

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIA TEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TAIMEFÜSIOLOOGIA ÕPPETOOL

Tiina Tosens

**Fotosünteesivõime sõltuvus gaasivahetuse sisemisest
takistusest liigil *Populus tremula***

Magistritöö

Juhendaja :Uuriija- Professor Ülo Niinemets

Tartu 2006

SISUKORD

LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Lehe arengu faasid	6
1.2 Mida on oluline mainida, kui räägitakse lehe arengust	7
1.3 Lehe pindala	7
1.4 Lehe paksus	7
1.5 Lehe mesofüll	8
1.6 Lehtede klorofüllisaldus ontogeneesi vältel	9
1.7 Lehe plastokroniindeks	9
1.8 Kogufotosünteesi (A_n) kiirus ontogeneesi vältel	10
1.9 Lehe anatoomia ja ontogeneesi mõju mesofüllis juhtivusele	11
1.10 Lehe optiliste omaduste muutumine ontogeneesi käigus	12
1.11 Kloroplastide areng ontogeneesi vältel	13
2. TÖÖ EESMÄRK	14
3. MATERJALID JA MEETODID	15
3.1 Taimed	15
3.2 Valgus- ja elektronmikroskoopia	16
3.3 Klorofüllisisalduse- ja optilise neeldumiskoeffitsendi määramine	17
3.4 Gaasivahetuse mõõtmine	17
3.5 Mesofüllis seismise takistuse (R_{md}) arvutamine	18
3.6 Keemilised ja struktuursed analüüsid	19
4. TULEMUSED	20
4.1 Veestressi ja vähese valguse mõju <i>Populus tremula</i> lehtede kasvukiirusele	20
4.2 Lehe anatoomia sõltuvus vanusest ja kasvutingimustest	21
4.3 Mesofüllis difusioonitakistuse ja fotosünteesikiiruse sõltuvus lehe vanusest ja kasvutingimustest	27
4.4 Difusioonitakistuse ja fotosünteesivõime sõltuvus lehe anatoomiast	32
5. ARUTELU	41

6. KOKKUVÕTE	48
7. SUMMARY	49
8. KASUTATUD KIRJANDUS	50

LÜHENDID

A_{ecol}	fotosünteesikiirus
A_n	netofotosünteesi kiirus
C_c	kloroplastisisene süsihappegaasi kontsentratsioon
C_i	rakuvaheruumide süsihappegaasi kontsentratsioon
g_i	mesofüllli juhtivus õhulõhedest kuni RUBISCO-ni
R_{ias}	õhuruumide ruumala
R_{cw}	mesofüllli vedelfaasi takistus
R_{ias}	mesofüllli gaasifaasi takistus
g_{ias}	mesofüllli gaasifaasi juhtivus
LMA	lehe pindtihedus
L	lehe paksus
LPI	lehe plastokrooniindeks
N	lehe lämmastikuisaldus
PAR	fotosünteesiliselt aktiivne kiirgus
RUBISCO	ribuloos 1.5- bisfosfaadi karboksülaas/oksügenaas
S_{mes}	rakuvaheruumidele eksponeeritud mesofüllli rakkude pindala
S_c	kloroplastide kogupindala, mis on eksponeeritud rakuvaheruumidele
S_c/S_{mes}	kloroplastide rakuvaheruumidele eksponeeritud pinna ja kogu mesofüllli eksponeeritud pinna suhe

SISSEJUHATUS

Fotosüntees on peamiseks orgaanilise süsiniku allikaks looduses. Rohelised taimed koos fotosünteesivate bakteritega toodavad inimestele ja loomadele vajalikku biomassi ning hoiavad atmosfääri hapniku ja süsihappegaasi tasakaalu. Taimede põhilisteks fotosünteesivateks organiteks on lehed, mille kogupindala kogu maakeral on ligikaudu 65×10^7 km². Seega on väga oluline aru saada lehtede fotosünteetilise aktiivsuse kujunemist määravatest teguritest.

Lehtede morfoloogia ja kudede struktuur muutuvad nende arengu käigus, samuti muutuvad lehtede arenedes nende füsioloogiline ja biokeemiline aktiivsus. Struktuursed ja füsioloogilised muutused toimuvad koordineeritult, muutes niiviisi lehtede fotosünteesivõimet. Eelkõige on kaasajal uuritud lehtede füsioloogilise aktiivsuse varieerumist. Alles viimasel ajal, täppisaparatuuri arenedes (Dr. Laisa ja kolleegide tööd) on võimalikuks saanud kvantitatiivselt hinnata lehtede struktuursete kitsenduste mõju fotosünteesivõimele. Samas on andmeid, et just struktuursed faktorid määravad realiseerunud lehtede fotosünteesivõime spektri läbi kogu maakera ökosüsteemide (Wright *et al.* 2004). Lehtede fotosünteesivõime varieerumise peamiseks struktuurseks põhjuseks võib olla gaasivahetuse sisemine takistus (st. takistus gaasivahetusele, mis tuleneb sellest, et CO₂ peab difundeeruma peale õhulõhede läbimist veel kloroplastideni).

Käesoleva töö eesmärk on uurida lehe ontogeneesist sõltuvaid muutusi lehtede füsioloogilises aktiivsuses ja struktuuris ning kontrollida hüpoteesi, et muutused lehtede anatoomias on peamiseks lehe fotosünteesivõimet määravaks faktoriks.

Töö juhatatakse sisse kirjanduse ülevaatega, mis võtab kokku teabe lehe arengu käigus toimuvate füsioloogiliste ja struktuursete muutuste kohta ja näitab peamisi lünki kaasaja lehe fotosünteesifüsioloogia arusaamades.

Eksperimentaalne osa uurib seoseid lehtede fotosünteesivõime ja nende sisemise takistuse vahel läbi erinevate arengufaaside. Suur varieeruvus lehtede sisemises takistuses ja arengukiiruses saadi kasvatades taimi erinevatel keskkonnatingimustel. Lisaks näitavad käesoleva töö eksperimendid ka tugevat keskkonnatingimuste kontrolli lehtede kasvukiirusele ning fotosünteesi kiiruse ja lehtede anatoomia vahelistele seostele.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Lehe arengu faasid

Lehe elus võib eristada kolme faasi: 1) moodustub lehe kuju ja pindala hakkab suurenema 2) leht on küps, mida loetakse hetkest, kui leht on maksimaalse pindalaga 3) vananemine, alates siit hakkab lehe pindala aeglaselt vähenema (Zdenek Šestak 1985).

Kui lehe arengut kirjeldada süsiniku majanduse aspektist, siis võib samuti kolme faasi eristada: 1) leht on süsinikku importiv struktuur niikaua kuni tema fotosünteesi aparaat on täiesti arenenud 2) kõik fotosünteesi parameetrid on maksimaalse võimsuse saavutanud, samal ajal on lehe kasv saavutanud oma maksimaalse kiiruse. (Rawson ja Hakett 1974). Selle perioodi kestus sõltub tugevalt taime kasvutingimustest.

Siin on üheks oluliseks limiteerivaks faktoriks veestress, mille tõttu võib lehe vananemine kuni poole rutem alata, eriti, kui siia lisada vähene valguse kättesaadavus. 3) Edasi transporditakse lehest intensiivselt süsinikku ja mineraale teistesse taime organitesse, kuid lehe fotosünteesi intensiivsus hakkab vähenema (Zdenek Šestak 1985).

Kõikidesse arengustaadiumidesse jõudmise kiirus sõltub keskkonnast, kus leht on kasvanud. Olulisemateks limiteerijateks on mulla lämmastiku sisaldus, vee kättesaadavus ning peale langeva valguse hulk.

1.2 Mida on oluline mainida, kui räägitakse lehe arengust.

Enne lehe füsioloogiliste parameetrite kirjeldamist tuleb määrata vanus – mida hästi kirjeldab plastokroniindeks. Omavahel ei tohi võrrelda küpset ja noort, noort ja vananevat või noort ja täiskasvanud lehte (Dickmann 1971). Samuti peavad lehed olema kasvanud hästi kontrollitud tingimustes, sest erinev vee kättesaadavus ja peale langeva valguse intensiivsus mõjutab lehe arenguetappide kestvust. Olgugi, et lehe anatoomilise struktuuri kujunemine ja metaboolne aktiivsus erinevates arengufaasides on suuresti geneetiliselt ette määratud, sõltub nende avaldumine taime kasvutingimustest ja seetõttu võib võrrelda ainult hästi kontrollitud tingimustes kasvanud lehti (Zdenek Šestak 1985).

1.3 Lehe pindala

Fotosünteesi kiirus on enamasti määratud, kui pinna kohta ajaühikus seotud süsihappegaasi hulk, seetõttu võib lehe pindala käsitleda kui lehe fotosünteesi potentsiaali näitavat suurust (Miyazawa *et al.*, 2003).

Lehe pindala juurdekasvu ontogeneesi käigus kirjeldab tüüpiline sigmoidkõver. Kuid lehelaba erinevad osad arenevad erineva kiirusega- kõige kiirem on kasv lehelaba keskel, küpseks saavad ja jagunemise lõpetavad kõigepealt lehelaba tipus asuvad koed. Samas kui laba alumises osas jätkub kudede diferentseerumine (Cromer *et al.*, 1993).

Lehe pindala juurdekasv on kõige kiirem noortes lehtedes ning seejärel aeglustub kuni leht on küps. Edasi asendub rakkude diferentseerumine venivus kasvuga (Dengler *et al.*, 1975). Lehe pindala suurenemine sõltub oluliselt keskkonnatingimustest, kus ühed olulisemad limiteerijad on veestress ja valguse kättesaadavus.

1.4 Lehe paksus

Lehe paksus kasvab paralleelselt pindala suurenemisega. (Dengler *et al.*, 1975). Sarnaselt pindala suurenemisega toimub kõigepealt kiire lehe paksenemine, mis hõlmab nii venivus- kasvu kui ka rakkude jagunemist. Siin suureneb sammaskoe rakkude ruumala ning arenevad rakuvaheruumid. Sel perioodil kasvab ka mesofüllilise rakukihtide arv. Kui leht on oma küpsele eale vastava maksimaalse paksuse saavutanud, toimub edasine paksenemine väga aeglaselt. Lehtede paksus sõltub nende kinnitumiskohast ja on liigiti erinev: leht pakseneb alumistest keskmiste suunas ja väheneb tipmistest suunas (Pieters 1974), Mõnikord on alumised lehed kõige paksemad ja paksus väheneb tipmistest suunas (Isebrands ja Larson 1973). Mõnel liigil on alumised ja ülemised lehed taime kõige paksemad (Pieters 1974).

Kohastumine madalale kasvuvalgusele seisneb muutustes lehe paksuses, mis parandab lehtede valguse neelamise efektiivsust ja lehtede eksponeeritust valgusele. Üldjuhul on madalavas valguses kasvanud lehed õhemad (Nobel *et al.*, 1976) ja neil on seetõttu väiksem pindtihedus (ρ) s.o kuivmass ühikulise pinna kohta (Niinemets *et al.*, 1997). Õhemad, väiksema pindtihedusega lehed madalas valguses on kasulikud, sest võimaldavad moodustada suurema lehepinna valguse neelamiseks sama biomassi investeerimise korral lehtedesse ($L = M / \rho$, kus L on kogu lehepind ja M lehtede kogumass).

Uurimused on näidanud, et esineb ka olulisi liikidevahelisi erinevusi samale valgusele eksponeeritud lehtede pindtiheduse väärtustes. Puuliikidel, mis kasvavad eelistatult suurema valguse kättesaadavusega kohtades (valgusliigid), on ρ suurem kui liikidel, mis levivad eelkõige kehvemini valgustatud paikades. Seega on sama lehestiku massi juures lehepind suurem varjuliikidel, mistõttu varjuliigid võivad neelata suurema proportsiooni pealelangevast valgusest kui valgusliigid. (Niinemets *et al.*, 1998).

1.5 Lehe mesofüll

C3 taimedel eristatakse palisaatkude ja sammaskude. Palisaatkoe rakud on orienteeritud mööda nende pikitelge ja selles suunas välja veninud. Rakud asetsevad korrapäraselt üksteise kõrval. Kobekoe rakkude kuju ja asetus on vähem korrapärane ja nende vahel on selgelt eristatavad õhuruumid. Palisaatkude on põhiline süsihappegaasi sidumise koht ja sammaskoe raku seinte ääres asetsevates kloroplastides toimub fotosüntees. (Dengler *et al.*, 1975). Mesofüllü anatoomia muutub lehe arengu käigus ja sõltub taime kasvutingimustest.

Mesofüllü paksus kasvab ontogeneesi käigus ligikaudu kaks korda, kuid kõrge valguse käes kasvanud taimedel kasvab koe paksus kuni kümnekordseks. Väga noorte lehtede mesofüllü rakud on kompaktselt koos ja rakuvahe ruumid praktiliselt puuduvad. Rakuvaheruumide hulk kasvab lehe ontogeneesi käigus kuni on saavutanud maksimum ruumala ning hakkab siis aeglaselt vähenema. Rakuvahe ruumide hulk on oluline, sest läbi nende transporditakse süsihappegaas õhulõhedest fotosünteesivate rakkude pinnale. Seesmine lehe pind on 10 kuni 40 korda suurem kui välimine lehe pind. Seesmise pinna suurus sõltub taime kasvutingimustest ja vanusest, mis määravad jällegi rakkude arvu ja suuruse pinna kohta. Lehe mesofüllü rakkude kogupindala on oluline, sest selle kaudu toimub süsihappegaasi molekulide sisenemine rakku ja fotosünteesiks oluline valguskvantide püüdmine. Seega suurem hulk sisemisi pindasid tähendab suuremat füsioloogilist aktiivsust. Kõrge valguse taimede kobekoes on õhuruumide koguruumala väiksem kui madalal valgusel kasvanud taimedel. Mesofüllü rakkude jagunemine on kiirem noortes lehtedes ja väheneb lehe arenedes kuni asendub täielikult venivus kasvuga. Rakkude jagunemine lõppeb esmalt kobekoes samal ajal kui sammaskoe rakud jagunevad edasi. Lehe ontogeneesi käigus väheneb mesofüllü rakkude arv pindalaühiku kohta, aga nende hulk lehe kohta suureneb. Palisaatkoe rakkude pikkus ja laius suureneb lehe arengu jooksul progressiivselt (Dengler *et al.*, 1975).

Valguseenergia määrab rakkude diferentseerumise intensiivsuse nii sammaskoe kui ka kobekoe rakkude puhul. Madala valguse taimedel on enamasti ainult üks kiht sammaskoe rakke ja need on tunduvalt lühemad kui kõrgel valgusel kasvanud taimed (Hanba *et al.*, 2002).

Veestressis taimede sammaskoerakud on väiksema ruumalaga, sest veestress pärsib venivus kasvu. Rakkude diferentseerumine on veestressile vähem tundlik kui venivus kasv (Isebrands *et al.*, 1973).

1.6 Lehtede klorofüllisaldus ontogeneesi vältel

Klorofüllis hulk kasvab kuni on saavutanud maksimaalse võimaliku taseme ja hakkab siis vähenema (Laisk *et al.*, 2004). Klorofüllisaldus kohaneb madalale valguse intensiivsusele. Madalale valgusele kohanemisel kasvab lehtede klorofüllis kontsentratsioon (Niinemets 1998) parandades lehtede valguse neelamise efektiivsust ühikulise massi kohta. Olgugi, et varjus kasvanud lehed on õhemad, varieerub pealelangeva valguse neelamise efektiivsus pinna kohta suhteliselt vähe, sest klorofüllikontsentratsiooni kasv ja sellega seotud lehe optilise paksuse suurenemine kompenseerib lehe anotoomilise paksuse vähenemise (Niinemets *et al.*, 1997). Samas on teada, et lehtede absorptsioonivõime võib sõltuvalt lehtede anatoomiast varieeruda suurtes piirides sama lehe klorofüllisisalduse juures (Evans 1999, Vogelmann 1993).

1.7 Lehe plastokroniindeks

Lehe arengust rääkides kasutatakse tihti numbrilist suurust, mis on plastokroniindeks (PI). See on numbriline indeks, mis seob taime arengust tingitud muutused ajaga. Indeks põhineb plastokronil- periood, mis jääb taime tipust üksteise järel moodustuvate lehtede vahele või veelgi täpsemalt, ajavahemik, mis jääb üksteise järel asetsevate lehtede vastavate arengujärgude vahele. Erickson ja Michelini avastasid 1957. a., et kui üksteise järgi asetsevad plastokronid on võrdse kestvusega, siis võib seda kasutada kui ühikut võsu arengut kirjeldaval skaalal kronoloogilise vanuse asemel. Nad esitasid numbrilise indeksi kirjeldamiseks taimede arengujärgust tingitud vanust plastokroniindeks (PI); taime arengu kirjeldamiseks ning sarnaselt esitati ka lehe plastokroniindeks (LPI).

Plastokroniindeks (PI) arvutatakse valemist:

$$PI = n + \log L_n - \log \Lambda / \log L_n - \log L_{n+1}$$

Kus n on noorima lehe järjekorra nr, mille pikkust mõõdetakse, $n+1$ on järgmine leht. L_n ja L_{n+1} tähistavad lehelaba pikkust (mm) indekslehelaba pikkus. Λ määramisel jälgitakse indekslehe pikkust tavaliselt on see 10 või 20 mm.

