

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELIEK ZA BIOLOGIJO

Andreja KERIN

**PRIVZEM Cd V RAZLIČNIH RAZVOJNIH FAZAH RANEGA (*Thlaspi praecox*)  
IN MODRIKASTEGA MOŠNJAKA (*Thlaspi caerulescens*)**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**Cd UPTAKE IN THE LIFE CYCLE OF *Thlaspi praecox* AND  
*Thlaspi caerulescens***

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana 2008

Diplomska naloga je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Poskus je bil opravljen na Katedri za rastlinsko fiziologijo Oddelka za biologijo, meritve vsebnosti Cd v rastlinskih tkivih pa so bile opravljene na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: Doc. dr. Barbara Vilhar  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: Prof. dr. Alenka Gaberščik  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Datum zagovora:

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

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Andreja Kerin

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK 581.1: 546.3: 582.683 (043.2) = 163.6
- KG privzem Cd / hiperakumulacija Cd / *Thlaspi praecox* / *Thlaspi caerulescens* / življenjski cikel / razvojne faze / vegetativna faza / faza cvetenja / faza semenitve
- AV KERIN Andreja
- SA REGVAR Marjana (Mentor)
- KZ SLO, 1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2008-03-18
- IN PRIVEM Cd V RAZLIČNIH RAZVOJNIH FAZAH RANEGA (*Thlaspi praecox*) IN MODRIKASTEGA MOŠNJAKA (*Thlaspi caerulescens*)
- TD Diplomaska naloga (univerzitetni študij)
- OP VIII, 31 s., 6 sl., 7 pril., 54 vir.
- IJ sl
- JI sl / en
- AI V rastlinjaku smo ob dodatku različnih koncentracij Cd (50, 100, 250 mg Cd kg<sup>-1</sup>) v substratu vzgojili rastline vrste *Thlaspi praecox* (populacija iz Žerjava) in *Thlaspi caerulescens* (ekotip Ganges). Pripravili smo tudi kontrolni poskus brez dodanega Cd v substratu. Obe vrsti sta hiperakumulacijski in lahko kopičita do 100-krat večje koncentracije Cd kot ostale nehiperakumulacijske vrste. Želeli smo ugotoviti, v kateri fazi življenjskega cikla sta hiperakumulacija in biomasa največji in, ali se z razvojem rastlin spreminjata. Rastline smo povzorčili v vegetativni fazi, fazi cvetenja in fazi semenitve ter analizirali značilnosti posamezne faze pri obeh vrstah. Ločili smo korenine, poganjke in poganjke s cvetovi, jih stehtali in po razklopu z mešanico HNO<sub>3</sub> in HClO<sub>4</sub>, v njih izmerili koncentracijo Cd z atomskim absorpcijskim spektrometrom (AAS). Ugotovili smo, da so bile večje biomase rastlin dosežene pri večjih (50, 100 in 250 mg Cd kg<sup>-1</sup>) koncentracijah Cd v substratu. Biomasa rastlin se je od vegetativne faze do faze cvetenja povečala, v fazi semenitve pa se je praviloma zmanjšala. Kontrolne rastline obeh vrst so po vegetativni fazi začele propadati. Akumulacija Cd v poganjkih se je v vseh razvojnih fazah povečevala s povečevanjem koncentracije Cd v substratu. Največje vrednosti koncentracije Cd sta vrsti tako dosegli že v vegetativni fazi (po treh mesecih rasti), pri tem se je rani mošnjak (*T. praecox*) pokazal kot uspešnejša hiperakumulacijska vrsta. Z dolžino rastne sezone so se pri obeh vrstah vsebnosti Cd praviloma povečevale. Večje vsebnosti Cd so bile pri obeh vrstah dosežene v fazi cvetenja in semenitve. Pri obeh vrstah je translokacijski faktor (TF) za Cd (razmerje koncentracij Cd med poganjki in koreninami) povsod presegal mejo za hiperakumulacijo (TF > 1). Kljub temu, da Cd ne velja za esencialen element, sta vrsti življenjski cikel dokončali le v substratu z dodanim Cd.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC 581.1: 546.3: 582.683 (043.2) = 163.6
- CX Cd uptake / Cd hyperaccumulation / *Thlaspi praecox* / *Thlaspi caerulescens* / life cycle / vegetation phase / flowering phase / seeding phase
- AU KERIN, Andreja
- AA Regvar, Marjana (supervisor)
- PP SLO, 1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2008
- TI Cd UPTAKE IN THE LIFE CYCLE OF *Thlaspi praecox* AND  
*Thlaspi caerulescens*
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO VIII, 31 p., 6 fig., 7 ann., 54 ref.
- LA sl
- AI sl / en
- AB In order to assess the differences in biomass and Cd accumulation during the life cycle of *Thlaspi praecox* (population of Žerjav) and *Thlaspi caerulescens* (ecotype Ganges) a greenhouse experiment was set up. These two species are hyperaccumulators, i.e. they are able to accumulate 100-times higher concentration of Cd than non-hyperaccumulators. The substrates were amended with different concentrations of Cd (50, 100, 250 mg Cd kg<sup>-1</sup>). There was also the control with 0 mg Cd kg<sup>-1</sup> added. Plants were collected in vegetative, flowering and seeding phases. Roots, shoots and shoots with flowers were separated, weighed and dried. Plant material was wet digested with a mixture of HNO<sub>3</sub> and HClO<sub>4</sub> and concentration of Cd was measured by atomic absorption spectrometry (AAS). Biomass of both plant species increased with increasing Cd concentrations in the substrate from vegetative to flowering phase. In seeding phase a decrease in biomass was observed at both species. In controls plants of both species died away after vegetative phase. Accumulation of Cd was higher when the concentration in substrate was higher. Cd concentration was the highest in the vegetative phase, but higher in *T. praecox* than in *T. caerulescens*. With the length of growing season the content of Cd in both species generally increased. In the flowering and seeding phases, higher contents of Cd in shoots at higher Cd concentrations (100 in 250 mg Cd kg<sup>-1</sup>) in the substrate were found. Translocation factors (TF) for Cd (shoot / root Cd concentration ratio) exceeded the hyperaccumulation criterion (TF > 1). Although Cd is not an essential element, both species were able to complete their life cycles only in the presence of Cd.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KATALO SLIK	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 KOVINE.....	2
2.1.1 <i>Kadmij (Cd)</i> .....	2
2.1.2 <i>Cd v tleh</i> .....	2
2.1.3 <i>Strupeni učinki Cd na rastline</i> .....	3
2.2 BIODOSTOPNOST KOVIN .....	3
2.3 PRIVZEM KOVIN PRI RASTLINAH.....	3
2.3.1 <i>Akumulacija in izključevanje</i> .....	4
2.4 HIPERAKUMULACIJA.....	4
2.4.1 <i>Značilnosti hiperakumulacijskih vrst</i> .....	5
2.4.2 <i>Hiperakumulacijski vrsti: T. praecox T. caerulescens in</i> .....	6
2.5 PRILAGODITVE HIPERAKUMULACIJSKIH RASTLIN .....	7
<b>3 CILJI .....</b>	<b>8</b>
<b>4 HIPOTEZE .....</b>	<b>8</b>
<b>5 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>9</b>
5.1 PRIPRAVA POSKUSA .....	9
5.2 PRIPRAVA SUBSTRATA ZA SEJANJE SEMEN .....	9
5.2.1 <i>Sejanje semen</i> .....	9
5.3 ANALIZA RASTLIN.....	10
5.3.1 <i>Tehtanje rastlin</i> .....	10
5.3.2 <i>Razklop rastlinskih vzorcev z dušikovo in perklorno kislino</i> .....	10
5.3.3 <i>Koncentracija Cd v rastlinskih vzorcih</i> .....	11
5.3.4 <i>Trasnslokacijski faktor za Cd</i> .....	11
5.3.5 <i>Vsebnost Cd</i> .....	11
5.4 STATISTIČNA ANALIZA.....	11
<b>6 REZULTATI.....</b>	<b>13</b>

6.1	VPLIV Cd V RASTNEM SUBSTRATU NA BIOMASO RASTLIN .....	13
6.1.1	<i>Biomasa korenin</i> .....	13
6.1.2	<i>Biomasa poganjkov</i> .....	14
6.2.	PRIMERJAVA KONCENTRACIJE Cd V RASTLINAH OBEH VRST V RAZLIČNIH RAZVOJINIH FAZAH.....	14
6.2.1	<b>Koncentracija Cd v koreninah</b> .....	14
6.2.2	<b>Koncentracija Cd v poganjkih</b> .....	15
6.3	TRANSLOKACIJSKI FAKTOR .....	17
6.4	VSEBNOST Cd V POGANJKIH .....	18
<b>7</b>	<b>RAZPRAVA</b> .....	<b>19</b>
7.1.	BIOMASA RASTLIN .....	19
7.1.1	<i>Biomasa korenin</i> .....	19
7.1.2	<i>Biomasa poganjkov</i> .....	19
7.2	AKUMULACIJA Cd.....	20
7.2.1	<i>Koncentracija Cd v koreninah</i> .....	20
7.2.2	<i>Koncentracija Cd v poganjkih</i> .....	21
7.2.3	<i>Vpliv daljšega časa rasti obeh vrst na akumulacijo Cd</i> .....	22
7.3	TRANSLOKACIJSKI FAKTOR (TF).....	22
7.4	VSEBNOST Cd V POGANJKIH .....	22
7.5	HIPERAKUMULACIJSKE SPOSOBNOSTI VRST <i>T. praecox</i> IN <i>T. caerulescens</i> .....	23
<b>8</b>	<b>SKLEPI</b> .....	<b>24</b>
<b>9</b>	<b>POVZETEK</b> .....	<b>25</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>26</b>

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Suha masa korenin [g] v različnih razvojnih fazah rastlin .....	13
<b>Slika 2:</b> Suha masa poganjkov [g] v različnih razvojnih fazah rastlin .....	14
<b>Slika 3:</b> Koncentracija Cd [ $\text{mg kg}^{-1}$ ] v koreninah .....	15
<b>Slika 4:</b> Koncentracija Cd [ $\text{mg kg}^{-1}$ ] v poganjkih .....	16
<b>Slika 5:</b> Translokacijski faktor za Cd .....	17
<b>Slika 6:</b> Vsebnost Cd [ $\text{mg poganjek}^{-1}$ ] .....	18

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AAS	atomska absorpcijska spektrometrija
Al	aluminij
As	arzen
BAF	bioakumulacijski faktor
Co	kobalt
Cd	kadmij
Cu	baker
Cr	krom
EDTA	etilen-diamin-tetraocetna kislina
GSH	glutation
Hg	živo srebro
HClO <sub>4</sub>	perklorna kislina
HNO <sub>3</sub>	dušikova (V) kislina
Mn	mangan
Ni	nikelj
Pb	svinec
Se	selen
SM	suha masa
TF	translokacijski faktor
TK	težka kovina
Zn	cink



## 1 UVOD

Od industrijske revolucije naprej se onesnaževanje tal, vode in zraka z različnimi onesnažili močno povečuje. Še posebej problematično je onesnaževanje tal s kovinami, saj so le-te v prevelikih koncentracijah strupene in nerazgradljive, njihova prisotnost v živih organizmih pa negativno vpliva na njihovo rast in razvoj. Zaradi vse večje onesnaženosti okolja narašča zanimanje in razvijanje ne invazivnih tehnik čiščenja, kakršna je fitoekstrakcija. To je tehnika, ki izkorišča sposobnost rastlin, da le te privzemajo kovine ali ostala onesnažila iz zemlje, vode ali sedimentov v svoja tkiva. Rastline se lahko ob koncu rastne sezone odstranijo, s tem pa so odstranjene tudi kovine.

