

Tartu Ülikool

Loodus- ja tehnoloogiateaduskond

Ökoloogia- ja maateaduste instituut

Linda Rusalepp

SUURENEVA ÕHUNIISKUSE JA SELLEGA KAASNEVATE
ÖKOSÜSTEEMIMUUTUSTE MÕJU KANDILISE NAISTEPUNA (*Hypericum maculatum*
Crantz) SEKUNDAARSELE METABOLISMILE

Magistritöö (30 EAP)

Juhendaja: TÜ ÖMI vanemteadur Anu Söber

Tartu 2015

SISUKORD

1. SISSEJUHATUS	3
1.1. Naistepuna keemiline koostis	4
1.1.1. Keemilise koostise varieeruvus	6
1.2. Sekundaarsete metaboliitide sünteesi mõjutavad tegurid.....	7
1.2.1. Veestressi mõju.....	9
1.2.2. Temperatuuri mõju	10
1.2.3. Valgustingimuste mõju.....	11
1.2.4. Kõrgendatud CO ₂ mõju	12
1.2.5. Toitainete kättesaadavuse mõju.....	12
1.3. Magistritöö eesmärk	14
2. METOODIKA	15
2.1. FAHM katse kirjeldus	15
2.2. Uurimismaterjal.....	15
2.3. Proovide ettevalmistus	17
2.4. Keemiline analüüs	18
2.5. Statistiline analüüs.....	20
3. TULEMUSED	21
3.1. FAHM katse mõju	21
3.2. Niiskuse mõju (VPD ja SWP).....	24
3.3. Valguse mõju.....	26
3.4. Mulla keemilise koostise mõju.....	27
4. ARUTELU.....	32
5. KOKKUVÕTE	36
6. SUMMARY.....	37
7. TÄNUAVALDUSED.....	39
8. KASUTATUD KIRJANDUS.....	40
9. LISAD.....	47

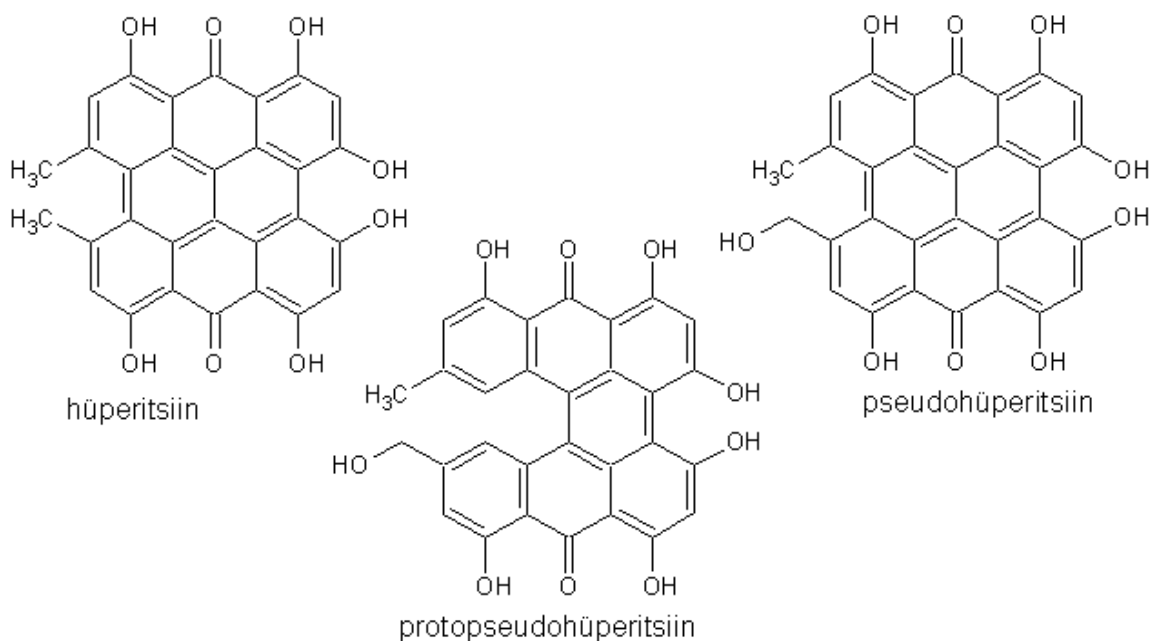
1. SISSEJUHATUS

Eestis on laialdase levikuga kaks naistepuna liiki – liht-naistepuna (*Hypericum perforatum* L) ning kandiline naistepuna (*Hypericum maculatum* Crantz). Ravimtaimena kasutatakse neid mõlemaid. Kahe liigi keemiline koostis on kvalitatiivselt sarnane, kuid kandilises naistepunas sisaldub väga vähe toimeainet hüperforiini ja selle derivaati adhüperforiini, mida kasutatakse depressiooni ravis (Laakmann *et al* 1998; Mártonfi *et al* 2001; Barnes *et al* 2002; Smelcerovic *et al* 2006; Gîtea 2010; Rusalepp 2012). Hüperitsiinide sisaldus on kahes liigis võrreldaval tasemel, tihti isegi kandilises naistepunas suurem kui liht-naistepunas (Radušienė *et al* 2004; Gîtea *et al* 2010; Vares 2011; Rusalepp 2012). Hüperitsiinidel on viirus- ja retroviirusvastane, kasvajakude arengut pärssiv ning põletikuvastane toime (Meruelo *et al* 1988; Thomas & Pardini 1992; Panossian *et al* 1996). Flavonoididel üldiselt on täheldatud põletikuvastast ning ühel neist – biapigeniinil – ka depressioonivastast toimet (Nielsen *et al* 1988; Butterweck *et al* 2000; Sosa *et al* 2007). Ka hüperforiinidel on põletikuvastane, antibakteriaalne ning depressioonivastane toime (Laakmann *et al* 1998; Schempp *et al* 1999; Barnes *et al* 2002; Schwarz *et al* 2003; Dona *et al* 2004; Feisst & Werz 2004; Saddiqe *et al* 2010).

Oletatakse, et taimes sisalduvate sekundaarsete metaboliitide kontsentratsioon sõltub keskkonnatingimustest, seal hulgas õhuniiskusest, mulla viljakusest, valgustingimustest jms. Sekundaarsed metaboliidid kaitsevad taimi kahjurite, patogeenide aga ka UV-kiirguse ja stressi eest. Üldteoreetiliselt arvatakse, et mida kehvemad on kasvutingimused, seda enam peab taim panustama enesekaitseks, et vältida ära söödud saamist (Herms & Mattson 1992; Wink 2010). Erinevate keskkonnatingimuste mõju konkreetsete liikide keemilisele koostisele on küll uuritud, aga teadmised on praktikas rakendamiseks veel lünklikud.

1.1. Naistepuna keemiline koostis

Liht-naistepuna droog sisaldab 0,1–1% naftodiantrone (antratseenderivaadid): hüperitsiini (kuni 0,4%), pseudohüperitsiini, isohüperitsiini, protohüperitsiini, protopseudohüperitsiini ning väikeses koguses ka tsüklopseudohüperitsiini (joonis 1). Protohüperitsiin ja protopseudohüperitsiin on biosünteesilised prekursorid, mis valguse toimel sünteesitakse vastavalt hüperitsiiniks ja pseudohüperitsiiniks (Barnes *et al* 2002; Bradley 2006; Raal 2010). Hüperitsiin on aromaadne polütsükiline dioon (Meruelo *et al* 1988).

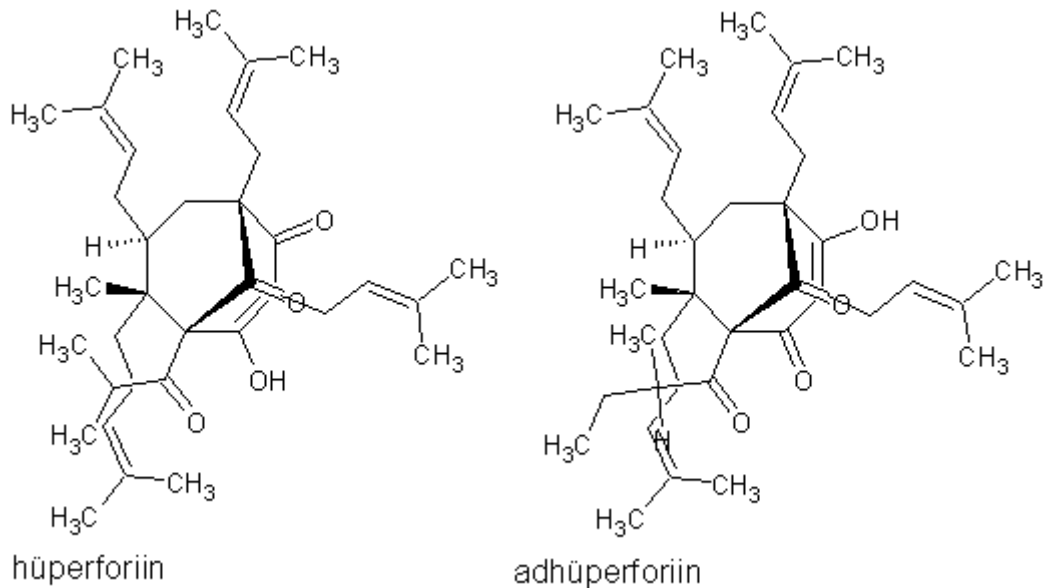


Joonis 1. Hüperitsiinid (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> viimati alla laetud 10.12.2011)

Lisaks hüperitsiinidele on droogis ka atsüülfloroglütinoole (keskmiselt 2–4,5%): hüperforiini (2,0–4,5%) ja adhüperforiini (0,2–1,9%) (joonis 2). Hüperforiin on prenuülrühmaga seotud atsüülfloroglütinooli derivaat, mis koosneb floroglütinooli skeletist ja lipofiilsest isopreeni ahelast. Floroglütinoolide sisaldus võib tugevasti varieeruda. Hüperforiin ja adhüperforiin on väga vastuvõtlikud oksüdeerumisele ja on eriti ebastabiilsed mittepolaarses solvendis või valguse käes. Hüperforiini on võimalik stabiliseerida sobivate antioksüdantidega (Barnes *et al* 2002; Bradley 2006; Medina *et al* 2006; Raal 2010). Samaselt hüperitsiinidele on ka hüperforiinidel biokeemilised prekursorid hüperfiriin ja adhüperfiriin vastavalt (Tatsis *et al* 2007).

Toime seisukohalt on olulised ka flavonoidid (kuni 4%): hüperosiid ehk hüperiin (peamiselt õites (0,7–1,2%)), rutiin (0,3–0,8%), kvertsitriin (~0,2%), isokvertsitriin (0,3–0,7%),

kvartsetiin ja apigeniin-7-O-glükosiid. Seejuures biflavoone (biapigeniin) leidub ainult õites ja õiepungades (Bradley 2006; Raal 2010).



Joonis 2. Hüperforiinid (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> alla laetud 10.12.2011)

Tanniine on droogis 6–15% sõltuvalt analüüsimeetodist, peamiselt sisaldab protsüanidiine. Protsüanidiine A2, B1, B2, B3, B5, B7 ja C1 on isoleeritud koos flavanooli monomeeride katehiini ja epikatehiiniga. Keskmiseks polümeeri pikkuseks on hinnatud 4–5 flavanoolimonomeeri (Bradley 2006).

Eeterlikku õli on 0,1–1,3%. Eeterlikest õlidest üle 30% moodustab 2-metüülloktaan (küllastunud süsivesinik), lisaks leidub veel n-nonaani ja jälgedena 2-metüüldekaani ja n-undekaani (küllastunud süsivesinikud), α - ja β -pineeni, α -terpineooli, geraniooli, limoneeni ja mürtseeni (monoterpeenid) ning karüofülleeni ja humuleeni (seskviterpeenid) (Barnes *et al* 2002).

Lisaks sisaldab proov ka ksantoone ning väikestes kogustes klorogeenhapet ja kohvhappe derivaate ning vabu aminohappeid (Bradley 2002; Tatsis *et al* 2007; Raal 2010).

Peamisteks toimeaineteks peetakse hüperitsiine, hüperforiine ja flavonoide (Barnes *et al* 2002; Medina *et al* 2006; Tatsis *et al* 2007).

1.1.1. Keemilise koostise varieeruvus

Naistepuna lehtedes on rohkem hüperosiidi, rutiini, isokvertsitriini, klorogeenhapet ja apigeniin-7-O-glükosiidi (Gray *et al* 2003; Radušienė *et al* 2004; Cirak *et al* 2007). Üldiselt on flavonoidide ja ka tanniinide sisaldus lehtedes suurem kui õites (Germ *et al* 2010).

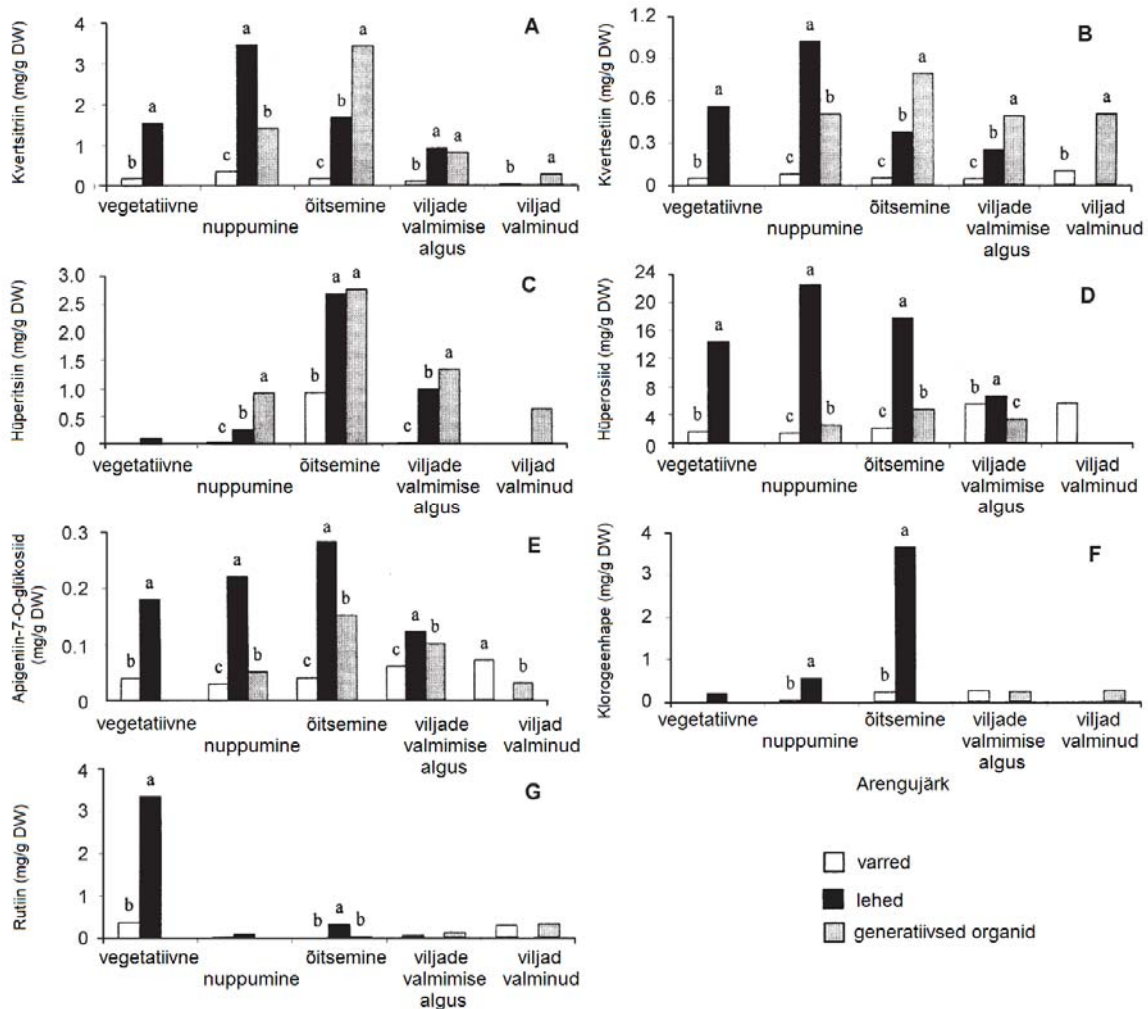
Hüperitsiinide ja hüperforiinide sisaldus on suurem taime generatiivsetes organites (Gray *et al* 2003; Radušienė *et al* 2004; Zobayed *et al* 2005; Cirak *et al* 2007). Radušienė *et al* (2004) tulemustes on kvartsetiini ja kvertsitriini samuti õites rohkem. Cirak *et al* 2007 fenoloogilise suunitlusega tööst selgub, et kvartsetiini ja kvertsitriini sisaldused on lehtedes suuremad enne taime õitsemist ning õitsemise ajal ja pärast suuremad taime generatiivsetes organites (joonis 3). Kuigi konkreetsete flavonoidide sisaldus taimes organiti varieerub, on üldflavonoidide hulk õites ja lehtedes üsna võrdne.

Fenoolsete ühendite sisaldus kasvab taime arengu käigus ning saavutab maksimumi enne õitsemist ning seejärel langeb (Gray *et al* 2003; Filippini *et al* 2010). Rutiini sisaldus on kõrgeim enne taime õitsemist (*floral budding*) (Cirak *et al* 2007; Filippini *et al* 2010; Bagdonaitė *et al* 2012). Hüperitsiinide ja hüperforiinide sisaldus on suurim taime õitsemise ajal (Cirak *et al* 2007; Filippini *et al* 2010). Bagdonaitė *et al* (2012) uurimuses hüperosiidi sisaldus ei sõltunud taime ontogeneesist, kui Filippini *et al* (2010) leidsid, et hüperosiid käitub nagu teisedki flavonoidid ning tema kontsentratsioon ontogeneesi jooksul väheneb. Biflavonoidi I3,II8-biapigeniini on taimes kõige rohkem õietolmu valmides, sest sisaldub just õietolmus (Mártonfi *et al* 2006; Filippini 2010).

Nii liht- kui kandilises naistepunas on hüperosiidi, isokvertsitriini, kvertsitriini, kvartsetiini, biapigeniini ja hüperitsiini (Kitanov 2001; Radušienė *et al* 2004; Mártonfi *et al* 2006; Smelcerovic *et al* 2006). Osadel andmetel on hüperitsiini rohkem liht-naistepunas (Kitanov 2001; Radušienė *et al* 2004), kuid märgitud on ka vastupidist olukorda (Gîtea *et al* 2010; Vares 2011; Rusalepp 2012). Kandiline naistepuna sisaldab väga vähe või üldse mitte hüperforiini (Mártonfi *et al* 2001; Smelcerovic *et al* 2006; Gîtea 2010; Rusalepp 2012) ja rutiini (Kitanov 2001; Radušienė *et al* 2004; Mártonfi *et al* 2006; Rusalepp 2012). Leitud on ka ilma rutiinita liht-naistepuna kemotüüp (Mártonfi *et al* 2001).

Hüperosiidi ja hüperitsiini sisalduse võrdlusest liht-naistepuna proovides ilmnes, et ühes konkreetses taimes on kas palju hüperosiidi ja vähe hüperitsiini või vastupidi – vähe hüperosiidi ja palju hüperitsiini (Radašienė *et al* 2004). Täheldatud on ka hüperosiidi ja

kvertsiitriini sisalduste vahelist positiivset korrelatsiooni ning hüperosiidi ja rutiini sisalduste vahelist negatiivset korrelatsiooni (Bagdonaitė *et al* 2012).



