

Tartu Ülikool  
Loodus- ja tehnoloogiateaduskond  
Ökoloogia ja Maateaduste Instituut  
Botaanika osakond

Keili Ojaste

Õhulõhede kiire, kuid ajutine sulgumine osoneerimisel ning selle seos ROS-ide  
produksiooni ja askorbaadi kontsentratsiooniga *Arabidopsis thaliana* lehtedes

Magistritöö

Juhendajad: Ebe Merilo, PhD  
Pirko Jalakas, MSc

Tartu 2014

## Sisukord

1.	SISSEJUHATUS .....	5
1.1.	ASKORBIINHAPPE SÜNTEES .....	6
1.2.	ASKORBIINHAPPE KOGUS TAIMEDES.....	7
1.3.	ASKORBIINHAPPE TÄHTSUS .....	8
1.4.	ASKORBAADI-GLUTATIOONI TSÜKKEL .....	9
1.5.	ÕHULÕHED .....	10
1.6.	ÕHULÕHEDE REAKTSIOONID SÜSIHAPPEGAASILE JA OSOONILE .....	11
1.7.	ÕHULÕHEDE JA ASA VAHELINE SEOS .....	13
2.	MATERJAL JA METOODIKA .....	15
2.1.	TAIMNE MATERJAL JA KASVUTINGIMUSED .....	15
2.2.	APARATUUR GAASIVAHETUSE MÕÕTMISEKS .....	16
2.3.	KATSESKHEEM.....	17
2.3.1.	Eelnev osoneerimine või madalas CO <sub>2</sub> -s hoidmine.....	17
2.3.2.	O <sub>3</sub> RTD katsed.....	18
2.4.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> MÕÕTMINE .....	19
2.5.	ASKORBIINHAPPE MÕÕTMINE .....	19
2.6.	ANDMETE ANALÜÜS .....	20
3.	TULEMUSED .....	21
3.1.	O <sub>3</sub> -INDUTSEERITUD RTD OLEMASOLU EELNEVALT OSONEERITUD VÕI MADALAS CO <sub>2</sub> -S HOITUD TAIMEDEL.....	21
3.2.	OSOONI JA MADALA SÜSIHAPPEGAASI MÕJU ROS-IDELE.....	25
3.3.	OSONEERIMISE MÕJU ASKORBAADILE .....	25
4.	ARUTELU .....	27
	KOKKUVÕTE.....	31
	SUMMARY .....	33
	TÄNUAVALDUSED .....	35
	KASUTATUD KIRJANDUS .....	36

LISAD .....	43
LISA 1 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> MÕÕTMINE AMPLEX RED MEETODIGA.....	43
LISA 2 ASKORBIINHAPPE MÕÕTMINE .....	44

## KASUTATUD LÜHENDID

ABA- abstsiihape

AMR1- askorbiinhappe sünteesi Man/Gal raja regulaator

APX- askorbaadi peroksüdaas

AsA- askorbiinhape, C vitamiin

DDT- ditiotreitool

DHA- dehüdroaskorbaat

DHAR- dehüdroaskorbaadi reduktaas

FAD- flaviinadeniindinukleotiid

GLDH- L-galaktono-1,4-laktooni dehüdrogenaas

gs- õhulõhede juhtivus

GSH- glutatioon

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- vesinikperoksiid

H<sup>+</sup>-ATPaas- ATP energiat kulutav H<sup>+</sup> kanal

MDHA- monodehüdroaskorbaat

MDHAR- monodehüdroaskorbaadi reduktaas

NEM- N-etüülmaleimiid

ROS- reaktiivsed hapniku osakesed

RTD- kiire, kuid mööduv õhulõhede juhtivuse vähenemine (*rapid transient decrease in stomatal conductance*)

SLAC1- sulgrakkude aeglast tüüpi anioonkanal (*slow anion channel-associated 1*)

TCA- trikloroetaanhape

*vtc1*- *Arabidopsis thaliana* askorbaadidefitsiitne mutant (*vitamin C-1*)

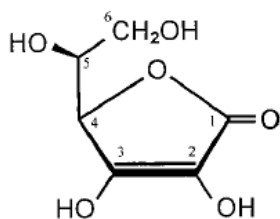
*vtc2*- *Arabidopsis thaliana* askorbaadidefitsiitne mutant (*vitamin C-2*)

## 1. SISSEJUHATUS

Askorbiinhape (AsA- inglise keeles *ascorbic acid*), tuntud ka kui vitamiin C, on tähtis ja vajalik nii taimedele, loomadele kui ka inimestele, kaitstes näiteks taimi oksüdatiivse stressi ja inimesi mitmete krooniliste haiguste eest. Inimesed ja mitmed loomad on evolutsiooni käigus kaotanud AsA sünteesimiseks vajaliku geeni (Arrigoni jt 2001), seetõttu tuleb vajalik vitamiinikogus omastada toidust.

Esimesi kaudseid viiteid võib askorbiinhappe kohta leida juba Vana-Kreeka ja Egiptuse allikatest, kus on kirjeldatud AsA puudusest tingitud haigust, skorbuuti. Kuid vitamiin C avastamiseni läks veel kaua. 1920ndate aastate lõpus isoleeris ungarlane Albert Von Szent György, kes sai 1937. aastal ka AsA uurimise eest Nobeli Preemia (Arrigoni jt 2001), köögiviljadest ühendi, mis sai hiljem nimeks askorbiinhape. Täpne struktuur määrati kindlaks 1932. aastal (Davey jt 2000). Pärast seda avaldati vaid mõned tööd AsA kohta ning tõsisemalt hakati askorbiinhapet uurima taas umbes 30 aastat tagasi.

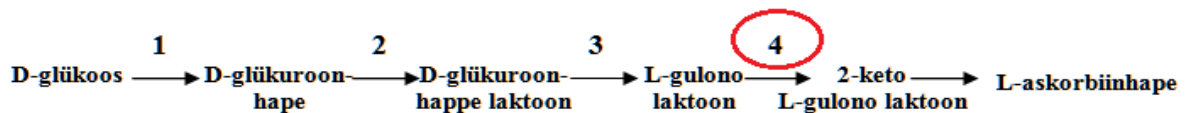
Struktuurilt (Joonis 1) on AsA üks lihtsamaid kuuest süsinikust koosnevaid veeslahustuvaid vitamiine ( $C_6H_8O_6$ ), millel on antioksidandi omadused. Antioksidantidest on taimedes kõige rohkem just askorbiinhapet (Chen & Gallie 2004), seda leidub nii tsütosoolis, vakuoolis, mitokondrites kui ka rakuseinas ning enim kloroplastides (Smirnoff 1996). Sõltuvalt liigist ja organist jääb taimedes AsA kontsentratsioon vahemikku 10-300 mM (Smirnoff & Wheeler 2000).



Joonis 1. C-vitamiini struktuur (Davey jt 2000)

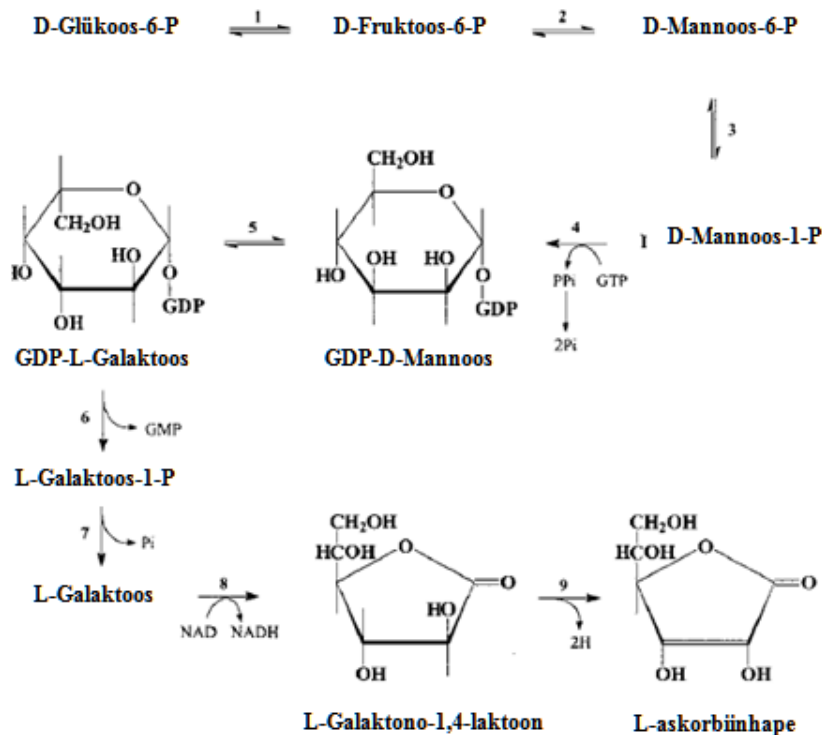
## 1.1. Askorbiinhappe süntees

Askorbiinhappe süntees on taimedel ja loomadel erinev. On kindlaks tehtud, et loomadel toimub see üht võimalikku rada mööda (Joonis 2), kuid taimedel on leitud 4 erinevat biosünteesi rada.



Joonis 2. Imetajate askorbiinhappe süntees. Inimestel on maksas olemas 3 esimest ensüümi, kuid puudub L-gulonolaktooni oksüdaas (Stone 1972 põhjal).

Kuna AsA biosünteesi radu on taimedel keerulisem kindlaks teha kui loomadel, tekitavad võimalikud sünteesiviisid taimedes siiani küsimusi (Imai jt 2009). Esimesed ja siiani ka kõige enam toetuspinda leidnud tulemused AsA biosünteesi kohta ilmusid 1998. aastal Wheeleri jt poolt avaldatud artiklis, kus käsitleti AsA produktsiooni glükoosist läbi GDP-mannoosi ja L-galaktoosi (Joonis 3). Lisaks *de novo* sünteesile, on AsA sisalduse kujunemisel oluline oksüdeeritud vormist dehüdroaskorbaadist (DHA) AsA taastamine, milles osalevad ensüüm dehüdroaskorbaadi reduktaas (DHAR) ning glutatioon (Chen jt 2003).



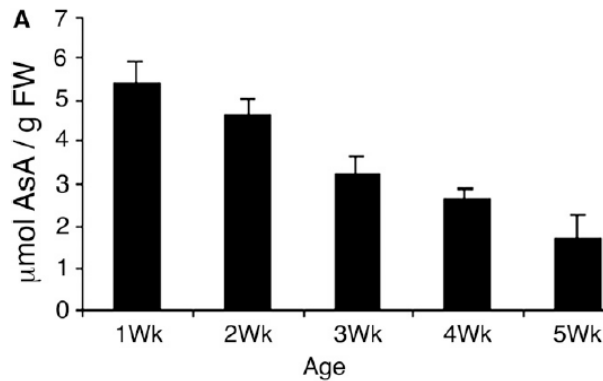
Joonis 3. Askorbiinhappe „Smirnoff-Wheeler“i biosünteesi rada (Wheeler jt 1998). Ensüümid: 1. Fosfoglüksi isomeraas 2. Fosfomannoosi isomeraas 3. Fosfomannoosi mutaas 4. GDP-D-mannoosi- pürofosforülaas 5. GDP-D-mannoosi-3`5`-epimeraas 6. GDP-L-galaktoosi fosforülaas 7. L-galaktoos-1-P 1-fosfataas 8. L-galaktoosi dehüdrogenaas 9. L-galaktono-1,4-laktooni dehüdrogenaas

## 1.2. Askorbiinhappe kogus taimedes

Askorbaadi kogus taimes sõltub liigist/mutandist ja organist. *Arabidopsis thaliana* mutant *vtc1*, millel on mutatsioon GDP-mannoosi pürofosforülaasis (Gallie 2013), on AsA-defitsiitne, sisaldades umbes 30% metsiktüübi askorbaadi kogusest (Conklin jt 1997). Mutandil *vtc-2*, millel on mutatsioon GDP-L-galaktoosi fosforülaasis (Gallie 2013), on vastav number kõigest 10-20% (Gallie 2012). AsA-defitsiitsetel *vtc* mutantidel on ilmselt suurem L-galaktono-1,4-laktooni dehüdrogenaasi (GLDH) võimsus kui metsiktüüpi taimedes (Davey jt 2000).

Lisaks sõltub AsA hulk konkreetsest taimeorganist ja tema vanusest (Joonis 4), DHAR-i ekspressioonist ning ööpäevastest tsüklist. AsA sisaldus on nooremates lehtedes kõrgem kui vanemates lehtedes, mis arvatakse olevat põhjustatud DHAR-i

aktiivuse langusest vananedes (Chen jt 2003). Askorbaadi sisaldust iseloomustab ka ööpäevane kõikumine: öösel on AsA madalam ja kasvab päeva jooksul.



