

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Liis Rüütel

**Kasvutingimuste mõju hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*)
õhulõhede regulatsioonile**

Bakalaureusetöö

Juhendajad Hanna Hõrak, MSc
Pirko Jalakas, MSc

TARTU 2015

SISUKORD

| | |
|---|----|
| SISUKORD | 2 |
| KASUTATUD LÜHENDID | 4 |
| SISSEJUHATUS | 5 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE..... | 6 |
| 1.1. Õhulõhede funktsioon ja regulatsioon | 6 |
| 1.2. Ioonkanalid | 7 |
| 1.2.1. Anioonkanalite regulatsioon sulgrakus vastusena abstsiihappele | 8 |
| 1.3. Õhulõhede sulgumine CO ₂ toimel | 9 |
| 1.4. Õhulõhede sulgumine pimeduse toimel..... | 10 |
| 1.5. Õhuniiskuse mõju õhulõhede regulatsioonile..... | 11 |
| 1.6. Mullaniiskuse mõju õhulõhede regulatsioonile ja põuastress..... | 12 |
| 1.7. Abstsiihape | 13 |
| 1.7.1. Abstsiihappe transport | 14 |
| 2. EKSPERIMENTAALOSA | 15 |
| 2.1. Töö eesmärgid..... | 15 |
| 2.2. Materjal ja meetodika | 16 |
| 2.2.1. Taimede kasvatamine | 16 |
| 2.2.2. Katseaparatuur..... | 17 |
| 2.2.3. Katsete läbiviimine..... | 18 |
| 2.2.3.1. Reaktsioon süsihappegaasile | 19 |
| 2.2.3.2. Reaktsioon pimedusele | 19 |
| 2.2.3.4. Reaktsioon õhuniiskusele | 19 |
| 2.2.3.5. Reaktsioon abstsiihappele | 20 |
| 2.2.4. Andmeanalüüs | 20 |
| 2.2.5. Õhulõhede sulgumiskiiruse arvutamine | 20 |
| 2.3. Tulemused..... | 21 |
| 2.3.1. Õhulõhede sulgumine süsihappegaasi toimel | 22 |
| 2.3.2. Õhulõhede sulgumine pimeduse toimel | 23 |
| 2.3.3. Õhulõhede sulgumine madala suhtelise õhuniiskuse toimel..... | 24 |
| 2.3.4. Õhulõhede sulgumine abstsiihappe toimel | 25 |
| 2.4. Arutelu | 27 |
| 2.4.1. Õhulõhede sulgumine CO ₂ ja pimeduse toimel | 28 |
| 2.4.2. Õhulõhede sulgumine madalas õhuniiskuses | 28 |

| | |
|---|----|
| 2.4.3. Kõrge suhtelise õhuniiskuse mõju õhulõhede regulatsioonile | 29 |
| 2.4.4. Mullaniiskuse mõju õhulõhede regulatsioonile..... | 29 |
| 2.4.5. Peamised järeldused | 30 |
| KOKKUVÕTE | 31 |
| RESÜMEE | 32 |
| KIRJANDUSE LOETELU..... | 33 |
| LISAD | 38 |
| LISA 1..... | 38 |
| LIHTLITSENTS..... | 39 |

KASUTATUD LÜHENDID

ABA – abstsiihape

ABA-GE – abstsiihappe β -D-glükosüülester

ABC – ATP-BINDING CASSETTE

AIT1 – ABA-IMPORTING TRANSPORTER 1

ALMT – ALUMINIUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER

ALMT12 – ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 12

CPK21, CPK23 – CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE 21, 23

CYP707A1 – CYTOCHROME P450, FAMILY 707, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 1

CYP707A3 – CYTOCHROME P450, FAMILY 707, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 3

DAF-2 DA – 4,5-diaminofluorestsiindiatsetaat

GORK – GATED OUTWARDLY-RECTIFYING K^+ CHANNEL

H^+ -ATPaas – ATP energiat vajav H^+ kanal

HT1 – HIGH LEAF TEMPERATURE 1

K^+ _{out} – kaaliumi väljavoolukanal

KAT1 – POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 1

NCED – NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 3

NRT1.2 – NITRATE TRANSPORTER 1.2

OST1 – OPEN STOMATA 1

PP2C – PROTEIN PHOSPHATASE BELONGING TO CLASS 2C

ppm – *parts per million* (osakest miljoni osakese kohta)

PYL – PYR1-LIKE

PYR – PYRABACTIN RESISTANCE

PYR1 – PYRABACTIN RESISTANCE 1

QUAC1 – QUICK-ACTIVATING ANION CHANNEL 1

RCAR – REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR

SEM – *Standard Error of the Mean* (aritmeetilise keskmise standardviga)

SLAC1 – SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1

SLAH3 – SLAC1 HOMOLOGUE 3

Valgu- ja geeninimede puhul tähistavad läbivad suurtähed tekstis valgunimesid, kaldkirjas läbivad suurtähed geeninimesid ja kaldkirjas läbivad väiketähed mutantide nimesid.

SISSEJUHATUS

Õhulõhed on väikesed avaused lehe epidermises, mille kaudu toimub taime gaasivahetus ümbritseva keskkonnaga. Õhulõhede kaudu siseneb fotosünteesiks vajalik süsihappegaas ning samal ajal väljub nende kaudu taimest vesi. Õhulõhede olulisimaks osaks on kaks sulgrakku, mille vahele moodustub väike poor. Sulgrakkude kaasabil toimub kogu õhulõhe avanemine ning sulgumine, mis on reguleeritud erinevate keerukate mehhanismide ja signaaliradade poolt. Õhulõhed avanevad näiteks valguse toimel ning sulguvad pimeduse, aga ka madala õhuniiskuse, osooni ja kõrge CO₂ kontsentratsiooni mõjul. Sulgumiseks ning avanemiseks on tähtis vee ja ionide olemasolu ja nende liikumine sulgrakkudes. Õhulõhede sulgumisel pumbatakse ionid erinevate kanalite kaudu sulgrakkudest välja, neile järgneb ka vesi – sulgraku siserõhk väheneb ning õhulõhe sulgub. Õhulõhe avanemisel toimub aga kõik vastupidi: ionid transporditakse rakku ning neile järgneb ka vesi. Selliste mehhanismide abil suudavad taimed reageerida keskkonnamuutustele ja stressile.

Maal on palju erinevaid keskkonnatingimusi, kus taimed suudavad kasvada. Mõned eelistavad kuiva, teised jällegi niiskemat pinnast. Osa taimi kasvavad paremini madala õhuniiskusega keskkonnas, nagu nt kõrbetes, teised aga vajavad kõrget õhuniiskust.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, kuidas erinevad kasvutingimused mõjutavad õhulõhede regulatsiooni harilikus müürloogas (*Arabidopsis thaliana*). Selleks kasvatati harilikku müürlooka erineva suhtelise õhuniiskusega keskkondades (20%, 70% ja 90%) ning kuivas või parajalt niiskes mullas. Nii kasvatatud taimedega tehti katseid gaasivahetuskambris, mis võimaldab mõõta taimest eralduvate ja neelduvate gaaside kogust ning selle alusel hinnata õhulõhede avatust. Gaasivahetussüsteemi abil saab uurida õhulõhede vastuseid erinevatele keskkonnateguritele, nagu õhuniiskus, süsihappegaas, pimedus ja osoon. Oma töös uurisin õhulõhede sulgumist madala õhuniiskuse, pimeduse, süsihappegaasi ja abstsiihappe toimel.

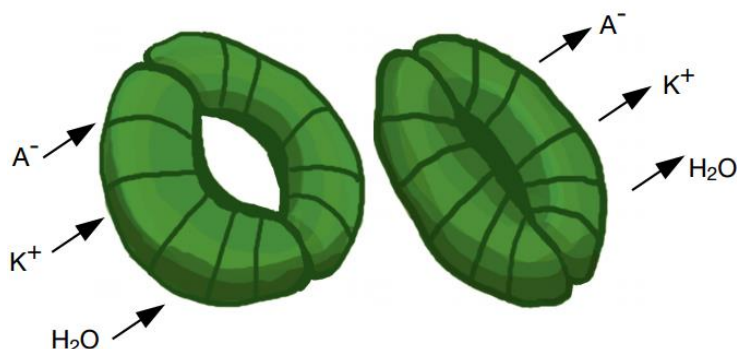
Täna juhendajaid – Hanna Hõrak ja Pirko Jalakas, et olite väga abivalmid ja vastutulelikud ning suureks abiks töö planeerimisel, koostamisel ja katsete läbiviimisel. Veel täna Irina Rasulovat, kes aitas ette valmistada taimede kasvupotte, ja Liina Jakobsoni, kes andis aeg-ajalt head nõu.

Töö koostati TÜ Tehnoloogiainstituudi Taimesignaalide uurimisrühmas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Õhulõhede funktsioon ja regulatsioon

Õhulõhed on avatud taime lehtede ja varte pinnal ning igapäev neist ümbritsevad kaks sulgrakku (Taiz ja Zeiger, 1991) (vt Joonis 1). Sulgrakud on spetsialiseerunud epidermiserakud, mis reageerivad erinevatele keskkonnast tulevatele signaalidele, nagu näiteks temperatuuri muutusele, CO₂ kontsentratsiooni muutusele, valgusele, niiskusele ja hormoonidele (Kwak jt, 2008). Enamike signaalide molekulaarsed toimemehhanismid ja signaalirajad pole lõpuni teada.



Joonis 1. Avatud ja suletud õhulõhe. Õhulõhe avatus on reguleeritud sulgraku turgorrõhuga, mis tekib anioonide (A⁻), kationide (K⁺) ja vee liikumisel sulgrakkudesse (joonise on teinud T. Vahisalu).

Küll aga on teada, et erinevate stiimulite mõjul toimub kas õhulõhede sulgumine või avanemine, mis on reguleeritud erinevate mehhanismide ja radade kaudu. Õhulõhede avanemisel on oluline H⁺-ATPaas (ATP energiat vajav H⁺ kanal), mis hüperpolariseerib membraani, pumbates prootoneid tsütoplastist apoplasti (Assmann jt, 1985; Shimazaki jt, 1986). See omakorda aktiveerib kaaliumi (K⁺) kanalid (Schroeder jt, 1984), mis pumpavad K⁺ ioone sulgrakkudesse. Kaaliumi kontsentratsioon sulgrakkudes muutub pidevalt – sõltuvalt taimeliigist suureneb õhulõhe avanedes K⁺ kontsentratsioon sulgrakkudes neli kuni kaheksa korda (Taiz ja Zeiger, 1991). Lisaks eelpool nimetatud osmootikumidele on oluline ka tähtsusest saadav orgaaniline anioon malaat (Taiz ja Zeiger, 1991) ning Cl⁻ ja NO³⁻, mis suurendavad veelgi sulgraku siserõhku ning hoiavad õhulõhe avatuna (Kwak jt, 2008). Õhulõhed avanevad näiteks valguse (Zelitch, 1961), madala CO₂ kontsentratsiooni ja kõrge õhuniiskuse toimetel.

Õhulõhe sulgemiseks on vaja rakumembraan depolariseerida (Kwak jt, 2008). Selleks inaktiveeritakse H⁺-ATPaas ning sulgumiseks olulise signaalmolekuli abstsissihape (ABA) toimet vabanev Ca²⁺ transporditakse sulgrakkudesse. Ca²⁺ kontsentratsiooni suurenemine avab omakorda nii anioonkanalid (Schroeder ja Hagiwara, 1989) kui ka K⁺ eksportivad

kanalid K^+_{out} (Schroeder jt, 1984). Peale selle muudetakse teiste signaaliradade kaudu osmootikum malaat inaktiivseks tärgliseks (MacRobbie, 1998). Lisaks Ca^{2+} ioonidele on kanalite aktiveerumiseks oluline ka valkude fosforüülimine (Sokolovski jt, 2005). Ioonide väljumise järel väljub sulgrakkudest ka vesi, turgor väheneb ja õhulõhe sulgub. Õhulõhe sulgumist kutsuvad esile ABA, CO_2 , madal suhteline õhuniiskus, osoon ja Ca^{2+} ioonid (Negi jt, 2008; Vahisalu jt, 2008) ning pimedus (Zelitch, 1961). Peale selle võivad õhulõhed sulguda ka vesinikperoksiidi (H_2O_2) toimel, mida on nähtud näiteks põldoas (*Vicia faba*) (Zhang jt, 2001) ja harilikus müürloogas (*Arabidopsis thaliana*) (Hua jt, 2012). Lämmastikoksiid (NO) on samuti oluline signaalmolekul, mis sünteesitakse sulgrakkudes vastusena ABAle ja nitritile (NO_2^-) (Desikan jt, 2002) ning mis osaleb õhulõhede sulgumisprotsessis.

Püsiv ABA olemasolu takistab õhulõhe avanemist (Kwak jt, 2008). Vakuoolist ja rakkudevahelisest ruumist ABA toimel vabanenud Ca^{2+} inhibeerib H^+ -ATPaasi aktiveerumist ja K^+ ioonide transporti sulgrakku, mis on vajalikud õhulõhe avanemiseks.

1.2. Ioonkanalid

Ioonkanalid on vajalikud ioonide liikumiseks läbi membraanide, mille tagajärjel muutub raku siserõhk ja membraanipotentsiaal ning millest sõltub õhulõhede avanemine ja sulgumine (Kollist jt, 2011). Ioonkanaleid on kahte tüüpi: kation- ja anioonkanalid (Hedrich, 2012). Õhulõhede avanemisel on olulisem roll kationkanalitel ning sulgumisel anioonkanalitel (Schroeder ja Hagiwara, 1989).

Esimesena avastati sulgrakkude rakumembraanist K^+ kanalid KAT1 (POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 1) – *Shaker*-tüüpi kanalid, mis aktiveeruvad hüperpolarisatsiooni mõjul (Hedrich, 2012). KAT1 transpordib K^+ ioone sulgraku sisse (Kollist jt, 2011) ning kanali aktiivsus ei sõltu K^+ ioonide hulgast (Hedrich, 2012).

