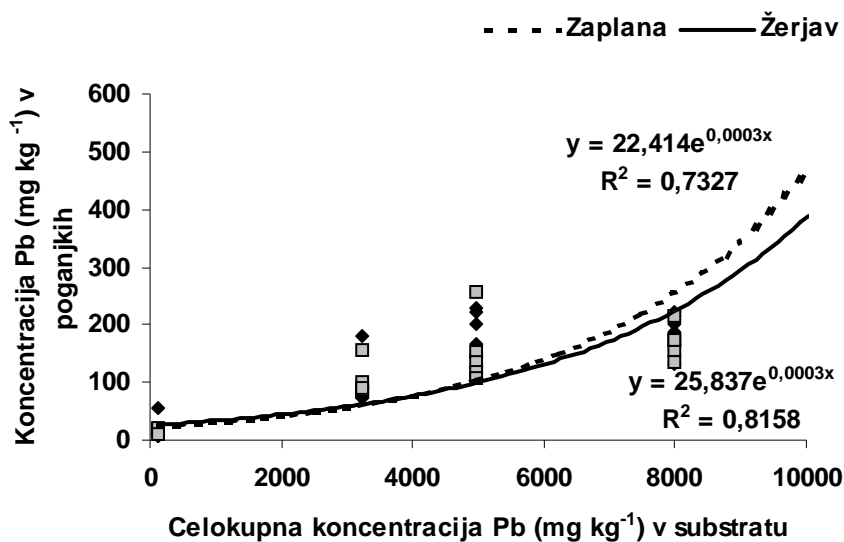


Slika 12: Koncentracija Cd v a) poganjkih in b) koreninah pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (n=25).

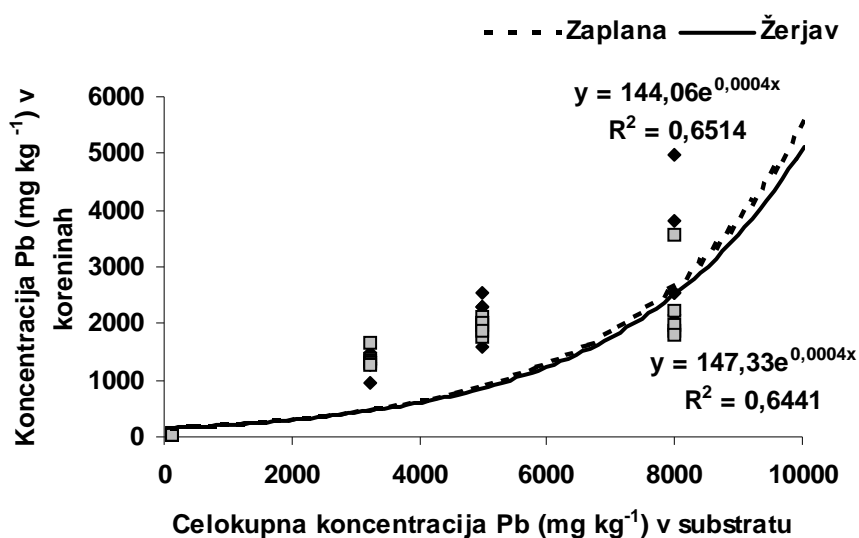
### 6.2.2.5 Privzem Pb

Koncentracije Pb so v poganjkih zaplanske populacije znašale od 5 do 420 mg kg<sup>-1</sup>, v poganjkih žerjavske pa od 10 do 550 mg kg<sup>-1</sup> (slika 13a). V koreninah zaplanske populacije smo namerili od 23 do 4963 mg kg<sup>-1</sup> Pb, v koreninah žerjavske pa od 37 do 3549 mg kg<sup>-1</sup> Pb (slika 13b). Najvišje izmerjene koncentracije Pb v poganjkih pri obeh populacijah so pod mejo določeno za hiperakumulacijo (>1000 mg Pb kg<sup>-1</sup>; Brooks, 2000). Med populacijama ni bilo statistično značilnih razlik v koncentracijah Pb tako pri poganjkih kot tudi pri koreninah.

a)



b)

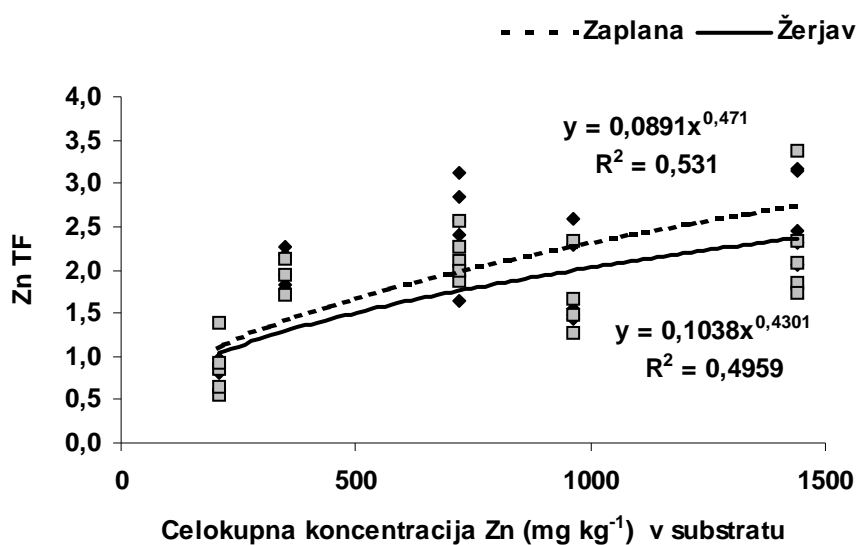


Slika 13: Koncentracija Pb v a) poganjkih in b) koreninah pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (n=25).

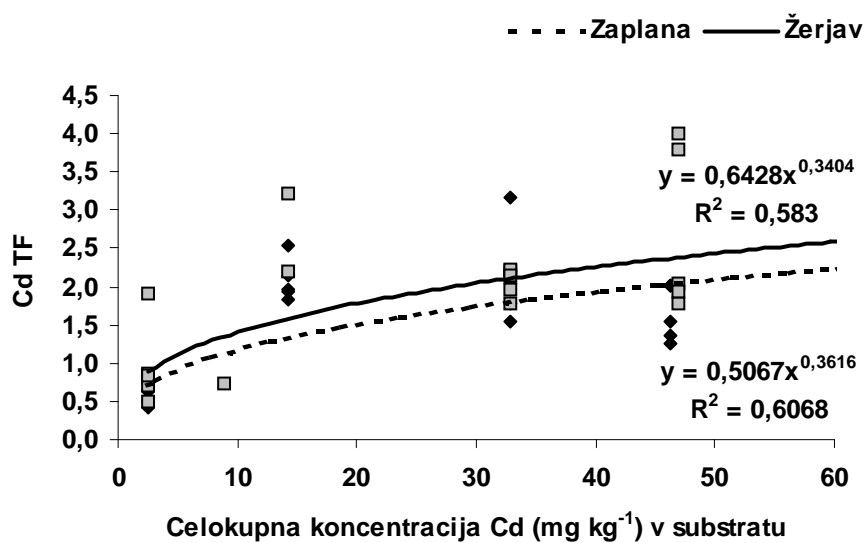
#### 6.2.2.6 Translokacijski faktorji

TF za Zn in Cd so naraščali z naraščajočimi koncentracijami Zn in Cd v substratu (slika 14a in 14b). TF za Zn so pri zaplanski populaciji znašali od 0,6 do 3,1 (povprečje=2), pri žerjavski pa od 0,6 do 3,4 (povprečje=1,8). TF za Cd so pri zaplanski populaciji znašali od 0,4 do 3,2 (povprečje=1,7), pri žerjavski pa od 0,5 do 4 (povprečje=2). TF za Pb pa so pri zaplanski populaciji znašali od 0,04 do 0,5 (povprečje=0,1), pri žerjavski pa od 0,05 do 0,5 (povprečje=0,1). Žerjavska populacija je imela v primerjavi z zaplansko populacijo statistično značilno višje vrednosti TF za Cd. Populaciji pa se nista razlikovali v TF za Zn in Pb.

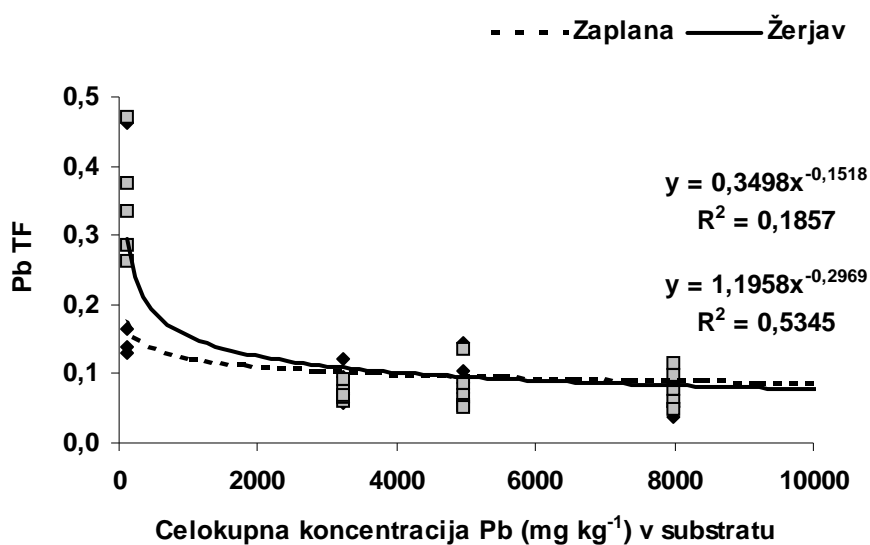
a)



b)



c)



Slika 14: Translokacijski faktor (TF) za a) Zn, b) Cd in c) Pb pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (n=25).