Lehe plastokroniindeks (LPI) i -ndale lehele arvutatakse $LPI_i = PI - i$, kus i on lehe järjekorra number (alati arvutatakse vanematest lehtedest). Lühemad kui indekslehed on negatiivse LPIga ja indekslehest pikematel on positiivne LPI. Lehtedel mille pikkus vastab Λ -le on LPI null.

Plastokroniindeks toetub järgmistele omadustele a) varajane lehekasv on eksponentsiaalne, b) üksteisele järgnevate lehtede varajane kasv kulgeb sarnase kiirusega c) järjestikused plastokronid ühesuguse pikkusega. (Erickson ja Michelini 1957).

1.8 Kogufotosünteesi (A_n) kiirus ontogeneesi vältel.

Fotosüntees hõlmab endas gaasivahetust lehe ja atmosfääri vahel. Süsihappegaas transporditakse kloroplastidesse ja hapnik vabastatakse atmosfääri. Seda nimetatakse hingamiseks. Kogu fotosünteesikiirus (A_n , ühik $\text{mgCO}_2/\text{m}^2\text{s}$) näitab gaasivahetuse intensiivsust lehe ja atmosfääri vahel.

A_n suureneb lehe arenedes ja saavutab oma maksimumi veidi enne, kui lehe pindala on saavutanud maksimaalse suuruse (Myazawa *et al.*, 2001). Seejärel hakkab A_n vähenema. A_n on tugevasti mõjutatud valguse kättesaadavusest, kõrgel valgusel kasvanud taimede A_n on ligi poole suurem, kui varjus kasvanud taimedel (Haniba *et al.* 2002). A_n ontogeneetiline suund on seotud mitmete areneva lehe parameetritega: kiire lehe pindala juurdekasv, lehe paksenemine ja mesofüllü rakkude pinna suurenemine. Väga noortes lehtedes on kõrge pimehingamine ja seetõttu on nende A_n tunduvalt väiksem. Pimehingamine väheneb ontogeneesi käigus tugevalt ning A_n suureneb. Noorte lehtede mesofüllü õhuruumide takistus (r_i) on tunduvalt suurem, sest rakud on tihedasti pakitud (Miyazawa *et al.*, 1998). Lehe arenedes suureneb ka lehepigmentide hulk. (Hidema *et al.*, 1992) Maksimaalne A_n saavutatakse, kui leht on saavutanud 35-100% oma lõppindalast, kuid igihaljaste taimedes saavutatakse maksimaalne A_n 20-40 päeva peale lehe pindala täis kasvamist (Myazawa 2001). Lehe küpsus fotosünteesi kohalt vaadates tähendab, et A_n on jõudnud platoole, kuigi igihaljastel taimedel võib esineda kuni kolm fotosünteesi maksimumi

peale lehe pindala täis kasvumist (Myazawa 2001). A_n vähenemine lehe vananedes on seotud klorofüll- ja fotosünteesiensiisiumide vähenemisega (Hidema *et al.*, 1992).

1.9 Lehe anatoomia ja ontogeneesi mõju mesofüll-juhtivusele

Gaasivahetuse kiirus sõltub mesofüll- süsihappegaasi juhtivusest (g_i) ja õhulõhede juhtivusest (g_s). Mõlemad komponendid on tugevalt mõjutatud lehe anatoomiast ja anatoomiline struktuur sõltub lehe arengufaasist. Süsihappegaasi molekulidel tuleb kloroplastidesse jõudmiseks liikuda läbi gaasifaasi (i_{as}), milleks on mesofüll-õhuruumid ja vedelafaasi (c_w) milleks on mesofüll- rakkude seinad. Seega:

$$g_i = g_{ias} + g_{cv}$$

Need kaks komponenti määravad mesofüll-juhtivuse millest otseselt sõltub fotosünteesi võimsus pindalaühiku kohta. Enamasti kasutatakse siin mesofüll- takistuse mõistet ($r_i = 1/g_i$). Süsihappegaasi difusiooni kiirust võib korelleerida ka mesofüll- rakkude pindalaga, mis on eksponeeritud rakuvaheruumidele (S_{mes}), sest mida rohkem neid pindu on seda lähemal on ka kloroplastid ja süsihappegaasi difusioonitee lüheneb (Syvertsen *et al.*, 1995).

Süsihappegaasi liikumise kiirus läbi rakuvaheruumide kloroplastidesse sõltub lehe vanusest. Mesofüll- takistus on suurem noortes lehtedes ja väheneb koos lehe küpsemisega ning saavutab stabiilse suuruse kui lehe pindala ja pindtihedus pindalaühiku kohta on lõpetanud suurenemise, sest siis ei suurene enam rakuvaheruumide hulk, mesofüll- rakuseinte paksus ega rakuvaheruumidele eksponeeritud mesofüll- rakkude pindala (S_{mes}) ning kloroplastide hulk. Oluline on just kloroplastide kogupindala (S_c), mis on eksponeeritud rakuvaheruumidele (Syvertsen *et al.*, 1995).

Mesofüll-juhtivus sõltub lehe kasvutingimustest. Optimaalse valguse all kasvanud taimede g_i on suurem kui varjus kasvanud taimedel. Põhjuseks on mesofüll- rakkude suurem hulk pindalaühiku kohta, mis on eksponeeritud rakuvaheruumidele. Kõrgema valguse juures kasvanud lehtede S_{mes} ja S_c on suuremad, kui madala valguse lehtedel. Positiivne korrelatsioon esineb just g_i ja S_c vahel (Hanba *et al.*, 1999). Kõrgemal valgusel kasvanud lehtedel on paksemad rakuseinad (eriti kobekoes vähem mõjutab valgus sammaskoe rakkude seinte paksust) ja see vähendab nende mesofüll-juhtivuse g_{cw} komponenti kuna see suurendab süsihappegaasi difundeerumisteed läbi vedelafaasi.

Õhulõhede juhtivus (g_s) sõltub nende arvust, kujust ja suurusest pindalaühiku kohta. Samuti on ta mõjutatud veestressi poolt, sest taimed sulgevad oma õhulõhed ja nii väheneb ka süsihappegaasi juhtivus, mis oluliselt vähendab fotosünteesi kiirust. Õhulõhede juhtivus nagu ka fotosünteesi

kiirus ja mesofüllü juhtivus suureneb lehe ontogeneesi vältel seejärel saavutab maksimumi ja hakkab siis vähenema (Miyazawa *et al.*, 2001).

1.10 Lehe optiliste omaduste muutumine ontogeneesi käigus.

Lehe fotosünteesi efektiivsuse seisukohalt on oluline lehe võime neelata fotosünteesiliselt aktiivset kiirgust PAR (400-700nm). Ning see korreleerub lehe vanusega. Lehele langev valgus võib kudedelt peegelduda (R), hajuda (S), lehest läbi minna (T) või neelduda ehk absorbeeruda (A). Suhted A, T, R ja S vahel muutuvad lehe arengu käigus ning nende osakaalu väljendatakse protsentides lehe pindalaühiku kohta. Noortes lehtedes on rakud tihedalt pakitud ja absorbeeritava valguse hulk on väike ning suur on lehest läbimineva valguse hulk. See on seotud noortes lehtedes oleva vähese klorofülliga ja kuna rakud on pisemad ja tihedalt pakitud on ka seesmisi valgust püüdvaid pindu tunduvalt vähem ent viimane on otseselt seotud neelduva PAR-i hulgaga.

Valguse peegeldumise määrab rakuvaheruumide ruumala, mille hulk kasvab lehe arenedes nii suureneb ka peegelduva valguse osakaal lehe arenedes. Hajuva valguse osakaal suureneb samuti rakkude hulga-ja mõõtmete kasvades.

Leht absorbeerib PAR-i kõige rohkem, kui tema pindala ja pindtihedus on kõige suurem, see on tingitud kloroplastide arvu suurenemisest raku kohta ning klorofüllü kontsentratsiooni suurenemisest lehe pinnaühiku kohta. Samuti suureneb veega täitunud vakuoolide hulk kuna väga noorte lehtede rakud on täidetud protoplasmaga ja vakuoolid puuduvad. Absorbeerunud kiirgus korreleerub positiivselt lehe pindala ja pindtihedusega ning mõlemad kasvavad ontogeneesi käigus.

Lehe pindtiheduse kasvades pinnaühiku kohta väheneb T oluliselt sest absorbeeriva materjali hulk pindalaühiku kohta suureneb, seega vastupidiselt A-le korreleerub T lehe vanusega negatiivselt kuni lehe küpseks saamiseni. Vananedes hakkab absorbeeriva materjali hulk vähenema ning sama juhtub absorbeeruva PAR-i hulgaga, kuid T hakkab taas suurenema.

Lehe ontogenees on erinevate arengustaadiumite järjestus, mis algab lehepinna moodustumisega ning lõppeb kui leht sureb. Lehelaba erinevad osad sisaldavad erinevas arengujärgus olevaid kudesid. Lehelaba alumises osas toimub alles kudede diferentseerumine, keskel pikkusesse kasv ning laba tipmises osas on kõige vanemad koed ja seega on kudede tihedus lehe erinevates osades erinev, mistõttu on leht valguse neelamise seisukohalt heterogeene süsteem.

Lehtede võime absorbeerida PARi sõltub nende kasvutingimustest. Optimaalsel valgusel kasvanud taimede lehed on suure pingtiheduse ja suure seesmise pindalaga ning seega neelatakse

suurem osa pealelangevast valgusest samuti on rakuvaheruumides hajuva valguse hulk väiksem. Madalal valgusel kasvanud lehtede absorptsiooni võimet vähendab oluliselt valgust püüdvate pindade hulk ent nad sisaldavad palju klorofüllit ja on seetõttu optiliselt paksemad. Veestressi all kannatanud taimede lehed on väikse pindtihedusega ning lehe seesmiste pindade hulk on oluliselt väiksem, samuti väheneb kloroplastide tihedus raku kohta ning klorofüllit kontsentratsioon pindala ühiku kohta seetõttu on nende lehtede absorptsiooni võime väiksem ja transmuteeruva valguse hulk suurem (Choinski *et al.*, 2003).

1.11 Kloroplastide areng ontogeneesi vältel

Eukarüootides on kloroplastid täiesti iseseisvad organellid. Ontogeneetilisel küps kloroplast on läätsekujuline. Nad on ümbritsetud topelt membraaniga ja sisaldavad tülakoidimembraane, mis on jaotatud stroomaks ja graanulaks. Tülakoidis toimuvad fotosünteesi fotokeemilised reaktsioonid ja maatriksis biokeemilised reaktsioonid. Kloroplastid on ühed süsihappegaasi difundeerumist määravad organellid, süsihappegaas liigub tsütosoolist karboksüleerimis tsentrisse.

Noortel lehtedel on kloroplastide hulk pinnaühiku kohta suurem ent nad on väikese läbimõõduga. Lehe ontogeneesi käigus suureneb kloroplastide hulk nii sammaskoe kui kobekoe rakkudes. Plastiidide hulk sammaskoes suureneb niikaua, kui lehe kasv kestab. Kobekoes lõpeb plastiidide arvu suuremine tunduvalt varem. Plastiidide arvukuse tõus pinnaühiku kohta on kiireim enne, kui leht on saavutanud oma maksimaalse pindala. Kloroplastide arv on sammaskoerakkudes tavaliselt kõrgem kui kobekoerakkudes. Kloroplastide juurdekasv on sammaskoe rakkudes kiirem kui kobekoe rakkudes. Lehe ontogeneesi käigus suureneb kloroplastide hulk rakkude kohta nii sammaskoe kui kobekoes 2-10 korda. Keskmise diameeter suureneb ontogeneesi käigus 1.6µm väga noortes lehtedes 6 µm küpsetes lehtedes. Kloroplastide suurenemine on kõige kiirem perioodil millal toimub kõige aktiivsem rakkude jagunemine.

Lehe ontogeneesi vältel suureneb kloroplastide diameeter nii sammaskoe kui kobekoes. Peale maksimumsuuruse saavutamist hakkab vähenema paralleelselt fotosünteesi intensiivsuse ja muude näitajatega. Sarnaselt mesofüllit rakkude pinna suurenemisega ontogeneesi käigus suureneb ka mesofüllit rakkude pind. Kloroplastide diameetri suurenemine on mõjutatud lehe kasvupaiga valguse tugevusest ning vastuseks valguskiirguse tugevusele võivad kloroplastid liikuda rakuseinale lähemale või eemalduda (Miyazawa *et al.*, 2001).

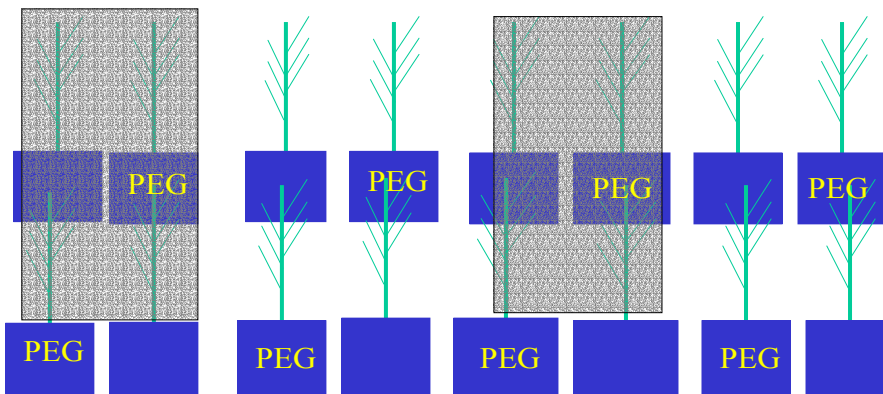
2. Töö eesmärk

Selle töö ülesanne oli läbiviia tundlikkuse analüüs selgitamaks lehtede anatoomiliste tunnuste varieerumise mõju lehtede sisemisele takistusele ja R_i varieerumise mõju lehtede fotosünteesivõimele

MATERJALID JA MEETODID

3.2 Taimed

Kahe aastased ühe *Populus tremula* juurevõsud istutati kevadel Tartus pottidesse (kõrgus 0.22 m. ja diameeter 0.2 m.), mis sisaldasid emapuu kasvukohast pärit mulda. Järgmisel kevadel tõsteti potid kasvukambrisse ja pandi kasvama neljal erineval tingimusel: madalal valgusel ja veestressis; madalal valgusel, ilma veestressita; kõrgel valgusel ja veestressiga; kõrgel valgusel, ilma veestressita . Kõiki taimi väetati iga kolme päeva tagant 0.5 l 0.2% kompleksväetisega “All Purpose Plant Food” (Schultz Company, St Louis, MO, USA). Kolm korda nädalas sai iga taim 0.2 l. Knopi toitelahust (sisaldas 48.9 H₃BO₃, 9.58 MnCl₂*4H₂O, 8.35 KI, 3.41 TiO₂, 3.27 LiCl, 1.16 KBr, 1.04 NiSO₄*7H₂O, 0.936 Co(NO₃)₂*6H₂O, 0.795 Al₂(SO₄)₃*18H₂O, 0.614 SnCl₂*2H₂O- kontsentratsiooni ühik on µM). Suhteline õhuniiskus oli kambris 70%, fotoperioodi pikkus 14 tundi. Fotosünteetiliselt aktiivne kiirus (PAR) oli 700µmol/m²s kõrge valguse taimedel ja 200µmol/m²s madala valguse käes kasvavatel taimedel. Varjutingimuste tekitamiseks kasutati lampide ees tumedat võrku (joon. 1). Veestressi tekitamiseks kasteti taimi polüetüleenglükooliga (polyethylene glycol 6000, Fluka AG, Buchs, Switzerland). Veestressis taimede mulla veepotentsiaal oli -0.6 ja -0.7 MPa.



Joonis. 1 *Populus tremula* taimede kasvatamine . PEG -polüetüleenglükool 6000, veestressi tekitamiseks.

3.2 Valgus- ja elektronmikroskoopia

Anatoomia mõõtmiseks võeti kõigilt erinevas vanuses ja erinevatel tingimustel kasvanud lehtedelt 10, 56 mm korgipuuriga kettad, mis asetati puhvrissse (2.5% glutaaraldehüüdi lahus kakodülaatpuhvriga pH = 7.4) proovid postfikseeriti 2% osmiumtetroksiidis ja dehüdreeriti etanoolireas seejärel sisestati proovid EPON'i vaiku. Kõigil lehtedel võeti kettad laba alumisest osast ja välditi suurte juhtsoonte sisse sattumist..

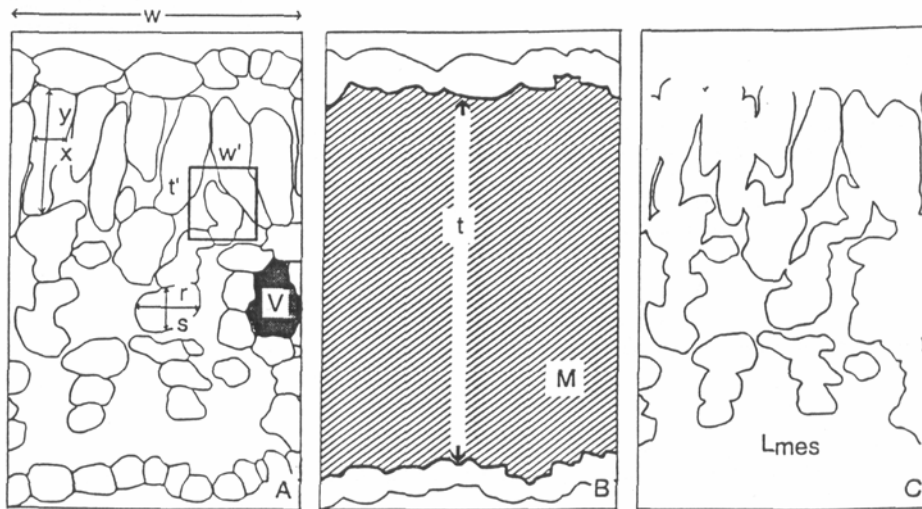
Ultramikrotoomil Reichert lõigati poolpaksud (700nm) valgusmikroskoopia preparaadid ja ultraõhukesed elektronmikroskoobi preparaadid (70nm). Ristlõike vaadati ja pildistati digitaalkaameraga varustatud valgusmikroskoobiga (optiline suurendus 150 – 190 korda) ja analüüsiti Win Folia programmiga (Regent Instruments Inc., Quebec, Canada).