GORK (GATED OUTWARDLY-RECTIFYING K^+ CHANNEL) on *Shaker*-tüüpi rakumembraanis asuv K^+ kanal, mis aktiveerub pingesõltuvalt membraani depolariseerumisel ja transpordib K^+ ioone sulgrakkudest välja (Kollist jt, 2011; Hedrich, 2012). GORK kanalite aktiivsus sõltub K^+ hulgast (Hedrich, 2012).

Ca^{2+} kanalid kuuluvad samuti kationkanalite hulka. Nende aktiivsus on reguleeritud nii pingesõltuvalt kui ka ligandi seondumisega. Mitmetest katsetest on selgunud, et taimedes kutsub Ca^{2+} ioonide liikumise esile membraani hüperpolarisatsioon, mitte depolarisatsioon nagu loomarakkudes (Hedrich, 2012).

Õhulõhede sulgemiseks on vaja aktiveerida anioonkanalid, mis transpordiksid anioonid sulgrakkudest välja (MacRobbie, 1998). Anioonkanalite geenid avastati alles hiljuti ning need kuuluvad kahte perekonda: *SLAC1* (*SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1*)

/SLAH3 (SLAC1 HOMOLOGUE 3) ja ALMT12 (ALUMINIUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 12) ehk QUAC1 (QUICK-ACTIVATING ANION CHANNEL 1) geenid (Hedrich, 2012). SLAC1/SLAH3 (Negi jt, 2008; Vahisalu jt, 2008) on aeglased S-tüüpi (*slow-type*) kanalid. ALMT12 on kiire R-tüüpi (*rapid-type*) kanal, mis paikneb sulgrakkudes ja transpordib peamiselt kloriidi (Cl^-) ja nitraati (NO_3^-) (Meyer jt, 2010; Sasaki jt, 2010). ALMT12 on alumiinium-aktiveeritud malaadi transporter (ALMT, ALUMINIUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER) homoloog, mis ei vaja aktivatsiooniks Al^{3+} ioone (Sasaki jt, 2010). SLAC1 homoloogina on teada neli SLAH kanalit (Hedrich, 2012), kuid ainult SLAH3 on ekspresseeritud sulgrakkudes (Geiger jt, 2011). SLAC1 kanal transpordib peamiselt samuti kloriidi ja nitraati (Kollist jt 2011).

R- ja S-tüüpi kanalite avatus sõltub membraanipotentsiaalst. R-tüüpi kanalite aktiveerumine ja deaktiveerumine toimuvad millisekundite jooksul, S-tüüpi kanalite puhul kulub aktiveerumiseks umbes 10 s ja nende inaktiveerumine ei toimu kohe (Kollist jt, 2011). S-tüüpi anioonkanali aktiveerumiseks on vajalikud ka Ca^{2+} ioonid ja fosforüleerimine (MacRobbie, 1998). Lisaks aktiveerib S-tüüpi kanaleid ABA (Hedrich, 2012).

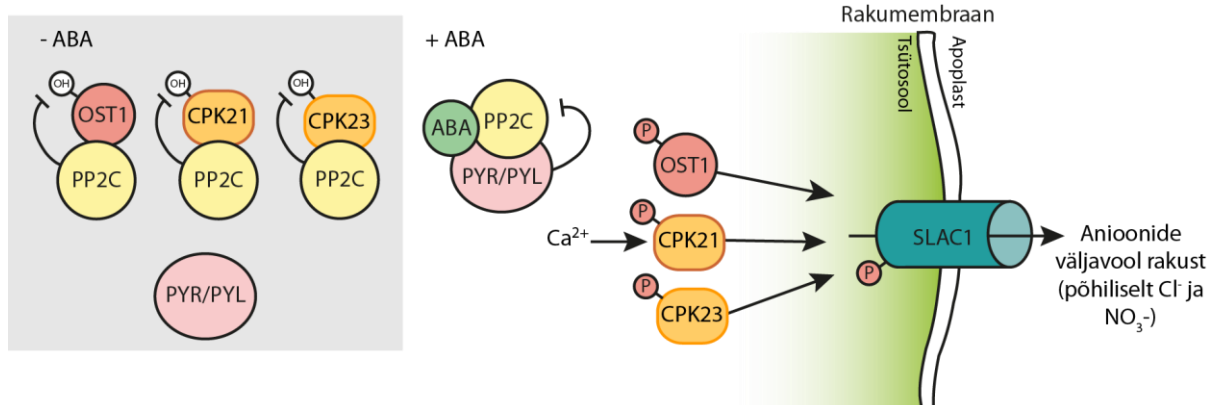
S-tüüpi SLAC1 kanal avastati hariliku müürlooga osoonitundlikust mutandist, kes ei reageerinud CO_2 -le, pimedusele, madalale õhuniiskusele ja osoonile ning kelle õhulõhede sulgumine oli takistatud (Negi jt, 2008; Vahisalu jt, 2008). Keskkonnastiimulite (ABA, NO, CO_2 , O_3 , pimedus, kuivus) mõjul toimuv õhulõhede sulgumine sõltub SLAC1 kanalist (Kim jt, 2010; Kollist jt, 2011). SLAC1 seondumisel OST1-ga (OPEN STOMATA 1) toimub SLAC1 fosforüleerimine, mille tulemusena SLAC1 kanal aktiveerub ja pumpab anioone sulgrakust välja (Geiger jt, 2009; Lee jt, 2009; Vahisalu jt, 2010). Anioonide väljavool sulgrakust vähendab rakusisest osmootset rõhku, mille tagajärjel väljub rakust ka vesi, sulgrakkude turgor väheneb ja õhulõhe sulgub (Kollist jt, 2011).

1.2.1. Anioonkanalite regulatsioon sulgrakus vastusena abstsiihappele

Sulgrakkudes on olulised ioonkanalid, mille abil on võimalik muuta sulgrakkude siserõhku ja sellega õhulõhede avatust. Anioonkanalitel on keskne roll õhulõhede sulgumisel (Kwak jt, 2008).

Anioonkanalite aktivatsioon sõltub abstsiihappe (ABA) olemasolust. ABA puudumisel (vt Joonis 2) inaktiveerivad 2C-tüüpi fosfataasid (PP2C, PROTEIN PHOSPHATASE BELONGING TO CLASS 2C) SLAC1 kanalit fosforüülvaid kinaase (OST1, CPK21, CPK23) (CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE 21, 23), defosforüleerides neid, mille tulemusena anioonkanalid ei aktiveeru (Kollist jt, 2011). ABA olemasolul moodustub kompleks ABA, ABA retseptori (PYR1/PYL) (PYRABACTIN

RESISTANCE 1/PYR1-LIKE) ja PP2C vahel ning sellega inaktiveeritakse PP2C fosfataasid. OST1, CPK21 ja CPK23 kinaasid vabanevad, aktiveeruvad ja fosforüleerivad SLAC1 anioonkanali, muutes selle aktiivseks. OST1 kinaasi aktiveerimiseks ei ole Ca^{2+} ioone vaja, kuid CPK kinaaside aktivatsioon sõltub Ca^{2+} ionide kontsentratsioonist. Anioonid liiguvad läbi aktiveeritud kanali sulgrakkudest välja ja õhulõhe sulgub (vt Joonis 1). Kirjeldatud ABA regulatsiooni skeem on esitatud joonisel 2.



Joonis 2. Anioonkanali regulatsioon sulgrakus (Kollist jt 2011). Originaaljoonist on muudetud.

1.3. Õhulõhede sulgumine CO_2 toimel

CO_2 mõju õhulõhedele uuris esimesena 1940. aastal Freudenberg. Ta leidis, et CO_2 kontsentratsiooni kahandamine põhjustab kann (*Canna*) õhulõhede avanemist ning CO_2 kontsentratsiooni suurenemine kutsub esile õhulõhede sulgumise (Freudenberg, 1940). Sarnaste tulemusteni jõudis ka Heath kaastöötajatega (Heath, 1948). Morison (1987) kinnitas oma katsetega eelnevaid tulemusi, eemaldades epidermisest, lehest või kogu taimest õhulõhe ja asetades selle suurenenud CO_2 kontsentratsiooniga keskkonda – toimus õhulõhe ava vähenemine. CO_2 kontsentratsiooni kahekordistamine võis õhulõhede juhtivust vähendada 40% (Morison, 1987). CO_2 kontsentratsiooni tõus atmosfääris suurendab paljude taimeliikide puhul lehtedesse siseneva CO_2 hulka ja vähendab õhulõhede avatust ning juhtivust (Medlyn jt, 2001).

Praeguseks pole täpselt teada molekulaarseid mehhanisme, kuidas CO_2 olemasolu taimes ära tuntakse ja õhulõhed suletakse (Kwak jt, 2008). Mõned CO_2 poolt reguleeritud õhulõhede regulatsioonis osalevad geenid on siiski teada. Näiteks *slac1* mutandis on õhulõhede sulgumine kõrge CO_2 kontsentratsiooni mõjul halvenenud (Negi jt, 2008; Vahisalu jt, 2008), kuna seal on häiritud anioonide liikumine, mis on vajalik õhulõhe sulgumiseks. Samuti on kõrge CO_2 mõjul õhulõhede sulgumine häiritud *ost1* mutandis (Merilo jt, 2013) ning ka *A. thaliana ht1* (*high leaf temperature 1*) mutandid ei reageeri CO_2 muutustele (Hashimoto jt, 2006). HT1 on kinaas, mis kontrollib õhulõhede avatuse muutumist sõltuvalt

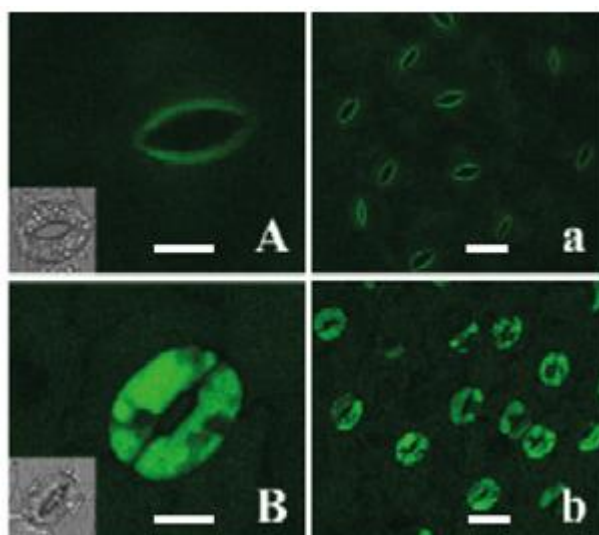
süsihappegaasist ning takistab CO₂ mõjul toimuvat õhulõhede sulgumist. Seega on HT1 kinaas süsihappegaasispetsiifiline õhulõhede regulaatorvalk.

1.4. Õhulõhede sulgumine pimeduse toimetel

Pimedus on lisaks süsihappegaasile teine olulisim ja levinuim keskkonnastiimul, mis kutsub esile õhulõhede sulgumise. Öösel on otstarbekas õhulõhed sulgeda, et vähendada taime veekadu, kuna pimeduses fotosünteesi ei toimu ja seega süsihappegaasi ei vajata. Paljud taimed aga ei sule öösel täielikult õhulõhesid (Caird jt, 2007) – nähtust ei mõisteta täpselt, kuna seda on vähe uuritud. Arvatakse, et öösel on õhulõhed reguleeritud samade mehhanismide kaudu nagu päevalgi ning et öine õhulõhede avatus ja transpiratsioon mõjutavad taime füsioloogiat ja kasvu (Caird jt, 2007). Õhulõhede pimedusvastuse täpsest regulatsioonist on vähe teada ja andmed on puudulikud. Enamik katseid on tehtud epidermisetükkide (nt She jt, 2004), mitte tervete taimedega.

Stressitingimustes sünteesitakse mitmeid signaalmolekule, millest ühed olulisimad on NO ja H₂O₂ (She jt, 2004). Need molekulid on õhulõhede valgus- ja pimedusvastuse olulised regulaatorid. NO süntees sulgrakkudes on eelduseks, et toimuks ABA-indutseeritud õhulõhede sulgumine (García-Mata ja Lamattina, 2002).

She jt (2004) katsed põldoaga (*Vicia faba*) näitasid, et endogeense NO ja H₂O₂ tase on sulgrakkudes pimeduses palju kõrgem kui valguses (vt Joonis 3). H₂O₂ roll on ulatuslikum kui ainult pimedusvastuses osalemine. Näiteks harilikus hernes (*Pisum sativum*) kutsub H₂O₂ esile õhulõhede sulgumise nii pimeduse kui ka ABA toimetel (Desikan jt, 2004).



Joonis 3. Aedoa (*Vicia faba*) sulgrakud valguses (A, a) ja pimeduses (B, b). Epidermiseribad on värvitud fluorestseeruva DAF-2 DA-ga (4,5-diaminofluorestsüandiidatsetaat), üleliigne värv on maha pestud ja vaadeldud laser skanneeriva konfokaalmikroskoobiga. Õhulõhed helenduvad, sest fluorestseeruv värv on seondunud vesinikperoksiidiga. Joone pikkus paneelidel A ja B on 16 µm ning paneelidel a ja b 40 µm. (She jt, 2004, originaaljoonist on muudetud).

ABA on pimedusvastuseski oluline signaalmolekul. Õhulõhede regulatsioonis on olulised ABA retseptorid PYR/RCAR (PYRABACTIN RESISTANCE/REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR) (Merilo jt, 2013), mille seandumine ABAGA aktiveerib OST1 kinaasi ja SLAC1 anioonkanali. Mutantidel *slac1* (Vahisalu jt, 2008) ja *ost1* (Merilo jt, 2013) on pimeduses õhulõhede sulgumine häiritud. Järelikult tagavad OST1 ja SLAC1 pimeduses kiire õhulõhede sulgumise. Sasaki jt (2010) näitasid, et ka *almt12* mutantidel on häiritud õhulõhede sulgumine pimeduse toimet. Järelikult on kiires õhulõhede sulgumises pimeduse mõjul oluline ka ALMT12.

