

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR-JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
BIOFÜÜSIKA JA TAIMEFÜSIOLOOGIA ÕPPETOOL

Mauri Veskimeister

**Ammooniumi toksilisus – kas põhjustatud alternatiivse  
elektronaktseptori puudumisest ?**

Bakalaureusetöö

Juhendajad Agu Laisk DSc

Hillar Eichelmann MSc

TARTU 2013

# SISUKORD

SISUKORD .....	2
LÜHENDID .....	3
SISSEJUHATUS .....	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	5
1.1. Fotosüntees .....	5
1.1.1. Fotosüsteem II (PSII) ja vee lagundamine .....	5
1.1.2. Plastokinoon (PQ) .....	6
1.1.3. Tsütokroom b <sub>6</sub> f kompleks ja Q-tsükkel .....	6
1.1.4. Plastotsüaniin .....	7
1.1.5. Fotosüsteem I (PSI) .....	7
1.1.6. Ferredoksiin (Fd) .....	8
1.1.7. Ferredoksiin: NADP+ oksüdoreduktaas (FNR) .....	8
1.1.8. NADP+ .....	8
1.1.9. ATP- süntaas .....	9
1.1.10. Calvin-Benson tsükkel .....	9
1.2. Nitraadi assimilatsioon .....	10
1.2.1. Nitraadi transport taimel .....	10
1.2.2. Nitraadi reduktaas (NR) .....	10
1.2.3. Nitriti reduktaas (NiR) .....	11
1.2.4. NR ja NiR geenide regulatsioon .....	11
1.2.5. Ammooniumi assimilatsioon .....	11
1.2.6. Ammooniumi toksilisus .....	12
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	14
2.1 Töö eesmärgid .....	14
2.2 Materjal ja meetodika .....	14
2.2.1. Optilised-gasomeetrised mõõtmised .....	15
2.2.2. Klorofüllil hulga määramine .....	16
2.2.3. RuBisCO hulga määramine geeleleetroforeesi meetodil .....	16
2.2.4. NR aktiivsuse määramine .....	17
2.3. Tulemused .....	18
2.3.1. Taimede kasv .....	18
2.3.2. Nitraadi reduktaasi aktiivsus .....	21
2.3.3. Optilised-gasomeetrised mõõtmised .....	22
2.3.4. Klorofüllil hulk .....	23
2.3.5. RuBisCO hulk .....	24
2.3.6. Taimede kuivkaalud .....	25
2.4. Arutelu .....	26
KOKKUVÕTE .....	30
RESUME .....	31
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU .....	32
LISAD .....	35
Lisa 1 .....	35
LIHTLITSENTS .....	36

## LÜHENDID

APS- Ammoonium persulfaat  
Chl- klorofüll  
FAD- flaviin adeniin dinukleotiid  
Fd- ferredoksiin  
FMN- flaviin mononukleotiid  
FNR- ferredoksiin: NADP+ oksüdüreduktaas  
GDH- glutamaadi dehüdrogenaas  
GOGAT- glutamaadi süntaas  
GS- glutamiini süntetaas  
G3P- glütseeraldehüüd-3-fosfaat  
MDH- malaadi dehüdrogenaas  
MES- 2-(*N*-morpholino)etaan sulfoonhape  
NiR- nitriti reduktaas  
NR- nitraadi reduktaas  
OA- oksaalatsetaat  
PGA- 3-fosfoglütseraat  
PQ- plastokinoon  
PS I- fotosüsteem I  
PS II- fotosüsteem II  
P680- fotosüsteem II aktiivtsenter  
P700- fotosüsteem I aktiivtsenter  
RuBisCO- ribuloos-1,5-bisfosfaadi karboksülaas/oksügenaas  
SDS- naatrium dodetsüülsulfaat  
TEMED- tetrametüületüüldiamiin  
WOC- vett oksüdeeriv kompleks

## SISSEJUHATUS

Fotosüntees on looduses aset leidev protsess, mille käigus elusorganismid muudavad valgusenergia keemiliseks energiaks. Fotosünteesi valgusreaktsioonide käigus vesi oksüdeeritakse, molekulaarse hapniku ja prootonite vabanemisega. Pimereaktsioonides toimub CO<sub>2</sub> redutseerimine veelt eraldatud elektronide abil ning CO<sub>2</sub> liitmine suhkrute koosseisu. Ühe molekuli CO<sub>2</sub> redutseerimiseks läheb vaja 3 ATPd ja 2 NADPHd.

Molekulaarse hapniku tekkeks on vaja lagundada 2 H<sub>2</sub>O. Selle tagajärjel eraldub 4 prootonit ja 4 elektroni. Elektronid liiguvad läbi elektrontransportahela komponentide, mis käituvad redoksreaktsioonides kui elektronide doonorid ja aktseptorid. Selles reas on viimane elektronaktseptor NADP<sup>+</sup>, mis 4 elektroni toimetel moodustab 2 NADPHd. Iga elektrontransportahelat läbinud elektron transpordib endaga koos stroomast luumenisse 2 H<sup>+</sup>. Seega suureneb luumenis H<sup>+</sup> hulk (4+2\*4) 12 H<sup>+</sup> võrra. Tekkinud H<sup>+</sup> kontsentratsiooni erinevuse kahel pool tülakoidi membraani kasutab ära ATP süntaas ATP sünteesiks ADP + P<sub>i</sub> -st. Pikka aega on olnud ebaselge, mitu H<sup>+</sup> peab läbima ATP süntaasi, et moodustuks ATP. Viimased andmed näitavad, et ühe ATP moodustumiseks peab ATP-süntaasi läbima 4 H<sup>+</sup> (Steigmiller *et al.*, 2008), mis tähendab, et ühe molekulaarse hapniku eraldumise kohta sünteesitakse 3 ATP.

Nagu näha, valgusreaktsioonides tekib ATPd ja NADPHd täpselt sellises vahekorras nagu on vaja CO<sub>2</sub> redutseerimiseks ja liitmiseks suhkrute koosseisu. Kuid kuna valguse käes puuduvad kloroplastis alternatiivsed ATP allikad, kuid siiski toimub ATPd tarbiv tärklise ja sekundaarsete metaboliitide süntees ja transport, siis ATP/NADPH tasakaal nihkub paigast ära ja ATP jääb defitsiiti.

Pikka aega on arvatud, et puuduv ATP genereeritakse tsüklilises elektrontranspordis. Kuid Eero Taltsi doktoritöö (Talts, 2010) näitas, et tsüklilise elektrontranspordi osakaal ATP defitsiidi vähendamiseks ei ole nii suur, kui on arvatud ja pakkus välja, et olulisemad ATP/NADPH tasakaalustajad on NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ja O<sub>2</sub>, kui alternatiivsed elektronide aktseptorid lineaarses elektrontransportahelas – mis küll võtavad elektronid vastu ja aitavad tekitada stöhhiomeetrilise koguse ATPd, kuid edasises metabolismis seda ATPd ei tarvita, kattes selle arvel teiste reaktsioonide vajadusi. Kuna kirjanduse andmetel on ammoonium taimedele toksiline ioon, kuid nitraadi lisamine keskkonda vähendab ammooniumi toksilist efekti, siis uurime, kas eeldatav taimede pärsitud kasv ammooniumit sisaldaval toitelahusel tuleneb ammooniumi olemasolust või nitraadi, kui alternatiivse elektronaktseptori puudumisest.

Antud töös otsitakse vastust küsimusele, kas ammooniumi poolt põhjustatud toksiline efekt tuleneb sellest, et ammooniumil kasvades puudub taimedel võimalus suunata elektrone lämmastiku ühenditele.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Fotosüntees

Fotosüntees toimub kloroplastis, mis on väikese 5 µm diameetriga organell. Kloroplaste eraldab tsütoplastmast ümbris, mis koosneb kahest fosfolipiidsest membraanist. Fotosünteesiline elektrontransportahel paikneb kloroplasti sisemuses asetseval keerulisel membraansüsteemil, mida kutsutakse tülakoidiks. Tülakoid on kinnine membraansüsteem, mille sisse jäävat ruumi kutsutakse luumeniks ja tülakoidi ning kloroplasti välismembraani vahele jäävat osa stroomaks. Fotosünteesi reaktsioonid jagatakse kaheks – valgusreaktsioonid ja pimereaktsioonid. Valgusreaktsioonid leiavad aset tülakoidi membraanil ja seal toimub valgusenergia neelamine ja muutmine keemiliseks energiaks. Pimereaktsioonid toimuvad kloroplasti stroomas ning seal kasutatakse valgusreaktsioonides genereeritud ATP ja NADPH ära CO<sub>2</sub> assimileerimiseks.

### 1.1.1. Fotosüsteem II (PSII) ja vee lagundamine

Fotosüsteem II on tülakoidisisene pigment- Valk kompleks. Fotosünteesiline elektrontransport algab, kui ergastus saabub PSII tsentripigmendile P680, mis kiiresti foto-oksüdeerub, andes oma elektroni primaarsele elektronaktseptorile. PSII esmaseks elektronaktseptoriks on feofütiin, mis omakorda väga kiiresti annab elektroni edasi valguga seotud plastokinoonile Q<sub>A</sub>. Foto-oksüdeerunud doonorpigment P680<sup>+</sup> saab asenduselektroni veelt, mis lagundatakse vett oksüdeeriva kompleksi (*water-oxidizing complex*, WOC) poolt. WOC on iga PSII üks subühikuid, mis asub tülakoidi membraani luumenipoolsel küljel. Toimuva keemilise reaktsiooni üldvalem on järgmine:  $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$  (Hiller 2005; Lubitz *et al.*, 2008). Kahelt vee molekulilt eemaldatakse kokku 4 elektroni, mille tagajärjel tekib hapniku molekul ja luumenisse eraldub 4 H<sup>+</sup> iooni. Vee lagundamise reaktsiooni põhiprobleemiks on kahe vee molekuli oksüdeerimine samaaegselt, nii et otsekohe tekiks O<sub>2</sub> ilma mitmesuguste aktiivsete vaheühendite staadiumeid läbimata. Kuna footonid kannavad elektrone ühekaupa, siis on WOC koosseisus nelja mangaaniaatomit sisaldav kompleks, mis täidab positiivse laengu akumulaatori rolli. Igale P680 ergastusele järgneb ühe elektroni eemaldamine Mn<sub>4</sub>O<sub>x</sub>Ca kompleksist (Yano *et al.*, 2006), kuni akumuleerub 4 positiivset elektroni vakantsi. Seejärel kogu kompleks redutseerub ühekorraga, oksüdeerides kaks vee molekuli ja vabastades O<sub>2</sub>, selleks on lisaks vajalik kofaktorina Cl<sup>-</sup> (Vrettos *et al.*, 2001;

Yocum, 2008; Gorkom ja Yocum, 2005). Vee lagundamise mehhanismi detailid on siiani lõpuni lahendamata.

### 1.1.2. Plastokinoon (PQ)

Elektronide aktseptoriks PSII on plastokinoon. PQ on lipiid-lahustuv bensokinooni derivaat, millel on isoprenoidne külgahele. PQ on liikuvaks elektronikandjaks fotosünteesilises elektrontransportahelas. Feofütiinilt saabub elektron primaarsele aktseptorile  $Q_A$ , kust elektron läheb omakorda kiiresti üle sekundaarsele aktseptorile  $Q_B$ , mis on samuti plastokinoon, kuid erinevalt  $Q_A$ -st liidab ta kaks elektroni. Seejärel liidab ta endale stroomast ka kaks prootonit, tekitades täielikult redutseerunud hüdokinooni  $PQH_2$ , mis eraldub PSII küljest. Kompleksi küljest lahkunud hüdokinoon difundeerub hüdfoobses membraani osas ning jõudes tsütokroom  $b_6f$  kompleksini annab järke mööda enda elektronid ära (Lubitz *et al.*, 2008; Taiz ja Zeiger, 2010).

