

Sari Siipola
Pro gradu-työ
Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta
Biotieteiden laitos
Kasvibiologia
Huhtikuu 2011

**AURINGONSÄTEILYN ERI AALLONPITUUSALUEIDEN
VAIKUTUKSIA HERNEEN (*Pisum sativum* cv. Meteor)
FYSIOLOGIAAN JA MORFOLOGIAAN**



SISÄLLYS

1. JOHDANTO

1.1. Taustaa

1.1.1 UV-B-säteilyn määrän lisääntyminen	2
1.1.2 Voimistuneen säteilyn kasvillisuusvaikutuksia	3
1.1.3 Kuinka kasvi aistii auringonsäteilyä?	4

1.2. UV-B-säteilyn kasveissa aiheuttamat muutokset

1.2.1 Molekulaariset, biokemialliset ja fysiologiset muutokset	5
1.2.2 Morfologiset muutokset	7
1.2.3 UV-B-säteilyn hyödyt	8

2. VAIKUTUSSPEKTRI, BIOLOGINEN PAINOTUSKERROIN JA RAF-ARVO

2.1 Vaikutusspektri	10
2.2. Biologinen painotuskerroin ja sen käyttö	10

3. AALLONPITUUKSIEN MERKITYS

3.1 UV-A:n, UV-B:n ja näkyvän valon yhdysvaikutuksista	13
3.2. Kokeiden suunnittelussa huomioitavia seikkoja	14

4. AINEISTO JA MENETELMÄT

4.1 Tutkimusmateriaali	16
4.2. Kasvatus	16
4.3. Koejärjestely	17
4.4. Mittaukset ja näytteiden keruu	20
4.5. Fenolien eristys ja identifiointi	22
4.6. Tilastomenetelmät	23

5. TULOKSET

5.1. Taimien pituudet, kuivapainot ja lehtien pinta-ala	24
5.2. Fenoliset yhdisteet lehtien epidermissä	26
5.3. Lehdistä eristetyt fenoliset yhdisteet	27

6. TULOSTEN TARKASTELU

6.1. Morfologisten vasteiden tulokset	30
6.2. Fenolisten yhdisteiden pitoisuuksien tulokset	31
6.3. Yhteenvedo	36

KIITOKSET	40
------------------	----

KIRJALLISUUS ELI LÄHTEET	41
---------------------------------	----

LIITTEET	50
-----------------	----

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta		Laitos Institution – Department Biotieteiden laitos	
Tekijä/Författare – Author Sari Siipola			
Työn nimi Arbetets titel – Title Auringonsäteilyn eri aallonpituusalueiden vaikutuksia herneen (<i>Pisum sativum</i> cv Meteor) fysiologiaan ja morfologiaan			
Oppiaine Läroämne – Subject Kasvibiologia			
Työn laji Arbetets art – Level Pro gradu		Aika Datum – Month and year Huhtikuu 2011	Sivumäärä Sidoantal – Number of pages 65
Tiivistelmä Referat – Abstract			
<p>Maapallolle tulevan haitallisen UV-B-säteilyn määrä on lisääntynyt stratosfääriin otsonikerroksen ohenemisen vuoksi. Lisääntynyt UV-B-säteily aiheuttaa muutoksia kasvien kasvuun ja keskinäiseen kilpailuun, kasvi-kasvinsyöjä ja kasvi-symbiontti-vuorovaikutuksiin, kasvien kemialliseen koostumukseen ja ravinteiden kiertoon ekosysteemeissä. Se vaurioittaa kasvin DNA:ta, fotosynteesikoneistoa ja solukalvoja. UV-B-säteily myös säätelee kasvien normaalia kehitystä. Kasvi voi suojautua UV-B-säteilyltä epidermiin kertyvillä fenolisilla yhdisteillä ja morfologian muutoksilla.</p> <p>Kasvi aistii säteilyä fotoreseptoreiden eli valoa absorboivien pigmenttien välityksellä. Fytokromi absorboi punaista ja pitkäa punaista valoa, kryptokromi sinistä valoa ja UV-A-säteilyä ja fototropiini sinistä valoa. UV-B-reseptoreita on todennäköisesti monta ja ne toimivat yhdessä näkyvän valon reseptoreiden kanssa. Kun kasvin saamassa säteilyssä tapahtuu muutos, reseptorit välittävän tiedon kasviin. Syntyy signaalintekijä, joka johtaa muutoksiin kasvin fysiologiassa ja/tai morfologiassa.</p> <p>UV-B-tutkimuksessa käytettävä vaikutusspektri kuvaa tarvittavan säteilyn määrää eri aallonpituuksilla tietyn suuruisen vasteen ilmenemisessä. Se muodostetaan annos-vastekäyrien perusteella. Vaikutusspektrejä käytetään biologisten painotuskertoimien laskemiseen. Painotuskertoimien avulla arvioidaan otsonikadon ja biologisesti vaikuttavan säteilyn muutoksen suhdetta. Käytössä olevissa painotuskertoimissa on annettu hyvin pieni painoarvo UV-A-säteilylle ja näkyvälle valolle. Näiden aallonpituusalueiden tiedetään kuitenkin vaikuttavan UV-B-säteilyn kasveille aiheuttamien muutosten voimakkuuteen. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli tutkia eri aallonpituusalueiden vaikutuksia herneen (<i>Pisum sativum</i> cv. Meteor) vasteisiin ja saada uutta tietoa luotettavampien vaikutusspektrien ja biologisten painotuskertoimien tuottamiseksi.</p> <p>Herneen taimet itivät ja kehittyivät viidessä käsittelyssä, joissa niiden saamasta säteilystä poistettiin auringonvalon eri aallonpituusalueita. Käsittelyt olivat: 1) Polyesteri (poistettu UV-B-säteily), 2) MHCM09B (poistettu UV-B-säteily ja lyhytaaltainen UV-A-säteily), Rosco 226 (poistettu UV-B- ja UV-A-säteily), Rosco 312 (poistettu UV-B- , UV-A-säteily ja sininen valo) ja Kontrollikalvo (läpäisi kaikki aallonpituudet). Kokeen aikana taimista mitattiin pituutta, lehtien epidermin fenolisten yhdisteiden määrää ja lehtien klorofyllipitoisuutta. Kerätyistä lehtinäytteistä mitattiin pinta-ala ja niistä eristettiin fenolisia yhdisteitä. Tulokset analysoitiin R-tilasto-ohjelmalla (versio 2.9.1). Kun käsittelyjen kokonaisvaikutus alitti tilastollisen merkitsevyyden rajan, käsittelyille tehtiin kontrastivertailu: kontrolli/polyesteri (UV-B-säteilyn vaikutus), polyesteri/MHCM09B (lyhytaaltoisen UV-A-säteilyn vaikutus), polyester/rosco 226 (UV-A-säteilyn vaikutus), MHCM09B/rosco 226 (pitkäaaltoisen UV-A-säteilyn vaikutus) ja rosco 226/rosco 312 (sinisen valon vaikutus).</p> <p>Sinisen valon poisto alensi lehtien epidermin absorptiota eli fenolisten yhdisteiden määrää ja useiden fenolisten yhdisteiden pitoisuutta lehdissä. UV-B-säteily nosti absorptiota nuorimmissa kasvulehdissä ja ensin avautuneissa alalehdissä. Nuorimpien lehtien epidermin absorptioksi oli vanhojen lehtien absorptioksi korkeampi. Fenolisten yhdisteiden pitoisuus nuorimmissa lehdissä oli suurin. Absorptioksi kohosi vanhemmissa alalehdissä niiden ikääntyessä. Yksittäisten fenolisten yhdisteiden pitoisuudet vaihtelivat yksilöllisesti eri käsittelyissä. Vaikuttaa siltä, että niiden pitoisuutta säädelään tarkasti ympäristötekijöiden muuttuessa. UV-B-säteilyn vaikutukset jäivät tässä tutkimuksessa hyvin vähäisiksi.</p> <p>Tulosten perusteella voidaan todeta, että luotettavien tulosten varmistamiseksi otsonikatotutkimuksessa on syytä kiinnittää huomiota siihen, paljonko UV-A-säteilyä ja sinistä valoa tutkittavat kasvit saavat. Taimien ja yksittäisten lehtien ikä on hyvä huomioida tutkimuksen suunnittelussa. Osa vasteista näkyi vasta viikkojen altistuksen jälkeen, minkä perusteella voidaan olettaa, että lyhyet kokeet varsinkaan ulkona ja luonnollisilla säteilyannoksilla eivät välttämättä ole luotettavia. Sinisen valon puuttumisen voimakas vaikutus mitattuihin vasteisiin on mielenkiintoinen ilmiö, jota olisi mielenkiintoista tutkia tarkemmin myös taimilla, jotka altistuvat UV-B-säteilylle. Tulevissa kokeissa haluaisin tutkia lehtien rakennetta ja kasvien ilmarakojen herkkyyttä valon aallonpituuksille erilaisissa olosuhteissa, esimerkiksi kuivuusstressissä.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords UV-B, UV-A, sininen valo, PAR, fotoreseptori, vaikutusspektri, biologinen painotuskerroin, fenoliset yhdisteet			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Kasvibiologian käsikirjasto, Viikin tiedekirjasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Biological and Environmental Sciences		Laitos Institution – Department Department of Biosciences	
Tekijä/Författare – Author Sari Siipola			
Työn nimi Arbetets titel – Title Effects of different wavebands of solar radiation to pea (<i>Pisum sativum</i> cv Meteor) physiology and morphology			
Oppiaine Läroämne – Subject Plant biology			
Työn laji Arbetets art – Level MSc	Aika Datum – Month and year April 2011	Sivumäärä Sidoantal – Number of pages 65	
Tiivistelmä Referat – Abstract			
<p>The amount of incoming solar UV-B radiation on Earth has increased as a consequence of stratospheric ozone depletion. UV-B radiation causes alterations to plant growth and ecology through competition, plant-herbivore and plant-symbiont interactions, plant chemical composition and nutrient cycling in ecosystems. UV-B also damages plant DNA, photosynthetic system and membranes. UV-B radiation controls the normal development of plants through photomorphogenic responses. Plants can protect themselves from UV-B radiation with changes in whole plant and leaf morphology and physiology particularly with phenolic compounds that accumulate in the epidermis.</p> <p>Plants sense radiation with light absorbing pigments, photoreceptors. Phytochrome absorbs red and far-red light, Cryptochrome blue light and UV-A radiation and Phototropin blue light. Plants are most likely to have several UV-B receptors that function together with those receptors that absorb visible light. When the amount or quality of the radiation changes, receptors pass the information on to the plant and start a signal chain that leads to adjustments in plants physiology and morphology.</p> <p>Action spectra used in UV-B research describe the amount of radiation in different wavelengths needed to cause a certain size response. Their formulation is based on dose-response curves. Action spectra are used to calculate biological spectral weighting functions (BSWF); with weighting functions is possible to evaluate changes in biologically effective radiation during ozone depletion. The biological spectral weighting functions that are most widely used today give a very low importance to UV-A radiation and visible light. These wavebands are nevertheless known to make a difference to UV-B-response size in plants. The goal of this research was to study the effects of different wavebands on pea (<i>Pisum sativum</i> cv. Meteor) responses and to obtain information that can be used for producing more reliable action spectra and biological spectral weighting functions.</p> <p>Pea seedlings germinated and developed under five different solar radiation treatments from which certain wavebands were removed from the doses that seedlings received. The treatments were: 1) Polyester (UV-B removed) 2) MHCM09B (UV-B and short wave UV-A removed) 3) Rosco 226 (UV-B and UV-A removed) 4) Rosco 312 (UV-B, UV-A and blue light removed) 5) Control (transmits all wavelengths). During the experiment the height of the seedlings, phenolic compounds in leaf epidermis and leaf chlorophyll concentrations were measured. Leaf area was measured and phenolic compounds were extracted from the sampled leaves. Some of these phenolic compounds were identified. Results were analyzed with R statistics programme (version 2.9.1), Linear mixed effect model (general effect of treatments). If the general effect was significant ($p < 0,05$), treatments were tested as contrast comparisons: Control/Polyester (effect of UV-B), Polyester/ MHCM09B (effect of short wave UV-A), Polyester/Rosco 226 (effect of UV-A), MHCM09B/Rosco 226 (effect of long wave UV-A) and Rosco 226/Rosco 312 (effect of blue light).</p> <p>The removal of blue light reduced the content of phenolic compounds in the leaf epidermis and the concentration of several phenolic compounds in the leaves. UV-B radiation increased the content of phenolic compounds in youngest leaves and first basal leaves to open. The content of phenolic compound in the epidermis was in general higher in youngest leaves compared to the oldest ones and the concentration of phenolic compounds was highest in youngest leaves. The content of phenolic compounds in the epidermis increased in the oldest basal leaves as they aged. Concentrations of individual compounds varied in different treatments in spite of the fact that the total of phenolic compounds remained almost unchanged. It seems that the concentration of individual components is carefully controlled when environmental factors change. However, in this study the effects of UV-B radiation on phenolic compounds remained minor.</p> <p>Based on the results it can be said that to ensure reliable results when researching the effects of changing solar UV-B filtered through ozone layer is important to take notice of changes in UV-A radiation and blue light as well. The age of seedlings and leaves should also be taken into account when planning measurements. Some of the responses could not be seen until weeks of exposure which gives a reason to assume that very short experiments, especially outdoors and under natural solar radiation are not necessary reliable. The strong effect of removing blue light on the responses is a phenomenon that would be interesting to study further with seedlings that are exposed to UV-B radiation. A better mechanistic understanding of these results could be obtained by studying the structure of the leaves and the sensitivity of stomata to different wavelengths in different light conditions, for example combined with drought stress.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords UV-B, UV-A, blue light, PAR, photoreceptor, action spectrum, biological weighting function, phenolic compounds			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Plant biology reference library, Viikki campus library			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

1. JOHDANTO

1.1. Taustaa

1.1.1. UV-B-säteilyn määrän lisääntyminen

Kloorifluorihilivetyjä eli CFC-yhdisteitä on käytetty 1930-luvulta lähtien hyvin yleisesti muun muassa aerosoleissa ja erilaisissa jäädytyskoneissa. Näitä värittömiä ja hajuttomia yhdisteitä pidettiin ihanteellisina niiden myrkyttömyyden ja palamattomuuden vuoksi. 1980-luvulla kuitenkin havaittiin, että otsonimolekyylien ja alailmakehästä kohoavien kloorifluorihilivetyjen reaktioiden johdosta maapallon yläilmakehän eli stratosfäärin otsonikerros on hälyttävässä määrin ohentunut (Solomon 1999). Ohenemisen seurauksena maahan tulevan haitallisen UV-B-säteilyn määrä on lisääntynyt. Luontaisen säteilyn määrä vaihtelee riippuen leveyspiiristä ja siitä, kuinka korkealla alue on maanpinnasta. Suurimmat säteilymäärät on mitattu alhaisilla leveysasteilla sijaitsevilla vuoristoalueilla, kuten Tiibetin ylängöllä (McKenzie ym. 2003). Otsonikadosta johtuva säteilyn lisääntyminen on ollut voimakkainta Etelämantereella, mutta ajoittain otsonin määrä on vähentynyt myös pohjoisilla napa-alueilla (Solomon 1999).

CFC-yhdisteiden käyttö kiellettiin melko kattavasti otsonikerroksen suojelua koordinoivalla kansainvälisellä sopimuksella, Montrealin pöytäkirjalla, joka astui voimaan v. 1989 (lisää pöytäkirjasta mm. valtion ympäristöhallinnon verkkosivuilla: <http://www.ymparisto.fi/default.asp?contentid=352851&lan=FI>). Otsonikerroksen arvioidaan olevan tällä hetkellä miltei ohuimmillaan ja UV-säteilyn lähellä maksimiaan (WMO 2002; McKenzie ym. 2003). Tilanne on korjautumassa toteutettujen toimenpiteiden ansiosta. Muutos tapahtuu tosin hitaasti, eikä 1980-luvun säteilymääriin todennäköisesti päästä ennen vuosia 2050–2060 (WMO 2002). Ilmastonmuutoksen negatiiviset vaikutukset otsonikerroksen uusiutumiseen ovat olleet tutkijoiden tiedossa yli vuosikymmenen ajan (Kirk-Davidoff ym. 1999). Sittemmin maapallon pinnalle tulevan UV-B-säteilyn ja ilmastonmuutoksen vuorovaikutus on osoittautunut äärimmäisen monimutkaiseksi kokonaisuudeksi (UNEP 2009). Paikallisesti UV-B-säteilyn määrää saattaa lisätä pilvisyyden ja ilmakehän pienhiukkasten eli aerosolien

vähentyminen (Panicker ym. 2009; Kvalevag ym. 2009; Meleti ym. 2009). Tällöin ilmastomuutoksen hidastamiseen tähtäävät päästörajoitukset saattavat nostaa UV-B-säteilyn tasoa.

1.1.2. Voimistuneen säteilyn kasvillisuusvaikutuksia

Lisääntyneen UV-B-säteilyn aiheuttamia muutoksia kasveissa ovat esimerkiksi:

1) Vaikutukset kasvuun ja sen myötä kasvien väliseen kilpailuun (Rousseaux ym. 2001). Toiset kasvit ovat herkempiä UV-B-säteilylle. Vähemmän herkät lajit voivat tällöin kasvaa ja kilpailla tehokkaammin.

2) Kasvien kemiallisen koostumuksen muuttuminen, erityisesti erilaisten fenolisten yhdisteiden määrän kasvu (de la Rosa ym. 2001; Paul 2001).

3) Vaikutukset kasvi-kasvinsyöjä- ja kasvi-symbiontti-vuorovaikutuksiin kasvien kemiallisen koostumuksen muuttumisen vuoksi (Caldwell ym. 2003). Kasvin ja sienien muodostama sienijuuri, mykorritsa, on kasveille tärkeä symbioosisuhde. Siinä sieni saa kasvilta sen yhteyttämällä tuottamia sokereita. Sienirihmasto puolestaan lisää kasvin juuripinta-alaa, mikä parantaa kasvin ravinteiden ja veden saantia. Sienijuuren merkityksestä kertoo se, että se on kehittynyt noin 80 prosentille maalla kasvavista kasveista (Peterson ym. 2004). Symbioosin ja herbivorien toiminnan muutokset saattavat vaikuttaa kasvien keskinäiseen kilpailuun (Rozema ym. 1997).

4) Fenolien pitoisuuden kasvun aiheuttamat muutokset karikkeen hajotukseen ja ravinteiden kiertoon ekosysteemeissä (Zepp ym. 2003). Kasvin osat ovat vaikeammin hajotettavia, jos niissä on enemmän fenolisia yhdisteitä, kuten tanniineja ja ligniinejä. Tästä seuraa, että ravinteiden vapautuminen maaperään on hitaampaa.

UV-B-säteily vaikuttaa siis kasvien välityksellä herbivorien ravinnonsaantiin ja maaperän koostumukseen eli moniin ekosysteemin tasoihin. Koska säteilyn lisääntyminen aiheuttaa muutoksia kasvien välisiin kilpailusuhteisiin ja ravintoketjuihin, joissa

ne näkyvät mahdollisesti pitkän ajan kuluttua, on lyhyiden tutkimusjaksojen lisäksi tarpeellista tehdä pitkän aikavälin tutkimusta ja seurantaa (Aphalo 2003).

1.1.3 Kuinka kasvi aistii auringonsäteilyä?

Kasvit ovat pääsääntöisesti paikoilleen juurtuneita ja niiden on selviytyäkseen sopeuduttava ympäristönsä muuttuviin olosuhteisiin. Eläimiin verrattuna kasveilla on moninkertainen määrä reseptoreita, joilla ne saavat tietoa ympäristönsä tilasta, muun muassa auringonsäteilyn määrästä ja laadusta. Reseptorien avulla kasvi saa tiedon siitä, altistuuko se esimerkiksi patogeenille tai alailmakehän otsonille. Reseptorien välittämä informaatio aiheuttaa kasvissa monimutkaisen signalointiketjun, joka johtaa geenien ekspression ja kasvin fysiologian muutoksiin, mistä seuraa muutoksia kasviyksilöissä ja kasvillisuudessa.