Joonis 3. Kvertsiitriini (A), kvertsetiini (B), hüperitsiini (C), hüperosiidi (D), apigeniin-7-O-glükosiidi (E), klorogeenhappe (F) ja rutiini (G) sisalduse (mg/g kuivmassi kohta) fenoloogilised muutused (ajalised muutused) taime vartes, lehtedes ning generatiivsetes organites.

Erinevad tähed sammastel näitavad vastava ühendi kontsentratsiooni märkimisväärset muutust ajalises skaalas tasemel $p < 0,01$. Tähe puudumine näitab, et muutused ei olnud märkimisväärsed. (tõlgitud artiklist Cirak *et al* 2007)

1.2. Sekundaarsete metaboliitide sünteesi mõjutavad tegurid

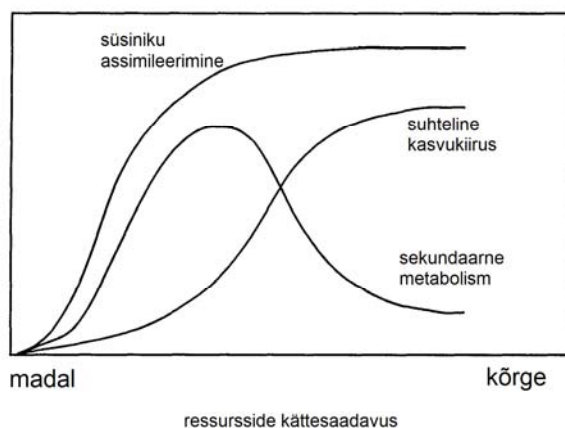
Ressursside allokeerimine taime kasvu või keemilise kaitsele on lõivsuhe (*trade-off*) (Herms & Mattson 1992). Madala toitainete (sh lämmastiku) kättesaadavusega keskkonnaga kohastunud taimed suunavad süsiniku/toitainete tasakaalu hüpoteesi (*carbon/nutrient balance*

(CNB) *hypothesis*) järgi rohkem ressursse keemilisse kaitseesse. Kui fotosünteesi kiirus ei ole piiratud, siis C:N suhe taimes kasvab ning sünteesitakse süsinikupõhiseid kaitseühendeid. Süsinikupõhise kaitsemehhanismi korral toodab taim sekundaarseid metaboliite, mis sisaldavad vaid süsinikku, vesinikku ja hapnikku, näiteks fenoolsed ühendid, terpeenid, saponiinid (Herms & Mattson 1992; Crawley 1997; Wink 2010). Vastupidises olukorras, kus limiteerivaks ressursiks on valgus või vesi ning toitained on rohkem, kui esmasteks vajadusteks vaja (kasv), fotosünteesi kiirus, süsivesinike kontsentratsioon ja C:N suhe väheneb. Samal ajal väheneb C-põhiste sekundaarsete metaboliitide süntees, sest C allokeeritakse esmajärjekorras taime kasvu. Sääraste piirangute korral suunatakse liias omastatud lämmastik sekundaarsete metaboliitide sünteesi. N-põhiste metaboliitide hulka kuuluvad alkaloidid, amiinid, tsüanogeensed glükosiidid, mittevalgulised aminohapped, glükosinolaadid, alkamiinid, peptiidid jt (Herms & Mattson 1992; Wink 2010). Sarnane olukord tekib ka maapinna väetamisel ja põlengute järel, kui mulda lisandub lämmastikku (Crawley 1997).

Ressursirikkas keskkonnas allokeeritakse süsinik esmalt kasvu. Seetõttu on populatsioonisiselt herbivooridele kõige haavatavamad kiireima kasvuga taimed. Kui mõni faktor (mõõdukas veepuudus, toitainete puudus, madal temperatuur) piirab taime kasvu rohkem kui fotosünteesi kiirus, siis suurendab see faktor sekundaarsele metabolismile kättesaadava süsiniku hulka ilma erilist lõivsuhet taime kasvuga omamata (Herms & Mattson 1992; Matsuki 1996). Lõivsuhe taime kasvu ja sekundaarsete metaboliitide tootmise vahel ei ole lineaarne (joonis 4). Ressursside (valgus, vesi, toitained) kättesaadavuse kasvades suureneb ka neto fotosünteesi hulk. Suurenenud süsiniku assimileerimine taime võimaldab „üleliigse“ süsiniku allokeerimist sekundaarsesse metabolismi hoolimata eeldatavast lõivsuhtest kasvuga. Keskmise ja kõrge ressursitaseme korral ilmneb taime kasvu ja kaitse vaheline füsioloogiline lõivsuhe, kui sekundaarse metabolismi ja suhtelise kasvukiiruse vahel tekib negatiivne korrelatsioon (Herms & Mattson 1992).

Taimed sünteesivad sekundaarseid metaboliite samades ainevahetusradades, kus sünteesitakse ka esmaseid ainevahetusprodukte, primaarse ja sekundaarse metabolismi vahel valitseb lõivsuhe (Jensen 1985; Herms & Mattson 1992; Wink 2010). Jensen'i (1985) järgi moodustab vähemalt 60% kogu taime kuivast biomassist molekulid, mis on läbinud šikimaatse ainevahetusraja. Šikimaatses ainevahetusrajas sünteesitakse vitamiinisarnaseid ühendeid ning aromaatsaid aminohappeid (L-türosiin, L-fenüülalaniin, L-trüptofaan), mis on proteiinide, fenoolide, alkaloidide, tsüanogeensete glükosiidide jm prekursoriks (Jensen 1985; Herms &

Mattson 1992; Matsuki 1996). Fenüülalaniin on üheaegselt fenüülpropanoidide (ligniin, flavonoidid, kondenseerunud tanniinid) sünteesi kiirust piirav prekursor ning asendamatu aminohape valkude tootmisel. Et taime kasv on otseselt seotud valguliste ensüümide (fotosünteesilised, biosünteesilised, reguleerivad) tootmisega, konkureerivad flavonoidide tootmine ja taime kasv samale ressursile (Herms & Mattson 1992; Matsuki 1996). Et alkaloidide sünteesi prekursoriks on samuti aminohapped, konkureerib ka see otseselt valgusünteesiga ja seetõttu taime kasvuga. Atsetüül koensüüm A on terpenoidide sünteesi ja samas ka tsitraaditsükli prekursor. Polüketiidses ainevahetusrajas sünteesitakse kinoone, naftokinoone, antrakinoone jm, sellest rajast tulevad ka ühed naistepuna põhilisi toimeaineid hüperitsiinid (Seigler 2002).



Joonis 4. Reaktsiooninormid neto süsiniku assimilatsioonikiirusele, suhtelisele kasvukiirusele ja sekundaarsele metabolismile muutuva ressursi kättesaadavuse korral (tõlgitud artiklist Herms & Mattson 1992).

Arvatakse, et taime kuivmassist moodustavad sekundaarsed metaboliidid 1–3% (Wink 2010). Samast ainevahetusrajust pärinevate ühendite kontsentratsioon taimes võib olla negatiivses korrelatsioonis, kui üht sünteesitakse teise kulul. Kõrgetes kontsentratsioonides akumulatsioonivahetavate metaboliitide sisaldused korreleeruvad suurema tõenäosusega sekundaarsete metaboliitide koguhulgaga. Seetõttu on CNB hüpoteesi paikapidavuseks parem jälgida sekundaarsete metaboliitide koguhulka (Herms & Mattson 1992).

1.2.1. Veestressi mõju

Põuaperioodid suurendavad mitmete fenoolsete ühendite sisaldust liht-naistepunas, kuid samal ajal väheneb ka taime biomass (Gray *et al* 2003; de Abreu & Mazzafera 2005). Põuda talunud liht-naistepuna õites kasvas klorogeenhape, rutiini, hüperosiidi, isokvertsitriini,

kvertsiitriini ning kvertsetiini keskmine sisaldus võrreldes kontrolltaimedega (Gray *et al* 2003). de Abreu & Mazzafera (2005) näitasid samuti, et veedefitsiit suurendab taimes *Hypericum brasiliense* rutiini ja kvertsetiini sisaldust. Samuti suurenes rutiini sisaldus hüpoksiias, kuid kvertsetiini sisaldus vähenes. Kuigi rutiin on kvertsetiini derivaat, ei ole nende kahe aine sisalduse muutused korrelatsioonis (de Abreu & Mazzafera 2005). Fenoolsete ühendite sisalduse tõus on üldiselt negatiivses seoses taime biomassi kasvuga (Gray *et al* 2003; de Abreu & Mazzafera 2005). Kuigi fenoolsete ühendite kontsentratsioon taimes kasvab, siis kogusaagis taime kohta on väiksem, sest biomass on väiksem (Gray *et al* 2003)

Gray *et al* (2003) tehtud 6-päevases katses liht-naistepunaga ei leitud, et põuaperioodil oleks olulist mõju hüperitsiinide sisaldusele taimes, samas kui Zobayed *et al* (2007) läbi viidud 12-päevases põuakatses hüperitsiinide sisaldus langes märgatavalt. 6-päevases katses oli põuda talunud taimede hüperforiini kontsentratsioon ligi kolmandiku võrra väiksem kui kontrolltaimedes. 12-päevases katses oli aga põuda talunud taimedes hüperitsiini kontsentratsioon ligi 2 korda suurem kui kontrolltaimedes. Hüperitsiinide ja hüperforiini sisalduse muutused olid veedefitsiidis taimedes kõige suuremad 9–11 põuapäeval. Sellega võib ka seletada, miks Gray *et al* (2003) ei leidnud muutusi hüperitsiinide sisalduses ja hüperforiini oli vähem kui kontrolltaimedes.

Veedefitsiidi mõju sõltus selle kestusest ja defitsiidi tekkimise kiirusest, mistõttu erinevates katsetes on saadud erinevaid tulemusi (Gray *et al* 2003; Zobayed *et al* 2007)

Veestressi talunud liht-naistepuna taimedes olid antioksidantsed omadused ligi 2,5 korda kõrgemad kui kontrolltaimedes (Zobayed *et al* 2007).

1.2.2. Temperatuuri mõju

Sarnaselt veestressile on ka temperatuuristressi puhul märgatud, et biomassi vähenemisega kaasneb fenoolsete ühendite sisalduse tõus. Öösiti madalamat temperatuuri (10 °C) taluma pidanud liht-naistepuna taimedes täheldati fotosünteesi efektiivsuse olulist langust koos fenoolsete ühendite (sh rutiin ja kvertsetiin) sisalduse tõusuga. Öösel kõrgema temperatuuriga (30 °C) kasvanud taimedes fotosünteesi aktiivsuse langust ei esinenud, kuid rutiini ja kvertsetiini sisaldused olid oluliselt madalamad kui kontrolltaimedes ja öösiti jahedas kasvanud taimedes (de Abreu & Mazzafera 2005).

Seega väheneb fotosünteesi saagis nii kõrgema kui madalama temperatuuriga keskkonnas (de Abreu & Mazzafera 2005; Zobayed *et al* 2005). Zobayed *et al* (2005) märkisid liht-naistepuna võrsetes olulist hüperitsiinide sisalduse tõusu koos temperatuuri kasvuga. See-eest kogu taime üldhüperitsiinide sisaldus oli suurim temperatuurioptimumis 25 °C juures. Hüperforiinide sisalduse muutused ei ole temperatuuri muutusega järjepidevad. Suurim sisaldus leiti 30 °C juures, teisele kohale tuli 20 °C juures kasvanud taimed. 35 °C juures kasvanud taimedel ei arenenud õisi ega õiepungasid, kuid on teada, et hüperforiinide ja hüperitsiinide sisaldused on suurimad just õites (Grey *et al* 2003; Zobayed *et al* 2005; Cirak *et al* 2007).

Temperatuuri tõus korreleerub positiivselt ka liht-naistepunas leiduvate antioksidantide peroksidaaside kontsentratsiooniga. Selline kontsentratsiooni tõus arvatakse olevat seotud vastusega abiootilisele stressile (Zobayed *et al* 2005).

1.2.3. Valgustingimuste mõju

Suurendatud valguse intensiivsuse tingimustes taime neto fotosüntees kasvab ja sellega kasvab ka süsiniku akumulatsioon (Briskin & Gawienowski 2001; Mosaleeyanon *et al* 2005). Kõrgem valguse intensiivsus suurendab taime biomassi, seejuures ei suurene taime kõrgus vaid harunemine (Briskin & Gawienowski 2001). Suurenenud süsiniku assimileerimise tingimustes allokeeritakse osa „üleliigsest“ süsinikust (*over-flow metabolism*) sekundaarsesse metabolismi (Herms & Mattson 1992; Matsuki 1996).

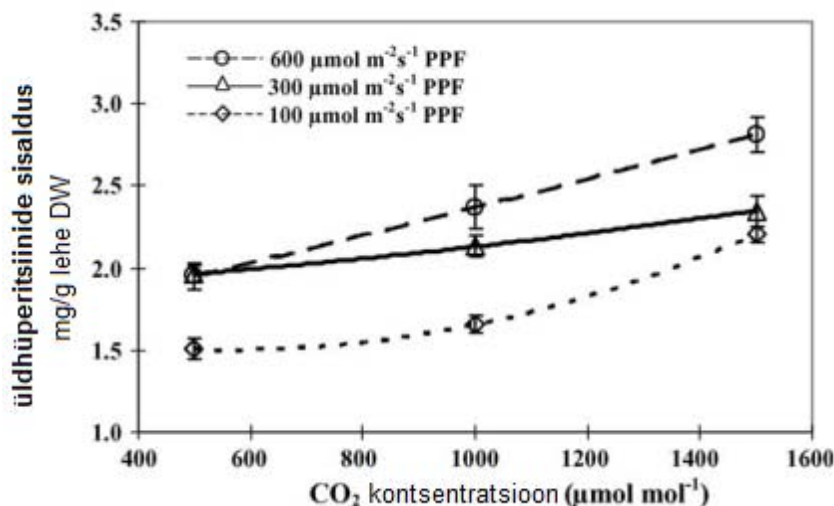
Kõrgendatud valguse intensiivsuse tingimustes suurenes liht-naistepuna lehel olevate mustade näärmetäppide hulk ja ka hüperitsiinide sisaldus. Katseliselt on kindlaks tehtud, et mustades näärmetäppides sisalduvadki hüperitsiinid. Naistepunas on üldiselt pseudohüperitsiini rohkem kui hüperitsiini. Valguse intensiivsuse kasvades jääb pseudohüperitsiini ja hüperitsiini suhe samaks (Briskin & Gawienowski 2001).

UV-B kiirgus indutseerib fenüülpropanoidse ainevahetusraja põhiensüümide sünteesi ning sellega kaasneb flavonoidide sisalduse tõus liht-naistepuna lehtedes. Tanniinide sisaldus lehtedes oli loodusliku või kõrgendatud UV-B kiirgustaseme juures kõrgem kui looduslikust madalama UV-B kiirgustasemega kasvanud taimedes. Hüperitsiinide sisaldus oli madalam rohkem UV-B kiirgust saanud taimedes. UV-B kiirguse stressi korral on flavonoidide süntees eelistatud taime kasvule, sest taim ei ole vastasel korral võimeline sellises keskkonnas vastu pidama (Germ *et al* 2010). Samas on täheldatud, et hüperitsiinide sisaldus on liht-naistepunas suurim 12 tundi pärast ühekordset 40 minutilist UV-B kiirguse doosi, misjärel hüperitsiinide

sisaldus hakkab langema. Nädal pärast UV-B kiirgustöötlust on hüperitsiini sisaldus esialgsest tasemest madalam (Brechner *et al* 2011).

1.2.4. Kõrgendatud CO₂ mõju

Sarnaselt valgusintensiivsuse kasvule suurendab ka kõrgendatud CO₂ sisaldus atmosfääris taimede fotosünteesi kiirust ning süsiniku assimileerimist (Zobayed & Saxena 2004; Mosaleeyanon *et al* 2005; Zobayed *et al* 2005). Suurenenud süsiniku assimileerimise tingimustes allokeeritakse osa „üleliigsest“ süsinikust (*over-flow metabolism*) sekundaarsesse metabolismi (Herms & Mattson 1992; Matsuki 1996). Kõrgendatud CO₂ tingimustes suureneb liht-naistepuna hüperitsiinide süntees oluliselt, olles seejuures korrelatsioonis CO₂ (joonis 5) ja PPF-ga (*photosynthetic photon flux*) (Zobayed & Saxena 2004; Mosaleeyanon *et al* 2005). Zobayed & Saxena (2004) näitasid, et ka hüperforiinide süntees kasvab kõrgendatud CO₂ tingimustes, kuid Mosaleeyanon *et al* (2005) seda ei kinnita.



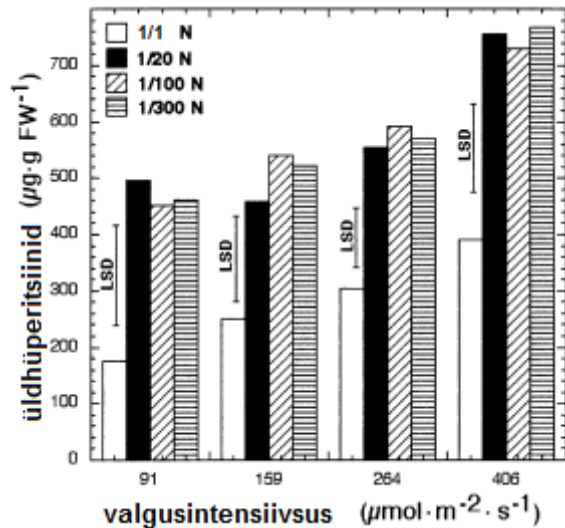
Joonis 5. Üldhüperitsiinide sisalduse sõltuvus CO₂ kontsentratsioonist erineva valgusintensiivsuse juures (tõlgitud artiklist Mosaleeyanon *et al* 2005).

1.2.5. Toitainete kättesaadavuse mõju

Lämmastikupuudus vähendab fotosünteesiks kasutatava Rubisco ja klorofüllid hulka ning häirib fotosünteesiliste membraanide tööd. Selle tagajärjel võib taim saada valguskahjustusi, mille ärahoidmiseks sünteesitakse pigmente (antotsüaniinid, flavonoolid), mis liigset valgust neelates suurema kahju ära hoiavad (Stewart *et al* 2001).

Katses liht-naistepunaga vähendati taimele kättesaadava lämmastiku hulka. Lämmastikuhulga vähenemine tõi kaasa hüperitsiinide sünteesi suurenemise lehtedes. Samas ei suurendanud

madalam N kontsentratsioon tumedate näärmetäppide arvu lehel (nagu tegi kõrgem valgusintensiivsus). Lämmastiku kontsentratsiooni mõju kumuleerub valguse mõjuga, aga ei sõltu valguse intensiivsusest (joonis 6) (Briskin & Gawienowski 2001).



Joonis 6. Valguse intensiivsuse ja N hulga kombineeritud mõju hüperitsiinide sisaldusele liht-naistepuna lehtedes ($\mu\text{g}/\text{g}$ elumassi kohta). LSD – least significant difference. (tõlgitud artiklist Briskin & Gawienowski 2001)

Suurendatud niklisisaldusega substraadis kasvanud liht-naistepuna taimed jäid kasvult alla kontrollgrupi taimedele ning neil arenes rohkelt punaseid näärmetäppe (hüperitsiinid). Samuti kaasnes mulla suurema niklisisaldusega molübdeeni sisalduse kasv ning raua sisalduse langus võrsetes. Nikli olemasolu substraadis tõi kaasa hüperitsiinide sisalduse vähenemise 15–20 korda võrreldes kontrollgrupiga, hüperforiinide sisaldus langes allapoole tuvastamispiiri (Murch *et al* 2003).