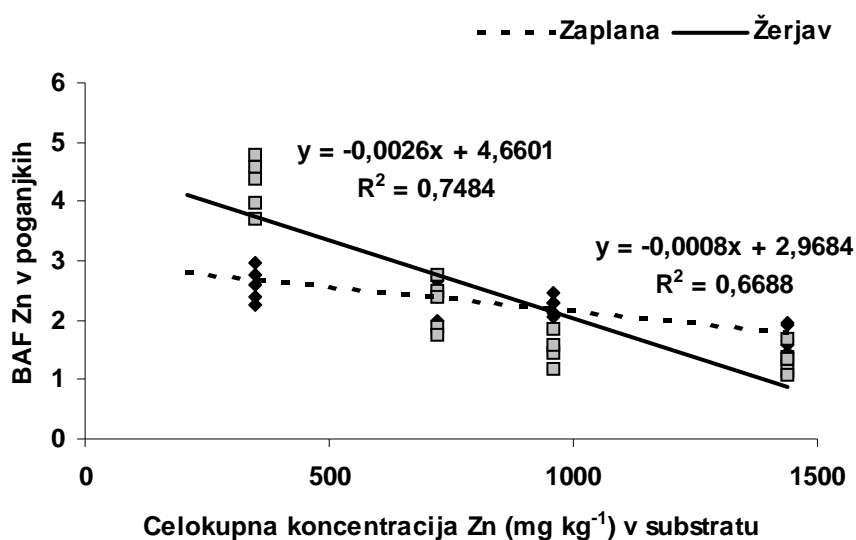
#### 6.2.2.7 Bioakumulacijski faktorji

##### BAF Zn

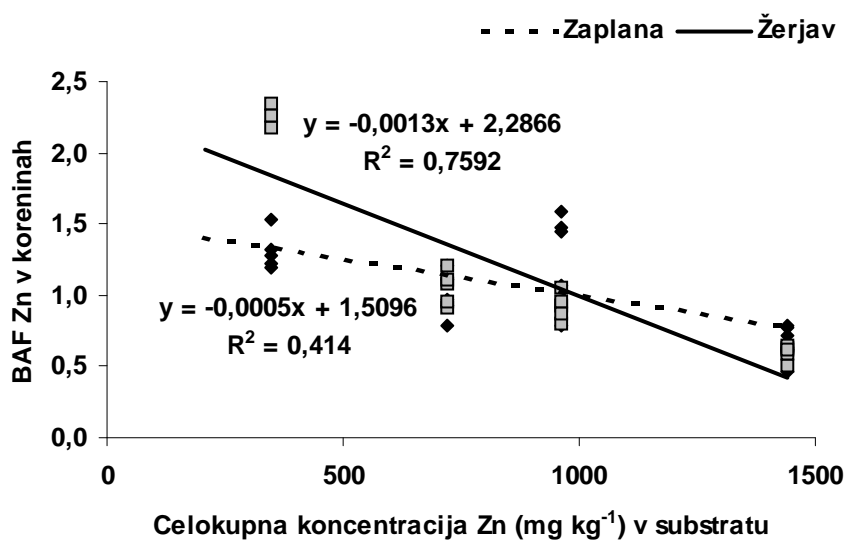
BAF Zn pri obeh populacijah so padali s koncentracijo Zn v substratu. Pri nizkih koncentracijah Zn v substratu so bile koncentracije Zn v poganjkih pri zaplanski populaciji do 3-krat višje od celokupnih koncentracij Zn v substratu, pri žerjavski pa do 4,8-krat. Pri višjih koncentracijah Zn v substratu je imela zaplanska populacija značilno višje vrednosti BAF Zn v poganjkih, žerjavaska populacija pa je imela značilno višje vrednosti BAF Zn v poganjkih pri nižjih celokupnih koncentracijah Zn v substratu (slika 15a). Koncentracije Zn v koreninah so bile pri nizkih koncentracijah Zn v substratu pri zaplanski populaciji do 1,6-krat višje od celokupnih koncentracij Zn v substratu, pri žerjavski pa do 2,3-krat. Žerjavaska populacija je imela značilno višje vrednosti BAF Zn v koreninah pri nižjih celokupnih koncentracijah Zn v substratu, pri višjih koncentracijah pa je imela zaplanska populacija značilno višje vrednosti BAF Zn (slika 15b).



a)



b)



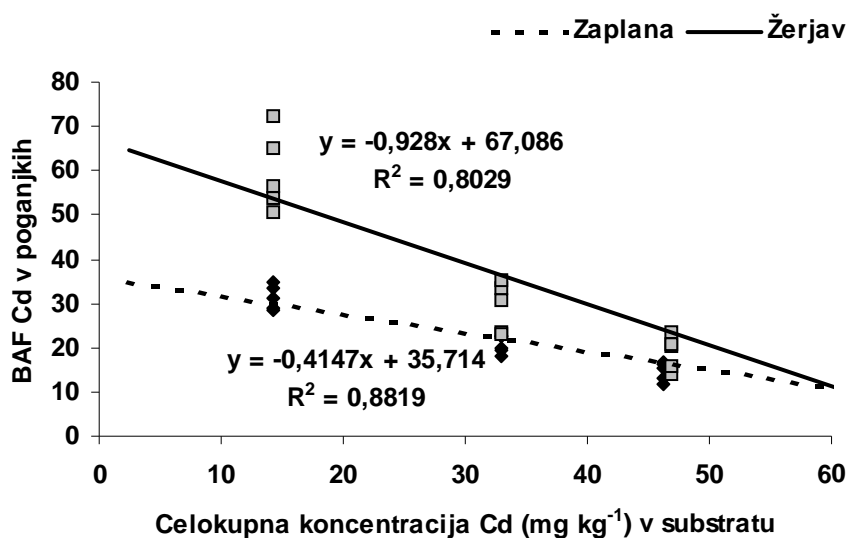
Slika 15: Bioakumuacijski faktor (BAF) a) poganjkov in b) korenin za Zn pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (n=25).

### BAF Cd

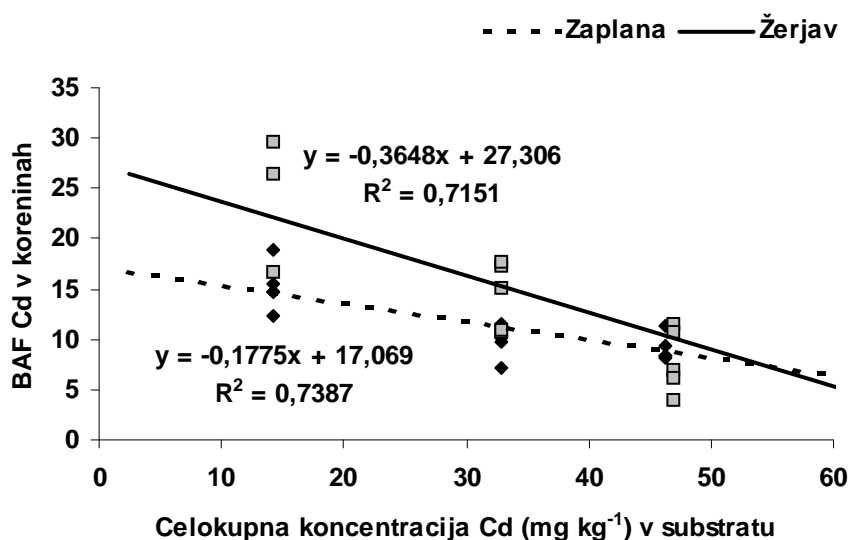
BAF Cd so upadali z naraščajočimi koncentracijami Cd v substratu. Pri nizkih koncentracijah Cd v substratu so bile koncentracije Cd v poganjkih pri zaplanski populaciji do 35-krat višje od celokupnih koncentracij Cd v substratu, pri žerjavski pa do 72-krat. Žerjavsko populacijo je imela v primerjavi z zaplansko populacijo statistično značilno višje

vrednosti BAF Cd v poganjkih (slika 16a). Pri nižjih koncentracijah Cd v substratu so bile koncentracije Cd v koreninah pri zaplanski populaciji do 19-krat višje od celokupnih koncentracij Cd v substratu, pri žerjavski pa do 29-krat. Tudi v koreninah je imela žerjavska populacija značilno višje vrednosti BAF Cd v primerjavi z zaplansko populacijo (slika 16b).

a)



b)

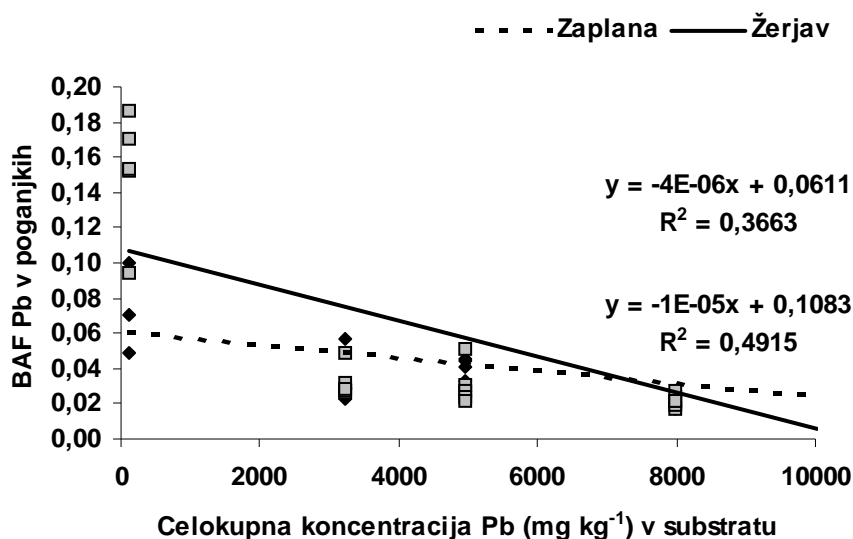


Slika 16: Bioakumuacijski faktor (BAF) a) poganjkov in b) korenin za Cd pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (n=25).

