

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

Marie Helen Väiku

Abstiishappe mõju hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) õhulõhede arengule

Bakalaureusetöö 12 EAP

Bioloogia ja elustiku kaitse

Juhendajad Ebe Merilo, PhD

Hanna Hõrak, PhD

TARTU 2021

INFOLEHT

Abstsiiishappe mõju hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) õhulõhede arengule

Õhulõhed on väikesed avased taimelehtede pinnal, mida kaudu toimub taimedel gaasivahetus väliskeskkonnaga. Abstsiiishape (ABA) on taimehormoon, mis muuhulgas osaleb taime õhulõhede sulgemises ja õhulõhede arengu reguleerimises. Käesoleva töö eesmärgiks on uurida kas ja kuidas mõjutab taime vanematelt lehtedelt tulev ABA signaal nooremate lehtede õhulõhede arengut. Selleks töödeldi *Arabidopsis thaliana* taime kolmandat, neljandat ja viiendat lehte erinevate ABA lahuste kontsentratsioonidega ja loendati hiljem õhulõhed ja epidermirakud 12. ja 13. lehelt. Katsetulemuste põhjal ei saa kindlalt väita, et ABA signaal oleks arenevaid õhulõhesid mõjutanud ja selle teada saamiseks peaks tegema veel edasisi katseid.

Märksõnad: abstsiiishape, õhulõhe, õhulõhede areng, õhulõhede tihedus, süsteemne signaal kood

CERCS: B310 Soontaimede füsioloogia

The effects of abscisic acid on stomatal development of *Arabidopsis thaliana*

Stomata are small pores on plant leaves, through which plants exchange gases with the surrounding environment. Abscisic acid (ABA) is a plant hormone that is involved in closing stomatal pores and regulating stomatal development. The aim of this thesis is to study the effect of ABA signal from older leaves on the stomatal development of younger, still developing leaves of the same plant. Third, fourth and fifth leaves of the *Arabidopsis thaliana wildtype* plant were treated with different concentrations of ABA and later, stomata and epidermal cells were counted on the 12th and 13th leaves. No conclusive answer was detected about the effect of ABA signal on stomatal development of younger leaves. More experiments are needed to reveal the potential systemic effect of ABA on stomatal development.

Key words: abscisic acid, stomata, stomatal development, stomatal density, systemic signalling

CERCS: B310 Soontaimede füsioloogia

SISUKORD

INFOLEHT	2
SISUKORD.....	3
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. Õhulõhed	6
1.2. Valguse mõju õhulõhede arengule	7
1.3. CO ₂ mõju õhulõhede arengule	7
1.4. Vee mõju õhulõhede arengule	7
1.5. Abstiisid	8
1.6. Abstiisid mõju õhulõhede arengule	8
1.4. Süsteemsed signaalid õhulõhede arengu reguleerijadena.....	8
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	10
2.1 Töö eesmärgid	10
2.2 Materjal ja meetodika	10
2.2.1 Taimede kasvatamine	10
2.2.2 Lehtede nummerdamine	10
2.2.3 Katsete läbiviimine	11
2.2.4 Andmete kogumine	12
2.2.5 Andmeanalüüs.....	13
2.3 Tulemused.....	13
2.3.1 ABA kontsentratsiooni mõju õhulõhede tihedusele arenevates lehtedes	13
2.3.2 ABA	14
kontsentratsiooni mõju õhulõheindeksile arenevates lehtedes	14
2.3.3 ABA kontsentratsiooni mõju õhulõhede arvule lehe kohta arenevates lehtedes	15
2.3.4 ABA kontsentratsiooni mõju arenevate lehtede pindaladele.....	16
2.4 Arutelu	17
2.4.1 ABA kontsentratsiooni mõju õhulõhede tihedusele.....	17
2.4.2 ABA kontsentratsiooni mõju õhulõheindeksile	18
2.4.3 ABA kontsentratsiooni mõju õhulõhede arvule lehe kohta.....	18
2.4.4 ABA kontsentratsiooni mõju lehtede pindalale	18
2.4.5 Üldised järeldused	18
2.4.6 Edasiseks uurimiseks	19
KOKKUVÕTE	20
RESÜMEE.....	21
TÄNUAVALDUSED.....	22

KIRJANDUSE LOETELU	23
LIHTLITSENTS	26

SISSEJUHATUS

Õhulõhed on mikroskoopilised avaused taimelehtede epidermis, mille kaudu toimub taime gaasivahetus väliskeskkonnaga. Õhulõhede kaudu siseneb taimedesse ümbritsevast õhust süsihappegaas, väljuvad veeaur ja hapnik. Õhulõhe moodustavad kaks sulgrakku ja nende vahel asuv poor. Sulgrakkude turgori muutmise abil toimub õhulõhede avanemine valguse ja madala süsihappegaasi kontsentratsiooni mõjul ning sulgumine pimeduse ja kõrge süsihappegaasi kontsentratsiooni mõjul.

Abstiishape (ABA) on taimehormoon, mis osaleb paljudes füsioloogilistes protsessides. Näiteks reguleerib ABA seemnete valmimist ja idanemist, vegetatiivset kasvu, juurekasvu, õhulõhede sulgumist ja õitsemist. ABA aitab taimedel vältida liigset veekadu osaledes veepuuduse korral õhulõhede sulgemises, aga ka põua korral õhulõhede tihedust vähendades.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, kas ja kuidas ABA signaal taime vanematelt lehtedelt mõjutab õhulõhede arengut sama taime noorematel lehtedel. Selle jaoks kanti taimede kolmanda, neljanda ja viienda lehe üla- ja alakülgedele pintsliga erinevate ABA kontsentratsioonidega lahuseid. Pärast loendati õhulõhesid ja epidermirakke samade taimede ABAga töötlemise ajal arenenud kaheteistkümnendalt ja kolmeteistkümnendalt lehelt. Töös uuriti õhulõhede tihedust, õhulõheindeksit, õhulõhede arvu lehe kohta ja lehtede pindala.

Tänapäeva muutuvus kliimas, kus veevarude vähenemine on aina aktuaalsem probleem on kasulik teada, kuidas taim reageerib põuatingimustes kasvamisele. Kuna ABA on hormoon, mis aitab taimel kuivades oludes toime tulla nii lühiajaliselt (õhulõhede sulgemine vähese veepotentsiaali korral) kui ka pikaajaliselt (õhulõhede arengu reguleerimine) on hea teada, kuidas see taime arengut süsteemselt mõjutab.

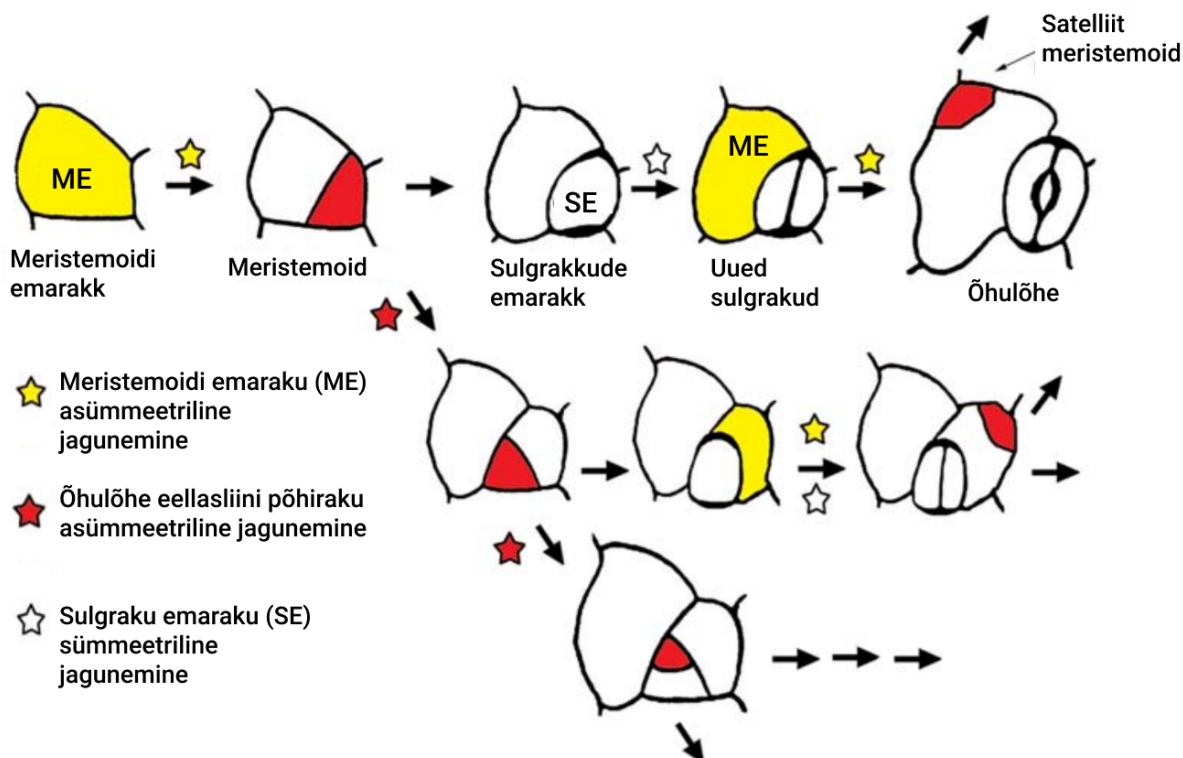
Töö koostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Õhulõhed