Joonis 4. Askorbiinhappe sisaldus *Arabidopsis thaliana* metsiktüübi 1-5 nädala vanustes lehtedes (Zhang jt 2009)

### 1.3. Askorbiinhappe tähtsus

Askorbiinhape toimib antioksidandina ja on ensüümide kofaktoriks. AsA võtab osa mitmetest protsessidest, sealhulgas fotosünteesist, valguskaitsest, rakkude kasvust ja ekspansioonist ning etüleeni, gibberelliinide, antotsüaniidi ja hüdroksüproliini sünteesist (Smirnoff & Wheeler 2000).

Kloroplastid, mitokondrid ja peroksüsoomid toodavad raku ainevahetuse käigus reaktiivseid hapniku osakesi (ROS- inglise k. *reactive oxygen species*). Sellisteks osakesteks on superoksiidi radikaal ( $O_2^{\cdot-}$ ), ühevalentne hapnik ( $^1O_2$ ), vesinikperoksiid ( $H_2O_2$ ) ja hüdroksüülradikaal ( $OH^{\cdot}$ ) (Davey jt 2000). ROS-id on olulised signaalmolekulidena, osaledes kaitse reaktsioonides, programmeeritud rakusurmas, õhulõhede sulgemises abtsiinhappe (ABA) signaalkompleksi vahendusel jne (Sharma jt 2012). Reaktiivsete hapniku osakeste produktsiooni tõstab ka keskkonnastress: põud, liigne valgus, kokkupuude saasteainetega jne (Davey jt 2000).

Antioksidatiivne kaitsesüsteem on võimeline elimineerima vabu radikaale. Vabaks radikaaliks on mingi aine molekul, mille välises elektronihis on üks elektron paaritu, mistõttu võib see kergesti keemilistesse reaktsioonidesse astuda. Taimed saavad vähendada keskkonnast pärit ROS-idest tulenevat kahju ühelt poolt õhulõhede sulgemisega, takistades nii saasteainete difusiooni lehte. Teisalt, kui ROS-id on lehes

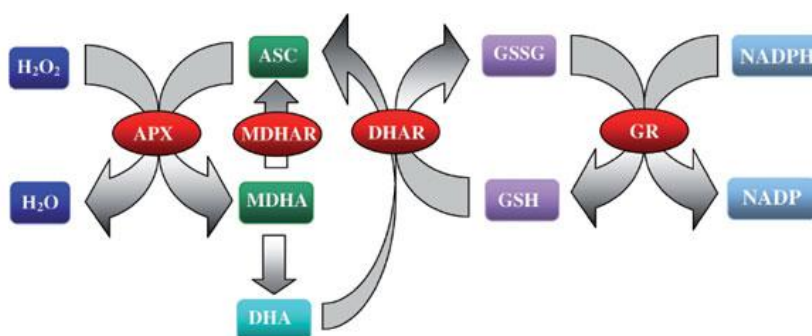


juba tekkinud, tuleks nad detoksifitseerida (Chen & Gallie 2005). Antioksidandid reageerivad kiiresti oksüdeerivate molekulidega, hoides ära organismile kahjulikke reaktsioone. Kui ROS-ide kontsentratsioon on kõrge, muutub see rakkudele ohtlikuks, kahjustades näiteks lipiide, proteiine, nukleiinhappeid, ensüüme (Sharma jt 2012) ning see võib viia ka raku surmani (Davey jt 2000).

AsA osaleb mitmetes olulistes ensümaatilistes reaktsioonides. Sellisteks ensüümideks on mono- või dioksügenaasid, mis sisaldavad rauda või vaske ja vajavad maksimaalse aktiivsuse saavutamiseks askorbiinhapet. AsA funktsiooniks on säilitada nende ensüümide reaktsioonitsentrites asuvad metallid redutseeritud olekus, mis tagab ensüümi aktiivsuse. AsA osaleb rakuseinas olevate hüdroksüproliini rikaste valkude sünteesis, mõjutades raku venivuskasvu ja jagunemist (Smirnoff & Wheeler 2000). Lisaks aktiveerib askorbiinhape mürosinaasi, ensüümi, mis katalüüsib glükosinolaatide hüdrolüüsi D-glükoosiks ja aglükooniks. AsA kui ko-substraadi olemasolu on tähtis ka hormoonide etüleeni ja giberelliinhappe biosünteesil. (Davey jt 2000).

#### 1.4. Askorbaadi-glutatiooni tsükkel

Askorbaadi (AsA) – glutatiooni (GSH) tsükkel, mida nimetatakse ka Halliwell-Asada rajaks (Joonis 5), mängib olulist rolli võitluses oksüdatiivse stressi vastu ning see seisneb askorbaadi ning glutatiooni regenereerimises (Sharma jt 2012). AsA-GSH tsükkel, mis esineb tsütosoolis, kloroplastides, mitokondrites ja peroksüsoomides (Jiménez jt 1997), on oluline säilitamaks sellist ROS-ide taset, mis minimeeriks oksüdatiivse kahju tekkevõimaluse, kuid säilitaks nende rolli signaalmolekulina (Gallie 2013).



Joonis 5. Askorbaadi-glutatiooni tsükkel (Saruhan jt 2009)

Askorbaadi peroksüdaas (APX) on AsA-GSH tsükli keskne ensüüm ja mängib tähtsat rolli rakusisesel ROS-ide taseme kontrollis. APX kasutab kahte AsA molekuli, et redutseerida  $H_2O_2$  veeks. Antud reaktsiooni käigus produtseeritakse monodehüdroaskorbaat (MDHA), mis on lühikese elueaga (Gallie 2013). Kuigi MDHA-st regenereeritakse AsA, saadakse sellest alati ka DHA-d (Sharma jt 2012), millest DHAR-i abil regenereeritakse AsA (Sharuhan jt 2009).

## 1.5. Õhulõhed

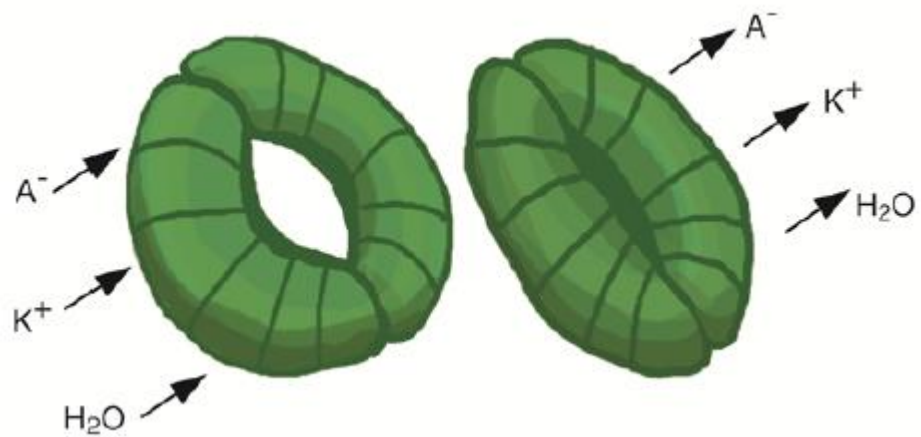
Taimedel paiknevad lehtede pinnal õhulõhed, mis koosnevad kahest sulgrakust ja nende vahele jäävast õhupilust. Pidevalt muutuvates keskkonnatingimustes optimeeritakse õhulõhede kaudu gaasivahetust taime ja atmosfääri vahel (Vavasseur & Raghavendra 2004). Õhulõhede avanemine ja sulgumine reguleerib ühelt poolt  $CO_2$  sisenemist taime ning teisalt veekadu taimest (Roelfsema & Hedrich 2005). Kui veepuuduses õhulõhed suletakse, on takistatud ka süsihappegaasi pääsemine lehtedesse ning väheneb fotosüntees.

Kuigi õhulõhede pooride pindala moodustab ainult 5% kogu lehepindalast, mängivad nad suurt rolli globaalses vee- ja süsinikuringes (Hetherington & Woodward 2003). Läbi taimede õhulõhede toimuv transpiratsioon viib igal aastal globaalselt 62 000  $km^3$  vett mullast atmosfääri, illustreerides bioloogiliste veevoogude osatähtsust globaalses veeringes (Jasechko jt. 2013).

Õhulõhede avatuses mängivad olulist rolli ööpäevane tsükkel ja vee olemasolu. Kui taimel on piisavalt vett, hoiab ta päevasel ajal, kui fotosünteesi aktiivsus võiks olla kõrge, oma õhulõhed lahti hoolimata kaasnevast veekaost. Õhulõhede lahtihoidmise mõte on võimaldada  $CO_2$  difusiooni lehtedesse. Öösel, kui fotosünteesi ei toimu, pannakse veekao vältimiseks õhulõhed kinni. Veestressi korral jäetakse ka päeval õhulõhed suletuks või avatakse vaid osaliselt.

Õhulõhede avanemise põhjuseks on sulgrakkude turgorrõhu muutumine, mis on tingitud osmootselt aktiivsete ainete ja vee liikumisest.  $K^+$  ja  $Cl^-$  liiguvad raku, alandades sellega sulgraku veepotentsiaali. Kuna vesi liigub kõrgema potentsiaaliga

kohtadest madalama potentsiaaliga kohtadesse, siis sulgrakk täitub veega ja turgorrõhk tõuseb. Kui sulgrakkudes on turgorrõhk suurem kui ümbritsevates kaasrakkudes toimub õhulõhede avanemine (Joonis 6).



Joonis 6. Avatud (vasakul) ja suletud (paremal) õhulõhe. Nooled näitavad anioonide ( $A^-$ ), kationide ( $K^+$ ) ja vee ( $H_2O$ ) liikumise suunda õhulõhede avanemisel ja sulgumisel (Kollist jt 2010)

Õhulõhede avanemisel aktiveerub  $H^+$ -ATP-aas, prootonid pumbatakse rakust välja ja membraan polariseerub. See võimaldab kaaliumioonidel läbi ioonkanalite tsütoplasmasse ja sealt edasi vakuooli liikuda. Kui taimes veepotentsiaal langeb (näiteks olukord, kui transpiratsioonist tingitud veekadu taimest on suurem kui juurte kaudu vee omastamine) kasvab abstsissiishappe (ABA) sisaldus (Gomes jt 2004). ABA poolt aktiveeritakse kanalid, mis võimaldavad rakuvälise  $Ca^{2+}$  sisenemist.  $Ca^{2+}$  kontsentratsiooni tõusu tõttu inhibeeritakse  $H^+$ -ATP-aas. Membraanid depolariseeruvad, membraanipotentsiaal väheneb ja sellega kaasneb eksportivate  $K^+$  kanalite avanemine. Lisaks aktiveeruvad ABA toimel anioonkanalid, mis viivad anioonide väljumisele sulgrakust ning, kokkuvõttes, samuti õhulõhede sulgumisele (Lee jt. 2009).

#### 1.6. Õhulõhede reaktsioonid süsihappegaasile ja osoonile

Õhulõhede avatust mõjutavad mitmed keskkonnafaktorid- valguse intensiivsus ja spektraalne koostis, temperatuur, suhteline õhuniiskus ja atmosfääri  $CO_2$  ning osooni kontsentratsioonid. Lisaks mõjutavad õhulõhede avatust lehepatogeenid (bakterid ja

seened), põhjustades häireid õhulõhede avanemises päeval ja sulgumises öösel (Grimmer jt 2012).

Õhulõhed suletakse kõrge ja avatakse madala CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni juures (Young jt 2006). Kõrgenenud CO<sub>2</sub> kontsentratsioonid toovad kaasa tsütosoolse Ca<sup>2+</sup> tõusu (Webb jt 1996), suureneb kaaliumi väljavool (Young jt 2006) ja see viib õhulõhede sulgumiseni. Lisaks osaleb kõrges CO<sub>2</sub> tingimustes toimuv õhulõhede sulgumises ABA ja tema signaalüksus, mis aktiveerib anioonkanali SLAC1 (Vahisalu jt 2008; Merilo jt 2013). Jätkuv CO<sub>2</sub> tõus atmosfääris põhjustab seega õhulõhede sulgumist, mis omakorda mõjutab CO<sub>2</sub> difusiooni lehte ja vee kasutamise efektiivsust. Teng jt 2006. aastal avaldatud artiklist selgus, et kõrge CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni juures kasvades vähenevad õhulõhede tihedus lehepinna ühiku kohta, õhulõhede juhtivus ja transpiratsioon.

Stratosfääri osoonikiht kaitseb Maad Päikeselt tuleva kahjuliku UV-kiirguse eest. Samas on meid ümbritsevas troposfääris osoon kahjulik, kahjustades nii taimi kui inimesi. Esmane taime kaitse osooni vastu on õhulõhede avatuse reguleerimine. Mida enam pääseb osooni lehte, seda suuremad on taime kahjustused (Brosche jt 2010). Osooni mõjul toimuv õhulõhede sulgumine käib samuti läbi ABA signaalüksuse ja anioonkanali SLAC1 aktivatsiooni (Vahisalu jt 2008; Merilo jt 2013). Lisaks mõjutab O<sub>3</sub> otseselt sulgrakkudes olevaid K<sup>+</sup> kanaleid, pärssides nii õhulõhede avanemist (Torsethaugen jt 1999) ja Ca<sup>2+</sup> homeostaasi (McAinsh jt 2001). Askorbiinhape ning teised antioksidandid aitavad juba lehte sattunud osooni ja temast lähtuvaid ROS-e detoksifitseerida (Moldau 1998).

