

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Simon VEBERIČ

**VPLIV TROPOSFERSKEGA OZONA NA NASTANEK POŠKODB IN  
IZBRANE FIZIOLOŠKE PROCESSE PRI INDIKATORSKI RASTLINI  
PLAZEČA DETELJA (*Trifolium repens* 'Regal') V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF TROPOSPHERIC OZONE ON INJURY  
FORMATION AND ON SELECTED PHYSIOLOGICAL PROCESSES  
IN THE INDICATOR PLANT WHITE CLOVER (*Trifolium repens*  
'Regal') IN SLOVENIA**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je bilo opravljeno na Biotehniški fakulteti, Oddelek za agronomijo, Katedra za aplikativno botaniko, ekologijo in fiziologijo rastlin.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Franca BATIČA.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik: prof. dr. Marjana REGVAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Član: prof. dr. Franc BATIČ, univ. dipl. biol.  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- Član: prof. dr. Alenka GABERŠČIK, univ. dipl. biol.  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega diplomskega dela v polnem tekstu na strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Simon VEBERIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
DK UDK 581.5:581.1:582.739(043.2)=163.6  
KG Fotosinteza/stomatalna prevodnost/ozon/ozonske poškodbe/onesnaženost zraka/plazeča detelja  
KK  
AV VEBERIČ, Simon  
SA BATIČ, Franc (mentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2008  
IN VPLIV TROPOSFERSKEGA OZONA NA NASTANEK POŠKODB IN IZBRANE FIZIOLOŠKE PROCESSE PRI INDIKATORSKI RASTLINI PLAZEČA DETELJA (*Trifolium repens* 'Regal') V SLOVENIJI  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XI, 33 str., 3 pregl., 14 sl., 6 pril., 28 vir.  
IJ sl  
JI sl / en  
AI Raziskava je bila del mednarodnega projekta UNECE ICP Vegetation. Potekala je od maja do sredine septembra 2007 v Ljubljani, Rakičanu in Iskrbi. Monitoring ozonskih poškodb smo izvajali na občutljivih in odpornih klonih poskusne rastline *Trifolium repens* 'Regal'. Na posameznem poskusnem polju smo ambientalnim razmeram izpostavili 20 posod z odpornim klonom in 20 posod z občutljivim klonom. V skladu z ICP Vegetation protokolom smo tedensko spremljali koncentracijo ozona in ozonske poškodbe na listih. Biomasa klonov indikatorske rastline smo spremljali v intervalu 28 dni. Fotosintezno aktivnost in prevodnost listnih rež smo merili v treh terminih (20.6.2007, 27.7.2007 in 13.9.2007) z merilnikom fotosinteze Licor LI-6400. Naši domnevi sta bili, da je privzem ozona v indikatorsko rastlino odvisen od prevodnosti listnih rež, in da privzeti ozon vpliva na fiziološko stanje plazeče detelje *Trifolium repens* 'Regal'. Rezultati so pokazali, da so bile AOT40 vrednosti prekoračene na vseh merilnih mestih. Kljub velikim vrednostim AOT40 ni bilo vidnejših listnih poškodb. Zaradi ozona, se je v povprečju zmanjšala biomasa občutljivega klona v primerjavi z odpornim. Razlika v biomasi med odpornim in občutljivim klonom plazeče detelje je znašala od 5-13 %. Na poškodovanost in biomaso je vplival izraziti mezofitski značaj plazeče detelje, ki se je pokazal pri meritvah stomatalne prevodnosti. V obdobju velikih koncentracij ozona je bil namreč fluks ozona v rastlino majhen. Ob enem se je stomatalna prevodnost izkazala kot eden glavnih omejujočih dejavnikov fotosinteze.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDK 581.5:581.1:582.739(043.2)=163.6  
CX Photosynthesis/stomatal conductance/ozone/ozone injury/air pollution/white clover  
CC  
AU VEBERIČ Simon  
AA BATIČ Franc (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana  
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of biology  
PY 2008  
TI Influence of tropospheric ozone on injury formation and specific physiologic processes on the indicator plant white clover (*Trifolium repens* 'Regal') in Slovenia

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XI, 33 p., 3 tab., 14 fig., 6 ann., 28 ref.

LA sl

AL sl / en

AB Our research was part of the UNECE program ICP Vegetation. The experiment was carried out from May to mid September 2007 at three different locations, Ljubljana, Rakičan and Iskrba. Ozone injury monitoring was carried out on resistant and sensitive clones of white clover *Trifolium repens* 'Regal'. On every experiment field 20 sensitive and 20 resistant clones were exposed to ambient conditions. Ozone concentration measurements, ozone injury monitoring on leaves and biomass measurements were made according to ICP Vegetation protocol. Measurements of photosynthetic activity and stomatal conductance were done on the 20<sup>th</sup> of June, 27<sup>th</sup> of July and on the 13<sup>th</sup> of September with Licor LI-6400. Our assumptions were that ozone uptake by the indicator plant depends on stomatal conductance and that the uptaken ozone affects the physiological state of white clover *Trifolium repens* 'Regal'. Results showed that despite of exceeded AOT40 values at all locations, no major leaf injuries were present. Anyway, biomass weight loss because of ozone has been noticed in sensitive clones. The average difference between the biomass of resistant and sensitive clones was from 5 to 13 %. The main reason for absence of injury symptoms is probably a strong mesophytic character of white clover, which has been shown in stomatal conductance measurements. In periods of high ozone concentrations stomatal conductance was low and consequently ozone flux into the plant was low as well. Stomatal conductance was the major limiting factors of photosynthesis in white clover.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KDW)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli	XI
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
2.1 ONESNAŽENJE ZRAKA V SLOVENIJI	2
2.2 OZON V SLOVENIJI	2
2.3 OZON	4
2.4 VPLIV OZONA NA RASTLINO	7
2.4.1 Vstop ozona v rastlino	8
2.4.2 Vpliv ozona na primarni metabolizem	10
2.4.3 Vpliv ozona na sekundarni metabolizem	11
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	<b>12</b>
3.1 MATERIALI	12
3.2 METODE	12
3.2.1 Nastavitev in izvajanje poskusa	12
3.2.2 Lokacije	12
3.2.3 Izvajanje poskusa v naravnih razmerah	13
3.2.4 Monitoring poškodb	13
3.2.5 Merjenje biomase	14
3.2.6 Merjenje fiziološkega stanja rastlin	14
3.2.7 Meteorološki podatki	15
3.2.8 Obdelava podatkov	15
<b>4 REZULTATI</b>	<b>16</b>
4.1 REZULTATI MERITEV AOT40	16
4.2 SPREMLJANJE OZONSKIH POŠKODB NA PLAZEČI DETELJI	16
4.3 MERITVE BIOMASE	18
4.4 MERITVE PREVODNOSTI LISTNIH REŽ	20
4.5 MERITVE FOTOSINTEZNE AKTIVNOSTI	22

4.6	MERITVE DEFICITA TLAKA VODNE PARE IN RELATIVNE ZRAČNE VLAGE	24
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>26</b>
5.1	RAZPRAVA	26
5.2	SKLEPI	29
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>30</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>31</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Tabela 1: Pregled učinkov ozona na rastline (Kley in sod., 1999)	str. 8
Tabela 2: Dejavniki, ki vplivajo na odziv rastline na O <sub>3</sub> (Kley in sod., 1999)	9
Tabela 3: Povprečna biomasa merilnega obdobja za posamičen klon.	18

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Primerjava akumuliranih vrednosti ozona (AOT40) z listnimi poškodbami plazeče detelje ( <i>Trifolium repens</i> 'Regal'; R-odporen klon, S-občutljiv klon) za mesto Ljubljana, sezona 2007.	17
Slika 2: Primerjava akumuliranih vrednosti ozona (AOT40) z listnimi poškodbami plazeče detelje ( <i>Trifolium repens</i> 'Regal'; R-odporen klon, S-občutljiv klon) za mesto Rakičan, sezona 2007.	17
Slika 3: Primerjava akumuliranih vrednosti ozona (AOT40) z listnimi poškodbami plazeče detelje ( <i>Trifolium repens</i> 'Regal'; R-odporen klon, S-občutljiv klon) za mesto Iskrba, sezona 2007.	18
Slika 4: Primerjava akumuliranih vrednosti ozona (AOT40) z izmerjeno biomaso plazeče detelje ( <i>Trifolium repens</i> 'Regal'; R-odporen klon, S-občutljiv klon) za mesto Ljubljana, sezona 2007.	19
Slika 5: Primerjava akumuliranih vrednosti ozona (AOT40) z izmerjeno biomaso plazeče detelje ( <i>Trifolium repens</i> 'Regal'; R-odporen klon, S-občutljiv klon) za mesto Rakičan, sezona 2007.	19
Slika 6: Primerjava akumuliranih vrednosti ozona (AOT40) z izmerjeno biomaso plazeče detelje ( <i>Trifolium repens</i> 'Regal'; R-odporen klon, S-občutljiv klon) za mesto Iskrba, sezona 2007.	20
Slika 7: Dnevni potek stomatarne prevodnosti na ozon odpornih in občutljivih klonov plazeče detelje ( <i>Trifolium repens</i> 'Regal'). Ljubljana, 20.06.2007. Podatki so na osnovi meritev na 6 rastlinah vsakega klona ob vsakem terminu, merjeno z Li-COR 6400.	21
Slika 8: Dnevni potek stomatarne prevodnosti na ozon odpornih in občutljivih klonov plazeče detelje ( <i>Trifolium repens</i> 'Regal'). Ljubljana 27.07.2007. Podatki so na osnovi meritev na 6 rastlinah vsakega klona ob vsakem terminu, merjeno z Li-COR 6400.	21
Slika 9: Dnevni potek stomatarne prevodnosti na ozon odpornih in občutljivih klonov plazeče detelje ( <i>Trifolium repens</i> 'Regal'). Ljubljana 13.09.2007. Podatki so na osnovi meritev na 6 rastlinah vsakega klona ob vsakem terminu, merjeno z Li-COR 6400.	22
Slika 10: Dnevni potek fotosintezne aktivnosti na ozon odpornih in občutljivih klonov plazeče detelje ( <i>Trifolium repens</i> 'Regal'). Ljubljana 20.06.2007. Podatki so na osnovi meritev na 6 rastlinah vsakega klona ob vsakem terminu, merjeno z Li-COR 6400.	23
Slika 11: Dnevni potek fotosintezne aktivnosti na ozon odpornih in občutljivih klonov plazeče detelje ( <i>Trifolium repens</i> 'Regal'). Ljubljana 27.07.2007. Podatki so na osnovi meritev na 6 rastlinah vsakega klona ob vsakem terminu, merjeno z Li-COR 6400.	23



- Slika 12: Dnevni potek fotosintezne aktivnosti na ozon odpornih in občutljivih klonov plazeče detelje (*Trifolium repens* 'Regal'). Ljubljana 13.09.2007. Podatki so na osnovi meritev na 6 rastlinah vsakega klona ob vsakem terminu, merjeno z Li-COR 6400. 24
- Slika 13: Dnevno spreminjanje stanja deficita vodne pare (VPD) in relativne zračne vlage (RH). Ljubljana 27.07.2007. Podatki so na osnovi meritev na 6 rastlinah vsakega klona ob vsakem terminu, merjeno z Li-COR 6400. 25
- Slika 14: Dnevno spreminjanje stanja deficita vodne pare (VPD) in relativne zračne vlage (RH). Ljubljana 13.09.2007. Podatki so na osnovi meritev na 6 rastlinah vsakega klona ob vsakem terminu, merjeno z Li-COR 6400. 25

## KAZALO PRILOG

- Priloga A: AOT40 v času izvajanja poskusov za mesto Ljubljana v vegetacijski sezoni 2007.
- Priloga B: Vrednosti AOT40 v času izvajanja poskusov za mesto Iskrba v vegetacijski sezoni 2007.
- Priloga C: Vrednosti AOT40 v času izvajanja poskusov za mesto Rakičan v vegetacijski sezoni 2007.
- Priloga D: Neto fotosinteza v odvisnosti od stomatalne prevodnosti pri občutljivem in odpornem klonu plazeče detelje *Trifolium repens* 'Regal'. Ljubljana 20.06.2007
- Priloga E: Neto fotosinteza v odvisnosti od stomatalne prevodnosti pri občutljivem in odpornem klonu plazeče detelje *Trifolium repens* 'Regal'. Ljubljana 27.07.2007
- Priloga F: Neto fotosinteza v odvisnosti od stomatalne prevodnosti pri občutljivem in odpornem klonu plazeče detelje *Trifolium repens* 'Regal'. Ljubljana 13.09.2007

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AOT40	Seštevek pozitivnih razlik med vrednostmi urnih koncentracij ozona v svetlem delu dneva in vrednostjo 40 ppb (Accumulated dose over a threshold of 40 ppb)
ARSO	Agencija Republike Slovenije za okolje
ppb	delcev na milijardo (parts per billion; enota za masni ali volumski delež topljenca v raztopini)
Rubisco	ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza
VOC	hlapne organske spojine (Volatile Organic Compounds)
CLRTAP	Convention on Transboundary Air Pollution
WGE	delovna skupina za učinke (Working Group on Effects)
EMEP	program za sledenje in ocenjevanje prenosa onesnažil na velike razdalje (European Monitoring and Evaluation Programme)
ICP-Vegetation	Mednarodni program o učinkih onesnaževanja zraka na naravno vegetacijo in kmetijske rastline (International Cooperative Programme on Effects of Air Pollution on Natural Vegetation and Crops)
UNECE	Gospodarska komisija Združenih narodov za Evropo (United Nations Economic Commission for Europe)

## 1 UVOD

Rastline so kot primarni producenti pomembni gradnik ekosistema, saj zagotavljajo dobršen del pretoka snovi in energije. Na njih deluje kompleksen splet fizikalnih, kemijskih in bioloških dejavnikov. Med slednje spada tudi človek, ki od svojega učlovečenja aktivno spreminja in si prilagaja svoje bivalno okolje. Hote ali nehote je vpliv človeka razmeroma hitro prekoračil ožino bivalnega okolja in postal globalen.

Z industrijsko revolucijo je razvoj presešel krhke meje trajnostnega gospodarjenja z okoljem, kar je vodilo v obremenjevanje in onesnaževanje globalnega okolja. Eno vidnejših in bolje preučenih je področje onesnaževanja in obremenjevanja zraka. V šestdesetih letih preteklega stoletja so se zaradi razvoja težke industrije v ozračju močno povečale koncentracije žveplovega dioksida in drugih polutantov. Dandanes se bodisi zaradi propada industrijskih obratov, bodisi zaradi tehnoloških izboljšav situacija v modernem svetu izboljšuje, saj so se marsikje koncentracije žveplovih oksidov v zraku znižale. Po drugi strani pa še vedno ostajajo problem fotooksidanti, še posebej ozon. Koncentracije ozona, zaradi naraščajoče obremenitve ozračja zaradi prometa, ostajajo visoke ali pa so celo v porastu. Ozon ima številne negativne posledice za zdravje ljudi in živali, ter povzroča poškodbe na naravni in polnaravni vegetaciji. Analize zmanjšanja pridelkov za Evropo kažejo na 4,625 milijarde Evrov izgube na leto. V Sloveniji je v letu 2000 izguba zaradi ozona znašala 5 milijonov Evrov (Batič in Turk, 2007). Dodatna težava obremenitve ozračja z ozonom je, da posledice ozona niso omejene zgolj na mesta nastajanja ozona, pač pa segajo vplivi preko državnih meja.

Kritično stanje prekomejne onesnaženosti z ozonom je botrovalo nastanku konvencije o prekomejnem razširjanju onesnaženega zraka na velike razdalje (CLRTAP). V okviru te konvencije obstajajo delovne skupine in programi, ki spremljajo učinke ozona in snujejo strategije zmanjševanja le-tega. V okviru delovne skupine WGE (Working group on effects) se izvaja program ICP Vegetation (International Cooperative programme of Air Pollution on Natural Vegetation and Crops) (Harmes in sod., 2007), v sklopu katerega je potekala tudi naša raziskava.

Naše delo je, kot že prej rečeno, potekalo v sklopu programa ICP Vegetation, ki se ukvarja s spremljanjem vpliva ozona na kmetijske rastline in naravno vegetacijo. Po enotnem protokolu se izvaja sledenje učinkov ozona na rastline po celotni Evropi. Zaradi domnevno dobrih indikatorski lastnosti in možnosti gojenja v različnih klimatih, je bila izbrana plazeča detelja (*Trifolium repens* 'Regal'). Pri indikatorski rastlini se na listih, ob povečanih koncentracijah ozona, pojavijo nekroze, ob enem pa se zmanjša tudi produkcija biomase. V preteklih raziskavah se je pokazalo, da plazeča detelja, zaradi mezofitskega značaja, pogosto ni najbolj primeren indikator ozonskih poškodb.