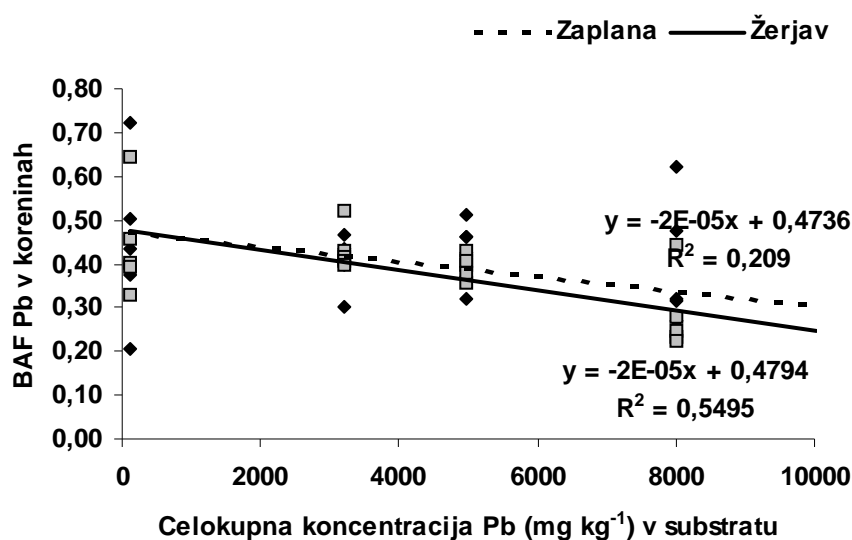
### BAF Pb

Koncentracije Pb v poganjkih so bile nižje od celokupnih koncentracij Pb v substratu z najvišjo vrednostjo 0,1 za zaplansko populacijo in 0,2 za žerjavsko populacijo (slika 17a). Tudi v koreninah so bile koncentracije Pb nižje od celokupnih koncentracij z najvišjo vrednostjo 0,7 pri zaplanski populaciji in 0,6 pri žerjavski populaciji (slika 17b). Opazna je bila statistično značilna razlika med populacijami v BAF Pb pri poganjkih. Žerjavsko populacija je imela značilno višje vrednosti BAF Pb v poganjkih, medtem ko v koreninah med populacijama ni bilo razlik v BAF Pb.

a)



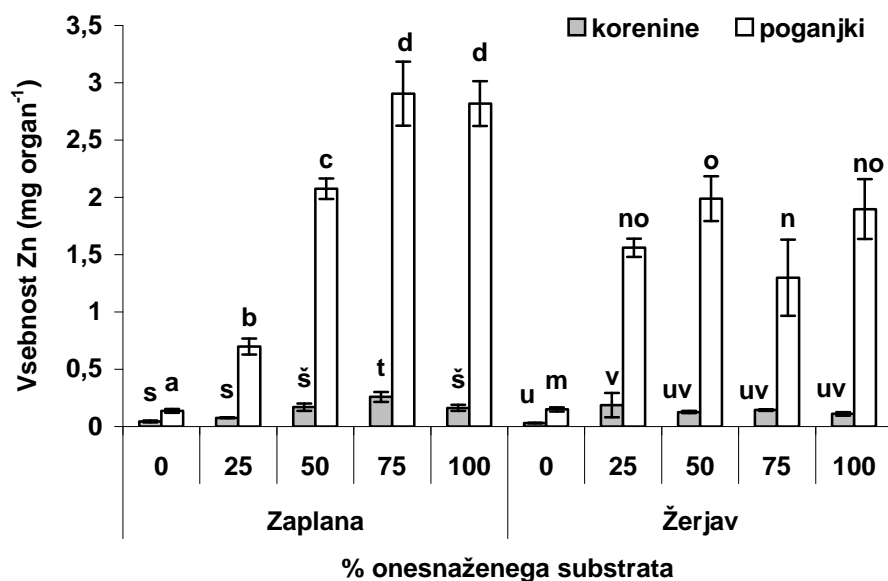
b)



Slika 17: Bioakumuacijski faktor (BAF) a) poganjkov in b) korenin za Pb pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (n=25).

#### 6.2.2.8 Vsebnost Zn

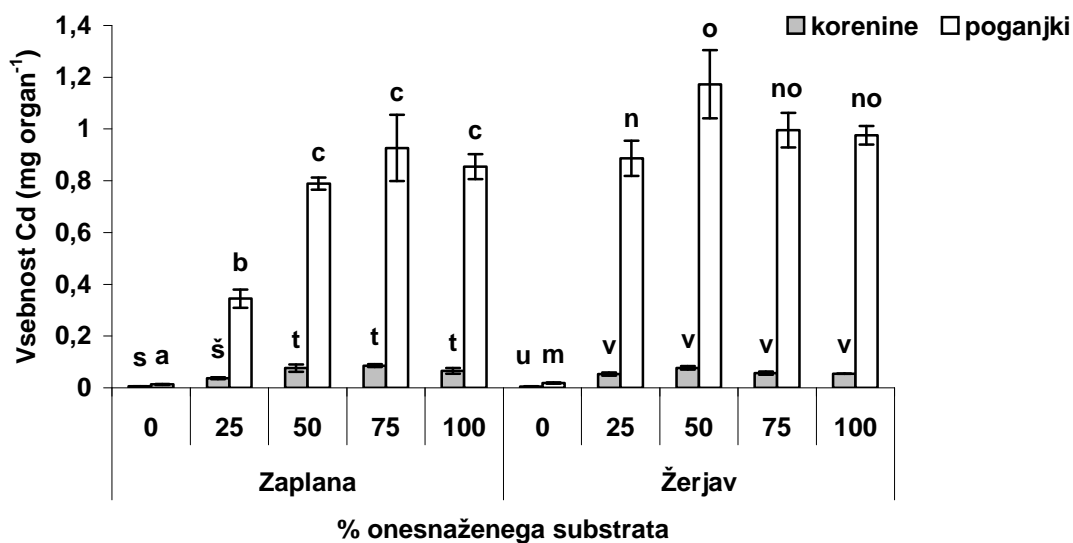
Vsebnost Zn je v poganjkih zaplanske populacije znašala od 0,1 do 2,9 mg, v koreninah pa od 0,0 do 0,2 mg. Pri žerjavski populaciji je vsebnost Zn na posamezen poganjek znašala od 0,1 do 2,0 mg, vsebnost Zn na korenino pa od 0,0 do 0,2 mg (slika 18). Zaplanska populacija je imela pri višji onesnaženosti substrata statistično značilne višje vsebnosti Zn v poganjkih. Pri koreninah pa med populacijama ni bilo opaznih značilnih razlik v vsebnostih Zn.



Slika 18: Vsebnost Zn v poganjkih in koreninah pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (povprečje  $\pm$  se, n=5). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko  $p < 0,05$ .

#### 6.2.2.9 Vsebnost Cd

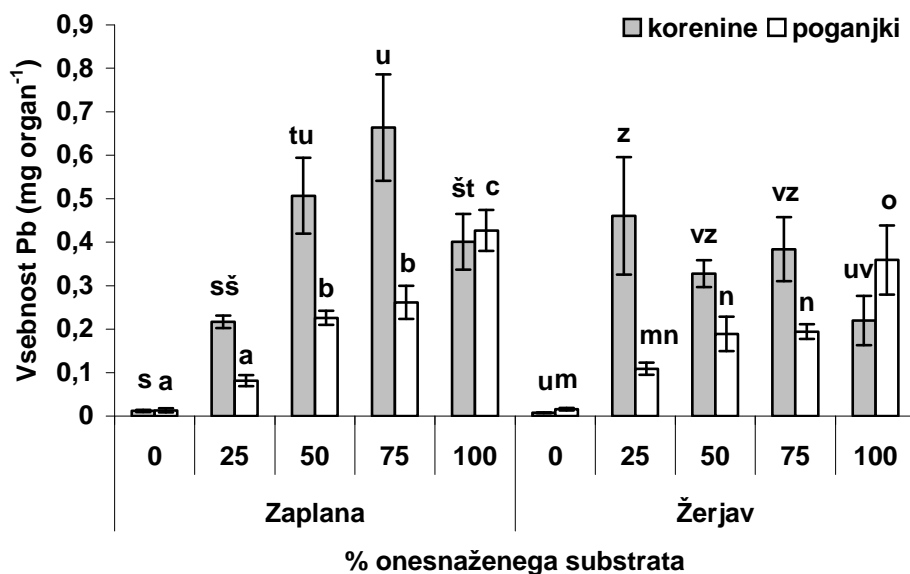
Vsebnost Cd je v poganjkih zaplanske populacije znašala od 0,0 do 0,9 mg, v koreninah pa od 0,0 do 0,1 mg. Pri žerjavski populaciji je vsebnost Cd na posamezen poganjek znašala od 0,0 do 1,2 mg, vsebnost Cd na korenino pa od 0 do 0,1 mg (slika 19). Žerjavaska populacija je imela statistično značilno višje vsebnosti Cd v poganjkih. Pri koreninah pa med populacijama ni bilo opaznih značilnih razlik v vsebnostih Cd.



Slika 19: Vsebnost Cd v poganjkih in koreninah pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (povprečje ± se, n=5). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko p<0,05.

#### 6.2.2.10 Vsebnost Pb

Vsebnost Pb je v poganjkih zaplanske populacije znašala od 0,0 do 0,4 mg, v koreninah pa od 0,0 do 0,7 mg. Pri žerjavski populacije je vsebnost Pb znašala od 0,0 do 0,4 mg na poganjek ter od 0,0 do 0,5 mg na korenino (slika 20). Med populacijama ni bilo opaznih statistično značilnih razlik v vsebnostih Pb tako pri poganjkih kot tudi pri koreninah.