### 1.1.3. Tsütokroom $b_6f$ kompleks ja Q-tsükkel

Tsütokroom  $b_6f$  kompleks on mitmesubühikuline intermembraane valk, mis koosneb kahest b-tüüpi heemist ja ühest c-tüüpi heemist (tsütokroom f). Tsütokroom  $b_6f$  ülesanne on vahendada elektrontransporti fotosüsteemide vahel, oksüdeerides PQ ja redutseerides plastotsüaniini ning pumbata prootoneid stroomast luumenisse, põhjustades prootongradiendi tekkimise tülakoidi membraanil. Kuna elektronide ja prootonite liikumine elektrontransportahelas ei ole täiesti selge, siis  $e^-/H^+$  stöhhiomeetrilise suhte kohta on pakutud mitmeid võimalusi. *In vitro* mõõtmised isoleeritud tülakoididest on näidanud, et lineaarse elektrontransporti puhul suureneb iga elektrontransportahelat läbinud elektroni kohta  $H^+$  ionide arv luumenis 2-3 võrra. Iga elektroni kohta jääb üks prooton luumenisse vee foto-oksüdatsioonil ja antud juhul 1-2 prootonit transporditakse stroomast luumenisse tsütokroom  $b_6f$  kompleksis. Lisaks on mitmed uurimisgrupid välja pakkunud võimaluse, et tsütokroom  $b_6f$  kompleksis stroomast luumenisse transporditavate  $H^+$  hulk sõltub valguse intensiivsusest (Berry ja Rumberg, 1999). Enim levinud seisukoht on siiski, et iga elektroni liikumisel elektrontransportahelas suureneb luumenis prootonite hulk 3 võrra üle kogu valgusintensiivsuste kõvera (Sacksteder *et al.*, 2000). Kõige usutavam mehhanism elektronide ja prootonite liikumiseks läbi tsütokroom  $b_6f$  kompleksi on Q- tsükkel, mille olemasolu mitokondrites postuleeris esmakordselt P. Mitchell. Samas töös pakkus ta välja, et sarnane mehhanism võib leiduda ka kloroplastides (Mitchell, 1975).

Q- tsükliis transporditakse üks elektron tsütokroom  $b_6f$  kompleksis plastokinoolilt (PQH<sub>2</sub>) Rieske FeS valgule, mis omakorda annab elektroni edasi tsütokroomile  $f$ , mis redutseerib plastotsüaniini. Plastokinoonilt lahkub teine elektron ühele kahest b-tüüpi heemist. Selle käigus toimub kahe prootoni vabanemine tülakoidi luumeni poolsesse ruumi. Peale teist samasugust elektronide voolu annavad b-tüüpi heemid elektronid plastokinoonile, mis seejärel liidab endale kaks prootonit strooma poolsest membraani osast, ning tekib plastokinool. Viimane lahkub saidist ja liigub tsütokroom  $b_6f$  elektropositiivsemale saidile, kus toimub jälle ühe elektroni liikumine Rieske FeS valgule ning teise liikumine b-tüüpi heemile. Nagu näeme, iga plastokinooni molekuli oksüdeerimisega toimub ühe elektroni liikumine plastotsüaniinile ning teine elektron kordab Q-tsükliit. Keskmiselt liigub iga elektron läbi tsütokroom  $b_6f$  kompleksi 2 korda, transportides endaga stroomast luumenisse kaks prootonit (Taiz ja Zeiger, 2010). Kuna ka vee foto-oksüdatsiooni käigus jääb iga elektroni kohta üks prooton luumenisse, siis fotosünteesilise elektrontranspordi käigus suureneb iga elektrontransport-ahelat läbinud elektroni kohta luumenis prootonite arv 3 võrra.

#### 1.1.4. Plastotsüaniin

Plastotsüaniin on väike (~10 kDa), aktiivsaidis vaske omav, elektronkandja tsütokroom  $b_6f$  ja PSI aktiivtsentri P700 vahel. Plastotsüaniin on luumenis lahustuv valk, mis võimaldab tal difundeeruda pikkade vahemaade taha ja transportida elektrone graana ja strooma membraanide vahel (Hope, 2000).

#### 1.1.5. Fotosüsteem I (PSI)

PSI on multisubühikuline membraanvalk, mis taimedes võtab elektroni vastu plastotsüaniinilt ja valgusenergia arvel toimub elektroni ergastamine ja edasikandmine ferredoksiinile. PSI kristallstruktuur on kindlaks tehtud harilkule hernele (*Pisum sativum* var. Alaska) 4.4 Å lahutusvõimega. PSI kristallstruktuuri järgi võib eeldada, et ta koosneb 12 tuumsest subühikust, 4 erinevast valgust neelavast membraansesest pigment-valgust (LHCI), mis on koondunud ühele poole tuumset kompleksi ja moodustavad poolkuu sarnase struktuuri. Kokku sisaldab PSI 167 klorofüllit, 3 Fe-S klastrit ja 2 füllokinooni. Ligikaudu 20 klorofüllit asetsevad strateegilisel positsioonil, lõhes LHCI ja tuumse osa vahel (Ben-Shem *et al.*, 2003). Elektrontranspordis läbi PSI osaleb terve rida komponente (P700, A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, F<sub>X</sub>, F<sub>A</sub> ja F<sub>B</sub>). Valguse poolt indutseeritud laengute lahutumisel oksüdeerub primaarne elektrondonor P700,

mis on Chl a/a' heterodimeer, ja redutseerub primaarne elektronaktseptor  $A_0$ , milleks on Chl a monomeer. Seejärel transporditakse elektron  $A_1$ -le, mis enamikes organismides on füllokiinon. Sealt läheb elektron edasi  $F_X$  le (4 Fe- 4 S) klastrisse, edasi 4 Fe- 4 S klastritele  $F_A$  ja  $F_B$ , mis on seotud välise subühiku PsaC-ga, millelt elektron lõpuks kandub üle ferredoksiinile.

#### **1.1.6. Ferredoksiin (Fd)**

Fd on väike raud-väävel valk molekulmassiga 11 kDa. Fd käitub kui ühe elektroni kandja. Aktiivtsentris omab ta [2 Fe- 2 S] klastrit, mis on ühendatud 4 tsüsteiini jäägiga. Peamine Fd ülesanne on elektronide transport PSIIlt ferredoksiin:NADP<sup>+</sup> oksüdüreduktaasile (FNR), mis produtseerib NADPH. Lisaks osaleb Fd ka tsüklilises elektrontranspordis ümber PSI ning elektronide transpordis teistele ferredoksiin-sõltuvatele ensüümidele, näiteks ka neile, mis osalevad lämmastiku ja sulfaadi assimileerimises. (Fukuyama, 2004). Taimsed Fd on oksüdeerunud olekus [2 Fe- 2 S] klastri tõttu punakas-pruunid ning väga madala redokspotensiaaliga, mis jääb vahemikku -390 mV kuni -425 mV (Cammack, 1977).

#### **1.1.7. Ferredoksiin: NADP<sup>+</sup> oksüdüreduktaas (FNR)**

FNR on 33 kDa suurune osaliselt lahustuv ensüüm, mis omab N-terminaalses osas mitte kovalentselt seotud FADi, mis interageerub ferredoksiiniga. C-terminaalses osas asub NADP<sup>+</sup> seondumis koht (Serre *et al.*, 1996). FNR katalüüsib pöörduvat elektronide transporti kahe eraldiseisva Fd molekuli ja ühe NADP(H) vahel. FNR on stroomas osaliselt lahustuv valk, mille lahustumatu osa jääb seotuks strooma poolse tülakoidi membraaniga (Carillo ja Vallejos, 1982). Taimsetes plastiidides võib FNR jagada leht-tüüpi ja juur-tüüpi isovormideks. Leht-tüüpi FNR katalüüsib lineaarse elektrontransportahela viimast reaktsiooni redutseerides NADP<sup>+</sup> NADPHks. Juur-tüüpi isovorm katalüüsib vastupidist reaktsiooni oksüdeerides NADPH, et varustada redutseeritud Fd-ga teisi ferredoksiin-tüüpi ensüüme.

#### **1.1.8. NADP<sup>+</sup>**

Viimane elektronaktseptor fotosünteesilises elektrontransportahelas on NADP<sup>+</sup>, mis redutseerub täielikult kahe elektroni liitumisel moodustades NADPH. NADPH kasutatakse hiljem elektrondonorina ära Calvini tsüklis CO<sub>2</sub> assimileerimiseks.

### 1.1.9. ATP- süntaas

ATP-süntaas on ensüüm tülakoidi membraanis, mis sünteesib CO<sub>2</sub> fikseerimiseks vajaliku ATP fosfaadist (P<sub>i</sub>) ja ADP-st. Energia selleks saadakse prooton gradiendist kahel pool tülakoidi membraani. Prootonite erinevus kahel pool membraani on tekkinud vee fotooksüdatsioonil luumenisse jäänud prootonitest ja elektrontransportahelas luumenisse transporditud prootonitest. ATP-süntaas on keerulise struktuuriga ligikaudu 500 kDa molekulmassiga valgu kompleks. Kloroplasti ATP- süntaas koosneb 2 osast: hüdrofoobsest membraanseotud osast (CF<sub>0</sub>), mille eesmärk on prootonite transport läbi membraani ning strooma poole jäävast katalüütilisest osast (CF<sub>1</sub>). Kloroplasti ATP-süntaasi CF<sub>1</sub> koosneb viiest erinevast polüpeptiidist suhtes  $\alpha_3\beta_3\Gamma\Delta\epsilon$ . (Groth ja Strotmann, 1999). CF<sub>0</sub> koosneb 4 erinevast polüpeptiidist a, b, b', c<sub>14</sub>, mille c koosneb 14 identsest protomeerist, mis on sümmeetriliselt paigutatunud ümber tsentraalse poori ja mis rootorina pööreldes transpordivad prootoneid luumenist stroomasse (Vollmar *et al.*, 2009; Taiz ja Zeiger, 2010). ATP süntaasi CF<sub>0</sub> 14 subühikulise ring struktuuri avastamine (Seelert *et al.*, 2000; H. Seelert, 2003) tekitas küsimusi, kas mitte kolme ATP genereerimiseks ei pea tülakoidi membraani läbima 14 H<sup>+</sup>. Sellisel juhul oleks ATP ja NADPH suhe veelgi rohkem paigast ära ning taimedes oleks tunduvalt suurem vajadus alternatiivsete elektronaktseptorite järgi. Steigmiller *et al.*, 2008 näitas, et ATP genereerimiseks vajaminevate prootonite hulk ei sõltu CF<sub>0</sub> ring struktuuri subühikute arvust ning näitas, et ATP genereerimiseks peab ATP-süntaasi läbima 4 prootonit.

### 1.1.10. Calvin-Benson tsükkel

Calvini tsükklis kasutatakse valgusreaktsioonides genereeritud ATP ja NADPH ära CO<sub>2</sub> fikseerimiseks orgaaniliste ainete koosseisu. Calvini tsükkel leiab aset kloroplasti stroomas ning koosneb 3 etapist. Esimeses etapis liidab RuBisCO CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O ja ribuloos 1,5-bisfosfaadi (RuBP), millest tekib kaks 3-fosfoglutseraati (PGA). Järgmises etapis kasutatakse ära ATP, NADPH ja PGA ning moodustatakse glütseeraldehüüd-3 fosfaat (G3P), mis on suhkrute ja tähtlase eelkäija. Tsükli viimases etapis regenereeritakse CO<sub>2</sub> aktseptormolekuli RuBP. See toimub läbi reaktsioonide seeria, millest üks etapp vajab toimumiseks ATPd. Kokku kasutatakse Calvini tsükklis ühe CO<sub>2</sub> redutseerimiseks 3 ATP ja 2 NADPH molekuli.

## 1.2. Nitraadi assimilatsioon

Lämmastik on taimedes enim vajaminev mineraalelement, kuuludes väga paljude bioorgaaniliste ühendite (valkude, nukleiinhapete jt) koosseisu. Taimede kuivmassist moodustab lämmastik ligikaudu 1-3 % (Padu ja Eichelmann, 2008). Võttes arvesse taimede suurt N vajadust ei ole imekspandav, et taimed suudavad kasutada peaaegu kõiki lämmastiku vorme. Erandiks on N<sub>2</sub>, mille kasutamiseks lämmastiku allikana on taimedel vajalik sümbioos lämmastikku siduvate bakteritega. Taimedele on kõige paremini omastatavad lämmastiku vormid NO<sub>3</sub><sup>-</sup> seejärel NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Aminohapetena omastatakse lämmastikku suhteliselt vähe. Aeroobsetes keskkondades, kus saab toimuda nitrifikatsiooni protsess, domineerib lämmastiku allikana nitraat, kuid see ei pruugi olla nii rohumaadel ja anaeroobsetes keskkondades, nagu näiteks üleujutatud riisipõllud, kus taimed omastavad eelistatult ammooniumi.

### 1.2.1. Nitraadi transport taime

Nitraat siseneb taime juurtes paiknevate madala ja kõrge afiinsusega prooton-nitraat kotransporterite süsteemide kaudu (Miller *et al.*, 2007). Keskkonnas, kus lämmastiku allikaks on nitraat, on tähele pandud pinnase aluselisemaks muutumist (seda ka meie katsetes). Pinnas muutub aluselisemaks seetõttu, et kotransporterid transpordivad iga nitraadi kohta taime 2 prootonit. Taime sisenenud nitraat redutseeritakse juurtes, säilitatakse vakuolis või transporditakse lehtedesse.

### 1.2.2. Nitraadi reduktaas (NR)

Nitraadi fikseerimise esimene etapp toimub nii juurtes kui ka lehtedes tsütosoolis, kus nitraat redutseeritakse nitritiks ensüümi NR poolt. NR vajab protsessi läbiviimiseks 2 elektroni, mille ta saab NADHlt või NADPHlt. NR on homodimeerne ensüüm, mille mõlemad subühikud koosnevad 100 kD polüpeptiidist, molübdeen-kofaktorist, heemist ja FADst (Campbell, 1999). Elektronid liiguvad suunal FAD-> heem -> molübdeen, edasi nitraadile nitriti tekkega.