Õhulõhed on avased taimelehtede pinnal, mis on ümbritsetud kahest sulgrakust (Kirkham, 2014). Õhulõhede kaudu toimub gaasivahetus taime ja väliskeskkonna vahel, taimest liigub õhulõhede kaudu välja veeaur ja sisse CO₂ (Taiz, L. and Zeiger, E., 2003). Õhulõhed sulguvad kuivades tingimustes, pimedas ja kõrge CO₂ taseme korral (Shimazaki et al., 2007).

Arabidopsis thaliana õhulõhed arenevad välja, kui meristemoidi emaraku asümmeetrilise jagunemise teel tekivad meristemoid ja õhulõhe eellasliini põhirakk. Meristemoid diferentseerub edasi sulgrakkude emarakuks, mis omakorda jaguneb sümmeetriliselt, moodustades kaks sulgrakku. Õhulõhe eellasliini põhirakk võib veel jaguneda ja moodustada meristemoide, mis samuti diferentseeruvad õhulõhedeks. Kahe õhulõhe vahele jääb vähemalt üks rakk, sest mitme õhulõhe tekkimisel samast meristemoidi emarakust jaguneb õhulõhe eellasliini põhirakk asümmeetriliselt mitu korda, paigutades hiljem moodustuvad meristemoidid esialgselt vähemalt ühe raku kaugusele. (Nadeau & Sack, 2002)



Joonis 1. Tähtsaimad rakutüübid ja rakkude jagunemised *Arabidopsis thaliana* õhulõhde arengus. Meristemoidi emaraku asümmeetrilisel jagunemisel tekib meristemoid, mis diferentseerub sulgrakkude emarakuks, see omakorda jaguneb sümmeetriliselt ja moodustab kaks sulgrakku. Võib toimuda ka õhulõhe eellasliini põhiraku asümmeetriline jagunemine, mille tõttu moodustub veel meristemoide, mis võivad differentseeruda sulgrakkude emarakkudeks. Kollaselt on märgistatud meristemoidi emarakud ja punaselt meristemoidid. Joonist on muudetud. (Nadeau & Sack, 2002)

1.2. Valguse mõju õhulõhede arengule

Tugevama valguse toimel tõuseb taimedel õhulõhede tihedus. Kui tomatitaimi kasvatati tugevama ja nõrgema valgustusega kasvukappides, leiti, et madalama valgusega kapis kasvanud taimedel oli vähem õhulõhesid nii lehe ülemisel kui alumisel küljel. Sama efekti märgati ka erineva intensiivsusega loomuliku valguse käes kasvanud taimedel (Gay & Hurd, 1975).

Tugevama valguse toimel tõuseb taimedel ka õhulõheindeks. Valguse tugevusest tingitud epidermirakkude jagunemisi kontrollib peamiselt fotoretseptor fütokroom B (phyB) (Casson and Hetherington, 2010).

1.3. CO₂ mõju õhulõhede arengule

Kõrgema CO₂ kontsentratsiooniga tingimustes kasvanud taimede õhulõhede tihedus on väiksem (Qi and Torii, 2018), aga õhulõhed ise on suuremad, õhulõhede suurus ja tihedus on omavahel pöördvõrdelises seoses. Põhjuseks võib olla, et taimed, millel on väiksemad ja tihedamalt paiknevad õhulõhed, tulevad paremini toime madala CO₂ tasemega (Casson and Hetherington, 2010).

Kui võrreldi 200 aasta jooksul kogutud herbaarlehtede näidiseid parasvöötmes kasvavate puudelt leiti, et nende õhulõhede tihedus on selle aja peale vähenenud keskmiselt 40%, sama aja jooksul on CO₂ tase atmosfääris 21% tõusnud. Samuti on leitud, et kui kasvatada taimi vähendatud CO₂ tasemega keskkonnas, mis on sarnane CO₂ tasemega kõrgmägedes, siis suureneb katsetaimede õhulõhede tihedus sarnaselt mägedes kasvavate taimede omaga (Woodward, 1987).

1.4. Vee mõju õhulõhede arengule

Põuatingimused vähendavad kõrrelistel õhulõhede tihedust, ka *Arabidopsis thaliana* põhjustas osmootne stress õhulõhede tiheduse vähenemist (Quarrie & Jones, 1977; Kumari et al., 2014) Kui puuvilla (*Gossypium hirsutum L.*) kasvatati veedefitsiidis leiti, et stressis taimede õhulõhde rakukest oli paksem ja õhulõhede suurus oli väiksem kui kontrollgrupil. Võimalik, et väiksemad rakud suudavad kehvades veetingimustes paremini turgorit hoida. (Cutler et al., 1977)

Lehtede arenemise ajal kõrges suhtelises õhuniiskuses ($\geq 85\%$) kasvanud taimede lehed on kehvema veekao regulatsiooniga, kui nad satuvad kuivematesse tingimustesse. Pikemaajaline kõrge õhuniiskusega atmosfääris kasvamine võib taimedel põhjustada muutusi õhulõhede funktsioonis, tekitada suurenenud õhulõhesid ja tõsta õhulõhede arvu (Fanourakis et al., 2013). Näiteks kõrge suhtelise õhuniiskusega (90%) keskkonnas kasvanud roosidel oli

märkimisväärselt rohkem õhulõhesid, mis olid ka pikemad ja laiemad kui keskmises (70%) õhuniiskuses kasvanud taimed. (Torre et al., 2003)

1.5. Abstiishape

Abstiishape (ABA) on taimehormoon, mida sünteesitakse eelkõige veepuuduse korral – ABA aitab taimedel stressiolukorras paremini toime tulla (Qi & Torii, 2018). ABA reguleerib seemnete valmimist ja idanemist, vegetatiivset kasvu, juurekasvu, õhulõhede sulgumist, õitsemist, immuunvastust ja taime vananemist (Jigang Li et al., 2017). Abstiishapet sünteesitakse peaaegu kõigis rakkudes, milles on kloroplastid või amüloplastid ja seda leidub kõigis tähtsamates taimekudedes (Taiz, L. and Zeiger, E., 2003).

Kui taimed puutuvad kokku ebasoodsate keskkonnatingimustega, nagu põud, soolsus või liiga madal temperatuur, siis suureneb ABA kontsentratsioon vegetatiivsetes kudedes. ABA vähendab õhulõhesid sulgedes veekadu ja leevendab stressile reageerivaid geene aktiveerides stressist tingitud kahjustusi. Seega on kõrgem ABA kontsentratsioon stressiolukorras taimele kasulik, kuigi heades kasvutingimustes võib ABA taimekasvu inhibeerida (Xiong and Zhu, 2003).

1.6. Abstiishappe mõju õhulõhedele

Abstiishape (ABA) mõjutab õhulõhede liikumist ja arengut. Abstiishappega töötlemine vähendab nisul õhulõhede arvu lehe kohta (Quarrie & Jones, 1977), aga suurendab õhulõhede teket *Potamogeton perfoliatus* 'e veealustel lehtedel (Iida et al., 2016). Sellest võib järeldada, et abstiishappe mõju õhulõhede arengule võib olla liigiti erinev.