V diplomski nalogi smo želeli podrobneje preučiti hiperakumulacijske sposobnosti modrikastega mošnjaka (*Thlaspi caerulescens*, Ganges) in ranega mošnjaka (*Thlaspi praecox*, populacijo iz Žerjava), ki se pojavlja tudi v Sloveniji. Vrsti smo primerjali glede na maso korenin, poganjkov, akumulacijo Cd v koreninah in poganjkih, vsebnosti Cd v poganjkih in velikost translokacijskega faktorja (TF). Ker rastline skozi življenjski cikel spreminjajo potrebo po nutrientih, nas je zanimalo, ali se te spremembe odražajo tudi v privzemu Cd. Poleg kontrolnega poskusa, kjer v rastnem substratu ni bilo dodanega Cd, smo v rastni substrat dodali tudi različne koncentracije Cd (50, 100 in 250 mg Cd kg<sup>-1</sup>) in v kontroliranih razmerah vzgojili obe vrsti. Rastline smo povzorčili v vegetativni fazi, fazi cvetenja in fazi semenitve, stehali korenine, poganjke oz. cvetne poganjke ter izmerili koncentracijo Cd v rastlinskem materialu. Ugotovili smo, da je od koncentracije Cd v substratu odvisna rast oz. biomasa rastlin ter akumulacija Cd v poganjkih. Vrsti sta dosegli večje biomase poganjkov in koncentracije Cd v poganjkih pri substratu z dodanim Cd. Koncentracija Cd v poganjkih je bila največja v vegetativni fazi, v fazi cvetenja se je zmanjšala. V fazi semenitve se je v nekaterih primerih ponovno povečala, vendar ni dosegla prvotnih vrednosti. Tako vrsta *T. caerulescens*, kot vrsta *T. praecox* sta za uspešno dokončanje življenjskega cikla potrebovali prisotnost Cd v substratu, saj so rastline brez dodanega Cd v substratu, po vegetativni fazi propadle.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 KOVINE

Strupene koncentracije kovin nakopičene v tleh in vodi so rezultat delovanja industrije, rudnikov, agrokemikalij, gnojenja, izgorevanja tekočih in trdih goriv. Zaradi svoje strupenosti zmanjšujejo mikrobovno aktivnost, biodiverzitetu, vplivajo na manjši pridelek v kmetijstvu, povzročajo pa tudi poškodbe na živalih in ljudeh (McLaughlin in Singh, 1999). Kovine se vključujejo v prehranjevalne verige. Mnoge med njimi (npr. Zn in Cu) so potrebni za normalno delovanje rastlin in živali, vendar pa so prevelike koncentracije zdravju nevarne (Prasad, 1999).

#### 2.1.1 Kadmij (Cd)

Cd s številnimi kovinami (As, Co, Cu, Cr, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Zn) predstavlja le 1% vseh prisotnih elementov v atmosferi, geosferi in hidrosferi (Prasad, 1999). V naravi je prisoten kot rezultat naravnega procesa mineralizacije kamnin. Neonesnažena tla vsebujejo manj kot  $0,3 \mu\text{g Cd g}^{-1}$  (Adriano, 2001). Kemijsko je Cd najbolj podoben Zn in se pojavlja skupaj z železom v sulfidnih rudah. V okolju ne razpada, lahko pa na njegovo obliko vplivajo fizični in kemijski procesi, ki določajo njegovo mobilnost in dostopnost rastlinam. Njegova razpolovna doba je med 10 in 30 let (Irwin s sod., 1997). Večinoma se Cd uporablja za izdelavo Ni-Cd baterij. Uporablja se tudi za barvila, prevleke, kot stabilizator plastike, pri elektrogalvaniziranju (Adriano s sod., 2001). Cd je strupen za organizme, tudi če je prisoten v majhnih količinah (Prasad, 1999; Sanita di Toppi in Gabbrielli, 1999). Še posebej je strupen za ljudi. Dovoljena zgornja meja vsebnosti Cd v rižu in žitaricah znaša  $0,2 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  (European commission, 2001). Letno se v okolje zaradi človekovega delovanja sprosti  $5,6\text{--}38 \times 10^6 \text{ kg Cd}$ .

#### 2.1.2 Cd v tleh

Največje koncentracije Cd so v zgornjih plasteh tal, kjer se nahaja tudi veliko organskih snovi. Cd tako v teh plasteh najdemo v obliki organskih kompleksov in sicer do globine 15 cm. V kislih tleh so koncentracije prostega, rastlinam dostopnega Cd večje, kot v apnenčastih, bazičnih tleh. Če so pH vrednosti tal nekoliko višje, je pomembna tudi adsorpcija Cd na oksihidrokside Mn in Fe na anaerobnih področjih. Na takšnih področjih se topnost Cd zmanjša, ker se Cd obarja (Bohinc, 2008).

### 2.1.3 Strupeni učinki Cd na rastline

Ker uravnavanje strupenih učinkov zahteva veliko energije, imajo zastrupljene rastline majhno biomaso (Ernst s sod., 1992). Tudi vijoličasta obarvanost listov, sušenje starejših listov v listni rozeti rastlin gojenih v rastlinjaku in kloroze mlajših, ter nekroze starejših listov v rozeti hidroponsko gojenih rastlin, so tudi znaki zastrupitve s Cd (Wójcik s sod., 2005). Cd je neesencialna kovina. Negativni vplivi kovin na rastlinska tkiva so odvisni od koncentracije kovine v tleh, talnih dejavnikov (Ph, vsebnosti organske snovi), učinkovitosti zaščitnega sistema rastline in prisotnosti mikroorganizmov.

Cd vpliva na:

- metabolizem (inhibicija klorofil sintaze, motnje Calvinovega cikla in elektronskega transporta zaradi vezave na SH skupine encimov),
- permeabilnost celične membrane in s tem na spremenjeno ionsko ravnovesje,
- rast (zavira celično delitev in elongacijo),
- prezgodnjo senescenco (Seregin in Ivanov, 2000).

## 2.2 BIODOSTOPNOST KOVIN

Na splošno je dostopnost kovin za rastline (biodostopnost) v veliki meri odvisna do oblike in kemijske vrste elementa, privzem pa prvotno določa koncentracija kovin v samem substratu (Adriano, 2001). Na biodostopnost vplivajo različni dejavniki, ki učinkujejo na sprostitvev nabitih ionov kovin s koloidov in kompleksov. Ti dejavniki so :

- pH,
- kationsko izmenljiva kapaciteta,
- redoks potencial,
- vsebnost glinenih delcev in organske snovi,
- tekstura tal,
- prisotnost drugih kovin in gnojil (Adriano, 2001; Greger, 1999),
- prisotnost mikroorganizmov (Fischerová s sod. 2006).

## 2.3 PRIVZEM KOVIN PRI RASTLINAH

Vloga Cd v rastlinah še ni povsem pojasnjena, vendar ga rastline kljub strupenosti privzemajo in transportirajo v nadzemne dele. Glede na zmožnost privzema kovin razlikujemo tri tipe rastlin:

- **akumulacijske** (kovine se koncentrirajo v nadzemnih delih),

- **izključevalske** (koncentracija kovin v rastlinah je vedno konstantna in nižja kot v tleh),
- **indikatorske** (koncentracija kovin v rastlini je sorazmerna s koncentracijo kovin v tleh) (Baker, 1981).

### 2.3.1 Akumulacija in izključevanje

Rastline, ki uspešno preživijo v s kovinami onesnaženem okolju, so razvile pomembni strategiji: **akumulacijo** in **izključevanje**. Akumulacijske rastline privzemajo kovine iz tal in jih zadržujejo v koreninah in poganjkih. Z mehanizmi privzema zmanjšujejo toksičnost kovin in so rezistentne tudi pri njihovih večjih koncentracijah (Baker, 1981). Pri akumulacijskih rastlinah je razmerje koncentracij kovin med poganjki in koreninami (translokacijski faktor - TF) večje od 1 ( $TF > 1$ ). Koncentracije kovin v nadzemnih delih so večje od koncentracij kovin v tleh. Pri rastlinah, ki kovine izključujejo, pa je omejeno privzemanje kovin iz korenin v poganjke in je zato  $TF < 1$ . Koncentracije kovin v nadzemnih delih rastlin so manjše od koncentracij v tleh (Baker s sod., 1994). Pri izključevanju kovin iz rastlinskih organov gre za izogibanje oz. omejevanje privzema kovin v korenine. Izogibanje oz. omejevanje privzema kovin poteka s pomočjo povečane tvorbe sluzi in odpadanja celic koreninske čepice (Llugany s sod., 2003).

## 2.4 HIPERAKUMULACIJA

Nekatere rastlinske vrste in določeni genotipi so sposobni kolonizirati tudi tla z velikimi koncentracijami kovin. Imajo namreč visoko raven tolerance na prisotnost kovin. To so hipertolerantne vrste in nekatere izmed njih (okoli 400 vrst) kovine tudi hiperakumulirajo. To so hiperakumulacijske vrste (Baker in Brooks, 1989). Znotraj rodu *Thlaspi* se pojavljajo tako vrste, ki ne akumulirajo kovin kot tudi hiperakumulacijske vrste. Znane so vrste, ki akumulirajo velike koncentracije Zn, Pb, Ni in Cd. Najbolj preučena vrsta je *T. caerulescens*. Uporabna bi bila za fitoekstrakcijo s kovinami onesnaženih tal, saj lahko v poganjkih akumulira več kot 3 % Zn in okoli 0,1 % Cd (preračunano na SM) (Robinson s sod., 1998).

#### 2.4.1 Značilnosti hiperakumulacijskih vrst

Za (hiper)akumulacijske rastline je značilno, da kovine pospešeno privzemajo iz tal v korenine in jih nalagajo v ksilem ter jih transportirajo v nadzemne dele, kjer pride do koncentriranja kovin (Baker, 1981). Obstajajo številni mehanizmi premeščanja kovin iz korenin v poganjke, vendar je njihovo delovanje še vedno nejasno (Assunção s sod., 2003). Hiperakumulacijske vrste se med seboj razlikujejo po številu in vrsti kovin, ki jih lahko kopičijo. Hiperakumulacijske vrste združujejo akumulacijo in toleranco, ki sta regulirani z različnimi genskimi sklopi (Macnair s sod., 1999). Hiperakumulacija kovin pri rastlinah vključuje vsaj tri pomembne procese:

- učinkovito absorpcijo kovin v korenine,
- učinkovito premeščanje kovin iz korenin v poganjke,
- hipertoleranco z notranjim razstrupljanjem (Baker s sod., 2000; Pollard s sod., 2002; Assunção s sod., 2003a; McGrath in Zhao, 2003).

Hiperakumulacijske rastline so sposobne akumulirati kovine v koncentracijah, ki so več 100-krat višje v primerjavi z ne akumulacijskimi vrstami (Salt s sod., 1998). Rastline lahko uvrstimo med hiperakumulacijske, ko v poganjkih kopičijo več kot 100 mg Cd kg<sup>-1</sup>, 1000 mg Ni, Cu oz. Co kg<sup>-1</sup>, 10000 mg Zn oz. Mn kg<sup>-1</sup> (Baker s sod., 1994). Najpogosteje rastline akumulirajo le eno kovino, lahko pa tudi dve ali več (McGrath, 1998). Večina hiperakumulacijskih rastlin je sposobno akumulirati med 1 in 5 % kovin glede na svojo suho maso. Te rastline so prisotne na tleh, ki vsebujejo velike koncentracije kovin, njihova rast je počasna in nimajo velike biomase (Persans in Salt, 2000). Hiperakumulacija je znana znotraj družine križnic, pri rodovih *Alyssum*, *Arabidopsis*, *Brassica* in *Thlaspi* (Baker in Brooks, 1989). Tudi v družinah Euphorbiaceae in Asteraceae so prisotne hiperakumulacijske vrste (Pollard in Baker, 1996). Hiperakumulacija je torej naravna sposobnost rastlin, da lahko akumulirajo velike količine kovin v poganjke in liste (Reeves in Brooks, 1983), medtem ko v koreninah kopičijo nižje koncentracije. Razmerje koncentracije kovin poganjki / korenine je ponavadi > 1 (Baker, 1981). To razmerje je definirano kot translokacijski faktor (TF). Sposobnost akumuliranja določenega elementa pa se meri z bioakumulacijskim faktorjem (BAF), ki predstavlja razmerje med koncentracijo določene kovine v suhi masi rastline in razpoložljivo koncentracijo te kovine v rastnem substratu. Hiperakumulacija naj bi rastlinam predstavljala kompeticijsko prednost. Ker so se s posebnimi mehanizmi sposobne izogniti posledicam strupenosti kovin, lahko uspevajo na območjih, kjer ostale rastline ne morejo. Na tak način so si zagotovile ekološko nišo, v kateri je medvrstna kompeticija minimalna (Brooks, 1998). Razlike v sposobnosti hiperakumulacije kovin naj bi bile odvisne od prisotnosti določenih genov, ki so vključeni v proces hiperakumulacije (Basic s sod., 2006). Vendar pa Escarré s

sod. (2000) ni našel veliko genetskih razlik med akumulacijskimi in neakumulacijskimi populacijami. Selekcija okolja in bariere imajo pomemben vpliv na genske razlike pri različnih populacijah. Tudi neakumulacijske rastline so pod posebnimi pogoji sposobne privzemati zelo velike koncentracije Cd iz tal. *Brassica juncea*, sicer nehiperakumulacijska vrsta, je ob povečanih koncentracijah Cd v substratu, začela kopičiti zelo veliko Cd. V listih je nakopičila desetkrat več Cd kot ostali nehiperakumulatorji oz. toliko Cd kot hiperakumulator *Thlaspi caerulescens* (Jiang sod., 2003).

