

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
TEHNOLOOGIAINSTITUUT
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Kaspar Koolmeister

Erineva lainepikkusega valguse mõju süsihappegaasi kontsentratsiooni muutustest tingitud õhulõhede sulgumisele ja avanemisele

Bakalaureusetöö

Juhendajad Hanna Hõrak, PhD

Hannes Kollist, PhD

TARTU 2017

Infoleht

Erineva lainepikkusega valguse mõju süsihappegaasi kontsentratsiooni muutustest tingitud õhulõhede sulgumisele ja avanemisele

Õhulõhed on poorid taime lehtede ja varte pinnal, mis reguleerivad taime veevahetust. Taimede õhulõhede avanemis- ja sulgumismehhanismide mõistmine on oluline, sest soojeneva kliima, CO₂ kontsentratsiooni tõusu ja kahanevate veevarudega võib tulevikus kujuneda eluliselt tähtsaks taime veekasutuse efektiivsuse suurendamine. Seetõttu uuriti käesolevas töös valguse mõju süsihappegaasi kontsentratsiooni muutuse poolt algatatud õhulõhede reaktsioonidele. Selleks teostati gaasivahetuseksperimendid hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) kahe ökotüübi ja vääristubakaga (*Nicotiana tabacum*). Katsete tulemustest selgus, et eri lainepikkusega valgus omab mõju õhulõhede reageerimisele ja see tundub olevat liigiti varieeruv.

Taim, õhulõhe, valguse lainepikkus, süsihappegaas, gaasivahetus

CERCS: B310 Soontaimede füsioloogia

The effects of light at different wavelengths on carbon dioxide induced stomatal regulation

Stomata are pores in the surfaces of leaves and stems, which control water loss from the plant via transpiration. In the light of the ongoing climate change it is getting more prevalent to better understand the mechanisms behind plant stomatal conductance, as it will be important in the future to have more water efficient plants that can cope with harsher conditions. In order to achieve this goal, the mechanisms of stomatal regulation need to be understood. Here, stomatal reactions induced by carbon dioxide concentration changes were measured under light at different wavelengths in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum* plants, to understand the effect of light at different wavelength on stomatal conductance and reactions. Experiments were carried out with a custom-built gas exchange device. Different light had an effect on stomatal conductance and reactions and it varied by species.

Stomata, plant, carbon dioxide, gas-exchange, light

CERCS: B310 Physiology of vascular plants

Sisukord

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. ÕHULÕHED.....	6
1.2. ÕHULÕHEDE REGULATSIOON VASTUSENA MUUTUVALE SÜSIHAPPEGAASI KONTSENTRATSIOONILE.....	6
1.3. SINISE VALGUSE MÕJU ÕHULÕHEDE JUHTIVUSELE.....	8
1.3.1. Sinise valguse retseptorid.....	9
1.3.2. Sinise valguse signaaliülekanne.....	9
1.4. PUNASE VALGUSE MÕJU ÕHULÕHEDELE.....	10
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	12
2.1. TÖÖ EESMÄRGID.....	12
2.2. MATERJAL JA METOODIKA.....	12
2.2.1. Taimede kasvatamine.....	12
2.2.2. Katseaparatuur.....	13
2.2.3. Katsete läbiviimine.....	15
2.2.4. Sulgumiskatse.....	15
2.2.5. Avanemiskatse.....	15
2.2.6. Madala niiskuse katse.....	16
2.2.7. Eri lainepikkusega valgus.....	16
2.2.8. Andmeanalüüs.....	16
2.3. TULEMUSED.....	16
2.3.1. Õhulõhede reaktsioonid süsihappegaasile sinise, punase ja valge valguse käes.....	16
2.3.2. Õhulõhede reaktsioonid süsihappegaasile valges ja pimeduses.....	22
2.4. ARUTELU.....	28
2.4.1. Õhulõhede juhtivus.....	28
2.4.2. Õhulõhede sulgumine kõrge süsihappegaasi mõjul valges, punases ja sinises valguses.....	29
2.4.3. Õhulõhede sulgumine kõrge süsihappegaasi mõjul pimeduses.....	30
2.4.4. Õhulõhede sulgumine madalas niiskuses kõrge süsihappegaasi mõjul.....	30
2.4.5. Õhulõhede avanemine madala süsihappegaasi mõjul.....	31
2.4.6. Edasised uuringud.....	32
2.4.7. Järeldused.....	32
KOKKUVÕTE.....	34
RESÜMEE.....	35
TÄNUAVALDUSED.....	36
KASUTATUD KIRJANDUS.....	37
LIHTLITSENTS.....	40

Kasutatud lühendid

GORK – GATED OUTWARDLY-RECTIFYING K⁺ CHANNEL, sulgrakust K⁺ ioone välja viiv kanal

KAT1 – POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 1, *Arabidopsis thaliana* kaaliumi-kanal 1, kanal, mille kaudu K⁺ ioonid sisenevad sulgrakkudesse

KAT2 – POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 2, *Arabidopsis thaliana* kaaliumi-kanal 2, kanal, mille kaudu K⁺ ioonid sisenevad sulgrakkudesse

AKT1 – *Arabidopsis thaliana* kaaliumi transporter 1, kanal, mille kaudu K⁺ ioonid sisenevad sulgrakkudesse

CA – CARBONIC ANHYDRASE, karboonhappe anhüdraas, katalüüsib süsihappegaasist bikarbonaadi moodustumist

HT1 – HIGH LEAF TEMPERATURE 1, kinaas, mis osaleb sulgrakkude CO₂ signaaliülekanes

MPK – MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE, mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaas, MPK4 ja MPK12 osalevad CO₂ algatatud õhulõhede sulgumisreaktsioonides

SLAC1 – SLOW ANION CHANNEL 1, aeglane anioonkanal, omab keskset rolli õhulõhede sulgumises

OST1 – OPEN STOMATA 1, õhulõhede sulgumisel SLAC1 aktiveeriv kinaas

PHOT1 – PHOTOTROPIN 1, fototropiin 1, sinise valguse retseptor

PHOT2 – PHOTOTROPIN 2, fototropiin 2, sinise valguse retseptor

CRY1 – CRYPTOCHROME 1, krüptokroom 1, sinise valguse retseptor

CRY2 – CRYPTOCHROME 2, krüptokroom 2, sinise valguse retseptor

LOV – LIGHT-OXYGEN-VOLTAGE, valgust, hapnikku ja pinget tajuv domeen fototropiin valkudes

PP1 – PROTEIN PHOSPHATASE 1, fosfataas, osaleb sinise valguse põhjustatud õhulõhede avanemisreaktsioonides

PRSL1 – PP1 REGULATORY SUBUNIT2-LIKE PROTEIN 1, PP1 reguleeriv subühik, reguleerib PP1 rakusisest paiknemist

BLUS1 – BLUE LIGHT SIGNALING1, kinaas, mis osaleb sinise valguse põhjustatud õhulõhede avanemisreaktsioonides

BHP – BLUE LIGHT-DEPENDENT H⁺-ATPASE PHOSPHORYLATION, kinaas, mis osaleb sinise valguse põhjustatud õhulõhede avanemisreaktsioonides

PHYB – PHYTOCHROME B, fütokroom B, punase valguse retseptor

PHYA – PHYTOCHROME A, fütokroom A, punase valguse retseptor

DCMU – 3-(3,4-diklorofenüül)-1,1-dimetüülurea, tugev fotosünteesi inhibiitor

Sissejuhatus

Õhulõhed on väikesed muudetava suurusega poorid taimedel, mille kaudu käib gaasivahetus väliskeskkonnaga. Õhulõhe moodustavad kaks sulgrakku, mis suudavad turgorimuutusega muuta raku kuju ja sellega ka poori läbimõõtu, mis mõjutab otseselt taime pääsevat süsihappegaasi hulka ja veekadu transpiratsiooni kaudu. Õhulõhede reguleerimiseks on taimel mitmeid keerukaid signaaliradu, millest meil ei ole veel täielikku arusaama. Õhulõhede avatust mõjutavad mitmed keskkonnategurid, näiteks süsihappegaasi kontsentratsiooni langus ja suurem valgustugevus avavad õhulõhed, kõrge süsihappegaasi tase ning pimedus sulgevad õhulõhed. Sulgrakkude turgorimuutus toimub ionide transpordi tõttu läbi rakumembraani, loonide liikumised põhjustavad vee sisenemist või väljumist, mis väljendub sulgrakkude turgorimuutustes. Tänu õhulõhede avauste suuruse varieerimisele suudavad taimed kohaneda mitmete kiirete keskkonnategurite muutustega. Kliimamuutus toob kaasa püsivamad keskkonnatingimuste muutused, millega taimedel võib olla raske kohaneda. Seetõttu on kasulik mõista paremini taimede õhulõhede regulatsiooni viise ja neid mõjutavaid tegureid selleks, et tulevikus oleksime võimelised taimi vajadusel muutma nii, et nad suudaksid keskkonnatingimustega kohaneda.

Antud töö eesmärgiks oli uurida erineva lainepikkusega valguse mõju süsihappegaasist sõltuvatele õhulõhede reaktsioonidele. Uurimistöös kasutati hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) Col-0 ja *Ler* ökotüüpe ning väärstübaka (*Nicotiana tabacum*) sorti Bel-B. Taimed kasvatati tavapärares kasvutingimustes ja uuritavad tegurid rakendati alles eksperimendi käigus. Õhulõhede avatuse määramiseks kasutati gaasivahetuse mõõtmise seadet, mis võimaldas täpselt hinnata taimede gaasivahetust ümbritseva keskkonnaga ja läbi selle ka õhulõhede avatust.

Töö koostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis taimsete signaalide uurimisrühmas.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Õhulõhed

Õhulõhed on väikesed muudetava suurusega avased taimedel, mis võimaldavad gaasivahestust väliskeskkonnaga ja mõjutavad sellega taimede veekadu ja süsihappegaasi kättesaadavust fotosünteesiks. Õhulõhe moodustavad kaks sulgrakku. Õhulõhede avanemine ja sulgumine toimub sulgrakkude turgorimuutuste läbi. Turgorimuutused on põhjustatud ionide liikumisest läbi sulgrakkude membraani.

Õhulõhede avanemisel transpordib H^+ -ATPaas prootoneid sulgrakkudest välja, selle tulemusel plasmamembraan hüperpolariseerub ja kaaliumi ioonid (K^+) liiguvad raku sisse läbi kaaliumi transportivate kanalite (Daszkowska-Golec ja Szarejko, 2013). K^+ rakku transportivateks kanaliteks on KAT1 (POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 1, *Arabidopsis thaliana* kaaliumikanal 1), KAT2 (POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 2, *Arabidopsis thaliana* kaaliumikanal 2) ja AKT1 (ARABIDOPSIS THALIANA K^+ TRANSPORTER 1, *Arabidopsis thaliana* kaaliumi transporter 1). Ka happeline keskkond apoplastis soodustab K^+ -kanalite aktivatsiooni (Daszkowska-Golec ja Szarejko, 2013). Ioonide rakku liikumise tulemusel liigub sinna ka vesi ja õhulõhed avanevad.

Õhulõhede sulgumisel inhibeeritakse H^+ -ATPaas ja aktiveeritakse anioonkanalid. Keskne roll õhulõhede sulgumisel on SLAC1 (SLOW ANIONCHANNEL-ASSOCIATED 1, aeglane anioonkanal) anioonkanalil (Vahisalu et al., 2008). Anioonkanalite kaudu väljuvad rakust malaat²⁻, Cl^- ja NO_3^- (Roelfsema ja Hedrich, 2005). H^+ -ATPaasi inhibitsioon koos anioonkanalite aktivatsiooniga põhjustab membraani depolariseerumise. Selle tulemusena aktiveeritakse K^+ ioone rakust välja transportivad kanalid, näiteks GORK (GATED OUTWARDLY-RECTIFYING K^+ CHANNEL, sulgrakust K^+ ioone välja viiv kanal) (Hosy et al., 2003; Jeanguenin et al., 2008). Seejärel liigub vesi sulgrakust välja ja õhulõhed sulguvad.

1.2. Õhulõhede regulatsioon vastusena muutuvale süsihappegaasi kontsentratsioonile

Taimed muudavad oma õhulõhede avatust vastavalt süsihappegaasi sisaldusele õhus. Tavaväärtusest kõrgem süsihappegaasi kontsentratsioon algatab õhulõhede sulgumisreaktsiooni ja madalam avanemisreaktsiooni. Pärast tööstusrevolutsiooni on atmosfääri süsihappegaasi tase olnud tõusuteel (IPCC 2014 et al.). Kõrge CO_2 kontsentratsioon põhjustab õhulõhede sulgumist ja nende arvukuse vähenemist lehepinnaühiku kohta. See toob aga kaasa lehtede

ülekuumenemise vähese jahutuse tõttu ja optimaalsest väiksema saagikuse oludes kus veevarud ei ole limiteerivad (Engineer et al., 2016).

Mehhanismid, mis kontrollivad õhulõhede käitumist vastusena muutuvale CO₂ kontsentratsioonile, on alles varases uurimisjärgus. Lahustunud süsihappegaas muudetakse taimedes, bikarbonaadiks ja prootoniteks, seega võib regulatsiooni viisiks olla CO₂, bikarbonaadi või prootonite kontsentratsiooni tajumine. Teada on see, et süsihappegaasi kontsentratsiooni tõstmine 1000 ppm tasemeni ei mõjuta tsütoplasma pH taset, seega arvatakse, et õhulõhede CO₂ vastus ei tulene muutunud pH-st (Kim et al., 2010). Praegu ollakse arvamusel, et just bikarbonaat on see ühend, mille vahendusel CO₂ kutsub esile õhulõhede sulgumist (Hu et al., 2010; Xue et al., 2011).

CO₂ mõjul toimuv õhulõhede sulgumine on sõltuv kaltsiumi ionide (Ca²⁺) kontsentratsioonist sulgrakkudes. Madala Ca²⁺ ionide kontsentratsiooni (0,2 µM) korral on õhulõhede sulgumine tugevalt inhibeeritud, samas kui kontsentratsiooni tõsta 50 µM-ni, taastub õhulõhede sulgumine normaalsele tasemele (Hubbard et al., 2012).

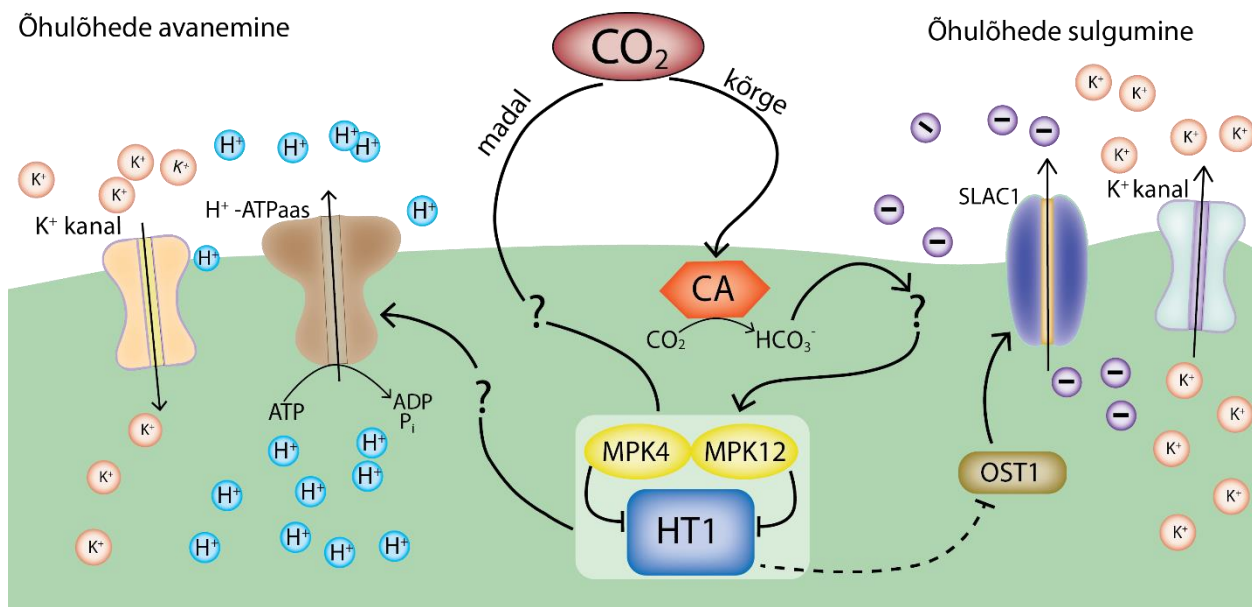
Süsihappegaasist sõltuva õhulõhede sulgumise jaoks on olulised karboonhappe anhüdraasid (CA), mis katalüüsivad CO₂-st bikarbonaadi moodustumist. Taimedes, kus võimendati CA geenide avaldumist, oli õhulõhede juhtivus oluliselt madalam kui metsiktüüpi taimedes (Hu et al., 2010). Karboonhappe anhüdraaside puudumisel olid õhulõhede reaktsioonid CO₂-le häiritud.