1.5. Õhuniiskuse mõju õhulõhede regulatsioonile

Õhulõhed võivad väga kiiresti reageerida suhtelise õhuniiskuse vähenemisele (Kwak jt, 2008). Õhuniiskus on oluline õhulõhede reageerimisvõime välja kujunemises. Kui viia kõrges (90%) suhtelises õhuniiskuses kasvanud taimed madalamasse õhuniiskusesse, siis esineb neil kiire transpiratsioon ja halvenenud õhulõhede sulgumine pimeduses (Arve jt, 2015). Kõrges niiskuses kasvades on taimede õhulõhed suuremad ja need ei funktsioneerid korralikult. Virgiinia tradeskantsia (*Tradescantia virginiana*) sulgrakud olid kõrges niiskuses (90%) kasvades 29% suuremad kui taimedel, kes kasvasid standardõhuniiskuses (55%) juures (Nejad ja Van Meeteren, 2005). Suuremaid õhulõhesid kõrges õhuniiskuses täheldati ka rooside puhul (Torre jt, 2003). Mitmed uuringud on näidanud, et kõrge õhuniiskus suurendab õhulõhede tundlikkust süsihappegaasile (Talbott jt, 1996; Frechilla jt, 2002). Lisaks sellele on uuringud roosiga näidanud, et kõrges niiskuses kasvanud taimedel on õhulõhede tihedus suurem (Torre jt, 2003; Fanourakis jt, 2011). Peale selle on ka nende veekadu suurem ja eluiga lõigatuna 6-8 päeva lühem (Mortensen ja Fjeld, 1998; Torre ja Fjeld, 2001).

Õhulõhede avatuse muutumine on reguleeritud peamiselt ABA kaudu. *Arabidopsis*, kes on kasvanud kõrges õhuniiskuses (92%), on madalama ABA sisaldusega, võrreldes taimedega, kes on kasvanud standardõhuniiskuses (60%) (Arve jt, 2015) ning seetõttu on õhulõhede talitlus veidi häiritud. Varasemalt on sedasama näidanud Nejad ja van Meeteren (2007). Lisaks leidsid Arve jt (2013), et kõrges niiskuses (90%) kasvanud roosides ei suurenenud pimeduses ABA tase ja inaktiivset ABAt ei muudetud nii efektiivselt aktiivseks ABAs kui standardõhuniiskuses (60%) kasvanud roosides. Mehhanismid, kuidas õhuniiskus reguleerib ABA sisaldust taimes, ei ole veel teada, kuigi ABA metabolismiuuringutes on tehtud edusamme (Arve jt, 2013). Arve jt (2015) avastasid, et õhuniiskus ei mõjuta ABA biosünteesi geene, vaid katabolismi geene, mis muudavad ABA ühest vormist teise. Niiskes õhus kasvanud taimedes ekspresseeruvad tugevalt ABA katabolismi geenid *CYP707A1* (*CYTOCHROME P450, FAMILY 707, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 1*) ja *CYP707A3*

(*CYTOCHROME P450, FAMILY 707, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 3*), mis on seotud õhulõhede avanemisega vastuseks kõrgele õhuniiskusele. On näidatud, et kõrges õhuniiskuses kasvanud taimede ABAga töötlemisel arenevad taimedel korralikud õhulõhed (Fanourakis jt, 2011), kuid pole täpselt teada, kas ABA muudab õhulõhede arengut või avaldab see mõju õhulõhede sulgumisele.

Madala õhuniiskuse mõjul õhulõhed sulguvad. Seni ajani ei teata, kuidas taimed tunnetavad õhuniiskuse muutumist ja lülitavad seejärel sisse signaalirajad. Mõned geneetilised ja füsioloogilised mehhanismid, mis vahendavad madala õhuniiskuse poolt põhjustatud õhulõhede sulgumist, on siiski teada, kuid nende niiskuse tuvastusmehhanismid on endiselt teadmata. Näiteks *slac1* mutantidel on madalas õhuniiskuses õhulõhede sulgumine halvenenud, mis näitab, et SLAC1 anioonkanal on oluline madalas õhuniiskuses toimuva õhulõhede sulgumise regulatsioonis (Vahisalu jt, 2008). Samuti ei sule madalas õhuniiskuses õhulõhesid *ost1* mutandid (Merilo jt, 2013).

1.6. Mullaniiskuse mõju õhulõhede regulatsioonile ja põuastress

Vesi on taimedes väga oluline fotosünteesis, toitainete omastamises ja transpordis ning taime jahutavas transpiratsioonis (Farooq jt, 2009). Kui õhulõhed sulguvad, siis väheneb transpiratsiooni jahutav efekt ning toitainete omastamine mullast (Arve jt, 2011). Kuna taimed ei suuda liikuda, siis on nende jaoks oluline taluda stressi, mis võib olla tingitud nii veepuudusest kui ka liigniiskusest. Põuastressi korral suletakse kiiresti õhulõhed, et vähendada liigset aurumist, suurendatakse hüdratatsiooni ja lehe pinnal olevat vaha hulka, kogutakse vett spetsiifilistesse organitesse, pidurdatakse vegetatiivset kasvu ja kiirendatakse juurte kasvu, et saada sügavamalt vett kätte (Iuchi jt, 2001).

Õhulõhede sulgumiseks on mitmeid mehhanisme. Võib toimuda hüdropassiivne sulgumine või sulgumine stressihormoonide, nt ABA mõjul (Arve jt, 2011). ABA suurendab juurte ja ksüleemi veejuhtivust, mis aitab taimel pärast stressi kiiremini taastuda (Kudoyarova jt, 2010). Geen *NCED3* (*NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 3*) on oluline ABA biosünteesis – see aktiveerub kuivastressi korral ning kontrollib taime sees olevat ABA taset. Mutandid, kel see geen on üleekspresseeritud, taluvad paremini põuda ning aurumine lehtedest on väiksem (Iuchi jt, 2001).

Paljud uuringud on näidanud, et mullaniiskus on õhulõhede sulgumisel palju olulisem kui lehe veesisaldus, kuna õhulõhed reageerivad keemilistele signaalidele (ABA), mis võivad tulla hoopis veepuuduses olevatest juurtest (Morgan ja Rickson, 1990; Taylor jt, 1991; Farooq jt, 2009). See tähendab, et õhulõhede juhtivust vähendatakse juba enne, kui lehtedes veepuudus tekib. Pole teada mehhanisme, kuidas juured kuiva mulla ära tunnevad, kuid on

oletatud, et veepuuduse korral hakkab ABA kontsentratsioon mullas suurenema, mis tuntakse ära juurte kaudu (Lambers jt, 2008).

Põuastress langetab fotosünteesi efektiivsust, sest õhulõhede sulgudes siseneb taimesse vähem süsihappegaasi (Lambers jt, 2008). Kui taim kauakestva stressiga toime ei tule, siis tekivad häired kasvus ja ainevahetuses (Arve jt, 2011). Põllumajanduses on põuastress suur probleem, kuna teatud piirkondades ei saada kuivuse tõttu korralikku saaki.

Kui mulla- ja õhuniiskus on kõrged, siis kasvab taime arengu käigus õhulõhede tihedus ehk arv pindalaühiku kohta (Metwally jt, 1970; Metwally jt, 1971), mis omakorda suurendab transpiratsiooni (Lake ja Woodward, 2008). Samas Gan jt (2010) näitasid, et ka põuas kasvanud põldoa (*Vicia faba*) õhulõhede tihedus kasvas – oletati, et see parandab vee transporti mullast. Katsetes tomati (Holbrook jt, 2002), eukalüpti (Lima jt, 2003) ja sojaoaga (Liu jt, 2003) on näidatud, et põuastressis olevate taimede õhulõhede juhtivus väheneb.

1.7. Abstiishape

Abstiishape (ABA) on taimehormoon, mis osaleb paljudes füsioloogilistes protsessides: reguleerib taime idanemist, kasvu, õhulõhede sulgumist ja takistab CO₂ fikseerimist (Taiz ja Zeiger, 1991). ABA on oluline õhulõhede suuruse ja tiheduse väljakujunemisel (Lake ja Woodward, 2008). Väiksema ABA kontsentratsiooni korral on õhulõhed ja nende arv pindalaühiku kohta suuremad.

ABA sünteesitakse *de novo* karotenoididest (Boursiac jt, 2013) või mevaloonhapest (Xu jt, 2013). Varasemate andmete põhjal on arvatud, et ABA sünteesitakse ainult juurtes ning seejärel transporditakse see erinevatesse maapealsetesse organitesse (Boursiac jt, 2013), kuid tegelikult sünteesitakse ABA kõigis taime kudedes (Xu jt, 2013). Rakus leidub ABA biosünteesi ensüüme nii plastiidides kui ka tsütosoolis (Boursiac jt, 2013).

ABA esineb rakkudes kahe vormina: anioonsena (ABA⁻) ja protoneerituna (ABA-H) (Boursiac jt, 2013). ABA olek sõltub keskkonna pH-st. Näiteks pH 4,7 juures on 50% ABA-st protoneeritud kujul ning 50% anioonsel kujul. Sellest madalama pH-ga keskkonnas on ülekaalus protoneeritud vorm ning kõrgema pH korral deprotoneeritud ehk anioonne vorm. Protoneeritud vorm difundeerub kergesti läbi lipiidse kaksikkihi, vajamata transportereid.

Tavaolukorras on soodustatud ABA difusioon rakkudesse (Boursiac jt, 2013). Selle tagajärjel jääb ksüleemivedelik ABA-vaeseks ning sulgrakkudeni ei jõua palju ABA. Stressitingimustes – näiteks kuivas või lämmastikupuuduses – tõuseb ksüleemi pH 6,7-ni, mis kahandab difundeeruva ABA hulga ligikaudu 1%-ni. Ksüleemivedelik rikastub ABA-ga ning ABA jõuab ka sulgrakkudeni, kutsudes esile õhulõhede sulgumise.

Juhul, kui ABAt ei vajata, muudetakse see inaktiivseks (Boursiac jt, 2013) ja säilitatakse vakuoolis. Enamik ABAst inaktiveeritakse oksüdatsiooni teel, mille käigus ABAst tekib faseiin- või dihidrofaseiinhape. Bioloogiliselt inaktiivne ABA tekib ka siis, kui ABA moodustab keemilise sideme mõne molekuliga. Levinuimaks vormiks on abstsiihappe β -D-glükosüülester (ABA-GE), mis tekib glükoosi liitumisel ABA-ga (Xu jt, 2013). ABA-GE sünteesiks on vaja glükosüültransferaasi ja selle tagasi ABAs muundamisel β -glükosidaasi. Kui taim on stressis, siis ABA-GE tase ksüleemis väheneb ning selle arvelt füsioloogiliselt aktiivse ABA hulk suureneb. ABA-GE transporterit pole veel kindlaks tehtud (Boursiac jt, 2013).

1.7.1. Abstsiihappe transport

Taimedes toimub ABA transport, mida tõendab selle leidumine ksüleemis (Boursiac jt, 2013). Kuna ksüleem koosneb surnud rakkudest, siis ABA sünteesi seal toimuda ei saa. Järelikult peab aset leidma ABA transport. Lisaks sellele on juurtest leitud võrsetes sünteesitud ABAt .

Seniajani on teada neli ABA transporterit (Merilo jt, 2015): ABCG22, ABCG25, ABCG40 (ARABIDOPSIS THALIANA ATP-BINDING CASSETTE G22, G25, G40) ja NRT1.2/AIT1 (NITRATE TRANSPORTER 1.2/ABA-IMPORTING TRANSPORTER 1). ABCG25 asub juhtkudede rakumembraanis, eksportides ABAt juhtsoontest (Kuromori jt, 2010). ABCG22 ja ABCG40 asuvad sulgrakkude rakumembraanis. ABA import sulgrakkudesse toimub läbi ABCG40. Kui ABC (ATP-BINDING CASSETTE) transporterit ei ole, siis toimub ABA liikumine sulgrakkudesse palju aeglasemalt, õhulõhed jäävad rohkem avatuks ning stressitaluvus väheneb (Kang jt, 2010). NRT1.2 liigutab ABAt juhtsoonte ja teiste kudede vahel, olles samal ajal ka nitraadi transporter (Boursiac jt, 2013).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Palju on uuritud, kuidas erinevad taimeliigid reageerivad süsihappegaasile, pimedusele, õhuniiskusele ja taimehormoonidele. Neid katseid on aga tavaliselt tehtud nii, et uuritakse ühe või kahe kindla eelmainitud keskkonnastiimuli mõju metsiktüüpi taimedele ning lisaks veel mõju mingile mutantsele taimele. Huvitaval kombel pole siiani väga palju uuritud, kuidas erinevad kasvutingimused metsiktüüpi taimede õhulõhede reaktsioone mõjutavad. Sellest lähtuvalt oli käesoleva töö eesmärgiks uurida,

- kas ja kuidas erinevad kasvutingimused (erinev õhu- ja mullaniiskus) mõjutavad õhulõhede juhtivust
- kas ja kuidas erinevad kasvutingimused mõjutavad õhulõhede reaktsioonivõimet vastusena erinevatele stiimulitele, milleks valiti CO₂ kontsentratsiooni tõus, pimedus, madal õhuniiskus ja abstsüsihape

2.2. Materjal ja meetoodika

2.2.1. Taimede kasvatamine

Katsetes kasutati hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) metsiktüüpi (Col-0 ökotüüp) taimi. Selleks, et seemned idaneksid paremini ja üheaegselt, hoiti neid vähemalt kolm päeva enne külvamist vees (külmkapis, 4°C temperatuuril). Taimed kasvasid spetsiaalsetes katseaparatuuriga kokku sobivates Jyrkki pottides (vt Joonis 4) (Kollist jt, 2007). Need on nelinurksed plastmassist potid, mis täideti 250 grammi kasvusubstraadiga. Kasvusubstraadi koostises oli kaks osa turvast ja üks osa vermikuliiti arvestatuna mahu järgi. Vett lisati nii palju, et see moodustaks eelnevate komponentide kogumahust poole. Poti peale asetati ruudukujuline klaas, mille keskel on umbes 3 mm läbimõõduga auk. Klaas asetub potile 45° nurga all poti nurga suhtes, mis võimaldab õhu liikumist kasvusubstraati. Seemned (3-5 tk) külvati automaatpipetti kasutades klaasi keskel olevasse auku mulla pinnale ning neid ei kaetud enam kasvusubstraadiga.