Arabidopsis thaliana mutantidel, millel on defektne ABA biosüntees või signalisatsioon, on õhulõhede tihedus suurem ja vigase ABA katabolismiga taimedel on leitud vähem õhulõhesid. (Tanaka et al., 2013) Sellest võib järeldada, et abstiishape represserib õhulõhede arengut (Qi & Torii, 2018). ABA inhibeerib *Arabidopsis thaliana* idulehtedel õhulõhede arengut ja põhjustab nendel suuremate epidermirakkude moodustumist, ABA puudusega mutandil *aba2-2* oli metsiktüübist rohkem õhulõhesid väiksemal idulehel ja ka väiksemad epidermirakud (Tanaka et al., 2013).

1.4. Süsteemsed signaalid õhulõhede arengu reguleerijatena

Arabidopsis thaliana täiskasvanud lehed suudavad edastada infot väliskeskkonna kohta noortele arenevatele lehtedele, mis kohandavad oma arengut vastavalt sellele infole. Katses töödeldi *Arabidopsis thaliana* täiskasvanud lehti kõrge kontsentratsiooniga CO₂-ga nii, et

nooremad lehed olid normaaltingimustel. CO₂-ga töödeldud taimede nooremate lehtede õhulõhede indeks ja tihedus olid väiksemad kui kontrollgrupil (Lake et al., 2001).

Väljaarenenud lehed, mis puutuvad rohkem keskkonnaga kokku, võivad mõjutada noorte arenevate lehtede õhulõhede arengut, sest noorte lehtede õhulõhede areng on võimaluste poolest paindlikum. Arvatakse, et arenevate lehtede õhulõhede arengut kontrollib vanematelt lehtedelt tulev signaal (Qi and Torii, 2018).

Kui taime täiskasvanud lehed on valguse eest varjutatud, arenevad uued lehed madalama õhulõheindeksiga, isegi kui noored arenevad lehed olid tugevama valguse käes (Casson and Hetherington, 2010).

On võimalik, et süsteemses signalisatsioonis osaleb fotoretseptor fütokroom B (phyB). Ainult täiskasvanud lehtedes phyB indutseerimine põhjustas tugeva valguse tingimustes phyB-ga mitte kokku puutunud nooremates lehtedes õhulõhede indeksi kasvu. PhyB mutandil sellist regulatsiooni ei toimunud (Casson and Hetherington, 2010).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Töö eesmärgiks oli uurida, kas ja milline süsteemne mõju on abstsiihappel *Arabidopsis thaliana* õhulõhede arengule. Täpsem uurimisküsimus oli kas kolmanda, neljanda ja viienda lehe regulaarsel abstsiihappesega töötlemisel nädala jooksul on mõju hiljem arenevate 12. ja 13. lehe õhulõhede tihedusele ja indeksile.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Taimede kasvatamine

Katses kasutati hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) metsiktüüpi taimi. Seemnete idanemise soodustamiseks hoiti neid enne külvamist kolm päeva külmkapis 4°C vees.

Kasvusubstraat koosnes kahest osast turbast ja ühest osast vermikuliidist (ruumala järgi), taimepotid pandi kandikule, millel sai mulda altniisutusega kasta. Veesuspensioonis seemned külvati 5-kaupa automaatpipetiga mulla pinnale. Idanedes olid taimepotid kaetud läbipaistva plastmassist kaanega, et tagada piisav õhuniiskus. Kaas eemaldati, kui taimed olid idanenud. Pärast idulehtede teket sai taimed pintsettidega harvendada, et igasse potti jääks kasvama üks taim. Taimi kasteti altniisutusega vähemalt kord nädalas, mullal ei lastud kastmiste vahel ära kuivada. Abstsiihappesega töötluks olid taimed valmis umbes 20 päeva vanuselt, siis kui neile oli kasvanud kolmas, neljas ja viies leht.

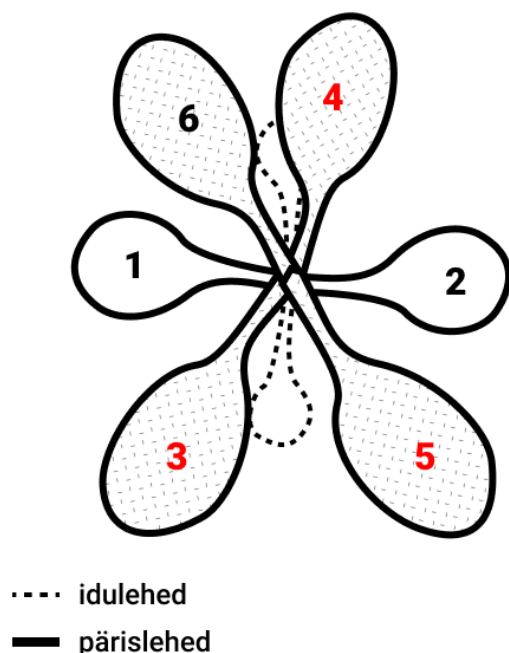
Esimese ja teise korduskatse taimed kasvasid kasvukappides, kus oli stabiilselt õhuniiskus 70%. Temperatuur oli kappides päeval 23°C ja öösel 20°C, päev kestis 10 ja öö 14 tundi. Esimese katse taimed kasvasid kapis Percival AR-66LX, teise katse taimed kapis Snijders Scientific MCA 1600-3LP6-E.

Kolmanda katse taimed kasvasid kasvuruumis, kus öösel oli õhuniiskus 35%-50% vahemikus ja temperatuur 19,5°C. Päeval oli temperatuur 24°C-28°C vahemikus ja õhuniiskus 30%-40% vahel, päev kestis 10 ja öö 14 tundi.

2.2.2 Lehtede nummerdamine

Katse läbi viimiseks oli vaja töödelda ABA lahusega 3., 4., ja 5. lehe mõlemaid külgi. Enne töötluks alustamist märgistati töödeldavad lehed niitidega, sidudes igale töödeldavale lehele ettevaatlikult ümber eri värvi niidid. Lehtede lugemist alustati esimesest lehest, mis ei olnud taime iduleht. Esimene ja teine leht on üldiselt ümarama kujuga ja väiksemad kui järgmisena kasvavad lehed (Farmer et al., 2013) ja asetsevad risti idulehtedega. Sealt edasi oli võimalik

leida üles kolmas leht, mis paiknes teise lehega vastastikku ja umbes 120 kraadise nurga all. Seeläbi sai ka aru, mis suunas on vaja lehti edasi lugeda, leheroseti kasvujärjekord võis olla kas päri-või vastupäeva. Lehti sai edasi järjestada, otsides eelneva lehega vastastikku kasvavaid lehti. Sama meetodiga lehtede lugemise abil sai andmete kogumise jaoks üles leida ka 12. ja 13. lehed.



Joonis 2. Skeem lehtede järjestumisest *Arabidopsis thaliana* leherosetis. Lehtedele on kantud numbrid nende kasvamise järjekorras, idulehti pole lugemisel arvesse võetud. Kolmas, neljas ja viies leht on punasega välja toodud. Originaaljoonis.

2.2.3 Katsete läbiviimine

Kui katsetaimedele oli kasvanud järjestuselt 3, 4 ja 5 leht, alustati 7 päeva kestva abstsiihappesega töötlusega; et süsteemne ABA signaal jõuaks 12. ja 13. lehtedeni nende arenemise ajal, pidi töötlus algama enne nende lehtede arenemist. Katsetaimede lehtede nii ülemisele kui alumisele küljele kanti pintsliga erinevate kontsentratsioonidega ABA lahust 7 päeva jooksul iga 24 tunni tagant.

Taimed olid enne töötluse algust grupeeritud kaheksasse gruppi, igas neist oli kuus sarnase suurusega taime. Kuueseid gruppe töödeldi 1 μM , 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM ABA lahustega, mis saadi nii, et milliQ vette lisati 5 μL soovivat kontsentratsioonist 1000 korda kangemat ABA lahust, kus ABA (Sigma-Aldrich) oli lahustunud etanoolis ja 0,5 μL detergentsilwet L-77 (Phytotechnology laboratories, lõppkontsentratsioon 0,01%). Ilma ABAta kontroll-lahusesse lisati kontsentreeritud ABA lahuse asemel asemel 5 μL etanooli.