1.3. Magistritöö eesmärk

Käesoleva magistritöö eesmärk on uurida keskkonnatingimuste mõju kandilise naistepuna sekundaarsele metabolismile. Kandiline naistepuna on oma keemiliselt koostiselt küll üldiselt sarnane liht-naistepunale, kuid teda on võrreldes liht-naistepunaga palju vähem uuritud. Kuigi üks toimeaine (hüperforiin) kandilises naistepunas puudub, on ülejäänud toimeained samuti väga olulised. Kandilise naistepuna uurimiseks kasutatakse juba olemasolevat õhuniiskusega manipuleerimise välikatset, FAHM (*free air humidity modifying*), kus kandiline naistepuna on alustaimestikus esindatud. Võrdluseks on töös kasutatud ka 2010. ja 2011. aastal Eestimaa erinevaist paigust korjatud nii liht- kui kandilise naistepuna proove.

2. METOODIKA

2.1. FAHM katse kirjeldus

2014. aasta proovid koguti Metsaökosüsteemi õhuniiskusega manipuleerimise katsealalt (FAHM – *free air humidity manipulation*), mis asub Rõka külas, Meeksi vallas, Tartumaal SA Järvelja Õppe- ja Katsemetskonna maal (58°24'N, 27°29' E). Aastate keskmine sademete hulk piirkonnas on 650 mm, keskmine õhutemperatuur on juulis 17,0 °C ja jaanuaris –6,7 °C. Vegetatsiooniperioodi pikkus on keskmiselt 175–180 päeva, aprilli keskpaigast oktoobrini. Keskmine huumushorisoni tüsedus on 27 cm. (Kupper *et al* 2011)

Katseala rajati söötis põllule aastal 2006. Tarastatud ala pindala on 2,7 hektarit, sellel asub kokku 9 14-meetrise läbimõõduga eksperimentaala ehk „katseringi“, kus viiakse läbi metsaökosüsteemi õhuniiskusega manipuleerimise eksperimenti. Praegu on katsealal teine kasvuring: katseringide ühel poolel kasvavad 2012. aasta kevadel 1 meetrise vahega istutatud arukased ning teisel poolel 2013. aasta kevadel kännu- ja juurevõsudest arenenud hübriidhaavad. Katseringide vahel on puhvertsoon, kuhu on istutatud hübriidhaavad 2 meetrise vahega. Katseringides on 2 tüüpi alustaimestikku – lihtne (peamiselt timut ja teised kõrrelised) ja keeruline (liigirikkam, mätastena istutatud niidu- ja metsataimed). Nii moodustub katseringidesse 4 erineva kooslusega veerandit.

9-st katseringist neljas (H1, H2, H3, H4) suurendatakse kunstlikult õhuniiskust süsteemiga, mis koosneb ventilaatorist, õhujaojustorustikust, kõrgsurvepumbast ja veedüüsidest. Vesi pihustatakse läbi düüside uduks osakese suurusega umbes 10 µm ning kantakse läbi kogu ringi tuule või ventilaatori abiga. Neli katseringi (C1, C2, C3, C4) on kontrollringid, kus niisutust ei toimu ning üks (D1) on õhuniiskuse kunstliku vähendamise prototüüp-katsering. Õhuniiskust on keskmiselt võimalik suurendada 7% protsendi võrra, maksimaalselt 18%. Katse ülesehitusest lähemalt on võimalik lugeda Kupper *et al* 2011 artiklist.

2.2. Uurimismaterjal

Hypericum maculatum Crantz

Kandiline naistepuna (*Hypericum maculatum* Crantz) on naistepunaliste sugukonda naistepuna perekonda kuuluv mitmeaastane rohttaim. Kandiline naistepuna kasvab 20–90 cm

kõrguseks. Kandilise naistepuna vars on eriti keskosas nelja selge kandiga ning seest õõnes. Vars on paljas ja enamasti vähe harunenud. Erinevalt liht-naistepunast on kandilisel naistepunal tupplehed tõmbi otsaga ning on enamasti viie rooga. Lehtedel on samuti mustad näärmetäpid. Üldiselt puuduvad lehtedel läbipaistvad näärmetäpid, kuid võivad esineda alumistel lehtedel. Õied on viietised, kuldkollased. Õitseb juunist septembrini. Vili on kupar (Kukk 2005; Krall *et al* 2007; Raal 2010).

Kandiline naistepuna kasvab sarnastes tingimustes liht-naistepunale, samuti on kandilise naistepuna levila ühine liht-naistepuna levilaga (Raal 2010).

***Hypericum perforatum* L**

Liht-naistepuna (*Hypericum perforatum* L) on naistepunaliste sugukonda naistepuna perekonda kuuluv mitmeaastane rohttaim. Liht-naistepuna vars on 20–90 cm kõrgune, alusel ümmargune, kõrgemal kahe servikuga (pikikandiga), seest säsikas. Vars on enamasti alusel lihtne, ülemises osas oksine, paljas. Taimel on teravatipulised, mustade täppidega ning enamasti kolme rooga tupplehed. Kollaste kroonlehtede välisküljel on samuti hõredalt näha musti täppe. Lehed on läbipaistvate näärmetäppidega – sellest tuleb ka taime ladinakeelse nime liigiepiteet *perforatum*. Lehed on vastakud, umbes 12 mm pikad. Kuldkollaste viietiste õite läbimõõt võib olla kuni 2,5 cm. Õitseb juunist septembrini. Vili on kupar (Tammeorg *et al* 1973; Kukk 2005; Krall *et al* 2007).

Liht-naistepuna kasvab sageli kivisel või liivasel pinnasel, eelistab valgusküllaseid kohti. Esineb kuivadel niitudel, puisniitudel, kinkudel, tee- ja põlluservadel, jäätmaadel, söötidel, kuivades võsades, metsaservades, tarade ääres, kraavikallastel, loodudel (Tammeorg *et al* 1973; Kukk 2005; Krall *et al* 2007; Raal 2010).

Maailmas on liht-naistepuna levinud Euroopas, Siberis, Kesk-Aasias. Sissetoodud liigina esineb Põhja- ja Lõuna-Ameerikas, Indias, Uus-Meremaal, Austraalias ning Lõuna-Aafrikas. Eestis on tavaline (Di Carlo *et al* 2001; Raal 2010).

Mõlema liigi noorte lehtede või õiepungade purustamisel või muljumisel eritub punakat mahla, mis värvib sõrmed punakas-violetseks (Tammeorg *et al* 1973; Raal 2010).

Proovid

2014. aasta proovid koguti 4. augustil Rõkalt FAHM katsealalt. Proovid koguti katseringidest C1, H1, C3, H3, C4 ja H4. C1 ja C4 ringis on kõik taimed korjatud haabade alt, C3 ringis on 1 taim haabade alt, kõik ülejäänud taimed on korjatud kaskede alt. Igast ringist korjati 5 taime.

Pärast toatemperatuuril varjulises kohas taime kuivatamist roobitseti vartelt lehed ja õied. Proove säilitati kuni järgnevale etapile Minigrip kotis pimedas toatemperatuuril.

2014. aastal võeti lisaks iga katseringi igast veerandist (puuliik vs alustaimestik) juhuslikest punktidest 0–10 cm kihist mullapuuriga (D=20 mm) 10 mullaproovi. Proovidest moodustati koondproov, millega viidi läbi analüüsid.

Lisaks on töös kasutatud ka proove, mis koguti aastatel 2010 ja 2011 Eestimaa erinevaist paigust.

2010. aastal kogus proovid Niina Vares ajavahemikul 20. juuni – 10. august. Erinevaid kasvukohti oli kokku 38. Ühest kasvukohast korjati 5–6 taime. Saadi 27 liht-naistepuna ning 11 kandilise naistepuna proovi. “Droogiproovid koguti õitsemisperioodil 25 cm pikkuste ladvaosadena ja kuivatati temperatuuril 35 °C hästi ventileeritud kohas valguse eest kaitstult. Kuni analüüside teostamisajani säilitati droogid paberkottides toatemperatuuril, pimedas ja valguse eest kaitstud kohas (Vares 2011:15).”

2011. aastal korjati proovid ajavahemikul 29. juuni – 21. august. Erinevaid kasvukohti oli kokku 20 (lisa 1). Koguti 15 liht-naistepuna ning 5 kandilise naistepuna proovi, võeti ainult üks taim ühest kasvukohast. Proovid on korjatud valdavalt kuivadelt, madala taimeestikuga rohumaadelt ja teeservadest.

2.3. Proovide ettevalmistus

Lehtede ja õite segu peenestati uhmri ja nuiaga (2010. ja 2011. aasta proovid sõeluti lisaks läbi 3 mm sõela). Valmistati 1:20 metanooliekstraktid – 0,3 g droogi kaaluti plastikkatseklaasi ning lisati 6 mL metanooli. Matseratsioon (taimsete kudede lagundamine leotades) kestis orienteeruvalt 24 tundi, proovid olid sel ajal toatemperatuuril ja pimedas ning neid loksutati paar korda. 24 tunni möödudes filtreeriti proovidest taimne materjal välja ning visati minema. Ekstrakte säilitati külmikus –40 °C juures kuni analüüside läbiviimiseni.

Ekstrakte tsentrifuugiti 15 min 4000 rpm 20 °C, pärast mida pipeteeriti 3 mL klaasviaalidesse ning suleti korgiga.

Metanooliekstraktide värvus varieerus mururohelisest tumepruunini, enamasti oli punakas. 2011. aasta proovidest valmistatud ekstraktide juures oleks huvitav ära märkida, et proovid nr 1, 4, 7 ja 15 olid värvuselt tunduvalt tumedamad, kui ülejäänud, tumepunakas-pruunid, ning

proovid nr 11, 13 ja 14 olid tunduvalt heledamad, mururohelised. 2014. aasta proovidest paistsid tumeda värvusega silma nr 6, 9, 10 ja 17 ning rohelise tooniga nr 8, 12, 22 ja 23.

2.4. Keemiline analüüs

HPLC-ESI-MS/MS ja HPLC-DAD/UV

Kromatograafilised analüüsid tehti Eesti Maaülikooli toiduhügieeni osakonna laboris.

Naistepuna ekstraktis leiduvate ühendite analüüsiks kasutati Agilent 1100 seeria instrumenti (automaatne proovisisestussüsteem, vaakumdegaseerija, binaarne pump, kolonni termostaat), millega olid ühendatud Agilent 1100 seeria UV-Vis diodrividetektor ning 1100 seeria LC/MSD Trap-XCT koos ESI ionisatsiooniallikaga. Ühendite lahutamiseks kasutati pöördfaas HPLC Zorbax 300SB-C₁₈ kolonni (2,1 x 150 mm; 5 µm; Agilent Technologies). Gradientelueerimisel kasutati 0,1% sipelghapet ning AcN, voolukiirus 0,3 mL/min, kolonni temperatuur 35 °C. Aparatuuri parameetrid: negatiivsete ionide detekteerimise vahemik m/z 50-1000, sihtmäss (*target mass*) 400, eellasioonide arv 2, maksimaalne mõõtmisaeg (*maximum accumulation time*) 100 ms, ühendi stabiilsus 100%, kuivatusgaasi voolukiirus (N₂ generaatorist) 10 L/min, gaasi temperatuur 350 °C, pihusti (nebulisaator) rõhk 30 psi, põrkegaasi (*collision gas*) He rõhk 6x10⁻⁶ mbar. Diodrividetektor töötas vahemikus 200–600 nm. Eluaadi neelduvust mõõdeti lainepikkustel 250, 270, 280, 330, 350, 370 ning 590 nm.

Protsessi juhtimiseks ja andmete esmaseks töötlemiseks kasutati tarkvara HPLC 2D ChemStation koos ChemStation Spectral SW mooduliga.

Proovides leiduvate koostisosade määramiseks kasutati elektropihustusionisatsiooni negatiivses töörežiimis ning tandem-massispektromeetrit. Ühendid identifitseeriti massilaengu suhete, retentsiooniaegade ning fragmentioonide võrdlusel standardainetega või kirjandusallikate põhjal. Lisas 2 on ära toodud kõik kahe naistepuna liigi metanooliekstraktides tuvastatud ained.

Ühendite kvantitatiivse sisalduse määramiseks kasutati kalibreerimisgraafikute meetodit. Osa aineid määrati UV spektri absorptsioonipiikide kõrguste järgi ning teine osa massispektri piigialuse pindala järgi. Millise spektri järgi ning mis lainepikkusel kvantiseerimine tehti, on näidatud lisas 3.

Erinevate ainete protsentuaalne sisaldus droogides leitakse mitmeetapiliselt. Esmalt tuleb regressioonivõrrandite järgi leida kindla ekstrakti kontsentratsioon ühikutes µg/mL.

2011. aasta proovide analüüsimisel oli süsti suurus 1,5 µL, 2014. aasta proovide analüüsimisel 3 µL. Kalibreerimisel kasutati 2011. aastal süsti suurus 6 µL ning 2010. aastal 10 µL, v.a hüperforiini ja hüperitsiini kalibreerimisel, kui süsti suurus oli 3 µL. Eelnevalt on samas laboris tõestatud, et süsti suurus ja analüütiline signaal on lineaarses sõltuvuses süsti suuruse vahemikus 0,5–10 µL. Seda arvesse võttes saame valemi:

$$c(\mu\text{g} / \text{mL}) = \frac{x(\mu\text{g} / \text{mL}) \times v_1(\mu\text{L})}{v_2(\mu\text{L})}, \quad (1)$$

kus $x(\mu\text{g}/\text{mL})$ on regressioonivõrrandi järgi arvatud suurus, $v_1(\mu\text{L})$ on süsti suurus kalibreerimisel ning $v_2(\mu\text{L})$ süsti suurus proovi analüüsimisel.

Protsentuaalse sisalduse saamiseks kasutame võrrandit:

$$c(\%) = \frac{c(\mu\text{g} / \text{mL}) \times V(\text{mL})}{m(\text{g}) \times 10^6} \times 100, \quad (2)$$

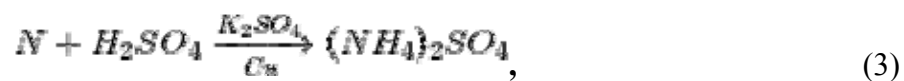
kus $V(\text{mL})$ on ekstraheerimisel kasutatud solventi ruumala milliliitrites ning $m(\text{g})$ on ekstraheerimisel kasutatud droogi täpne mass grammides.

Käesolevas töös on kõigi ainete kontsentratsioonid antud protsendina õhkuivas droogis. Kuna drooge säilitati analüüside läbiviimiseni samadel tingimustel, võib eeldada, et nende niiskussisaldused olid ühtlustunud. Sellise analüüsimeetodiga ei määrata absoluutset ainete sisaldust naistepuna droogis, vaid ainete kogust droogis, mis antud tingimustel metanooli ekstraheerub.

Lämmastiku, orgaanilise aine kao ja pH määramine

Eesti Maaülikooli põllumajandus- ja keskkonnainstituudi taimebiokeemia laboris määrati nii taimse materjali kui mullaproovide lämmastikuisaldus (%), mulla orgaanilise aine kadu kuumutamisel (360 °C) (*loss on ignition*, LOI) (%) ning mulla pH_{KCl} .

Lämmastiku määramiseks kasutati põletamist Kjeldahli meetodil kontsentreeritud väävelhappes, katalüsaatorite Cu ja K_2SO_4 tablettidega. Protsessi käigus sünteesitakse lämmastikust ammoniumsulfaat valemi 3 järgi.



Pärast põletust lahjendati proovid veega ning destilleeriti automaatanalüsaatoril Kjeltec Auto 1030. Destilleerimise käigus läheb ammooniumioon (NH_4^+) üle ammoniaagiks (NH_3) kasutades 40% NaOH lahust. Auruga destilleerides kogutakse ammoniaak vastuvõtvasse boorhappe lahusesse, kuhu on indikaatorina lisatud broomkresoolrohelist ja metüülpunast, ning tiitritakse HCl lahusega kolorimeetriliselt. Lämmastikisisaldus arvutatakse tagasi vastavalt kulunud HCl hulgale ja molaarsele kontsentratsioonile (*Official Methods of Analysis* 1990).

Eksperimentaalselt on näidatud orgaanilise aine sisalduse (LOI) seotust mulla kogu orgaanilise süsiniku sisaldusega (TOC). Mulla orgaanilise aine kaost kuumutamisel arvutati võrrandi 4 järgi kogu orgaanilise süsiniku sisaldus.

$$\text{TOC} = 0,58 \times \text{LOI} \quad (\text{De Vos et al 2005}) \quad (4)$$

Mulla C:N suhe näitab mulla orgaanilise aine „kvaliteeti“. Madalama suhtarvu juures toimub kiirem orgaanika lagunemine kui kõrgema suhtarvu korral. Orgaanika kiirem lagunemine soodustab lämmastiku mineraliseerumist ja seeläbi parandab taimedele kättesaadavust (Mary et al 1996).

2.5. Statistiline analüüs

Andmesisestus ja esmane töötlus viidi läbi programmis Apache OpenOffice Calc 4.0.0 (The Apache Software Foundation, 2013) ning MS Excel 2010 (Microsoft Corp., Ameerika Ühendriigid). Statistilise analüüsi jaoks kasutati programmi Statistica 7.1 (StatSoft Inc., Ameerika Ühendriigid). Andmete vastavust normaaljaotusele kontrolliti Shapiro-Wilki testiga. Andmete puhul, mis juba ei olnud normaaljaotusega, rakendati naturaalloogarithmimist, mis enamasti (v.a kvartsetiin) viis normaaljaotuseni. Erinevate parameetrite mõju hindamiseks keemilisele koostisele kasutati GLM mooduli dispersioonanalüüsi. Katseringide ja töötluste mõju keemilisele koostisele hinnati GLM mooduli kahefaktorilise dispersioonanalüüsiga. Et andmed on tasakaalustatud, rakendati mõlemal juhul analüüsis III tüüpi ruutude summat. Keemiliste ühendite sisalduste erinevust katseringide ja töötluste vahel uuriti Tukey HSD testiga. Keemiliste ühendite ja keskkonnakarakteristikute vahelisi seoseid vaadeldi korrelatsioonanalüüsi, lineaarse- ning mittelineaarse regressioonanalüüsiga.

3. TULEMUSED

3.1. FAHM katse mõju

Tabelis 1 on ära toodud keskkonnatingimused 2014. aastal katseringides, kust taimi korjati. Fotosünteetiliselt aktiivse kiirguse (PAR) ja mulla veepotentsiaali (SWP) andmed on antud vastavalt sellele, kas taimed korjati kase või haava poolelt, temperatuur (T), suhteline õhuniiskus (RH) ja õhu veeaururõhu defitsiit (VPD) on antud ringi keskmistena. Mulla veepotentsiaali määrati kahel sügavusel – 15 ja 30 cm. Puude erineva kõrguse tõttu oli valgustus ringisiseselt haava ja kase poolel erinev. Ära on näidatud, kui palju erineb niisutusringide keskmine kontrollringide keskmisest (%).

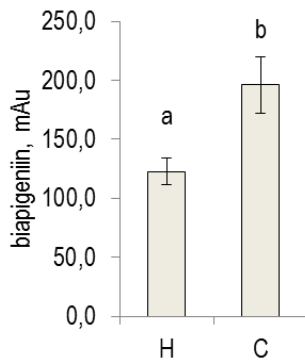
Tabel 1. Keskkonnatingimused katseringides 2014. aastal. H – haab, K – kask.