Õhulõhede vastuses CO₂-le on keskne roll kinaasil HT1 (HIGH LEAF TEMPERATURE 1) (Hashimoto et al., 2006). Hiljuti avastati süsihappegaasile reageerimisel oluline osa ka mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaasidel MPK12 ja MPK4, mis inhibeerivad kõrge CO₂ taseme korral HT1 kinaasi (Hõrak et al., 2016; Jakobson et al., 2016). Selle tulemusel vabaneb OST1 (OPEN STOMATA 1, õhulõhede sulgumisel SLAC1 aktiveeriv kinaas) HT1 inhibitsiooni alt ja aktiveerib SLAC1 anioonkanali, mis viib õhulõhede sulgumiseni (Vahisalu et al., 2008). Õhulõhede reaktsioone süsihappegaasile iseloomustav skeem on joonisel 1.

Õhulõhede avanemisest madala CO₂ taseme mõjul on veel väga vähe teada. Madal süsihappegaasi tase aktiveerib H⁺-ATPaase, mis tekitab membraani hüperpolariseerumise ja see omakorda algatab K⁺ ionide rakku sissevoolu, otsene seos H⁺-ATPaasi regulatsiooni ja süsihappegaasi vahel on veel uurimisel (Engineer et al., 2016). HT1 kinaas on oluline komponent ka õhulõhede avanemisel vastusena madalale CO₂ tasemele, *ht1* mutandid ei reageeri mada-

lale süsihappegaasi tasemele õhulõhede avanemisega (Hashimoto et al., 2006). Ka MPK12 ja MPK4 on selles protsessis olulised (Hõrak et al., 2016, Jakobson et al., 2016).

Õhulõhede avanemine



Joonis 1. Madala ja kõrge CO₂ kontsentratsiooni korral toimivad signaalirajad õhulõhede avanemiseks ja sulgumiseks. Madala CO₂ mõjul toimub H⁺-ATPaasi aktivatsioon, mis pumpab prootoneid rakust välja, tekitades membraani hüperpolariseerumise, see käivitab K⁺-kanali, mille kaudu liiguvad K⁺ ioonid rakku ja õhulõhed avanevad. HT1, MPK12 ja MPK4 on selleks protsessiks vajalikud, kuid pole seni selge, kuidas. Kõrge CO₂ kontsentratsiooni puhul katalüüsivad CA-d süsihappegaasist bikarbonaadi moodustumist, bikarbonaat aktiveerib seni teadmata mehhanismi kaudu MPK4 ja MPK12, mis inhibeerivad HT1 toimimist. Selle tulemusena HT1 lõpetab OST1 inhibeerimise ja viimane aktiveerib SLAC1 anioonkanali, mis viib anioone rakust välja, hiljem käivitub membraani depolarisatsiooni tõttu ka K⁺-kanal ja õhulõhed sulguvad.

1.3. Sinise valguse mõju õhulõhede juhtivusele

Sinine ja ultravioletvalgus on tugevad õhulõhede avanemist algatavad tegurid. Sinise valguse poolt reguleeritud on ka mitmed muud füsioloogilised signaalid, mis aitavad madalates valgusoludes hoida fotosünteesi võimalikult efektiivsena ja tugevates valgusoludes kaitsta taime kahjustuste eest (Briggs ja Christie, 2002). Taimedes on erinevaid sinise valguse poolt reguleeritud protsesse, näiteks fototropism ehk taime lehtede suunamine valguse poole või valgusest eemale, kloroplastide ümberkorraldamine lehes ja õhulõhede avanemine valguse toimel (Briggs ja Christie, 2002). Sinise valguse langemisel lehele tajuvad seda PHOT1 (PHOTOTROPIN 1, fototropiin 1, sinise valguse retseptor) ja PHOT2 (PHOTOTROPIN 2, fototropiin 2, sinise valguse retseptor) retseptorid, mis antud signaali tulemusena aktiveerivad H⁺-ATPaasid, see tekitab membraani hüperpolariseerumise, mis aktiveerib polarisatsioonisõltuvad K⁺-kanalid ja laseb K⁺ ioonidel rakku siseneda õhulõhede avanemiseks (Assmann et al., 1985; Briggs ja Christie, 2002). Oletatakse, et avanemine valguses on ka põhjustatud

sinise valguse komponendi tajumise kaudu PHOT1 ja PHOT2 retseptorite kaudu (Fujita et al., 2013), mis võib tähendada, et taim valget valgust otseselt ei erista, vaid kasutab õhulõhede reguleerimiseks vaid kitsast osa kogu lainepikkusest.

1.3.1. Sinise valguse retseptorid

Teadagi on neli sinise valguse retseptorit: CRY1 (CRYPTOCHROME 1, krüptokroom 1), CRY2 (CRYPTOCHROME 2, krüptokroom 2), PHOT1 ja PHOT2 (Kinoshita et al., 2001). PHOT1 valk seob flaviini kofaktorit LOV (LIGHT-OXYGEN-VOLTAGE, valgust, hapnikku ja pinget tajuv) domeeniga, mis toimib valgussensorina (Briggs ja Christie, 2002). Valguse mõjul toimub valgus aktiveerumine fosforüleerumise läbi, mis leiab aset mitmel seriini ja treoniini aminohappe jäägil. Antud reaktsioon on ATP spetsiifiline ja valk ise sisaldab ka ATP seondumissaiti (Briggs ja Huala, 1999).

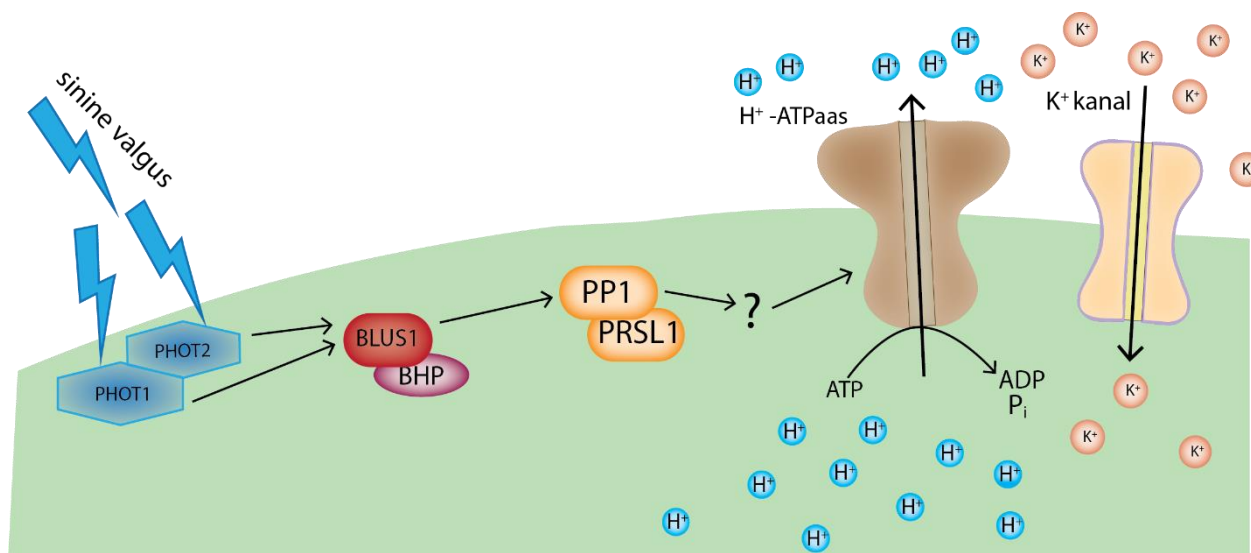
PHOT2 valk on oma funktsioonilt ja struktuurilt sarnane PHOT1 valgule, kuid ta toimib vaid kõrge valgusintensiivsuse korral (Briggs ja Christie, 2002). *PHOT1* defektiga mutante uurides avastati, et taimedel säilib tundlikkus tugeva sinise valguse korral, *phot1 phot2* topeltmutandid olid samas ka tugevale sinisele valgusele vähetundlikud (Briggs ja Christie, 2002).

Krüptokroomid tajuvad samuti sinist valgust ja reguleerivad näiteks tsirkadseid rütme, hormoonide tootmist, stressivastuseid, fotosünteesi ja ainevahetust (Chaves et al., 2011), kuid suurt rolli õhulõhede regulatsioonis vastusena sinisele valgusele pole neil seni leitud (Boccalandro et al., 2012).

1.3.2. Sinise valguse signaaliülekanne

Hiljuti on avastatud veel ka teisi lülisid sinise valguse signaaliülekanndes. PP1 (PROTEIN PHOSPHATASE 1, fosfataas, mis osaleb sinise valguse põhjustatud õhulõhede avanemisreaktsioonides) toimib sinise valguse reaktsioonides vahelülina, ta kannab PHOT1 ja PHOT2 signaali üle H⁺-ATPaasile (Shimazaki et al., 2007; Hayashi ja Kinoshita, 2011). PRSL1 (PP1 REGULATORY SUBUNIT2-LIKE PROTEIN 1, PP1 regulatoorse subühiku moodi valk) toimib PP1 regulaatorina ja mõjutab tema paiknemist rakus, kuid täpseid toimemehhanisme ei ole hetkel veel teada (Takemiya et al., 2013b). BLUS1 (BLUE LIGHT SIGNALING1), kinaas, mis osaleb sinise valguse põhjustatud õhulõhede avanemisreaktsioonides, vahendab signaali PHOT1/PHOT2 ja H⁺-ATPaasi vahel (Takemiya et al., 2013a). BHP (BLUE LIGHT-DEPENDENT H⁺-ATPASE PHOSPHORYLATION, kinaas, mis osaleb sinise valguse põhjustatud õhulõhede avanemisreaktsioonides) on oletuslikult järgmine lüli BLUS1 järel H⁺-ATPaasi aktiveerimises, kuigi ta ei interakteeru viimasega otse, seega peaks olema selles signaalirajas veel ülekanndevalke (Hayashi et

al., 2017). Mudel sinise valguse vahendatud signaaliülekanne kohta õhulõhede avanemisel on näidatud joonisel 2.



Joonis 2. Signaalirada sinise valguse algatatud õhulõhede avanemisreaktsioonis. PHOT1 ja PHOT2 tajuvad sinist valgust ja edastavad signaali BLUS1-le ja BHP-le, edasi läheb signaal PP1-le, mida reguleerib PRSL1 ning seejärel aktiveeritakse H⁺-ATPaas. See pumpab prootoneid rakust välja ja membraan hüperpolariseerub, võimaldades K⁺ ionide sissevoolu raku ja õhulõhe avaneb. Joonis koostatud Inoue ja Kinoshita (2017) põhjal.

1.4. Punase valguse mõju õhulõhedele

Õhulõhede avanemiseks punases valguses on tarvis oluliselt suuremat kiirgustaset kui sinises valguses (Sharkey ja Raschke, 1981). On näidatud, et sulgrakud ei reageeri otse punasele valgusele, vaid hoopis punase valguse poolt põhjustatud fotosünteesi käivitumisele ja sellest tulenevale CO₂ kontsentratsiooni langusele (Roelfsema et al., 2002). See avastus viitab sellele, et punase valguse ja süsihappegaasi tasemest sõltuv õhulõhede regulatsioon on omavahel seotud. Punase valguse poolt algatatud õhulõhede avanemisreaktsioon tundub olevat otseselt seotud mesofüllirakkudes toimuva fotosünteesiga, sest katseliselt on näidatud, et kui taime lehe osa töödeldi DCMU-ga (3-(3,4-diklorofenüül)-1,1-dimetüülurea, tugev fotosünteesi inhibiitor), ei toimunud peaaegu mingit avanemisreaktsiooni (Fujita et al., 2013). Õhulõhede avanemise reaktsioon punases valguses koos nõrga sinise valgusega on tunduvalt efektiivsem kui ainult punases valguses, ainult nõrga sinise valguse korral õhulõhede reaktsioon peaaegu puudub (Shimazaki et al., 2007). Järelikult mõjutab sinine valgus õhulõhesid punasest sõltumatult, kuid madalast intensiivsusest avanemise jaoks ei piisa. On teada ka see, et mõni punase valguse retseptoritest on seotud õhulõhede avanemisega punase valguse mõjul, sellised on näiteks PHYB (PHYTOCHROME B, fütokroom B, punase valguse retseptor) (Wang et al., 2010) ja PHYA (PHYTOCHROME A, fütokroom A, punase valguse retseptor)

(Eckert ja Kaldenhoff, 2000). Süsihappegaasi vastuseks oluline HT1 kinaas on vajalik ka punase valguse mõjul õhulõhede avanemiseks (Matrosova et al., 2015), mis toetab jälle seda, et õhulõhede reaktsioonid madalale süsihappegaasile ja punasele valgusele on omavahel seotud.

2. Eksperimentaalosa

2.1. Töö eesmärgid

Teadagi on see, et sinises valguses on taimedel õhulõhed tavapärasest rohkem avatud. Siiani on vähe uuritud kuidas käituvad sinises valguses olevad taimed süsihappegaasi poolt algatatud õhulõhede avanemis- ja sulgumisreaktsioonides võrreldes teistsugustes valgustingimustes olevate taimedega. Sellest ajendatult oli antud töö eesmärgiks uurida:

- kas süsihappegaasi kontsentratsiooni tõusust tingitud taimede õhulõhede sulgumisreaktsioon sõltub valguse lainepikkusest
- kas taimede õhulõhede avanemisreaktsioon vastusena süsihappegaasi kontsentratsiooni langusele sõltub valguse lainepikkusest
- kuidas mõjutab pimedus õhulõhede reaktsioone süsihappegaasi kontsentratsiooni muutustele

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Taimede kasvatamine

Eksperimendis kasutatavateks taimedeks olid harilik müürlook (*Arabidopsis thaliana*, ökotüübid Col-0 ja Ler) ja vääristubakas (*Nicotiana tabacum*, sort Bel-B). Taimede seemned külvati spetsiaalsetesse Jyrkki pottidesse (Kollist et al., 2007), mis võimaldavad taime sisestada katseaparatuuri. Hariliku müürlooga seemneid hoiti vähemalt kolm päeva enne külvamist külmkapis vee sees, mis simuleerib talveperioodi ja soodustab seemnete idanemist. Tubaka-seemned taolist eeltöötlust ei vajanud.

Jyrkki potid on plastmassist, nelinurkse kujuga ja nende peale on 45° nurga all kinnitatud klaasplaat. See võimaldab õhul kasvusubstraadile ligi pääseda. Klaasplaadi keskele on puuritud umbes 3 mm läbimõõduga koonusjas auk, mis võimaldab taimedel kasvada nii, et kogu maapealne osa on kasvusubstraadist klaasplaadiga eraldatud. Plastmassist pottide põhja on puuritud augud, mis võimaldavad kasutada altniisutusega kastmist.

Potid täideti 250 g kasvusubstraadiga, mis koosnes mahu järgi arvestatuna kahest osast turbast ja ühest osast vermikuliidist. Vett lisati segule nii palju, et see moodustaks 50% eelnevate komponentide mahust. Klaasplaat asetati potile peale nii, et kasvusubstraat ja klaasplaat puutusid omavahel kokku.