Idanemiseks piisava niiskuse tagamiseks kaeti külv Petri tassiga (vt Joonis 4), mis eemaldati pärast idulehtede teket. Idulehtede arengu ajaks, umbes nädal pärast külvi, olid taimed juba sobivas suurus, mil neid sai ka pintsettidega harvendada – igasse potti jäeti kasvama ainult üks taim.

Taimi kasteti altniisutusega senikaua, kuni poti mass oli 320-340 grammi. Olenevalt keskkonna suhtelisest õhuniiskusest kasteti taimi vähemalt korra nädalas, kuid 20% suhtelise õhuniiskuse juures kasvanud taimed kuivasid kiiremini ning vajasis mõnikord sagedasemat kastmist.



Joonis 4. Petri tassiga kaetud külv Jyrkki potis.

Katsetes uuriti kahe erineva parameetri – mullaniiskuse ning suhtelise õhuniiskuse mõjusid. Seega kasteti osad taimi regulaarselt (+H₂O taimed), teise osa taimede kastmine lõpetati aga vähemalt 1,5 nädalat enne katsete algust (-H₂O taimed). Lisaks sellele kasvatati katsetaimed kolmes erinevas keskkonnas, kus oli suhteline õhuniiskus vastavalt 20%, 70% ja

90%. Kõige selle tulemusena saadi kuus erinevates kasvutingimustes kasvatatud taimegruppi. Tingimused kasvuruumides ja -kappides on toodud tabelis 1. Madala õhuniiskusega (20%) kasvuruumis varieerus suhteline õhuniiskus päeval 20-30% ning öösel 40-50% vahel, sest seal polnud võimalik niiskuse sisaldust täpselt reguleerida nii, nagu seda sai teha 70% ja 90% kasvukappides.

Tabel 1. Tingimused kasvuruumides ja -kappides päeval ning öösel.

| Kasvukeskkond | Valgusperiood (kell 7-19) | | Pimedusperiood (kell 19-7) | |
|---------------------------------|---------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|
| | Temperatuur | Suhteline õhuniiskus | Temperatuur | Suhteline õhuniiskus |
| Madal õhuniiskus (20%) | 21 °C | 20-30% | 21 °C | 40-50% |
| Standardõhuniiskus (70%) | 23 °C | 70% | 20 °C | 70% |
| Kõrge õhuniiskus (90%) | 23 °C | 90% | 19 °C | 90% |

Umbes 25 päeva pärast külvamist saadi katsete jaoks sobiva suurusega taimed. Kuna gaasivahetuskatseid tehti nädal aega, siis nädala lõpuks olid esimesena külvatud taimed kasvanud juba liiga suureks. Seetõttu külvati natuke seemneid ka neljandal päeval pärast esimest külvi, et oleks ka katsenädala lõpus sobiva suurusega taimi.

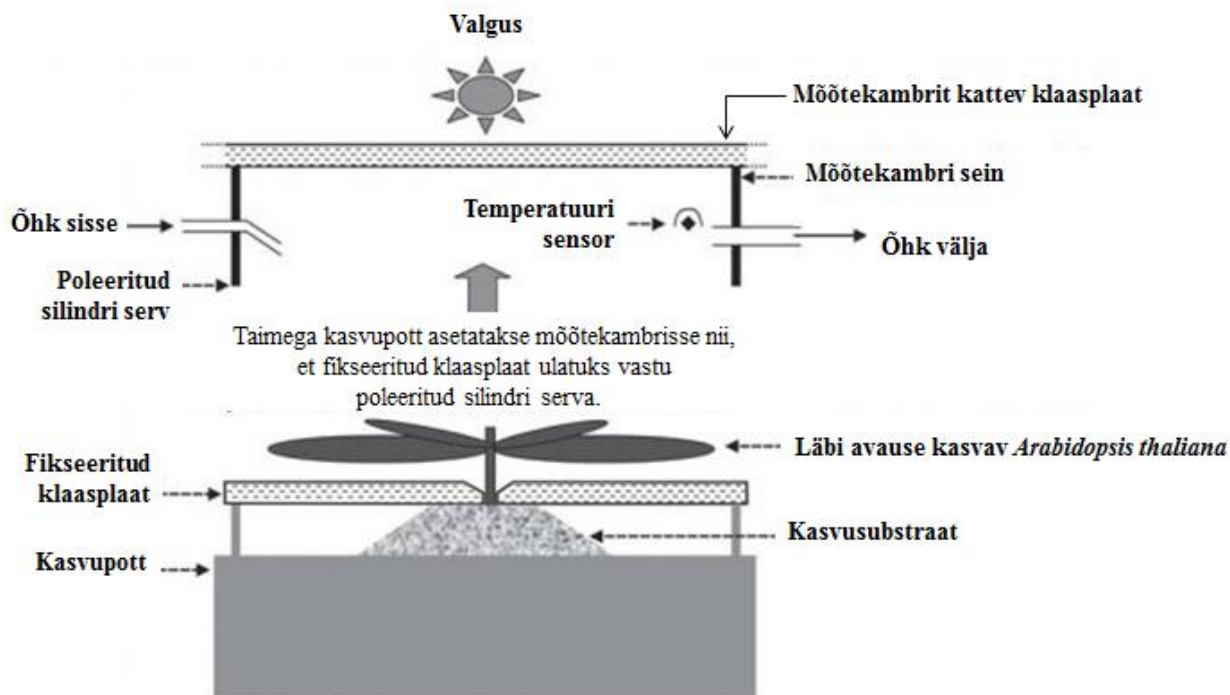
2.2.2. Katseaparatuur

Eritellimusel ehitatud aparatuuri moodustavad mõõtekambrid, valgustus, pumbad, termostaadid, CO₂/H₂O ja O₃ gaasianalüsaatorid, gaasiballoonid, arvuti (Kollist jt, 2007). Katseseade võimaldab mõõtekambrites muuta O₃ ja CO₂ kontsentratsioone, õhuniiskust ja valgustatust ning registreerida taimede õhulõhede kiiret reageerimist muutustele. Selleks mõõdetakse CO₂ ja veeauru sisaldust mõõtekambrisse sisenevas ja sealt väljuvas õhus ning selle põhjal arvutatakse õhulõhede juhtivus. Hariliku müürlooga leherosett on üsna habras, mistõttu taime katsudes tekivad kergesti vigastused. Kambrite kasutamine võimaldab taime gaasivahetust mõõta teda häirimata ning vigastamata.

Mõõtekambrid on roostevabast terasest silindrid läbimõõduga 7,8 cm ja kõrgusega 3,5 cm (vt Joonis 5). Pealtpoolt on need kaetud klaasist plaadiga, seejuures silindri servad on hästi tihendatud. Taimega pott asetatakse kambrisse altpoolt, potti jääb põhjast toetama vedru, mis surub poti koos sellel oleva nelinurkse klaasiga tihedalt vastu silindri alumist serva.

Igasse kambrisse siseneb õhk väikese avause kaudu silindri seinas ning väljub teise avause kaudu (vt Joonis 5). Lisaks tekitatakse rõhk 35 mmHg, mis tagab piisava õhu liikumise ja segunemise kambris. Peale selle on kambris temperatuuri sensor, mille

mõõdetavad väärtused on vajalikud õhulõhede juhtivuse arvutamiseks. Masin mõõdab kõigepealt kambrisse sisenevat ning siis kambrist väljuvat õhku. Kokku kulub ühe kambri mõõtmiseks kaks minutit. Kui kasutatakse kõiki seadme kaheksat kambrit, siis iga leheroseti gaasivahetust mõõdetakse uuesti 16 minuti möödudes. Antud katsetes kasutati korraga kolme või nelja kambrit. Kolme kambri kasutamisel saadi iga kambri mõõtmistulemused kuueminutiliste vahedega ning nelja kambri puhul kaheksaminutiliste vahedega.



Joonis 5. Gaasivahetuskamber (Kollist jt, 2007). Originaaljoonist on muudetud.

2.2.3. Katsete läbiviimine

Enne katset taimed vahatati – see tähendab, et nelinurkse klaasi keskel olev auk täideti pookevahaga (tootja: AS Agropol DT), et läbi avause ei toimiks mingisugust gaaside liikumist mullast. See võimaldab mõõta leheroseti gaasivahetust ilma mullast tulenevate kõrvaliste mõjudeta. Vahatamine teostati mõned päevad või päev enne katset, kuna taimede häirimine (katsumine) samal päeval võib mõjutada mõõtmistulemusi. Enne taime asetamist mõõtekambrisse pildistati (digitaalkaamera Pentax K100D) taime koos millimeeterpaberi lõiguga (10x30 mm), et hiljem mõõta taime lehepindala, milleks kasutati programmi ImageJ.

Seejärel asetati taimed mõõtekambrisse. Selleks, et taim harjuks kambris oleva keskkonnaga, läks aega umbes üks tund. Stabiliseerunud taime õhulõhede juhtivus jõudis sel juhul mingisugusele platoole ning püsis seal suhteliselt muutumatuna. Mõõdetavaid punkte oli võimalik jälgida arvuti ekraanilt, kasutades selleks spetsiaalselt kirjutatud programmi (Kollist jt, 2007). Samuti salvestas antud programm mõõdetud väärtused, mida sai hiljem analüüsida.

Enne keskkonnastiimuli muutust registreeriti 4 stabiilset punkti, mis näitasid katseelset õhulõhede juhtivust. Pärast seda rakendati taimedele erinevaid mõjureid ning jälgiti keskkonnatingimuste muutusest põhjustatud õhulõhede juhtivuse muutumist. Enne muutust tekitati termostaadi abil igasse kambrisse ~70% suhteline õhuniiskus, olenemata sellest, millise õhuniiskusega keskkonnas taim enne kasvas, et algtingimused oleks kõikide taimede jaoks samad. Õhk võeti õuest, suunati suurde klaasanumasse, kus see toatemperatuuril soojenes ning liikus seejärel läbi termostaadi, mille abil saadigi vajalik niiskus (~70%). Kambrite õhuniiskust oli võimalik vähendada, kui termostaadi temperatuuri alandada või suurendada termostaadi temperatuuri tõstmisega.

Tavapärased tingimused kambris enne keskkonnamuutust: temperatuur 24-25°C, suhteline õhuniiskus ligikaudu 70%. Erinevate stiimulite kasutamist kirjeldatakse alljärgnevalt.

2.2.3.1. Reaktsioon süsihappegaasile

Antud katses tõsteti CO₂ kontsentratsiooni ligikaudu 400-lt ppm-lt 800 ppm-ni ehk kahekordistati välisõhus olevat CO₂ hulka. Kui neli stabiilset punkti olid mõõdetud, siis viienda mõõtmise ajal lisati kambrisse gaasiballoonist süsihappegaasi juurde. Pärast stiimuli muutust jälgiti õhulõhede juhtivust ligikaudu tund aega. Katset korrati igast taimegrupist 13-14 taimega.

2.2.3.2. Reaktsioon pimedusele

Taimed stabiliseerusid esmalt kambris valguse käes ja tavapärastel tingimustel. Enne pimeduse rakendamist mõõdeti neli stabiilset punkti. Pärast neljanda punkti mõõtmist kaeti kambri klaaspind raamatuga, et takistada valguse juurdepääs. Pärast stiimuli muutust jälgiti õhulõhede juhtivust ligikaudu tund aega. Katset korrati igast taimegrupist 13-14 taimega.

2.2.3.4. Reaktsioon õhuniiskusele

Antud katses kasutati tavatermostaadile lisaks veel teist termostaati (T₁), milles õhk muudeti 1°C juures väga kuivaks, võimaldades kambri õhuniiskust langetada 20-30%-ni. Kui neli stabiilset punkti tavapärastel tingimustel ligikaudu 70% õhuniiskuse juures olid mõõdetud, siis lülitati süsteem tavatermostaadilt ümber teise termostaadi peale (T₁) ning kõigisse kolme mõõdetavasse kambrisse liikus korraga madala veesisaldusega kuiv õhk. Pärast stiimuli muutust jälgiti õhulõhede juhtivust tund aega. Eksperimenti korrati igast katsegrupist 14-15 taimega.

2.2.3.5. Reaktsioon abstsüshappele

Kõigepealt mõõdeti igale kambrile neli stabiilset punkti tavapärastel tingimustel. Pärast neljanda punkti mõõtmist eemaldati taim kambrist ja pihustati sellele neli pihustuskorda 5 µM ABA lahust ning kuivatati taime ümbruses klaasi pind. Seejärel asetati taim kambrisse tagasi. Umbes kaheksa minuti pärast, kui sama kambrist uuesti mõõdeti, olid veepiisad taimelt kuivanud (ei andnud mõõtmisel lisaniiskust) ning tänu lahuses sisalduvale detergentile oli ABA taime sisenenud. Kontroll-lahusega (detergent ja destilleeritud vesi) taimi ei pritsitud, kuna on teada, et detergent ei mõjuta kuidagi õhulõhede juhtivust (Merilo jt, 2015). Pärast viimase taime pritsimist kestis katse 40 minutit. Katset korrati igast taimegrupist 23-25 taimega. 5 µM ABA lahus: 10 ml destilleeritud vett (Millipore Milli-Q masinast), 5 µl 10 mM ABA, 1,2 µl detergenti (Silwet L-77, tootja: PhytoTechnology Laboratories)

2.2.4. Andmeanalüüs

Katsetes mõõdetud õhulõhede juhtivused keskmistati, lisaks arvutati õhulõhede sulgumiskiirus. Statistiline andmeanalüüs teostati programmiga Statistica, kus meetoditena kasutati kahefaktorilist ANOVAt ja *post hoc* testina Tukey testi.