Cilj naše naloge je bil monitoring ozonskih poškodb v treh različnih okoljih Slovenije (Ljubljana, Rakičan, Iskrba) v okviru programa ICP Vegetation. Ob enem nas je podrobneje zanimal fiziološki odziv plazeče detelje na ozon in druge okoljske dejavnike v Ljubljani ter morebitne povezave med njimi.

V okviru naših raziskav smo preverjali dve hipotezi:

- Prevodnost listnih rež vpliva na privzem ozona v liste indikatorske rastline *Trifolium repens* 'Regal'.
- Privzeti ozon vpliva na fiziološko stanje plazeče detelje *Trifolium repens* 'Regal'.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ONESNAŽENJE ZRAKA V SLOVENIJI

Onesnaženost zraka je posledica emisij škodljivih snovi v zrak in procesov, ki vplivajo na razredčevanje in odstranjevanje teh snovi iz zraka. Procesi, ki vplivajo na prisotnost onesnažil v ozračju vključujejo veter in stabilnost atmosfere. Polutanti prisotni v ozračju na območju Republike Slovenije ne izvirajo le iz virov znotraj države, pač pa je njihov izvor daleč izven državnih meja. V preteklosti so bile emisije škodljivih snovi v Sloveniji razmeroma velike. Onesnaženost je po letu 1985 dosegla kritične meje na katere je opozorilo propadanje gozdov, poslabšanje zdravstvenega stanja ljudi, živali in ekosistemov na številnih območjih širom Slovenije. Območja, najbolj podvržena onesnaženju, so bila dna dolin, kotline, mestna in industrijska območja (Hrček, 1994). Tudi danes so center onesnaženja še vedno industrijska območja in urbana središča, opazno pa narašča tudi onesnaževanje zaradi prometa. Če izvzamemo promet, se je onesnaženost, zaradi zaprtja nekaterih industrijskih obratov in montaže čistilnih sistemov, na številnih območjih zmanjšala. O izboljševanju stanja pričajo podatki, da koncentracija žveplovega dioksida v letu 2007 prvič nikjer v Sloveniji ni preseгла mejnih vrednosti. Vrednosti so bile sicer nekoliko večje na vplivnih območjih TE Šoštanj in TE Trbovlje, a so prekoračile le zgornji ocenjevalni prag. Tudi koncentracije dušikovega dioksida v preteklih dveh letih niso presegle mejnih vrednosti. Sicer pa so bile vrednosti nekoliko večje v mestnih okoljih, ki so pod vplivom emisij iz prometa (Bolte in sod., 2007; Šegula in sod., 2008). Pod mejno vrednostjo ostajajo tudi izmerjene koncentracije ogljikovega monoksida.

Še vedno pa ostajajo problem delci ( $PM_{10}$ ) in ozon. Zrak je obremenjen z delci zaradi vpliva emisij iz prometa (Maribor), pa tudi zaradi industrije (mesta v Zasavju) (Šegula in sod., 2008).

### 2.2 OZON V SLOVENIJI

Na kakovost zraka v Sloveniji najbolj vplivajo emisije snovi v državi sami, delno pa je onesnaženost posledica transporta onesnaženja čez meje. Ozon predstavlja enega glavnih zračnih polutantov v Sloveniji. Monitoring ozona se izvaja na 18 mestih širom države in je

po *Uredbi o ozonu v zunanjem zraku (Ur.l. RS, št. 8/2003)* zakonsko obvezen (Bolte in sod., 2007).

Koncentracija ozona je močno odvisna od lokacije in njene neposredne okolice. Mreža merilnih mest je zato organizirana tako, da pokriva različna okolja. Nekatera mesta so daleč proč od virov onesnaženja (Krvavec, Iskrba, Otlica...), merilno mesto Rakičan je podeželskega tipa, druga so v mestih (Ljubljana, Celje, Nova Gorica, Koper Hrastnik...), nekatera pa so ob prometnih cestah (Maribor, Trbovlje, Zagorje) (ARSO, 2008).

Uredba o ozonu v zunanjem zraku predpisuje za varovanje zdravja opozorilno in alarmno koncentracijo ter ciljno vrednost najvišje 8-urne dnevne koncentracije. Za zaščito vegetacije je določena mejna vrednost faktorja AOT40, za zaščito materialov pa je določena mejna letna vrednost. O resnosti situacije pričajo podatki iz leta 2006. Koncentracije ozona so namreč prekoračile opozorilno urno vrednost na skoraj vseh merilnih mestih, največkrat na Primorskem in ob obali. Letno dovoljeno število prekoračitev ciljne 8-urne vrednosti koncentracije ozona je bilo preseženo povsod, razen na merilnih mestih tik ob prometnih cestah. Podobno so bile prekoračene vrednosti faktorja AOT40 Kot že rečeno se najvišje koncentracije ozona pojavljajo na Primorskem, predvsem ko piha veter iz južne do jugozahodne smeri ali pa iz severozahoda. To kaže na prenos ozona iz industrijskih območij Italije (Bolte in sod., 2007).

Ozon ima značilni letni hod. Zaradi vpliva sončnega obsevanja in temperature zraka, so najvišje koncentracije v poletnih mesecih, najnižje pa pozimi. Močno sevanje, visoke temperature in malo vertikalno mešanje okrog 14. ure pogojujejo dnevni višek ozona v nižinskih krajih. Na višjih lokacijah (Krvavec) je dnevni hod troposferskega ozona neizrazit (Bolte in sod., 2007). Koncentracije so na višjih nadmorskih višinah (Krvavec, Otlica) višje kot v dolini, saj se plast onesnaženega zraka poleti ob jasnem vremenu premeša do višine okoli treh kilometrov (ARSO, 2008).

Področje monitoringa in kakovosti zraka je v Sloveniji regulirano s slovensko in evropsko zakonodajo ter konvencijami. Leta 1992 je Slovenija ratificirala konvencijo o prekomejnem onesnaževanju zraka na velike razdalje, imenovano CLRTAP (Convention on Long-range Transboundary Air Pollution). Omenjena konvencija sodi med glavne mednarodne sporazume za področje varstva zraka (Bolte in sod., 2007). V letu 2005 je stopil v veljavo Goeteburški protokol, ki podpisnicam konvencije CLRTAP določa predpisano implementacijo regulacije zračnih onesnažil kot so trdni delci, žveplove in dušikove spojine, troposferski ozon in njegovi prekurzorji, organski polutanti in težke kovine (Batič in Turk, 2007). V okviru konvencije deluje delovna skupina za posledice (WGE-Working Group on Effects), ki zbira rezultate monitoringov, spremlja stanje in napoveduje prihodnje stanje okolja. ICP Vegetation je le eden sedmih mednarodnih programov pod okriljem WGE. Ustanovljen je bil leta 1987 z namenom ovrednotiti

poškodbe na kmetijskih rastlinah in polnaravni vegetaciji, ki jih povzročajo ozon in drugi fotooksidanti. Od leta 2002 se v okviru tega programa koordinira spremljanje učinkov dušikovih spojin in težkih kovin. ICP program s svojimi izsledki aktivno sodeluje pri reviziji Goeteburškega protokola in protokola o zmanjšanju emisij težkih kovin, imenovanega Aarhaški protokol (Harmes in sod., 2007).

Isti avtorji (Harmes in sod., 2007) opredeljujejo naloge ICP Vegetation kot:

- biomonitoring učinkov ozona in drugih fotooksidantov na gojenih rastlinah in naravni vegetaciji v Evropi in Severni Ameriki,
- razvoj računalniških modelov za kvantifikacijo in interpretacijo vplivov podnebja/vremena in drugih okoljskih stresov na odzive rastlin na ozon in uporaba modelov za določanje kritičnih nivojev za učinke ozona,
- razvoj kart, ki kažejo območja tveganja (poškodb) zaradi učinkov ozona na vegetacijo v regijah EU (skupaj z ICP-Mapping & Modeling) oz. območij, kjer so kritične ravni že presežene,
- ocenjevanje in izračun ekonomskih izgub zaradi učinkov ozona na gojene rastline,
- zbiranje in pregled informacij o učinkih ozona na biotsko raznovrstnost rastlin,
- zbiranje in pregled informacij o učinkih ozona na klimatske spremembe,
- zbiranje, pregled in sledenje atmosferske depozicije težkih kovin na osnovi akumulacije v mahovih in višjih rastlinah (ta program je bil vključen v ICP Vegetation leta 2001, pred tem je potekal v koordinaciji Nordic Council of Ministers, Danska),
- razvoj biomonitoringa atmosferske depozicije dušikovih spojin z uporabo mahov,
- ugotavljanje vpliva depozicije dušika na naravno vegetacijo vključno z njegovim vplivom na učinke ozona,
- koordinacija aktivnosti z ICP-Forest s konvencijo o Biotski raznovrstnosti in Kiotskim protokolom.

### 2.3 OZON

Ozon je molekula sestavljena iz treh kisikovih atomov in je eden najpomembnejših plinov v sledovih v zemeljski atmosferi. V standardnih razmerah je belo moder plin in je močan oksidant. Molekula je nestabilna in teži k razpadu (v reakciji  $2\text{O}_3 \rightarrow 3\text{O}_2$ ), običajno v dvoatomarno obliko in prosti kisikov atom. Prosti kisikov atom je zelo reaktiven in se hitro veže s snovmi v okolici, zaradi česar ga lahko uporabljamo za čiščenje in dezinfekcijo, povzroča pa tudi številne težave. Negativni učinki ozona so poškodbe materialov, rastlin in živali (ARSO, 2008).

Povečane koncentracije ozona vplivajo na človekovo zdravje. Ozon povzroča: poškodbe tkiva v dihalnih poteh (predvsem alveolov); ubija celice v pljučih in povečuje celično dihanje; zmanjšuje pljučne funkcije; povzroča vnetja dihalnih poti; povečuje pojav respiratornih simptomov, kot so kašelj in oteženo globoko dihanje; zavira delovanje

imunskega sistema; v nekaterih primerih povzroča tudi glavobole in slabost (Kley in sod., 1999).

Razporeditev ozona ni enakomerna. Največ ga je v stratosferi, približno 90 % (ARSO, 2008). Stratosfera je plast atmosfere, ki sega od 15 do 50 km nad tlemi (Ciglar in Planinšek, 1995). Ozon ima v tej plasti pozitiven učinek, saj zmanjšuje količino škodljivega UV-B sevanja (280-315 nm valovne dolžine), ki prodira do zemeljske površine. Tako do površine prodre le 0,5% prvotnega UV-B sevanja. Zaradi tanjšanja ozonske plasti prihaja v nižje plasti atmosfere vse več škodljivega UV-B sevanja, kar ima številne negativne posledice.

V stratosferi nastaja ozon iz molekul kisika ( $O_2$ ), v t.i. Chapmanovem ciklu. Molekula kisika absorbira svetlobo ( $h\nu$ ) valovne dolžine  $\lambda < 200$  nm (krajše valovne dolžine UV-C) in pri tem razpade na dva enoatomarna kisikova radikala (1). Kisikov radikal reagira z molekulo kisika in tvori se ozon (2).



Ozon ( $O_3$ ) absorbira svetlobo pri 200-290 nm (daljše valovne dolžine UV-C sevanja in krajše valovne dolžine UV-B sevanja) in pri tem razpade na eno molekulo kisika in na enoatomarni kisik (4).



V zgornjih reakcijah je M snov, kot je npr. molekula dušika ( $N_2$ ), ki odstrani odvečno energijo nastalo v reakciji.

Če ni drugih dejavnikov, ki vplivajo na potek reakcij, sta fotoliza kisika in fotoliza ozona v »stady state« ravnotežju (Krupa, 2000).

Pritalni, troposferski ozon ima dva glavna vira. Prvi vir je stratosfera in tamkajšnja fotodisociacija molekularnega kisika. Drugi in hkrati najbolj pogost vir ozona v troposferi je fotokemična produkcija. Ozon nastaja iz prekurzorjev (npr. CO, VOC) ob prisotnosti  $NO_x$  na različne načine:

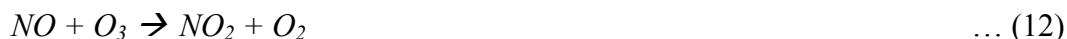
- a) Glavno vlogo pri fotokemijski produkciji ozona igra NO in  $NO_2$ . Za oksidacijo NO v  $NO_2$  so potrebni peroksi radikali ( $HO_2$  in  $RO_2$ ). Vir peroksi radikalov je oksidacija ogljikovodikov (5-8). Oksidaciji NO sledita fotoliza  $NO_2$  (za reakcijo je potrebna svetloba valovne dolžine  $\lambda=420$  nm) in rekombinacija kisikovih atomov (9-11).





Karbonilne skupine in ketoni v reakciji 8 procesa fotolize tvorijo dodatne peroksilne skupine in tako povečajo tvorbo ozona. Te snovi imenujemo fotooksidanti. Pomembnejši fotooksidant iz te skupine je  $CH_3(O)O_2NO_2$  (peroksiacetonitril) (Kley in sod., 1999).

Znano je, da dušikov monoksid v reakciji, obratni fotolizi  $NO_2$ , deluje kot porabnik ozona (Jacobson, 2002).



Med dušikovim monoksidom in dušikovim dioksidom se hitro vzpostavi ravnotežje, ki v končni fazi določa koncentracijo ozona (13). Koncentracije prizemnega ozona so v podeželskih razmerah višje od koncentracij dušikovega monoksida in dušikovega dioksida. Ker je ozona več kot  $NO$ , reakcija (12) ne vodi do bistvenih sprememb v koncentracijah ozona. Situacija je nekoliko drugačna v mestnem okolju, kjer prihaja do zmanjšanja koncentracije ozona. Ponoči, zaradi pomanjkanja svetlobe, reakcija 10 ne poteče. Odsotnost vira  $O_3$  in  $NO$  pomeni prenehanje tvorbe ozona. V kolikor prihaja ponoči v mestnem okolju do izpustov  $NO$  (npr. promet), reakcija 12 uniči ozon. Ker istočasno ni fotolize  $NO_2$ , se dušikov dioksid kemijsko pretvarja v  $NO_3(g)$ ,  $N_2O_2$  in  $HNO_3$ . (Jacobson, 2002).



- b) Produkcijo troposferskega ozona pospešuje ogljikov monoksid. Ozon nastaja po naslednji poti (Kley in sod., 1999):





Hidroperoksi radikal je ključni reagent pri oksidaciji NO v NO<sub>2</sub> (9-11). Končni produkt reakcij je ozon. Sumarično lahko naslednjo reakcijo zapišemo kot:



- c) Vir ozona v prizemni plasti atmosfere so med drugim tudi ogljikovodiki. V mestnem okolju sta med alkani z vidika abundance in reaktivnosti najbolj pomembna pentan in butan. V mestih k povečanim koncentracijam ozona najmanj prispeva metan. Slednji ima pomembnejšo vlogo pri tvorjenju prostega troposferskega ozona in njegovi kemiji v ruralnem okolju. Metan je pogost organski plin, ki ima v atmosferi dolg obstojni čas. Najpomembnejši mehanizem odstranjevanja metana iz atmosfere je reakcija s hidroksilnim radikalom. Zaporedje reakcij je podobno kot pri vseh VOC (5-11). Končni produkt teh reakcij je ozon (Jacobson, 2002).

Alkeni prispevajo k nastajanju ozona na dva načina. Prvi je reakcija alkena s hidroksi radikalom, drugi pa reakcija z ozonom. Slednja navidez paradoksalna relacija rezultira v nastanku HCHO(g), HO<sub>2</sub>(g), CO(g) in NO<sub>2</sub>(g). Nastale spojine, ne le obnovijo v reakciji porabljen ozon, temveč tvorijo tudi novega (Kley in sod., 1999).

Petrokemijska industrija, barve, gorenje biomase in gradbeni materiali sproščajo v ozračje reaktivne aromatske spojine, kot je toluen (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>(g)). Po metanu je toluen najpogosteje sproščeni organski plin. Iz vidika nastajanja ozona v urbanem okolju je najpomembnejši organski plin, ksilen. To je plin, ki je prisoten v gorivih in lepilih (Jacobson, 2002).

- d) Poleg emisij antropogenega izvora na troposfero vplivajo tudi biogene emisije. Velik delež predstavljajo emisije izoprena in ostalih terpenov. Vir terpenov so lesne vrste, kot so na primer hrast, bor, cipresa. Raziskave kažejo, da lahko v gozdnatih predelih terpeni prispevajo tudi 40 % totalnega ozona (Kley in sod., 1999; Jacobson, 2002).

## 2.4 VPLIV OZONA NA RASTLINO

Ozon ima velik vpliv na organizme, torej vpliva tudi na rastline (glej tabela 1). Učinke ozona na rastline delimo na akutne in kronične. Akutni odziv se kaže v obliki vidnih poškodb na listih. Do njega pride, ko velikost privzema ozona v rastlino naglo preseže velikost detoksifikacije rastline. Pri tem lahko privzemanje traja nekaj ur pa tja do nekaj dni. Simptomi akutnih listnih poškodb zaradi ozona so: kloroze, bledenje, "bronzing",

pegavost ter uni- in bifacialne nekroze. Pri iglavcih je akutni odziv viden kot nekroze na vrhovih iglic, lisast vzorec in zvijanje iglic (Kley in sod., 1999). V kolikor akutni učinki ozona v nekem obdobju niso ponavljajoči, nimajo bistvenega vpliva na rast in produktivnost rastlin (US EPA, 1996).