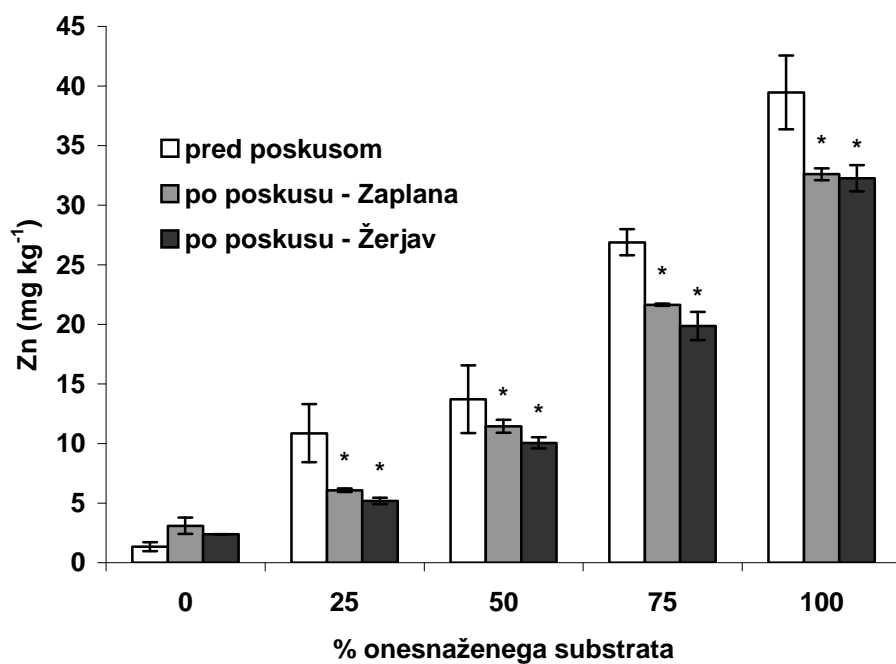


Slika 20: Vsebnost Pb v poganjkih in koreninah pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (povprečje  $\pm$  se, n=5). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko  $p < 0,05$ .

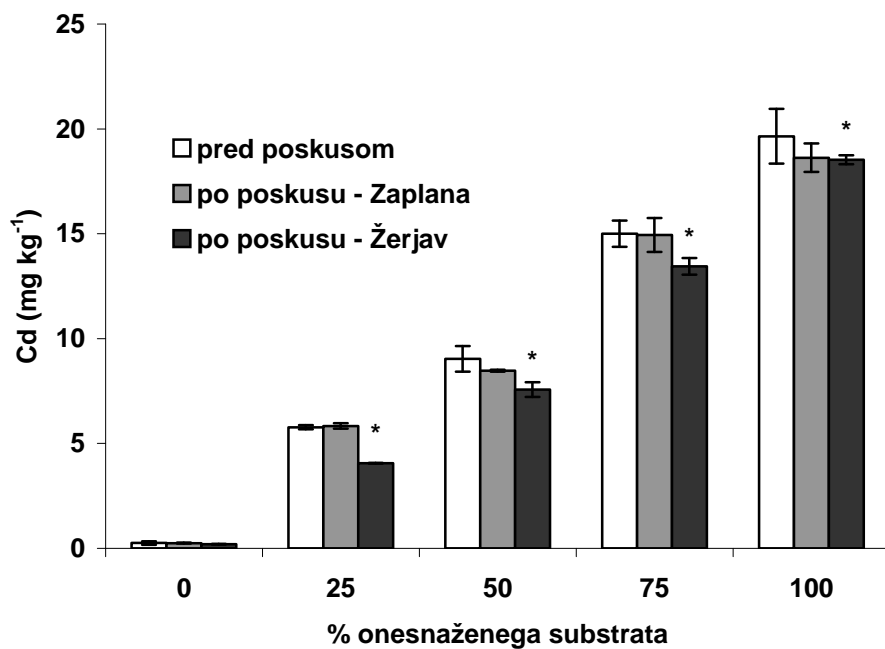
#### 6.2.2.11 Ocenjevanje fitoekstrakcijske sposobnosti z amonijevim acetatom

Po odstranitvi odraslih rastlin po poskusu so bile pri obeh populacijah v substratu opazne statistično značilno nižje biodostopne koncentracije Zn (slika 21a). Ni pa bilo opaznih značilnih razlik v znižanju biodostopne frakcije Zn v substratu po poskusu med populacijama. Pri ekstrakciji Cd pa se je izkazalo, da so bile biodostopne koncentracije Cd po poskusu statistično značilno nižje od koncentracij pred poskusom samo pri žerjavski populaciji (slika 21b). Koncentracije Pb se pred in po poskusu pri obeh populacijah niso razlikovale (slika 21c).

a)

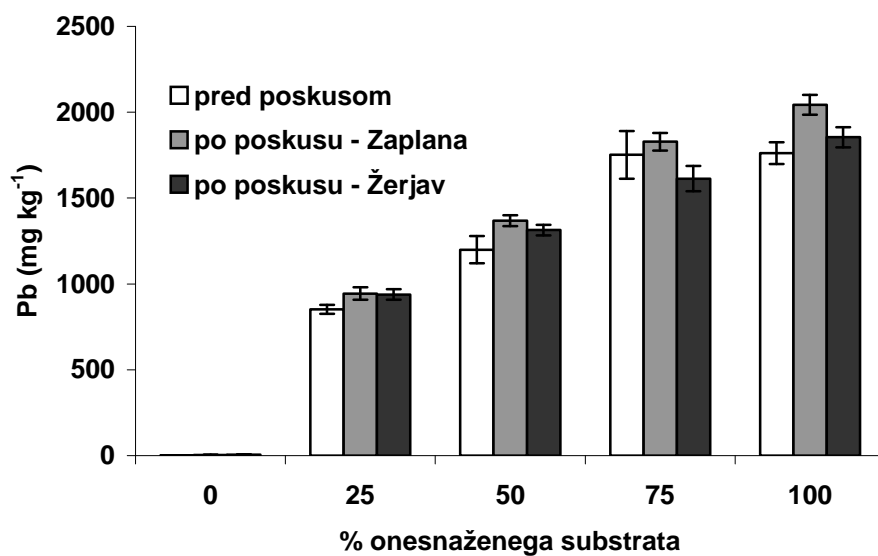


b)





c)



Slika 21: Izmenljive frakcije a) Zn, b) Cd in c) Pb pred in po poskusu pri populacijah vrste *T. praecox* z neonesnaženega (Zaplana) in onesnaženega (Žerjav) rastišča (povprečje ± se, n=2). Zvezdice označujejo statistično značilno razliko  $p < 0,05$ .

## 7 RAZPRAVA

### 7.1 TOLERANCA IN AKUMULACIJA Cd

Pri tem poskusu smo želeli testirati le privzem in toleranco rastlin na Cd. Zaradi interakcij med kovinami ob privzemu, smo poskus zastavili tako, da smo v substrat dodali le Cd.

#### 7.1.1 Toleranca na Cd

Kot pokazatelja tolerance na kovine smo vzeli biomaso in koncentracijo klorofilov. Ugotovili smo, da ni bilo značilnih razlik v biomasah poganjkov in korenin med obema populacijama. Kljub visokim koncentracijam Cd v substratu pri nobeni od populacij ni prišlo do pretiranega upada biomas. Čeprav vloga Cd za rastline še ni dokončno pojasnjena in velja za eno najbolj strupenih kovin (Adriano, 2001), se je izkazalo, da Cd ni imel posebnega vpliva na rast oz. je bila rast celo stimulirana pri višjih koncentracijah Cd v substratu (100 in 250 mg Cd kg<sup>-1</sup>). To potrjuje obstoj dobrih tolerančnih mehanizmov na Cd pri obeh populacijah. Možno je celo, da ima Cd pomembno biološko vlogo za rastline. Roosens in sod. (2003) so pri raziskavah različnih populacij vrste *T. caerulescens* pokazali stimulacijo rasti populacije iz Gangesa (južna Francija) pri povišanih koncentracijah Cd v substratu, iz česar so sklepali, da Cd igra vlogo mikronutrienta pri tej populaciji oz. je udeleženec v obrambi pred herbivori in patogeni. Vloga Cd v rastlinah je še zelo nejasna in potrebne bodo še številne raziskave, ki bodo razjasnile njegov biološki pomen.

Tudi v koncentraciji klorofilov se populaciji nista značilno razlikovali. Koncentracije klorofilov so bile pri obeh populacijah višje pri nižjih koncentracijah Cd v substratu (0 in 50 mg Cd kg<sup>-1</sup>). Pri koncentraciji 100 in 250 mg Cd kg<sup>-1</sup> pa so koncentracije klorofilov pri obeh populacijah upadle, vendar so bile še vedno primerljive s koncentracijami v kontroli. Očitno so takšne koncentracije Cd v substratu že previsoke in tako mehanizmi sekvestracije ter detoksifikacije kovin nekoliko popustijo, kar se najprej odrazi na fotosintezno aktivnih tkivih. Kljub temu pa tudi najvišje koncentracije Cd v substratu niso bile toksične za rastline, saj pri nobeni od populacij nismo opazili znakov zastrupitve (kloroze, nekroze). Vse to zopet potrjuje obstoj dobrih tolerančnih mehanizmov za Cd pri obeh populacijah.

### 7.1.2 Akumulacija Cd

Sposobnost hiperakumulacije Cd pri vrsti *T. praecox* je bila prvič odkrita s poskusi v naravi s strani Vogel-Mikuš s sod. (2005), pri katerih so izmerili visoke koncentracije Cd (do 5960 mg kg<sup>-1</sup>). Z našo nalogo pa smo želeli določiti razlike v privzemu Cd pri dveh populacijah ranega mošnjaka, katerih substrat je vseboval le Cd. Izkazalo se je, da obstajajo razlike v hiperkumulaciji Cd. Žerjavška populacija je za razliko od zaplanske populacije v višji meri akumulirala Cd v poganjke. Koncentracije Cd so naraščale skoraj linearno in niso dosegle platoja pri visokih koncentracijah Cd v substratu, tako kot je bilo to opaziti pri poskusu testiranja akumulacije večih kovin (Zn, Cd, Pb) na onesnaženem (žerjavškem) substratu. Linearna rast hiperakumulacije Cd pri tem poskusu je posledica tega, da smo imeli v substratu dodano samo eno kovino (Cd) in ni prišlo do interakcij z drugimi kovinami ob privzemu. Rastline so tako lahko neomejeno privzemale Cd tudi pri visokih koncentracijah te kovine v substratu.

### 7.1.3 Translokacijski faktor

Hiperakumulacijske rastline pogosto označujemo tudi z razmerjem koncentracij kovin poganjki/korenine (TF). Če je to razmerje >1, se kovine v manjši meri zadržujejo v koreninah in se uspešno naložijo v ksilem, po katerem se transportirajo v poganjke, kjer se sekvestrirajo v netoksični obliki (Baker, 1981). Pri obeh populacijah so TF za Cd >1 (povprečje=1,3 pri zaplanski populaciji in 1,7 pri žerjavški populaciji), kar kaže na uspešen transport Cd iz korenin v poganjke pri obeh populacijah, le da je bila žerjavška populacija bolj uspešna pri transportu Cd v poganjke.