Hariliku müürlooga seemneid hoiti enne külvi vee sees ja seetõttu oli sobilik külvata neid automaatpipetiga vesisuspensioonina. Tubaka seemned külvati kuivalt. Külvamiseks pandi seemned klaasplaadi auku mullapinnale. Idanemise soodustamiseks asetati klaasplaadi augu kohale tagurpidi Petri tass, mille alla tekkis suurema õhuniiskusega keskkond. Idulehed arenesid taimedele umbes nädal pärast külvamist ja siis sai Petri tassi eemaldada. Hariliku müürlooga taimed harvendati pintsettidega 7-10 päeva pärast külvi. Tubakataimede areng oli alguses aeglasem ja need harvendati umbes kaks nädalat pärast külvamist.

Taimede kastmine toimus üks kord nädalas ja selleks kasutati altniisutuse meetodit. Kastmiseks asetati potid veega täidetud vanni ja hoiti seal nii kaua kuni poti kogumass oli umbes 340 g.

Taimed saavutasid sobiva suuruse katsete läbiviimiseks umbes 24 päevaga.

2.2.2. Katseaparatuur

Katseseade on välja arendatud ja valmistatud konkreetsetes töögruppis. See koosneb mõõtekambritest, CO₂ ja H₂O analüsaatorist, valgustitest, pumpadest, termostaatidest, arvutist, gaasiballoonidest (CO₂, N₂) ja KOH kolonnist. Antud katseseade on edasi arendatud variant varasemast seadmest (joonis 3 Kollist et al., 2007).

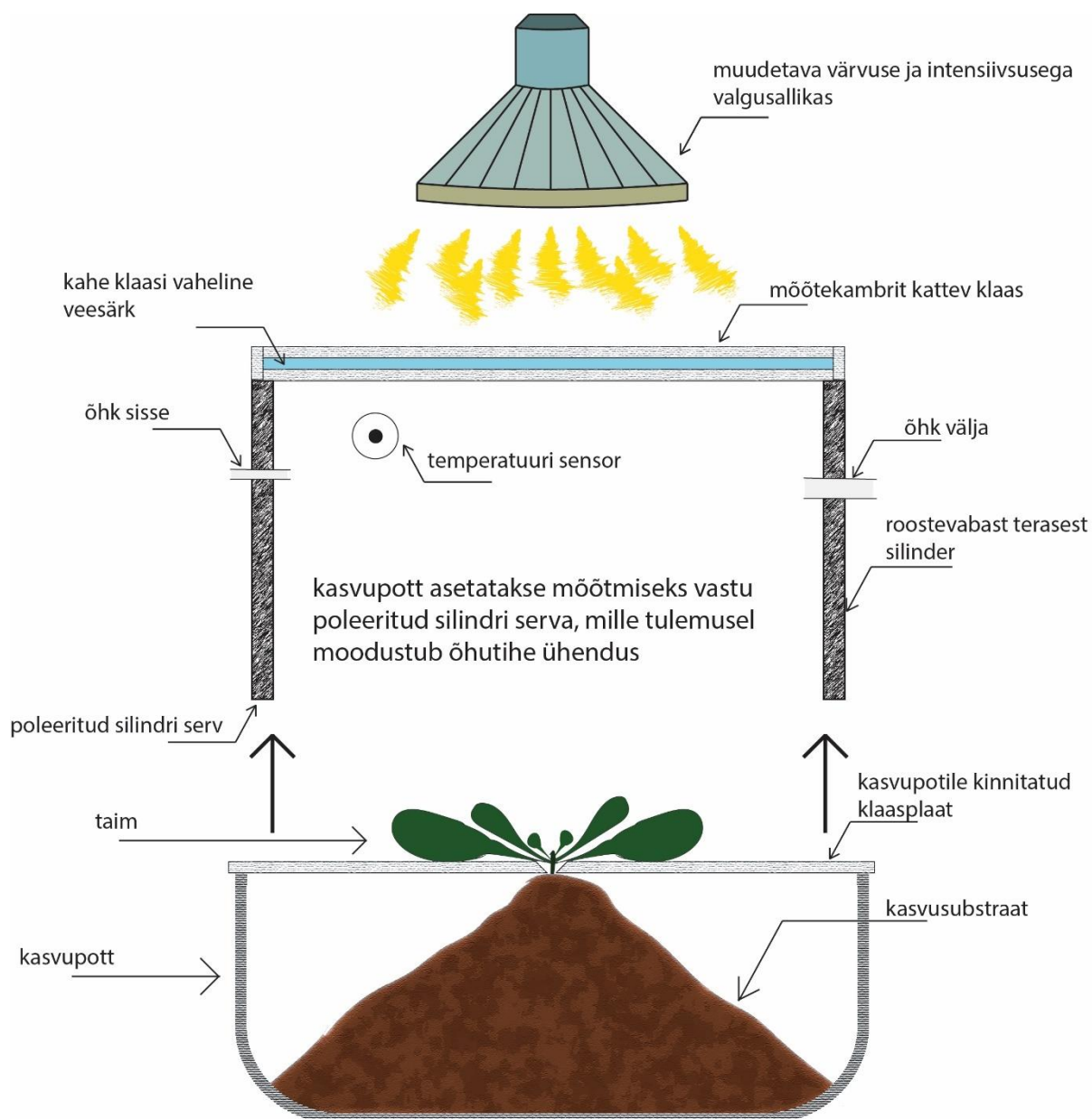
Taimede gaasivahetuse analüüsimiseks mõõdetakse kambrisse siseneva ja kambriest väljuva õhu CO₂ ja H₂O kontsentratsiooni. Nende näitude muutuste järgi arvutatakse õhulõhede juhtivus. Selline lahendus võimaldab mõõta terve taime gaasivahetust ilma taime oluliselt häirimata.

KOH kolonn on kasutusel õhu CO₂ sisalduse vähendamiseks. KOH kolonn ühendatakse sisetulevale välisõhuliinile ja kogu süsteemi CO₂ tase langeb. Seejärel saab CO₂ balloonist lisada igasse kambrisse teistest sõltumatult süsihappegaasi, et saavutada soovitud CO₂ kontsentratsioon.

Valgustitena on kasutusel muudetava intensiivsusega LED valgustid valges, punases ja sinises toonis.

Mõõtekambreid on kaheksa tükki ja need on roostevabast terasest silindrid. Silindri pealmine osa koosneb kahest klaasplaadist, mille vahel on vesisärk, mis ringleb läbi termostaadi ja on kindla temperatuuriga, võimaldades kontrollida mõõtekambri temperatuuri. Mõõtekambris asub ka temperatuuri sensor.

Õhk siseneb kambrisse väikese avause kaudu ja väljub teisest avausest. Süsteemi tekitatakse rõhk 41 mmHg, mis tagab õhu ühtlase liikumise ja segunemise. Edasi liigub kambrist väljunud õhk CO₂/H₂O analüsaatorisse (Li-cor Li-7000 CO₂/H₂O analyzer), mille näit saadetakse arvutisse, kus on spetsiaalselt antud seadme jaoks programmeeritud tarkvara. See tarkvara arvutab katsest mõõdetud andmete põhjal õhulõhede juhtivuse. Esmalt mõõdetakse gaaside sisaldus kambrisse sisenevas ja siis kambrist väljuvas õhus. Kokku kulub ühe kambri mõõtmiseks üks minut (30 sek kambrisse sisenev ja 30 sek kambrist väljuv õhk). Enamasti mõõdeti neli kambrit korraga, nii saadi üks ajapunkt ühe kambri kohta iga nelja minuti järel. Ülejäänud neljas kambri stabiliseerusid taimed järgmiseks katseks.



Joonis 3. Katseseadme gaasivahetuskamber.

2.2.3. Katsete läbiviimine

Esmalt oli vajalik elimineerida kasvusubstraadist toimuv gaaside eraldumine kambris. Selle jaoks kaeti taime varre ja klaasplaadi vaheline ala taimedele ohutu vahaga (100 g vaseliini, 5 g mesilasvaha, 5 g parafiini). See protseduur teostati vähemalt üks päev enne eksperimenti, sest samal päeval vahatamine võib taimedele põhjustada stressi ja mõjutada tulemusi. Enne taimede mõõtekambrisse panemist pildistati (Sony RX-100) taimi koos millimeeterpaberiga. Arvutis määrati piltide järgi taimede pindalad rakendusega ImageJ (Schneider et al., 2012).

Pärast taimede kambrisse asetamist tuli lasta neil kohaneda uute tingimustega, seega oodati, kuni õhulõhede juhtivus saavutas stabiilse taseme, selleks kulus tavaliselt 30-60 minutit, tubakataimede korral kauem. Kui taimed olid stabiliseerunud, mõõdeti õhulõhede juhtivust neli ajapunkti taime kohta, enne kui keskkonnatingimuse muutus tekitati. Muudetavaks tingimuseks oli CO₂ kontsentratsioon, nii langetamine kui tõstmine algväärtuselt 400 ppm. Õhulõhede avanemiskatse korral toimus CO₂ kontsentratsiooni langetamine 400 ppm-ilt 100 ppm-ile ja sulgumiskatsel tõstmine 400 ppm-ilt 800 ppm-ile. CO₂ taseme muutuse mõju õhulõhede juhtivusele mõõdeti valguses, sinises ja punases valguses ning ka pimeduses. Lisaks uuriti õhulõhede sulgumist kõrge CO₂ kontsentratsiooni mõjul madalas õhuniiskuses.

2.2.4. Sulgumiskatse

Sulgumiskatsel lasti taimedel kambrites kõigepealt kohaneda ja õhulõhede juhtivusel stabiliseeruda. Seejärel mõõdeti neli ajapunkti ja pärast seda muudeti süsihappegaasi kontsentratsiooni kambrisse sisenevas õhus. Katse jaoks kasutatav õhk võeti väliskeskkonnast, mille süsihappegaasi kontsentratsioon on sellel katsel n-ö nullpunktiks, CO₂ kontsentratsioon välisõhus on umbes 400 ppm. Pärast nelja stabiilse ajapunkti registreerimist suurendati kambrisse siseneva õhu CO₂ kontsentratsiooni väärtuseni 800 ppm. Selleks kasutati gaasiballoonis olevat süsihappegaasi.

2.2.5. Avanemiskatse

Selles katses juhiti välisõhk enne kambrisse sisenemist läbi KOH kolonni, mis vähendas süsihappegaasi hulka õhus oluliselt. Katse alguseks reguleeriti CO₂ gaasiballooni kasutades kambrisse siseneva õhu CO₂ kontsentratsioon 400 ppm-ile. Taimedel lasti jällegi kohaneda ja enne tingimuste muutmist mõõdeti neli stabiilset ajapunkti. Pärast seda vähendati CO₂ kontsentratsioon 100 ppm tasemele.

2.2.6. Madala niiskuse katse

Katse jaoks vajalik madal õhuniiskus tekitati õhu jahutamise kaudu. Selleks juhiti õhk läbi spiraalse vasktoru, mis asus vahtplastiga vooderdatud silindris. Katse jaoks täideti silinder jääga, mis jahutas vasktoru, ja tänu sellele jahtus ka läbi toru liikuv õhk ja õhus sisalduv niiskus vähenes. Taimedel lasti madala õhuniiskusega kambrites stabiliseeruda ja mõõdeti neli ajapunkti. Pärast seda suurendati CO₂ kontsentratsiooni 400 ppm-ilt 800 ppm-ile.

2.2.7. Eri lainepikkusega valgus

Katsetes kasutatud erinevat värvi valgus tekitati eri lainepikkusega LED-lampidega. Katsetes kasutati valget, punast või sinist värvi valgust ning ka pimedust. Kõikidel lampidel reguleeriti intensiivsus katse jaoks 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Pimeduskatsetes kasutati taimede valguse eest varjamiseks raamatuid, mis asetati mõõtekambrite peale, nii et need kataksid täielikult klaasist osa taimede kohal.

2.2.8. Andmeanalüüs

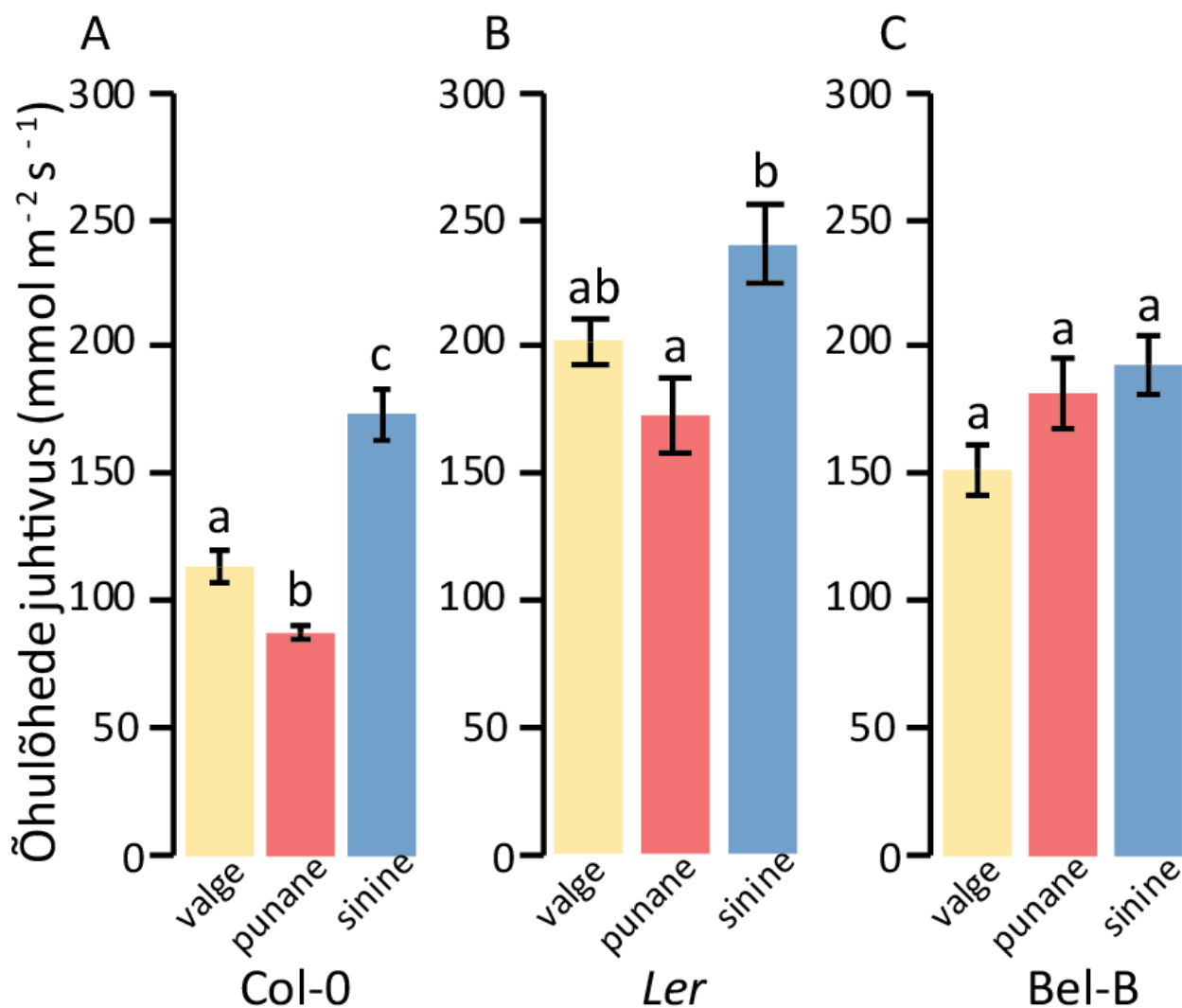
Katsetest saadud õhulõhede juhtivused keskmistati. Arvutati õhulõhede sulgumiskiirus ühes minutis [(juhtivus ajahetkel 0 – juhtivus ajahetkel 13)/13 minutiga] ja poolestusaeg (õhulõhede reaktsiooni poolestusaegade arvutamiseks viidi kogu 60-minutilise katse jooksul toimunud õhulõhede vastus 0-100% skaalale, poolestusaja leidmiseks arvutati aeg mil saavutati 50%-line sulgumine). Statistiliseks analüüsiks kasutati rakendust Statistica (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Meetoditena kasutati Studenti t-testi või ühefaktorilist ANOVAt koos Tukey *post-hoc* testiga, mis oli kohandatud ebavõrdse valimi suuruse jaoks.

