Tartu Ülikool
Loodus- ja täppisteaduste valdkond
Ökoloogia ja Maateaduste instituut
Botaanika osakond

Lota Marie Aaliste

LEHTEDE FLUKTUEERIV ASÜMMEETRIA KUI KAUDNE MORFOLOOGILINE MEETOD TAIMEDE STRESSI HINDAMISEKS

Bakalaureusetöö
12 EAP
Bioloogia ja elustiku kaitse eriala

Juhendaja: PhD Eele Õunapuu-Pikas

Tartu 2022

Lehtede fluktueeriv asümmeetria kui kaudne morfologiline meetod taimede stressi hindamiseks

Lehtede fluktueeriv asümmeetria (FA), ehk väikesed juhuslikud kõrvalekalded perfektsest bilateraalsest sümmeetriast, on levinud meetod keskkonnastressi hindamiseks taimedel. Käesoleva bakalaureusetöö käigus uuriti, kuidas suurenenud õhu- ja mullaniiskus mõjus FAHM (*Free Air Humidity Manipulation)* katsealal arukase (*Betula pendula* Roth) ja hübriidhaava (*Populus* × *wettsteinii* Hämet-Ahti) lehtede fluktueerivale asümmeetriale. FA taseme hindamiseks korjati lehti nii kontroll- kui ka suurendatud mulla- ja õhuniiskusega katseringidest ning mõõdeti parema ja vasaku lehepoole laiust lehe kõige laiemas punktis. Ehkki suurenenud õhu- ja mullaniiskus tekitavad taimedele teatavat kasvustressi, siis fluktueerivas asümmeetrias see ei väljendunud. Siiski esines FA puhul liikide vaheline erinevus ning samuti oli FA seotud lehepindala ja lehelaba maksimaalse laiusega.

Märksõnad: fluktueeriv asümmeetria, taimede stress, mullaniiskus, õhuniiskus, FAHM, arukask, hübriidhaab

CERCS kood: B310 Soontaimede füsioloogia

Leaf fluctuating asymmetry as an indirect method for assessing plant stress

Fluctuating asymmetry (FA), a common method for assessing the effects of environmental stress on plants, describes small random deviations from perfect bilateral symmetry in leaves. This bachelor thesis studied the effects of increased soil moisture and air humidity on the fluctuating asymmetry of silver birch (*Betula pendula* Roth.) and hybrid aspen (*Populus* × *wettsteinii* Hämet-Ahti) growing at the FAHM (Free Air Humidity Manipulation) experimental site. To assess the changes in FA, leaves were sampled from three types of experimental plots (increased soil moisture, increased air humidity and reference plots) and the distance from the midrib to the left and right margin was measured at the widest point of the leaf blade. Although increased soil moisture and air humidity have proved to be sources of environmental stress for the trees, they did not exhibit any effect on FA. However, there was a difference in FA between species and a correlation between FA and leaf blade maximum width and FA and leaf area.

Keywords: leaf fluctuating asymmetry, plant stress, soil moisture, air humidity, FAHM, silver birch, hybrid aspen

CERCS code: B310 Physiology of vascular plants

SISUKORD

1. Sissejuhatus *5*

1.1. Fluktueeriv asümmeetria **6**

1.2. Fluktueeriv asümmeetria ja erinevad stressorid **8**

1.2.1. Herbivooria 9

1.2.2. (Õhu)reostus 10

1.2.3. Valguse hulk 12

1.2.4. Toitainete ja vee hulk 13

1.2.5. Temperatuur 13

1.2.6. Geneetiline stress 14

1.3. FA mõõtmise meetodid **14**

1.4. Suurenenud õhuniiskus ja kliimamuutus **18**

1.5. Bakalaureusetöö eesmärk **19**

2. Metoodika *20*

2.1. Prooviala kirjeldus **20**

2.2 Andmete kogumise metoodika **21**

2.3. Andmeanalüüs **22**

3. Tulemused *23*

4. Arutelu *27*

5. Kokkuvõte *31*

6. Summary *32*

Kasutatud kirjandus *33*

1. SISSEJUHATUS

Kõikide elusorganismide puhul võib vaadelda mingil määral esinevat sümmeetriat. Näiteks inimestel esineb bilateraalne sümmeetria ehk parem ja vasak kehapool on teineteise peegelpildid. Kerakujulistel bakteritel esineb radiaalkiireline sümmeetria, mille puhul sümmeetriatelgi on lõpmatu arv. Seega võib pidada kõrvalekaldeid tavapärasest sümmeetriast märgiks stressist, millega organism on pidanud arengu jooksul toime tulema (Graham *et al.*, 2010). Samuti võib erinevusi sümmeetrias põhjustada ka arenguline ebastabiilsus (ingl. *developmental instability*), mis tuleneb nii organismivälisest keskkonnastressist kui ka organismisisesest arengumürast (ingl. *developmental noise*) (Hochwender & Fritz, 1998). Arengulise ebastabiilsuse üheks põhjuseks on energia puudus, kuna muidu stabiilsele kasvamisele ja vigade likvideerimisele kuluv energia, näiteks kasvuhormoonide ja erinevate ensüümide taseme regulatsioon, suunatakse nüüd stressiga toimetulemisele (Koehn & Bayne, 1989; Leung *et al.*, 2000; Sommer, 1996).

Taimed kohanevad stressiga üldiselt hästi, st nende fenotüüp võimaldab neil nii lühi- kui pikaajalise stressiga toime tulla, muutes muuhulgas kloroplastide aktiivsust, lehtede suurust ja paksust jne. Nii-öelda negatiivne stress avaldub taimele alles siis, kui tema taluvuslävi on ületatud ja ta ei suuda enam oma ressursside põhjal ebasoodsat olukorda kompenseerida (Lichtenthaler, 1995). Madala stressiga keskkondades on taimed võimelised juhuslikke kõrvalekaldeid arengu jooksul korrigeerima (Hódar, 2002).

Taimestressi saab kategoriseerida erinevate omaduste järgi, näiteks abiootiline ja biootiline stress, pikaajaline ja lühiajaline stress. Abiootilise stressi alla kuuluvad muutused vee ja päikesevalguse hulgas, liigne soolsus, reostus ja raskemetallid mullas, ebasobilik temperatuur jne. Biootilise stressi all mõeldakse putukherbivooriat, erinevaid viiruste ja seente poolt põhjustatud haiguseid jne. Taimede stressi hindamiseks uuritakse erinevaid tunnuseid, sealhulgas kasvukiirus, maapealne ja -alune biomass ja nende omavaheline suhe, pungade suurus, lisaks veel erinevad füsioloogilised parameetrid nagu veesisaldus, sekundaarne metabolism, fotosünteesi efektiivsus, erinevate ainete sisaldus taimes ja lehtedes jne. (Larcher, 2003)

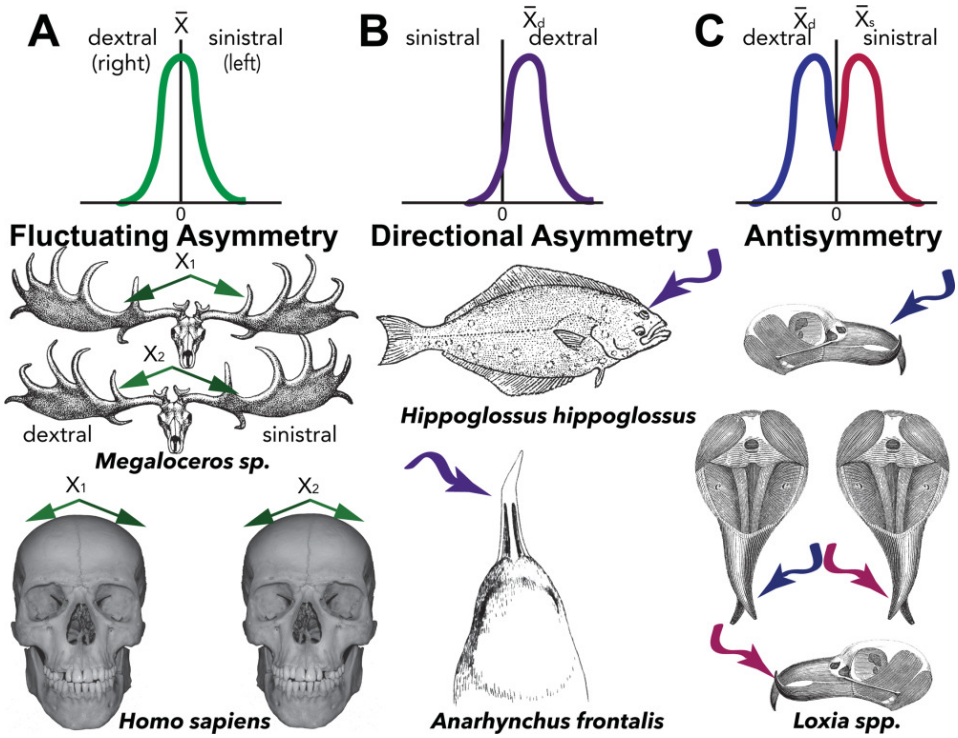
1.1. Fluktueeriv asümmeetria

Lehtede fluktueeriva asümmeetria (FA) tähendab väikeseid juhuslikke kõrvalekaldeid lehe perfektsest bilateraalsest sümmeetriast, mis tavaliselt tekivad ebasobilike keskkonnatingimuste tagajärjel. FA-d kasutatakse nii geneetilise kui keskkonnastressi mõju hindamiseks taimedel. Taimelehtedel esineb bilateraalne sümmeetria, mille puhul leht jagatakse keskroo ehk sümmeetriatelje abil vasakuks ja paremaks pooleks. Ideaalsel juhul peaksid mõlemad lehe pooled olema sümmeetrilised, kuna samad geenid kodeerivad paremat ja vasakut poolt, kuid varases arengujärgus olevale taimele stressi tekitavad geneetilised- ja keskkonnafaktorid põhjustavad väikeseid erinevusi lehe parema ja vasaku poole vahel. Stress väljendub fluktueeriva asümmeetriana, kuna taime füsioloogia muutub, sealhulgas väheneb taime võime neutraliseerida arengumüra, või vastupidiselt arengumüra suureneb, kuna taim peab arenedes samal ajal stressiga toime tulema (Hochwender & Fritz, 1998). Vähem stressirohkes keskkonnas kasvavatel taimedel esineb kasvukeskkonna ebastabiilsust kogedes suurem FA taseme kõikumine kui taimedel, mis kasvavad pideva stressiga keskkonnas (Hódar, 2002).

Siiski ei pruugi pikaajaline stress tingimata fluktueeriva asümmeetriana väljenduda, kuna aja jooksul taim harjub ja hakkab kõrvalekaldeid likvideerima. Sümmeetria on kahe lehepoole vahel reguleeritud ning vastav sünkroonsus paraneb aja jooksul. Seevastu lühiajaline stress võib jätta endast suurema jälje (Freeman *et al.,* 2002). Samuti ei tähenda kõrgem FA tase alati, et taim on stressis. Ka lühiajalised häiringud, mille mõju aja möödudes lõpuks kaob, võivad fluktueerivas asümmeetrias kajastuda (Hochwender & Fritz, 1998). Seega sõltub FA tuvastamine sellest, millisel ajahetkel mõõtmisi tehakse.

Fluktueeriv asümmeetria on üks elusorganismidel esinev asümmeetria vorm lisaks suunalisele asümmeetriale ja antisümmeetriale (Palmer & Strobeck, 1986). Asümmeetria hindamiseks kasutatakse bilateraalse tunnuse vasaku ja parema poole vaheliste erinevuste dispersiooni ning jaotust. Fluktueeriva asümmeetria puhul peavad erinevused moodustama normaaljaotuse, suunalise asümmeetria ja antisümmeetria puhul erineb erinevuse keskväärtus nullist või moodustab bimodaalse kõvera (joonis 1). Suunalise asümmeetria puhul on terve liigi ulatuses kõikidel isenditel teatud tunnus koondunud ühele poole ja antisümmeetria puhul esineb kalduvus kas paremale või vasakule poolele. Nii suunaline asümmeetria kui ka antisümmeetria on geneetiliselt kontrollitud nähtused, seega ei saa neid pidada märgiks stressist (Alves-Silva *et al.,* 2018; Graham *et al.*, 2010). Ehkki suunaline asümmeetria ja antisümmeetria

ei ole taimede puhul nii laialt levinud kui fluktueeriv asümmeetria, peab siiski stressist tuleneva FA uurimise puhul kontrollima, et mõõdetud tulemused ei näitaks suunalist asümmeetriat ega antisümmeetriat.



Joonis 1. Erinevad asümmeetria tüübid: A) fluktueeriv asümmeetria B) suunaline asümmeetria C) antisümmeetria. Allikas: Compagnucci et al. (2014).

Fluktueeriv asümmeetria võib ka aja jooksul teiseks asümmeetria tüübiks üle minna või nendega seguneda (Lens *et al.,* 2001). Lisaks on täheldatud, et nii antisümmeetria kui ka suunaline sümmeetria võivad samuti stressi kajastada: Venâncio, Alves-Silva & Santos (2016a) leidsid, et varjus kasvavatel taimedel esines fluktueeriva asümmeetria asemel antisümmeetria. Kuna varjulises keskkonnas kasvanud lehed olid 5% asümmeetrilisemad, kui nende valguse käes kasvavad osapooled, võib oletada, et varjuline keskkond oli nende jaoks stressirohkem ja siinkohal kajastas ka antisümmeetria keskkonnastressi. Antisümmeetria võidakse tuvastada faasis, kus taim kasvab intensiivse stressi tõttu ebalineaarselt (Graham, Freeman & Emlen, 1993). Samuti on vaieldud, et kuna lehed on oma fenotüübis nii plastilised, kasvõi selleks, et saavutada maksimaalne päikesevalguse neeldumine, siis polegi neil ideaalset keskmist sümmeetriat, mille poole püüelda. See aga ei välista stressi poolt põhjustatud asümmeetria suurenemist (Black-Samuelsson & Andersson, 2003).