Kasutades sama koetüki valgus- ja elektronmikrofotosid mõõdeti mesofüllil rakkude rakuvaheruumidele eksponeeritud pinna pindala (S_{mes}), kloroplastide rakuvaheruumidele eksponeeritud pinna pindala (S_c) ja mesofüllil kobe- ning sammaskoe rakuseinte paksused. Jälgides Syvertsen *et al.* (1995) poolt pakutud meetodikat määrati S_c ja S_{mes} järgmiselt:

$$S_c = l'_c / l'_{mes} * l_{mes} / W * F, \quad (1)$$

$$S_{mes} = l_{mes} / W * F \quad (2)$$

Valemis kasutatud tähistused: l'_c - joone pikkus, mis tähistab kloroplastide pinna suurust, mis on eksponeeritud rakuvaheruumidele (m); l'_{mes} - mesofüllil rakkude rakuseinte pikkus, mis on eksponeeritud rakuvaheruumidele (m), mis vastab kloroplastide eksponeeritud pinna suurusele; l_{mes} - rakuvaheruumidele eksponeeritud kogu mesofüllil rakkude rakuseinte pikkused, W- lõigu pikkus (m); F on paranduskoefitsient, mis arvestab, et rakud on sfäärilise kujuga s.t neil on erinevad pikkuse ja laiuse suhted. Keskmine laiuste ja pikkuste suhe (x/y) oli palissaatkoel 0.24 mesofüllil rakkude kuju ja palissaatkoe rakkudel 1.2 on 1.51 palissaatkoe rakkudel ja 1.2 kobekoe rakkude puhul (joon 1) (Thain 1983), sellest rakkude kuju arvestav koefitsient: $F = 0.45 * 1.51 + 0.55 * 1.2 = 1.34$. V- tähistab juhtsooni, mõõdetava lõigu pikkus valiti ühest juhtsoonest teiseni.



Joonis 1. Lehe ristlõiget kujutav skeem, mis selgitab anatoomilisi mõõtmisi.

3.3 Klorofüllisisalduse- ja optilise neeldumiskoeffitsendi määramine

10. 56 mm läbimõõduga korgipuuriga võeti katsealuste taimede lehtedelt kettad ning säilitati -18°C juures. Seejärel homogeniseeriti proovid 20% kaaliumfosfaatpuhvris ($\text{pH} = 7.8$) ja 80% atsetonis. Ekstinktsioonikoeffitsendid määrati lainepikkustel: 470; 646.6; 663.6 ja 750 nm.

Lehe optiline neeldumiskoeffitsent leiti integreeriva kera abil. Mõõdeti lehe neeldumist nii otse pealangevas kui ka hajusas valguses ning võrreldi seda musta keha neeldumisega.

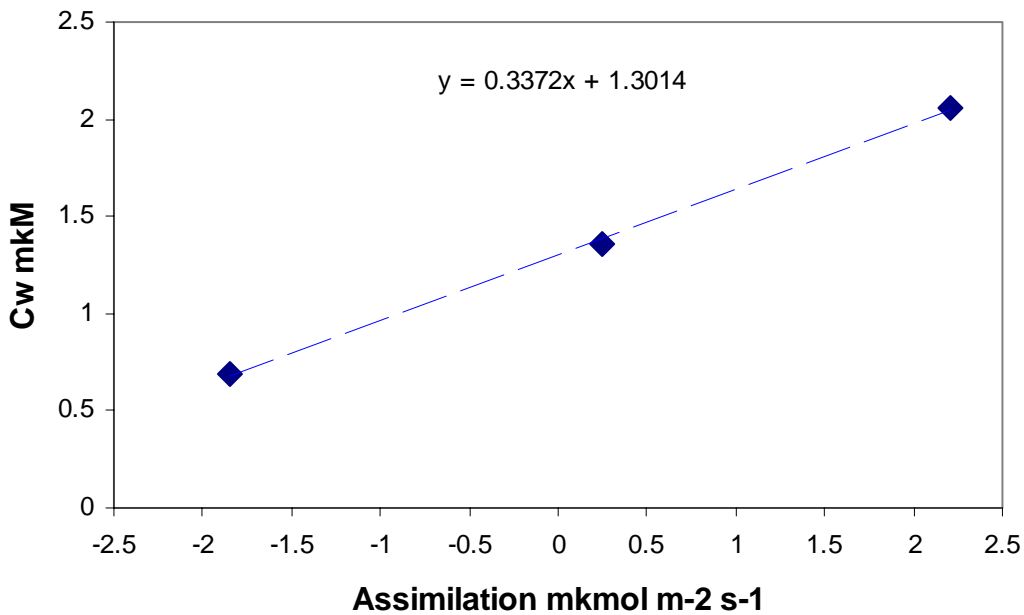
3.4 Gaasivahetuse mõõtmine

Eksperimentides kasutati 2-kanalist kiiretoimelist gaasisüsteemi. Osa lehest suleti mõõtekambrisse. Mõõtekambri diameeter oli 31 mm ja kõrgus 3 mm, gaasivoolu kiirus oli 0.5 mmol/s. Leht fikseeriti tärglisekliistri abil ülemise poolega lehekambri termostateeritava klaasakna külge. Nii suurendati lehe soojusvahetust termostaadi veega ning lehe temperatuur, mida mõjutab pealangev valgus ja transpiratsioon hoiti kontrolli all- kõikides eksperimentides oli see stabiilselt 22°C , et haavalehel lehel õhulõhed ülemisel epidermisel puuduvad ei mõjunud selline kliistriga fikseerimine gaasivahetusele.

Gaasisüsteemi toideti kõrgsurve balloonidest kindla hapniku kontsentratsiooniga gaas. CO_2 kontsentratsiooni reguleeriti monostaadi abil.

Gaasianalüsaatorid paiknesid süsteemi mõõtekanali väljundis. CO₂ kontsentratsiooni mõõdeti infrapuna analüsaatoriga LI-6251 (Li-Cor, Lincoln, NE, USA). Hapniku kontsentratsiooni mõõdeti tsirkoonoksiidelemendiga O₂ analüsaatoriga Ametek S-3A (Thermox, Pittsburgh, PA), mis kalibreeriti 100% O₂ ja välisõhu suhte.

3.5 Mesofüllli seesmise takistuse (R_{md}) arvutamine.



Joonis 2. Mesofüllli seesmise difusioonitakistuse R_{md} arvutamine. Y- teljel on kujutatud C_w - süsihappegaasi rakuvaheruumide kontsentratsioon ja x- teljel süsihappegaasi assimilatsioonikiirus.

Mesofüllli seesmine takistus arvutati kasutades A-C_w tõusu meetodit (joon. 2). Tehti graafik kus Y-teljel oli C_w (süsihappegaasi kontsentratsioon rakuvaheruumides) ja X-teljel A (assimilatsioonikiirus). Sirgevõrrandist arvutatud tõus näitab mesofüllli juhtivust g_i ($R_{md} = 1/g_i$) Evans et al (1994).

3.6 Keemilised ja struktuursed analüüsid

Lämmastiku protsentuaalne sisaldus sisaldused mõõdeti CHNS/O analüsaatoriga (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Inc., Boston, MA, USA).

Lehtede pindala mõõtmiseks skaneeriti lehed lahutusvõime 300 dpi juures arvutisse ja pindalade väärtused leiti programmiga UTHSCA imagetool 2.00 alpha (C. Donald Wilcox, S. Brent Dove, W. Doss Mc David and David B. Greer, Department of Dental Diagnostic science, The University of Texas Health Science Center San Antonio, TX USA.).

Gaasivahetuse mõõtmiseks kasutatud lehed kaaluti kohe peale mõõtmisi ja kuivatati 48 tundi, 70°C juures ning seejärel määrati nende kuivkaalud.

4.TULEMUSED

4.1 Veestressi ja vähese valguse mõju *Populus tremula* lehtede kasvukiirusele

Võrreldi erinevatel tingimustel kasvanud *Populus tremula* lehtede pindala juurdekasvu. Selleks joonistati iga kahe päeva tagant lehe pindala üles. Joonistama hakati päevast, millal lehe pindala oli ligikaudu 30 – 60 mm². Lehte jälgiti täiskasvanuks saamiseni ehk ajani millal lehe pindala enam ei suurenenud. Enamasti jõudis lehtede kasv 15 päevaga platoole, kuid see sõltus puude kasvutingimustest. Kasvu analüüsiti Richardi funktsioonist arvutatud parameetrite abil kust arvutati neli eksponentsiaalset kasvukõverat iseloomustavat parameetrit (tabel 1, joon. 2).

Selgus, et lehe pinna juurdekasv on tugevalt mõjutatud pealelangeva valguse intensiivsusest ning vee kättesaadavusest.

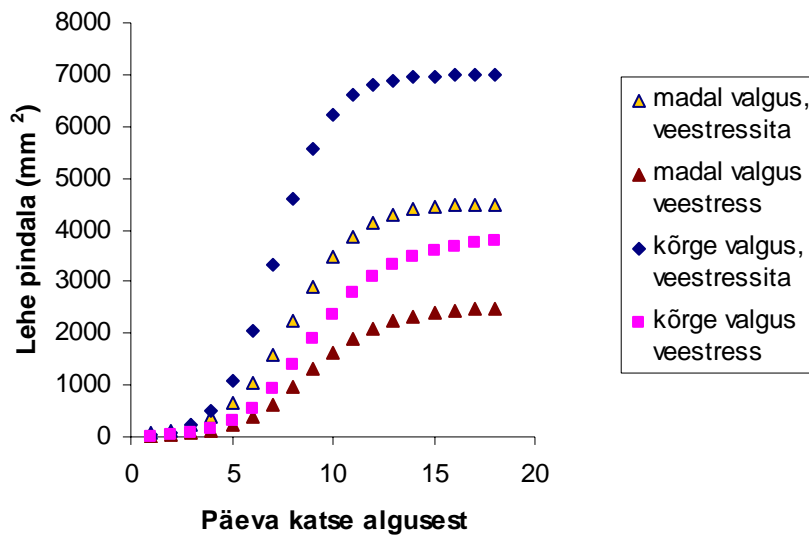
Tabel 1. Erinevate keskkonnafaktorite mõju *Populus tremula* lehtede kasvukiirusele. W_x iseloomustab lehtede lõpppindala (mm²), t_0 - aeg (päevades) millal lehe pindala hakkab iseloomustama eksponentsiaalne tõus, d - iseloomustab kasvukõvera kaju ja r - tõusu kiirus.

Suurus	Mõjur			
	Kõrge valgus, veestressita	Madal valgus, veestress	Madal valgus, veestressita	Kõrge valgus, veestress
W_x (mm ²)	4512	2500	7000	3839
d	1.0	0.65	0.75	0.45
r	0.3	0.3	0.4	0.35
t_0 - aeg (päeva)	8.6	8.6	7.0	8.0

Lõpp-pindala on kõige suurem (7000 mm²) nendel lehtedel, mis olid kasvanud varjutingimustes ja ilma veestressita samal ajal kui kõrge valguse kuid ilma veestressita kasvanud lehtede w_x oli tunduvalt väiksem (4512 mm²).

Kasvutingimustest on mõjutatud ka t_0 ehk päevade arv mis kulub enne kui lehtede pindala juurdekasv kiireneb hüppeliselt. Madalal valgusel ilma veestressita taimedel on see aeg kõige lühem. Lehe pindala hakkab kiiresti kasvama. Madalal valgusel ja veestressiga kasvanud taimede ning kõrgel valgusel ja veestressiga kasvanud taimede t_0 oli ühesugune Kõrge

valguse ja veestressiga taimede lehtedel on see aeg pikem (8.6 päeva). Uurides madala valguse ja veestressita lehti ning kõrge valguse ja veestressiga kasvanud lehti, selgus, et w_x on enam limiteeritud veestressi poolt.



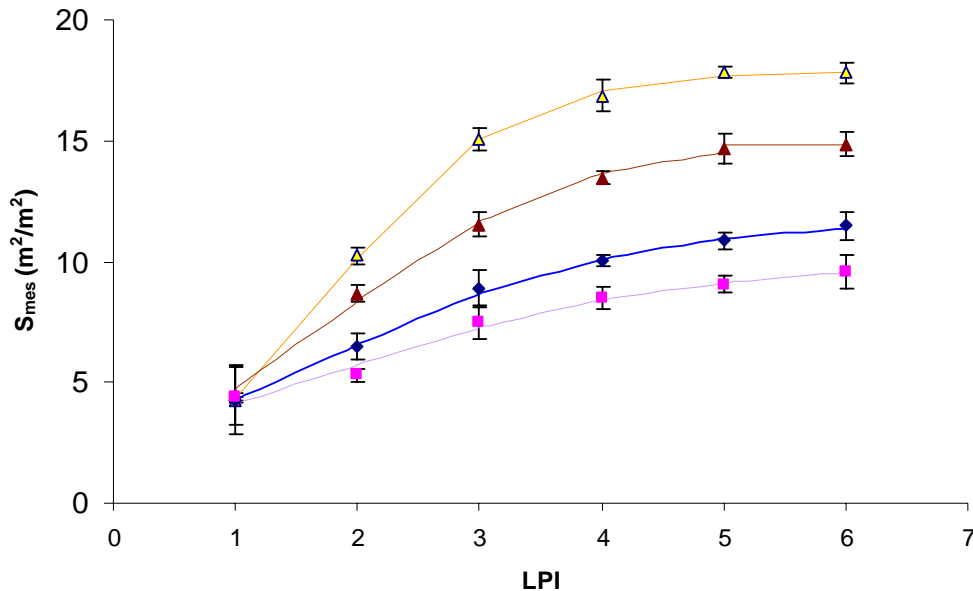
Joonis 3. Erinevate keskkonnatingimuste mõju *Populus tremula* lehtede kasvukiirustele.

Richardsi funktsioon võimaldab mehhanistlikult kirjeldada lehtede kasvu. Käesolev töö näitab, et mitmed selle funktsiooni parameetrid muutuvad stressitingimustes. Nagu käesolevas töös, leidsid kas Cromer *et al.* (1993), et stressitingimustes (vähene N-i ja P kättesaadavus) varieerus eelkõige lehtede lõpp-pindala ja arengu kestus. Seevastu algkasvukiirus oli suhteliselt vähevarieeruv nagu leiti ka käesolevas töös.

4.2 Lehe anatoomia sõltuvus vanusest ja kasvutingimustest

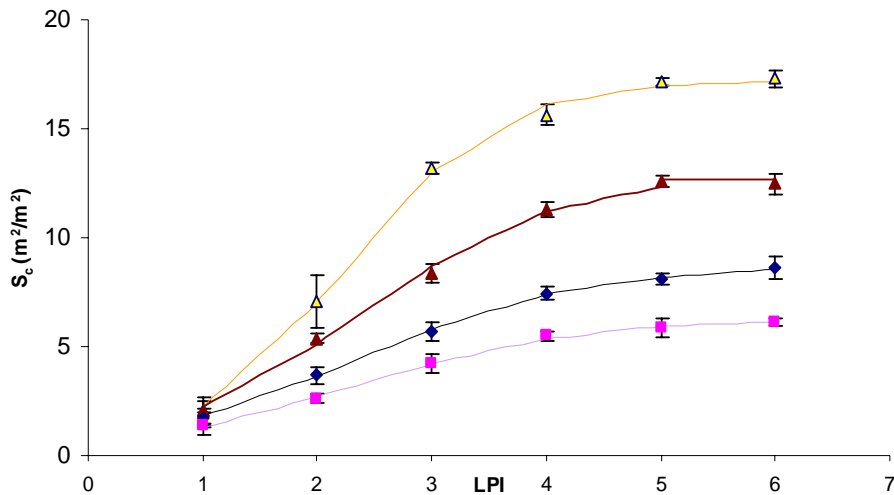
Võrreldi erinevates tingimustes kasvanud ja erinevas vanuses olevaid *Populus tremula* lehtede anatoomiat. Mesofüllirakkude pind, mis on eksponeeritud rakuvaheruumidele (S_{mes}) kasv jõudis kõrgel valgusel ja ilma veestressita kasvanud lehtedel platoole lehtedel plastokrooniindeksiga 4-5. S_{mes} oli kõrgel valgusel ja ilma veestressita kasvanud lehtedel poole suurem, kui varjutatud tingimustes ja veestressis kasvanud lehtedel. Madalaimad S_{mes} väärtused saadi varjus kasvanud taimedel (joon 4). Anatoomilisi parameetreid S_{mes} ; S_c ja S_c/S_{mes} muutumist lehe arengukäigus on uurinud igihaljastel laialehelistel puudel Miyazawa

et. al (2001) ning leidsid, et antud parameetrid kasvasid kuni leht saavutas füsioloogilise küpsuse (FLE), seejärel toimus mõningane kahanemine ja maksimumväärtuse saavutasid nad 20-30 päeva peale FLE-d. *Populus tremula* antud parameetrid saavutavad maksimumsuuruse LPI 4-5 juures ja sealt edasist suurenemist ei toimu.