Taimede osoneerimisel vähemalt 155 ppb osooniga on kirjeldatud kiiret, kuid mööduvat õhulõhede juhtivuse vähenemist, RTD-d (rapid transient decrease in stomatal conductance), kui õhulõhed sulguvad ja peagi taasavanevad (Vahisalu jt 2010; Moldau jt 2011). Kui osoneerimine antakse 3-minutilise pulsina, siis jäävad õhulõhed tavaliselt peale RTD taandumist sama avatuks või isegi rohkem avatuks kui nad enne osoneerimist olid (Moldau jt 2011). Kui osoneerimine kestab, siis järgneb sellele taasavanemisele uus sulgumine umbes 90 minuti pärast (Vahisalu jt. 2010). RTD esineb kõigil uuritud *Arabidopsis* ökotüüpidel, samuti teistel taimeliikidel (Vahisalu jt 2010, Jõesaar jt 2012), olles seega evolutsioonis konserveerunud vastus. Samas, RTD puudus rikutud SLAC1 anioonkanaliga mutantidel, mistõttu SLAC1 mutandid olid väga O<sub>3</sub>-

tundlikud (Vahisalu jt 2008; Vahisalu jt 2010). SLAC1 valgu avastamine toimuski tänu sellele, et seda funktsionaalset valku mittetootvad mutandid olid väga O<sub>3</sub>-tundlikud.

### 1.7. Õhulõhede ja AsA vaheline seos

AsA-defitsiitsed taimed on väga O<sub>3</sub>-tundlikud, nende O<sub>3</sub>-tundlikkus on tingitud eelkõige O<sub>3</sub> ja ROS-ide detoksifitseerimismehhanismi puudulikkusest (Conklin jt 1996). Näiteks AsA-defitsiitne mutant *vtc1* isoleeritigi just tema O<sub>3</sub>-tundlikkuse tõttu (Conklin jt 1996). Ka AMR1 geen, mis osutus AsA sünteesi Man/Gal raja negatiivseks regulaatoriks, avastati mutantide osoneerimisel: AMR1 geeni üleekspressioon põhjustas O<sub>3</sub>-tundlikkust ja 60%-list AsA sisalduse langust ning antud geeni väljalülitamine tagas O<sub>3</sub>-tolerantsuse ja ka kõrgema askorbaadi sisalduse (Zhang jt 2009).

Chen & Gallie 2004. aastal avaldatud artiklis uuriti DHAR-i ekspressiooni, askorbaadi kontsentratsiooni ja õhulõhede avatust. Leiti, et askorbaadi roll õhulõhede avanemisel on seotud tema funktsiooniga H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoksifitseerimises. Pärastlõunati H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsioon tõuseb, tõenäoliselt tingituna fotosünteesiprotsessidest, samal ajal langeb askorbaadi tase ja see viib õhulõhede sulgemiseni.

Chen & Gallie (2004) tulemused näitasid, et transgeensetes taimedes, kel on suurenenud DHAR-i ekspressioon, on ka õhulõhede avatus suurem ning seetõttu on need taimed tundlikumad veedefitsiidi suhtes. Madalama DHAR-i ekspressiooniga taimedel olid õhulõhed osaliselt suletud ja taimed omasid paremat kontrolli transpiratsiooni üle. DHAR-i üleekspressioon suurendab sulgrakkudes AsA kontsentratsiooni, mis vähendab sulgrakkude reageerimisvalmidust tekkivatele ROS-idele.

Eeltoodud kirjanduse ülevaade tõi välja, et:

- 1) AsA on antioksidant, osaledes ROS-ide detoksifitseerimises;
- 2) ROS-id reguleerivad õhulõhede avatust ja õhulõhede vastuseid keskkonnatingimustele, sealhulgas osoonile;

- 3) O<sub>3</sub> toimel ilmneb taimedel RTD – kiire, kuid mööduv õhulõhede juhtivuse vähenemine;
- 4) Asa/DHA omavaheline suhe osaleb õhulõhede avatuse ja reaktiivsuse määramisel.

Käesoleva töö eesmärk on uurida lehtede AsA kontsentratsiooni, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sisalduse ja õhulõhede O<sub>3</sub>-vastuse (RTD) omavahelisi seoseid ning vaadata, kuidas muutub peale 1-tunnist osoneerimist ja madalas CO<sub>2</sub>-s hoidmist ROS-ide ja AsA kontsentratsioon lehtedes.

Antud töös kontrolliti hüpoteesi, et eelnev osoneerimine muudab RTD iseloomu, tõstab ROS-ide sisaldust taimedes ning langetab AsA kontsentratsiooni. Eeldades, et AsA süntees lähtub otseselt glükoos-6P-st, mis on fotosünteesi produkt, tehti paralleelselt ka katseseeria, kus hoiti taimi eelnevalt madalas CO<sub>2</sub>-s, et näha, kas madalas CO<sub>2</sub>-s hoitud taimedel on AsA vähem ja ROS-e rohkem.

## 2. MATERJAL JA METOODIKA

### 2.1. Taimne materjal ja kasvutingimused

Katsetaimeks oli müürlook (*Arabidopsis thaliana* L.), mis on kujunenud taimegeneetika ja taimede molekulaarbioloogia üheks mudelorganismiks, sest tema suhteliselt väike (5 kromosoomi, 114.5 megaluspaari) genoom on sekveneeritud, elutsüklil on kiire, seemneproduksioon külluslik ning kättesaadav on tohtu hulk mutante. (<http://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp>). Antud töös kasutati laboratoorseid metsiktüüpi Col-0.

Seemned pandi vette ja stratifitseeriti 4°C juures 2-4 päeva, seejärel külvati klaasplaadiga kaetud (plaadi keskel paikneb 0,3 cm läbimõõduga avaus) ning kasvusubstraadiga (2 osa turvast 1 osa vermikuliiti) täidetud 200 ml plastikpotsidesse. Seemned asetati pipeti abil kasvusubstraadile läbi klaasplaadil oleva ava, et kasvades jääksid klaasi pinnale ainult taimede maapealsed osad (Joonis 7). Hiljem harvendati taimi vastavalt vajadusele, et igasse potti jääks kasvama ainult 1 taim. Taimed kasvasid kontrollitud tingimustega kasvukambrites (AR-66LX ja AR-22L; Percival Scientific, Perry, IA, USA ning MCA1600; Snijders Scientific, Drogenbos, Belgia), kus õhuniiskus oli 70-75%, ööpäevane tsüklil 12 tundi valgust/ 12 tundi pimedust ja temperatuurid vastavalt 23°C/ 18°C. Fotosünteesiliselt aktiivne kiirus päevasel ajal oli 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Mullaniiskust hoiti vahemikus 60-80% kasvusubstraadi veemahust, selleks kasteti taimi umbes iga 5 päeva tagant altniisutamise meetodil. Taimed olid katse ajaks 21-27 päeva vanad (leheroseti pindala 4,3- 13,2  $\text{cm}^2$ ) ja vegetatiivses arengufaasis.



Joonis 7. *Arabidopsis thaliana* metsiktüüpi taim Col-0 klaasplaadiga kaetud plastiktopsis.

## 2.2. Aparatuur gaasivahetuse mõõtmiseks

Lehtede gaasivahetust mõõdeti kaheksakambrilise gaasivahetussüsteemiga, mida on täpsemalt kirjeldatud artiklis Kollist jt (2007). Antud süsteem on spetsiaalselt mõeldud väikeste taimede, näiteks müürlooga, mõõtmiseks. Gaasivahetussüsteem töötab läbivoolu põhimõttel, ühe kambri mõõtmiseks kulub 2 minutit, mille jooksul seade salvestab arvutisse CO<sub>2</sub>, veeauru ja osooni kontsentratsioonid kambrisse sisenevas ning sealt väljuvas õhuvoolus. Katsetes saab muuta erinevaid keskkonnafaktoreid (õhu CO<sub>2</sub> ja O<sub>3</sub> kontsentratsioone, õhuniiskust, valgust) ning uurida nende muutuste mõju õhulõhede juhtivusele. Katsed algasid taimede pildistamisega, mis oli vajalik hilisemaks lehepindala mõõtmiseks. Lehepindala määramiseks kasutati programmi ImageJ (versioon 1.46r).



## 2.3. Katseskeem

### 2.3.1. Eelnev osoneerimine või madalas CO<sub>2</sub>-s hoidmine

Et uurida eelneva osoneerimise mõju RTD iseloomule ning lehtede H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ja AsA sisaldusele, oli vaja kõigepealt taimi osoneerida. See 1-tunnine taimede osoneerimine 450 ppb (=450 nmol mol<sup>-1</sup>) osooniga toimus pärastlõunati. Taimed asetati kaheksasse kambrisse ning hoiti seal 30-45 minutit füsioloogiliste näitajate, eelkõige õhulõhede juhtivuse (*g<sub>s</sub>*), stabiliseerumiseni ning siis lisati kamber-haaval nelja kambrisse osooni. 4 kambrit jäid osoneerimata kontrollideks. Aparatuur registreeris 16-minutilise intervalliga iga kambri õhutemperatuuri ning kambrisse siseneva ja sealt väljuva õhu veeauru, CO<sub>2</sub> ning osooni kontsentratsioonid. Siseneva ja väljuva veeauru sisalduse vahest, lehepindalast ning kambri õhuvoolu kiirusest lähtuvalt arvutas spetsiaalne programm hiljem transpiratsiooni ja sealt omakorda lehetemperatuuri arvesse võttes õhulõhede juhtivuse (*g<sub>s</sub>*). Lehetemperatuur arvutati lähtuvalt õhutemperatuurist, kasutades valemit, mis arvestab transpiratsiooni ja pealelangeva kiirguse mõju lehetemperatuurile. Siseneva ja väljuva CO<sub>2</sub> sisalduse vahe võimaldab arvutada netoassimilatsiooni väärtuse (Kollist jt 2007).

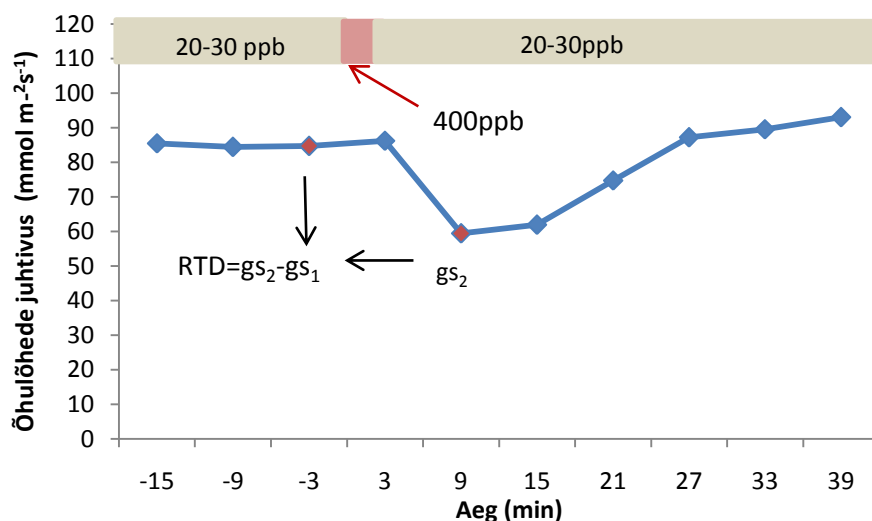
Ozoneeritud ja vastavate kontrolltaimedelt võeti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> määramise proovid kas samal õhtupoolikul 30 minutit peale osoneerimise lõppu või pandi nad tagasi kasvukambritesse ning võeti proovid järgmise päeva hommikul. Selline aeg (30 minutit peale osoneerimise lõppu) sai valitud selleks, et tabada O<sub>3</sub>-indutseeritud kahefaasilise ROS-ide tootmise teist maksimumi: esimene ROSide maksimum on 3 ja teine umbes 90 minutit peale osoneerimise algust (Vahisalu jt 2010). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proovideks koguti ~100 mg värsket taimset materjali (lehed+leherootsud) 1,5 ml tuubi, mis pandi vedelasse lämmastikku ning ööseks sügavkülma -80°C juurde. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> määramine toimus järgmisel päeval koos hommikul võetud proovidega.

Need ozoneeritud- ja kontrolltaimed, mis pandi pärast osoneerimist kasvukambrisse tagasi, läksid järgmisel hommikul kas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> või AsA määramiseks või O<sub>3</sub> RTD mõõtmiseks tagasi gaasivahetusaparaati.

