

GDK 181.45+176.1 *Viburnum lantana* L.

Prispelo / Received: 02.10.2002

Sprejeto / Accepted: 05.11.2002

Izvirni znanstveni članek

Original scientific paper

UČINKI OZONA V TROPOSFERI NA NAVADNO DOBROVITO (*VIBURNUM LANTANA* L.)

Tomaž REMIČ*, Helena ŠIRCELJ**, Boris TURK**, Franc BATIČ**

Izvleček:

Ugotavljali smo primernost navadne dobrovite kot možne nove bioindikatorske vrste. Zanj smo se odločili, ker je v Sloveniji splošno razširjena, v Švici pa so jo že uporabili za sledenje povečanih koncentracij troposferskega ozona. V raziskavi smo nabrali rastline iz devetih naključno izbranih populacij v Sloveniji; izpostavili smo jih v Iskrbi pri Kočevski Reki (ruralno okolje) in v Ljubljani (mestno okolje). Skozi tri vegetacijska obdobja smo spremljali pojavljanje vidnih ozonskih poškodb na listih navadne dobrovite. Določili smo vsebnosti askorbinske kisline in pigmentov v listih; dobljene rezultate smo primerjali s koncentracijami ozona v zraku. Tipičnih ozonskih poškodb na poskusnih mestih nismo zaznali; kljub temu smo v naravnem okolju odkrili na ozon občutljiv genotip navadne dobrovite, na katerem bi bilo smiselno opraviti dodatne raziskave. Rezultati biokemijskih analiz (predvsem vsebnosti karotenoidov ksantofilnega cikla, beta karotena in askorbinske kisline v listih) so pokazali, da so bile rastline pod večjim oksidativnim stresom na poskusnem mestu Iskrba.

Ključne besede: *Viburnum lantana* L., ozon, bioindikacija, onesnaženost ozračja, pigmenti, askorbinska kislina

EFFECTS OF TROPOSPHERE OZONE ON WAYFARING TREE (*VIBURNUM LANTANA* L.)

Abstract:

The aim of this study was to use the native *Viburnum lantana* L. as an ozone bioindicator. This shrub was chosen due to its wide distribution in Slovenia and the fact that it has been already used for troposphere ozone monitoring in Switzerland. Nine populations of *Viburnum lantana* were randomly collected in Slovenia and planted at Iskrba by Kočevska Reka (rural site) and Ljubljana (urban site). Foliar injuries were monitored and recorded during three vegetation periods. The plants were also tested for biochemical response to ozone by analyzing photosynthetic pigments and ascorbic acid. Typical ozone injuries did not appear on *Viburnum lantana* leaves at the experimental sites. Nevertheless, in the year 2000 we found a *Viburnum lantana* plant about 10 km north from Iskrba, which showed typical ozone injuries. We presume that the plant is an ozone sensitive genotype. Analyses of photosynthetic pigments and ascorbic acid showed more pronounced "oxidative stress" at the Iskrba site. It was manifested by increase of ascorbic acid and photosynthetic pigments, especially carotenoids of xanthophyll cycle and beta carotene.

Key words: *Viburnum lantana* L., ozone, bioindication, atmosphere pollution, pigments, ascorbic acid

* Prigorica 97, 1331 Dolenja vas, SVN

** BF, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, SVN

VSEBINA
CONTENTS

1	UVOD	
	INTRODUCTION	45
2	MATERIAL IN METODE DELA	
	MATERIAL AND METHODS	46
3	REZULTATI IN RAZPRAVA	
	RESULTS AND DISCUSSION	48
4	ZAKLJUČKI	
	CONCLUSIONS.....	55
5	SUMMARY	55
6	VIRI	
	REFERENCES.....	57
	ZAHVALA	
	ACKNOWLEDGEMENT	59

1 UVOD INTRODUCTION

Človekovo dejavnost že od vsega začetka spremlja pojav, ki ga danes imenujemo onesnaževanje okolja. Proces onesnaževanja okolja je po mnenju številnih raziskovalcev povzročil poslabšanje zdravstvenega stanja gozdov, ponekod pa tudi njihovo propadanje. Če se omejimo le na onesnaževanje zraka, so se v Sloveniji v zadnjem času povečale koncentracije fotooksidantov (predvsem ozona). Meritve ozona namreč kažejo, da so občasno koncentracije fotooksidantov zelo velike in presegajo prag za nastanek poškodb na vegetaciji, vplivajo pa tudi na zdravje ljudi. Koncentracije ozona v poletnem času pogosto presegajo urne, osemurne in dnevne mejne emisijske vrednosti. Največje izmerjene, dalj časa trajajoče koncentracije so bile zabeležene v krajih z večjo nadmorsko višino v ruralnem okolju, kot so Krvavec, Iskrba in Kovk (MOPE 2002). Fotooksidanti so plinasta onesnažila, ki nastajajo v ozračju iz primarnih onesnažil (predvsem dušikovih oksidov in ogljikovodikov) ob delovanju sončne svetlobe. Zaradi tega jih imenujemo tudi sekundarna onesnažila. Za razliko od primarnih onesnažil zraka (npr. žveplov dioksid, fluorovodik, dim, saje) je za fotooksidante značilno, da nastajajo velikokrat daleč stran od emisijskih virov njihovih predhodnikov in pogosto povzročajo poškodbe na vegetaciji v ruralnem okolju (KRUPA / MANNING 1988, HEGGESTAD / BENNETT 1984). Vidne poškodbe in upad pridelka zaradi vpliva fotooksidantov so najprej opazili na številnih kmetijskih rastlinah (KRUPA / MANNING 1988), zatem pa tudi na naravni vegetaciji – predvsem na občutljivejših drevesnih vrstah (FUHRER / ACHERMANN 1994). Med fotooksidanti ima ozon v troposferi največji negativni vpliv na zdravje ljudi in na delovanje ekosistemov. Nasprotno je ozon v stratosferi znan kot naravni ščit pred škodljivim ultravijoličnim sevanjem.

