

UTJECAJ FOSFOGIPSA IZ INDUSTRIJSKOG ODLAGALIŠTA NA HRAST LUŽNJAK (*Quercus robur*)*

THE INFLUENCE OF PHOSPHOGYPSUM FROM AN INDUSTRIAL
DUMP ON THE PEDUNCULATE OAK (*Quercus robur*)

Jadranka ROŠA**

SAŽETAK: U neposrednoj blizini odlagališta fosfogipsa (područje kutinskog bazena) primijećeno je sušenje i propadanje šuma hrasta lužnjaka, što je moguća posljedica utjecaja fosfogipsa iz odlagališta, nusprodukta koji nastaje kod proizvodnje umjetnih gnojiva. Kemijska analiza vode iz odlagališta pokazala je prisutnost teških metala (Al, Cd, i dr.), te izrazitu kiselost ($pH=1,2-2,6$). Hrast lužnjak u blizini odlagališta sa 60-70% oštećenosti krošnje pripada kategoriji jako oštećenih stabala.

Za utvrđivanje promjena na stanicama hrasta lužnjaka proveden je kratko-trajni test citotoksičnosti tretiranjem korjeniča hrasta lužnjaka iskljijalih u laboratoriju različitim razrijedenjima fosfogipsa iz odlagališta (od 0,5-10%). Citogenetske analize provedene su u meristemskim stanicama vrškova korijena klijanaca dobivenih iz žireva sakupljenih ispod stabala bez vidljivih znakova oštećenja. Mjerenjem mitotske aktivnosti stanica korijena te vrste i učestalosti kromosomskih aberacija, utvrđivan je stupanj citotoksičnosti nakon 24-satnog tretmana kao i oporavka. Kao negativna kontrola upotrijebljeni su sijanci dobiveni iz žireva sakupljenih u sjemenskoj sastojini.

Kao kontrolni test geno- i citotoksičnosti fosfogipsa iz odlagališta proveden je Allium-test. Lukovice luka Allium ascalonicum iskljijavane su u vodovodnoj vodi, a zatim tretirane jednakim razrijedenjima fosfogipsa iz odlagališta i u jednakom razdoblju kao i hrast lužnjak. Kao negativna kontrola poslužile su lukovice iskljijavane u vodovodnoj vodi, dok su kao pozitivna kontrola poslužile lukovice tretirane hidrazid maleinskom kiselinom.

Radi utvrđivanja neposrednog utjecaja odlagališta fosfogipsa na citogenetičke promjene u hrasta lužnjaka, provedena su istraživanja na meristemskim stanicama vrškova korijena sijanaca iskljijalih iz žireva sakupljenih sa stabala hrasta lužnjaka u neposrednoj blizini odlagališta, a kao negativna kontrola poslužili su sijanci dobiveni iz žireva sakupljenih u sjemenskoj sastojini.

Nakon što je utvrđena povećana količina fluorida u lišcu hrasta lužnjaka uz odlagalište, analizirana je i morfologija epikutikularnog voska na uzorcima lišća u različitim razvojnim stadijima, primjenom skenirajućeg elektronskog mikroskopa. Provedena analiza ukazala je na postojanje povezanosti količine fluorida u lišcu hrasta lužnjaka i stupnja degradacije epikutikularnog voska.

Ključne riječi: Test citotoksičnosti, Allium-test, mitotske i subkromatidne aberacije, epikutikularni vosak elektronska mikroskopija (SEM).

*Magistarski rad, skraćeno za Šumarski list

**Mr. sc. Jadranka Roša "Hrvatske šume" p.o. Zagreb

UVOD – Introduction

Propadanje šuma sve je naglašeniji problem u Republici Hrvatskoj. Skladištenje tehnološkog otpada u blizini šuma dodatno ugrožava šumske ekosustave. Propadanje šume hrasta lužnjaka u blizini industrijskog odlagališta fosfogipsa vjerojatno je posljedica neposrednog utjecaja.

Istraživanja utjecaja zračnog zagađenja na genom šumskog drveća uspješno su provedena u Sloveniji na smreći (*Picea abies* L.), (Drušković, 1988b, Bavec i sur. 1993. Slična istraživanja provedena su i u Austriji (Müller i sur. 1991).

Propadanje šuma hrasta lužnjaka sve se više povezuje s atmosferskim zagađenjem. Istraživanja odnosa oštećenja krošnja hrasta lužnjaka i stupnja oštećenja genetičkog materijala provedena su na hrastu lužnjaku iz okolice Bjelovara (Zoldoš i sur., 1994a, 1994b).

Jedan od najstarijih i najčešće upotrebljavanih biljnih testova za proučavanje djelovanja različitih kemijskih spojeva na genom viših biljaka je Allium-test, koji je 1938. godine uveo Levan, upotrijebivši korjeniče zdravih lukovica običnog luka (*Allium cepa* L.). Allium-test pokazao se pogodan za utvrđivanje inhibicije rasta korjeniča, kromosomskih aberacija, kao i za ispitivanje djelovanja raznih supstanci iz okoliša na proces mitoze (Fiskesjö, 1985).

Razvoj suvremenih istraživačkih tehniku, poglavito elektronske mikroskopije, omogućio je neposredan uvid u finu strukturu biljnih stanica, što je doprinijelo

boljem razumijevanju građe i funkcija lista kao organa. U sklopu istraživanja tih struktura osobito su značajna saznanja o kutikuli i epikutikularnom vosku.

Različiti zračni zagađivači i kisele kiše mogu neposredno ili posredno poremetiti normalno izlučivanje epikutikularnog voska. To smanjuje obrambenu funkciju lista (zaštitu od pojačanog ultraljubičastog i infrarvenog zračenja, kukaca, gljiva) i narušava regulaciju vode u biljci (Baker, 1973). Krajnja posljedica svih tih promjena može biti rano opadanje lišća i iglica. Iz ovih razloga su istraživanja utjecaja različitih zagađivača iz okoliša na površinske strukture lista sve zastupljenija u ekologiji. Svjetska istraživanja oštećenja šumskog drveća najopsežnije su provodena analizom iglica crnogorice. U Norveškoj je istraživan utjecaj ozona na epikutikularni vosak iglica bora (Barnes i sur., 1988). Suvremeni rasterski elektronski mikroskop (Scanning Electron Microscope-SEM) omogućio je površinsku analizu mikromorfoloških značajki lišća. Na taj način prepoznate su strukturne promjene površine iglica različitih crnogoričnih vrsta, koje su posljedica zračnog zagađenja (Huttunen i Laine, 1983; Sauter i Vass, 1986).

Upotreba Scanning elektronskog mikroskopa u istraživanjima epikutikularnog voska listova u Republici Hrvatskoj je u početnoj fazi. Za sada su tom metodom provedena istraživanja površine lišća, primjerice nekih hrastova (Bačić, 1996; 1997a) i jele (Bačić, 1998).

2. MATERIJAL I METODE – Material and methods

Biljni materijal upotrijebljen za istraživanja uzet je iz neposredne blizine odlagališta fosfogipsa i sjemenske sastojine udaljene 2 km od odlagališta, kao kontrolu. Izbor biljnog materijala napravljen je prema izgledu i stanju sastojine hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) u cjevini, te osutnosti krošnje pojedinih stabala. Izabrana stabla neposredno uz odlagalište imala su osutnost krošnje 2. i 3. stupnja, što znači da su srednje do jako oštećena, dok su stabla iz kontrolne sastojine 0. stupnja, tj. nisu imala znakove oštećenosti krošnje. Stabla hrasta lužnjaka s kojih su sakupljeni uzorci stara su 120 godina.

Test citotoksičnosti proveden je na žirevima hrasta lužnjaka iskljavanih u vodovodnoj vodi u staklenkama na sobnoj temperaturi. Sijanci s dobro razvijenim korjenjem tretirani su 24 sata otopinama procesne vode iz odlagališta u razrijedenjima od 0,5%, 1,0%, 2,5%, 5% i 10%. Kao negativna kontrola upotrijebljeni su sijanci iskljavani u vodovodnoj vodi. Jedan dio korjeniča nakon tretmana stavljen je ponovno u vodovodnu vodu radi oporavka koji je trajao 24 sata. Nakon tretmana i

oporavka, korjeniči su fiksirani u mješavini etilnog alkohola i ledene octene kiseline u omjeru 3:1.

Za praćenje promjena u mitozu upotrijebljeni su sljedeći parametri: mitotski indeks (broj stanica u mitozu/ukupan broj stanica), učestalost i tipovi kromosomskih aberacija.

Utjecaj otpadne vode iz odlagališta na tijek mitoze i pojavu kromosomskih aberacija istraživan je upotrebom testa citotoksičnosti na biljkama hrasta lužnjaka iskljalih iz žireva sakupljenih u sjemenskoj sastojini, te Allium-testa. Za Allium-test upotrijebljene su lukovice luka *Allium cepa var. ascalonicum*.