### 7.1.4 Bioakumulacijski faktor

Bioakumulacijski faktorji (BAF) so pomembnejši za ocenjevanje potencialne vrednosti rastlin za fitoremediacijo kot pa same koncentracije kovin v poganjkih (Zhao s sod., 2003). Za rastlinsko hiperakumulacijo je značilno, da lahko koncentracije v tkivih nekajkrat presegajo koncentracije v tleh (Brooks, 2000). Višji BAF poganjkov predstavljajo boljše hiperakumulacijske sposobnosti rastlin. Znano je, da BAF upadajo z naraščajočimi talnimi

koncentracijami kovin, kar se je izkazalo tudi v naši raziskavi. Verjetno je vzrok v nasičenju privzema kovin in/ali transportnega sistema, predvsem ob visokih koncentracijah kovin v rastlini (Zhao s sod., 2003).

Koncentracije Cd v poganjkih in koreninah presegajo celokupne koncentracije Cd v substratu pri obeh populacijah. Najvišji BAF poganjkov za Cd pri zaplanski populaciji so dosegli vrednost 18, pri žerjavski pa 21. Najvišji BAF korenin pa so pri zaplanski populaciji dosegli vrednost 18, pri žerjavski pa 23. Žerjavska populacija je imela v primerjavi z zaplansko značilno višje vrednosti BAF Cd, s čimer lahko zopet potrdimo, da ima žerjavska populacija boljše hiperakumulacijske sposobnosti in s tem tudi večjo potencialno uporabnost pri fitoremediaciji s Cd onesnaženih tal.

#### **7.1.5 Vsebnost Cd**

Pogosto se pojavlja vprašanje, ali je za določitev razlik v fitoekstrakcijskih sposobnostih med populacijami bolj pomembna toleranca rastlin na kovine (ki jo lahko izrazimo z biomaso) ali hiperakumulacijska sposobnost (ki jo izrazimo kot koncentracijo kovine na enoto biomase rastlinskega tkiva) (Roosens s sod., 2003). Pomembno je oboje, zato smo celotno količino fitoekstrahiranega Cd iz substrata podali kot vsebnost Cd na rastlinski del (poganjek oz. korenino), ki je produkt biomase poganjka oz. korenine (g) in koncentracije Cd ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) v določenem poganjku oz. korenini.

Vsebnosti Cd so pri žerjavski populaciji ves čas naraščale, medtem ko so se vsebnosti pri zaplanski populaciji ustalile pri višjih koncentracija Cd v substratu. Ker imata obe populaciji zelo podobne biomase tako poganjkov kot tudi korenin, je nižja vsebnost Cd pri zaplanski populaciji posledica nižje sposobnosti akumulacije Cd. Obratno je bilo pri žerjavski populaciji. Zaradi podobnih biomas primerkov obeh populacij, biomase v našem primeru ne igrajo tako pomembne vloge za določitev fitoekstrakcijske sposobnosti. Bolj pomembno vlogo ima sposobnost hiperakumulacije Cd, pri čemer lahko trdimo, da je žerjavska populacija bolj uspešna pri fitoekstrakciji Cd, zato bi bila tudi bolj primerna za fitoremediacijo s Cd onesnaženih tal.

### **7.1.6 Ocenjevanje fitoekstrakcijske sposobnosti z amonijevim acetatom**

Z ekstrakcijo z amonijevim acetatom smo ugotovili, da je pri žerjavski populaciji prišlo do značilnega znižanja biodostopnega Cd v substratu po poskusu. S tem lahko potrdimo večjo fitoekstrakcijsko sposobnost žerjavske populacije v primerjavi z zaplansko.

## **7.2 TOLERANCA IN AKUMULACIJA KOVIN (Zn, Cd, Pb) NA ONESNAŽENEM (ŽERJAVSKEM) SUBSTRATU**

### **7.2.1 Toleranca na kovine**

Tako kot pri poskusu, kjer smo imeli v substratu dodan le Cd, se je tudi pri poskusu z večimi kovinami izkazalo, da se populaciji ne razlikujeta v biomasah tako poganjkov kot tudi korenin. Pri srednjih vrednostih onesnaženega substrata (50% in 75%) so bile pri obeh populacijah biomase najvišje. Očitno obe populaciji potrebujeta določeno vsebnost kovin za rast. Tudi na najbolj onesnaženem substratu (100%) ni bilo občutnega upada biomas, kar zopet kaže na dobro razvite mehanizme tolerance pri obeh populacijah. Prav tako so analize fotosinteznih pigmentov pokazale dokaj visoko mero tolerance pri obeh populacijah. Populaciji se namreč nista značilno razlikovali v koncentraciji klorofilov. Pri obeh populacijah se koncentracije klorofilov niso bistveno spreminjale preko celega koncentracijskega območja onesnaženosti substrata. Obe populaciji torej uspešno transportirata kovine v fotosintezno neaktivna tkiva. Opazili smo povišano koncentracijo klorofilov v rastlinah zaplanske populacije pri 25% onesnaženem substratu. Zn je esencielen rastlinski mikroelemnt in porast klorofilov pri 25% onesnaženem substratu si razlagamo s tem, da so bile tukaj zastopane najbolj optimalne koncentracije Zn. Presenečeni smo bili tudi nad tem, da zaplanska populacija ni kazala znakov zastrupitve (kloroze, nekroze,...) pri visoki onesnaženosti substrata, saj celokupne koncentracije Zn, Cd in Pb na najbolj onesnaženem substratu močno presegajo koncentracije kovin v kontroli. Vsekakor naši rezultati in opažanja kažejo na to, da je toleranca na kovine konstitutivna prednost vrste *T. praecox*.

### 7.2.2 Akumulacija in izključevanje kovin

Akumulacija in izključevanje sta dve osnovni strategiji s katerima rastlina odgovarja na povišano vsebnost kovin. Te strategije so zelo variabilne, kar smo opazili tudi v naši raziskavi. Vogel-Mikuš s sod. (2005) so pri populacijah vrste *T. praecox* z onesnaženega in neonesnaženega naravnega rastišča pokazali razlike v akumulaciji Cd, ni pa bilo razlik v akumulaciji Zn in izključevanju Pb. Rezultati našega poskusa, kjer smo populaciji gojili v kontroliranih razmerah, pa so pokazali razlike v akumulaciji Zn in Cd, prav tako pa ni bilo razlik v izključevanju Pb.

Zaplanska populacija je imela v primerjavi z žerjavsko populacijo višjo sposobnost akumulacije Zn. Višjo sposobnost akumulacije Zn pri populaciji z neosnaženih tal si razlagamo s povečano potrebo te populacije po Zn. Domnevajo, da naj bi se v procesu naravne selekcije povečala sposobnost privzema Zn pri populacijah, ki uspevajo na s Zn revnih tleh, zato da izravnajo primanjkljaj Zn v substratu (Meerts s sod., 2003). Populacija z onesnaženih tal je imela nižje koncentracije Zn v poganjkih. Sklepamo na to, da je povišana koncentracija Zn v žerjavskih tleh predstavljala selekcijski pritisk, ki pa je vodil v razvoj omejevanja privzema Zn kot odgovor na povišano koncentracijo Zn v substratu. Rezultati pri raziskavah akumulacijskih in tolerančnih sposobnosti pri vrstah *T. caerulescens* in *A. halleri* kažejo na to, da je višja toleranca na Zn pri populacijah z onesnaženih tal povezana z redukcijo akumulacije in transporta te kovine (Bert s sod., 2000). Povišan privzem Zn pri zaplanski populaciji oz. pri vseh populacijah z neonesnaženih tal je verjetno posledica stalne ekspresije visoko zmogljivih sekvestracijskih mehanizmov, ki znižujejo prekomeren dostop Zn v citoplazmo. Nižjo sposobnost akumulacije Zn pri populacijah z onesnaženih tal si lahko razlagamo tudi z obstojem dominantnega alela odgovornega za zniževanje privzema Zn. Kontrolirana križanja populacij vrste *T. caerulescens* z onesnaženih in neonesnaženih tal iz južne Francije kažejo na to, da imajo starševske populacije z onesnaženih tal dominanten alel, ki omeji hiperakumulacijo Zn na  $10000 \mu\text{g g}^{-1}$ , medtem ko imajo starševske populacije z neonesnaženih tal recesiven alel, ki je odgovoren za dvakratno oz. trikratno povečanje hiperakumulacije Zn (Frérot s sod., 2003).

Nobena od naših populacij ni dosegla meje določene za hiperakumulacijo Zn, zato nobena od njiju ne bi bila primerna za fitoremediacijo s Zn onesnaženih tal.