2.3. Tulemused

2.3.1. Õhulõhede reaktsioonid süsihappegaasile sinise, punase ja valge valguse käes

2.3.1.1. Õhulõhede juhtivused sinise, punase ja valge valguse käes

Katses määrati taimede õhulõhede juhtivused eri lainepikkusega valguse ja 400 ppm CO₂ kontsentratsiooni tingimustes. Hariliku müürlooga ökotüübil Col-0 ilmnes, et kõige kõrgem juhtivus oli sinises valguses ja kõige madalam punases (joonis 4A). Juhtivused valges, punases ja sinises valguses olid kõik üksteisest statistiliselt erinevad. Hariliku müürlooga ökotüübil Ler oli kõige kõrgem õhulõhede juhtivus sinises valguses ja kõige madalam punases (joonis 4B). Juhtivused sinises ja punases valguses olid üksteisest statistiliselt oluliselt erinevad, samas kui juhtivus valges valguses ei erinenud statistiliselt oluliselt ei sinise ega punase valgusega saavutatud juhtivustest. Tubakataimedel ei erinenud õhulõhede juhtivus eri valguses oluliselt (joonis 4C).



Joonis 4. Kujutatud on uuritavate taimeliinide [Col-0 (A), Ler (B), Bel-B (C)] õhulõhede juhtivused ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) valges, punases ja sinises valguses vahetult enne CO_2 kontsentratsiooni tõstmist. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud \pm standarddviiga. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja *post-hoc* testiks kasutati Tukey testi. Üksteisest statistiliselt erinevad grupid on tähistatud tähtedega (a, b, c). Valimi suurus: Col-0 n = 12, Ler n = 11, Bel-B n = 9.

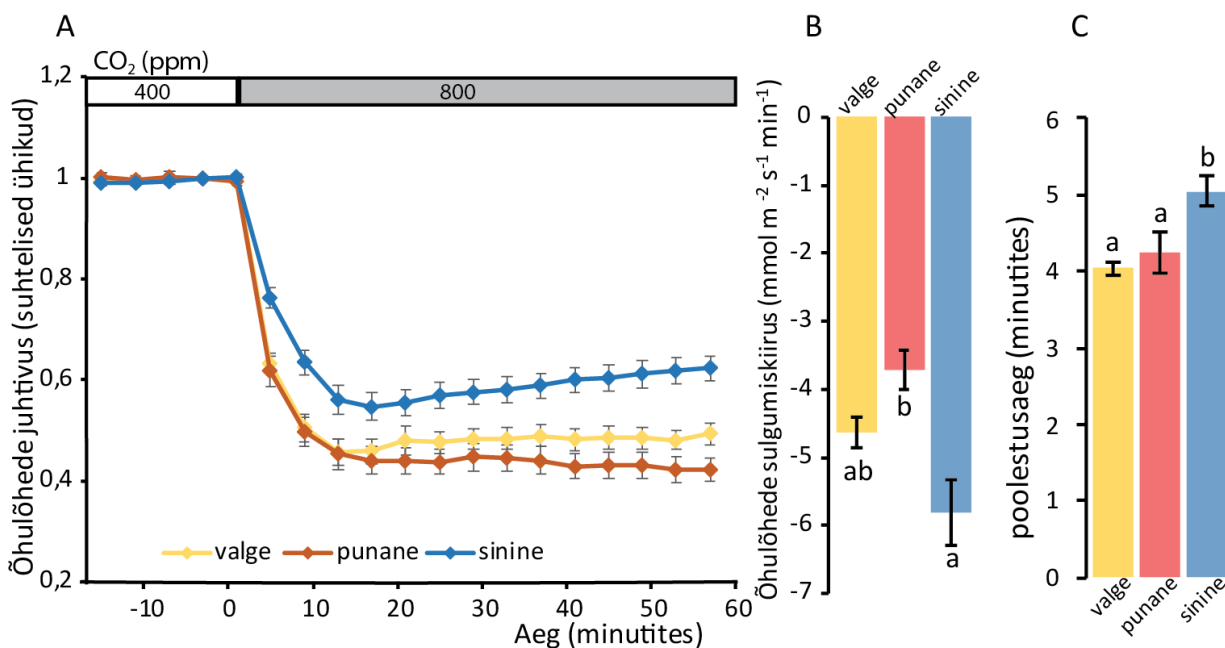
2.3.1.2. Õhulõhede reaktsioon kõrgele süsihappegaasile sinise, punase ja valge valguse käes

Taimede reaktsioon süsihappegaasi kontsentratsiooni tõusule väljendus õhulõhede sulgumise läbi.

a) harilik müürlook, ökotüüp Col-0

Müürlooga Col-0 ökotüübi reaktsioonidest kõrgele süsihappegaasi kontsentratsioonile on näha, et suhtelistes ühikutes mõõdetuna sulgusid õhulõhed sinises valguses vähemal määral võrreldes valge ja punase valgusega (joonis 5A). Samas sulgumiskiirusest on näha, et sinises valguses toimus sulgumine kiiremini kui punases, kuid sulgumiskiirus valges valguses ei erinenud statistiliselt oluliselt sulgumiskiirusest sinises ega punases valguses (joonis 5B). Pooletusaeg oli sinises valguses kõige pikem (joonis 5C) ja statistiliselt oluliselt erinev nii puna-

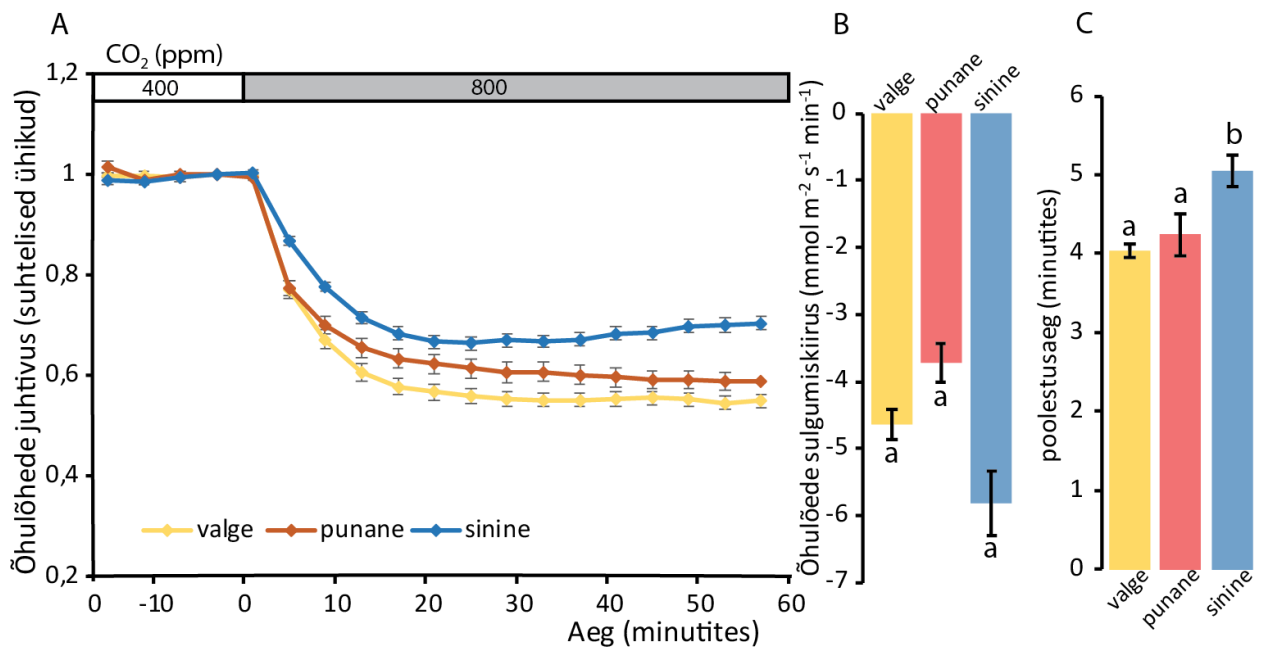
ses kui ka valges valguses saadud tulemustest. Valges ja punases valguses saadud tulemused üksteisest statistiliselt oluliselt ei erinevad.



Joonis 5. (A) Col-0 õhulõhede juhtivus suhtelises ühikutes kõrge CO₂ kontsentratsiooni korral. (B) Col-0 õhulõhede sulgumiskiirus ja (C) poolestusaeg kõrge CO₂ taseme juures. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud ± standardviga. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja *post-hoc* testiks kasutati Tukey testi. Üksteisest statistiliselt erinevad grupid on tähistatud tähtedega (a, b). Valimi suurus n = 12.

b) harilik müürlook, ökotüüp *Ler*

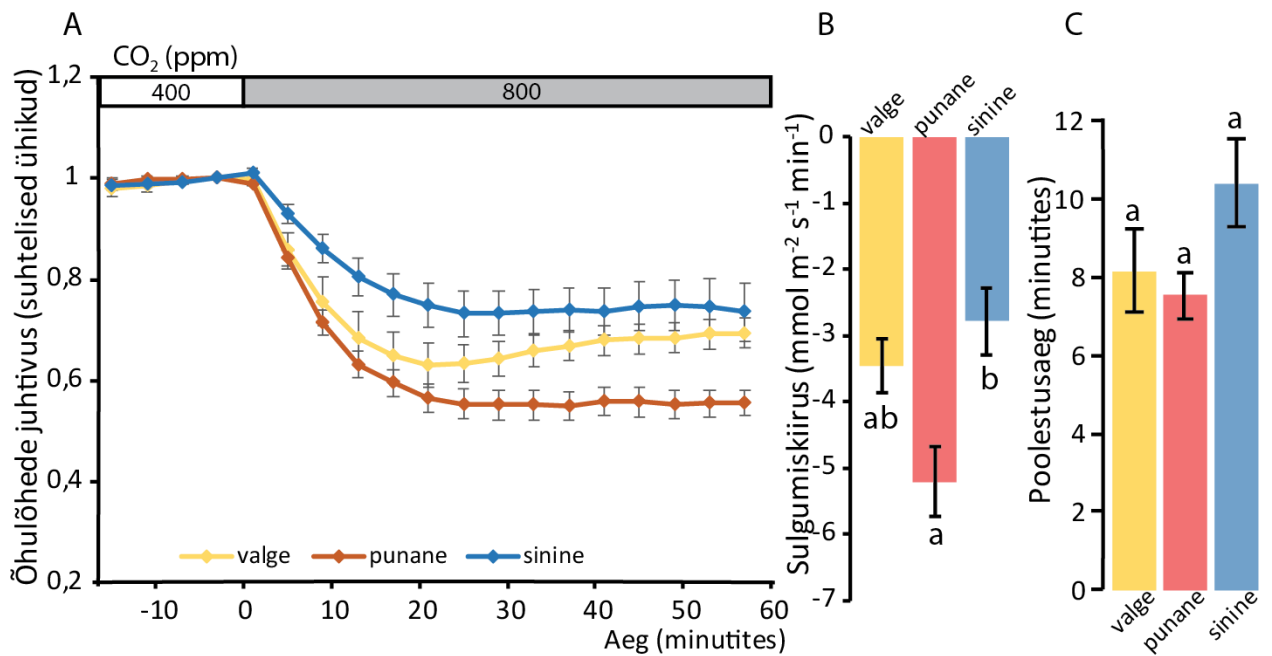
Kõrge süsihappegaasi kontsentratsiooni katsetest selgus, et suhtelises ühikutes mõõdetuna sulgusid õhulõhed sinises valguses vähemal määral võrreldes valge ja punase valgusega (joonis 6A). Sulgumiskiirused ei erinevad üksteisest statistiliselt oluliselt üheski valguses (joonis 6B). Sulgumisreaktsiooni poolestusaeg oli ökotüübil *Ler* pikim sinises valguses (joonis 6C). Sinises valguses saadud tulemused erinesid statistiliselt oluliselt punases ja valges valguses saadud tulemustest.



Joonis 6. (A) *Ler* õhulõhede juhtivus suhtelistes ühikutes kõrge CO₂ kontsentratsiooni korral. (B) *Ler* õhulõhede sulgumiskiirus ja (C) poolestusaeg kõrge CO₂ taseme juures. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud ± standardviga. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja *post-hoc* testiks kasutati Tukey testi. Üksteisest statistiliselt erinevad grupid on tähistatud tähtedega (a, b). Valimi suurus n = 11.

c) väärstubakas Bel-B

Väärstubakaga tehtud katsetest kõrgel süsihappegaasi kontsentratsioonil on näha, et sinises valguses sulgusid õhulõhed suhtelistes ühikutes kõige vähem (joonis 7A). Õhulõhede sulgumiskiirus oli suurim punases valguses. Punases ja sinise valguses saadud tulemused olid üksteisest statistiliselt oluliselt erinevad (joonis 7B), valge valguse tulemused ei erinenud ei punase ega sinise valguse tulemustest. Poolestusaegades ei leitud statistiliselt olulisi erinevusi erinevate valgustingimuste vahel (joonis 7C).



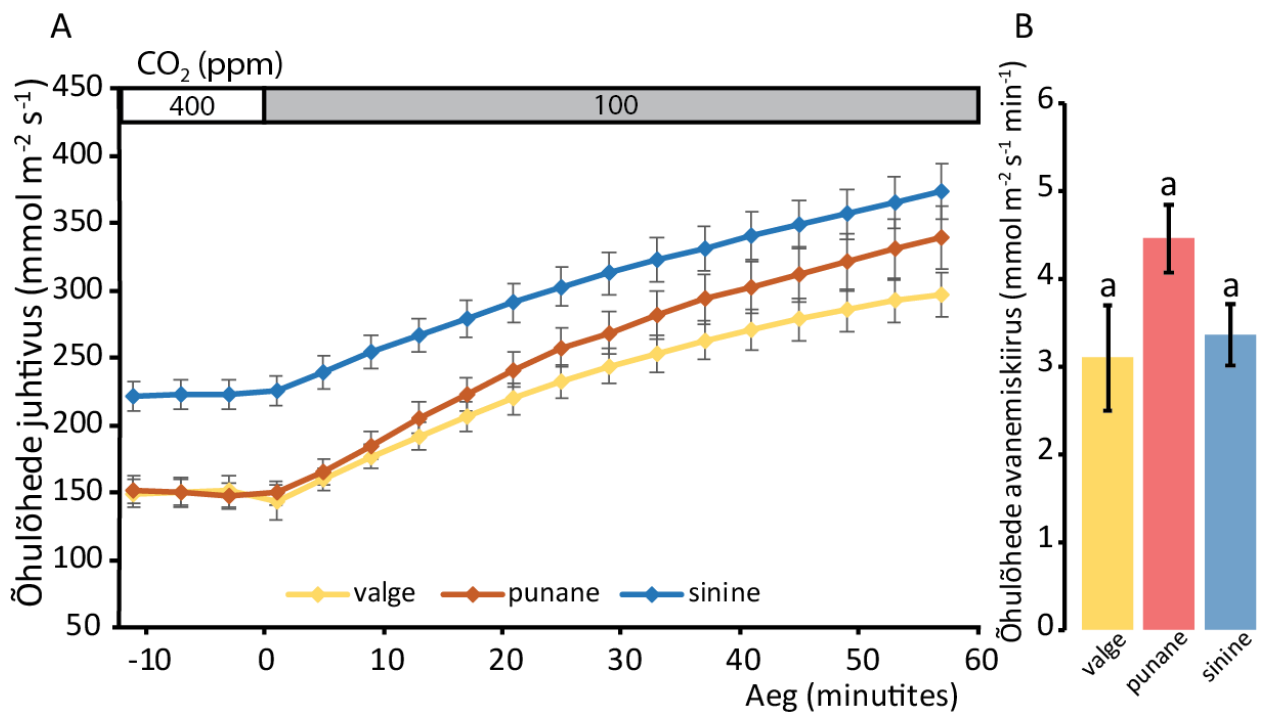
Joonis 7. (A) Tubaka Bel-B õhulõhede juhtivus suhtelistes ühikutes kõrge CO₂ kontsentratsiooni korral. (B) Bel-B õhulõhede sulgumiskiirus ja (C) poolestusaeg kõrge CO₂ taseme juures. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud ± standardviga. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja *post-hoc* testiks kasutati Tukey testi. Üksteisest statistiliselt erinevad grupid on tähistatud tähtedega (a, b). Valimi suurus n = 9.