Ozon pri večini rastlin najprej oksidira membranske beljakovine in tako spremeni prepustnost celičnih membran (SCHULTE-HOSTEDE 1987). Zaradi spremenjene prepustnosti plazmaleme se nadaljuje pot ozona v notranjost celice. Med najbolj občutljive celične organele nedvomno sodi kloroplast. Po izpostavitvi rastline večjim koncentracijam ozona pride namreč zelo hitro do dezintegracije kloroplastov, kateri sledi razgradnja klorofila. Če je razgradnja večja od njegove sinteze, list izgubi zeleno barvo. Nastanejo poškodbe, ki jih imenujemo kloroze. Pri rastlinah z dobro razvitim parenhimom so poškodbe sprva omejene le na nekaj palisadnih celic, kasneje se

poškodovanost širi proti površini in pojavijo se vidne poškodbe (ARNDT / NOBEL / SCHWEIZER 1987). Odvisno od prevladujočega pigmenta so na listih vidne rumene, rdeče, srebrnkaste, modrikaste ali rjavkaste pike (TAYLOR 1984). Klorozam sledijo nekroze, pri katerih se ne razgradijo samo klorofili, ampak mestoma odmre celotno tkivo. Na listih so vidne nekrotične pike, ki so lahko sivkasto-zelene, rjave, bele, črne, rdeče, rdeče-vijolične ter lahko preidejo v svetlejše ali temnejše odtenke (KRUPA / MANNING 1988).

Raziskave vpliva fotooksidantov na rastline so bile v Sloveniji do sedaj opravljene predvsem na kmetijskih bioindikatorskih rastlinah, in sicer na občutljivih sortah tobaka *Nicotiana tabacum* 'BelW3', 'BelB', 'BelC' (BATIČ *et al.* 1995) ter na plazeči detelji *Trifolium repens* 'Menna', 'Regal', 'NC-R', 'NC-S' (ŠIRCELJ / BATIČ / BIENELLI 1997, TURK *et al.* 1999, PAČNIK / BATIČ / ŠIRCELJ 1999) v okviru projekta *ICP Crops* (sedaj *ICP Vegetation*) in le v manjši meri tudi na naravni vegetaciji. V okviru programa *ICP Vegetation* je potekala tudi naša raziskava, katere namen je bil ugotoviti primernost navadne dobrovite (*Viburnum lantana* L.) kot možne nove bioindikatorske vrste za sledenje ozona v gozdnih ekosistemih in na polnaravni vegetaciji (pašniki, grmišča). Za navadno dobrovito smo se odločili, ker je po ugotovitvah laboratorijskih raziskav (SKELLY *et al.* 1998) in raziskav na poskusnem polju (VANDERHEYDEN *et al.* 1999) občutljiva na povečane koncentracije ozona. Poleg tega uspeva po vsej Sloveniji, se dobro vegetativno razmnožuje in ima nedeterminantno rast (novi listi se razvijajo skozi vso rastno sezono, kar omogoča spremljanje pojavljanja ozonskih epizod skozi rastno sezono).

2 MATERIAL IN METODE DELA MATERIAL AND METHODS

V okviru raziskave smo presadili marca leta 1998 rastline navadne dobrovite iz devetih naključno izbranih populacij iz različnih predelov Slovenije na poskusni mesti v Ljubljano in Iskrbo pri Kočevski Reki. Spremljali smo pojavljanje vidnih poškodb na listih navadne dobrovite enkrat tedensko, ob pojavu dalj časa trajajočih velikih ozonskih koncentracij tudi v naravnem okolju, v letih 1998, 1999 ter 2000. Na vsaki izpostavljeni rastlini smo prešteli vse liste; posebej smo šteli tiste, ki so bili poškodovani zaradi

delovanja ozona. Za tipične ozonske poškodbe smo šteli rdeče-vijolične točkaste kloroze in rjavo-rumene točkaste nekroze. Za vsak poškodovani list smo s pomočjo posebne skale, ki temelji na razporeditvi posameznih listov v šest kategorij (skalo smo prevzeli od Norvežanov; ANONYMOUS 1989), ocenili stopnjo (odstotni razred) poškodovanosti listne površine. Pri nas je bila omenjena skala že uporabljena za ocenjevanje poškodovanosti tobaka (za razlago glej BATIČ *et al.* 1995). Podatke smo nato preračunali na naslednje vrednosti: PLR (odstotek poškodovanih listov na rastlino); PLPR (odstotek poškodovanosti listne površine na rastlino); MPLR (odstotek močno poškodovanih listov na rastlino), in sicer kot:

- % PLR = (število pošk. listov na rastlino)*100 / število vseh listov na rastlini;
- % PLPR = (SUM (% pošk. listne pov.) na rastlino) / število vseh listov na rastlini;
- % MPLR = število listov v 4. + 5. + 6. kategoriji / število vseh listov na rastlini.