Taimede hoidmine madala CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni juures toimus eelnevalt kirjeldatud gaasvahetussüsteemis. Selleks paigutati taimed samuti kaheksasse kambrisse; neljas hoiti neid madala CO<sub>2</sub> (umbes 50 ppm= μmol mol<sup>-1</sup>) juures umbes tund aega, kontrolltaimed olid samamoodi kambrites, kuid normaalse CO<sub>2</sub> (400 ppm= μmol mol<sup>-1</sup>) juures. Pärast katse lõppu läksid madala CO<sub>2</sub> ja vastavad kontrolltaimed kas AsA või H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proovideks või järgnevasse gaasvahetuskatsesse O<sub>3</sub> RTD mõõtmiseks.

### 2.3.2. O<sub>3</sub> RTD katsed

Eelnevalt osoneeritud või madalas CO<sub>2</sub>-s hoitud taimede (ning vastavate kontrolltaimede) O<sub>3</sub> RTD mõõtmine toimus korraka gaasvahetussüsteemi kolmes kambris. See võimaldab saada igast kambrist andmeid 6-minutilise intervalliga, mis omakorda lubab hinnata RTD sügavust võimalikult optimaalselt. RTD mõõtmiseks osoneeriti taimi 3 minuti jooksul 400-450 ppb osooniga, katse jätkus veel 60 minutit, võimaldades registreerida nii RTD-d kui järgnevat õhulõhede juhtivuse taastumist. RTD kvantitatiivseks iseloomustamiseks kasutati valemit  $RTD = g_{s2} - g_{s1}$ , kus  $g_{s2}$  on õhulõhede juhtivuse väärtus 9 minutit pärast 3-minutilise osoneerimise algust ning  $g_{s1}$  on osoneerimis-eelne stabiilne õhulõhede juhtivus (Joonis 8).



Joonis 8. Skeem õhulõhede juhtivuse ajutisest vähenemisest 3-minutilise osoneerimisel. Osooni kontsentratsioonid märgitud graafiku ülaosas.

Selgitamaks, kas eelnev 1-tunnine osoneerimine või madalas CO<sub>2</sub>-s hoidmine muudab õhulõhede võimet sulguda üldiselt, uuriti osoneeritud/madalas CO<sub>2</sub>-s hoitud taimede reaktsioone pimedusele ja/või kõrgele CO<sub>2</sub>-le, tuntud sulgumist indutseerivatele faktoritele. Selleks tehti lisakatsed, kus 1) eelnevalt 1h jooksul osoneeritud ja vastavad kontrolltaimed jäeti ööseks gaasivahetusaparaati, mis registreeris järgneva öö (19.00-7.00) ja hommiku jooksul taimede transpiratsiooni ning fotosünteesi. Hommikul, 90 minutit peale valguse pealeminekut tõsteti CO<sub>2</sub> kontsentratsioon kahekordseks (800 ppm ) ning registreeriti õhulõhede käitumine; 2) Madalas CO<sub>2</sub>-s hoitud ja vastavatele kontrolltaimedele rakendati pimedust ning registreeriti õhulõhede käitumine.

#### 2.4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mõõtmine

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mõõtmiseks kasutati Amplex Red meetodit, mida on täpsemalt kirjeldatud Lisas 1. Antud meetodi puhul reageerib peroksüdaasi juuresolekul Amplex Red'i reagent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ga 1:1 stöhhiomeetria kohaselt ja tekib punast värvi fluorestseeruv resorufiin. Hiljem määratakse spektromeetriga 525 nm juures neelduvus.

Proovideks koguti umbes 100mg värsket taimset materjali, mis pandi kohe pärast kaalumist vedelasse lämmastikku. Proovid koguti järgmiselt:

- 30 minutit peale 1-tunnise osoneerimise lõppu (vt ülalpool),
- eelmisel öhtul osoneeritud ja vastavatelt kontrolltaimedelt järgmisel hommikul ehk umbes 1,5h pärast valgusstaadiumi algust.
- eelnevalt madalas CO<sub>2</sub>-s hoitud ja vastavatelt kontrolltaimedelt vahetult kohe pärast CO<sub>2</sub> töötamise lõppu.

#### 2.5. Askorbiinhappe mõõtmine

Askorbaadi ja dehüdroaskorbaadi määramine toimus Gillespie & Ainsworthi (2007) protokollil alusel, mida on pikemalt kirjeldatud Lisas 2. AsA määramine toimub

värvusreaktsioonil, milles  $\text{Fe}^{3+}$  ja 2,2'-bipüridüüli reageerimisel tekib punane värvus, mille neelduvust mõõdetakse spektromeetriga 525 nm juures.

Askorbiinhappe määramiseks koguti ühest taimest ühe proovi tarvis vähemalt 80 mg värsket taimset materjali (lehed+leherootsud). AsA proove koguti järgmiselt:

- eelmisel öhtul osoneeritud ja vastavate kontrolltaimedelt järgmisel hommikul ehk umbes 1,5h pärast valgusstaadiumi algust.
- eelnevalt madalas  $\text{CO}_2$ -s hoitud ja vastavate kontrolltaimedelt vahetult kohe pärast  $\text{CO}_2$  töötuse lõppu.

## 2.6. Andmete analüüs

Spektromeetriga saadud  $\text{H}_2\text{O}_2$  ja AsA tulemuste esmane analüüs ja graafikute koostamine teostati programmiga Microsoft Excel. Statistiline analüüs viidi läbi programmiga STATISTICA 7.0.

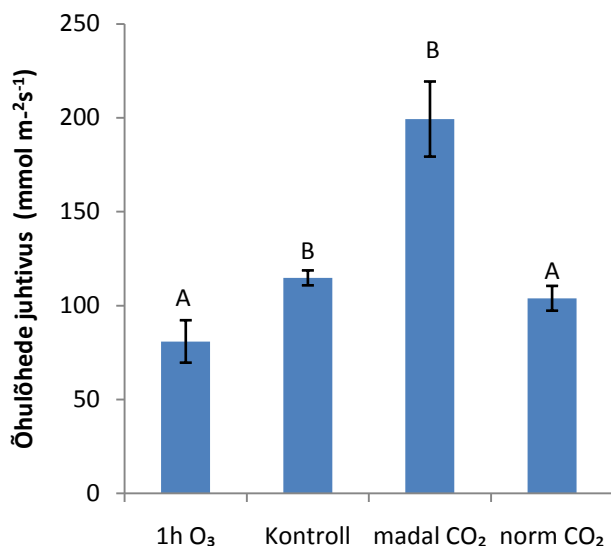
AsA katsete puhul nullproovide tulemused keskmistati ja saadud tulemused lahutati askorbaadi standardite ning proovide väärtustest. Saadud standardite väärtuste põhjal konstrueeriti regressioonsirge funktsiooniga  $y=ax+b$ , mille abil arvutati proovide kontsentratsioonid (nmol). Vastava tulemuse saamiseks märg kaalu (grammides) kohta, jagati kontsentratsioon nmol-ides vastava proovi kaaluga. Võttes arvesse askorbaadi molaarmassi (176,12 g/mol), konverteeriti saadud tulemused kujule mg 1g kohta.

$\text{H}_2\text{O}_2$  standardkõvera saamiseks lahutati standardväärtustest keskmistatud nullproovi väärtused ja saadud tulemuste põhjal koostati lineaarse sirgega ( $y=x$ ) graafik, mille abil arvutati proovide kontsentratsioon ( $\mu\text{M}$ ). Võttes arvesse värsket taimset materjali kaalu, konverteeriti tulemused kujule  $\mu\text{mol g}^{-1}$ .

### 3. TULEMUSED

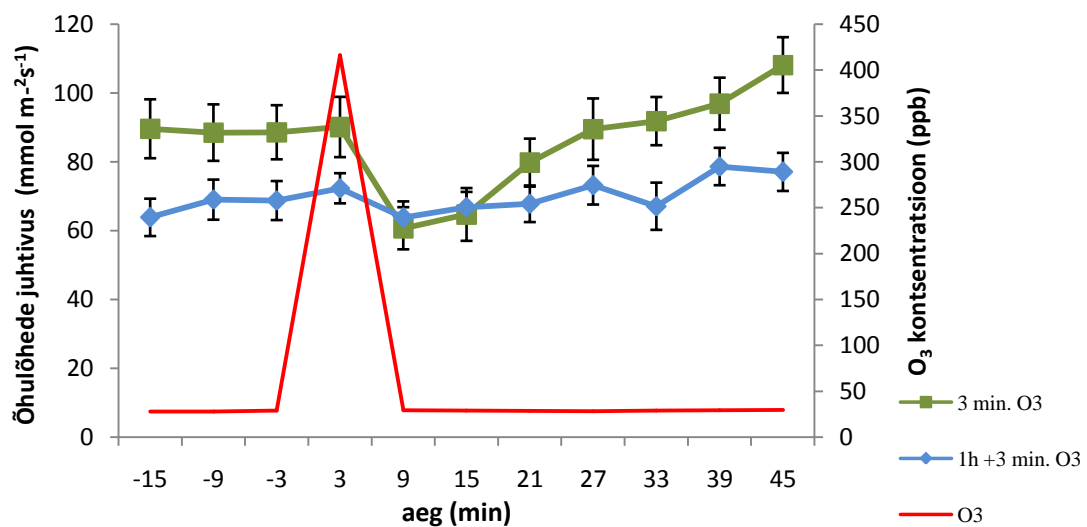
#### 3.1. O<sub>3</sub>-indutseeritud RTD olemasolu eelnevalt osoneeritud või madalas CO<sub>2</sub>-s hoitud taimedel

Tund aega kestnud osoneerimise käigus vähenes õhulõhede juhtivus võrreldes kontrolltaimedega (Joonis 9). Töödeldud taimede puhul oli osoneerimise lõpuks  $g_s$  keskmiselt ligi 30% madalam ( $p=0.013$ , ANOVA). Sarnane vahe oli märgatav ka järgmisel hommikul: eelnevalt osoneeritud taimede  $g_s$  oli võrreldes kontrolltaimedega ligi 29% madalam.



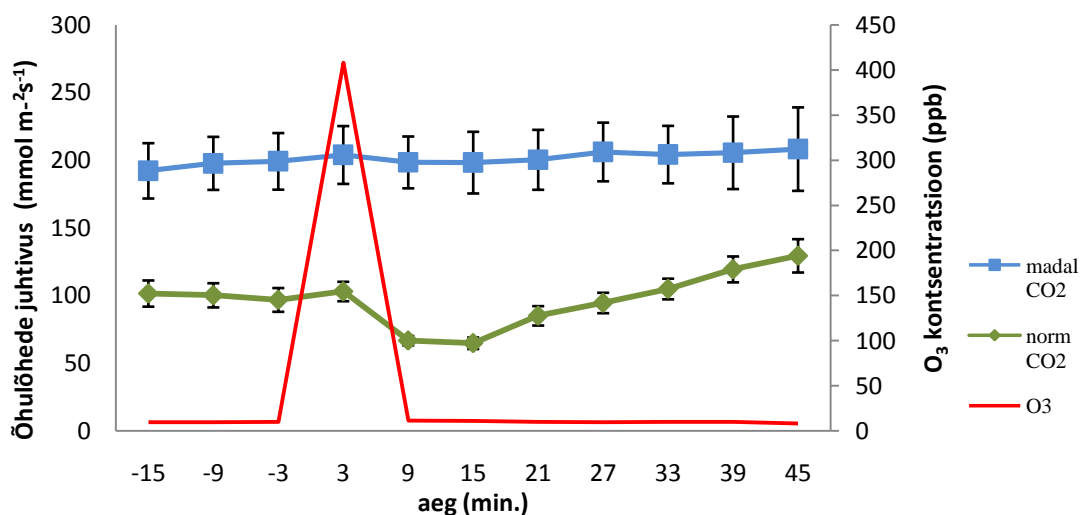
Joonis 9. *Arabidopsis thaliana* metsiktüübi Col-0 õhulõhede juhtivuste väärtused osoneeritud ja madalas CO<sub>2</sub>-s hoitud taimedel ning vastavatel kontrolltaimedel Näidatud keskmine  $\pm$  SEM. Tähed viitavad statistiliselt olulistele erinevustele ( $p<0.05$ , LSD test) ( $n=8$ )

Eelnevalt osoneerimata taimedel põhjustas 3-minutiline osoneerimine selge RTD (Joonis 10) – õhulõhede juhtivus vähenes keskmiselt 32% võrreldes osoneerimis-eelse stabiilse  $g_s$  väärtusega. Eelnevalt osoneeritud taimedel oli RTD minimaalne,  $g_s$  langes vaid 8% võrreldes töötluseelse  $g_s$ -ga.