Za analizu genotoksičnosti, lukovice su naklijavane u vodovodnoj vodi. Nakon što su korjeniči narasli do dužine 1 cm, lukovice su tretirane otopinama procesne vode iz odlagališta u razrijedenjima od 0,5%, 1%, 5% i 10%. Lukovice koje su rasle u vodovodnoj vodi predstavljale su negativnu kontrolu. Kao pozitivna kontrola poslužile su lukovice tretirane 1×10^{-4} M otopinom hidrazida maleinske kiseline (Pavlica i sur., 1995).

Tretman je trajao 24 sata. Nakon tretmana dio korjenčića je fiksiran, dok je drugi dio materijala prebačen u vodovodnu vodu na 24-satni oporavak te zatim fiksiran.

Utvrđivanje neposrednog citotoksičnog utjecaja odlagališta fosfogipsa na tijek mitoze i pojavu kromosomskih aberacija proveden je na sijancima žireva sakupljanih sa stabala uz samo odlagalište i iskljavanih u laboratoriju. Kao kontrola upotrijebljeni su sijanci iskljavani iz žireva sakupljenih u sjemenskoj sastojini.

Za utvrđivanje količine fluorida upotrijebljeno je lišće hrasta lužnjaka ubranog u središnjem dijelu krošnje stabala neposredno uz odlagalište, te iz sjemenske sastojine. Korištena je potenciometrijska metoda koja se temelji na uporabi selektivne fluoridne elektrode s kristalom lantana koji daje elektrokemijski impuls na koncentraciji fluorida od 10^{-6} M.

Morfološke promjene epikutikularnog voska analizirane su na uzorcima lišća stabala uz odlagalište i iz sjemenske sastojine u vegetacijskoj sezoni 1996. godine. Analizirana su 4 razvojna stadija lista i to lišće na početku vegetacijske sezone, uključujući listove iz sastava pupa, vrlo mlade i potpuno razvijene listove, kao i lišće s kraja vegetacijskog razdoblja.

Analiza morfologije epikutikularnog voska na stomatalnom obrubu puči lišća hrasta lužnjaka provedena je skenirajućim elektronskom mikroskopijom (SEM).

Radi ocjenjivanja stupnja degradacije kristalnog epikutikularnog voska (Thijsse i Bass, 1990; Bačić i sur., 1996) određivana je relativna količina amorfognog voska u obliku krasta na stomatalnom obrubu prema sljedećim stupnjevima:

1. stupanj - puči s obrubom koji je prekriven samo s kristalnim (bez krasta) voskom.
2. stupanj - puči s obrubom koji je prekriven amorfnim voskom u količini od 1-20%.
3. stupanj - puči s obrubom koji je prekriven amorfnim voskom u količini od 21-60%.
4. stupanj - puči s obrubom koji je prekriven amorfnim voskom u količini od 61-80%.
5. stupanj - puči s obrubom koji je prekriven amorfnim voskom u količini od 81-100%.

Za svaku analiziranu puč određena je pripadnost jednom od navedenih stupnjeva. Stupnjevi od 1.-4. su stupnjevi fuzije i aglomeracije kristalnog u amorfni vosak.

Radi utvrđivanja statističkog odstupanja u mitotskoj aktivnosti u odnosu na kontrolu primijenjen je χ^2 -test za analizu varijance. Kod usporedbe stupnjeva fuzije i aglomeracije kristalnog u amorfni epikutikularni voska (kraste) na lišću hrasta lužnjaka uz odlagalište i u kontroli, korišten je test sa slijedovima (run-test). Radi se o neparametarskom testu za usporedbu dvaju uzoraka kod kojeg nije potrebno poznavati razdiobu populacije.

3. REZULTATI – Results

Tretiranje korjenskih meristemskih stanica klijanaca hrasta lužnjaka različitim koncentracijama vode iz odlagališta fosfogipsa, rezultiralo je pojavom tri tipa kromosomskih aberacija:

1. Aberacije na razini kromosoma
 - a) lutajući kromosomi
 - b) mikronukleus
2. Aberacije na razini diobenog vretena
 - a) c - mitoza
 - b) višepolarnost diobenog vretena
3. Subkromatidne aberacije
 - a) sljepljenost kromosoma

Citotoksično djelovanje istraženo je utvrđivanjem ukupnog broja kromosomskih aberacija i mjerenjem mitotske aktivnosti. Mitotska aktivnost ili mitotski indeks (M.I.) iskazana je kao broj stanica u diobi u odnosu na ukupni broj ispitivanih stanica.

Kod tretmana uzorka različitim koncentracijama fosfogipsa uočena je općenito slaba diobena aktivnost meristemskih stanica (tablica 1). Najaktivnija dioba stanica odvijala se kod tretmana 2,5 %-tnom koncentra-

cijom kod koje je M.I. bio 3,59%. Tretman većim koncentracijama (5 i 10%) doveo je do značajnog smanjenja mitotske aktivnosti. Analiza je pokazala da je mitotska aktivnost kod meristemskih stanica u svim koncentracijama bila niža od mitotske aktivnosti kontrolnog uzorka kod kojeg je iznosila 4,34%.

Nakon 24 sata tretmana, ukupan broj kromosomskih aberacija bio je značajan u odnosu na kontrolni uzorak kod kojeg nije uočena pojava kromosomskih aberacija. Povećanjem koncentracije do 5% povećavala se mitotska aktivnost, a i broj aberacija bio je dvostruko veći. Nakon tretmana 5 i 10%-tnom otopinom mitotska aktivnost se smanjila, kao i broj kromosomskih aberacija. Uočene su aberacije na razini diobenog vretena i kromosoma (tablica 2). Poremećaji diobenog vretena očitovali su se u velikom broju c-mitoza (slika 1a), posebice kod koncentracije od 2,5% te lutajući kromosomi (slike 1c, d, e). Uočeno je također sljepljivanje kromosoma (slika 1f), te mikronukleusi, kao siguran pokazatelj eliminacije kromosomskog materijala. Pojava mikronukleusa uočena je samo kod koncentracije od 1,0%. (Tablica 2).

Tablica 1. Mitotska aktivnost i ukupan broj kromosomskih aberacija kod klijanaca hrasta lužnjaka tretiranih 24 sata različitim koncentracijama fosfogipsa.

Koncentracija (%)	Kiselost (pH)	Ukupan broj stanica	Broj stanica u mitozi	M. I. (%)	Broj stanica s kromosomskim aberacijama
Kontrola	7,0	7444	323	4,34	-
0,5	6,4	6766	181	2,67*	4
1,0	6,0	3709	39	1,05*	18
2,5	5,8	6383	298	3,59	20
5,0	4,4	4416	11	0,25*	10
10,0	4,1	2666	50	1,87*	16

* Statistički signifikantna razlika u odnosu na kontrolu (provjereno χ^2 testom za $p < 0,05$).

Tablica 2. Tipovi kromosomskih aberacija kod klijanaca hrasta lužnjaka tretiranih 24 sata različitim koncentracijama fosfogipsa.

Koncent. (%)	Ukupan broj stanica	M. I. (%)	MITOTSKE I KROMOSOMSKE ABERACIJE					Ukupan broj aberacija
			C- mitoza	Višepolarno diobeno vreteno	Lutajući kromosomi	Sljepljeni kromosomi	Mikronukleus	
Kontrola	7444	4,34						
0,5	6766	2,67	4					4
1,0	3709	1,05	12					6
2,5	6383	3,59	13	2	2	3		20
5,0	4416	0,25	10					10
10,0	2666	1,87	16					16