Za razliko od Zn pa sta obe populaciji presegle mejo določeno za hiperakumulacijo Cd. Kot je bilo omenjeno že v uvodu, je bilo narejenih manj raziskav o variabilnosti akumulacije Cd. Veliko več jih je bilo narejenih za Zn. Poleg tega pa so raziskovalci prišli tudi do nekoliko nasprotujočih si rezultatov. V našem primeru je Cd v večji meri akumulirala populacija z onesnaženih tal. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Vogel-Mikuš s sod. (2005) pri poskusih iz narave. Korelacije med hiperakumulacijo Zn in Cd kažejo na to, da si različne kovine delijo mehanizme privzema in translokacije (Baker s sod., 1994). Nižja sposobnost akumulacije Cd pri zaplanski populaciji bi lahko bila povezana z višjo sposobnostjo akumulacije Zn pri tej populaciji. Lombi s sod. (2001) je dokazal inhibitorni efekt Zn na privzem Cd pri populaciji vrste *T. caerulea* (Prayon). Zhao s sod. (2002) predlaga delno vlogo Zn transporterjev (ZNT1) za nižji privzem Cd pri populaciji iz Prayona. ZNT1 ima večjo afiniteto za  $Zn^{2+}$  ( $K_m = 7,5\mu M$ ) in nižjo afiniteto za  $Cd^{2+}$  (Zhao s sod., 2002). Zaplanska populacija ima zaradi povišane potrebe po Zn verjetno tudi povišano ekspresijo Zn transporterjev, ki imajo nižjo afiniteto za Cd, zato je privzem Cd pri populaciji z onesnaženih tal nižji v primerjavi s populacijo z onesnaženih tal. Zhao s sod. (2002) je pri primerjavi populacije vrste *T. caerulea* iz Prayona (z nizko sposobnostjo akumulacije Cd) in Gangesa (z visoko sposobnostjo akumulacije Cd) predlagal, da naj bi bil privzem Cd pri populaciji iz Prayona posredovan preko Ca kanalov ali transporterjev za Zn in Mn. V nasprotju s tem, pa naj bi obstajali visoko selektivni Cd transportni sistemi na koreninskih celicah pri tistih populacijah, ki so sposobne visokih akumulacij Cd. Tudi v našem primeru bi lahko sklepali, da je pri žerjavski populaciji razvit poseben transportni sistem za Cd in da na membranah koreninskih celic te populacije obstaja več specifičnih Cd transporterjev. Visoke koncentracije Cd v Žerjavu so posledica metalurške dejavnosti, ki je potekala le nekaj stoletij. Takoj se seveda postavi vprašanje, če se je lahko v tem času razvil poseben transportni sistem za Cd. Vsekakor naše ugotovitve in vprašanja kličejo po novih raziskavah z uporabo genetskih in molekularnih tehnik. Postavlja se tudi vprašanje, čemu bi populacije z onesnaženih tal prekomerno akumulirale Cd. Verjetno je to povezano tudi z mineralno prehrano rastlin. Raziskave so pokazale, da pomanjkanje Fe inducira prekomeren privzem Cd v rastline (Cohen s sod., 1998) in da

visoke koncentracije Cd v rastnem mediju povzročijo motnje absorpcije in/ali translokacije Fe, Mn in Zn pri nekaterih sadežih (Moral s sod., 1994). Genetske raziskave kažejo na to, da je IRT1 (član ZIP družine genov) poglavitni visoko afinitetni sistem privzema Fe v koreninah pri vrsti *A. thaliana* in da verjetno igra pomembno vlogo tudi pri transportu Zn ter da hkrati povišana ekspresija teh transporterjev vodi v povečan privzem Cd v pogojih pomanjkanja Fe (Vert s sod., 2002). Znano je, da Fe tekmuje s težkimi kovinami za občutljiva metabolna mesta v listih. Verjetno so populacije z onesnaženih tal razvile to sposobnost, da privzamejo velike količine Cd, ga transportirajo v metabolno neaktivna tkiva oz. ga razstrupijo, zato da postanejo ostali esencialni elementi bolj dostopni rastlini. Steffens (1990) je dokazal, da ima Cd močnejši vpliv na sintezo fitohelatinov (PC) kot pa npr. Cu. PC imajo to funkcijo, da se vežejo na Cd, ga razstrupijo in s tem preprečijo, da bi Cd zasedel pomembne SH- skupine vitalnih encimov in proteinov. Vendar je po novejših raziskavah znano, da PC ne igrajo vloge niti pri hiperakumulaciji niti pri toleranci, ampak drugi mehanizmi. PC naj ne bi bili udeleženi v mehanizmih detoksifikacije Cd pri rastlinah, ki imajo povečano toleranco na Cd (Schat s sod., 2002). Pri populaciji vrste *T. caerulescens* iz področja Ganges z visoko sposobnostjo akumulacije Cd in toleranco na Cd se je izkazalo, da PC ne sodelujejo pri toleranci, ampak so pri tem udeleženi cistein in drugi nizkomolekularni tioli (Hernández-Allica s sod., 2006).

Po analizah privzema Pb lahko pri obeh populacijah potrdimo izključevanje kot tolerančno strategijo na povišano koncentracijo Pb v tleh.

### 7.2.3 Translokacijski faktorji

Pri obeh populacijah so  $TF > 1$  za Zn (povprečje=2 pri zaplanski populaciji in 1,8 pri žerjavski populaciji) in Cd (povprečje=1,7 pri zaplanski populaciji in 2 pri žerjavski populaciji), kar kaže na uspešen transport kovin iz korenin v poganjke na račun učinkovitega Zn in/oz. Cd transportnega sistema, ki je verjetno zelo podoben transportnemu sistemu vrste *T. caerulescens* (Lasat s sod., 2000; Lombi s sod., 2000; Zhao s sod., 2002). Vsekakor je glede na naše rezultate žerjavska populacija bolj uspešna pri transportu Cd iz korenin v poganjke. Ni pa bilo opaznih značilnih razlik v transportu Zn in Pb med obema populacijama. Pri obeh populacijah je večina Pb ostala vezanega v



koreninah, saj so  $TF < 1$  tako pri zaplanski kot tudi pri žerjavski populaciji (povprečje=0,1 pri obeh populacijah). To kaže na obstoj učinkovite bariere, ki preprečuje prenos Pb iz korenin v poganjke in/oz. na odsotnost transportnega sistema za prenos Pb iz korenin v poganjke (Vogel-Mikuš s sod., 2005).

#### 7.2.4 Bioakumulacijski faktorji

V našem primeru so koncentracije Zn pri obeh populacijah presegale celokupne koncentracije Zn v substratu tako v poganjkih kot v koreninah. Maksimalni BAF za Zn je v poganjkih pri zaplanski populaciji dosegel vrednost 3, pri žerjavski pa 4,8. V koreninah so bile vrednosti BAF nižje (do 1,6 pri zaplanski populaciji in do 2,3 pri žerjavski populaciji). Vrednosti BAF za Zn so bile pri zaplanski populaciji višje pri večjih celokupnih koncentracijah Zn v substratu, žerjavska populacija pa je imela višje vrednosti BAF za Zn pri nižjih koncentracijah Zn v substratu. Take vrednosti BAF so verjetno posledica tega, da je bila žerjavska populacija pri visokih koncentracijah Zn v substratu sposobna blokirati visoko afinitetne sisteme privzema in transporta Zn. Vrednosti BAF za Zn so precej nižje v primerjavi z BAF za Zn, ki so jih dobili Vogel-Mikuš s sod. (2005) (do 20) pri *T. praecox* in Zhao s sod. (2003) (do 40) pri *T. caerulescens*. Glede na naše izračune ne bi bila nobena od populacij primerna za fitoremediacijo s Zn onesnaženih območij.

Koncentracije Cd so v poganjkih zaplanske populacije presegale celokupne koncentracije Cd v substratu do 35-krat, pri žerjavski pa do 72-krat. Naši rezultati se ujemajo z rezultati Vogel-Mikuš s sod. (2005), kjer so BAF za Cd pri populaciji vrste *T. praecox* z onesnaženega področja dosegli vrednost 75. Podobne vrednosti so dobili tudi Zhao s sod. (2003) pri populaciji vrste *T. caerulescens* iz južne Francije (Ganges). Vrednosti BAF za Cd v koreninah so bili nekoliko nižje (do 19 pri zaplanski populaciji in do 29 pri žerjavski populaciji). Žerjavska populacija je imela značilno višje vrednosti BAF za Cd tako v poganjkih kot tudi v koreninah in bi bila v primerjavi z zaplansko populacijo bolj primerna za fitoremediacijo s Cd onesnaženih območij.

Koncentracije Pb so bile tako v poganjkih (do 0,1-krat pri zaplanski populaciji in do 0,2-krat pri žerjavski populaciji) kot tudi v koreninah (do 0,7-krat pri zaplanski populaciji in do

0,6-krat pri žerjavski populaciji) nižje od celokupnih koncentracij Pb v substratu. BAF za Pb (<1) pri obeh populacijah vrste *T. praecox* so podobni BAF za Pb pri britanskih populacijah vrste *T. caerulescens*, kar kaže na zelo nizko stopnjo izkoriščanja Pb iz tal (Baker s sod., 1994). Razlog za to je med drugim tudi v tem, da je Pb v primerjavi s Zn in Cd zelo nemobilen element in je zato pogosto rastlinam nedostopen (Adriano, 2001). Prav tako ima Pb tudi visoko afiniteto do organske snovi (Martinez in Motto, 2000), kar je dodatni razlog za slabši privzem Pb v rastline. Po naših rezultatih je imela žerjavska populacija značilno višje vrednosti BAF Pb v poganjkih, kar kaže na to, da ima žerjavska populacija nekoliko višjo sposobnost izkoriščanja Pb iz tal.

### 7.2.5 Vsebnost Zn, Cd in Pb

Tudi pri poskusu testiranja tolerance in akumulacije kovin (Zn, Cd in Pb) na onesnaženem (žerjavskem) substratu smo ugotovili, da se populaciji v biomasi poganjkov in korenin ne razlikujeta. Iz tega razloga je za ugotavljanje razlik v vsebnostih kovin med populacijama pomembna predvsem razlika v sposobnosti akumulacije kovin. Zaplanska populacija je imela v primerjavi z žerjavsko višjo sposobnost akumulacije Zn v poganjke in posledično tudi višje vsebnosti Zn v poganjkih. Zaplanska populacija je torej nekoliko boljša v fitoekstrakciji Zn. Žerjavska populacija pa je imela višje vsebnosti Cd v poganjkih, iz česar lahko tudi sklepamo na večjo fitoekstrakcijsko sposobnost za Cd pri žerjavski populaciji in s tem tudi na večjo uporabnost te populacije pri fitoremediaciji s Cd onesnaženih tal.

Pri poskusu, kjer smo imeli v substratu dodan le Cd, je vsebnost Cd v poganjkih žerjavske populacije naraščala s koncentracijo Cd v substratu. Pri poskusu z večimi kovinami onesnaženem substratu pa je vsebnost Cd nehala naraščati pri 50% onesnaženem substratu. Razlog za prenehanje rasti vsebnosti Cd je v tem, da je ob privzemu Cd prišlo do interakcij z drugimi kovinami, ki so bile prisotne v substratu. Nekatere raziskave kažejo na to, da si Zn in Cd delita določen del transportnih mehanizmov. Ker je bil pri tem poskusu substrat onesnažen z večimi kovinami, je verjetno prišlo do tekmovanja za vezavna mesta na transportnih sistemih in posledično je prej prišlo do nasičenja transportnih sistemov z drugimi kovinami.