Fluktueeriva asümmeetria uurimise eesmärk on teada saada, kas taimed kannatavad stressi käes või on nad võimelised vastavalt keskkonnatingimustele kohanema. FA kasutamine taimede stressi uurimiseks on levinud meetod (Cornelissen & Stiling, 2005; Cornelissen & Stiling, 2011; Mendes *et al.,* 2018; Cuevas-Reyes *et al.,* 2018; Freeman, Graham & Emlen, 1993; Graham, Freeman & Emlen, 1993; Ivanov *et al.,* 2015; Sandner & Matthies, 2017; Zvereva *et al.,* 1997; Telhado *et al.,* 2010; Venâncio, Alves-Silva & Santos, 2016; Venâncio, Alves-Silva & Santos, 2016a), kuna ei nõua spetsiifilist tehnikat ja mõõtmiste läbiviimine on tänu tehnoloogia arengule võrdlemisi lihtne, kiire ja odav.

1.2. Fluktueeriv asümmeetria ja erinevad stressorid

Mitmed uuringud on leidnud seose antropogeense keskkonnasaaste ja kõrgenenud FA taseme vahel. Sinna alla kuuluvad nii suurenenud pestitsiidide ja raskemetallide hulk mullas, suurenenud süsinikdioksiidi tase kui ka muu õhureostus (Cuevas-Reyes *et al.,* 2018; Freeman, Graham & Emlen, 1993; Graham, Freeman & Emlen, 1993; Ivanov *et al.,* 2015; Mendes *et al.,* 2018; Turmukhametova & Shadrina, 2020) Samuti mõjutavad FA-d negatiivselt ka suurenenud herbivooride hulk, liigne päikesevalgus ja soolsus, veepuudus jne (Black-Samuelsson & Andersson, 2003; Cuevas-Reyes *et al.,* 2013; Cornelissen & Stiling, 2005; Cornelissen & Stiling, 2011; Hódar, 2002; Mendes *et al.,* 2018; Venâncio, Alves-Silva & Santos, 2016a). Taimede reaktsioon nendele teguritele annab aimu, kui hästi taimed tulevikus kliimamuutusest tulenevate tingimustega toime tulevad ning mida peaks tegema, et keskkonna saastatust vähendada.

Fluktueeriv asümmeetria ei ole alati põhjustatud antropogeensete faktorite poolt, vaid ka loodusliku kasvukeskkonna poolt, mille üle pole inimestel mingit kontrolli, nt millisel kõrgusel merepinnast taim kasvab (Hagen *et al.,* 2007; Wilsey *et al.,* 1998). Samuti, mida rohkem taime levila piiride poole liikuda, seda rohkem suureneb fluktueeriv asümmeetria (Hódar, 2002). Taim võib olla antud kasvukohas mitte kõige sobivamate keskkonnatingimuste tõttu stressis, kuid sessiilse eluvormina ei saa ta ebasoodsate tingimuste eest põgeneda. Küll aga näitab stressi tõttu suurenenud FA tase liigile sobiliku levila piire, mida saab arvesse võtta looduskaitselistes töödes.

1.2.1. Herbivooria

Herbivooria (eelkõige putukherbivooria) ja taimelehtede fluktueeriva asümmeetria vahelise seose osas on leitud vastakaid tulemusi. Nendevaheline seos võib seisneda suurenenud FA tasemega lehtede vastuvõtlikkuses herbivooride rünnakutele või hoopis herbivooria põhjustatud stressist, mis väljendub suurenenud fluktueeriva asümmeetriana. Samuti on leitud, et herbivooria ja fluktueeriv asümmeetria ei ole omavahel seotud.

Abiootilise stressi all kannatavatel taimedel võib esineda rohkem herbivooriat tänu suurenenud lämmastikuühendite hulgale taimes, kaitsemehhanismide jaoks tähtsate ainete vähenemisele ja toit- ning keemiliste ainete omavahelise suhte muutuse tõttu. On täheldatud, et putukad eelistavad süüa suurema lämmastikusisaldusega taimelehti. Mitmed uuringud (Cornelissen & Stiling, 2005; Cornelissen & Stiling, 2011; Mendes *et al.,* 2018) on leidnud seose erinevate abiootiliste stressorite, nagu soolastress ja õhusaaste, fluktueeriva asümmeetria ja herbivooria vahel. Abiootiline stress põhjustas nende uuringute põhjal nii putukatele sobivate toitainete kui ka lämmastiku sisalduse suurenemist, võrreldes kontrollaladel kasvavate taimedega, mille tõttu suurenes putukarünnakute osakaal. Sealhulgas täheldati, et putukad valivad söömiseks suurema FA-ga lehti. Seega võib öelda, et kõrgem FA tase põhjustab suuremat herbivooriat.

Samas on aga mitmed uuringud leidnud, et hoopis herbivooria on taimedele biootilise stressi allikaks ning põhjustab suuremat FA-d, mitte fluktueeriv asümmeetria ei ole herbivooride rünnakute suurenemise eelduseks (Sandner & Matthies, 2017; Zvereva *et al.,* 1997; Telhado *et al.,* 2010; Venâncio, Alves-Silva & Santos, 2016). Herbivooria ja FA vaheline positiivne seos – järeldus, milleni on mitmed senimaani läbiviidud uuringud jõudnud – võib tuleneda asjaolust, et lehti on mõõdetud peale herbivooride toitumist. Seega puudub võrdlusmoment, milline oli taime fluktueeriva asümmeetria tase enne herbivooride rünnakut. Näiteks Zvereva *et al.* (1997) uuringus mõõdeti lehtede FA-d samas populatsioonis 1992. aastal ja seejärel aastatel 1994-1996, mil esines laiaulatuslik lehti sööva kahjuri levik. Tulemusena leiti, et intensiivne putukarünnak põhjustas FA taseme tõusu, mitte vastupidi. Sama nähtuse uurimiseks kasutati ka eksperimentaalset lähenemist, näidates seega, et kasvuhoones heades tingimustes kasvanud kontrollgrupil puudus võimalus eelnevaks FA taseme suurenemiseks (Venâncio, Alves-Silva & Santos, 2016), millest võis järeldada, et putukatel puudus FA taseme suhtes eelistus.

Fluktueeriva asümmeetria ja herbivooria vahelise seoseni võib olla ekslikult jõutud ning seos võib seisneda hoopis putukate eelistuses erinevate lehes sisalduvate ainete suhtes. Lempa *et al.* (2000) leidsid, et lehes sisalduv glükoosi, sukroosi, tanniinide ja fenoolhappe tase oli tugevalt seotud lehe fluktueeriva asümmeetria tasemega. Kusjuures FA ja teatud keemiliste ühendite vaheline seos varieerus ajas, olles lehe kasvu algus- või lõpuperioodil tugevam. Sellest tulenevalt võib aga järeldada, et fluktueeriv asümmeetria ei pruugi tingimata (herbivooriast tulenevast) stressist põhjustatud olla, kuna antud ained ei osale taime stressivastuses, vaid on tavapärased taime lehtede koostise osad. Kui FA ja erinevate keemiliste ühendite vaheline seos on liigispetsiifiline, võib see vastavalt sellele, millised ained kõrgemat FA taset soosivad, fluktueerivat asümmeetriat mõjutada nii positiivselt kui ka negatiivselt.

Samuti peaksid biootilise stressorina ka erinevate putukate tekitatud pahad taimelehtedel ja puukoorel taimedes stressi tekitama, ent Alves-Silva (2012) ei leidnud, et putukate poolt tekitatud lehepahad oleksid fluktueeriva asümmeetria suurenemise näol taimele negatiivset mõju avaldanud. FA oli lehtede puhul, kus esines pahkasid, küll kergelt suurem, kuid mitte piisavalt, et see oleks statistiliselt oluline olnud. Samuti ei leitud ka, et kõrgem fluktueeriv asümmeetria suurendaks pahkasid moodustavate putukate rünnakuid (Cornelissen & Stiling, 2011). See võib jällegi tuleneda taime evolutsioonilistest kohastumusest antud kahjuriga toimetulemisel. Stress, mis avaldub teatud tunnustes põlvkondade jooksul, ei pruugi aja möödudes enam FA taset suurendada. Ka Cornelissen & Stiling (2005) ei leidnud, et suurem fluktueeriv asümmeetria lehepahkasid tekitavaid putukaid mõjutaks ja seletas seda antud putukate võimega manipuleerida lehe omadusi vastavalt oma vajadustele. Sellest võib järeldada, et fluktueeriv asümmeetria ei pruugi olla usaldusväärne meetod taimede stressi tuvastamiseks kõikide stressorite puhul.

1.2.2. (Õhu)reostus

Cuevas-Reyes *et al.* (2013) uurisid inimasustuse ja sellest tulenevalt suurenenud herbivooria mõju maavitsaliste perekonda kuuluva *Solanum lycocarpum*'i A. St. Hil. fluktueerivale asümmeetriale. Võrreldes liikide loodusliku kasvukeskkonnaga kujutab linnastumine endast drastilist muutust ning linnades kasvavate taimede abiootilised ja biootilised keskkonnatingimused on algsest levilast väga erinevad. Kõrge FA tase näitab, et tihe inimasustus ja sellest tulenev õhu- ja keskkonnareostus vähendavad taimele sobivat levilat antud piirkonnas (Cuevas-Reyes *et al.,* 2013; Turmukhametova & Shadrina, 2020). Lisaks

inimasustuse gradiendil paiknemise ilmselgele mõjule fluktueerivale asümmeetriale, tulenevad FA taseme erinevused ka indiviidide erinevast genotüübist ja mikrokeskkonnast sõltuvalt fenotüübi plastilisusest, kuna stressi all oleva taime genotüüp ei suuda enam ühesugust fenotüüpi produtseerida (Møller & Swaddle, 1997; Telhado *et al.,* 2010).

Taime reaktsioon õhureostusele sõltub ka konkreetsest asurkonnast. Kui populatsioon on ajalooliselt tiheda inimasustusega aladel kasvanud, siis tekib populatsioonisiseselt asukohale omastele stressoritele suurem vastupidavus ja antud stressor ei pruugi enam taimedele nii suurt negatiivset mõju avaldada ja seega ka fluktueeriva asümmeetria taset tugevalt mõjutada. Sellist efekti on nähtud just tugeva reostusega aladel, nagu töötuspiirkonnad ja tehaste ümbrus, kus on ainult kõige vastupidavamad isendid alles jäänud (Zverev & Kozlov, 2020; Zvereva *et al.,* 1997; Veličković & Perisic, 2006). Samuti võivad ka mõned liigid tänu oma plastilisele genotüübile olla teatud stressoritele vastupidavamad kui teised (Zvereva *et al.,* 1997; Wuytack *et al.,* 2011). Keskkonnasaaste suurendab organismide geneetilist variatsiooni, mille läbi saab stress kohastumise protsesse kiirendada (Hoffmann & Parsons, 1997).

Kaligarič *et al.* (2008) leidsid aga, et kõrgem CO_2 tase toob endaga kaasa fluktueeriva asümmeetria vähenemise. See võib tuleneda asjaolust, et suurem süsiniku kättesaadavus mõjub taime kasvule positiivselt. Ühtlasi on täheldatud, et suurem CO_2 sisaldus õhus vähendab ka taime lehtede lämmastikusisaldust (Cornelissen *et al.,* 2003; Kaligarič *et al.,* 2008), mis omakorda võib vähendada ka herbivooriast tingitud stressi taimele, kuna putukad eelistavad süüa kõrgema lämmastikusisaldusega lehti (Lempa *et al.,* 2000). Samuti tuvastati ka väiksem transpiratsioon, kuna õhulõhesid esines pindala kohta vähem ning need olid ka vähem aega avatud. Sellest tulenev suurem veesisaldus taimes võib samuti fluktueerivat asümmeetriat vähendada (Kaligarič *et al.,* 2008). Antud artiklis uuriti taimi loodusliku CO_2 allika läheduses, mis olid ilmselt mitme põlvkonna jooksul kõrgema süsinikdioksiidi tasemega kohastunud. Ent antropogeense õhusaaste puhul ei tõuse mitte ainult CO_2, vaid ka muude ühendite hulk õhus, mis koos võivad taimedele siiski stressi tekitada ja kasvukeskkonna tingimusi halvemaks muuta.

Kozlov *et al.* (1996) ei leidnud, et kõrgem fluoritase keskkonnas oleks üldiselt, lisaks vääveldioksiidi mõjule, arukase (*Betula pendula* Roth) fluktueerivat asümmeetriat veel tõstnud. Ka suurem kontsentratsioon saasteaineid ei tõstnud FA taset märkimisväärselt. Seega järeldati, et (õhu)reostuse puhul võib peamiseks stressoriks olla vääveldioksiid (SO_2). Samas võib raskemetallidest ja teistest saasteainetest tulenev kahjulik mõju taimele FA-na mitte väljenduda.

1.2.3. Valguse hulk

Valguse suhtes tundlikel taimedel põhjustab liigne/vähene valguse hulk samuti fluktueeriva asümmeetria suurenemist. Varjus kasvavad lehed sisaldavad rohkem lämmastikku ja vett ning vähem süsinikupõhiseid sekundaarseid metaboliite, seega on neil ka väiksem keemiline vastupanuvõime erinevatele kahjuritele ja haigustele (Miljkovic *et al.,* 2018). Sellest tulenevalt võib esineda rohkem herbivooriat, mis omakorda võib suurendada fluktueerivat asümmeetriat. Seega võib valguse hulk ka kaudselt põhjustada FA taseme tõusu. Rohkema päikesevalguse neelamiseks suurendab taim tavaliselt oma lehepindala, mille kasv võib olla vastavalt päikesevalguse kättesaadavusele asümmeetriline (Black-Samuelsson & Andersson, 2003).