2.3.1.3. Reaktsioonid madalale CO₂-le sinise, punase ja valge valguse käes

Taimede reaktsioon süsihappegaasi kontsentratsiooni langusele väljendus õhulõhede avanemise läbi.

a) harilik müürlook, ökotüüp Col-0

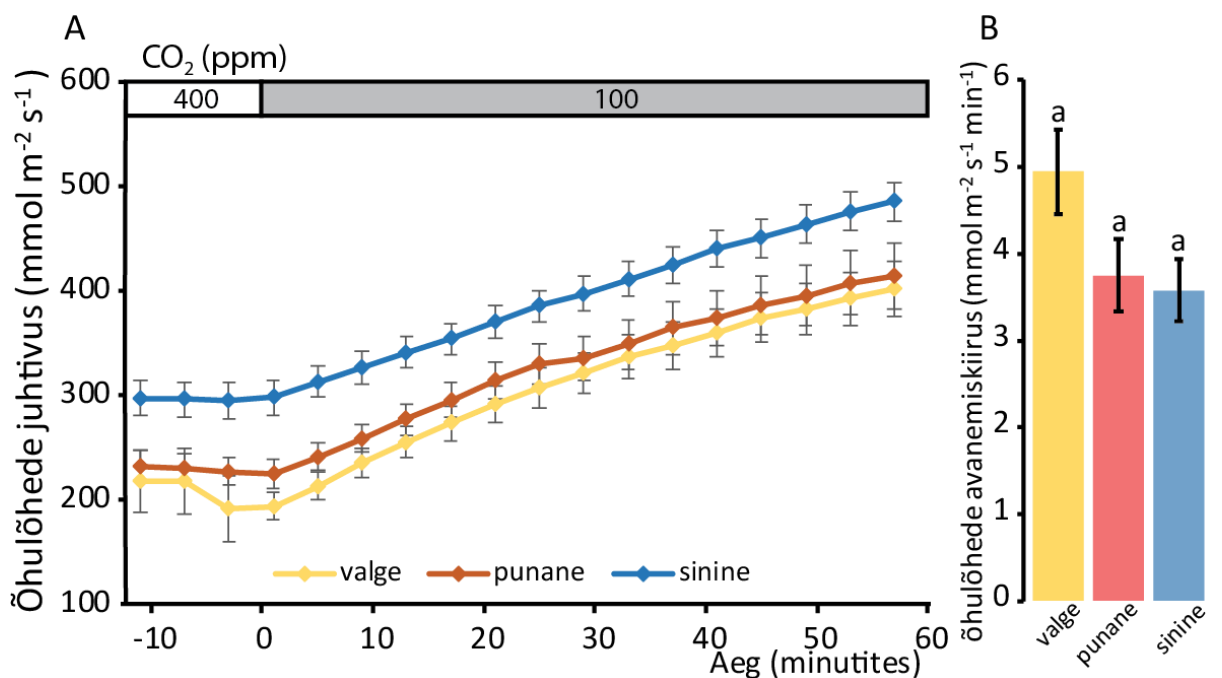
Antud katses oli hariliku müürlooga ökotüübil Col-0 kõige kõrgem õhulõhede juhtivus sinises valguses (joonis 8A). Punases ja valges valguses olid õhulõhede juhtivused enne tingimuste muutmist samaväärsed, kuid pärast CO₂ kontsentratsiooni langetamist oli tendents punases valguses olevate taimede õhulõhedel rohkem avaneda. Statistiliselt olulisi erinevusi avanemiskiiruste vahel eri valgustes ei täheldatud (joonis 8B).



Joonis 8. (A) Col-0 õhulõhede juhtivus (mmol m⁻² s⁻¹) ja (B) õhulõhede avanemiskiirus ühes minutis madala süsihappegaasi katsetes. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud ± standardviga. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja *post-hoc* testiks kasutati Tukey testi. Valimi suurus n = 12.

b) harilik müürlook, ökotüüp *Ler*

Ka selles katses oli õhulõhede juhtivus kõige kõrgem sinises valguses kasvavatel taimedel (joonis 9A). Valges ja punases valguses ei olnud õhulõhede juhtivusel olulist vahet. Statistiliselt olulisi erinevusi õhulõhede avanemiskiiruste vahel ei esinenud (joonis 9B).

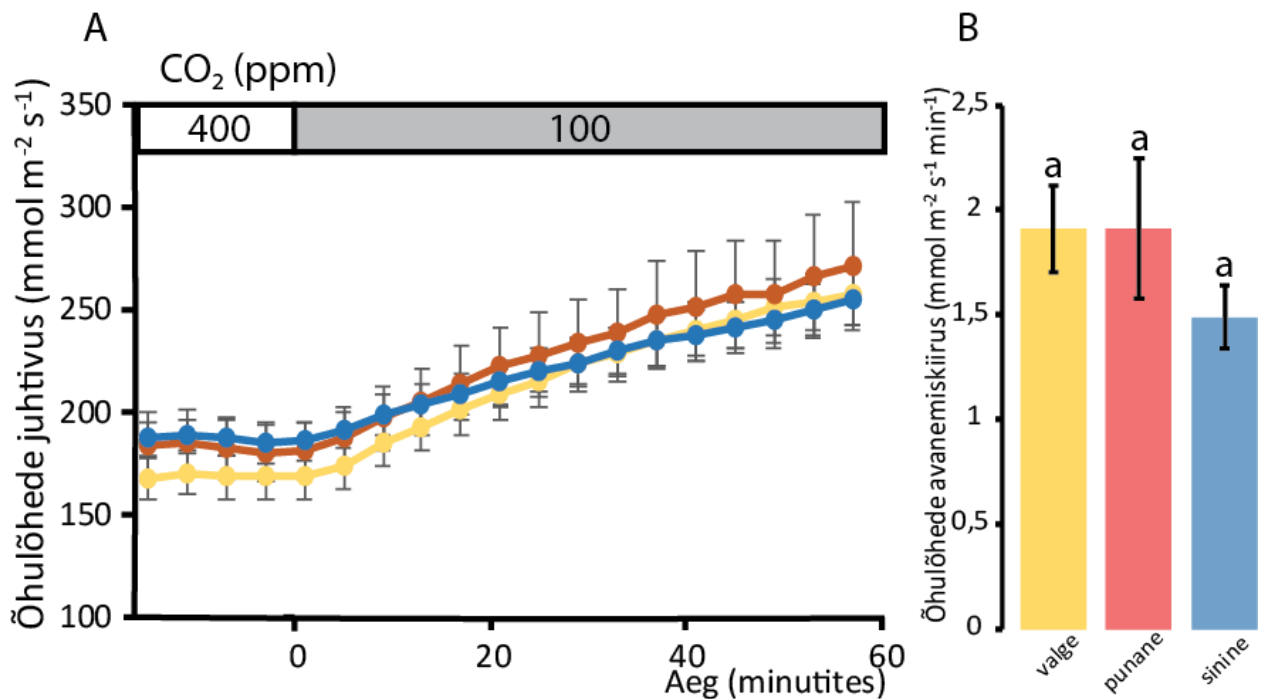


Joonis 9. *Ler* õhulõhede juhtivus (mmol m⁻² s⁻¹) ja õhulõhede avanemiskiirus ühes minutis madala süsihap-

pegaasi katsetel. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud \pm standarddviiga. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja *post-hoc* testiks kasutati Tukey testi. Valimi suurus $n = 11$.

c) väärstubakas Bel-B

Madala CO₂ kontsentratsiooni juures tubakalõhulõhede juhtivuses olulisi erinevusi eri valgustüüpide vahel ei olnud (joonis 10A). Statistiliselt olulist erinevust antud katses õhulõhede avanemiskiiruste vahel ei tuvastatud (joonis 10B).



Joonis 10. (A) Bel-B õhulõhede juhtivus ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ja (B) õhulõhede avanemiskiirus ühes minutis madala süsihappegaasi katsetes. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud \pm standarddviiga. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja *post-hoc* testiks kasutati Tukey testi. Valimi suurus $n = 9$.

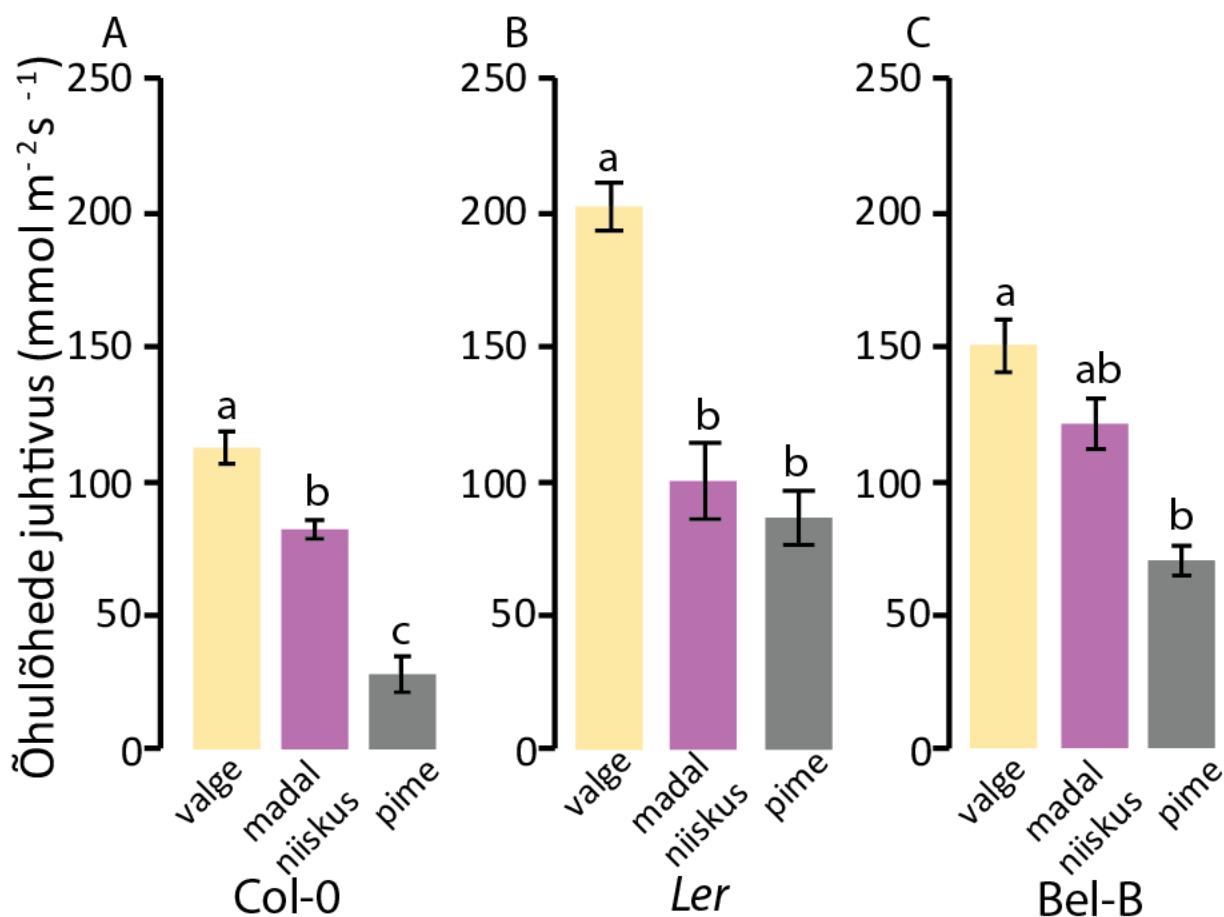
2.3.2. Õhulõhede reaktsioonid süsihappegaasile valgus ja pimeduses

Antud katsete eesmärk oli uurida, kas õhulõhede reaktsioonid süsihappegaasile valgus ja pimeduses on erinevad. Kuna pimedus põhjustab madalamat õhulõhede juhtivust, kasutati sulgumiskatsetes kontrollina katseid madala niiskusega, mis põhjustab samuti õhulõhede juhtivuse vähenemist. See võimaldas uurida, kas võimalikud muutused õhulõhede reaktsioonides kõrgele CO₂-le olid tingitud õhulõhede juhtivuse ja sellest tuleneva reageerimispotentsiaali üldisest vähenemisest või spetsiifiliselt just pimedusest.

2.3.2.1. Õhulõhede juhtivused pimedas, valge valguse käes ja madalas niiskuses

Antud tulemused iseloomustavad erinevate taimeliinide õhulõhede juhtivusi eri tingimustes, valgus valguses, madalas niiskuses ja pimeduses. Hariliku müürlooga ökotüüp Col-0 taimedel oli kõige kõrgem õhulõhede juhtivus valgus valguses ja madalaim pimeduses (joonis 11A), madalas niiskuses saadud tulemused jäid nende kahe vahele. Ler ökotüübil oli õhulõhedel

kõrgeim juhtivus valges valguses, madalas niiskuses ja pimeduses saadud tulemused ei erinevad üksteisest oluliselt (joonis 11B). Tubakataimede puhul oli õhulõhede juhtivus valges valguses kõrgem kui pimeduses (joonis 11C), madalas niiskuses saadud tulemused ei erinevad oluliselt kummastki eelnevast.

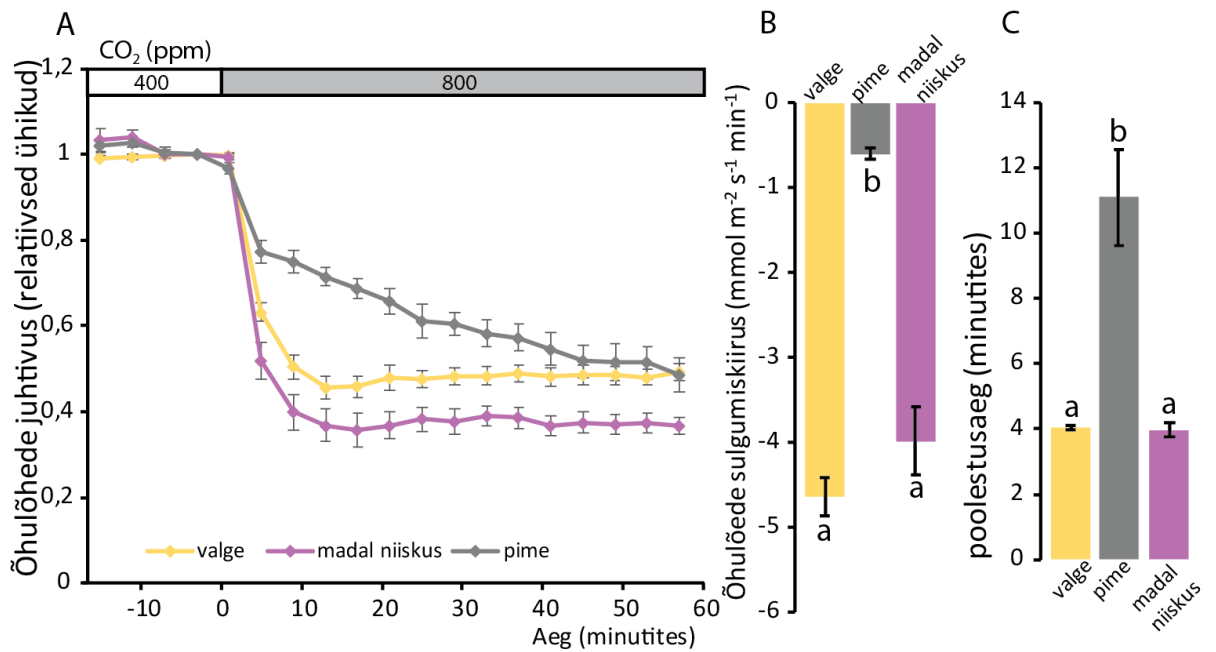


Joonis 11. Eri taimeliinide õhulõhede juhtivused ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) eri tingimustes (valge valgus, madal õhuniiskus, pimedus). Väärtused on mõõdetud vahetult enne CO_2 kontsentratsiooni tõstmist. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud \pm standardviga. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja *post-hoc* testiks kasutati Tukey testi. Üksteisest statistiliselt oluliselt erinevad grupid on tähistatud tähtedega (a, b, c). Valimi suurus: Col-0 n = 9-12, Ler n = 11-12, Bel-B n = 7-9.