### 1.2.3. Nitriti reduktaas (NiR)

Nitrit on oma olemuselt väga reaktiivne ja toksiline ioon, happega aga veel toksilisem, sellepärast transporditakse ta koheselt lehtedes kloroplasti, juurtes aga plastiidi, kus NiR konverteerib ta ammooniumiks. Ühe nitriti molekuli redutseerimiseks läheb vaja 6 elektroni. Elektronidoonoriks NiRle on nii lehtedes kui ka juurtes Fd. Kloroplastides saab Fd elektronid otse PSI-lt, aga plastiidides, saadakse elektronid Glükoos-6P oksüdatsiooni käigus pentoosfosfaadi rajast. Fd-sõltuv NiRon stroomas paiknev lahustuv monomeerne ensüüm molekulmassiga 60 - 63 kD. Fd-sõltuv NiR koosneb  $Fe_4S_4$  klastrist ja siroheemist, mis samas järjekorras transpordivad elektronid Fd-lt nitritile (Swamy *et al.*, 2005).

### 1.2.4. NR ja NiR geenide regulatsioon

NR ja NiR geenide transkriptsioon on kaas-reguleeritud, mis on vajalik selleks, et takistada kahjuliku nitriti kogunemist olukorras, kus nitraati assimileeritakse ja N metaboliite produtseeritakse, aga NiR aktiivsus puudub. NR ja NiR geenide transkriptid indutseeritakse valguse ja nitraadi olemasolul, kuid on repressseeritud lämmastiku metaboliitide poolt. (Faure *et al.*, 1991). Valguse poolt indutseeritud NiR geenid on lähemalt seotud fotosünteesiliste geenide regulatsiooniga kui NR geenid, sellele viitab ka asjaolu, et madal valguse intensiivsus repressseerib mõningal määral NiR geene (Vincentz *et al.*, 1993). Taimlehtedes nitriti redutseerimist ammooniumiks pimedas ei toimu, sest NiR vajab tööks redutseeritud ferredoksiini, mis saab enda elektronid PSI-lt. Seega võib eeldada, et ka nitraadi redutseerimine nitritiks NR poolt on pimedas peatatud. Seda on kinnitatud ka katseliselt (Riens ja Heldt, 1992) spinati taimede viimisega valguse käest pimedasse, mis viis NR aktiivsuse järsult alla.

### 1.2.5. Ammooniumi assimilatsioon

Ammooniumi neeldumise kõver on mitmefaasiline, mis näitab mitut tüüpi transporterite olemasolu. Transport on sekundaaraktiivne, sõltudes eelkõige elektrookeemilisest potentsiaalst ja mitte otseselt ATP hüdrolüüsist. Ammoonium saab läbida plasmamembraani nii  $NH_4^+$  kui ka  $NH_3$ , kuid peamine vorm, mis membraani läbib, on  $NH_4^+$ . Selleks, et vältida ammooniumi kuhjumist taimedes, seotakse ammoonium aminohapete koosseisu. Seda viivad läbi peamiselt kaks ensüümi – glutamiini süntaas (GS) ja glutamaadi süntaas (GOGAT).

Esimeses reaktsioonis kasutab GS ära ühe ATP molekuli hüdroolüüsi energia ja liidab glutamaadile ammooniumi ning selle tagajärjel moodustub glutamiin. Reaktsiooni toimumiseks on vaja ka kofaktorina divalentset katiooni ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ) (Taiz ja Zeiger, 2010). Eksisteerib 2 peamist GS isovormi, millest üks esineb lehtede kloroplastides ja teine lehtede tsütoplasmas ning mittefotosünteesilistes kudedes. Kloroplastides esinev GS koosneb 8 polüpeptiidist molekulmassidega 43-45 kDa (Hirel ja Lea, 2002).

GOGAT viib läbi Fd või NADH sõltuvat reaktsiooni, kandes glutamiini amiid rühma 2-oksoglutaraadile, kahe glutamaadi moodustamisega. Üks glutamaat läheb valkude koosseisu ja teine seondub uue ammooniumi iooniga. Fd sõltuv GOGAT paikneb kloroplastides ja ta on monomeerne (FMN, FAD ja 3Fe- 4S klastrit sisaldav) ensüüm, mille molekulmass on ligikaudu 170 kDa, kuid varieerub liigiti. NADH sõltuv GOGAT paikneb mittefotosünteesiliste kudede plastiidides ja arenevate lehtede juhtkimpudes. Juurtes on NADH sõltuva GOGATi ülesanne risosfäärilise taime võetud ammooniumi assimilatsioon (Hirel ja Lea, 2002).

Lämmastiku assimileerimine võib toimuda ka alternatiivse raja kaudu. Glutamaadi dehüdrogenaas (GDH) katalüüsib pöörduvat reaktsiooni, mis sünteesib või deamiinib glutamaadi. GDH paikneb mitokondrites või kloroplastides ja on NAD(P)H sõltuv ensüüm. Kuigi GDHd on taimedes rikkalikult ei suuda ta asendada GS-GOGAT rada ja tema peamine ülesanne taimedes on glutamaadi deamiinimine lämmastiku ümberpaigutamise käigus (Taiz ja Zeiger, 2010). Kui ammoonium on viidud glutamiini või glutamaadi koosseisu, siis teised aminohapped saadakse transamiinimise reaktsioonide tagajärjel.

### **1.2.6. Ammooniumi toksilisus**

Ammoonium on kirjeldatud kui toksiline ioon nii taimedele kui ka loomadele. Ammooniumi toksilise efekti all peetakse silmas lehtede kloroosi, juurte/võrsete suhte vähenemist (kuid on ka nähtud juurte/võrsete suhte kasvamist) ja üldist pärsitud kasvu. Milles täpselt ammooniumi toksilisus seisneb on siiani ebaselge. Ammooniumi toksilisusust pani tähele juba C. Darwin 1882 aastal. Darwinist kuni tänapäevani on jõudnud koguneda lõpmata palju erinevaid teooriaid, milles ammooniumi toksilisus seisneda võib. Olukorra teeb segasemaks asjaolu, et osade teadlaste läbiviidud katsed lükkavad ümber teiste poolt saadud tulemused ja vastupidi (Cramer ja Lewis, 1993). Ülevaade ammooniumi toksilisusest ja antud vallas läbiviidud katsetest on toodud artiklis (Britto ja Kronzucker, 2002). Ühe ammooniumi toksilise efekti põhjusena pakutakse välja ammooniumi poolt põhjustatud hormoonide

tasakaalustamatust. Kuna on täheldatud, et taimed võtavad keskkonnast ammooniumi ülesse liias, siis on pakutud, et üleliigse ammooniumi transpordiks taimest välja kulub rohkem energiat, kui taimed suudavad taluda. Need on ainult paar võimalikku seletust ammooniumi toksilistele efektidele. Ammooniumit sisaldavas keskkonnas on täheldatud keskkonna happelisemaks muutmist. Seega on happe tolerantset taimed ka tolerantsemad ammooniumile.

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Nagu eespool kirjeldatud, on CO<sub>2</sub> fikseerimiseks orgaaniliste ainete koosseisu vaja 3ATP ja 2NADPH molekuli. Täpselt sellises suhtes produtseeritakse neid lineaarses elektrontransportahelas, kuid kloroplastis läheb vaja ATPd ka tärklise ja sekundaarsete metaboliitide sünteesiks ja transpordiks. Pikka aega on arvatud, et puudujääv ATP genereeritakse H<sup>+</sup> transpordiga paardunud tsüklilises elektrontransportahelas ümber PSI. Eero Talts näitas enda doktoritöös, et kuigi kõrgetel valguse intensiivsustel on tsüklilise elektrontransportahela kiirus väga suur, siis ei pruugi olla tsükliline elektrontransport H<sup>+</sup> transpordiga paardunud ja tsüklilise elektrontranspordi eesmärk on eelkõige fotosünteesi läbiviivate komponentide kaitse, mitte lisa ATP genereerimine. Seega ei ole siamaani selge, kuidas tekitatakse puudujääv ATP. Tähelepanu on koondumas alternatiivsetele elektronaktseptoritele, kuhu elektrone suunates sünteesitakse ATPd, aga ei teki NADPHd. Selle tulemusena jääb alternatiivse elektrontranspordiga paardunud ATP vabaks teiste sünteeside toetamiseks. Antud töö eesmärk on uurida, kas NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ja NO<sub>2</sub><sup>-</sup> on taimedele obligatoorsed alternatiivsed elektronaktseptorid ATP defitsiidi leevendamiseks ning uurida, kas ammoniumi toksilisus tuleneb sellest, et taimedel puudub võimalus lämmastiku ühendeid redutseerida ning vajalikku lisa ATP produtseerida. Selleks kasvatati taimi erinevatel lämmastiku allikatel ja võrreldi nende fotosünteesilisi ja kasvu parameetreid.

### 2.2 Materjal ja meetodika

Päevalille (*Helianthus annuus* L.) taimi kasvatati kahes katseseerias (korruga 8 taime) kasvukambris (AR-95HIL, Percival, CLF Plant Climatics GmbH, Emersacker, Saksamaa), aeropoonilisel süsteemil, valguse intensiivsusel 420 µmol kvante m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Taimed kasvasid päeva/öö suhtega 12h/12h vastavalt temperatuuridel 24/20 C ja õhuniiskustel 70%/80%. Toitelahusena kasutati Knopi toitelahust (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,25 g l<sup>-1</sup>, KCl 0,125 g l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O 0,25 g l<sup>-1</sup>, Fe<sub>2</sub>Cl<sub>6</sub> 0,0125 g l<sup>-1</sup>), millele oli lisatud 1 ml/l Hoglandi mikroelementide segu [CoN<sub>2</sub>O<sub>6</sub> 0,057 g l<sup>-1</sup>, MnCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O 0,381 g l<sup>-1</sup>, KBr 0,028 g l<sup>-1</sup>, SnCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 0,028 g l<sup>-1</sup>, KI 0,027 g l<sup>-1</sup>, TiO<sub>2</sub> 0,057 g l<sup>-1</sup>, NiSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 0,056 g l<sup>-1</sup>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,623 g l<sup>-1</sup>, LiCl 0,03 g l<sup>-1</sup>, AL<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 0,055 g l<sup>-1</sup>, ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 0,536 g l<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>Mo<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 0,1 g l<sup>-1</sup>, NaCl 0,5 g l<sup>-1</sup>,

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   $0,53 \text{ g l}^{-1}$ ]. Toitelahused erinesid lämmastikku sisaldava soola ja lämmastiku substraadi kontsentratsiooni poolest. Toitelahusele, kus lämmastiku allikaks oli ammoonium lisati veel  $\text{CaSO}_4$   $0,35 \text{ g l}^{-1}$ . Nitraadil põhinevatele lahustele  $\text{CaSO}_4$  ei lisatud, kuna seal oli kalitsiumi allikas  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ .

Esimeses katseseerias kasvatati taimi toitelahustel, mis sisaldasid nii ammooniumit  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  kui nitraati  $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$ , aga erinevates suhetes. Ammooniumi ja nitraadi summaarne kontsentratsioon oli kõigis toitelahustes 8mM. Lämmastiku ionide protsentuaalsed hulgad toitelahustes olid järgmised: 100%  $\text{NH}_4^+$  ja 0%  $\text{NO}_3^-$ , 90%  $\text{NH}_4^+$  ja 10%  $\text{NO}_3^-$ , 75%  $\text{NH}_4^+$  ja 25%  $\text{NO}_3^-$ , 60%  $\text{NH}_4^+$  ja 40%  $\text{NO}_3^-$ , 45%  $\text{NH}_4^+$  ja 55%  $\text{NO}_3^-$ , 30%  $\text{NH}_4^+$  ja 70%  $\text{NO}_3^-$ , 15%  $\text{NH}_4^+$  ja 85%  $\text{NO}_3^-$ , 0%  $\text{NH}_4^+$  ja 100%  $\text{NO}_3^-$ . Toitelahused ei sisaldanud puhvrit, aga pH viidi algselt 6.3 le. Igapäevaselt pHd ei stabiliseeritud.

Teises katseseerias oli igas toitelahuses ainult üks lämmastiku allikas. Lämmastiku sisaldava ühendi hulgad toitelahustes olid järgmised (sulgudes lämmastikuiooni molaarsus):  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  -  $0,236 \text{ g l}^{-1}$  (2mM),  $0,472 \text{ g l}^{-1}$  (4mM),  $0,708 \text{ g l}^{-1}$  (6mM),  $0,944 \text{ g l}^{-1}$  (8mM)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  -  $0,132 \text{ g l}^{-1}$  (2mM),  $0,264 \text{ g l}^{-1}$  (4mM),  $0,396 \text{ g l}^{-1}$  (6mM),  $0,528 \text{ g l}^{-1}$  (8mM).