#### **2.4.2 Hiperakumulacijski vrsti: *T. praecox* *T. caerulescens* in**

*Thlaspi praecox* ali rani mošnjak je trajnica, ki jo najdemo na suhih, kamnitih travnikih od nižine do subalpinskega pasu (Martinčič s sod., 1999). Pojavlja se tudi v Sloveniji in ima hiperakumulacijske značilnosti. Populacija iz Žerjava lahko akumulira Zn (1,5%), Cd (0,6%) in Pb (0,4 %) (Vogel-Mikuš s sod., 2005). Vrsta *T. praecox* je v pogojih sposobna kopičiti do 7428 mg Cd kg<sup>-1</sup>, oz 6497 mg Cd kg<sup>-1</sup> v koreninah (Vogel-Mikuš s sod., 2007). Cd se kopiči v vseh tkivih (povrhnjici, skorji in prevodnem tkivu) (Pongrac, 2004). Vrsta hiperakumulira Cd tudi v semenih. V različnih razvojnih fazah so zaznali tudi različno sposobnost akumulacije Cd (Pongrac s sod., 2007). Največ Cd so rastline nakopičile v vegetativni fazi, med reproduktivno fazo pa se je akumulacija omejila oz. zmanjšala.

*Thlaspi caerulescens* J&C Presl ali modrikasti mošnjak iz družine križnic (Brassicaceae) je danes najbolj raziskana hiperakumulacijska vrsta, ki je razširjena po celi Evropi. Uspeva na tleh, ki lahko vsebujejo manjše ali velike koncentracije kovin. V primeru vrste *T. caerulescens*, je znotraj različnih populacij z različnih območij, veliko variacij v zmožnosti kopičenja Cd. Populacija iz južne Francije predstavlja največjo zmožnost akumulacije Cd (Lombi s sod., 2000; Roosens s sod., 2003). Ta populacija predstavlja ekotip za hiperakumulacijo Cd (ekotip Ganges) (Lombi s sod., 2001). V naravi je v nadzemnih delih sposoben kopičiti do 164 mg Cd kg<sup>-1</sup> (preračunano na SM) (Baker s sod., 1994), na hidroponiki pa tudi do 14000 mg Cd kg<sup>-1</sup>, ne da bi se pojavili simptomi zastrupljenosti rastlin (Lombi s sod., 2000). Različne, hidroponsko gojene populacije *T. caerulescens*, se na povečane koncentracije Cd različno odzivajo. Pri ekotipu Ganges se biomasa ni zmanjšala niti po 4-tedenski izpostavitvi 500 µM Cd v hranilni raztopini, pri ekotipu Prayon (Belgija), z manjšo sposobnostjo akumulacije, pa se je znatno manjša biomasa pokazala pri 250 in 500 µM Cd v hranilni raztopini (Lombi s sod., 2000). Tudi pri ekotipu Plombières (Belgija) se je biomasa rastlin, tretiranih z 500 µM Cd po 14 dneh zmanjšala.

## 2.5 PRILAGODITVE HIPERAKUMULACIJSKIH RASTLIN

Hiperakumulacijske rastline so na povečano koncentracijo kovin razvile posebne prilagoditve. Prevladujoča mehanizma sta vezava kovin na celično steno, helacija in kompartmentizacija v vakuoli (Rauser, 1999). Kot helatorji kovin pogosto nastopajo organske kisline (malat, citrat). Pri hiperakumulacijskih rastlinah se kovine v poganjkih večinoma kopičijo na poti transpiracijskega toka, v povrhnjici listov in žilah, manj pa v palisadnem in gobastem tkivu, kar kaže na odlaganje kovin stran od občutljivih, fotosintezno aktivnih tkiv (Seregin in Ivanov, 2000; Bhatia s sod., 2004; Cosio s sod., 2005; Wójcik s sod., 2005). Cd vstopi v rastlino skozi koreninske celice kot kation  $Cd^{2+}$ . Vstop mu omogočijo  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  in  $Ca^{2+}$  transporterji. V koreninah se pri vrsti *T. caerulescens* Cd večinoma kopiči v vseh tkivih, najpogosteje v celičnih stenah (Vázquez s sod., 1992; Seregin in Ivanov, 2000; Küpper s sod., 2001; Wójcik s sod., 2005;), saj ta vezava omejuje transport kovine v ostale celice (Seregin in Ivanov, 2000). Mesto vezave kovin v poganjkih je odvisno od starosti listov. V zrelih in starih listih se Cd veže na kisikove ligande (malat, citrat), v mlajših listih pa je vezan večinoma na žveplove ligande. Cd se v listih kopiči predvsem v fotosintezno neaktivnem tkivu, v celicah pa se oddeljuje v vakuole, ki predstavljajo metabolno manj aktivna mesta shranjevanja kovine (Wójcik s sod., 2005; Ma s sod., 2005).

Ne vemo natančno, zakaj so se ti mehanizmi razvili oz. ohranili. Pri vrsti *T. caerulescens* (Ganges) vpliv pH, tip in struktura prsti ter biologija hipertolerance na Cd še vedno niso povsem pojasnjeni.

### 3 CILJI

Namen diplomske naloge je bil v kontroliranih razmerah vzgojiti vrsti *T. caerulescens* (Ganges) in *T. praecox* (populacija iz Žerjava) in preučiti:

- 1) privzem Cd pri obeh vrstah glede na različne koncentracije Cd v tleh,
- 2) privzemu Cd v posameznih razvojnih fazah (vegetativna faza, faza cvetenja, faza semenitve),
- 3) oceniti kakšen vpliv imajo različne koncentracije Cd v substratu na biomaso rastlin pri obeh vrstah.

### 4 HIPOTEZE

Predvidevamo, da:

- 1) premajhne oz. presežne koncentracije Cd v substratu negativno vplivajo na posamezne razvojne stadije,
- 2) bo pri večjih koncentracijah Cd v substratu prišlo tudi do večjega privzema Cd v rastlino,
- 3) bo TF večji kot 1, saj sta obe vrsti znani kot hiperakumulacijski vrsti, ki uspešno transportirata Cd iz korenin v poganjke,
- 4) bomo tudi v kontroliranih razmerah presegli mejne hiperakumulacijske vrednosti Cd ( $100 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  (SM)).



## 5 MATERIALI IN METODE

### 5.1 PRIPRAVA POSKUSA

S prvim poskusom smo začeli februarja 2006. Ker pa veliko rastlin ni cvetelo, smo decembra 2006 pripravili ponoven poskus z enakimi metodami in cilji. Ker poskusa pri posameznih kategorijah zaradi zelo različnih oz. manjkajočih (rastline niso cvetele) podatkov nismo mogli združiti, smo upoštevali drugi poskus, ki je obsegal več podatkov.

### 5.2 PRIPRAVA SUBSTRATA ZA SEJANJE SEMEN

Pripravili smo mešanico komercialne zemlje Biobrazda z dodanim Cd in 100 mg Zn kg<sup>-1</sup> (Zn smo dodali zaradi potreb hiperakumulacijskih rastlin po večjih koncentracijah Zn v substratu. Kovine smo raztopili z ustreznimi količinami vode in pripravili štiri različne koncentracije Cd v substratu (0, 50, 100 in 250 mg Cd kg<sup>-1</sup>). Substrat smo pustili v posodah 14 dni, da se je dobro prepojil. Vsake tri dni smo substrat tudi premešali, saj smo s tem zagotovili enakomerno razporeditev Cd. Z vsakim pripravljanim substratom smo nato napolnili po 24 lončkov. Skupno torej 96 lončkov, od katerih smo 24 lončkov napolnili samo z mešanico komercialne zemlje. Ti lončki so nam predstavljali kontrolo (0 mg Cd kg<sup>-1</sup> v substratu). V vsak lonček smo dali 0,5 kg substrata.

#### 5.2.1 Sejanje semen

Lončke smo razdelili v štiri skupine in jih označili glede na njihovo vsebino. V 48 lončkov smo posejali semena ranega mošnjaka (*T. praecox*) in v 48 lončkov semena modrikastega mošnjaka (*T. caerulescens*). Pri obeh vrstah smo v vsaki fazi, pri vseh koncentracijah Cd v substratu povzorčili po 4 lončke. Različne stopnje razvoja rastlin smo razdelili na tri faze:

- Vegetativna faza: to je faza, ko so rastline že v celoti razvile liste, vendar še nimajo cvetnih poganjkov. Povzorčene rastline so bile stare 3 mesece.
- Faza cvetenja: to je faza, ko imajo rastline cvetne poganjke z razvitimi cvetovi. Povzorčene rastline so bile stare 5 - 6 mesecev.
- Faza semenitve: rastline v tej fazi imajo dolga cvetna stebila, iz cvetov pa so se razvili luščki. Rastline smo povzorčili, ko luščki niso bili več zeleni (po 7 mesecih rasti).

Lončke smo odnesli v klimatiziran rastlinjak, kjer smo rastline gojili pri 20°C, 16 urni svetlobi in 8 urni temi. Po 1 mesecu so bile rastlinice dovolj velike, tako da smo jih razredčili na 2 rastlinici na lonček. Tako pripravljene lončke smo pustili v rastlinjaku 3 mesece. Zalivali smo jih približno trikrat tedensko z destilirano vodo in pripravljeno hranilno raztopino za rod *Thlaspi* (Tolrà s sod., 1996) (Priloga A, Tabeli 1, 2).

Po enem mesecu vegetativne rasti smo rastline za 6 tednov prestavili na temperaturo 10° C (vernalizacija). S tem smo inducirali cvetenje rastlin.

## 5.3 ANALIZA RASTLIN

### 5.3.1 Tehtanje rastlin

Iz lončkov smo postopoma (odvisno od razvojnega stadija rastlin) pobirali rastline, ki smo jih temeljito oprali pod tekočo vodo. Prvo (vegetativno) fazo rastlin smo pobrali po treh mesecih. Ostale rastline smo povzorčili postopoma, ko so dosegle določeno razvojno fazo. S skalpelom smo ločili korenine od poganjkov oz. cvetov. Rastlinski material smo osušili in ločeno stehtali. Nato smo posamezne poganjke in korenine zavili v aluminijasto folijo in jih potopili v tekočem dušiku. Tako pripravljene rastlinske vzorce smo do sušenja spravili v zamrzovalno skrinjo. Zmrznjene vzorce smo sušili en teden v liofilizerju (Christ, model Alpha 2-4 z zračnim hlajenjem). Ko so se vzorci posušili, smo jih ponovno stehtali, da smo dobili suho maso rastlin (Prilogi B in C).

### 5.3.2 Razklop rastlinskih vzorcev z dušikovo in perklorno kislino

Posušene vzorce smo ob dodajanju tekočega dušika v terlnici strli v droben prah. Prah smo spravili v označene plastične lončke in jih shranili za nadaljnje analize. V 16 cm dolge epruvete, ki smo jih uporabljali za predrazklop in za merjenje koncentracij Cd, smo temeljito oprali pod tekočo vodo, jih sprali z 0,2% HNO<sub>3</sub> in nato še z bidestilirano vodo. Epruvete smo sušili pol ure pri 105°C. V tako očiščene epruvete smo ločeno zatehtali 30 mg uprašenega rastlinskega materiala. Na vzorce smo odpipetirali 3,5 ml kislinske mešanice za razklop. Mešanico smo pripravili iz 65% HNO<sub>3</sub> in koncentrirane HClO<sub>4</sub> v razmerju 7:1 (Vogel-Mikuš s sod., 2005). Predrazklop smo izvajali v digestoriju. Epruvete z rastlinskimi vzorci in kislinsko mešanico smo zaradi hlapenja kisline pokrili z zamaški ali aluminijasto folijo 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 ga segrevali. Epruvete smo segrevali približno 8 ur, oz. tako dolgo, dokler ni kislina povsem izhlapela. Epruvete z razklopljenim materialom smo pokrili s pokrovčki ali aluminijasto folijo in jih do meritev hranili na sobni temperaturi.

### 5.3.3 Koncentracija Cd v rastlinskih vzorcih

Koncentracijo Cd v rastlinskih vzorcih smo izmerili z atomsko absorpcijsko spektrometrijo (AAS). 24 ur pred merjenjem smo vzorce raztopili v 5 ml 0,2% HNO<sub>3</sub>. Epruvete smo pokrili (da ne bi prišlo do kontaminacije) in jih do merjenja shranili v hladilniku. Pred merjenjem koncentracij Cd z AAS, smo razklopljene vzorce ogreli na sobno temperaturo in jih primerno redčili z 0,2% HNO<sub>3</sub>. Z redčenjem smo zagotovili meritve koncentracij Cd v optimalnem meritvenem razponu umeritvene krivulje za Cd. Koncentracije Cd v rastlinskih vzorcih so zbrane v Prilogi D in E.