Izmenjavanje visokih in nizkih koncentracij ozona, ki se naključno pojavljajo tekom rastne sezone ali življenjskega cikla rastlin in povzročajo stres, ima kronični učinek. Pri kroničnem učinku ozona so lahko vidne poškodbe, kot so kloroze, senescenca in abscizija, odsotne. Glavna pokazatelj kroničnega učinka ozona na rastlino sta zmanjšana produkcija in rast (Kley in sod., 1999).

Zmanjšana produkcija se pojavi, ko je vpliv ozonskega stresa na asimilacijo in/ali na premeščanje asimilatov večji kot sposobnost rastline, da kompenzira in popravi učinek stresa (Krupa., 1994).

Tabela 1: Pregled učinkov ozona na rastline (Kley in sod., 1999)

Značilnost rastline	Odziv rastline na ozon
Fotosinteza	Zmanjšana pri številnih rastlinskih vrstah
Prevodnost listnih rež	Zmanjšana pri občutljivih vrstah in sortah
Učinkovitost izrabe vode	Zmanjšana pri občutljivih vrstah
Skupna površina listov	Zmanjšana pri občutljivih vrstah
Specifična teža listov	Povečana pri občutljivih vrstah
Zorenje pridelka	Zmanjšano
Cvetenje	Zmanjšano cvetenje zmanjšan pridelek, zakasnelo nastavljanje plodičev
Suha biomasa	Zmanjšana pri številnih vrstah
Medvrstna občutljivost na ozon	Velike razlike med vrstami
Znotraj vrstna občutljivost na ozon	Odziv pri različnih sortah različen
Občutljivost na sušni stres	Rastlina ob sušnem stresu postane sicer manj občutljiva za ozon, a občutljiva na pomanjkanje vode
Občutljivost zaradi pomanjkanja hranil	Rastline postanejo bolj občutljive na ozonske poškodbe

---

#### 2.4.1 Vstop ozona v rastlino

Ozon in drugi fotooksidanti vstopajo iz atmosfere v rastlino skozi listne reže, saj je kutikula za ozon tako rekoč nepropustna (Schültze in sod., 2005). Do listne površine potujejo fotooksidanti z atmosfersko difuzijo, ki je v soodvisnosti z atmosfersko prevodnostjo. Na atmosfersko prevodnost vplivajo mikrometeorološki dejavniki in atmosferska upornost. Le-ta se po sončnem vzhodu polagoma manjša in doseže minimum med 9. in 16. uro. Visoke koncentracije ozona, horizontalni veter, temperatura zraka in globalno sevanje sicer povečujejo atmosfersko prevodnost, a pogosto ne delujejo koherentno. Ko molekula O<sub>3</sub> prispe do listne površine, njen privzem v notranjost lista določa prevodnost listnih rež. Močan vpliv na prevodnost ima deficit tlaka vodne pare

(VPD), ki je najvišji okrog 15. in 16. ure (Kley in sod., 1999). Na transport plinov v notranjost lista vplivata tudi upor mejne plasti zraka in upor listnih rež, ki nasprotujeta stomatalni prevodnosti (Larcher, 2001).

Ko ozon vstopi v rastlino, reagira s celičnimi stenami in komponentami celičnih membran ter tvori številne reaktivne kisikove spojine (ROS), kot so vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), superoksid ( $O_2^{\cdot-}$ ) in hidroksilni ( $OH^{\cdot}$ ) ter hidroperoksilni ( $HOO^{\cdot}$ ) radikal. Navedene spojine so zelo reaktivne in hitro reagirajo z biološkimi molekulami. Reakcije z biološkimi molekulami zmanjšajo integriteto bioloških membran in tako spremenijo prepustnost, osmotski tlak, membranske potenciale in aktivnost na membrane vezanih encimov (npr. ATPaze) (Benton in sod., 2000). Zaradi zmanjšane integritete in povečane prepustnosti membran se v tkivih pojavijo nekroze, ki so na zunanosti listov vidne kot pikčast vzorec (Francini in sod., 2007). Druga vidnejša posledica oksidacije maščobnih kislin v membranah je izguba kompartmentizacije celičnih procesov, kar pomeni, da celični procesi ne morejo potekati v ločenih predelih rastlinske celice. Posledica tega je nestabilnost in prenehanje celičnih procesov (Schültze in sod., 2005).

Na delovanje ozona v rastlinah vplivajo številni dejavniki, ki bodisi učinek ozona ojačajo, ali pa ga zmanjšajo (tabela 2). Za razumevanje in vrednotenje ozonskega vpliva je nujno poznavanje teh dejavnikov.

Tabela 2: Dejavniki, ki vplivajo na odziv rastline na  $O_3$  (Kley in sod., 1999)

Dejavnik	Odziv rastline
<b>A Fizikalni</b>	
Gibanje zračne mase	Mora biti dovolj močno, da spremeni upornost mejne plasti zraka in tako omogoči privzem $O_3$ .
Svetloba	
Intenziteta, fotoperioda, kvaliteta (vključno z UV-B)	Idealna vrednost odvisna od posamezne rastline; odmik od idealne vrednosti zmanjšuje občutljivost rastline na $O_3$ ; veliko UV-B sevanje ojača efekt $O_3$ .
Temperatura	Poškodovanost se poveča v rangu temperatur 3-30°C.
Voda	
Relativna vlaga	Vpliva na odprtost listnih rež in izmenjavo plinov; privzem in poškodbe zaradi $O_3$ se povečujejo s povečanjem relativne vlage.
Namočenost tal	Vodni stres zaradi zaprtja rež povečuje toleranco na $O_3$ .
<b>B Kemični</b>	
Pesticidi	Širok spekter vplivov (povečanja tolerance na $O_3$ , zmanjšanje tolerance na $O_3$ , brez odziva).
Ostali polutanti, $CO_2$	Širok spekter vplivov (od povečane tolerance na $O_3$ do zaščite pred $O_3$ )
<b>C Biološki</b>	
Biodiverziteteta	Homogene rastlinske združbe imajo uniformni odziv; združba z veliko vrstami, kloni, kultivarji ima heterogene odzive na $O_3$ .
Razvojni stadij rastline	Rastline v različnih razvojnih stadijih imajo različni odziv na $O_3$ .
Patogeni in bolezni	Lahko povečajo toleranco na $O_3$ .

D *Gojitev*

Splošna gojitvena praksa  
Nutrienti

Običajna gojitvena praksa rezultira v »tipičnem« odzivu na O<sub>3</sub>.  
Optimalne vrednosti nutrientov omogočajo optimalne poškodbe zaradi ozona.

---

#### 2.4.2 Vpliv ozona na primarni metabolizem

Ozon je polarna molekula in kot taka ne prodira skozi plazmalemo. Radikali in signali, ki povzročajo različne odzive primarnega rastlinskega metabolizma, se tvorijo na membrani in v celični steni (Schültze in sod., 2005).

Ozon zmanjšuje fotosintezo na več nivojih. Zmanjšanje fotosinteze se pripisuje zmanjšani učinkovitosti karboksilacije, zmanjšanemu transportu elektronov in vplivu ozona na reže (Paoletti in Grulke, 2005). Znano je, da se zaradi reaktivnih kisikovih radikalov poškodujejo tilakoidne membrane kloroplastov, kar povzroča motnje v fotosinteznem transportu elektronov. Nadalje se ozonski stres kaže kot zmanjšanje fotokemične učinkovitosti fotosistema II. Zmanjšanje omenjene učinkovitosti je zanesljiv pokazatelj ozonsko povzročene fotoinhibicije. Drugi način, kako ozon vpliva na fotosintezo aktivnost rastlin je degradacija klorofilov. Klorofilaza je prvi encim v reakcijski verigi razgradnje klorofilov. Razgrajuje oba najpogostejša tipa klorofilov: klorofil a in klorofil b. Ker ozon povzroča poškodbe membran, pride klorofilaza, ki se nahaja ob zunanji ovojnici, v stik s klorofili. Ob stiku se začne razgradnja klorofila. Ozon ob enem uničuje tudi ksantofile, ki so pomembni odstranjevalci odvečne energije in preprečevalci fotoinhibicije (Francini in sod., 2007). Nenazadnje ozon reagira tudi z encimi, kot je Rubisco. Pri nekaterih rastlinskih vrstah se je pokazalo, da ozonski stres zmanjšuje aktivnost encima in njegovo količino za 50%. Če je rastlina v normalnih svetlobnih razmerah, to ne vpliva bistveno na neto fotosintezo, saj je Rubisco v rastlinah načeloma v prebitku. V kolikor pa je rastlina izpostavljena močnemu sončnem sevanju, pa je Rubisco eden glavnih omejitvenih dejavnikov fotosinteze (Schültze in sod., 2005).

V številnih raziskavah je bila pri različnih rastlinskih vrstah ugotovljena relacija med troposferskim ozonom, starostjo listov, okoljskimi dejavniki in odzivom listnih rež. Zaprtje listnih rež ni neposredno odvisno od ozona. Nekateri avtorji navajajo, da se odprtost zmanjša zaradi ozonske inhibicije asimilacije ogljika in posledične povečane koncentracije ogljikovega dioksida v notranjosti lista (Paoletti in Grulke, 2005). Drugi viri smatrajo zaprtje listnih rež kot posledico vpliva ozona na sproščanje vode iz celic zapiralk. Isti avtorji dopuščajo možnost, da ozon vpliva na kalcijevo signalno verigo, ki je glavni regulator stomatalnega gibanja (Paoletti, 2005). Izpostavljenost kratkim in zmernim epizodam ozona stimulira hitro zmanjšanje stomatalne odprtosti. Če je epizoda ozona daljša in so koncentracije ozona višje, je pri bolj občutljivih rastlinskih vrstah odziv rež počasnejši. Asimilacija in delovanje listnih rež sta v tem primeru oslabela. Počasen odziv

listnih rež je izrazitejši, ko je rastlina hkrati izpostavljena ozonskemu in vodnemu stresu. Na odprtost listnih rež vpliva tudi nestalna osvetlitev (Paoletti in Grulke, 2005).

### **2.4.3 Vpliv ozona na sekundarni metabolizem**

Ozon povzroči hitro aktivacijo sekundarnega metabolizma rastlin, ki se aktivira še preden se pojavijo vidne poškodbe (Schültze in sod., 2005). Sekundarni metabolizem, še posebej tvorba antioksidantov, je glavna metabolna obramba pred oksidativnim stresom. Sistem antioksidantov je učinkovita past za radikale, saj je sposoben razstrupiti nevarne oblike kisika. Antioksidanti so raznovrstna skupina spojin in vključujejo vitamine, oligopeptide, fenolne kisline, flavonoide in karotenoide (Severino in sod., 2007).

Najpomembnejši odstranjevalec reaktivnih kisikovih spojin v kloroplastih in citoplazmi je askorbat-glutationska veriga. Reaktivne kisikove spojine se ob prisotnosti askorbata razstrupijo, saj se ob askorbatu reducirajo. Oksidiran askorbat se v celici preko glutaciona spet obnovi (Larcher, 2001).

Ob visokih koncentracijah privzetega ozona obrambni mehanizmi sekundarnega metabolizma ne zadostujejo. V končni fazi se tvori etilen, kar rezultira v prezgodnji senescenci. Senescenca pomeni škodo v kmetijstvu, gozdarstvu, vsekakor pa tudi na celotnem ekosistemskem nivoju (Schültze in sod., 2005).

Tekom rastle sezone starost listov ni konstantna, marveč se neprenehoma spreminja. S starostjo listov se spreminjajo tudi vsebnosti askorbinske kisline, fenolov in totalna antioksidativna kapaciteta v listih. Mladi listi imajo torej večjo antioksidativno kapaciteto kot stari listi in tako tudi večjo odpornost na ozonske poškodbe (Severino in sod., 2007).

Novejše raziskave kažejo, da ozon deluje na celično jedro in izražanje genov. Tako naj bi imel negativni vpliv na sintezo encima Rubisco. Geni za sintezo encima Rubisco pa niso edina tarča ozona. Do sedaj so pri zelnatih in lesnati vrstah odkrili kar 50 genov, katerih prepisovanje inducira ozon. V glavnem gre za gene, ki sodelujejo na petih metabolnih področjih: fitoaleksini, celične bariere (lignini, ekstenzini), signalne snovi, antioksidativni sistemi in PR proteini (pathogenesis related proteins). PR proteini so beljakovine, ki se začnejo sintetizirati kot obrambni odgovor rastline na napad patogena. Sintezo teh proteinov sprožijo eliktorji. V primeru ozonskega stresa deluje ozon kot abiotski eliktor (Kley in sod., 1999).

V splošnem so biokemijski odzivi na ozon specifični ali nespecifični. Nespecifični odzivi nastanejo zaradi oksidacijskega učinka ozona in lahko rastlino poškodujejo ali jo celo zavarujejo pred drugimi stresorji (navzkrižna obramba) (Schültze in sod., 2005).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

V poskusu smo uporabili odporne in občutljive klone plazeče detelje *Trifolium repens* 'Regal'. Plazečo deteljo smo posadili v 15 litrske posode. Na posameznem poskusnem mestu smo ambientalnim razmeram izpostavili 20 posod z odpornim in 20 posod z občutljivim klonom. Fotosintezno aktivnost in prevodnost listnih rež smo merili z merilnikom fotosinteze Li-COR 6400.

Podatke smo uredili v programu MS Excel 2003 in jih statistično obdelali v programu Statgraphics.

Pri poskusu smo si pomagali z naslednjo opremo:

- Terenska lupa povečave 15 X
- 15 litrske posode
- Vrtne škarje
- Merilo
- Papirnate vrečke
- Sušilnik
- Laboratorijska tehtnica
- Merilni sistem Li-COR 6400

#### 3.2 METODE

##### 3.2.1 Nastavitev in izvajanje poskusa

Poskus je trajal od maja do sredine septembra. Pri poskusu smo sledili navodilom ICP Vegetation 2007. Pri merjenju prevodnosti listnih rež in fotosintezne aktivnosti smo si pomagali z ICP Vegetation protokolom iz leta 2003. V protokolih je naveden postopek gojitve in izpostavitve klonov plazeče detelje. Protokol natančneje opisuje tudi potek poskusa, merjenje biomase, sledenje poškodb, meritve fizioloških in okoljskih parametrov.

##### 3.2.2 Lokacije

Poskus smo izvajali na treh različnih lokacijah, ki smo jih izbrali glede na onesnaženost, rabo tal in obstoječe meritve zračnih onesnažil ter vremenskih parametrov. V skladu z navedenimi parametri smo izbrali naslednje lokacije:

- Ljubljana: mestno okolje, manj ozona, Laboratorijsko polje BF
- Iskrba: podeželje, zaledje z več ozona, EMEP postaja
- Rakičan: podeželje, kmetijska proizvodnja, povečan promet, polje Srednje kmetijske šole Rakičan

Poskusna mesta so bila na odprtem in vsaj 200 m oddaljena od glavne ceste.

### 3.2.3 Izvajanje poskusa v naravnih razmerah

Poskusne rastline, vrste *Trifolium repens* 'Regal', smo pridobili od koordinacijskega centra v Veliki Britaniji. Po osemindvajsetdnevni rasti v rastlinjaku, smo jih izpostavili na poskusna polja. Na vseh treh lokacijah smo posadili 20 rastlin občutljivih in 20 rastlin odpornih klonov v 15 litrske lonce. Kot substrat smo uporabili komercialno dostopno substratno mešanico. V vse lonce smo namestili stenje, ki so bili namočeni v vodne rezervoarje pod samimi lonci. S tem smo dosegli, da so bile rastline dobro oskrbljene z vodo. Rastline smo zalivali enkrat, v sušnem obdobju pa tudi dvakrat tedensko.

Iz loncev smo redno odstranjevali plevel in tako preprečili neželjeno senčenje rastlin. Poskusno mesto smo obdali z ograjo, da bi zajcem, ptičem, in malim sesalcem preprečili objedanje rastlin. Proti polžem smo uporabljali limacid s komercialnim imenom Mesurol granulat.

### 3.2.4 Monitoring poškodb

Z opazovanjem poškodb smo začeli takoj po izpostavitvi plazeče detelje na poskusnih poljih. Poškodbe smo spremljali z enotedenskim razmakom. Intenzivnost poškodovanosti rastline zaradi ozona smo ocenjevali po naslednji lestvici:

- 0: brez poškodb
- 1: zelo neznatne poškodbe, prvi simptomi
- 2: neznatne poškodbe, 1-5% listov z neznatnimi poškodbami
- 3: zmerne poškodbe, 5-25 % listov poškodovanih
- 4: obilne poškodbe, 25-50% listov poškodovanih
- 5: zelo obilne poškodbe, 50-90% listov s poškodbami
- 6: vsa rastlina poškodovana, 90-100% listov s poškodbami

Vzporedno s spremljanjem poškodb, smo opazovali tudi splošno stanje in morebitno poškodovanost rastlin:

- H: zdrava
- S: zakrnela
- D: bolna
- I: poškodbe žuželk
- SL: poškodbe polžev
- A: poškodbe drugih živali (srnjad, ptiči, zajci)
- V: virus

Pri opazovanju smo si pomagali s terensko lupo 15 x povečave.