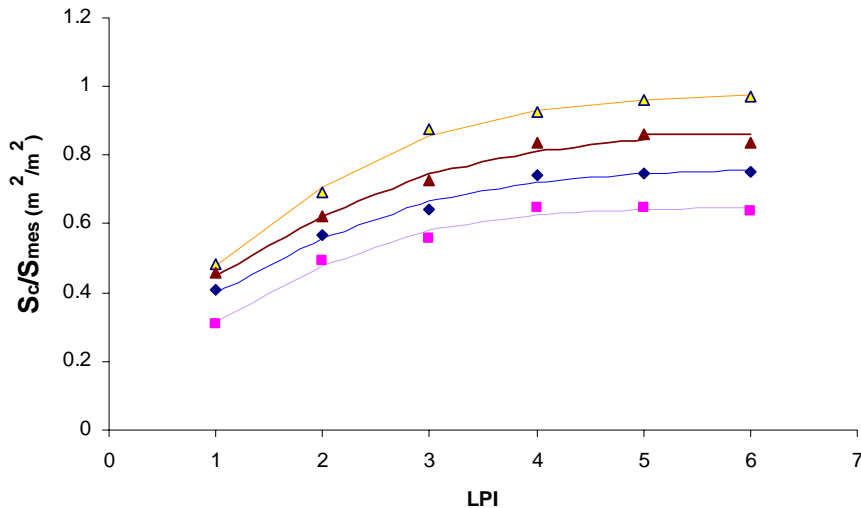
Joonis 4. Seos rakuvaheruumidele eksponeeritud mesofüllli rakkude pinna (S_{mes}) ning lehe plastikrooniindeksi(LPI) vahel. Kõikide katsetingimuste $r^2 < 0.93$. Sümbolid on samad, mis joonisel 3.

Kloroplastide rakuvaheruumidele eksponeeritud suhteline pind oli tunduvalt suurem kõrgel valgusel kasvanud lehtedel kui madalal valgusel kasvanud lehtedel. Kõrgel valgusel, ilma veestressita kasvanud lehtede S_c oli rohkem, kui poole suurem võrreldes madalal valgusel ja veestressis kasvanud taimedega. Erinevalt S_{mes} kasvust, mis saavutab maksimumväärtuse LPI 4 juures jätkud S_c suurenemine kõrgel valgusel kasvanud taimedel. Madalal valgusel kasvanud taimede S_c suurenemine lehe arengujooksul on väike ning saavutab maksimumi koos lehe füsioloogilise küpsuse saavutamisega LPI 4-5 juures.



Joonis 5. Rakuvaheruumidele eksponeeritud kloroplastide suhtelise pinna (S_c) sõltuvus lehe füsioloogilisest vanusest, r^2 kõigi katsetingimuste puhul < 0.97 . Sümbolid samad, mis joon 2.

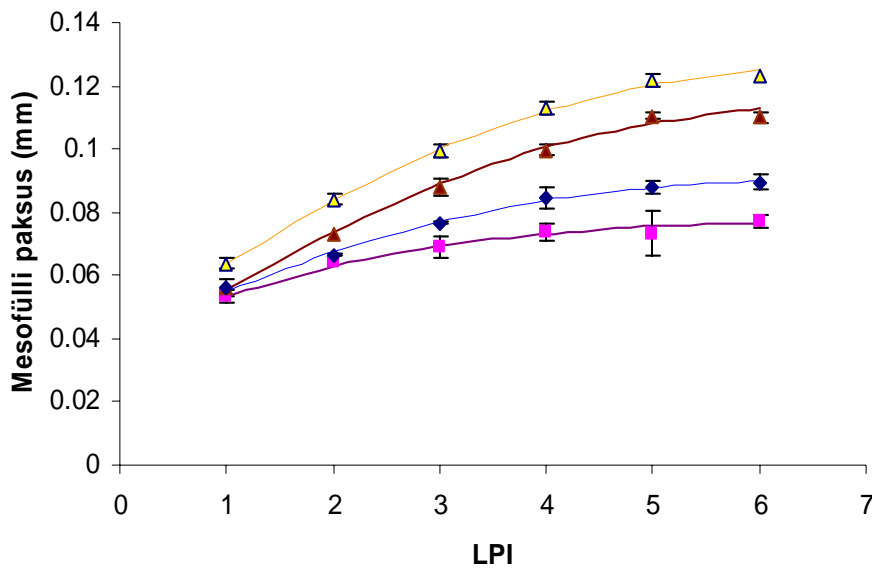
Muutused S_c/S_{mes} (näitab kui suur osa mesofüllil eksponeeritud pinnast on kaetud kloroplastidega) suhtes, lehe arengujooksul, olid erinevatel tingimustel kasvanud lehtedel erinevad. S_c/S_{mes} kasvas koos lehe vanuse suurenemisega ja saavutas maksimumväärtuse kui lehe plastokrooniindeks oli 4-5. Kõrgel valgusel ja veestressita kasvanud lehtede mesofüllil rakuseinad olid täiskasvanuks saades peaaegu täielikult kloroplastidega kaetud. Nende S_c/S_{mes} maksimumväärtus oli peaaegu 1. Kõige suuremad kõrgel valgusel kasvanud lehtedel (joon. 5). Madalal valgusel ja veestressis kasvanud lehtede S_c/S_{mes} oli arengu jooksul vähem muutuv, kui kõrgel valgusel, veestressita ning kõrgel valgusel ja veestressis kasvanud lehtedel.



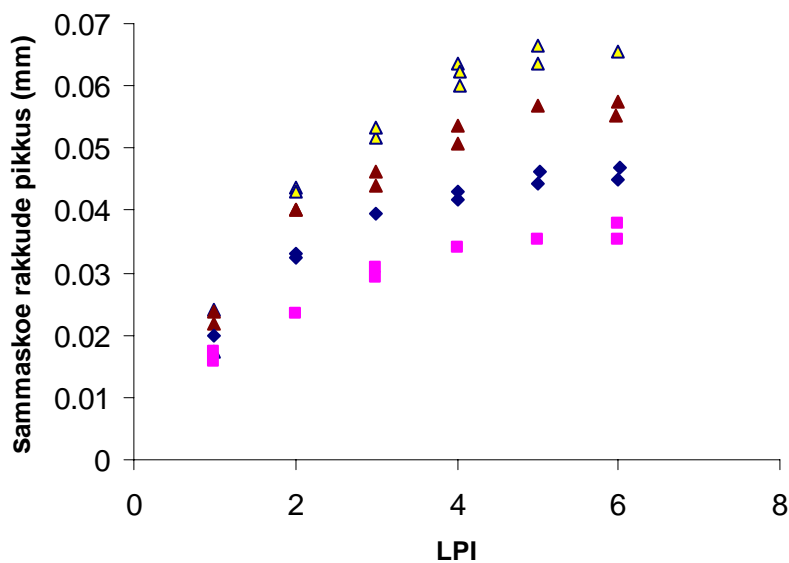
Joonis 6. Suhte S_c/S_{mes} (näitab, kui suur osa mesofüllil eksponeeritud pinnast on kaetud kloroplastidega) sõltumine kasvutingimustest lehe arengu jooksul r^2 kõikidel tingimustel kasvanud taimedel > 0.93 . Sümbolid vt. joon 3.

Kõrgel valgusel kasvanud *Populus tremula* lehtede sammaskude oli kahe kihiline (pilt 1) Mesofüllil paksuse kasv erines lehtedel sõltuvalt kasvutingimustest (joon. 6). Kõrgel valgusel ja ilma veestressita kasvanud lehtede mesofüllil paksus suurenes lehe arengukäigus peaaegu poole võrra (0.06-0.123mm). Seevastu madal valgusel ja veestressitingimustes kasvanud lehtede mesofüllil paksus muutus arengu käigus vahem (0.05-0.07mm). Valguse kättesaadavus oli olulisem limiteerija, sest hoolimata veestressist olid kõrgel valgusel kasvanud lehed paksema mesofülliga, kui madalal valgusel ent veestressita kasvanud lehed. Varjus ja veestressita kasvanud lehtede mesofüllil paksus oli suurem, kui varjus- veestressiga kasvanud lehtedel: vastavalt 0.075 ja 0.084mm. kõrge valguse taimede mesofüllil rakud olid pikemad kui madalal valgusel kasvanud lehtedel (joon. 7). Kõrgel valgusel kasvanud lehtede mesofüllil oli paksem eelkõige pikema sammaskoe tõttu (joon. 6b).

a)



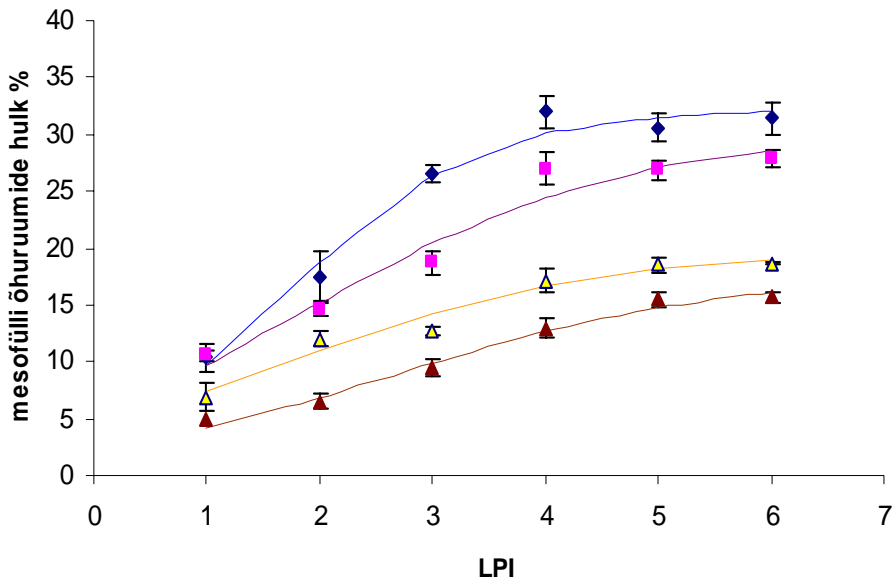
b)



Joonis 7. Mesofüllikoe paksuse ja lehe füsioloogilise vanuse (LPI) vaheline seos: a) mesofüllikoe paksusega; b) sammaskoerakkude keskmise pikkusega- kõrge valguse taimedel mõõdetud sammaskoe esimese kihi rakke.

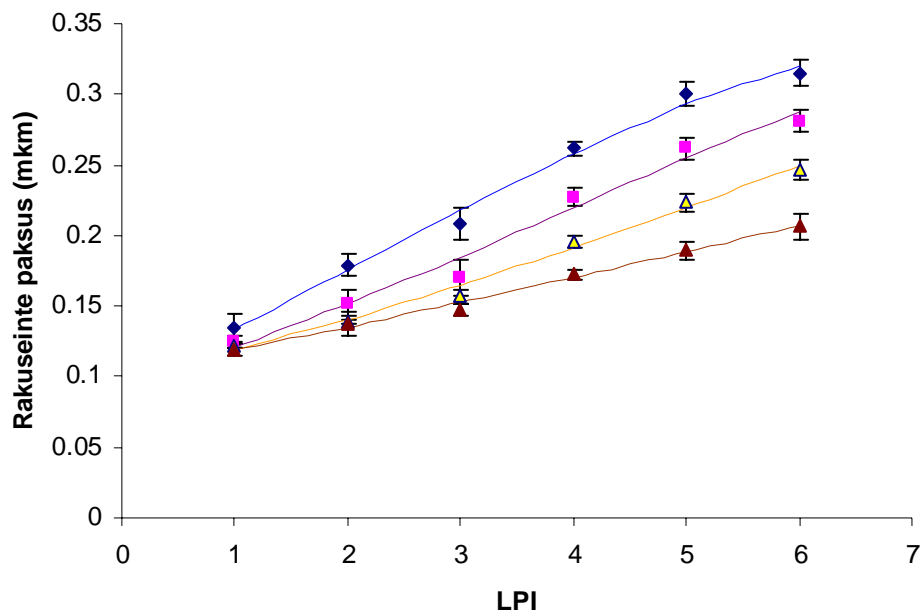
Mesofüllli poorsus (õhuruumide ruumala kogu mesofülliruumalast %) suurenes hoolimata kasvutingimustest kuni lehtede LPI oli 4-5 sealt edasist kasvu ei toimunud. Rakuvaheruumide ruumala protsent (rakuvaheruumide ruumala kogu mesofüllli ruumalast) oli madalal valgusel

ja veestressis kasvanud taimedel 33% ja kõrgel valgusel ning veestressis kasvanud taimedel 12% kogu mesofülliriimulast.



Joonis 8. Õhuruumide poolt okupeeritud mesofülliriimulala seos lehe füsioloogilise vanusega. Kõikidel tingimustel kasvanud taimedel $r^2 < 0.92$. Sümbolid joon. 3.

Kui teised anatoomilised näitajad jõudid LPI 5 juures platoole, siis sammaskoe rakuseinte paksuse ja vanuse vahel esines lineaarne seos. Rakuseinte paksus sõltub kasvutingimustest: stressitingimustel kasvanud lehtede rakuseinad olid õhemad, kui kõrgel valgusel ja veestressita kasvanud lehtedel- $0.242\mu\text{m}$. Vähe erinesid oma paksuse poolest madalal valgusel ja veestressis ning veestressita kasvanud lehtede rakuseinad, LPI 5 juures: vastavalt $0.176\mu\text{m}$ ja $0.182\mu\text{m}$.

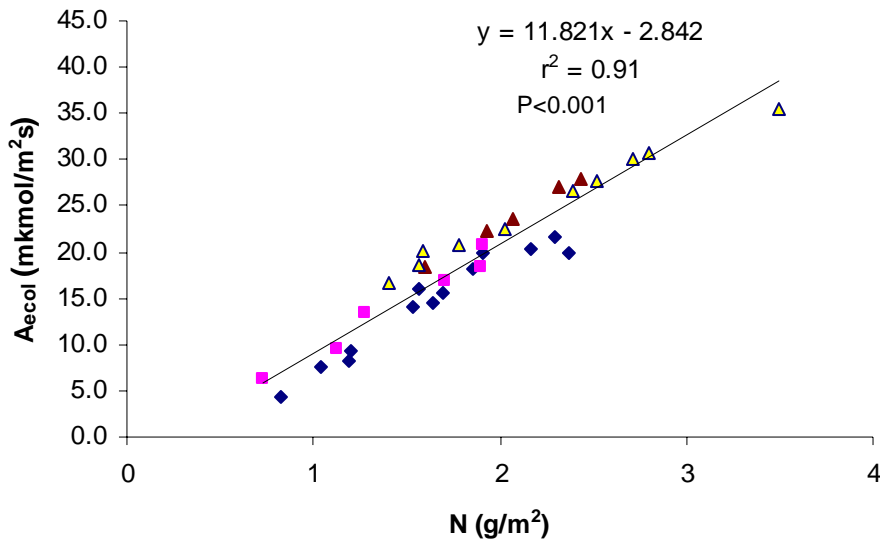


Joonis 9. Rakuseinte paksuse seos lehtede füsioloogilise vanusega (LPI).

4.3 Mesofülli difusioonitakistuse ja fotosünteesikiiruse sõltuvus lehe vanusest ja kasvutingimustest.

Fotosünteesikiirus oli tugevalt seotud lämmastiksisaldusega lehtedes (joon. 9). Kõige kõrgem valgusküllastunud fotosünteesikiirus (A_{ecol}) ja lämmastiksisaldus pinnaühiku kohta oli kõrgel valgusel ja ilma veestressita kasvanud lehtedel ($35.5\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ja $3.5\text{g}/\text{m}^2$). Väikseim fotosünteesikiirus oli madalal valgusel ja veestressis kasvanud lehtedel neil saadi ka väikseimad lämmastiksisaldused ($19.4\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ja $2.23\text{g}/\text{m}^2$).

a)



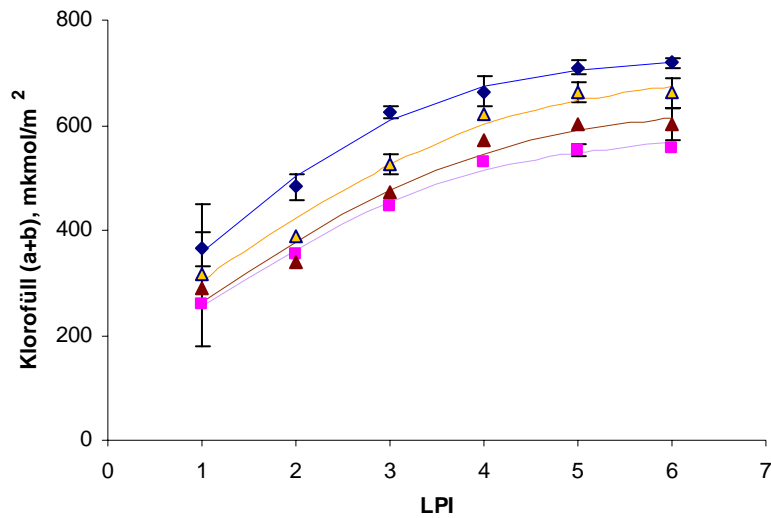
Joonis 10. Seos lehe lämmastikuisalduse (N) ja fotosünteesikiiruse (A_{ecol}) vahel.