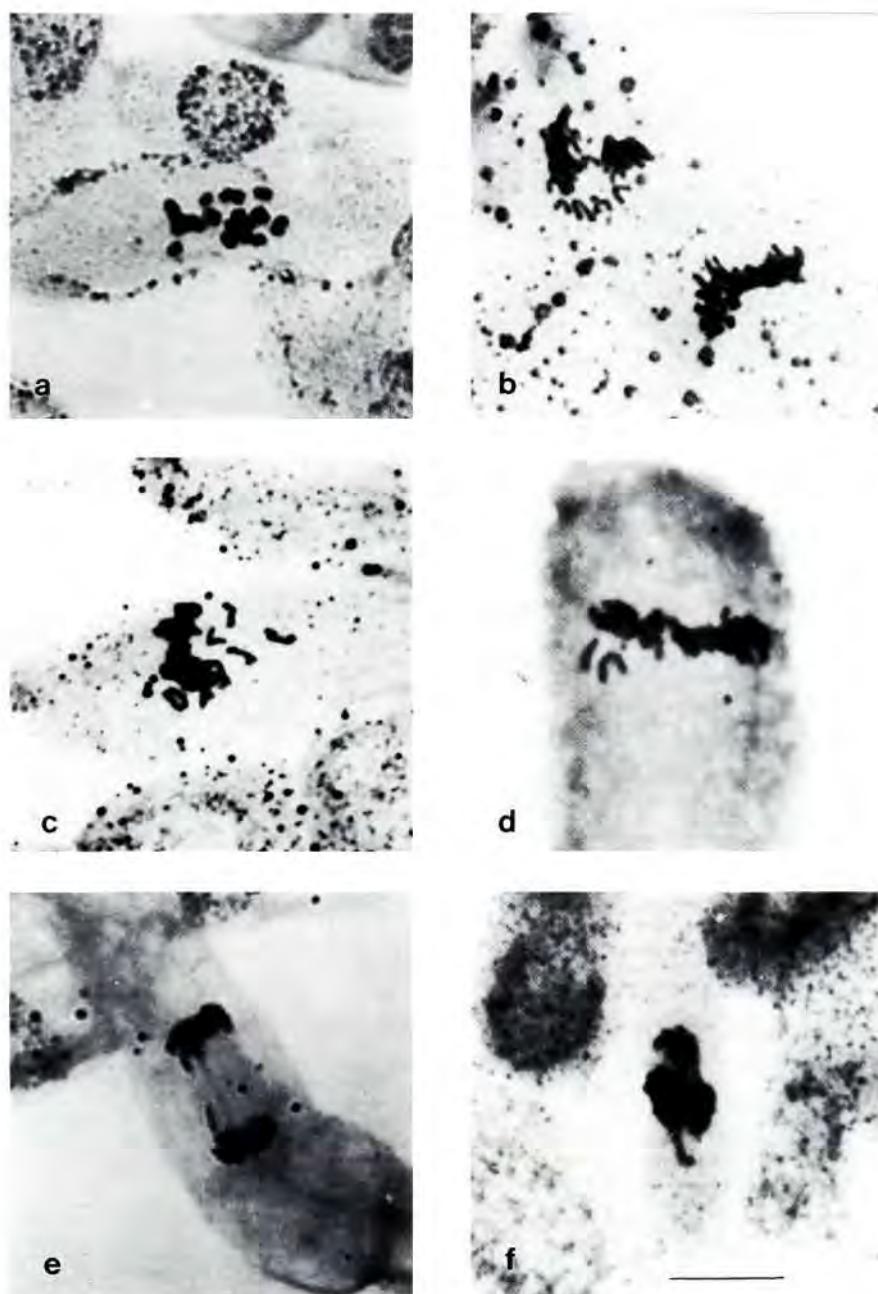
Nakon 24-satnog oporavka klijanaca hrasta lužnjaka u vodovodnoj vodi nije došlo do značajne promjene mitotske aktivnosti (tablica 3). Mitotska aktivnost značajnije pada kod oporavka nakon tretmana većim koncentracijama. Najniža mitotska aktivnost bila je nakon oporavka uzorka tretiranih 5%-tnom koncentracijom fosfogipsa.

Nakon 24-satnog oporavka ukupan broj aberacija značajno se smanjio, osobito broj c-mitoza (tablica 4). Međutim značajno je porastao broj sljepljenih kromosoma, dok pojava mikronukleusa nije uočena. Gotovo kod svih koncentracija uočeno je sljepljivanje kromosoma.

Test na klijancima hrasta lužnjaka, iskljajih iz žireva sakupljenih u sastojini neposredno uz odlagalište i sjemenske sastojine kao kontrole, ukazao je značajan broj mitotskih aberacija kod klijanaca uz odlagalište (tablica 5). Najviše je bilo sljepljenih kromosoma i višepolarno diobeno vreteno. Od analiziranih 19130 stanica u kontroli, uočene su samo dvije mitotske aberacije, sljepljivanje kromosoma i poliploidija.

Provedeni Allium test ukazao je na geno- i citotoksičnost fosfogipsa. S porastom koncentracije smanjivao se rast korjenčića, ali se povećavao broj i učestalost kromosomskih aberacija.

Nakon 24-satnog teretmana nije uočena velika razlika u odvijanju mitotske aktivnosti u odnosu na negativnu (vodovodna voda) ili pozitivnu kontrolu (hidrazid maleinske kiseline) (tablica 6). Kod svih koncentracija mitotska aktivnost bila je oko 6.6%, osim kod tretmana 0,5%-tnom koncentracijom kod kojih je mitotska aktivnost bila veća (9,24%). Složeni kemijski sastav otpadne vode kao i njena kiselost, utjecali su na pojavu sljepljivanja kromosoma te anafaznih mostova kao posljedica sljepljivanja (slika 2d). Također je uočena fragmentacija kromosoma (slika 2e). Mitotske aberacije kao posljedica djelovanja na diobeno vreteno - višepolarna anafaza i lutajući kromosomi (slika 2a, b) uočene su u puno manjem broju od kromosomskih aberacija (tablica 7).



Slika 1. Mitotske i kromosomske aberacije u stanicama vrška korjena hrasta lužnjaka nakon 24-satna tretmana različitim koncentracijama fosfogipsa: a) c-mitoza, b) višepolarna anafaza, c) i d) lutajući kromosomi u metafazi, e) anafazni most i zaostajući kromosomi i f) sljepljeni kromosomi u metafazi.
Cr.=10 μ m.

Tablica 3. Mitotska aktivnost i kromosomske aberacije kod klijanaca hrasta lužnjaka nakon 24-satnog oporavka u vodovodnoj vodi.

Koncentracija (%)	Ukupan broj stanica	Stanice u mitozi	M. I. (%)	Broj stanica s kromosomskim aberacijama
Kontrola	3163	149	4,71	-
0,5	3316	81	2,44*	2
1,0	3757	86	2,28*	4
2,5	2395	38	1,59*	9
5,0	2309	22	0,95*	4
10,0	2762	38	1,37*	7

* Statistički signifikantna razlika u odnosu na kontrolu (provjereno χ^2 testom za $p < 0,05$).

Tablica 4. Učestalost mitotske aktivnosti i tipovi kromosomskih aberacija kod klijanaca hrasta lužnjaka nakon 24-satnog oporavka u vodovodnoj vodi.

Koncent. (%)	Ukupan broj stanica	M. I. (%)	MITOTSKE I KROMOSOMSKE ABERACIJE				Ukupan broj aberacija
			C-mitoza	Višepolarno diobeno vreteno	Lutajući kromosomi	Sljepljeni kromosomi	
Kontrola	3163	4,71					
0,5	3316	2,44				2	2
1,0	3757	2,28			2	2	4
2,5	2395	1,59	5	2		2	9
5,0	2309	0,95	1	1		2	4
10,0	2762	1,37	4			3	7

Tablica 5. Mitotska aktivnost, broj i vrste aberacija u kontrolnoj sastojini i neposredno uz odlagalište

Sastojina	Broj uzoraka	Ukupan broj stanica	Broj stanica u mitozi	M. I. (%)	MITOTSKE I KROMOSOMSKE ABERACIJE					Ukupan Broj aberacija	Aberacije (%)
					C- mitoza	Višepolarno diobeno vreteno	Lutajući kromosomi	Sljepljeni kromosomi	Poliploidija		
Kontrolna	1	6048	174	2,88				1	1	2	1,15
	2	4524	107	2,36							
	3	1237	8	0,65							
	4	4950	137	2,77							
	5	2371	29	1,22							
Ukupno	5	19130	455	2,38				1	1	2	0,44
	1	3346	45	1,34		2				2	4,44
	2	3938	21	0,53		1				1	4,76
Uz*	3	1170	20	1,71	1	2	2			5	25,0
odlagalište	4	6044	352	5,82				1		1	0,28
	5	1995	106	5,31			1	1		2	1,89
	6	4069	15	0,37		1		1		2	13,4
	7	2562	74	2,89				3		3	4,05
Ukupno	7	23124	633	2,74	1	6	3	6		16	2,53

* Nije ustanovljena statistički signifikantna razlika u odnosu na kontrolu (provjereno χ^2 -testom za $p < 0,05$).

Nakon 24-satnog oporavka mitotska aktivnost u meristemskim stanicama luka kod svih koncentracija nije se značajnije smanjila, te je i dalje bila oko 6,0 % (tablica 8). Mitotska aktivnost značajnije se povećala samo prilikom oporavka nakon tretmana 0,5%-tnom koncentracijom (7,79 %). Ukupan broj kromosomskih aberacija se smanjio, a od vrsta kromosomskih aberacija najviše je bilo sljepljenih kromosoma i mostova u anafazi i telofazi. Od mitotskih aberacija najviše je uočeno višepolarnih anafaza (tablica 9). Također je značajno smanjen broj c-mitoza.

Rezultati analize fluorida u lišću hrasta lužnjaka ukazali su na značajno povećanje u lišću neposredno uz odlagalište (8,49 ppm) za razliku od kontrole gdje je zabilježena količina od 1,82 ppm.

SEM istraživanja pokazala su da je površina listova hrasta lužnjaka iz sastava pupa, neposredno uz odlagalište fosfogipsa kao i iz kontrolne sastojine, prekrivena isključivo epikutikularnim voskom u obliku tankog homogenog sloja (slika 3a). Kristalni vosak na tim listovima nije nađen. Površina vrlo mlađih, tek proliferiranih listova, uključujući stomatalni obrub puči, na obe je

Tablica 6. Mitotska aktivnost i kromosomske aberacije u meristemskim stanicama luka nakon 24 sata tretmana.