Seerias 2. mõõdeti võrdluseks ka tavalises mullapotis kasvanud taime.

Teise seeria toitelahused sisaldasid 5 mM MES (pH 6.4) puhvrit. pHd kontrolliti igapäevaselt ja kõikumiste puhul viidi tagasi 6.4le.

Toitelahust pumbati taimedele iga poole tunni tagant mõneks minutiks. Toitelahust vahetati olenevalt taimede kasvufaasist noorte taimede puhul korra nädalas, mõõtmisfaasis taimedel aga juba ülepäeviti. Iga taime kahe lehega (vanuses 30-37 päeva) viidi läbi optilised-gasomeetrilised mõõtmised, mõõtmiste järgselt eemaldati mõõdetud lehelt 3 lehekettast ( $1,938 \text{ cm}^2$ ) klorofüllil hulga ja RuBisCO hulga määramiseks. Lehekettad säilitati  $-80\text{C}^\circ$  juures. Peale lehekettaste eemaldamist määrati taimede NR aktiivsus, millele järgnes taimede surmamine ja kuivkaalude mõõtmiseks  $70\text{C}^\circ$  kuivama jätmine.

### 2.2.1. Optilised-gasomeetrilised mõõtmised

Taimede optilised-gasomeetrilised mõõtmised viidi läbi intaktsete lehtedega kasutades gaasivahetuse mõõtmise süsteemi (Fast-Est, Tartu), mida on põhjalikult kirjeldatud (Laisk *et al.*, 2002). Antud töösse on toodud ainult õhuhapniku kontsentratsiooni juures (21%) mõõdetud valgus- sõltuvuste tulemused. Lisainformatsiooni esimese seeria taimede ja eelkatsete mõõtmistest võib leida lisast 1.

### 2.2.2. Klorofüllü hulga määramine

Optilised-gasomeetriselised mõõtmised läbinud lehtedelt eraldati leheketas, mis uhmardati vedela lämmastiku temperatuuril 0,5 ml MES-puhvril [50mM MES-NaOH pH (6.8), 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM β- merkaptotoetanool, 1 % Tween 80 ] ühtlase suspensiooni moodustumiseni. Suspensioonist eraldati 100 µl, millele lisati 100 µl vett ja 800 µl atsetooni. Mõõtmiseni säilitati proov külmas ja pimedas. Enne mõõtmist tsentrifugeeriti proov 13000 rpm Centrifuge 5804 R (Eppendorf AG, Hamburg) 5 minutit ja eemaldati supernatant. Supernatandi optiline neeldumisspekter mõõdeti spektrofotomeetriga UV-2401PC (Shimadzu Corporation, Kyoto Japan) lainepikkuste vahemikus 400-800 nm. Klorofüllü sisaldus leiti Porra *et al.*, (1989) meetodi järgi.

### 2.2.3. RuBisCO hulga määramine geelelektroforeesi meetodil

Teine osa purustatud leheketta suspensioonist kasutati RuBisCO hulga määramiseks. Uhmrist võeti 200 µl suspensiooni ja lisati samapalju loadingut [0,0625 M TRIS-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 20% glütserool, 5 % merkaptotoetanool ja 0,005% BFS]. Seejärel segati proov *vortex'*il, kuumutati keeval veevannil 5 minutit ja lasti proovil 5 minutit jääs jahtuda. Jahutamisele järgnes 5 minutiline tsentrifugeerimine eelkülmutatud tsentrifugeeriga pööratel 13000 rpm (Centrifuge 5804 R). Kuni kasutamiseni säilitati proovid -30 °C juures. RuBisCO hulga määramisel kasutati markerina eelnevalt TUMRI Taimefüsioloogia õppetoolis puhastatud RuBisCO valku.

SDS geelelektroforees viidi läbi vertikaalsel 1 mm paksusel akrüülamiid geelil külma kraanivee temperatuuril (Hofer SE 600, Amersham Pharmacia Biotech AB, Minnesota, San Francisco, USA). Geel valati kuuest osast lahutavast geelist [0,375 M TRIS-HCl (pH 8,8), 12 % akrüülamiid, 0,3 % N,N'-bisakrüülamiid, 0,1 % SDS, 0,067 % APS, 0,067 % TEMED] ja ühest osast kontsentreerivast geelist [0,125 M TRIS-HCl (pH 6,8), 4,5 % akrüülamiid, 0,12 % N,N'-bisakrüülamiid, 0,1 % SDS, 0,15 % APS, 0,15 % TEMED]. Peale lahutava geeli valamist lisati ettevaatlikult 0,5 ml butanooliga küllastunud vett, et saada ühtlasemalt ja paremini polümeriseerunud geel.

Enne geelile kandmist tehti proovidest veel 7 kordne (kokku 14 kordne) lahjendus. Katsevea vähendamiseks kanti proovid geelile kahes korduses (8-14 µl) ning arvutati nende keskmine. 1 liiter voolutuspuhvril sisaldas 3 g TRISi, 14,4 g glütsiini ja 1 g SDSi. Proove jooksutati kontsentreerivas geelis voolutugevusel 45 mA, kuni nad olid jõudnud lahutavasse

geeli, mis võttis aega umbes 40 minutit. Lahutavas geelis kasutati voolutugevust 70 mA ja proove jooksutati umbes 2 tundi ja 30 minutit. Pärast elektroforeesi jäeti geelid värvilahusesse (0,2 % Serva Blue, 25 % isopropanool ja 10 % jää-äädikas) loksuma. Järgmisel päeval pandi värvunud geelid värvitustamise segusse (25 % isopropanooli ja 10 % jää-äädikat) ning jäeti üleöö loksuma. Järgneval päeval vahetati lahus ja jäeti geelid kuni skanneerimiseni 7 % äädikhappe lahusesse seisma.

Geelid skanneeriti HP Scanjet G4050 skanneriga ja analüüsiti ImageQuant programmiga.

#### **2.2.4. NR aktiivsuse määramine**

NR aktiivsus määrati elusatele taimedele viimase etapina, sest NR aktiivsuse määramiseks on vaja eemaldada ~ 0,5g taimset materjali nii juurtest kui lehtedest, peale mida pole taimed enam kasutatavad muudeks mõõtmisteks. NR aktiivsus määrati Padu ja Eichelmanni (2008) kirjeldatud meetodil.

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. Taimede kasv

Päevalille seemned idandati, hoides neid 3 ööpäeva niiskete salvrätikute vahel tagurpidi pööratud petri tassil. Idanenud seemned tõsteti esimeses katseseerias mullaga, teises liivaga täidetud potti ja jäeti nädalaks destilleeritud veele kasvama. Seejärel tõsteti taimed aeropoonilisse süsteemi, kus kõigile taimele pumbati iga poole tunni tagant mõneks minutiks temale ettenähtud toitelahust. Optilised-gasomeetriselised mõõtmised viidi läbi 30-37 päeva vanuste taimede kahe lehega. Mõõtmistele järgnes leheketaste eraldamine hilisemaks klorofüllil ja RuBisCO hulkade määramiseks.



Joonis 1. Teise seeria taimede kasvutingimused. 4 vasakpoolset taimet on 17 päeva vanused nitraadi taimed ja parempoolsed 14 päeva vanused ammoniumi taimed



Joonis 2. 17 päeva vanune 8mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> kasvav taim

Joonisel 1. on näidatud kasvukambrit, kus katseseeria taimed kasvasid. Joonis 2. On toodud illustreerimaks aeropoonilise süsteemi eripära. Joonistel 3. ja 4. On toodud pildid mõlemas katseseerias kasvatatud taimedest. Oluline on joonisel 3. tähele panna, et esimese seeria 8mM ammoniumil kasvaval taimel juured peaaegu puudusid.

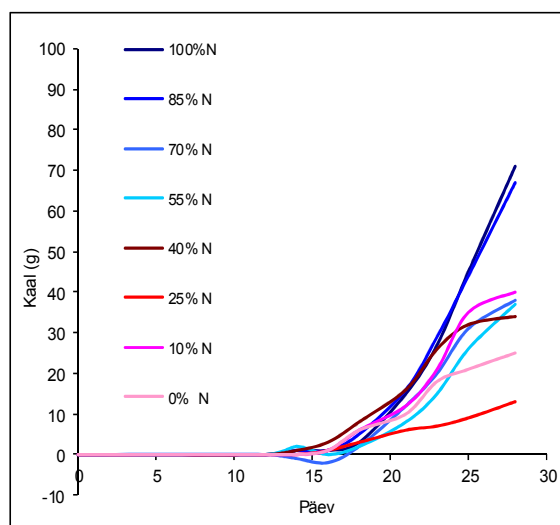
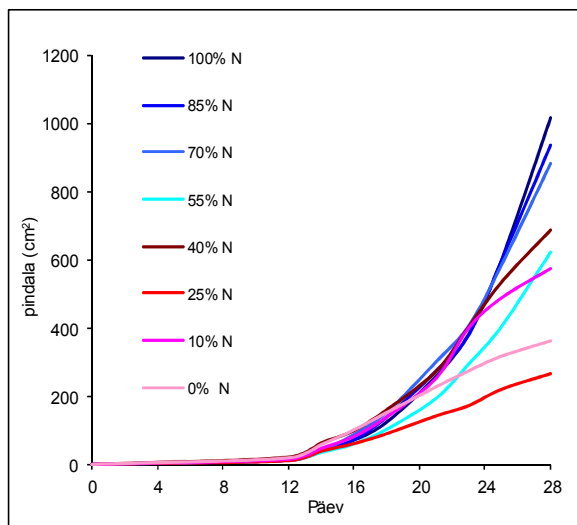


Joonis 3. 25. Päeva vanused taimed seeriast 1. Vasakul pool 100% nitraadil ehk 8mM nitraadil kasvav taim ja paremal 100% ammooniumil, ehk 8mM ammooniumil kasvav taim.

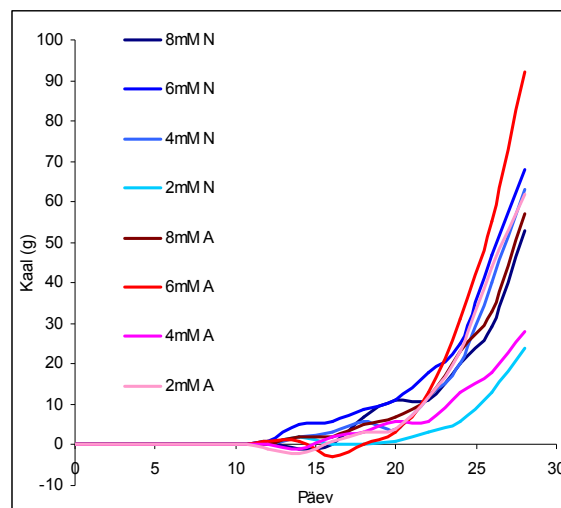
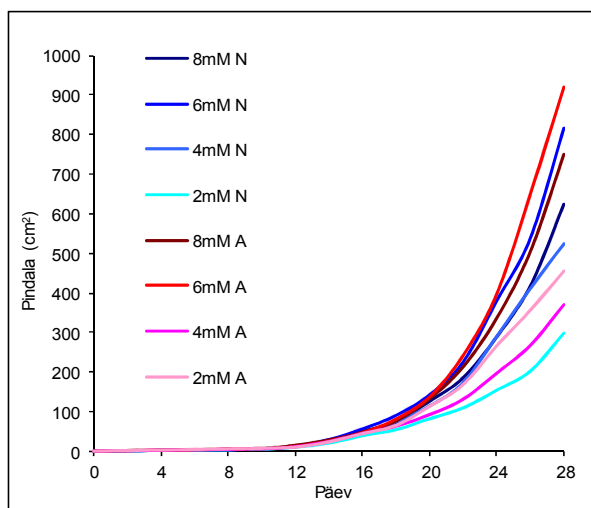


Joonis 4. 25. Päeva vanused taimed seeriast 2. Vasakul pool 8mM nitraadil kasvav taim ja paremal 8mM ammooniumil kasvav taim

Esialgse ülevaate saamiseks lämmastiku allika ja tema kontsentratsiooni mõjust taime kasvule, kaaluti taimi ja mõõdeti nende lehepindala ülepäeviti. Taimede kasvukõverad on toodud joonistel 5.-8.



Joonised 5. ja 6. Taimede lehepindala ja taime kaalu kõverad seeriast 1. 1% N- näitab, kui suure osa 8mM lämmastikust toitelahuses moodustab nitraat. Graafikud iseloomustavad taimede kasvu. Mõlema graafiku x-teljel on taime vanus alates seemne idanema panekust. Joonise 5. y-teljel on lehepindala muutus ja joonisel 6. y-teljel taime kaalu muutus.