### 3.2.5 Merjenje biomase

V okviru ICP Vegetation protokola smo spremljali tudi biomaso. Prvo vzorčenje biomase smo izvedli 28 dni po izpostavitvi klonov na poskusnem polju. Žetve so si sledile v intervalu 28 dni. V Ljubljani smo termine žetev naravnali tako, da smo vedno poželi le polovico rastlin. To nam je omogočilo nemoteno spremljanje listnih poškodb na preostalih rastlinah.

Biomaso smo vzorčili tako, da smo odstrigli deteljo 7 cm nad površino tal. Prav tako smo odstrigli vse poganjke, ki so segali čez rob posode. Z rastlin smo odstranili vse bolne liste. Za žetev smo uporabili vrtno škarje. Vzorčeno biomaso smo spravili v označene papirnate vrečke in jo posušili v sušilniku. Ko so bili vzorci posušeni do konstantne mase, smo jih stehali z laboratorijsko tehtnico.

### 3.2.6 Merjenje fiziološkega stanja rastlin

V sklopu navodil ICP Vegetation 2003 je predvideno spremljanje dnevnega poteka stomatalne prevodnosti pri plazeči detelji. Predpisano meritev smo razširili na merjenje fotosintezne aktivnosti, deficita vodne pare (VPD) in zunanje zračne vlage. Celodnevne meritve smo opravili 20.6.2007, 27.7.2007 in 13.9.2007 v sončnem vremenu. Fiziološke parametre smo merili na šestih občutljivih in šestih odpornih klonih pri ambientalnih razmerah. Da bi zagotovili enakomerno meritev, smo merili fiziološke parametre izmenično na občutljivih in na odpornih klonih. Pri meritvah smo uporabili le polno razvite liste. Merili smo na sredinskem lističu, tretjega lista od vrha stolona. Listič smo namestili v merilno komoro in ocenili površino ploskve v komori. Ocenjeno površino smo nato vnesli v merilni inštrument. Pri prvi meritvi smo list označili in ga nato uporabljali do konca celodnevne meritve.

Fotosintezno aktivnost merimo s spremljanjem spreminjanja koncentracije CO<sub>2</sub> ali O<sub>2</sub> v neki omejeni atmosferi, npr. komora v kateri je zaprt list rastline. Pri tem moramo upoštevati tudi druge fiziološke procese, pri katerih prihaja do izmenjave plinov med rastlino in okoljem. Glavna med temi procesi sta respiracija in fotorespiracija, pri katerih se tvori CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> pa se porablja. Najpogostejši način spremljanja fotosintezne aktivnosti je merjenje privzema CO<sub>2</sub>. Merimo ga z infrardečim plinskim analizatorjem (IRGA). Za molekule CO<sub>2</sub> je značilno, da absorbirajo sevanje v določenih delih IR spektra. Absorpcijski vrhovi CO<sub>2</sub> se nahajajo pri štirih valovnih dolžinah, 2,66, 2,77, 4,26 in 14,99 mm. Infrardeči analizatorji plina večinoma izračunavajo jakost neto fotosinteze na podlagi absorpcijskega vrha pri valovni dolžini 4,3 mm. Sisteme za merjenje fotosinteze lahko razdelimo na zaprte in odprte. Za naše namene smo uporabili diferencialni odprti sistem. Sistem ima dva analizatorja, eden meri CO<sub>2</sub> v zraku iz listne komore, drugi pa meri referenčno vrednost CO<sub>2</sub> v zraku, ki ga vodimo mimo listne komore. S primerjavo obeh vrednosti lahko izračunamo velikost neto fotosinteze. Poleg analizatorjev je ključni del sistema, s senzorjem za svetlobo in ventilatorjem, opremljena merilna komora. Ventilator

znotraj komore preprečuje nastajanje zastojne plasti zraka na listni površini. Jakost neto fotosinteze sistem izračunava kot spremembo CO<sub>2</sub> v času na enoto mase rastlinskega tkiva, enoto površine rastlinskega tkiva ali enoto mase klorofila.

Merjenje prevodnosti listnih rež je v principu podobno merjenju fotosintezne aktivnosti, le da IRGA molekule vodne pare absorbirajo svetlobo v drugem delu spektra. Merilni sistem meri razliko v absorpciji molekul vode v listni in referenčni komori ter tako izračuna stomatalno prevodnost. Tudi deficit vodne pare (VPD) in relativna zračna vlaga sta izračunana parametra.

### **3.2.7 Meteorološki podatki**

Klimatske podatke in podatke o koncentracijah ozona ter drugih onesnažil (SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>) nam je posredovala Agencija Republike Slovenije za okolje (ARSO). Podatki so bili pridobljeni s postaj, ki so v bližini poskusnih mest. Podatke za ljubljansko lokacijo smo dobili od meteorološke postaje Bežigrad, za Iskrbo in Rakičan pa od postaj v neposredni bližini poskusnih mest.

### **3.2.8 Obdelava podatkov**

Podatke smo tabelarno in grafično uredili v programu MS Excel 2003. Da bi ugotovili, če obstajajo razlike v podatkih meritve fotosinteze in prevodnosti listnih rež med občutljivim in odpornim klonom, smo podatke prenesli v program Statgraphics, kjer smo jih analizirali s polinomske regresije.

## 4 REZULTATI

### 4.1 REZULTATI MERITEV AOT40

V Ljubljani je v 127. dneh, ko so bile rastline izpostavljene ambietalnemu ozonu, dnevna koncentracija ozona prekoračila mejno vrednost (40 ppb) kar 104-krat. Največ ozona je bilo med 17.7.2007 in 27.7.2007, ko je kumulativna vrednost AOT40 dosegla vrednost 2570 ppb (slika 1). V tem obdobju je bila izmerjena največja vrednost ozona, ki je 18. julija znašala 433 ppb (priloga A). Najmanjše vrednosti je ozon dosegel konec avgusta in v začetku septembra. Takrat kumulativne tedenske vrednosti AOT40 niso prekoračile 400 ppb. Povprečna dnevna AOT40 vrednost merilnega obdobja je bila v Ljubljani 90 ppb.

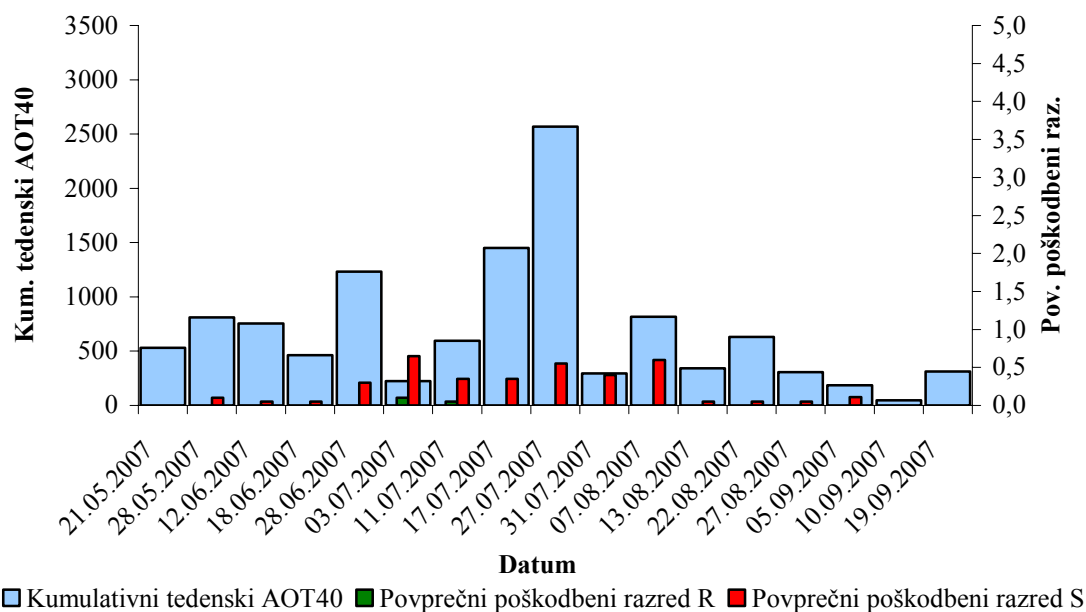
Rezultati meritev ozona v Rakičanu kažejo podobne trende kot v Ljubljani. Rastline smo izpostavili ambientalnemu ozonu za 112 dni. V tem času je dnevna koncentracija ozona preseгла vrednost 40 ppb kar 99-krat. Najmanjše tedenske vrednosti AOT so bile avgusta in niso bistveno presegle vrednosti 600 ppb. Vrh ozonske epizode je bil med 14.7 in 21.7. 2007 (slika 2). V omenjenem obdobju je bila izmerjena najvišja dnevna koncentracija ozona, ki je 17. julija 2007 dosegla vrednost 401 ppb (priloga B). Povprečna dnevna vrednost AOT40 za obdobje med 14.5 in 3.9. 2007 je bila 113 ppb.

Najvišja dnevna koncentracija ozona v Iskrbi je bila izmerjena 18.7.2007 in je znašala 438 ppb (priloga C). Največja kumulativna tedenska vrednost AOT40 sovпада s tem datumom. in je znašala 2082 ppb. Izrazito zmanjšanje omenjenega parametra je opazno med 27.8. in 13.9.2007 (slika 3). V Iskrbi je bila v času opazovanja povprečna dnevna vrednost AOT40 120 ppb.

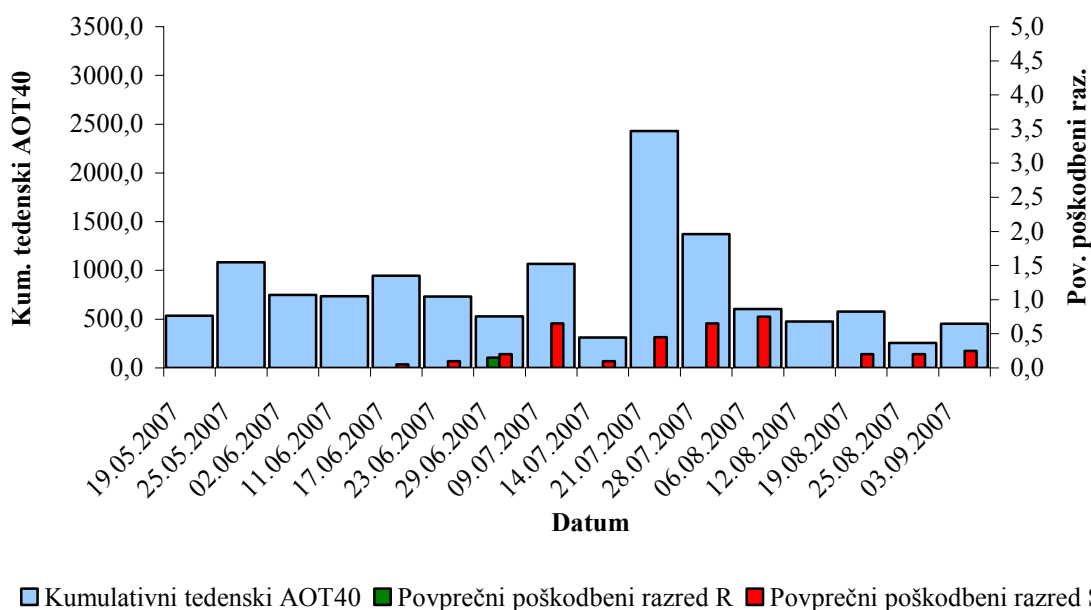
### 4.2 SPREMLJANJE OZONSKIH POŠKODB NA PLAZEČI DETELJI

V Ljubljani in Rakičanu je bila poškodovanost plazeče detelje razmeroma majhna. Poškodbe so bile znotraj mej prvega poškodbenega razreda. Največja poškodovanost detelje na obeh omenjenih lokacijah je bila evdentirana meseca julija (sliki 1 in 2). V času meritev je bilo v povprečju več poškodb na občutljivih klonih kot na odpornih klonih.

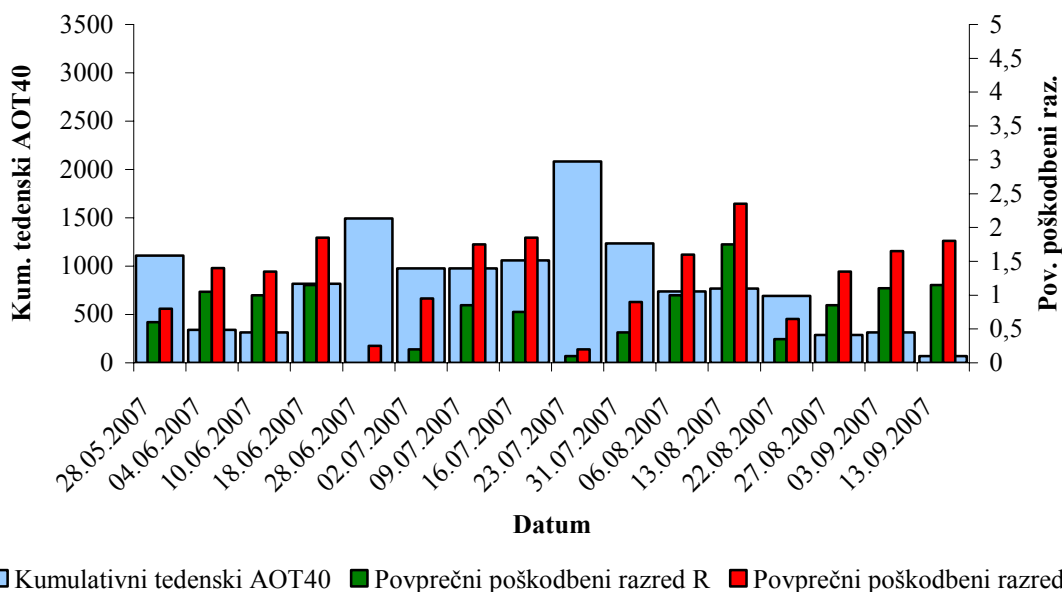
Večja poškodovanost klonov plazeče detelje je bila v Iskrbi (slika 3). Tam je povprečna poškodovanost občasno preseгла meje drugega poškodbenega razreda. Prisotnost poškodb je bila enakomerno razporejena skozi vso merilno obdobje in ni kazala vrhov, kakršni so se pokazali na poskusnih poljih v Ljubljani in Rakičanu. Povprečni poškodbeni razred za občutljive klone tekom merilnega obdobja je bil 1,3, medtem ko je za odporne klone znašal 0,78.



Slika 1: Primerjava akumuliranih vrednosti ozona (AOT40) z listnimi poškodbami plazeče detelje (*Trifolium repens* 'Regal'; R-odporen klon, S-občutljiv klon) za mesto Ljubljana, sezona 2007.



Slika 2: Primerjava akumuliranih vrednosti ozona (AOT40) z listnimi poškodbami plazeče detelje (*Trifolium repens* 'Regal'; R-odporen klon, S-občutljiv klon) za mesto Rakičan, sezona 2007.



Slika 3: Primerjava akumuliranih vrednosti ozona (AOT40) z listnimi poškodbami plazeče detelje (*Trifolium repens* 'Regal'; R-odporni klon, S-občutljiv klon) za mesto Iskrba, sezona 2007.