Pred pojavom vidnih poškodb povzroči delovanje onesnažil na rastline najprej spremembe na biokemijski in fiziološki ravni. Zato smo v letih 1998 in 1999 enkrat letno na obeh poskusnih mestih vzorčili liste za analizo rastlinskih pigmentov ter askorbinske kisline. V letu 1998 smo material za biokemične analize na Iskrbi nabrali na po treh rastlinah iz populacij »Zagora«, »Dobrna«, »Dolič« in »Mala gora«; v Ljubljani pa na treh rastlinah iz populacije »Mala gora«. V letu 1999 smo material nabrali na istih rastlinah kot v letu 1998; dodatno smo vključili v biokemične analize v Iskrbi tri rastline iz populacije »Gradišče«, v Ljubljani pa tri rastline iz populacije »Kozje«. S pomočjo HPLC sistema (*Spectra Physics*) smo določili vsebnosti askorbinske kisline po metodi, ki so jo razvili TAUSZ / KRANNER / GRILL (1996); vsebnosti fotosinteznih pigmentov v listih smo določili po metodi, ki jo je razvil PFEIFHOFER (1989). Značilnost razlik med povprečnimi vrednostmi parametrov biokemičnih analiz smo preizkusili s t-testom za neodvisne vzorce; kot značilno različne smo privzeli rezultate, če je bila stopnja statističnega tveganja $p < 0,05$. Za poskusni mesti v Ljubljani ter Iskrbi pri Kočevski Reki smo se odločili zaradi različnih okoljskih razmer za tvorbo ozona ter bližine meteoroloških postaj, ki merijo troposferski ozon v zraku. Polurne ozonske koncentracije iz merilnih postaj smo preračunali na dnevno AOT40 vrednost; iz pridobljenih podatkov smo ugotavljali preseganje kritične meje za vidne poškodbe ter kritične meje za gozdno drevje (KÄRENLAMPI / SKÄRBY 1996). AOT40 vrednost se izračuna za svetli del dneva; predstavlja vsoto razlik med urnimi ozonskimi koncentracijami in vrednostjo 40

ppb za vsako uro, ko ozonske koncentracije presežejo 40 ppb (enota ppb v primeru ozona pomeni $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ zraka pri temperaturi $20 \text{ }^\circ\text{C}$).

3 REZULTATI IN RAZPRAVA **RESULTS AND DISCUSSION**

Delovna hipoteza je temeljila na pričakovanju večje poškodovanosti in pojava vidnih poškodb rastlin na poskusnem mestu Iskrba. Pričakovali smo povečanje vsebnosti askorbinske kisline in zaščitnih pigmentov v listih ter zmanjšanje vsebnosti klorofila, saj so ti parametri kazalniki oksidativnega stresa pri rastlinah.

3.1 KONCENTRACIJE OZONA NA POSKUSNIH MESTIH **OZONE CONCENTRATIONS ON EXPERIMENTAL SITES**

Izbrani poskusni mesti v Ljubljani ter Iskrbi pri Kočevski Reki se razlikujeta predvsem zaradi različnih okoljskih razmer za tvorbo ozona. Poskusno mesto v Ljubljani je primer urbanega, onesnaženega okolja s stalnimi emisijami dušikovih oksidov, kar ima za posledico relativno manjšo tvorbo ozona na račun njegove večje razgradnje. Dušikovi oksidi niso le predhodniki ozona, ampak tudi njegovi porabniki, zato med njimi potekajo nepretrgane kemične reakcije – ozon nastaja, a se hkrati tudi porablja. Iskrba pri Kočevski Reki je primer ruralnega, "čistega" okolja; v oddaljenosti do 50 km od postaje ni večjih virov emisij, zato je tu prisotnost ozona posledica daljinskega transporta. Koncentracije dušikovega monoksida (glavnega porabnika ozona) so običajno majhne, kar povzroča povečane koncentracije ozona in povečanje deleža vidnih poškodb na rastlinah. V vseh letih poskusa so bile po pričakovanjih na mestu Iskrba večje povprečne ozonske koncentracije in večje AOT40 vrednosti kot v Ljubljani (preglednica 1); za naše razmere so bile izjemno velike v letu 2000, ko je AOT40 vrednost za mesec junij na poskusnem mestu Iskrba znašala 5.206 ppb ur, kar je skoraj toliko, kot je bila v letu 1999 AOT40 vrednost v Ljubljani v vseh treh poletnih mesecih (5.401 ppb ur). V Ljubljani so bile v času poskusa največje AOT40 vrednosti v letu 1998, ko so le malo zaostajale za vrednostmi z Iskrbe iz istega leta ter celo presegale vrednosti z Iskrbe iz leta 1999. V letu 1999 so bile dosežene najmanjše AOT40 vrednosti tako v Iskrbi kot v Ljubljani. V vseh

treh letih poskusa je bila na Iskrbi (v Ljubljani pa le v letu 1998) presežena kritična meja za gozdno drevje (10.000 ppb ur), kljub temu da smo upoštevali le seštevek AOT40 vrednosti mesecev maj, junij, julij, avgust, za katere smo dobili podatke o meritvah ozona, in ne celotne vegetacijske dobe od aprila do konca septembra, kot je zapisano v definiciji zgornje kritične meje (KÄRENLAMPI / SKÄRBY 1996). V preglednici 1 so podane največje dnevne AOT40 vrednosti in skupna vsota AOT40 vrednosti od začetka maja do konca avgusta za obe poskusna mesti in vsa tri leta vzorčenja.