Joonised 7. ja 8. Taimede lehepindala ja taime kaalu kõverad seeriast 2. N- nitraadil kasvanud taim. A- ammooniumil kasvanud taim. Graafikud iseloomustavad taimede kasvu. Mõlema graafiku x-teljel on taime vanus alates seemne idanema panekust. Joonise 1. y-teljel on taime lehepindala muutus ja joonisel 2. y-teljel taime kaalu muutus.

Joonistel 5. ja 6. on toodud esimese katseseeria taimede kasvukõverad. Joonistel on näha toitelahustes oleva ammooniumiiooni kontsentratsiooni väga tugevat mõju taime kasvule. Joonised 7. ja 8. Iseloomustavad teise katseseeria taimede kasvukõveraid. Joonistelt võib selgelt välja lugeda, et taimede kasv ei erine oluliselt ammooniumil ja nitraadil kasvanud taimede vahel, vaid sõltub lämmastikuiooni kontsentratsioonist toitelahuses. Joonisel 8. on toodud taimede kaalu muutus, kus on näha, et taimedel on mingis kasvuetapis toimunud kaalu vähenemine. See ei tulene mitte taime kaalu langusest vaid taimede juurte kasvades rebeneb salvrätik, mis on pandud liivapoti alla takistamaks liiva ärakannet. Salvräti purunedes

puudub osa liiva alumisse potti ja see ära uhitud liiva hulk tuleb joonisel välja taimede kaalu langusena. Jooniselt 6. võib näha, et esimese katseseeria taimedel toimus mulla kompaktsuse tõttu mulla ärakanne palju väiksemal määral kui teises katseseerias liiva ärakanne.

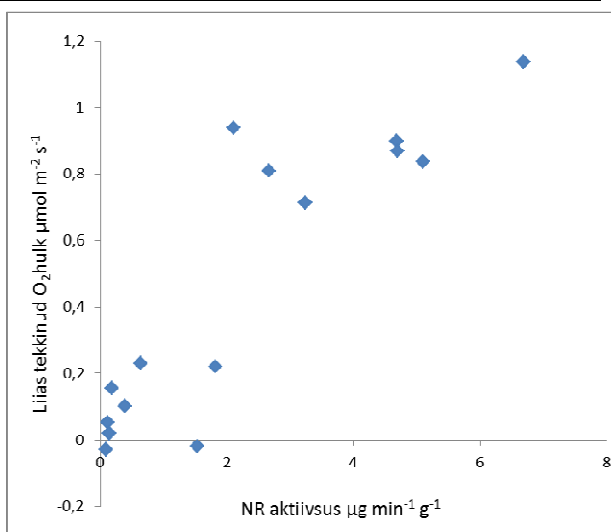
### 2.3.2. Nitraadi reduktaasi aktiivsus

NR aktiivsus määrati leidmaks, kus redutseeritakse päevalille taimedes nitraati. Taimede NR aktiivsused on toodud tabelis 1. Hiljem tekkis veel võimalus mõõdetud NR aktiivsusi võrrelda optilistest-gasomeetristest mõõtmistest leitud elektronvooga teistele aktseptoritele peale NADP<sup>+</sup>. Lisa elektronvoog leiti võrreldes omavahel CO<sub>2</sub> assimilatsiooni ja O<sub>2</sub> evolutsiooni. Kinnitamaks, et liias tekkinud hapniku puhul läksid elektronid veelt NADP<sup>+</sup> asemel lämmastiku redutseerimiseks on toodud võrdlev joonis 9, kus on omavahel võrreldud taimede NR aktiivsust ja liias tekkinud O<sub>2</sub> hulka.

Tabel 1. Tabelis on toodud taimede NR aktiivsus väljendatuna redutseeritud lämmastiku hulganähtu minutis ühe grammi taimse materjali kohta.

Seeria 1									
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> % toitelahuses		100	85	70	55	40	25	10	0
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> % toitelahuses		0	15	30	45	60	75	90	100
Redutseeritud N µg min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup>	leht	6,69	-	5,11	4,68	1,83	1,54	0,12	0,14
	juur	0,52	-	0,52	0,67	0,39	0,27	0,20	0,15
Seeria 2									
lämmastikuiooni molaarsus toitelahuses		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>				NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>			
		8 mM	6 mM	4 mM	2 mM	8 mM	6 mM	4 mM	2 mM
Redutseeritud N µg min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup>	leht	4,70	3,24	2,68	2,11	0,40	0,63	0,09	0,19
	juur	0,14	0,09	0,08	0,12	0,05	0,02	0,03	0,03

See, kas taimedes redutseeritakse nitraat juurtes või lehtedes varieerub liigiti. On taimi, mis redutseerivad peaaegu kõik nitraadi juba juurtes ning leidub taimi, mille juurtes puudub täielikult NR aktiivsus. Tabeli andmetest võime järeldada, et päevalill kuulub nende taimede hulka, mis redutseerivad suurema osa nitraadist lehtedes. See, et ammooniumil kasvanud taimed näitasid samuti mõningast NR aktiivsust ei

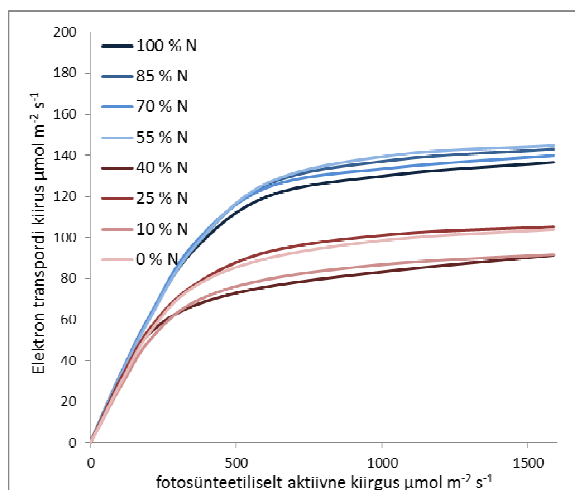


Joonis 9. Korrelatsiooni graafik NR aktiivsuse ja liias tekkinud O<sub>2</sub> hulga vahel

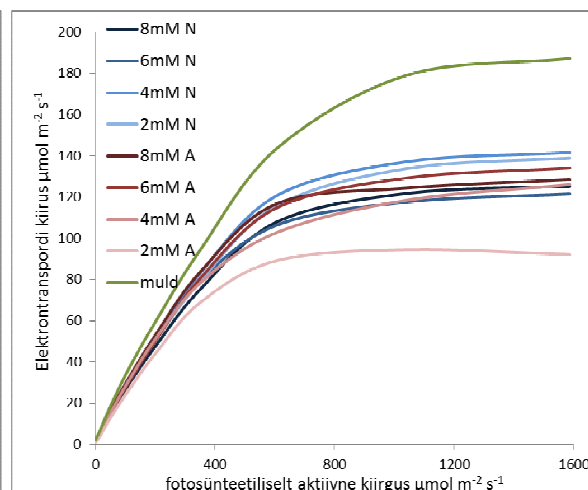
Tulene mitte nitraadiga saastunud toitelahustest, vaid pigem sellest, et NR kodeerivate geenide transkriptsioon on indutseeritud ka valguse poolt.

### 2.3.3. Optilised-gasomeetriselised mõõtmised

Taimede valguskõver õhuhapniku kontsentratsioonil on toodud joonistel 10. ja 11. Mõõtmistes suunati taimetele erineva intensiivsusega valgust ja mõõdeti elektrontranspordi kiirust.



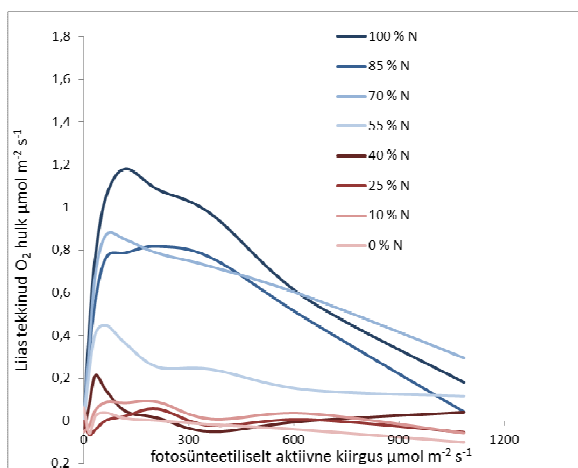
Joonis 10. Esimese seeria taimede valguskõverad. % N näitab, kui suure osa 8mM lämmastikust toitelahuses moodustab nitraat.



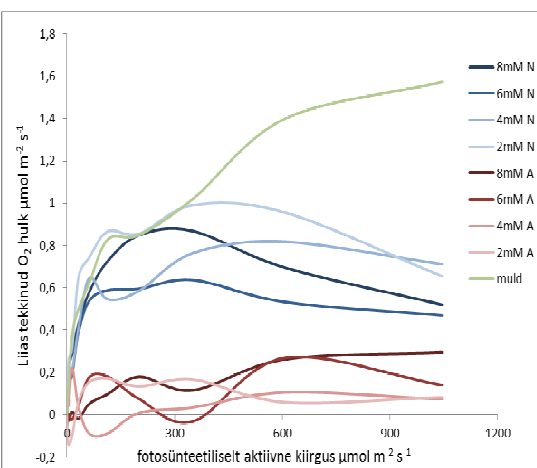
Joonis 11. Teise seeria taimede valguskõverad. N- nitraadil kasvanud taim. A- ammooniumil kasvanud taim.

Joonisel 10. on näha, et taimedel, mille toitelahuses oli ammooniumi sisaldus kogulämmastikust üle 60 % omasid teiste taimedega võrreldes madalamat fotosünteesi kiirust. Teise katseseeria taimede valguskõveratest võib näha, et üldiselt on kõigil sarnane fotosünteesiline aktiivsus, erinevad on ainult mulla taim, mille elektrontransport on samadel valgustel tunduvalt kiirem kui ükskõik kumma katseseeria teistel taimedel ja 2mM ammooniumi kontsentratsioonil kasvanud taim, millel on teise seeria taimedest madalaim fotosünteesi kiirus.

Lisaks oli võimalik võrrelda taimede hapniku evolutsiooni ja CO<sub>2</sub> assimilatsiooni erinevatel valguse intensiivsustel (Oja *et al.*, 2007). Antud tulemused on toodud joonistel 12. ja 13. Tulemustest on näha, et taimes, mis kasvasid toitelahuses, mille lämmastik allikas oli ainult nitraat või kus domineeris nitraat, omasid lisa elektronvoogu nitritile. Esimese katseseeria taimedes, mille ammooniumi sisaldus toitelahuses ületas 60%, puudus alternatiivne elektronvoog täielikult. Teises katseseerias ammooniumit sisaldanud toitelahustel kasvanud taimedel on näha alternatiivset elektronvoogu, aga siiski tunduvalt väiksemat, kui nitraadil kasvanud taimedel.



Joonis 12. Esimese seeria taimede lisa O<sub>2</sub> mõõtmised. % N- näitab, kui suure osa 8mM lämmastikust toitelahuses moodustab nitraat.



Joonis 13. Teise seeria taimede lisa O<sub>2</sub> mõõtmised. N- nitraadil kasvanud taim. A- ammooniumil kasvanud taim

### 2.3.4. Klorofüll hulk

Klorofüll hulgade määramiseks tehti leheproovist 80% atsetooni lahus ja määrati spektrofotomeetriliselt lahuse optiline tihedus. Kasutades Porra *et al.*, (1989) poolt väljapakutud valemeid:

$$\text{Chla (nmol/ml)} = 13.71 \cdot \text{OD}_{663.6} - 2.85 \cdot \text{OD}_{646.6}$$

$$\text{Chlb (nmol/ml)} = 22.39 \cdot \text{OD}_{646.6} - 5.48 \cdot \text{OD}_{663.6}$$

Kus Chla ja Chlb on klorofüllide hulgad lahuses ja OD<sub>646.6</sub> ning OD<sub>663.6</sub> on lahuse optilised tihedused antud lainepikkustel. Klorofüll hulgad arvutati ümber taimelehe pinnaühiku kohta ja tulemused on toodud tabelis.

Tabel 2. Toodud on iga taime kahe lehe klorofüll a ja b hulkade keskmised väärtused lehe pinnaühiku kohta. Lisaks on toodud klorofüll a ja klorofüll b suhted.