### 4.3 MERITVE BIOMASE

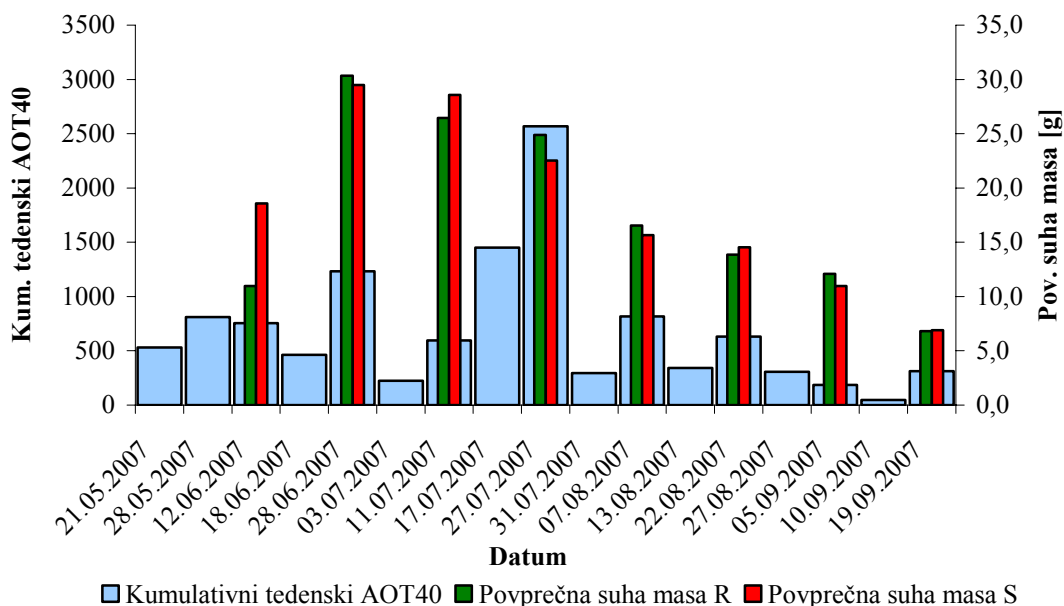
V sklopu spremljanja vplivov ambientalnega ozona na klone plazeče detelje meritve kažejo, da so občutljivi in odporni kloni dosegali največjo povprečno suho maso na poskusnem polju v Ljubljani (slika 4). Največja povprečna vrednost suhe mase odpornega klona na tej lokaciji je bila izmerjena 28. junija 2007 in je znašala 30,3 g. Povprečna suha masa občutljivega klona je tega datuma znašala 29,5 g. Vrednosti so med 28. junijem in koncem poskusnega obdobja postopoma padale. Izračunano razmerje med suho maso občutljivega klona in suho maso odpornega klona je imelo vrednost 0,95.

Tabela 3: Povprečna biomasa merilnega obdobja za posamičen klon.

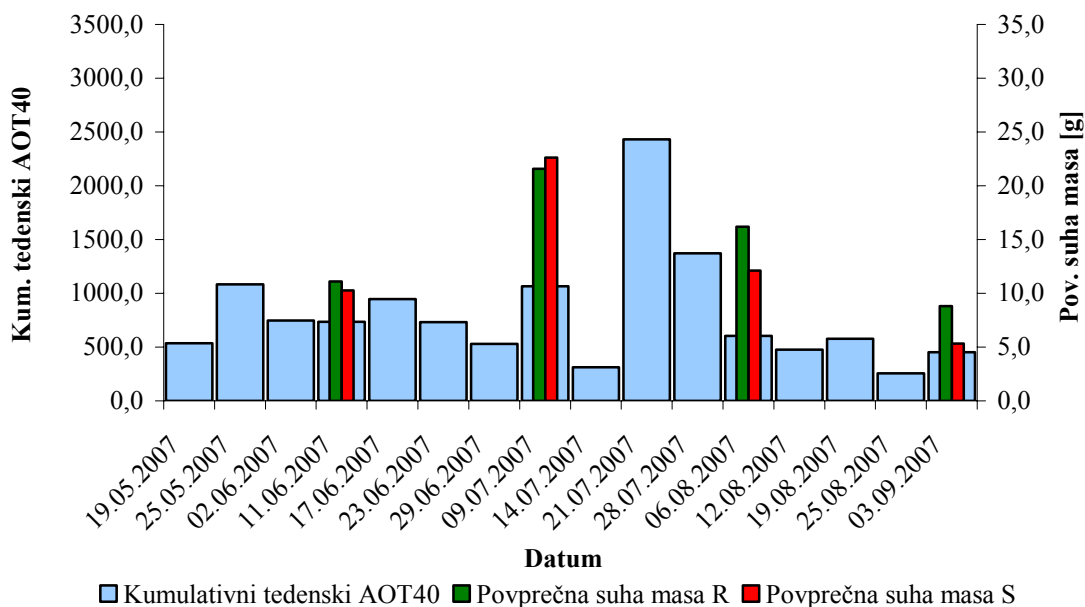
Poskusno mesto	Povprečna suha masa merilnega obdobja [g]	
	S	R
Ljubljana	18,27	17,74
Rakičan	12,86	14,50
Iskrba	10,49	10,99

Meritve biomase v Rakičanu in Iskrbi so dale podobne rezultate. Največji povprečni vrednosti suhe mase pri obeh klonih sta bili ob drugi žetvi. Druga žetev je bila v Rakičanu 9. julija, v Iskrbi pa 16. julija. Povprečna vrednost suhe mase občutljivega klona ob drugi žetvi je bila v Rakičanu 22,6 g, povprečna suha masa odpornega klona pa 21,6 g. Na dan 16. julija 2007 je bila v Iskrbi povprečna suha masa občutljivega klona 19,9 g, povprečna suha masa rezistentnega klona pa 21,6 g. Ob tretji in četrti žetvi so bile na obeh lokacijah

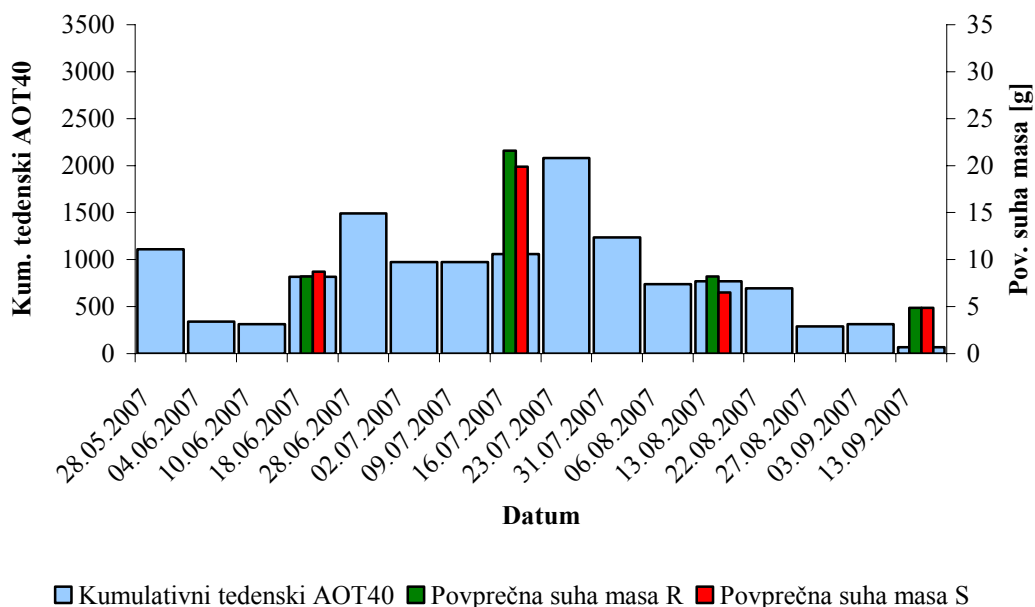
vrednosti suhih mas obeh klonov manjše in so proti koncu merilne sezone upadale. Podobno kot v Ljubljani, se je tudi na ostalih dveh lokacijah pokazala majhna razlika v razmerju med suho maso občutljivega in odpornega kлона. V Iskrbi je bilo razmerje med suho maso občutljivega kлона in suho maso rezistentnega kлона 0,89, v Rakičanu pa 0,87.



Slika 4: Primerjava akumuliranih vrednosti ozona (AOT40) z izmerjeno biomaso plazeče detelje (*Trifolium repens* 'Regal'; R-odporen klon, S-občutljiv klon) za mesto Ljubljana, sezona 2007.



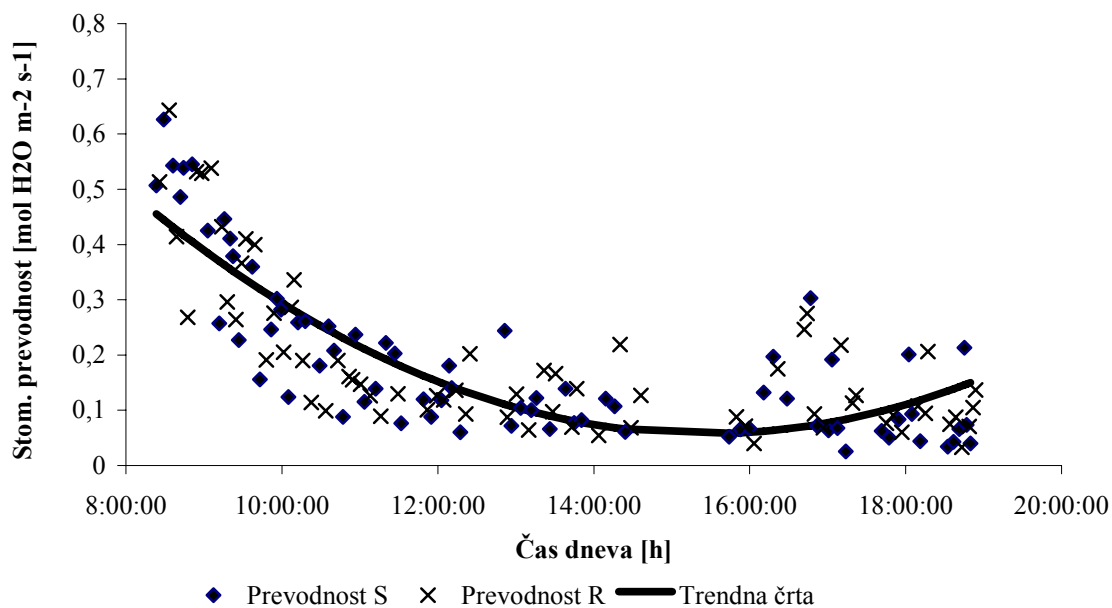
Slika 5: Primerjava akumuliranih vrednosti ozona (AOT40) z izmerjeno biomaso plazeče detelje (*Trifolium repens* 'Regal'; R-odporen klon, S-občutljiv klon) za mesto Rakičan, sezona 2007.



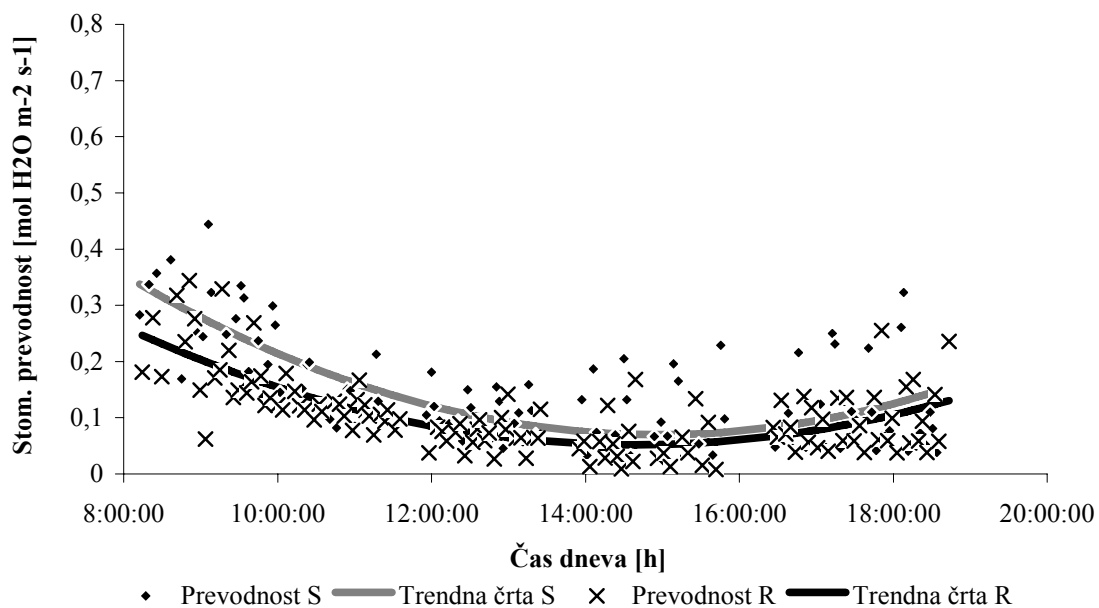
Slika 6: Primerjava akumuliranih vrednosti ozona (AOT40) z izmerjeno biomaso plazeče detelje (*Trifolium repens* 'Regal'; R-odporni klon, S-občutljiv klon) za mesto Iskrba, sezona 2007.

#### 4.4 MERITVE PREVODNOSTI LISTNIH REŽ

Dnevni potek prevodnosti listnih rež smo merili v Ljubljani, in sicer v treh terminih. Dnevni potek stomatalne prevodnosti je pri vseh meritvah kazal podoben trend (slike 7-9). Vrednosti prevodnosti so bile največje zjutraj in so proti poldnevu postopno padale. V vseh meritvah so dosegle minimum v času med 14. in 16. uro. Proti koncu meritve so izmerjene vrednosti spet naraščale. Največja prevodnost je bila izmerjena 13.9.2007 (slika 9), in sicer je znašala  $0,70 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Najmanjšo prevodnost listni rež smo izmerili 27.7.2007 ( $<0,01 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). V primerjavi s septembrskimi meritvami so 27.7.2007 vrednosti manjše že ob samem začetku meritve in ostajajo majhne skozi ves dan. V času druge meritve je prihajalo do statistično značilne razlike med občutljivim (S) in rezistentnim (R) klonom. Prevodnost pri rezistentnem klonu je bila skozi ves dan nekoliko manjša kot pri občutljivem klonu (slika 8).

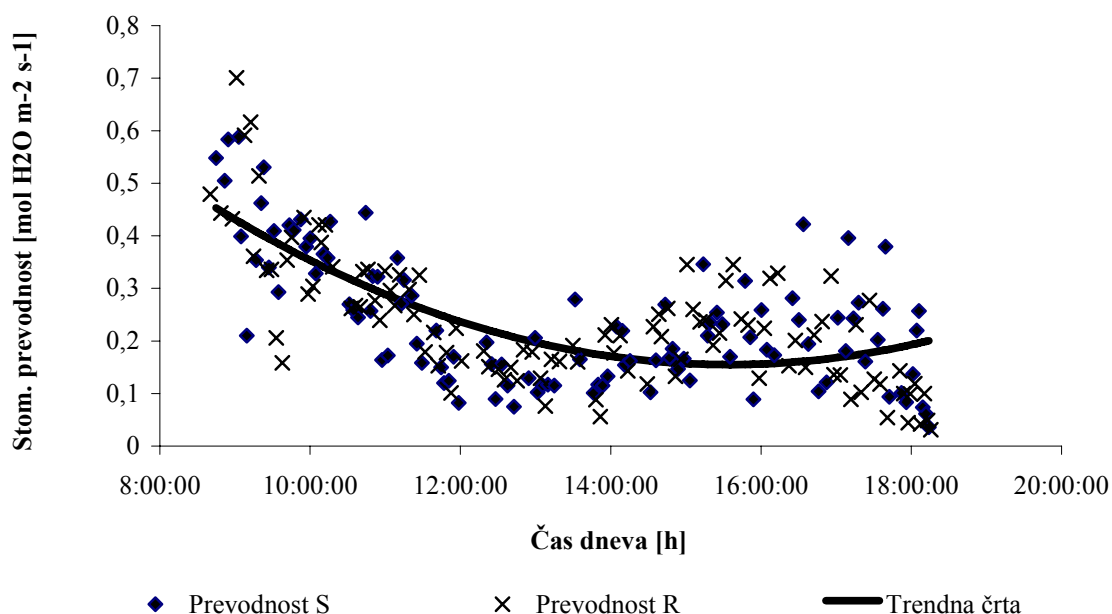


Slika 7: Dnevni potek stomatarne prevodnosti na ozon odpornih in občutljivih klonov plazeče detelje (*Trifolium repens* 'Regal'). Ljubljana, 20.06.2007. Podatki so na osnovi meritev na 6 rastlinah vsakega klona ob vsakem terminu, merjeno z Li-COR 6400.



Slika 8: Dnevni potek stomatarne prevodnosti na ozon odpornih in občutljivih klonov plazeče detelje (*Trifolium repens* 'Regal'). Ljubljana 27.07.2007. Podatki so na osnovi meritev na 6 rastlinah vsakega klona ob vsakem terminu, merjeno z Li-COR 6400.