Preglednica 1: Primerjava med AOT40 vrednostmi za poskusni mesti v letih 1998, 1999 ter 2000 (s krepkim tiskom so prikazane največje vrednosti znotraj posameznega leta)

Table 1: Comparison between AOT40 values for experimental sites in the years 1998, 1999 and 2000 (the highest values in a single year in bold)

Leto / Year	Poskusno mesto / Experimental site	Max. dnevna AOT40 (ppb ur) / Max. daily AOT40 (ppb h)	Vsota AOT40 (ppb ur; maj-avg.) / Sum AOT40 (ppb h; May-Aug.)
1998	Iskrba	361 (22. junij / June)	14.621
	Ljubljana	391 (22. junij / June)	11.235
1999	Iskrba	347 (30. maj / May)	10.291
	Ljubljana	312 (30. maj / May)	7.485
2000	Iskrba	495 (22. junij / June)	17.778
	Ljubljana	267 (17. julij / July)	7.188

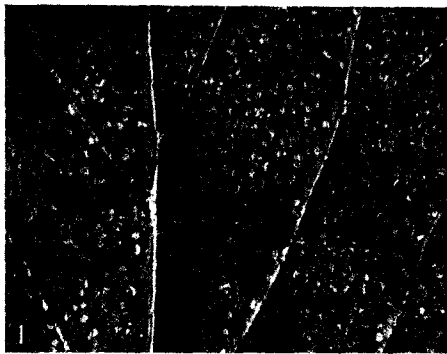
3.2 POJAVLJANJE POŠKODB NA LISTIH NAVADNE DOBROVITE APPEARANCE OF LEAF INJURIES ON WAYFARING TREE

Tipične vidne ozonske poškodbe se na izpostavljenih rastlinah niso pojavile. V naravnem okolju smo 26.6.2000 nad Grčaricami (10 km severozahodno od Iskrbe; jelovo-bukov gozd, 700 m nadmorske višine, jugozahodna lega) našli navadno dobrovito s tipičnimi ozonskimi poškodbami (slike 1, 2, 3, 4). Pod lupo so bile lepo vidne nekroze in kloroze listnega tkiva. Poškodovani so bili predvsem starejši listi; bolj so bile poškodovane celice palisadnega kot gobastega tkiva. Celice povrhnjice niso bile poškodovane, ampak so odmrle kasneje, ker jim celice listne sredice niso več dovajale hrane in vode (sliki 3, 4). Kot je pokazala že analiza rezultatov koncentracij ozona na poskusnih mestih, so bile v letu 2000 na Iskrbi zelo velike ozonske koncentracije. V treh zaporednih dneh (20. do 22. junij) je AOT40 vrednost znašala 1.333 ppb ur; kritična meja za vidne ozonske poškodbe

(700 ppb ur) je bila torej močno presežena. Obravnavana rastlina je imela dne 26.6. 50 % poškodovanih listov (PLR) in 15 % poškodovane listne površine (PLPR). Poškodovani so bili predvsem starejši listi. Ob ponovnih pregledih v juliju in avgustu so se poškodbe razširile tudi na novonastale odrasle liste. Poškodbe so se na obravnavani rastlini v Grčaricah ponovile v letih 2001 in 2002; ravno tako smo jih opazili na delu te rastline, ki smo ga v letu 2002 presadili na Iskrbo. Po izgledu poškodb bi lahko pomislili na zelo močan napad pršic (*Acarina*) ali stenic (*Heteroptera*). Teoretično pa bi lahko bili povzročitelji poškodb tudi endofitni glivni organizmi. V skupino endofitov spadajo vsi organizmi, ki se v določeni fazi svojega razvojnega cikla lahko naselijo v notranja tkiva rastline, pri čemer ne povzročajo vidnih poškodb na gostitelju (JURC 1994). Nadalje navajajo (*ibid.*), da lahko določene endofitne glive del svojega življenja živijo z rastlino v mutualizmu, v drugem delu pa v parazitizmu in takrat povzročajo vidne simptome rastlinskih bolezni. Vendar s podrobnim mikroskopskim pregledom listov nismo odkrili nikakršnih znakov pretekle prisotnosti žuželk (npr. ostanki leva, mrtve žuželke, njihovi iztrebki); zgoraj opisani simptomi poškodb rastlin tudi niso značilni za glive. Prikazane poškodbe pa so zelo podobne poškodbam, ki so jih zasledili švicarski raziskovalci (INNES / SKELLY / SCHAUB 2001) na rastlinah navadne dobrovite, ki so jih v laboratoriju izpostavili velikim ozonskim koncentracijam (120 ppb, 5 tednov zapored, 5 dni v tednu, 8 ur na dan,), zato predvidevamo, da smo odkril na ozon občutljiv genotip navadne dobrovite. Za nadaljnje preučevanje bi bilo zanimivo občutljivo rastlino vegetativno razmnožiti in jo spremljati na poskusnih mestih po Sloveniji ter na izvornem nahajališču Grčarice. Smiselno bi bilo narediti primerjavo z ostalimi rastlinami na podlagi terenskih opazovanj, izvesti laboratorijsko izpostavitve povečanim ozonskim koncentracijam in opraviti primerjave biokemijskih parametrov ter v rastlinah živečih endofitov.