2.3.2.2. Reaktsioonid kõrgele CO_2 -le pimeduses, valge valguse käes ja madalas niiskuses

a) harilik müürlook, ökotüüp Col-0

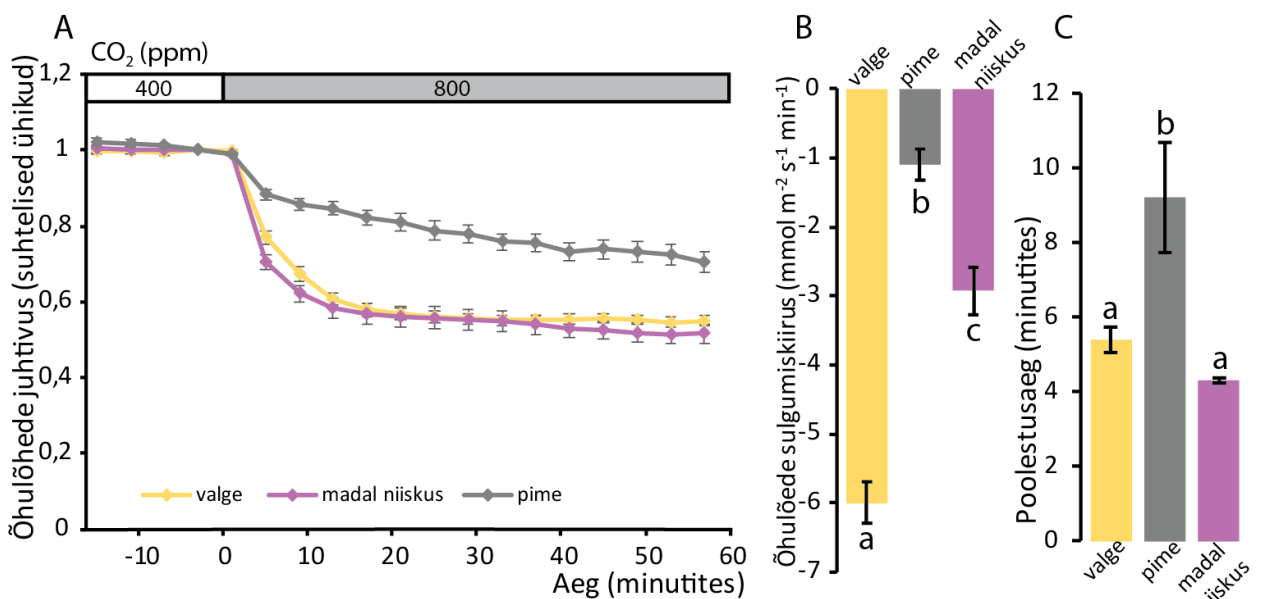
Õhulõhede sulgumine suhtelistes ühikutes oli väikseim pimedas ja suurim madala niiskusega tingimustes (joonis 12A). Sulgumiskiirus oli pimeduses oluliselt madalam kui valges valguses ja madalas niiskuses (joonis 12B). Poolestusaeg oli pimeduses oluliselt pikem kui madalas niiskuses ja valges valguses (joonis 12C).



Joonis 12. (A) Col-0 õhulõhede juhtivus suhtelistes ühikutes (B) õhulõhede sulgumiskiirus ja (C) poolestusaeg kõrge CO₂ kontsentratsiooni korral erinevates tingimustes. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud ± standardviga. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja *post-hoc* testiks kasutati Tukey testi. Üksteisest statistiliselt erinevad grupid on tähistatud tähtedega (a, b). Valimi suurus n = 9-12.

b) harilik müürlook, ökotüüp *Ler*

Suhtelistes ühikutes saadud tulemustest selgus, et *Ler* ökotüübil oli pimeduses kõige väiksem õhulõhede sulgumine (joonis 13A). Õhulõhede sulgumiskiirustest oli kiireim sulgumine valges valguses ja aeglasim pimeduses (joonis 13B), madala niiskuse tulemus jäi nende kahe vahele. Poolestusaeg oli pimeduses pikim ja erines statistiliselt oluliselt valges ja madalas niiskuses saadud tulemustest (joonis 13C).

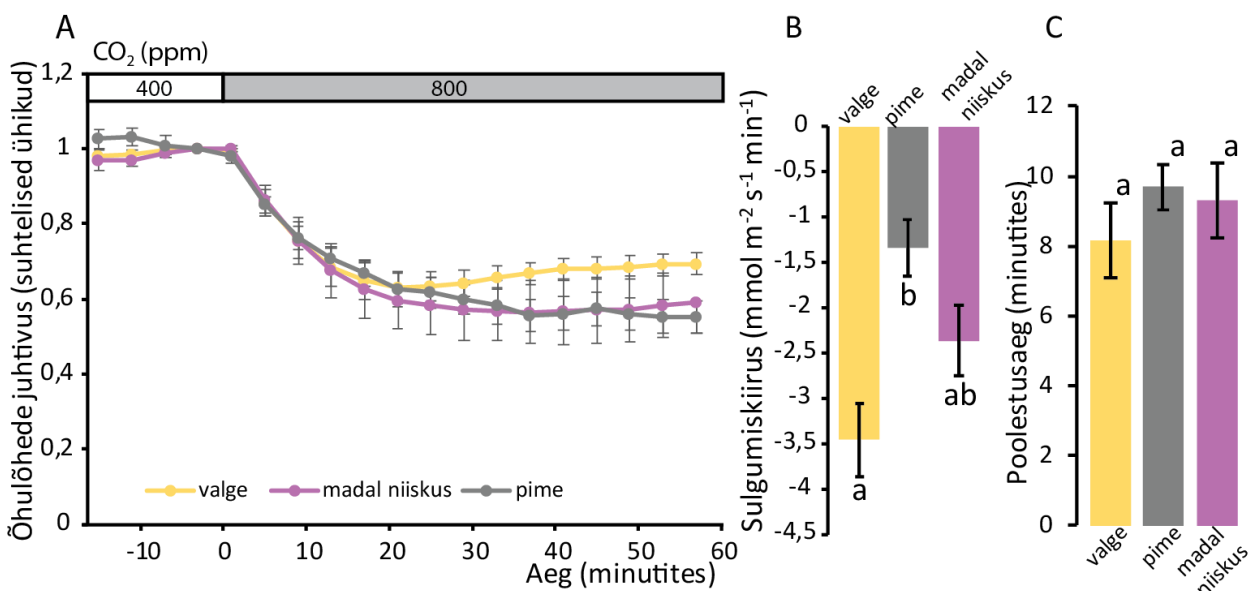


Joonis 13. (A) *Ler* õhulõhede juhtivus suhtelistes ühikutes (B) õhulõhede sulgumiskiirus ja (C) poolestusaeg kõrge CO₂ kontsentratsiooni korral erinevates tingimustes. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud ± stan-

dardviga. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja *post-hoc* testiks kasutati Tukey testi. Üksteisest statistiliselt erinevad grupid on tähistatud tähtedega (a, b, c). Valimi suurus $n = 11-12$

c) väärstubakas Bel-B

Antud katses ei ilmnenud õhulõhede juhtivuses suhtelistes ühikutes olulisi erinevusi (joonis 14A). Õhulõhede sulgumiskiirus oli suurim valges valguses (joonis 14B) ja statistiliselt oluliselt erinev sulgumisest pimeduses. Sulgumiskiirus madalas niiskuses ei erinenud statistiliselt oluliselt teistest tingimustest. Ka poolestusajad ei erinenud üksteisest oluliselt (joonis 14C).



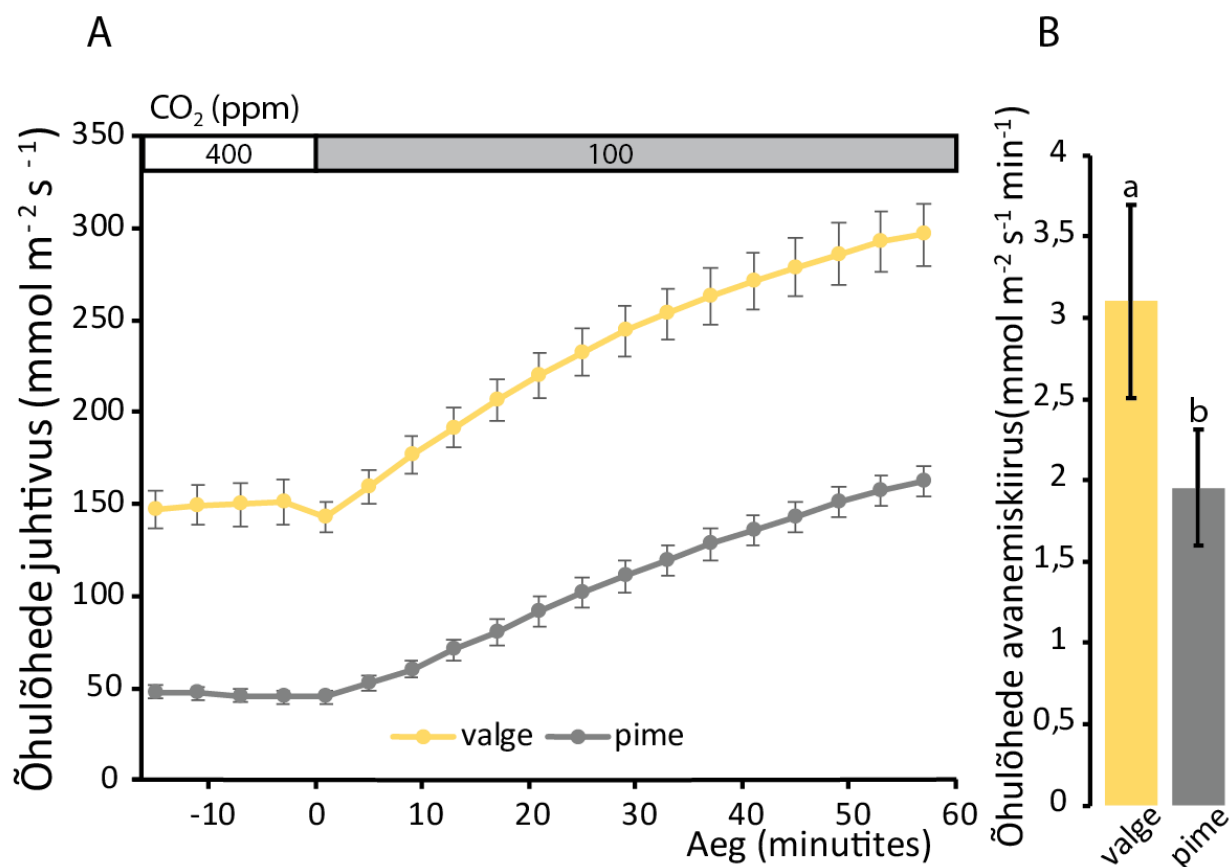
Joonis 14. (A) Bel-B õhulõhede juhtivus suhtelistes ühikutes (B) õhulõhede sulgumiskiirus ja (C) poolestusaeg kõrge CO₂ kontsentratsiooni korral erinevates tingimustes. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud \pm standarddardviga. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja *post-hoc* testiks kasutati Tukey testi. Üksteisest statistiliselt erinevad grupid on tähistatud tähtedega (a, b). Valimi suurus $n = 7-9$.

2.3.2.3. Reaktsioonid madalale CO₂-le pimedas ja valge valguse käes

Õhulõhede avanemine madala CO₂ mõjul nii pimeduses kui valguses.

a) harilik müürlook, ökotüüp Col-0

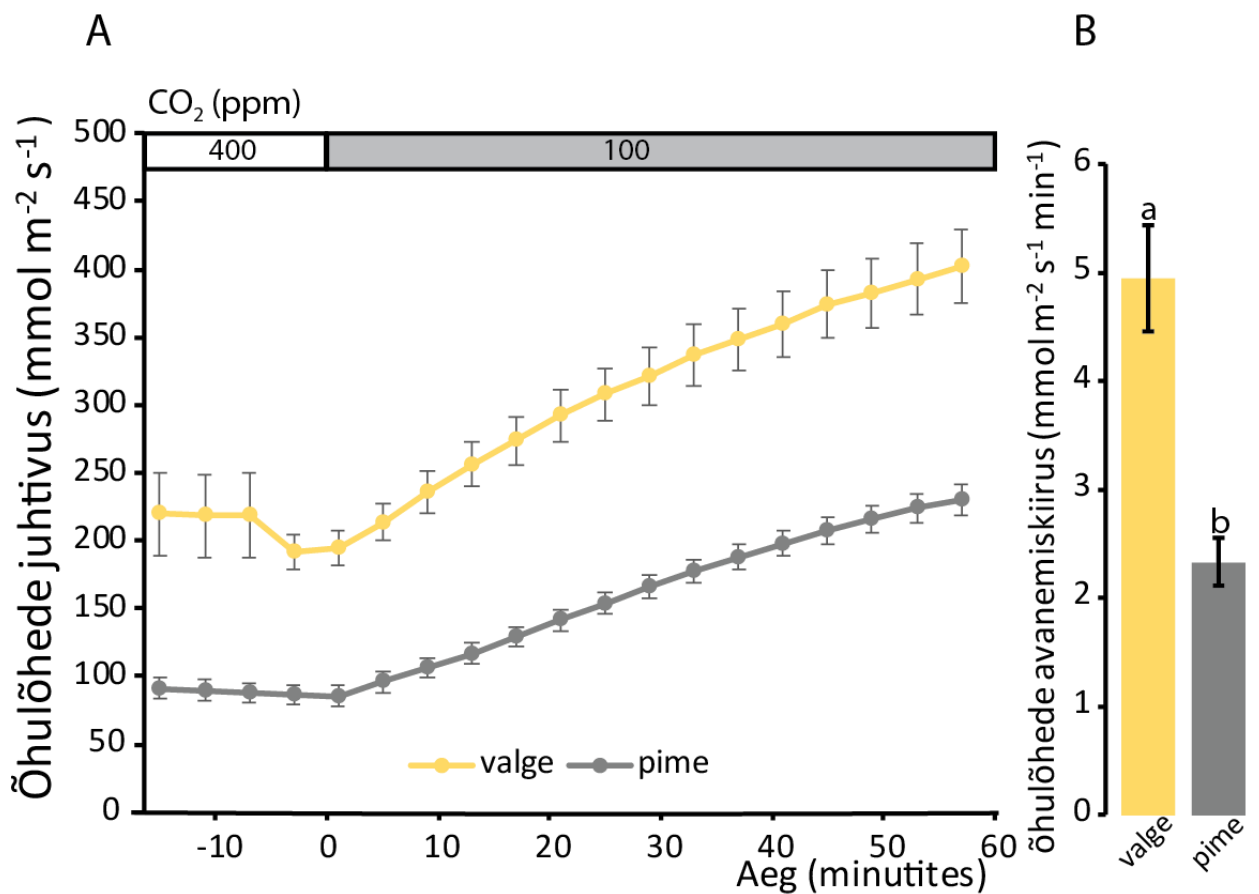
Valges valguses oli õhulõhede juhtivus pimedusest oluliselt kõrgem (joonis 15A). Juhtivuste vahe oli sarnane enne ja pärast CO₂ taseme muutmist. Õhulõhede avanemiskiirus valges valguses oli statistiliselt oluliselt suurem kui pimeduses (joonis 15B).