<i>katsering</i>	<i>T (°C)</i>	<i>RH (%)</i>	<i>VPD (kPa)</i>	<i>SWP 15 (kPa)</i>	<i>SWP 30 (kPa)</i>	<i>PAR (mmol m⁻² s⁻¹)</i>
H1	15,9	82,2	0,43	-11,15	-5,06	308
C1	16,4	80,3	0,50	-18,53	-18,53	244
H3	15,7	82,7	0,41	-1,87	-0,14	201
C3	16,2	81,6	0,45	-3,21 H/-5,16 K	-8,46 H/-3,78 K	204 H/ 279 K
H4	16,1	82,3	0,42	-8,19	-5,64	267
C4	16,2	82,4	0,43	-11,74	-9,75	242
H keskmine	15,9	82,4	0,42	-7,07	-3,61	259
C keskmine	16,3	81,5	0,46	-11,81	-10,69	250
erinevus H/C	-2,2 %	1,2 %	-9,0 %	40,1%	66,2%	3,6 %

Tabel 2. FAHM katse mõju kahefaktorilise dispersioonanalüüsi tulemused, *ns* – efekti mõju pole statistiliselt oluline, $\alpha=0,05$.

<i>tunnus</i>	<i>efekt</i>		
	<i>katsering</i>	<i>töötlus</i>	<i>katsering×töötlus</i>
ln c(biapiginiin) (mAu)	<i>ns</i>	0,012	0,015
ln c(neoklorogeenhape) (%)	0,017	<i>ns</i>	<i>ns</i>
ln c(katehhiin) (%)	0,004	<i>ns</i>	<i>ns</i>
c(hüperosiid) (%)	0,019	<i>ns</i>	0,015
ln c(kvartsitriin) (%)	<0,0001	<i>ns</i>	0,018
ln c(protopseudohüperitsiin) (%)	0,006	<i>ns</i>	0,013
ln c(pseudohüperitsiin) (%)	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,006
ln c(protohüperitsiin) (%)	0,026	<i>ns</i>	0,047
ln c(hüperitsiin) (%)	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,002
ln c(üldhüperitsiinid) (%)	0,014	<i>ns</i>	0,015
c(flavonoidid) (%)	0,034	<i>ns</i>	<i>ns</i>
c(fenoolsed ühendid) (%)	0,044	<i>ns</i>	<i>ns</i>
c(üldlämmastik) (%)	0,034	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Kahefaktorilisest dispersioonanalüüsist, kus sõltumatute muutujatena on katsering (1, 3 ja 4) ning töötlus (H – niisutuskatse, C – kontroll), ilmneb, et töötlusel puudub praktiliselt igasugune mõju kandilise naistepuna keemilisele koostisele (tabel 2). Töötluse mõju avaldub vaid I3,II8-biapigeniini (biflavonoid) puhul – niisutusringide taimedes on oluliselt vähem biapigeniini kui kontrollringide taimedes (joonis 7).



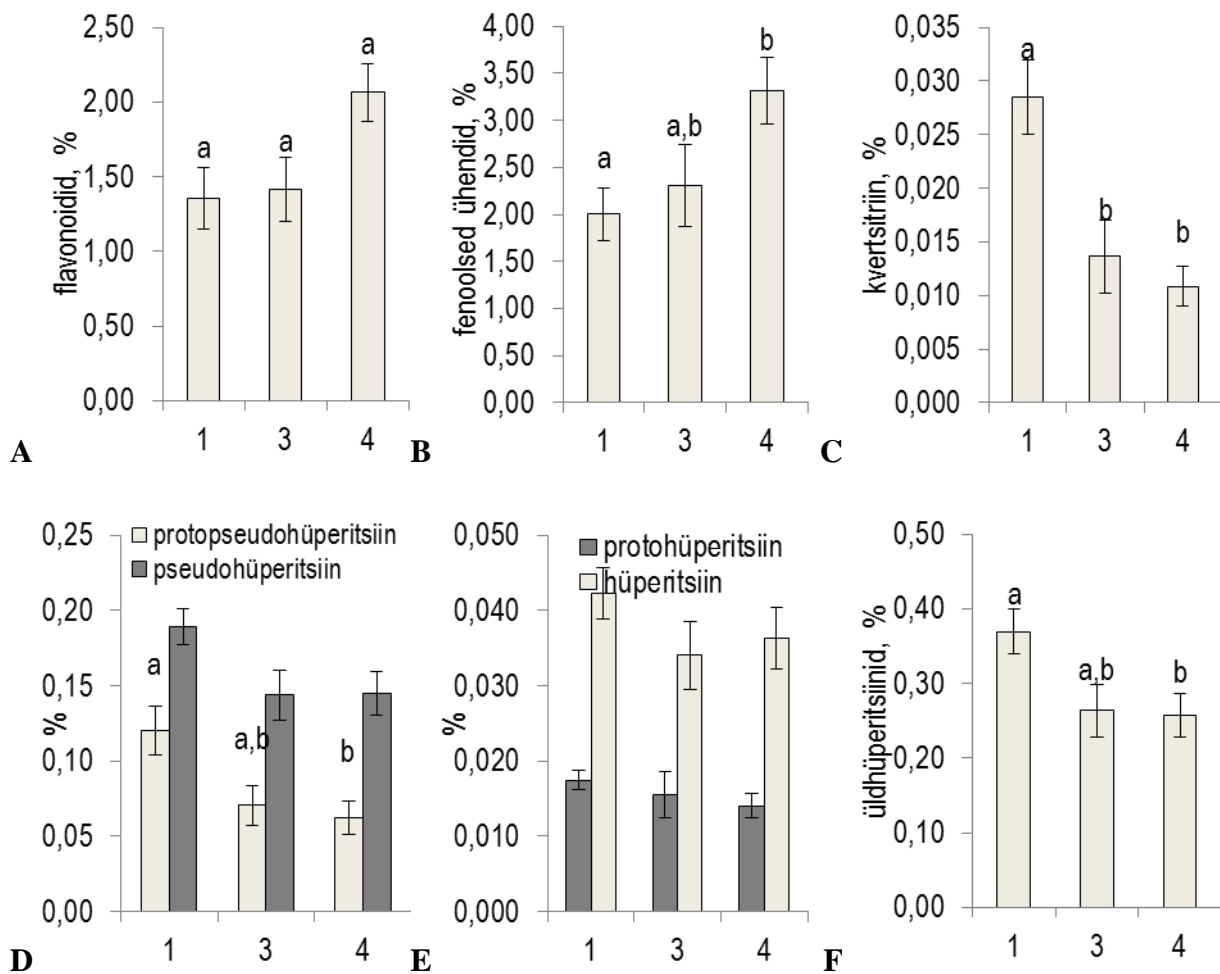
Joonis 7. Biapigeniini sisaldus erinevate töötluste korral, \pm keskmise standardviga. H – niisutuskatse, C – kontroll. Erinevad tähed tulpadel märgivad statistiliselt olulist erinevust rühmade vahel Tukey HSD testi järgi.

Valdavalt sõltub keemilise koostise kvantitatiivne sisaldus katseringist, kust taimed korjati. Katseringi oluline mõju avaldub neoklorogeenhappe, katehiini, hüperosiidi, kvertsitriini, pseudohüperitsiini, protopseudohüperitsiini, flavonoidsete ühendite summa, kõigi fenoolsete ühendite summa ning üldhüperitsiinide (kõigi hüperitsiinide summa) sisalduse ja taime lämmastikusisalduse puhul (tabel 2).

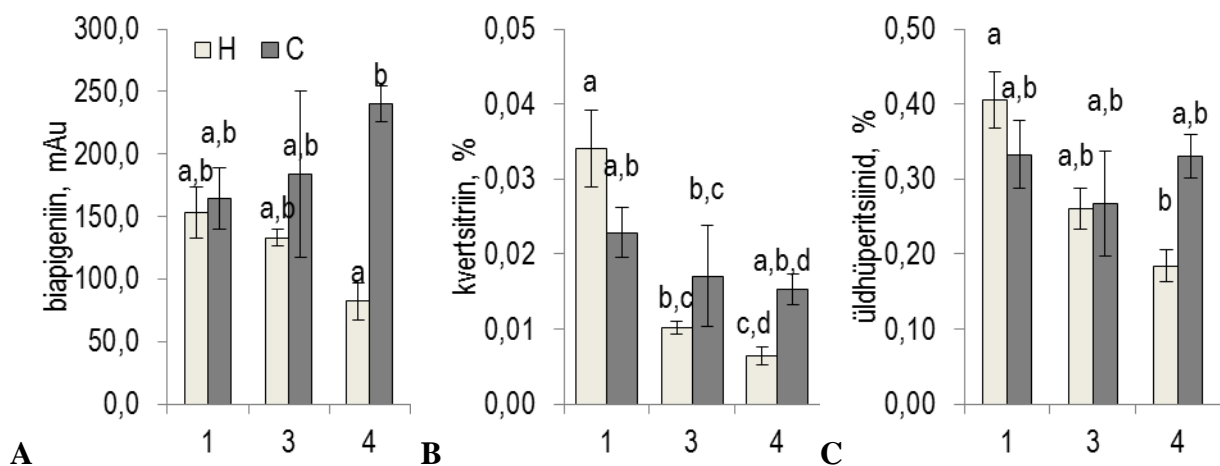
Fenoolsete ühendite (sh katehiinid, klorogeenhapped, hüperosiid, flavonoidid) sisaldused on madalamad 1. ringist ning kõrgemad 4. ringist korjatud taimedes, kuid flavonoidi kvertsitriini sisaldus on vastupidiselt suurem just 1. ringist ning väiksem 3. ja 4. ringist korjatud taimedes (joonis 8 A–C).

Hüperitsiinide sisaldused on suuremad 1. katseringis, katseringi üldine mõju avaldub kõigi hüperitsiinide puhul. Taimedes on pseudohüperitsiini rohkem kui hüperitsiini ning hüperitsiinide lõpp-produkte rohkem kui prekursoreid, see on nii ka 2010. ja 2011. aasta proovides (joonis 8 D–F).

Katseringi ja töötluse koosmõju on oluline biapigeniini, kvertsitriini, hüperosiidi ning kõigi hüperitsiinide ja ka üldhüperitsiinide juures (tabel 2). Kui 1. ja 3. katseringis töötluste vahel olulist erinevust ei ole, siis 4. ringi niisutuskatse taimed sisaldavad oluliselt vähem biapigeniini, kvertsitriini ning hüperitsiini kui kontrollringide taimed (joonis 9).



Joonis 8. Flavonoidide, kõigi fenoolsete ühendite, kvertsitriini ning hüperitsiinide sisaldus katseringides (1, 3, 4), ± keskmise standardviga. Erinevad tähed tulpadel märgivad statistiliselt olulist erinevust rühmade vahel Tukey HSD testi järgi.



Joonis 9. Biapigeniini (A), kvertsitriini (B) ja üldhüperitsiinide (C) sisaldus katseringides (1, 3, 4) eraldi tööstlustena (H – niisutuskatse, C – kontroll), ± keskmise standardviga. Erinevad tähed tulpadel märgivad statistiliselt olulist erinevust rühmade vahel Tukey HSD testi järgi.

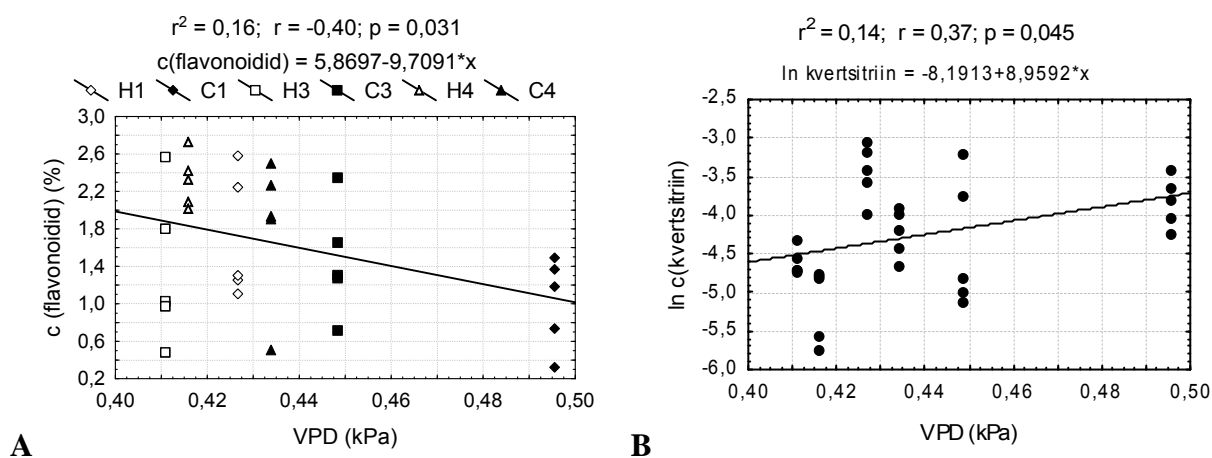
Fenoolsetest ühenditest kiinahappe ja kohvhappe derivaatide, vanillhappe glükosiidi, klorogeenhappe, epikatehiini, isokvertsiitriini, kvartsetiinpentosiidi ning kvartsetiini sisaldus ei sõltu tööstusest ega ka katseringist. Kõigi kvantitatiivselt määratud sekundaarsete metaboliitide sisalduste keskväärtused on lisades 4–6 rühmade kaupa välja toodud.

3.2. Niiskuse mõju (VPD ja SWP)

Õhu veeaururõhu defitsiit (VPD) avaldab mõju kandilise naistepuna flavonoidide sisaldusele (tabel 3). Kõrgema VPD juures kasvanud taimed sisaldavad summaarselt vähem flavonoide, suurima kontsentratsiooniga flavonoidi hüperosiidi sisaldus käitub analoogselt, kvertsiitriini sisaldus aga kasvab VPD kasvades (joonis 10).

Tabel 3. VPD seos sekundaarsete metaboliitide sisaldusega. Lineaarse regressioonanalüüsi tulemused. $\alpha=0,05$

tunnus	korrelatsiooni suund	R^2	$F_{1,28}$	p
c(hüperosiid) (%)	–	0,17	5,73	0,024
ln c(kvertsiitriin) (%)	+	0,14	4,40	0,045
c(flavonoidid) (%)	–	0,16	5,19	0,031

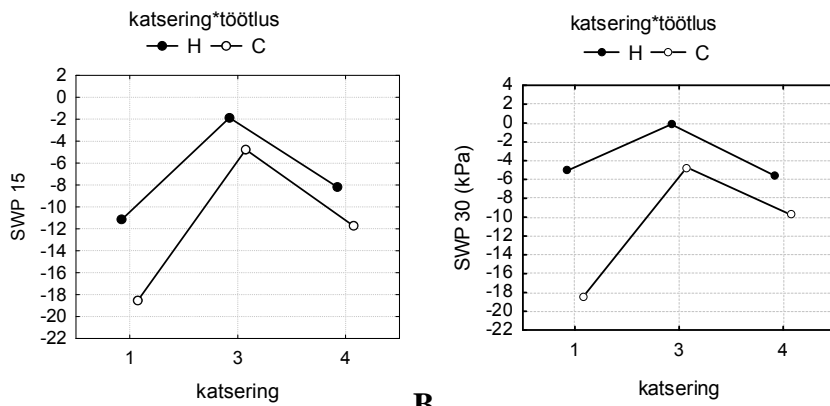


Joonis 10. Flavonoidide sisalduse sõltuvus VPD-st.

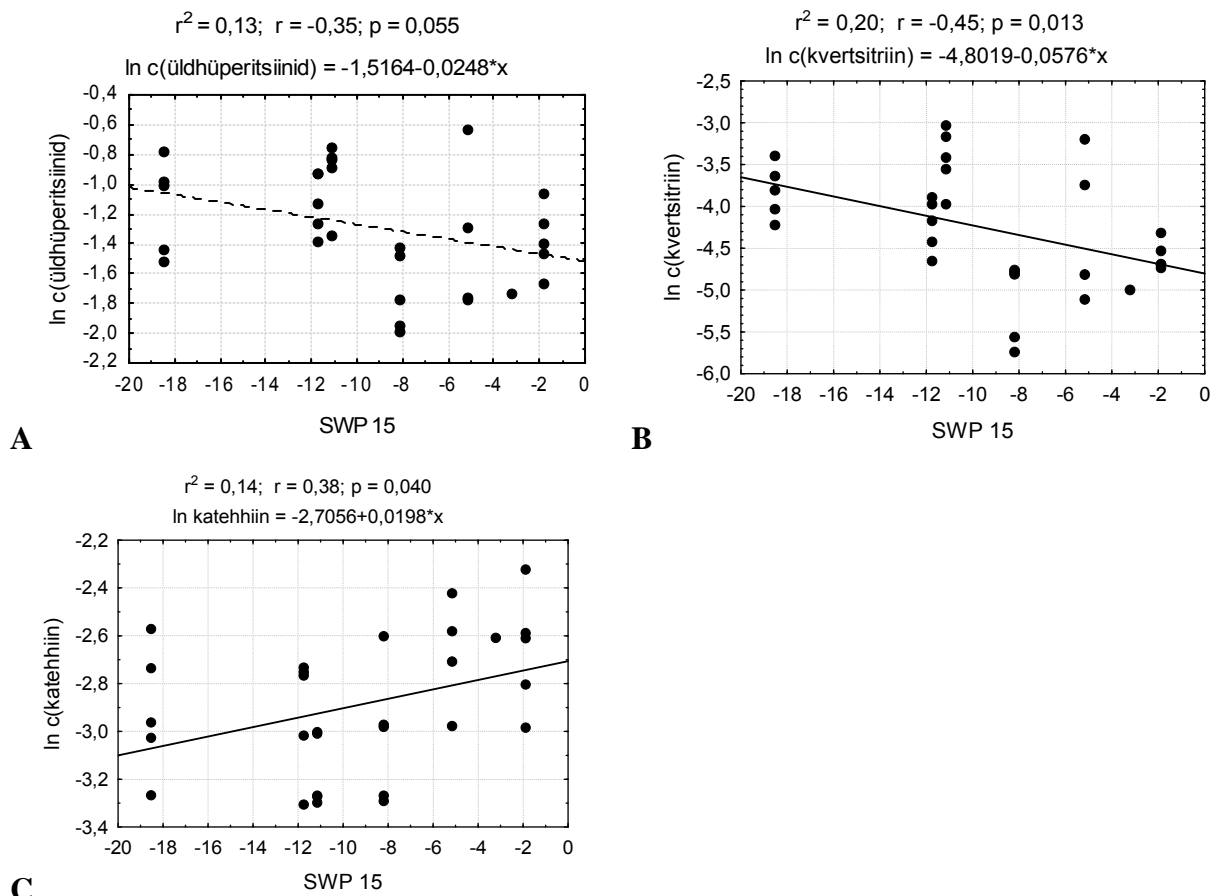
Tabel 4. SWP seos sekundaarsete metaboliitide sisaldusega. Mitmese regressioonanalüüsi tulemused. $\alpha=0,05$, napilt statistiliselt mitteolulised tulemused on heledamas kirjas.

tunnus	korrelatsiooni suund	faktor	R^2	$F_{1,27}$	p
ln c(katehiin)	+	SWP 15	0,34	12,7	0,001
		SWP 30		8,0	0,009
ln c(kvertsiitriin)	–	SWP 15	0,31	8,9	0,006
		SWP 30		4,1	0,052
ln c(üldhüperitsiinid)	–	SWP 15	0,22	6,3	0,018
		SWP 30		3,4	0,078

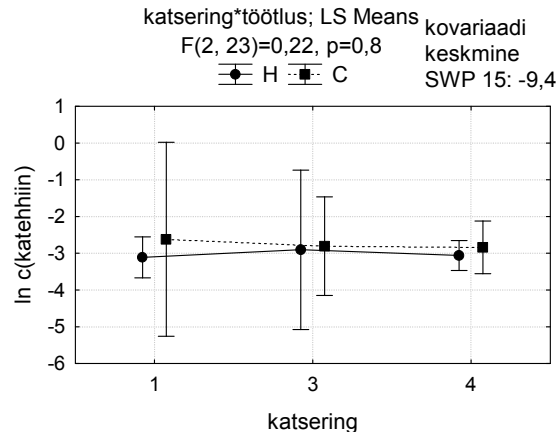
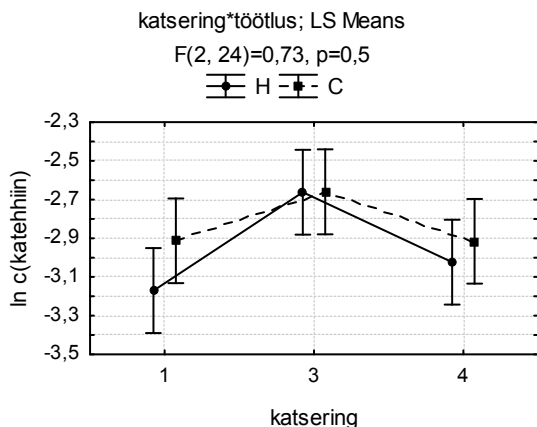
Mulla veepotentsiaali (SWP) väärtused ei ole kõigis kontroll- ja niisutusringides samal tasemel. Erinevused töötuse ja kontrolli vahel ilmnevad paarides (joonis 11). SWP-st sõltub taimede katehiini, kvertsitriini ja üldhüperitsiinide hulk (tabel 4). SWP on ka ainus tegur, mis otseselt üldhüperitsiinide sisaldust mõjutab. Üldhüperitsiinide ja kvertsitriini sisaldus langeb, katehiini sisaldus kasvab mulla veepotentsiaali tõustes (joonis 12). SWP mõju katehiini ja üldhüperitsiinide sisaldusele seletab ära katseringi statistilise olulisuse kahefaktorilises dispersioonanalüüsis (joonis 13).