Alves-Silva (2012) kohaselt oli varjus kasvavate taimede fluktueeriv asümmeetria 25% kõrgem, kui taimedel, mis said rohkem päikest. Kuna uuritud liik *Miconia fallax* (sugukond *Melastomataceae*) eelistab kasvamiseks avatud maastikke, on antud tulemus igati mõistetav. Samasugusele järeldusele jõudsid ka Venâncio, Alves-Silva & Santos (2016a). Lisaks võib lehtede FA tase indiviidisiseselt valguse hulga tõttu varieeruda, kuna võra seespool paiknevad lehed saavad vähem valgust. 90% fluktueeriva asümmeetria variatsioonist esineb ühe isendi siseselt (Kozlov, Zverev & Zvereva, 2018; de Sibio & Rossi, 2012). Seega ei tähenda kõrgem FA tase automaatselt, et taim on stressis, vaid selle kinnitamiseks tuleks ühelt taimelt korjata lehti erinevatelt positsioonidelt ja teha järeldus nende keskmise põhjal.

Lisaks valguse otsesele positiivsele mõjule, esineb sümmeetrilisematel lehtedel ka suurem fotosünteesivõime (Xu, Hu & Zhang, 2011). See aga käib vastu Kozlov, Zverev & Sandneri (2019) leitule, mille kohaselt fotosüntees on efektiivsem just suurema asümmeetriaga lehtedes. Viimane seostub ka Cornelissen & Stiling (2005) avastustega, mille kohaselt kõrgema FA tasemega taime lehed sisaldasid rohkem lämmastikku ning kõrgema lämmastikusisaldusega lehed on üldiselt paremad fotosünteesijad (Evans, 1989; Jin *et al.,* 2014; Wright *et al.,* 2004). Kui muidu peetakse suurema fluktueeriva asümmeetriaga lehti kui vähem kvaliteetseteks, siis antud järeldus, mille kohaselt suurem FA tähendab paremat fotosünteesivõimet, tähendab, et vähem sümmeetrilised lehed mängivad taime kui tervikliku organismi siseselt olulist rolli. Eelmainitud artikli (Kozlov, Zverev & Sandner, 2019) autorid oletasid, et suurem FA ja fotosünteesi tase võivad teoorias olla ka põhjustatud kolmanda välise stressori, näiteks herbivooria poolt. Lisaks herbivooria ja fluktueeriva asümmeetria vahelisele positiivsele seosele

on ka leitud, et herbivooriast tulenev vähenenud lehepindala kompenseeritakse efektiivsema fotosünteesiga (Delaney *et al.,* 2008).

1.2.4. Toitainete ja vee hulk

Toitainete puudusest tulenev stress ei kajastu fluktueeriva asümmeetriana, ehkki esinevad muud vastavad märgid, nagu aeglane kasvukiirus, varajane lehtede närbumine, väiksem taime biomass kui ka lehe suurus. Ehkki lehe keskmine absoluutne asümmeetria on „näljas" taimede puhul suurem, ei esine peale FA korrigeerimist lehe suuruse suhtes erinevate toitainete hulgaga gruppide vahel statistilist erinevust. (Black-Samuelsson & Andersson, 2003)

Ent toitainete küllus ning sellest tulenev kiirem kasvutempo suurendavad arengulise ebastabiilsuse läbi juhuslike vigade tekkimise tõenäosust, mis väljendub fluktueeriva asümmeetriana. Samuti on ka leitud, et suurem lämmastikusisaldus mullas põhjustab fenoolühendite ja tanniini kontsentratsiooni vähenemist taimes (Lappalainen *et al.,* 2000). Kuna antud ained mängivad rolli putukarünnakute tõrjumisel (Lempa *et al.,* 2000), võib toitainete ülekküllus ka kaudselt põhjustada FA taseme suurenemist.

Vee hulgale reageerib taim vastavalt sellele, millises keskkonnas ta kasvab. Kui taime tavapärane keskkond on kuiv, ei avalda veepuudus taimele kohest olulist mõju. Kui taim on aga kasvanud ja arenenud niiskemas keskkonnas, avaldub veepuudusest tingitud stress ka fluktueeriva asümmeetriana (Hódar, 2002). See kattub Lens *et al.* (2001) väitega, et stressirohkes keskkonnas on fluktueeriv asümmeetria parem kohastumise näitaja kui stabiilses keskkonnas.

1.2.5. Temperatuur

Mida kõrgem temperatuur, seda madalam on fluktueeriva asümmeetria tase. Samuti, mida külmem on temperatuur, seda suurem on FA tase (Zverev & Kozlov, 2020; Xu, Hu & Zhang, 2011). See kehtib eeldusel, et ei teki põuastressi ja kõrgema temperatuuriga kaasneb ka piisaval hulgal sademeid, mis võimaldavad taimel edukalt kasvada. Samas väga heades tingimustes võib fluktueeriva asümmeetria tase tänu kiirele kasvutempole ajutiselt suureneda (Lempa *et al.,* 2000).

1.2.6. Geneetiline stress

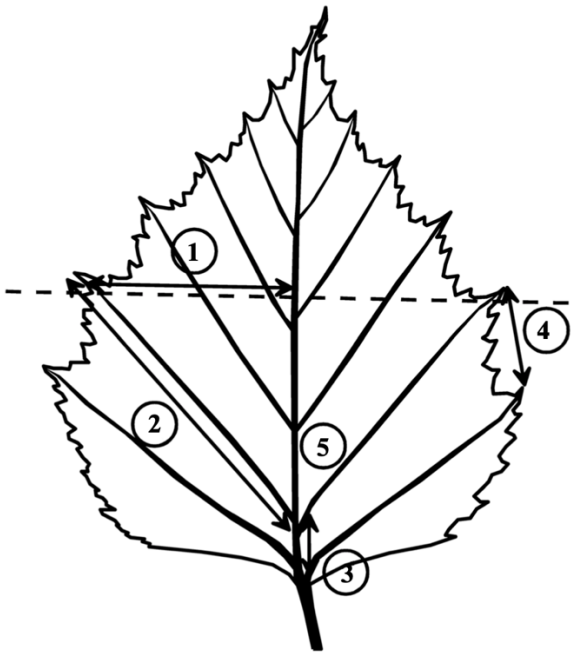
Teoorias peaks hübridisatsioon fluktueerivale asümmeetriale tänu arengu stabiliseerimisele positiivselt mõjuma. Hübridisatsioonist tulenev heterosügootsus suurendab taime ensüümide aktiivsusvahemikku ja taime biokeemilist efektiivsust. Teisalt on hübridisatsioon taimedele geneetilise stressi allikaks, kuna arengu stabiilsus on saavutatud läbi evolutsiooniliste kohastumuste, mida hübridisatsioon koadapteerunud geenikomplekse lõhkudes häiriks (Hochwender & Fritz, 1998). Koadapteerunud geenikomplekside lõhkumise tagajärjena on taime tavapärased füsioloogilised protsessid häiritud (Freeman, Graham & Emlen, 1993). FA taseme muutus hübridisatsiooni tagajärjena näitab, kui geneetiliselt lähedaselt on vanemliigid omavahel seotud (Wilsey *et al.,* 1998). Kui FA tase langeb, suureneb heterosügootide osakaal populatsioonis ja seeläbi geneetiline stress väheneb (Freeman, Graham & Emlen, 1993).

Mitu uuringut on leidnud, et hübridisatsioon mõjub FA tasemele negatiivselt, st hübridisatsioonist tulenevas geneetilises stressis mängib olulisemat rolli koadaptiivsete geenikomplekside lõhkumine kui heterosügootsus. Geneetiline tasakaal nihkub sellisel juhul paigast. Ainult liikide puhul, mis on ajalooliselt ja evolutsiooniliselt kaua koos eksisteerinud ning on oma genoomi poolest sarnased, võiks hübridiseerumisel heterosügootsus domineerida (Hochwender & Fritz, 1998; Wilsey *et al.,* 1998). Lisaks on sama perekonna liigid sarnased oma võime poolest stressirohketes olukordades negatiivseid mõjusid kompenseerida, seega oleks looduslikul valikul tulevikus piiratud võimalused arengulise stabiilsuse säilitamiseks (Wilsey *et al.,* 1998).

1.3. FA mõõtmise meetodid

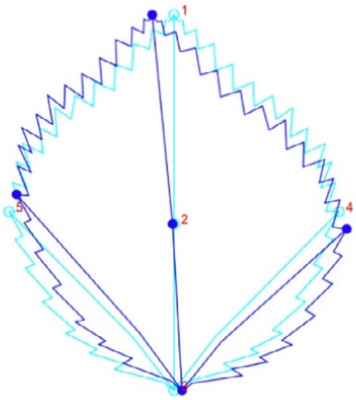
Fluktueeriva asümmeetria mõõtmisel taimelehtedel võib uuritavateks tunnusteks võtta nii lehelaba parema ja vasaku poole laiuse ning nende pindala, esimese ja teise külgroo basaalsete otsade kauguse teineteisest, keskroo ja esimese külgroo vahelise nurga, keskroo ja teise külgroo vahelise nurga, esimese külgroo pikkuse, teise külgroo pikkuse, esimese ja teise külgroo distaalsete otsade kauguse teineteisest jne (Joonis 2, Ivanov *et al.,* 2015, Erofeeva & Yakimov, 2020). Vastakuti asetsevate lehtede või liitlehtede puhul võib võrrelda ka leherootsu ja lehelaba pikkust (Miljokovic *et al.,* 2018). Mitme tunnuse mõõtmine FA uurimisel suurendab tõenäosust leida stressi väljendumist FA-na (Leung *et al.,* 2000). Lisaks ei pea erinevate tunnuste fluktueeriv asümmeetria ühe lehe siseselt üksteisega positiivselt seotud

olema, vaid nende FA tase võib lehesiseselt erineda (Lens *et al.*, 2001). Samuti võivad ühe puu raames erinevad lehed stressorile erinevalt reageerida (Veličković & Savić, 2012).



Joonis 2: Erinevad tunnused fluktueeriva asümmeetria mõõtmisel: 1) lehepoole laius keskroo keskpunktis 2) teise külgroo pikkus 3) esimese ja teise külgroo basaalsete otsade kaugus teineteisest 4) esimese ja teise külgroo distaalsete otsade kaugus teineteisest 5) keskroo ja teise külgroo omavaheline nurk. Allikas: Ivanov et al. (2015).

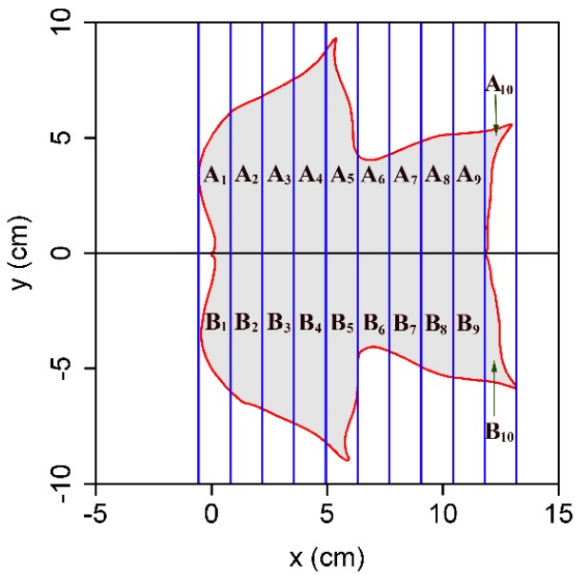
Kõige levinum tunnus, mida taimede FA uurimisel kasutatakse, on lehelaba parema ja vasaku poole laius lehelaba poole kõrguse juures või lehelaba kõige laiemas punktis (Black-Samuelsson & Andersson, 2003; Kozlov *et al.*, 2017; Sandner *et al.*, 2019; Sandner & Matthies, 2017). On uuritud ka, kas orientiiride kasutamine suudab FA-d täpsemini tuvastada. Sandner *et al.* (2019) uuringus kasutati orientiiridena keskroo alguspunkti, esimeste külgroode lõpp-punkte, lehetippu ja lehe keskpunkti lähedal asuva kuuenda külgroo alguspunkti (Joonis 3), millest tuletatud umbkaudse lehe kuju põhjal on asümmeetria paremini nähtav. Leiti, et orientiiride kasutamisel saadud lehe kujus väljendus FA tõepoolest kõige paremini, kusjuures ka lehtedel, mille puhul lehepoolte laiuse FA ja esimeste külgroode FA asümmeetriat ei tuvastanud (Sandner et al. 2019). Samuti on kasutatud FA liitindeksit (ingl. *FA integrated index*), mille puhul on mõõdetud mitme tunnuse fluktueerivat asümmeetriat ning seejärel saadud FA tasemed üheks liidetud (Lens *et al.*, 2001; Leung *et al.*, 2000).



Joonis 3: Orientiiride põhjal tuletatud umbkaudne lehe kuju fluktueeriva asümmeetria uurimisel. Allikas: Sandner et al. (2019).