V vseh letih opazovanja rastlin smo zasledili tudi rdečkasta obarvanja listov abiotskega izvora (sliki 5, 6). Obarvanja so se pojavljala na obeh poskusnih mestih enakomerno razpršeno po rastlinah, a predvsem na delih listov, ki so bili izpostavljeni direktnemu sončnemu sevanju. Kot vidimo na sliki 6 prej prikriti del lista (slika 5) ni rdečkasto obarvan. V naravi smo podobno obarvanje zasledili na rastlinah, ki so rasle na suhih, sončnih legah. Po novejših navedbah (INNES / SKELLY / SCHAUB 2001) so takšna obarvanja posledica delovanja ozona na rastlino; vendar jih nismo šteli za listno poškodbo, saj do njih ne pride le zaradi delovanja ozona, temveč tudi zaradi ostalih

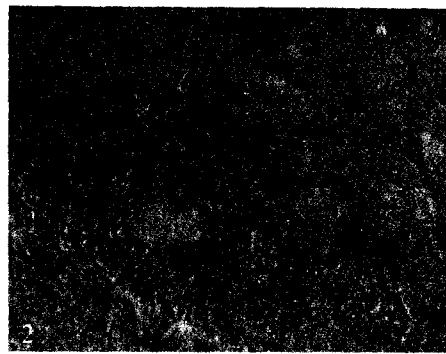
okoljskih dejavnikov, kot so svetlobni, temperaturni in vodni režim, hranila ter patogeni organizmi (MARTIN / GERATZ 1993).



Slika 1: Vidne ozonske poškodbe na zgornji strani lista navadne dobrovite

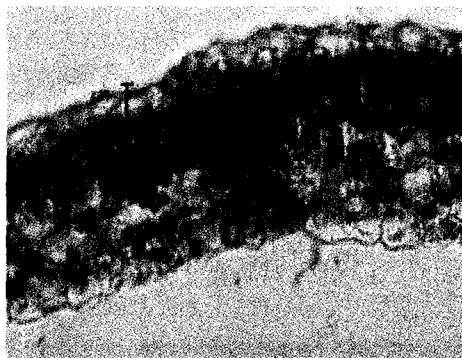
(*Viburnum lantana* L.)

Figure 1: Visible ozone injuries on the upper side of a leaf of *Viburnum lantana*



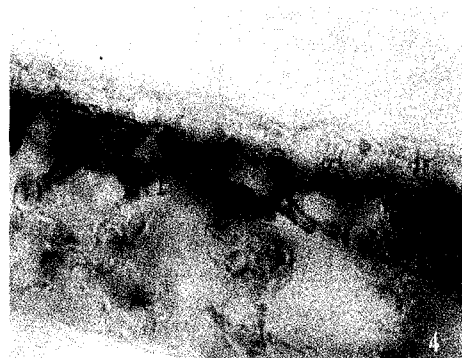
Slika 2: Zgornja stran lista s slike 1, fotografirana z lupo Olympus SZH 10

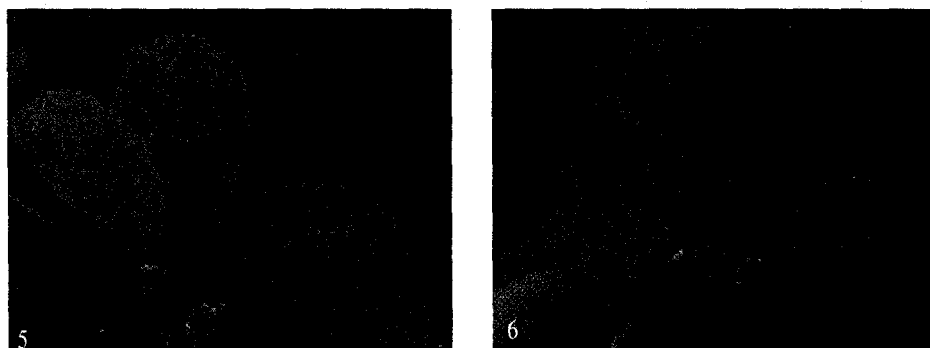
Figure 2: Upper side of the same leaf as in figure 1 photographed with an Olympus SZH 10 stereo microscope



Slika 3, 4: Vidne ozonske poškodbe na prečnem prerezu lista navadne dobrovite (*Viburnum lantana* L.), mikroskop Olympus AX70TRF, na sliki 3 predstavlja merilce velikost 50 μm , na sliki 4 pa 10 μm

Figure 3, 4: Visible ozone injuries on cross section of a leaf of *Viburnum lantana*, photographed with an Olympus AX70TRF microscope, on fig. 3 bar is equal to 50 μm , on fig. 4 bar is equal to 10 μm





Slika 5, 6: Rdečkasto obarvanje listov. V primerjavi s sliko 5 je na sliki 6 v celoti odkrit opazovani list na sredini fotografije. Vidimo, da prej prikriti del lista ni rdečkasto obarvan

Figure 5, 6: Reddening of leaves. By removing the upper leaf, as shown on the fig.6 (right figure), it can be seen that the previously covered part of lamina is not red

Vidne poškodbe zaradi delovanja povečanih koncentracij ozona na navadno dobrovito se niso pojavile na poskusnih mestih, niti v naravi, v takem obsegu, kot smo pričakovali. Vendar so v primerjavi s podobnim poskusom, ki so ga VANDERHEYDEN *et al.* 1999 izvedli v Švici na nekaterih avtohtonih rastlinskih vrstah, in ki je potrdil navadno dobrovito kot rastlino, občutljivo na povečane ozonske koncentracije, ozonske koncentracije pri nas manjše. Največja kumulativna AOT40 vrednost štirih mesecev (maj – avgust) je pri nas v letu 2000 na Iskrbi znašala 17.778 ppb ur; takrat smo v naravnem okolju odkrili rastlino s tipičnimi ozonskimi poškodbami. Samo ta vrednost je primerljiva s kumulativno AOT40 vrednostjo štirih mesecev (maj – avgust) v Švici, kjer je v letu 1997 znašala okoli 19.000 ppb ur, v letu 1998 pa približno 27.000 ppb ur (*ibid.*). Urne koncentracije v tem delu Švice ob ozonskih epizodah presegajo 150 ppb oziroma 300 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (SKELLY *et al.* 1998).