2.2.5. Õhulõhede sulgumiskiiruse arvutamine

Katsete käigus mõõdeti õhulõhede juhtivus enne ja pärast stiimuli muutust. Selleks, et paremini hinnata ja võrrelda erinevate taimede reageerimist stiimuli muutusele, arvutati õhulõhede sulgumiskiirus ühes tunnis, kasutades valemit (1)

$$v = \frac{gst2 - gst1}{t2 - t1} \times 60, \quad (1)$$

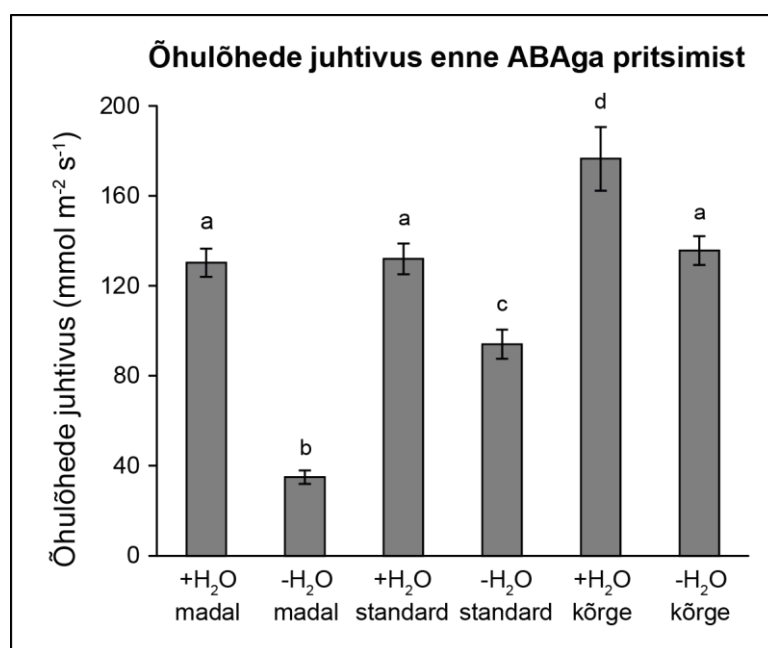
kus v on õhulõhede sulgumiskiirus ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{h}^{-1}$), $gst2$ ja $gst1$ on õhulõhede juhtivused ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) vastavalt ajahetkel $t2$ ja $t1$ (minutites).

Erinevate katsete puhul kasutati sulgumiskiiruse arvutamiseks erinevaid ajapunkte. ABA- ja pimeduskatse korral kasutati arvutustes ajapunkte 0 ja 16 (vastavalt $t1$ ja $t2$). CO_2 katses õhulõhede sulgumiskiiruse leidmiseks kasutati aga ajapunkte 0 ja 10 minutit ning õhuniiskuse katses ajapunkte -2 ja 16 minutit. Ajapunktid valiti nii, et nad jääksid sulgumiskõvera lineaarsesse piirkonda.

2.3. Tulemused

Katsetes mõõdeti erinevates tingimustes (erinev õhuniiskus ja kastmine) kasvanud hariliku müürlooga ökotüübi Col-0 õhulõhede juhtivust ning vaadati, kuidas juhtivus muutub, kui rakendada erinevaid stiimuleid (CO₂ hulga suurendamine õhus, pimedus, madal suhteline õhuniiskus, ABA). Saadud tulemused võimaldavad hinnata kastmise ning suhtelise õhuniiskuse mõju õhulõhede avatusele ja reaktsioonivõimele.

Enne stiimuli rakendamist mõõdetud tulemused näitasid, et kastmata taimede õhulõhede juhtivus oli väiksem kui samades tingimustes kasvanud kastetud taimedel (vt Joonis 6). Joonise tegemisel on kasutatud andmeid ABAGA läbiviidud katsetest, kuna seal oli valim suurim (n=23-25 taime iga katsegrupi kohta). Lisaks toimusid katsed ABAGA katsenäda lõpus ja selleks ajaks olid kastmata taimed olnud piisavalt kaua kuivuses, et mullas tekiks veedefitsiit. Kõige suurem erinevus õhulõhede juhtivuses esines madala suhtelise õhuniiskuse (20%) juures kasvanud taimedel. Kõige kõrgem õhulõhede juhtivus oli kõrges suhtelises õhuniiskuses (90%) kasvanud kastetud taimedel. Madalas ja standardses (70%) õhuniiskuses kasvanud kastetud taimede ning kõrges õhuniiskuses kasvanud kastmata taimede õhulõhede juhtivused olid sarnased. Ööpäevakatses (vt Lisa 1), kus mõõdeti taimede lehe kogujuhtivust järjest kahel ööpäeval, saadi õhulõhede juhtivuses sarnased tulemused.

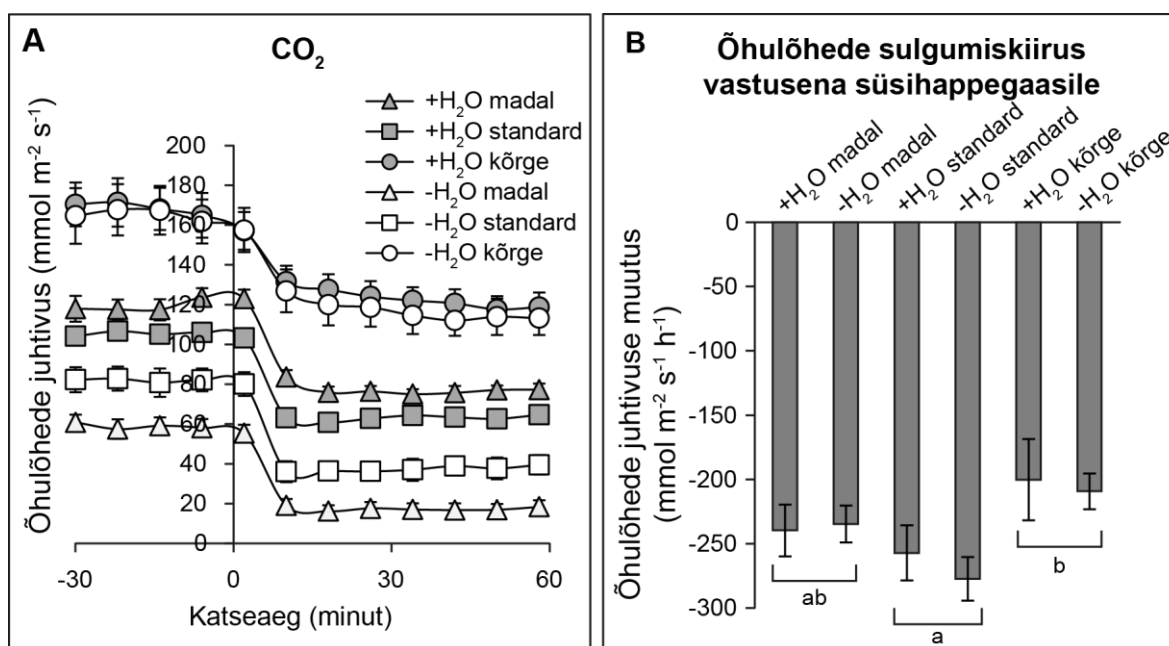


Joonis 6. Õhulõhede juhtivus (mmol m⁻² s⁻¹) vahetult enne abtsiishappega pritsimist. Katseandmete statistilisel analüüsil kasutati kahefaktorilist ANOVAt ja *post hoc* testina Tukey testi. Statistiliselt üksteisest oluliselt erinevad rühmad ($p < 0,05$) on tähistatud tähtedega a, b, c, d. Joonisel on katsete keskmistatud tulemused (n=23-25 taime) \pm SEM (Standard Error of the Mean).

2.3.1. Õhulõhede sulgumine süsihappegaasi toimel

Katses uuriti, kuidas kõrge CO₂ tase mõjutab erinevates tingimustes kasvanud taimede õhulõhede käitumist. CO₂ kontsentratsiooni kahekordistamine kutsus kõigil taimedel esile õhulõhede osalise sulgumise, mida näitab õhulõhede juhtivuse vähenemine pärast ajapunkti 0 (vt Joonis 7A). Madala ja standardõhuniiskuse juures kasvanud kastetud ja kastmata taimede õhulõhede juhtivused erinesid üksteisest, kuid kõrges õhuniiskuses kasvanud taimede puhul olid nii kastmata kui ka kastetud taimede õhulõhede juhtivused sarnased (vt Joonis 7A).

Lisaks õhulõhede juhtivusele analüüsiti ka erinevates tingimustes kasvanud taimede õhulõhede sulgumiskiirusi (vt Joonis 7B). Kahefaktoriline tüüp III ANOVA analüüs viitas, et erinevused sulgumiskiiruses tulenesid pigem sellest, et taimed kasvasid erinevates õhuniiskuse tingimustes, kui sellest, kas taimed olid kastetud või kastmata. Seega kastmisel siin katses statistiliselt olulist efekti sulgumiskiirusele ei leitud. Lisaks sellele näitas Tukey *post hoc* test, et CO₂ taseme muutusele reageerisid standardses ja kõrges õhuniiskuses kasvanud taimed erinevalt ning madalas õhuniiskuses kasvanud taimed ei erinenud statistiliselt kahest eelnevast taimerühmast.



Joonis 7. **A** *Arabidopsis thaliana* metsiktüüpi taimede õhulõhede reageerimine süsihappegaasi kontsentratsiooni tõusule. CO₂ kontsentratsiooni kahekordistati ajahetkel 0. Joonisel on näidatud keskmistatud õhulõhede juhtivus (n=13-19 taime) ±SEM.

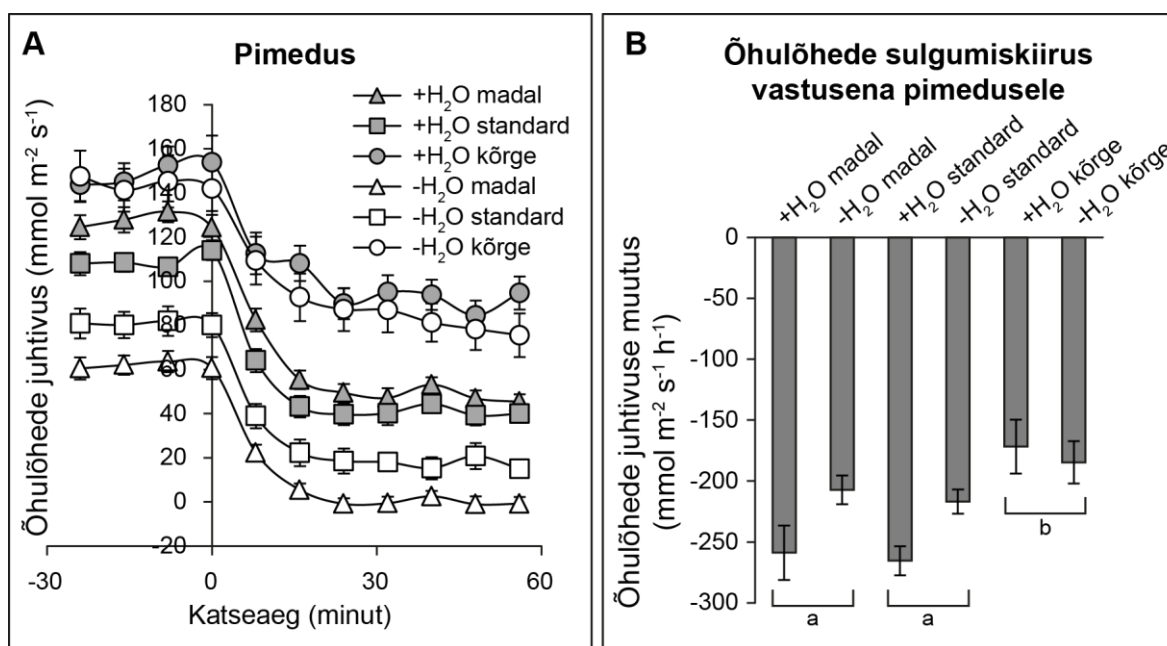
B Õhulõhede sulgumiskiirus ehk õhulõhede juhtivuse muutus ühes tunnis pärast CO₂ kontsentratsiooni tõstmist. Sulgumiskiiruse arvutamist on täpsemalt kirjeldatud peatükis 2.2.5. Kasutatud on sama katse andmete põhjal arvatud keskmistatud tulemusi ±SEM, mis näidatud paneelil A. Üksteisest statistiliselt oluliselt erinevad (p < 0,05) grupid on tähistatud tähtedega a ja b. Gruppidevahelised erinevused tulenevad erinevatest õhuniiskustingimustest, kus taimed kasvasid.

2.3.2. Õhulõhede sulgumine pimeduse toimel

Katses uuriti pimeduse mõju erinevates tingimustes kasvanud taimede õhulõhede reaktsioonile. Mõõtekamber kaeti raamatuga ajahetkel 0 ning pimedus põhjustas õhulõhede osalise sulgumise. Jooniselt 8A on näha, et madala suhtelise õhuniiskuse juures kasvanud kastmata taimede õhulõhede juhtivus langes peaaegu nulli lähedale.

Kõrges suhtelises õhuniiskuses kasvatatud kastetud ja kastmata taimede õhulõhede juhtivused (vt Joonis 8A) ja sulgumiskiirused (vt Joonis 8B) olid sarnased. Lisaks sellele oli kõrges õhuniiskuses kasvanud taimede õhulõhede sulgumiskiirus märgatavalt väiksem kui madalas ja standardõhuniiskuses kasvanud taimedel.

Jooniselt 8B on näha, et madala ja standardõhuniiskuse juures kasvanud kastetud taimed reageerisid pimedusele mõnevõrra kiiremini kui samas niiskuses kasvanud kastmata taimed. Seejuures ei leitud õhuniiskuse puhul statistiliselt olulisi erinevusi madalas ja standardses õhuniiskuses kasvanud taimede vahel, küll aga oli mõlema taimerühma puhul oluline kastmise mõju, mida näitas Tukey *post hoc* test. Nii kastmine kui ka õhuniiskuse eraldi mõjudasid õhulõhede sulgumiskiirust, kuid nende koosmõju polnud statistiliselt oluline.