Lisaks on kasutusele tulnud veel standardiseeritud indeksi (ingl. *Standardized Index)* ehk SI meetod, mis mõõdab fluktueerivat asümmeetriat, kasutades lehelaba pindala. Leht jaotatakse keskroodu järgides kaheks ning lehepooled omakorda pikuti mitmeks ribaks, kusjuures suurema arvu ribade puhul on FA paremini tuvastatavam. Seejärel mõõdetakse saadud tükkide pindala ja võrreldakse parema ja vasaku poole vastavate osade pindala (Joonis 4). Mida väiksem on SI, seda suurem on lehe bilateraalne sümmeetria. SI meetodit saab kasutada ka omavahel suuruse poolest erinevate lehtedega taimede fluktueeriva asümmeetria võrdlemisel, kuna erinevalt teistest meetoditest puudub sellel seos suurusega. (Shi *et al.*, 2018, Yu *et al.*, 2019)

Harilikult uuritakse fluktueeriva asümmeetria taseme muutust seoses ühe kindla stressoriga, kuid see võib olla eksitav, kuna taimede looduslikus keskkonnas mõjutavad taime mitu faktorit korraga. Seega on eeldatav, et taimede FA tase on tihedalt seotud mitme stressoriga, isegi kui uuritakse ainult ühe faktori mõju. Mitme faktori koos mõjumise uurimine peaks aitama fluktueerivat asümmeetriat ja selle tagamaid paremini tuvastada. (Leung *et al.*, 2000)



Joonis 4: SI meetod fluktueeriva asümmeetria uurimisel. Leht on jagatud vasakuks (A) ja paremaks (B) pooleks ning need omakorda väiksemateks ribadeks, mille pindala omavahel võrreldakse. Allikas: Shi et al. (2018).

Samuti peab FA uurimisel arvestama faktiga, et indiviidisisene fluktueeriva asümmeetria kõikumine võib moodustada suure osa leitud FA-st (de Sibio & Rossi, 2012). Kuna taimed on (teatud määral) modulaarsed, siis mõjutab lehe morfoloogiat ka konkreetse lehe mikrokeskkond (Kozlov, Zverev & Sandner, 2019). Võra välimisel piiril paiknevad lehed kogevad rohkem külma/soojust, UV-kiirgust ja herbivooriat ning vesi aurustub välimistelt lehtedelt kiiremini (Cowart & Graham, 1999). Samuti on puuvõra keskpaiga lähedal kasvavad lehed sümmeetrilisemad kui need, mis kasvavad puu alumises ja ülemises osas (Bagchi *et al.*, 1989). Seda arvesse võttes on võimalik indiviide omavahel võrrelda, kui lehed korjatakse puu erinevatest osadest või vastupidiselt, kõikidel puudel korjatakse lehed samast kohast (Cowart & Graham, 1999).

Lisaks tuleks arvestada ka mõõtmisvigadega, mida FA uurimisel sageli esineb. Nagu Kozlov *et al.* (2017) oma töös demonstreerisid, esines FA mõõtmisel 24% saadud tulemustest mõõtmisviga. Erinevused tulenesid muuhulgas leheserva kujust, mõõtja kogemusest ja lehe värskusest. Mõõtmiste korratavus oli ainult 7,4% (Kozlov, 2015). Kuna fluktueeriva asümmeetria puhul on mõõdetavad suurused väga väikesed, tuleb kindlaks teha, et saadud tulemused kajastavad ikka FA-d, mitte mõõtmisviga. Selleks tuleks teatud arv lehti mõõta mitu korda (Graham, 2021; Lens *et al.*, 2001) ning kasutada andmeanalüüsil erinevaid mudeleid,

mis tuvastavad mõõtmisvea suuruse (Lens *et al.,* 2001; Palmer & Strobeck, 1986). Mõõtmisviga peaks olema statistiliselt oluliselt väiksem FA väärtustest, et kindel olla, et mõõdetud on ikka fluktueerivat asümmeetriat.

1.4. Suurenenud õhuniiskus ja kliimamuutus

Kliimamuutuse tagajärjena on Eestis oodata suuremat sademete hulka ning ka kõrgemat temperatuuri, mille tagajärjena suureneb atmosfääri veeauru mahutavus. See toob endaga kaasa õhuniiskuse suurenemise 10-20% (Jaagus & Mändla, 2014; Kont, Jaagus & Aunap, 2003). Eesti laiuskraadile ennustatakse 2041-2070 perioodiks 10-14% sademete hulga tõusu ja 2071-2100 perioodiks 16-19% tõusu (IPCC, 2014). Ka päevane sademete maksimum suureneb üle 10% (IPCC, 2021). Viimase 60 aasta jooksul on sademete hulk Eesti piirkonnas tõusnud kuni 100 millimeetrit aastas igal kümnendil. Suurenenud sademete hulk ja veeringluse muutus põhjustab ka mullaniiskuse suurenemist 5-10% perioodil 2080-2099 (Meehl *et al.,* 2007). Globaalse veeringluse muutumine ja temperatuuri tõus tähendab ka muutusi atmosfääri veeauru sisalduses. Veeauru kui ühe peamise kasvuhoonegaasi sisalduse suurenemine atmosfääris omakorda suurendab kasvuhooneefekti ja panustab kliimasoojenemisse (Held & Soden, 2000).

Uurimaks kliimamuutuste valguses, kuidas suurenenud õhu- ja mullaniiskus olulistele metsapuudele mõjub, on Eestisse rajatud Metsaökosüsteemi Õhuniiskusega Manipuleerimise Eksperiment ehk FAHM (ingl *Free Air Humidity Manipulation*). Saadud tulemusi kasutatakse kliimamuutuste mõju ennustamiseks metsaökosüsteemidele. Metsaökosüsteemide terviklikkus on esmatähtis kliimasoojenemise aeglustamisel süsiniku sidumise kaudu, muldade stabiliseerimisel, sademete reguleerimisel läbi evapotranspiratsiooni, elurikkuse säilitamisel, põlisrahvastele elatise pakkumisel ja loomadelt inimestele kanduvate haiguste leviku takistamisel (WRI, 2022).

Kõrgem suhteline õhuniiskus võib mõjuda taimedele nii positiivselt kui negatiivselt. Senised FAHMi tulemused näitavad, et suurenenud õhuniiskus mõjub laialehistele puudele pigem negatiivselt, vähendades nende kasvukiirust, lehepinda ja suurendades patogeenide rünnaku riski (Kupper *et al.*, 2011; Oksanen *et al.,* 2018; Sellin *et al.*, 2017; Tullus *et al.*, 2012). Kõrgema suhtelise õhuniiskuse korral on aururõhu vahe taime sees ja väliskeskkonnas väiksem ning sellest tulenevalt on ka taimede evapotranspiratsioon väiksem. Suurema õhuniiskuse tõttu väheneb aurumine taimelehtedelt, mis omakorda parandab puude veevarustust ja tõstab lehtede

temperatuuri, mis mõjub taimede kasvule positiivselt. Ent väiksem aurustumine võib ka vähendada taimele kättesaadavaid toitaineid, kuna need ei liigu enam väiksema massivoolu tõttu juurtesse. Mullast omastatav lämmastik aga on taime kasvu puhul esmatähtis (Sellin *et al.*, 2013). Kõrgema õhuniiskusega keskkonnas kujunenud väiksem lehepindala tähendab ka väiksemat fotosünteesivõimet (Sellin *et al.*, 2017; Tullus *et al.*, 2012). Suurenenud mullaniiskus võib taime kasvule positiivselt mõjuda kuni teatud piirini, millal vett saab liiga palju ja mullas tekib hapnikupuudus (Parent *et al.*, 2008). Liigsest mullaniiskusest tingitud hapniku puudus takistab taimejuurtel vee ja toitainete omastamist. Ka suurenenud õhuniiskus võib põhjustada hapniku vähenemist mullas, kuna vähenenud aurumine suurendab mullaniiskust.

1.5. Bakalaureusetöö eesmärk

Ehkki varem on uuritud fluktueeriva asümmeetria ja veestressi (liiga vähese vee näol) omavahelist seost (Hódar, 2002), on vähe informatsiooni, kuidas suurenenud vee hulk keskkonnas mõjutab lehtede sümmeetrilisust. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk on FAHM katseala andmetele toetudes välja selgitada, kas suurenenud mulla- ja õhuniiskusest tingitud kasvustress arukasel ja hübriidhaaval avaldub ka lehtede fluktueerivas asümmeetrias ning kuidas on omavahel seotud FA ja erinevad lehe morfoloogilised tunnused.

2. METOODIKA

2.1. Prooviala kirjeldus

Välitööd antud bakalaureusetöö raames viidi läbi FAHM katsealal, mis asub Tartumaal, Meeksi vallas, Rõka külas (58°14′N, 27°17′E, kõrgus merepinnast 40-48 m). Katseala asub segametsavööndis ning merelise ja mandrilise kliima üleminekuvööndis. Katseala piirkonnas on aasta keskmine sademete hulk 650 mm, juuli keskmine õhutemperatuur 17,0°C ja jaanuari keskmine õhutemperatuur -6,7°C. Kasvuperiood kestab aprilli keskpaigast oktoobrini (175-180 päeva).

FAHM katseala rajati 2006-2007 aastal endisele põllumaale. Katseala suurus on 2,7 ha, millel asub üheksa katseringi (iga ringi Ø 14 m), millest kolm on kontrollringid (C), kolm on suurendatud õhuniiskusega töötlusringid (H) ja kolm on suurendatud mullaniiskusega töötlusringid (I). Katseringe eraldab üksteisest hübriidhaabadest puhvertsoon. Katseandmete kogumise perioodil kasvas igas töötlusringis 1 m vahedega 196 puud, millest poole moodustasid arukask (*Betula pendula* Roth) ja teise poole hübriidhaab (*Populus×wettsteinii* Hämet-Ahti). Arukased istutati 2012. aasta sügisel ning hübriidhaavad uuenesid eelmise rotatsiooni puude võsudest ise 2013. aasta kevadel.

Õhuniisutusega FAHM katsealal alustati 2008. aasta mais ning sellest ajast saadik on seda töötlust rakendatud järjepidevalt iga aasta kasvuperioodil (mai-september). Suurendatud suhteline õhuniiskus saavutatakse vee pihustamisel läbi peenikeste düüside, kust vesi jõuab edasi töötlusringi ventilaatorite ja tuule abil. Õhuniiskuse suurendamine toimub arvutiprogrammi vahendusel, mis kohandab oma tööd vastavalt tuule suunale ja kiirusele ja ümbritseva õhu niiskusele. Niisutus töötab hommikul kella üheksast õhtul kella seitsmeni iga päev (va pühapäevadel), kui õhutemperatuur on üle 12°C, suhteline õhuniiskus üle 75% ja tuulekiirus alla 4 m/s. Niisutamisega tõstetakse suhtelist õhuniiskust keskmiselt 5-7%. Mulla niisutamisega alustati 2018. aasta mais. Suurendatud mullaniiskuse töötluse puhul lisatakse tilkniisutussüsteemi abil iga nädal (mai-oktoober) mulda 20% nädala sademete hulgast.

Katsealal mõõdetakse vegetatsiooniperioodi jooksul järjepidevalt suhtelist õhuniiskust (RH; %), õhutemperatuuri (T_A; °C), tuule suunda ja kiirust, mulla veepotentsiaali (Ψ_S; kPa) ja temperatuuri nii 15 kui ka 30 cm sügavusel ning fotosünteetiliselt aktiivset kiirgust. Katset on täpsemalt kirjeldatud Kupper *et al.* (2011), Sellin *et al.* (2017) ja Tullus *et al.* (2012). Tabelis 1

on näidatud 2019. aastal maist augustini mõõdetud keskkonnaparameetrite keskmised väärtused. 2019. aastal oli absoluutne sademete hulk maist augustini 367 mm, mis oli 52% kõrgem eelmiste aastate pikaajalisest keskmisest. Mais, juunis, juulis ja augustis oli kuu absoluutne sademete hulk vastavalt 106 mm (226% eelmiste aastate sademete keskmisest), 59 mm (80%), 100 mm (200%) ja 102 mm (144%).

Parameeter	Niisutustöötlus			Töötluse mõju p väärtus
	C	H	I	
RH (%)	54.9 ± 0.27[a]	56.3 ± 0.27[b]	54.3 ± 0.30[a]	**P < 0.001**
T_A (°C)	21.1 ± 0.07[a]	21.3 ± 0.07[a]	21.1 ± 0.08[a]	P = 0.442
Ψ_{s15} (kPa)	-23.3 ± 0.10[a]	-15.4 ± 0.05[b]	-9.0 ± 0.03[c]	**P < 0.001**

Tabel 1: Keskkonnaparameetrite keskmised väärtused (±SE) kontrollis (C), suurendatud õhuniiskuse (H) ja suurendatud mullaniiskuse (I) töötluses. RH - suhteline õhuniiskus; T_A – õhutemperatuur; Ψ_{s15} – mulla veepotentsiaal 15 cm sügavusel. Erinevad tähed (a,b,c) tähistavad statistiliselt olulisi erinevusi töötluste vahel.

2.2 Andmete kogumise metoodika

Katseandmete kogumine toimus FAHM katseala teise rotatsiooni lõpus, 2019. aasta augustis (II rotatsioon kestis 2013. aasta maist 2019. aasta oktoobrini), kui katseringides kasvavad arukased oli 7-aastased ja hübriidhaavad 6-aastased. Igast katseringist korjati kümnelt puult umbes 1,5 m kõrguselt viis lehte, liigi kohta kokku 50 lehte (50 lehte × 2 liiki × 9 katseringi, kokku 900 lehte). Lehtede analüüsiks skaneeriti need kohe peale korjamist skanneriga (CanoScan LiDE 210, Canon Inc., Japan). Lehti mõõdeti, kasutades programmi WinFOLIA Pro 2013 (Regent Instruments Inc., Canada). Programmiga mõõdeti lehe pindala (S; cm^2), lehelaba kõrgus (BL; cm), lehelaba maksimaalne laius (W_{max}; cm), rootsu pikkus (Pet, cm), lehelaba vasaku poole laius pearoo keskpunktist leheservani (L, cm), lehelaba parema poole laius pearoo keskpunktist leheservani (R; cm) ja lehe perimeeter (P). Lehed, mida programmiga mingil põhjusel ei olnud võimalik mõõta, mõõdeti käsitsi 0,5 mm täpsusega, kasutades joonlauda.