Joonis 15. (A) Col-0 õhulõhede juhtivus ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ja (B) õhulõhede avanemiskiirus ühes minutis madala süsihappegaasi katsetel madalas niiskuses ja pimeduses. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud \pm standardviga. Statistiline analüüs teostati Studenti t-testiga. Üksteisest statistiliselt erinevad grupid ($p < 0,05$) on tähistatud tähtedega (a, b). Valimi suurus $n = 9-12$.

b) harilik müürlook, ökotüüp *Ler*

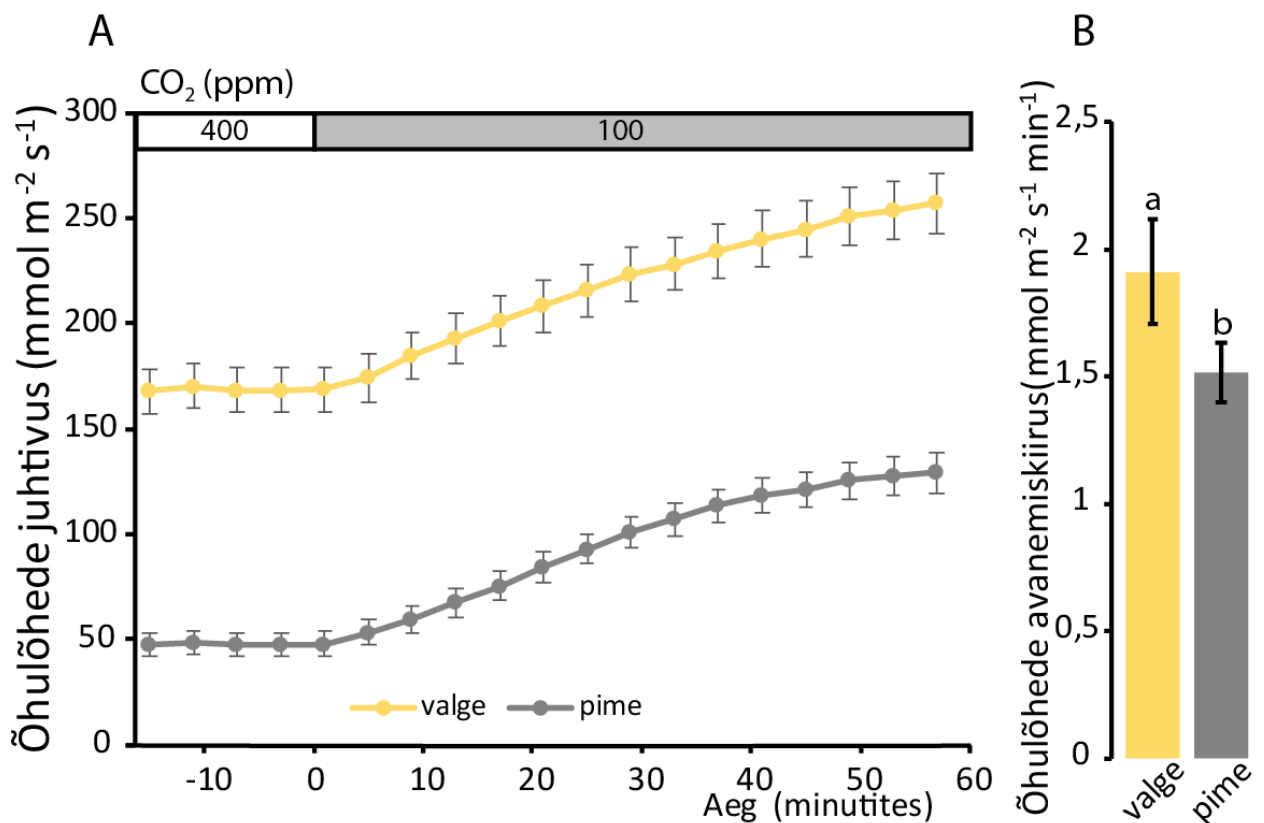
Müürlooga ökotüüp *Ler* käitus Col-0 ökotüübile võrdlemisi sarnaselt, kuid õhulõhede juhtivus oli *Ler* ökotüübil kõrgem (joonis 16A). Valges valguses olid õhulõhede juhtivus ja avanemiskiirus oluliselt suuremad kui pimeduses (joonis 16B).



Joonis 16. (A) *Ler* õhulõhede juhtivus (mmol m⁻² s⁻¹) ja (B) õhulõhede avanemiskiirus ühes minutis madala süsihappegaasi katsetel madalas niiskuses ja pimeduses. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud ± standardviiga. Statistiline analüüs teostati Studenti t-testiga. Üksteisest statistiliselt erinevad ($p < 0,05$) grupid on tähistatud tähtedega (a, b). Valimi suurus $n = 11-12$.

c) väärstubakas Bel-B

Tubakataimede õhulõhede juhtivus oli pimeduses oluliselt madalam kui valges valguses (joonis 17A). Avanemiskiirus oli valges valguses kiirem (joonis 17B) nagu hariliku müürlooga puhulgi, kuid kiiruste vahe oli väiksem, ehkki statistiliselt oluline.



Joonis 17. (A) Bel-B õhulõhede juhtivus ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ja (B) õhulõhede avanemiskiirus ühes minutis madala süsihappegaasi katsetel madalas niiskuses ja pimeduses. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud \pm standarddviaga. Statistiline analüüs teostati Studenti t-testiga. Üksteisest statistiliselt erinevad ($p < 0,05$) grupid on tähistatud tähtedega (a, b). Valimi suurus $n = 7-9$.

2.4. Arutelu

2.4.1. Õhulõhede juhtivus

Õhulõhede juhtivus oli sinises valguses alati kõrgem kui punases (joonis 4), see võib tuleneda sellest, et sinine valgus on tugev õhulõhede avanemist esile kutsuv signaal. Samas tubaka puhul see nii ei olnud, mis tekitab küsimuse, kas seal on sinise valguse roll sama oluline kui harilikus müürloogas. Õhulõhede juhtivus madalas niiskuses jäi enamjaolt samale tasemele kui pimeduses (joonis 11). Erandiks oli siin Col-0, millel oli madalas niiskuses kõrgem õhulõhede juhtivus kui pimeduses. See võib tähendada seda, et Col-0 taimedel on õhulõhede sulgumisreaktsioon vee säästmiseks nõrgem kui teistel, järelkult on fotosünteesil suurem prioriteet kui vee säästmisel. Üldiselt toimis madala niiskuse katse kontrollkatsena pimedusele hästi, sest õhulõhede juhtivust õnnestus alandada pimeduses oleva lähedale, mis elimineeris võimaliku erinevast juhtivusest tuleneva reageerimispotentsiaali faktori pimeduse ja valguse õhulõhede reaktsioonide vahel.

2.4.2. Õhulõhede sulgumine kõrge süsihappegaasi mõjul valges, punases ja sinises valguses

Kõrge süsihappegaasi mõjul on hariliku müürlooga ökotüüpides Col-0 ja *Ler* õhulõhede sulgumine poolestusaegade põhjal sinises valguses aeglasem kui punases ja valges valguses (joonis 5, joonis 6). Tubakataimedel poolestusaegades polnud olulist erinevust, kuid sinises valguses sulgumine oli sulgumiskiiruste põhjal aeglasem kui punases (joonis 7). See võib olla seotud sellega, et sinine valgus on õhulõhede avanemise aktivaator (Mansfield ja Meidner, 1966) ja takistab teataval määral õhulõhede sulgumist CO₂ mõjul, sarnast efekti on märgatud ka fusikoktsiiniga (mükotoksiin), mis on samuti õhulõhede avanemise aktivaator (Travis ja Mansfield, 1979). Sinises valguses esinev õhulõhede aeglasem reaktsioon võib olla tingitud sellest, et sulgrakud reageerivad õhulõhede sulgumist aktiveerivatele teguritele vähem. Avastatud on, et kõrge intensiivsusega valges valguses muutuvad õhulõhed uimaseks ja reageerivad õhulõhede sulgumist aktiveerivatele teguritele aeglasemalt (Hoshika et al., 2016). Kuna kõrge intensiivsusega valges valguses on ka sinise valguse kiirus tugevam, võib ka neis tingimustes esinev õhulõhede aeglasem reaktsioon olla tingitud sinise valguse tugevama intensiivsusest. Tubakas paistab sinise valguse efekt olevat nõrgem. Selle põhjuseks võib olla liigispetsiifiline käitumiserinevus, näiteks on leitud, et kõrge CO₂ ja valge valguse mõjul avanevad *A. thaliana* õhulõhed rohkem kui *N. tabacum*-il, kui rakendada mõlemat tingimust korraga (Merilo et al., 2014). Käesolevas uurimuses tehtud katsetest on näha, et *N. tabacum*-il on õhulõhede reageering süsihappegaasi taseme tõstmisel (joonis 5B ja 7B) ja langetamisel (joonis 8B ja 10B) aeglasem kui *A. thaliana* Col-0 taimedel, samasugune erinevus on näha ka poolestusaegades (joonis 5C ja 7C). Antud katsetes nii tubakas kui harilikus müürloogas kõrge CO₂ ja valguse tingimustel õhulõhed küll sulgusid, mis on erinev Merilo et al., 2014 katsete tulemustest, kuid viimastes kasutati valgust intensiivsusega 450 μmol m⁻² s⁻¹, mis tekitab tõenäoliselt oluliselt tugevama õhulõhede avanemissignaali kui käesolevas katses kasutatud 150 μmol m⁻² s⁻¹ valgusintensiivsus. Katsed erinesid veel selle poolest, et käesolevas katses oli juhtivus stabiliseeritud valguses ja siis muudeti CO₂ kontsentratsiooni; samas Merilo et al., 2014 muudeti korraga valgust ja CO₂ taset ning seega anti korraga kaks vastandlikku signaali, samas kui antud töös läbi viidud katsetes muudeti vaid üht tingimust korraga. Need tulemused annavad alust arvata, et eri liiki taimed käituvad õhulõhede regulatsioonis samadele tingimustele erinevalt ka teiste mõjutegurite puhul.

2.4.3. Õhulõhede sulgumine kõrge süsihappegaasi mõjul pimeduses

Pimeduses oli õhulõhede sulgumine kõrge süsihappegaasi mõjul aeglustunud Col-0 ja *Ler* taimeliinides (joonis 12B, joonis 13B), tubakataimed reageerisid sama kiiresti kui teistes valgusoludes (joonis 14B). Leitud on, et katteseemnetaimed reageerivad pimeduses CO₂ taseme muutustele Ca²⁺ sõltuvate signaaliradade kaudu (Brodrigg ja McAdam, 2013), paljasseemnetaimedel selline mehhanism puudub ja pimeduses süsihappegaasi vastust ei esine. Arvatakse, et see andis katteseemnetaimedele eelise kiirema õhulõhede reaktsiooni näol ja sellega koos efektiivsema veekasutuse. Kõik kolm käesolevas töös uuritud taimeliini kuuluvad katteseemnetaimede hulka ja nad ka reageerivad pimeduses kõrgele süsihappegaasile õhulõhede sulgumisega. Huvitav on aga see, et mõlemad hariliku müürlooga ökotüübid reageerivad pimeduses vähem ja aeglasemalt kui teistes valgustingimustes ja tubakataimed reageerivad samaväärselt teiste valgustingimustega. See võib tähendada, et eri taimeliinides on Ca²⁺ sõltuvates reaktsiooniradades erinevused, mis mõjutavad õhulõhede sulgumise efektiivsust. Võimalik, et taimedel, mille algne kasvukoht oli piirkonnas, kus vesi oli raskesti kättesaadav, arenes antud signaalirada mõjuvamaks kui taimedel, mille kasvupiirkonnas veepuudust tihti ei esinenud. Tegelikult oleks kasulik pimeduses üldse õhulõhed kinni hoida, et veekadu minimeerida. Samas kui veeolud on piisavad, siis ei ole taimetele kahjulik õhulõhesid mingil määral avatuna hoida, sest sellisel juhul toimub ilmselt avanemine kiiremini, kui fotosünteesiks soodsad tingimused saavutatakse. Lisaks kõigele on õhulõhedest vee aurumine oluline vee transpordiks läbi taime ja ilma selleta ei saa taim omastada substraadis leiduvast veest elutegevuseks vajalikke lahustunud aineid.

2.4.4. Õhulõhede sulgumine madalas niiskuses kõrge süsihappegaasi mõjul

Need katsed tehti eesmärgiga testida, kas pimedus omab õhulõhedele konkreetselt valguse puudumisest põhjustatud mõju või on aeglasem reageering põhjustatud suletumatest õhulõhedest, madal niiskus on ka õhulõhesid sulgev tegur ja seetõttu on seda hea kasutada võrdluseks pimedusele. Madal niiskuse tase vähendas õhulõhede juhtivust oluliselt hariliku müürlooga ökotüüpides Col-0 (joonis 11A) ja *Ler* (joonis 11B), tubakal (joonis 11C) olulist erinevust ei esinenud. Pimedus sulges õhulõhesid vähemalt sama palju kui madal niiskus, Col-0 taimede puhul isegi rohkem (joonis 11A). Reaktsioonil kõrgele süsihappegaasile näitasid Col-0 (joonis 12ABC) ja *Ler* (joonis 13ABC) olulisi erinevusi õhulõhede käitumises pimeduses ja madalas niiskuses. Mõlemal juhul oli pimeduses sulgumiskiirus (joonis 12B ja 13B) oluliselt madalam ja poolestusaeg (joonis 12C ja 13C) oluliselt pikem madalas niiskuses saavutatud tulemustest. Tubakataimedel ei esinenud olulisi erinevusi ei õhulõhede sulgumiskiires

(joonis 14B) ega ka poolestusaegades (joonis 14C). Järelikult on võimalik, et pimedus põhjustab õhulõhede regulatsioonis muudatusi, mis on antud tingimustele omased, ja õhulõhede aeglasem reaktsioon ei ole tingitud ainult nende algsest suuremast suletusest. Tubakataimede õhulõhede regulatsiooni pimedus näiliselt taolisel viisil ei mõjuta, sest reageering on sarnane madala niiskuse ja ka valge valguse tingimustes saavutatule.

2.4.5. Õhulõhede avanemine madala süsihappegaasi mõjul

Pimeduses on õhulõhede avanemine madala süsihappegaasi mõjul aeglasem kui valges valguses kõigis uuritud taimeliinides (joonis 15B, 16B, 17B). Avanemine siiski toimub, kuigi sellistes tingimustes ei ole võimalik fotosünteesida ja ei oleks mõtet üldse õhulõhesid lahti hoida. Tuleb arvestada ka sellega, et looduslikult selliseid tingimusi (pimedus + madal CO₂ tase) üldiselt ei esine. Siin saab oletada, et CO₂ taseme langus on taimedele väga tugevaks õhulõhede avanemise signaaliks ja omab prioriteeti teiste mõjude üle. On näidatud, et hariliku müürlooga Col-0 ja Ler ökotüübil toimub kahe üksteisele vastandliku õhulõhesid reguleeriva teguri üheaegse rakendamise puhul alati õhulõhede avanemine (Merilo et al., 2014). See viitab sellele, et harilikul müürloogal on õhulõhede reguleerimises kõrgem prioriteet alati fotosünteesi substraadil. Samas katses (pimedus + madal CO₂) suutsid tubakataimed hoida õhulõhede juhtivust madalamal kui müürloogad, kuid avanemine leidis siiski aset (Merilo et al., 2014). Käesolevas katseseerias madala CO₂ ja pimeduse tingimustes saavutati sarnased tulemused, tubakataimede õhulõhed küll avanesid antud tegurite mõjul (joonis 17A), kuid õhulõhede juhtivus jäi siiski madalamaks kui tavatingimustes (CO₂ 400 ppm, valge valgus 150 μmol m⁻² s⁻¹), harilikud müürloogad Col-0 (joonis 15A) ja Ler (joonis 16A) avasid oma õhulõhed pimeduses ja madala CO₂ kontsentratsiooni korral umbes samaväärsele tasemele kui tavatingimustes. Süsihappegaasi taseme langetamise katsetes valges, punases ja sinises valguses ei olnud taimedel õhulõhede avanemises olulisi erinevusi (joonis 8, 9, 10). See viitab jällegi sellele, et CO₂ kontsentratsiooni langus on taimedele väga oluline mõjutegur ja ületab oma mõjult teisi tegureid. Süsihappegaas on taimedel fotosünteesi substraat ja seega eluliselt vajalik. Ilmselt on õhulõhede vastus madalale CO₂ tasemele väga tähtis ja see reaktsioon on arenenud igas olukorras toimivaks ja omab teiste tegurite ees prioriteedi eelist. Merilo et al., 2014 katsetes on näha, et ka mitmetel teistel liikidel lisaks tubakale ja harilikule müürloogale avanevad õhulõhed madala süsihappegaasi mõjul isegi pimeduses, kuigi sellistes tingimustes fotosüntees toimuda ei saa. Seega on madal CO₂ tase ilmselt tõesti eelisõigusega signaal.