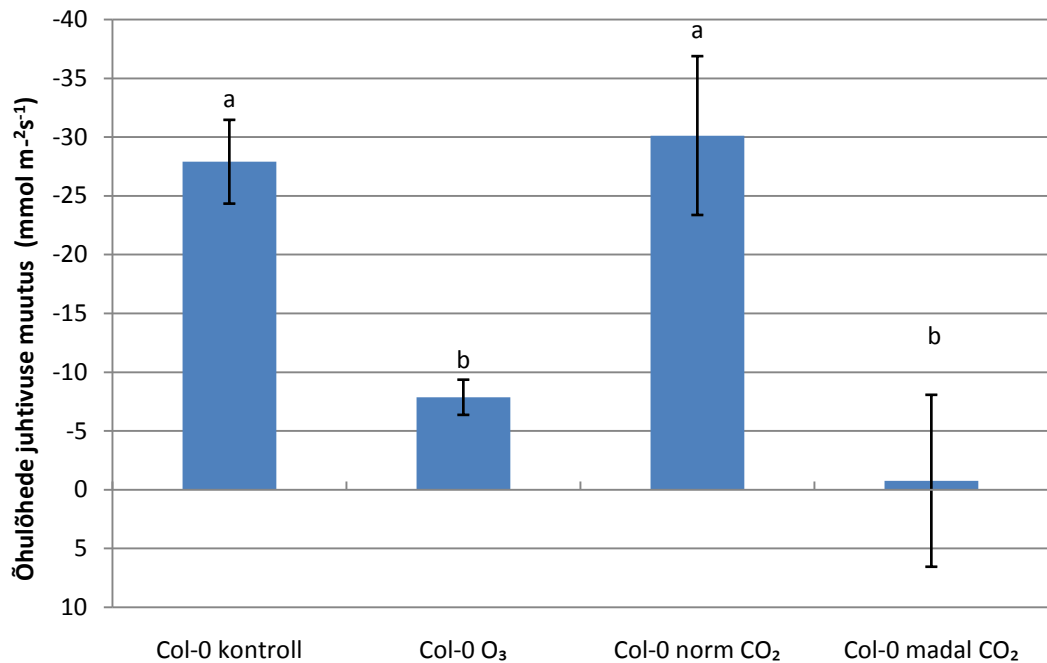
Joonis 10. Eelnevalt osoneeritud ja kontrolltaimede reageerimine 3-minutilisele O<sub>3</sub>-pulsile. Näidatud keskmine ± SEM (n=8)

Madalas CO<sub>2</sub>-s hakkasid õhulõhed kiiresti avanema, vahetult enne 3-minutilist osoneerimist oli madalas CO<sub>2</sub>-s hoitud taimedel õhulõhede juhtivus 48% kõrgem võrreldes kontrolltaimedega, mida hoiti paralleelkambrites normaalse CO<sub>2</sub> juures (Joonis 9). Madalas CO<sub>2</sub>-s hoitud taimede RTD oli minimaalne, *gs* langes 1% võrreldes töötluseelse *gs*-ga. Kontrolltaimede RTD oli tavapärane: 28% (Joonis 11).



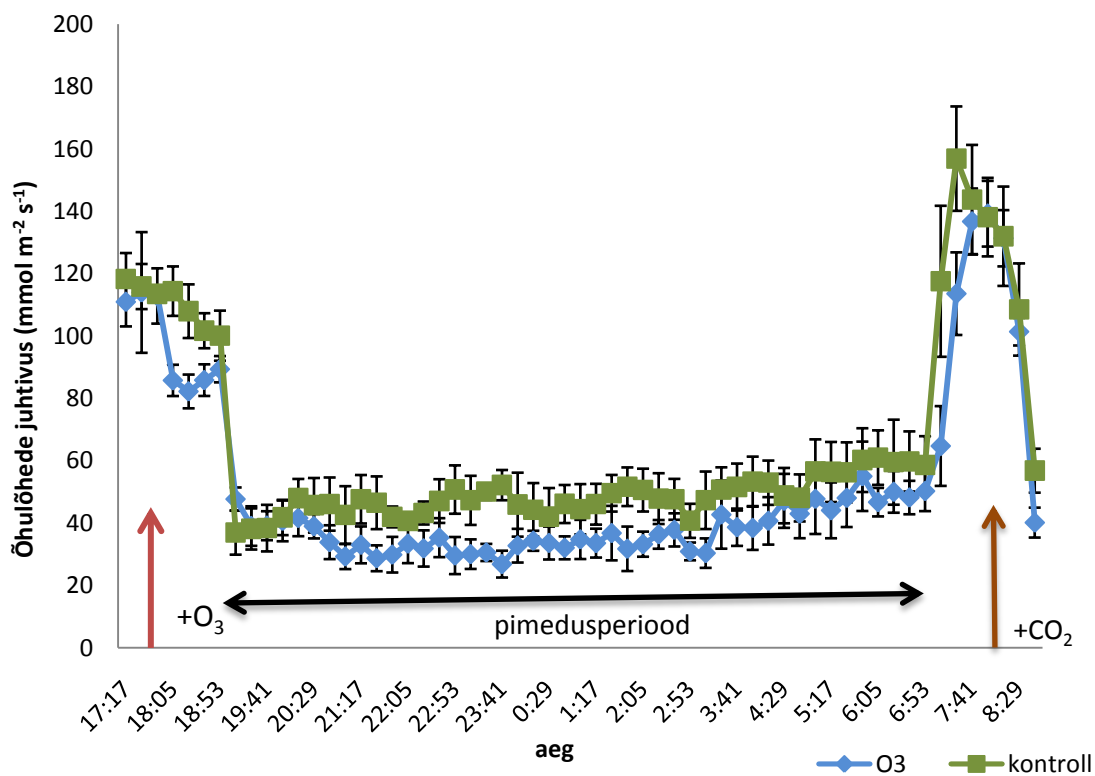
Joonis 11. *Arabidopsis thaliana* metsiktüübi reageerimine 3-minutilisele osoneerimisele madala CO<sub>2</sub> (≈50 ppm) ja normaalse CO<sub>2</sub> (≈400 ppm) tingimustes. Näidatud keskmine ± SEM (n=8).

Kokkuvõttes, madalas CO<sub>2</sub>-s hoidmine ja eelmisel õhtul toimunud 1-tunnine osoneerimine kaotasid RTD ära (Joonis 12).

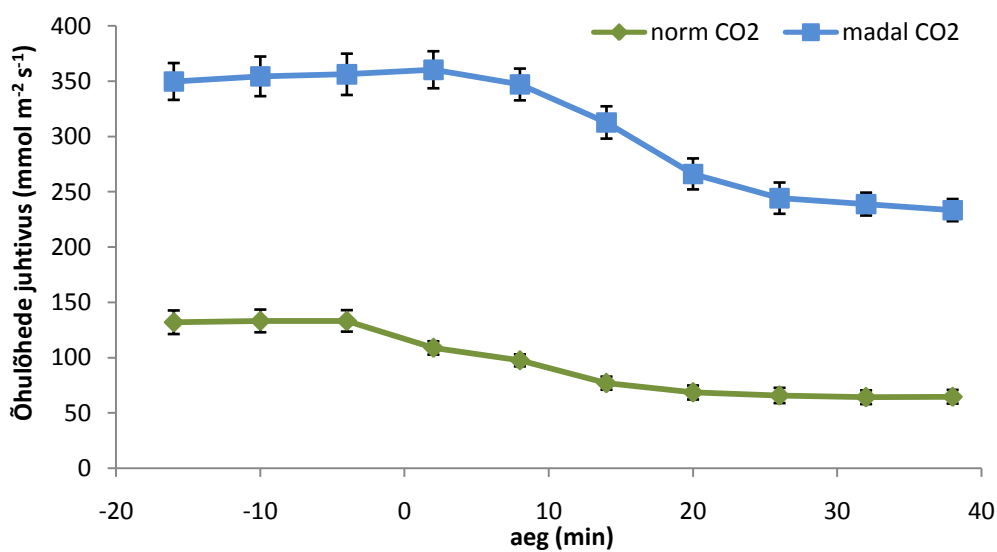


Joonis 12. Erinevate töötluste RTD ( $RTD=gs_2-gs_1$ ) väärtused. Näidatud keskmine  $\pm$  SEM. Tähed viitavad statistiliselt olulistele erinevustele ( $p<0.05$ , LSD test) ( $n=8$ )

Kuna eelnev osoneerimine ja madalas CO<sub>2</sub>-s hoidmine kaotasid RTD ära, siis tekkis küsimus, kas kadunud on ainult reaktsioon osoonile või ka teistele sulgevatele faktoritele nagu pimedus või kõrge CO<sub>2</sub>. Sellele küsimusele vastamiseks tehti lisakatseid. Selgus, et eelnevalt osoneeritud taimed olid võimelised sulguma nii öösel, pimeduse saabudes, kui ka järgmisel hommikul kõrge CO<sub>2</sub> mõjul (Joonis 13). Seega, ehkki eelnevalt osoneeritud taimede  $gs$  oli madalam, olid nad võimelised edasi sulguma ehk sulgumine ei olnud füüsiliselt takistatud ning RTD puudumine oli pigem spetsiifiline reaktsioon osoonile. Ka madalas CO<sub>2</sub>-s hoitud taimed olid suutelised pimedusele reageerima (Joonis 14).



Joonis 13. Õhulõhede juhtivuse muutus eelnevalt osoneeritud ja vastavatel kontrolltaimedel üleöö katses; pimedusperioodi kestus on näidatud noolega. Järgmisel hommikul peale valgusperioodi taastumist tehti kõrge CO<sub>2</sub> (800 ppm) töötlus. Näidatud keskmine ± SEM (n=4)



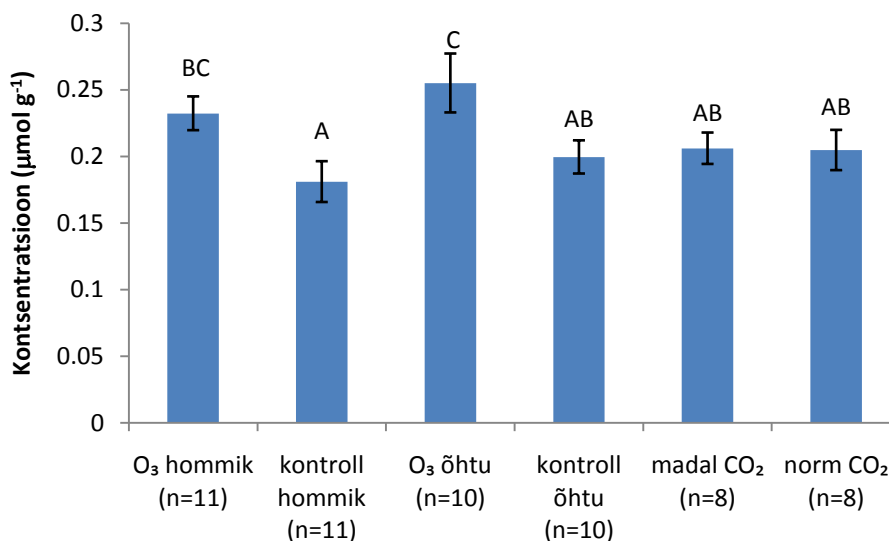
Joonis 14. Madalas CO<sub>2</sub>-s hoitud ja vastavate kontrolltaimedede õhulõhede juhtivuse reaktsioon pimedusele. Pimedust rakendati ajahetkel 0. Näidatud keskmine ± SEM (n=6).



### 3.2. Osooni ja madala süsihappegaasi mõju ROS-idele

Osonerimisega kaasnes  $H_2O_2$  kontsentratsiooni tõus: 90 minutit peale osoneerimise algust võetud proovides oli  $H_2O_2$  tase kontrolliga võrreldes 22% tõusnud (ANOVA,  $p=0.018$ ). Sarnane vahe osoneeritud ja kontrolltaimede vahel (21.6%) oli olemas ka järgmisel hommikul.

Madalas  $CO_2$ -s hoidmine  $H_2O_2$  sisaldust ei mõjutanud (Joonis 15). Kui võrrelda kontrollproove omavahel, siis õhtune  $H_2O_2$  tase oli küll võrreldes hommikusteenelõunaste proovidega pisut kõrgem, kuid need erinevused ei olnud statistiliselt olulised.