Konc. (%)	Broj analiz. stanica	Broj stanica u diobi	M.I. (%)	Broj kromosomskih aberacija				Ukupno
				Ijeplivost kromosoma	Mostovi u anafazi/ telofaz	Fragmenti	Mikronukleusi	
NK	2574	173	6,72	0	9	0	0	9
PK	2039	136	6,66	0	9	22	77	198
0,5	2175	201	9,24*	2	10	3	1	16
1,0	3136	211	6,72	12	11	7	4	34
5,0	2975	206	6,92	5	11	6	2	24
10,0	2545	169	6,64	4	5	6	3	17

NK - negativna kontrola (vodovodna voda)

PK - pozitivna kontrola (hidrazid maleinske kiseline, 1×10^{-4} M)* Statistički signifikantna razlika u odnosu na kontrolu (provjereno χ^2 testom za $p < 0,05$).

Tablica 7. Mitotska aktivnost i mitotske aberacije u meristemskim stanicama luka nakon 24 sata tretmana.

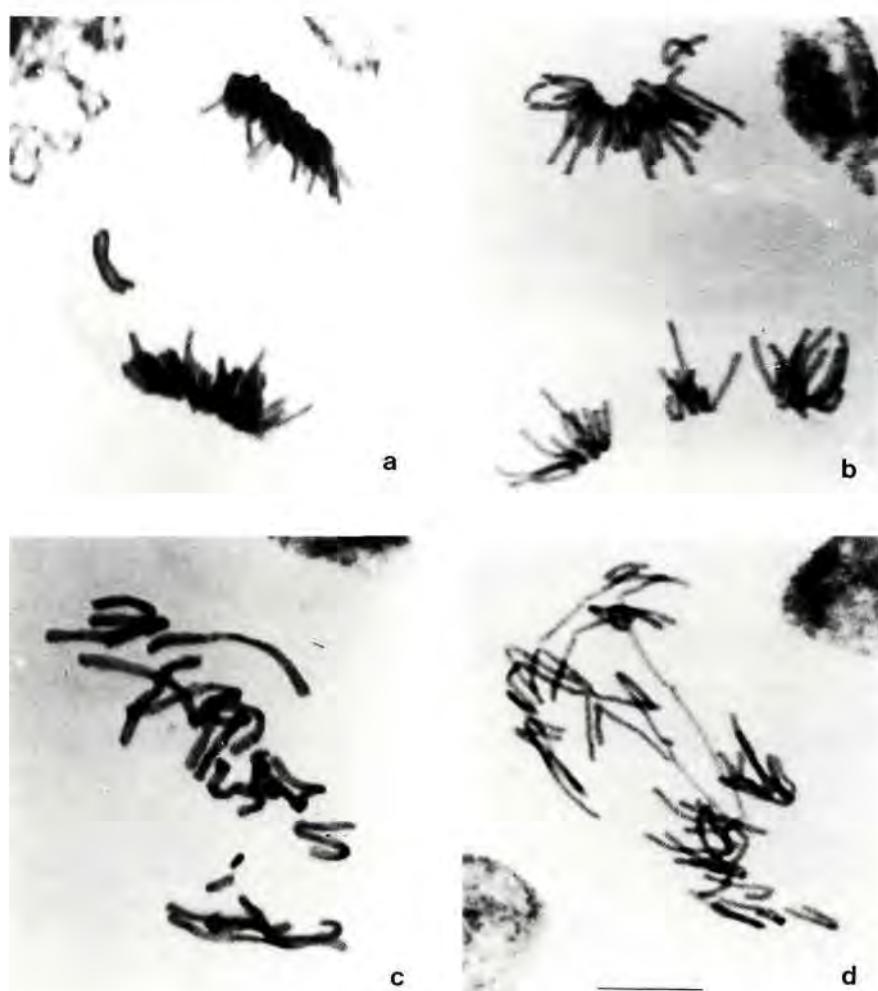
Konc. (%)	Broj analiz. stanica	Broj stanica u diobi	M. I. (%)	Broj mitotskih aberacija			Ukupno
				C- mitoza	Lutajući kromosomi	Višepolarna anafaza	
NK	2574	173	6,72	0	0	0	0
PK	2039	136	6,66	0	6	0	6
0,5	2175	201	9,24*	0	1	1	2
1,0	3136	211	6,72	5	4	2	11
5,0	2975	206	6,92	2	3	0	5
10,0	2545	169	6,64	2	2	0	4

* Statistički signifikantna razlika u odnosu na kontrolu (provjereno χ^2 testom za $p < 0,05$).

Tablica 8. Mitotska aktivnost i kromosomske aberacije u meristemskim stanicama luka nakon 24 sata oporavka.

Konc. (%)	Broj analiz. stanica	Broj stanica u diobi	M.I. (%)	Broj kromosomskih aberacija				Ukupno
				Ijepljivost kromosoma	Mostovi u anafazi/ telofazi	Fragmenti	Mikronukleusi	
NK	2760	190	6,88	0	0	0	0	0
0,5	2386	186	7,79*	2	1	0	1	4
1,0	2795	186	6,65	8	1	2	1	12
5,0	2117	108	5,10*	0	0	1	1	2
10,0	2772	178	6,42	6	9	3	4	22

* Statistički signifikantna razlika u odnosu na kontrolu (provjereno χ^2 testom za $p < 0,05$).

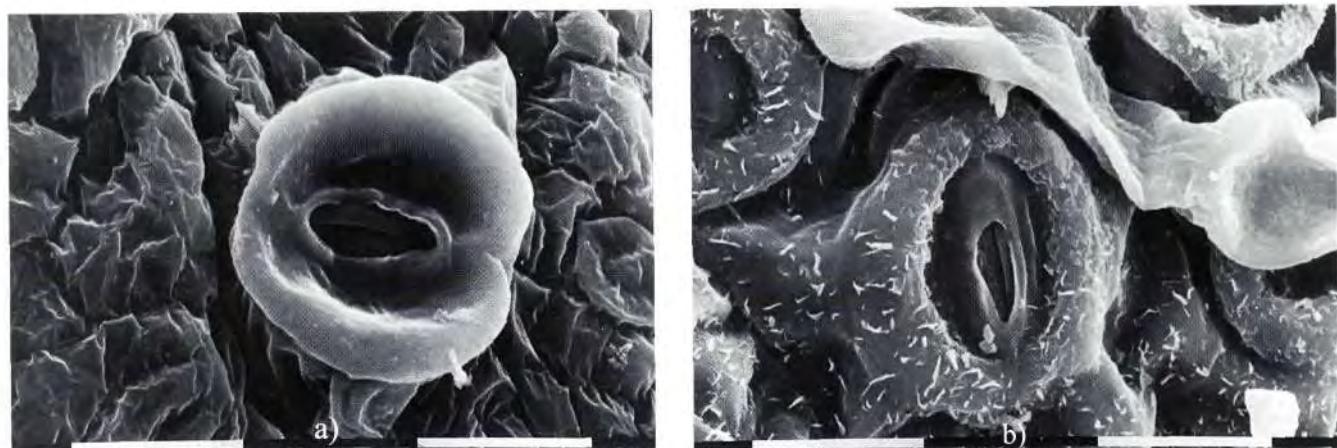


Slika 2. Mitotske i kromosomske aberacije u stanicama vrška luka *A. cepa* var. *ascalonicum* nakon 24-satnog tretmana različitim koncentracijama fosfogipsa: a) lutajući kromosomi u anafazi, b) višepolarna anafaza, c) metafaza s kromosomskim fragmentima d) anafazni mostovi. Cr.=10 μ m

Tablica 9. Mitotska aktivnost i mitotske aberacije u meristemskim stanicama luka nakon 24 sata oporavka.