Kasvi aistii säteilyä usean fotoreseptorin eli säteilyä absorboivan pigmentin välityksellä. Kukin pigmentti absorboi tiettyä säteilyn spektrin osaa ja välittää kasville tietoa siinä tapahtuvista muutoksista. Fytokromi toimii punaisen ja pitkän punaisen valon aallonpituuksien tunnistamisessa (Aphalo ym. 1999). Kryptokromi absorboi sinistä valoa ja UV-A-säteilyä (Schulze ym. 2005a). Kryptokromin lisäksi fototropiini toimii sinisen valon reseptorina (Briggs & Huala 1999). Kryptokromit aiheuttavat fytokromien kanssa muun muassa seuraavia vasteita: varren pitenemisen estyminen, lehden pinta-alan kasvu, kukkimisen fotoperiodinen kontrolli sekä kasvien liikkeistä kukkien avautumisen ja sulkeutumisen vuorokausirytmii (Más ym. 2000). Fototropiinit toimivat välittäjinä seuraavissa kasvien valoon liittyvissä liikkeissä: positiivinen fototropismi eli kasvin kääntyminen valoa kohti, viherhiukkasten eli kloroplastien asettuminen valon tulosuuntaan solussa ja ilmarakojen avautuminen (Briggs ym. 2001). Tiettyä kasvien UV-B-fotoreseptoria ei ole varmuudella löydetty. Yleinen hypoteesi on, että UV-reseptoreita on monta ja että niillä sekä näkyvän valon fotoreseptoreilla on lukuisia yhdysvaikutuksia (Mohr ym. 1984; Hashimoto & Yatsunami 1984). Todennäköisesti yksi reseptoreista on UVR8 (UV RESISTANCE LOCUS8), joka toimii kasvien UV-B-puolustuksen signalointireitillä (Brown ym. 2005; Brown & Jenkins 2008).

UV-B-säteily aiheuttaa haitallisia muutoksia kasvien DNA:ssa, solukalvoilla ja fotosynteesikoneistossa (Jansen ym. 1998). Kasvi voi suojautua haitalliselta säteilyltä esimerkiksi fenolisten yhdisteiden avulla. UV-B-säteily indusoi näiden yhdisteiden kertymisen lehden pintakerroksen eli epidermin solujen vakuoleihin ja soluseiniin, missä ne toimivat säteilyä absorboivina suoja pigmentteinä. Kasveille on myös kehittynyt mekanismeja, joiden avulla ne voivat korjata aiheutuneita vaurioita (Jansen ym. 1998). Suojautumiseen ja vaurioiden korjaamiseen kuuluu kuitenkin kasvien yhteyttämisesään tuottamaa energiaa ja niiden yhteyttämisteho saattaa kärsiä. Kasvin menestyminen riippuu siitä, kuinka se pystyy sopeutumaan lisääntyneeseen UV-säteilyyn ja samalla kasvamaan ja lisääntymään mahdollisimman tehokkaasti. Lukuisten tutkimusten mukaan kasvin eri kehitysvaiheissa useat fotoreseptorit toimivat yhtäaikaaisesti ja säätelevät prosesseja, jotka suojaavat kasvia UV-B-säteilyn haitoilta. (Fuglevand ym. 1996; Vlohr & Drumm-Herrel 2006; Middleton & Teramura 1994) Seuraavaksi käydään läpi UV-B:n aiheuttamia vaurioita ja vasteita sekä auringonsäteilyn eri aallonpituuksien vaikutuksia niiden voimakkuuteen.

1.2. UV-B-säteilyn kasveissa aiheuttamat muutokset

1.2.1. UV-B-säteilyn aiheuttamat molekulaariset, biokemialliset ja fysiologiset muutokset

UV-B-säteilylle altistuminen aiheuttaa kasvien DNA:ssa muutoksia, jotka estävät RNA- ja DNA-polymeraasien toimintaa eli kasveille elintärkeää geenien transkriptiota ja DNA:n kahdentumista (Jansen ym. 1998). UV-B aiheuttaa fotosysteemi II:n D1 ja D2 proteiinien hajoamista (Strid & Anderson 1994). Se alentaa Rubiscon määrää ja aktiivisuutta (Teramura & Sullivan 1994) sekä karotenoidien ja klorofyllin määrää, vahingoittaa tylakoidi-membraaneja (DeLucia ym. 1992) ja hiljentää fotosynteesigeenien toimintaa (DeLucia ym. 1992). Vaurioiden voimakkuus riippuu saadun säteilyn määrän lisäksi ympäristötekijöistä.

Reaktiiviset happiradikaalit ovat tärkeitä signaalimolekyylejä kasvien UV-B-vasteissa. Ne myös aiheuttavat kasville oksidatiivista stressiä. Kasvin kyky tunnistaa ja poistaa näiden happiradikaalien reaktiivisuus entsyymaattisten tai ei-entsyymaattisten toimintojen

kautta voi lieventää UV-B-säteilyn aiheuttamaa stressiä (Jansen ym. 1998). UV-B-altistuksessa kasvin puolustusmekanismeissa toimivien antioksidanttien, kuten glutationin ja askorbaatin, määrät nousevat (Takeuchi ym. 1996), mikä parantaa kasvien vastustuskykyä.

UV-B-altistus nostaa antioksidanteina toimivien entsyymien, kuten superoksididismutaasin, glutationireduktaasin ja glutationiperoksidaasin määrää (Rao ym. 1996). Lisäksi UV-B-säteily kohottaa NAPDH-oksidaasin aktiivisuutta, mikä johtaa kasvavaan peroksidin tuotantoon. Peroksidi on happiradikaali, mutta saattaa toimia kasvin puolustautumisessa seuraavasti: peroksidin reaktio peroksidaasin kanssa aloittaa reaktiketjun, joka johtaa spontaanisti polymerisoituvien fenoksiradikaalien muodostumiseen ja lopuksi lignifikoitumiseen (Passardi ym. 2005; Koistinen 2008). Ligniini toimii kasvissa pigmenttien kaltaisena UV-suojana (Rozema ym. 1997;).

UV-B-säteily indusoi kasvissa sekundaariaineenvaihdunnan tuotteina syntyvien fenolisten yhdisteiden synteesiä. Fenolit muodostavat laajan ryhmän, johon kuuluu sekä vesiliukoisia, että veteen liukenemattomia yhdisteitä. Fenolisten yhdisteiden rakenteeseen kuuluu fenolinen ryhmä eli bentseenirengas, johon on liittynyt yksi tai monta hydroksyyli ryhmää (-OH). Fenoleilla on UV-B-säteilyltä suojaamisen lisäksi keskeinen merkitys kasvin puolustautumisessa herbivoreja ja patogeenejä vastaan (Taiz & Zeiger 1998). Lisäksi muut stressitekijät yhdessä UV-B-säteilyn kanssa saattavat aiheuttaa fenolisten yhdisteiden akkumuloitumista (Caldwell ym. 1998). UV-puolustukseen osallistuvat todennäköisesti myös polyamiinit, vahamaiset aineet ja tietyt alkaloidit. Näistä sekundaarimetabolian tuotteista epidermin vahamaisen suojakerroksen eli kutikulan vahat toimivat antioksidanteina. Kutikula voi sisältää absorboivia aineita tai heijastaa säteilyä. Sen ulommainen osa muodostaa tietyillä lajeilla vaalean, puuterimaisen kerroksen, joka estää tehokkaasti säteilyn pääsyn lehteen. Tällainen kerros on havaittu esimerkiksi eräillä kuiviin paikkoihin sopeutuneilla sukkulenttikasveilla (Mulroy 1979)

Flavonoidit, joihin kuuluvat flavonit, flavonolit, flavanolit, isoflavonoidit ja antosyanidiinit, muodostavat yhden suurimmista fenolisten yhdisteiden ryhmistä. Flavonoidit absorboivat aallonpituuksia, joilla on kasville haitallisia vaikutuksia. Ne päästävät lävitseen fotosynteesille tärkeät aallonpituudet. Flavonoideja kertyy pääasiassa

kasvin lehtien päällimmäiseen epidermikerrokseen (Schmeltzer ym. 1988). Ne ovat UV-B-säteilyn absorboinnin lisäksi antioksidantteja eli torjuvat reaktiivisten happilajien aiheuttamia vaurioita. Flavonoidien biosynteesiä säädellään transkriptiotasolla. Mahdollinen UV-B-fotoreseptori, jonka absorptiomaksimi on 290 nanometrissä, kontrolloi todennäköisesti säätelyä. Fytokromit ja kryptokromit vaikuttavat flavonoidien synteesiin yhdessä UV-B-reseptorin kanssa, mutta ne eivät pysty indusoimaan synteesiä ilman UV-B-säteilyä (Duell-Pfaff & Wellmann 1982; Wade ym. 2001). UV-B-altistus nostaa lukuisien flavonoidien synteesireittien entsyymien transkriptiotasoa. Näistä kalkonisyntaasi (CHS) ja fenyylialaniiniammoniumlyyaasi (PAL) ovat avainentsyymejä flavonoidipigmenttien muodostuksessa (Mori ym. 2000; Morales ym. 2010). Kalkonisyntaasin biosynteesi voi aktivoitua UV-B-altistuksen ohella ympäristön ja kasvin kehitykseen liittyvien tekijöiden vaikutuksesta. Tällöin yhdisteitä on vaihtelevasti kasvin eri osissa toisin kuin UV-B-säteilyssä, jolloin flavonoideja akkumuloituu yksinomaan lehtien epidermiin (Greenberg 1997).

1.2.2 Morfologiset muutokset

Toisin kuin molekulaaristen, biokemiallisten ja fysiologisten muutosten, kasvien UV-B-säteilyn aiheuttamien morfologisten muutosten mekanismit ovat suurelta osin tuntemattomia (Jansen ym. 1998). Morfologisiin vasteisiin kuuluvat lehden paksuuntuminen, sirkkalehtien käpertyminen, lehdessä olevien solujen alhaisempi määrä, sirkkavarren, varren ja lehden pituuskasvun estyminen, kasvin haarautumisen lisääntyminen sekä muutokset kasvin tuore- ja kuivapainojen juuri/versosuhteissa (Tevini & Teramura 1989; Barnes ym. 1996). UV-B-säteily myös lisää kukkien määrää (Grammatikopoulos ym. 1998) ja läpimittaa (Petropoulou ym. 2001). Se aiheuttaa herneen (*Pisum sativum*) lehtien paksuuntumista ja lehtien adaksiaalisen puolen klorofyllikonsentraation alentumista (Day & Vogelmann 1995). Morfologiset vasteet ovat vaihtelevia eri kasvilajeilla ja jopa saman lajin ekotyypeillä tai viljelylajeilla. On kuitenkin todettu, että yksisirkkaiset kasvit ovat UV-B-säteilylle kaksisirkkaisia herkempiä (Barnes ym. 1990). Korkeilla paikoilla kasvaneet kasvit kestävät kasvihuonekokeissa paremmin UV-B-säteilyä kuin saman lajin matalilla paikoilla kasvaneet yksilöt (Teramura & Ziska 1996). Vasteista sirkkalehtien käpertyminen ja sirkkavarren pituus-

kasvun estyminen näkyvät hyvin lyhyellä aikavälillä. Lehden paksuuntumisen tai juuren ja verson painosuhteen muutosten syntyminen taas vaatii pidempää altistusta.

Morfologiset vasteet ovat luultavasti lukuisten, toisistaan riippumattomien mekanismien säätelemiä. Lituruoholla (*Arabidopsis thaliana*) tehdyssä kokeessa kävi ilmi, että vaikkakin UV-B vaikuttaa sekä sirkkalehtien avautumiseen että sirkkavarren pituuskasvuun, niiden UV-B-säteilyn annos-vastekäyrät eli herkkyysmaksimit olivat erilaiset. Ero näkyi myös fytochromi-B:n vaikutuksessa kyseisiin vasteisiin (Boccalandro ym. 2001). Brosché ja Strid (2000) ovat ehdottaneet herneen erityiseksi morfologiseksi UV-B-markkeriksi kärhien tiukkaa kiertymistä, jota he havaitsivat vain UV-B-säteilyn vaikutuksesta. Kiertymistä ei ilmennyt kun hernekasvit altistettiin UV-A-säteilylle tai otsonille, eikä suolastressin aikana tai kun kasvin lehteä vahingoitettiin. Se näkyi sekä kasvissa kiinni olevissa että siitä irrotetuissa kärhissä. Lituruoholla sirkkavarren kasvun estyminen havaittiin suhteellisen alhaisella UV-B:n määrällä ($0.01\text{--}0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) Eri aallonpituuksien suhteella ei ollut vaikutusta vasteen voimakkuuteen (Kim ym. 1998).

1.2.3. UV-B-säteilyn hyödyt

UV-B-säteily aiheuttaa kasveille selkeitä vaurioita. Toisaalta monet sen vaikutuksista ovat kasveille edullisia. Tiettyjen näennäisen selkeiden vaurioiden, kuten fotosysteemi II:n proteiinien D1 ja D2 hajotuksen mahdollista hyödyllistä merkitystä on pohdittu (Jansen ym. 1996b). Useat flavonoidit ja muiden sekundaariyhdisteiden metaboliareittien entsyymit vaikuttavat siihen, miten kasvi selviää ulkoisista stressitekijöistä. Näistä tärkeimpiä ovat fenyylyalaniini-ammoniumlyyaasi (PAL) ja kalkonisyntaasi (CHS). Sen lisäksi, että flavonoidit toimivat antioksidanteina ja suojapigmenteinä epidermissä, ne voivat suojata DNA:ta UV-B:n vaikutuksilta (Stapleton & Walbot 1994), parantaa kasvien kuivuusstressin sietoa vaikuttamalla ilmarakojen huulisoluihin (Gitz & Liu-Gitz 2003) ja suojata kasvia herbivorialta (Caasi-Lit ym. 1997). Flavonoidien ja muiden fenolisten yhdisteiden määrässä löytyy selviä eroja saman lajin eri genotyyppien välillä (Caasi-Lit ym. 1997).

UV-B-säteilyn indusoimaa haaroittumista pidetään auksiinimetabolian häiriintymisen seurauksena (Ros & Tevini 1995). Toisaalta se voidaan nähdä UV-B-fotoreseptorin

välittämänä morfologisena sopeutumiskeinona. Kasvin sopeutumista ja sille aiheutuvaa vahinkoa voi myös olla mahdotonta erottaa toisistaan; sopeutumismekanismit, jotka aiheuttavat kasvin aineenvaihdunnan tehokkuuden alenemista ja verottavat kasvin yhteyttämislänsän tuottamaa energiaa, heikentävät kasvin tuottavuutta. Lyhyt kasvi, jolla on pienet, mahdollisesti k pertyneet lehdet, on kasvustossa paremmin suojassa UV-B-säteilyltä. Toisaalta tällaisen kasvin yhteytt miseens  tarvitseman fotosynteettisesti aktiivisen säteilyn (photosynthetic active radiation, PAR) määrä on alhaisempi. UV-B-säteilyn indusoimien morfologisten muutosten, kuten varren pituuskasvun estymisen ja kasvin haarautumisen lisääntymisen, arvioidaan olevan fotosynteesin muutoksia t rke mpii  eri lajien ja saman lajin genotyyppien välissä kilpailusuhteissa (Barnes ym. 1990). Lajien ja genotyyppien väliset herkkyserot ja niistä johtuvat kilpailutasapainon muutokset voivat johtaa luonnonkasvuston lajikoostumuksen sekä maa- ja metsätaloudessa kasvatettavien lajien tuottavuuden muutoksiin. Viimeisimpien tutkimusten mukaan ainoa tunnettu yksinomaan UV-B-säteilyn vasteisiin liittyvä signalointikomponentti UVR8 osallistuu puolustusmekanismien lisäksi lituruohon lehden kehityksen ja morfogeneesin säätelyyn (Wargent ym. 2009). Havainto viittaa siihen, että UV-B on haitallisten vaikutustensa lisäksi tärkeä säätelytekijä kasvin normaalissa kehityksessä.

Kasvien tuottamista fenolisista yhdisteistä lähinnä flavonoidit toimivat ravintokasvien makuaineina ja antioksidantteina. Niiden ihmisten terveyteen liittyvistä vaikutuksista on tehty paljon tutkimuksia, joita käydään melko kattavasti läpi Harborne & Williams (2000) katsausartikkelissa. UV-B-säteilyä ei vielä käytetä laajassa mittakaavassa esimerkiksi antioksidanttien tuotantoon, mutta siitä ja flavonoidien synteessireittien muokkaamisesta käydään keskustelua (Formann & Martens 2001). Aromaattisten  llyjen määrää basilikan kasvatuksessa on jo lis tt  UV-B-säteilyn avulla (Johnson ym. 1999).

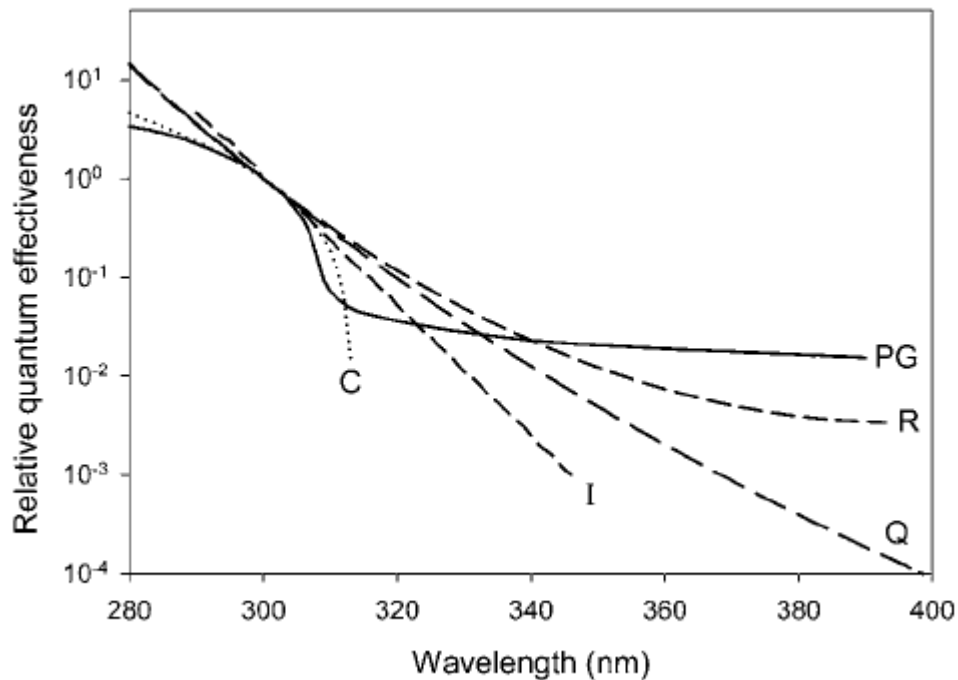
2. VAIKUTUSSPEKTRI, BIOLOGINEN PAINOTUSKERROIN JA RAF- ARVO

2.1. Vaikutusspektri

UV-tutkimuksessa yleisesti käytettävä vaikutusspektri kuvaa tarvittavan säteilyn eli fotonien määrää eri aallonpituuksilla tietyn suuruisen vasteen ilmenemisessä. Se esitetään yleensä muodossa vaste – esim. flavonoidien määrä – /säteilyn määrä/aallonpituus. Vaikutusspektrin muodostamiseksi mitataan ensin kunkin tutkittavan säteilyn aallonpituuden osalta eri säteilymäärien aiheuttaman vasteen suuruus, jolloin voidaan muodostaa näiden aallonpituuksien annos-vaste-käyrät. Vaikutusspektriä muodostettaessa annos-vaste-käyristä nähdään, mikä määrä eri aallonpituuksien säteilyä tarvitaan tietyn suuruisen vasteen aiheuttamiseen (Björn 2002). Kunkin pigmentin eli fotoreseptorin välityksellä syntyvien vastekäyrien perusteella muodostettu vaikutusspektri muistuttaa luonnollisesti kyseisen fotoreseptorin absorptiospektriä, mistä seuraa, että saman fotoreseptorin absorboiman säteilyn vaikutusspektrit muistuttavat toisiaan. Kun siis esimerkiksi kahden tarkasteltavan vasteen vaikutusspektrit ovat samanlaiset, on aiheellista olettaa, että vasteet ovat saman fotoreseptorin välittämiä. Kääntäen erilaiset vaikutusspektrit omaavien vasteiden voidaan ajatella olevan eri fotoreseptorien kontrollissa. (Caldwell & Flint 1997).

2.2. Biologinen painotuskerroin ja sen käyttö

Biologisen painotuskertoimen (BSWF eli Biological Spectral Weighting Function) laskemiseen käytetään yleensä vaikutusspektreistä saatavaa tietoa. Vaikutusspektrin tavoin painotuskerroin kuvaa eri aallonpituusalueiden suhteellista osuutta tutkittavien vasteiden ilmenemisessä. Painotuskerroin on sitä suurempi, mitä voimakkaampi kyseisen alueen biologinen vaikutus käytettävien vaikutusspektrien mukaan on. Yhtä kattavaa painotuskerrointa ei ole pystytty löytämään (Kohen ym. 1995), vaan useille eri kasvilajeille ja vasteille on laskettu spesifisiä kertoimia ja niitä käytetään muun muassa kun halutaan arvioida, mikä suhde on otsonikadon ja biologisesti vaikuttavan säteilyn muutoksen välillä (Caldwell & Flint 1997) (Kuva 1.).