Esimeses katses töödeldi taimi pärast kasvukambri välja võtmist, alustades kontroll-lahusega ja lõpetades 100 µM ABA lahusega. Pärast töötuse lõppu pandi taimed kohe kasvukappi tagasi. Teise ja kolmanda katse taimi hoiti 30 minutit enne ja pärast töötust kandiku all hämaras, et kõik taimed jõuaks enne töötust õhulõhed sulgeda ja erinevate kontsentratsioonidega lahustega töötlemise järjestust muudeti iga päev.

Katseid tehti kokku kolm, kaks esimest kasvasid stabiilsema keskkonnaga kasvukappides, kolmanda katse taimed kasvasid kasvuruumis, kus suhteline õhuniiskus ja temperatuur kõikusid rohkem.

2.2.4 Andmete kogumine

Kui katsetaimedel hakkas kasvama õievars, võeti 12. ja 13. lehelt lehejäljendid. Selleks kasutati hambasilikooni Xantopren L blue ja aktivaatorit Universal Plus. Jäljendisegu segati aktivaatoriga kokku ja segu määrati lehtede alaküljele. Seejärel lasti segul täielikult kuivada (15-20 minutit) ja jäljend eemaldati lehelt. Jäljendile kanti läbipaistvat küünelakki, pärast küünelaki kuivamist (10-15 minutit) kleebiti selle pinnale läbipaistev teip, millega sai küünelaki jäljendi pinnalt ära tõmmata ja kleepida alusklaasile.

Kasutades Zeiss Discovery.V20 stereomikroskoopi tehti lehtede keskosast leherootsu lähedalt pildid, mis olid õhulõhede lugemise hõlbustamiseks mitmekihilised. Pildistamiseks kasutati programmi Zen 3.2. pro. Pildistatava ala suurus oli ligikaudu 300*600 µm. Õhulõhede ja epidermirakkude lugemiseks kasutati rakendust ImageJ (versioon 1.53). Programmis määrati tehtud pildi täpne pindala ja loeti sellel kokku õhulõhed. Epidermirakkude lugemiseks selekteeriti vaba käega umbes 70% pildi täispindalast, inverteeriti selektsiooni värvid ja loeti sellelt alalt kokku epidermirakud. Loeti kokku kõik nähtavad õhulõhed ja epidermirakud, mis olid uuritava alal vähemalt 50% ulatuses sees. Saadud andmete põhjal sai arvutada õhulõhede ja epidermirakkude arvud pindalaühiku kohta ja õhulõheindeksi (õhulõhede arv jagatud õhulõhede ja epidermirakkude summaga samal pindalal).

Lehepindalade teada saamiseks mõõdeti lehtedest 12. ja 13. tehtud preparaate joonlauuga. Ligikaudse pindala teada saamiseks oli vaja mõõta lehe pikkus ja laius lehe keskroost lehe servani. Pindala arvutamiseks kasutati ellipsi pindala valemit $S = \pi * a * b$, kus a oli lehe laius keskosast servani ja b oli pool lehe pikkusest.

2.2.5 Andmeanalüüs

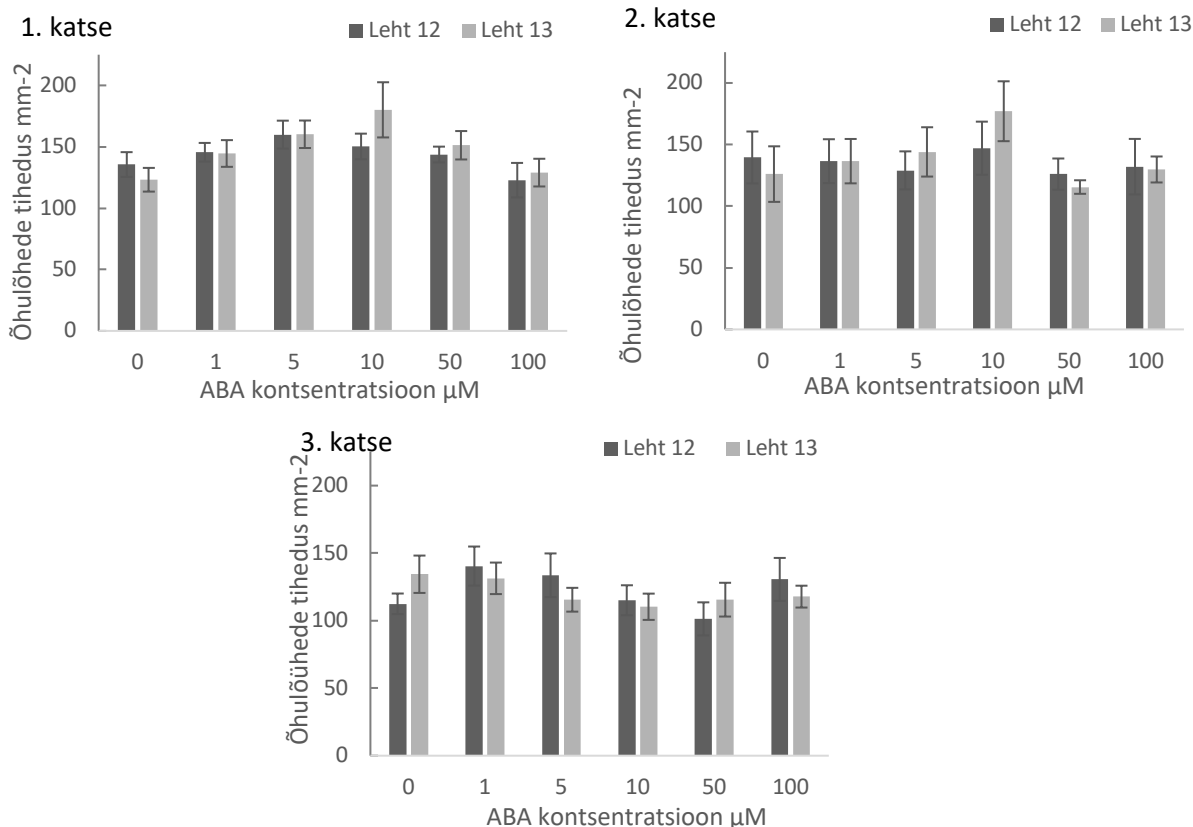
Andmete statistiline analüüs tehti programmiga Statistica (versioon 7.1.), kus analüüsiti eraldi lehtede 12 ja 13 andmeid ja kasutati ühefaktorilist ANOVAt, *post-hoc* testina kasutati Tukey testi. Tulemused loeti statistiliselt oluliseks, kui nende p-väärtus oli väiksem kui 0,05 ($p < 0,05$).

2.3 Tulemused

Katsetes töödeldi *Arabidopsis thaliana* 3., 4. ja 5. lehtede ülemisi ja alumisi külgi erinevate kontsentratsioonidega ABA lahustega ja uuriti, kuidas need töötlusted mõjutavad õhulõhede tihedust, indeksit, õhulõhede arvu lehe kohta ja lehepindala samade taimede 12. ja 13. lehtedel. Tulemused näitavad, kas ja kuidas ABA signaal vanematelt lehtedelt mõjutab taime arenevaid lehti.