### 5.3.4 Translokacijski faktor za Cd

Z razmerjem koncentracije kovin v poganjkih / korenine pri hiperakumulacijskih rastlinah označujemo, kje se kovine zadržujejo. 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 sekvestirajo v netoksični obliki (Baker, 1981). Translokacijski faktor (TF) smo izračunali kot razmerje koncentracije Cd v poganjkih / koncentraciji Cd v koreninah.

### 5.3.5 Vsebnost Cd

Celotno količino fitoekstrahiranega Cd iz substrata v poganjkih smo podali kot vsebnost Cd v poganjkih, ki je rezultat produkta biomase poganjkov rastlin (g) in koncentracije Cd na enoto biomase (mg kg<sup>-1</sup>) poganjkov rastlin. Vsebnosti Cd v poganjkih so zbrane v Prilogi G.

## 5.4 STATISTIČNA ANALIZA

Vpliv tretmajev in posamezne vrste na biomaso korenin in poganjkov, koncentracijo Cd v koreninah in poganjkih, translokacijske faktorje ter vsebnosti Cd v poganjkih smo analizirali z dvosmerno analizo variance (ANOVA), pri čemer smo kot neodvisni

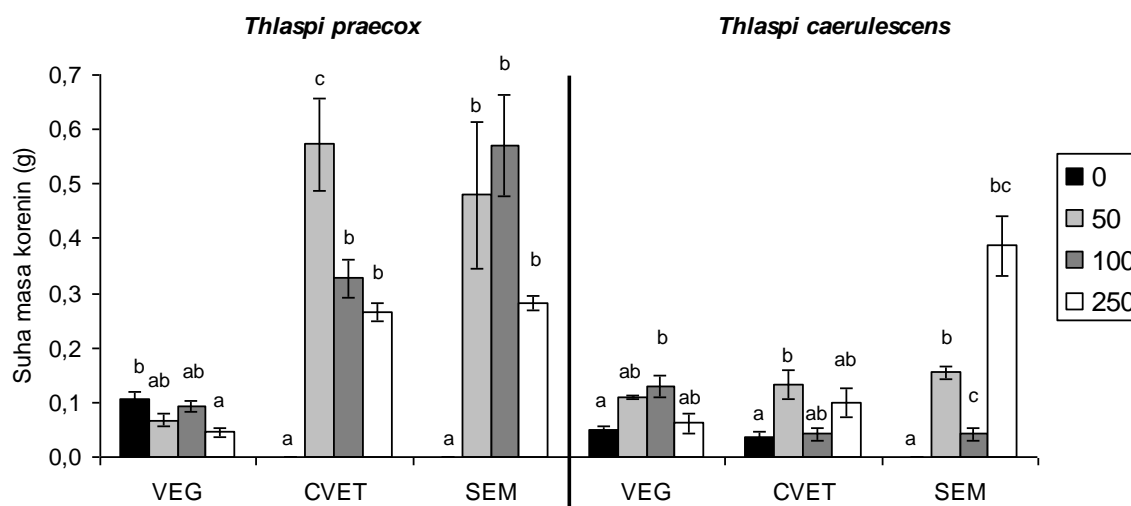
spremenljivki uporabili tretmaje (0, 50, 100, 250 mg Cd kg<sup>-1</sup>) in vrsti (*T. praecox* in *T. caerulescens*). Rezultati statistične analize so zbrani v Prilogi F. Vpliv tretmaja na merjene parametre smo nato ovrednotili z enosmerno ANOVO, statistično značilne razlike med tretmaji v posamezni fazi za vsako vrsto posebej pa s posthoc HSD testom pri  $p < 0.05$  in jih prikazali na grafih.

## 6 REZULTATI

### 6.1 VPLIV Cd V RASTNEM SUBSTRATU NA BIOMASO RASTLIN

#### 6.1.1 Biomasa korenin

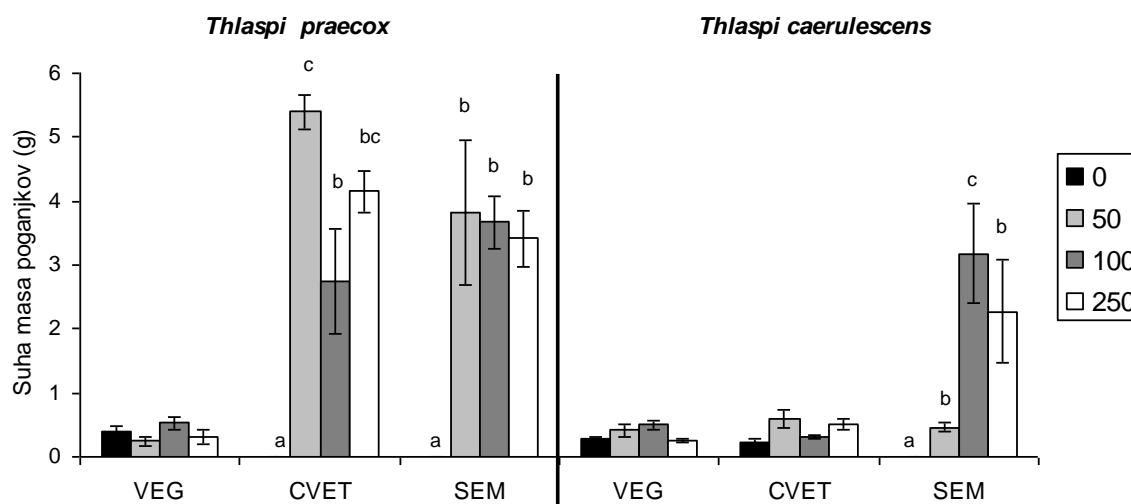
V vseh treh fazah je bila masa korenin med vrstama odvisna od koncentracije Cd v rastnem substratu (Priloga F). Obe vrsti sta povprečne najvišje biomase korenin dosegli v fazi semenitve (Slika 1). Vrsti sta se značilno razlikovali le v fazi cvetenja (Priloga F), kjer je vrsta *T. praecox* pri 50, 100 in 250 mg Cd kg<sup>-1</sup> v substratu dosegla bistveno večje biomase korenin kot vrsta *T. caerulescens*. Kontrolne rastline pri vrsti *T. praecox* so bile povzorčene le v vegetativni fazi, kasneje pa so propadle. Tudi pri vrsti *T. caerulescens* se je pri kontrolnih rastlinah rast skozi faze zmanjševala, dokončno pa so rastline propadle v fazi semenitve.



Slika 1: Suha masa korenin [g] v vegetativni fazi (VEG), fazi cvetenja (CVET) in fazi semenitve (SEM) pri različnih koncentracijah Cd v substratu (0 - kontrola, 50 – 50 mg Cd kg<sup>-1</sup>, 100 – 100 mg Cd kg<sup>-1</sup>, 250 - 250 mg Cd kg<sup>-1</sup>). Stolpci predstavljajo povprečno vrednost (n = 4) ± standardna napaka. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko, kjer je ta prisotna, za vsako vrsto posebej pri posamezni fazi (HSD test, p < 0,05).

### 6.1.2 Biomasa poganjkov

Pri obeh vrstah so bile biomase poganjkov v fazi cvetenja in semenitve odvisne od koncentracije Cd v substratu (Priloga F). Pri vrsti *T. praecox* so se biomase poganjkov pri vseh koncentracijah Cd v substratu močno povečale v fazi cvetenja, z viškom pri 50 mg Cd kg<sup>-1</sup> (Slika 2). V fazi semenitve so se rahlo zmanjšale (Slika 2). Pri vrsti *T. caerulescens* se je biomasa poganjkov povečala šele v fazi semenitve, v substratu z dodanim Cd. Vrsta je v primerjavi s *T. praecox*, dosegla značilno manjšo biomaso poganjkov ( $p < 0,05$ ), v fazi cvetenja in semenitve (Priloga F). Pri vrsti *T. caerulescens* ni bilo opaziti trendov spreminjanja biomas poganjkov skozi različne razvojne faze. Pri obeh vrstah se je biomasa poganjkov kontrolnih rastlin skozi faze razvoja zmanjševala, saj so rastline propadale (Slika 2).



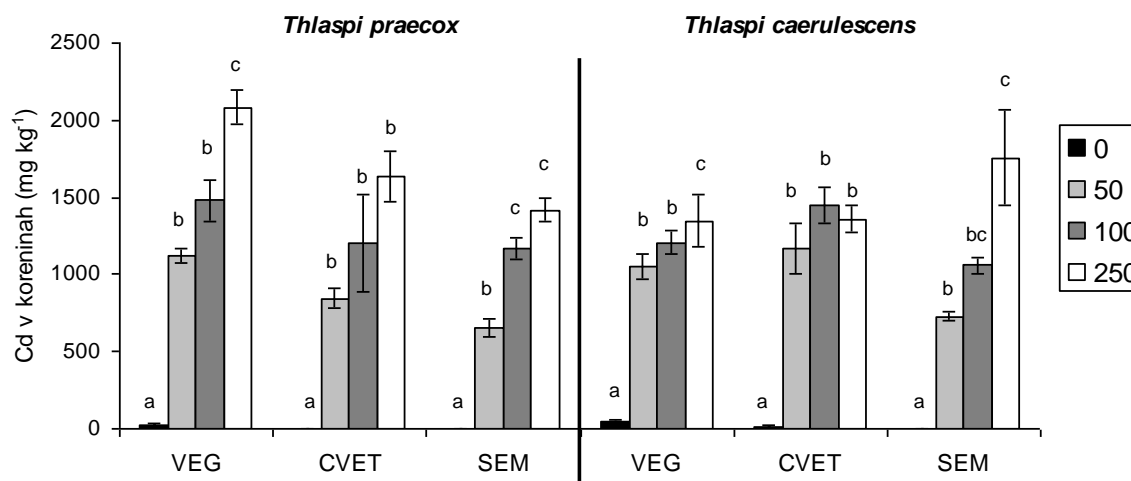
Slika 2: Suha masa poganjkov [g] v vegetativni fazi (VEG), fazi cvetenja (CVET) in fazi semenitve (SEM) pri različnih koncentracijah Cd v substratu (0 - kontrola, 50 – 50 mg Cd kg<sup>-1</sup>, 100 – 100 mg Cd kg<sup>-1</sup>, 250 - 250 mg Cd kg<sup>-1</sup>). Stolpci predstavljajo povprečno vrednost (n = 4) ± standardna napaka. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko, kjer je ta prisotna, za vsako vrsto posebej pri posamezni fazi (HSD test,  $p < 0,05$ ).

## 6.2. PRIMERJAVA KONCENTRACIJE Cd V RASTLINAH OBEH VRST V RAZLIČNIH RAZVOJINIH FAZAH

### 6.2.1 Koncentracija Cd v koreninah

Na koncentracijo Cd v koreninah so pri obeh vrstah vplivale koncentracije Cd v substratu (Priloga F). Koncentracije Cd v koreninah so se pri obeh vrstah značilno razlikovale le v

vegetativni fazi (Priloga F). Pri vrsti *T. praecox* so se koncentracije Cd v koreninah od vegetativne faze do faze semenitve pri vseh koncentracijah Cd v substratu zmanjševale. Pri posameznih fazah pa se je koncentracija akumuliranega Cd v koreninah povečevala s povečevanjem Cd v substratu (Slika 3). Slednji trend smo opazili tudi pri vrsti *T. caerulescens* v vegetativni fazi in fazi semenitve (Slika 3).