Ugotovili smo, da se populaciji v vsebnostih Pb ne razlikujeta in da je večina Pb pri obeh populacijah ostala vezanega v koreninah, kar smo potrdili tudi s TF.

### **7.2.6 Ocenjevanje fitoekstrakcijske sposobnosti z amonijevim acetatom**

Pri obeh populacijah je prišlo do značilnega znižanja biodostopne frakcije Zn ocenjene z amonijevim acetatom po poskusu. Glede na to, da je imela zaplanska populacija v primerjavi z žerjavsko populacijo višjo sposobnost akumulacije Zn v poganjke in posledično tudi višje vsebnosti Zn na posamezen poganjek, bi pričakovali, da bo frakcija biodostopnega Zn po poskusu pri zaplanski populaciji nižja od biodostopne frakcije Zn po poskusu pri žerjavski populaciji. Ker smo izmerili višje koncentracije akumuliranega Zn v poganjkih pri zaplanski populaciji ter iz tega izračunali tudi višje vsebnosti Zn, bi pričakovali večjo ekstrakcijsko moč te populacije, katere najboljši pokazatelj naj bi bil amonijev acetat. Po raziskavi Vogel-Mikuš s sod. (2005) ekstrakcija biodostopnih kovin z amonijevim acetatom predstavlja samo 3% in 7% celokupnega privzema Cd/Zn v poganjke vrste *T. praecox*, kar kaže na to, da lahko rastline privzemajo kovine tudi iz nedostopnih frakcij kovin v substratu. Iz tega lahko sklepamo, da ekstrakcija biodostopnih kovin iz tal z amonijevim acetatom ni vedno najboljši pokazatelj fitoekstrakcije. Da bi dobili boljšo oceno fitoekstrakcijske sposobnosti Zn pri obeh populacijah, bi bilo potrebno izmeriti še celokupne koncentracije kovin v substratu po poskusu.

Žerjavsko populacija ima višjo sposobnost fitoekstrakcije Cd iz substrata, saj je v relativno kratkem času prišlo do statistično značilnega znižanja biodostopne frakcije Cd ocenjene z ekstrakcijo z amonijevim acetatom po poskusu v primerjavi z biodostopno frakcijo Cd pred poskusom.

## 8 SKLEPI

- Obe populaciji vrste *T. praecox* imata podobno toleranco na kovine (Cd, Zn, Pb), saj med njima ni bilo razlik v biomasah in v koncentracijah klorofilov.
- Pri obeh populacijah smo potrdili hiperakumulacijo Cd, saj smo v poganjkih izmerili več kot 100 mg Cd kg<sup>-1</sup> SM.
- Koncentracije Zn v poganjkih pri nobeni od populacij niso dosegle meje določene za hiperakumulacijo.
- Zaplanska populacija je imela višjo sposobnost akumulacije Zn v poganjke pri višjih koncentracijah Zn v substratu.
- Žerjavski populacija pa je imela višjo sposobnost hiperakumulacije Cd v poganjke.
- Obe populaciji sta izključevali Pb.
- Višje vrednosti TF in BAF za Cd ter večja fitoekstrakcijska sposobnost ocenjena z amonijevim acetatom pri žerjavski populaciji kažejo na večjo uporabnost te populacije za fitoekstrakcijo / fitoremediacijo s Cd onesnaženih tal.
- Nobena od preučevanih populacij ne bi bila primerna za fitoremediacijo s Zn in Pb onesnaženih tal.

## 9 POVZETEK

Izbor najbolj primernih rastlin za čiščenje s kovinami onesnaženih območij predstavlja precej trd oreh za raziskovalce. Potekajo številne raziskave o variabilnostih v sposobnosti akumulacije kovin ter o toleranci na kovine. Uspešnost na tem področju bo botrovala k večjemu znanju o genetski podlagi akumulacije kovin, kar bi v precejšnji meri pripomoglo k večji uporabi hiperakumulacijskih rastlin v praksi. Tudi z našo diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti, kako se različne populacije znotraj iste vrste razlikujejo v privzemu in v toleranci na kovine.

Z različnimi koncentracijami s kovinami onesnaženega substrata smo preučevali razlike v privzemu Zn, Cd in Pb pri populacijah vrste *T. praecox* Wulf. z onesnaženega in neonesnaženega rastišča. Določali smo tudi razlike v toleranci na kovine.

Celokupne koncentracije kovin v talnih vzorcih smo merili z XRF, izmenljive koncentracije kovin pa smo ocenjevali z ekstrakcijo z amonijevim acetatom. V talnih vzorcih smo določili tudi vsebnost organske snovi ter pH. Rastlinske vzorce smo stehali, koncentracije kovin v poganjkih in koreninah pa smo določali po razklopu z mešanico HNO<sub>3</sub> in HClO<sub>4</sub>. Določali smo tudi koncentracije klorofilov.

Z biomasami in s koncentracijami klorofilov smo pokazali, da med populacijama ni razlik v toleranci na kovine. Ugotovili smo, da nobena od populacij ni dosegla meja določenih za hiperakumulacijo Zn in Pb v poganjkih, obe populaciji pa sta hiperakumulirali Cd. Zaplanska populacija je akumulirala več Zn v poganjke pri višjih koncentracijah Zn v substratu, žerjavska populacija pa je akumulirala več Cd v poganjke. Obe populaciji sta izključevali Pb. Prav tako sta obe populaciji uspešno transportirali Zn in Cd v poganjke (TF>1), večina Pb pa je ostala vezanega v koreninah (TF<1). Žerjavska populacija je bila bolj uspešna pri transportu Cd v poganjke, medtem ko pri transportu Zn in Pb med populacijama ni bilo razlik. Koncentracije Zn in Cd so pri obeh populacijah presegle koncentracije kovin v substratu (BAF>1), medtem ko so bile koncentracije Pb nižje v rastlinskih delih kakor pa v substratu (BAF<1). BAF Cd v poganjkih in koreninah so bili

pri žerjavski populaciji višji v primerjavi z zaplansko populacijo, kar nakazuje na boljšo uporabnost žerjavske populacije za fitoremediacijo s Cd onesnaženih tal. BAF so pri obeh populacijah padali s povečano koncentracijo kovin v substratu. Zaplanska populacija je imela višjo vsebnost Zn v poganjkih, iz česar lahko sklepamo, da je ta populacija bolj uspešna pri fitoekstrakciji Zn. Vendar pa z ocenjevanjem fitoekstrakcijske sposobnosti z amonijevim acetatom tega nismo mogli potrditi, saj je bilo znižanje biodostopne frakcije Zn po poskusu pri obeh populacijah podobno. Žerjavski populaciji je imela višjo vsebnost Cd v poganjkih, kar sovpada z oceno fitoekstrakcijske sposobnosti z amonijevim acetatom, s katero smo dokazali večjo moč žerjavske populacije pri fitoekstrakciji Cd iz substrata.

## 10 LITERATURA

- Adriano D.C. 2001. Trace Elements in Terrestrial Environments – Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals. Springer Verlag, Berlin: 10-11, 264-313, 349-410, 626-675
- Antonovics J., Bradshaw A.D., Turner R.G. 1971. Heavy metal tolerance in plants. *Advances in Ecological Research* 7: 1-85
- Assunção A.G.L., Schat H., Aarts, M.G. 2003. *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* 159: 351-360
- Assunção A.G.L., Ten Bookum W.M., Nelissen H.J.M., Vooijs R. Schat H., Ernst W.H.O. 2003. Differential metal-specific tolerance and accumulation patterns among *Thlaspi caerulescens* populations originating from different soil types. *New Phytologist* 159: 411-419
- Baker A.J.M. 1981. Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* 3: 643-654
- Baker A.J.M., Brooks R.R. 1989. Terrestrial higher plants which accumulate metallic elements a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1: 81-126
- Baker A.J.M., Proctor J. 1990. The influence of cadmium, copper, lead and zinc on the distribution and evolution of metallophytes in the British Isles. *Plant Systematic and Evolution* 173: 91-108
- Baker A.J.M., Reeves R.D., McGrath S.P. 1991. In situ decontamination of heavy metal polluted soils using crops of metal accumulating plants – a feasibility study. In: Hinchey R.E., Olfenbittel R.F. Ed. 1991. *in situ bioreclamation*, Butterworth – Heinemann, Boston: 600-605
- Baker A.J.M., Reeves R.D., Hajar A.S.M. 1994. Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl. (Brassicaceae). *New Phytologist* 127: 61-68
- Bert V., Macnair M.R., De Laguerie P., Saumitou - Laprade P. in Petit D. 2000. Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *New Phytologist*. 146: 225-233

- Boyd R.S., Martens S.N. 1998. Nickel hiperaccumulation by *Thlaspi montanum* var. *montanum* (Brassicaceae): a constitutive trait. *American Journal of Botany* 85: 259-265
- Brooks R.R. 2000. General introduction. V: *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals. Their role in phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytominig.* Brooks R.R. (ur.). 2<sup>nd</sup> edition. NY, USA, CAB International: 380 str.
- Chaney R.L., Malik K.M., Li Y.M., Brown S.L., Brewer E.P., Angle J.S, 1997. Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. Biotechnol* 8: 279-284
- Cohen C.K., Fox D.F., Garvin D. F., Kochian L.V. 1998. The role of iron-deficiency stress responses in stimulation heavy metal transport in plants. *Plant Physiology* 116: 1063-1072
- Dechamps C., Roosens N.H., Hotte C., Meerts P. 2005. Growth and mineral element composition in two ecotypes of *Thlaspi caerulescens* on Cd contaminated soil. *Plant and soil* 273: 327-335
- Delisle G., Champoux M. in Houde M. 2001. Characterization of oxidase and cell death in Al-sensitive and tolerant wheat roots. *Plant Cell Physiology* 42: 324-333
- Ebbs S.D., Kochian L.V. 1997. Toxicity of zinc and copper to Brassica species: implications for phytoremediation. *Journal of Environmental Quality* 26: 776-781
- Ernst W.H.O. 1996. Bioavailability of heavy metals and decontamination of soil by plants. *Applied Geochemistry* 11: 136-167
- Escaré J., Lefèbvre C., Gruber W., Leblanc M., Lepart J., Rivière Y., Delay B. 2000. Zinc and cadmium hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites in the Mediterranean area: implications for phytoremediation. *New Phytologist* 157: 643-648
- Frérot H., Petit C., Lefèbvre C., Gruber W., Collin C., Escaré J. 2003. Zinc and cadmium accumulation in controlled crosses between metallicolous and nonmetallicolous populations of *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae). *New Phytologist*. 157: 643-648
- Hall J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 366: 1-11
- Hamer D.H. 1986. Metallothionein. *Biochemistry* 55: 913-951
- Hernández-Allica J., Garbisu C., Becerril J.M., Barrutia O., García-Plazaola J.I., Zhao F.J., McGrath S.P. 2006. Synthesis of low molecular weight thiols in response to Cd exposure in *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell and Environment* 29: 1422-1429