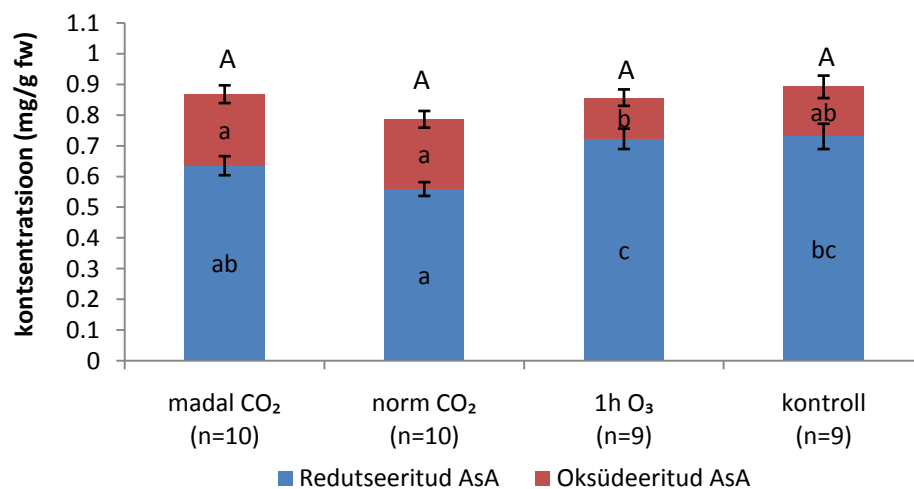


Joonis 15. Osooni ja madala süsihappegaasi mõju  $H_2O_2$  kontsentratsioonile. Näidatud keskmine  $\pm$  SEM. „Õhtu“ tähistab proove, mis on võetud 90 minutit peale osoneerimise algust. „Hommik“ tähistab järgmisel hommikult kogutud proove. Tähed viitavad statistilisel olulistele erinevustele ( $p<0.05$ , LSD test)

### 3.3. Osoneerimise mõju askorbaadile

AsA on antioksidant, mis osaleb ROS-ide detoksifitseerimises. AsA kontsentratsioone mõõdeti käesoleva töö raames osoneerimisele järgneval hommikul osoneeritud ja kontrolltaimedes ning madalas  $CO_2$ -s hoitud ja vastavates kontrolltaimedes, kuid õhtuse AsA sisalduse kohta (90 minutit peale osoneerimise

algust) andmeid pole. Kuigi osoon tekitab taimes ROS-e ning ka antud katsed tuvastasid keskmiselt 22%-lise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsioon tõusu, siis askorbaadi taset osoneerimine ei mõjutanud (Joonis 16) ning statistiliselt olulisi erinevusi töötluste vahel ei tuvastatud. See kehtib nii summaarse AsA, kui tema redutseeritud ja oksüdeeritud vormide kohta. Ka madalas CO<sub>2</sub>-s hoidmine ei mõjutanud AsA taset.



Joonis 16. Redutseeritud (AsA) ja oksüdeeritud askorbaadi (DHA) kontsentratsioonid vastavalt töötlusele. Näidatud keskmine  $\pm$  SEM. Tähed viitavad statistiliselt olulistele erinevustele ( $p < 0.05$ , LSD test). Suurtähed tähistavad statistiliselt olulisi erinevusi summaarses askorbaadi kontsentratsioonis.

Seega, käesolevas töös leiti, et eelnev 1-tunnine osoneerimine ja madalas CO<sub>2</sub>-s hoidmine kaotavad tüüpilise O<sub>3</sub>-reaktsiooni (nn RTD) ära. Ehkki osoneerimine põhjustas olulist H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsiooni tõusu lehes, ei kaasnunud sellega AsA sisalduse ega AsA redoks taseme muutusi. Madalas CO<sub>2</sub>-s hoidmine ei põhjustanud muutusi ei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ega AsA kontsentratsioonis.

#### 4. ARUTELU

Osoon kui tuntud õhusaasteaine, mille kontsentratsioon tööstuse arengu ja kliima soojenemise tõttu jätkuvalt kasvab, mõjutab negatiivselt taimede kasvu ja produktsiooni. Suvised keskpäevased O<sub>3</sub> kontsentratsioonid ületavad Euroopas regulaarselt 60 ppb taset (Klumpp jt 2006). Osooni mõju taimedele sõltub paljudest teguritest: osooni kontsentratsioonist ja osoneerimise kestvusest, taimeliigist, –sordist ja –populatsioonist (Mills jt 2011; Brosche jt 2010). Vastuseks osoonile võivad muutused taimes olla vähemärgatavad, seda just lühiajalisemate katsete puhul, kus väliseid kudede kahjustusi näha ei ole, aga muutused võivad olla toimunud valkude tegevuses, geeniekspressioonis, metabolismis või fotosünteesis (Vainonen & Kangasjärvi 2014). Osoneerimisega võivad kaasned ka nähtavad lehekahjustused, vähenenud kasv, muutused süsivesikute allokatsioonis ning, lõpptulemusena, produktsiooni langus (Musselman jt 2006). O<sub>3</sub> ja temast lähtuvate ROS-ide kahjutuks tegemises osaleb antioksidatiivne kaitsesüsteem, mille üheks olulisemaks lülis on AsA. Sellest tulenevalt on AsA-defitsiitsed mutandid väga tundlikud O<sub>3</sub> suhtes (Conklin jt 1996).

*Arabidopsis thaliana* laboratoorne tüvi Col-0 on küllaltki vastupidav osoonile: 4-tunnine osoneerimine (350 ppb) ei põhjustanud tal nähtavaid lehekahjustusi, samas kui tundlikud populatsioonid, näiteks Cvi, olid sellise osoneerimise järel tugevasti kahjustunud (Brosche jt 2010). Kuna O<sub>3</sub> siseneb lehte õhulõhede kaudu, siis O<sub>3</sub>-indutseeritud nähtavate kahjustuste rohkus korreleerus hästi õhulõhede juhtivuse ning lehte sisenenud esialgse O<sub>3</sub> doosiga (Brosche jt 2010). Käesolevas magistritöös osoneeriti Col-0 taimi 400 ppb-ga 1 tunni jooksul. See põhjustas olulist õhulõhede juhtivuse langust- osoneerimise lõpuks oli *gs* vahe võrreldes kontrolltaimedega 30%, kuid nähtavaid lehekahjustusi ei tekkinud. Seega leidis kinnitust, et Col-0 ei ole väga O<sub>3</sub>-tundlik, kuna tema õhulõhede juhtivus ei ole väga kõrge ning ta on suuteline O<sub>3</sub> mõjul õhulõhesid kiiresti sulguma.

RTD on õhulõhede kiire, kuid mööduv sulgumine, mis tekib O<sub>3</sub> kontsentratsioonidel alates 150 ppb-st, õhulõhed sulguvad umbes 40% ulatuses (Kollist jt 2007; Vahisalu jt 2010). Ka antud magistritöös esines kontrolltaimedel selge RTD, mille ulatus oli küll pisut väiksem: 28-32%. RTD on mööduv st umbes 20 minuti pärast

hakkavad õhulõhed uuesti avanema ja saavutavad 30-40 minuti pärast osoneerimis-eelse või isegi pisut kõrgema taseme (käesolev magistritöö, Kollist jt 2007, Vahisalu jt 2010, Moldau jt 2011). Õhulõhede juhtivuse taastumine viitab, et rakud ei olnud püsivalt kahjustunud, vaid *gs*-i langus ja järgnev tõus olid tingitud õhulõhede sulgrakkudes toimivate signaaliradade tööst. Vahisalu jt (2010) leidsid, et õhulõhede liikumise dünaamika RTD ajal langeb päris hästi kokku ROS-ide tootmisega sulgrakkudes: Col-0 sulgrakkudes oli ROS-ide maksimumtase saavutatud 3 minutit pärast osoneerimist, kuid järgneva 45 minuti jooksul ROS-ide tase vähenes, langes kokku õhulõhede taasavanemisega (Vahisalu jt 2010). Kui osoneerimine kestis, siis järgnes 90. minuti pärast uus, püsivam sulgumine, mis võib olla seotud rakukahjustuste tekkega (Vahisalu jt 2010). O<sub>3</sub> RTD on omane kõigile uuritud *Arabidopsis thaliana* populatsioonidele (Vahisalu jt 2010), samuti teistele liikidele (Jõesaar jt 2012), seega tegemist on evolutsioonis konserveerunud vastusega.

Võiks arutleda, et RTD möödumisel iseloom on tingitud sellest, et taime antioksidatiivsed kaitsesüsteemid talitlevad väga efektiivselt ja suudavad osoneerimisel tekkinud ROS-ide detoksifitseerida, mis võimaldab õhulõhede sulgumist indutseerivatel signaalradadel inaktiveeruda ja õhulõhedel uuesti avaneda. Kui osoneerimine on lühike, antud katsetes 3-minutiline, siis on selline *gs* taastumine taimetele hea, võimaldades normaalse fotosünteesi jätkumist. Kui aga osoneerimine on kestav, siis on see negatiivne, võimaldades suuremat O<sub>3</sub> sisenemist lehte: võiks öelda, et lehe antioksidatiivsete kaitsesüsteemide efektiivne tegutsemine teeb pikemas perspektiivis taimetele karuteene. Magistritöös selgus, et nii eelnev osoneerimine kui madalas CO<sub>2</sub>-s hoidmine kaotavad RTD ära. Samas, sulgumine teiste faktorite toimetel, milleks olid pimedus ja kõrge CO<sub>2</sub> eelnevalt osoneeritud taimede puhul ning pimedus madalas CO<sub>2</sub>-s hoitud taimede puhul, säilisid. Seega, RTD puudumise näol oli tegemist spetsiifilise reaktsiooniga osoonile, mitte teistele sulguvatele faktoritele. Osooni sisenemisel lehte ta laguneb apoplastis ja tekivad ROS-ide (Burkey jt 2006). Katsete tulemustest on näha, et 90 minutit pärast osoneerimist on lehe ROS-ide kontsentratsioon võrreldes kontrolltaimedega 22% kõrgem. Sarnane ROS-ide erinevus on näha ka järgmisel hommikul, mil vahe kontrolltaimedega oli 21,6%. Seega, antioksidatiivne kaitsesüsteem ei suutnud ka järgmiseks hommikuks tekkinud ROS-ide detoksifitseerida. Ehkki see erinevus kajastab eelkõige kogu lehe ja mitte üksnes sulgrakkude ROS-ide

erinevusi, on tõenäoline, et vastav ROS-ide tõus toimus ka eelnevalt osoneeritud taimede sulgrakkudes. Seega võiks pakkuda, et RTD puudumine eelnevalt osoneeritud taimedel on seotud sellega, et ROS-ide tase, seda nii kogu lehes kui ka sulgrakkudes, on juba niigi kõrge, vastavad sulgumist indutseerivad signaalrajad on aktiivsed ning lisaaktivatsiooni uue koguse ROS-ide lisandudes enam ei teki.

Madalas CO<sub>2</sub> hoidmine pani õhulõhed avanema, kuid, nagu öeldud, kaotas RTD ära. Kõrge CO<sub>2</sub> kutsub esile õhulõhede sulgumise ja madal CO<sub>2</sub> avanemise (Young jt 2006). Ka antud CO<sub>2</sub> katsetes on näha, et madalas CO<sub>2</sub> tõusis gs ligi kaks korda. Võib oletada, et kui fotosünteesiks vajaliku CO<sub>2</sub> kontsentratsioon on madal, hoitakse õhulõhed võimalikult lahti, et mitte takistada selle vähesegi CO<sub>2</sub> lehte sisenemist. Õhulõhede avanemine madalas CO<sub>2</sub>-s on omane kõigile taimerühmadele lükofüütidest õistaimedeni (Brodribb jt 2009). Vaatamata enam avatud õhulõhedele madalas CO<sub>2</sub>-s, mis lihtsustab O<sub>3</sub> sisenemist lehte, ei leitud madalas CO<sub>2</sub>-s hoitud taimedel kõrgemat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sisaldust pärast 3-minutilise O<sub>3</sub> pulsi andmist. See on ühtpidi ootuspärane: on näidatud, et hoopis kõrges CO<sub>2</sub>-s hoidmine tõstab H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sisaldust sulgrakkudes ning põhjustab õhulõhede sulgumist (Kolla jt 2007). Teistpidi, tsütoplasma happeliseks muutumine indutseerib H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eemaldamist (She jt 2010) ning kuna madalas CO<sub>2</sub>-s hoidmine peaks pH-d hoopis tõstma, siis võiks eeldada, et madalas CO<sub>2</sub>-s on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rohkem. Tuleb mainida, et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mõõdeti kogu lehes, kuid õhulõhede sulgumise põhjustab ikka eelkõige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> teke sulgrakkudes, nii et seda, mis juhtub madalas CO<sub>2</sub>-s sulgrakkude ROS-ide tasemega, tuleks eraldi uurida. RTD puudumist madalas CO<sub>2</sub>-s võib seletada stressihormoon ABA tasemega: kui süsihappegaasi ei ole ja fotosüntees ei toimu, siis pole ka püruvaati. Püruvaadist saadakse isopreen, temast karotenoidid ning neist omakorda sünteesitakse ABA (Xiong & Zhu 2003). Seega, madalas CO<sub>2</sub>-s pole piisavalt ABA, mistõttu ei aktiveeru anioonkanalid ning õhulõhed ei sulgu. Pimedusreaktsiooni olemasolu madalas CO<sub>2</sub>-s hoitud taimedel võib seletada sellega, et fototropiinide ja plasmamembraani H<sup>+</sup>-ATPaasi inaktiveerumise kaudu toimuv sulgrakkude turgori langus (Shimazaki jt 2007) oli funktsionaalne ka madalas CO<sub>2</sub>-s.