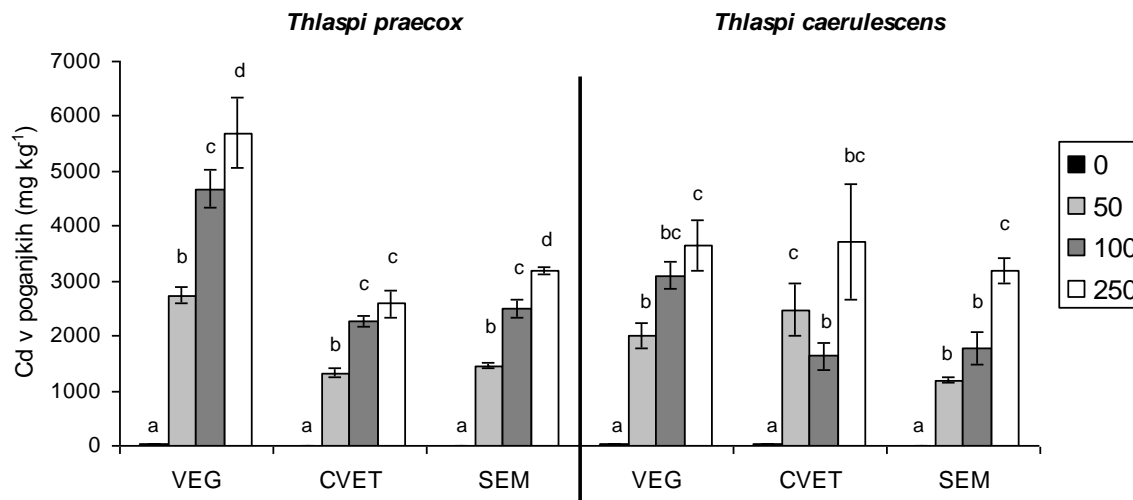


Slika 3: Koncentracija Cd v koreninah ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) v vegetativni fazi (VEG), fazi cvetenja (CVET) in fazi semenitve (SEM) pri različnih koncentracijah Cd v substratu (0 - kontrola, 50 – 50  $\text{mg Cd kg}^{-1}$ , 100 – 100  $\text{mg Cd kg}^{-1}$ , 250 - 250  $\text{mg Cd kg}^{-1}$ ). Stolpci predstavljajo povprečno vrednost ( $n = 4$ )  $\pm$  standardna napaka. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko, kjer je ta prisotna, za vsako vrsto posebej pri posamezni fazi (HSD test,  $p < 0,05$ ).

### 6.2.2 Koncentracija Cd v poganjkih

Koncentracija Cd v poganjkih se je medvrstno značilno razlikovala v vegetativni fazi, kjer je vrsta *T. praecox* dosegla večje vrednosti (Priloga F). Na koncentracijo Cd v poganjkih, je pri vseh fazah vplivala koncentracija Cd v substratu (Priloga F). Koncentracija Cd v poganjkih se je v posameznih razvojnih fazah pri obeh vrstah (izjema *T. caerulescens* v fazi cvetenja pri koncentraciji 100  $\text{mg Cd kg}^{-1}$  v substratu) povečevala, s povečevanjem koncentracije Cd v substratu (Slika 4). Pri vrsti *T. praecox* se je koncentracija Cd v poganjkih v fazi cvetenja v primerjavi z vegetativno fazo pri vseh tretmajih zmanjšala, v fazi semenitve pa se je koncentracija Cd v poganjkih spet povečala, vendar ni dosegla vrednosti iz vegetativne faze. Pri vrsti *T. caerulescens* se je koncentracija Cd v poganjkih v fazi cvetenja zmanjšala pri 100  $\text{mg Cd kg}^{-1}$  v substratu, sicer pa je ostala enaka kot v vegetativni fazi. V fazi semenitve se je akumulacija zmanjšala. Največja koncentracija je

bila dosežena pri vrsti *T. praecox*, v vegetativni fazi ( $5695 \pm 644 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ ), pri  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  Cd v substratu (Slika 4). V kontrolnih loncih so rastline po treh mesecih odmrle.



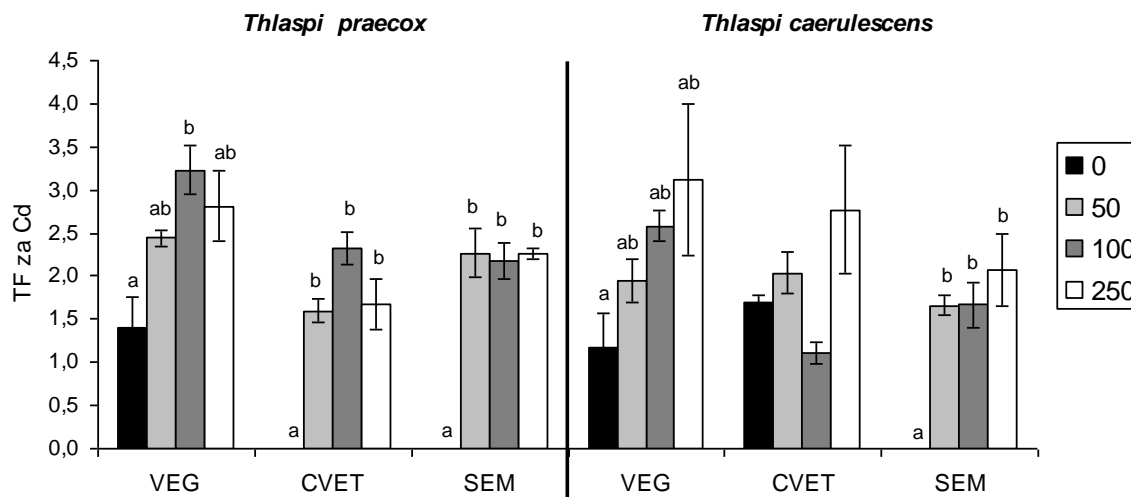
Slika 4: Koncentracija Cd v poganjkih ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) v vegetativni fazi (VEG), fazi cvetenja (CVET) in fazi semenitve (SEM) pri različnih koncentracijah Cd v substratu (0 - kontrola, 50 – 50  $\text{mg Cd kg}^{-1}$ , 100 – 100  $\text{mg Cd kg}^{-1}$ , 250 - 250  $\text{mg Cd kg}^{-1}$ ). Stolpci predstavljajo povprečno vrednost ( $n = 4$ )  $\pm$  standardna napaka. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko, kjer je ta prisotna, za vsako vrsto posebej pri posamezni fazi (HSD test,  $p < 0,05$ ).



### 6.3 TRANSLOKACIJSKI FAKTOR

Translokacijski faktor (TF) za Cd je bil neodvisen od vrste. Odvisen je bil od koncentracije Cd rastnem v substratu (Priloga F).

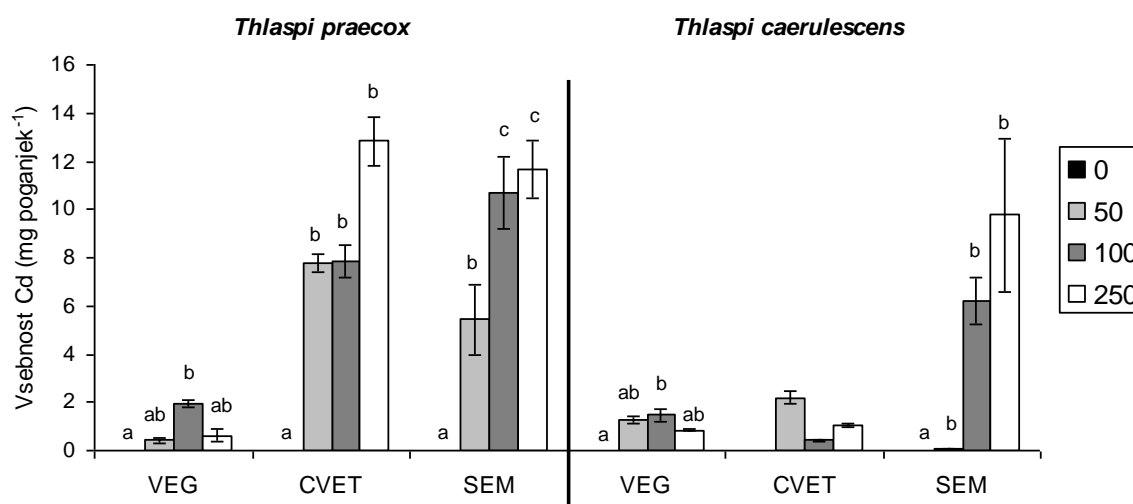
Vrednosti TF pri obeh vrstah presegajo mejno vrednost hiperakumulacije (TF > 1).



Slika 5: TF – translokacijski faktor za Cd v vegetativni fazi (VEG), fazi cvetenja (CVET) in fazi semenitve (SEM) pri različnih koncentracijah Cd v substratu (0 - kontrola, 50 – 50 mg Cd kg<sup>-1</sup>, 100 – 100 mg Cd kg<sup>-1</sup>, 250 - 250 mg Cd kg<sup>-1</sup>). Stolpci predstavljajo povprečno vrednost (n = 4) ± standardna napaka. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko, kjer je ta prisotna, za vsako vrsto posebej pri posamezni fazi (HSD test, p < 0,05).

#### 6.4 VSEBNOST Cd V POGANJKIH

Vsebnost Cd v poganjkih je bila pri obeh vrstah večja v substratu z dodanim Cd, v fazi cvetenja in semenitve (Slika 6). Vrsta *T. praecox* je v fazi cvetenja in semenitve dosegla značilno večje vsebnosti Cd ( $p < 0,01$ ) kot vrsta *T. caerulescens* (Priloga F). V kontrolnih rastlinah so bile vsebnosti Cd zelo majhne (Slika 6).



Slika 6: Vsebnost Cd v poganjkih (mg) v vegetativni fazi (VEG), v fazi cvetenja (CVET) in fazi semenitve (SEM) pri različnih koncentracijah Cd v substratu (0 - kontrola, 50 – 50 mg Cd kg<sup>-1</sup>, 100 – 100 mg Cd kg<sup>-1</sup>, 250 - 250 mg Cd kg<sup>-1</sup>). Stolpci predstavljajo povprečno vrednost (n = 4) ± standardna napaka. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko, kjer je ta prisotna, za vsako vrsto posebej pri posamezni fazi (HSD test,  $p < 0,05$ ).

## 7 RAZPRAVA

### 7.1. BIOMASA RASTLIN

#### 7.1.1 Biomasa korenin

Biomasa korenin (SM) se v vegetativni fazi in fazi semenitve ni medvrstno značilno statistično razlikovala, medtem ko je v fazi cvetenja vrsta *T. praecox* dosegla značilno večje ( $p < 0,01$ ) biomase v primerjavi z vrsto *T. caerulescens* (Priloga F). Razlike so verjetno posledica zakasnelega razvoja rastlin pri vrsti *T. caerulescens*. Biomasa korenin je bila v povprečju od 6,5-krat (*T. caerulescens*) do 10,5-krat (*T. praecox*) manjša od biomase poganjkov. Najvišje biomase korenin so dosegle rastline vrste *T. praecox* v fazi cvetenja in semenitve, ko je prišlo tudi do največje biomase poganjkov. Obe vrsti sta praviloma dosegli večje biomase pri koncentracijah 50, 100 in 250 mg Cd kg<sup>-1</sup> v rastnem substratu, v fazi cvetenja oz. semenitve. Vrsti očitno za uspešno rast potrebujeta povišano koncentracijo Cd v rastnem substratu. V kontrolnih poskusih, kjer ni bilo dodanega Cd, so rastline obeh vrst po treh mesecih odmrle.

Zaradi potreb hiperakumulacijskih vrst po večjih vsebnostih Zn v rastnem substratu, smo v vse rastne substrate smo poleg različnih koncentracij Cd dodali tudi po 100 mg Zn kg<sup>-1</sup>. Cd in Zn sta si kemijsko podobna (Mengel in Kirkbly, 2001). Cd se zato zaradi podobnosti z Zn, ki je esencialen element, lahko privzema. Zn in Cd sta tudi kompetitorja (Schmid, Hawfand, 1967; Chaney, 1973). Rastline na splošno privzemajo več Cd, če je koncentracija Zn manjša. Na splošno velja, da je Cd strupen in nima nobene fiziološke funkcije (Lane in Morel, 2000), vendar pa je Liu s sod. (2008) v poskusu potrdil boljšo rast vrste *T. caerulescens* ob prisotnosti Cd v substratu, saj naj bi le-ta imel pomembno vlogo pri fiksaciji CO<sub>2</sub>. Vzrok za propad kontrolnih rastlin v našem poskusu bi lahko bil v pomanjkanju Zn in Cd.

#### 7.1.2 Biomasa poganjkov

V vegetativni fazi se vrsti glede biomas poganjkov nista značilno razlikovali. Do razlik je prišlo v fazi cvetenja in semenitve, kjer je vrsta *T. praecox* pri vseh tretmajih dosegla večje biomase poganjkov kot vrsta *T. caerulescens*. Razlike so verjetno posledica prekinjene rasti rastlin vrste *T. caerulescens*. Biomasa poganjkov se je skozi razvojne faze povečevala. Pri vrsti *T. praecox* so bile največje vrednosti dosežene v fazi cvetenja in semenitve. Tudi naravne populacije rastlin vrste *T. praecox* nabrane iz Žerjava (Slovenija), so viške biomas poganjkov dosegle v fazi tvorjenja cvetov in med cvetenjem (Pongrac s sod., 2007). Vrsta *T. caerulescens* je povišanje biomas poganjkov dosegla šele v fazi semenitve. Skozi razvojne faze je bilo pri vrsti *T. caerulescens* opaziti nihanja v biomas

poganjkov. V fazi semenitve je povprečna masa poganjkov pri vrsti *T. praecox* padla, pri *T. caerulescens* pa narasla.