Joonis 11. SWP erinevused katseringide ja töötuste vahel 15 cm (A) ja 30 cm (B) sügavusel.



Joonis 12. SWP (mõõdetud 15 cm sügavusel) mõju sekundaarsete metaboliitide sisaldusele.



A

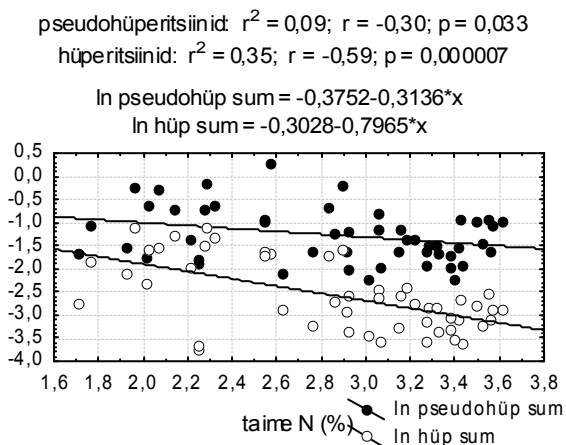
B

Joonis 13. $\ln c(\text{katehiin})$ sõltuvus katseringist ja töötusest enne (A) ja pärast (B) SWP kaasamist kovariaadina.

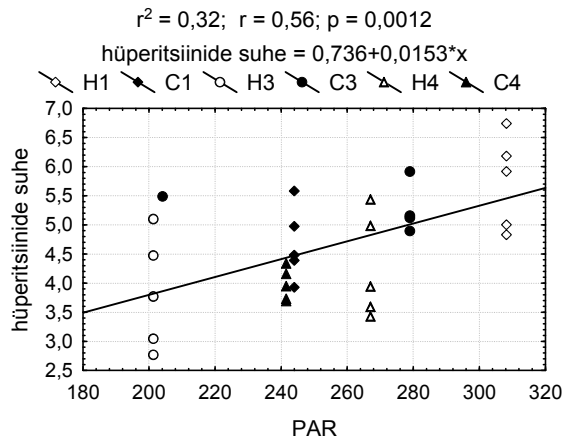
3.3. Valguse mõju

Tabel 5. PAR seos sekundaarsete metaboliitide sisaldusega. Lineaarse regressioonanalüüsi tulemused. $\alpha=0,05$

tunnus	korrelatsiooni suund	R^2	$F_{1,28}$	p
$\ln c(\text{katehiin})$	–	0,21	7,59	0,010
$\ln c(\text{kvertsiiriin})$	+	0,15	4,84	0,036
hüperitsiinide suhe	+	0,32	12,94	0,001



A



B

Joonis 14. Pseudohüperitsiinide ja hüperitsiinide sisalduse sõltuvus taime lämmastiksisaldusest (2 aasta proovides) ning nende suhte sõltuvus PAR-st.

Fotosünteesiliselt aktiivse kiirguse hulga (PAR) mõju taime lämmastiksisaldusele ei leitud, mõju katehiini ja kvertsiiriini sisaldusele on nõrk (tabel 5). Kuigi PAR ei mõjuta taime üldhüperitsiinide hulka, siis kiirgushulga kasvades kasvab ka pseudohüperitsiinide (pseudohüperitsiin + prekursor) ja hüperitsiinide (hüperitsiin + prekursor) omavaheline suhe (joonis 14 B), hüperitsiinide suhe korreleerub ka taime N sisaldusega (joonis 15 D). Suhe on

väiksem madalama valgusintensiivsuse ja taime N sisalduse juures. Hüperitsiinide süntees on lämmastikust tugevamini sõltuvuses ja kahaneb kiiremini lämmastikusisalduse suurenedes kui pseudohüperitsiinide süntees (joonis 14 A). PARi hulk mõjutab aga veidi enam pseudohüperitsiine kui hüperitsiine. Samas on PARi andmed olemas vaid 2014. aasta proovidele ning valimi väiksuse tõttu ei pruugi saadud tulemus suurt üldistusjõudu omada.

3.4. Mulla keemilise koostise mõju

Mulla keemilisest analüüsist saadi lämmastikusisaldus (%), mulla pH_{KCl} ning orgaanilise aine sisaldus (%). Neist andmetest arvatati orgaanilise süsiniku ja lämmastiku sisalduse suhe (C:N) (tabel 6).

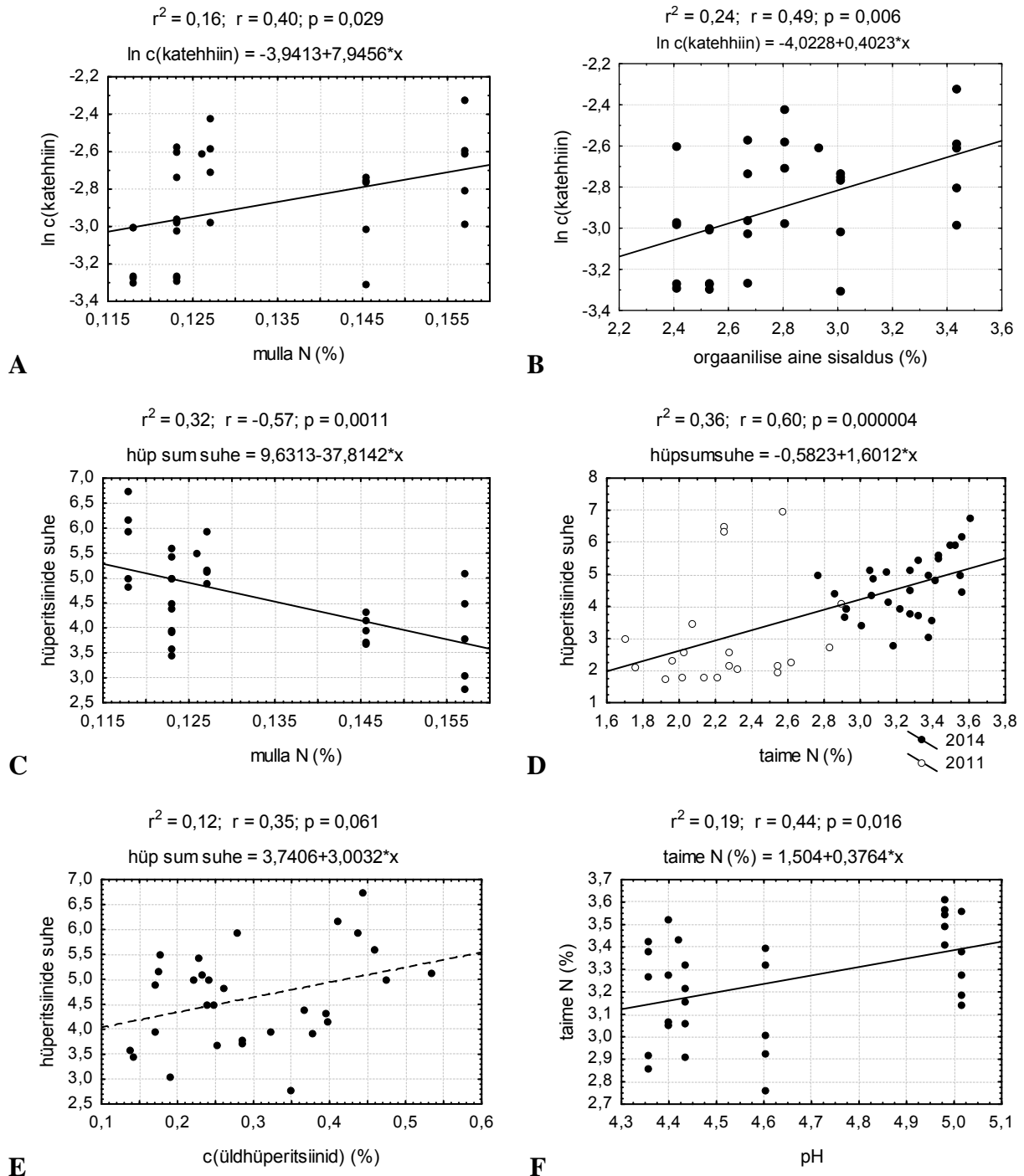
Tabel 6. Katseringide mulla huumushorisoni keemilised omadused.

Katsering	N (%)	org. aine (%)	pH_{KCl}	C:N
H1	0,12	2,53	4,98	12,4
C1	0,12	2,67	4,36	12,6
H3	0,16	3,44	5,02	12,7
C3 haab (1 proov)	0,13	2,93	4,42	13,5
C3 kask (4 proovi)	0,13	2,81	4,40	12,8
H4	0,12	2,41	4,61	11,4
C4	0,15	3,01	4,43	12,0
H keskmine	0,13	2,79	4,87	12,2
C keskmine	0,13	2,83	4,40	12,5
keskmine	0,13	2,81	4,63	12,3

Mulla N sisalduse ja orgaanilise aine sisaldusega on otseses seoses vaid katehiini sisaldus (tabel 8). Madalama mulla N ja orgaanilise aine sisalduse juures on ka katehiini sisaldus väiksem (joonis 15 A, B). Lisaks mõjutab mulla N ja orgaanilise aine sisaldus hüperitsiinide omavahelist suhet (tabel 8 ja joonis 15 C). Hüperitsiinide suhe on 2014. ($R^2=0,12$, $p=0,061$) ja 2010. ($R^2=0,10$; $p=0,061$) aasta proovides suurem, kui kogu proovi üldhüperitsiinide sisaldus on suurem (joonis 15 E). 2011. aasta proovides selline seos puudub, samuti puudub seos kolme aasta proovide peale kokku. Kuigi üldhüperitsiinide sisalduse seos mulla N sisaldusega välja ei tulnud, siis hüperitsiinide suhte järgi on üldhüperitsiine taimes rohkem mulla väiksema N ja orgaanilise aine sisalduse juures. Hüperitsiinide suhe sõltub veel ka taime N sisaldusest, kuid mõju on vastupidine mulla N sisalduse mõjule (joonis 15 D). Mitmeses regressioonanalüüsis, kus sõltuv muutuja on hüperitsiinide suhe ja sõltumatuteks muutujateks mulla ning taime N sisaldus, tulid statistiliselt oluliseks mõlemad sõltumatud muutujad (tabel 7).

Tabel 7. Hüperitsiinide suhte sõltuvus mulla ja taime lämmastikusisaldusest. Mitmese regressioonanalüüsi tulemus. $\alpha=0,05$

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
mulla N%	1	7,3	14,6	0,0007
taime N%	1	4,5	9,0	0,006
viga	27	13,5		



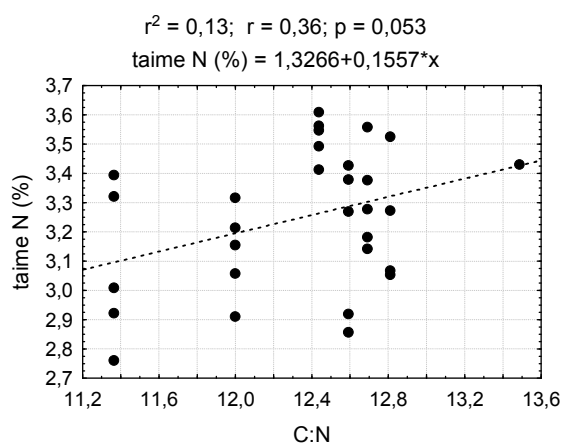
Joonis 15. Sekundaarsete metaboliitide ja taime N sisalduse sõltuvus mulla keemilistest omadustest.

Tabel 8. Mulla lämmastikuisalduse (%) ja orgaanilise aine sisalduse (%) mõju sekundaarsele metabolismile. Lineaarse regressioonanalüüsi tulemused. $\alpha=0,05$

tunnus	korrelatsiooni suund	faktor	R^2	$F_{1,28}$	p
ln c(katehhiin) (%)	+	N	0,16	5,3	0,029
	–	org. aine	0,24	8,7	0,006
hüperitsiinide suhe	–	N	0,32	13,3	0,001
	–	org. aine	0,17	5,7	0,024

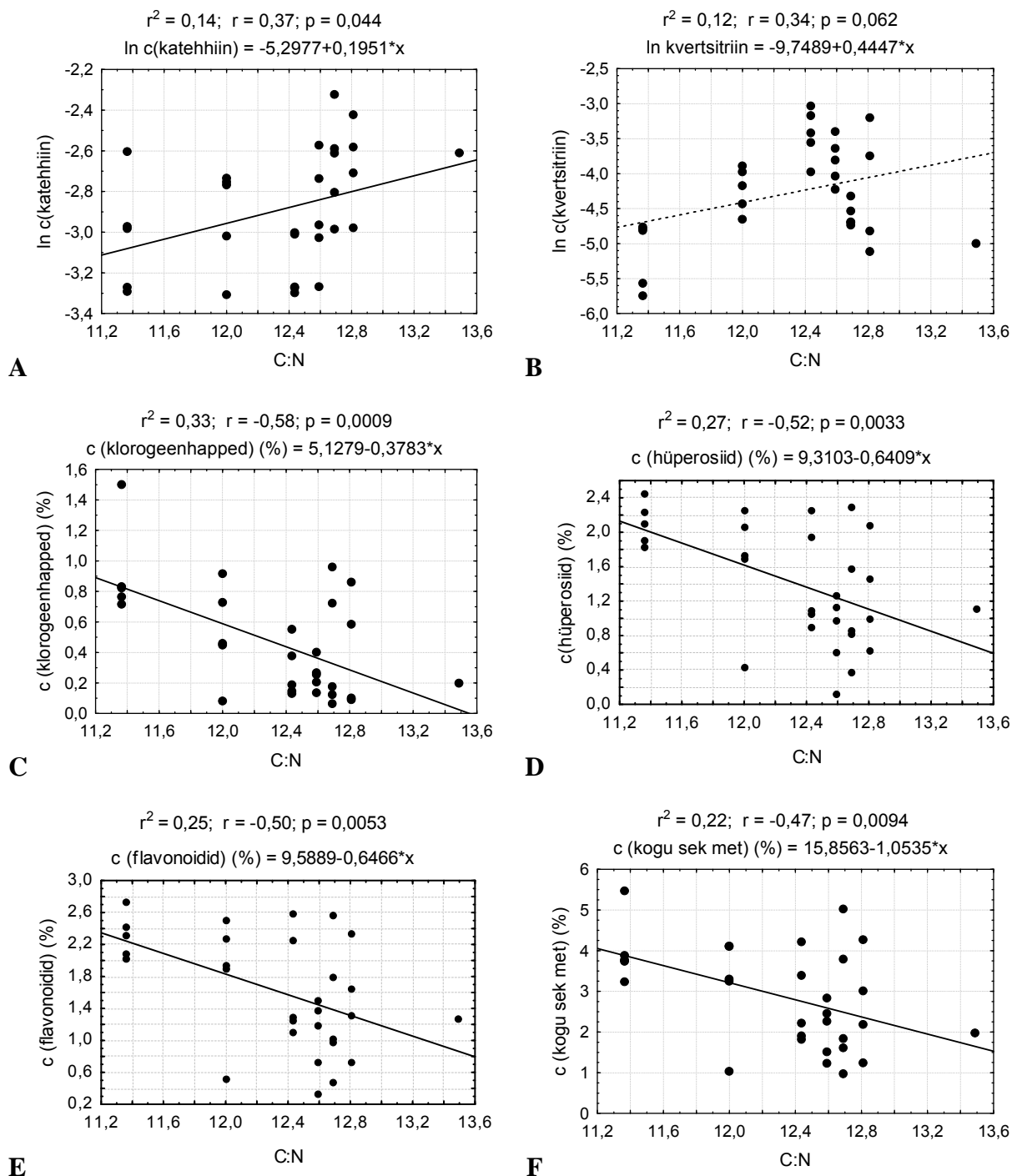
Tabel 9. C:N suhte seos sekundaarsete metaboliitide sisaldusega. Lineaarse regressioonanalüüsi tulemused. $\alpha=0,05$, napilt statistiliselt mitteolulised tulemused on heledamas kirjas.

tunnus	korrelatsiooni suund	R^2	$F_{1,28}$	p
ln c(neoklorogeenhape) (%)	–	0,30	12,1	0,002
ln c(klorogeenhape) (%)	–	0,17	5,8	0,023
ln c(katehhiin) (%)	+	0,14	4,4	0,044
c(hüperosiid) (%)	–	0,27	10,4	0,003
c(kvertsetiinpentosiid) (%)	–	0,20	7,1	0,012
ln c(kvertsitriin) (%)	+	0,12	3,8	0,062
c(flavonoidid) (%)	–	0,25	9,1	0,005
c(fenoolsed ühendid) (%)	–	0,23	8,3	0,007
c (kogu sek. met.) (%)	–	0,22	7,8	0,009
taime N (%)	+	0,13	4,2	0,053



Joonis 16. Taime lämmastikuisalduse sõltuvus mulla C:N suhtest.