- Jain S.K. 1976. The evolution of inbreeding in plants. *Ecology and Systematics* 7: 469-495
- Kandeler E. 1995. Organic matter by wet combustion. V: *Methods in Soil Biology*. Schinner F., Kandeler E., Margesin R. (ur.). Springer Verlag, Berlin: 397-398
- Khan A. G., Kuek C., Chaudry T.M., Khoo C.S. in Hayes W.J. 2000. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 41: 197-207
- Koch M., Mummenhoff K, Hurka H. 1998. Systematic and evolutionary history of heavy metal tolerant *Thlaspi caerulescens* in Western Europe: evidence from genetic studies based on isozyme analysis. *Biochemical Systematic and Ecology* 26: 823-838
- Krämer U., Cotter-Howels J.D., Charnock J.M., Baker A.J.M., Smith J.A.C. 1996. Free histidine as metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379: 635-638
- Kruckeberg A.R. 1967. Ecotypic response to ultramafic soils by some plant species of the northwestern United States. *Brittonia* 19: 133-151
- Lasat M.M., Baker A.J.M., Kochian L.V. 1998. Altered Zn compartmentation in root symplasm and stimulated Zn absorption into the leaf as mechanism involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* 118: 875-883
- Lasat M.M., Baker A.J.M., Kochian L.V. 1998. Altered zinc compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn<sup>2+</sup> absorption into the leaf as mechanism involved in zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* 118: 875-883
- Lasat M.M., Pence N.S., Garvin D.F., Ebbs S.D. in Kochian L.V. 2000. Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany* 51: 71-79
- Llugany M., Lombini A., Poschenrieder C., Barcelo J. 2003. Different mechanisms account for enhanced copper resistance in *Silene armeria* from mine spoil and serpentine sites. *Plant and Soil* 251: 55-63
- Lombi E., Zhao F.J., Dunham S.J., McGrath S.P. 2000. Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. *New Phytologist* 145: 11-20
- Lombi E., Zhao F.J., McGrath S.P., Young S., Sacchi A. 2001. Physiological evidence for a high – affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. *New Phytologist* 149: 53-60

- Macnair M.R., Baker A.J.M. 1994. Metal tolerance in plants: evolutionary aspects. In: Farago ME, ed. Plants and the chemical elements. Weinheim, Germany: VHC: 68-86
- Macnair M.R., Bert V., Huitson S.B., Saumitou-Laprade P., Petit D. 1999. Zinc tolerance and hyperaccumulation are genetically independent characters. Proceedings of the Royal Society, London, Series B 266: 2175-2179
- Macnair M.R. 2003. The hyperaccumulation of metals by plants. Advances in Botanical Research 40: 63-105
- Martin I. in Bardos P., 1996. A review of full scale treatment technologies for the remediation of contaminated land. EPP Publications, Richmond, Surrey TW10 6EP (UK): 182 str.
- Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Ravnik V., Podobnik A., Turk B., Vreš B. 1999: Mala flora Slovenije. Tretja izdaja. Tehniška založba Slovenije. Ljubljana, ISBN 86-365-0300-0: 845 str.
- Martinez C.E., Motto H.L. 2000. Solubility of lead, zinc and cooper added to mineral soils. Environmental Pollution 107: 153-158
- McGrath S.P., Shen Z.G. in Zhao F.J., 1997. Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soil. Plant and Soil 188: 153-159
- McGrath S.P. 1998. Phytoextraction for soil remediation. In: Brooks R.R., ed. Plants that hyperaccumulate heavy metals. Wallingford, UK: CAB International: 261-287
- McGrath S.P., Zhao F.J., Lombi E. 2002. Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. Advances in Agronomy 75: 1-56
- McLean E.O. 1982. Soil pH and lime requirement. V: Methods of soil analysis. Schinner et al. (ur.): 199-224
- Meerts P., Van Isacker N. 1997. Heavy metal tolerance and accumulation in metallicolous and non metallicolous populations of *Thlaspi caerulescens* from continental Europe. Plant Ecology 133: 221-231
- Meerts P., Duchêne Ph., Gruber W., Lefèbvre C. 2003. Metal accumulation and competitive ability in metallicolous and non-metallicolous *Thlaspi caerulescens* fed with different Zn salts. Plant and soil 249: 1-8

- Molitor M., Dechamps C., Gruber W., Meerts P. 2005. *Thlaspi caerulescens* on nonmetalliferous soil in Luxembourg: ecological niche and genetic variation in mineral element composition. *New Phytologist* 165: 503-512
- Moral R., Gomez J., Navarro-Pedreno J., Matrix J. 1994. Effects of cadmium on nutrient distribution, yield and growth of tomato grown soilless culture. *Journal of Plant Nutrition* 17: 953-962
- Pollard A.J., Baker A.J.M., 1996. The quantitative genetics of zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* 132: 113-118
- Pollard A.J., Powell K.D., Harper F.A., Smith J.A.C., 2002. The Genetic basis of metal hyperaccumulation in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21: 539-566
- Psaras G.K. in Manetas Y. 2001. Nickel localisation in Seeds of the metal hyperaccumulator *Thlaspi pindicum* Hausskn. *Annals of Botany* 88: 513-516
- Raskin I. in Ensley B.D., Ed., 2000. Phytoremediation of toxic metals using plants to clean up the environment. Wiley, New York: 316 str.
- Reeves R.D., Brooks R.R. 1983a. European species of *Thlaspi* L. (Cruciferae) as indicators of nickel and zinc. *Journal of Geochemical Exploration* 18: 275-283
- Reeves R.D., Brooks, R.R. 1983b. Hyperaccumulation of lead and zinc by two metallophytes from mining areas of central Europe. *Environmental pollution series A, Ecological and Biological* 31 (4): 277-285
- Reeves R.D., Baker A.J.M. 1984. Studies on metal uptake by plants from serpentine and non-serpentine populations of *Thlaspi goesingense* Halacsy (Cruciferae). *New Phytologist* 98: 191-204
- Reeves, R.D. in Baker, A.J.M. 2000. Metal accumulating plants. In I. Raskin in B.D. Ensley Eds., *Phytoremediation of toxic metals, Using plants to Clean up the Environment* 1<sup>st</sup> edition. New York, USA: John Wiley in Sons Inc.:193-229
- Regvar M., Vogel-Mikuš K., Kugonič N., Turk B., Batič F. 2006. Vegetational and mycorrhizal succession at a metal polluted site: Indications for the direction of phytostabilisation? *Environmental Pollution* 144: 976-984
- Roosens N., Verbruggen N., Meerts P., Ximénez-Embún P., Smith J.A.C. 2003. Natural variation in cadmium tolerance and its relationship to metal hyperaccumulation for seven populations of *Thlaspi caerulescens* from western Europe. *Plant, Cell and Environment* 26: 1657-1672

- Salt D.E., Smith R.D. in Raskin I., 1998. Phytoremediation. *Plant Physiology* 49: 643-668
- Schat H., Llugany M., Vooijs R., Hartley-Whitaker J., Bleker P.M. 2002. The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and nonhyperaccumulator metallophytes. *Journal of Experimental Botany* 53: 2381-2392
- Shen Z.G., Zhao F.J. in McGrath S.P., 1997. Uptake and transport of zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and the non-hyperaccumulator *Thlaspi ochroleucum*. *Plant Cell Environment* 20: 898-906
- Silver S. 1996. Bacterial heavy metal resistance. *Microbiology* 50: 753-789
- Steffens J.C. 1990. The heavy metal-binding peptides of plants. *Plant Physiology* 41: 553-575
- Taylor S.I., Macnair M.R. 2006. Within and between population variation for zinc and nickel accumulation in two species of *Thlaspi* (Brassicaceae). *New Phytologist* 169: 505-514
- Vert G., Grotz N., Dédaldéchamp F., Gaymard F., Guerinot M.L., Briat J.F., Curie C. 2002. IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* 14: 1223-1233
- Vogel-Mikuš K., Drobne D., Regvar M. 2005. Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. *Environmental Pollution* 133: 233-242
- Vogel-Mikuš K., Pongrac P., Kump P., Nečemer M., Regvar M. 2006. Colonisation of a Zn, Cd and Pb hyperaccumulator *Thlaspi praecox* Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake. *Environmental Pollution* 139: 362-371
- Wenzel W.W., Jockwer F. 1999. Accumulation of heavy metals in plants grown on mineralised soils of the Austrian Alps. *Environmental Pollution* 104: 145-155
- Zenk M.H. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene* 179: 21-30
- Zhao F.J., Hamon R.E., Lombi E., McLaughlin M.J., McGrath S.P. 2002. Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany* 53: 535-543

Zhao F.J., Lombi E. in McGrath S. P. 2003. Assessing the potential for zinc and cadmium phytoremediation with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Plant and Soil 249: 37-43

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se prof. dr. Marjani Regvar za mentorstvo in potrpežljivost.

Posebna zahvala gre dr. Katarini Vogel-Mikuš, ki mi je pri izdelavi diplomske naloge ves čas pomagala in me usmerjala. Iskrena hvala za pomoč.

Hvala Pauli, Matevžu in Mileni za vse nasvete in usmeritve.