Pri vrsti *T. praecox* se je s povečanjem koncentracij Cd v substratu, povečala tudi biomasa poganjkov, vendar pa so učinki različni. V fazi cvetenja se je za najbolj optimalno koncentracijo izkazalo 50 mg Cd kg<sup>-1</sup> v substratu, v fazi semenitve pa 50, 100 in 250 mg Cd kg<sup>-1</sup>. Pri vrsti *T. caerulescens* so bile največje biomase poganjkov dosežene v fazi semenitve pri 50, 100 in 250 mg Cd kg<sup>-1</sup> v substratu. Da se ob dodatku Cd biomasa poganjkov pri vrsti *T. caerulescens* lahko poveča za 32-57%, je ugotovil tudi Liu s sod. (2008), ko so v poskusu pri tretmajih od 5-500 mg Cd kg<sup>-1</sup> v substratu, izmerili povišanje biomas poganjkov. Cd naj bi imel pri vrsti *T. caerulescens* pozitiven učinek na večjo rast rastlin, vendar pa se to ne opazi v vsakem poskusu. Razlike so lahko posledica različnega načina gojenja rastlin (na hidroponiki oz. v lončkih) (Liu s sod., 2008). Pri vrsti *T. caerulescens* so ugotovili, da povečane koncentracije Cd v substratu, povečajo tudi aktivnost ogljikove anhidraze, ki katalizira notranjo pretvorbo CO<sub>2</sub> in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in je pomembna pri fiksaciji CO<sub>2</sub> v C<sub>4</sub> rastlinah (Roosens s sod. 2003; Yanai s sod., 2006). Da obe vrsti bolje uspevata ob dodatku Cd v substratu, smo potrdili tudi v našem poskusu. Obe vrsti sta za uspešno zaključen življenjski cikel potrebovali Cd v substratu. Rastline obeh vrst v kontrolah so imele statistično značilno manjšo biomaso ( $p < 0,01$ ) (Priloga F) v primerjavi z ostalimi tretmaji in so še pred fazo semenitve propadle.

## 7.2 AKUMULACIJA Cd

### 7.2.1 Koncentracija Cd v koreninah

Z izjemo kontrolnih rastlin v vegetativni fazi pri vrsti *T. caerulescens*, koncentracije Cd v koreninah pri obeh vrstah niso presegle vrednosti koncentracij Cd v poganjkih. Koncentracije Cd v koreninah pri posamezni fazi, so se pri obeh vrstah, z večanjem koncentracij Cd v substratu praviloma povečevale. Pri vrsti *T. praecox* so bile največje vrednosti dosežene v vegetativni fazi, v fazi cvetenja so se koncentracije pri vseh tretmajih zmanjšale. Trend zmanjševanja se je nadaljeval tudi do faze semenitve. Pri vrsti *T. caerulescens* so se koncentracije Cd v koreninah v primerjavi z vegetativno fazo, v fazi cvetenja povečale, v fazi semenitve so se zmanjšale.

### 7.2.2 Koncentracija Cd v poganjkih

Akumulacija Cd v poganjkih se je v vseh razvojnih fazah (izjema pri *T. caerulescens* v fazi cvetenja pri koncentraciji 100 mg Cd kg<sup>-1</sup> v substratu), povečevala s povečevanjem koncentracije Cd v substratu. Tudi Lombi s sod. (2000) in Vogel-Mikuš s sod. (2005) so v svojih poskusih prišli do enakih rezultatov. Pri vrsti *T. praecox* se je koncentracija Cd v poganjkih, v fazi cvetenja zmanjšala, po fazi cvetenja se je koncentracija Cd spet povečala, vendar pa ni dosegla vrednosti iz vegetativne faze. Pri vrsti *T. caerulescens* nismo zaznali tako izrazitih trendov, kar je bila najverjetneje posledica že omenjene začasne ustavitve rasti rastlin. Upad privzema Cd v poganjkih v fazi cvetenja in semenitve pri vrsti *T. praecox*, je potrdila tudi Pongrac s sod. (2007). Manjše vrednosti Cd v poganjkih v reproduktivni fazi (faza cvetenja oz. semenitve) so posledica manjšega transporta Cd iz korenin v poganjke in translokaciji Cd v stebila (rastline so omejile privzem Cd iz substrata in ga intenzivno transportirale iz rozetnih listov v stebila). Vendar pa smo v našem primeru v fazi semenitve ponovno zaznali povišanje akumulacije Cd v poganjkih, kar pa bi lahko pripisali naši razdelitvi cikla rastlin na tri faze. Po cvetenju smo namreč analizirali le še fazo semenitve. Zadnja faza je bila torej pobrana in analizirana zelo pozno, saj smo čakali, da bodo rastline tvorile semena. V to fazo so bili verjetno že vključeni začetni procesi senescence, zato so naše tkivne vrednosti Cd v poganjkih odstopale od zgoraj navedenega poskusa. Najvišja koncentracija Cd v poganjkih je bila dosežena pri vrsti *T. praecox* v vegetativni fazi (5695 ± 644 mg Cd kg<sup>-1</sup>), pri 250 mg Cd kg<sup>-1</sup> v substratu. Tudi Pongrac s sod. (2007) navajajo najvišje koncentracije v vegetativni fazi v rozetnih listih.

Akumulacija Cd je bila značilno večja pri vrsti *T. praecox* v vegetativni fazi ( $p < 0,01$ ) (Priloga F). V vegetativni fazi so bile tudi sicer pri obeh vrstah dosežene največje vrednosti. Za vrsto *T. caerulescens* smo pričakovali večje koncentracije Cd v poganjkih, saj so bile največje dosežene vrednosti do 14187 mg Cd kg<sup>-1</sup> (Lombi s sod. 2000). Tudi Xing s sod. (2007) navajajo *T. caerulescens* (ekotip Ganges) kot najboljšo hiperakumulacijsko vrsto za Cd. Vseeno pa so rastline v našem poskusu dosegle večje tkivne koncentracije Cd od 2000 mg Cd kg<sup>-1</sup>, ki jo je kot platojsko koncentracijo določil Robinson s sod. (1998). Rezultati našega poskusa so podobni poskusu, kjer je Liu s sod. (2008) primerjal koncentracijo Cd v poganjkih pri *T. caerulescens* ob različnih koncentracijah dodanega Cd v rastnem substratu. Koncentracija Cd v poganjkih se je hitro povečevala in dosegla plato pri 3000 mg Cd kg<sup>-1</sup>. V našem poskusu sta obe vrsti prav tako že v vegetativni fazi pri enaki koncentraciji (100 mg Cd kg<sup>-1</sup> v substratu) dosegli oz. presegli slednjo vrednost. Tudi v substratu z 250 mg Cd kg<sup>-1</sup>, so koncentracije Cd v poganjkih še vedno naraščale. V fazi cvetenja in semenitve rastline obeh vrst v poganjkih koncentracij nad 3000 mg Cd kg<sup>-1</sup> niso dosegle.

### 7.2.3 Vpliv daljšega časa rasti obeh vrst na akumulacijo Cd

Poskus je pokazal, da pri večjih koncentracijah Cd (50, 100 in 250 mg kg<sup>-1</sup>) v rastnem substratu obe vrsti lahko akumulirata največje koncentracije Cd v poganjkih že v vegetativni fazi, oz. po treh mesecih rasti. V fazi cvetenja (po 5 oz. 6 mesecih rasti) smo pri vrsti *T. praecox* v poganjkih izmerili najmanjše koncentracije Cd, kar je posledica omejenega transporta Cd v poganjke, intenzivne translokacije Cd v stebela in povečanja biomase rastlin v fazi cvetenja. V fazi semenitve (po 7 mesecih rasti) se je koncentracija Cd v poganjkih ponovno povečala, vendar pa vrednosti iz vegetativne faze niso bile dosežene. Da večji privzem Cd ni povezan z daljšim časom rasti rastlin, je v poskusu potrdil tudi McGrath s sod. (2006), kjer med rastlinami (*T. caerulescens*), ki so rasle od 3 do 9 mesecev ni prišlo do značilnih sprememb v količini privzema Cd.

### 7.3 TRANSLOKACIJSKI FAKTOR (TF)

Na velikost TF pri obeh vrstah je vplivala koncentracija Cd v rastnem substratu. Pri obeh vrstah, pri koncentracijah 50, 100 in 250 mg Cd kg<sup>-1</sup> v substratu, je bil TF > 1, kar kaže na uspešno transportiranje Cd iz korenin v poganjke. Značilno najvišje vrednosti TF so bile pri obeh vrstah dosežene v vegetativni fazi (Priloga F). Vrsti sta imeli pri posamezni koncentraciji Cd v substratu najmanjši TF v fazi cvetenja, saj se je takrat omejila akumulacija Cd v cvetne poganjke. Vrsta *T. praecox* je imela v vegetativni fazi in v fazi semenitve večji TF kot vrsta *T. caerulescens*, vendar pa razlike niso statistično različne. Statistično značilne razlike med vrstama in s tem dokaz, da ima vrsta *T. praecox* učinkovitejše mehanizme premeščanja Cd iz korenin v poganjke, pa je potrdil Xing s sod. (2007), kjer so v poskusu primerjali sposobnost translokacije Cd pri različnih populacijah rodu *Thlaspi*. Vrednosti TF v našem poskusu pa so v primerjavi z analizami, narejenimi na onesnaženem rastišču v Žerjavu, še vedno precej nizke. Tam je TF za vrsto *T. praecox* znašal 5,6 (Vogel-Mikuš s sod., 2005).

### 7.4 VSEBNOST Cd V POGANJKIH

Večina Cd se je akumuliralo v poganjkih (30 - 64 %). Tudi Wójcig s sod. (2005) navaja, da se v poganjke lahko privzame do 74 % vsega akumuliranega Cd. Večje vsebnosti Cd v poganjkih so bile pri obeh vrstah dosežene v fazi cvetenja in semenitve. Vrsti sta se značilno razlikovali v fazi cvetenja in semenitve, kjer je vrsta *T. praecox* dosegla večje vsebnosti Cd pri 50, 100 in 250 mg Cd kg<sup>-1</sup> v substratu. V kontrolnih rastlinah so bile vsebnosti Cd pri obeh vrstah zelo majhne.

#### 7.5 HIPERAKUMULACIJSKE SPOSOBNOSTI VRST *T. praecox* IN *T. caerulescens*

Pri obeh vrstah smo potrdili hiperekumulacijske značilnosti, saj je bila razen v kontrolnih poskusih, presežena mejna hiperakumulacijska vrednost  $100 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ SM}$ , katero je določil Baker s sod. (1984). Kontrolnim rastlinam, ki so rasle v substratu brez dodanega Cd, so se v fazi cvetenja in semenitve pojavili znaki kot so: ustavljena rast in razvoj rastlin, rumenenje in sušenje starejših in mladih listov ter zvijanje listov, kar kaže na to, da je rastlinam primanjkovalo Cd. Da naj bi Cd povečal aktivnost ogljikove anhidraze in s tem rast rastlin, so predvidevali tudi Liu s sod. (2008). Tudi naš poskus je potrdil, da obe vrsti za uspešno zaključen cikel potrebujejo prisotnost Cd v substratu.