Klorofüllisisaldus muutus lehe arengujooksul (joon. 11a). Kõige madalam oli ta noortes lehtedes LPI 1. Noortes lehtedes kasvas klorofüllikontsentratsioon hüppeliselt (LPI 1-4) vanemates lehtedes muutus ta lehe edasisel vananemisel vähe.

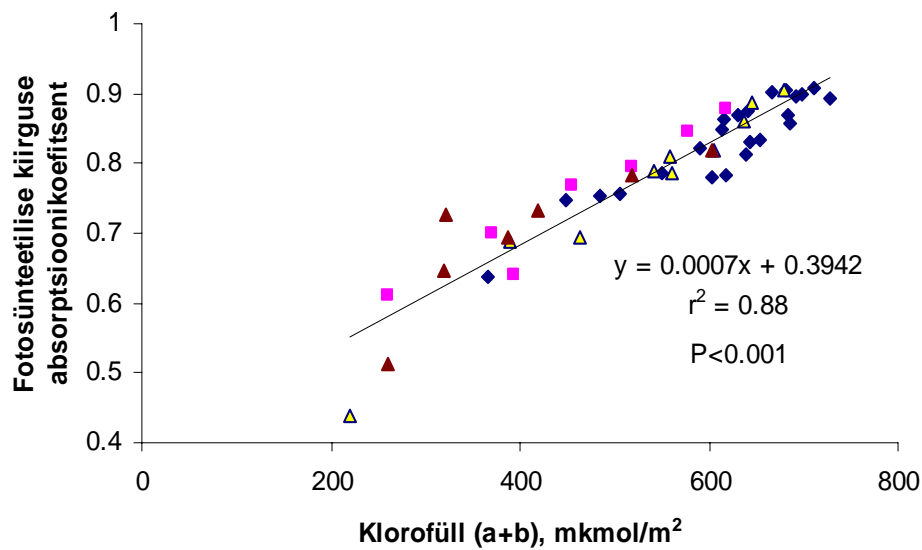
Klorofüllisisaldus sõltus kasvutingimustest. Võrreldes erinevatel tingimustel kasvanud lehti, mille LPI on 6 selgub, et suuremad klorofüllikontsentratsioonid leiti madalal valgusel ja ilma veestressita kasvanud lehtedes ($716.094 \mu mol/m^2$). Madalaimad klorofüllikontsentratsioonid olid kõrgel valgusel ja veestressiga kasvanud lehtedes ($560.331 \mu mol/m^2$).

Lehtede võime neelata fotosünteesiliselt aktiivset kiirgust (PAR) varieerus sõltuvalt kasvutingimustest ning vanusest (joon. 10b). Madalal valgusel ja veestressita kasvanud täiskasvanud lehtede absorptsioonikoefitsent oli kõige kõrgem (0.925) sarnane neeldunud PAR-i hulk oli ka kõrgel valgusel ning ilma veestressita kasvanud lehtedel. Väiksem PAR-i neeldumiskoefitsent oli kõrgel valgusel ja veestressis lkasvanud lehtedel (LPI 5, 0.744) ja madalal valgusel ning veestressis kasvanud lehtedel (0.704).

a)



b)



Joonis 11. Lehe füsioloogilise vanuse seos: a) klorofüllil sisaldusega lehes; b) lehes neelduva fotosünteesiliselt aktiivse kiirguse hulga. Sümbolid joon. 3.

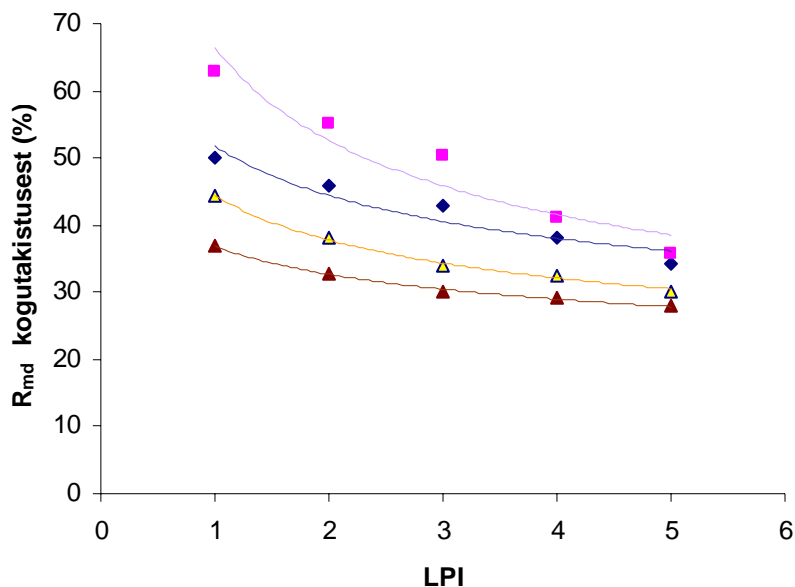
Mesofüllil seesmine difusioonitakistus R_{md} ($R_{ias} + R_{liq}$) korreleerus lehe vanusega kõigil tingimustel kasvanud lehtedel (joon.11b). Erinevatel tingimustel kasvanud lehtede R_{md} väärtused olid väga erinevad. Oluliselt väiksemad R_{md} väärtused olid kõrgel valgusel ja

veestressi tingimustel kasvanud taimedel. LPI 5 juures: kõrge valgus, veestressita 0.01; madal valgus, veestress 0.06; kõrge valgus, veestress 0.03; madal valgus, veestressita 0.028.

Uurides, kui suure osa protsentides, moodustab R_{md} , kogu seesmisest takistusest (R_i), kus on võetud arvesse ka keemilist takistust R_c ($R_i = R_{md} + R_c$). R_{md} osakaal kogu takistusest sai määravaks lehtede vanuse kasvades ja eelkõige stressitingimustes kasvanud taimede puhul. Täiskasvanud lehtedes, LPI 5, moodustas kõrgel valgusel ja veestressis kasvanud taimede R_{md} R_i -st 62%, kõrgel valgusel ja veestressita kasvanud taimedel kuni 34%. Madalal valgusel kuid ilma veestressita kasvanud taimede R_{md} moodustas 33% kogutakistusest, madalal valgusel ja veestressis kasvanud taimede R_{md} moodustas 50% kogutakistusest.

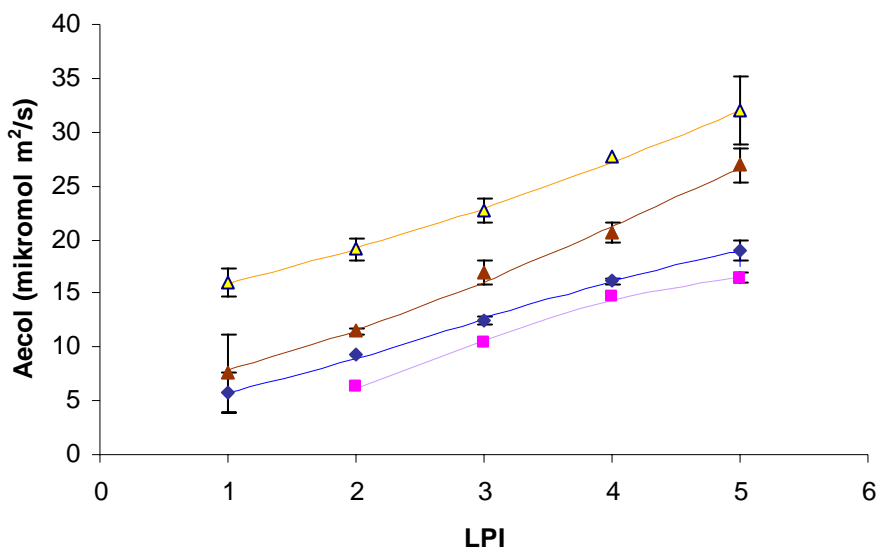
Fotosünteesikiirus (Aecol) oli väiksem noortes lehtedes ja kasvas koos lehe vanusega hüppeliselt kuni plastokrooniindeksini 4 seejärel oli Aecol vähemuutuv. Suurimad Aecol väärtused mõõdeti LPI 5 juures kõrgel valgusel ja veestressita kasvanud lehtedel ($35.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$). Kõrgel valgusel ja veestressitingimustes kasvanud lehtedel, plastokrooniindeksiga 5, oli Aecol $28.2 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$. Väikseimad fotosünteesikiirused olid madalal valgusel kasvanud taimedel, (LPI 5 juures: madal valgus, veestressita $18.9 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ ja madal valgus, veestress $20.3 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$).

a)



b)

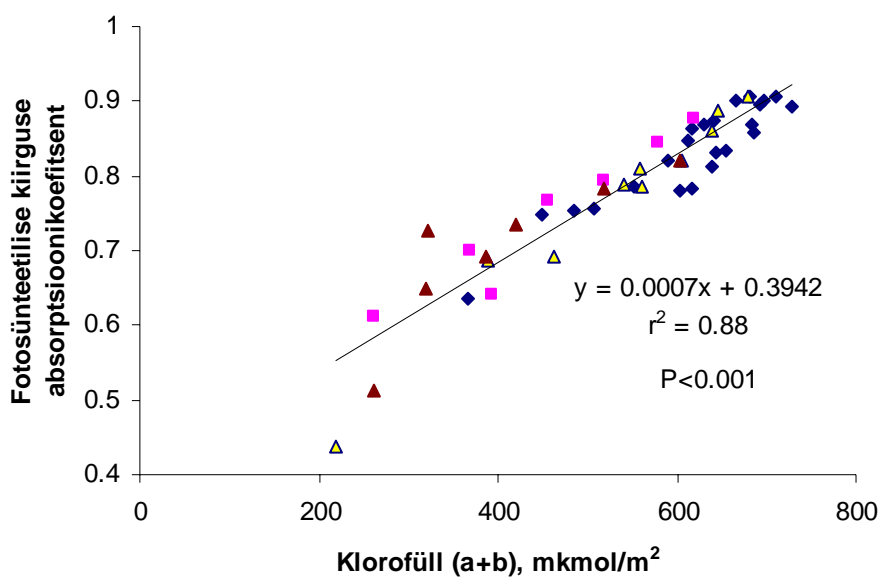
Joonis 12. Lehe füsioloogilise vanuse seos: a) mesofülli seesmise takistusega; b) mesofülli difusioonitakistuse osakaal protsentides kogu seesmisest takistusest (R_i), kõikide katsetingimuste $r^2 < 0.90$. Sümbolid joon. 3.



Joonis 13. Fotosünteesikiiruse seos lehe füsioloogilise vanusega, kõikidel tingimustel kasvanud lehtedel $r^2 < 0.95$. Sümbolid joon.3

4.4 Difusioonitakistuse ja fotosünteesivõime sõltuvus lehe anatoomiast

PAR-i absorptsioonikoeffitsendi ja klorofüllisalduse vahel esines seos (joon. 13). Üldjuhul olid kõrgemate klorofüllisisalduste juures kõrgemad PAR-i neeldumise väärtused. Madalal valgusel ilma veestressita taimedel oli kõrgeim klorofüllisisaldus (joon. 13, 10a), kõrgel valgusel ilma veestressita kasvanud taimedel olid küll madalam klorofüllisisaldus pinnaühiku kohta (ent nende PAR-i neeldumiskoeffitsendid erinesid vähe (madal valgus, veestressita $779.2\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ja 0.92; kõrge valgus, veestressita $650.0\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ja 0.91). Kõrgel valgusel ja veestressis kasvanud lehtede kõrgeim absorptsioonikoeffitsent oli 0.732 kõrgeim klorofüllisisaldus $578.143\mu\text{mol}/\text{m}^2$, madalal valgusel ja veestressis kasvanud lehtedel oli kõrgeim absorptsioonikoeffitsent 0.76 ja klorofüllisisaldus $502.2\mu\text{mol}/\text{m}^2$.



Joonis 14. Seos lehtede fotosünteetiliselt aktiivse kiirguse neeldumise ning klorofüllisalduse vahel. Sümbolid joon. 3.

Seesmine difusioonitakistus (R_{md}) ja mesofüllirakkude rakuvaheruumidele eksponeeritud pinna pindala vahel (S_{mes}) esines kõikidel kasvutingimustel kasvanud lehtedel seos (joon. 14a). Sõltuvalt kasvutingimustest varieerusid maksimaalsed ja minimaalsed S_{mes} -i väärtused ja sellega seotult ka R_{md} (tabel. 2).

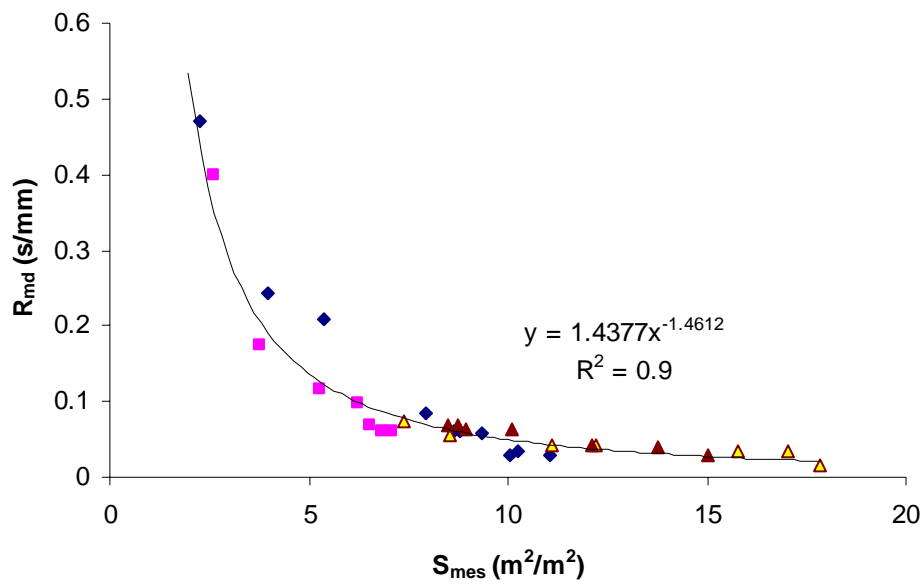
Mesofüllikoe õhuruumide ruumala protsendi ja Rmd vahel esines tugev seos (joon. 14b). Väiksemate õhuvaheruumide osakaalu korral olid väiksemad Rmd väärtused. Võrreldes erinevatel tingimustel kasvanud lehtede suurimat ja väiksemat Rmd vastava lehe õhuruumide ruumala protsendiga kogu mesofüllikoeist: Kõrge valgus, veestressita- 12.04% (õhuruumide ruumala %, joon. 14b) - 0.078s/mm (suurim väärtus) ja 4.6%- 0.0163s/mm (väikseim väärtus); kõrge valgus veestress- 20.04% - 0.148s/mm ja 5.82% - 0.038s/mm; madal valgus, veestressita- 27.53% - 0.209s/mm ja 8.38% - 0.038s/mm ; madal valgus, veestress- 31.2% - 0.175s/mm ja 16.2% - 0.06s/mm.

Erinevatel tingimustel kasvanud lehtede mesofüllikude on erineva paksusega, kuid kõikide tingimuste puhul esines seos mesofüllipaksuse ja seesmise difusioonitakistuse vahel (Rmd).

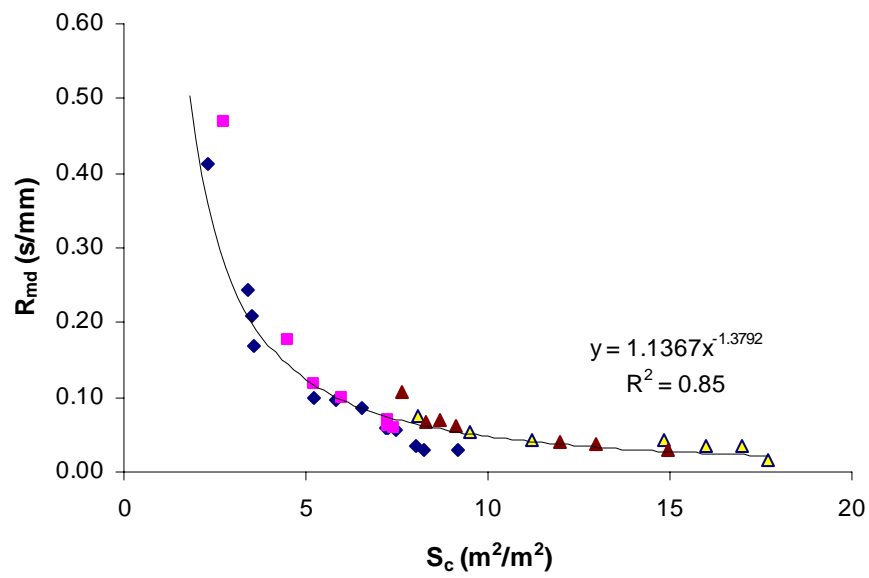
Mesofüllikoe paksuse ja Rmd vahel oli seos (joon. 14c). Võrreldes suurimat ja väiksemat lehe mesofüllipaksust, erinevatel kasvutingimustel, võis näha olulist seesmiste takistuste väärtuste muutumist samal katsetingimustel kasvanud lehtede puhul. Kõrgel valgusel ja ilma veestressita kasvanud taimede väikseimale mesofüllipaksusele 0.029mm vastav Rmd oli 0.128s/mm ja kõige paksemale mesofüllikoele 0.126mm vastav Rmd oli 0.025s/mm. Takistus vähenes 50%. Kõrgel valgusel ja veestressis kasvanud lehtede väikseim mesofüllipaksus oli 0.0304mm ja sellele vastav Rmd 0.148s/mm; suurim mesofüllipaksus – 0.108mm ja sellele vastav Rmd 0.029s/mm. Rmd muutumine samadel tingimustel kasvanud lehtede puhul oli 81%. Madalal valgusel ja veestressita kasvanud taimedel oli suurim mesofüllipaksus 0.0117mm ja sellele vastav Rmd 0.229s/mm; väikseima paksusega mesofüllipaksus 0.097mm ja Rmd 0.038s/mm. Muutumine oli 83%. Madalal valgusel ja veestressis kasvanud taimede suurim mesofüllipaksus oli 0.0196mm millele vastas Rmd 0.175s/mm ning väikseima mesofüllipaksusele 0,0945 vastav Rmd 0.06s/mm. Rmd muutus 34%.