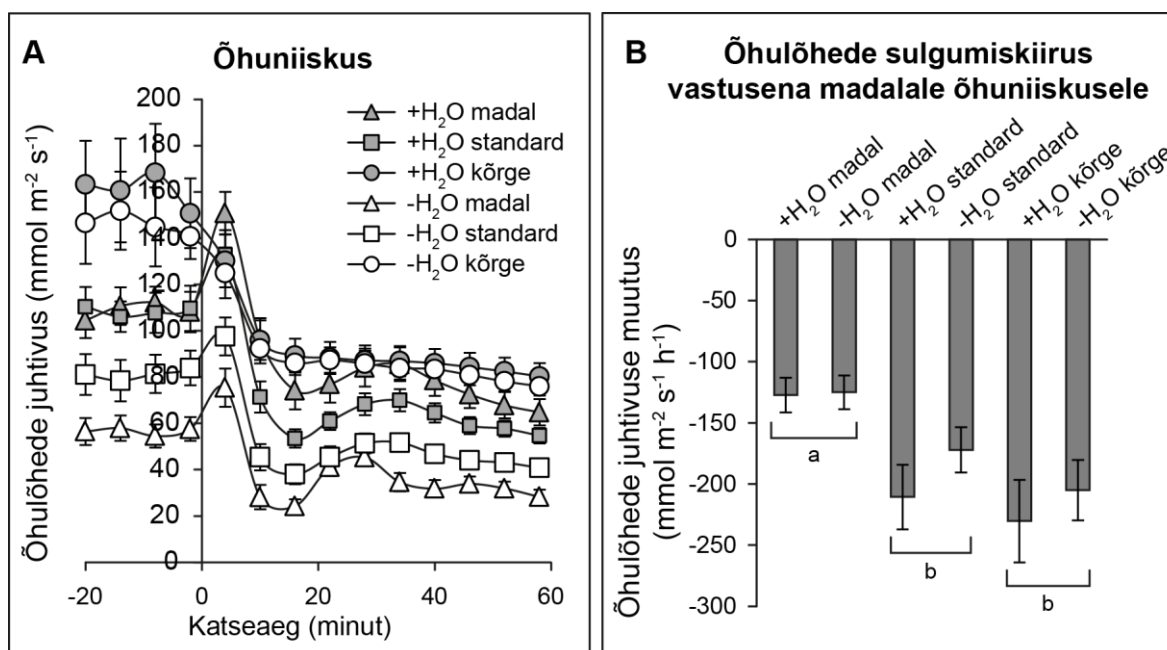
Joonis 8. **A** Õhulõhede reageerimine pimedusele. Pimedus saabus ajahetkel 0. Joonisel on keskmistatud õhulõhede juhtivus ($n=13-19$ taime) \pm SEM.

B Õhulõhede sulgumiskiirus vastusena pimedusele. Kasutatud on sama katse andmete põhjal arvutatud keskmistatud tulemusi \pm SEM, mis näidatud paneelil A. Sulgumiskiiruse arvutamist on täpsemalt kirjeldatud peatükis 2.2.5. Üksteisest õhuniiskuse alusel statistiliselt oluliselt erinevad ($p < 0,05$) grupid on tähistatud tähtedega a ja b. Madala ja standardõhuniiskuse puhul oli ka kastetud ja kastmata taimede vahel statistiliselt oluline erinevus.

2.3.3. Õhulõhede sulgumine madala suhtelise õhuniiskuse toimetel

Antud katse eesmärk oli uurida, kuidas hariliku müürlooga õhulõhed reageerivad suhtelise õhuniiskuse kiirele langusele. Katses vähendati suhtelist õhuniiskust ligikaudu 70%-lt 20-30%-ni ajahetkel 0 (vt Joonis 9A). Õhuniiskuse vähenedes peaks õhulõhede avatus ning juhtivus vähenema. Just nii juhtus kõrge suhtelise õhuniiskuse juures kasvanud taimede puhul (vt Joonis 9A), kuid madala ja standardõhuniiskuse juures kasvanud taimedel esines hoopis lühiajaline (5 min) õhulõhede avanemine ja juhtivuse suurenemine ning alles siis hakkasid need sulguma (kuni umbes 16. katseminutini). Seejärel, sulgudes justkui liiga palju, toimus umbes 30. katseminutil taas väike juhtivuse suurenemine, v.a kõrges niiskuses kasvanud taimede puhul, mis jäid üsna stabiilseteks.

Jooniselt 9B on näha, et standardses ja kõrges õhuniiskuses kasvanud taimede õhulõhede sulgumiskiirused ei erinenud üksteisest oluliselt. Madalas suhtelises õhuniiskuses kasvanud taimede õhulõhede sulgumiskiirused olid võrreldes teiste rühmadega oluliselt väiksemad. Tukey *post hoc* test näitas, et kastmine siin katses taimede õhulõhede sulgumiskiirust oluliselt ei mõjutanud ning erinevused sulgumiskiirustes olid tingitud pigem õhuniiskusest, kus taimed kasvasid.



Joonis 9. **A** Õhulõhede reageerimine suhtelise õhuniiskuse vähendamisele. Joonisel on näidatud katsete keskmistatud tulemused ($n=13-17$ taime) \pm SEM.

B Õhulõhede sulgumiskiirus pärast õhuniiskuse langust. Kasutatud on sama katse andmete põhjal arvutatud keskmistatud tulemusi \pm SEM, mis näidatud paneelil A. Sulgumiskiiruse arvutamist on täpsemalt kirjeldatud peatükis 2.2.5. Üksteisest õhuniiskuse alusel statistiliselt oluliselt ($p < 0,05$) erinevad grupid on joonisel tähistatud tähtedega a ja b.

2.3.4. Õhulõhede sulgumine abstsiiishappe toimetel

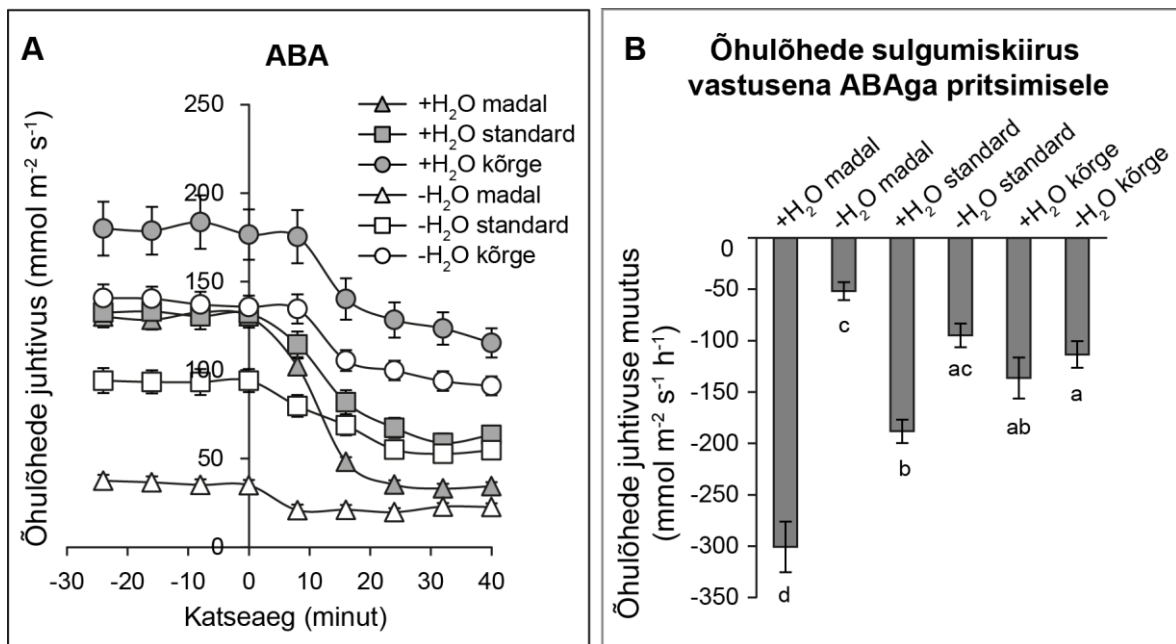
Katses pihustati taimedele abstsiiishapet ning vaadati, kuidas õhulõhed sellele reageerivad. Kõrges suhtelises õhuniiskuses kasvanud taimed reageerisid abstsiiishappele väikese viivitusega – pärast ABAGA pritsimist ajahetkel 0 jäid nad veel kuni järgmise ajapunkti mõõtmiseni stabiilseteks, samal ajal kui teistes tingimustes kasvanud taimed sulgesid juba õhulõhesid (vt Joonis 10A). Kõrges õhuniiskuses kasvanud, nii kastmata kui ka kastetud taimed reageerisid sarnaselt – õhulõhede sulgumiskiirus (vt Joonis 10B) ja muutus nende juhtivuses (Joonis 10A) olid peaaegu samasugused.

Antud katses mõjutas õhulõhede sulgumiskiirust nii kastmine, õhuniiskus kui ka nende mõlema koosmõju. Joonis 10B näitab koosmõju alusel gruppidesse jaotumist. Õhuniiskuse mõju madalas niiskuses kasvanud taimede õhulõhede reaktsioonile erines statistiliselt oluliselt teistest gruppidest.

Jooniselt 10A on näha, et kastmata kõrge õhuniiskuse, kastetud standardse ja kastetud madala õhuniiskuse taimede õhulõhede juhtivus oli enne stiimuli rakendamist üsna samal tasemel, kuid pärast ABAGA pritsimist reageerisid nad erinevalt. Madalas suhtelises õhuniiskuses kasvanud taimedel toimus õhulõhede juhtivuses kõige suurem muutus ning see langes eelnevalt nimetatutest kõige madalamale.

Kui võrrelda madalas õhuniiskuses kasvanud kastetud ja kastmata taimede reaktsioonivõimet, siis joonis 10B näitab väga selgelt, et õhulõhede sulgumiskiirust mõjutas antud katses oluliselt mullaniiskus. Kastetud ja kastmata taimed moodustasid täiesti omaette rühmad. Madalas niiskuses kasvanud kastetud taimed reageerisid kõigi teiste rühmadega võrreldes oluliselt kiiremini.

Standardõhuniiskuse juures kasvanud taimedel oli oluliseks mõjutajaks mullaniiskus nii nagu madalas õhuniiskuses kasvanud taimede puhulgi.



Joonis 10. **A** Õhulõhede reageerimine abtsiishappele. Taimi pritsiti 5 μM ABA lahusega ajahetkel 0. Joonisel on katsete keskmistatud tulemused ($n=23-25$ taime) $\pm\text{SEM}$.

B Õhulõhede sulgumiskiirus pärast ABAGA pritsimist. Sulgumiskiiruse arvutamist on täpsemalt kirjeldatud peatükis 2.2.5. Kasutatud on sama katse andmete põhjal arvutatud keskmistatud tulemusi $\pm\text{SEM}$, mis näidatud paneelil A. Üksteisest kastmise ja õhuniiskuse koosmõju alusel statistiliselt oluliselt ($p < 0,05$) erinevad grupid on joonisel tähistatud tähtedega a, b, c ja d.

2.4. Arutelu

Juba eelnevalt oli teada, et metsiktüüpi hariliku müürlooga taimede õhulõhed sulguvad CO₂ kontsentratsiooni tõusu, pimeduse, õhuniiskuse languse ja abstsessiin (ABA) toimel. Täpselt nii juhtus ka käesolevas töös läbiviidud katsetes, kuid erinevates tingimustes kasvanud taimede puhul võis näha erinevusi sulgumiskiirustes ja õhulõhede juhtivuses. Õhulõhede juhtivus sõltus nii õhuniiskusest, kus taim kasvas kui ka sellest, kas taime kasteti või mitte. Kastmata taimed olid põuastressis ning nende õhulõhede juhtivus oli selgelt väiksem kui samades tingimustes kasvanud kastetud taimedel (vt Joonis 6 ja Lisa 1). Sedasama on näidanud katsed näiteks tomatiga (Holbrook jt, 2002), eukalüptiga (Lima jt, 2003) ja sojaoaga (Liu jt, 2003).

Kõrges õhuniiskuses (90%) kasvanud taimedel oli kõrgem õhulõhede juhtivus, mis võis tulla sellest, et antud tingimustes oli taimedel kogu aeg piisavalt niiskust ning seetõttu olid õhulõhed avatumad. Lisaks võivad kõrges õhuniiskuses õhulõhed olla suuremad, mida näitasid Arve jt (2015) ning mille tõttu võib samuti õhulõhede juhtivus kõrgem olla. Käesolevas töös seda ei uuritud, kuid tulevikus võiks seda teha.

Madalas õhuniiskuses (20%) kasvanud taimede õhulõhede juhtivus oli aga kõige madalam, mille üheks põhjuseks võis olla õhulõhede väiksem avatus – seega väiksem gaasivahetus ümbritseva keskkonnaga, et vähendada aurumist ja hoida kokku vett, mida oli niigi vähe. Et seda kindlaks teha, oleks vaja madalas õhuniiskuses kasvanud taimi vaadelda mikroskoobiga ning võrrelda teistes niiskustingimustes kasvatatud taimedega. Madalam õhulõhede juhtivus võis tulla ka sellest, et taimel oli vähem õhulõhesid lehepinna ühiku kohta. Madalamas niiskuses kasvanud taimed olid väga kohanemisvõimelised ja reageerisid erinevatele keskkonnamuutustele üldjuhul palju kiiremini kui kõrges niiskuses kasvanud taimed. Ainsaks erandiks oli õhuniiskuskatse, kus kõrges niiskuses (ja ka standardniiskuses) kasvanud taimed reageerisid kiiremini ning madalas niiskuses kasvanud taimed reageerisid kõige aeglasemalt. Selline tulemus oli üllatav ning hetkel veel ei osata seletada, mis selle põhjuseks võiks olla.

Standardõhuniiskuses (70%) kasvanud taimed ei erinenud sulgumiskiiruse poolest üldiselt teistest rühmadest, vaid igas katses olid nad sarnased kas madalas või kõrges õhuniiskuses kasvanud taimedega. Õhulõhede juhtivuse väärtuste poolest asetsid nad kahe eelnevalt mainitud rühma vahele.

2.4.1. Õhulõhede sulgumine CO₂ ja pimeduse toimetel

Juba palju aega tagasi (1940ndad) näidati, et õhulõhed sulguvad kõrge CO₂ kontsentratsiooni juuresolekul. Nii juhtus ka minu katsetes. Põhjuseks asjaolu, et õhulõhe väiksema avausega saadakse antud tingimustel sama efektiivselt CO₂ kätte ja neid ei pea nii avatuna hoidma, mis omakorda vähendab transpiratsiooni. Morisoni (1987) katsetes vähendas CO₂ kontsentratsiooni kahekordistamine õhulõhede juhtivust 40%. Käesolevas töös läbiviidud katsetes vähenes õhulõhede juhtivus mõnes taimegrupis isegi veel rohkem.