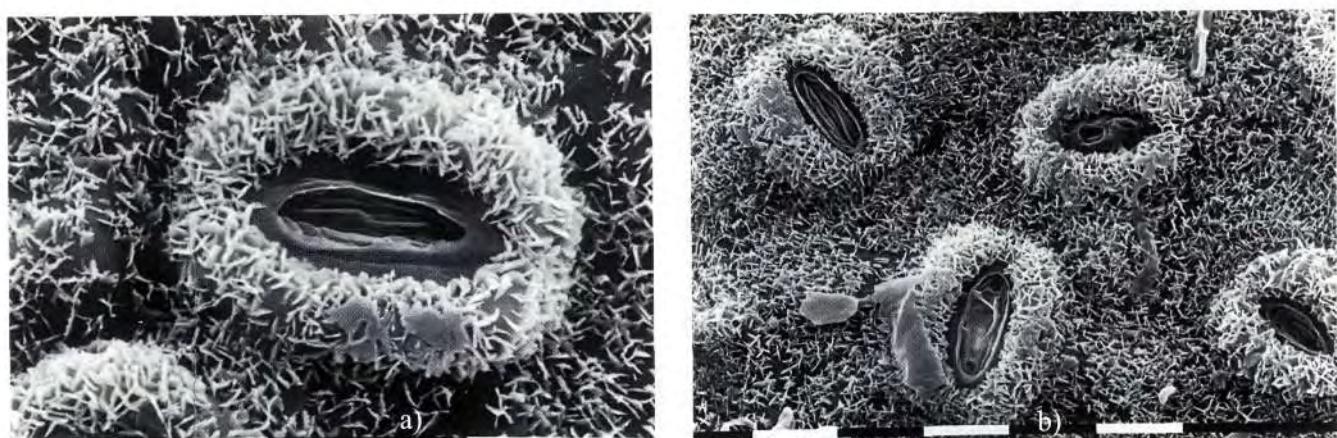
Konc. (%)	Broj analiz stanica	Broj stanica u diobi	M.I. (%)	mitotskih aberacija			Ukupno
				C- mitoza	Lutajući kromosomi	Višepolarna anafaza	
NK	2574	173	6,88	0	0	0	0
0,5	2175	201	7,79*	0	1	1	2
1,0	3136	211	6,65	1	2	4	7
5,0	2975	206	5,10*	0	0	2	2
10,0	2545	169	6,42	0	4	5	9

* Statistički signifikantna razlika u odnosu na kontrolu (provjereno χ^2 testom za $p < 0,05$).



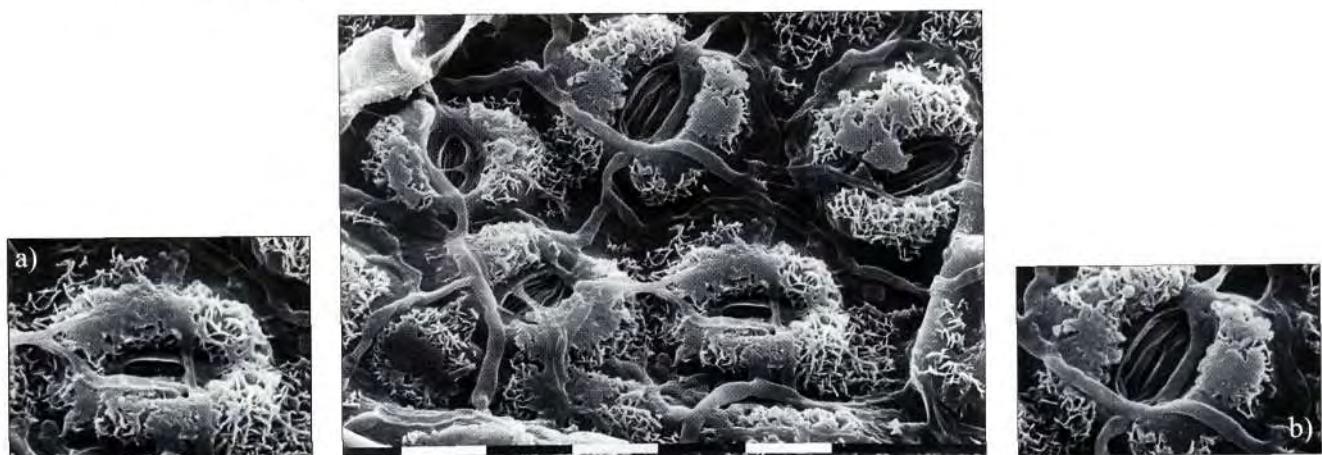
Slika 3. Scanning elektronska snimka puči listova hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.)

- a) puč na listu iz sastava pupa iz sjemenske sastojine; na stomatalnom obrubu nema kristala epikutikularnog voska, (x 3100).
- b) puč na sasvim mlađom, tek proliferiranom listu uz odlagalište; stomatalni obrub prekriven je isključivo kristalima epikutikularnog voska (0.-stupanj), (x 3100).



Slika 4. Scanning elektronska snimka puči listova hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.)

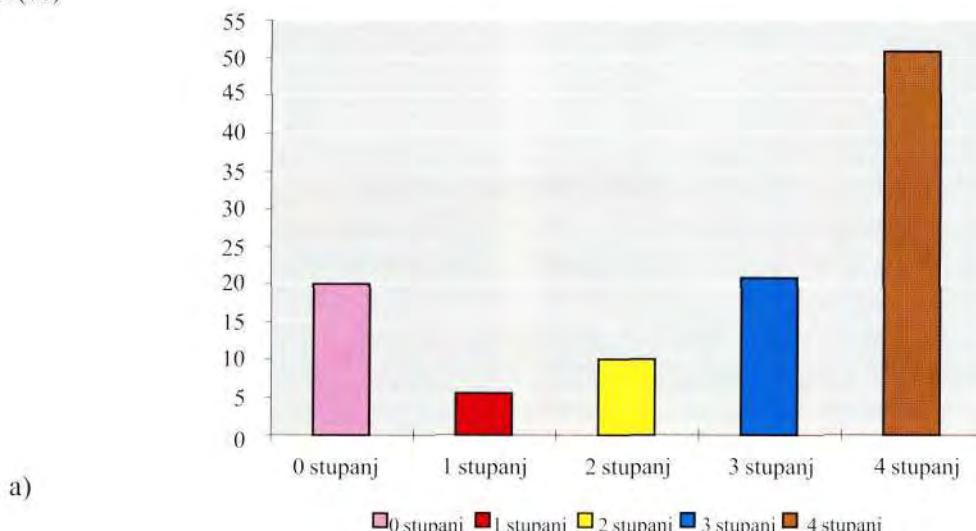
- a) puč na sasvim mlađom, tek proliferiranim listu, uz odlagalište; na stomatalnom obrubu je amorfna krasta u količini do 20% (1.-stupanj degradacije), (x 3540).
- b) puč, dolje lijevo, na sasvim mlađom, tek proliferiranim listu, uz odlagalište; na stomatalnom obrubu je amorfna krasta u količini od 21% - 50% (2.-stupanj degradacije), (x 1550).



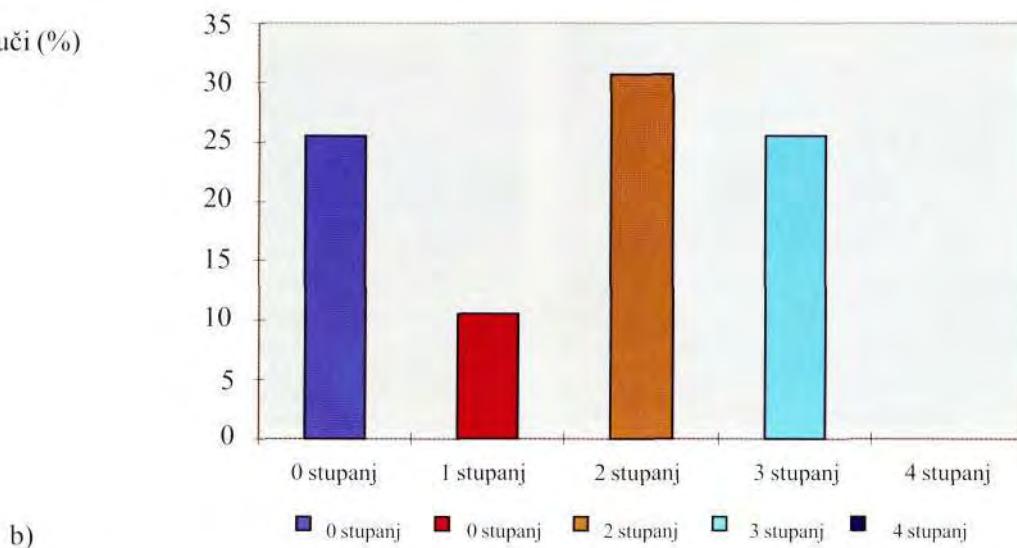
Slika 5. Scanning elektronska snimka puči na potpuno razvijenom listu hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) uz odlagalište; na slici su vidljive hife gljiva, (x 1550).

- a) izdvojena puč iz slike 5. (donji red desno); stomatalni obrub prekriven je amorfnom krastom u količini od 51%-80% (3.-stupanj degradacije).
- b) izdvojena puč iz slike 5. (gornji red sredina); stomatalni obrub prekriven je amorfnom krastom u količini od 81%-100% (4.-stupanj degradacije).

Post. puči (%)



Post. puči (%)



Slika 6. Histogrami postotka puči listova hrasta lužnjaka kristalnim (0. stupanj) i amorfni voskom u obliku krasta (1.-4. stupanj) na
 b) stomatalnom obrubu puči listova uz odlagalište fosfogipsa
 c) na stomatalnom obrubu puči listova iz sjemenske sastojine (kontrola)

staništa pak prekriven samo kristalnim voskom (0. stupanj; slika 3b). Faze degradacije kristalnog u amorfni vosak u tom razvojnom stadiju lista nisu zapažene. Kako se list razvijao i rastao do konačnog oblika i dužine, kristali voska na listovima s obje lokacije postupno su se fuzionirali i aglomerirali u amorfne kraste (1. - 4. stupanj degradacije; slika 3a i b, 4a i b). Međutim, početak i intenzitet degradacije bili su različiti s obzirom na stanište. Uz odlagalište fosfogipsa fuzija i aglomeracija kristalnog voska počinjala je ranije i bila je izraženija. Na tom su staništu osobito znatno ranije počeli 3. i 4. stupanj degradacije. 4. stupanj degradacije zabilježen je samo na lokaciji uz odlagalište.