LMA (lehe kuivkaal pinnaühiku kohta g/m^2) ja Rmd vahel esines tugev seos. Üldjuhul vastasid suuremale LMA väärtustele väiksemad Rmd väärtused. Oluline limiteerija oli LMA stressitingimuste puhul kus olid väiksemad LMA väärtused ja suuremad Rmd väärtused (joon. 14d). Kõrgel valgusel, ilma veestressita kasvanud lehtede LMA väärtused- 34.6g/m² – 0.0738; 83.5 g/m²– 0.0163s/mm; kõrge valgus, veestress- 21.3g/m²- 0.147s/mm ja 66.8g/m²- 0.0292s/mm; madalal valgusel ja veestressita- 12.9g/m²- 0.209s/mm ja 47.4g/m²- 0.0292s/mm; madal valgus, veestress 10.76g/m²- 0.175s/mm ja 30.1g/m²- 0.06s/mm.

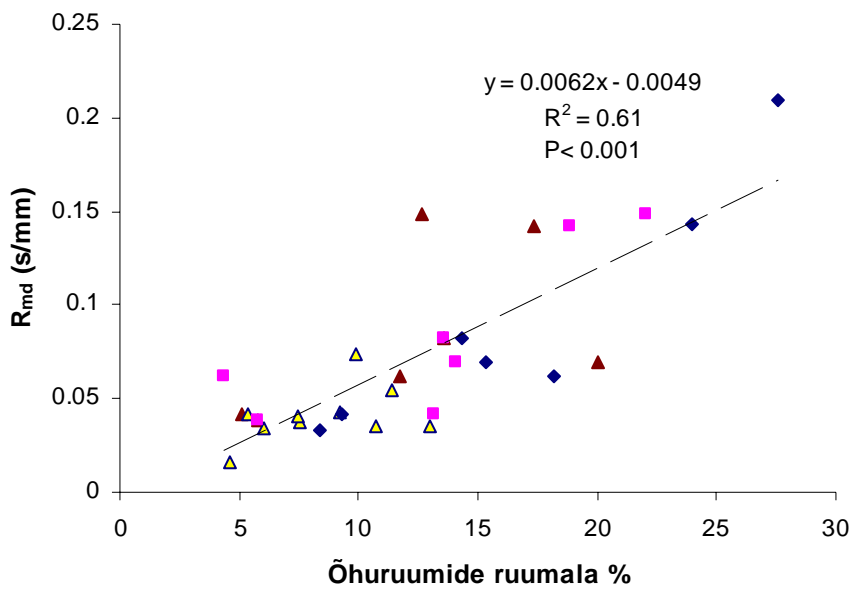
a)



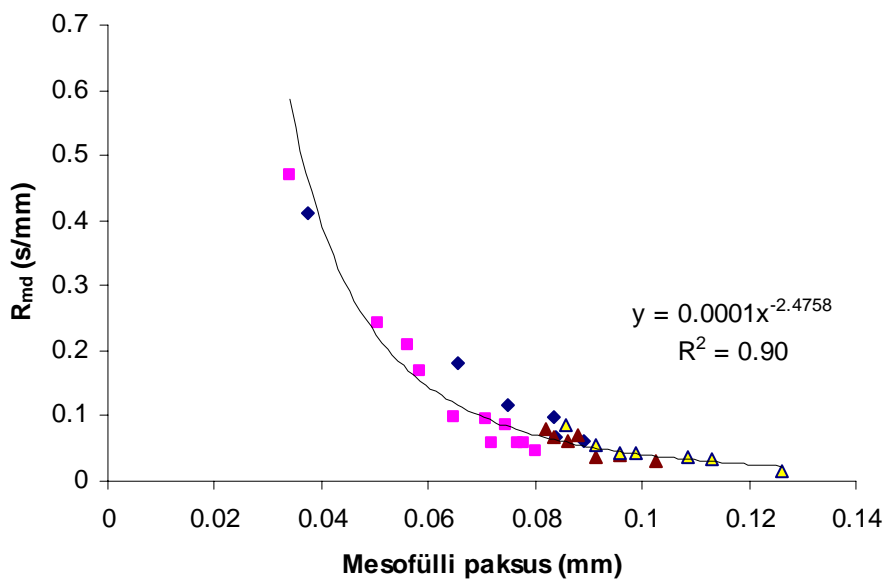
b)



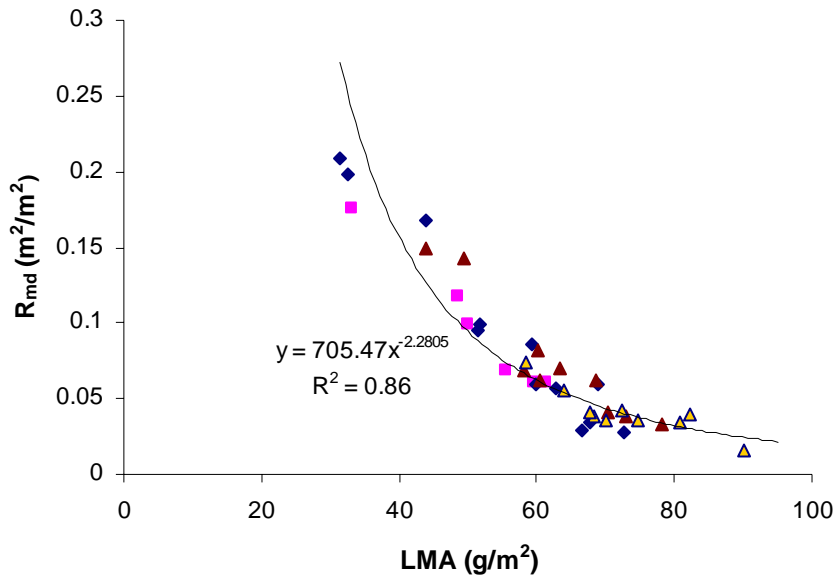
c)



d)



e)

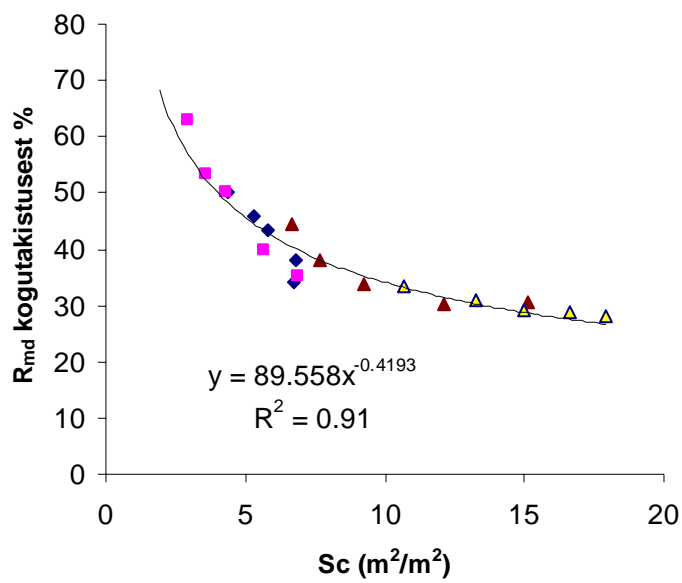


Joonis 15. a) Mesofüllli difusioonitakistuse (R_{md}) seos a) mesofüllli rakuvaheruumidele eksponeeritud pinna pindalaga (S_{mes}); b) kloroplastide rakuvaheruumidele eksponeeritud pinna suurusega (S_c) c) mesofüllli õhuruumide ruumalaga (mõõdetud protsentides); d) mesofüllli paksusga ja e)lehe kuivmassiga pinnaühiku kohta (LMA)

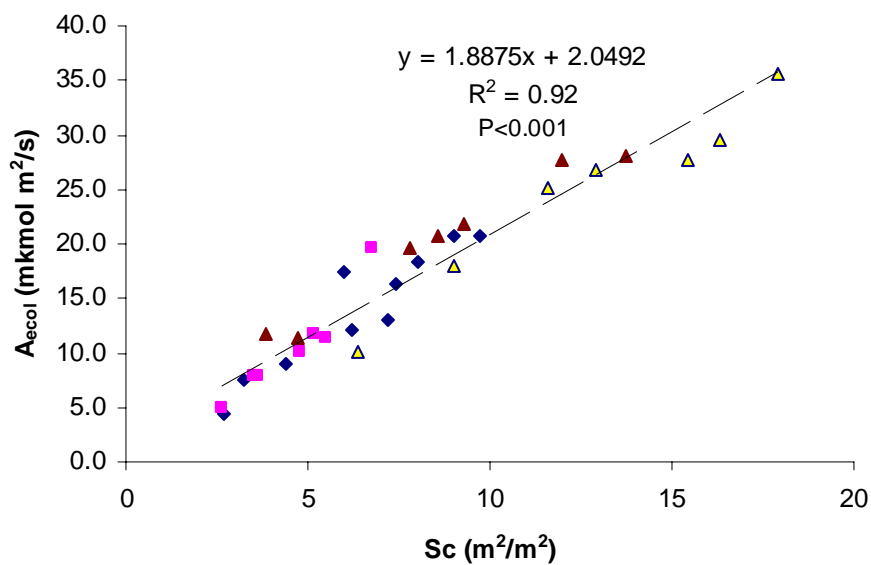
R_{md} hulk kogutakistusest sõltus kloroplastide rakuvaheruumidele eksponeeritud pinna suurusest (S_c) (joon. 15b). Suurim R_{md} osakaal kogu seesmisest takistusest R_i oli kõrgel valgusel ja veestressis kasvanud taimedel 62%, mis mõõdeti lehes mille S_c oli 15.04m²/m². Madalal valgusel ja veestressita kasvanud lehtede R_{md} ulatus 51%-ni R_i -st. Madalal valgusel ja veestressis kasvanud lehtede seesmine takistus ulatus 33%-ni ja kõrgel valgusel ning veestressita kasvanud taimedel moodustas R_{md} 34% R_i -st, S_c oli 17.9m²/m².

Fotosünteesikiiruse (Aecol) ja S_c vahel esines seos (joon. 15b). Kõrgeimad Aecol väärtused mõõdeti kõrgel valgusel ja ilma veestressita kasvanud taimedel, mille S_c oli suurem kui stressitingimustel kasvanud lehtedel: Aecol- 35µmol/m²s; S_c - 17.9m²/m². Väikseim fotosünteesikiirus oli madalal valgusel ja veestressis kasvanud lehtedel: Aecol- 19.6µmol/m²s ja S_c 8.5m²/m². Kõrgel valgusel, veestressiga kasvanud lehtede suurim Aecol: 12.39µmol/m²s ja sellele vastav S_c - 12.39m²/m².

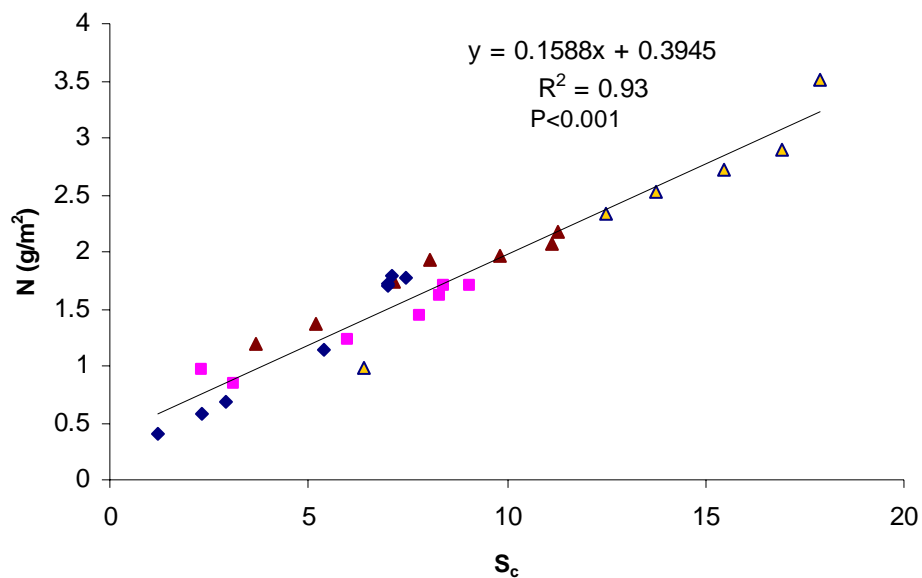
a)



b)



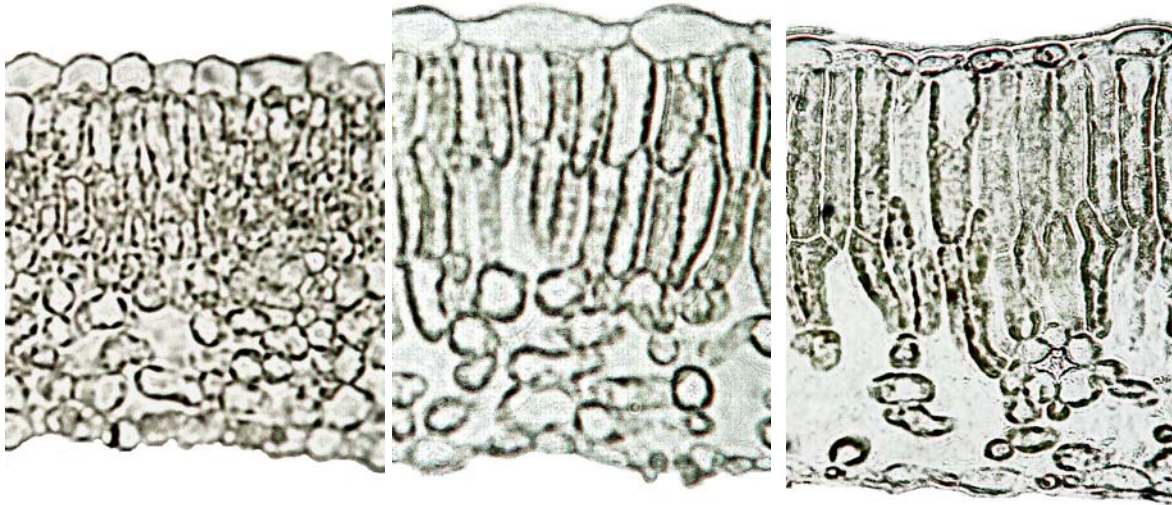
Joonis 16. Kloroplastidele eksponeeritud pinna ja lehe projekteeritud pinna suhte (S_c) seos: a) mesofüllü difusioonitakistusega (R_{md}) kogu takistusest ($R_{md} + R_c$ -keemiline takistus) ja b) fotosünteesikiirusega.



Joonis 17. Seos lehe lämmastikuisalduse (N) ja kloroplastide rakuvaheruumidele eksponeeritud pinna pindala vahel (S_c).

Joonis 17. iseloomustab S_c ja lämmastikuisalduse vahelisi seoseid erinevatel stressitingimustel kasvanud taimedel. Lämmastikuisaldus pinna kohta kasvab S_c suurenedes, kõikides tingimustes kasvanud lehtedel.

a)

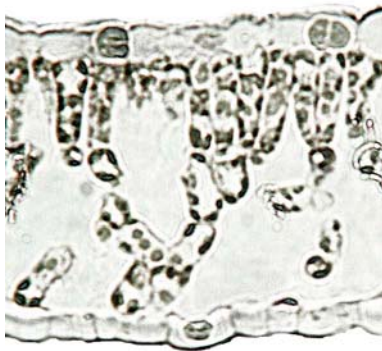


LPI 1

LPI 3

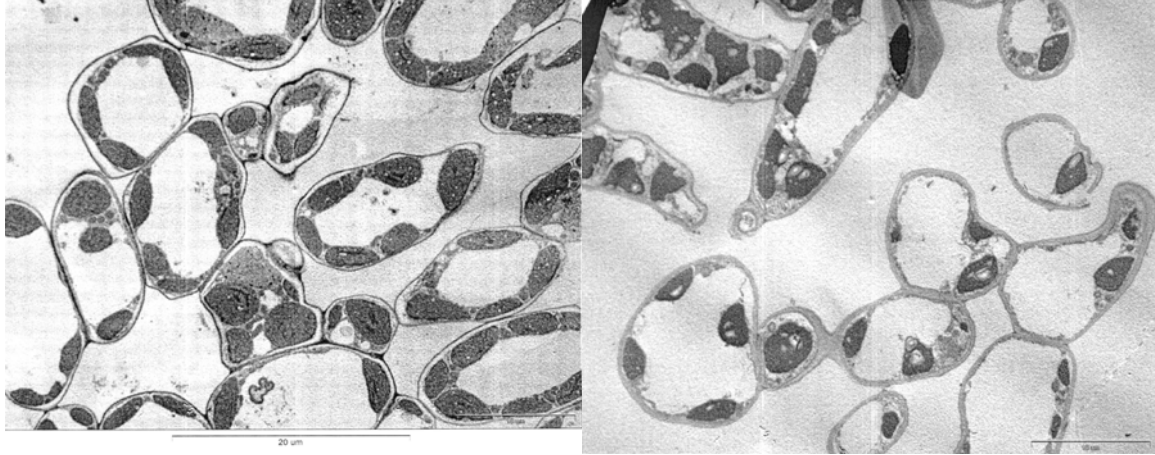
LPI 5

b)



0.1mm

Pilt 2. valgusmikroskoobi fotod *Populus tremula* ristlõigetest: a) kõrgel valgusel jai lma veestressita kasvanud lehed vanuses LPI 1, 3 ja 5.