2.3. Andmeanalüüs

WinFOLIA'ga mõõdetud lehtede tunnuste suuruste sisestamiseks ja töötlemiseks kasutati programmi Microsoft Excel 16.6 (Microsoft Corp., USA). Statistiline analüüs ja graafikud tehti programmiga Statistica 7.1 (StatSoft Inc., USA). Tulemuste usaldusväärsused on arvutatud olulisuse nivool 0.05.

Lehtede fluktueeriva asümmeetria (FA) hindamiseks arvutati iga lehe jaoks kaks erinevat fluktueeriva asümmeetria indeksit (Palmer & Strobeck, 1986):

$$FA_1 = |R - L| \quad (1)$$

$$FA_2 = \frac{2 \times |R - L|}{R + L} \quad (2)$$

FA_1 (cm) näitab absoluutset fluktueerivat asümmeetriat. Kuna asümmeetria ulatus võib sõltuda lehe suurusest, s.t. suurematel lehtedel võib esineda suurem asümmeetria, siis erineva suurusega lehtede omavaheliseks võrdlemiseks on vaja suuruse mõju eemaldada. Selleks kasutatakse indeksit FA_2, mis näitab suurusega skaleeritud FA-d.

Kõigepealt tehti kindlaks, kas uuritud lehtede puhul esineb fluktueeriv asümmeetria (juhuslik hälbimine sümmeetriast, R-L = 0, suurused normaaljaotusega), mitte suunaline asümmeetria (DA, R-L ≠ 0) või antisümmeetria (AS, suurused ei ole normaaljaotusega). Andmete keskväärtuse erinemist nullist kontrolliti ühe valimi t-testiga, andmete normaaljaotust kontrolliti Kolmogorov-Smirnovi testiga. Grupisisese varieeruvuse homogeensust kontrolliti Levene testiga.

FA ja lehe erinevate morfoloogiliste tunnuste (rootsu pikkus, lehe pindala, lehelaba pikkus, perimeeter) omavahelist seost hinnati korrelatsioonanalüüsi ja lihtsa regressioonanalüüsiga. Liigi ja erinevate töötluste mõju analüüsimiseks FA-le ning lehe erinevatele morfoloogilistele tunnustele kasutati dispersioonanalüüsi (ANOVA) ning keskmiste võrdlemiseks Tukey testi. FA ning lehe morfoloogiliste tunnuste võrdlemiseks liikide vahel kasutati Studenti t-testi sõltumatute vaatluste jaoks. Töötluse mõju analüüsimiseks keskkonnaparameetritele (RH, T_A, Ψ_{S15}) rakendati Kruskal-Wallise testi.

3. TULEMUSED

Analüüsitud lehtede morfoloogilised tunnused on toodud Tabelis 2. Üle kõigi töötluste olid kõik lehetunnused hübriidhaaval arukasega võrreldes oluliselt suuremad (Studenti t-test sõltumatute vaatluste jaoks; $p < 0.01$). Töötlus avaldas lehetunnustele olulist mõju vaid haava puhul (ANOVA; $p < 0.01$). Tukey testi järgi olid haaval kõik lehetunnused õhuniisutuses oluliselt väiksemad võrreldes kontrolliga ($p < 0.05$), mullaniisutuses lehetunnused kontrollist oluliselt ei erinenud. Kase puhul lehetunnustes olulisis erinevusi töötluste vahel ei esinenud (Tabel 2).

Tunnus	*B. pendula*				*P. × wettsteinii*			
	Keskmine niisutustöötluse mõju tunnusele ± SE			Liigi keskmine ± SE (n = 450)	Keskmine niisutustöötluse mõju tunnusele ± SE			Liigi keskmine ± SE (n = 448)
	C n = 150	H n = 150	I n = 150		C n = 150	H n = 149	I n = 149	
S (cm^2)	11,20 ± 2,731 [a]	11,87 ± 3,976 [a]	11,76 ± 2,868 [a]	11,61 ± 3,245	21,56 ± 5,936 [a]	18,94 ± 4,493 [b]	21,23 ± 5,444 [a]	20,58 ± 5,440*
BL (cm)	5,13 ± 0,614 [a]	5,14 ± 0,652 [a]	5,26 ± 0,605 [a]	5,17 ± 0,626	5,63 ± 0,810 [a]	5,26 ± 0,667 [b]	5,60 ± 0,708 [a]	5,50 ± 0,749*
W_{max} (cm)	3,82 ± 0,496 [a]	3,84 ± 0,534 [a]	3,85 ± 0,450 [a]	3,84 ± 0,494	5,14 ± 0,706 [a]	4,92 ± 0,595 [b]	5,13 ± 0,699 [a]	5,06 ± 0,675*
Pet (cm)	2,29 ± 0,423 [a]	2,32 ± 0,495 [a]	2,37 ± 0,503 [a]	2,33 ± 0,475	4,15 ± 0,872 [a]	3,92 ± 0,749 [b]	4,06 ± 0,848 [ab]	4,04 ± 0,828*
P (cm)	15,84 ± 2,203 [a]	16,06 ± 2,297 [a]	16,19 ± 2,131 [a]	16,03 ± 2,211	17,59 ± 2,435 [a]	16,76 ± 2,560 [b]	17,66 ± 2,431 [a]	17,34 ± 2,503*

Tabel 2: Lehtede morfoloogiliste tunnuste keskmised väärtused (± SE) kontrollis (C), suurendatud õhuniiskuse (H) ja suurendatud mullaniiskuse (I) töötluses ning terve liigi üleselt arukase (Betula pendula) ja hübriidhaava (Populus × wettsteinii) kohta. S – lehe pindala; BL – lehelaba pikkus; W_{max} – lehelaba maksimaalne laius; Pet – leherootsu pikkus; P – perimeeter. Erinevad tähed (a,b) tähistavad statistiliselt olulisi erinevusi töötluste vahel ühe liigi piires; tärn tähistab statistiliselt olulist erinevust liigi keskmiste vahel.

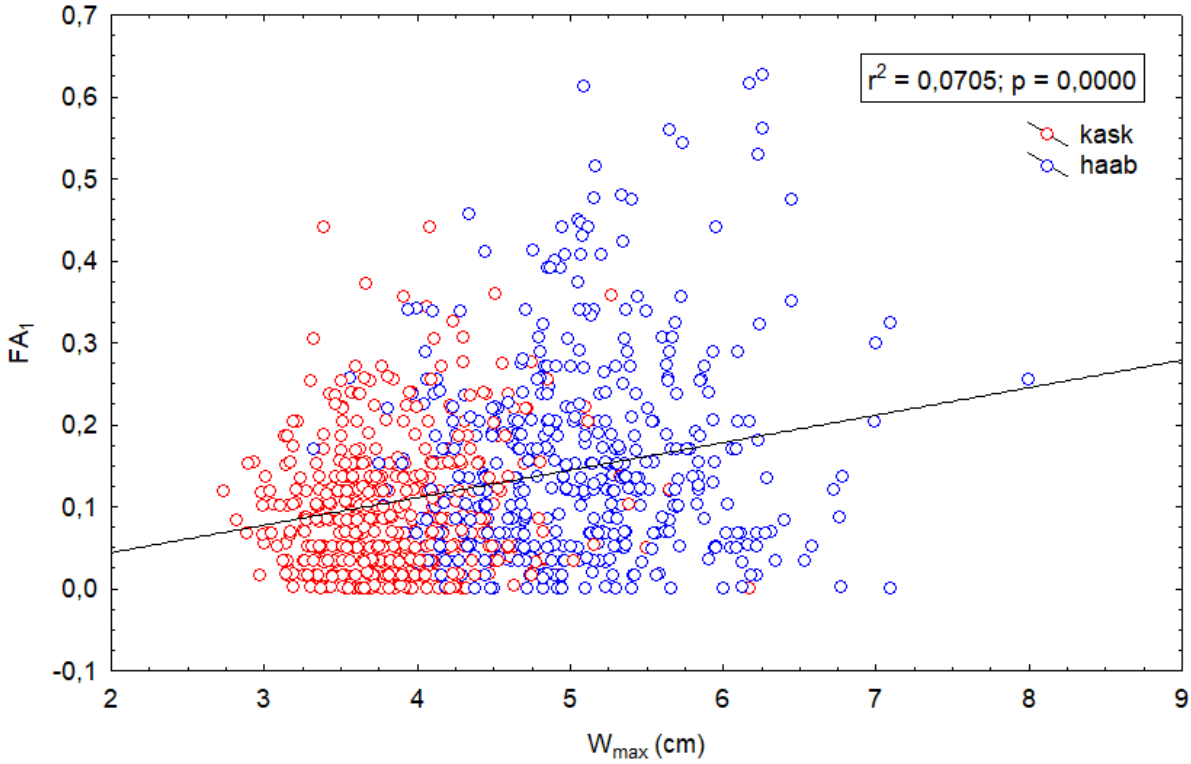
Tulemused kinnitasid, et nii arukase kui hübriidhaava lehtedel esineb just fluktueeriv asümmeetria. R–L väärtuste keskmine kummalgi liigil ei erinenud oluliselt nullist (ühe valimi t-test, $p > 0.05$), viidates suunalise asümmeetria puudumisele. Samuti leidis kinnitust ka antisümmeetria puudumine, kuna R–L väärtused kummalgi liigil olid normaaljaotusega (Kolmogorov-Smirnovi test, $p > 0.05$).

Tunnuste vaheliste seoste tuvastamiseks rakendatud korrelatsioonanalüüs näitas, et absoluutne FA (FA_1) oli positiivselt seotud kõigi lehe morfoloogiliste tunnustega (Tabel 3), viidates fluktueeriva asümmeetria sõltuvusele lehe suurusest. Uurimaks iga lehetunnuse ja FA_1 vahelise seose tugevust ja kuju, teostati lihtne lineaarne regressioonanalüüs. Ilmnes, et kõige

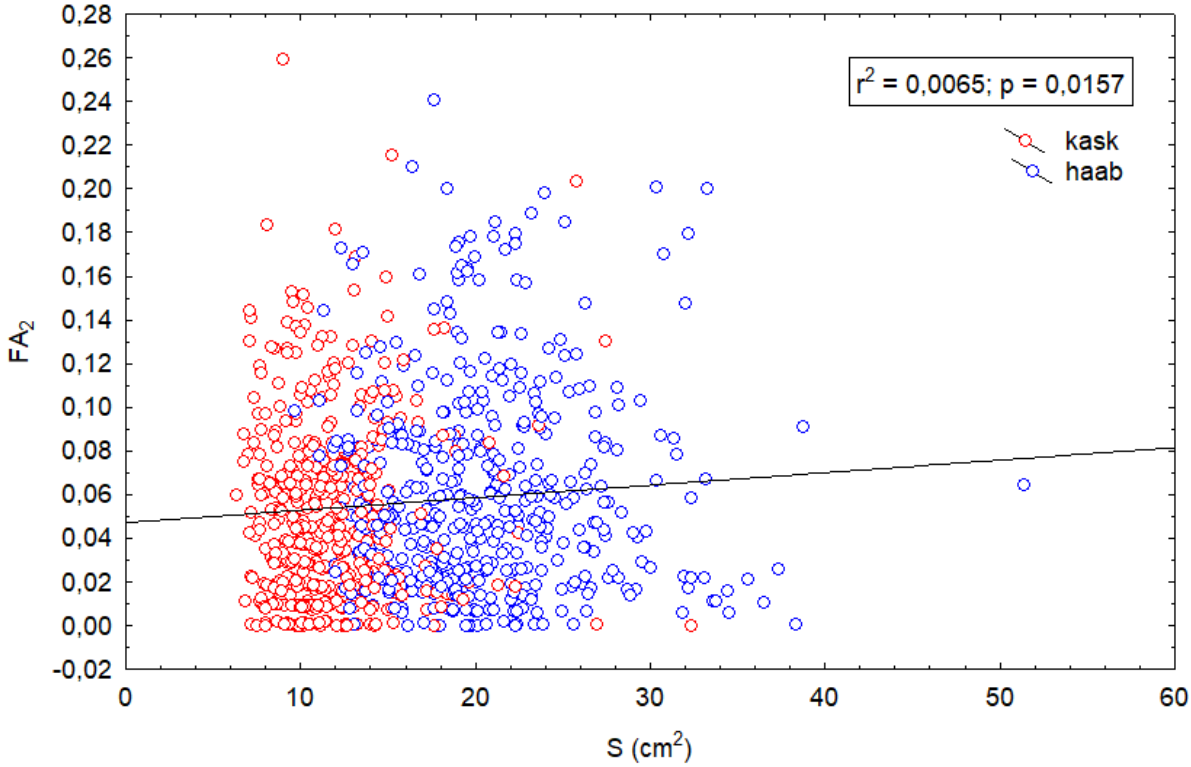
tugevam seos esines FA_1 ja lehelaba maksimaalse laiuse (W_{max}) vahel (r^2 = 0,071, r = 0,265, p < 0,001, Joonis 5). Kuna absoluutne FA (FA_1) oli suurusest sõltuv, kasutati edasises analüüsis suurusega skaleeritud FA indeksit (FA_2). Korrelatsioonanalüüs näitas, et lehe suurusega skaleerimine eemaldas lehe suuruse mõju fluktueerivale asümmeetriale ning FA_2 ja lehe tunnuste vahel olulist seost ei ilmnenud, välja arvatud lehe pindala (S) puhul (Tabel 3). FA_2 ja S vahel ilmnes siiski nõrk, kuid oluline positiivne seos (r^2 = 0,007, r = 0,081, p = 0,016, Joonis 6), viidates lehe pindala tõelisele, suurusest sõltumatule mõjule FA-le.