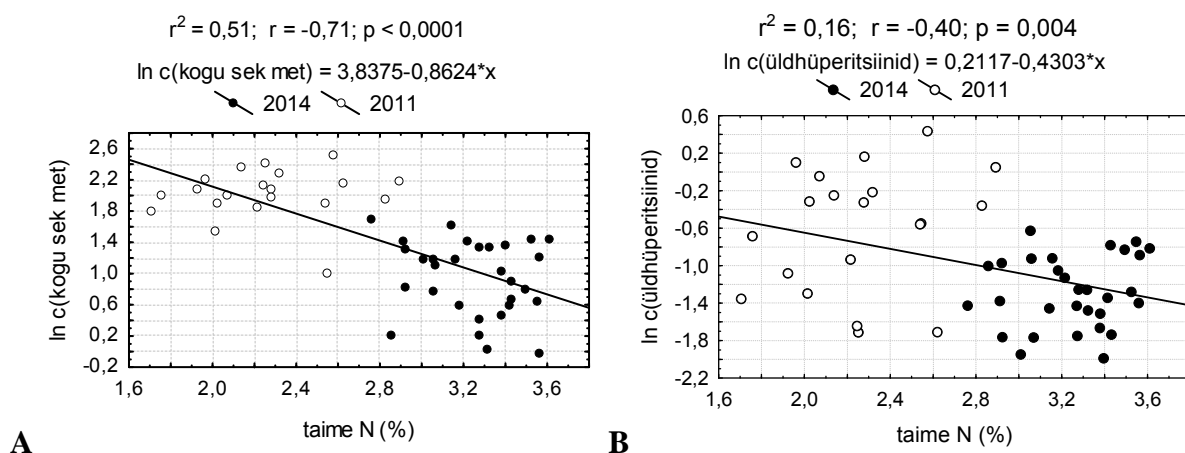
Kui mulla N ja orgaanilise aine sisaldusest midagi peale katehhiini sisalduse ja hüperitsiinide suhte ei sõltu, siis C:N suhtest sõltub peamiselt fenoolsete ühendite sisaldus (tabel 9 ja joonis 17). Valdavalt on seos C:N suhte ja sekundaarsete metaboliitide kontsentratsioonide vahel negatiivne, v.a katehhiini ja kvertsitriini ($p=0,062$) puhul, kui seos on positiivne. Taime lämmastikuisalduse seos C:N suhtega ei tulnud napilt statistiliselt oluliseks, kuid näha on tendents, kus taime N sisaldus kasvab suhtarvu kasvades (joonis 16). Mulla pH_{KCl} mõjutab kõigist kvantitatiivselt määratud ainetest vaid taime lämmastikuisaldust ($R^2=0,19$; $F_{1,28}=6,60$; $p=0,016$) (joonis 15 F).



Joonis 17. Sekundaarsete metaboliitide sisalduse sõltuvus mulla C:N suhtest.

Üldiselt korreleerub sekundaarse metabolismi koguhulk taime lämmastiksisaldusega negatiivselt ($R^2=0,51$; $F_{1,48}=49,9$; $p<0,0001$), negatiivne on seos ka hüperitsiinide ($R^2=0,16$; $F_{1,48}=9,1$; $p=0,004$) ja flavonoidide ($R^2=0,47$; $F_{1,48}=42,0$; $p<0,0001$) puhul eraldi (joonis 18). Hüperitsiinide sisaldus korreleerub kogu taime sekundaarse metabolismiga positiivselt ($R^2=0,20$; $F_{1,48}=12,0$; $p=0,001$). 2014. aasta proovides korreleerub kvartsitriini sisaldus taime lämmastiksisaldusega küll positiivselt, kuid 2011. ja 2014. aasta proovides koos on ka see

seos siiski negatiivne. Ainult FAHM katse taimedes taime N ja sekundaarsete metaboliitide sisalduse vahel seos puudub.



Joonis 18. Taime lämmastiksisalduse korrelatsioon sekundaarse metabolismi koguhulga ning üldhüperitsiinide sisaldusega.

Tabel 10. FAHM katse mõju kovariatsioonanalüüsi tulemus, kovariaat on C:N suhe. *ns* – efekti mõju pole statistiliselt oluline, $\alpha=0,05$, napilt statistiliselt mitteolulised tulemused on heledamas kirjas.

tunnus	efekt			
	C:N	katsering	töötlus	katsering×töötlus
In c(biapigeniin) (mAu)	0,081	<i>ns</i>	0,0053	0,0048
In c(katehhiin) (%)	<i>ns</i>	0,019	<i>ns</i>	<i>ns</i>
In c(kvertsitriin) (%)	<i>ns</i>	0,0001	0,050	0,009
In c(protoseudohüperitsiin) (%)	<i>ns</i>	0,01	<i>ns</i>	0,027
In c(hüperitsiin) (%)	<i>ns</i>	0,073	0,094	0,006
In c(pseudohüperitsiin) (%)	<i>ns</i>	0,017	0,099	0,040
In c(protohüperitsiin) (%)	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,003
In c(üldhüperitsiinid) (%)	<i>ns</i>	0,011	<i>ns</i>	0,019
hüperitsiinide suhe	<i>ns</i>	0,052	<i>ns</i>	0,002

Kahefaktorilisest dispersioonanalüüsist selgus, et valdavalt mängib rolli katsering, kust taimed korjati, ning töötuse efekt praktiliselt puudub (tabel 2). Mulla keemilistest omadustest ja sekundaarsete metaboliitide sisalduse seotusest johtuvalt viisin läbi kovariatsioonanalüüsi samade andmetega, kaasates kovariaadina mulla C:N suhte. Kovariaadi kaasamisel osutus töötuse mõju oluliseks nüüd lisaks biapigeniinile ka kvertsitriini sisalduse puhul. Katseringi ja katsering×töötlus koosmõju jäi alles hüperitsiinide puhul (tabel 10). Seega seletab C:N suhe ära nende fenoolsete ühendite sisalduse varieeruvuse katseringide vahel, mis korreleerusid C:N suhtega statistiliselt olulisel määral (vt ka tabel 9). Hüperitsiinidel seos C:N suhtega puudus ning nende sisaldus sõltub ka kovariatsioonanalüüsis katseringist ja/või katsering×töötlus koosmõjust.

4. ARUTELU

FAHM katse avaldas mõju neoklorogeenhappe, katehiini, hüperosiidi, kvertsitriini, pseudohüperitsiinide, fenoolsete ühendite ning üldhüperitsiinide sisaldusele ja taime lämmastiksisaldusele. Fenoolsete ühendite sisaldused olid suuremad 4 katseringis, hüperitsiinide sisaldused aga 1 katseringis (joonis 8). Katseringi ja töötuse koosmõju oli oluline biapigeniini, kvertsitriini ning hüperitsiinide sisalduse juures, töötuse mõju oli tugevaim 4. katseringis (joonis 9). Töötusest omaette sõltus vaid biapigeniini sisaldus, mis oli märkimisväärselt väiksem niisutuskatse taimedes (joonis 7 ja tabel 2).

FAHM katse taustaandmetest selgub, et 2014. aastal erines õhuniiskus katsealustes niisutus- ja kontrollringides kõigest 1,2%, varasematel aastatel on see number olnud umbes 7%. Küll aga oli niisutusringides väiksem õhu veeaururõhu defitsiit (VPD) ja suurem mulla veepotentsiaal (SWP) (tabel 1). SWP erinevused katseringide (1, 3 ja 4) vahel olid suuremad kui töötuste (H ja C) vahel ja ilmselt sellepärast ei leitud töötuse olulist mõju hüperitsiinide ja valdava enamuse flavonoidide osas.

Kõige otsesem mõju üldhüperitsiinide sisaldusele oli mulla veepotentsiaalil (SWP), kui suurema veesisaldusega mullal kasvanud taimed sisaldasid vähem üldhüperitsiini. Katehiini sisaldus oli suurem aga just niiskemal mullal kasvanud taimedes (tabel 4). Samuti seletas SWP varieeruvus katseringide vahel ära katehiini sisalduse sõltuvuse katseringist. Üldhüperitsiini sisaldus jäi endiselt sõltuma katsering×töötus koosmõjust, kuid katehiini sisaldus oli kõigis katseringides SWPd kovariaadina arvestades võrdne (joonis 13). Zobyed *et al* (2007) poolt liht-naistepunaga läbi viidud eksperimendis langes temperatuuristressi, sh põuda talunud liht-naistepuna taimedes hüperitsiinide sisaldus. Käesolevas töös vähenes hüperitsiinide sisaldus SWP tõustes. Võib järeldada, et vee kättesaadavuse mõju hüperitsiinide sünteesile on optimumiga, kus sünteesi pärssivad nii liigniiskus kui põud.

Hüperitsiinide suhet mõjutas taime lämmastiksisaldus (joonis 15 D), mis sõltus FAHM katses samuti katseringist. Taime N sisalduse mõju suhte suurenemisele on tingitud hüperitsiini sisalduse kiiremast langusest taime N sisalduse tõustes võrreldes pseudohüperitsiini sisalduse langusega (joonis 14 A). Üldhüperitsiinide sisaldus on

hüperitsiinide suhtega seotud 2014. ja 2010. aasta proovide puhul, sedagi nõrgalt ($p=0,061$ mõlemal aastal). Kolme aasta proovide peale kokku ($N=88$) on see seos lausa olematu.

Niisutusringides kasvas naistepuna eranditult kase poolel, kus oli puude madalama kasvu tõttu parem valgustatus. Ka taimede lämmastikuomastamine oli soodustatud niisutusringides mulla kõrgema pH tõttu, kuid sellele vaatamata ei tulnud seos PARi ja taime N sisalduse vahel oluliseks. PAR, nagu ka taime N sisaldus, korreleerusid hüperitsiinide suhtega. Kuigi varasemalt on näidatud, et valgusintensiivsuse kasvades peaks hüperitsiinide sisaldus taimes kasvama ning nende suhe jääma samaks (Briskin & Gawienowski 2001), siis antud töös üldhüperitsiinide sisalduse tõusu ei täheldatud. Selle asemel tõusis hoopis hüperitsiinide suhe (joonis 14 B). Kui arvestada, et hüperitsiinide suhte suurenemisega kaasneb üldhüperitsiinide sisalduse tõus (joonis 15 E), siis vastab käesolevas töös saadud tulemus varasematele andmetele (Briskin & Gawienowski 2001; Mosaleeyanon *et al* 2005). Otsene seos üldhüperitsiinide sisalduse ja valgusintensiivsuse vahel võis jääda leidmata võrdlemisi kitsa valgustingimuste diapasooni tõttu – tingimused katseringides ei erinenud üksteisest oluliselt.

Nagu juba öeldud, sõltus taimede N sisaldus FAHM katses ringist. Üldiselt korreleerub sekundaarmetaboliitide koguhulk kõige tugevamini N hulgaga taimes, korrelatsioon on piisava valimi korral negatiivne (joonis 18 A). FAHM katse keskkonnatingimuste varieeruvus oli siiski üsna väike, näiteks neis proovides puudus seos sekundaarse metabolismi hulga ja taime lämmastikusisalduse vahel. FAHMi proovides on nii taime lämmastikuhulk kui ka sekundaarmetaboliitide koguhulk suurem niisutuskatse taimedes, kuid see erinevus pole statistiliselt oluline.

Siiski, mulla keemilised omadused erinevates katseringides olid küllaltki erinevad, mis tõenäoliselt seletab ka sekundaarse metabolismi erinevusi katseringide vahel (joonis 8). Niisutusringides oli jälle pH oluliselt suurem kui kontrollringides (tabel 6) ning seda on täheldatud ka varasematel aastatel (Parts *et al* 2013; Kukumägi *et al* 2014). On teada, et mulla pH-d mõjutab mulla veesisaldus. Käesolevas töös korreleeruski N hulk taimes kõige paremini mulla pH-ga, seejuures korrelatsioon oli positiivne (joonis 15 F). Kukumägi *et al* (2014) näitasid, et niisutusringide mullas on mikroorganisme rohkem. Mikroorganismide biomass on aga tihedalt seotud mulla pH-ga (Kemmitt *et al* 2006). Mikroorganismide elutegevus soodustab ka lämmastiku mineraliseerumist ja seeläbi taimedele kättesaadavust (Mary *et al* 1996). Mulla suur veesisaldus võib muuta tingimused mullas anaeroobsemaks, mis toob kaasa nitraatiooni redutseerimise ammoniumiooniks, see aga põhjustab pH tõusu (Zhang &

Wienhold 2002). Ammooniumioon seostub positiivse laengu tõttu tugevamini mullaosakestega, negatiivse laenguga nitraatioon kaldub sademetega välja leostuma. Korrelatsiooni puudumine mulla pH ja mulla N sisalduse vahel võib olla tingitud sellest, et mullas määrati kogu N sisaldust, seal hulgas ka orgaaniline N, millest enamik pole taimedele omastatav. Korrelatsioon puudub ka mulla pH ja C:N suhte vahel (Kemmitt *et al* 2006). Samal FAHM katsealal kasvanud mõlema lehtpuuliigi puhul on tihti täheldatud niisutusringides madalamat lehtede N kontsentratsiooni võrreldes kontrollringidega (Tullus *et al* 2012; Sellin *et al* 2013). Et naistepunataimedes selline seos puudus, ei saa veel teha põhjapanevaid järeldusi niisutuse mõju kohta taimede N sisaldusele. Kui FAHM katse arukaskede lehtede väiksemat N sisaldust põhjendati vähenenud transpiratsioonivoo ning massivooluga (Sellin *et al* 2013), siis kandilise naistepuna puhul transpiratsioonivoo vähenemist N sisalduse järgi ennustada ei saa.

Üldiselt on teada, et sekundaarsete metaboliitide süntees on soodustatud piiratud toitainete kättesaadavusega tingimustes. 2014. aasta proovide lämmastikusisaldus oli suurem kui 2011. aasta proovides, mis viitab vähemasti sellele, et FAHM katsest korjatud taimede kasvutingimused olid keskmiselt paremad. Madala toimeainete sisalduse tõttu võib juhtuda, et sõltuvused erinevatest keskkonnatingimustest ei tule lihtsalt välja.

Veeauru defitsiidi (VPD) mõju kandilise naistepuna flavonoidide sisaldusele on vastupidine põuakatsete põhjal oodatule. VPD kasvades kahaneb flavonoidide süntees, seejuures kvertsitriini süntees kasvab (joonis 10). Valdavalt on täheldatud fenoolsete ühendite sünteesi tõusu seoses vee kättesaadavuse langusega (Gray *et al* 2003; de Abreu & Mazzafera 2005). Flavonoidide sünteesi langust VPD vähenedes võib seletada mõne teise, VPD vähenemisega seotud keskkonnastressi (nt hüpoksia) tugevama mõjuga. Ordoñez *et al* 2009 metaanalüüs näitas, et lehe keemiline koostis sõltub pigem mulla keemilistest omadustest kui keskkonnatingimustest. Nii sõltuski flavonoidide sisaldus suuremal määral mulla C:N suhtest (tabel 9). Mulla C:N suhte väikesed erinevused katseringide vahel põhjendavad ka flavonoidide sisalduse erinevusi katseringide vahel. Flavonoide sünteesitakse rohkem madalama mulla C:N suhte korral ehk nõu parema kvaliteediga mullal (joonis 17 E), CNB hüpotees, kus madalamakvaliteedilisel mullal kasvanud taimed sisaldavad rohkem sekundaarseid metaboliite, ei pea antud katses flavonoidide puhul paika. Võimalik on ka, et madal VPD ja kõrge SWP indutseerivad vabade radikaalide teket taimes, millele vastukaaluks sünteesitakse antioksidante – flavonoide. Niisutusringide haabadel näiteks on niisketel

aastatel täheldatud noorte lehtede spetsiifilisi kahjustusi seoses pidevalt lehte katva õhukese veekihiga (Kupper *et al* 2011; Tullus *et al* 2012).

H4 ja C4 ringides olid keskkonnatingimused (T, RH, VPD) 2014. aastal võrdsed (tabel 1), kuid töötluse mõju oli suurim just H4 ringis võrreldes C4-ga. Samas olid neis ringides C:N suhted kogu katse madalaimad. Biapigeniini sisaldus ei sõltunud mulla C:N suhtest, kuid sõltus töötlusest (joonis 7). Võib järeldada, et töötluse mõju on seda tugevam, mida väiksem on mulla C:N suhe ja seega parem N kättesaadavus taimedele. Kui üldflavonoidide sisaldus oli suurem pigem niiskemates tingimustes kasvanud taimedes, siis biapigeniini sisaldus käitus vastupidiselt. Biapigeniin on oluline lisaks antioksidantsele toimele ka antidepressiivsete omaduste poolest (Nielsen *et al* 1988; Butterweck *et al* 2000). Nii võib keskkonnatingimustest sõltuda mitte ainult summaarne sekundaarsete metaboliitide hulk, vaid ka mõju, mida see inimorganismile avaldab.

5. KOKKUVÕTE

Käeosoleva uurimistöö eesmärgiks oli uurida keskkonnatingimuste mõju kandilise naistepuna (*Hypericum maculatum* Crantz) sekundaarsele metabolismile ning võrrelda üldiselt saadud tulemusi varasematel aastatel korjatud proovidega, kus oli ka liht-naistepuna (*Hypericum perforatum* L.) esindatud. Proovid koguti 2014. aastal FAHM katsealalt, 2010. ja 2011. aastal Eesti erinevaist paigust.

Vaadeldi sekundaarsete metaboliitide kontsentratsioonide erinevuste sõltuvust keskkonnatingimustest ning mulla keemilistest omadustest.

FAHM katse tulemustest selgus, et liigniisketes tingimustes sünteesivad kandilise naistepuna taimed rohkem üldflavonoide, enim hüperosiidi, kuid olulise, antidepressiivse toimega biflavonoidi, I3,II8-biapigeniini sünteesi liigniiskus hoopis pärsib. Ka hüperitsiinide süntees on pärsitud liigniisketes tingimustes.

Leiti, et taimede lämmastikusisaldus sõltub mulla pH-st, mis oli võrreldes kontrollringidega suurem niisutusringides. Sekundaarsete metaboliitide sisaldus 2014. ja 2011. aasta proovides koos sõltus taime lämmastikusisaldusest negatiivselt. Flavonoidide sisaldusele avaldas enim mõju mulla C:N suhe, väiksema suhtarvu korral oli flavonoidide sisaldus suurem. Mulla N ja orgaanilise aine sisaldus avaldas mõju katehiini sisaldusele ning hüperitsiinide suhtele, seejuures ei mõjutanud üldhüperitsiinide sisaldust. Ka fotosünteesiliselt aktiivse kiirgushulga kasvades kasvas hüperitsiinide suhe, kuid mitte hüperitsiinide summaarne sisaldus.

Kõrgendatud õhuniiskusega keskkonnas kasvanud kandilise naistepuna taimede sekundaarsete metaboliitide kontsentratsioon on suurem kui kontrolltaimedes, kuid erinevus tuleb peamiselt põletikuvastaste omadustega flavonoidide (eeskätt hüperosiidi) sisalduse tõusu arvelt. Olulisemate toimeainete, viirus- ja kasvajarakkude arengut pärssivate hüperitsiinide ja antidepressiivsete omadustega I3,II8-biapigeniini sisaldused on suuremad kuivemates tingimustes kasvanud taimedes. FAHM katse võimaldab tõstata sekundaarse metabolismi koguhulka kandilise naistepuna taimes, kuid selle kvaliteet kannatab ning koostises jäävad domineerima flavonoidid.

The effect of rising air humidity and related changes in the ecosystem on secondary metabolism of *Hypericum maculatum* Crantz.

Linda Rusalepp

6. SUMMARY

The aim of this Master's Thesis is to study the environmental impact on secondary metabolism of *Hypericum maculatum* Crantz, as it has similar chemical composition but is less studied than *Hypericum perforatum* L. Main chemical constituents hypericins have been reported to have antiviral and antiretroviral, anti-tumoral and inflammatory properties (Meruelo *et al* 1988; Thomas & Pardini 1992; Panossian *et al* 1996) whereas flavonoids generally have also inflammatory properties, but one – I3,II8-biapigenin has shown antidepressant activities (Nielsen *et al* 1988; Butterweck *et al* 2000; Sosa *et al* 2007). Plant secondary metabolism is generally influenced by environmental factors.

H. maculatum samples were gathered from the free air humidity manipulation experiment (FAHM), also samples consisting of species *H. maculatum* and *H. perforatum* gathered from various sites of Estonia were used in comparison.