Kvantitavna analiza degradacije kristalnog voska u amorfni vosak također je ukazala na razlike između sastojina. Na slici 5a i b prikazan je postotak puči samo s

kristalnim voskom (0. stupanj) i postotak puči s kristalnim i amorfni voskom (1.- 4. stupanj degradacije) na stomatalnom obrubu s listova neposredno uz odlagalište (slika 5a) i s listova iz sjemenske sastojine (slika 5b). Neparametarskom usporedbom, primjenom tzv. *run* testa, uzoraka sastojine uz odlagalište i sjemenske sastojine, pokazalo se da među uzorcima postoji značajna razlika i bez primjene statističkih testova. Naime, očigledan je značajno visok postotak puči s 4. stupnjem degradacije kristalnog voska na listovima uz odlagalište, dok 4. stupanj degradacije na pučima listova iz sjemenske sastojine, kako je već spomenuto, uopće nije zabilježen. Postotak puči s 1., 2. i 3. stupnjem degradacije kristalnog voska, poglavito drugim, bio je znatno niži uz odlagalište fosfogipsa (slika 6a i b).

RASPRAVA – Discussion

U ovom radu ponajprije je istraživana citotoksičnost, odnosno učinak različitih koncentracija fosfogipsa iz odlagališta na proces mitoze i pojavu kromosomskih aberacija u meristemskim stanicama hrasta lužnjaka. Istražen je i utjecaj fosfogipsa na klijance hrasta lužnjaka dobivene iz žireva sakupljenih na staništu uz odlagalište fosfogipsa, te iz žireva sjemenske sastojine kao kontrole.

Citogenetičke analize meristemskih stanica vrška korjeniča hrasta lužnjaka nakon 24-satnog tretmana pokazale su značajno smanjenje mitotske aktivnosti. Samo kod tretmana 2,5%-tnom koncentracijom mitotska aktivnost značajnije se razlikovala od kontrole. Uočene su mitotske aberacije kao posljedica poremećaja funkcije diobenog vretena i to c-mitotički učinak, koji se porastom koncentracije povećavao, te višepolarno diobeno vreteno. Također su uočeni mikronukleusi uz interfazne jezgre.

Nakon 24-satnog oporavka nije došlo do značajnije promjene mitotske aktivnosti. Mitotska aktivnost je i dalje ostala relativno slaba, ali je primjećeno više kromosomskih aberacija subkromatidnog tipa kao što je sljepljivanje kromosoma. U manjem je broju uočena višepolarnost u anafazi, dok mikronukleusi nisu uočeni.

U ovom je istraživanju mitostumulativan učinak fosfogipsa na stanice hrasta lužnjaka bio opažen kod koncentracije od 2,5%. Opaženi učinak ukazuje da fosfogips u određenim koncentracijama možda može imati i kancerogeni učinak, upravo zbog stimulativnog djelovanja na staničnu diobu. Naime, dosadašnja istraživanja upućuju na povezanost neoplastične transformacije i nepravilne regulacije mitotskog ciklusa (Schlegel i Craig, 1991).

Da bi se potvrdila osjetljivost hrasta lužnjaka, odnosno mogućnost primjene te vrste u testovima genotoksičnosti, u istraživanju je istovremeno korišten i Allium-test, kao kontrolni test. Ovaj test provodi se od 1938. godine kada ga je uveo Levan, upotrijebivši korjeniče mladih lukovica običnog luka *Allium cepa* L. Od tada pa sve do danas to je jedan od najčešće upotrebljavnih testova za proučavanje djelovanja različitih kemijskih spojeva na biljne kromosome (Fiskesjö, 1988). Allium-test se pokazao pogodan za utvrđivanje kromosomskih i genomske mutacija, a također i za ispitivanje djelovanja različitih supstanci na proces mitoze u cjelini. U novije vrijeme sve se češće koristi kao standard za utvrđivanje prisutnosti genotoksičnih zagađivača u prirodi (Fiskesjö, 1985; Rank i Nielsen, 1997).

Rezultati dobiveni Allium-testom, ukazali su na toksičnost fosfogipsa. Citogenetička analiza meristemskih stanica luka nakon 24-satnog tretmana pokazala je mi-

todepresivan učinak fosfogipsa. Izuzetak je bila koncentracija fosfogipsa od 0,5% kod koje je došlo do značajnijeg porasta mitotske aktivnosti. Slično djelovanje uočili su Papec i sur. (1989). Primjenom Allium-testa za djelovanje herbicida cijanazina, utvrdili su da kod kratkih tretmana (24 sata) male koncentracije cijanazina djeluju mitodepresivno, dok u produljenim tretmanima djeluju kao mitostimulansi. Samo kod visokih koncentracija mitotska aktivnost bila je slaba. U našem je istraživanju mitostumulativan učinak u stanicama luka bio opažen kod koncentracije od 0,5% fosfogipsa, dok je kod hrasta lužnjaka takav učinak imala 5x veću koncentraciju (2,5%). Opaženi učinak ukazuje da fosfogips u određenim koncentracijama možda može imati i kancerogeni učinak, upravo zbog stimulativnog djelovanja na staničnu diobu.

Ova dva testa citotoksičnosti pokazala su postojanje značajnih razlika u načinu i stupnju djelovanja fosfogipsa na stanice hrasta lužnjaka i luka. Slični rezultati ustanovljeni su usporednim istraživanjima utjecaja iona teških metala (Al^{3+}) na stanice luka, smreke (*Picea abies* L.), bukve i hrasta lužnjaka. Naime, ustanovljeno je da nakon tretmana istim koncentracijama iona dolazi do različitih degradacijskih oblika stanica kod istraživanih vrsta. Kod smreke je uočen isti tip aberacija kao i kod luka, ali tek nakon tretmana od devet dana, za razliku od bukve i hrasta lužnjaka, kod kojih u istom razdoblju i s istim tretmanom nisu uočene takve aberacije (Fiskesjö, 1990).

Dobivene razlike u broju i vrstama kromosomskih aberacija kod stanica hrasta lužnjaka u odnosu na stanicu luka mogle bi biti posljedice razlike u veličini kromosoma. Dok kod luka veličina kromosoma iznosi od 6,42-12,76 μm (Puzina, 1997), bjelogorične drvenaste vrste imaju male kromosome, osobito hrast lužnjak kod kojega veličina kromosoma iznosi od 2,49 do 6,26 μm (Ohrnić i Ahuja, 1990). Budući da se smreka s izrazito velikim kromosomima 7,5-12,5 μm (Papec i sur., 1997) pokazala vrlo osjetljiva na prisutnost štetnih supstanci u okolišu, moglo bi se prepostaviti da vrste s malim genomom imaju veću razinu tolerancije prema različitim kemijskim spojevima. Drušković (1988a; 1988b) je utvrdila da se s vidljivim znakovima oštećenja na smreci povećava stupanj oštećenja genetičkog materijala, koji se očituje u velikom broju kromosomskih aberacija.

Provadena istraživanja pokazala su da tretmani istim koncentracijama otopine fosfogipsa kod luka izazivaju značajan broj kromosomskih aberacija, dok su kod hrasta lužnjaka uglavnom opažane mitotske aberacije, i to u puno manjem broju.

Glede rezultata testova provedenih u laboratorijskim uvjetima na hrastu i luku, bilo je za očekivati da će

slični rezultati biti potvrđeni citogenetičkim istraživanjima klijanaca hrasta iz prirodnih staništa. Istraživanja odnosa ekoloških uvjeta i oštećenja genetičkog materijala provedena na meristemskim stanicama vrškova klijenaca iz žireva sakupljenih u blizini odlagališta fosfogipsa i žireva sjemenske sastojine, ukazala su na neke različitosti. Stabla uz odlagalište imala su vidljive znakove oštećenja krošanja za razliku od kontrolnih. Kod mitotske aktivnosti nije bilo značajnijih razlika, uglavnom je ista bila jednaka ili nešto veća od kontrolnog uzorka. U uzorcima sakupljenim uz odlagalište, uočeno je više stanica s aberacijama. Najčešće su to bili poremećaji u funkciji diobenog vretena. Slične rezultate objavili su Zoldoš i sur., (1994; 1997; Bešendorfer i sur. (1996) prateći tijek mitoze u meristemskim stanicama klijanaca iz populacije hrasta lužnjaka u okolini Bjelovara. Spomenuti autori uzimali su uzorke ispod stabala od 0. do 4. stupnja oštećenja i pratile pojavu kromosomskih aberacija, te su utvrdili da postoji poremećaj funkcionalnosti diobenog vretena kod stabala većeg stupnja oštećenja.