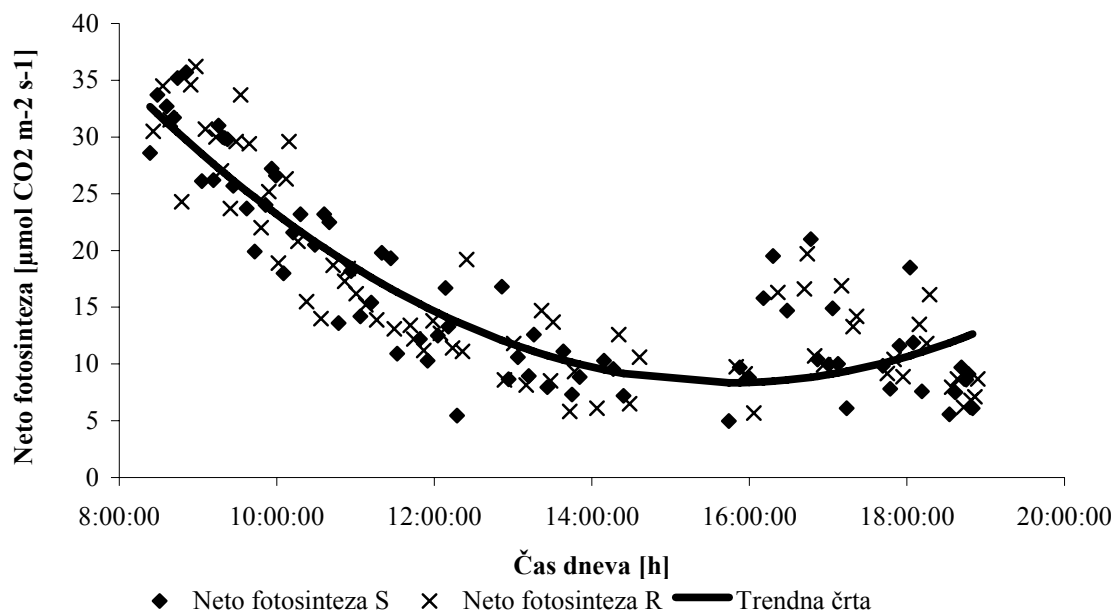




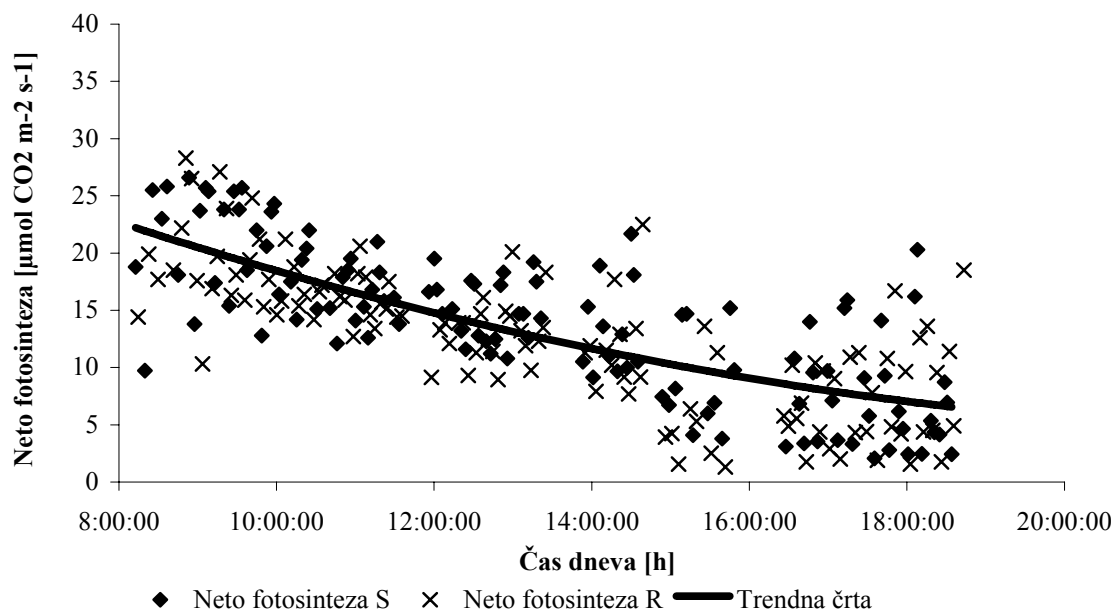
Slika 9: Dnevni potek stomatarne prevodnosti na ozon odpornih in občutljivih klonov plazeče detelje (*Trifolium repens* 'Regal'). Ljubljana 13.09.2007. Podatki so na osnovi meritev na 6 rastlinah vsakega klona ob vsakem terminu, merjeno z Li-COR 6400.

#### 4.5 MERITVE FOTOSINTEZNE AKTIVNOSTI

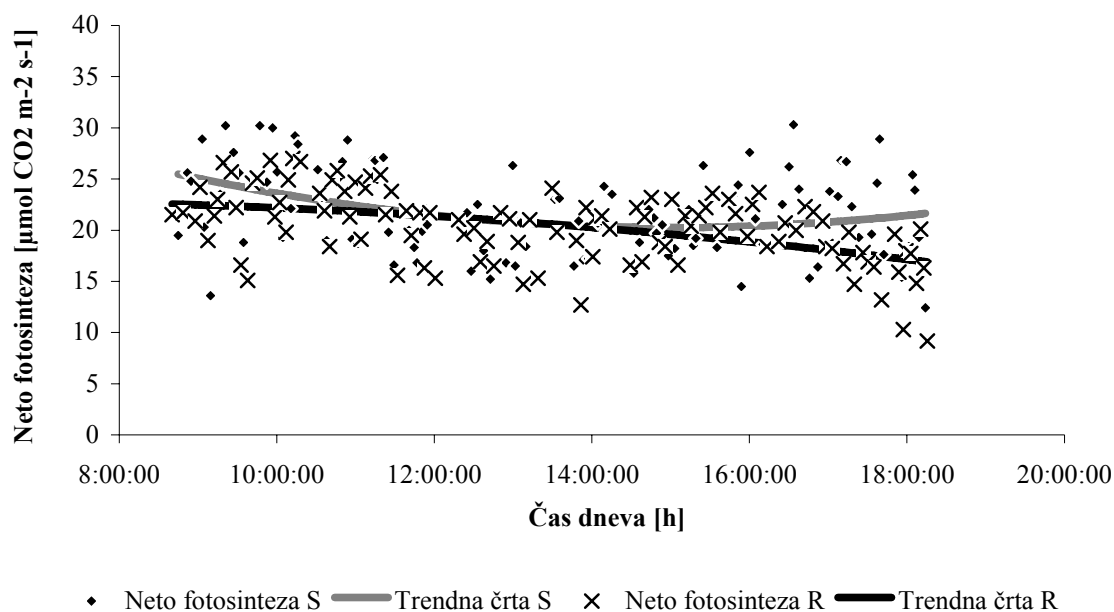
Hkrati z meritvami prevodnosti listnih rež smo merili tudi fotosintezno aktivnost rastlin-neto fotosintezo. Pri junijski meritvi so se vrednosti neto fotosinteze po začetnem jutranjem vrhu proti popoldnevu polagoma manjšale (slika 10). Fotosintezna aktivnost je dosegla minimum okrog 16. ure popoldne. Po tej uri je neto fotosinteza spet kazala trend zviševanja. Pri julijskem terminu je, za razliko od junijskega, odsotna zadnja faza večernega povečevanja fotosintezne aktivnosti (slika 11). Še najbolj izstopa meritev 13.9.2007. To je namreč edini termin, v katerem je prišlo do statistično značilnih razlik v neto fotosintezi med občutljivim in odpornim klonom. Vrednosti neto fotosinteze občutljivega klona so bile v dopoldanskem in popoldanskem času večje od vrednosti neto fotosinteze odpornega klona. Med 12. in 14. uro so se vrednosti gibale v istem območju (slika 12). Največja izmerjena vrednost neto fotosinteze je bila 20.6.2007 ( $36,2 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), najmanjša pa 27.7.2007 ( $1,3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).



Slika 10: Dnevni potek fotosintezne aktivnosti na ozon odpornih in občutljivih klonov plazeče detelje (*Trifolium repens* 'Regal'). Ljubljana 20.06.2007. Podatki so na osnovi meritev na 6 rastlinah vsakega klona ob vsakem terminu, merjeno z Li-COR 6400.



Slika 11: Dnevni potek fotosintezne aktivnosti na ozon odpornih in občutljivih klonov plazeče detelje (*Trifolium repens* 'Regal'). Ljubljana 27.07.2007. Podatki so na osnovi meritev na 6 rastlinah vsakega klona ob vsakem terminu, merjeno z Li-COR 6400.

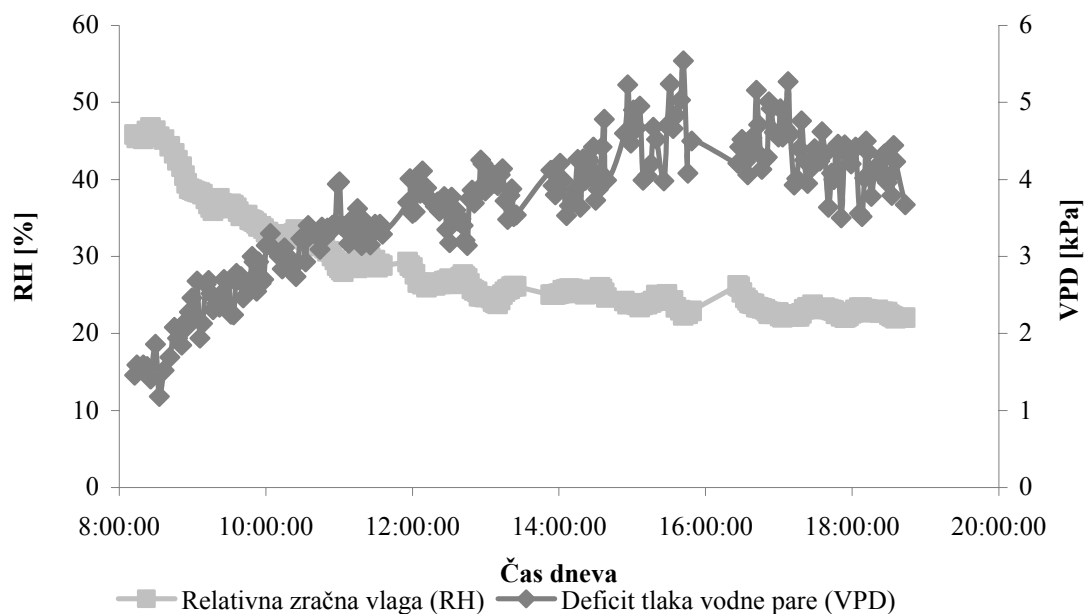


Slika 12: Dnevni potek fotosintezne aktivnosti na ozon odpornih in občutljivih klonov plazeče detelje (*Trifolium repens* 'Regal'). Ljubljana 13.09.2007. Podatki so na osnovi meritev na 6 rastlinah vsakega klona ob vsakem terminu, merjeno z Li-COR 6400.

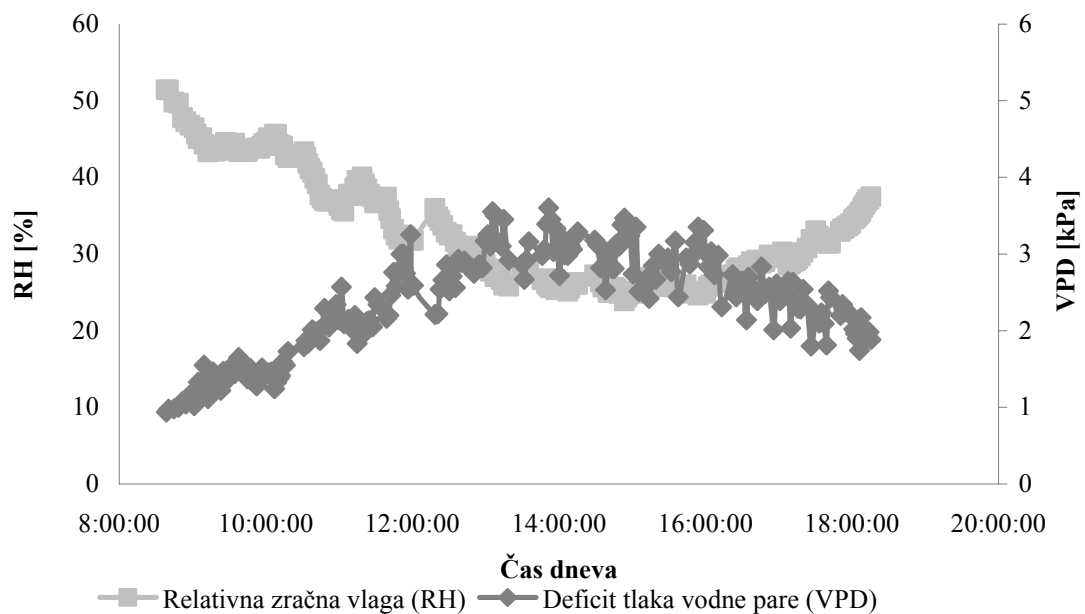
#### 4.6 MERITVE DEFICITA TLAKA VODNE PARE IN RELATIVNE ZRAČNE VLAGE

Deficit tlaka vodne pare (VPD) je v obeh terminih tekom dneva naraščal, medtem ko se je zunanja relativna zračna vlaga polagoma zmanjševala. Deficit tlaka vodne pare je 27.7.2007 dosegel maksimum okrog 16. ure popoldan (slika 13), 13.9.2007 pa okoli 14. ure popoldan (slika 14). Po doseženem dnevnem maksimumu so se vrednosti VPD začele zmanjševati. V julijskem terminu je bil razpon vrednosti VPD večji kot v septembrskem terminu. Vrednosti so se gibale med 1,18 kPa in 5,54 kPa.

Dnevni potek sprememb zunanje relativne zračne vlage je tekom dneva kazal nasproten trend kot deficit tlaka vodne pare. Največje vrednosti so bile zjutraj, ob začetku meritve. Tekom dneva so se vrednosti polagoma zmanjševale in v septembrski meritvi dosegle minimum okrog 14. ure popoldne (slika 14). Po doseženem minimumu so se vrednosti polagoma večale. Julijska meritev, za razliko od septembrske, ni pokazala nobenega popoldanskega minimuma, temveč se je relativna zračna vlaga po začetnem jutranjem maksimumu, le še zmanjševala (slika 13).



Slika 13: Dnevno spreminjanje stanja defcita vodne pare (VPD) in relativne zračne vlage (RH). Ljubljana 27.07.2007. Podatki so na osnovi meritev na 6 rastlinah vsakega klona ob vsakem terminu, merjeno z Li-COR 6400.



Slika 14: Dnevno spreminjanje stanja defcita vodne pare (VPD) in relativne zračne vlage (RH). Ljubljana 13.09.2007. Podatki so na osnovi meritev na 6 rastlinah vsakega klona ob vsakem terminu, merjeno z Li-COR 6400.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V Sloveniji so pogoste prekoračitve mejnih vrednostih ozona, kar se odraža na splošnem zdravstvenem stanju ljudi, živali in rastlin. V namene spremljanja in odpravljanja posledic ozona se je Slovenija v letu 2001 pridružila ICP Vegetation programu. V okviru programa smo spremljali vpliv ozona na plazečo deteljo, *Trifolium repens* 'Regal'.

V letu 2007 je bila vrednost AOT40 prekoračena na vseh merilnih mestih v Sloveniji. Na poskusnih mestih v Iskrbi, Rakičanu in v Ljubljani je bila koncentracija višja od 40 ppb več kot 80 % dni merilnega obdobja. Po višini koncentracij in kumulativnih tedenskih vrednostih ozona najbolj izstopa mesec julij. Znano je, da so velike koncentracije ozona največkrat povezane z visokimi temperaturami, prisotnostjo prekurzorjev ozona in intenzivnim sončnim sevanjem (Schültze in sod., 2005). V juliju so bile koncentracije prekurzorjev ozona (NO<sub>x</sub>, CO, ogljikovodiki...) razmeroma majhne in nikjer niso prekoračile mejnih vrednosti. Po drugi strani pa je bil iz vidika temperatur in sončnega obsevanja julij nad dolgoletnim povprečjem. Povprečna mesečna temperatura v Ljubljani je bila 2,1 °C, v Kočevju 1,1 °C in v Murski Soboti 3,0 °C nad dolgoletnim povprečjem. Največji pozitivni odkloni so bili okrog 20. v mesecu, kar sovpada z doseženimi maksimalnimi dnevnimi koncentracijami in z največjimi tedenskimi kumulativnimi vrednostmi ozona. Tudi v mesecu avgustu je povprečna mesečna temperatura presegla dolgoletno povprečje (odkloni so bili med 1 in 1,5 °C), a so bile vrednosti ozona vseeno manjše od julijskih (Šegula in sod., 2008). Majhne koncentracije in tedenske kumulativne vrednosti ozona bi lahko bile posledica zmanjšanega sončnega obsevanja in majhnih koncentracij prekurzorjev ozona v omenjenem merilnem obdobju. Kljub nekoliko nižjim koncentracijam ozona v zadnjem delu merilnega obdobja, so trimesečne vsote AOT40 na vseh treh lokacijah za več kot trikrat prekoračile vrednost 3000 ppb.h. CLRTAP konvencija definira omenjeno AOT40 vrednost, akumulirano v treh mesecih, kot kritično vrednost za poljščine, naravno in polnaravno vegetacijo (Harmes in sod., 2007).