Seeria 1								
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> % toitelahuses	100	85	70	55	40	25	10	0
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> % toitelahuses	0	15	30	45	60	75	90	100
a(μmol/m <sup>2</sup> )	381,3	433,4	423,6	423,9	427,2	370,8	402,9	453,6
b(μmol/m <sup>2</sup> )	97,5	106,8	111,3	100,9	114,1	90,9	105,7	127,9
a+b	478,8	540,2	534,9	524,8	541,2	461,7	508,6	581,5
a/b	3,91	4,07	3,80	4,19	3,74	4,08	3,80	3,55

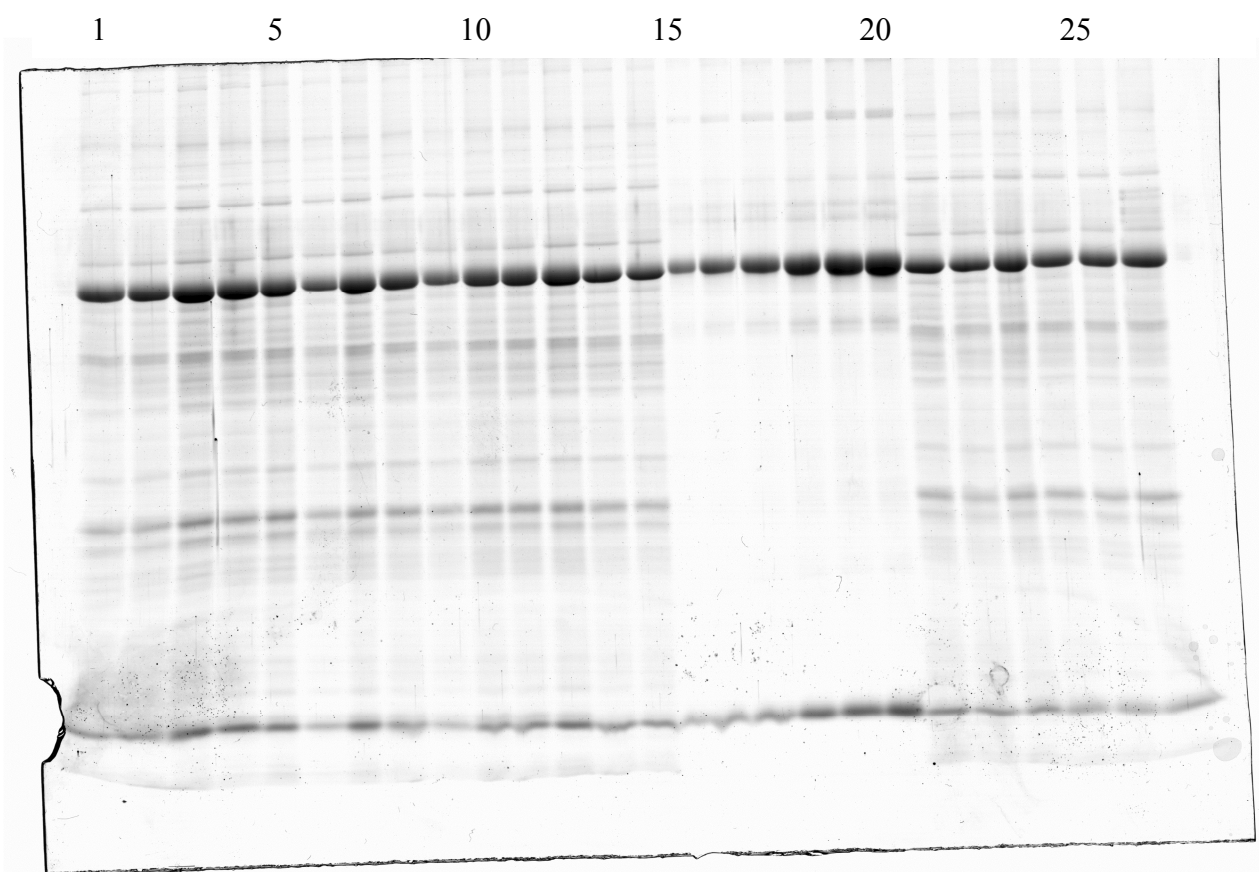
Seeria 2									
lämmastikiooni molaarsus toitelahuses	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>				NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>				Muld
	8 mM	6 mM	4 mM	2 mM	8 mM	6 mM	4 mM	2 mM	
a(μmol/m <sup>2</sup> )	408,5	328,1	352,0	326,4	486,1	459,8	495,5	313,2	501,7
b(μmol/m <sup>2</sup> )	108,6	82,2	88,9	85,4	122,8	118,9	133,1	82,4	131,2
a+b	517,1	410,3	440,9	411,9	608,9	578,7	628,5	395,6	632,9
a/b	3,77	3,99	3,95	3,83	3,95	3,87	3,73	3,80	3,82

a- klorofüll a, b- klorofüll b

Kui esimeses katseseerias ei mõjutanud klorofüllü hulka oluliselt, millistel ammooniumi/nitraadi suhetel taimed kasvasid, siis teises katseseerias oli ammooniumi taimedel tunduvalt suurem klorofüllü sisaldus võrreldes nitraadi taimedega, küündides isegi peaaegu mulla taime klorofüllü sisalduseni.

### 2.3.5. RuBisCO hulk

Rubisco hulk määrati densitomeetriselt suure subühiku (LSU) bändi värvuse optilise tiheduse järgi akrüülamiid geelil. Arvutisse skaneeritud geelipilt teise katseseeria taimedega läbiviidud geelelektroforeesist on toodud joonisel 14. RuBisCO hulga määramiseks kasutati markerina eelnevalt TUMRI Taimefüsioloogia õppetoolis puhastatud RuBisCO valku. Värvitud geelid skaneeriti ja salvestati formaati \*.tif. Pildifail konverteeriti ümber programmiga tif2.exe (Talts, 2005) ja analüüsiti ImageQuant programmiga. Saadud RuBisCO hulgad on toodud tabelis. Tabelis on toodud iga taime kahe lehe keskmised RuBisCO hulgad.



Joonis 14. RuBisCO proovide geelelektroforeesil saadud geeli skaneeritud pilt (ainult punase kanali info) teise katseseeria proovidest. Proove kanti hambasse 10µl. Parevalt poolt lugedes bändid 15-20 on markerid.

Tabel 3. RuBisCO hulk taimedes lehe pinnaühiku kohta.

Seeria 1								
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> % toitelahuses	100	85	70	55	40	25	10	0
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> % toitelahuses	0	15	30	45	60	75	90	100
RuBisCO hulk (g/m <sup>2</sup> )	3,8	4,6	4,2	3,9	1,6	2,3	1,8	2,3

Seeria 2									
lämmastikiooni	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>				NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>				muld
molaarsus toitelahuses	8 mM	6 mM	4 mM	2 mM	8 mM	6 mM	4 mM	2 mM	
RuBisCO hulk (g/m <sup>2</sup> )	4,1	3,2	3,5	3,4	4,9	4,0	4,0	2,1	5,9

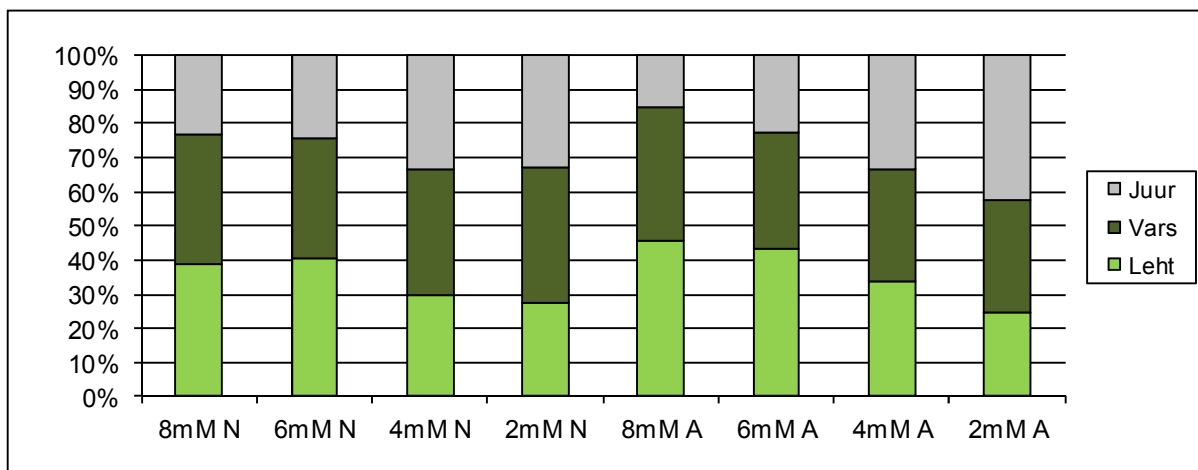
Esimeses katseseerias oli suurematel ammooniumi kontsentratsioonidel kasvavatel taimedel madalam RuBisCO hulk, samal ajal kui teises katseseerias suurenes RuBisCO hulk taimes ammooniumi kontsentratsiooni kasvades. Teises katseseerias oli ammooniumil kasvavatel taimedel lehtedes rohkem RuBisCOt kui nitraadil kasvavatel taimedel (erandina 2mM ammooniumi taim), mis viitab sellele, et esimeses katseseerias suurematel ammooniumi kontsentratsioonidel kasvavate taimede vähene RuBisCO hulk ei tulenenud ammooniumi kontsentratsioonist vaid muudest faktoritest. Sarnaselt elektrontranspordi kiirusele erinevatel valguse intensiivsustel ei küündinud ka RuBisCO hulgas ükski taim mulla taimele ligilähedalegi.

### 2.3.6. Taimede kuivkaalud

Peale NR aktiivsuse määramist, surmati taimed ja jäeti 70 °C juurde kuivama. Kuivkaalud katseseeriast 2. mõõdeti, kui taimeosade kaal enam ei vähenenud ja oli jäänud pidama platoole. Nitraadil kasvanud taimed olid surmamise hetkel 35 päeva vanused ja ammooniumil kasvanud taimed 38 päeva vanused. Esimese seeria taimedel kuivkaale ei mõõdetud, selle pärast et kõik kättesaadavad juured kasutati NR aktiivsuse määramiseks ja mullast eraldatud juurte kaal oluks ebatäpne.

Tabel 4. Taimeosade kuivkaalud seeriast 2.

lämmastiku iooni	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>				NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>			
	8 mM	6 mM	4 mM	2 mM	8 mM	6 mM	4 mM	2 mM
Lehe kuivkaal (g)	3.59	4.57	3.1	1.32	6.32	7.47	1.74	2.99
Varre kuivkaal (g)	3.56	4.02	3.81	1.87	5.39	5.79	1.72	4.05
Juure kuivkaal (g)	2.16	2.76	3.42	1.57	2.06	3.86	1.73	5.16



Joonis 15. Taimede eri piirkondade kuivkaalude osa kogu taimede kuivkaalust. N-nitraadil kasvanud taim, A- ammooniumil kasvanud taim

Joonisel 15. toodud graafik näitab, et taimede toitelahuses lämmastiku kontsentratsiooni suurendades suureneb lehtede ja väheneb juurte osakaal. Antud tulemusi kinnitavad ka eelkatsetes läbiviidud mõõtmiste tulemused.

## 2.4. Arutelu

Taimede ATP/NADPH tasakaalu küsimuse üle on diskuteeritud juba elektrontransportahela avastamisest saadik. Praeguseks on jõutud arusaamale, et kloroplastis peavad leiduma veel mingid mehhanismid ekstra ATP genereerimiseks, mis moodustab mõne % lineaarsest elektrontransportahelast. Ülevaate võimalikest mehhanismidest ekstra ATP genereerimiseks on andnud Kramer ja Evans, (2011). Küll aga on seal töös jäänud mainimata nitraadi redutseerimine, mis on samuti üks võimalus lisa ATP genereerimiseks, sest ühe nitraadi redutseerimiseks  $\alpha$ -amino grupi moodustumiseni kulub 10 elektroni, aga ainult 1 ATP (Noctor ja Foyer, 1998). Viimasest tööst ajendatuna antud töö valmiski.