Dok su sve provedene citogenetičke analize na crnogoričnim vrstama potvrdile veliku osjetljivost na prisutnost genotoksičnih supstanci u okolišu, citogenetičke analize na hrastu lužnjaku pokazale su se nedostatnima za objašnjenja vidljivih znakova oštećenja.

Kako je hrast lužnjak dugoživuća vrsta i ima relativno mali genom, svega 1,59 pg (Zoldoš i sur., 1997), on pokazuje veliku razinu tolerancije prema prisutnosti različitih genotoksičnih tvari u okolišu. Visoka razina tolerancije hrasta lužnjaka potvrđena je i ovim istraživanjima utjecaja fosfogipsa iz odlagališta. Pored toga, odlagalište u svome sadašnjem kapacitetu postoji od 1987. godine, što je očigledno kratko razdoblje za utvrđivanje značajnijih citogenetičkih oštećenja.

Vidljiva oštećenja na hrastu lužnjaku vjerojatnije su posljedica morfoloških i fizioloških poremećaja koji su nastali od taloženja velikih količina fluorida iz okoliša. Dosadašnja istraživanja na biljnem materijalu u područjima velikih emisija fluorida ukazala su na izmijenjene morfološke karakteristike i smanjenu sposobnost plodonošenja (Klump i sur., 1994).

Utvrđena količina fluorida u lišcu hrasta lužnjaka iz staništa u blizini odlagališta fosfogipsa bila je značajno

veća nego u lišcu hrasta lužnjaka na staništu 2 km udaljenom od odlagališta.

Epikutikularni vosak na površini listova hrastova primarno je razvijen u obliku kristalnih listića, kristaloidea (engl. "Platelets") koji se nalaze na stomatalnom obrubu puči, ali također i na površini periklinskih stijenki običnih epidermalnih stanica. Obično su složeni okomito na obrub puči. Tijekom vremena kristaloidi epikutikularnog voska se fuzioniraju i aglomeriraju u amorfni vosak koji je poznat pod nazivom amorfne kraste.

Istraživanja epikutikularnog voska pomoću raster-skog elektronskog mikroskopa, u ovome radu ukazuju na značajne razlike između listova dvaju staništa. Opažene razlike odnose se na pojavu i količinu epikutikularnog voska. Stanje epikutikularnog voska u prva dva razvojna stadija lista neposredno uz odlagalište, kao i u kontroli, bila je gotovo jednaka, dok je u višim stadijima razvoja lista došlo do značajne razlike. 4. stupanj degradacije epikutikularnog voska (pojava krasta u količini od 81–100%) zabilježen je samo na pučima listova uz odlagalište. Budući da su analizirani listovi iz obje sastojine iste starosti, može se zaključiti da je proces degradacije uz odlagalište tekaо brže. Na osnovi dobivenih rezultata može se pretpostaviti da je količina fluorida u lišcu uz odlagalište izazvala prijevremenu degradaciju kristalnog epikutikularnog voska. To je moglo utjecati na promjene fenotipskih karakteristika stabala uz odlagalište i kao krajnji rezultat na smanjenje vitalnosti stabala i sposobnosti prirodne reprodukcije.

Sličnu pojavu degradacije epikutikularnog voska zabilježili su Bačić i sur. (1997b), na iglicama alepskog bora (*Pinus halepensis* Arnold.). Utvrđena je razlika u izgledu puči i stanju epikutikularnog voska sa staništa u blizini tvornice cementa u Solinu i onoga izvan doticaja emisije cementne prašine. Dok je na iglicama u blizini tvornice opažena i "erupcija voska" (porast produkcije epikutikularnog voska), na kontrolnom uzorku to nije uočeno. Autori su utvrdili povezanost između produkcije epikutikularnog voska i količine čestica kalija iz cementne prašine taloženih na površini iglica. Veliki dio puči ostao je blokiran uslijed nataložene cementne prašine, što je rezultiralo pojačanim razvojem amorfog voska te preranim odbacivanjem iglica.

ZAKLJUČAK – Conclusion

1. Citogenetičke analize provedene na klijancima hrasta lužnjaka nakon 24-satnog tretmana fosfogipsom iz odlagališta, ukazale su na smanjenu mitotsku aktivnost u ovisnosti o razrijedenjima i na pojavu aberacija u odnosu na kontrolu. Samo kod koncentracije od 2,5 %

uočeno je značajnije povećanje mitotske aktivnosti. S povećanjem koncentracija povećavao se broj aberacija i to puno učestalije bile su mitotske od kromosomskih. Kod svih razrijedenja pojavile su se aberacije i to uglavnom c-mitoza i lutajući kromosomi, nastale kao rezultat

poremećaja funkcije diobenog vretena. Učestalost i vrste kromosomskih aberacija ovisile su o koncentracijama fosfogipsa iz odlagališta. Nakon 24-satnog oporavka kod svih koncentracija nije došlo do značajnije promjene mitotske aktivnosti. Ona je i dalje ostala slaba, ali je bilo više subkromatidnih od mitotskih aberacija. Najviše je zabilježeno sljepljenih kromosoma.

2. Provedeni Allium-test ukazao je na geno- i citotoksičnost fosfogipsa nakon 24-satnog tretmana kao i nakon 24-satnog oporavka. Uočeno je zaostajanje rasta korjenčića nakon petodnevног tretmana provedenim koncentracijama. U stanicama vrškova korjenčića treiranim svim koncentracijama, pojavile su se kromosomske i mitotske aberacije. Od kromosomskih aberacija najzastupljeniji su bili kromosomski prekidi, dok su mitotske aberacije najčešće bile lutajući kromosomi i c-mitoza. Usporedna analiza kromosomskih aberacija

u luka i hrasta lužnjaka ukazala je na učestalije kromosomske aberacije u luka, dok su kod hrasta lužnjaka učestalije bile mitotske promjene.

3. U stanicama vrškova korjenčića hrasta lužnjaka neposredno uz odlagalište, kao i u kontroli nije bilo značajnije razlike u mitotskoj aktivnosti, ali je ipak nešto veća mitotska aktivnost utvrđena u klijancima uz odlagalište. Međutim uočene su značajne razlike u broju i vrsti mitotskih i kromosomskih aberacija. Najčešće su to bili poremećaji u funkciji diobenog vretena.

4. U lišću hrasta lužnjaka neposredno uz odlagalište utvrđena je povećana količina fluorida, što se može povezati s pojmom degradacije kristalnog epikutikularnog voska 4. stupnja, tj. razvojem amorfne voštane krate koja prekriva stomatalni obrub gotovo preko 50% analiziranih puči listova u količini od 80-100%, a koja u kontroli nije zabilježena.



Slika 7. Izgled kazeta u koје se odlaže fosfogips
Phoshogypsum and waste waters from factories in Kutina

Za rast i razvoj biljaka potrebni su mnogi makro i mikro elementi, koji se u prirodi nalaze u oblicima nepristupačnim biljkama. Stoga se pri proizvodnji mineralnih gnojiva obradom prirodnih soli, hranjiva prevode u oblik lakše pristupačan biljkama.

INA-Petrokemija d.o.o., Kutina, s ukupnom proizvodnjom od 1,5 milijuna tona gnojiva godišnje, postala je najveći proizvođač mineralnih gnojiva u ovom dijelu Europe (Gosp. i okoliš, 1996. br. 5). Osnovne sirovine

za proizvodnju kompleksnih NPK gnojiva su fosfatne rude, amonijak i kalijeve soli. Reakcijom fosfatne rude i sulfatne kiselina nastaje fosfatna kiselina i fosfogips kao tehnološki otpad. Fosfatna kiselina s amonijakom daje amonijeve fosfate, a uz dodatak kalijevih soli nastaje NPK kompleksno gnojivo. Fosfogips se kao 25 do 30%-tina vodena suspenzija hidraulički transportira od postrojenja do odlagališta udaljenog 5 km od tvornice.