## 8 SKLEPI

- V kontroliranih pogojih smo ob dodatku različnih koncentracij Cd uspeli vzgojiti rastline vrste *T. caerulescens* (ekotip Ganges) in *T. praecox* (populacija Žerjav).
- Biomasa obeh vrst se je povečevala do faze cvetenja. V fazi semenitve pa se je biomasa poganjkov v nekaterih primerih povečala, v nekaterih pa zmanjšala.
- Vrsti sta za uspešno rast potrebovali povečano koncentracijo Cd v rastnem substratu, saj so v kontrolnih poskusih brez dodanega Cd rastline obeh vrst po treh mesecih odmrle.
- Vrsta *T. praecox* je glede na maso poganjkov praviloma enako dobro uspevala ob dodatku 50, 100 in 250 mg Cd kg<sup>-1</sup> v substratu.
- Potrdili smo hiperakumulacijske sposobnosti za Cd pri obeh vrstah, saj smo v poganjkih izmerili več kot 100 mg Cd kg<sup>-1</sup> SM.
- Akumulacija Cd v poganjkih se je v vseh razvojnih fazah (izjema pri vrsti *T. caerulescens* v fazi cvetenja pri koncentraciji 100 mg Cd kg<sup>-1</sup> v substratu), povečevala s povečevanjem koncentracije Cd v substratu.
- Večji del Cd se je akumuliral v poganjkih. Koncentracije Cd v poganjkih so bile pri obeh vrstah največje v vegetativni fazi, v fazi cvetenja so se zaradi omejenega privzema Cd iz substrata, omejene translokacije iz korenin v poganjke ter povečane mase poganjkov, zmanjšale. V fazi semenitve, se je privzem Cd ponovno povečal, vendar vrednosti iz vegetativne faze niso bile dosežene.
- V vegetativni fazi je vrsta *T. praecox* v poganjkih pri vseh tretmajih akumulirala več Cd kot vrsta *T. caerulescens*.
- Vsebnosti Cd v poganjkih so pri obeh vrstah skozi različne razvojne faze praviloma ves čas naraščale. Višje vsebnosti Cd so bile pri obeh vrstah dosežene v fazi cvetenja in semenitve.
- Vsebnost Cd v poganjkih se je med vrstama razlikovala v fazi cvetenja in semenitve, kjer je vrsta *T. praecox* dosegla večje vsebnosti Cd v primerjavi z vrsto *T. caerulescens*.
- Translokacijski faktor je bil pri vseh tretmajih odvisen od koncentracije Cd v substratu. TF je bil pri obeh vrstah večji od 1, kar potrjuje dobre mehanizme translokacije Cd iz korenin v poganjke. TF se med vrstama ni značilno razlikoval.



## 9 POVZETEK

V kontroliranih razmerah smo ob dodatku različnih koncentracij Cd (0, 50, 100, 250 mg Cd kg<sup>-1</sup>) v substratu vzgojili rastline vrste *T. praecox* (populacija Žerjav) in *T. caerulescens* (Ganges). Rastline smo povzorčili v vegetativni fazi, fazi cvetenja in semenitve ter analizirali značilnosti posamezne faze določene vrste. Rastline smo ločili na korenine, poganjke in poganjke s cvetovi, jih stehtali, material uprašili ter mineralizirali z mešanico kislin. Z atomsko absorpcijsko spektroskopijo (AAS) smo izmerili celokupne koncentracije Cd v rastlinskih vzorcih. Poskus je pokazal, da so koncentracije Cd v substratu pomembno vplivale na rast in razvoj rastlin. Vrsta *T. praecox* je v fazi cvetenja in semenitve dosegla večje biomase kot vrsta *T. caerulescens*. Največje biomase poganjkov so bile dosežene pri vrsti *T. praecox*, v fazi cvetenja pri 50 mg Cd kg<sup>-1</sup> in v fazi semenitve pri 50, 100 in 250 mg Cd kg<sup>-1</sup> v substratu. Biomasa rastlin se je povečevala do faze cvetenja, v fazi semenitve se je v nekaterih primerih povečala, v nekaterih pa zmanjšala. Kontrolne rastline obeh vrst so po vegetativni fazi začele propadati. Vrsti pri nobeni koncentraciji Cd v substratu nista kazali znakov zastrupitve s Cd.

Koncentracija Cd v poganjkih se je v vseh razvojnih fazah (izjema pri vrsti *T. caerulescens* v fazi cvetenja pri koncentraciji 100 mg Cd kg<sup>-1</sup> v substratu), povečevala s povečevanjem koncentracije Cd v substratu. Najvišje vrednosti privzema Cd sta vrsti tako dosegli že v vegetativni fazi (po treh mesecih rasti), kjer se je *T. praecox* pokazal kot uspešnejša hiperakumulacijska vrsta. Obe vrsti sta zelo uspešno transportirali Cd iz korenin v poganjke, saj je TF povsod presegal mejo za hiperakumulacijo (TF > 1).

Z dolžino rastne sezone, so se vsebnosti Cd pri obeh vrstah praviloma povečevale. Višje vsebnosti Cd so bile dosežene v fazi cvetenja in semenitve.

Vrsta *T. praecox* je v primerjavi z vrsto *T. caerulescens* v fazi cvetenja in semenitve dosegla večje biomase poganjkov ter večje vsebnosti Cd v poganjkih. Tudi v vegetativni fazi, kjer so bile vrednosti akumulacije Cd v poganjkih največje, je vrsta *T. praecox* akumulirala več Cd.

Čeprav Cd ni esencialen element, sta vrsti povečevali biomaso poganjkov ter uspešno zaključiti življenjski cikel le ob prisotnosti Cd v substratu.

## 10 LITERATURA

- Adriano D.C. 2001. Trace Elements in Terrestrial Environments – Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals. Springer Verlag, Berlin: 10-11, 264-349, 349-410
- 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 a. 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 excludes-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., 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
- Baker A.J.M., Reeves R.D., McGrath S.P., Smith J.A.C. 2000. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biochemical resource for phytoremediation of metal-polluted soils. V: Terry N, Bañuelos G. Phytoremediation of contaminated soil and water. Boca Raton, FL, USA: Lewis Publishers: 85-107
- Basic N., Salamin N., Keller C., Galland N., Besnard G. 2006. Cadmium hyperaccumulation and genetic differentiation of *Thlaspi caerulescens* populations. *Biochemical Systematics and Ecology* 34: 667-677
- Bhatia N.P., Orlic I., Siegele R., Ashwath N., Baker A.J.M., Walsh K.B. 2004. Quantitative cellular localisation of nickel in leaves and stems of the hyperaccumulator plant *Stackhousia tryonii* Bailey using nuclear-microprobe (Micro-PIXE) and energy dispersive X-ray microanalysis (EDXMA) techniques. *Functional Plant Biology* 31: 1-14

Bohinc Natalija: Onesnaževanje tal

<http://www.kemija.org/index.php?option=content&task=view&id=225> (13.3.2008)

Chaney R.L. 1973. Crop and food chain effects of toxic elements in sludges and effluents. Proceedings of the Joint Conference on Recycling Municipal Sludges and Effluents on Land. National Association of State Universities and Land-Grant colleges, Washington, D.C., str 129-141

Cosio C., DeSantes L., Frey B., Diallo S., Keller C. 2005. Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*. Journal of Experimental Botany 56: 765-775

Ernst W.H.O., Verkleij J.A.C., Schat H. 1992. Metal tolerance in plants. Acta Botanica Neerlandica 41(3): 229-248

Escaré J., Lefébrve 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

European Commission, 2001. Commission Regulation (EC) št. 466/2001 of March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Communities 77: 1-13

Fischerová Z., Tlustoš P., Száková J., Šichorová K. 2006. A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. Environmental Pollution 144: 93-100

Greger M.: Metal availability and bioconcentration in plants. V: Prasad M.N.V., Hagenmeyer J., 1999. Heavy metal stress in plants. From molecules to ecosystems. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 1-27

Irwin R.J., VanMouwerik M., Stevens L., Seese M.D., Basham W. 1997. Environmental Contaminants Encyclopedia, National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado. Distributed within the Federal Government as an Electronic Document (<http://www.nature.nps.gov/hazardssafety/toxic/cadmium.pdf>) (12.12.2007)

- Jiang X.J., Luo Y.M., Zhao Q.G., Baker A.J.M., Christie P., Wong M.H. 2003. Soil Cd availability to Indian mustard and environmental risk following EDTA addition to Cd-contaminated soil. *Chemosphere* 50: 813-818
- Küpper F., Zhao F.J., McGrath S.P. 2001. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* 119: 305-311
- Lane T.W., Morel F.M.M. 2000. A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proceedings of the National Academy Sciences USA* 97: 4627-4631
- Liu M.Q., Yanai J., Jiang R., Zhang F., McGrath S.P., Zhao F. J. 2008. Does cadmium play a physiological role in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*? *Chemosphere* 71: 1276-1283
- Llugany M., Lombini A., Poschenrieder C., Barceló 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.D., Sacchi G.A. 2001. Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. *New Phytologist*. 149: 53-60
- Ma J.F., Ueno D., Zhao F.J., McGrath S.P., 2005. Subcellular localisation of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulator ecotype of *Thlaspi caerulescens*. *Planta*. 220: 731-736
- Macnair M.R., Bert V., Huitson S.B., Saumitou-Laprade P., Petit D. 1999. Zinc tolerance and hyperaccumulation are genetically independent characters. *Proceeding of the Royal Society, London, Series B* 266: 2175-2179
- Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Ravnik V., Podobnik A., Turk B., Vreš B. 1999. Mala flora Slovenije, 388-389. Tretja izdaja. Tehniška založba Slovenije. Ljubljana

- McGrath S.P. 1998. Phytoextraction for soil remediation. V: Brooks R.R., ed. Plants that hyperaccumulate heavy metals. Wallingford, UK: CAB International, 261-287
- McGrath S.P., Zhao F.J. 2003. Phytoextraction of metals, metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 277-282
- McGrath S.P., Lombi E., Gray C.W., Caille N., Dundam S.J., Zhao F.J. 2006. Field evaluation of Cd and Zn phytoextraction potential by the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri*. *Environmental Pollution* 141: 115-125
- McLaughlin M.J., Singh B.R. 1999. Cadmium in soils and plants. *Developments in Plant and Soil Sciences*. Kluwer Academic Publishers, London: 271
- Mengel K., Kirkby E.A. 2001. Principles of Plant Nutrition. Peta izdaja Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, str. 849
- Persans M.W., Salt D.E. 2000. Possible molecular mechanisms involved in nickel, zinc and selenium hyperaccumulation in plants. *Biotechnology & genetic engineering reviews* 17: 389-413
- 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 Science* 21: 539-566
- Pollard A.J., Baker A.J.M. 1996. The quantitative genetics of zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* 132: 113-118
- Pongrac P. 2004. Privzem in lokalizacija Zn, Cd in Pb pri ranem mošnjaku (*Thlaspi praecox* Wulf.), Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Mentor: prof.dr. Marjana Regvar
- Pongrac P., Vogel-Mikuš K., Kump P., Nečemer M., Torá R., Poschenrieder C., Barceló, J., Regvar M. 2007. Changes in elemental uptake and arbuscular mycorrhizal colonisation during the life cycle of *Thlaspi praecox* Wulfen. *Chemosphere* 69: 1602-1609
- Prasad M.N.V. 1999. Heavy metal stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems, second ed. Springer-Verlag., Berlin-Heidelberg 401

- Rauser W.E. 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochem. Biophys.* 31: 19-48
- Reeves R.D., Brooks, R.R. 1983. Hyperaccumulation of lead and zinc by two metallophytes from mining areas of central Europe. *Environmental pollution seriea A, Ecological and Biological* 31 (4): 277-285
- Robinson B.H., Leblanc M., Petit D., Brooks R.R., Kirkman J.H., Gregg P.E.H. 1998. The potential of *Thlaspi caerulescens* for phytoremediation of contaminated soil. *Plant and Soil* 203: 47-56
- 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., Raskin I. 1998. Phytoremediation. *Plant Physiology* 49: 643-668
- Sanita di Toppi L., Gabrielli R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Journal of Experimental Botany* 41: 105-130
- Schmid W.E., Hawfand L.R., 1967. Uptake and translocation of zinc by intact plants. *Plant and Soil* 27: 249-260
- Seregin I.V., Ivanov V.B. 2000. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian journal of plant physiology* 48: 523-544
- Tolrá R., Poschenbrieder C., Barceló J. 1996. Zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*: Influence on growth and mineral nutrition. *Journal of Plant Nutrition* 19 (12): 1531-1540
- Vazquez M.D., Barceló J., Poschenrieder C., Madico J., Hatton P., Baker A.J.M., Cope G.H. 1992. Localization of zinc and cadmium in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), a metallophyte that can hyperaccumulate both metals. *Journal of Plant Physiology* 140: 350-355

- 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. Simčič J., Pelicon P., Budnar M., Povh B., Regvar M. 2007. Localisation and quantification of elements within seeds of Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi praecox* by micro-PIXE. *Environmental pollution* 147: 50-59
- Wójcik M., Vangrosnveld J., Tukiendorf A. 2005. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens* I. Growth parameters, metal accumulation and phytochelatin synthesis in response to cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 53 (2005): 151-161
- Xing J.P., Jiang R.F., Ueno D., Ma J.F., McGrath S.P., Zhao F.J. 2007. Variation in root-to-shoot translocation of cadmium and zinc among different accessions of the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi praecox*. *New Phytologist* 178 (2): 315-325
- Yanai J., Zhao F.J., McGrath S.P., Kosaki T. 2006. Effect of soil characteristics on Cd uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Environmental Pollution* 139: 167-175

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se svoji mentorici prof. dr. Marjani Regvar, ki mi je omogočila izdelavo diplomske naloge.