Kuva 1. BSWF-kuvaaja. C = Caldwellin 'generalized plant response'(GPR), I = Ibdahin ym. käyrä flavonolien akkumuloitumiselle, Q = Quaiten ym. käyrä DNA vaurioille, R = lehtien fotosynteesin inhibitio *Rumex patienti*alla, PG =Flintin ja Caldwellin 'plant growth response'. Lähde: Flint ym. 2004.

Hyvin yleisesti käytetty painotuskerroin on jo 1970-luvulla kehitetty GPR (generalized plant response eli kasvien yleinen vaste), joka pohjautuu useaan vaikutusspektriin ja yhteensä yhdeksän vasteen tietoihin (Flint & Caldwell 2003a). GPR korostaa UV-B-säteilyn osuutta jättämällä aallonpituudeltaan yli 313nm pitkän säteilyn vaille biologista vaikuttavuutta (Kuva 1.). Sen kokoamisen lähtökohtina toimineista vasteista puuttuvat lisäksi kasvuun liittyvät vasteet (Flint & Caldwell 2003a; Flint ym. 2003). Näitä puutteita Flint ja Caldwell (2003a) pyrkivät korjaamaan uudella painotuskertoimellaan ("Plant growth response"), joka perustuu peltokauran (*Avena sativa*) kasvuvasteisiin ja jossa huomioidaan vaikuttavana säteilynä myös UV-A-aallonpituusalue (Kuva 1.). Useiden painotuskertoimien vertailuissa "Plant growth response" ennusti odotetusti parhaiten UV-B-säteilyn aiheuttamia kasvuvasteita. Vastaavasti pigmenttien muutosten osalta luotettavimpia ovat kertoimet, joissa on annettu painoarvoa UV-A-aallonpituusalueelle (Flint & Caldwell 2003b; Flint ym. 2004; Kotilainen ym. 2009).

Otsonikadon säteilymuutosten arvioinnin lisäksi painotuskertoimia voidaan käyttää lamppu- ja kenttäkokeiden säteilyominaisuuksien vertaamiseen ja havaittujen vasteiden valofysiologian selvittämiseen (Holmes 1997). Niiden avulla pystytään arvioimaan, millaisia määriä lisättyä UV-säteilyä käytetään lamppujen avulla tehtävissä kokeissa tai sitä, mikä on kasvien saama suhteellinen säteily määrä koejärjestelyssä, jossa osa säteilystä poistetaan kalvojen avulla. Tällöin kokeessa määritellään simuloitavan otsonikadon taso ja sovitetaan sitten koejärjestely sitä vastaavaksi.

Radiation Amplification Factor (RAF) – arvo lasketaan biologisen painotuskertoimen avulla. Arvo kertoo, kuinka monta prosenttia biologisesti vaikuttavan säteilyn määrä nousee tarkasteltavalla aallonpituudella, jos otsonikerros ohenee yhden prosentin. Jos RAF-arvo on 250 nanometrin kohdalla 1,5, se tarkoittaa, että kun otsonikerros ohenee yhden prosentin, säteilyn määrä nousee kyseisellä aallonpituudella 1,5 prosenttia. Yleensä arvot liikkuvat 0,1-2,5 välillä (Kohen ym. 1995). Otsonikerroksen oheneminen vaikuttaa voimakkaimmin spektrin UV-B-alueeseen ja biologisen painotuskertoimen kuvaaja laskeekin jyrkästi pitkien aallonpituuksien alueella. Mitä jyrkempi tämä lasku on, sitä suurempi RAF-arvo on lyhyillä aallonpituuksilla, jolloin biologisesti vaikuttavan säteilyn määrän kasvu on otsonikadon myötä voimakkaampaa (Caldwell & Flint 1997).

Väärän painotuskertoimen käyttö saattaa johtaa virheelliseen kokeiden suunnitteluun ja harhaanjohtaviin tuloksiin (Paul 1998). Painotuskerroin tulisikin valita tapauskohtaisesti tutkittavan vasteen mukaan. Esimerkiksi ”kasvien yleisen vasteen” (GPR) käytöstä lampuilla tehtävän kokeen suunnittelussa seuraa usein suhteellisesti suuren UV-B-säteilyn määrän käyttö. Voimakkaan UV-B-säteilyn ansiosta kasvien vasteet ovat yleensä selvät. Ne vahvistavat sitten painotuskertoimen toimivuuden. Tämän tutkimuksen tavoitteena on saada tietoa luotettavampien vaikutusspektrien, biologisten painotus-kerrointen ja RAF-arvojen tuottamista varten. Siinä huomioidaan UV-B-säteilyn lisäksi UV-A-säteilyn ja näkyvän valon, erityisesti sinisen valon, aiheuttamat vasteet.

3. AALLONPITUUSALUEIDEN MERKITYS

3.1. UV-A:n, UV-B:n ja näkyvän valon yhdysvaikutuksista

UV-A:n, UV-B:n ja näkyvän valon erillisiä vaikutuksia on tutkittu paljon, mutta niiden yhdysvaikutuksia huomattavasti vähemmän. Kuten jo aiemmin tuli esille, vasteiden tiedetään seuraavan useiden reseptorien samanaikaisesta toiminnasta. Niiden ilmeneminen ja voimakkuus riippuvat UV-B-säteilyn lisäksi muiden aallonpituusalueiden suhteellisesta osuudesta kasvien vastaanottamassa säteilyssä. Eri aallonpituusalueiden suhteella on havaittu olevan merkittävä yhteys esimerkiksi siihen, kuinka herkkä kasvi on UV-B-säteilyn vaihtelulle (Mirecki & Teramura 1984; Middleton & Teramura 1994).

Merkittävä osa tähänastisesta UV-tutkimuksesta on tehty laboratorioissa, kasvatuskammioissa ja kasvihuoneissa. Tutkimusten säteilyolosuhteissa ja muissa vasteisiin mahdollisesti vaikuttavissa ympäristötekijöissä on ollut suurta vaihtelua. Sisätiloissa lamppujen avulla lisätyn UV-B-säteilyn avulla tehtyjen kokeiden tulokset eroavat usein suuresti ulkona tehdyistä. Tämä johtuu ainakin osittain lamppujen avulla tehtyjen kokeiden luonnottoman korkeasta UV-B:n määrästä sekä riittämättömistä määristä UV-A:ta ja PAR:ia. On havaittu, että kasvien kokonaisbiomassa laskee, kun niiden saaman PAR-säteilyn määrä vähenee ja UV-B-säteilyn määrä kasvaa. Kasvit ovat tällöin myös keskimääräisesti lyhyempiä (Edwards 1992).

Kohotettu määrä UV-B-säteilyä (13 kJ m^{-2}) aiheutti kasvihuoneessa tehdyssä kokeessa huomattavaa kasvun ja kuivapainon alenemista riisille (*Oryza sativa*). Samalla määrällä UV-B:tä ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta ulkona kasvatettuihin kasveihin. Kokeen tekijät pitivät eron todennäköisenä syynä sitä, että kasvit saivat ulkona suhteellisesti enemmän UV-A-säteilyä. Sen suhteellinen määrä UV-B-säteilyyn verrattuna oli ulkona 7,5 kertaa suurempi kuin kasvihuoneessa (Dai ym. 1995). Soijapapujen biomassa laski ulkotiloissa tehdyssä kokeessa (Caldwell ym. 1994), kun ne altistettiin UV-B-säteilylle ja niiden PAR:n ja UV-A-säteilyn määrä vähennettiin alle puoleen aurinkoisen päivän maksimista. UV-A heikensi UV-B:n aiheuttamia vasteita, kun vain PAR:n määrä oli alhainen. Kun PAR:n määrä oli korkea, UV-A ei vaikuttanut

vasteiden voimakkuuteen (Caldwell ym. 1994). Yksittäisissä tutkimuksissa vasteissa on ollut eroa riippuen siitä, millaisia lamppeja kokeessa on käytetty. Erojen on osassa tapauksista epäilty aiheutuvan lamppujen eroavista UV-A:n ja sinisen valon määristä (mm. Krizek ym. 1993).

UV-A-säteilyllä ja sinisellä valolla katsotaan olevan tärkeä tehtävä fotoreaktivaatiossa. Se on entsyymaattinen prosessi, jossa fotolyaasi-entsyymi käyttää UV-A:n ja sinisen valon energiaa hajottaakseen DNA:han UV-B-altistuksessa muodostuneita haitallisia rakenteita. Näitä ovat pääasiassa syklobutaani-pyrimidiinidimeerit ja pyrimidiini (6-4) pyrimidinonidimeerit (Britt 1996). Hada ym. (2000) ovat määritelleet fotoreaktivaation vaikutusspektrin. Tämän vaikutusspektrin mukaan syklobutaani pyrimidiinidimeerien hajotus on voimakkainta 400 nanometrin kohdalla eli UV-A:n ja sinisen valon aallonpituusalueiden keskellä.

Kohotetulle UV-B-säteilylle altistamisen on todettu heikentävän fotosynteesiä ja fotosynteettistä tuottavuutta monilla UV-B:lle herkillä kasvilajeilla (Day & Vogelmann 1995; Teramura & Ziska 1996). Murali ym. (1988) altistivat herkkää soija-papulajiketta UV-B-säteilylle, jonka he laskivat vastaavan 16 prosentin otsonikatoa ($11,5 \text{ kJ m}^{-2}$). Soijapavuissa havaittiin fotosynteesin vähenemistä korkeimmillaan 17 prosentilla. Kun samaa lajiketta kasvatettiin niin sanotuissa open-top-kammioissa ja UV-B-säteilyn määrä oli alhaisempi, kasvien nettohiilitaseeseen ei tullut muutoksia (Miller ym. 1994). UV-B-säteilyn määrän lisäksi säteilyn spektrillä ja erityisesti PAR:lla on ollut vaikutusta muun muassa fotosysteemi II:n D1 ja D2 proteiinien hajoamiseen. (Jansen ym. 1996). Strid ym. (1990) kokeessa lisätyn UV-B-säteilyn herneelle aiheuttamat vauriot olivat vähäisempiä kuin PAR:n määrä oli korkea. Kasvien altistuminen yhtäaikaaisesti suhteellisen korkealle lämpötilalle ($+35^{\circ}\text{C}$), UV-B-säteilylle ja voimakkaalle valolle saattaa voimistaa valon vaikutuksesta tapahtuvaa valoreaktio II:n estymistä eli fotoinhibitiota (Ziska ym. 1993).

3.2. Kokeiden suunnittelussa huomioitavia seikkoja

Tutkimusten valo-olosuhteita on nykyisen tiedon valossa syytä tarkastella uudelleen, jotta niistä saataisiin luotettavaa tietoa kasvien UV-B-vasteista. Kokeita tehdään

aiempaa enemmän ulkotiloissa, jolloin kasvien saaman säteilyn määrää muutetaan erilaisten kalvojen avulla. Kalvoja valitessa on tärkeää huomioida, miten ne päästävät läpi UV-B:n lisäksi muita aallonpituuksia (Kotilainen ym. 2009, Morales ym. 2010). Ulkona tehtyjen kokeiden etuna on kasvien saaman luonnollisen spektrin lisäksi se, että kasveja ympäröivä mikroilmasto saadaan mahdollisimman luonnonmukaiseksi. Ulkokokeet eroavat kuitenkin hyvin paljon toisistaan kokeellisten menetelmiensä ja välineistönsä puolesta (Krizek ym. 1993).

Sisäkokeet ovat tarpeellisia kun ympäristöolosuhteet halutaan kontrolloida tarkasti. Muun muassa uudentyypisillä lampuilla (Krizek ym. 1993) kasvihuoneiden valaistusolosuhteita on pystytty muokkaamaan luonnollisemmiksi. On tärkeää, että aallonpituuksien väliseen tasapainoon kiinnitetään huomiota tutkimuksen suunnittelussa ja biologisesti vaikuttavan säteilyn määrän muutosten arvioinnissa. Tarkoin suunniteltua tutkimusta tarvitaan edelleen, jotta voidaan tarkentaa UV-A:n, UV-B:n ja näkyvän valon vuorovaikutuksia. Tutkimuksessa on tärkeää kontrolloida ja raportoida huolellisesti kunkin aallonpituusalueen suhteellinen määrä ja vaikutus kasvien vasteisiin. Aallonpituusalueiden merkitysten ymmärtäminen auttaa luomaan vasteille tarkkoja vaikutusspektrejä ja niiden kautta luotettavia painotuskertoimia (Kotilainen ym. 2009). Lamppu-, kasvatuskammio- ja kasvihuonekokeiden valaistusta voidaan painotuskertoimien avulla suunnitella paremmin luonnollisia olosuhteita vastaaviksi. Näin vähennetään otsonikadon vaikutuksiin liittyviä virheellisiä ennusteita.

Tutkin pro gradu-työssäni herneen (*Pisum sativum* cv. Meteor) vasteita auringonsäteilyn eri aallonpituusalueille. Alla esitetään tutkimukseni hypoteesit:

1. Muutokset kasvussa ja morfologiassa sekä fenolisten yhdisteiden lehtiin kertyminen vaihtelevat riippuen taimien eri käsittelyissä saamasta valon aallonpituusalueesta.
2. Fenolien kertymiseen ja epidermissä tapahtuvaan UV-suojaukseen vaikuttavat eri aallonpituudet kuin kasvussa tai morfologiassa mitattaviin muutoksiin.
3. Taimien ja niiden lehtien eri kehitysvaiheilla on vaikutusta tutkittavien vasteiden voimakkuuteen.

4. AINEISTO JA MENETELMÄT

4.1 Tutkimusmateriaali

Herne (*Pisum sativum*) on hernekasveihin kuuluva perinteinen viljelykasvi. Se on yksivuotinen, rentovartinen ja heikkojuurinen kasvi. Lehdissä on yhdestä kolmeen lehdykkäparia ja keskisuonen jatkeena olevat kärhet. Kärhien avulla herne tarttuu esimerkiksi toisiin kasveihin saadakseen tukea. Epäsäännöllisessä kukassa on viisi terälehteä. Kukkat ovat valkoiset tai punaisenkirjavat ja hedelmä palko. Herne on typensitoja, eli se pystyy sitomaan ilmakehän typpeä (Peoples ym. 1995). Herneen juurien ja maaperän typensitojabakteerien vuorovaikutuksen seurauksena muodostuu juurinyströitä. Kyseessä on symbioosi, jossa juurinyströissä elävät bakteerit saavat isäntäkasviltaan yhteyttämisessä syntyneitä hiiliyhdisteitä ja luovuttavat kasville sen tarvitsemaa typpeä (Mylona ym. 1995). Typensidonnan vuoksi hennettä käytetään perinteisessä vuoroviljelyssä lisäämässä maaperän typpipitoisuutta (Peoples ym. 1995).

4.2 Kasvatus

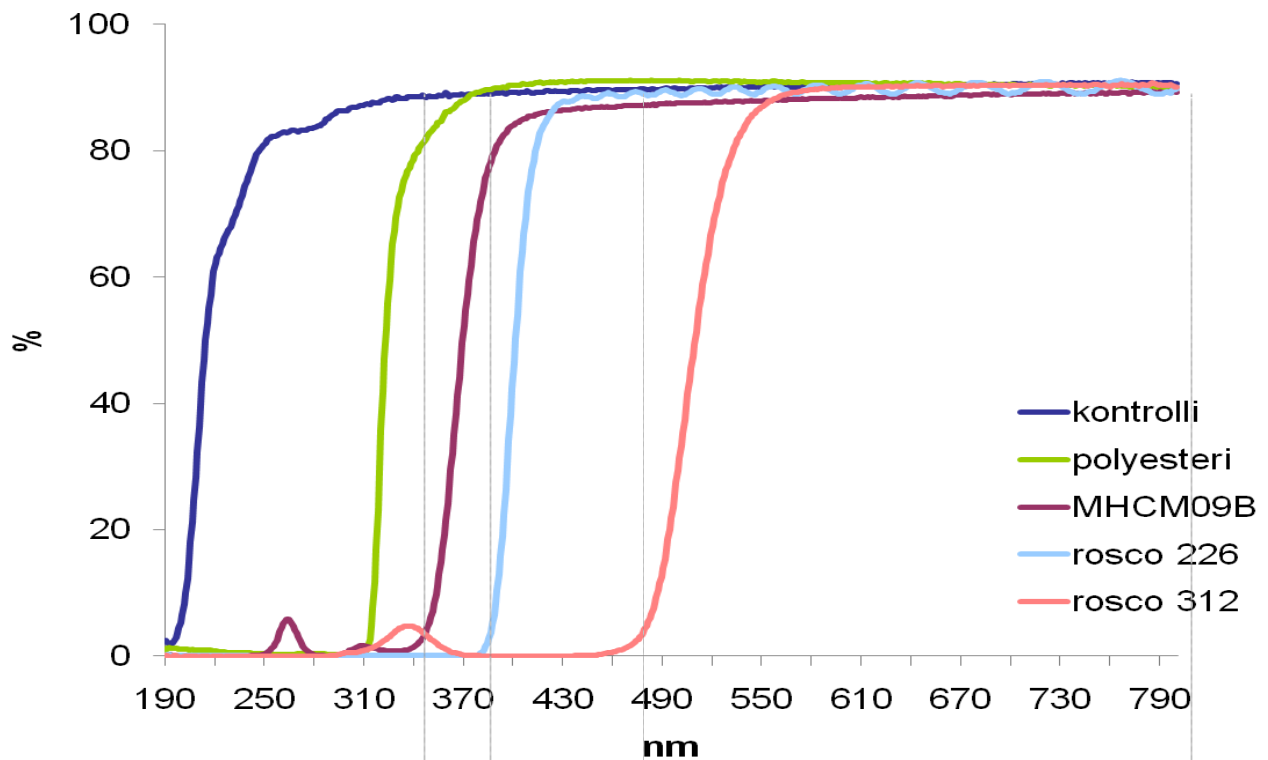
Koe tehtiin Helsingin yliopiston Viikin kampuksen kasvihuoneiden koealueella 1.6. – 10.7.2008 välisenä aikana. Herneen (*Pisum sativum* cv. Meteor, Thomson & Morgan (UK) Ltd., Poplar Lane, Ipswich, England IP8 3BU) siemeniä pidettiin vedessä yön yli. Liotuksen jälkeen siemenet kylvettiin muovisiin ruukkuihin (0,3 l) kosteutta sitovan hienojakoisen vermikuliitin (VERMIPU, Lapinjärvi) ja keskikarkean kasvaturpeen (KEKKILÄ Oyj, Vantaa) sekoitukseen (1:2). Kasvaturve sisälsi typpeä (1600mg/kg), fosforia (500mg/kg) ja kaliumia (2600mg/kg). Jokaiseen ruukkuun kylvettiin neljä siementä, joista itäneistä sirkkataimista valittiin kokeeseen yksi. Ruukut asetettiin alustoille, kaksikymmentä ruukku kullekin. Ylimääräiset itäneet taimet poistettiin päivittäin.

Siemenet itivät ja taimet kehittyivät ulkotiloissa kalvojen alla. Ne suojattiin itämiseen saakka ruukkujen yläpuolella olevien kalvokehikoiden yli pingotetulla rastasverkolla. Ensimmäiset siemenet itivät viisi ja viimeiset siemenet kaksitoista vuorokautta kylvämisen jälkeen. Kun taimet olivat keskimäärin kaksiviikkoisia ja kaksikymmentä

senttimetriä korkeita, ruukkuihin asetettiin tukikepit pitämään taimet pystyasennossa ja estämään niiden takertuminen toisiinsa. Samalla kalvokehikoita nostettiin kaksikymmentä senttiä, jotta taimet voivat kasvaa esteettä. Taimia kasteltiin ruukkujen alla oleville kasvualustoille. Kastelun tiheys riippui lämpötilasta ja ulkoilman kosteudesta. Tavoitteena oli kasvualustan pitäminen tasaisen kosteana. Alustojen ympärille ja ruukkuihin kasvaneet rikkakasvit kitkettiin kastelun yhteydessä.