3.3 BIOKEMIČNE ANALIZE BIOCHEMICAL ANALYSES

Pri analizi rezultatov biokemičnih parametrov navadne dobrovite smo prišli do zanimivih ugotovitev, večinoma v skladu s pričakovanimi (preglednica 2). Vsebnost karotenoidov ksantofilnega cikla (violaksantina, anteraksantina, zeaksantina; v nadaljevanju V+A+Z, predvsem zeaksantina ter anteraksantina, s pomočjo katerih rastlina razsipava absorbirano presežno svetlobno energijo, se poveča v primeru počasi razvijajočega se oksidativnega stresa (npr. kot posledica delovanja O₃ na rastlino). Delež presežne absorbirane svetlobne energije se pod oksidativnim stresom poveča zaradi zmanjšane fotosinteze rastline pod stresom (PALLETT / YOUNG 1993). V okviru naše raziskave smo ugotovili, da je bila vsebnost pigmentov V+A+Z v letu 1999 statistično značilno večja na poskusnem mestu Iskrba, kar je verjetno posledica prilagoditve na večje koncentracije ozona na Iskrbi kot v Ljubljani. V letu 1998 ni bilo razlik v vsebnosti pigmentov V+A+Z med poskusnima mestoma. Primerjava srednje vrednosti skupne vsebnosti pigmentov V+A+Z ne glede na poskusno mesto za leti 1998 in 1999 je pokazala statistično značilno večjo vsebnost teh pigmentov v letu 1998, kar si razlagamo z dejstvom, da so bile AOT40 vrednosti v letu 1998 na obeh mestih velike v primerjavi z letom 1999. Vsebnost β -karotena in skupnih karotenoidov se v primeru počasi razvijajočega se oksidativnega stresa v rastlini poveča (ŠIRCELJ / BATIČ / ŠTAMPAR 1999). Statistično značilno povečano vsebnost β -karotena in skupnih karotenoidov v letu 1998 v primerjavi z letom 1999 si razlagamo z dejstvom, da so bile rastline v letu 1998 na obeh poskusnih mestih izpostavljene večjim koncentracijam ozona kot v letu 1999. V letu 1999 je bil po pričakovanjih oksidativni stres (upoštevaje povprečne ozonske koncentracije oziroma AOT40 vrednosti) večji na poskusnem mestu Iskrba. To hipotezo potrjujejo tudi statistično značilno večje vsebnosti β -karotena in skupnih karotenoidov na poskusnem mestu Iskrba v primerjavi s poskusnim mestom Ljubljana v letu 1999. Pri zaplinjevanju rastlin z ozonom se poveča vsebnost askorbinske kisline v rastlini; poveča se aktivnost askorbinsko-glutationskega cikla, kar ima za posledico večjo obrambno sposobnost rastline pred oksidativnim stresom (CASTILLO / GREPPIN 1988). Vsebnost askorbinske kisline je bila v obeh letih poskusa večja na poskusnem mestu Iskrba. Ne glede na poskusno mesto so bile vsebnosti askorbinske kisline večje v letu 1998, kar se sklada z meritvami ozona. V rastlinah, izpostavljenih povečanim ozonskim koncentracijam, se praviloma vsebnost klorofilov a in b zmanjša (PALLET / YOUNG 1993). V okviru naše raziskave smo proti

pričakovanjem ugotovili, da je bila vsebnost klorofilov a in b statistično značilno večja v letu 1998 v primerjavi z letom 1999 kljub večjim koncentracijam ozona v letu 1998. V letu 1998 med poskusnima mestoma nismo ugotovili razlik v vsebnosti klorofilov. V letu 1999 so bile vrednosti klorofilov a in b proti pričakovanju statistično značilno manjše na poskusnem mestu Ljubljana. Iz rezultatov analiz klorofilov in antioksidantov lahko sklepamo, da je bil sistem antioksidantov dovolj uspešen pri zaščiti klorofilnih molekul pred oksidacijo.

Najpomembnejši rezultati biokemičnih analiz so prikazani v preglednici 2; podane so srednje vrednosti vsebnosti askorbinske kisline in izbranih fotosinteznih pigmentov v listih navadne dobrovite, in sicer ločeno ter za obe poskusni mesti skupaj.

Preglednica 2: Vsebnosti fotosinteznih pigmentov in askorbinske kisline (mg/g suhe teže) v listih navadne dobrovite (*Viburnum lantana* L.)

Table 2: Photosynthetic pigments and ascorbic acid content (mg/g DW) in leaves of the wayfaring tree (*Viburnum lantana* L.)

Leto / Year	Poskusno mesto / Experimental site	Z	V+A+Z	b-kar	Vsi K	Kl a+b	ASK
1998	Iskrba	0,023	0,134	0,248	0,825	2,654	3,169
	Ljubljana	0,009	0,162	0,271	1,059	3,100	2,476
	Skup. povp. IS+LJ	0,021	0,140*	0,252*	0,872*	2,743*	2,996
1999	Iskrba	0,040	0,125 ^s	0,132 ^s	0,524 ^s	1,654 ^s	2,437
	Ljubljana	0,012	0,028 ^s	0,076 ^s	0,282 ^s	0,872 ^s	2,288
	Skup. povp. IS+LJ	0,032	0,097*	0,116*	0,455*	1,430*	2,395

Legenda / Legend: Z: zeaksantin / zeaxanthin; b-kar: β -karoten / β -carotene; V+A+Z: violaksantin + anteraksantin + zeaksantin / violaxanthin + anteraxanthin + zeaxanthin; Vsi K: skupni karotenoidi / total carotenoids; Kl a+b: klorofil a+b / chlorophyll a+b; ASK: askorbinska kislina / ascorbic acid; Skup. povp. IS+LJ: srednja vrednost znotraj posameznega leta vzorčenja za obe poskusni mesti skupaj / mean value of all samples made in a single year at experimental sites Iskrba and Ljubljana; ^s: statistično značilne razlike med poskusnima mestoma znotraj posameznega leta vzorčenja / statistically significant differences between experimental sites in selected year of sampling; * : statistično značilne razlike med letoma 1998 in 1999 za obe poskusni mesti skupaj / statistically significant differences between years 1998 and 1999 for both experimental sites together.