Velike koncentracije ozona, ki so presegle AOT40 vrednosti v Iskrbi, Rakičanu in v Ljubljani so bile opažene že v preteklih raziskavah. Avtorji, kljub velikim koncentracijam ozona, niso opazili poškodb na indikatorski rastlini *Trifolium repens* 'Regal' (Džuban 2002; Lesar, 2007). Izsledki opazovanja ozonskih poškodb v letu 2007 kažejo podobne rezultate. V Ljubljani in Rakičanu je poškodovanost detelje v povprečju, kljub visokim akumuliranim vrednostim ozona, dosegla le prvi poškodbeni razred. To pomeni, da so bile poškodbe zelo neznatne (<1% listov poškodovanih), oz. da so se pojavljali le prvi simptomi ozonskih poškodb (Mills in sod., 2005). Največ poškodb je bilo popisanih v juliju in v začetku avgusta. Obdobje povečane poškodovanosti sovpada z vrhom ozonske epizode. Nekoliko več poškodb je bilo v Iskrbi, kjer so vrednosti občasno presegle meje

drugega poškodbenega razreda. Viri označujejo drugi poškodbeni razred kot razred, kjer je poškodovanih od 1-5 % listov (Batič in Turk, 2007). Za razliko od Rakičana in Ljubljane, so bile ozonske poškodbe enakomerno razporejene skozi vso trajanje poskusa. Taka razporeditev ozonskih poškodb je lahko posledica konstantnega privzema ozona v rastlino ob bolj ali manj stalnih, visokih koncentracijah ozona. V Iskrbi je bila povprečna AOT40 vrednost celotnega poskusnega obdobja večja kot na ostalih dveh lokacijah in je znašala 120 ppb. Na razmeroma konstantno visoke koncentracije ozona v veliki meri vpliva geografska lega Iskrbe. Iskrbo smo že v osnovi izbrali, zaradi njene odmaknjene lege. V bližini poskusnega mesta ni antropogenih virov prekursorjev ozona, pač pa so le-ti po zračnih tokovnicah prinešeni iz industrijskih območij v okolici Reke (Batič in Turk, 2007). Po drugi strani pa je lega merilne postaje v gozdnati krajini, kjer so zaradi lesnatih vrst v ozračju prisotni terpeni. Znano je, da so terpeni v gozdnati krajini eden glavnih prekursorjev ozona (Jacobson, 2002). Kljub majhnim ocenam poškodovanosti, so se, tako kot v preteklih raziskavah (Džuban, 2002; Lesar 2007), pokazale razlike med občutljivimi in odpornimi kloni detelje. V povprečju je bilo na občutljivih klonih opaženih več poškodb kot na odpornih klonih.

Chevone in sodelavci (1998) trdijo, da kakovost spremljanja ozona s pomočjo plazeče detelje ni toliko v različni listni poškodovanosti odpornega in občutljivega klona, kot je v razlikah v biomasi. V našem poskusu sta klona dosegala največjo biomaso v Ljubljani, kar je verjetno posledica optimalnih rasti razmer (tabela 3). V Rakičanu in Iskrbi sta bili povprečni biomasi rastlin celotnega merilnega obdobja manjši. Najmanjša povprečna suha masa merilnega obdobja je bila v Iskrbi, kar bi lahko povezali z večjimi vrednostmi AOT40 in skozi vse merilno obdobje prisotnimi listnimi poškodbami.

V naši raziskavi se je pokazalo, da so bile suhe mase pri prvi žetvi manjše kot pri naslednji žetvi. Do podobnih rezultatov so prišli Fumigalli in sod. (2002). Vzrok za manjšo maso pri prvi žetvi bi naj bila počasna adaptacija rastlin na gojenje zunaj zaprtih prostorov in se zaradi tega v raziskavah naj ne bi upoštevala (Mills in sod., 2000). Isti avtorji so razvili model, ki predvideva vplive ambientalnega ozona na biomaso plazeče detelje. Ugotovili so, da je najpomembnejši dejavnik, ki vpliva na biomaso detelje, vrednost AOT40. V našem poskusu so se vrednosti povprečne suhe mase po drugi žetvi le še zmanjševale. Zmanjševanje je verjetno, bolj kot zaradi ozona, posledica zmanjšane obnovitvene sposobnosti detelje, zaradi rednega prikrajševanja stolonov (Fumagalli in sod., 2003).

Primerjave razmerij povprečnih suhih mas občutljivih in odpornih klonov so pokazale zmanjšanje suhe mase občutljivega klona v primerjavi z odpornim (Postiglione in sod., 2000; Fumagalli in sod., 2003). V nekaterih raziskavah se je suha masa občutljivega klona v primerjavi z rezistentnim zmanjšala kar za 60 %. Na vseh treh lokacijah nismo ugotovili velikih razlik v biomasi med klonoma. Razmerja suhih mas med obema klonoma kažejo,

da se je v Rakičanu suha masa občutljivega klona napram odpornemu razlikovala le za 13 %, v Iskrbi za 11 % in v Ljubljani le za 5 %.

Znano je, da vrednost AOT40 ni dovolj za zanesljivo napovedovanje ozonskih poškodb. Poleg omenjene vrednosti ima pomembno funkcijo sam privzem ozona v rastlino ali t.i. ozonski tok. Ključno vlogo na poti ozona v notranjost lista imajo listne reže in posledično tudi vsi dejavniki, ki vplivajo na njihovo prevodnost (Crous in sod., 2006; Ball in sod., 1998; Krupa 1994). Stomatalna prevodnost bi lahko pojasnila majhen vpliv ozona na biomaso in odsotnost listnih poškodb. V sklopu navodil ICP Vegetation programa iz leta 2003, ki predvideva spremljanje spreminjanja prevodnosti listnih rež, smo v Ljubljani opravili tri celodnevne meritve. V vseh treh meritvah se je pokazal podoben trend padanja, minimuma in naraščanja vrednosti stomatalne prevodnosti. Plazeča detelja je izrazito mezofitska rastlina, ki ob sušnem stresu, bodisi v tleh ali pri majhni relativni zračni vlagi zapre listne reže (Batič in Turk, 2007). Glavna dejavnika, ki naj bi, po viru sodeč, vplivala na prevodnost listnih rež in s tem tudi na fluks ozona, sta temperatura in deficit tlaka vodne pare (VPD). Temperatura vpliva na fluks ozona direktno preko delovanja listnih rež in z vplivom na VPD (Ball in sod., 1998). Ko je VPD majhen, je prevodnost listnih rež velika. Fluks ozona je s tem znatno povečan in za ozonske poškodbe zadostujejo že majhne koncentracije. Ko pa se VPD poveča, se stomatalna prevodnost zmanjša in s tem tudi fluks ozona v liste. Da pride do ozonskih poškodb in vpliva na biomaso rastline, morajo biti ambientalne koncentracije ozona (tudi AOT40) večje (Benton in sod., 2000). Deficit tlaka vodne pare je največji med 15. in 16. uro (Kley in sod., 1999), kar se sklada z našimi meritvami, kjer je bil VPD največji med 14. in 16 uro popoldne (sliki 13 in 14). Ob enem so bile v tem času dneva tudi najvišje temperature. Najverjetneje sta oba dejavnika vplivala na prevodnost listnih rež, ki je bila prav tako med 14. in 16. uro najmanjša. Nekoliko večje jutranje in večerne stomatalne prevodnosti so tako najverjetneje posledica nekoliko nižjih temperatur in manjšega VPD. Primerjava julijskih in septembrskih prevodnosti listnih rež je pokazala, da so bile 27.7. prevodnosti tekom dneva najmanjše. V istem terminu so bile majhne tudi vrednosti relativne zračne vlage. Po drugi strani pa so vrednosti deficita tlaka vodne pare v julijskem terminu znatno presegle vrednosti septembrskega termina. Treba je poudariti, da je bila temperatura 27.7. 2007 kar 6 °C nad dolgoletnim povprečjem, kar je še dodatno zmanjšalo stomatalno prevodnost. Julijski termin meritve je tudi edini termin pri katerem je prišlo do statistično značilnih razlik v stomatalni prevodnosti med odpornim in občutljivim klonom plazeče detelje. Crous in sod. (2006) so na plazeči detelji opazili zmanjšanje stomatalne prevodnosti občutljivega klona napram odpornemu. V nekaterih primerih se je le-ta zmanjšala kar za 30 %. V nasprotju z navedenim virom se je v našem poskusu izkazalo, da je bila stomatalna prevodnost rezistentnega klona skozi ves dan manjša od prevodnosti listnih rež občutljivega klona. Vzrok za razliko v prevodnosti je verjetno različna občutljivost klonov na ozon in ostale okoljske dejavnike. Pri tem bi bila lahko manjša stomatalna prevodnost rezistentnega klona posledica večje tolerance na ozon (Francini in sod., 2007). Obenem pa ni izključeno, da ni pri občutljivem klonu, zaradi

ozona ali okoljskih dejavnikov, prišlo do poškodb mehanizma regulacije odprtosti listnih rež, kar je vodilo v manjšo zaprtost listnih rež (Postiglione in sod., 2000).

Prevodnost listnih rež je bila eden glavnih dejavnikov, ki so določali dnevni potek fotosintezne aktivnosti (Priloge D-F). Še posebej je to razvidno v julijskem terminu, kjer so se pri stomatalni prevodnosti in neto fotosintezi pokazali isti trendi. Najmanjšo vrednost je fotosintezna aktivnost dosegla okrog 16. ure popoldne, kar ustreza najmanjšim vrednostim prevodnosti listnih rež. Iz podatkov je razvidno, da pri julijski in septembrski meritvi stomatalna prevodnost ni bila ključni faktor, ki je vplival na gibanje fotosintezne aktivnosti. V julijskem terminu se je neto fotosinteza ves dan zmanjševala in to kljub temu da je prevodnost listnih rež po 15. uri popoldne spet rasla. Podobni rezultati so bili tudi 13. septembra. Septembrski termin je bil tudi edini, ko so se v rezultatih pokazale statistično značilne razlike med vrednostmi neto fotosinteze pri odpornem in občutljivem klonu. Tudi Crous in sod. (2006) so ugotovili statistično značilne razlike v neto fotosintezi med klonoma. Navajajo, da je bila neto fotosinteza na ozon občutljivega klona manjša kot pri odpornemu klonu. Rezultati naših meritev kažejo prav nasprotno. Neto fotosinteza odpornega klona je bila ob začetku in koncu meritve manjša od neto fotosinteze občutljivega klona.

Pri septembrski meritvi je prišlo do statistično značilne razlike v neto fotosintezi med klonoma, a med klonoma ni prišlo do razlik v prevodnosti listnih rež. Nasprotno se je pokazalo pri julijski meritvi. Sklepamo lahko, da je prevodnost listnih rež v teh dveh terminih sicer igrala pomembno vlogo pri dnevnem poteku fotosinteze (priloge E in F), a ni imela ključnega pomena. Na takšen dnevni potek so verjetno, razen stomatalne prevodnosti, vplivali še sušni stres, temperatura in morfološko stanje posamičnega klona ali komponent fotosistema (Larcher, 2001)

## 5.2 SKLEPI

Prejšnje poglavje lahko povzamem v naslednjih sklepih:

- Meritve ozona in AOT40 vrednosti nam kažejo, da je onesnaženost z ozonom v Sloveniji zelo velika in dosega kritične vrednosti za poljščine, polnaravno in naravno vegetacijo.
- Bolj kot ozon so na fiziološki odziv plazeče detelje *Trifolium repens* 'Regal' vplivali drugi okoljski dejavniki.
- Meritve biomase so pokazale, da se je biomasa zmanjšala od 5-13%, kar bi lahko povzročilo manjše ekonomske izgube.
- Prevodnost listnih rež je omejitveni dejavnik privzema ozona.
- Kloni plazeče detelje *Trifolium repens* 'Regal' se niso izkazali kot dober indikator onesnaženosti zraka z ozonom.



## 6 POVZETEK

Problem onesnaževanja zraka z ozonom in drugimi fotoooksidanti je v Sloveniji in v Evropi prisoten že od začetkov industrializacije gospodarstva. Raziskave so pokazale izrazit negativen vpliv ozona na zdravje ljudi, živali ter vpliv na polnaravno in naravno vegetacijo. Viri ozona na nekem območju so lokalne in prekomejne narave. Čezmejni negativni vplivi so bili povod za nastanek konvencije o prekomejnem razširjanju onesnaženega zraka na velike razdalje, imenovane CLRTAP. V okviru te konvencije obstajajo delovne skupine in programi, ki spremljajo učinke ozona in snujejo strategije zmanjševanja le-tega. V okviru delovne skupine WGE (Working group on effects) se izvaja program ICP Vegetation, v sklopu katerega je potekala tudi naša raziskava.

Poskus je potekal po navodilih ICP Vegetation, od maja do sredine septembra v Ljubljani, Rakičanu in Iskrbi. Poskusno mesto v Ljubljani je predstavljalo mestno okolje, poskusno mesto v Rakičanu ruralno okolje in poskusno mesto v Iskrbi ruralno okolje pod čezmejnimi vplivi ozona. Monitoring ozonskih poškodb smo izvajali na občutljivih in odpornih klonih poskusne rastline *Trifolium repens* 'Regal'. Na posameznem poskusnem polju smo ambientalnim razmeram izpostavili 20 posod z odpornim klonom in 20 posod z občutljivim klonom. V skladu z ICP Vegetation protokolom smo tedensko spremljali koncentracijo ozona in ozonske poškodbe na listih. Biomaso klonov indikatorske rastline smo spremljali v intervalu 28 dni. Fotosintezno aktivnost in prevodnost listnih rež smo merili v treh terminih (20.6.2007, 27.7.2007 in 13.9.2007) z merilnikom fotosinteze Li-COR 6400. Podatke smo obdelali s programom Statgraphics in jih grafično uredili v programu MS Excel 2003.

Rezultati so pokazali, da so bile AOT40 vrednosti prekoračene na vseh merilnih mestih. Kljub visokim vrednostim AOT40 ni prišlo do vidnejših listnih poškodb. Povprečna poškodovanost listov je bila pri občutljivem klonu v prvem oz. drugem poškodbenem razredu, kar pomeni, da so bile poškodbe neznatne. Kljub odsotnosti poškodb, se je nekoliko zmanjšala biomasa občutljivega klona napram odpornemu. Razlika v biomasi med odpornim in občutljivim klonom plazeče detelje je znašala od 5-13 %. Na poškodovanost in biomaso je vplival izrazit mezofitski značaj plazeče detelje *Trifolium repens* 'Regal', saj je bil v obdobju velikih koncentracij ozona fluks ozona v rastlino majhen. Mezofitski značaj plazeče detelje se je najbolje pokazal pri celodnevni meritvah prevodnosti listnih rež, saj je bila stomatalna prevodnost najmanjša med 14. in 16. uro. Stomatalna prevodnost je bila eden glavnih omejujočih dejavnikov fotosinteze, saj je imela le-ta po večini podoben dnevni potek.