2.3.1 ABA kontsentratsiooni mõju õhulõhede tihedusele arenevates lehtedes

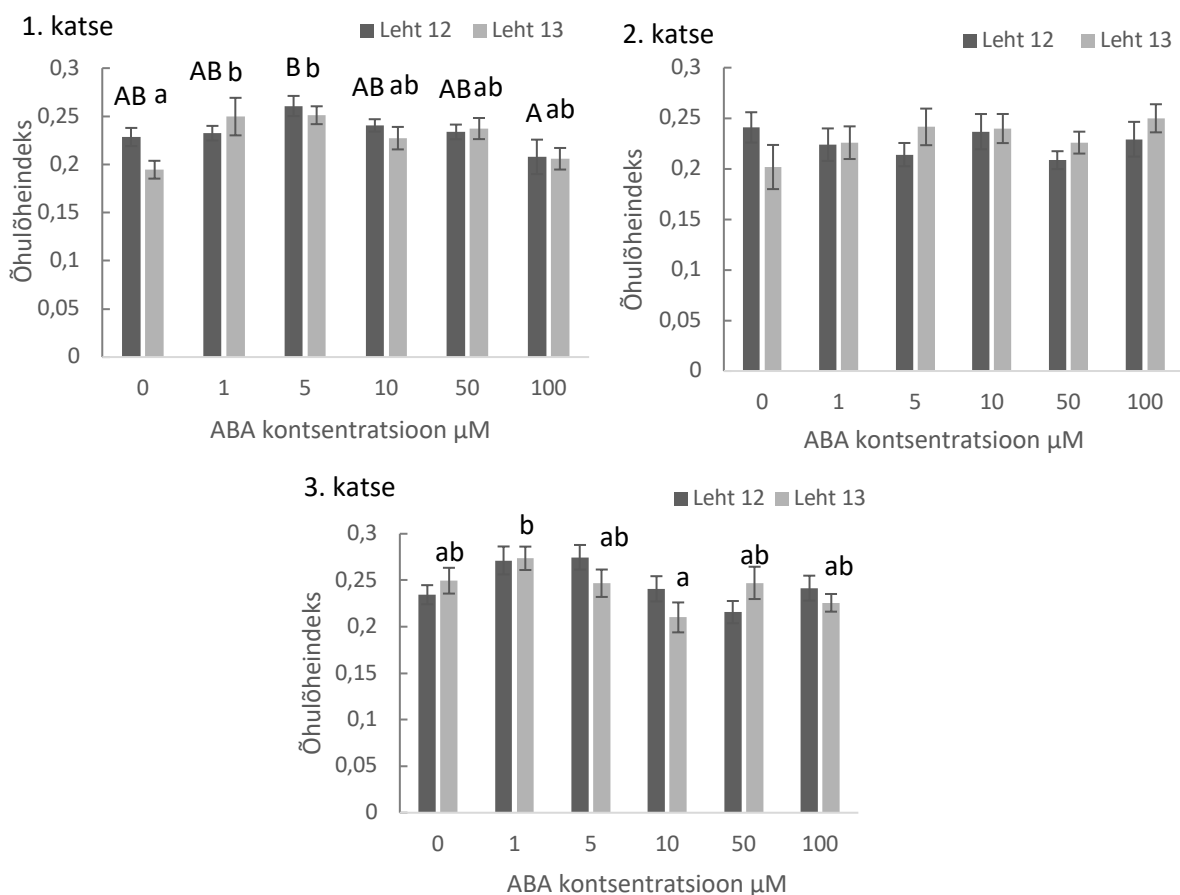
Erinevate ABA kontsentratsioonidega töötlus ei avaldanud õhulõhede tihedusele mm² kohta statistiliselt olulist mõju. Nii esimese kui teise. korduskatse puhul, kus taimed kasvasid stabiilsema keskkonnaga kasvukappides, oli 10 µM kontsentratsiooniga ABAGA töödeldud taimede 13. lehtede õhulõhede tihedus teistest kõrgem, aga mitte statistiliselt oluliselt erinev teistest gruppidest. Kolmanda katse taimede õhulõhede tihedused olid erinevate ABA kontsentratsioonide puhul väga sarnased.



Joonis 3. Erinevate ABA kontsentratsioonidega töötlemise mõju arenevate lehtede õhulõhede tihedusele. Katses töödeldi *Arabidopsis thaliana* 3., 4. ja 5. lehe ülemisi ja alumisi külgi ABA lahustega nädala vältel ning hiljem määrati 12. ja 13 lehe õhulõhede tihedus. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga. Joonistel on toodud keskmised \pm SEM (Standard Error of the Mean) valimi suurus $n=8$.

2.3.2 ABA kontsentratsiooni mõju õhulõheindeksile arenevates lehtedes

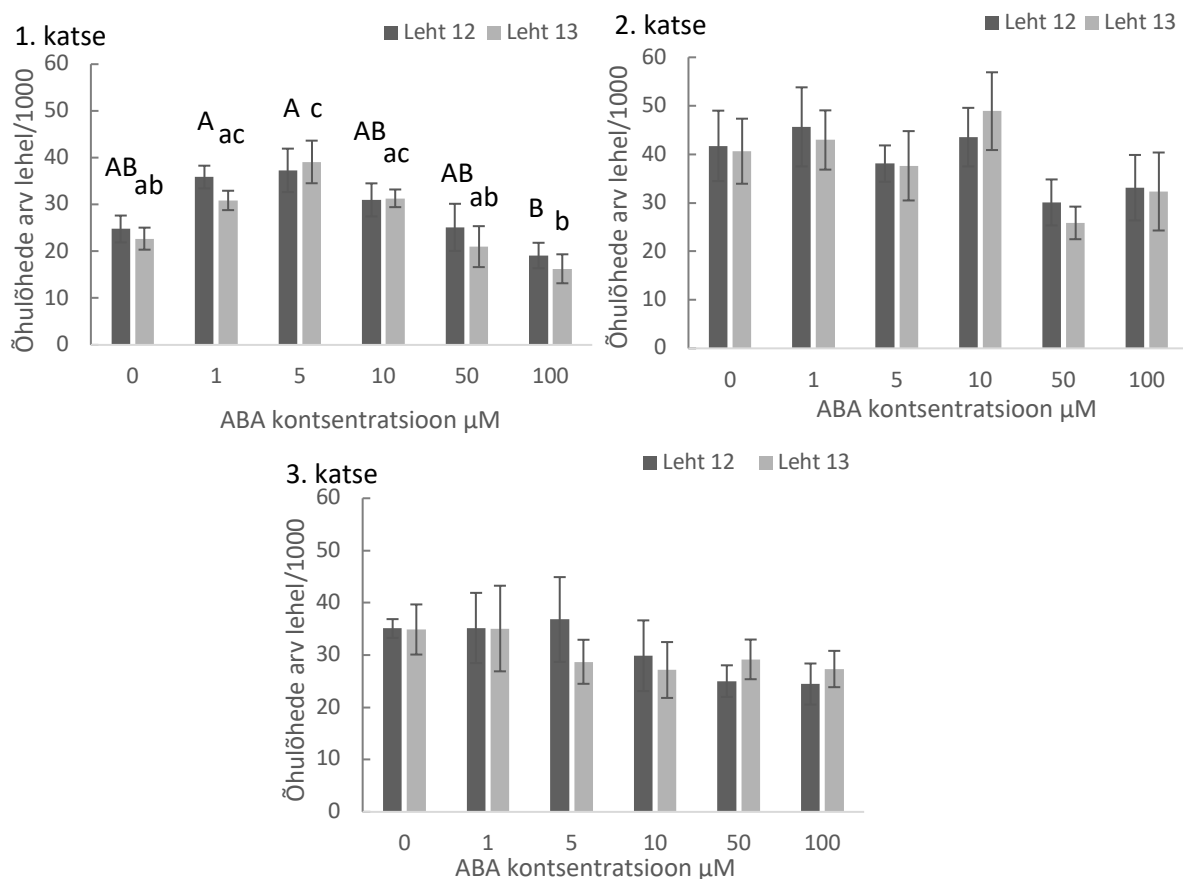
Õhulõheindeksi puhul oli statistiliselt olulisi erinevusi gruppide vahel esimeses katses nii 12. kui ka 13. lehe ja kolmandas katses 13. lehe tulemustes. Esimeses katses olid 12. lehe puhul staatilistiselt oluliselt erinevad 5 μM ja 100 μM kontsentratsiooniga töödeldud taimed. Lehe 13 puhul oli 1 ja 5 μM ABAGA töödeldud taimede 13. lehtedel õhulõheindeks statistiliselt oluliselt kõrgem kui kontrolltaimedel. Kolmandas katses oli 1 μM ABAGA töödeldud taimede 13. lehtedel statistiliselt oluliselt kõrgem õhulõheindeks kui 10 μM ABAGA töödeldud taimede 13. lehtedel.