Pilt 3. TEM fotod kobekoe kloroplastidest. Vasakul pildil on kujutatud kõrgel valgusel ja ilma veestressita kasvanud lehtede kloroplaste ning parempoolsel pildil madalal valgusel ja veestressis kasvanud lehe kloroplast. Joon vasaku pildi allservas kujutab mõõdikut 20 µm ja paremal 10 µm.

5. ARUTELU

Lehtede pindala juurdekasvu kiiruse uurimiseks kasutati Richardsi funktsiooni, mis võimaldab mehhanistlikult kirjeldada lehtede kasvu. Käesolev töö näitab, et mitmed selle funktsiooni parameetrid (joon. 2; tabel. 1) muutuvad stressitingimustes. Nagu käesolevas töös leidsid ka Cromer *et al.* (1993), et stressitingimustes (vähene lämmastiku ja fosfori kättesaadavus varieerus eelkõige lehtede lõpp-pindala ja arengu kestus. Seevastu algkasvukiirus oli suhteliselt vähevarieeruv nagu leiti ka käesolevas töös.

Leht on täiskasvanud, kui tema mesofüllilise paksus, sammaskoe paksus ja mesofüllilise õhuruumide ruumala on saavutanud stabiilse väärtuse (Yano ja Terashima 2004).

Populus tremula S_{mes} , õhuruumide ruumala, mesofüllilise paksus, sammaskoe paksus ja LMA (kuivmass pinnaühiku kohta) ning Sc saavutasid maksimumväärtused kui lehe plastokrooniindeks (LPI) oli 5, sellele vastav lehtede vanus on 14-15 päeva, edas jäi kasv platoole ning hakkas vanades lehtedes aeglaselt (LPI 8) kahanema. See on sarnane rohttaimede (Ticha 1985) ning *Betula pendula* (Laisk *et al.* 2004) täiskasvanuks saamise ajaga. Myazawa *et al.* (2001) leidsid igihaljaste laialeheliste liikide puhul, et mesofüllilise paksus ja õhuruumide ruumala saavutasid maksimumväärtuse ja selt edasi püsis muutumatuna, seevastu õhuruumide ruumala suurenemine saavutas maksimumi, seejärel toimus vähenemine ning ligikaudu 30 päeva peale esimest maksimumi saavutas õhuruumide ruumala väärtus uue maksimumi.

Rakuseinte paksuse kasv jätkus peale seda, kui lehed olid anatoomilise küpsuse saavutanud (joon), sest peale lehtede kasvamise lõppemist hakkab toimuma nende lignifitseerumisprotsess (Brett ja Waldron 1996)

Juba ammu on teada, et lehtede seesmine anatoomiline struktuur sõltub tema kasvutingimustest (eelkõige vee kättesaadavusest ja pealelangeva valguse intensiivsusest) nii ka *Populus tremula* kõrgel valgusel ja veestressita kasvanud lehtede anatoomiline struktuur erines madalal valgusel ja veestressis kasvanud lehtede omast (pilt. 3). Võrreldes *Populus tremula* lehti plastokrooniindeksiga 5, siis madalal valgusel ja veestressis kasvanud lehtede mesofüll oli 40% õhem kui kõrgel valgusel ja ilma veestressita kasvanud lehtedel sama leidsid ka Pandey *et al.* (2005). Paksu mesofüllilise kõrgel valgusel ja ilma veestressita kasvanud

lehtedel oli suurim Smes, mis toetab Nobel et al (1991) ja Evans (1994) ideed, et paksudel lehtedel peaksid olema suuremad Smes väärtused. Selle põhjus võib olla, et paksudel lehtedel on enam arenenud palissaatkude (joon.8), sest palissaatkoel on suurem rakuvaheruumidele eksponeeritud raku pind, kui kobekoel (Turrell 1936).

Kõrge valguse lehtedel oli kahekihiline palissaatkude seevastu madalal valgusel kasvanud lehtedel oli see ainult ühekihiline, sammaskoe rakud olid madalavalguse lehtedel lühemad, kui kõrgel valgusel kasvanutel (joon.15). Õhuruumide ruumala protsent kogu mesofüllil ruumalast oli madalal valgusel ja veestressiga kasvanud lehtedel ligi poole suurem kui kõrgel valgusel ja ilma veestressita kasvanud lehtedel.

Lehtede võime neelata fotosünteesiliselt aktiivset kiirgust (PAR) kasvas lehe vanusega ning saavutas püsiva väärtuse lehtedel, mille $LPI = 5$ (joon. 15). Absorbeeritava PAR-i hulk oli suurim madalal valgusel ja veestressita kasvanud ning kõrgel valgusel ja veestressita kasvanud lehtedel. Noortes lehtedes on rakud tihedalt pakitud ja lehest läbi mineva valguse hulk on suur noortes lehtedes on klorofüllil hulk pindalaühiku kohta väiksem (joon.) ja kuna rakud on väiksemad ning tihedamini pakitud, siis on ka seesmisi valgustpüüdvaid pindu vähe. Valguse peegeldumise määrab rakuvaheruumide ruumala, mille hulk oli suurem madalal valgusel kasvanud lehtedel (joon.8) seevastu oli madalal valgusel ja veestressita kasvanud lehtede klorofüllil sisaldus suurim, mis teeb nad optiliselt paksemaks ja lubab rohkem PAR-i neelata. Veestressi all kannatanud lehed on väikse pindtihedusega ning lehe seesmiste pindade hulk on oluliselt väiksem, samuti väheneb kloroplastide tihedus raku kohta ning klorofüllil kontsentratsioon pindalaühiku kohta (joon.11) seetõttu on nende lehtede absorptsioonivõime väiksem ja läbimineva valguse hulk suurem (Choinski et al. 1993)

Lehtede fotosünteesikiirus kasvas koos anatoomiliste parameetrite (Smes, mesofüllil paksus, sammaskoe paksus) suurenemisega lehe vanuse kasvades ning hakkas platoole jõudma $LPI = 5$ juures. Selline fotosünteesikiiruse kasvu põhjus on lehtede arengukäigus toimuv Rmd vähenemine, mis saavutab miinimumväärtused samuti $LPI = 5$ juures (joon. 5). Noorte lehtede mesofüllil on tihedalt pakitud (Dengler, 1980; Tischa, 1985), nende palissaatkude pole jõudnud täielikult välja areneda ning sellest tulenevalt on nende Smes ja Sc väikesed. Samasugust lehe anatoomiliste ja füsioloogiliste parameetrite koos „täiskasvanuks saamist“ on näidanud ka Miyazawa and Terashima 2001 ning Laik et al. 2004. Selline füsioloogiliste ja anatoomiliste parameetrite üksteisest ja vanusest sõltumine lubas tõstatada hüpoteesi, et lehe fotosünteesivõimsust määravad difusioonilised kitsendused on määratud ontogeneetiliste modifikatsioonide poolt (Miyazawa and Terashima 2001).

Süsihappegaasi difusioon õhulõhedest kloroplastidesse toimub gaasifaasis ja vedelfaasis). Difusioonitakistus gaasifaasis on peamiselt mõjutatud lehe poorsusest (õhuruumide ruumala) ja sellest kas õhulõhed asetsevad ainult alumises või alumises ja ülemises epidermises (Evans ja Von Caemmerer 1996). *Populus tremula* ülemises epidermises õhulõhed puuduvad ning tema kõrgel valgusel kasvanud lehed on suhteliselt paksu mesofülliga (pilt 3, joon 5), siiski esines mesofüllil õhuruumide ruumala ja R_{md} vahel vaid nõrk seos (joon 7, $r = 0.65$), mis näitab, et gaasifaasitakistus (R_{ias}) ei ole *Populus tremula* puhul limiteeriva tähtsusega. Nõrka seost R_{md} ja mesofüllil õhuruumide ruumala vahel näitasid ka Piel *et al.* (2002) ning Hanba *et al.* (1999). Tubakalehtedes, millel on õhulõhed mõlemas epidermises, leidsid Evans *et al.* (1994), et R_{ias} on nii väike, et ta oluliselt R_{md} koguväärtust ei mõjuta.

Mesofüllil vedelfaasi takistus sõltub mesofüllil anatoomilistest omadustest: kloroplastide pinna suurus, mis on rakuvaheruumidele eksponeeritud, S_c (Evans *et al.* 1994), rakuseinte paksus ja koostis (Kogami *et al.* 2001) ja muudest omadustest, mis on seotud membraanide läbilaskvusega (Terashima and Ono 2002).

Mesofüllil difusioonitakistus korreleerus tugevalt LMA ja mesofüllil paksusega ($r = 0.86$ ja 0.89). Kõige suurem mesofüllilipaksus ja LMA väärtused oli kõrgel valgusel ja veestressita kasvanud taimedel ning nende difusioonitakistused olid väiksemad kui stressitingimustes kasvanud õhukese mesofülliga ning väikese pindtihedusega lehtedel. Kui lehe paksus kasvab (kõrge LMA), siis see tekitab vaba ruumi mesofüllirakuseinte äärde, mida võib täita kloroplastidega ja suurendada seega CO_2 assimilatsiooni kiirust (Oguchi *et al.* 2003). Vitousek *et al.* (1990) väitis, et r_{md} võib suurene da kui suureneb LMA, põhjustades positiivse $\delta^{13}C$, käesolevas töös oli R_{md} väiksem suuremate LMA väärtuste juures (joon. 14d). Globaalses skaalas varieerub lehtede LMA rohkem kui suurusjärgu võrra ja on tugevasti korreleeritud lehtede fotosünteesivõimega (Niinemets, 1999; 2000)

Meie töö tulemused näitavad, et S_{mes} -i (mesofüllil rakuvaheruumidele eksponeeritud pinna) suurenemisel kahaneb R_{md} (joon 14a) samuti leidsime, et kõrge valguse taimedel on hoolimata veestressist kõrgemad S_{mes} väärtused ja seega ka väiksemad R_{md} väärtused kui madalal valgusel kasvanud taimedel.

Mesofüllilkoepaksuse ja R_{md} vahel valitses tugev seos. Kõrge valguse lehed olid paksema mesofüllikoega ja neil olid väikseimad R_{md} väärtused. Madalal valgusel ja veestressis kasvanud lehtede mesofüll oli ligi 40% õhem, kui kõrgel valgusel ja veestressita kasvanud taimedel, see tulemus ühtib ka Pandey *et al.* (2005).

Miks suuremad mesofüllil paksuse väärtused on olulised vähendamaks seismist difusioonitakistust ja suurendamaks fotosünteesikiirust? Üheltpoolt suureneb selle arvelt S_c

sest mesofüllli paksuse kasv toimub sammaskoe rakkude pikenemise arvel nagu näitab joon. 6. Seega suureneb Sc suurendades kloroplastide pinda CO_2 neeldumiseks samas väheneb lehtede ülalpidamiseks vajalik kulu. Kui kloroplastide hulk rakus suureneks ilma mesofüllipinna suurenemiseta oleks see ressursside raiskamine sest kõik kloroplastid ei mahuks rakuseina äärde. Lehtede kõrge fotosünteesivõime on seotud paksude lehtedega Terashima et al (2001), samuti on lämmastik investeeritud fotosünteesiensiimidesse (Björkman O. 1981). Sellega on kooskõlas ka *populus tremula* kõrgel valgusel ja ilma veestressita kasvanud lehtede kõrge Sc/S_{mes} , mis oli 0.964- seega peaaegu kogu rakupind oli kloroplastidega kaetud. Seevastu madalal valgusel kasvanud lehtede Sc/S_{mes} suhted olid tunduvalt madalamad (vt pilt 2), kus on näha varjutaimede suured tühjad ruumid rakuseinte ääres). Oguchi et al. (2005) leidsid, et viies madalal valgusel kasvanud täiskasvanud lehed kõrge valguse kätte, siis suurenes nende fotosünteesikiirus, kuid lehe mesofüllipaksus ei muutunud kuid suurenes Sc/S_{mes} just varjus kasvanud lehtede mesofüllirakkude seinääres oleva vaba ruumi arvel.

Suuremad S_{mes} väärtused olid kõrgel valgusel ja veestressita kasvanud lehtedel samuti oli neil väikseimad R_{md} väärtused. Varjus kasvanud lehtedel olid väiksemad S_{mes} väärtused ja suuremad mesofüllitakistused. See ühtib Syvertsen et al. (1994) leidis samuti tsitruuse lehtedes tugeva korrelatsiooni g_i (mesofüllli juhtivus õhulõhedest kloroplastidesse- $R_{md} = 1/g_i$) ja S_{mes} vahel samuti Oguchi et al (2003). Eriti madalad S_{mes} väärtused saadi madalal valgusel ja veestressis kasvanud lehtedel, mille samade S_{mes} väärtuste juures olid teistest tunduvalt kõrgemad R_{md} väärtused madalal valgusel ja veestressita kasvanud lehtedel. Oguchi et al. (2005), näitab lehetede kohastumise katsetes kolme laialehelise puu liigiga; *Betula ermanii* Cam, *Fagus crenata* Blume ja *Acer Rufinerve* Sieb. et Zucc. *Fagus crenata* Blume mesofüllli pind oli täielikult kloroplastide poolt okupeeritud ja tema P_{max} (valgusküllastunud fotosünteesikiirus) ei suurenenud kui ta madala valguse käest kõrgele valgusele viidi. Teisest küljest *Betula ermanii*, varasuktsessionaalne liik, varjulehtedel oli palju kloroplastide poolt okupeerimata pinda mesofüllli rakuseinte ääres see lubas lehtedel fotosünteesikiirust peale valgusele eksponeerimist tublisti tõsta. *Populus tremula* on Kesk-euroopa boreaalsete metsade varasuktsessionaalne liik (Ellenberg 1996) ja valgusnõudlik puu (Bazzazz 1979, Küppers 1998). Varasuktsessionaalsetel liikidel on kõrge fotosünteesiline kohanemispotentsiaal (Oguchi et al. 2005) ning plastiline kloroplastide aklimatiseerumise potentsiaal.

Sc ja R_{md} ning A_{ecol} on omavahel tugevalt seotud ning Sc on ülioluline fotosünteesi kiiruse tõstmise seisukohast. Meie töö näitab, et lehe füsioloogilise küpsuse saavutades LPI 5) ei

suurene enam S_{mes} , mesofüllikoe paksus ning sammaskoerakkude pikkus ent platool ei ole kõrgel valgusel ja ilma veestressita kasvanud lehtede S_c (joon. 3, 4, 6), mis näitab, et kloroplastide eksponeeritud pind võib suurenda ka peale seda kui lehed on oma füsioloogilise küpsuse juba saavutanud. Samas madalal valgusel ja kõrgel valgusel ning veestressis kasvanud lehtede S_c saavutas oma platoo LPI 5 juures, seevastu Hanba et al. (2002) ei saanud ühegi *Aceri* liigi ja S_c vahel märgatavat korrelatsiooni.

Süsihappegaasi difusioon õhulõhedest karboksüleerimispaika toimub gaasifaasis ja vedelfaasis (Evans ja Von Caemmerer 1996). Difusioonitakistus gaasifaasis on mõjutatud lehe poorsusest (õhuruumide ruumala) ja sellest kas õhulõhed asetsevad mõlemas epidermises või ainult alumises. Kui R_{ias} oleks põhiline R_i määraja, siis väheneks R_{md} mesofüllil poorsuse suurenedes. Meie töös esines *Populus tremula* (millel on õhulõhed ainult alumises epidermises) r_{md} ja mesofüllil poorsuse vahel nõrk negatiivne seos (joon 14b), mis lubab oletada, et difusioon gaasifaasis ei ole *Populus tremula* puhul määrava tähtsusega. Nõrka R_{md} ja mesofüllil õhuvaheruumide hulga vahelist seost on näidanud ka Loreto et al (1992), Piel et al. (2002).

Süsihappegaasi difusiooniteed, õhulõhedest kuni rakuvaheruumideni, iseloomustavad andmed korreleeriti kloroplastide rakuvaheruumidele eksponeeritud pinna ja mesofüllil projekteeritud pinna suhe (S_c) (joon. 14b).