Plant material was ground, sieved and extracted (maceration) with plant to methanol ratio 1:20 (w/v). Compounds were identified using reversed phase HPLC-ESI-MS/MS and fragmentation in negative mode and quantified using HPLC-ESI-MS/MS or HPLC-DAD/UV using an external calibration curve method. Soil and plant nitrogen was determined using Kjeldahl acid digestion, soil organic matter was determined with loss-on-ignition method and soil pH was measured in KCl buffer solution.

Total secondary compounds were generally negatively correlated with plant nitrogen content, but not in year 2014 alone. Plant nitrogen content was affected by soil pH which was higher in treatment plots compared to control plots. Nevertheless, plants that received humidification treatment contained more secondary metabolites quantitatively. Total flavonoids were most affected by soil C:N ratio, the relation was negative. Soil N and soil organic compounds affected catechin content and also the ratio between pseudohypericin and hypericin, whereas it did not affect the amount of total hypericins. The hypericins ratio also grew with rising photosynthetically active radiation (PAR). The total amount of hypericins still did not change,

although earlier studies have shown the ratio to be stable instead and total amount of hypericins to rise. Plants growing with lower vapour pressure deficit (VPD) and higher soil water potential (SWP) showed higher amounts of flavonoids, probably due to humidity induced stress, e.g. hypoxia. Plants growing with lower SWP showed higher amounts of hypericins, although generally an increase in these compounds has been noticed accompanied with water deficit, not excess. This suggests the relation to water availability is a curve with an optimum. Also biapigenin content was higher in plants grown in less humid condition.

The total amount of secondary metabolites is higher in humidification treatment plants than in control plants. This difference comes from the content of flavonoids (mainly hyperoside). The amount of more important substances hypericins and biapigenin show a decrease related to higher water availability in the environment.

In conclusion, the FAHM experiment enables to enhance the secondary metabolism of *Hypericum maculatum*, but the quality of the chemical composition suffers.

7. TÄNUAVALDUSED

Tänu ja kiituse on ära teeninud minu juhendaja Anu Sõber, lisaks ka Jaak Sõber vihmutuskatse käigus hoidmise eest, Krista Lõhmus ja Priit Kupper fooniandmetega varustamise eest ning Tõnu Püssa, kes HPLC tehnilise poolega tegeles.

8. KASUTATUD KIRJANDUS

- Bagdonaite E., Mártonfi P., Repcak M., Labokas J. (2012) Variation in the concentrations of major bioactive compounds in *Hypericum perforatum* L. from Lithuania. *Industrial Crops and Products*, **35**, 302–308.
- Barnes J., Anderson L. A., Phillipson J. D. (2002) *Herbal Medicines: A guide for healthcare professionals*. 2nd ed, pp. 444–453. Pharmaceutical Press, London Chicago.
- Barros L., Dueñas M., Ferreira I. C. F. R., Carvalho A. M., Santos-Buelga C. (2011) Use of HPLC–DAD–ESI/MS to profile phenolic compounds in edible wild greens from Portugal. *Food Chem.* **127**, 169–173.
- Bradley P. (2006) *British Herbal Compendium: Volume 2: A handbook of scientific information on widely used plant drugs*. pp. 363–367. British Herbal Medicine Association, Bournemouth.
- Brechner M. L., Albright L. D., Weston L. A. (2011) Effects of UV-B on secondary metabolites of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) grown in controlled environments. *Photochem. Photobiol.* **87**, 680–684.
- Briskin D. P., Gawienowski M. C. (2001) Differential effects of light and nitrogen on production of hypericins and leaf glands in *Hypericum perforatum*. *Plant Physiol. Biochem.* **39**, 1075–1081.
- Brolis M., Gabetta B., Fuzzati N., Pace R., Panzeri F., Peterlongo F. (1998) Identification by high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography-UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. *J. Chromatogr. A*, **825**, 9–16.
- Butterweck V., Jürgenliemk G., Nahrstedt A., Winterhoff H. (2000) Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med.* **66(1)**, 3–6.
- Charrouf Z., Hilali M., Jauregui O., Soufiaoui M., Guillaume D. (2007) Separation and characterization of phenolic compounds in argan fruit pulp using liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectroscopy. *Food Chem.* **100**, 1398–1401.

- Cirak C., Radusienė J., Karabük B. S., Janulis V., Ivanauskas L. (2007) Variation of bioactive compounds in *Hypericum perforatum* growing in Turkey during its phenological cycle. *Journal of Integrative Plant Biology*, **49** (5), 615–620.
- Crawley M. J. (1997) *Plant Ecology*. 2nd ed, pp. 132–155; 294–313. Blackwell Science Ltd.
- de Abreu I. N., Mazzafera P. (2005) Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiol. Biochem.* **43**, 241–248.
- De Vos B., Vandecasteele B., Deckers J., Muys B. (2005) Capability of loss-on-ignition as a predictor of total organic carbon in non-calcareous forest soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **36**, 2899–2921.
- Di Carlo G., Borrelli F., Ernst E., Izzo A. A. (2001) St. John's wort: Prozac from the plant kingdom. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 292–297.
- Dona M., Dell'Aica I., Pezzato E., Sartor L., Calabrese F., Della Barbera M., Donella-Deana A., Appendino G., Borsarini A., Caniato R., Garbisa S. (2004) Hyperforin inhibits cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.* **64**, 6225–6232.
- Dueñas M., Mingo-Chornet H., Pérez-Alonso J. J., Di Paola-Naranjo R., Gonzáles-Paramás A. M., Santos-Buelga C. (2008) Preparation of quercetin glucuronides and characterization by HPLC-DAD-ESI/MS. *Eur Food Res Technol.*, **227**, 1069–1076.
- Feisst C., Werz O. (2004) Suppression of receptor-mediated Ca²⁺ mobilization and functional leukocyte responses by hyperforin. *Biochem. Pharmacol.* **67**, 1531–1539.
- Filippini R., Piovan A., Borsarini A., Caniato R. (2010) Study of dynamic accumulation of secondary metabolites in three subspecies of *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia*, **81**, 115–119.
- Germ M., Stibilj V., Kreft S., Gaberščik A., Kreft I. (2010) Flavonoid, tannin and hypericin concentrations in the leaves of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) are affected by UV-B radiation levels. *Food Chem.* **122**, 471–474.
- Gîtea D. (2010) Comparative pharmacobotanical research regarding some *Hypericum* species in the Bihor county. Doctoral thesis abstract.
- Gîtea D., Şipoş M., Mircea T., Paşca B. (2010) The analysis of alcoholic extracts of *Hypericum* species by UV/Vis spectrophotometry. *Analele Universitatii din Oradea – Fascicula Biologie*, **Tom. XVII/1** 111–115.
- Glisic S., Smelcerovic A., Zuehlke S., Spitteller M., Skala D. (2008) Extraction of hyperforin and adhyperforin from St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) by supercritical carbon dioxide. *J. of Supercritical Fluids*, **45**, 332–337.

- Gray D. E., Pallardy S. G., Garrett H. E., Rottinghaus G. E. (2003) Effect of acute drought stress and time of harvest on phytochemistry and dry weight of St. John's wort leaves and flowers. *Planta Med.* **69**, 1024–1030.
- Hermes D. A., Mattson W. J. (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *Q Rev Biol.* **67**(3), 283–335.
- Jensen R. A. (1985) The shikimate/arogenate pathway: link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. *Physiol. Plant.* **66**, 164–168.
- Kemmitt S. J., Wright D., Goulding K. W. T., Jones D. L. (2006) pH regulation of carbon and nitrogen dynamics in two agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* **38**, 898–911.
- Kitanov G. M. (2001) Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. *Biochem. Syst. Ecol.* **29**, 171–178.
- Krall H., Kukk T., Kull T., Kuusk V., Leht M., Oja T., Reier Ü., Sepp S., Zingel H., Tuulik T. (2007) *Eesti taimede määraja*. p. 192. Eesti Loodusfoto, Tartu.
- Kukk T. (2005) *Eesti taimede kukeaubits*. p. 194. Varrak, Tallinn.
- Kukumägi M., Ostonen I., Kupper P., Truu M., Tulva I., Varik M., Aosaar J., Sõber J., Lõhmus K. (2014) The effects of elevated atmospheric humidity on soil respiration components in a young silver birch forest. *Agric. For. Meteorol.* **194**, 167–174.
- Kupper P., Sõber J., Sellin A., Lõhmus K., Tullus A., Raim O., Lubenets K., Tulva I., Uri V., Zobel M., Kull O., Sõber A. (2011) An experimental facility of free air humidity manipulation (FAHM) can alter water flux through deciduous tree canopy. *Environ. Exp. Bot.* **72**, 432–438.
- Laakmann G., Schüle C., Baghai T., Kieser M. (1998) St. John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry*, **31**, 54–59.
- Lu L., Song F.-R., Tsao R., Jin Y.-R., Liu Z.-Q., Liu S.-Y. (2010) Studies on the homolytic and heterolytic cleavage of kaempferol and kaempferide glycosides using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **24**, 169–172.
- Markowicz Bastos D. H., Saldanha L. A., Catharino R. R., Sawaya A. C. H. F., Cunha I. B. S., Carvalho P. O., Eberlin M. N. (2007) Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*, **12**, 423–432.
- Mártonfi P., Repčák M., Ciccrelli D., Garbari F. (2001) *Hypericum perforatum* L. – chemotype without rutin from Italy. *Biochem. Syst. Ecol.* **29**, 659–661.

- Mártonfi P., Repčák M., Zanvit P. (2006) Secondary metabolites variation in *Hypericum maculatum* and its relatives. *Biochem. Syst. Ecol.* **34**, 56–59.
- Mary B., Recous S., Darwis D., Robin D. (1996) Interactions between decomposition of plant residues and nitrogen cycling in soil. *Plant Soil.* **181**, 71–82.
- Matsuki M. (1996) Regulation of plant phenolic synthesis: from biochemistry to ecology and evolution. *Aust. J. Bot.* **44**, 613–634.
- Medina M. A., Martinez-Poveda B., Amores-Sanchez M. I., Quesada A. R. (2006) Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? *Life Sci.* **79**, 105–111.
- Meruelo D., Lavie G., Lavie D. (1988) Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5230–5234.
- Mosaleeyanon K., Zobayed S. M. A., Afreen F., Kozai T. (2005) Relationships between net photosynthetic rate and secondary metabolite contents in St. John's wort. *Plant Sci.* **169**, 523–531.
- Murch S. J., Haq K., Rupasinghe H. P. V., Saxena P. K. (2003) Nickel contamination affects growth and secondary metabolite composition of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Environ. Exp. Bot.* **49**, 251–257.
- Nielsen M., Frokjaer S., Braestrup C. (1988) High affinity of the naturally-occurring biflavonoid, amentoflavone, to brain benzodiazepine receptors in vitro. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 3285–3287
- Official Methods of Analysis* 15th ed (1990) Protein (crude) determination in animal feed: copper catalyst Kjeldahl method. (984.13), Association of Official Analytical Chemists (AOAC).
- Ordoñez J. C., van Bodegom P. M., Witte J.-P. M., Wright I. J., Reich P. B., Aerts R. (2009) A global study of relationships between leaf traits, climate and soil measures of nutrient fertility. *Global Ecol. Biogeogr.* **18**. 137–149.
- Panossian A. G., Gabrielian E., Manvelian V., Jurcic K., Wagner H. (1996) Immunosuppressive effects of hypericin on stimulated human leukocytes: inhibition of the arachidonic acid release, leukotriene B₄ and Interleukin-1 α production, and activation of nitric oxide formation. *Phytomedicine.* **3(1)**, 19–28.
- Parts K., Tedersoo L., Lõhmus K., Kupper P., Rosenvald K., Sõber A., Ostonen I. (2013) Increased air humidity and understory composition shape short root traits and the colonizing ectomycorrhizal fungal community in silver birch stands. *For. Ecol. Manage.* **310**, 720–728.

- Plazonić A., Bucar F., Maleš Ž., Mornar A., Nigović B., Kujundžić N. (2009) Identification and Quantification of Flavonoids and Phenolic Acids in burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.), Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Molecules*, **14**, 2466–2490.
- Raal A. (2010) *Farmakognoosia*. pp. 178–180. Tartu Ülikooli Kirjastus, Tartu.
- Radušienė J., Bagdonaitė E., Kazlauskas S. (2004) Morphological and Chemical Evaluation on *Hypericum perforatum* and *H. maculatum* in Lithuania. *Acta Hort.* **629**, 55–62.
- Rusalepp L. (2012) Eestis looduslikult kasvava kahe naistepunaliigi (*Hypericum spp*) metanooliekstraktide keemilise koostise analüüs. Bakalaureusetöö, Tartu.
- Saddiqe Z., Naeem I., Maimoona A. (2010) A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *J. Ethnopharmacol.* **131**, 511–521.
- Sánchez-Rabaneda F., Jáuregui O., Lamuela-Raventós R. M., Viladomat F., Bastida J., Codina C. (2004) Qualitative analysis of phenolic compounds in apple pomace using liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem mode. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 553–563.
- Schempp C. M., Pelz K., Wittmer A., Schöpf E., Simon J. C. (1999) Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *Lancet*, **353**, 2129.
- Schwarz D., Kisselev P., Roots I. (2003) St. John's wort extracts and some of their constituents potently inhibit ultimate carcinogen formation from benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1. *Cancer Res.* **63**, 8062–8068.
- Seigler D. S. (2002) *Plant secondary metabolism*. 2nd ed, Kluwer Academic Publisher, Boston/Dordrecht/London.
- Sellin A., Tullus A., Niglas A., Õunapuu E., Karusion A., Lõhmus K. (2013) Humidity-driven changes in growth rate, photosynthetic capacity, hydraulic properties and other functional traits in silver birch (*Betula pendula*). *Ecol. Res.* **28**, 523–535.
- Sleno L., Daneshfar R., Eckert G. P., Müller W. E., Volmer D. A. (2006) Mass spectral characterization of phloroglucinol derivatives hyperforin and adhyperforin. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 2641–2648.
- Smelcerovic A., Verma V., Spiteller M., Ahmad S. M., Puri S. C., Qazi G. N. (2006) Phytochemical analysis and genetic characterization of six *Hypericum* species from Serbia. *Phytochemistry*, **67**, 171–177.

- Sosa S., Pace R., Bornancin A., Morazzoni P., Riva A., Tubaro A., Della Loggia R. (2007) Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Hypericum perforatum* L. *J. Pharm. Pharmacol.* **59**, 703–709.
- Stewart A. J., Chapman W., Jenkins G. I., Graham I., Martin T., Crozier A. (2001) The effect of nitrogen and phosphorus on deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant Cell Environ.* **24**, 1189–1197.
- Sun J., Liang F., Bin Y., Li P., Duan C. (2007) Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass spectrometry Libraries. *Molecules*, **12**, 679–693.
- Zhang R., Wienhold B. J. (2002) The effect of soil moisture on mineral nitrogen, soil electrical conductivity, and pH. *Nutri. Cycl. Agroecosyst.* **63**, 251–254.
- Zhao H.-Y., Sun J.-H., Fan M.-X., Fan L., Zhou L., Li Z., Han J., Wang B.-R., Guo D.-A. (2008) Analysis of phenolic compounds in *Epimedium* plants using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1190**, 157–181.
- Zobayed S. M. A., Afreen F., Kozai T. (2005) Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentration in St. John's wort. *Plant Physiol. Biochem.* **43**, 977–984.
- Zobayed S. M. A., Afreen F., Kozai T. (2007) Phytochemical and physiological changes in the leaves of St. John's wort plants under a water stress condition. *Environ. Exper. Bot.* **59**, 109–116.
- Zobayed S., Saxena P. K. (2004) Production of St. John's wort plants under controlled environment for maximizing biomass and secondary metabolites. *In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant*, **40**, 108–114.
- Tammeorg J., Kook O., Vilbaste G. (1973) *Eesti NSV ravimtaimed*. pp. 146–148. Valgus, Tallinn.
- Tatsis E. C., Boeren S., Exarchou V., Troganis A. N., Vervoort J., Gerothanassis I. P. (2007) Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry*, **68**, 383–393.
- Thomas C., Pardini R. S. (1992) Oxygen dependence of hypericin-induced phototoxicity to EMT6 mouse mammary carcinoma cells. *Photochem. Photobiol.* **55**, 831–837.
- Touriño S., Fuguet E., Jáuregui O., Saura-Calixto F., Cascante M., Torres J. L. (2008) High-resolution liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry combined with liquid chromatography/electrospray ionization tandem

- mass spectrometry to identify polyphenols from grape antioxidant dietary fiber. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 3489–3500.
- Tullus A., Kupper P., Sellin A., Parts L., Sõber J., Tullus T., Lõhmus K., Sõber A., Tullus H. (2012) Climate change at northern latitudes: rising atmospheric humidity decreases transpiration, N-uptake and growth rate of hybrid aspen. *PLoS ONE*, **7(8)**, e42648.
- van der Merwe J. D., Joubert E., Manley M., de Beer D., Malherbe C. J., Gelderblom W. C. A. (2012) Mangiferin glucuronidation: Important hepatic modulation of antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology*, **50**, 808–815.
- Vares N. (2011) Flavonoidide üldsisalduse ja teiste fenoolsete ühendite sisalduse määramine lihtnaistepuna ja kandilise naistepuna ürdis. Proviisoriõppe uurimistö, Tartu.
- Wink M. (2010) *Functions and biotechnology of plant secondary metabolites. Annual Plant Reviews*, **39**, 2nd ed, Wiley-Blackwell.

9. LISAD

Lisa 1.

Proovide kogumiskohad aastal 2011.

Proovid on kogunud Linda Rusalepp ajavahemikul 29. juuni – 21. august 2011.

- 1) *Hypericum maculatum* (Jõgevamaa, Põltsamaa vald, Väike-Kamari küla)
- 2) *Hypericum perforatum* (Lääne-Virumaa, Rakvere linn)
- 3) *Hypericum perforatum* (Lääne-Virumaa, Rakvere vald, Karivärava küla)
- 4) *Hypericum maculatum* (Lääne-Virumaa, Kadrina vald, Riistamäe küla)
- 5) *Hypericum perforatum* (Lääne-Virumaa, Kadrina vald, Riistamäe küla)
- 6) *Hypericum perforatum* (Tartumaa, Tartu vald, Maramaa küla)
- 7) *Hypericum perforatum* (Tartumaa, Tartu vald, Maramaa küla)
- 8) *Hypericum perforatum* (Tartumaa, Tartu vald, Maramaa küla)
- 9) *Hypericum perforatum* (Lääne-Virumaa, Kadrina vald, Ohepalu küla)
- 10) *Hypericum perforatum* (Lääne-Virumaa, Kadrina vald, Soomukse (mitteam.))
- 11) *Hypericum perforatum* (Lääne-Virumaa, Kadrina vald, Soomukse (mitteam.))
- 12) *Hypericum perforatum* (Harjumaa, Kuusalu vald, Turbuneeme küla)
- 13) *Hypericum maculatum* (Harjumaa, Kuusalu vald, Kasispea küla)
- 14) *Hypericum maculatum* (Harjumaa, Kuusalu vald, Kasispea küla)
- 15) *Hypericum perforatum* (Harjumaa, Kuusalu vald, Kasispea küla)
- 16) *Hypericum perforatum* (Lääne-Virumaa, Vihula vald, Palmse küla)
- 17) *Hypericum perforatum* (Lääne-Virumaa, Vihula vald, Palmse küla)
- 18) *Hypericum maculatum* (Lääne-Virumaa, Vihula vald, Võsupere)
- 19) *Hypericum perforatum* (Lääne-Virumaa, Kadrina vald, Tõrma (mitteam.))
- 20) *Hypericum perforatum* (Ida-Virumaa, Lügánuse vald, Purtse küla)

Lisa 2.