	S	BL	W_{max}	Pet	P	FA_1	FA_2
S	1,00	**0,61**	**0,85**	**0,72**	**0,62**	**0,26**	**0,08**
BL	**0,61**	**1,00**	**0,66**	**0,46**	**0,84**	**0,13**	-0,01
W_{max}	**0,85**	**0,66**	1,00	**0,75**	**0,75**	**0,27**	0,05
Pet	**0,72**	**0,46**	**0,75**	1,00	**0,47**	**0,19**	0,03
P	**0,62**	**0,84**	**0,75**	**0,47**	1,00	**0,16**	0,00
FA_1	**0,26**	**0,13**	**0,27**	**0,19**	**0,16**	1,00	**0,96**
FA_2	**0,08**	-0,01	0,05	0,03	0,00	**0,96**	1,00

Tabel 3: Lehe morfoloogiliste tunnuste ja FA korrelatsioonimaatriks. S – lehe pindala (cm^2); BL – lehelaba pikkus; W_{max}– lehelaba maksimaalne laius (cm); Pet – leherootsu pikkus (cm); P – perimeeter (cm); FA_1 – absoluutne FA (cm); FA_2 – suurusega skaleeritud FA.



Joonis 5: Absoluutse fluktueeriva asümmeetria (FA_1) ja lehe maksimaalse laiuse (W_{max}) vaheline seos.

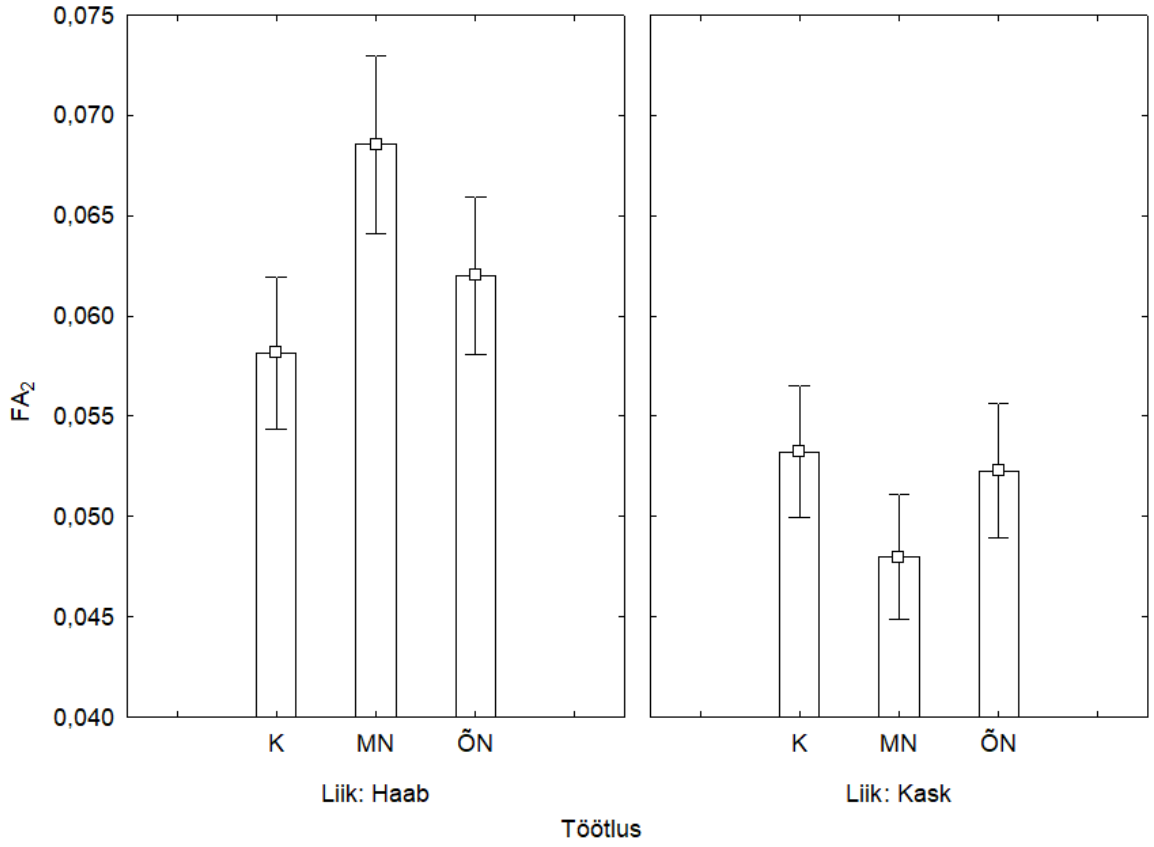


Joonis 6: Suurusega skaleeritud fluktueeriva asümmeetria (FA_2) ja lehe pindala (S) vaheline seos.

Liigi ja töötluse mõju tuvastamiseks rakendatud dispersioonanalüüs näitas, et töötlusel fluktueerivale asümmeetriale olulist mõju ei olnud ($p = 0.942$; Tabel 4). Hübriidhaava FA_2 kaldus küll natuke suurenema ning arukase FA_2 natuke vähenema õhu- ja mullaniisutuse tagajärjel, kuid erinevused töötluste ja kontrolli vahel ei osutunud statistiliselt olulisteks (Joonis 7). Küll aga mõjutas fluktueeriva asümmeetria taset oluliselt liik: hübriidhaava FA_2 oli tunduvalt kõrgem arukase omast ($p < 0.001$). Hübriidhaava keskmine FA_2 väärtus oli 0.061 (± 0.002 SE), samas kui arukase FA_2 väärtus oli 0.051 (± 0.002 SE).

Faktor	SS	df	MS	F	p
Liik	**0,023798**	**1**	**0,023798**	**11,86124**	**<0.001**
Töötlus	0,000239	2	0,000120	0,05965	0,942000
Liik × Töötlus	0,006925	2	0,003462	1,72566	0,179000
Viga	1,789670	892	0,002006		

Tabel 4: Dispersioonanalüüsi tulemused, hindamaks liigi ja niisutustöötluse mõju fluktueerivale asümmeetriale.



Joonis 7: Suurusega skaleeritud fluktueeriva asümmeetria (FA_2) keskväärtused (±SE) sõltuvalt liigist ja töötlusest. K – kontroll; MN – suurendatud mullaniiskus; ÕN – suurendatud õhuniiskus.

4. ARUTELU

FAHM-i katse käigus on täheldatud, et liigne õhuniiskus mõjub puude kasvule negatiivselt, väljendudes nii vähenenud tüve ruumalas ja diameetris, kasvukiiruses, lehe pindalas kui ka biomassis (Oksanen *et al.,* 2018; Sellin *et al.*, 2017; Tullus *et al.*, 2012). Suurenenud mulla- ja õhuniiskuse mõju fluktueerivale asümmeetriale pole veel FAHM-i katse raames põhjalikult uuritud. Ka käesoleva töö tulemuste põhjal ei saa järeldada, et antud stress tingimata fluktueeriva asümmeetria näol avaldub, kuna niisutustöötluste puhul ei täheldatud taimedele stressi tekitavat mõju. Katsepuud võisid olla kõrgema mulla- ja õhuniiskusega juba kohanenud, kuna lehtede korjamise ajal FAHM-i 2. roatsiooni lõpus oli katsepuude jaoks käimas juba seitsmes niiskusega töötlemise aasta. Kuigi kaskede kasvule mõjus õhuniisutus esimestel aastatel negatiivselt, siis FAHM-i 2. rotatsiooni viimastel aastatel kontrolli ja niisutuse vahel puude kasvuparameetrites enam olulisi erinevusi ei esinenud (Rosenvald *et al.* 2020). Haava kasvule ei avaldanud niisutustöötlus kogu FAHM-i 2. rotatsiooni ajal enam negatiivset mõju, kuna tegemist oli 1. rotatsiooni langetatud puude kännuvõsudega, mis olid suurendatud õhuniiskusega ilmselt juba juurestiku tasandil kohanenud (Tullus *et al.* 2020). FA nõrk reaktsioon suurenenud õhu- ja mullaniiskusele võis olla põhjustatud ka tavapärasest suuremast sademete hulgast 2019. aastal (152% eelmiste aastate keskmisest), mis oluliselt vähendas töötluste efektiivsust. Kuna puude reaktsioon muutunud keskkonnatingimustele on ajast sõltuv, siis võib oletada, et FAHM-i katses varasematel aastatel korjatud lehtede FA tase oleks ehk teistsugune olnud.

Ehkki töötlused FA-le erilist mõju ei avaldanud, leidus siiski erinevus liikide vahel. Hübriidhaaval oli üldiselt kõrgem FA tase kui arukasel ning õhu- ja mullaniisutuse puhul suurenes see veidi, kuid mitte piisavalt, et olla statistiliselt oluline. Kase puhul erines FA tase erinevate katseringide lõikes marginaalselt, vähenedes hoopis suurema mullaniiskuse korral. Kask on ka tuntud kui vastupidav ja hästi kohastuv taim (Franiel, 2008; Black-Samuelsson & Andersson, 2003), seega ei ole selline tulemus üllatav.

Fluktueeriva asümmeetria mõõtmine on viimase 50 aasta jooksul muutunud laialdaselt levinud meetodiks taimede stressi hindamisel (Cornelissen *et al.*, 2003; da Costa *et al.* 2013; Cuevas-Reyes *et al.,* 2018; Ivanov *et al.,* 2015; Mendes *et al.,* 2018; Miljkovic *et al.,* 2018), kuid hiljuti (Alves-Silva *et al.,* 2018; Kozlov *et al.,* 2017) on hakatud arutlema, kas nende uurimuste metoodika on olnud piisavalt täpne, et pidada saadud tulemusi usaldusväärseks. Ehkki

fluktueeriva asümmeetria mõõtmisel kasutatakse erinevaid programme ning mõõtmine toimub enamasti digitaalselt, ei saa tulemuste täpsuses 100% kindel olla. Samuti kasutatakse ka mõnel määral käsitsi mõõtmist, mis on digitaalsest ebatäpsem. Sellest tulenevalt võivad esineda mõõtmisvead, mis mõjutavad lõplikke FA tulemusi, varjates olemasolevat FA-d või tuvastades olematut FA-d.

Kõik stressorid ei mõju sümmeetriale alati oodatud viisil, kuigi võivad samal ajal taime kasvule pärssivalt mõjuda (West-Eberhard, 2005), seetõttu esineb palju vastakate tulemustega uurimusi. On leitud, et teatud keskkonnastressi faktorid põhjustavad FA taseme suurenemist (Cornelissen *et al.,* 2003; Mendes *et al.,* 2018; Cuevas-Reyes *et al.,* 2013), kuid samas teistes uuringutes on jõutud järeldusele, et antud faktorid fluktueerivat asümmeetriat ei mõjuta (da Costa *et al.,* 2013; Franiel, 2008; Hochwender & Fritz, 1998; Zverev & Kozlov, 2020; Zvereva *et al.,* 1997; Veličković & Perisic, 2006). Teatud stressorite puhul on jõutud vastakate järeldusteni seoses nende negatiivse mõjuga taime FA-le. Näiteks da Costa *et al.* (2013) ei leidnud oma uuringus seost herbivooria ja arengujärgus olevate taimede FA vahel, samas kui Cornelissen *et al.* (2003) leidsid, et herbivooria mõjub FA-le positiivselt. See võib tuleneda erinevate liikide vastupidavusest erinevatele stressoritele või mitme stressori koosmõjust, millest ei võida teadlikud olla. Ka Veličković & Perisic (2006) leidsid, vastupidiselt ootustele, et suurema reostusega keskkonnas kasvavatel taimedel esineb vähem fluktueerivat asümmeetriat, kui pealtnäha ideaalses keskkonnas kasvavatel taimedel. Fluktueeriva asümmeetria vaatlemisel looduslikus keskkonnas on raske eristada, milline faktor parasjagu taimele stressi tekitab (Hódar, 2002; Lens *et al.,* 2001). Samuti võivad mitu faktorit koos taimele ootamatut mõju avaldada. Seetõttu on vaieldud, et eksperimentaalsed uurimused sobivad fluktueeriva asümmeetria uurimiseks paremini. Et olla kindel FA-d põhjustavas faktoris, tuleks uurida ka muid parameetreid ja lisada uurimusse ka kontrolltest. Ehkki antud töös kasutati samuti eksperimentaalset lähenemist ning katse käigus on jälgitud ka teisi füsioloogilisi parameetreid, võis siiski fluktueeriva asümmeetria tuvastamisel mängida rolli välitingimused, mille puhul on kontrollimatuid faktoreid rohkem. Laboritingimustes läbiviidud katsed näitavad harilikult kõrgemat FA taset (Ivanov *et al.,* 2015), kuid samas ei kasva taimed looduses samuti ideaalsetes kontrollitud tingimustes, seega ei pruugi laboritingimustes saadud tulemused päris elusse ülekantavad olla.