4.3 Koejärjestely

Herneiden vasteita tutkittiin viiden erilaisen auringonsäteilyä valikoivasti absorboivan muovikalvon avulla. Neljä koekalvoa, 1) polyesteri (Autostat CT5; Thermoplast, Helsinki, Finland), 2) MHCM09B (Experimental film, hpi.visqueen horticultural products, Ardeer, Stevenston, KA20 3NQ, UK), 3) rosco226 ja 4) rosco312 (Rosco-kalvot: Westlightning, Helsinki, Finland), päästävät lävitseen auringonsäteilyn aallonpituusalueita Kuvan 1 osoittamalla tavalla. Kyseisten kalvojen alla kasvatetut taimet kehittyivät altistuneina kunkin kalvon läpäisemille aallonpituuksille. Viides kalvo (polyteeni, 04 PE-LD; Etola, Jyväskylä, Finland) päästi lävitseen kaikki aallonpituudet ja toimi kontrollina. Mainituilla viidellä käsittelyllä (mukaan lukien kontrolli) oli kuusi toistoa. Koeasetelmassa oli siis yhteensä 30 kalvoa. Puukehikoihin (100 × 80 cm) kiinnitetyt kalvot sidottiin naiton narulla neljään maahan upotettuun tukikeppiin kasvatusalustojen ylle. Kussakin käsittelyssä käytettävää kalvoa kiinnitettiin lisäksi taimien sivuille (Kuva 2). Jokaisen kehikon alla oli kaksi kasvatusalustaa ja kullakin kasvatusalustalla kaksikymmentä siementä. Mittaukset tehtiin siementen idettyä alustojen kuudelle keskellä kasvavalle taimelle. Yhden kalvon alla oli yhteensä kaksitoista mitattavaa kasvia. Kasvatusalustojen reunoilla olevat neljätoista taimea ehkäisivät mahdollista reunavaikutusta (Kuva 2.).



Kuva 2. Koekalvojen spektrofotometrillä (Shimazu UV-2501 PC UV-VIS, Kioto, Japani). mitatut prosentuaaliset läpäisevyydet. Auringonvalon aallonpituudet nanometreinä X-akselilla ja prosentit Y-akselilla. Aallonpituudet vastaavat spektrin alueita seuraavasti: UV-B: 280-315nm. UV-A: 315-400nm ja sininen valo: 400-500nm.



Kuva 3. Kasvatusalustat kontrollikalvon alla.

Aallonpituusalueiden suhteellisen määrän merkitystä taimien kasvuun ja fysiologisiin muutoksiin selvitetiin vertaamalla käsittelyjä tilastollisella kontrastivertailulla: kontrolli/polyesteri (UV-B-säteilyn vaikutus), polyesteri/MHCM09B (lyhytaaltoisen UV-A-säteilyn vaikutus), polyesteri/rosco 226 (UV-A-säteilyn vaikutus), MHCM09B/rosco 226 (pitkäaaltoisen UV-A-säteilyn vaikutus) ja rosco 226/rosco 312 (sinisen valon vaikutus). Taimien saamat säteilymäärät esitetään Taulukossa 1. Kontrastivertailuihin palataan Tilastolliset analyysit-kappaleessa.

Taulukko 1. Kalvon läpäisevien aallonpituusalueiden osuus eri käsittelyissä.

Kalvo	UV-B	UV-A	Sininen valo
Kontrolli	100%	100%	100%
Polyesteri	0%	100%	100%
MHCM09B	0%	65%	100%
Rosco 266	0%	0%	100%
Rosco 312	0%	0%	0%

Kokeen alussa kehikot olivat kasvatusalustojen yläpuolella kolmenkymmenen senttimetrin korkeudella ja noin 20 asteen kulmassa kehikon alempana oleva reuna etelään päin (Kuva 3). Kehikoiden vinoon asettamisella ja sivuille asetettavilla kalvoilla varmistettiin taimien altistuminen vain kunkin käsittelyn aallonpituuksille. PAR-säteilyn fotonitiheys ($\mu\text{mol s m}^2$) mitattiin kalvojen ylä- ja alapuolelta kvanttianturilla (LI-250A, LI-COR Biosciences Inc., Lincoln, Nebraska). Fotonitiheys oli kalvojen alla keskimäärin viisitoista prosenttia alhaisempi kuin niiden yläpuolella. Tulos oli sama kaikissa käsittelyissä lukuun ottamatta sinistä valoa absorboivaa filteriä, jonka alla PAR-säteilyn määrä oli keskimäärin 40 prosenttia alhaisempi.



Kuva 4. Kehikot koealueella.

Kalvoja puhdistettiin pölystä ja liasta kastelun yhteydessä. Näytteiden keräämisen jälkeen niistä leikattiin 10cm×10cm kokoiset liuskat, joiden läpäisevyys mitattiin spektrofotometrillä (Shimazu UV-2501 PC UV-VIS, Kioto, Japani). Mittauksella varmistettiin, että kalvojen läpäisevyys eri aallonpituuksilla pysyi kokeen loppuun saakka samana.

4.4. Mittaukset ja näytteiden keruu

UV-B-säteilyn indusoimien fenolisten yhdisteiden määrää mitattiin Dualex 3 FLAV (FORCE-A, Orsay, France)-laitteella. Laite mittaa säteilyn absorptio määrää lehden epidermissä 375 nanometrin kohdalla eli UV-A-säteilyn aallonpituusalueella. Kyseistä aallonpituutta absorboivat monet fenoliset yhdisteet, joiden epidermiin kertymistä UV-B-säteily indusoi. (Dualexin toimintaperiaatteesta: Goulas ym. 2004). Mittaukset tehtiin

kolmessa vaiheessa, jotta saataisiin selville lehtien iän ja taimien fenologisen kehitysvaiheen vaikutukset yhdisteiden määrään. Kaikilla kerroilla mitattiin lehtien ylä- ja alaepidermin absorptiot tietystä kohdasta suurten lehtisuonien välistä. Ensimmäisellä kerralla (19.6.2008) mitattiin ensin avautuneet alalehdet. Toisella kerralla (26.6.2008) mitattiin aiemmin mitatut lehdet ja ensimmäiset kasvulehdet, kolmannella kerralla (3.7.2008) aiemmin mitatut lehdet ja nuorimmat kasvulehdet. Ensin avautuneet lehdet mitattiin siis yhteensä kolme kertaa, toisen mittauskerran lehdet kaksi kertaa ja viimeisinä mitatut vain kerran. Lehdistä mitattiin myös klorofyllin määrää (SPAD-502-klorofyllimittari, Minolta camera Co., Osaka, Japani), joka oli erittäin tasainen käsittelystä ja lehden iästä riippumatta. Olen jättänyt kyseisen datan pois Tulokset-kappaleesta, mutta palaan siihen lyhyesti yhteenvedossa.

Taimien pituudet mitattiin niiden ollessa 11 vuorokauden (19.6.2008) ja 30 vuorokauden (8.7.2008) ikäisiä. Ensimmäisellä kerralla taimet mitattiin suoristettuina ja toisella kerralla asennossa, jossa ne kasvoivat tukikeppejä vasten. Työssä käytettiin metallista rullamittanauhaa ja pituudet kirjattiin ylös millimetrin tarkkuudella.

Taimista kerättiin näytteitä fenolisten yhdisteiden eristämistä ja pinta-alamittauksia varten. Molemmissa tapauksissa näytteiksi kerättiin lehdet tai lehdykät (3 kpl/taimi), joista oli aiemmin mitattu epidermin fenolipitoisuutta Dualex-laitteella. Fenolien eristämiseen käytettävät näytteet kerättiin 9.7.2008. Lehdet laitettiin välittömästi irrottamisen jälkeen merkittyihin foliokuoriin ja foliokuoret nestemäiseen tyypeen. Yksi kuori sisälsi yhden käsittelyn ja yhden toiston saman ikäiset lehdet. Näytteet siirrettiin pienikokoisiin pahvirasioihin ja syväjäädettiin -80°C pakastimessa. Alustoille jäävien taimien annettiin kehittyä elokuun alkuun saakka ja niiden kuntoa tarkasteltiin silmämääräisesti. Havaintoihin palataan Tulosten tarkastelu-kappaleessa.

Pinta-alamittauksiin käytettävät lehdykät (1 lehdykkä/lehden lehdykkäpari) kerättiin paperipusseihin 10.7.2008. Pinta-alat mitattiin välittömästi (LI-3000A, siirrettävä pinta-alan mittauslaite; LI-3050A, Lincoln, Nebraska). Kasvien versot kuivattiin $+60^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa kolmen vuorokauden ajan. Versojen kuivapainot punnittiin analyysivaa'alla (SCALTEC, Berner GMBH, Heligestadt, Saksa).

Taimet mitattiin ja niiden näytteet kerättiin koko kokeen ajan satunnaistetussa järjestyksessä. Alustat vedettiin kalvokehikoiden alta mittausten ja näytteiden keruun ajaksi. Taimien altistuminen niiden käsittelyyn kuulumattomille säteilyn aallonpituusalueille minimoitiin tekemällä toimenpiteet mahdollisimman nopeasti.

4.5. Fenolien eristys ja tunnistaminen

Lehdet otettiin -80°C-pakastimesta ja niitä pidettiin yön yli eksikaattorissa, jonka pohjalla oli kosteutta sitovaa silikageeliä. Sulaneista näytteistä (saman käsittelyn ja ikäryhmän lehdet) irrotettiin lehdenkappale, jota kuivattiin huoneenlämmössä kaksi vuorokautta. Kappaleista kirjattiin ylös tuore- ja kuivapainot ja laskettiin niiden suhde. Tuore- ja kuivapainot punnittiin analyysivaa'alla (SCALTEC, Berner GmbH, Heligestadt, Saksa) Kunkin käsittelyn lehdet jauhettiin erikseen nestemäisessä työssä. Näytteistä erotettiin noin kuusikymmentä grammaa lehtijauhetta. Tarkat painot mitattiin analyysivaa'alla ja kirjattiin ylös. Jauhetut näytteet liuotettiin eppendorf-putkessa 1 millilitraan metanolia. Liuotettuja näytteitä pidettiin 15 minuuttia jäämurskalla ja sentrifugoitiin kolme minuuttia (Minispin Eppendorf AG 22331, Hampuri, Saksa) 10000 kierrosta/min. Supernatantti (pinnalle jäänyt metanoli ja siihen liuenneet yhdisteet) siirrettiin pasteur-pipetillä lasiseen koeputkeen. Yhdisteiden uuton tehostamiseksi käsittely toistettiin kolme kertaa. Lopuksi koeputkessa olevat neljä millilitraa uutettua liuosta pipetoitiin eppendorf-putkeen ja sentrifugoitiin aiemmin esitetyllä tavalla, minkä jälkeen lopullinen näyte siirrettiin takaisin lasiseen koeputkeen. Käsittelyjen välillä näytteitä säilytettiin styrox-laatikossa jäämurskalla lämpötilan nousun ja fenolisten yhdisteiden hajoamisen estämiseksi. Valmiit näytteet kuivattiin typpivirtauksen avulla ja säilöttiin -20 °C pakastimeen.

Fenoliset yhdisteet erotettiin ja tunnistettiin Viikin kampuksen perinnöllisyystieteen osastolla. Yhdisteet erotettiin korkean erotuskyvyn nestekromatografialla (High pressure liquid chromatography, Agilent 1100 series, Waldbroon, Saksa), jonka detektoriin muodostuu säteilyn absorptiopiikki kullekin näytteessä olevalle yhdisteelle tyypillisen retentioajan kohdalle. Retentioaika tarkoittaa aikaa, joka kuluu yhdisteen kulkeutumiseen kromatografisen systeemin läpi. Mitä suurempi yhdiste on, sitä pidempi on sen retentioaika.

Yksittäisten yhdisteiden määrät laskettiin niiden absorptiopiikkien pinta-alojen perusteella Keinäsen & Julkunen-Tiiton (1998) tutkimuksen mukaisesti. Yhdisteiden konsentraatiot näytteiden kuivapainosta laskettiin lehtien tuore-kuivapainojen suhteiden avulla ja ilmoitettiin muodossa mg/g.

Osa yhdisteistä tunnistettiin nestekromatografiin liitettyllä massaspektrometrillä. Massaspektrometrisessä määrittämisessä näyte saatetaan kaasutilaan, jolloin osa sen molekyyleistä pilkkoutuu. Laite piirtää massaspektrin, jonka piikkien sijainnista näkyy muodostuneiden ionien massa. Tunnistaminen tehtiin Ferreres ym. (2008) tutkimuksessa kuvatulla tavalla ja siitä löytyvien yhdisteiden massatietoihin vertaamalla. Yhdisteet tunnistettiin kaikista näytteistä vertaamalla niiden massoja ja yksilöllisiä retentioaikoja. Yhdisteet, joista ei löytynyt vertailutietoja, nimettiin ryhmätasolla niiden UV-säteilyn absorptiospektrin perusteella.

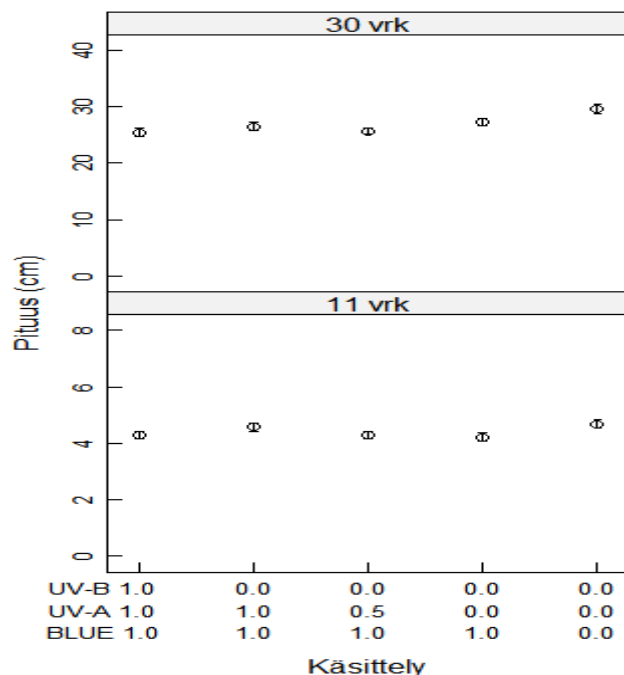
4.6. Tilastomenetelmät

Kokeen tulokset analysoitiin R-tilasto-ohjelmalla (versio 2.9.1). Käsittelyjen kokonaisvaikutus (joka kertoo, onko vasteissa eroa käsittelyjen välillä) testattiin LME:llä (Linear mixed effect model). Kaikkien analyysien osalta käytettiin toimintoa "weights=varPower" tasoittamaan varianssien heterogeenisyyttä. Kun kokonaisvaikutus alitti tilastollisen merkitsevyyden rajan, käsittelyjä verrattiin kontrastivertailuna seuraavasti: kontrolli/polyesteri (UV-B-säteilyn vaikutus), polyesteri/MHCM09B (lyhytaaltoisen UV-A-säteilyn vaikutus), polyester/rosco 226 (UV-A-säteilyn vaikutus), MHCM09B/rosco 226 (pitkäaaltoisen UV-A-säteilyn vaikutus) ja rosco 226/rosco 312 (sinisen valon vaikutus). Kontrastivertailuissa saatujen p -arvojen luotettavuus tarkistettiin niiden thep-arvojen avulla. Dualex-mittauksista ja fenolisista yhdisteistä testattiin kokonaisvaikutuksen lisäksi vasteiden ja lehtien iän interaktio eli se, vaikuttaako lehtien ikä (=fenologisella kehitysvaiheella) vasteiden suhteelliseen voimakkuuteen eri käsittelyissä. Ensin avautuneiden lehtien dualex-mittauksista ja taimien pituusmittauksista testattiin mittausajankohdan eli lehtien ja taimien ikääntymisen ja vasteiden interaktio. Tilastollisen merkitsevyyden rajana käytettiin kokonaisvaikutuksessa ja interaktioissa 0,05 ($p < 0,05$) ja kontrasteissa 0,10 ($p < 0,10$).

5. TULOKSET

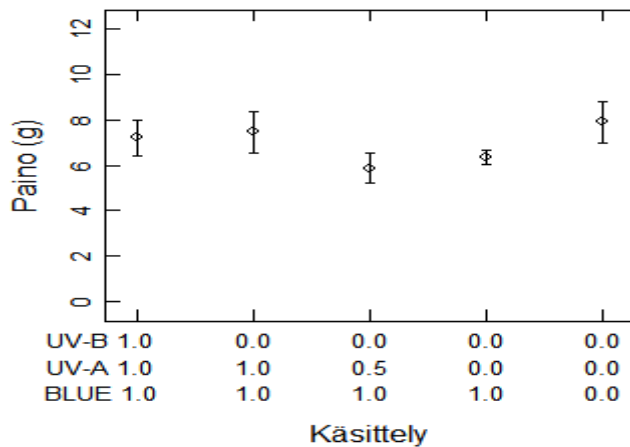
5.1. Taimien pituudet, kuivapainot ja lehdyköiden pinta-ala

Taimien pituuden keskiarvo oli 11 päivän ikäisillä taimilla 4,4 cm ja 30 päivän ikäisillä taimilla 26,9 cm. Käsittelyjen kokonaisvaikutus pituuteen oli tilastollisesti merkitsevä (Liite 1.), samoin kuin vasteiden ja mittausajankohdan interaktio (Liite 1.), minkä vuoksi eri mittausajankohtien aineistot testattiin erillään. Käsittelyt vaikuttivat pituuskasvuun tilastollisesti merkitsevästi molemmilla mittauskerroilla, mutta erot olivat niin pieniä, etteivät ne tulleet esiin kontrastivertailuissa. Rosco312-kalvon alla eli ilman sinistä valoa kasvaneet taimet olivat keskimäärin muita pidempiä etenkin jälkimmäisellä (30vrk) mittauskerralla (Kuva 4.). Ensimmäisellä mittauskerralla taimet olivat hyvin lyhyitä ja niiden väliset kokoerot erittäin pieniä. Kokojärjestys oli sama kuin jälkimmäisessä mittauksessa.



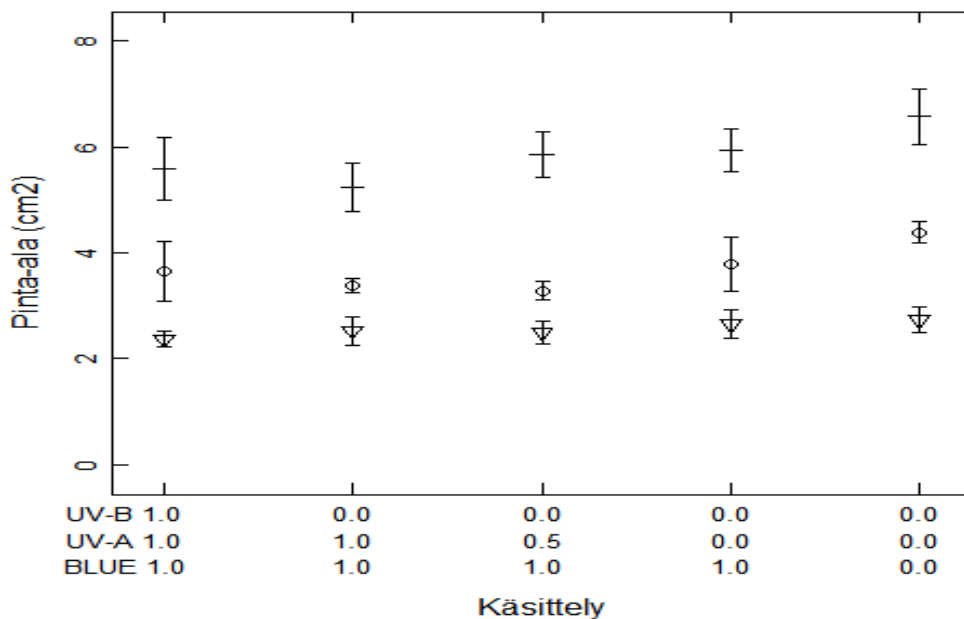
Kuva 5. Taimien pituudet kahdella mittauskerralla (11 vrk ja 30 vrk itämisestä). Käsittelyt vasemmalta kontrolli, polyesteri, MHCM09B, rosco226 ja rosco312. X-akselilla olevat luvut ilmaisevat kunkin aallonpituusalueen suhteellisen määrän kussakin käsittelyssä. n=12.

Morfologisiin analyyseihin kerättyjen taimien (6 taimea/käsittely) versojen keskimääräinen yhteenlaskettu kuivapaino oli 6,96 grammaa. Käsittelyjen kokonaisvaikutus tähän kuuden kasvin yhteiskuivapainoon ei ollut tilastollisesti merkitsevä (Liite 1.).



Kuva 6. Taimien kuivapainot. Käsittelyt ja niiden kuvaus X-akselilla kuten kuvassa 5.