Määratud ühendite retentsiooniajad, eellasioonid ja fragmentioonid. Paksus kirjas on märgitud kvantitatiivselt määratud ühendite järjekorranumbrid ning suurema osakaaluga fragmendid massispektris.

jrk. nr.	aine nimetus	t _R	[M-H] ⁺ , m/z	fragmentioonid, m/z	viited
1	kiinahappe derivaat	1,1	533	191 → 173 ; 127; 111 ; 109; 93; 87	e
2	kohvhappe derivaat	1,2	377	341 ; 215 ; 179	e, g
3	vanillhappeglükosiid	3,1	329	311; 293; 168; 167	l
4	neoklorogeenhape	4,2	353	191 ; 179 ; 135	h
5	3-O-p-kumarüülkiinahape	5,6	337	191 ; 164; 163 ; 119	a, b
6	katehhiin	7,3	289	271; 245 ; 231; 205 ; 179 ; 126	f, g
7	klorogeenhape	8,3	353	191 ; 179 ; 135	h
8	protsüanidiin B1	9,6	577	559; 451 ; 426; 425 ; 408; 407 ; 289; 287	g
9	protsüanidiin B1	11,4	577	559; 451 ; 426; 425 ; 408; 407 ; 289; 287	g
10	epikatehhiin	12,7	289	271; 245 ; 231; 205 ; 203; 179	f, g
11	mangiferiin	14,6	421	403; 385; 331 ; 302; 301 ; 259	p
12	kempferool-3-O-ramnosiid	17,4	431	286; 285 ; 284	o
13	müritsetiin-3-glükosiid	19,6	479	318; 317 ; 316 ; 271; 179	f
14	müritsetiin-3-glükosiid	20,3	479	318; 317 ; 316 ; 271; 179	f
15	kvertsetiinagalaktosiid	24,3	463	302; 301 ; 300; 271; 179	f, g, h
16	dihüdrokvertsetiin-7-O-ramnosiid	24,5	449	431; 303 ; 287; 285; 151	a
17	kvertsetiin-glükosiid	24,6	463	343; 302; 301 ; 300; 271; 179; 151	f, h
18	kvertsetiin-glükuroniid	24,8	477	301	i
19	rutiin	25,3	609	343; 301 ; 271; 257	f, g
20	protsüanidiin B1 v. B2	26,5	577	559; 451; 425 ; 407 ; 289; 287	g
21	kvertsetiin-O-pentosiid	27,6	433	345; 315; 302; 301 ; 300; 179	f
22	kempferool-3-O-glükosiid	28,0	447	327; 285 ; 284 ; 255; 239; 151	k
23	quercetin-3-rhamnoside	29,7	447	301; 285; 179; 151	h, m
24	kempferoolrutinosiid	30,0	593	285 ; 257; 199	n
25	ramnetiin-glükosiid	32,7	477	316; 315; 314; 297; 287; 193; 165	b
26	kvertsetiin-atsetüülglükosiid	36,4	505	463; 301; 179	h
27	kvertsetiin	38,6	301	273; 257; 229; 193; 179 ; 151 ; 107	f, h
28	I3,II8 biapigeniin	55,5	537	493; 444; 443 ; 417; 386; 385 ; 151	a, h
29	adhüperfiin	62,5	481	437; 412; 411; 369; 329; 276	h
30	adhüperfiin	62,7	481	437; 412; 411; 369; 329; 276	h
31	hüperfiin	63,5	467	423; 398; 329 ; 287 ; 262; 219	h
32	hüperforiin	64,6	535	466 ; 397; 395; 383 ; 315 ; 313	c, d, h, j
33	adhüperforiin	65,3	549	480 ; 465; 412; 411; 397 ; 329 ; 313	c, h, j
34	protopseudohüperitsiin	59,2	521	477; 463; 452 ; 404; 393; 381; 347 ; 333	h
35	pseudohüperitsiin	59,8	519	473; 452; 449; 440; 406; 342; 299; 249	a, h
36	protohüperitsiin	60,7	505	fragmente ei saadud	h
37	hüperitsiin	61,5	503	fragmente ei saadud	a

^a Brolis *et al* 1998

^b Sánchez-Rabaneda *et al* 2004

^c Sleno *et al* 2006

^d Smelcerovic *et al* 2006b

^e Markowics Bastos *et al* 2007

^f Charrouf *et al* 2007

^g Sun *et al* 2007

^h Tatsis *et al* 2007

ⁱ Dueñas *et al* 2008

^j Glisic *et al* 2008

^k Zhao *et al* 2008

^l Touriño *et al* 2008

^m Plazonic *et al* 2009

ⁿ Lu *et al* 2010

^o Barros *et al* 2011

^p van der Merwe *et al* 2012

Lisa 3.

Kvantitatiivselt määratud ühendite kalibreerimiseks kasutatud ained, määramisviis ja neelduvuse mõõtmise lainepikkus.

jrk. nr.	kvantitatiivselt määratud aine	kalibreeritud aine ... järgi	UV absorptsiooni- või massispekter	lainepikkus nm
1	kiinahappe derivaat	kiinahape	massispekter	-
2	kohvhappe derivaat	kohvhape	massispekter	-
3	vanillhappe derivaat	vanillhape	absorptsioonispekter	250
4	neoklorogeenhape	klorogeenhape	absorptsioonispekter	330
5	klorogeenhape	klorogeenhape	absorptsioonispekter	330
6	katehiin	katehiin	absorptsioonispekter	280
7	epikatehiin	katehiin	absorptsioonispekter	280
8	müritsetiinglükosiid	müritsetiin	absorptsioonispekter	350
9	kvertsetiingalaktsiid	kvertsetiinglükosiid	absorptsioonispekter	350
10	kvertsetiinglükosiid	kvertsetiinglükosiid	massispekter	-
11	rutiin	rutiin	massispekter	-
12	kvertsetiinpentosiid	kvertsetiinglükosiid	absorptsioonispekter	350
13	kvertsetiinramnosiid	kvertsetiinramnosiid	massispekter	-
14	kempferoolglükosiid	kempferool	absorptsioonispekter	350
15	kempferoolrutinosiid	kempferool	massispekter	-
16	kvertsetiin	kvertsetiin	absorptsioonispekter	370
17	hüperforiin	hüperforiin	absorptsioonispekter	280
18	adhüperforiin	hüperforiin	absorptsioonispekter	280
19	protopseudohüperitsiin	hüperitsiin	absorptsioonispekter	590
20	pseudohüperitsiin	hüperitsiin	absorptsioonispekter	590
21	hüperitsiin	hüperitsiin	absorptsioonispekter	590

Lisa 4.

Sekundaarsete metaboliitide sisaldused erinevate katseringide ja töötluste vahel. *se* – keskmise standardviga, *mean* – keskväärtus. Erinevad tähed märgivad statistiliselt olulist erinevust rühmade vahel Tukey HSD testi järgi.

		n=5 taime töötluste kohta									
		töötlus×katsering									
		H1	C1	H3	C3	H4	C4	ühik			
2,3	biapigeniin	<i>Mean</i> 153,2 a,b <i>se</i> 20,9	164,4 a,b 24,9	133,2 a,b 6,5	183,8 a,b 66,3	82,0 a 14,4	240,0 b 12,2	mAu			
	kiinahappe derivaat	<i>Mean</i> 0,0016 a <i>se</i> 0,0006	0,0031 a 0,0007	0,0030 a 0,0014	0,0052 a 0,0022	0,0049 a 0,0027	0,0016 a 0,0006	%			
	kohvhappe derivaat	<i>Mean</i> 0,013 a <i>se</i> 0,003	0,025 a 0,010	0,017 a 0,007	0,015 a 0,003	0,017 a 0,005	0,022 a 0,010	%			
	vanillhappe glükosiid	<i>Mean</i> 0,049 a <i>se</i> 0,006	0,046 a 0,005	0,057 a 0,011	0,051 a 0,009	0,067 a 0,004	0,053 a 0,008	%			
1	neoklorogeenhape	<i>Mean</i> 0,18 a <i>se</i> 0,05	0,12 a 0,03	0,19 a 0,08	0,16 a 0,06	0,54 a 0,07	0,27 a 0,08	%			
	klorogeenhape	<i>Mean</i> 0,10 a <i>se</i> 0,03	0,14 a 0,03	0,22 a 0,10	0,21 a 0,10	0,39 a 0,09	0,26 a 0,07	%			
1	katehiin	<i>Mean</i> 0,042 a <i>se</i> 0,003	0,056 a,b 0,007	0,072 b 0,008	0,071 b 0,006	0,050 a,b 0,007	0,055 a,b 0,006	%			
	epikatehiin	<i>Mean</i> 0,21 a <i>se</i> 0,08	0,31 a 0,06	0,43 a 0,19	0,30 a 0,09	0,44 a 0,09	0,33 a 0,07	%			
1	hüperosiid	<i>Mean</i> 1,44 a,b <i>se</i> 0,27	0,82 a 0,21	1,18 a,b 0,34	1,25 a,b 0,25	2,10 b 0,11	1,63 a,b 0,32	%			
	isokvertsitriin	<i>Mean</i> 0,12 a <i>se</i> 0,02	0,10 a 0,01	0,09 a 0,02	0,08 a 0,01	0,10 a 0,01	0,08 a 0,01	%			
	rutiin	<i>Mean</i> 0,0028 a <i>se</i> 0,0006	0,0015 a 0,0003	0,0016 a 0,0005	0,0011 a 0,0003	0,0017 a 0,0002	0,0013 a 0,0003	%			
	kvartsetiin-pentosiid	<i>Mean</i> 0,051 a <i>se</i> 0,009	0,032 a 0,004	0,034 a 0,008	0,036 a 0,010	0,060 a 0,005	0,048 a 0,010	%			
1,3	kvartsitriin	<i>Mean</i> 0,034 a <i>se</i> 0,005	0,023 a,b 0,003	0,010 b,c 0,001	0,017 b,c 0,007	0,006 c,d 0,001	0,015 a,b,d 0,002	%			
	kvartsetiin	<i>Mean</i> 0,048 a <i>se</i> 0,006	0,043 a 0,005	0,052 a 0,005	0,072 a 0,027	0,040 a 0,010	0,050 a 0,006	%			
1,3	protopseudo-hüperitsiin	<i>Mean</i> 0,146 a <i>se</i> 0,020	0,095 a,b 0,021	0,067 a,b 0,008	0,074 a,b 0,026	0,038 b 0,009	0,086 a,b 0,013	%			
1,3	pseudo-hüperitsiin	<i>Mean</i> 0,20 a <i>se</i> 0,01	0,18 a,b 0,02	0,14 a,b 0,01	0,15 a,b 0,03	0,11 b 0,01	0,18 a,b 0,01	%			
3	proto-hüperitsiin	<i>Mean</i> 0,017 a <i>se</i> 0,002	0,018 a 0,002	0,020 a 0,005	0,011 a 0,003	0,010 a 0,001	0,018 a 0,001	%			
3	hüperitsiin	<i>Mean</i> 0,043 a,b <i>se</i> 0,004	0,041 a,b 0,006	0,037 a,b 0,005	0,031 a,b 0,008	0,025 a 0,002	0,048 b 0,003	%			
1,3	üld-hüperitsiinid	<i>Mean</i> 0,41 a <i>se</i> 0,04	0,33 a,b 0,04	0,26 a,b 0,03	0,27 a,b 0,07	0,18 b 0,02	0,33 a,b 0,03	%			
1	flavonoidid	<i>Mean</i> 1,69 a,b <i>se</i> 0,30	1,02 a 0,22	1,37 a,b 0,37	1,46 a,b 0,27	2,31 b 0,13	1,82 a,b 0,35	%			
1	fenoolsed ühendid	<i>Mean</i> 2,29 a <i>se</i> 0,46	1,71 a 0,30	2,35 a 0,76	2,26 a 0,52	3,82 a 0,36	2,81 a 0,56	%			
	kogu sek. met.	<i>Mean</i> 2,71 a <i>se</i> 0,47	2,06 a 0,30	2,65 a 0,76	2,54 a 0,52	4,02 a 0,38	3,16 a 0,56	%			
1	lämmastik	<i>Mean</i> 3,53 a <i>se</i> 0,03	3,17 a,b 0,12	3,31 a,b 0,07	3,27 a,b 0,09	3,08 b 0,12	3,13 a,b 0,07	%			

¹ katseringi mõju oluline, ² töötluste mõju oluline, ³ katsering×töötlus mõju oluline.

Lisa 5.

Sekundaarsete metaboliitide sisaldused erinevate katseringide vahel. *se* – keskmise standardviga, *mean* – keskväärtus. Erinevad tähed märgivad statistiliselt olulist erinevust rühmade vahel Tukey HSD testi järgi.

n=10 taime ringi kohta						
		Ring				
		1	3	4	ühik	
biapigeniin	<i>Mean</i>	158,8 a	158,5 a	161,0 a	mAu	
	<i>se</i>	15,4	32,5	27,8	mAu	
kiinahappe derivaat	<i>Mean</i>	0,00 a	0,00 a	0,00 a	%	
	<i>se</i>	0,0005	0,0013	0,0014	%	
kohvhappe derivaat	<i>Mean</i>	0,019 a	0,016 a	0,019 a	%	
	<i>se</i>	0,005	0,004	0,005	%	
vanillhappe glükosiid	<i>Mean</i>	0,047 a	0,054 a	0,060 a	%	
	<i>se</i>	0,004	0,007	0,005	%	
neoklorogeenhape	<i>Mean</i>	0,15 a	0,17 a	0,40 b	%	
	<i>se</i>	0,03	0,05	0,07	%	
klorogeenhape	<i>Mean</i>	0,12 a	0,22 a	0,32 a	%	
	<i>se</i>	0,02	0,07	0,06	%	
katehiin	<i>Mean</i>	0,049 a	0,071 b	0,053 a	%	
	<i>se</i>	0,004	0,005	0,004	%	
epikatehiin	<i>Mean</i>	0,26 a	0,36 a	0,39 a	%	
	<i>se</i>	0,15	0,33	0,18	%	
hüperosiid	<i>Mean</i>	1,13 a	1,21 a,b	1,86 b	%	
	<i>se</i>	0,19	0,20	0,18	%	
isokvertsitriin	<i>Mean</i>	0,11 a	0,09 a	0,09 a	%	
	<i>se</i>	0,01	0,01	0,01	%	
rutiin	<i>Mean</i>	0,0022 a	0,0013 a	0,0015 a	%	
	<i>se</i>	0,0004	0,0003	0,0002	%	
kvertsetiin-pentosiid	<i>Mean</i>	0,042 a	0,035 a	0,054 a	%	
	<i>se</i>	0,005	0,006	0,006	%	
kvertsitriin	<i>Mean</i>	0,028 a	0,014 b	0,011 b	%	
	<i>se</i>	0,003	0,003	0,002	%	
kvertsetiin	<i>Mean</i>	0,045 a	0,062 a	0,045 a	%	
	<i>se</i>	0,004	0,013	0,006	%	
protopseudo-hüperitsiin	<i>Mean</i>	0,120 a	0,071 a,b	0,062 b	%	
	<i>se</i>	0,016	0,013	0,011	%	
pseudo-hüperitsiin	<i>Mean</i>	0,19 a	0,14 a	0,15 a	%	
	<i>se</i>	0,01	0,02	0,01	%	
protohüperitsiin	<i>Mean</i>	0,017 a	0,015 a	0,014 a	%	
	<i>se</i>	0,001	0,003	0,002	%	
hüperitsiin	<i>Mean</i>	0,042 a	0,034 a	0,036 a	%	
	<i>se</i>	0,003	0,005	0,004	%	
üldhüperitsiinid	<i>Mean</i>	0,37 a	0,26 a,b	0,26 b	%	
	<i>se</i>	0,03	0,04	0,03	%	
flavonoidid	<i>Mean</i>	1,36 a	1,41 a	2,07 a	%	
	<i>se</i>	0,21	0,21	0,19	%	
fenoolsed ühendid	<i>Mean</i>	2,00 a	2,31 a,b	3,32 b	%	
	<i>se</i>	0,28	0,43	0,36	%	
kogu sek. met.	<i>Mean</i>	2,39 a	2,60 a	3,59 a	%	
	<i>se</i>	0,28	0,43	0,35	%	
lämmastik	<i>Mean</i>	3,35 a	3,29 a	3,11 a	%	
	<i>se</i>	0,08	0,06	0,07	%	

Lisa 6.

Sekundaarsete metaboliitide sisaldused töötluste vahel. *se* – keskmise standardviga, *mean* – keskvärtus. Erinevad tähed märgivad statistiliselt olulist erinevust rühmade vahel Tukey HSD testi järgi.

n=15 taime töötluste kohta				
Töötlus				
		H	C	ühik
biapigeniin*	<i>Mean</i>	122,8	196,1	mAu
	<i>se</i>	11,4	23,8	mAu
kiinahappe derivaat	<i>Mean</i>	0,003	0,003	%
	<i>se</i>	0,001	0,001	%
kohvhappe derivaat	<i>Mean</i>	0,016	0,021	%
	<i>se</i>	0,003	0,005	%
vanillhappe glükosiid	<i>Mean</i>	0,058	0,050	%
	<i>se</i>	0,005	0,004	%
neoklorogeenhape	<i>Mean</i>	0,30	0,18	%
	<i>se</i>	0,06	0,04	%
klorogeenhape	<i>Mean</i>	0,24	0,20	%
	<i>se</i>	0,05	0,04	%
katehiin	<i>Mean</i>	0,055	0,061	%
	<i>se</i>	0,005	0,004	%
epikatehiin	<i>Mean</i>	0,36	0,31	%
	<i>se</i>	0,08	0,04	%
hüperosiid	<i>Mean</i>	1,57	1,23	%
	<i>se</i>	0,17	0,17	%
isokvertsitriin	<i>Mean</i>	0,104	0,086	%
	<i>se</i>	0,009	0,007	%
rutiin	<i>Mean</i>	0,0020	0,0013	%
	<i>se</i>	0,0003	0,0001	%
kvertsetiin-pentosiid	<i>Mean</i>	0,048	0,039	%
	<i>se</i>	0,005	0,005	%
kvertsitriin	<i>Mean</i>	0,017	0,018	%
	<i>se</i>	0,004	0,003	%
kvertsetiin	<i>Mean</i>	0,047	0,055	%
	<i>se</i>	0,004	0,009	%
protopseudo-hüperitsiin	<i>Mean</i>	0,083	0,085	%
	<i>se</i>	0,014	0,011	%
pseudo-hüperitsiin	<i>Mean</i>	0,15	0,17	%
	<i>se</i>	0,01	0,01	%
protohüperitsiin	<i>Mean</i>	0,016	0,016	%
	<i>se</i>	0,002	0,002	%
hüperitsiin	<i>Mean</i>	0,035	0,040	%
	<i>se</i>	0,003	0,004	%
üldhüperitsiinid	<i>Mean</i>	0,28	0,31	%
	<i>se</i>	0,03	0,03	%
flavonoidid	<i>Mean</i>	1,79	1,43	%
	<i>se</i>	0,18	0,17	%
fenoolsed ühendid	<i>Mean</i>	2,82	2,26	%
	<i>se</i>	0,35	0,28	%
kogu sek. met.	<i>Mean</i>	3,13	2,59	%
	<i>se</i>	0,34	0,28	%
lämmastik	<i>Mean</i>	3,31	3,19	%
	<i>se</i>	0,07	0,05	%

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, **Linda Rusalepp**,

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

Suureneva õhuniiskuse ja sellega kaasnevate ökosüsteemimuutuste mõju kandilise naistepuna (*Hypericum maculatum* Crantz) sekundaarsele metabolismile,

mille juhendaja on TÜ ÖMI vanemteadur **Anu Sõber**,

- 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, **28.05.2015**