Esimese seeria taimede kasvu, klorofüllil ja RuBisCO hulga vähenemise järgi ammooniumi kontsentratsiooni suurenedes toitelahuses võis eeldada, et see tuleneb kas nitraadi puudusest tulenevast ATP/NADPH tasakaalustamatusest, või mõnest muust ammooniumi poolt põhjustatud toksilisest efektist. Kuna optilised- gasomeetrilised mõõtmised näitasid, et taimed on võimelised kasvama ka ilma elektronvoota nitritile, siis eeldasime, et ammooniumil kasvanud taimede kasvu pidurdumine on tingitud mõnest muust ammooniumi poolt põhjustatud efektist. Siiani on selgusetu, miks ammoonium taimedele toksiliselt mõjub, kuid teooriaid selleks on väljapakutud mitmeid. Ühe võimalusena pakutakse (Britto ja Kronzucker, 2002), ammooniumi poolt põhjustatud hormoonide tasakaalustamatusest tulenevaid probleeme taimede metabolismile. Samuti raskendavat

ammooniumi olemasolu keskkonnas teiste kationide ülesvõttu. Lisaks muudab ammoonium keskkonna pH happeliseks ja seetõttu tulevad suuremad ammooniumi poolt põhjustatud toksilised efektid välja just taimede puhul, kes ei talu keskkonna madalat pHd (Findenegg, 1987). Kuna jäi mulje, et ammooniumi toksilisus ja pH on omavahel väga tugevalt seotud, siis otsustati teises katseseerias stabiliseerida toitelahuste pH MES puhvriga 6.4le. Vaatamata MES puhvri lisamisele, toimus ammooniumit sisaldavate toitelahuste hapestumine. Selleks, et vältida pH langemist alla 6 tuli toitelahuste pH stabiliseerida vähemalt korra päevas KOHga. Juba teise katseseeria taimede kasvamise järgus oli võimalik järeldada, et ammooniumi poolt põhjustatud keskkonna pH langusel on väga tugev efekt taimede kasvule. Sellele viitas asjaolu, et taimed, mis kasvasid stabiliseeritud pHga ammooniumit sisaldaval toitelahusel näitasid isegi suuremaid kasvu parameetreid kui samal lämmastiku kontsentratsioonil kasvanud nitraadi taimed. Hiljem sai selgeks, et olulised erinevused puudusid ka klorofüllil ja RuBisCO hulgas nitraadil ja ammooniumil kasvanud taimede vahel ning ammooniumil kasvanud taimed sisaldasid isegi rohkem klorofüllil ja RuBisCOt. See tulemus oli ootamatu, sest esimeses katseseerias oli näha ammooniumil kasvavatel taimedel kasvu, eriti juurte kasvu inhibitsiooni. Seega pakume välja, et ammooniumi toksiline efekt taimetele tuleneb ammooniumi omadusest muuta taime kasvukeskkond happeliseks. Meie saadud tulemusi kinnitavad ka (Gill ja Reisenauer, 1993), kuid nagu korduvalt mainitud, siis ei saa antud valdkonnas uurimustööd läbi viia ilma kellegi teise tööga vastuollu minemata. Qin *et al.*, 2011 uuris sarnaselt antud tööle ammooniumi mõju taimedele ja temagi kasutas pH stabiliseerimiseks MES puhvrit, kuid stabiliseeritud pHle vaatamata täheldati taimede kasvu inhibitsiooni. Antud töödes oli aga meie tööga võrreldes kaks väga olulist erinevust. Esiteks kasutati teisi taimi (*Arabidopsis*), aga nagu enne sai mainitud, siis erinevad taimeliigid reageerivad ammooniumile erinevalt, seega pole üllatav, et erinevate taimedega läbiviidud katsed annavad erinevad tulemused. Teine ja ilmselt olulisem erinevus seisneb selles, et antud töödes mõjutati ammooniumiga väga noori taimi, samal ajal, kui meie katsetes lasti taimedel enne toitelahusesse viimist nädal aega destilleeritud veel kasvada. Kuigi on selge, et madal pH ammooniumit sisaldaval toitelahusel pärsib taimede kasvu, siis antud töös jääb lahtiseks küsimus, kas esimeses katseseerias täheldatud ammooniumi toitelahusel kasvavate taimede kasvu inhibitsioon tuleneb ammooniumi poolt põhjustatud keskkonna hapestumisest või sellest, et kui keskkonna pH on madal, siis mõjub ammooniumiioon päevalille taimetele teisiti kui neutraalse pH juures. Et sellele küsimusele vastus saada tuleks läbi viia lisakatse, kus nii ammooniumi kui nitraadi toitelahuste pH hoitakse mõlemal juhul madala väärtuse juures.

Antud töö näitab, et nitrit ei ole taimedes obligatoorne elektronaktseptor ning ammooniumi toksilisus päevalillele ei tulene nitraadi puudusest, vaid hoopis ammooniumi

omadusest muuta taimede kasvukeskkond happeliseks. Kuid mis siis on see ühend, mis täidab taimedes alternatiivse elektronaktseptori rolli ja päästab taime ATP defitsiidist? Eelnevalt arvati, et selleks on tsükliline elektrontransportahel, aga selle võimaluse välistas Eero Talts enda doktoritöös. Ühe võimalusena on pakutud välja üleliigsete elektronide kloroplastist välja transportimise rada *malate valve*. Antud süsteem seisneb selles, et kloroplastides malaadi dehüdrogenaas (MDH) redutseerib oksaalatsetaadi (OA) malaadiks, kasutades NADPH elektrone. Kloroplasti membraanis on malaadi/OA transporter, mis vahendab antud ühendite ülekannet kloroplasti ja tsütosooli vahel. Tsütosoolis malaat oksüdeeritakse OAs redutseerides tsütosoolset NADi. MDH mutantidega tehtud katsed (Laisk *et al.*, 2007) näitasid, et *malate valve* üksinda ei suuda puudujäävat ATPd genereerida. Seega kui fotosünteetilises elektrontransportahelas üldse on üks ja ainus alternatiivne elektronaktseptor, mis ilma teiste protsesside abita vabastab taime ATP/NADPH tasakaalustamatusest tulenevad probleemid, siis on see hapnik. Sellist reaktsiooni, kus elektronid liiguvad lineaarses elektrontransportahelas veelt hapnikule vee moodustamisega kutsutakse Mehleri reaktsiooniks või *water-water cycle*iks. Kuigi sellise raja olemasolu on juba pikka aega teada olnud, ei ole sellest siiani selget ülevaadet. Sarnaselt tsüklilisele elektrontransportile on pakutud tema ülesanneteks lisa ATP genereerimine (tekib ATP ilma NADPH moodustamiseta) ja taime kaitse kõrgetel valgustel fotoinhibitsiooni eest (Asada, 1999). Kuid kuna elektronide hulka, mis liiguvad *water-water cycle*is on väga raske määrata, siis on siiani ebaselge, mis intensiivsusega antud tsüklil töötab. Antud töös viitas hapniku olulisusele elektronaktseptorina asjaolu, et taimedel, mille toitelaht sisaldas ammooniumit üle 60 % kogulämmastikust puudus erinevus O<sub>2</sub> evolutsiooni ja CO<sub>2</sub> assimilatsiooni vahel peaaegu täielikult. Selle järgi ammooniumil kasvanud taimedel puudub täielikult elektronvoog alternatiivsetele aktseptorile, mis aga ei lähe kokku teema ülevaates püstitatud probleemiga. Lahenduse pakub Mehleri reaktsioon seetõttu, et kui elektronid lähevad veelt hapnikule, siis produtseeritakse otsitud ATPd, aga ei assimileerita süsihappegaasi ning ka hapniku kontsentratsioon kloroplastis ei muutu. Seega jääb O<sub>2</sub> evolutsiooni ja CO<sub>2</sub> assimileerimise võrdlemisel *water-water cycle*is liikuvate elektronide hulk märkamatuks.

Kuid taimedes ei pruugigi olla ühte ainust alternatiivset elektronaktseptorit, mille puudumisel taim ei saaks kasvada, vaid süsteem, mis suunab elektrone vastavalt vajadusele ja võimalusele erinevatele aktseptoritele. Antud katsetes viitab sellele asjaolu, et teises katseseerias kasvanud ammooniumi taimedel oli märgata mõningast alternatiivset elektronvoogu, mis ei saanud olla nitraat. Ka kirjandusest võib leida materjali, mis viitab väljapakutud mehhanismi olemasolule. Näiteks on ammooniumil kasvanud taimedes täheldatud suuremat hapnikuradikaalidest vabanevate ensüümide hulka, kui nitraadil

kasvanud taimedel. Samal ajal kui askorbaadi hulk lehes oli ammooniumil kasvavatel taimedel väiksem (Zhu *et al.*, 2000). Antud kombinatsioon võimaldab oletada, et ammooniumil kasvavatel taimedel töötab *water-water cycle* intensiivsemalt kui nitraadil kasvavatel taimedel. Selleks, et antud teemat edasi uurida, peaks taimi kasvatama sarnaselt meiepoolt läbiviidud katsetele, aga kasvukambris peaks viima hapniku kontsentratsiooni miinimumini. See annaks võimaluse hinnata taimede kasvu olukorras, kus taimedel puudub võimalus suunata elektrone *water-water cycle*isse.

## KOKKUVÕTE

Antud töös uuriti, kas nitrit on obligatoorne alternatiivne elektronaktseptor lineaarses elektrontransportahelas ning kas ammooniumi toksilisus taimedele tuleneb sellest, et ammooniumil kasvanud taimed ei saa lämmastiku redutseerida, mille tagajärjel jääb kloroplast ATP defitsiiti. Vastuse leidmiseks püstitatud küsimustele, kasvatati taimi erinevatel toitelahustel, mis varieerusid lämmastikaluse ja lämmastiku iooni kontsentratsiooni poolest. Ammooniumi toksilisuse uurimiseks varieeriti toitelahuste pHd. Kui toitelahuste pH hoiti puhvrit kasutades paigas, siis ammooniumil kasvanud taimedel puudusid stressi sümptomid, aga kui puhvrit ei lisatud, siis ammooniumit sisaldavate toitelahuste pH muutus kiiresti happeliseks, mis põhjustas taimedele toksilise efekti, pärssides nende kasvu. Välistades pHst tingitud toksilise efekti kasvasid taimed ammooniumil sama hästi kui nitraadil. See näitab, et üks olulisemaid põhjuseid, miks ammoonium pärsib kõrges kontsentratsioonis taimede kasvu, tuleneb sellest, et ammoonium muudab taimede kasvukeskkonna kiiresti happeliseks. Kuna stabiliseeritud pHga toitelahustel kasvanud taimede kasvukõveratel ja fotosünteesi parameetritel puudusid olulised erinevused, siis võis järeldada, et nitrit pole obligatoorne elektronaktseptor lineaarses elektrontransportahelas. Seega pakutakse välja, et hoopis hapnik on taimedes alternatiivne elektronaktseptor, mis genereerib puudujääva ATP sekundaarsete metaboliitide sünteesiks. Välistatud ei ole ka võimalus, et taimedes leiduvad mehhanisimid, mis suudavad vastavalt vajadusele suunata elektrone erinevatele alternatiivsetele elektronaktseptoritele.

Ammonium toxicity – is it caused by lack of alternative electron acceptors ?

Mauri Veskimeister

## RESUME

In photosynthetic electron transport chain ATP and NADPH are produced in a strict stoichiometry. In linear electron transport the ratio produced ATP and NADPH is 3ATP/2NADPH. ATP and NADPH are then consumed for CO<sub>2</sub> reduction in exactly the same ratio. But in chloroplast some extra ATP is needed for the synthesis and transport of secondary metabolites. This extra ATP has to be produced by an alternative source, either cyclic electron transport around PSI or by electron transport to alternative electron acceptors other than NADP<sup>+</sup>. The aim of this work was to find out if nitrate and nitrite are the alternative electron acceptors that enable the extra production of ATP. A fact supporting this hypothesis is that ammonium (a fully reduced nitrogen source) has been found to be toxic for plants but by adding nitrate to the solution toxic effects disappear. We hypothesized that not ammonium itself is toxic but lack of nitrate causes toxic effects in plants. To figure that out plants were grown under different nitrogen sources. We did not find any important differences between plants grown under ammonium or nitrate as sole nitrogen source while the solution medium pH was kept stable at 6.4. But we did see retardation of growth when the solution medium pH was not strictly stabilized. We propose that ammonium toxicity is caused by its nature to acidify the root growth medium. This indicated that nitrate and nitrite are not obligatory alternative electron acceptors in photosynthetic linear electron transport chain. We propose that alternative acceptor that saves chloroplast from ATP deficit could then be oxygen. But there is also a possibility that there are not one direct alternative electron acceptor but that plants are able to channel electrons between different acceptors.

## KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- Asada, K (1999) THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601–39
- Ben-Shem, A. Frolow, F. Nelson, N. (2003) Crystal structure of plant photosystem I *Nature* 426: 630-635
- Berry, S. Rumberg, B. (1999) Proton to electron stoichiometry in electron transport of spinach thylakoids *Biocim. Biophys. Acta* 1410: 248-261
- Britto, D.T. Kronzucker, H.J.(2002) NH<sub>4</sub><sup>+</sup> toxicity in higher plants: a critical review *J. Plant Physiol.* 159: 567-584
- Cammack, R. Rao, K.K. Barger, C.P. Hutson, K.G. Andrew, P.W. Rogers, L.J. (1977) Midpoint redox potentials of plant and algal ferredoxins *Biochem. J.* 168: 205-208
- Campbell W. H. (1999) Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology *Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 277-303
- Carrillo, N. Vallejos, R.H (1982) Interaction of ferredoxin-NADP oxidoreductase with the thylakoid membrane *Plant Physiol.* 69: 210-213
- Cramer, M.D. Lewis, O.A.M. (1993) The influence of nitrate and ammonium nutrition on the growth of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) plants *Annals of Botany* 72: 359-365
- Faure, J.-D. Vincentz, M. Kronenberger, J. Caboche, M. (1991) Co-regulated expression of nitrate and nitrite reductases *The Plant Journal* 1: 107-113
- Findenegg, G.R. (1987) A comparative study of ammonium toxicity at different constant pH of the nutrient solution *Plant and Soil* 103: 239-243
- Foyer, C.H. Noctor, G. (2002) Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon and respiratory metabolism. Volume 12 USA: Kluwer Academic Publishers
- Fukuyama, K. (2004) Structure and function of plant-type ferredoxins *Photosynth Res* 81: 289-301
- Gill, M.A. ja Reisenauer, H.M. (1993) Nature and characterization of ammonium effects on wheat and tomato *Agronomy Journal* 85: 874- 879
- Groth, G. Strotmann, H. (1999) New results about structure, function and regulation of the chloroplast ATP synthase (CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>) *Physiol Plant* 106: 142-148
- Hillier, W. Messinger, J. (2005) Photosystem II Advances in Photosynthesis and Respiration. Govindjee. Volume 22. Mechanism of photosynthetic oxygen production 567-608. Springer
- Hirel, B. Lea, P.J. (2002) The biochemistry, molecular biology, and genetic manipulation of

- primary ammonia assimilation pp. 71-92. Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon and respiratory metabolism. Foyer, C.H. Noctor, G. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/ Boston/ London
- Hope, A.B. (2000) Electron transfers amongst cytochrome *f*, plastocyanin and photosystem 1: kinetics and mechanisms *BBA* 1456: 5-26
- Kramer, D.M. Evans, J.R. (2011) The importance of energy balance in improving photosynthetic productivity *Plant Physiology* 155: 75-78
- Laisk, A. Eichelmann, H. Oja, V. Talts, E. Scheibe, R. (2007) Rates and roles of cyclic and alternative electron flow in potato leaves *Plant Cell Physiol.* 48: 1575-1588
- Laisk, A. Oja, V. Rasulov, B. Rämama, H. Eichelmann, H. Kasparova, I. Pettai, H. Padu, E. Vapaavuori, E. (2002) A computer-operated routine of gas exchange and optical measurements to diagnose photosynthetic apparatus in leaves *Plant Cell Env.* 25: 923-943
- Lubitz, W. Reijerse, E.J. Messinger, J. (2008) Solar water-splitting into H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>: design principles of photosystem II and hydrogenases. *Energy Environ. Sci.* 1: 15-31
- Miller, A.J. Fan, X. Orsel, M. Smith, S.J. Wells, D.M. (2007) Nitrate transport and signaling *J Exp Bot* 58: 2297-2306
- Mitchell, P. (1975) The protonmotive Q cycle: A general formulation. *FEBS letters* 59: 137-9
- Noctor, G. Foyer, C.H. (1998) A re-evaluation of the ATP :NADPH budget during C3 photosynthesis: a contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity? *J Exp Bot* 49: 1895-1908
- Padu, E. Eichelmann, H. (2008) Taimefüsioloogia praktikum. Atlex
- Porra, R.J. Thompson, W.A. Kriedemann, P.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy *Biochim. Biophys. Acta* 975: 384-394
- Qin, C. Yi, K. Wu, P. (2011) Ammonium affects cell viability to inhibit root growth in *Arabidopsis* Journal of Zhejiang Univ Sci B 12: 477- 484
- Oja, V. Eichelmann, H. Agu, L. (2007) Calibration of simultaneous measurements of photosynthetic carbon dioxide uptake and oxygen evolution in leaves *Plant Cell Physiol.* 48: 198-203
- Riens, B. Heldt, H.W. (1992) Decrease of nitrate reductase activity in spinach leaves during a light-dark transition *Plant Physiol* 98: 573-577
- Sacksteder, C.A. Kanazawa, A. Jacoby, M.E. Kramer, D.M. (2000) The proton to electron stoichiometry of steady-state photosynthesis in living plants: a proton-pumping Q cycle is continuously engaged *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14283-14288
- Seelert, H. Dencher, N.A. Müller, D.J. (2003) Fourteen protomers compose the oligomer II of the proton-rotor in spinach chloroplast ATP synthase *J. Mol. Biol.* 333: 337-344

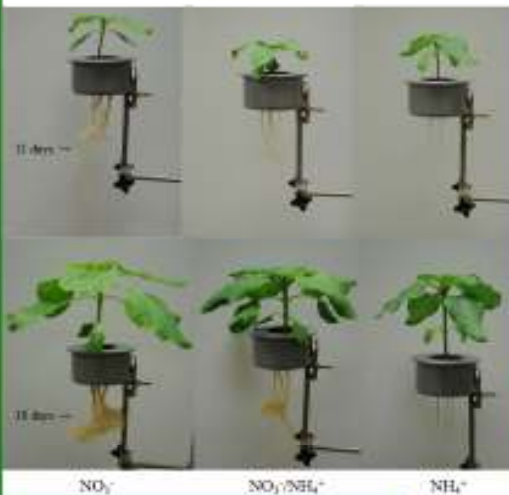
- Seelert, H. Poetsch, A. Dencher, N.A. Engel, A. Stahlberg, H. Müller, D.J. (2000) Proton powered turbine of a plant motor *Nature* 405: 418-419
- Serre, L. Vellieux, F.M.D. Medina, M. Gomez-Moreno, C. Fontecilla-Camps, J.C. Frey, M. (1996) X-ray structure of the ferredoxin: NADP<sup>+</sup> reductase from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7119 at 1.8 Å resolution, and crystallographic studies of NADP<sup>+</sup> binding at 2.25 Å resolution *Journal of Molecular Biology* 263: 20-39
- Steigmiller, S. Turina, P. Gräber, P. (2008) The thermodynamic H<sup>+</sup>/ATP ratios of the H<sup>+</sup>-ATP synthases from chloroplasts and *Escherichia coli* *PNAS*. 105: 3745-3750
- Swamy, U. Wang, M. Tripathy, J. N. Kim, S. Hirasawa, M. Knaff, D.B. Allen, J.P. (2005) Structure of spinach nitrite reductase: implications for multi-electron reactions by the iron-sulfur-siroheme Cofactor *Biochemistry* 44: 16054–16063
- Taiz, L. Zeiger, E. (2010) Plant physiology 5th ed. Sinauer Associates Inc, Sunderland
- Talts, E. (2005) Ribuloos-1,5-bisfosfaadi karboksülaasi – oksügenaasi aktiivsus tubakas ja selle seos fotosüsteem I hulgaga
- Talts, E. (2010) Photosynthetic cyclic electron transport – measurement and variably proton-coupled mechanism. Tartu. Tartu Ülikooli Kirjastus
- Zhu, Z. Gerendás, J. Bendixen, R. Schinner, K. Tabrizi, H. Sattelmacher, B. Hansen U-P. (2000) Different tolerance to light stress in NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - grown *Phaseolus vulgaris* L. *Plant biol* 2: 558-570
- van Gorkom, H.J. Yocum, C.F. (2005) The calcium and chloride cofactors *Springer* 307- 327
- Vincentz, M. Moureaux, T. Leydecker, M-T. Vaucheret, H. Caboche, M. (1993) Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana glauca* leaves by nitrogen and carbon metabolites *The Plant Journal* 3: 315-324
- Vollmar M Schlieper D Winn M Büchner C Groth G (2009) Structure of the c<sub>14</sub> rotor ring of the proton translocating chloroplast ATP synthase *Journal of Biological Chemistry* 284: 18228-18235
- Vrettos, J.S. Limburg, J. Brudvig G.W. (2001) Mechanism of photosynthetic water oxidation: combining biophysical studies of photosystem II with inorganic model chemistry *Biochim Biophys Acta* 1503: 229-245
- Yano, J. Kern, J. Sauer, K. Latimer, M.J. Pushkar, Y. Biesiadka, J. Loll, B. Saenger, W. Messinger, J. Zouni, A. Yachandra, V.K. (2006) Where water is oxidized to dioxygen: structure of the photosynthetic Mn<sub>4</sub>Ca cluster *Science* 314: 821-825
- Yocum, C.F. (2008) The calcium and chloride requirements of the O<sub>2</sub> evolving complex *Coordination Chemistry Reviews* 252: 296- 305

## Nitrate reduction is not an indispensable alternative electron sink in photosynthesis

Hillar Eichelmann, Mauri Vesikimeister, Eero Talts\*, Evi Padu and Agu Laisk  
 Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Riia 23, Tartu 51010, ESTONIA  
 \*Presently: Institute of Agricultural and Environmental Sciences, Estonian University of Life Sciences.

**CONCLUSION** These results show that the "ammonia toxicity" is neither the result of impaired ATP/NADPH ratio nor other "toxic" chemical activity of ammonia in leaves, but growing plants on reduced N has a direct inhibiting effect on root growth. The related low level of root-produced hormones will lead to misbalanced protein synthesis in shoots, e.g. such as the decreased Rubisco level. Nitrate is not an indispensable alternative electron acceptor for fine tuning of the ATP/NADPH ratio.

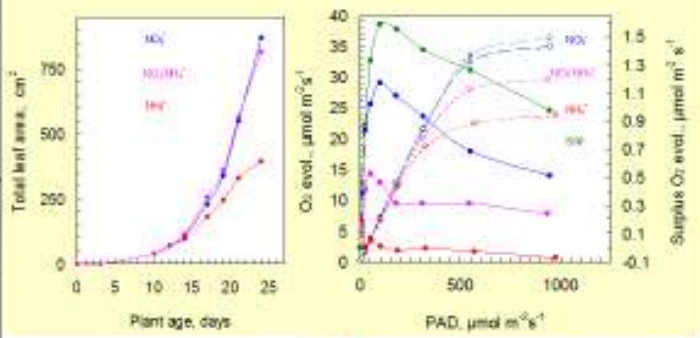
**METHODS.** Sunflower plants were grown aeroponically on Knop solutions,  $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$  summary concentration was 8 mM, varying the fraction of  $\text{NO}_3^-$ .



Root growth is inhibited in 100%  $\text{NH}_4^+$

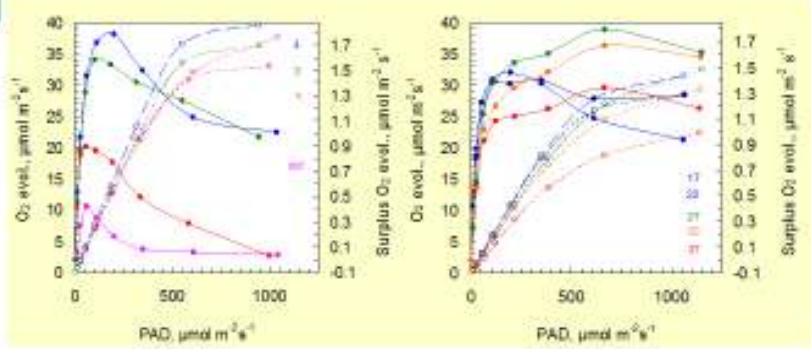


Root growth is inhibited by  $\text{NH}_4^+$ , as well as by carbamide



Leaf growth, is influenced by  $\text{NH}_4^+$  mainly due to the absence of roots

Surplus  $\text{O}_2$  evolution ( $\text{O}_2$  evolution -  $\text{CO}_2$  uptake) is absent in  $\text{NH}_4^+$  plants, but higher in  $\text{NO}_3^-$  plants



Surplus  $\text{O}_2$  evolution is higher in young and lower in old leaves.

Surplus  $\text{O}_2$  evolution little depends on temperature, only slightly decreasing at 37°C

		$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$
Oxygen evol.	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	35	30	23
Dark resp.	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	0.84	0.95	1.25
Surpl. $\text{O}_2$ evol.	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1.05	0.49	0.05
$V_m$ Rubisco	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	116	94	72
Rubisco	$\text{g m}^{-2}$	0.74	0.47	0.29
Rubisco/Prot	%	30	20	13
Rubisco $k_{cat}$	$\text{s}^{-1}$	2.64	3.25	3.75

In reduced-N plants the total protein content per leaf area unit was 87% of that of the nitrate plants. The light response curves of photosynthesis showed similar initial slope (similar quantum yield) independent of the growth substrate, but decreased plateau by 35% on the reduced N. Respiratory  $\text{CO}_2$  evolution was faster in the reduced N plants (1.25 vs. 0.84,  $\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). The lower maximum photosynthetic rate was not caused by lower stomatal conductance, but was caused by significantly lower Rubisco content in the reduced N plants (the fraction of Rubisco in the total protein was 30 and 13% in the nitrate and reduced N plants, respectively). The *in vivo*  $V_m$  of Rubisco was 72 in the reduced N plants, compared to 116  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  in the nitrate plants, despite that  $k_{cat}$  of the enzyme was increased in the plants with the lower enzyme content (2.6 in nitrate and 3.8  $\text{s}^{-1}$  in reduced N plants).

## LIHTLITSENTS

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Mauri Veskimeister

(sünnikuupäev: 22.07.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose  
Ammooniumi toksilisus – kas põhjustatud alternatiivse elektronaktseptori puudumisest ?,

mille juhendajad on Agu Laisk ja Hillar Eichelmann,

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, 27.05.2013