Lehdyköiden (3 lehdykkää/taimi, 6 taimea/käsittely) pinta-alan keskiarvo oli 4,02 cm²/lehdykkä. Käsittelyjen vaikutus lehdyköiden pinta-aloihin ei ollut tilastollisesti merkitsevä, eikä käsittelyjen ja lehdyköiden iän välillä havaittu interaktiota (Kuva 6, Liite 1.). Eri-ikäisten lehdyköiden pinta-alojen erot olivat sitä vastoin tilastollisesti merkitsevät ($p < 0,0001$, Liite 1.). Tyvilehtien yksittäisen lehdykän pinta-alan keskiarvo oli 3,71 cm², kasvulehtien 5,87 cm² ja kärkilehtien 2,56 cm²/lehdykkä. Lehdyköissä näkyi taimien eri-ikäisten lehtien toisistaan poikkeava morfologia. Vesipitoisuus oli korkein ensimmäisinä avautuneissa alalehdissä eli vanhimmissa lehdissä (keskiarvo 82,8 %) ja alhaisin nuorimmissa kasvulehdissä (keskiarvo 65,05 %). Käsittelyjen ja lehtien iän interaktion puuttuessa lehdykkäryhmiä ei testattu erillään.



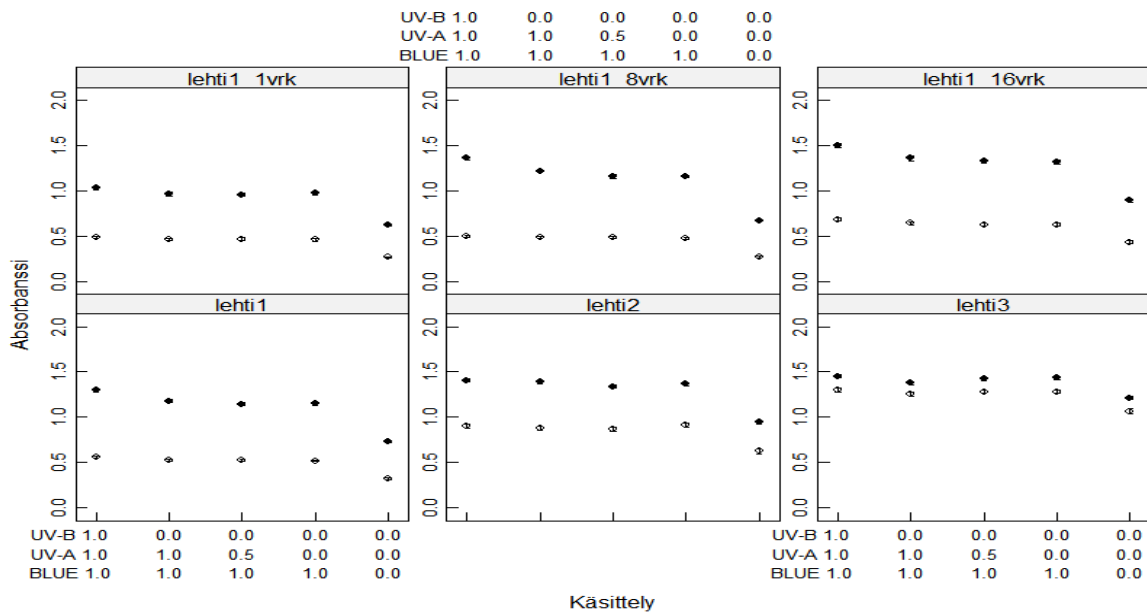
Kuva 7. Lehdyköiden pinta-alat. Lehdet alhaalta: nuorimmat kasvulehdet (kolmiot), alalehdet (ympyrät) ja ensimmäiset kasvulehdet (viivat). Käsittelyt ja niiden kuvaus X-akselilla kuten aiemmissä kuvissa.

5.2. Fenoliset yhdisteet lehtien epidermissä

Käsittelyt, lehtien ikä sekä käsittelyjen ja lehtien interaktio vaikuttivat tilastollisesti merkitsevästi lehtien yläepidermin absorbanssiin eli yläepidermin fenolisten yhdisteiden määrään ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p = 0,0193$, Liite 2.). Käsittelyjen kokonaisvaikutus absorbanssiin oli tilastollisesti merkitsevä kolmella lehtien ikäryhmällä ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$, Liite 3.). Kontrastivertailuissa sinisen valon poisto vaikutti absorbanssiin kaikissa ikäryhmissä ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$). UV-B-säteilyn vaikutus oli tilastollisesti merkitsevä vain nuorimmilla lehdillä ($p = 0,094$). Epidermien absorbanssit olivat alhaisimmat taimilla, joilta poistettiin sininen valo ja keskimäärin korkeimmat taimilla, jotka altistuivat UV-B-säteilylle. Ero korostui lehtien ikääntyessä (Kuva 7.). Käsittelyt ja lehtien ikä vaikuttivat tilastollisesti merkitsevästi lehtien alaepidermin absorbanssiin ($p = 0,021$, $p < 0,001$, Liite 4.) Kuvan 7. alaosassa ylä- ja alaepidermien absorbanssit esitetään lehtiryhmittäin.

Käsittelyt, lehtien ikä sekä iän ja käsittelyjen vuorovaikutus vaikuttivat tilastollisesti merkitsevästi alalehtien yläepidermin absorbanssiin. ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p = 0,012$,

Liite 5.). Käsittelyjen vaikutus absorbanssiin oli selvä kolmella mittauskerralla ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$, Liite 6.) Kontrastivertailussa näkyi sinisen valon poiston ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$, Liite 6.) ja UV-B-säteilyn ($p = 0,097$, $p = 0,0013$, $p = 0,0023$) vaikutus. Millään muuttujalla ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta alalehtien alaepidermin absorbanssiin (Liite 4.). Kuvan 7. yläosassa esitetään ensin avautuneiden lehtien ylä- ja alaepidermien absorbanssit kolmella mittauskerralla.

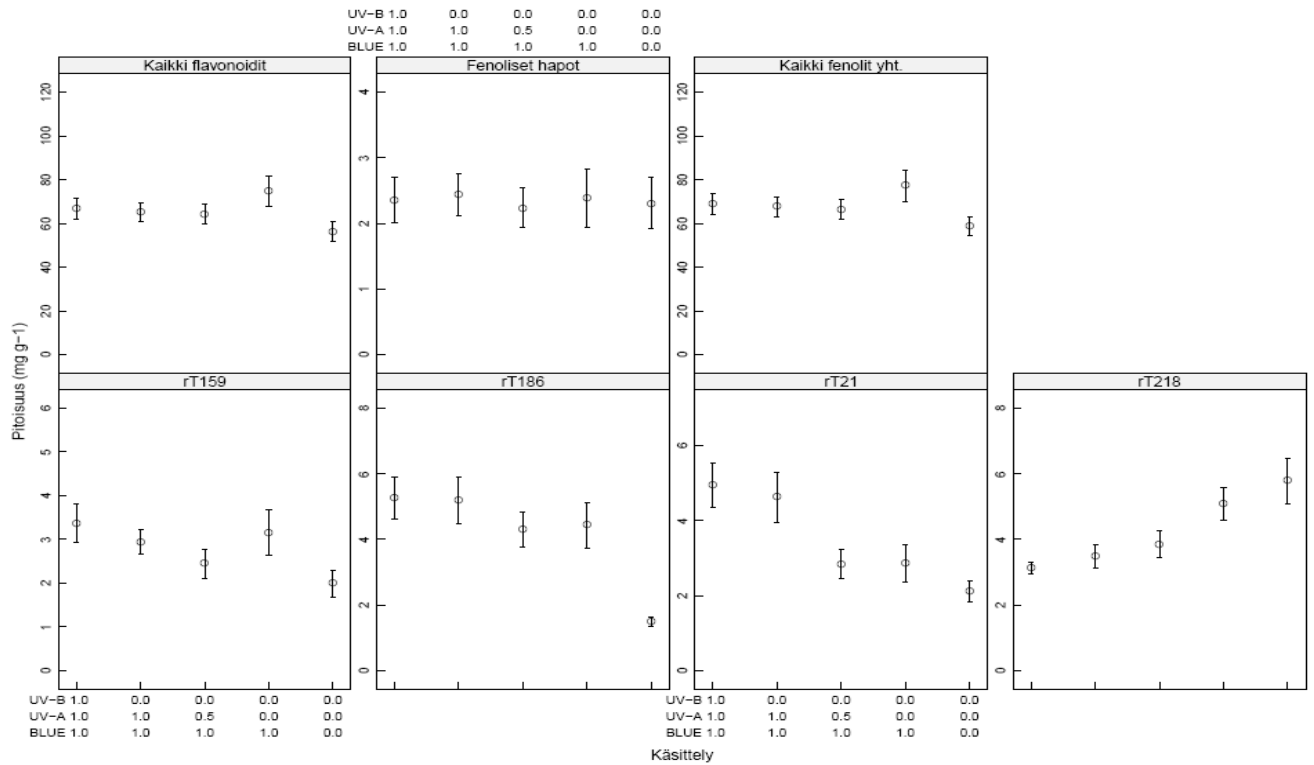


Kuva 8. Lehtien epidermien absorbanssit. Alla olevissa laatikoissa (lehti 1, lehti 2, lehti 3) eri ikäryhmien (nuorimmat lehdet=lehti 3.) ja ylhäällä olevissa laatikoissa saman lehtiryhmän kolmen mittauskerran absorbanssit. Kaikissa laatikoissa ylemmällä pisterivillä yläepidermien ja alemmalla pisterivillä alaepidermien absorbanssit. Käsittelyt ja niiden kuvaus X-akselilla kuten kuvissa 5.–7.

5.3. Lehdistä eristetyt fenoliset yhdisteet

Lehdistä eristettiin 26 fenolista yhdistettä, joista 21 oli flavonoideja ja 5 fenolisia happoja. 12 yhdistettä tunnistettiin ja 14 nimettiin ryhmätasolla tunnistamisen vaatimien vertailutietojen puuttuessa. Fenolisten yhdisteiden kokonaispitoisuuden keskiarvo oli 70,28 mg/g lehtien kuivapainosta. Käsittelyillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta yhdisteiden kokonaismäärään eikä erikseen tarkasteltuna flavonoideihin. Lehtien ikä ja käsittelyt vaikuttivat tilastollisesti merkitsevästi fenolisten happojen

määrään (Liite 7.). Kontrastivertailuissa käsittelyjen väliset erot olivat kuitenkin pienet. Iän vaikutus käsittelyjen välisiin eroihin ei ollut tilastollisesti merkitsevä, joten eri ikäryhmien lehtiä ei testattu toisistaan riippumattomasti. Kaikkien yhdisteiden eri käsittelyjen pitoisuudet ja tilastolliset tulokset esitetään taulukossa (Liite 13).



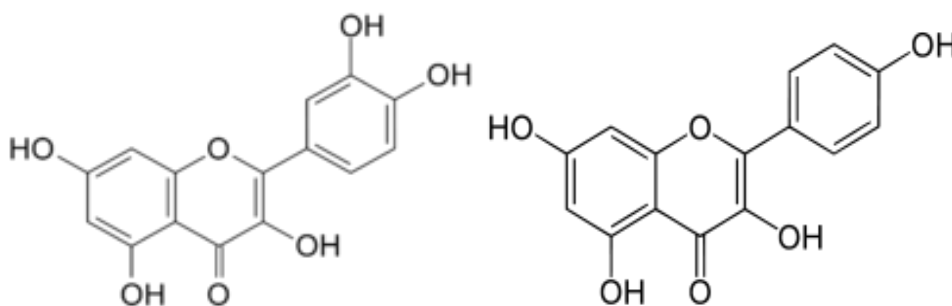
Kuva 9. Flavonoidien, fenolisten happojen, kaikkien fenolien ja neljän yksittäisen yhdisteen pitoisuudet eri käsittelyissä. Flavonoidit nimetty taulukossa retentioaikojen mukaan, nimet seuraavasti: **rt159**: quercetin-3,7-di-*O*-glucoside, **rt186**: quercetin-3-*O*-(caffeyyl)-sophoroside-7-*O*-glucoside (isomer), **rt21**: quercetin-3-*O*-(*p*-coumaryl)-sophoroside, **rt218**: kaempferol-3-*O*-(*p*-coumaryl)sophoroside-7-*O*-glucose. Käsittelyt ja niiden kuvaus X-akselilla kuten kuvissa 5.–8..

Valtaosaa eristetyistä fenolisista yhdisteistä oli koekasvien lehdistä hyvin pieninä pitoisuuksina (alle 2 mg/g). Joukossa oli kahdeksan flavonoidia, joiden pitoisuus ylitti yhdessä tai useammassa käsittelyssä kahden milligramman rajan. Kyseiset flavonoidit olivat flavonoleihin kuuluvien kversetiinin (quercetin) ja kamferolin (kaempferol) (Kuva 9.) johdannaisia, joiden väliset erot perustuvat hydroksyyliyhdyntien (–OH) määrään ja sijaintiin. Niistä neljällä käsittelyjen kokonaisvaikutus oli merkitsevä (Liite 8) kaikissa lehtien ikäryhmissä lukuun ottamatta nuorimpien lehtien kaempferol-3-*O*-(*p*-coumaryl)sophoroside-7-*O*-glucose-flavonoidin (rt218) pitoisuuksia (Liite 8.). Lehtien

iän vaikutus yhdisteiden määrään ja käsittelyjen välisiin eroihin oli tilastollisesti merkitsevä kaikilla neljällä yhdisteellä (Liite 8.).

Kontrastivertailuissa UV-A-säteilyn puolittamisen vaikutus oli tilastollisesti merkitsevä flavonoideilla Quercetin-3-*O*-(caffeoyle)-sophoroside-7-*O*-glucoside (isomer) (Liite 10., lehti 1), Quercetin-3-*O*-(*p*-coumaryl)-sophoroside (Liite 11, lehti 1) ja Kaempferol-3-*O*-(*p*-coumaryl) sophoroside-7-*O*-glucose (Liite 12., lehti 2). Sinisen valon poisto vaikutti yhdisteiden määrään osassa lehdistä (Liite 10. lehdet 1,2,3; Liite 11, lehti 2; Liite 12, Lehti 1.). Yhdisteiden pitoisuus oli pääsääntöisesti alempi sinisen valon poiston ja korkeampi UV-A-säteilyn osittaisen poiston myötä (Kuva 8.).

Käsittelyjen kokonaisvaikutus korkeimpina pitoisuuksina (ka 38,198 mg/g) esiintyneeseen flavonoidiin (quercetin-3-*O*-(*p*-coumaryl)-sophoroside-7-*O*-glucoside) ylitti niukasti tilastollisen merkitsevyyden rajan ($p=0,053$, $F=2,813$, Liite13). Yhdisteen pitoisuus oli pienin kun taimien saamasta säteilystä poistettiin sininen valo ja suurin kun siitä poistettiin UV-A ja UV-B. Vaihteluväli oli kuitenkin suuri kaikissa käsittelyissä, mikä vaikeuttaa tulkintaa yhdisteen biologisesta merkityksestä. Useimpien fenolisten yhdisteiden pitoisuus vaihteli selvästi lehden iästä riippuen, mihin palataan tulosten tarkastelussa.



Kuva 10. Kversetiinin (vasemmalla) ja kamferolin kemiallinen rakenne.

6. TULOSTEN TARKASTELO

6.1. Morfologisten mittausten tulokset

Käyttämäni herneen lajike Meteor on todettu suhteellisen herkäksi UV-B-säteilylle (Nogués ym. 1998). Useimmat lajikkeella tehdyt kokeet on tosin tehty lamppujen avulla ja erittäin suurilla säteilyannoksilla, jolloin vasteita todennäköisesti ilmenee. Tässä kokeessa UV-B säteilyllä ei ollut vaikutusta herneen taimien pituuskasvuun. Tähän saattoi vaikuttaa se, että kontrollitaimet itivät ja kehittyivät UV-B-altistuksessa, toisin kuin aiemmissa kokeissa. Taimet myös saivat UV-B-säteilyn määrään nähden paljon UV-A-säteilyä ja PAR:ia. Tämän tutkimuksen kannalta onkin mielenkiintoista, että UV-A-säteilyn ja PAR:n on todettu pienentävän UV-B-säteilyn aiheuttamia vasteita. (Dai ym. 1995, Caldwell ym. 1994).

Tässä tutkimuksessa ilman sinistä valoa kasvaneet taimet olivat muita pidempiä. Sinistä valoa absorboivat kryptokromit osallistuvat kasvien varren pituuskasvun hidastumiseen (Briggs & Huala 1999). Männyn (*Pinus sylvestris*) taimet, joiden saamasta säteilystä poistettiin sininen valo, kasvoivat pidemmiksi kuin taimet, joilta sinistä valoa ei poistettu (Sarala 2010). Muutokset kasvussa saattavat selittyä sinisen ja vihreän valon suhteellisen määrän muuttumisella. Suuri sinisen valon määrä suhteessa vihreään valoon alentaa lituruohon pituuskasvua (Sellaro ym. 2010). Kryptokromit ilmeisesti välittävät tietoa sinisen valon määrän lisäksi sinisen ja vihreän valon määrien suhteesta. Ilman sinistä valoa kasvaneet taimet tuottivat myös melko vähän fenolisia yhdisteitä (Sellaro ym. 2010) kuten tässäkin tutkimuksessa. Kryptokromi, joka toimii UV-A-säteilyn reseptoripigmenttinä, vaikuttaa flavonoidien synteisiin. Sinisen valon ja UV-A-säteilyn aallonpituuksien puuttuessa synteesi voi häiriytyä, missä tapauksessa yhteyttämisen tuloksena syntyneet hiiliyhdisteet on periaatteessa mahdollista allokoita kasvuun.

Erot kuivapainoissa ja lehdyköiden pinta-aloissa käsittelyjen välillä olivat hyvin pieniä, eikä UV-B-säteilyn vaikutusta näkynyt. Lehdyköiden pinta-alassa käsittelyjen välinen ero näkyi selvimmin vanhimmissa lehdissä ja hävisi lähes kokonaan nuorimmissa lehdissä. Kokoero taimien eri kehitysvaiheiden lehdyköiden välillä oli huomattavasti suurempi kuin eri käsittelyjen lehdyköiden välillä. Tämä viittaa siihen, että hernekasvin

sisäiset kehitykseen liittyvät säätelymekanismit vaikuttivat lehdyköiden kokoon enemmän kuin kokeen käsittelyt. Nuorimpien kasvulehtien lehdykät olivat selvästi pienimpiä ja niiden vesipitoisuus oli alhaisin. Kokeen puolivälissä kehittyneiden kasvulehtien pinta-ala oli suurin ja alalehtien vesipitoisuus korkein.

Herneen morfologiaan liittyvä tutkimus on keskittynyt UV-B-säteilyn vaikutuksiin ja saadut tulokset ovat vaihtelevia. UV-B-säteilylle herkällä herneen taimilla pituus, kuivapaino ja lehtien yhteenlaskettu pinta-ala laskivat pääsääntöisesti UV-B-säteilyn kohotessa ($2-8 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) (González ym. 1998a). Samansuuntaisia tuloksia saatiin kun herneen (*Pisum sativum* L.) taimet altistettiin maltilliselle ($2.2 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) ja korkealle ($9.9 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) määrälle UV-B-säteilyä. Samanaikaisesti niille annettiin lampuilla PAR:ia ja UV-A-säteilyä (González ym. 1998b). Korkea määrä UV-B-säteilyä laski kokeessa kasvien pituutta, kuivapainoa ja lehtien pinta-alaa. Pienemmällä ($2.2 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) annoksella säteilyä ei ollut niihin vaikutusta. Artikkelin kirjoittajat esittävät, että etenkin fotosynteettiset vasteet UV-B-altistukselle voivat olla seurausta äkillisestä säteilyn muutoksesta kun kasvi on kehittynyt ilman UV-B-säteilyä ja siirretään vain tietyn jakson ajaksi voimakkaaseen säteilyyn.