## 7 VIRI

- Ball G.R., Benton J., Palmer-Brown D., Fuhrer J., Skärby L., Gimeno B.S., Mills G. 1998. Identifying factors which modify the effects of ambient ozone on white clover (*Trifolium repens*) in Europe. *Environmental pollution*, 103: 7-16
- Batič F., Turk B. 2007. Strokovne podlage za izvajanje Konvencije CLRTAP in Programa ICP-Vegetation v Sloveniji v letu 2006-2007. Poročilo za leto 2007 in končno poročilo projekta. Ljubljana, BF, Univerza v Ljubljani: 4-33
- Benton J., Fuhrer J., Gimeno B.S., Skärby L., Palmer-Brown D., Ball G., Roadknight C., Mills G. 2000. An international cooperative programme indicates the widespread
- Bolte T., Šegula A., Jesenovec B., Planinšek A., Bizjak M., Brinc R., Krsnik P. Kakovost zraka v Sloveniji v letu 2006. 2007. ARSO  
<http://www.arso.gov.si/zrak> (29. avgust 2008)
- Chevone B., Manning W., Varbanov A., Krupa S. 1998. Relating ambient ozone concentrations to adverse biomass responses of white clover. A case study. *Environmental pollution*, 103: 103-108
- Ciglar R., Planinšek A. 1995. Ozon. Ljubljana. ARSO: 4 str
- Crous K. Y., Vandermeiren K., Ceulemans R. 2006. Physiological responses to cumulative ozone uptake in two white clover (*Trifolium repens* L. cv. Regal) clones with different ozone sensitivity. *Environmental and experimental botany*, 58: 169-179
- Džuban T. 2002. Indikacijske vrednosti klonov plazeče detelje *Trifolium repens* 'Regal' ('NC-S', 'NC-R') za sledenje fotooksidantov v Sloveniji. Diplomsko delo. Ljubljana, BF, Oddelek za agonomijo: 43 str.
- Francini A., Nali C., Picchi V., Lorenzini G. 2007. Metabolic changes in white clover clones exposed to ozone. *Environmental and experimental botany*, 60: 11-19
- Fumagalli I., Mignanego L., Mills G. 2003. Ozone biomonitoring with clover clones: yield loss and carryover effect under high ambient ozone levels in northern Italy. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 95: 119-128
- Harmes H., Mills G., Hayes F., Jones L., Norris D., Fuhrer J. 2007. Air pollution and vegetation. ICP Vegetation annual report 2006/2007, Bangor, University of Wales, UK: 37 str.
- Hrček D. 1994. Onesnaženost zraka v Sloveniji.– stanje in usmeritve za izboljšanje. *Okolje v Sloveniji. Okolje v Sloveniji*: 345-355
- Jacobson, Z. M. 2002. Atmospheric pollution. History, science, and regulation. Cambridge, Cambridge University Press: 339 str.
- Kley D., Kleinmann M., Sanderman H., Krupa S. 1999. Photochemical oxidants: state of the science. *Environmental pollution*, 100: 19-42
- Krupa S V. 2000. Ultraviolet-B radiation, ozone and plant biology. *Environmental pollution*, 110: 193-194

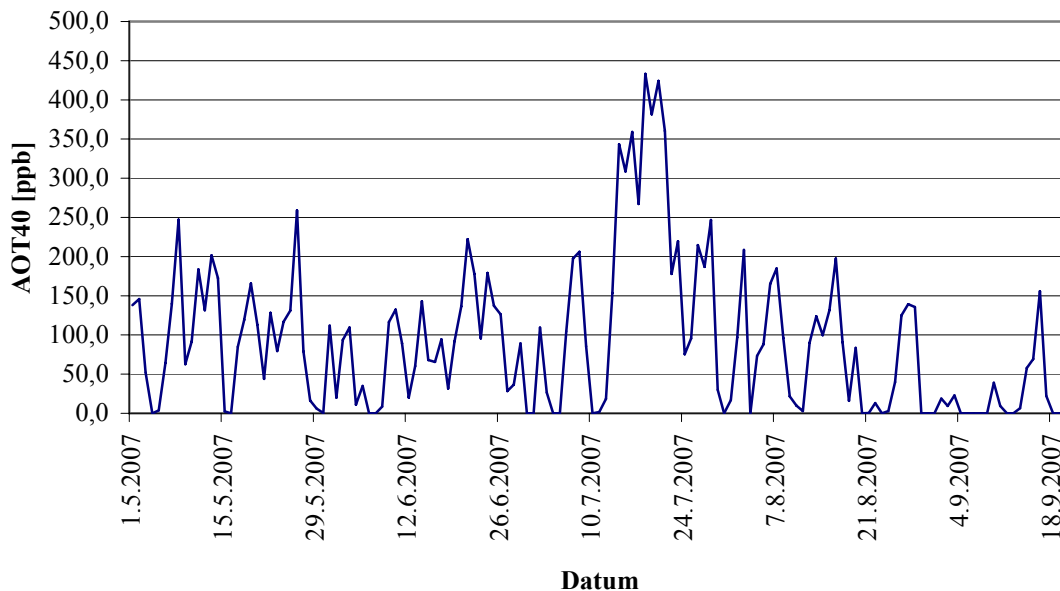
- Krupa S. V., Grünhage L., Jäger H. J., Nosal M., Manning W. J., Legge A. H., Hanewald K. 1994. Ambient ozone (O<sub>3</sub>) and adverse crop response. A unified view of cause and effect. *Environmental pollution*, 87: 119-126
- Larcher W. 2001. *Physiological plant ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups..* 4th edition. New York, Springer: 513 str.
- Lesar P. 2007. Spremljanje učinkov troposferskega ozona s plazečo deteljo *Trifolium repens* 'Regal'. Diplomsko delo. Ljubljana, BF, Oddelek za agronomijo: 33 str.
- Mills G., Ball G., Hayes F., Fuhrer J., Skärby L., Gimeno B., Temmerman L., Heagle A. 2000. Development of a multi-factor model for predicting the effects of ambient ozone on the biomass of white clover. *Environmental pollution*, 109: 553-542
- Mills G., Hayes F., Williams P., Harmens H. 2005. ICP Vegetation experimental protocol for monitoring the incidences of ozone injury on vegetation. Bangor, Natural Environment Research Council: 21 str.
- occurrence of ozone injury on crops. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 78: 19-30
- Ozon naš zaščitnik in sovražnik. ARSO  
[www.arso.gov.si/novice/datoteke](http://www.arso.gov.si/novice/datoteke) (29. avgust 2008)
- Paoletti E. 2005. Ozone slows stomatal response to light and leaf wounding in Mediterranean evergreen broadleaf, *Arbutus unedo*. *Environmental pollution*, 134: 439-445
- Paoletti E., Grulke N. E. 2005. Does living in elevated CO<sub>2</sub> ameliorate tree response to ozone? A review on stomatal response. *Environmental pollution*, 137: 483-493
- Postiglione L., Fagnano M., Merola G. 2000. Response to ambient ozone of two white clover (*Trifolium repens* 'Regal') clones, one resistant and one sensitive, grown in a Mediterranean environment. *Environmental pollution*, 109: 525-531
- Schultze E., Beck E., Müller-Hohenstein K. 2005. *Plant ecology*. New York. Springer: 320 str.
- Severino F. J., Stich K., Soja G. 2007. Ozone stress and antioxidant substances in *Trifolium repens* and *Centaurea jacea* leaves. *Environmental pollution*, 146: 707-714
- Šegula A., Murovec M., Jesenovec B., Turšič J., Koleša T., Brinc R., Cegnar T. Kakovost zraka v Sloveniji v letu 2007. 2008. ARSO  
<http://www.arso.gov.si/zrak> (15. avgust 2008)
- US EPA. 1996. *Air Quality Criteria for Ozone and Other Photo-chemical Oxidants. Vol. II.* North Carolina, US Environmental Protection Agency: 173-184

## **ZAHVALA**

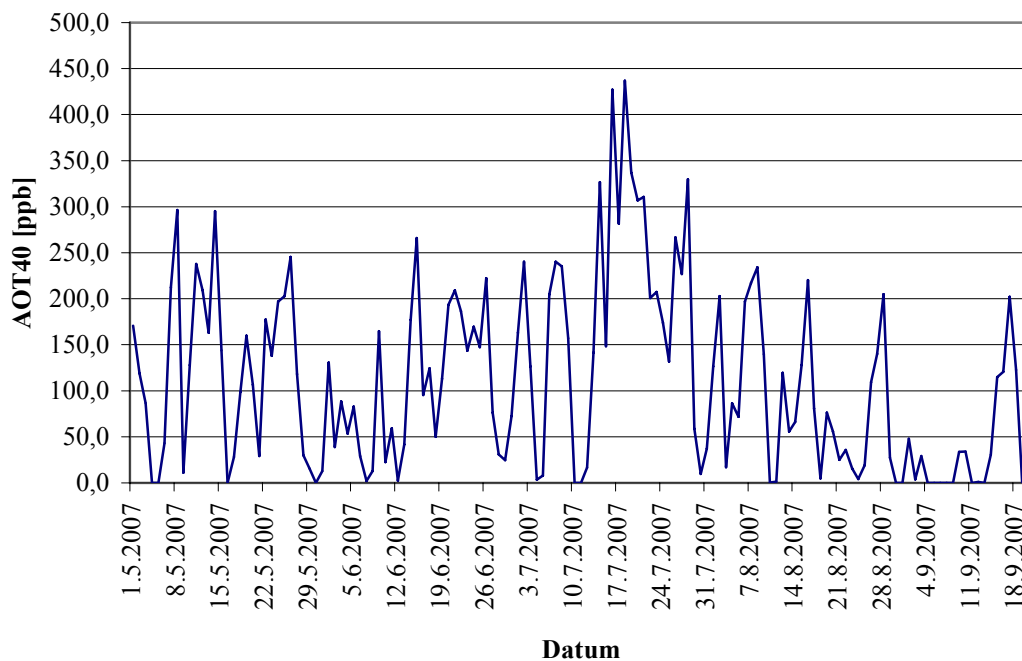
Hvala vsem in še komu.

## PRILOGE

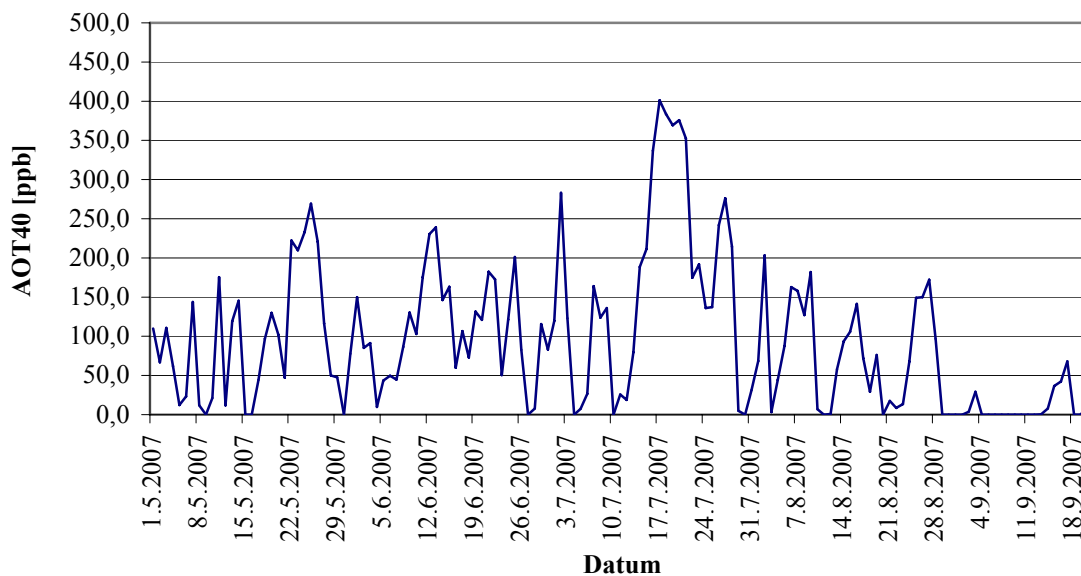
Priloga A: AOT40 v času izvajanja poskusov za mesto Ljubljana v vegetacijski sezoni 2007.



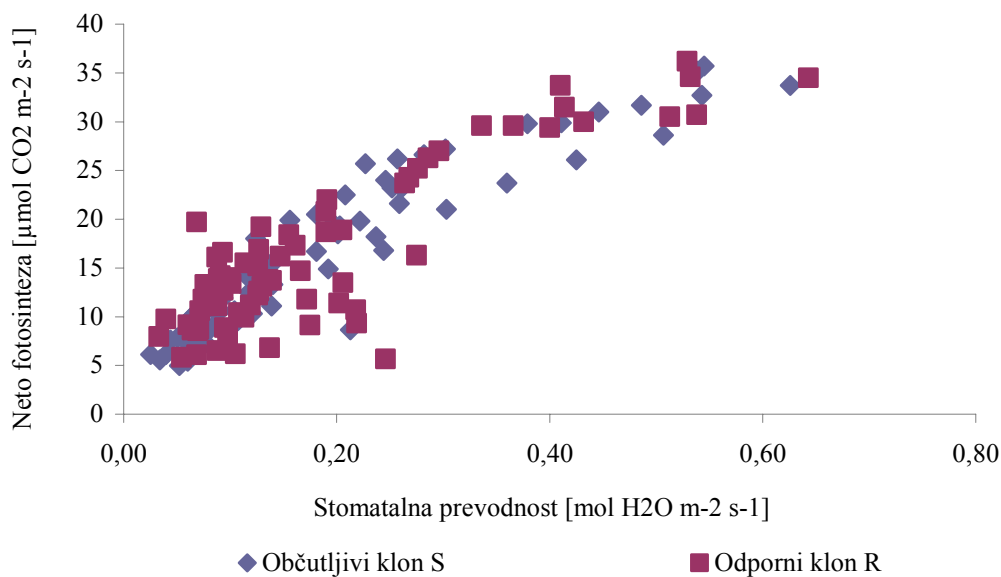
Priloga B: Vrednosti AOT40 v času izvajanja poskusov za mesto Iskrba v vegetacijski sezoni 2007.



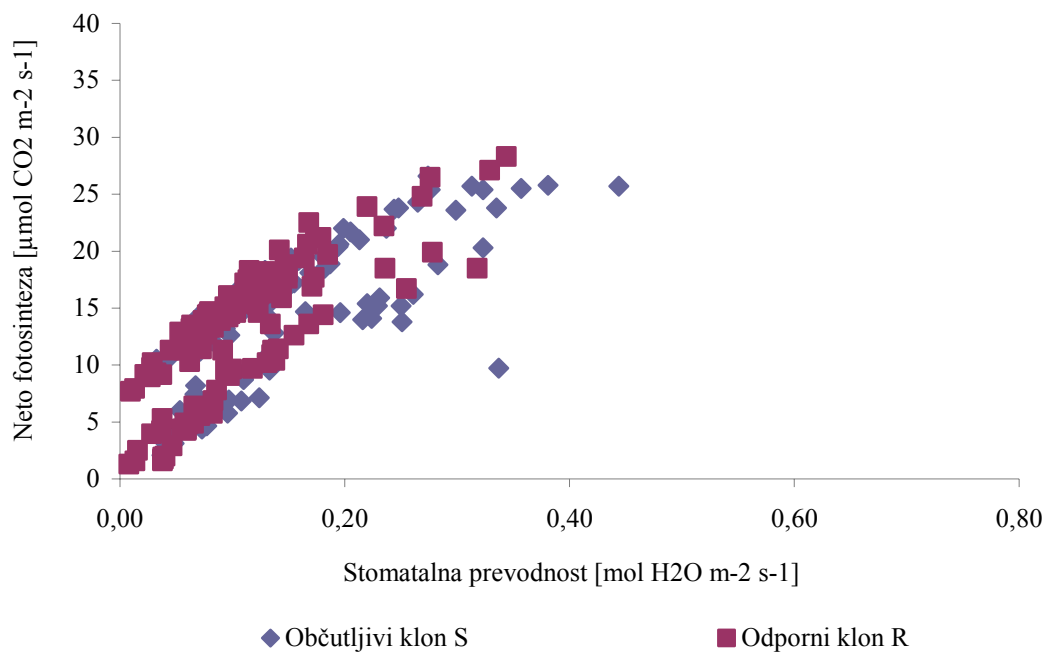
Priloga C: Vrednosti AOT40 v času izvajanja poskusov za mesto Rakičan v vegetacijski sezoni 2007.



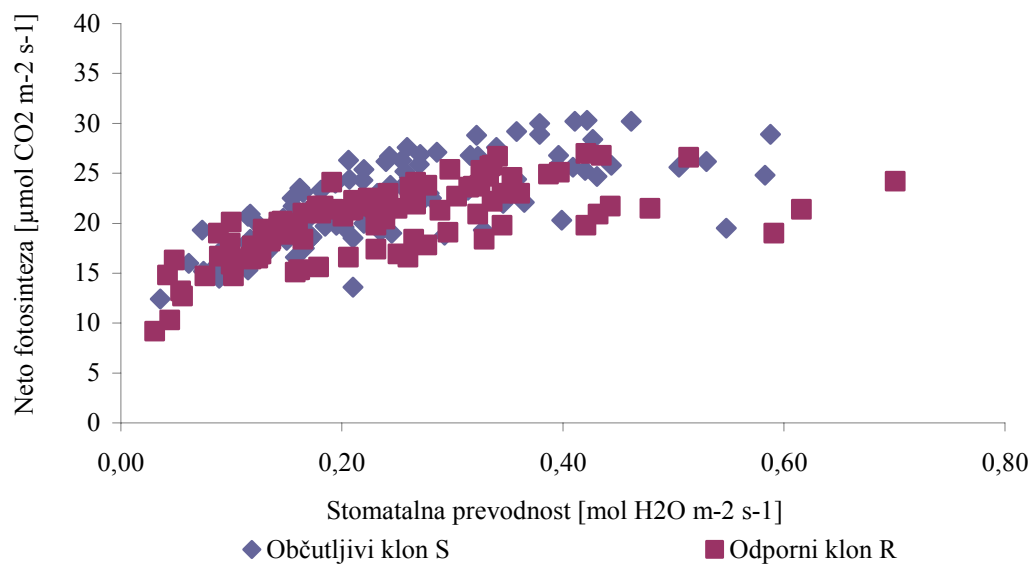
Priloga D: Neto fotosinteza v odvisnosti od stomatalne prevodnosti pri občutljivem in odpornem klonu plazeče detelje *Trifolium repens* 'Regal'. Ljubljana 20.06.2007



Priloga E: Neto fotosinteza v odvisnosti od stomatalne prevodnosti pri občutljivem in odpornem klonu plazeče detelje *Trifolium repens* 'Regal'. Ljubljana 27.07.2007



Priloga F: Neto fotosinteza v odvisnosti od stomatalne prevodnosti pri občutljivem in odpornem klonu plazeče detelje *Trifolium repens* 'Regal'. Ljubljana 13.09.2007



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Simon VEBERIČ

**VPLIV TROPOSFERSKEGA OZONA NA NASTANEK  
POŠKODB IN IZBRANE FIZIOLOŠKE PROCESSE PRI  
INDIKATORSKI RASTLINI PLAŽEČA DETELJA  
(*Trifolium repens* 'Regal') V SLOVENIJI**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008