Joonis 4. Erinevate ABA kontsentratsioonidega töötlemise mõju arenevate lehtede õhulõheindeksile. Katses töödeldi *Arabidopsis thaliana* 3., 4. ja 5. lehe ülemisi ja alumisi külgi ABA lahustega nädala vältel ning hiljem määrati 12. ja 13 lehe õhulõheindeks. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja *post-hoc* testina kasutati Tukey testi, üksteisest statistiliselt erinevad grupid on tähistatud tähtedega (leht 12 - suurtähed, leht 13 - väiketähed). Joonistel on toodud keskmised \pm SEM (Standard Error of the Mean), valimi suurus $n=8$

2.3.3 ABA kontsentratsiooni mõju õhulõhede arvule lehe kohta arenevates lehtedes

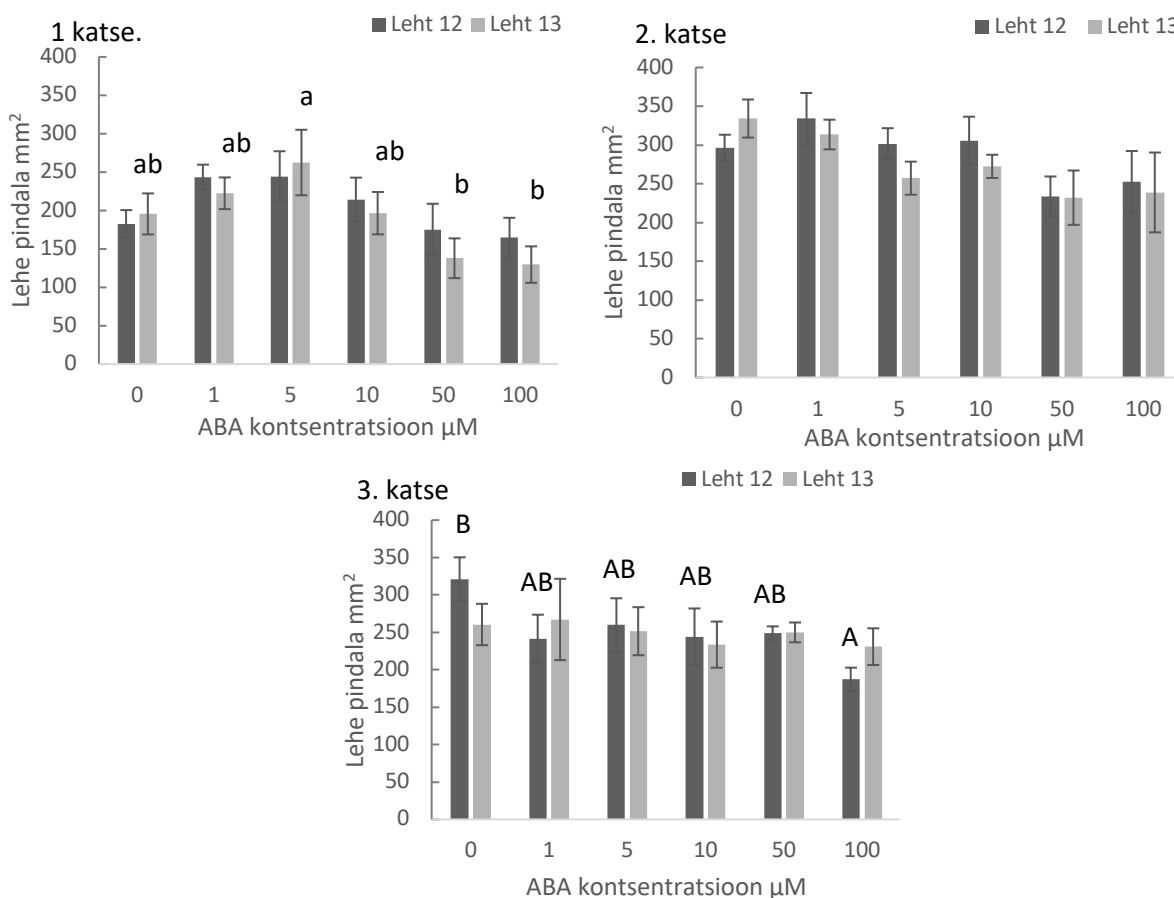
Õhulõhede arvus lehe kohta olid statistiliselt olulised erinevused 1. korduskatses nii 12. kui 13. lehel. 13. lehe puhul oli kõige rohkem õhulõhesid lehe kohta taimedel, mida oli töödeldud 5 μM kontsentratsiooniga ABA lahusega. 12. lehel olid 1 μM ja 5 μM kontsentratsiooniga lahusega töödeldud lehtede tulemused omavahel sarnased ja neil oli lehe kohta rohkem õhulõhesid kui kontroll-lahusega töödeldud grupis, aga vahe polnud piisavalt suur, et olla statistiliselt oluline. 13. lehtede puhul oli 5 μM ABAga töödeldud taimedel rohkem õhulõhesid lehe kohta kui kontrollgrupi taimedel ning samuti rohkem kui 50 ja 100 μM ABAga töödeldud taimedel. Nii 12. kui 13. lehtede puhul oli kontroll-lahuse ja 50 μM lahusega töödeldud lehtede õhulõhede hulgad omavahel sarnased. Kõige vähem õhulõhesid kogu lehe peale oli tekkinud 100 μM lahusega töödeldud taimede lehtedel.



Joonis 5. Keskmise õhulõhede arv lehe kohta tuhandetes sõltuvalt ABA kontsentratsioonist. Joonisel on eraldi välja toodud 12. ja 13. leht. Joonised on nummerdatud katsete sooritamise järjekorras. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja *post-hoc* testina kasutati Tukey testi, üksteisest statistiliselt erinevad grupid on tähistatud tähtedega (leht 12 - suurtähed, leht 13 - väiketähed). Joonistel on toodud keskmised \pm SEM (Standard Error of the Mean), valimi suurus $n=8$.

2.3.4 ABA kontsentratsiooni mõju arenevate lehtede pindaladele

Lehtede pindalad olid statistiliselt üksteisest erinevad katsetes 1 ja 3. Esimeses katses olid suuruste vahel statistilised erinevused 13. lehel, kolmandas katses 12. lehel. Esimeses katses olid lehtede pindalad kõige suuremad 5 μM ABA lahusega töödeldud taimedel, sellest nõrgemate ja tugevamate kontsentratsioonide lehepindalad olid väiksemad. Kolmandas katses olid 100 μM ABA lahusega töödeldud taimede lehed statistiliselt oluliselt väiksemad kui kontroll-lahusega töödeldud taimedel



Joonis 6. Keskmise lehtede pindala sõltuvalt ABA kontsentratsioonist. Joonisel on eraldi välja toodud 12. ja 13. leht. Joonised on nummerdatud katsete sooritamise järjekorras. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja *post-hoc* testina kasutati Tukey testi, üksteisest statistiliselt erinevad grupid on tähistatud tähtedega (leht 12 - suurtähed, leht 13 - väiketähed). Joonistel on toodud keskmised \pm SEM (Standard Error of the Mean), valimi suurus $n=8$.

2.4 Arutelu

Katse eesmärk oli teada saada, kas vanematest lehtedest noorematesse liikuv ABA signaal mõjutab nooremate lehtede õhulõhede arengut. Katseid võrreldes on näha, et need pole omavahel piisavalt sarnased, et saaks veel teha selgeid järeldusi. Katsetevahelised erinevused võivad olla põhjustatud kasvutingimustest ja meetoodikast. Esimese katse tulemused võivad järgmistest erineda näiteks seetõttu, et siis ei tehtud taimede ABA-ga töötlemise eelset ja järgset 30 minutilist stabiliseerimist hämaras, nagu teise ja kolmanda katse puhul. Lisaks olid esimese ja teise korduskatse taimede kasvutingimused kolmanda katse taimedest erinevad.