Näissä tutkimuksissa UV-B-säteilyn määrää oli otsonikadon simuloimiseksi lisätty lamppujen avulla. Otsonikadon myötä suhteellisesti lisääntyvän biologisesti vaikuttavan säteilyn määrää oli arvioitu Caldwellin GPR-painotuskertoimen perusteella. GPR ei huomioi aallonpituudeltaan 312 nanometriä pidempää säteilyä biologisesti vaikuttavana, eikä se ole sopiva kasvuvasteiden arviointiin. Liian suppean biologisen painotuskertoimen käyttö on ilmeisesti vääristänyt esimerkiksi Gonzálezin ym. (1998b) arviota otsonikadon myötä voimistuvan UV-B-säteilyn sekä PAR:in ja UV-A:n suhteellisesta määrästä. Tämä on hyvä esimerkki siitä, kuinka tärkeä sopivan painotuskertoimen valinta on

6.2. Dualex-mittausten ja fenolisten yhdisteiden pitoisuuksien tulokset

Lehtien absorbanssi eli niissä olevien fenolisten yhdisteiden määrä oli Dualex-laitteella mitattaessa alhaisin ilman sinistä valoa kehittyneillä taimilla. Muista mittauksista poiketen alalehtien ja nuorimpien kasvulehtien yläepidermin absorbanssi oli korkein UV-B-säteilylle altistuneissa kontrollitaimissa. Ensin avautuneissa lehdissä absorbanssi

nousi tasaisesti lehtien iän myötä ja oli korkein viimeisellä mittauskerralla. Nousu näkyi kaikilla käsittelyillä. UV-B-säteilyä saaneiden kontrollitaimien nuorimpien lehtien absorbanssi oli vanhempien lehtien absorbanssia korkeampi. Se oli myös kaikilla käsittelyillä hieman korkeampi kuin ensin avautuneiden eli vanhimpien lehtien viimeisen mittauskerran absorbanssi. Tämä viittaa siihen, että taimet allokoivat nuorimpiin lehtiin hyvin voimakkaasti UV-B-säteilyltä suojaavia pigmenttejä.

Alaepidermin absorbanssi suhteessa yläepidermin absorbanssiin nousi nuoremmilla lehdillä, mutta ei kuitenkaan yläepidermin absorbanssia korkeammaksi. Absorbanssin nousu saattoi johtua siitä, että nuorimpien lehtien alaepidermi altistui UV-B-säteilylle alalehtien alaepidermiä enemmän niiden sijainnin ja pystymmän asennon vuoksi. Vastaavan absorbanssin nousun herneellä (*Pisum sativum* mutantti *Argenteum*) huomasivat myös Day ym. (1996). Tilastollisesti merkitsevää UV-B-säteilyn vaikutusta ei kuitenkaan nähty edes korkeimmalla kokeessa käytetyllä UV-B-annoksella eli 24 % otsonikatoa simuloivalla käsittelyllä ($5,4 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). Herneellä UV-B-vasteita on aiemmin ilmennyt lähinnä sisäkokeissa, joissa on käytetty suhteellisen korkeita säteilyannoksia ja vähäistä määrää näkyvää valoa (He ym. 1993; Day & Vogelmann 1995; Gonzáles ym. 1998a).

Kokeessa herneen nuorimpien täysin avautuneiden lehtien absorptio nousi UV-B-annosta lisätessä vähemmän kuin vanhempien lehtien absorptio. Nuoret lehdet ovat herkkiä UV-B-säteilyn aiheuttamille vaurioille, minkä on arvioitu johtuvan lehtien alhaisemmasta absorbointikyvystä eli vähäisemmästä UV-suojauksesta (DeLucia ym. 1992). Tässä tutkimuksessa nuorimpien lehtien absorptio oli kuitenkin vanhoja lehtiä korkeampi. Erilainen tulos voi johtua osittain koeasetelmien eroista. Esimerkiksi absorbanssin nousun tutkiminen UV-B-säteilyä lisäämällä (Gonzáles ym. 1998a) voi johtaa erilaisiin tuloksiin kuin tässä tutkimuksessa käytetty melko tasainen säteily määrä. Toisaalta tässäkin tutkimuksessa olisi ehkä ollut hyödyllistä seurata myös nuorimpien lehtien absorbanssin kehitystä. Tällä koeasetelmalla nuorimmat lehdet mitattiin vain kerran, mikä saattoi antaa puutteellisen kuvan niiden absorbointikyvystä. On huomattava että tutkimuksessa, jossa verrattiin UV-B-säteilylle herkän ja tolerantin herneen jalostuslinjan vasteita (Gonzáles ym. 1998a), kaikkien mitattujen morfologisten

parametrien osalta hyvin herkkä linja tuotti kestävästä linjasta vähemmän UV-B:tä absorboivia yhdisteitä.

Dualexilla mitatuista lehdistä eristettiin 26 fenolista yhdistettä, joiden pitoisuus määritettiin kuivapaino-osuutena. Herneistä on eristetty vastaavatyypisiä fenolisia yhdisteitä ja erityisesti flavonoleja aiemmissa, melko varhaisissa tutkimuksissa (Furuya & Galston 1965; Ferreres ym. 1994). Tutkimukset ovat keskittyneet flavonoidien sekä niiden synteesireittien entsyymien sijainnin ja rakenteen selvittämiseen. Ferreresin ym. (1994) kokeessa eristetyistä seitsemästä flavonoidista useiden rakenne on lähellä tämän tutkimuksen flavonoidien rakennetta. Niistä kuitenkin vain quercetin-3-*O*-glucoside löytyi myös tässä tutkimuksessa.

Fenolisten yhdisteiden pitoisuus oli pääsääntöisesti alhaisin sinisen valon poiston seurauksena (Liite 13.). UV-A:n poiston johdosta pitoisuus oli joillakin yhdisteillä hyvin alhainen ja joillakin jopa korkein (Liite 13.). Kaikkien fenolisten yhdisteiden ja flavonoidien kokonaismäärien pitoisuus oli yllättäen korkein kun kasvien saamasta säteilystä poistettiin UV-B ja UV-A. Tulos selittyy sillä, että korkeimpina pitoisuuksina esiintyneen flavonoidin quercetin-3-*O*-(*p*-coumaryl)-sophoroside-7-*O*-glucoside pitoisuudet olivat korkeimmat tällä käsittelyllä. Käsittelyjen vaikutus oli selvin ensin kehittyneissä eli vanhimmissa lehdistä, jotka avautuivat 20 vrk ennen näytteiden keräämistä. Osassa taimista vaikutus näkyi myös toisen mittauskerran lehdistä, jotka avautuivat 13 vrk ennen näytteiden keräämistä (Liite 13.). Muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta yhdisteiden pitoisuus oli korkein vanhimmissa lehdistä (Liite 13.). (quercetin-3-*O*-(*p*-coumaryl)-sophoroside-7-*O*-glucoside) pitoisuus oli kuitenkin korkein nuorimmissa lehdistä (Liite 13.), mikä aiheutti sen, että nuorimpien lehtien kokonaisfenolimäärä oli korkein. Yksittäisten fenolisten yhdisteiden pitoisuudet olivat muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta hyvin pieniä. Niiden pitoisuuden vaihtelun biologinen merkitys on näin ollen hyvin kyseenalainen (Liite 13.).

Lehtien iän ja pitoisuuden muutokset olivat samansuuntaiset Day ym. tutkimuksen (1996) kanssa. Siinä herneen lehtien fenolisten yhdisteiden määrä kuivapaino-osuutena mitattuna on sitä alhaisempi, mitä vanhemmasta lehdestä on kysymys. Lehtien epidermin absorptio siis nousee lehtien ikääntymisen myötä lehden fenolisten

yhdisteiden pitoisuuden sitä vastoin laskiessa. Tämä voi johtua siitä, että fenoleita syntetisoidaan vanhemmissa lehdissä nimenomaan epidermissä, missä niitä tarvitaan UV-B-suojaukseen. Lehdissä ei havaittu UV-B-säteilyn indusoimaa fenolisten yhdisteiden pitoisuuden nousua lukuun ottamatta hyvin pieninä pitoisuuksina esiintynyttä fenolista happoa (Liite 13.).

UV-B-altistus vaikuttaa fenolisten yhdisteiden sijaintiin muun muassa herneen ja rapsin (*Brassica napus* L. cv. Ceres) lehdissä (Cen & Bornman 1993; Day ym. 1996). Yhdisteiden pitoisuus on korkeampi etenkin lehden adaksiaalisessa epidermissä, joka vastaanottaa valtaosan lehteen tulevasta UV-B-säteilystä (Day ym. 1996). Lehtien yläepidermin fenolipitoisuus onkin yleensä alaepidermin pitoisuutta korkeampi. Tässä tutkimuksessa herneen nuorimpien lehtien ylä- ja alaepidermien pitoisuusero oli tosin hyvin pieni. Fenolien kokonaispitoisuudessa ei havaittu muutoksia. Osalla kasveista lehden kuivapaino suhteessa pinta-alaan nousee ilmeisesti lehden paksuuntumisen vuoksi lehden ikääntyessä. Artikkeleissa ilmiö mainitaan nimellä Specific leaf mass (SLM) Fenolisten yhdisteiden pitoisuuden laskun lehden ikääntyessä huolimatta absorption samanaikaisesta noususta on ajateltu voivan liittyä tähän kuivapainon nousuun (Day ym. 1996).

Flavonoidien antioksidanttiaktiivisuuteen vaikuttavat oleellisesti niiden perusrakenteeseen sitoutuvat hydroksyyliiryhmät (-OH) (Dugas ym. 2000; Heijnen ym. 2001). Kamferolin johdannaisten aktiivisuutta nostavat hydroksyyliiryhmien sijainnit 3,5,7,4' (Heijnen ym. 2001) ja kversetiinin johdannaisten sijainti 3' (Dugas ym. 2000). Neljän tämän tutkimuksen flavonoidin (quercetin-3,7-di-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-(caffeoyl)-sophoroside-7-*O*-glucoside (isomer), quercetin-3-*O*-(*p*-coumaryl)-sophoro-side ja kaempferol-3-*O*-(*p*-coumaryl)sop-horoside-7-*O*-glucose) ja niistä erityisesti kversitiinin johdannaisten antioksidanttiaktiivisuus on hyvin korkea. Niitä ei kuitenkaan tässä tutkimuksessa syntetisoitu vasteena UV-B-säteilyyn. Sinisen valon poistaminen pienensi näiden flavonoidien pitoisuuksia lukuunottamatta kaempferol-3-*O*-(*p*-coumaryl)-sophoroside-7-*O*-glucose – flavonoidia, jonka pitoisuutta sinisen valon poisto laski. Pitoisuus nousi lehtien iän myötä lukuun ottamatta quercetin-3,7-di-*O*-glucoside – flavonoidia, jonka pitoisuus oli korkein nuorimmissa lehdissä (Liite 13.).

Kolmen tämän tutkimuksen kanssa saman flavonoidin (kaempferol-3-*O*-(*p*-coumaryl)sophoroside-7-*O*-glucose, quercetin-3-*O*-(*p*-coumaryl)-sophoroside ja quercetin-3-*O*-(caffeoyle)-sophoroside-7-*O*-glucoside) määrän on todettu nousevan UV-B-altistuksessa mm. lantun lehtien epidermissä (Wilson 1996; Olsson ym. 1999). Määrään vaikuttaa Wilsonin ym. (2001) mukaan UV-B-säteilyn ohella kasvien saama UV-A-säteilyn määrä. Heidän lantulla tekemässään kokeessa samojen flavonoidien pitoisuudet olivat pienempiä kun tutkittavat kasvit altistettiin UV-A-säteilylle ennen UV-B-käsittelyä verrattuna pitoisuuksiin kasveilla, jotka olivat ennen UV-B-altistusta vastaavan ajan hyvin alhaisessa määrässä UV-A:ta.

Koska UV-A-säteily vähentää UV-B-säteilyn kasveille aiheuttamia haittavaikutuksia, tekijät olettivat, että UV-A-säteilylle altistaminen ennen UV-B-altistusta nostaa kasvien lehdissä olevien flavonoidien määrää. Selityksenä yllättävälle tulokselle kirjoittajat esittivät flavonoidien synteesin ylittävää foto-oksidaatiota ja hajotusta UV-A-säteilylle altistettaessa. Tällöin flavonoidien määrä olisi korkeampi käsittelyssä, jossa UV-B-käsittelyä ei edellä voimakas UV-A-säteily. Flavonoidien määrä ei kuitenkaan laskenut kun UV-A-säteilyaltistus seurasi UV-B-altistusta. Flavonoidit ovat myös fotokemiallisesti melko vakaita, mikä tekee niistä tehokkaita suojapigmenttejä haitallisia aallonpituuksia vastaan. Tässä tutkimuksessa taimet altistuivat UV-A-säteilylle samanaikaisesti UV-B:n kanssa. On kuitenkin mahdollista, että siinä näkyy UV-A:n flavonoidien pitoisuutta alentava vaikutus.

Kolmen viime vuosikymmenen aikana tehtyjä UV-tutkimuksia käsittelevissä meta-analyseissä on mainittu kasvien UV-B-säteilyn vasteina versojen kuivapainon ja pituuden alenemista sekä UV-B-säteilyä absorboivien pigmenttien pitoisuuden nousua. (Newsham & Robinson 2009; Li ym. 2010) Jälkimmäisessä analyysissä lisätty UV-B-säteily laski tutkittavien kasvien lehtipinta-alaa, juuri/verso-suhdetta, versojen ja lehtien biomassaa sekä lehtien klorofyllin määrää. Tarkastelluilla vasteilla ja säteilyannoksilla ruohovartiset kasvit olivat puuvartisia herkempiä. Menetelmät ja tutkimuksen kesto vaihtelivat suuresti, mutta pääosin niissä käytetyt kasvit altistettiin vaihtelevasti (18–40 % luontaisesta säteilystä) kohotetulle UV-B-säteilylle. Vasteiden voimakkuus korreloi odotetusti käytetyn säteilyn määrän kanssa. Tosin UV-altistuksen kesto ei yllättäen vaikuttanut vasteisiin tilastollisesti merkitsevästi. Kasvit eivät

kehittyneet tutkimuskäsittelyjen säteilyolosuhteissa, vaan kasvoivat niissä ainoastaan tietyn altistusajan. Tämä saattaa suurempien säteilyannosten lisäksi vaikuttaa siihen, että kasvien vasteet, mukaan lukien muutokset klorofyllipitoisuuksissa, ovat olleet niissä voimakkaampia kuin tässä tutkimuksessa. Klorofyllipitoisuuksissa ei tiettävästi ole havaittu merkittäviä muutoksia luontaiselle tai lievästi kohotetulle UV-B-säteilylle altistetuissa kasveissa kun kasvit saavat samanaikaisesti UV-A- ja PAR-säteilyä (Krizek 2004).

PAR- ja UV-A-säteilyllä on katsausartikkelissa todettu olevan tärkeä rooli kasvien UV-B-vasteiden alentamisessa (Krizek 2004). Vaikutus on havaittu kasvussa ja biomassassa. Suuren suhteellisen määrän PAR-säteilyä on UV-B-altistuksessa havaittu aiheuttavan UV-B-säteilyä absorboivien fenolisten yhdisteiden konsentraation nousua lehtien epidermissä. PAR-säteilystä erityisesti sinisen valon ja UV-A-säteilyn on arvioitu toimivan UV-B-puolustuksessa, etenkin DNA-vaurioiden korjaamisessa (Krizek 2004). Sinisen valon poiston vaikutus suojaavien pigmenttien konsentraation laskuun näkyi tässä tutkimuksessa.

6.3. Yhteenveto

Sinisen valon poisto vaikutti tässä tutkimuksessa muita käsittelyitä enemmän kaikkiin vasteisiin. Ilman sinistä valoa kehittyneet taimet olivat pidempiä ja niiden lehtien pinta-ala oli suurempi kuin muiden käsittelyjen taimilla. Lehtien pinta-alan kasvu oli selvimmin nähtävissä ensin avautuneissa eli vanhimmissa lehdissä. Nuorimmissa lehdissä ero muihin käsittelyihin nähden oli hyvin pieni.

Taimien pituuteen, kuivapainoon ja lehtien pinta-alaan vaikutti myös taimien saaman UV-A-säteilyn aallonpituusalue. Heikointa kasvu oli taimilla, joilta poistettiin UV-B-säteily ja lyhytaaltainen UV-A-säteily, mutta ei pitkäaaltoista UV-A-säteilyä ja sinistä valoa (MHCM09B-kalvo). Kasvu parani, jos taimilta poistettiin UV-B-säteilyn ja lyhytaaltaisen UV-A-säteilyn lisäksi pitkäaaltoinen UV-A-säteily (Rosco 226-kalvo). Tässä kokeessa siis pitkäaaltoisen UV-A-säteilyn, mutta erityisesti sinisen valon poisto taimien saamasta valosta paransi niiden kasvua.

Sinisen valon poiston seurauksena lehtien epidermin UV-B-säteilyä absorboivien yhdisteiden määrä ja useimmissa tapauksissa fenolisten yhdisteiden pitoisuus lehtien kuivapainosta olivat alhaisemmat kuin muissa käsittelyissä. Lehtien fenolisten yhdisteiden ja flavonoidien pitoisuudet olivat korkeimmat UV-B-säteilyn ja UV-A-säteilyn poiston seurauksena. Ilmiö johtui yksittäisen suurina pitoisuuksina esiintyneen flavonoidin (Quercetin-3-*O*-(*p*-coumaryl)-sophoroside-7-*O*-glucoside) pitoisuuden kohoamisesta tässä käsittelyssä. Eristettyjen yksittäisten yhdisteiden pitoisuudet vaihtelivat hyvin yksilöllisesti. Pitoisuuksien vaihtelusta huolimatta yhdisteiden kokonaismäärä pysyi hyvin tasaisena käsittelystä riippumatta. Jos joidenkin yhdisteiden pitoisuudet siis nousivat jonkin käsittelyn seurauksena, toisten yhdisteiden pitoisuudet vastaavasti laskivat. Vaikuttaakin siltä, että taimet säätelivät yksittäisten yhdisteiden määrää hyvin tarkasti erilaisissa valaistusolosuhteissa. Kun esim. yksittäisten flavonoidien toiminnalliset ominaisuudet voivat muuttua merkittävästi riippuen niiden hydroksyyliyhdisteiden sijainnista, syntyy tuloksesta vaikutelma taimien hyvin hienovaraisesta fenolisten yhdisteiden pitoisuuksien säätelystä ympäristötekijöiden muuttumisen myötä.

Selkeästi havaittavat muutokset vasteena UV-B-säteilylle jäivät tässä kokeessa hyvin vähäisiksi. Kyseiselle säteilylle altistuneiden kontrollitaimien lehtipinta-ala oli muiden käsittelyjen taimiin verrattuna hieman alhaisempi. Ilmiö on havaittu aiemmissa tutkimuksissa ja sen arvioidaan johtuvan solujen vähäisemmästä jakautumisesta UV-B-säteilylle altistuneissa lehdissä. UV-B-säteilyn vaikutukset kasvuun kuitenkin puuttuivat kokonaan tai olivat hyvin lieviä. Tähän saattoi vaikuttaa se, että kontrollitaimet kehittyivät UV-B-altistuksessa, toisin kuin monissa koeasetelmissa. Taimet saivat myös suhteellisesti paljon UV-A-säteilyä ja PAR:ia, joiden tiedetään lieventävän kasvien UV-B-vasteita.

UV-B-säteily nosti ensimmäisinä avautuneiden lehtien adaksiaalisen epidermin fenolisten yhdisteiden määrää. Kyseisten lehtien epidermissä yhdisteiden määrä oli käsittelystä riippumatta sitä suurempi, mitä vanhempia ne olivat. Toisaalta UV-B-säteily nosti vastaavan epidermin absorbanssia myös kokeen loppuvaiheessa kehittyneissä lehdissä. Niissä yhdisteiden määrä oli korkeampi kuin ensin kehittyneissä lehdissä heti avautumisen jälkeen mitattuna. Tehokkaampi yhdisteiden muodostuminen kokeen lopussa selittyy kasvin suuremmalla koolla ja yhteyttämisteholla. Yhdisteitä kuljetettiin

tulosten perustella tehokkaasti uusiin, vasta avautuneisiin lehtiin, mutta allokoitiin kuitenkin runsaasti myös ensin kehittyneisiin lehtiin, joissa niiden pitoisuus nousi koko kokeen ajan. Vastoin epidermin absorption kasvua, fenolisten yhdisteiden osuus kuivapainosta oli muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta alhaisin nuorimmissa lehdissä ja vastaavasti korkein ensin avautuneissa lehdissä. Tulosten perusteella fenolisia yhdisteitä syntetisoidaan nuorissa lehdissä pääasiassa epidermissä, jossa ne absorboivat tehokkaasti UV-B-säteilyä. Vanhemmissa lehdissä yhdisteitä taas on tasaisemmin lehden eri osissa päätellen siitä, että niiden epidermin absorptiokyky oli alhaisin, mutta fenolien osuus kuivapainosta pääsääntöisesti korkein.