Antioksidatiivse kaitsesüsteemi, mille tähtis osa on ka AsA, ülesanne on teha ROS-e kahjutuks. Näiteks eksogeense AsA lisamine lahusesse, milles hoiti *Vicia faba* epidermiribasid, vähendas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsiooni sulgrakkudes ning õhulõhede sulgumist pimedas (She jt 2010). Osoneerimine tõstis selle magistritöö tulemustes ROS-

ide kontsentratsiooni ligi 22%, kuid muutusi askorbaadi tasemes erinevate töötluste vahel ei leitud. Askorbiinhappe süntees algab heksoosidest ehk fotosünteesi-produktidest ning võiks eeldada, et madalas CO<sub>2</sub>-s AsA sisaldus langeb, kuid statistiliselt olulist erinevust AsA kontsentratsioonis kontroll- ja madala CO<sub>2</sub> taimede vahel ei olnud. Suhteliselt madalad oksüdeeritud askorbaadi kontsentratsioonid kõigis töötlustes viitavad taimede heale võimele AsA redokstaseme säilitamisel.

Üks võimalus, miks AsA tasemetes olulisi erinevusi eelnevalt osoneeritud ja kontrolltaimede vahel ei leitud, võib olla tingitud taimede antioksidatiivse kaitsesüsteemi paindlikkusest ja efektiivsusest. Mitteesümaatilisel antioksidatiivsel kaitsesüsteemil, kuhu kuuluvad lisaks AsA-le ka näiteks GSH ja  $\alpha$ - tokoferool (Foyer & Noctor 2011), on tihe koostöö ensümaatilise antioksidatiivse kaitsesüsteemiga ning lõpptulemuseks on efektiivne ROS-ide regulatsioon (Foyer & Noctor 2009). Osoneerimine kestusega 2 ja 8 tundi ei mõjutanud ka *Arabidopsis* erinevate populatsioonide, sh Col-0, AsA kontsentratsiooni ja redutseerituse taset (Brosche jt 2010). Samas, eelnevalt osoneeritud taimed sisaldasid ka järgmisel hommikul rohkem ROS-e, mis viitab võimalusele, et tugeva stressifaktori kogemisel, milleks 1-tunnine osoneerimine 450 ppb-ga kindlasti on, võib taimele olla kasulikum säilitada mõneks ajaks stressisignaliseerimine, selle asemel, et kulutada antioksidatiivsete kaitsesüsteemide vahendeid ROS-ide täielikuks kõrvaldamiseks. Stressisignaliseerimise ülalhoidmine aitab näiteks õhulõhesid suletuna hoida, tagades niimoodi parema kaitse stressi võimaliku kordumise korral.

Kokkuvõttes: eelnev 1-tunnine osoneerimine ja madalas CO<sub>2</sub>-s hoidmine kaotas *Arabidopsis thaliana* metsiktüüpi taimedel ära RTD – tüüpreaktsiooni 3-minutisele osoneerimisele. Eelnev osoneerimine põhjustas ka H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsiooni tõusu nii 90 minutit pärast osoneerimise algust kui järgmisel päeval. Samas AsA sisalduses erinevusi ei olnud. Madalas CO<sub>2</sub>-s hoidmine ei mõjutanud lehe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ega AsA sisaldust võrreldes kontrolltaimedega. Sulgrakkude käitumise dünaamika paremaks seostamiseks H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ja AsA sisaldustega oleks vaja mõõta neid aineid mitte kogu lehes, vaid eelkõige sulgrakkudes ja sulgrakke ümbritsevas rakuvaheruumis.

## KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti muutusi lehtede askorbiinhappe (AsA, C vitamiin) kontsentratsioonis, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sisalduses ja õhulõhede O<sub>3</sub>-vastuses peale taimede 1-tunnist osoneerimist või madalas CO<sub>2</sub>-s hoidmist *Arabidopsis thaliana* metsiktüübi Col-0 näitel. Töö eesmärgiks oli leida seoseid õhulõhede O<sub>3</sub>-toimelise regulatsiooni, reaktiivsete hapniku ühendite tootmise ja nende detoksitseerimise vahel. Taimede gaasivahetust mõõdeti unikaalse läbivoolu põhimõttel töötava gaasivahetusaparatuuriga.

1 tund osoneerimist (400 ppb), põhjustas olulise õhulõhede juhtivuse (gs) languse- osoneerimise lõpuks oli gs vahe võrreldes kontrolltaimedega 30% ning sarnane erinevus (29%) säilis ka järgmisel hommikul enne 3-minutilise osoneerimise algust. Eelnevalt madalas CO<sub>2</sub>-s (50 ppm) hoidmine, vastupidi, avas õhulõhesid: taimede gs oli 48% kõrgem võrreldes kontrolltaimedega, mida hoiti normaalse CO<sub>2</sub> juures. Eelnevalt osoneerimata ja normaalse CO<sub>2</sub> juures hoitud taimedel (kontrolltaimedel) põhjustas 3-minutiline osoneerimine 400 ppb-ga, nn O<sub>3</sub>-pulss, õhulõhede juhtivuse kiire, kuid mööduva vähenemise (RTD). Võrreldes O<sub>3</sub>-pulsi eelse stabiilse gs väärtusega vähenes õhulõhede juhtivus kontrolltaimedel keskmiselt 28-32%. Õhulõhede juhtivuse langus RTD ajal oli mööduv, viidates, et rakud ei olnud füüsiliselt kahjustunud, vaid õhulõhede sulgumine-avanemine oli tingitud sulgrakkudes toimivate signaaliradade tööst. Eelnev 1-tunnine osoneerimine ja madalas CO<sub>2</sub>-s hoidmine kaotas taimedel RTD ära, samas sulgumine pimedas ja kõrge CO<sub>2</sub> mõjul säilisid.

Eelnev 1-tunnine osoneerimine põhjustas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsiooni tõusu lehtedes: 90 minutit peale osoneerimise algust võetud proovides oli H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tase võrreldes kontrolliga 22% tõusnud. Sarnane vahe osoneeritud ja kontrolltaimede vahel (21.6%) oli olemas ka järgmisel hommikul. Madalas CO<sub>2</sub>-s hoidmine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sisaldust ei mõjutanud.

AsA kontsentratsioone mõõdeti käesoleva töö raames eelnevalt osoneeritud ning madalas CO<sub>2</sub>-s hoitud taimede ja vastavate kontrolltaimede lehtedes. Kuigi eelnev osoneerimine tekitas taimes ROS-e, siis askorbaadi taset see ei mõjutanud, samuti ei erinenud madalas CO<sub>2</sub>-s hoitud ja vastavate kontrolltaimede AsA kontsentratsioonid.

Üks võimalus, miks AsA kontsentratsioonides olulisi erinevusi eelnevalt osoneeritud ja kontrolltaimede vahel ei leitud, võib olla tingitud taimede

antioksidatiivse kaitsesüsteemi paindlikkusest ja efektiivsusest. Kuna eelnevalt osoneeritud taimed sisaldasid ka järgmisel hommikul rohkem ROS-e, viitab see võimalusele, et tugeva stressifaktori kogemisel võib taimel olla pigem kasulikum säilitada mõneks ajaks stressisignaliseerimine, kui et kulutada antioksidatiivsete kaitsesüsteemide vahendeid ROS-ide täielikuks kõrvaldamiseks. Sulgrakkude käitumise dünaamika paremaks seostamiseks  $H_2O_2$  ja AsA sisaldustega oleks vaja mõõta neid aineid mitte kogu lehes, vaid eelkõige sulgrakkudes ja sulgrakke ümbritsevas rakuvaheruumis.



## SUMMARY

In the present study, changes in leaf ascorbic acid (AsA) concentration, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and stomatal O<sub>3</sub>-induced response after ozonating plants for 1 h or keeping them in low CO<sub>2</sub> concentration were examined using *Arabidopsis thaliana* wild-type Col-0. The study aimed to find correlations between stomatal O<sub>3</sub>-induced regulation, reactive oxygen species production and their detoxification. Plant gas exchange was measured using unique flow-through gas exchange device.

Ozonation for 1h (400 ppb) resulted in decreased stomatal conductance (*g<sub>s</sub>*): the *g<sub>s</sub>* of ozonated plants was 30% reduced compared to control plants after ozonation and this difference (29%) persisted the next morning, when 3-min O<sub>3</sub>-pulse was given. Keeping plants in low CO<sub>2</sub> concentration (50 ppm), on the contrary, had a positive effect on *g<sub>s</sub>*: compared to plants kept in ambient CO<sub>2</sub>, the *g<sub>s</sub>* of low CO<sub>2</sub> kept plants was 48% higher.

In control plants that were not previously ozonated and were kept in ambient CO<sub>2</sub>, ozonation with 400 ppb for 3 min (O<sub>3</sub>-pulse) resulted in a rapid but transient decrease in *g<sub>s</sub>* (RTD). Compared to the pre-treatment *g<sub>s</sub>* values, *g<sub>s</sub>* decreased 28-32% after O<sub>3</sub>-pulse was given. As the decrease in *g<sub>s</sub>* during RTD was transient, cells were not physically damaged, but stomatal closure and opening were caused by guard cell signaling pathways. However, previous 1h ozonation and keeping plants in low CO<sub>2</sub> concentration resulted in no RTD after O<sub>3</sub>-pulse, whereas the closure responses to elevated CO<sub>2</sub> and darkness persisted.

Previous 1-hour ozonation induced a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> burst in leaves: 90 min after the ozone treatment started, the ozonated plants had 22% higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration than control plants. A similar difference in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration (21,6%) between the ozonated and control plants persisted the next morning. Keeping plants in low CO<sub>2</sub> did not affect H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration.

Ascorbate concentrations were measured in the leaves of previously ozonated and low CO<sub>2</sub> kept plants and the corresponding control plants (Although previous ozonation resulted in ROS production in the leaves, it did not affect AsA concentrations. Furthermore, no significant difference in AsA concentration was detected between plants kept in low CO<sub>2</sub> and the corresponding control plants. One reason for no differences between AsA concentrations in previously ozonated and control plants,

might be due to the flexibility and efficiency of plant antioxidant defense system. As previously ozonated plants contained more ROS also in the next morning, it is possible that, when experiencing a strong stress factor, it is more beneficial to maintain stress signaling for a while and not to spend antioxidant resource capacity to ensure complete elimination of ROS. To better understand the correlations between AsA concentration, ROS production and guard cell behavior, AsA and ROS should be measured in the guard cells and surrounding apoplast, not in the whole leaves.

## TÄNUAVALDUSED

Soovin kogu südamest tänada oma töö juhendajat Ebe Merilot suure abi ja kannatlikkuse eest ning Pirko Jalakat, kes õpetas ja juhendas mind katsete läbiviimisel. Suured tänud Kristiina Laanemetsale ja Agnes Alevile heade näpunäidete eest ning Marge Thetloffile, kes oli abivalmilt nõus vastama vormistamist puudutavatele küsimustele. Tänuõnad ka töökaaslastele mõistva suhtumise ja vastutulelikkuse eest.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Arrigoni, O., De Tullio, MC. 2001. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta* 1569: 1-9

Brodribb, TJ., McAdam, SA., Jordan, GJ., Feild, TS. 2009. Evolution of stomatal responsiveness to CO<sub>2</sub> and optimization of water-use efficiency among land plants. *New Phytol.* Aug;183(3):839-47

Brosché, M., Merilo, E., Mayer, F., Pechter, P., Puzõrjova, I., Brader, G., Kangasjärvi, J., Kollist, H. 2010. Natural variation in ozone sensitivity among *Arabidopsis thaliana* accessions and its relation to stomatal conductance. *Plant Cell Environ.* Jun;33(6):914-25

Burkey, KO., Neufeld, HS., Souza, L., Chappelka, AH., Davison, AW. 2006. Seasonal profiles of leaf ascorbic acid content and redox state in ozone-sensitive wildflowers. *Environ Pollut.* 2006 Oct;143(3):427-34.

Chen, Z., Young, TE., Ling, J., Chang, S-C., Gallie, DR. 2003. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 3525–3530.

Chen, Z., Gallie DR. 2004. The Ascorbic Acid Redox State Controls Guard Cell Signaling and Stomatal Movement. *The Plant Cell*, Vol. 16, 1143–1162

Chen, Z., and Gallie, D.R. 2005. Increasing Tolerance to Ozone by Elevating Foliar Ascorbic Acid Confers Greater Protection against Ozone Than Increasing Avoidance. *Plant Physiology*, July 2005, Vol. 138, pp. 1673–1689

Conklin, PL., Pallanca, JE., Last, RL., Smirnoff, N. 1997. L-Ascorbic Acid Metabolism in the Ascorbate-Deficient *Arabidopsis* Mutant *vtc1*'. *Plant Physiol.* 115: 1277-1285

Conklin, PL., Williams, EH., Last, RL. 1996. Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. Proc Natl Acad Sci USA. Sep 3;93(18):9970-4.