Kasvukappides kasvanud esimese ja teise katse taimed olid kasvanud kõrgema suhtelise õhuniiskusega keskkonnas (70%) ja kappides esines ka vähem temperatuurikõikumisi – päevane õhutemperatuur oli 23°C ja öine 20°C. Kasvuruumi, kus kasvasid kolmanda katse taimed, keskkond oli vähem stabiilne. Seal oli öine õhuniiskus 35% - 50%, päevane kõikus 30%-40% vahel. Öine temperatuur oli 19,5°C, päeval oli see 24°C- 28°C. Õhuniiskuse erinevused võivad näiteks mõjutada õhulõhede hulka, sest kõrge õhuniiskuse korral areneb taimelehtedele rohkem õhulõhesid (Torre et al., 2003). Antud katse puhul ei olnud esimese ja teise katse õhulõhede tiheduse ja õhulõhede arvu lehe kohta tulemustes võrreldes kolmanda katsega märkimisväärset vahet. Roosid, mille lehtedel arenes õhuniiskuse mõjul rohkem õhulõhesid, kasvasid kõrgemas suhtelises õhuniiskuses (90%) (Torre et al., 2003), seega on võimalik, et õhuniiskuse tase hakkab taime õhulõhede arengut mõjutama alles teatud tasemest. Kindlamate järelduste tegemiseks, kas kasvutingimused mõjutasid tulemusi oleks vaja teha korduskatseid sarnaste tingimustega ja neid omavahel võrrelda.

2.4.1 ABA kontsentratsiooni mõju õhulõhede tihedusele

Vigase ABA biosünteesiga mutantidel on täheldatud kõrgemat õhulõhede tihedust (Léon-Kloosterziel et al., 1996; Bradford et al., 1983), samuti on leitud, et *Arabidopsis thaliana* ABA-defitsiitse *aba-1* mutandi õie kandlehtedel paiknevad õhulõhed tihedamalt kui metsiktüübil (Razem & Davis, 2002). Sellest saab järeldada, et ABA süsteemse signaali mõjul võiks kõrgemate ABA kontsentratsioonidega töödeldud taimedel õhulõhede tihedus mm⁻² kohta olla väiksem kui väiksemate kontsentratsioonidega töödeldutel. Minu katse tulemustes ei olnud õhulõhede tiheduse puhul statistiliselt olulisi erinevusi erinevate ABA kontsentratsioonide vahel. Tulemuse põhjal võib järeldada, et antud katses ei mõjutanud ABA signaal vanematelt lehtedelt hiljem arenenud lehtede õhulõhede tihedust.

2.4.2 ABA kontsentratsiooni mõju õhulõheindeksile

Kui võrreldi *Arabidopsis thaliana* metsiktüüpi taime ja ABA defektse mutandi *aba-1* õie kandlehtedel õhulõheindekseid, leiti, et õhulõhede ja epidermirakkude omavaheline suhe jäi konstantseks ja metsiktüübi ja mutandi vahel statistilist erinevust ei leitud (Razem & Davis, 2002). Sellest võib järeldada, et ABA kontsentratsioon ei pruugi õhulõheindeksit mõjutada. Minu katsete tulemustes olid esimese katse 12. ja 13. lehtedel ja kolmanda katse 13. lehtede tulemustes statistiliselt olulised erinevused mõnede gruppide vahel, aga õhulõheindeks ei kasvanud ega langenud süstemaatiliselt koos ABA kontsentratsiooniga. See võib tähendada, et õhulõhede ja epidermirakkude omavaheline suhe ei ole otseselt ABA kontsentratsioonist sõltuv.

2.4.3 ABA kontsentratsiooni mõju õhulõhede arvule lehe kohta

Õhulõhede arvul lehe kohta oli statistiliselt oluline erinevus ainult esimeses katses nii 12. kui ka 13. lehel. Kõige rohkem õhulõhesid lehe kohta oli taimedel, mida oli töödeldud 1 μM ja 5 μM ABA lahusega, kõige vähem 100 μM lahusega töödeldud lehtedel. Ka lehtede pindaladel oli sarnane korrelatsioon ABA kontsentratsiooniga. See võib tähendada, et madal ABA tase võib mõnikord lehekasvu soodustada ja kõrge seda takistada.

2.4.4 ABA kontsentratsiooni mõju lehtede pindalale

Lehe välispidielt ABAga töötlemine inhibeerib oa (*Phaseolus vulgaris*) rakkude kasvu (Van Volkenburgh & Davies, 1983). Käesolevas katses mõõdeti nende lehtede pindalaid, mida otseselt ABAga ei töödeldud ja leitistatistiliselt olulised erinevused esimese katse 13. lehe pindaladel ja kolmanda katse 12. lehe pindalade vahel. Mõlema katse puhul olid kõrgema kontsentratsiooniga töödeldud taimede lehepindalad väiksemad, aga esimeses katses olid kõige suurema pindalaga 5 μM kontsentratsiooniga töödeldud taimede lehed. ABA on mõju ka kogu taime kasvule, näiteks reguleerib ABA taime kasvamist ebasoodsate keskkonningimuste korral (Himmelbach et al., 1998). Kuna kõrgema ABA kontsentratsiooniga lahustega töödeldud taimede uuritavad lehed olid väiksema pindalaga on võimalik, et ABA töötlus mõjutab nende lehtede suurust süsteemse signaali kaudu. Täielikuma info saamiseks võiks mõõta ka kogu taime pindala, et teada saada, kas kasv oli mõjutatud ainult nendel lehtedel, mis ABA töötamise ajal välja arenemas olid, või mõjutas ABA ka pikemaajaliselt taime kasvamist.

2.4.5 Üldised järeldused

Praeguste tulemuste põhjal ei saa kindlalt järeldada, et töödeldud lehtedest saabunud signaal oleks mõjutanud 12. ja 13. lehtedel õhulõhede arengut. Kolme katse võrdluses olid tulemused üpris erinevad, katseid korrates ei saadud statistiliselt olulisi ($p < 0,05$) erinevusi, mis oleks

omavahel sarnased. Erinevused võisid olla ka põhjustatud sellest, et katseskeem ja taimede kasvutingimused olid üksteisest erinevad. Näiteks võis tulemuste erinevus tulla sellest, et teise ja kolmanda katse ajal hoiti taimi pool tundi enne ja pärast ABAga töötlemist hämaras, samas kui esimese katse ajal sellist aklimatiseerimist polnud. Seega võisid esimese katse ajal taimede õhulõhed töötlemise ajal rohkem lahti olla, sest need polnud hämaras seisnud. Selleks, et teada saada, kas see mõjutas katse tulemust, peaks katset samamoodi uuesti kordama.

2.4.6 Edasiseks uurimiseks

Edaspidi oleks hea siin töös olevaid katseid korrata, et saada teada, kuidas näiteks kasvutingimuste erinevused ja enne töötlust taimede stabiliseerimine katsetulemusi mõjutasid. Samuti oleks huvitav võtta õhulõhede jäljendeid nii uuritava lehe üla- kui ka alaküljelt, et saada teada, kas ABA mõjutab lehe peal asuvaid õhulõhesid teistmoodi kui lehe alaküljel olevaid. Võiks mõõta ka õhulõhede suurust. Metsiktüüpi *Arabidopsis thaliana* taimed võiks võrdlusesse panna mõne mutandiga, millel pole ABA tundlikkust.

ABA signaali kohta rohkem teada saamiseks võiks proovida töödelda ABA lahusega suuremat lehepinda. Kui töödelda ABA lahusega kõiki lehti peale noorte arenevate lehtede, siis oleks töödeldav pind suurem ja ABA signaal võiks sellest tulenevalt tugevam olla ja hiljem arenevatele lehtedele rohkem mõju avaldada.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti, kas *Arabidopsis thaliana* vanemate lehtede ABAga töötlemine saadab signaali edasi ka noorematele, alles arenevatele lehtedele ja kuidas see mõjutab õhulõhede arengut. Selle uurimiseks kanti erinevate kontsentratsioonidega ABA lahust taimede kolmandale, neljandale ja viiendale lehele ja tehti jäljendid 12. ja 13. lehtedest. Uuriti ABA mõju õhulõhede tihedusele ja indeksile, lehtede pindalale ja õhulõhede arvule kogu lehel.