Kokeessa testaamani hypoteesit osoittautuivat tosiksi lukuun ottamatta oletusta, jonka mukaan fenolisten yhdisteiden kertyminen ja epidermissä tapahtuva UV-suojaus havaitaan vasteena eri aallonpituuksille kuin muutokset kasvussa ja morfologiassa. Sinisen valon poisto vaikutti valtaosaan vasteista ja yhdisteistä, UV-B-säteily ei juuri mihinkään. Tiettyjen aallonpituusalueiden nimeämistä joko morfologiaan ja fenolisiin yhdisteisiin vaikuttaviksi ei siis tässä tutkimuksessa voitu tehdä. Kysymyksessä oli kuitenkin suhteellisen lyhyt ajanjakso ja voidaan kysyä, mitä vasteita kasvussa ja fenolisten yhdisteiden määrissä näkyisi monivuotisilla kasveilla ja pidemmällä koejaksoilla. Tällä hetkellä käytössä olevilla kalvoilla ei myöskään pysytty testaamaan sinisen valon poiston vaikutusta olosuhteissa, joissa taimet altistuvat samanaikaisesti UV-B-säteilylle. Kyseinen koeasetelma antaisi mahdollisuuden tarkastella paremmin UV-A-säteilyn roolia taimien UV-B-vasteissa ja seurata sinisen valon poiston seurauksena tapahtuvan vähäisemmän fenolituotannon vaikutuksia taimien UV-B-säteilyn sietoon.

Tutkimukseni tavoitteena oli tuottaa tietoa, jota voidaan käyttää jo tehdyn otsonikatotutkimuksen luotettavuuden arvioinnissa ja koeasetelmien suunnittelussa. Sen tulosten perusteella voidaan todeta, että luotettavien tulosten varmistamiseksi otsonikatotutkimuksessa on syytä kiinnittää huomiota siihen, että tutkimuskasvit saavat auringonvalon spektriä vastaavan suhteellisen määrän UV-A-säteilyä ja sinistä valoa. Myös tutkittavien taimien ja yksittäisten lehtien ikä on hyvä huomioida tutkimuksen suunnittelussa. UV-B-säteilyn vaikutukset näkyivät osassa vasteita vasta viikkojen altistuksen jälkeen, minkä perusteella voidaan olettaa, että lyhyet kokeet varsinkaan ulkona ja luonnollisilla säteilyannoksilla eivät välttämättä ole luotettavia. Sinisen valon

puuttumisen voimakas vaikutus kaikkiin mitattuihin vasteisiin on itsessään mielenkiintoinen ilmiö, jota täytyy tutkia tarkemmin ja jolla on potentiaalisia soveltamisalueita kasvintuotannon alueella.

Tulevissa kokeissa toivon pääseväni testaamaan sinisen valon puuttumisen vaikutuksia kasveihin, jotka kasvavat altistettuina UV-B-säteilylle. Valitettavasti kyseiseen käsittelyyn sopivaa kalvoa ei ole vielä löytynyt. Yksi mahdollisuus on luoda kokeeseen sopivat valo-olosuhteet käyttämällä kalvojen ja UV-B-lamppujen yhdistelmää. Kyseinen tapa tuo kuitenkin runsaasti haasteita koejärjestelyn rakentamiseen ja vaatii sopivien säteilyannosten huolellista suunnittelua. Kokeiden suunnittelussa olisi hyödyllistä selvittää, kuinka suuria ovat erot koetaimien vasteissa eri aallonpituuksille riippuen siitä, ovatko ne kehittyneet käsittelyjen valo-olosuhteissa vai onko ne siirretty sinne vasta kokeen alussa. Käyttäisin tulevissa kokeissa yksivuotisten kasvien lisäksi monivuotisia, puuvartisia kasveja ja pyrkisin mahdollisimman pitkiin koejaksoihin, kuitenkin niin, että koejakso rajoittuu yhteen kasvukauteen. Ulkokokeiden osalta kokeen alkamisajan on oltava tarpeeksi myöhäinen, jotta taimille haitallisia yöpakkasia ei enää esiinny. Tämä rajoittaa valitettavasti koeajan UV-B-säteilyn osalta sopivan varhaisen kevään ulkopuolelle. Sisäkokeetkin ovat toki mahdollisia, jos ne ovat jonkin tutkimusasetelman kohdalla ulkokoetta tarkoituksenmukaisempia. Sinisen valon lisäksi vihreän valon aallonpituudet olisi hyvä ottaa tulevissa koejärjestelyissä paremmin huomioon. Tarkasteltavia vasteita laajentaisin erityisesti puuvartisten kasvien osalta myös juuri/verso kuivapainon suhteeseen, biomassaan sekä on myös mielenkiintoinen tutkimusalue, jonka parissa tutkimusryhmässäni on jo ryhdytty työskentelemään. Alati kehittyvät tutkimusmenetelmät ja -laitteet, sekä uudet löydöt valoa spesifisesti absorboivien kalvojen osalta auttavat toivottavasti löytämään vastauksia tässä tutkimuksessani vielä avoimiksi jääneisiin kysymyksiin.

7. Kiitokset

Kiitän tutkimusryhmäni johtajaa, dosentti Pedro Aphaloa työni ohjaamisesta, työtiloista ja -tarvikkeista. Kiitän Luis Moralesia ja Kira Maisniemeä auttavista käsistä koejärjestelyn rakentamisessa, Nina Siparia ja Riitta Tegelbergiä asiantuntemuksesta

fenolisten yhdisteiden erottamisesta ja tunnistuksesta, sekä Titta Kotilaista kallisarvoisesta avusta tilastollisissa analyyseissä ja kuvaajissa.

Kiitän Suomen Biologian Seura Vanamoja ja Societas pro Fauna et Flora Fennicaa myönnettyistä apurahoista.

KIRJALLISUUS ELI LÄHTEET

Aphalo P.J., Ballaré C.L. & Scopel A.L. (1999). Plant-plant signalling, the shade-avoidance response and competition. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1629-1634.

Aphalo P. (2003). Do current levels of UV-B radiation affect vegetation? The importance of long-term experiments. *New Phytologist* **160**: 273-280.

Barnes P.W., Flint S.D. & Caldwell M.M. (1990). Morphological responses of crop and weed species of different growth forms to ultraviolet-B radiation. *American Journal of Botany* **77**: 1354-1360.

Barnes P.W., Ballaré C.L. & Caldwell M.M. (1996). Photomorphogenic effects of UV-B radiation on plants: Consequences of light competition. *Journal of Plant Physiology* **148**: 15-20.

Björn L.O. (2002). Action spectroscopy in biology. *Photobiology: The Science of Light and Life*. Kluwer Academic, Dordrecht. s. 97-114.

Boccalandro H.E., Mazza C.A., Casal J.J. & Ballaré C.L. (2001). Ultraviolet B radiation enhances phytochrome-B mediated photomorphogenetic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**: 780-788.

Briggs W.R. & Huala E. (1999). Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **15**: 33-62.

Briggs W.R., Beck C.F., Cashmore A.R., Christie J.M., Hughes J., Jarillo J.A., Kagava T., Kanegae H., Liscum E., Nagatani A., Okada K., Salomon M., Rüdiger W., Sakai T., Takano N., Wada M. & Watson J.C. (2001). The Phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* **13**: 993-997.

Britt A.B. (1996). DNA damage and repair in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 75-100.

Brosché M. & Strid Å. (2000). Ultraviolet-B radiation causes tendril coiling in *Pisum sativum*. *Plant Cell and Physiology* **41**: 1077-1079.

Brown B.A., Cloix C., Jiang G.H., Kaiserli E., Herzyk P., Kliebenstein D.J. & Jenkins G.I. (2005). A UV-B-specific signalling component orchestrates plant UV protection. *PNAS* **102**: 18225-18230.

Brown B.A. & Jenkins G.I. (2008). UV-B signalling pathways with different fluence-rate response profiles are distinguished in mature *Arabidopsis* leaf tissue by requirement for UVR8, HY5 and HYH. *Plant Physiology* **146**: 576-588.

Caasi-Lit M., Whitecross M.I., Nayudu M. & Tanner G.J. (1997). UV-B irradiation induces differential leaf damage, ultrastructural changes and accumulation of specific phenolic compounds in rice cultivars. *Australian Journal of Plant Physiology* **24**: 261-274.

Caldwell M.M. (1971). Solar UV irradiation and growth and development of higher plants. *Photophysiology, vol VI. Current topics in photobiology and photochemistry Academic Press, New York*, s. 131-177.

Caldwell M.M., Flint S.D. & Searles P.S. (1994). Spectral balance and UV-B sensitivity of soybean: a field experiment. *Plant Cell and Environment* **17**: 267-276.

Caldwell M.M. & Flint S.D. (1997). Uses of biological spectral weighting functions and the need of scaling for the ozone reduction problem. *Plant Ecology* **128**: 67-76.

Caldwell M.M., Björn L.O., Bornman J.F., Flint S.D., Kulandaivelu, G., Teramura A.H. & Tevini M. (1998): Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **46**: 40-52.

Caldwell M.M, Ballaré C.L, Bornman J.F, Flint S.D, Björn L.O, Teramura A.H, Kulandaivelu D & Tevini M. (2003). Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2**: 29-38.

Cen Y.P. & Bornman J.F. (1993). The effect of exposure to enhanced UV-B radiation on the penetration of monochromatic and polychromatic UV-B radiation in leaves of *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum* **87**: 249-255.

Dai Q., Peng S., Chavez Q. & Vergara B.S. (1995). Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on growth and production of rice under greenhouse and field conditions. *Climate Change and Rice*. Springer-Verlag, Berlin. s. 189-198.

Day T.A. & Vogelmann T.C. (1995). Alterations in photosynthesis and pigment distributions in pea leaves following UV-B exposure. *Physiologia Plantarum* **94**: 433-440.

Day T.A., Howells B.W. & Ruhland C.T. (1996). Changes in growth and pigment concentrations with leaf age in pea under modulated UV-B radiation field treatments. *Plant, Cell and Environment* **19**: 101-108.

de la Rosa T.M., Julkunen-Tiitto M., Lehto T. & Aphalo P.J. (2001). Secondary metabolites and nutrient concentrations in silver birch seedlings under five levels of daily UV-B exposure and two relative nutrient addition rates. *New Phytologist* **150**: 121-131.

DeLucia E.H., Day T.A. & Vogelmann T.C. (1992). Ultraviolet-B ja visible light penetration into needles of two species of subalpine conifers during foliar development. *Plant Cell & Environment* **15**: 921-929.

Duell-Pfaff N. & Wellmann E. (1982). Involvement of phytochrome and a blue light photoreceptor in UV-B induced flavonoid biosynthesis in parsley (*Petroselinum hortense Hoffm.*). *Planta* **156**: 213-217.

- Dugas A.J. Jr, Castañeda-Acosta J., Bonin G.C., Price K.L., Fischer N.H. & Winston G.W. (2000). Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *Journal of Natural Products* **63**: 327-331.
- Edwards N.T. (1992). State-of-the-art exposure techniques do not qualitatively simulate expected global increases in UV-B irradiance. *Bulletin of the Ecological Society of America* **73**: 165.
- Ferreres F., Esteban E., Carpena-Ruiz R., Jiménez M.A. & Tomás-Barberán F.A.T. (1994). Acylated flavonol sophorotriosides from pea shoots. *Phytochemistry* **39**: 1443-1446.
- Ferreres F., Valentão P., Bento A., Noites A., Seabra R.M., & Andrade P.B (2008). HPLC-DAD-MS/MS-ESI screening of phenolic compounds in *Pieris brassicae* L. Reared on *Brassica rapa*. var *rapa* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: no **3**: 844-853.
- Flint, S.D. & Caldwell, M.M. (2003a): A biological spectral weighting function for ozone depletion research with higher plants. *Physiologia Plantarum* **117**: 137-144.
- Flint, S.D. & Caldwell, M.M. (2003b): Field testing of UV biological spectral weighting functions for higher plants. *Physiologia plantarum* **117**: 145-153.
- Flint, S.D., Ryel, R.J. & Caldwell, M.M. (2003): Ecosystem UV-B experiments in terrestrial communities: a review of recent findings and methodologies. *Agricultural and Forest Meteorology* **120**: 177-189.
- Flint, S.D., Searles, P.S. & Caldwell, M.M. (2004): Field testing of biological spectral weighting functions for induction of UV-absorbing compounds in higher plants. *Photochemistry and Photobiology* **79**: 399-403.
- Formann G. & Martens S. (2001). Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology* **12**: 155-160.
- Fuglevand G, Jackson J.A. & Jenkins G.I. (1996). UV-A, UV-B and blue light signal transduction pathways interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in Arabidopsis. *The Plant Cell* **8**: 2347-2357.
- Furuya M. & Galston A.W. (1965). Flavonoid complexes in *Pisum sativum* L.: nature and distribution of the major components. *Phytochemistry* **4**: 285-296.
- Gitz D.C. & Liu-Gitz L. (2003). How do UV photomorphogenetic responses confer water stress tolerance? *Photochemistry & Photobiology* **78** (6): 529-534.
- González R., Wellburn A.R. & Paul N.D. (1998a). Dose responses of two pea lines to ultraviolet-B radiation (280-315 nm). *Physiologia Plantarum* **104**: 373-378).
- González R., Mempelsted R., Wellburn A.R. & Paul N.D. (1998b). Non-photosynthetic mechanisms of growth reduction in pea (*Pisum sativum* L.) exposed to UV-B radiation. *Plant, Cell and Environment* **21**: 23-32.

- Goulas Y., Cerovic Z.G., Cartelat A. & Moya I. (2004). Dualex: a new instrument for field measurements of epidermal ultraviolet absorbance by chlorophyll fluorescence. *Applied optics* **43**: 4488-4496.
- Grammatikopoulos G., Karousou R., Kokkini S. & Manetas Y. (1998). Differential effects of UV-B radiation on reproductive effort in two chemotypes of *Mentha spicata* under field conditions. *Australian Journal of Plant Physiology* **25**: 345-351.
- Greenberg B.M. (1997). The effects of ultraviolet-B radiation on higher plants. *Plants for Environmental Studies*. s.1-35. Wang W., Gorsuch J. & Hughes J.S.,eds.
- Hada M., Iida Y. & Takeuchi Y. (2000). Action spectra of DNA photolyases for photorepair of cyclobutane pyrimidine dimers in sorghum and cucumber. *Plant Cell & Physiology* **41**: 644-648.
- Harborne J.B. & Williams C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**: 481-504.
- Hashimoto T. & Yatsunami H. (1984). Ultraviolet photoreceptors and their interaction in broom sorghum-analysis of action spectra and fluence-response curves. *Blue Light Effects in Biological Systems*. s. 125-136. Springer-Verlag, Berlin.
- He J., Huang L.K., Chow W.S., Whitecross M.J. & Anderson J.M. (1993). Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on rice and pea plants. *Australian Journal of Plant Physiology* **20**: 129-142.
- Heijnen C.G.M., Henem G.R.M.M., van Acker A.A.R., van der Vijgh W.J.F. & Bast A. (2001). Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicology in Vitro* **15**: 3-6.
- Holmes M.G. (1997). Action spectra for UV-B effects on plants: monochromatic and polychromatic approaches for analysing plant responses. *Plants and UV-B: responses to environmental change*. Cambridge University Press, Cambridge. s. 31-50.
- Jansen M.A.K., Babu T.S., Heller D., Gaba V., Mattoo A.K. & Edelman N. (1996a). Ultraviolet-B effects on *Spirodela ologorrhiza*: induction of different protection mechanisms. *Plant Science* **115**: 217-223.
- Jansen M., Gaba V., Greenberg G., Mattoo A. & Edelman M. (1996b). Low thresholds of ultraviolet-B in a background of photosynthetically active radiation trigger rapid degradation of the D2 protein of photosystem II. *Plant Journal* **9**: 963-969.
- Jansen M.A.K., Gaba V. & Greenberg B.M. (1998). Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science* **3**: 131-135.
- Johnson B.C., Kirby J., Naxakis G. & Pearson S. (1999). Substantial UV-B-mediated induction of essential oils in sweet basil. *Phytochemistry* **5**: 507-510.

Keinänen M. & Julkunen-Tiitto R. (1998). High-performance liquid chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves. *Journal of Chromatography A* **793**: 370-377.

Kim B.J., Tennessen T.J. & Last R.L. (1998). UV-B-induced photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **15**: 667-674.

Kirk-Davidoff D.B., Hintsa E.J., Anderson J.G., Keith D.J. (1999). The effect of climate change on ozone depletion through changes in stratospheric water vapour. *Nature* **402**: 399-401.

Kohen, E., Santus, R. ja Hirschberg, J.G. (1995). *Photobiology*. Academic press. California, USA. 506 s.

Koistinen V.V.T. (2008). Monolignolien kuljetusmekanismit solulimasta apoplastiseen tilaan puutuvissa soluissa. *Pro gradu-työ, Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta, Helsingin yliopisto.*

Kotilainen T, Venäläinen T, Tegelberg R, Lindfors A, Julkunen_Tiitto R, Sutinen S, O'Hara R.B. & Aphalo P.J. (2009). Assessment of UV-B biological spectral weighting functions for phenolic metabolites and growth responses in silver birch seedlings. *Photochemistry and Photobiology* **85**: 1346-1355.

Krizek D.T., Kramer G.F., Upadhyaya D. & Mirecki R.M. (1993). UV-B response of cucumber seedlings grown under metal halide and high pressure sodium/deluxe lamps. *Physiologia Plantarum* **88**: 350-358.

Krizek D.T. (2004). Influence of PAR and UV-A in determining plant sensitivity and photomorphogenic responses to UV-B radiation. *Photochemistry and Photobiology* **79**: 307-315.

Kvalevag M.M., Myhre G. & Lund Myhre C.G. (2009). Extensive reduction of surface UV radiation since 1750 in World's populated regions. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions* **9**: 10457-10486.

Li F.R., Peng S.L., Chen B.M. & Hou Y.P. (2010). A meta-analysis of the responses of woody and herbaceous plants to elevated ultraviolet B radiation. *Acta Oecologica* **36**: 1-9.

Más P., Devlin P.F., Panda S. & Kay S.A. (2000). Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature* **408**: 207-211.

McKenzie R.L, Björn L.O, Bais A. & Ilyas M. (2003). Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the earth's surface. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2**:5-15.

Meleti C., Bais A., Kazadzis S., Kouremeti N., Garane K. & Zerefos C. (2009). Factors affecting solar ultraviolet irradiance measured since 1990 at Thessaloniki, Greece. *International Journal of Remote Sensing* **30**: 4167-4179.

- Middleton E.M. & Teramura A.H. (1994). Understanding photosynthesis, pigment and growth responses by UV-B and UV-A irradiances. *Photochemistry and Photobiology* **60**: 38-45.
- Miller J.E., Booker F.L., Fiscus E.L., Heagle A.S., Pursley W.A., Vozzo S.F. & Heck W.W. (1994). Ultraviolet-B radiation and ozone effects on growth, yield and photosynthesis of soybean. *Journal of Environmental Quality* **23**: 83-91.
- Mirecki R.M. & Teramura A.H. (1984). Effects of ultraviolet-B radiation on soybean. V. The dependence of plant sensitivity on the photosynthetic photon flux density during and after leaf expansion. *Plant Physiology* **74**: 475-480.
- Mohr H., Drumm-Herrel H. & Oelmurrel R. (1984). Coaction of phytochrome and blue/UV light photoreceptors. *Blue Light Effects in Biological Systems. Springer-verlag, Berlin*. s. 6-18.
- Morales L.O., Tegelberg R., Brosche M., Keinänen M., Lindfors A. & Aphalo P.J. (2010). Effects of solar UV-A and UV-B radiation on gene expression and phenolic accumulation in *Betula pendula* leaves. *Tree Physiology* **30**: 923-934.
- Mori T., Sakurai M. & Sakuta M. (2000). Changes in PAL, CHS, DAPH synthase (DS-Co and Ds-Mn) activity during anthocyanin synthesis in suspension culture of *Fragaria ananassa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **62**: 135-139.
- Mulroy T.W. (1979). Spectral properties of heavily glaucous and non-glaucous leaves of a succulent rosette plant. *Oecologia* **38**: 349-357.
- Murali N.S., Teramura A.H. & Randall S.K. (1988). Response differences between two soybean cultivars with contrasting UV-B radiation sensitivities. *Photochemistry and Photobiology* **48**: 653-657.
- Mylona P., Pawlowski K. & Bisseling T. (1995). Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell* **7**: 869-885.
- Newsham K.K. & Robinson S.A. (2009). Responses of plants in polar regions to UV exposure: a meta-analysis. *Global Change Biology* **15**: 2574-2589.
- Nogués S., Allen D.J., Morison I.J.L. & Baker N.R. (1998). Ultraviolet-B radiation effects on water relations, leaf development, and photosynthesis in droughted pea plants. *Plants Physiology* **117**: 173-181.
- Olsson L.C., Veit M. & Bornman J.F. (1999). Epidermal transmittance and phenolic composition in leaves of atrazine tolerant and atrazine sensitive cultivars of *Brassica napus* grown under enhanced UV-B radiation. *Physiologia Plantarum* **107**: 259-266.
- Panicker A.S., Pandithurai G., Takamuta T. & Pinker R.T. (2009). Aerosol effects in the UV-B spectral region over Pune, an urban site in India. *Geophysical Research Letters* **36**: L10802.