4 ZAKLJUČKI CONCLUSIONS

Sklenemo lahko:

- Vidne ozonske poškodbe na izpostavljenih rastlinah navadne dobrovite se niso pojavile.
- V naravnem okolju smo odkrili na ozon občutljiv genotip navadne dobrovite, na katerem bi bilo smiselno opraviti dodatne raziskave, da bi ga lahko v prihodnosti uporabili kot bioindikator za spremljanje povečanih koncentracij troposferskega ozona v okolju.
- Čeprav se vidne ozonske poškodbe na poskusnih mestih na navadni dobroviti niso pojavile, so analize vsebnosti zaščitnih pigmentov in askorbinske kisline v listih potrdile naša predvidevanja, da so rastline pod večjim oksidativnim stresom na poskusnem mestu Iskrba, kar je v skladu z meritvami ozona in dosedanjimi raziskavami na izbrani sorti plazeče detelje na teh dveh poskusnih mestih.
- Koncentracije ozona so povečane in zaskrbljujoče predvsem v ruralnem okolju.
- Način ocenjevanja poškodovanosti rastlin navadne dobrovite, ki smo ga uporabili v našem poskusu, je zelo podroben. Predlagamo, da se metodo ocenjevanja vidnih ozonskih poškodb na rastlinah navadne dobrovite spremeni: (1) preštejemo število vseh odraslih listov na preučevani rastlini in število vseh odraslih poškodovanih listov; (2) ne ocenimo stopnje poškodovanosti vsakega posameznega lista posebej, ampak ocenimo povprečno stopnjo poškodovanosti vseh poškodovanih listov.

5 SUMMARY

*The concentration of troposphere ozone has increased during recent decades in Slovenia, exceeding the threshold for plant injuries and health risks in human (MOPE 2002). The first investigations in Slovenia dealing with effects of ozone on plants were carried out on some agricultural plants (e.g. *Nicotiana tabacum* 'BelW3', 'BelB', 'BelC' (BATIČ et al. 1995), and *Trifolium repens* 'Menna', 'Regal', 'NC-R', 'NC-S' (TURK et al. 1999)). Almost no research of this kind had been done on natural vegetation. Therefore the aim of this study was to use native *Viburnum lantana* L. as a bioindicator. This shrub was chosen due to its wide distribution in Slovenia and the fact that it has been already used*

for troposphere ozone monitoring in Switzerland (SKELLY et al. 1998, VANDERHEYDEN et al. 1999). Another reason for taking this species was its indeterminate growth pattern. Nine populations of *Viburnum lantana* L. were randomly collected in Slovenia and planted in early spring 1998 at Iskrba (rural site) and in Ljubljana (urban site). Meteorological stations measuring air pollutants are set at both sites. Foliar injuries were monitored and recorded during 1998, 1999 and 2000 vegetation periods. Symptoms as observed by SKELLY et al. (1998) and VANDERHEYDEN et al. (1999) as well as others which appeared during the experiment were used. The plants were also tested for biochemical response to ozone by analyzing photosynthetic pigments and ascorbic acid, following methods developed by PFEIFHOFER (1989) for pigments and TAUSZ / KRANNER / GRILL (1996) for ascorbic acid. Ozone levels were, as expected, higher at Iskrba during the whole period of experiment. Typical ozone injuries did not appear on *Viburnum* leaves. Other than symptoms caused by insects and fungi, we only detected reddening of leaves on experimental sites, and no other symptoms as observed with *Viburnum* in Switzerland (VANDERHEYDEN et al. 1999). The reason for this might be a smaller ozone concentration in Slovenia. Nevertheless, in year 2000 we found a *Viburnum* plant about 10 km north from Iskrba, which showed typical ozone injuries. We suppose that the plant is of an ozone sensitive genotype. Reddening of leaves appeared quite often on *Viburnum* at Iskrba and Ljubljana but we did not characterize this as typical ozone induced symptom, since high light intensity, temperature stress, water stress, response to pathogens etc., might have also contributed to such effects (MARTIN / GERATZ 1993). Analyses of photosynthetic pigments and ascorbic acid showed more pronounced "oxidative stress" at the Iskrba site. It was manifested by increase of ascorbic acid and pigments, especially carotenoids of xanthophyll cycle and β -carotene. The same response was found in a white clover experiment on experimental sites Ljubljana and Iskrba (PAČNIK 1998). The results of analyses of chlorophyll and antioxidants indicated that the pool of antioxidants sufficiently protected chlorophyll molecules against oxidation.