Posebna zahvala gre dr. Katarini Vogel-Mikuš in Pauli Pongrac, ki sta me s svojimi napotki usmerjali in mi pomagali pri interpretaciji rezultatov.

Paula, hvala za pomoč pri delu z atomskim absorpcijskim spektrometrom, koristne nasvete in vzpodbude.

Hvala Mileni za pomoč pri zalivanju rastlin, nasvete in optimizem.

Hvala staršem, sestri Anji in Erniju, ki so mi stali ob strani in me podpirali.



## PRILOGA A

### **Hranilna raztopina za rod *Thlaspi***

Sestavina hranilne raztopine za rod *Thlaspi* je povzeta po Tolrá in sod. (1996)

Tabela 1: Sestava založnih raztopin

<b>MAKROELEMENTI</b>	<b>c [mM]</b>	<b>[mg/mol]</b>	<b>m [g] za 1000 ml</b>	<b>m [g] za 1000 ml 50 x konc.</b>
<b>Založna raztopina 1</b>				
KNO <sub>3</sub>	3	101	0,303	15,15
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	114,98	0,115	5,75
<b>Založna raztopina 2</b>				
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * 4H <sub>2</sub> O	2	236,1	0,4722	23,61
<b>Založna raztopina 3</b>				
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,5	246,38	0,1232	6,16
<b>MIKROELEMENTI</b>	<b>c [mM]</b>	<b>[mg/mol]</b>	<b>m [g] za 1000 ml</b>	<b>m [g] za 1000 ml 50 x konc.</b>
<b>Založna raztopina 4</b>				
Fe EDTA	66	367,05	0,024225	2,42
<b>Založna raztopina 5</b>				
KCl	50	74,55	0,003728	0,3728
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	46	61,81	0,002843	0,2843
MnSO <sub>4</sub> * 4H <sub>2</sub> O	9	197,84	0,001718	0,1781
ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,5	287,62	0,000431	0,0431
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	1,5	249,62	0,000374	0,0374
(NH <sub>4</sub> )Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,14	241,95	0,00003387	0,003387

### **Hranilna raztopina za rod *Thlaspi***

Tabela 2: Priprava hranilne raztopine

V poskusu smo uporabili tekočino za zalivanje

	<b>50 x koncentrirana raztopina makroelementov (založna raztopina 1, 2, 3)</b>	<b>1000 x koncentrirana Fe EDTA (založna raztopina 4)</b>	<b>1000 x koncentrirana raztopina mikronutrientov (založna raztopina 5)</b>
HIDROPONIKA	20 ml na 1000 ml	1 ml na 1000 ml	1 ml na 1000 ml
ZALIVANJE	40 ml na 1000 ml	2 ml na 1000 ml	2 ml na 1000 ml

## **PRILOGA B:**

### **Biomasa rastlin za *Thlaspi praecox***

Tabela 1: Biomasa rastlin

SM – suha masa

/ - ni podatkov zaradi propada rastlin

	VEGETATIVNA FAZA		FAZA CVETENJA		FAZA SEMENITVE	
	SM poganjkov [g]	SM korenin [g]	SM poganjkov [g]	SM korenin [g]	SM poganjkov [g]	SM korenin [g]
tretma [mg Cd kg <sup>-1</sup> ]						
0	0,48	0,15	/	/	/	/
0	0,34	0,09	/	/	/	/
0	0,57	0,11	/	/	/	/
0	0,25	0,08	/	/	/	/
50	0,05	0,05	6,14	0,78	5,43	0,67
50	0,48	0,09	5,23	0,69	/	/
50	0,23	0,09	5,51	0,37	2,21	0,29
50	0,21	0,04	4,70	0,45	/	/
100	0,31	0,10	0,32	0,42	3,35	0,69
100	0,44	0,06	3,01	0,24	4,47	0,55
100	0,81	0,11	2,75	0,29	4,41	0,28
100	0,54	0,10	4,94	0,36	2,44	0,76
250	0,07	0,03	4,21	0,29	2,81	0,29
250	0,58	0,03	3,16	0,28	3,61	0,24
250	0,16	0,05	4,21	0,28	4,76	0,29
250	0,43	0,07	5,03	0,21	2,47	0,31

## PRILOGA C:

### Biomasa rastlin za *Thlaspi caerulescens*

Tabela 1: Biomasa rastlin

SM – suha masa

/ - ni podatkov zaradi propada rastlin

tretma [mg Cd kg <sup>-1</sup> ]	VEGETATIVNA FAZA		FAZA CVETENJA		FAZA SEMENITVE	
	SM poganjkov [g]	SM korenin [g]	SM poganjkov [g]	SM korenin [g]	SM poganjkov [g]	SM korenin [g]
0	0,19	0,04	0,33	0,10	/	/
0	0,20	0,03	0,12	0,06	/	/
0	0,36	0,06	0,20	0,05	/	/
0	0,33	0,07	0,28	0,03	/	/
50	0,47	0,11	0,75	0,17	0,62	0,18
50	0,69	0,12	0,91	0,18	0,37	0,15
50	0,35	0,11	0,53	0,14	0,32	0,12
50	0,16	0,10	0,19	0,04	0,54	0,17
100	0,75	0,17	0,33	0,01	3,58	0,89
100	0,51	0,17	0,20	0,03	/	/
100	0,42	0,10	0,36	0,06	4,58	0,46
100	0,32	0,08	0,33	0,07	1,36	0,31
250	0,19	0,11	0,40	0,07	0,61	0,24
250	0,32	0,01	0,78	0,18	1,13	0,47
250	0,16	0,05	0,34	0,04	2,54	0,51
250	0,35	0,08	0,53	0,11	4,80	0,33

## **PRILOGA D:**

### **Koncentracije Cd v poganjkih in koreninah**

Tabela 1: Vrednosti AAS za *Thlaspi praecox*

/ - ni podatkov zaradi propada rastlin

tretma [mg Cd kg <sup>-1</sup> ]	VEGETATIVNA FAZA		FAZA CVETENJA		FAZA SEMENITVE	
	c Cd v pog.	c Cd v kor.	c Cd v pog.	c Cd v kor.	c Cd v pog.	c Cd v kor.
0	36,9	22,1	/	/	/	/
0	23,4	38,9	/	/	/	/
0	28,2	29,4	/	/	/	/
0	48,9	20,3	/	/	/	/
50	2841	1256	1196	967	1378	734
50	3149	1153	1382	685	/	/
50	2534	1028	1571	972	1533	575
50	2441	1054	1173	760	/	/
100	5786	1481	2299	1167	2126	1117
100	3892	1309	2377	626	2626	1406
100	4752	1923	2496	2249	2996	1032
100	4295	1206	1919	780	2270	1114
250	3669	2392	2990	1675	3224	1435
250	7240	2008	1764	1623	3302	1570
250	6053	1774	2575	2087	2961	1190
250	5818	2159	2993	1157	3292	1483

## PRILOGA E:

### Koncentracije Cd v poganjkih in koreninah

Tabela 1: Vrednosti AAS za *Thlaspi caerulescens*

/ - ni podatkov zaradi propada rastlin

tretma [mg Cd kg <sup>-1</sup> ]	VEGETATIVNA FAZA		FAZA CVETENJA		FAZA SEMENITVE	
	c Cd v pog.	c Cd v kor.	c Cd v pog.	c Cd v kor.	c Cd v pog.	c Cd v kor.
0	21,4	97,6	20,4	13,3	/	/
0	24,8	14,5	21,5	12,2	/	/
0	19,6	30,0	42,0	22,2	/	/
0	48,0	22,4	22,8	14,7	/	/
50	2299	1249	2905	1566	1234	790
50	2188	818	2997	1235	1199	765
50	1232	984	3173	1231	1307	641
50	2324	1163	829	641	1058	719
100	3651	1194	965	1062	2113	999
100	3530	1366	2219	1453	/	/
100	2672	1297	1894	1652	1056	996
100	2538	966	1433	1640	2173	1184
250	4487	1591	2082	1416	1757	1757
250	2604	1539	7314	1425	3518	1428
250	4665	771	3111	1061	3234	2740
250	2829	1489	2336	1526	3568	1100

## **PRILOGA F: DVOSMERNNA ANALIZA VARIANCE (ANOVA)**

VEG – vegetativna faza, CVET- faza cvetenja, SEME - faza semenitve

Faza		VEG			CVET			SEME		
		stopinje prostosti	F	p	stopinje prostosti	F	p	stopinje prostosti	F	p
<b>Masa korenin</b>	tretma	3	255,1298	0,006311	3	21,9141	0,000000	3	19,1264	0,000000
	vrsta	1	5,2452	0,346249	1	53,6104	0,000000	1	1,1345	0,298915
	t * v	3	0,9231	0,008205	3	11,9765	0,000054	3	2,4539	0,091480
	napaka	24	4,9423		24			21		
<b>Masa poganjkov</b>	tretma	3	2,5715	0,077755	3	20,9764	0,000001	3	13,30919	0,000044
	vrsta	1	0,0321	0,859288	1	96,9737	0,000000	1	8,27508	0,009029
	t * v	3	1,1284	0,357385	3	15,8809	0,000007	3	2,53979	0,083983
	napaka	24			24			21		
<b>Konc. Cd v koreninah</b>	tretma	3	132,6390	0,000000	3	29,3778	0,000000	3	43,8332	0,000000
	vrsta	1	11,2630	0,002734	1	0,3865	0,540000	1	0,4859	0,493395
	t * v	3	3,4730	0,032492	3	1,2069	0,328573	3	0,8355	0,000000
	napaka	23			24			21		0,489420
<b>Konc. Cd v poganjkih</b>	tretma	3	92,2710	0,000000	3	77,2306	0,000000	3	200,685	0,000000
	vrsta	1	32,0154	0,000009	1	3,6571	0,068940	1	3,122	0,092478
	t * v	3	6,6146	0,002195	3	14,2324	0,000023	3	4,146	0,019447
	napaka	23			22			20		
<b>TF za Cd</b>	tretma	3	5,2768	0,006142	3	4,1171	0,017245	3	35,6674	0,000000
	vrsta	1	0,6247	0,437059	1	3,0329	0,094400	1	3,3248	0,082509
	t * v	3	0,3822	0,766764	3	4,8105	0,009214	3	0,6065	0,618095
	napaka	24			24			21		
<b>Vsebnost Cd v poganjkih (µg)</b>	tretma	1	8,7912	0,000000	3	12,65271	0,000000	3	13,03891	0,000000
	vrsta	3	2,3148	0,000412	1	41,09254	0,000037	1	5,16759	0,000030
	t * v	3	1,1324	0,355859	3	5,564	0,000001	3	0,93631	0,438491
	napaka	24			24			24		

## **PRILOGA G:**

### **Vsebnosti Cd v poganjkih [ $\mu\text{g}$ ] pri *T. praecox* in *T. caerulescens***

Tabela 1: Vsebnosti Cd [ $\mu\text{g}$ ] v poganjkih  
/ - ni podatkov zaradi propada rastlin

<i>T. praecox</i>					<i>T. caerulescens</i>			
Faza	VEG	VEG	VEG	VEG	VEG	VEG	VEG	VEG
<b>Tretma [<math>\text{mg kg}^{-1}</math>]</b>	0	50	100	250	0	50	100	250
vsebnost Cd	17,72	142	1794	257	4,06	1080	2738	853
v poganjkih	7,96	1511	1713	4199	4,97	1510	1800	833
[ $\mu\text{g}$ ]	16,05	583	3849	969	7,07	431	1122	746
	12,21	513	2319	2502	15,85	372	812	990
Faza	CVET	CVET	CVET	CVET	CVET	CVET	CVET	CVET
<b>Tretma [<math>\text{mg kg}^{-1}</math>]</b>	0	50	100	250	0	50	100	250
vsebnost Cd	/	7345	736	12589	6,73	2179	318	833
v poganjkih	/	7230	7156	5575	2,58	2727	444	5705
[ $\mu\text{g}$ ]	/	8658	6863	10841	8,40	1682	682	1058
	/	5512	9478	15055	6,37	158	473	1238
Faza	SEM	SEM	SEM	SEM	SEM	SEM	SEM	SEM
<b>Tretma [<math>\text{mg kg}^{-1}</math>]</b>	0	50	100	250	0	50	100	250
vsebnost Cd	/	7481	7121	9059	/	765	7565	1490
v poganjkih	/	/	11738	11920	/	447	/	3975
[ $\mu\text{g}$ ]	/	3387	13211	14093	/	420	4835	8215
	/	/	5540	8131	/	572	2955	17128