Meie töö tulemused näitavad tugevat R_{md} sõltumist S_c -st. Ficki seaduse järgi on süsihappegaasi difusioonikiirus vedelfaasis 10000 korda aeglasem, kui gaasifaasis. S_c on oluline kui aktiivne pind CO_2 difusiooni jaoks (Laisk et al. 1970., Nobel, 1977., Evans and Loreto, 2000., Evans et al. 2004). Seetõttu võib lugeda S_c oluliseks difusioonitakistuse vähendajaks. Silmnähtavat R_{md} vähenemist seoses S_c suurenemisega näitas viiel laialehelisel heitlehelisel puuliigil Hanba et al. (2001).

LPI 5 juures oluline langus fotosünteesikiiruses, mis võib olla seotud paksude rakuseinte ja sellest tulenevast suurest takistusest.

Et Lehtede anatoomia on, globaalses skaalas, mesofüllil õhuruumide hulga poolest tohutult erinev, varieerudes 10-36%-ni (Niinemets 1999). Paksud lehed on fotosünteesipotentsiaaliga, kuid nende õhulõhed asuvad seljuhul mõlemas epidermises, et vähendada difusiooniteed gaasifaasis poole võrra. .

Käesolevas töös on seesmine takistus r_i tugevalt seotud S_c ja S_{mes} -iga sama tulemuseni jõudsid Evans et al. 1994; Syvertsen et al. 1996; Hanba et al. 1999. Erinevad S_c ja S_{mes} muutused mõjutavad r_i -d, mis viib erinevatele Aecol väärtusteni. Teisest küljest rakuseinte paksenemine arengukäigus suurendab vedelfaasitakistust (Nobel 1991).

Kõikidel tingimustel kasvanud taimedel korreleerus S_c Rmd-ga ja Aecol-ga.

Veestressi mõju seesmisele juhtivusele on märkinud ka: Renou et al. 1990, Roupsard et al. 1996, Ridolfi and Dreyer 1997, Brugnoli et al. 1997, Scartazza et al. 1998. kõik leidsid oma töödes suurema olevat CO_2 gradient C_i ja C_c vahel kui C_a ja C_i vahel.

Kuna fotosünteesiapparaat võtab endale ligi poole kogu lehes leiduvast lämmastikust siis ei ole imestatav, et fotosüntees on tubevalt seotud lämmastiku sisaldusega lehes ja Amax suureneb lineaarselt koos lehe lämmastiku kontsentratsiooniga (Field and Mooney 1986).

Meie töö näitab, et R_i pole konstantne ajas vaid muutub lehtede kasvades ja arenedes. Samuti lubavad saadud tulemused eeldada, et R_i pole konstantne ruumis vaid varieerub looduslikes keskkonnagradients. Rakuseinte paksenemine (joon. 9) peale lehtede kasvu lõppemist näitab, et R_i väärtused ei pruugi olla konstantsed isegi täiskasvanud lehtede puhul. Lehtede pindtihedus on

Korrelatsioonid lehtede anatoomiliste tunnuste ja R_i vahel võivad olla fundamentaalse iseloomuga ja seletada lehtede netofotosünteesi variatsioonimustrit läbi kõigi maakera bioomide.

Uurimuse tähtsus teadusele ja tulevikuperspektiivid

Difusioonitakistus rakuvaheruumidest kloroplastideni (R_i) on lehtede biokeemilisi potentsiaale ja lehtede struktuurseid variaableid omavahel siduv kriitiline parameeter. Viimase aja R_i suurt tähtsust demonstreerivate uuringute valguses annavad meie poolt läbiviidud detailsed eksperimendid kaalukad informatsiooni R_i varieeruvuse kohta ja R_i -d määravate mehhanismide kohta .

Detailne arusaam lehesise difusiooni mehhanismidest võimaldab määrata realiseerunud ja potentsiaalse fotosünteesipiirid, mida saab kasutada selektsioonikriteeriumitena ja selektsiooniprotsessi määravate kitsendustena geneetilistes töödes. On selge, et lehtede fotosünteesivõime ei saa kasvada lõpmatult, aga piiranguid mille seavad fotosünteesikiirustele lehtede difusioonitakistused pole siiani kvantifitseeritud erinevate lehestruktuuride jaoks

6. KOKKUVÕTE

Fotosüntees on protsess, mis toimub kloroplastides, mis on agregeerunud keerulise sisemise anatoomilise struktuuriga lehtedesse. Seetõttu mõjutavad ulatuslikud otogeneetilised muutused lehe anatoomias ja morfoloogias ka lehtede fotosünteesi kiirust. Lehtede arengu käigus kasvab lehepind, suurendades fotosünteetiliselt aktiivse kiirguse neelamist. Käesolev töö näitab ka, et lehtede arengu käigus kasvab lehtede paksus eelkõige fotosünteetiliselt kompetentse mesofüllilise paksenemise arvel, samuti suurendades lehtede fotosünteesi intensiivsust lehepinna kohta. Samas muudab mesofüllilise paksenemine süsihappegaasi difundeerumismaa pikemaks, vähendades teatud juhtudel fotosünteesi intensiivsust lehemassi kohta. See uurimus näitab, et lehtede arengu käigus toimuvad muutused lehtede sisemises takistuses süsihappegaasile on üheks peamiseks lehtede fotosünteesi intensiivsust mõjutavaks teguriks. Lisaks näitavad selle töö tulemused ka, et taimede stressitingimustes kasvamine mõjutab lehtede fotosünteesi intensiivsust eelkõige sisemise takistuse muutuste kaudu. Kui varem arvati, et fotosünteesi kiirused arenevates lehtedes on eelkõige limiteeritud biokeemiliste faktorite poolt, siis selle töö tulemused rõhutavad anatoomiliste muutuste olulisust. Puhtfüüsikaline protsess – lehe sisene difusioon – võib olla sama oluline kui biokeemilis-füsioloogilised muutused, eriti just stressitingimustel kasvanud taimedes.

7. SUMMARY

Leaf photosynthesis occurs in chloroplasts, but the chloroplast are embedded in a complex leaf anatomical framework. Therefore, the marked changes in leaf anatomy and morphology during leaf ontogeny substantially contribute to developmental changes in leaf photosynthesis.

This study demonstrates that the rates of leaf photosynthesis are particularly sensitive to accumulation of photosynthetic tissue in developing leaves as well as to developmental changes in internal mesophyll resistance to CO₂. Increases in leaf area during leaf ontogeny imply a greater area for interception of radiant energy and photosynthesis, while increases in leaf thickness imply more photosynthetic mesophyll per unit leaf area. However, thicker leaves also imply a longer internal diffusion pathway for CO₂.

Our study further indicates that the values of leaf anatomical parameters are strongly modified by various environmental factors, even though the general developmental pattern is maintained also in stressed plants. The environmental stresses primarily modify leaf photosynthetic potentials due to changes in leaf area, but also due to enhanced internal diffusion resistance.

8. KASUTATUD KIRJANDUS

- Bazzazz, F.A. 1979. The physiological ecology of plant succession. *Annual Rev. Ecol. Syst.* 10:351-371. Björkman O. (1981)
- Boardman N.K. (1997) Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annual Review of Plant Physiology* 28, 355-377.
- Choinski, J.S., Ralph, P., Eamus, D. (2003). Changes in photosynthesis during leaf expansion in *Corymbia gummifera*. *Australian Journal of Botany*, 51, 111-118.
- Cromer, R.N., Kriedmann P.E., Sands, P. J., Stewart, L. G. (1993). Leaf Growth and Photosynthetic Response to Nitrogen and Phosphorus in Seedling Trees of *Gmelina arborea*. *Aust. J. Plant physiol*, 20, 83-90.
- Dengler, N.G. (1980). Comparative histological basis of sun and shade leaf dimorphism. *Helianthus annuus*. *Can J. Bot*, 58, 717-730.
- Dengler, Nancy. G., Mackay, L. B., Gregory, L. M. (1973). Cell enlargement and tissue differentiation during leaf expansion in beech, *Fagus grandifolia*. *Can. J. Bot*, 5, 2846- 2865.
- Dickmann, D. (1971). Photosynthesis and respiration by developing leaves of cottonwood. *Bot. Gaz.*132, 253-259.
- Dyhstra.M.J. A manual of techniques for biological electron microscopy. Plenum press New York and London 1993
- Eichelmann, H., Oja,V., Rasulov, B., Padu, E., Bichele, I., Pettai, H., Vapaavuori, E., Niinemets, Ü., Laisk, A. (2004). "Leading role of photosystem I in development of leaf photosynthetic activity in *Betula bendula*." (in press).
- Eichelmann, H., Oja, V., Rasulov, B., Padu, E., Bichele, I., Pettai, H., Möls, T., Kasparova, ., Laisk, A. (2004). Photosynthetic parameters of birch (*Betula bendula* Roth) leaves growing in normal and CO₂- and O₃- enriched atmospheres. *Plant, Cell and Environment*, 27, 479-495.
- Ellenberg Eerickson, R. O., Michelini, F. J. (1957). The Plastochron Index. *Amer. J.Bot.* 44: 297-305.
- Evans J.R., von Caemmerer S., Stchell B.A. and Hudson G.S (1994) The relationship between CO₂ transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with

- a reduced content of Rubisco. *Australian Journal of Plant Physiology* 21, 475-495.
- Evans, J.R and Von Caemmerer, S. (1996) Carbon dioxide diffusion inside leaves. *Plant Physiology* 110, 339-346
- Field, C.B and Mooney, H.A. (1986) The photosynthesis- nitrogen relationships in wild plants. In: *On the economy of plant form and function*, T.J. Givinish (ed). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 25-55.
- Hanba Y.T., Miyazawa S.-I. And Terashima I. (1999) The influence of leaf thickness on the on the Species in Japanese warm te
Species in Japanese warm temperate forests. *Functional Ecology* 13, 632-639
- Honda S.I and Wildman S.G (1971) Interpretations on chloroplast reproduction derived from correlations between cells and chloroplasts. *Planta* 97, 1-15
- Küppers, M (1989) Ecological significance of aboveground architectural patterns in woody plants: a question of cost-benefit relationships. *TREE* 4:375-379.
- Von Caemmerer S. and Farquhar G.D. (1981) Some relationships between biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153, 376-387.
- Pachepsky, L. B., and Acock, B. (1996) A model 2 DLEAF of gas exchange: development, validation and ecological application. *Ecol. Model* 93:1-18.
- Parkhurst D.F . and Mott K.A (1990) Intercellular diffusion limits to CO₂ uptake in leaves. *Studies in air and helox. Plant Physiology* 94, 1024-1032.
- Parkhurst, D. F. (1994) Diffusion of CO₂ and other gases inside leaves. *New Phytologist* 126:449-479.
- Piel, C., Frak, E., Le Roux., X., and Genty, B. (2002). Effects of local irradiance on CO₂ transfer conductance of mesophyll in walnut. *J. Exp. Bot.* 53:2423-2430.
- Pyke K.A. (1999) plastid division and development. *Plant Cell* 11, 549-556.
- Terashima, I., Miyazawa, S. I and Hanba, Y. T (2001) Why are sun leaves thicker than shade leaves? Consideration based on analyses of CO₂ diffusion in the leaf. *J. Plant. Res.*114; 93-105.
- Haniba, Y. T., Miazawa, S.-I., Terashima, I. (1999). The influence of leaf thickness on the CO₂ transfer conductance and leaf stable carbon isotope ratio for some evergreen tree species in Japanese warm temperate forests. *Functional ecology* 13, 632-639.

- Haniba, Y.T., Kogami, H., Terashima, I. (2002). "The effect of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in Acer species differing in light demand." *Plant, Cell and Environment*, 25, 1021-1030.
- Hikosaka, K. (1996). "Effects of leaf age, nitrogen nutrition and photon flux density on the organization of photosynthetic apparatus in leaves of a vine grown horizontally to avoid mutual shading of leaves." *Planta* 198, 144-150.
- Isebrands, J. G., Larson P. R. (1973). "Anatomical changes during leaf ontogeny in *Populus deltoides*." *Amer. J. Bot*, 60, 199-208.
- Miyazawa, S.-I., Terashima, I. (2001). "Slow development of leaf photosynthesis in an evergreen broad-leaved tree, *Castanopsis sieboldii*: Relationships between leaf anatomical characteristics and photosynthetic rate." *Plant, Cell and Environment*, 24, 279-291.
- Miyazawa, S., Shigenari, Terashima, I. (1998). "Slow Leaf Development of Evergreen Broad-leaved Tree Species in Japanese Warm Temperate Forests." *Annals of Botany*, 82, 859-869.
- Miyazawa, S.-I., Makino, A., Terashima, I. (2003). Changes in mesophyll anatomy and sink-source relationships during leaf development in *Quercus glauca*, an evergreen tree showing delayed leaf greening. *Plant, Cell and Environment*, 26, 745-755.
- Muraoka, H., Tang, Y., Terashima, I., Koizumi, H., Washitani, I. (2000). Contributions of diffusional limitation, photoinhibition and photorespiration to midday depression of photosynthesis in *Arisema heterophyllum* in natural high light. *Plant, Cell and Environment*, 23, 235-250.
- Greer, D. H. (1996). Photosynthetic development in Relation to Leaf Expansion in Kiwifruit Vines during growth in a controlled Environment." *Aust. J. Plant Physiol*, 23, 541-549.
- Niinemets, Ü., Bilger, W., Kull, O., Tehunen, J. T (1999). "Responses of foliar photosynthetic electron transport, pigment stoichiometry, and stomatal conductance to interacting environmental factors in a mixed species forest canopy." *Tree Physiology* 19, 839-852.
- Niinemets, Ü., Kull, O. (1998). "Stoichiometry of foliar carbon constituents varies along light gradients in temperate woody canopies: implications for foliage morphological plasticity." *Tree Physiol*, 18, 467-479.

- Niinemets, Ü., Kull, O., Tehunen, J. T. (1997). An analysis of light effects on foliar morphology, physiology, and light interception in temperate deciduous woody species of contrasting shade tolerance.” *Tree Physiology*, 18, 681- 696
- Niinemets, Ü., Kull, O., and Tehunen, J. (2004) Within canopy variation in the rate of development of photosynthetic capacity is proportional to integrated quantum flux density in temperate deciduous trees. *Plant Cell Environment*. 27, 293-313.
- Nobel, P. S. (1976). “Photosynthetic rates of sun versus shade leaves of *Hyptis emory* Torr.” *Plant Physiol*, 58, 218 - 223.
- Nobel, P. S. (1991) *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. Academic Press, San Diego.
- Oguchi R, Hikosaka K, Hirose T. (2003) Does the photosynthetic light acclimation need change in leaf anatomy? *Plant, Cell and Environment* 26, 505-512.
- Oguchi R, Hikosaka k, Hirose T. (2005) Leaf anatomy as a constraint of photosynthetic light acclimation: differential responses in leaf anatomy to increasing growth irradiance among three deciduous trees. *Plant, Cell and Environment*. 28, 916-927.
- Pieters, G. A. (1974). “The growth of sun and shade leaves of *Populus euamericana* in relation to age, light intensity and temperature.” *Can. J. Plant. Sci*, 59, 1067-1095
- Porra, J.R. (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research* 73, 149-156.
- Rawson, H. M., Hackett, C. (1974). An exploration of the carbon economy of the tobacco plant. *Aust. J. Plant Physiol*, 1, 551-560.
- Renou, J.L., Gerbaud, A., Just, D., Andre, M. (1990). Differing substomatal and chloroplastic CO₂ concentrations in water stressed wheat. *Planta* 182: 415-419.
- Ridolfi, M and Dreyer, E (1997) Responses to water stress in ABA –unresponsive hybrid poplar. *New Phytologist* 135:31-40.
- Syvertsen, J. P., Lloyd, J., McConchie. C., Kriedemann, P.E., Farquhar, G.D. (1995). “On the relationship between leaf anatomy and CO₂ diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves.” *Plant, Cell and Environment*, 18, 149-157.
- Terashima I, Ono K (2002) Effects of HgCl₂ on CO₂ dependence of leaf photosynthesis: evidence indicating involvement of aquaporins in CO₂ diffusion across the plasma membrane. *Plant and Cell Physiology* 43, 70-78.

- Thain J.F. (1983) Curvature correction factors in the measurement of cell surface areas in plant tissues. *Journal of Experimental Botany* 34, 87-94.
- Valladares, F and R. W. Pearcy. (1997) Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. *Plant, Cell and Environment*. 20: 25-36.
- Valladares, F and R. W. Pearcy. (2002) Drought can be more critical in the shade than in the sun: a field study of carbon gain and photoinhibition in a Californian shrub during a dry El Nino year. *Plant Cell and Environment* , 25, 749 – 759.
- Vitousek, P.M., Field ., Field, C. B and Matson, P. A. (1990) Variation in foliar Po^{13} in Hawaiian *Metrosideros polymorpha*: a case of internal resistance? *Oecologia* 84, 362- 370.
- Vogelmann, T.C. (1993) “Plant tissue optics.” *Plant Mol. Biol*, 44, 231-252.
- Wright, J., Reich, P. B., Westboy, M., Ackerly, D., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender, J., Chapin, T., Diemer, M., Flexas, Jaume., Garnier, E., Gulias, J., Hikosaka, K., Lee, Tali., Lusk, C., Niinemets, Ü., Oleksyn. J., Poorter, H., Poot, P., Prior, L., Roumet, C., Thomas, S.C., Tjoelker, M. G., Veneklaas, E. J., Villar, R. (2004) “The worldwide leaf economics spectrum.” *Nature*, 428, 821 –827.
- Yano, S and Terashima, I. (2004) Developmental process
- Zdenek Š. (ed.) “Photosynthesis during leaf development” Praha 1985