Kuna FA ei avaldu kõikides tunnustes ühtlastelt, st erinevate tunnuste fluktueeriv asümmeetria ei ole omavahel positiivselt seotud, siis võib tulemust mõjutada ka uuritava

tunnuse valik (Lens *et al.,* 2001). Fluktueerivat asümmeetriat tuntakse oma senimaani vastakate tulemuste tõttu mõnevõrra häguse meetodina stressi tuvastamisel ning kuna uurimustes kasutatakse erinevaid liike, ei saa alati kindel olla, millises kindlas tunnuses fluktueeriv asümmeetria avaldub. Võidakse valida „vale" tunnus ja jõutakse järeldusele, et teatud stressor ei põhjusta FA-d. Tunnuse valiku sobivus sõltub uuritavast taimest ja lehti peaks mõõtma mitmelt taimelt üle kogu vaatlusala. Graham (2021) soovitab lehti uurida erinevatest populatsioonidest, kus mõjub sama stressor, et olla kindel selle väljendumises fluktueeriva asümmeetriana. Tunnuse valimine fluktueeriva asümmeetria mõõtmisel võis ka antud töös FA tuvastamist mõjutada. Ehkki lehepoolte laius on üks enamkasutatum tunnus fluktueeriva asümmeetria uurimisel, annab see vähe informatsiooni lehe kuju kohta (Ivanov *et al.,* 2015). Orientiirid ja liitindeksi kasutamine on fluktueeriva asümmeetria tuvastamisel tundlikumad meetodid (Lens *et al.,* 2001; Leung *et al.,* 2000; Sandner *et al.,* 2019) ning edasistes uuringutes peaks täpsemate tulemuste saamiseks ka neid rakendama.

Alves-Silva *et al.* (2018) tõid lehtede sümmeetria uurimuste nõrgaks küljeks standardse valimi suuruse puudumise. Näiteks oli ühe uurimuse käigus mõõdetud ühe taime kohta vähem kui viite lehte, samas kui teises oli mõõdetud sadu, ning puude arv, millelt lehed korjati, varieerus kümnest tuhandeni. Antud töös oletati, et suurem valim tähendab ka fluktueeriva asümmeetria paremat tuvastamist. Selle väitega nõustuvad ka Hochwender & Fritz (1998). Suur valim on FA tuvastamisel esmatähtis, kuna FA mõõtmisel kasutatavad statistilised testid on valimi suuruse suhtes väga tundlikud. Kolme erineva taimeliigi uurimisel leiti, et ehkki valimi suurus mõjutab tuvastatud asümmeetria liiki, ei pea see kõikidel juhtudel paika. Kuigi kindlat numbrit välja ei toodud, soovitati asümmeetria mõõtmisel statistilise andmetöötluse asemel kaaluda erinevate graafikute kasutamist. Kui ühelt taimelt pole võimalik liigi eripärade tõttu palju lehti korjata, siis tuleks lehti korjata paljudelt taimedelt, et saavutada samaväärne valimi suurus (Graham, 2021). Ehkki antud töös kasutatud valimi suurus (50 lehte töötluse kohta, 450 lehte liigi kohta, kokku 900 lehte) on üldjoontes piisav, võiks võimaluse korral kasutada veel suuremat valimit, kuna suurem valim on FA tuvastamisel usaldusväärsem. Samas suure valimi kasutamine oleks vastuolus FA kui lihtsa ja kiire meetodi olemusega taimede stressi hindamisel (Wuytack *et al.,* 2011). Ometi, kuna valimi suurus võib mõjutada FA tuvastamise suutlikkust, tuleks läbi viia edasised mõõtmised.

Samuti on ka vastakaid seisukohti teemal, kas erinevad lehe tunnused ja fluktueeriv asümmeetria on omavahel seotud. Kui Kozlov, Zverev ja Sandner (2019) ei leidnud lehe

pindala ja fluktueeriva asümmeetria vahel mingit seost, siis Veličković & Savić (2012) kohaselt on suurematel lehtedel ka suurem FA tase, mis võib tuleneda heades kasvutingimustes kasvavate taimede kiiremast kasvutempost ja arengulisest ebastabiilsusest (Hochwender & Fritz, 1998; Lempa *et al.*, 2000). Samale järeldusele jõudsid ka Venâncio, Alves-Silva ja Santos (2016a), kes leidsid, et lehe pindala avaldab fluktueerivale asümmeetriale küll nõrka, kuid positiivset mõju. Antud erinevused võivad tuleneda, nagu eespool mainitud, eksperimentide erinevast ülesehitusest, uuritavatest tunnustest jne.

5. KOKKUVÕTE

Antud bakalaureusetöö käigus uuriti, kuidas suurendatud õhu- ja mullaniiskus mõjusid arukase (*Betula pendula* Roth) ja hübriidhaava (*Populus* × *wettsteinii* Hämet-Ahti) fluktueerivale asümmeetriale (FA). FA määramiseks korjati FAHM (*Free Air Humidity Manipulation*) katsealal kasvavatelt puudelt lehti ning mõõdeti parema ja vasaku lehepoole laiust lehelaba kõige laiemas punktis.

Kuna leiti, et absoluutne fluktueeriv asümmeetria sõltus lehe suurusest, kasutati edasises analüüsis suurusega skaleeritud FA-d. Ka siis leiti lehe pindala ja fluktueeriva asümmeetria vaheline seos, mis näitas, et lehe pindala mõjutas FA-d positiivselt. Samuti olid omavahel seotud ka lehelaba maksimaalne laius ja FA. Suurendatud õhu- ja mullaniiskuse töötlused fluktueerivale asümmeetriale mõju ei avaldanud, ent esines liikide vaheline FA taseme erinevus: hübriidhaava FA oli kõikide töötlusringide lõikes suurem arukase omast.

Käesoleva töö põhjal võib järeldada, et fluktueeriv asümmeetria ei ole nii lihtne ja kiire meetod taimede stressi hindamiseks, nagu seda peetakse. Fluktueeriva asümmeetria meetod, nagu iga teine meetod, nõuab adekvaatsete tulemuste saamiseks sama palju (kui mitte rohkemgi) tööd ja aega, kui teised meetodid. Uurimuste erineva ülesehituse, peidetud faktorite, erinevate liikide ja uuritavate tunnuste jne tõttu on fluktueeriva asümmeetria meetodi kasutamisel stressi tuvastamisel saadud tihti vastakaid tulemusi. Seetõttu võib fluktueeriva asümmeetria meetodit pidada pigem kaudseks stressi tuvastamise meetodiks ning alati tuleks lisaks FA-le uurida ka muid morfoloogilisi või füsioloogilisi tunnuseid.

6. SUMMARY

Leaf fluctuating asymmetry as an indirect method for assessing plant stress

Leaf fluctuating asymmetry, small random deviations from perfect bilateral symmetry, is considered as a somewhat easy and fast method for detecting stress in plants. There have been multiple studies showing a connection between heightened pollution levels, unsuitable environmental conditions, etc. and an increase in fluctuating asymmetry. However, there have also been studies which fail to find such a connection.

This thesis studied the effects of increased soil and air humidity on the fluctuating asymmetry of silver birch (*Betula pendula* Roth) and hybrid aspen (*Populus* × *wettsteinii* Hämet-Ahti). The assessment was based on leaves sampled from the FAHM (Free Air Humidity Manipulation) experimental facility in Southern Estonia. The measurements for fluctuating asymmetry were based on the width of the left and right sides of the leaf.

It was found that fluctuating asymmetry was dependent on leaf size, therefore size scaled FA was used in further analyses. Even then the relation between leaf area and fluctuating asymmetry persisted, indicating a true relationship between the two. A correlation between leaf maximum width and fluctuating asymmetry was also observed. Increased soil and air humidity treatments had no effect on the fluctuating asymmetry of both silver birch and hybrid aspen. However, hybrid aspen showed higher levels of fluctuating asymmetry than silver birch throughout all treatments.

In conclusion, fluctuating asymmetry is not as simple and fast a method for detecting stress in plants as it might seem. Fluctuating asymmetry like any other method requires time and work to yield reliable results. Due to different experiment designs, hidden factors, varying species and traits etc. in studies, there have been many conflicting findings. Hence fluctuating asymmetry should be regarded as more of an indirect method and other physiological and morphological traits should be studied in addition when assessing the effects of stress on plants.

KASUTATUD KIRJANDUS

Alves-Silva, E. (2012). The influence of Ditylenchus (Nematoda) galls and shade on the fluctuating asymmetry of Miconia fallax (Melastomataceae). *Ecologia Australia,* 22. 53-61.

Alves-Silva, E., Santos, J. C., & Cornelissen, T. G. (2018). How many leaves are enough? The influence of sample size on estimates of plant developmental instability and leaf asymmetry. *Ecological Indicators*, 89, 912-924. doi:10.1016/j.ecolind.2017.12.060

Bagchi, S. K., Sharma, V. P., & Gupta, P. K. (1989). Developmental instability in leaves of *Tectona grandis*. *Silvae Genet,* 38, 1–6.

Black-Samuelsson, S., & Andersson, S. (2003), The effect of nutrient stress on developmental instability in leaves of *Acer platanoides* (Aceraceae) and *Betula pendula* (Betulaceae). *American Journal of Botany*, 90, 1107-1112. doi:10.3732/ajb.90.8.1107

Cornelissen, T., & Stiling, P. (2005). Perfect is best: low leaf fluctuating asymmetry reduces herbivory by leaf miners. *Oecologia*, 142, 46–56. doi:10.1007/s00442-004-1724-y

Cornelissen, T. & Stiling, P. (2010). Small Variations over Large Scales: Fluctuating Asymmetry over the Range of Two Oak Species. *International Journal of Plant Sciences*, 171, 303-309. doi:10.1086/650202

Cornelissen, T. & Stiling, P. (2011). Similar responses of insect herbivores to leaf fluctuating asymmetry. *Arthropod-Plant Interactions,* 5, 59-69. doi:10.1007/s11829-010-9116-1

Cornelissen, T., Stiling, P., & Drake, B. (2003). Elevated CO2 decreases leaf fluctuating asymmetry and herbivory by leaf miners on two oak species. *Global Change Biology*, 10, 27-36. doi:10.1111/j.1365-2486.2003.00712.x

Cowart, N. M., & Graham, J. H. (1999). Within- and Among-Individual Variation in Fluctuating Asymmetry of Leaves in the Fig (*Ficus carica* L.). *International Journal of Plant Sciences*, 160, 116–121. doi:10.1086/314104

Cuevas-Reyes, P., Gilberti, L., González-Rodríguez, A., & Fernandes, G. (2013). Patterns of herbivory and fluctuating asymmetry in *Solanum lycocarpum* St. Hill (Solanaceae) along an urban gradient in Brazil. *Ecological Indicators*, 24, 557–561. doi:10.1016/j.ecolind.2012.08.011

Cuevas-Reyes, P., Pereira, G. C. N., Gélvez-Zuñiga, I., Fernandes, G. W., Venâncio, H., Santos, J. C., Maldonado-López, Y. (2018) Effects of ferric soils on arthropod abundance and herbivory on *Tibouchina heteromalla* (Melastomataceae): is fluctuating asymmetry a good indicator of environmental stress?. *Plant Ecology,* 219, 69-78. doi: 10.1007/s11258-017-0778-y

da Costa, F. V., de Azevedo, I. F. P., de Lima Braga, L., Perillo, L. N., de Siqueira Neves, F., Leite, L. O., da Silva, B. L. R., Ribeiro, L. C., Fernandes, G. W., Cuevas-Reyes,

P. (2013). Fluctuating asymmetry and herbivory in two ontogenetical stages of *Chamaecrista semaphora* in restored and natural environments. *Journal of Plant Interactions*, 8(2), 179-186. doi:10.1080/17429145.2012.657253

Delaney, K.J., Haile, F.J., Peterson, R.K., & Higley, L.G. (2008). Impairment of leaf photosynthesis after insect herbivory or mechanical injury on common milkweed, Asclepias syriaca. *Environmental Entomology,* 37, 1332–1343.

de Sibio P. R., & Rossi M. N. (2012). Oviposition of a leaf-miner on *Erythroxylum tortuosum* (Erythroxylaceae) leaves: hierarchical variation of physical leaf traits. *Australian Journal of Botany,* 60, 136-142.

Erofeeva, E. A. & Yakimov, B. N. (2020). Change of Leaf Trait Asymmetry Type in *Tilia cordata* Mill. and *Betula pendula* Roth under Air Pollution. *Symmetry*, *12*, 727. doi:10.3390/sym12050727

Evans, J.R. (1989) Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia*, *78*, 9–19.

Franiel, I. (2008) Fluctuating asymmetry of Betula pendula Roth leaves - an index of environment quality. *Biodiversity Research and Conservation*, 9/10, 7-10.

Freeman, D. C., Graham, J. H., & Emlen, J. M. (1993) Developmental stability in plants: symmetries, stress and epigenesis. *Genetica,* 89, 97-119.

Freeman, D. C., Brown, M. L., Dobson, M., Jordan, Y., Kizy, A., Micallef, C., Hancock, L. C., Graham, J. H., & Emlen, J. M. (2002). Developmental instability: measures of resistance and resilience using pumpkin (Cucurbita pepo L.). *Biological Journal of the Linnean Society,* 78 (1), 27–41. doi:10.1046/j.1095-8312.2003.00123.x

Graham, J. H., Freeman, D. C., & Emlen, J. M. (1993) Antisymmetry, directional asymmetry and chaotic morphogenesis. *Genetica,* 89.

Graham, J. H., Raz, S., Hel-Or, H., Nevo, E. (2010). Fluctuating Asymmetry: Methods, Theory, and Applications. *Symmetry,* 2, 466-540. doi: 10.3390/sym2020466.

Graham, J. H. (2021). Fluctuating Asymmetry and Developmental Instability, a Guide to Best Practice. *Symmetry*, 13, 9. doi:10.3390/sym13010009

Hagen, S.B., Ims, R.A., Yoccoz, N.G., & Sørlibråten, O. (2007). Fluctuating asymmetry as an indicator of elevation stress and distribution limits in mountain birch (Betula pubescens). *Plant Ecology,* 195, 157-163. doi:10.1007/s11258-007-9312-y

Held, I. M., & Soden, B. J. (2000). Water vapor feedback and global warming. Annual review of energy and the environment, 25(1), 441-475.

Hochwender, C. G., & Fritz, R. S. (1998) Fluctuating asymmetry in a Salix hybrid system: the importance of genetic versus environmental causes. *Evolution,* 53(2), 408-416.