6 VIRI REFERENCES

- ANONYMOUS, 1989. Ozon-under sokelser.- Norges naturverbund Felleskampanjen for moljo og utviklung, Fytotronene ned biologisk institut Universitatet i Oslo og Distriktshogskolen i Bo.
- ARNDT, U. / NOBEL, W. / SCHWEIZER, B., 1987. Bioindikatoren.- Stuttgart, Ulmer Verlag, 388 str.
- BATIČ, F. / KLEMENČIČ, S. / JENČIČ-MEDVEVŠEK, M. / MACAROL, B. / STRNIŠA, A. / RIBARIČ-LASNIK, C. / VIDERGAR, N. 1995. Bioindikacija ozona z občutljivim kultivarjem tobaka.- Zb. Gozd. Les. 47: 131-144.
- CASTILLO, F. J. / GREPPIN, H., 1988. Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolisem in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure.- Environ. Experim. Bot. 28: 231-238.
- FUHRER, J. / ACHERMANN, B., 1994. Critical levels for ozone a UN/ECE workshop report.- Liberfeld-Bern, Swiss federal research station for agricultural chemistry and environment hygiene. Report No. 16, 333 str.
- HEGGESTAD, H. E. / BENNETT, J. H., 1984. Impact of atmospheric pollution on agriculture.- V: TRESHOW, M. (ed.), Air pollution and plant life, New York, John & Sons, str. 357-397.
- INNES, J. L. / SKELLY, J. M. / SCHAUB, M., 2001. Ozone and broadleaved species. A guide to the identification of ozone-induced foliar injury.- Bern – Stuttgart – Wien, Birmensdorf, Eidgenössische Forschungsanstalt WSL, 136 str.
- JURC, M., 1994. Glivni endofiti v višjih rastlinah.- Zb. Gozd. Les. 44: 5-43.
- KÄRENLAMPI, L. / SKÄRBY L., 1996. Critical levels for ozone in Europe: Testing and Finalizing the Concepts.- UN-ECE Workshop Report. University of Kuopio, Department of Ecology and Environmental Science, 363 str.
- KRUPA, S. V. / MANNING, W. J., 1988. Atmospheric ozone: Formation and effects on vegetation.- Environ. Pollut. 50: 101-137.
- MARTIN, C. / GERATZ, T., 1993. Control of pigment biosynthesis genes during petal development.- Plant Cell 5: 1253-1264.
- MOPE, 2002. Onesnaženost zraka v letu 2000.- Ministrstvo za okolje, prostor in energijo, Agencija Rep. Slovenije za okolje. http://www.rzs-hm.si/pripravili_smo/porocila/zrak_letna.html

- PAČNIK, L. / BATIČ, F. / ŠIRCELJ, H., 1999. Impact of ozone on appearance of leaf injuries and changes in selected biochemical parameters of white clover (*Trifolium repens* L.).- V: Research Reports, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, 73: 123-134.
- PALLET, K. E. / YOUNG A. J., 1993. Carotenoids.- V: ALSCHER, R. G. / HESS, J. L. (eds.), Antioxidants in higher plants, CRC Press, str. 60-90.
- PFEIFHOFER, W., 1989. Evidence of chlorophyll b and lack of lutein in *Neottia nidus-avis* plastids.- Biochem. Physiol. Pflanzen. 184: 51-66.
- SCHULTE-HOSTEDE, S., 1987. Air pollution and plant metabolism.- London – New York, Elsevier applied science, 150 str.
- SKELLY, J. M. / INNES, J. L. / SNYDER, K. R. / SAVAGE, J. E. / HUG, C. / LANDOLT, W. / BLEULER, P., 1998. Investigations of ozone induced injury in forests of southern Switzerland: field surveys and open-top chamber experiments.- Chemosphere 36, 4-5: 995-1000.
- ŠIRCELJ, H. / BATIČ, F. / BIENELLI, A., 1997. Effects of ozone on pigment and ascorbic acid content in white clover (*Trifolium repens* L. cv. 'Menna') leaves.- Acta Biol. Sloven. 41, 4: 43-50.
- ŠIRCELJ, H. / BATIČ, F. / ŠTAMPAR, F., 1999. Effects of drought stress on pigment, ascorbic acid and free amino acids content in leaves of two apple tree cultivars.- Phytol 39, 3: 97-100.
- TAUSZ, M. / KRANNER, I. / GRILL, D., 1996. Simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plant materials by HPLC.- Phytochem. Anal. 17: 136-141.
- TAYLOR C. O., 1984. Organismal responses of higher plants to atmospheric pollutants: Photochemical and other.- V: TRESHOW, M. (ed.), Air pollution and plant life, New York, John Wiley & Sons, str. 215-239.
- TURK, B. / BIENELLI, A. / DŽUBAN, T. / TURZA, J. / MIKUŠ, T. / KRIVIC, M. / KOPUŠAR, N. / BATIČ, F., 1999. Ozone injury in white clover experiment carried out in Slovenia.- V: FUHRER, J. / ACHERMANN, B. (eds.), Critical levels for ozone – Level II, Environ. Document. 115: 249-251.
- VANDERHEYDEN, D. J. / SKELLY, J. M. / INNES, J. L. / HUG, C. / LANDOLT, W. / BLEULER, P. / ZHANG, J., 1999. Ozone exposure thresholds and foliar injury of native plants of Switzerland.- V: FUHRER, J. / ACHERMANN, B. (eds.), Critical levels for ozone – Level II, Environ. Document. 115: 77-81.

ZAHVALA
ACKNOWLEDGEMENT

Za posredovanje podatkov o meritvah onesnažil in mikroklimatskih dejavnikov se zahvaljujemo Agenciji Republike Slovenije za okolje. Za pomoč pri določanju možnih vzrokov listnih poškodb smo hvaležni mag. Dušanu Jurcu in doc. dr. Franciju Celarju. Zahvaljujemo se Gabrijelu Leskovcu za pomoč na terenu in pri laboratorijskem delu.