2.4.6. Edasised uuringud

Tulemuste paremaks tõlgendamiseks oleks kasulik uurida taimede reaktsioone erineva intensiivsusega sinises valguses, sest sinise valguse kvandi energia on suurem võrreldes punase valguse omaga. Seda uurides saaks teha kindlaks, kas sinise valguse mõju õhulõhedele on põhjustatud konkreetset lainepikkuse erinevuse või hoopis suurema energiaga valguskvanti tõttu. Veel võiks testida, kas sinise valguse ja kõrge intensiivsusega valge valguse efekt õhulõhede sulgumisreaktsioonile süsihappegaasi mõjul on sarnaselt takistav nagu katsetes, kus kõrge intensiivsusega valges valguses oli õhulõhede sulgumisreaktsioon osooni mõjul aeglustunud (Hoshika et al., 2016). On näidatud, et punasele valgusele madala intensiivsusega sinist valgust lisades avab see õhulõhesid palju rohkem kui punane valgus üksi (Shimazaki et al., 2007). Hea oleks katsetada, kuidas mõjutab õhulõhede reaktsioone kõrgele ja madalale süsihappegaasi tasemele erineva valgustugevuse suhtega punase ja sinise valguse kombinatsioonide kasutamine. See aitaks paremini mõista punase ja sinise valguse omavahelist seost ja mõju. Kõrge CO₂ katsetes hariliku müürlooga Col-0 ja Ler ökotüüpidel oli sinises valguses efekt, mille käigus pärast esmast õhulõhede juhtivuse langust süsihappegaasi kontsentratsiooni tõusule hakkasid õhulõhede juhtivused taas aeglaselt tõusma (joonis 5A ja joonis 6A). Antud katsed keetsid tund aega ja selle aja jooksul oli õhulõhede juhtivuse tõus pidev ja praegusel hetkel pole teada, millisel määral juhtivus oleks taastunud, seetõttu oleks hea teha katse, kus kasutatakse sinist valgust ja kõrget süsihappegaasi taset. Katse kestus võiks olla nii pikk, kuni õhulõhede juhtivused stabiliseeruvad uuesti. Eksperiment aitaks selgitada seda, millisele tasemele taastuks õhulõhede juhtivus või kas sinise valguse mõjul avaneksid õhulõhed pärast teatud aega tavalisele või selle lähedasele tasemele isegi kõrge süsihappegaasi kontsentratsiooni tingimustes.

2.4.7. Järeldused

Töö tulemustest selgus, et erineva lainepikkusega valgus mõjutab CO₂ taseme muutuse poolt algatatud õhulõhede reaktsioone, seejuures suurim efekt oli sinisel valgusel. Sinises valguses on õhulõhede sulgumine pärsitud ja üldine reageering aeglustatud ning õhulõhede vastus süsihappegaasi kontsentratsiooni muutustele on tuimem. Selle efekti suurus tundub olevat liigispetsiifiline, sest katses kasutatud tubakataimede õhulõhede regulatsioon muutus sinises valguses vähem kui harilikul müürloogal. Madala süsihappegaasi poolt algatatud õhulõhede avanemisreaktsioonile ei avaldanud erineva lainepikkusega valgus olulist mõju ja avanemine toimus isegi pimeduses, mis annab alust arvata, et madala CO₂ poolt algatatud avanemis-

reaktsioon on väga tugev signaal õhulõhede reguleerimisel. Õhulõhede sulgumisel pimeduses käitusid müürlookade õhulõhed jällegi tubaka omadest teistmoodi, tubakataimel sulgusid pimeduses õhulõhed normaalselt, kuid müürlookadel oli sulgumine tunduvalt aeglasem ja väiksema ulatusega.

Kokkuvõte

Käesolevas töös tehtud katsete tulemusena selgus, et taimede süsihappegaasi tõusust tingitud õhulõhede sulgumisreaktsioon sõltub valguse lainepikkusest, kuid efekti suurus on tõenäoliselt liigispetsiifiline, sest katsetes kasutatud eri liiki taimed ei reageerinud alati ühtmoodi. Suurimat mõju avaldas õhulõhede reaktsioonile sinine valgus, mis aeglustas ja vähendas nende sulgumist.

Õhulõhede avanemisreaktsioonide uurimisel ei tuvastatud saadud katseandmete põhjal eri lainepikkusega valgusel olulist mõju õhulõhede regulatsioonile. See võib olla tingitud madala süsihappegaasi signaali suurest tähtsusest ja selle prioriteetseks kujunemisest taimede õhulõhede reguleerimises.

Pimedus vähendas õhulõhede juhtivust, kuid reaktsioonid süsihappegaasi taseme muutustele siiski toimusid. Kõrge CO₂ taseme korral oli taimede õhulõhede sulgumine oluliselt aeglustunud võrreldes teiste valgusoludega ja poolestusaeg oli pikem, tubakataimede puhul sulgusid õhulõhed normaalselt, mis viitab liigispetsiifilistele regulatsioonierinevustele.

Käesolevate tulemuste põhjal võib arvata, et sinine ala valgusspektrist on oluline tegur õhulõhede avanemisel ja juhtivuse määramisel. Seega väiksema õhulõhede juhtivuse ja sellega seonduvalt ka madalama veekulu saavutamiseks võib aidata taimede sinise valguse signaalsatsiooniraja vähem tundlikuks muutmine.

Resümee

The effects of light at different wavelengths on carbon dioxide induced stomatal regulation

Kaspar Koolmeister

Summary

Stoma is a small opening in plant epidermis, which is formed by two guard cells, which have unique properties to regulate the size of stomatal aperture. Stomata are very important to plants, as they are used to exchange gases with atmosphere for photosynthesis and also prevent excessive water loss. Guard cells control the stomatal aperture by increasing or decreasing their turgor pressure; for opening they increase their turgor pressure and for closure they decrease it. Guard cell turgor pressure is controlled by movement of anions, cations and water. In order to close the stomata, ions move out of the guard cells and for opening they move into the guard cells. The mechanisms of stomatal movement and its regulation remain to be fully characterized.

This research was carried out to better understand the effect of light at different wavelengths to CO₂-induced stomatal movements. This kind of knowledge can be used in the future to engineer more drought resistant plants with higher water use efficiency that can reduce agricultural water consumption in regions where water is scarce. To analyze stomatal responses, a gas exchange machine was used to measure the CO₂ uptake and water evaporation from the whole plant, from this data the stomatal conductance was calculated which indicated how much did the stomata close or open. Stomatal closure was induced with higher than normal CO₂ levels and for stomatal opening lower than normal levels of CO₂ were used.

Results showed that plants that were exposed to blue light had higher stomatal conductance and slower stomatal closure rate than plants that were in red or white light. Stomatal closure in response to CO₂ in darkness was significantly slower than in light in *Arabidopsis thaliana*. Stomatal opening in response to low CO₂ concentration occurred irrespective of light conditions and even in darkness, indicating that lack of substrate for photosynthesis is a robust and dominating signal for stomatal opening.

Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajat Hanna Hõrakut, kes leidis doktoritöö kirjutamise kõrvalt aega, et pakkuda uurimistöö valmimiseks igakülgset abi. Tänan ka oma teist juhendajat Hannes Kollistit, kes oli alati abivalmis ja toetav. Lisaks tänan kogu ülejäänud laborirahvast sooja ja sõbraliku suhtumise eest.

Kasutatud kirjandus

- Assmann SM, Simoncini L, Schroeder JI** (1985) Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* **318**: 285–287
- Boccalandro HE, Giordano CV, Ploschuk EL, Piccoli PN, Bottini R, Casal JJ** (2012) Phototropins But Not Cryptochromes Mediate the Blue Light-Specific Promotion of Stomatal Conductance, While Both Enhance Photosynthesis and Transpiration under Full Sunlight. *Plant Physiol* **158**: 1475–1484
- Briggs WR, Christie JM** (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* **7**: 204–210
- Briggs WR, Huala E** (1999) Blue-Light Photoreceptors in Higher Plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 33–62
- Brodribb TJ, McAdam SAM** (2013) Unique Responsiveness of Angiosperm Stomata to Elevated CO₂ Explained by Calcium Signalling. *PLOS ONE* **8**: e82057
- Chaves I, Pokorny R, Byrdin M, Hoang N, Ritz T, Brettel K, Essen L-O, Horst GTJ van der, Batschauer A, Ahmad M** (2011) The Cryptochromes: Blue Light Photoreceptors in Plants and Animals. *Annu Rev Plant Biol* **62**: 335–364
- Core Writing Team, Pachauri RK, Meyer LA** IPCC, 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Geneva, Switzerland
- Daszkowska-Golec A, Szarejko I** (2013) Open or Close the Gate – Stomata Action Under the Control of Phytohormones in Drought Stress Conditions. *Front Plant Sci* **4**: 3389
- Eckert M, Kaldenhoff R** (2000) Light-induced stomatal movement of selected *Arabidopsis thaliana* mutants. *J Exp Bot* **51**: 1435–1442
- Engineer CB, Hashimoto-Sugimoto M, Negi J, Israelsson-Nordström M, Azoulay-Shemer T, Rappel W-J, Iba K, Schroeder JI** (2016) CO₂ Sensing and CO₂ Regulation of Stomatal Conductance: Advances and Open Questions. *Trends Plant Sci* **21**: 16–30
- Fujita T, Noguchi K, Terashima I** (2013) Apoplastic mesophyll signals induce rapid stomatal responses to CO₂ in *Commelina communis*. *New Phytol* **199**: 395–406
- Hashimoto M, Negi J, Young J, Israelsson M, Schroeder JI, Iba K** (2006) *Arabidopsis* HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO₂. *Nat Cell Biol* **8**: 391–397
- Hayashi M, Inoue S, Ueno Y, Kinoshita T** (2017) A Raf-like protein kinase BHP mediates blue light-dependent stomatal opening. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep45586
- Hayashi M, Kinoshita T** (2011) Crosstalk between blue-light- and aba-signaling pathways in stomatal guard cells. *Plant Signal Behav* **6**: 1662–1664
- Hörak H, Sierla M, Töldsepp K, Wang C, Wang Y-S, Nuhkat M, Valk E, Pechter P, Merilo E, Salojärvi J, et al** (2016) A Dominant Mutation in the HT1 Kinase Uncovers Roles of

MAP Kinases and GHR₁ in CO₂-induced Stomatal Closure. *Plant Cell* **28**: tpc.00131.2016

Hoshika Y, Marco AD, Materassi A, Paoletti E (2016) Light Intensity Affects Ozone-Induced Stomatal Sluggishness in Snapbean. *Water Air Soil Pollut* **227**: 419

Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, Porée F, Boucherez J, Lebaudy A, Bouchez D, Véry A-A, et al (2003) The Arabidopsis outward K⁺ channel *GORK* is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 5549–5554

Hu H, Boisson-Dernier A, Israelsson-Nordström M, Böhmer M, Xue S, Ries A, Godoski J, Kuhn JM, Schroeder JI (2010) Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO₂-controlled stomatal movements in guard cells. *Nat Cell Biol* **12**: 87–93

Hubbard KE, Siegel RS, Valerio G, Brandt B, Schroeder JI (2012) Abscisic acid and CO₂ signaling via calcium sensitivity priming in guard cells, new CDPK mutant phenotypes and a method for improved resolution of stomatal stimulus–response analyses. *Ann Bot* **109**: 5–17

Inoue S, Kinoshita T (2017) Blue light regulation of stomatal opening and the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol* pp.00166.2017

Jakobson L, Vaahtera L, Töldsepp K, Nuhkat M, Wang C, Wang Y-S, Hõrak H, Valk E, Pechter P, Sindarovska Y, et al (2016) Natural Variation in *Arabidopsis* Cvi-0 Accession Reveals an Important Role of MPK12 in Guard Cell CO₂ Signaling. *PLOS Biol* **14**: e2000322

Jeanguenin L, Lebaudy A, Xicluna J, Alcon C, Hosy E, Duby G, Michard E, Lacombe B, Dreyer I, Thibaud J-B (2008) Heteromerization of Arabidopsis Kv channel alpha-subunits: Data and prospects. *Plant Signal Behav* **3**: 622–625

Kim T-H, Böhmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI (2010) Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO₂, and Ca²⁺ Signaling. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 561–591

Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K (2001) phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**: 656–660

Kollist T, Moldau H, Rasulov B, Oja V, Rämme H, Hüve K, Jaspers P, Kangasjärvi J, Kollist H (2007b) A novel device detects a rapid ozone-induced transient stomatal closure in intact Arabidopsis and its absence in *abi2* mutant. *Physiol Plant* **129**: 796–803

Mansfield TA, Meidner H (1966) Stomatal Opening in Light of Different Wavelengths: Effects of Blue Light Independent of Carbon Dioxide Concentration. *J Exp Bot* **17**: 510–521

Matrosova A (2015) New insights into the regulation of stomatal movements by red light, carbon dioxide and circadian rhythms. <http://pub.epsilon.slu.se/12812/>

Matrosova A, Bogireddi H, Mateo-Peñas A, Hashimoto-Sugimoto M, Iba K, Schroeder JI, Israelsson-Nordström M (2015) The HT1 protein kinase is essential for red light-

- induced stomatal opening and genetically interacts with OST1 in red light and CO₂-induced stomatal movement responses. *New Phytol* **208**: 1126–1137
- Merilo E, Jõesaar I, Brosché M, Kollist H** (2014) To open or to close: species-specific stomatal responses to simultaneously applied opposing environmental factors. *New Phytol* **202**: 499–508
- Roelfsema MRG, Hanstein S, Felle HH, Hedrich R** (2002) CO₂ provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *Plant J* **32**: 65–75
- Roelfsema MRG, Hedrich R** (2005) In the light of stomatal opening: new insights into ‘the Watergate.’ *New Phytol* **167**: 665–691
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW** (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**: 671–675
- Sharkey TD, Raschke K** (1981) Effect of Light Quality on Stomatal Opening in Leaves of *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiol* **68**: 1170–1174
- Shimazaki K, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T** (2007) Light Regulation of Stomatal Movement. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 219–247
- Takemiya A, Sugiyama N, Fujimoto H, Tsutsumi T, Yamauchi S, Hiyama A, Tada Y, Christie JM, Shimazaki K** (2013a) Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening. *Nat Commun* **4**: 2094
- Takemiya A, Yamauchi S, Yano T, Ariyoshi C, Shimazaki K** (2013b) Identification of a Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 1 Which Mediates Blue Light Signaling for Stomatal Opening. *Plant Cell Physiol* **54**: 24–35
- Travis AJ, Mansfield TA** (1979) Reversal of the CO₂-Responses of Stomata by Fusicoccin. *New Phytol* **83**: 607–614
- Vahisalu T, Kollist H, Wang Y-F, Nishimura N, Chan W-Y, Valerio G, Lamminmäki A, Brosché M, Moldau H, Desikan R, et al** (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* **452**: 487–491
- Wang F-F, Lian H-L, Kang C-Y, Yang H-Q** (2010) Phytochrome B Is Involved in Mediating Red Light-Induced Stomatal Opening in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **3**: 246–259
- Xue S, Hu H, Ries A, Merilo E, Kollist H, Schroeder JI** (2011) Central functions of bicarbonate in S-type anion channel activation and OST1 protein kinase in CO₂ signal transduction in guard cell. *EMBO J* **30**: 1645–1658

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kaspar Koolmeister,

(sünnikuupäev: 02.04.1995)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose **Erineva lainepikkusega valguse mõju süsihappegaasi kontsentratsiooni muutustest tingitud õhulõhede sulgumisele ja avanemisele**, mille juhendajad on Hanna Hõrak ja Hannes Kollist,
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 29.05.2017