Mõned taimed ei sule pimeduses korralikult õhulõhesid (Caird jt, 2007). Käesoleva töö katsetes ei sulgenud taimed täielikult õhulõhesid vastusena päeval tekitatud kunstlikule pimedusele, vaid need jäid ikka veidi avatuks. Pääaegu täielikult sulgesid õhulõhed need kastmata taimed, kes olid kasvanud madalas õhuniiskuses. Samas ööpäevakatses sulgesid õhulõhed palju paremini ja olid võimelised päris kinni minema, millele viitas lehe kogujuhtivuse vähenemine nullile (vt Lisa 1).

Kõrges niiskuses kasvanud taimede reageerimisvõime oli mõlemas katses kehvem kui teistel taimerühmadel, mis võib samuti tulla sellest, et kõrgemas niiskuses kasvades sisaldavad nad vähem ABA. Õhulõhede sulgumine vastusena pimedusele ja süsihappegaasile näib toimuvat erinevate mehhanismide kaudu. Eri tingimustes kasvanud taimede reaktsioonid olid erinevad, kuigi katsed viidi läbi samal päeval ja samade taimedega. Pimedusvastuses oli oluline ka kastmise mõju, seda nii madalas kui ka standardõhuniiskuses kasvanud taimede puhul, kuid sulgumises CO₂ toimetel kastmise mõju ei täheldatud. Seega õhuniiskuse mõjutab mõlemaid protsesse, kuid kastmine ainult pimedusvastust.

2.4.2. Õhulõhede sulgumine madalas õhuniiskuses

Kõige kiiremini reageerisid stiimuli muutusele kõrges õhuniiskuses kasvanud taimed ning kõige aeglasemalt madalas niiskuses kasvanud taimed. Arvan, et see võis tulla sellest, et madalas niiskuses kasvanud taimed olid juba varem antud tingimustega kokku puutunud – katses alandati õhuniiskust ~70%-lt ~20-30%-ni, mis oli nende jaoks tavapärane olukord ja see ei kutsunud esile kiiret reaktsiooni. Lisaks sellele olid neil juba enne stiimuli muutust õhulõhed kinnisemad, mille tõttu võib reaktsioon olla aeglasem. Teiste õhuniiskusrühmade taimed aga polnud varem nii madala õhuniiskusega kokku puutunud. Seega oli tegemist nende jaoks ootamatu olukorraga ja nad sulgesid kaitseks kuivamise eest kiiresti õhulõhed. Isegi kõrges niiskuses kasvanud taimed sulgesid siin katses üsna kiiresti oma õhulõhed.

Taimede reageerimine niiskusele sõltub samuti ABAst (Arve jt, 2015). Võiks oletada, et kõrgemas õhuniiskuses kasvanud taimed reageerivad ka niiskuskatses õhuniiskuse alandamisele aeglasemalt, sest väiksema ABA sisalduse tõttu on sulgumine häiritud.

Tulemused olid aga hoopis vastupidised – kõrges niiskuses kasvanud taimed reageerisid täiesti normaalselt. Võimalik, et siin on õhulõhede sulgumises peale ABA veel mingid teised mehhanismid olulised.

2.4.3. Kõrge suhtelise õhuniiskuse mõju õhulõhede regulatsioonile

Nejad ja van Meeteren (2007) leidsid, et kõrges õhuniiskuses kasvanud virgiinia tradeskantsia (*Tradescantia virginiana* L.) taimedel väheneb võime toota ABAt, mille tõttu väheneb ka sulgrakkude reageerimisvõime ja nad ei funktsioneerid korralikult. Sarnane asjaolu ilmnes ka antud katsetes, kus kõrges õhuniiskuses kasvanud taimed sulgesid oma õhulõhed aeglasemalt. Eriti hästi oli seda näha pimeduskatses, kus vastavad taimed erinesid statistiliselt olulisel määral teistest rühmadest. CO₂ katses oli samuti sarnane tendents nähtav, kuid statistiliselt olulised erinevused ilmnisid ainult standard- ja kõrges õhuniiskuses kasvanud taimede vahel. Sama võib öelda ABAGA läbiviidud katse kohta – kõrges õhuniiskuses kasvanud taimede õhulõhed sulgusid aeglasemalt kui näiteks madala õhuniiskuse juures kasvanud taimedel. Õhuniiskuskatses reageerisid kõrges niiskuses kasvanud taimed aga oodatust teisiti – vastupidiselt teiste stiimulite katsetele reageerisid taimed üsna kiiresti.

Mõned uuringud on näidanud, et kõrges õhuniiskuses kasvades suureneb õhulõhede tundlikkus süsihappegaasile (Talbot jt, 1996; Frechilla jt, 2002). Antud katsetes aga seda ei täheldatud.

Võiks oletada, et kõrges niiskuses kasvanud taimede õhulõhede reaktsioonid olid kehvemad, sest nende ABA tase võis olla madalam. ABA taset antud katsetes ei mõõdetud, kuid tulevikus võiks seda teha. Samuti võiks edasi uurida, kas ABAGA töötlemine parandaks taimede reaktsioonivõimet. Lisaks sellele võiks proovida, kas kõrges niiskuses kasvanud taimede hoidmisel mõnda aega madalamas niiskuses või kõrgemal temperatuuril muutuksid nad reaktsioonivõimelisemaks, nagu varem on mõnel juhul nähtud (Arve jt, 2011). Võiks ka proovida muuta ABA biosünteesi- või katabolismiraja geenide ekspressiooni nii, et kõrges õhuniiskuses kasvades oleks ABA tase pidevalt suhteliselt kõrge.

2.4.4. Mullaniiskuse mõju õhulõhede regulatsioonile

Mullaniiskus mõjutas taimede vastuseid ainult pimeduse ja ABA katsetes, kus kastmine põhjustas statistiliselt olulisi erinevusi. Kastmata taimed reageerisid ABAlle vähem ja aeglasemalt kui kastetud taimed (vt Joonis 10). Ehk on see seotud sellega, et kui taimes on veepuudus, siis ABAt lihtsalt ei transporditagi korralikult sinna, kuhu vaja (õhulõhedesse) või on põuas kasvanud taimedes ABA süntees hästi käivitunud ning juba seetõttu on nende õhulõhed kinnisemad (vt Joonis 6).

2.4.5. Peamised järeldused

Läbiviidud katsete ja saadud tulemuste põhjal võib järeldada, et kõrges suhtelises õhuniiskuses kasvanud taimed reageerivad keskkonnamuutustele aeglasemalt. Võimalik, et selle põhjuseks on väiksem ABA sisaldus, aga see vajab veel täiendavat uurimist. Kõrges niiskuses kasvanud taimede puhul ei avaldanud mullaniiskus õhulõhede reaktsioonidele tugevat mõju. Võimalikud põhjused võivad olla esiteks, et õhus oli piisavalt niiskust ja teiseks, et kõrges õhuniiskuses ei õnnestunud alati tekitada tugevat mullavee defitsiiti. Madala õhuniiskuse juures kasvatades saadi kõige parema reaktsioonivõimega taimed, vähemalt abstsiihappevastust hinnates. Madalas õhuniiskuses kasvanud taimed olid ka teistes katsetes hea reaktsioonivõimega, v.a õhuniiskuskatse. Siinkohal tuleb arvestada ka mullaniiskusega ja märgata, et sellised taimed vajavad kindlasti sagedast kastmist.

Uurimist vajab veel nähtus, miks õhuniiskuse katses esines pärast õhuniiskuse langetamist ~20-30%-ni õhulõhede juhtivuse suurenemine ja miks kõrges niiskuses kasvanud taimede puhul õhulõhede juhtivuse tõusu ei täheldatud. Õhulõhede juhtivuse suurenemine võib olla tingitud Iwanoffi efektist, mille tõttu suureneb hetkeks õhulõhede juhtivus nii madalasse õhuniiskusesse pandud taimelehtedel kui ka tavatingimustes taimelt lõigatud lehtedel (Iwanoff, 1928). Samas vajab see küsimus veel täiendavat selgitamist.

Huvitav oleks kontrollida, kas kõrges niiskuses kasvanud taimed sisaldavad vähem ABAt ja kas nt pimeduses olnud taimed rohkem ABAt. Lisaks võiks mõõta ABA taset kastetud ja kastmata taimedes. Peale selle võiks vaadata, kas kõrges niiskuses kasvades on õhulõhed suuremad ja madalas väiksemad ning võib-olla on muutunud ka õhulõhede tihedus.

KOKKUVÕTE

Antud töös tehtud katsed kinnitasid, et kasvutingimustel on mõju hariliku müürlooga õhulõhede regulatsioonile. Õhulõhede reaktsioonivõimet mõjutasid nii õhuniiskustingimused kui ka kastmine (mullaniiskus). Selgelt oli näha, et kastmata taimede õhulõhede juhtivus oli palju väiksem kui samas õhuniiskuses kasvanud kastetud taimedel.

Metsiktüüpi hariliku müürlooga taimed sulgesid õhulõhed vastusena kõrgenenud CO₂ kontsentratsioonile, pimedusele, madalale õhuniiskusele ja abstsiihappele (ABA). Sõltuvalt õhuniiskustingimustest, kus taimed kasvasid, reageerisid nad erinevatele stiimulitele erinevalt. Seega tuleks edaspidistes katsetes arvestada ka kasvutingimuste efektiga.

Katsed taimedega näitasid, et kõrges suhtelises õhuniiskuses kasvanud taimed reageerivad muutustele aeglasemalt kui standardses või madalas õhuniiskuses kasvanud taimed. Seetõttu on reaktsioonivõimelisemate taimede saamiseks soovitatav neid kasvatada pigem standardses või madalas õhuniiskuses. Samuti oli kõrges niiskuses kasvanud taimede õhulõhede juhtivus suurem kui teistel taimedel, mis võib olla tingitud näiteks sellest, et kõrgemas niiskuses kasvanud taimedes sünteesitakse vähem ABA-t või on nende õhulõhede tihedus suurem.

Erinevas õhuniiskuses kasvamine mõjutas õhulõhede sulgumiskiirust kõigis katsetes. Pimeduskatses täheldati ka kastmise efekti, aga seda ainult madalas ja standardniiskuses kasvanud taimede puhul. Abstsiihappe mõjul toimivas õhulõhede sulgumises olid aga olulised nii õhuniiskus, kastmine kui ka nende koosmõju. Lisaks sellele nähti katsetes abstsiihappega, et madala õhuniiskuse juures kasvanud kastetud taimed on abstsiihappevastust hinnates kõige parema reaktsioonivõimega. Mistõttu reaktsioonivõimelisemate taimede saamiseks oleks vaja taimi kasvatada madalas õhuniiskuses, kus neid peaks kindlasti regulaarselt kastma.

RESÜMEE

The effects of growth conditions on stomatal regulation of *Arabidopsis thaliana*

Liis Rüütel

Summary

Stoma is a small pore, which is bordered by a pair of specialized epidermal cells known as guard cells. Guard cells regulate the size of stomatal opening. Stomata mediate gas exchange – CO₂ uptake and water loss between the atmosphere and the plant. CO₂ is needed for photosynthesis and water is important for transport and leaf cooling via transpiration. Plants open and close their stomata to different environmental stimuli. Stomata close in response to increased CO₂, darkness, abscisic acid (ABA), low humidity, ozone, calcium ions, hydrogen peroxide and nitric oxide. Stomatal movements are regulated by turgor pressure of guard cells. Movement of anions, cations and water change turgor pressure. When the ions move out of guard cells, the stomata close. There are many unknown mechanisms in stomatal signalling.

The aim of this research was to analyze, if growth conditions have an effect on stomatal regulation and how the stomatal conductance changes in response to different environmental stimuli (increased CO₂, darkness, low humidity and ABA) in differently grown plants. The plants were grown in a different humidity environment, where relative air humidity was 20%, 70% and 90%, respectively. Furthermore, half of plants were watered and the other half were not watered, thus inducing drought stress in these plants. The plants were used in whole-rosette gas-exchange device, which enables to measure the quantity of gases released and absorbed by the plant in chamber.

All the plants closed their stomata in response to different stimuli, but the growth conditions affected the responses. Drought stressed plants had lower stomatal conductance compared with well-watered plants. Plants that were grown at high relative air humidity developed malfunctioning stomata, which were unable to close as efficiently in response to CO₂, darkness and ABA as did the stomata of plants grown in standard and low relative air humidity conditions. The experiment with ABA showed that well-watered plants which were grown in low relative air humidity had the best reaction ability.