LITERATURA – References

- Bačić, T. 1996: Note on use of some micro-morphological features in distinction of three pubescent oaks in Croatia. *Acta Biologica Cracoviensia*, Series: Botanica 38, 67-72.
- Bačić, T. 1997a: Comparative SEM investigations of the abaxial leaf epidermis of *Quercus cerris* L. var. *cerris* Lond. and *Quercus cerris* L. var. *austriaca* (Willd.) Lond. from Croatia. *Acta Biologica Cracoviensia*, Series: Botanica 39, 43-46.
- Bačić, T., Lynch, A.H., Cutler, D. 1997b: Reactions to cement factory dust contamination by *Pinus halepensis* leaves. *New Phytologist* (u tisku).
- Bačić, T., Popović, Ž. 1998: Preliminary report on epicuticular wax surface condition on stomata of *Abies alba* Mill. needles from National park "Risnjak" in Croatia *Acta Biologica Cracoviensia*, Series: Botanica (u tisku).
- Baker, E.A. 1973: Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. Long Ashton Research Station, University of Bristol, Bristol BS18 9AF.
- Bavcon, J., Druškovič, B., Papeš, D. 1994: Germination of seeds and cytogenetic analysis of the spruce in differently polluted areas of Slovenia. *Phyton* 33, 267-277.
- Besendorfer, V., Zoldoš, V., Peškan, T., Krsnik-Rasol, M., Littvay, T., Papeš, D. 1996: Identification of potential cytogenetical and biochemical markers in bioindication of common oak forests. *Phyton* (Horn, Austria) 36(3), 139-146.
- Druškovič, B. 1988a: Citogenetska bioindikacija I-Uporaba citogenetske analize pri odkrivanju de-lovanja genotoksičnih polutantov na gozdno drevje, *Biološki Vestnik* 36, 1-18.
- Druškovič, B. 1988b: Citogenetska Bioindikacija II-Prikaz načina ocenjivanja obremenjenosti genetskoga Materiala in oceana ogroženosti smreke na posamezni lokalitet, *Biološki Vestnik* 36, 31-44.
- Fiskesjö, G. 1985: The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102, 99-112.
- Fiskesjö, G. 1988: The Allium test - an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research* 197, 243-260.
- Fiskesjö, G. 1990: Occurrence and degeneration of "Al-structures" in root cap cells of *Allium cepa* L. after Al-treatment. *Hereditas* 112, 193-202.
- Fiskesjö, G. 1993: The Allium test in wastewater monitoring. *Environmental Toxicology and Water Quality, An International Journal* 8, 291-298.
- Huttunen, S., Laine, K. 1983: Effects of air-borne pollutants on the surface wax structure of *Pinus sylvestris* needles. *Annales Botanici Fennici* 20, 79-86.
- Klumpp, A., Klumpp G. 1996: Fluoride impact on native tree species of the atlantic forest near Cubatão, Brazil. *Water, Air and Soil Pollution* 87, 57-71.
- Levan, A. 1938: The effects of colchicine on root mitosis in *Allium*. *Hereditas* 24, 471-486.
- Müller, M., Guttenberger, H., Grill, D., Druškovič, B., Paradiž, J. 1991: A cytogenetic method for examining the vitality of spruces. *Phyton* 31, 143-155.
- Müller, M., Grill D., Guttenberger H. 1994a: The effects of interactions between ozone and CO₂ on the chromosomes of Norway Spruce root Meristems. *Phyton* 34, 321-335.
- Ohri, D., Ahuja, M.R. 1990: Giemsa C-banded karyotype in *Quercus* L. (Oak). *Silvae Genetica* 39, 216-219.
- Papeš, D., Besendorfer, V., Bosiljevac, V. 1989: The Allium-test response to cyanazine. *Acta Botanica Croatica* 48, 39-46.
- Papeš, D., Jelinić, S., Cerbah, M., Yakovlev, Š., S. 1997: Fluorescent chromosomal banding in *Picea omorika* and *P. abies*. U: Borzan, Ž., Schlarbaum, S.E. (ed.), *Cytogenetic Studies of Forest Trees and Scrub Species*. Proc. First IUFRO Cytogenetics Working Party S2.04-08 Symposium, Brijuni 8-11, 09.1993.103-109.
- Pavlica, M., Puizina, J., Papeš, D. 1995: Differences in response to Maleic hydrazide observed in diploid and triploid shallot root-tip cells. *Periodicum Biologorum* 97(4), 337-342.
- Puizina, J. 1997: Citogenetička i molekularno genetička obilježja prirodnih, hibridnih i poliploidnih formi crvenog luka (*Allium cepa* L.) Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, 1997.
- Rank, J., Nielsen, M.H. 1997: *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, andethyl methanesulfonate. *Mutation Research* 390, 121-127.
- Riding, R.T., Percy, K.E. 1985: Effects of SO₂ and other air pollutants on the morphology of epicuticular waxes on needles of *Pinus strobus* and *Pinus banksiana*. *New Phytology* 99, 555-563.
- Sauter, J.J., Voss, J.U. 1986: SEM-observations on the structural degradation of epistomatal waxes

- in *Picea abies* (L.) Karst. and its possible role in the "Fichtensterben". European Journal of Forest Pathology 16, 408-423.
- Schlegel, R., Craig, R.N. 1991: Mitosis: Normal control mechanisms and consequences of aberrant regulation in mammalian cells. U: Perspectives on cellular regulation: From bacteria to cancer (J. Campsi, D. D. Cunningham, M. Riley eds), wiley-liss, inc., New York, 253-249.
- Thijssse G., Baas, P. 1990: "Natural" and NH₃ induced variation in epicuticular needle wax morphology of *Pseudotsuga menziesii*. Trees: Structure and Function 4, 111-119.
- Zoldoš, V., Littvay, T., Besendorfer, V., Jelenić, S., Lorković, Z., Papeš, D. 1994a: The application of citogenetic and biochemical ana-
- lyses in determination of damage degree of common oak forests. Radovi 29(1), 151-160.
- Zoldoš, V., Besendorfer, V., Littvay, T., Papeš, D. 1994b: The common oak (*Quercus robur* L.) as potential test plant for cytotoxicity monitoring. Periodicum Biologorum 96 (4), 490-492.
- Zoldoš, V., Besendorfer, V., Jelenić, S., Lorković, Z., Littvay, T., Papeš, D. 1997: Cytogenetic damages as an indicator of pedunculate oak forest decline. U: Borzan, Ž. Schlarbaum, S.E. (ed.), Cytogenetic Studies of Forest Trees and Scrub Species. Proc. First IUFRO Cytogenetics Working Party S2.04-08 Symposium, Brijuni 8-11, 09.1993.275-284.

SUMMARY: Decline and decay of pedunculate oak forests (*Quercus robur* L.) becomes a more and more important problem of forestry in Croatia. Decay of forests is obvious near industrial formations and their dumps. The effect of phosphogypsum and waste waters of fertiliser factories in Kutina on pedunculate oak forests which are located near these factories is examined in this elaboration.

The chemical analysis of the water from the dumps has proved the presence of heavy metals (Al, Cd and others), as well as a remarkable low pH value of 1,2 - 2,6. The pedunculate oak growing in the surrounding of the dump showed 60-70% of the crown damage and therefore belongs to the category of highly damaged trees.

As a first step in our investigation we applied a short-term cytotoxicity-test. Root-tip meristematic cells were treated by different dilution rates (from 0,5% to 10%) of phosphogypsum from the dump. Roots were excised from the sprouts germinated in laboratory from the acorns gathered in the tree seed stand.

Mitotic activity decreased with an increase of concentration, except for the concentration of 2,5% where the opposite effect was noticed. All concentrations caused the same cytotoxic effect e.i. mitotic aberrations such as c-mitosis and lagging chromosomes appeared as a result of the spindle disturbances. The most frequent were subchromatide aberrations such as sticking of the chromosomes.

There was no significant change of the mitotic activity after a 24-hour recovery for any of the concentrations. Mitotic activity remained low and even higher rate of the subchromatide aberrations were noticed.

Allium-test was applied as a control test of the cyto- and genotoxicity of the phosphogypsum from the dumps. Bulbs of the onion *Allium ascalonicum* were germinated in the tap water and treated subsequently with the same dilutions of phosphogypsum that were used in cytotoxicity test with roots of pedunculate oak. As a negative control we used onions germinated in tap water while onions treated with maleichydrazide served as a positive control.

Allium-test confirmed cyto- and genotoxicity of phosphogypsum from the dumps. Important inhibition of the roots' growth after a five-days-treatment

with the all concentrations was noticed. Although mitotic activity was hardly lowered, a high number of the chromosomal aberrations was noticed of which chromosome breaks were the most frequent ones. The most frequent mitotic aberrations were c-mitosis and vagrant chromosomes.

In order to establish the immediate influence of phosphogypsum dumps on cytogenetic changes of pedunculate oak we analysed root-tip cells of the seedlings germinated from acorns which were collected from trees growing close to the dump. Seedlings germinated from acorns collected in the seedling stand served as negative control. No significant difference of the mitotic activity between the germs near the dump and germs from the seedling stand was noticed. On the other hand, the germs near the dump showed twice higher rate of aberrations. Two types of chromosome aberrations; sticking and anaphase bridges, and three types of mitotic aberrations; multipolar spindle, c-mitosis and vagrant chromosomes, were noticed.

Apart from the cytogenetic analyses of pedunculate oak, fluoride quantity in the leafs of the trees growing close to phosphogypsum dumps as well as trees from the seedling stand (control) was established. As increased quantity of fluoride in the leaves of the oaks near the dump was noticed, we analysed morphology of the epicuticular wax in leafs of the different development stages using an electron-scanning microscope. The analysis revealed the connection between fluoride quantity in the leaves of pedunculate oak and the degree of epicuticular wax degradation. In other words, the early degradation (so called crust) of epicuticular wax on the stomata in the leaves of oaks close to the dump was recorded, while in the control leaves the same was not observed. Our research revealed the effect-complexity of the phosphogypsum dump on the vitality and the reproductive capacity of pedunculate oak.