Davey, MW., Van Montagu, M., Inze, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, IJJ., Strain, JJ., Favell, D., Fletcher, J. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. Journal of the Science of Food and Agriculture 80: 825-860

Foyer, CH., Noctor, G., 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. Antioxid Redox Signal. Apr;11(4):861-905.

Foyer, CH., Noctor, G. 2011. Ascorbate and glutathione : the heart of the redox hub. Plant Physiology 155, 2-18

Gallie, DR. 2012. L-Ascorbic Acid: A Multifunctional Molecule Supporting Plant Growth and Development. Hindawi Publishing Corporation Scientifica, Article ID 795964, 24 pages

Gallie, DR. 2013. The role of l-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. Journal of Experimental Botany, Vol. 64, No. 2, pp. 433–443

Gillespie, KM., Ainsworth, EA. 2007. Measurement of reduced, oxidized and total ascorbate content in plants. Nat Protoc. 2007;2(4):871-4.

Gomes, MMA., Lagôa, AMMA., Medina, CL., Machado, EC., Machado, MA. 2004. Interactions between leaf water potential, stomatal conductance and abscisic acid content of orange trees submitted to drought stress. Braz. J. Plant Physiol. vol.16, n.3, pp. 155-161.

Grimmer, MK; John Foulkes, M., Paveley, ND. 2012. Foliar pathogenesis and plant water relations: a review. *J Exp Bot.* Jul;63(12):4321-31

Hetherington, AM., Woodward, FI. 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 424: 901–908.

Imai, T., Ban, Y., Terakami, S., Yamamoto, T., Moriguchi, T. 2009. L-Ascorbate biosynthesis in peach: cloning of six L-galactose pathway-related genes and their expression during peach fruit development. *Physiologia Plantarum* 136: 139–149

Jasechko, S., Sharp, ZD., Gibson, JJ., Birks, SJ., Yi, Y., Fawcett, PJ. 2013. Terrestrial water fluxes dominated by transpiration. *Nature* 496, 347–350

Jimenez, A., Hernandez, JA., Del Rio, LA., Sevilla, F. 1997. Evidence for the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves. *Plant Physiology*, vol. 114, no. 1, pp. 275–284, 1997.

Jõesaar, I., Ehonen, S., Merilo, E., Kangasjärvi, J & Kollist, H. 2012. Stomatal responses in various species. In: *Scandinavian Plant Physiology Society 7th PhD Student Conference: The 7th SPPS PhD Student Conference*; Laulasmaa, Estonia; 12-15 Sept 2012; pp. 19

Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Vergne, P., Sifakis, N., Sanz, M. J., Rasmussen, S., Ro-Poulsen, H., Ribas, A., Peñuelas, J., Kambezidis, H., He, S., Garrec, J. P., Calatayud, V. 2006. Ozone pollution and ozone biomonitoring in European cities Part II. Ozone-induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. *Atmosphere Environment* 40: 7437–7448

Kolla, VA., Vavasseur, A., Raghavendra, AS., 2007. Hydrogen peroxide production is an early event during bicarbonate induced stomatal closure in abaxial epidermis of *Arabidopsis*. *Planta*. May;225(6):1421-9.

Kollist, T., Moldau, H., Rasulov, B., Oja, V., Rämna, 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

Kollist, H., Moldau, H. & Vahisalu, T. 2010. Taimede osoonitaluvusest õhulõhede regulatsioonimehhanismideni. EV teaduspreemiad, Eesti Teaduste Akadeemia Kirjastus, Tallinn, p122-134.

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. USA*. 106, 21419-24.

McAinsh, MR., Evans, NH., Montgomery, LT., North, KA. 2001. Calcium signalling in stomatal responses to pollutants. *New Phytologist*. 153: 441–447

Merilo, E., Laanemets, K., Hu, H., Xue, S., Jakobson, L., Tulva, I., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, PL., Schroeder, JI., Broschè, M., Kollist, H. 2013. PYR/RCAR receptors contribute to ozone-, reduced air humidity-, darkness-, and CO<sub>2</sub>-induced stomatal regulation. *Plant Physiol*. Jul;162(3):1652-68

Mills, G., Pleijel, H., Braun, S., Büker, P., Bermejo, V., Calvo, E., Danielsson, H., Emberson, L., González Fernández, I., Grünhage, L., Harmens, H., Hayes, F., Karlsson, P.-E., Simpson, D. 2011. New stomatal flux-based critical levels for ozone effects on vegetation. *Atmospheric Environment* 45: 5064-5068.

Moldau, H. 1998. Hierarchy of ozone scavenging reactions in the plant cell wall. *Physiologia Plantarum*, 104(4), 617 - 622.

Moldau, H., Vahisalu, T., Kollist, H. 2011. Rapid stomatal closure triggered by a short ozone pulse is followed by reopening to overshooting values. *Plant Signaling & Behavior*, 6(2), 311 - 313.

- Musselman, RC., Lefohn, AS., Massman, WJ., Heath, RL., 2006. A critical review and analysis of the use of exposure and flux-based ozone indices for predicting vegetation effects. *Atmos. Environ.*, 40, 1869-1888.
- Roelfsema, MR., Hedrich, R. 2005. In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytologist* 167(3):665-691.
- Saruhan, N., Terzi, R., Saglam, A., Kadioglu, A. 2009. The Relationship between Leaf Rolling and Ascorbate-Glutathione Cycle Enzymes in Apoplastic and Symplastic Areas of *Ctenanthe setosa* Subjected to Drought Stress. *Biol Res.* 42(3):315-26.
- Sharma, P., Jha, AB., Dubey, RS., Pessarakli, M. 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, Vol 2012, Article ID 217037, 26 pages
- She, XP., Huang, AX., Li, J., Han, XZ. 2010. Inhibition of dark-induced stomatal closure by fusicoccin involves a removal of hydrogen peroxide in guard cells of *Vicia faba*. *Physiologia Plantarum* 140, 258–268.
- Shimazaki, K., Doy, M, Assmann, SM., Kinoshita, T. 2007. Light regulation of stomatal movement. *Annu Rev Plant Biol* 58: 219–247
- Smirnoff, N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* 78: 661-669
- Smirnoff, N., Wheeler, GL. 2000. Ascorbic acid in plants: Biosynthesis and function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 19: 267-290
- Stone, I. 1972. The natural history of ascorbic acid in the evolution of the mammals and primates and its significance for present-day man. *Journal Orthomolecular Psychiatry* IINOS 2 & 3:82-89



Zhang, W., Lorence, A., Gruszewski, HA., Chevone, BI., Nessler, CL. 2009. AMR1, an *Arabidopsis* Gene That Coordinately and Negatively Regulates the Mannose/L-Galactose Ascorbic Acid Biosynthetic Pathway. *Plant Physiology*, Vol. 150, pp. 942–950

Teng, N., Wang, J., Chen, T., Wu, X., Wang, Y., Lin, J. 2006. Elevated CO<sub>2</sub> induces physiological, biochemical and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 172: 92–103

Torsethaugen, G., Pell, EJ., Assmann, SM. 1999. Ozone inhibits guard cell K<sup>+</sup> channels implicated in stomatal opening. *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **96**: 13577-13582

Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, YF., Nishimura, N., Chan, WY., Valerio, G., Lamminmäki, A., Brosché, M., Moldau, H., Desikan, R., Schroeder, JI., Kangasjärvi, J. 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, YS., Lindgren, O., Salojärvi, J., Loog, M., Kangasjärvi, J., Kollist, H. 2010. Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *The Plant Journal*. 62, 442–453

Vainonen, JP., Kangasjärvi, J. 2014. Plant signalling in acute ozone exposure. *Plant, Cell & Environment*

Vavasseur, A., Raghavendra, AS. 2004. Guard cell metabolism and CO<sub>2</sub> sensing. *New Phytologist*. 165: 665–682

Webb, AAR., McAinsh, MR., Mansfield, TA., Hetherington, AM. 1996. Carbon dioxide induces increases in guard cell cytosolic free calcium. *Plant Journal* 9: 297–304.

Wheeler, GL., Jones, MA and Smirnoff, N. 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393: 365-369

Xiong, L., Zhu, JK. 2003. Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology*; 133:29-36.

Young, JJ., Mehta, S., Israelsson, M., Godoski, J., Grill, E., Schroeder, JI. 2006. CO<sub>2</sub> signaling in guard cells: calcium sensitivity response modulation, a Ca<sup>2+</sup>-independent phase, and CO<sub>2</sub> insensitivity of the *gca2* mutant. *Proc Natl Acad Sci USA*. May 9;103(19):7506-11

Internetileheküljed:

The Arabidopsis Information Resource

[<http://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp>], 03.03.2014

Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit

[<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/A22188>], 27.04.2014

## LISAD

### LISA 1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mõõtmine Amplex red meetodiga

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mõõtmiseks kasutati Amplex Red meetodit (reagent 10-atsetüül-3,7-dihüdroküfenoksasiin), mida on täpsemalt kirjeldatud leheküljel (<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/A22188>). Antud protokoll oli kohandatud siinse labori tingimustele.

1. Taimne materjal (~100 mg) koguti tuubidesse, mille põhjas olid 2 mm läbimõõduga SiO<sub>3</sub> kuulikesed ning külmutati vedelas lämmastikus.
2. Proovid purustati Silmat S6-ga ning H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ekstraheerimiseks lisati proovidele 500 µl 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,2)
3. Proovid tsentrifugeeriti 4°C juures 15 minutit kiirusel 16 000g
4. Värvilahuse valmistamiseks segati kokku 4,85 ml 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 µl 10 U/ml HRP-d (mädarõika peroksidaas) ja 50 µl 10mM Aplex Red-i.
5. Valmistati H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standardid (0-75 µM) 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lahusest ja 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> puhvrast.
6. Mikroplaadile pipeteeriti kolmes korduses 50 µl standardlahuseid ning proove. Proovidele lisati 50 µl värvilahust.
7. Fooliumiga kaetud mikroplaati inkubeeriti toatemperatuuril 30 minutit ning seejärel määrati neelduvus 525 nm juures Multiscan FC spektromeetriga

## LISA 2 Askorbiinhappe mõõtmine

Askorbaadi ja dehüdroaskorbaadi määramisel kasutati Gillespie ja Ainsworth(2007) protokoll, mis oli kohandatud siinse labori tingimustele.

1. Askorbaadi standard (0,075–5 mM) valmistati 10mM askorbaadi lahusest ja 6% -lisest trikloroetaanhapest ehk TCA-st.
2. Taimne materjal koguti 1,5 ml tuubidesse, mille põhjas olid 2mm läbimõõduga  $\text{SiO}_3$ -st kuulikesed. Proovidele Lisati 1ml 6%-st TCA-d
3. Proovid purustati masinaga Silmat S6 ning tsentrifugeeriti 5 minutit 4°C juures kiirusel 16 000g.
4. Tühjadesse 1,5 ml tuubidesse lisati 50  $\mu\text{l}$  75 mM fosfaatpuhtrit. Fosfaatpuhtrile lisati 100  $\mu\text{l}$  kas 6%-list TCA-d (nullproovidesse), 0,075-5 mM standardlahuseid standardite jaoks või 100  $\mu\text{l}$  proove, vastavalt markeeringuga proovitopsidesse. Summaarse askorbaadi tuubidesse lisatakse 50  $\mu\text{l}$  10 mM ditiotreitooli ehk DDT-d ning lastakse 10 minutit toatemperatuuril seista. Liigse DDT eemaldamiseks lisatakse 50  $\mu\text{l}$  0,5%-list N-etüülmaleimiidi ehk NEM-i.
5. Sama mahu saamiseks lisatakse kõikidesse redutseeritud askorbaadi tuubidesse kompensatsiooniks 100  $\mu\text{l}$  vett.
6. Kõikidesse tuubidesse pipeteeritakse 250  $\mu\text{l}$  10%-list TCA-d, 200  $\mu\text{l}$  43%-list  $\text{H}_3\text{PO}_4$ -a, 200  $\mu\text{l}$  4 %-list 2,2'-bipüridüüli ning 100  $\mu\text{l}$  3 %-list  $\text{FeCl}_3$ -e. Pärast  $\text{FeCl}_3$  lisamist raputati kinniseid tuube, et vältida sademe tekkimist.
7. Proove inkubeeriti 37°C juures 1h ning seejärel mõõdeti neelduvust 525 nm juures Multiscan FC spektromeetriga.

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

Mina, Keili Ojaste

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Õhulõhede kiire, kuid ajutine sulgumine osoneerimisel ning selle seos ROS-ide produktsiooni ja askorbaadi kontsentratsiooniga *Arabidopsis thaliana* lehtedes“,

mille juhendajad on Ebe Merilo 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, **26.05.2014**