KIRJANDUSE LOETELU

- Arve LE, Kruse OMO, Tanino KK, Olsen JE, Futsæther C, Torre S** (2015) Growth in continuous high air humidity increases the expression of CYP707A-genes and inhibits stomatal closure. *Environ Exp Bot* **115**: 11–19
- Arve LE, Terfa MT, Gislerød HR, Olsen JE, Torre S** (2013) High relative air humidity and continuous light reduce stomata functionality by affecting the ABA regulation in rose leaves. *Plant Cell Environ* **36**: 382–392
- Arve LE, Torre S, Olsen JE, Tanino KK** (2011) Stomatal Responses to Drought Stress and Air Humidity. *Abiotic Stress Plants - Mech Adapt* **12**: 267–280
- Assmann SM, Simoncini L, Schroeder JI** (1985) Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* **318**: 285–287
- Boursiac Y, Lèran S, Corratgé-Faillie C, Gojon A, Krouk G, Lacombe B** (2013) ABA transport and transporters. *Trends Plant Sci* **18**: 325–333
- Caird MA, Richards JH, Donovan LA** (2007) Nighttime stomatal conductance and transpiration in C3 and C4 plants. *Plant Physiol* **143**: 4–10
- Desikan R, Cheung M, Clarke A, Golding S, Sagi M, Fluhr R, Rock C, Hancock J, Neill S** (2004) Hydrogen peroxide is a common signal for darkness- and ABA-induced stomatal closure in *Pisum sativum*. *Funct Plant Biol* **31**: 913–920
- Desikan R, Griffiths R, Hancock J, Neill S** (2002) A new role for an old enzyme: Nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 16314–16318
- Fanourakis D, Carvalho SMP, Almeida DPF, Heuvelink E** (2011) Avoiding high relative air humidity during critical stages of leaf ontogeny is decisive for stomatal functioning. *Physiol Plant* **142**: 274–286
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA** (2009) Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management. *In* E Lichtfouse, M Navarrete, P Debaeke, S Véronique, C Alberola, eds, *Sustain. Agric.* Springer Netherlands, pp 153–188
- Frechilla S, Talbott LD, Zeiger E** (2002) The CO₂ response of *Vicia* guard cells acclimates to growth environment. *J Exp Bot* **53**: 545–550
- Freudenberger H** (1940) Die Reaktion der Schliesszellen auf Kohlensäure und Sauerstoffentzug. *Protoplasma* **35**: 15–54
- Gan Y, Zhou L, Shen ZJ, Shen ZX, Zhang YQ, Wang GX** (2010) Stomatal clustering, a new marker for environmental perception and adaptation in terrestrial plants. *Botanical Studies* **51**: 325–336
- García-Mata C, Lamattina L** (2002) Nitric Oxide and Abscisic Acid Cross Talk in Guard Cells. *Plant Physiol* **128**: 790–792

- Geiger D, Maierhofer T, AL-Rasheid KAS, Scherzer S, Mumm P, Liese A, Ache P, Wellmann C, Marten I, Grill E, et al** (2011) Stomatal Closure by Fast Abscisic Acid Signaling Is Mediated by the Guard Cell Anion Channel SLAH3 and the Receptor RCAR1. *Sci Signal* **4**: ra32–ra32
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Stange A, Marten I, Bauer H, Ache P, Matschi S, Liese A, Al-Rasheid KAS, et al** (2009) Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 21425–21430
- Hashimoto M, Negi J, Young J, Israelsson M, Schroeder JI, Iba K** (2006) *Arabidopsis* HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO₂. *Nat Cell Biol* **8**: 391–397
- Heath OVS** (1948) Control of Stomatal Movement by a Reduction in the Normal Carbon Dioxide Content of the Air. *Nature* **161**: 179–181
- Hedrich R** (2012) Ion Channels in Plants. *Physiol Rev* **92**: 1777–1811
- Holbrook NM, Shashidhar VR, James RA, Munns R** (2002) Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: response of grafted plants to soil drying. *J Exp Bot* **53**: 1503–1514
- Hua D, Wang C, He J, Liao H, Duan Y, Zhu Z, Guo Y, Chen Z, Gong Z** (2012) A Plasma Membrane Receptor Kinase, GHR1, Mediates Abscisic Acid- and Hydrogen Peroxide-Regulated Stomatal Movement in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* **24**: 2546–2561
- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* **27**: 325–333
- Iwanoff, L** (1928) Zur Methodik der Transpirationsbestimmung am Standort. *Berichte Dtsch Bot Ges* **46**: 306–310
- Kang J, Hwang J-U, Lee M, Kim Y-Y, Assmann SM, Martinoia E, Lee Y** (2010) PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 2355–2360
- Kim T-H, Bohmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI** (2010) Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO₂, and Ca²⁺ Signaling. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 561–591
- Kollist H, Jossier M, Laanemets K, Thomine S** (2011) Anion channels in plant cells. *FEBS J* **278**: 4277–4292
- Kollist T, Moldau H, Rasulov B, Oja V, Rämme H, Hüve K, Jaspers P, Kangasjärvi J, Kollist H** (2007) A novel device detects a rapid ozone-induced transient stomatal closure in intact *Arabidopsis* and its absence in *abi2* mutant. *Physiol Plant* **129**: 796–803

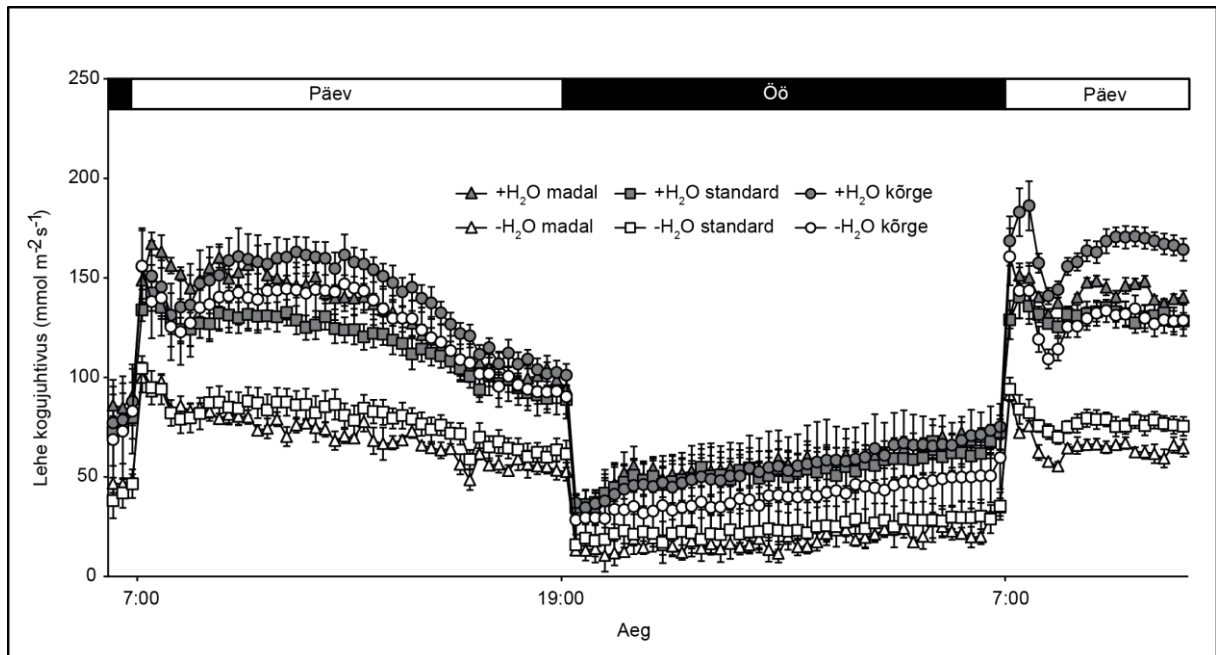
- Kudoyarova G, Veselova S, Hartung W, Farhutdinov R, Veselov D, Sharipova G** (2010) Involvement of root ABA and hydraulic conductivity in the control of water relations in wheat plants exposed to increased evaporative demand. *Planta* **233**: 87–94
- Kuromori T, Miyaji T, Yabuuchi H, Shimizu H, Sugimoto E, Kamiya A, Moriyama Y, Shinozaki K** (2010) ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 2361–2366
- Kwak JM, Mäser P, Schroeder JI** (2008) The Clickable Guard Cell, Version II: Interactive Model of Guard Cell Signal Transduction Mechanisms and Pathways. *Arab Book* e0114
- Lake JA, Woodward FI** (2008) Response of stomatal numbers to CO₂ and humidity: control by transpiration rate and abscisic acid. *New Phytol* **179**: 397–404
- Lambers H, Iii FSC, Pons TL** (2008) *Plant Water Relations*. *Plant Physiol. Ecol.* Springer New York, pp 163–223
- Lee SC, Lan W, Buchanan BB, Luan S** (2009) A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 21419–21424
- Lima W de P, Jarvis P, Rhizopoulou S** (2003) Stomatal responses of *Eucalyptus* species to elevated CO₂ concentration and drought stress. *Sci Agric* **60**: 231–238
- Liu F, Jensen CR, Andersen MN** (2003) Hydraulic and chemical signals in the control of leaf expansion and stomatal conductance in soybean exposed to drought stress. *Funct Plant Biol* **30**: 65–73
- MacRobbie E a. C** (1998) Signal transduction and ion channels in guard cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353**: 1475–1488
- Medlyn BE, Barton CVM, Broadmeadow MSJ, Ceulemans R, De Angelis P, Forstreuter M, Freeman M, Jackson SB, Kellomäki S, Laitat E, et al** (2001) Stomatal conductance of forest species after long-term exposure to elevated CO₂ concentration: a synthesis. *New Phytol* **149**: 247–264
- Merilo E, Jalakas P, Kollist H, Brosché M** (2015) The Role of ABA Recycling and Transporter Proteins in Rapid Stomatal Responses to Reduced Air Humidity, Elevated CO₂, and Exogenous ABA. *Mol Plant* **8**: 657–659
- Merilo E, Laanemets K, Hu H, Xue S, Jakobson L, Tulva I, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez PL, Schroeder JI, Brosche M, et al** (2013) PYR/RCAR Receptors Contribute to Ozone-, Reduced Air Humidity-, Darkness- and CO₂-Induced Stomatal Regulation. *Plant Physiol* pp.113.220608
- Metwally AW, Beck GE, Struckme Be** (1971) Density and behavior of stomata of *Pelargonium hortorum* – Grown under 3 soil moisture regimes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **96**: 31-34
- Metwally AW, Struckme Be, Beck GE** (1970) Effect of 3 soil moisture regimes on growth and anatomy of *Pelargonium hortorum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **95**: 803-808

- Meyer S, Mumm P, Imes D, Endler A, Weder B, Al-Rasheid KAS, Geiger D, Marten I, Martinoia E, Hedrich R** (2010) AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J* **63**: 1054–1062
- Morgan RPC, Rickson RJ** (1990) Issues on soil erosion in Europe: the need for a soil conservation policy. John Wiley & Sons Ltd., pp 591–603
- Morison JIL** (1998) Stomatal response to increased CO₂ concentration. *J Exp Bot* **49**: 443–452
- Morison, JIL** (1987) Intercellular CO₂ Concentration and Stomatal Response to CO₂. In: Zeiger E, Farquhar GD, Cowan IR, editors. *Stomatal Function*. Stanford, CA: Stanford University Press;. p. 229-251
- Mortensen LM, Fjeld T** (1998) Effects of air humidity, lighting period and lamp type on growth and vase life of roses. *Sci Hortic* **73**: 229–237
- Negi J, Matsuda O, Nagasawa T, Oba Y, Takahashi H, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Hashimoto M, Iba K** (2008) CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* **452**: 483–486
- Nejad AR, Van Meeteren U** (2005) Stomatal response characteristics of *Tradescantia virginiana* grown at high relative air humidity. *Physiol Plant* **125**: 324–332
- Sasaki T, Mori IC, Furuichi T, Munemasa S, Toyooka K, Matsuoka K, Murata Y, Yamamoto Y** (2010) Closing Plant Stomata Requires a Homolog of an Aluminum-Activated Malate Transporter. *Plant Cell Physiol* **51**: 354–365
- Schroeder JI, Hagiwara S** (1989) Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* **338**: 427–430
- Schroeder JI, Hedrich R, Fernandez JM** (1984) Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* **312**: 361–362
- She X-P, Song X-G, He J-M** (2004) Role and Relationship of Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide in Light/Dark-regulated Stomatal Movement in *Vicia faba*. *Acta Bot Sin* **46**: 1292–1300
- Shimazaki K, Iino M, Zeiger E** (1986) Blue light-dependent proton extrusion by guard-cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* **319**: 324–326
- Sokolovski S, Hills A, Gay R, Garcia-Mata C, Lamattina L, Blatt MR** (2005) Protein phosphorylation is a prerequisite for intracellular Ca²⁺ release and ion channel control by nitric oxide and abscisic acid in guard cells. *Plant J* **43**: 520–529
- Zelitch I** (1961) BIOCHEMICAL CONTROL OF STOMATAL OPENING IN LEAVES*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **47**: 1423–1433
- Zhang X, Zhang L, Dong F, Gao J, Galbraith DW, Song C-P** (2001) Hydrogen Peroxide Is Involved in Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure in *Vicia faba*. *Plant Physiol* **126**: 1438–1448
- Taiz L, Zeiger E** (1991) *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California, USA, pp 8; 134; 172; 399; 482-488

- Talbott LD, Srivastava A, Zeiger E** (1996) Stomata from growth-chamber-grown *Vicia faba* have an enhanced sensitivity to CO₂. *Plant Cell Environ* **19**: 1188–1194
- Taylor GJ, Stadt KJ, Dale MRT** (1991) Modelling the phytotoxicity of aluminum, cadmium, copper, manganese, nickel, and zinc using the Weibull frequency distribution. *Can J Bot* **69**: 359–367
- Torre S, Fjeld T** (2001) Water loss and postharvest characteristics of cut roses grown at high or moderate relative air humidity. *Sci Hortic* **89**: 217–226
- Torre S, Fjeld T, Gislerød HR, Moe R** (2003) Leaf Anatomy and Stomatal Morphology of Greenhouse Roses Grown at Moderate or High Air Humidity. *J Am Soc Hortic Sci* **128**: 598–602
- Vahisalu T, Kollist H, Wang Y-F, Nishimura N, Chan W-Y, Valerio G, Lamminmäki A, Brosché M, Moldau H, Desikan R, et al** (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* **452**: 487–491
- Vahisalu T, Puzõrjova I, Brosché M, Valk E, Lepiku M, Moldau H, Pechter P, Wang Y-S, Lindgren O, Salojärvi J, et al** (2010) Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *Plant J* **62**: 442–453
- Xu Z-Y, Kim DH, Hwang I** (2013) ABA homeostasis and signaling involving multiple subcellular compartments and multiple receptors. *Plant Cell Rep* **32**: 807–813

LISAD

LISA 1



Lisa 1. Ööpäevakatse. Taimede gaasivahetust mõõdeti järjest kaks ööpäeva, joonisel on sellest kujutatud umbes 28 tundi. Joonisel on keskmistatud lehe kogujuhtivus ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ($n=4-6$ taime) \pm SEM.

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Liis Rüütel,

(sünnikuupäev: 12.05.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose **Kasvutingimuste mõju hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) õhulõhede regulatsioonile**, mille juhendajad on Hanna Hõrak ja Pirko Jalakas,
 - 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, 25.05.2015