Katsetest saadud tulemuste põhjal ei saa teha kindlat järeldust, et vanematelt lehtedelt saadud ABA signaal oleks mõjutanud hiljem arenenud lehti. Kolme katset võrreldes ei leitud omavahel sarnaseid statistiliselt olulisi tulemusi. Järelduste tegemiseks võiks katseid samasuguste tingimustega veel korrata, et saada teada, kas tulemuste erinevused võisid olla põhjustatud teise ja kolmanda katse taimede enne ja pärast töötlust hämaras stabiliseerimisest või kasvutingimuste erinevusest esimese kahe ja kolmanda katse vahel.

RESÜMEE

The effects of abscisic acid on stomatal development of *Arabidopsis thaliana*

Marie Helen Väiku

Summary

Stomata are microscopic pores bordered by a pair of specialized epidermal cells called guard cells, which have the ability to open and close the stomata to mediate gas exchange. Stomata open in response to light and low concentrations of CO₂ and close in response to darkness and high concentrations of CO₂. Plant hormones and environmental cues can influence stomatal development to optimize photosynthesis and water-use.

ABA is a plant hormone that regulates many physical processes, such as plant growth, development and stress responses. ABA helps plants avoid excessive water loss by closing the stomata in drought conditions and regulating stomatal development.

The aim of this research was to analyze the effect of ABA signaling on the stomata of still developing leaves. To test this, different concentrations of ABA solutions were applied to the abaxial (top) and adaxial (bottom) sides of the third, fourth and fifth leaves of *Arabidopsis thaliana* plants every 24 hours for 7 days. When the plants matured, impressions were made of the 12th and 13th leaves of the plants using dental silicone. Then the stomata and epidermal cells were counted and used to calculate stomatal density, stomatal index, the number of stomata per leaf and the leaves were measured to find out the approximate area of the leaves.

The results of this research were not conclusive and more research is needed to know for certain if ABA signals from existing leaves can affect the stomatal development of still growing leaves. For now, any results of statistical significance did not match between the three repeats of the experiments. Furthermore, since growth conditions and the method of ABA application varied between experiments, more testing would be required to know how much the growth conditions and application methods affect the results.

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin sügavalt tänada oma juhendajaid Ebe Merilot ja Hanna Hõrakut kannatlikkuse, heade ideede ja abi eest töö koostamisel ja planeerimisel. Samuti Tahaksin tänada ülejäänud laborirahvast sooja vastuvõtu eest ja ka selle eest, et iga tekkiva küsimuse puhul oli olemas keegi, kellel oli sellele põnev ja läbimõeldud vastus.

KIRJANDUSE LOETELU

- Bradford, K. J., Sharkey, T. D., & Farquhar, G. D. (1983). Gas Exchange, Stomatal Behavior, and δC Values of the flacca Tomato Mutant in Relation to Abscisic Acid. *Plant Physiology*, 72(1), 245–250. <https://doi.org/10.1104/pp.72.1.245>
- Casson, S. A., & Hetherington, A. M. (2010). Environmental regulation of stomatal development. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(1), 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.08.005>
- Cutler, J. M., Rains, D. W., & Loomis, R. S. (1977). The Importance of Cell Size in the Water Relations of Plants. *Physiologia Plantarum*, 40(4), 255–260. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1977.tb04068.x>
- Fanourakis, D., Heuvelink, E., & Carvalho, S. M. P. (2013). A comprehensive analysis of the physiological and anatomical components involved in higher water loss rates after leaf development at high humidity. *Journal of Plant Physiology*, 170(10), 890–898. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.01.013>
- Farmer, E., Farmer, E., Mousavi, S., & Lenglet, A. (2013). Leaf numbering for experiments on long distance signalling in Arabidopsis. *Protocol Exchange*. <https://doi.org/10.1038/protex.2013.071>
- Gay, A. P., & Hurd, R. G. (1975). THE INFLUENCE OF LIGHT ON STOMATAL DENSITY IN THE TOMATO. *New Phytologist*, 75(1), 37–46. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1975.tb01368.x>
- Himmelbach, A., Iten, M., & Grill, E. (1998). Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 353(1374), 1439–1444.
- Iida, S., Ikeda, M., Amano, M., Sakayama, H., Kadono, Y., & Kosuge, K. (2016). Loss of heterophylly in aquatic plants: Not ABA-mediated stress but exogenous ABA treatment induces stomatal leaves in *Potamogeton perfoliatus*. *Journal of Plant Research*, 129(5), 853–862. <https://doi.org/10.1007/s10265-016-0844-x>

- Kirkham, M. B. (2014). Chapter 24—Stomatal Anatomy and Stomatal Resistance. M. B. Kirkham (Toim), *Principles of Soil and Plant Water Relations (Second Edition)* (lk 431–451). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420022-7.00024-0>
- Kumari, A., Jewaria, P. K., Bergmann, D. C., & Kakimoto, T. (2014). Arabidopsis reduces growth under osmotic stress by decreasing SPEECHLESS protein. *Plant & Cell Physiology*, *55*(12), 2037–2046. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu159>
- Lake, J. A., Quick, W. P., Beerling, D. J., & Woodward, F. I. (2001). Signals from mature to new leaves. *Nature*, *411*(6834), 154–154. <https://doi.org/10.1038/35075660>
- Léon-Kloosterziel, K. M., Gil, M. A., Ruijs, G. J., Jacobsen, S. E., Olszewski, N. E., Schwartz, S. H., Zeevaart, J. A., & Koornneef, M. (1996). Isolation and characterization of abscisic acid-deficient Arabidopsis mutants at two new loci. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *10*(4), 655–661. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1996.10040655.x>
- Li, Jigang, Wu, Y., Xie, Q., & Gong, Z. (2017). 5—Abscisic acid. Jiayang Li, C. Li, & S. M. Smith (Toim), *Hormone Metabolism and Signaling in Plants* (lk 161–202). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00005-0>
- Nadeau, J. A., & Sack, F. D. (2002). Stomatal Development in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, *1*. <https://doi.org/10.1199/tab.0066>
- Qi, X., & Torii, K. U. (2018). Hormonal and environmental signals guiding stomatal development. *BMC Biology*, *16*(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0488-5>
- Quarrie, S., & Jones, H. (1977). Effects of Abscisic Acid and Water Stress on Development and Morphology of Wheat. *Journal of Experimental Botany*, *28*, 192–203. <https://doi.org/10.1093/jxb/28.1.192>
- Razem, F. A., & Davis, A. R. (2002). Stomatal frequency, maturity and index on developing bracts of four abscisic acid mutants and wild-type plants of Arabidopsis thaliana.

- Environmental and Experimental Botany*, 48(3), 247–256.
[https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(02\)00039-4](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00039-4)
- Shimazaki, K., Doi, M., Assmann, S. M., & Kinoshita, T. (2007). Light Regulation of Stomatal Movement. *Annual Review of Plant Biology*, 58(1), 219–247.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105434>
- Taiz, L. and Zeiger, E., T. (2003). Taiz, L. and Zeiger, E. Plant physiology. 3rd edn. *Annals of Botany*, 91(6), 750–751. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg079>
- Tanaka, Y., Nose, T., Jikumaru, Y., & Kamiya, Y. (2013). ABA inhibits entry into stomatal-lineage development in Arabidopsis leaves. *The Plant Journal*, 74(3), 448–457.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12136>
- Torre, S., Fjeld, T., Gislørød, H. R., & Moe, R. (2003). Leaf Anatomy and Stomatal Morphology of Greenhouse Roses Grown at Moderate or High Air Humidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(4), 598–602.
<https://doi.org/10.21273/JASHS.128.4.0598>
- Van Volkenburgh, E., & Davies, W. J. (1983). Inhibition of Light-Stimulated Leaf Expansion by Abscisic Acid. *Journal of Experimental Botany*, 34(7), 835–845.
<https://doi.org/10.1093/jxb/34.7.835>
- Woodward, F. I. (1987). Stomatal numbers are sensitive to increases in CO₂ from pre-industrial levels. *Nature*, 327(6123), 617–618. <https://doi.org/10.1038/327617a0>
- Xiong, L., & Zhu, J.-K. (2003). Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant Physiology*, 133(1), 29–36. <https://doi.org/10.1104/pp.103.025395>

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Marie Helen Väiku

Sünnikuupäev (24.05.1998)

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

Abstiishappe mõju hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) õhulõhede arengule,

mille juhendajad on Ebe Merilo ja Hanna Hõrak,

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, 30.05.2021