Hódar, J. (2002). Leaf fluctuating asymmetry of Holm oak in response to drought under contrasting climatic conditions. *Journal of Arid Environments*, 52, 233-243. doi:10.1006/jare.2002.0989

Hoffmann, A. A., & Parsons, P. A. (1997). Extreme environmental change and evolution. Cambridge University Press.

IPCC. (2014). AR5 Synthesis Report: Climate Change 2014. Cambridge University Press, Cambridge.

IPCC. (2021). Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Cambridge University Press, Cambridge.

Ivanov, V. P., Ivanov, Y. V., Marchenko, S. I., & Kuznetsov, V. V. (2015) Application of Fluctuating Asymmetry Indexes of Silver Birch Leaves for Diagnostics of Plant Communities under Technogenic Pollution. *Russian Journal of Plant Physiology,* 62(3), 340-348. doi:10.1134/S1021443715030085

Jaagus, J., & Mändla, K. (2014). Climate change scenarios for Estonia based on climate models from the IPCC Fourth Assessment Report. *Estonian Journal of Earth Sciences*, 63, 166. doi:10.3176/earth.2014.15

Jin, X., Yang, G., Tan, C., & Zhao, C. (2014). Effects of nitrogen stress on the photosynthetic CO2 assimilation, chlorophyll fluorescence, and sugar-nitrogen ratio in corn. *Scientific Reports*, *5*, 9311.

Kaligarič, M., Tognetti, R., Janžekovič, F., & Raschi, A. (2008). Leaf Fluctuating Asymmetry of Myrtus Communis L., Affected by Increases in Atmospheric CO2 Concentration: Evidence from a Natural CO2 Spring. *Polish Journal of Environmental Studies*, 17, 503-508.

Koehn, R. K., & Bayne, B. L.(1989). Towards a physiological and genetical understanding of the energetics of the stress response. *Biological Journal of the Linnean Society*, 37(1-2), 157–171.doi:10.1111/j.1095-8312.1989.tb02100.x

Kont, A., Jaagus, J., & Aunap, R. (2003). Climate change scenarios and the effect of sea-level rise for Estonia. *Global and Planetary Change,* 36 (1–2), 1-15. DOI: 10.1016/S0921-8181(02)00149-2.

Kozlov, M. V. (2015). How reproducible are the measurements of leaf fluctuating asymmetry?. *PeerJ*. doi:10.7717/peerj.1027

Kozlov, M. V., Cornelissen, T., Gavrikov, D. E., Kunavin, M. A., Lama, A. D., Milligan, J. R., Zverev, V., Zvereva, E. L. (2017). Reproducibility of fluctuating asymmetry measurements in plants: Sources of variation and implications for study design. *Ecological Indicators*, 73, 733-740. doi:10.1016/j.ecolind.2016.10.033.

Kozlov, M. V., Zverev, V., & Sandner, T. M. (2019). Photosynthetic Efficiency is Higher in Asymmetric Leaves than in Symmetric Leaves of the Same Plant. *Symmetry*, 11(6), 834. doi:10.3390/sym11060834

Kozlov, M.V., Zverev, V., & Zvereva, E.L. (2018). Do defoliating insects distinguish between symmetric and asymmetric leaves within a plant? *Ecological Entomology*, 43. doi:10.1111/een.12642

Kozlov, M. V., Wilsey, B. J., Koricheva, J., & Haukioja, E. (1996). Fluctuating Asymmetry of Birch Leaves Increases Under Pollution Impact. *Journal of Applied Ecology*, 33(6), 1489–1495. doi:10.2307/2404787

Kupper, P., Sõber, J., Sellin, A., Lõhmus, K., Tullus, A., Räim, O., Lubenets, K., Tulva, I., Uri, V., Zobel, M., Kull, O., & Sõber, A. (2011). An experimental facility for Free Air Humidity Manipulation (FAHM) can alter water flux through deciduous tree canopy. *Environmental and Experimental Botany,* 72 (3), 432–438. doi10.1016/j.envexpbot.2010.09.003.

Lappalainen, J. H., Martel, J., Lempa, K., Wilsey, B., & Ossipov, V. (2000). Effects of Resource Availability on Carbon Allocation and Developmental Instability in Cloned Birch Seedlings. *International Journal of Plant Sciences*, 161(1), 119–125. https://doi10.1086/314228

Larcher, W. (2003). Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups. Berlin, Heidelberg: Springer Science and Business Media.

Lempa, K., Martel, J., Koricheva, J., Haukioja, E., Ossipov, V., Ossipova, S., & Pihlaja, K. (2000). Covariation of fluctuating asymmetry, herbivory and chemistry during birch leaf expansion. *Oecologia*, 122, 354-360. doi:10.1007/s004420050041.

Lens, L., Van Dongen, S., Kark, S., & Matthysen, E. (2001). Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies?. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society,* 77(1), 27–38. doi:10.1017/s1464793101005796

Leung, B., Forbes, M. R., & Houle, D. (2000). Fluctuating Asymmetry as a Bioindicator of Stress: Comparing Efficacy of Analyses Involving Multiple Traits. *The American Naturalist,* 155 (1), 101-115.

Lichtenthaler, H. K. (1995). Vegetation Stress: an Introduction to the Stress Concept in Plants. *Plant Physiology,* 148, 4-14.

Meehl, G.A., T.F. Stocker, W.D. Collins, P. Friedlingstein, A.T. Gaye, J.M. Gregory, A. Kitoh, R. Knutti, J.M. Murphy, A. Noda, S.C.B. Raper, I.G. Watterson, A.J. Weaver & Z.-C. Zhao. (2007). Global Climate Projections. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Mendes, G., Boaventura, M. G., Cornelissen, T. (2018). Fluctuating Asymmetry as a Bioindicator of Environmental Stress Caused by Pollution in a Pioneer Plant Species. *Environmental Entomology,* 47(6), 1479-1484. doi:10.1093/ee/nvy147.

Miljkovic, D., Selakovic, S., Vujić, V., Stanisavljević, N., Radović, S., Cvetković, D. (2018). Patterns of herbivore damage, developmental stability, morphological and biochemical traits in female and male *Mercurialis perennis* in contrasting light habitats. *Alpine Botany,* 128, 193-206. doi:10.1007/s00035-018-0203-8.

Møller, A. P., & Swaddle, J. P. (1997). *Asymmetry, developmental stability and evolution*. Oxford University Press, UK.

Oksanen, E., Lihavainen, J., Keinänen, M., Keski-Saari, S., Kontunen-Soppela, S., Sellin, A., & Sõber, A. (2018). Northern forest trees under increasing atmospheric humidity. *Progress in Botany*, 80, 317-336. doi:10.1007/124_2017_15

Palmer, A. R., & Strobeck, C. (1986). Fluctuating Asymmetry: Measurement, Analysis, Patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 17, 391–421.

Parent, C., Capelli, N., Berger, A., Crèvecoeur, M., & Dat, J. F. (2008). An overview of plant responses to soil waterlogging. *Plant stress*, 2(1), 20-27.

Rosenvald, K., Lõhmus, K., Rohula-Okunev, G., Lutter, R., Kupper, P., & Tullus, A. (2020). Elevated atmospheric humidity prolongs active growth period and increases leaf nitrogen resorption efficiency of silver birch. *Oecologia*, 193, 449–460.

Sandner, T. M., & Matthies, D. (2017). Fluctuating asymmetry of leaves is a poor indicator of environmental stress and genetic stress by inbreeding in Silene vulgaris. *Ecological Indicators,* 79, 247-253. doi:10.1016/j.ecolind.2017.04.030

Sandner, T., Zverev, V., & Kozlov, M. (2019). Can the use of landmarks improve the suitability of fluctuating asymmetry in plant leaves as an indicator of stress?. *Ecological Indicators,* 97, 457-465. doi:10.1016/j.ecolind.2018.10.038

Sellin, A., Tullus, A., Niglas, A., Õunapuu-Pikas, E., Meitern, A., & Lõhmus, K. (2013). Humidity-driven changes in growth rate, photosynthetic capacity, hydraulic properties and other functional traits in silver birch (Betula pendula). *Ecological Research*, 28, 523-535. doi:10.1007/s11284-013-1041-1

Sellin, A., Alber, M., Keinänen, M., Kupper, P., Lihavainen, J., Lõhmus, K., Oksanen, E., Sõber, A., Sõber, J., & Tullus, A. (2017). Growth of northern deciduous trees under increasing atmospheric humidity: possible mechanisms behind the growth retardation. *Regional Environmental Change,* 17(7), 2135–2148. doi:10.1007/s10113-016-1042-z

Shi, P., Zheng, X., Ratkowsky, D., Li, Y., Wang, P., & Cheng, L. (2018). A Simple Method for Measuring the Bilateral Symmetry of Leaves. *Symmetry,* 10(4), 118. doi:10.3390/sym10040118

Sommer, C. (1996). Ecotoxicology and Developmental Stability as an in situ Monitor of Adaptation. *Ambio*, 25(5), 374–376.

Zverev, V., & Kozlov, M. V. (2020) Variation in Leaf Size and Fluctuating Asymmetry of Mountain Birch (Betula pubescens var. pumila) in Space and Time: Implications for Global Change Research. *Symmetry*, 12, 1703. doi:10.3390/sym12101703

Zvereva, E. L., Kozlov, M. V., & Haukioja, E. (1997). Stress Responses of Salix borealis to Pollution and Defoliation. *Journal of Applied Ecology,* 34(6), 1387–1396. doi:10.2307/2405256

Telhado, C., Esteves, D., Cornelissen, T., Fernandes, G. W., & Carneiro, M. A. A. (2010). Insect Herbivores of Coccoloba cereifera Do Not Select Asymmetric Plants. *Environmental Entomology,* 39(3), 849–855. doi:10.1603/EN09179

Tullus, A., Kupper, P., Sellin, A., Parts, L., Sõber, A., Sõber, J., Tullus, H., & Lõhmus, K. (2012). Climate Change at Northern Latitudes: Rising Atmospheric Humidity Decreases Transpiration, N-Uptake and Growth Rate of Hybrid Aspen. *PLoS ONE* 7(8). doi:10.1371/journal.pone.0042648

Tullus, A., Rosenvald, K., Lutter, R., Kaasik, A., Kupper, P., & Sellin, A. (2020). Coppicing improves the growth response of short-rotation hybrid aspen to elevated atmospheric humidity. *Forest Ecology and Management,* 459 (117825), 1–11.

Turmukhametova, N., & Shadrina, E. (2020). Changes in the Fluctuating Asymmetry of the Leaf and Reproductive Capacity of Betula pendula Roth Reflect Pessimization of Anthropogenically Transformed Environment. *Symmetry*, *12*(12), 1970. doi:10.3390/sym12121970

Veličković, M., & Savić, T. (2012). Patterns of leaf asymmetry changes in Plantago major L. (ssp. major) natural populations exposed to different environmental conditions. *Plant Species Biology,* 27, 59-68. doi:10.1111/j.1442-1984.2011.00328.x

Veličković, M., & Perisic, S. (2006). Leaf fluctuating asymmetry of common plantain as an indicator of habitat quality. *Plant Biosystems,* 140(2), 138-145. doi:10.1080/11263500600756322

Venâncio, H., Alves-Silva, E., & Santos, J. (2016). Is a leaf life span enough to display changes on developmental instability and nitrogen after simulated herbivory?. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 222. doi:10.1016/j.flora.2016.04.005

Venâncio, H., Alves-Silva, E., & Santos, J. (2016a). Leaf phenotypic variation and developmental instability in relation to different light regimes. *Acta Botanica Brasilica,* 30, 296-303. doi:10.1590/0102-33062016abb0081.

West-Eberhard, M. J. (2005). Developmental plasticity and the origin of species differences. *PNAS,* 102, 6543-6549. doi:10.1073/pnas.0501844102

World Resources Institute. (2022) Why Preserving Forest Integrity is as Vital as Preventing Deforestation. Vaadatud 06.05.2022. https://www.wri.org/insights/why-preserving-forest-integrity-preventing-deforestation

Wilsey, B., Haukioja, E., Koricheva, J., & Sulkinoja, M. (1998). Leaf Fluctuating Asymmetry Increases with Hybridization and Elevation in Tree-Line Birches. *Ecology*, 79, 2092-2099. doi:10.2307/176712.

Wright, I.J., Reich, P.B., Westoby, M., Ackerly, D.D., Baruch, Z., & Bongers, F. (2004) The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*, 428, 821–827.

Wuytack, T., Wuyts, K., Van Dongen, S., Baeten, L., Kardel, F., Verheyen, K., & Samson, R. (2011). The effect of air pollution and other environmental stressors on leaf fluctuating asymmetry and specific leaf area of Salix alba L. *Environmental Pollution,* 159(10), 2405-2411. doi:10.1016/j.envpol.2011.06.037.

Xu, Z., Hu, T. & Zhang, Y. (2012). Effects of experimental warming on phenology, growth and gas exchange of treeline birch (*Betula utilis*) saplings, Eastern Tibetan Plateau, China. *European Journal of Forest Research,* 131, 811–819. doi:10.1007/s10342-011-0554-9

Yu, X., Shi, P., Hui, C., Miao, L., Liu, C., Zhang, Q., & Feng, C. (2019). Effects of Salt Stress on the Leaf Shape and Scaling of Pyrus betulifolia Bunge. *Symmetry,* 11(8), 991. doi:10.3390/sym11080991

LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ REPRODUTSEERIMISEKS JA ÜLDSUSELE KÄTTESAADAVAKS TEGEMISEKS

Mina, Lota Marie Aaliste,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Lehtede fluktueeriv asümmeetria kui kaudne morfoloogiline meetod taimede stressi hindamiseks“, mille juhendaja on Eele Õunapuu-Pikas, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Lota Marie Aaliste

25.05.2022