Passardi F, Cosio C., Penel C. & Dunand C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports* **24**: 255-265.

Paul N.D. (1998). Interactions between trophic levels. *Plants and UV-B: Responses to Environmental Change. Society for Experimental Biology Seminar Series 64. Cambridge University Press, Cambridge*: 317-339.

Paul N.D. (2001). Plant responses to UV-B: time to look beyond the stratospheric ozone depletion? *New Phytologist* **150**:5-8.

Peoples M.B., Herridge D.F. & Ladha J.K. (1995). Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. *Plant and Soil* **37**: 3-28.

Peterson R.L., Massicotte H.B. & Melville L.H. (2004). *Mychorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. CABI Publishing, Wallingford, 173s.

Petropoulou Y., Georgiou O., Psaras G.K. & Manetas Y. (2001). Improved flower advertisement, pollinator rewards and seed yield by enhanced UV-B radiation in the mediterranean annual *Malcolmia maritima*. *New Phytologist* **152**: 85-90.

Rao M.V., Paliyath G. & Ormrod D.P. (1996). Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **110**: 125-136.

Ros J. & Tevini M. (1995). Interaction of UV radiation and IAA during growth of seedlings and hypocotyl segments of sunflower. *Journal of Plant Physiology* **146**: 295-302.

Rousseaux M.C, Scopel A.L, Searles P.S, Caldwell M.M, Sala O.E, Ballaré C.L. (2001). Responses to solar ultraviolet-B radiation in a shrub-dominated natural ecosystem of Tierra del Fuego (southern Argentina). *Global Change Biology* **7**: 467-478.

Rozema J., van de Staaij J., Björn L.O. & Caldwell M. (1997). UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends in Ecology and Evolution* **12**: 22-28.

Sarala M. (2010). Sinisen valon puutteen vaikutus männyn taimien pituuskasvuun. Väitös. Oulun yliopisto. Luonnontieteellinen tdk. Biologian laitos.

Schmeltzer E., Jahnen W. & Hahlbrock K. (1988). *In situ* localization of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase and flavonoid end products in the epidermal cells of parsley leaves. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* **85**: 2989-2993.

Schulze E.D., Beck E. & Müller-Hohenstein K. (2005a). *Plant Ecology. Spingler-Verlag Berlin Heidelberg New York*. s. 40.

Schulze E.D., Beck E. & Müller-Hohenstein K. (2005b). *Plant Ecology. Spingler-Verlag Berlin Heidelberg New York*. s. 25.

Sellaro R., Crepy M., Trupkin S.A., Karayekov E., Buchowsky A.S., Rossi C. & Casal J.J. (2010). Cryptochrome as a sensor of the blue/green ratio of natural radiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **154**: 401-409.

Solomon S. (1999). Stratospheric ozone depletion: A review of concepts and history. *Reviews of Geophysics* **37**: 275-316.

Stapleton A.E. & Walbot V. (1994). Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiology* **105**: 881-889.

Strid Å., Chow W.S. & Anderson J.M. (1990). Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthesis in *Pisum sativum*. *Biochimica et Biophysica acta (BBA) Bioenergetics* **1020**: 260-268.

Strid Å., Chow W.S. & Anderson J.M. (1994). UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynthesis Research* **39**: 475-489.

Taiz, L. & Zeiger, E. (1998): *Plant physiology*. 2. painos. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, USA. s. 155-193 ja 347-376.

Takeuchi Y., Murakami M., Nakajima N., Kondo N. & Nikaido O. (1996). Induction and repair of damage to DNA in cucumber cotyledons irradiated with UV-B. *Plant & Cell Physiology* **37**: 181-187.

Teramura A.H. & Sullivan J.H. (1994). Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. *Photosynthesis Research* **39**: 463-473.

Teramura A.H. & Ziska L.H. (1996). Ultraviolet-B radiation and photosynthesis. *Photosynthesis and the Environment: Advances in Photosynthesis* **5**: 435-450.

Tevini M. & Teramura A.H. (1989). UV-B effects on terrestrial plants. *Photochemistry and Photobiology* **50**: 479-487.

UNEP(2009). Environmental effects of ozone depletion and its interactions with climate change: Progress report 2008. *Photochemical & Photobiological Sciences* **8**: 13-22.

Vlohr Hans & Drumm-Herrel Helge (2006). Coaction between phytochrome and blue/UV light in anthocyanin synthesis in seedlings. *Physiologia Plantarum* **58**: 408-414.

Wade H.K., Bibikova T.N., Valentine W.J. & Jenkins G.I. (2001). Interactions within a network of phytochrome, cryptochrome and UV-B phototransduction pathways regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* leaf tissue. *The Plant Journal* **25**: 675-685.

Wargent J.J., Gegas V.C., Jenkins G.I., Doonan J.H. & Paul N.D. (2009). UVR8 in *Arabidopsis thaliana* regulates multiple aspects of cellular differentiation during leaf development in response to ultraviolet B radiation. *New Phytologist* **183**: 315-326.

Wilson K.E. (1996). Flavonoid biosynthesis in *Brassica napus* L. and its role in tolerance to ultraviolet-B radiation. MSc. thesis, Department of Biology, University of Waterloo, Waterloo, Canada.

Wilson K.E., Thompson J.E., Huner M.P.A. & Greenberg B.M. (2001). Effects of ultraviolet-A exposure on ultraviolet-B-induced accumulation of specific flavonoids in *Brassica napus*. *Photochemistry and Photobiology* **73**: 678-684.

WMO (2002) Scientific assessment of ozone depletion: Global Ozone Research and Monitoring Project. *Report no.47. World meteorological Organization. Geneva, Switzerland.*

Zepp R.G, Callaghan T.V. & Erickson D.J III. (2003). Interactive effects of ozone depletion and climate change on biogeochemical cycles. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2**: 51-61.

Ziska L.H., Teramura A.H., Sullivan J.H. & McCoy A. (1993). Influence of ultraviolet-B (UV-B) radiation on photosynthetic and growth characteristics in field-grown cassava (*Manihot esculentum* Crantz). *Plant, Cell & Environment* **16**: 73-79.

INTERNET-LÄHTEET

Valtion ympäristöhallinnon verkkosivut:

<http://www.ymparisto.fi/default.asp?contentid=352851&lan=FI> (27.4.2011)

Liite 1. Käsittelyjen kokonaisvaikutus herneen taimien pituuteen (n=12), kuivapainoon ja lehtien pinta-alaan. df =4 ja 639 (pituus, käsittely) ja 4 ja 639 (pituus, interaktio), 4 ja 20 (kuivapaino, käsittely), 4 ja 20 (pinta-ala, käsittely) ja 4 ja 54 (pinta-ala, interaktio).

Ominaisuus	Vrk	Käsittely <i>p, F</i>	Aika <i>p, F</i>	Lehti <i>p, F</i>	Interaktio <i>p, F</i>	Keskiarvo cm/g/cm ²	Keskiarvon keskivirhe cm/g/cm ²
Taimien pituus (cm)		0,0078	<0,0001		0,0011		
		3,49	4892,79		4,6		
	11	0,044				4,41	±0,06
		2,49					
	30	0,0001				26,92	±0,33
		5,99					
Kuivapaino (g)		0,29				6,96	±0,34
		1,35					
Lehtien pinta-ala (cm²)		0,46		<0,0001	0,704	4,02	±0,17
		0,94		73,44	0,54		

Liite 2. Käsittelyjen kokonaisvaikutus Dualex-laitteella mitattuihin lehden ylä- ja alapinnan absorbansseihin (A). df (kaikissa)=4 ja 165. Lehden epidermin yhdistepitoisuus kasvaa absorbanssin kohotessa. Lehti =mitattavien lehtien ikä, Interaktio =käsittelyjen ja lehtien iän interaktio.

Mittaus Dualex	Käsittely p, F	Lehti p, F	Interaktio p, F	Keskiarvo (A)	Keskiarvon keskivirhe
Ylä A	<0,0001 56,12	<0,0001 101,77	0,0193 3,03	1,21	±0,02
Ala A	0,021 2,98	<0,0001 211,1	0,509 0,83	0,75	±0,03

Liite 3. Käsittelyjen kokonaisvaikutus eri-ikäisten lehtien yläepidermin absorbansseihin (**p, F**) ja kontrastivertailut. $df = 4$ ja 80 (lehti 1 eli vanhin alalehti), 4 ja 50 (lehti 2 eli taimien kehityksen keskivaiheen kasvulehti), 4 , 20 (lehti 3 eli nuorin kasvulehti). Kontrastivertailujen yksityiskohdat ks. Taulukko 3. Keskivirhe = keskiarvon keskivirhe.

	Lehti 1	Lehti 2	Lehti 3
<i>p</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001
F	30,22	20,78	34,35
Keskiarvo (A)	1,09	1,29	1,37
Keskivirhe (A)	±0,03	±0,02	±0,02
<i>p</i> K vs. P	0,163	1	0,094
<i>p</i> P vs. MH	1	1	0,22
<i>p</i> P vs. R226	1	1	0,104
<i>p</i> R226 vs. MH	1	1	0,552
<i>p</i> R226 vs. R312	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Liite 4.. Käsittelyjen kokonaisvaikutuksen sekä kolmen mittauskerran ja käsittelyjen interaktion testaus ensin avautuneiden lehtien ylä- ja alaepidermin absorbanseihin (A). df (käsittelyt ja interaktio, ylä- ja alaepidermi)=4 ja 75. Aika =mittausajankohdan vaikutus vasteisiin. Interaktio =eri mittausajankohtien ja käsittelyjen interaktio. Keskivirhe =keskiarvon keskivirhe.

	Käsittely <i>p, F</i>	Aika <i>p, F</i>	Interaktio <i>p, F</i>	Keskiarvo (A)	Keskivirhe (A)
Lehti 1 (ylä)	<0,0001 222,15	<0,0001 529,74	0,012 3,48	1,09	±0,26
Lehti 1 (ala)	0,916 0,23	0,335 0,94	0,282 1,29	0,68	±0,03

Liite 5. Käsittelyjen kokonaisvaikutus ensimmäisinä avautuneiden lehtien yläepidermin absorbansseihin (**p**, **F**) kolmella mittauskerralla ja kontrastivertailut.

Kontrastivertailujen yksityiskohdat: ks. Taulukko 3. df (kaikissa kolmessa)=4 ja 20.

Keskivirhe =keskiarvon keskivirhe. X-akselilla oleva aikamääre =lehtien ikä mittaushetkellä.

	1 vrk	8 vrk	16 vrk
<i>p</i>	<0,0001	<0,0001	0,0001
F	66,2	202,25	89,94
Keskiarvo (A)	0,91	1,11	1,28
Keskivirhe (A)	±0,01	±0,02	±0,01
K vs. P <i>p</i>	0,097	0,0013	0,0023
P vs. MH <i>p</i>	1	0,098	0,744
P vs. R226 <i>p</i>	1	0,98	0,74
R226 vs. MH <i>p</i>	1	0,932	0,782
R226 vs. R312 <i>p</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Liite 6. Lehtien alaepermin absorbanssien kontrastivertailut. K vs. P: UV-B-säteilyn vaikutus, P vs. MH: lyhytaaltoisen UV-A-säteilyn vaikutus, P vs. R226: UV-A-säteilyn vaikutus, MH vs. R226:pitkäaaltoisen UV-A-säteilyn vaikutus ja R226 vs. R312: sinisen valon vaikutus. K=kontrolli, P=polyesteri, MH=MHCM09B, R226=rosco 226, R312= rosco 312.

	K vs. P	P vs. MH	P vs. R226	R226 vs. MH	R226 vs. R312
<i>p</i>	<0,0001	0,979	1	1	<0,0001

Liite 7. Käsittelyjen kokonaisvaikutus fenolisten happojen määrään ja kontrastivertailut. df= 4 ja 20 (käsittely), 4 ja 54 (interaktio). Kontrastivertailujen yksityiskohdat: ks. Taulukko 3. Interaktio = lehden iän ja käsittelyjen interaktio. Keskiarvo =keskiarvon keskiarvo.

Fenoliset hapot		
Käsittely	<i>p</i>	0,0005
	F	8,061
Lehti	<i>p</i>	<0,0001
	F	84,728
Interaktio	<i>p</i>	0,414
	F	1,004
Keskiarvo		0,468
Keskiarvo		±0,09
K vs. P	<i>p</i>	1
P vs. MH	<i>p</i>	1
P vs. R226	<i>p</i>	1
R226 vs., MH	<i>p</i>	1
R226 vs. R312	<i>p</i>	0,254

Liite 8. Käsittelyjen kokonaisvaikutus neljään flavonoidiin kaikkien lehtien ja lehtien eri ikäryhmien osalta. Flavonoidit nimetty taulukossa retentioaikojen mukaan, nimet seuraavasti: **rt159:** Quercetin-3,7-di-*O*-glucoside, **rt186:** Quercetin-3-*O*-(caffeyl)-sophoroside-7-*O*-glucoside (isomer), **rt21:** Quercetin-3-*O*-(*p*-coumaryl)-sophoroside, **rt218:** Kaempferol-3-*O*-(*p*-coumaryl)sophoroside-7-*O*-glucose. df (kaikilla)=4 ja 54. Interaktio =lehden iän ja käsittelyjen interaktio. Keskivirhe =keskiarvon keskivirhe.

		rt159	rt186	rt21	rt218
Käsittely	<i>p</i>	0,004	<0,0001	<0,0001	0,0001
	F	5,39	33,8	11,936	10,081
Lehti	<i>p</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	F	54,12	54,64	73,557	39,724
Interaktio	<i>p</i>	0,04	<0,0001	0,005	0,0014
	F	2,63	8,45	4,206	5,124
Keskiarvo	mg/g	2,786	4,138	3,482	4,275
Keskivirhe	mg/g	±0,175	±0,292	±0,252	±0,227
Lehti 1	<i>p</i>	0,0006	<0,0001	<0,0001	0,0012
	F	4,94	18,52	19,589	6,832
Keskiarvo	mg/g	1,436	5,386	4,642	5,743
Keskivirhe	mg/g	±0,151	±0,568	±0,489	±0,605
Lehti 2	<i>p</i>	0,009	<0,0001	0,009	<0,0001
	F	4,57	14,82	4,58	12,351
Keskiarvo	mg/g	3,122	4,858	4,562	3,773
Keskivirhe	mg/g	±0,142	±0,312	±0,215	±0,201
Lehti 3	<i>p</i>	<0,0001	<0,0001	0,0007	0,31
	F	4,52	19,61	7,476	1,282
Keskiarvo	mg/g	4,292	2,192	1,278	3,291
Keskivirhe	mg/g	±0,149	±0,095	±0,054	±0,0723

Liite 9. Quercetin-3,7-di-*O*-glucoside-flavonoidin vasteiden kontrastivertailut. df=20.
 Kontrastivertailujen yksityiskohdat: ks. Taulukko 3.

Quercetin-3,7-di- <i>O</i> -glucoside		Lehti 1	Lehti 2	Lehti 3
K vs. P	<i>p</i>	0,88	1	1
P vs. MH	<i>p</i>	0,14	0,75	1
P vs. R226	<i>p</i>	0,02	1	0,16
R226 vs, MH	<i>p</i>	0,35	0,75	0,01
R226 vs. R312	<i>p</i>	0,88	0,03	0,06

Liite 10. Quercetin-3-*O*-(caffeoyl)-sophoroside-7-*O*-glucoside (isomer),-
flavonoidin vasteiden kontrastivertailut. df=20.

Quercetin-3- <i>O</i> -(caffeoyl)- sophoroside-7- <i>O</i> -glucoside (isomer)			Lehti 1	Lehti 2	Lehti 3
K vs. P	<i>p</i>	0,43	1	1	
P vs. MH	<i>p</i>	0,12	1	1	
P vs. R226	<i>p</i>	0,0007	1	1	
R226 vs, MH	<i>p</i>	0,12	1	1	
R226 vs. R312	<i>p</i>	0,013	0,007	0,0006	

Liite 11. Quercetin-3-*O*-(*p*-coumaryl)-sophoroside-flavonoidin
vasteiden kontrastivertailut. df=20.

Quercetin-3- <i>O</i> -(<i>p</i> -coumaryl)- sophoroside		Lehti 1	Lehti 2	Lehti 3
K vs. P	<i>p</i>	0,638	1	0,213
P vs. MH	<i>p</i>	0,001	0,994	0,685
P vs. R226	<i>p</i>	<0,0001	1	0,213
R226 vs, MH	<i>p</i>	0,003	1	0,685
R226 vs. R312	<i>p</i>	0,214	0,043	0,685

Liite 12. Kaempferol-3-*O*-(*p*-coumaryl)sophoroside-7-*O*-glucose-flavonoidin vasteiden kontrastivertailut. df=20.

Kaempferol-3- <i>O</i> -(<i>p</i> -coumaryl)sophoroside-7- <i>O</i> -glucose		Lehti 1	Lehti 2
K vs. P	<i>p</i>	0,33	0,862
P vs. MH	<i>p</i>	1	0,437
P vs. R226	<i>p</i>	1	<0,0001
R226 vs, MH	<i>p</i>	1	0,002
R226 vs. R312	<i>p</i>	0,064	0,211

Liite 13. Fenoliset yhdisteet. Vasemmassa reunassa retentioajat ja oikeassa yhdisteet ryhmä-tai yksilötasolla identifioituina. Merkitsevät tulokset korostettu keltaisella, kontrastivertailujen osalta vihreällä. Korkeimmat pitoisuudet nuorimmissa lehdissä korostettu violetilla, alhaisimmat oranssilla.

Ryhmä / yhdiste	käsitely	lehti	inter-aktio	lehti	p, F	K vs. P	P vs. UVA	P vs. R226	R226 vs. UVA	R226 vs. R312	K	P	UVA	R226	R312	
91	0,01	<0,0001	0,6		1	0,1	0,11	0,11								FENOLIHAPPO
	4,12	111,98	0,7								0,813	1,29	1,08	1,181	0,723	
											0,55	0,428	0,611	0,88	0,55	
114	<0,0001	<0,0001	0,1			0,91	0,59	0,27	0,27							FENOLIHAPPO
	15,21	85,74	2,03								1,251	1,367	1,22	0,83	1,682	
											0,691	0,896	0,832	1,13	1	
122	0,13	<0,0001	0,08								0,498	0,431	0,49	0,544	0,561	FENOLIHAPPO
	2,03	57,86	2,18								0,636	0,942	0,591	0,62	0,973	
											0,435	0,455	0,34	0,79	0,55	
146	0,03	0,39	0,02								0,228	0,188	0,331	0,24	0,177	FENOLIHAPPO
	3,32	0,77	3,12													
						1	<0,0001	1	1	1	0,2	0,941	0,227	0,191	0,193	0,29
157	0,41	<0,0001	0,29													FLAVONOIDI
	1,04	173,77	1,29								0,15	0,212	0,159	0,182	0,233	Quercetin-3-O-sophorostide-7-O-glucoside
											0,455	0,419	0,383	0,304	0,168	
159	0,004	<0,0001	0,04													FLAVONOIDI
	5,39	54,12	2,63								0,752	0,821	0,55	0,568	0,551	Quercetin-3-O-sophorostide-7-O-glucoside
											1,09	0,833	0,731	0,988	0,382	
167	0,61	0,4	0,32													FLAVONOIDI
	0,69	0,74	1,2								7,83	5,351	5,977	7,33	5,772	Quercetin-3,7-di-O-glucoside
172	0,02	<0,0001	0,83													FENOLIHAPPO
	3,69	29,25	0,37													Quercetin-3-O-(caffeoyl)-sophorostide-7-O-glucoside
											0,155	0,114	0,1	0,072	0,134	
											0,371	0,3	0,33	0,357	0,339	

177	0,25 1,48	<0,0001 40,17	0,01 3,61					1	1	0,089	0,089	0,089	0,089	0,121	0,124	0,131	0,07	0,124	FLAVONOIDI Kaempferol-3-O-sophoroside-7-O-glucose
					1	0,018 3,864		1	0,089	0,089	0,089	0,089	0,089	0,121	0,124	0,131	0,07	0,124	
					2	0,001 7,145		0,069	0,535	0,036	0,016	0,011	0,081	0,081	0,122	0,117	0,192	0,11	
					3	0,018 3,85		0,09	0,53	0,25	0,14	0,19	0,272	0,191	0,191	0,177	0,241	0,182	
181	0,15 1,89	0,0003 14,79	0,15 1,75																FLAVONOIDI Kaempferol-3,7-di-O-glucoside
					1								0,371	0,412	0,313	0,222	0,251	0,251	
					2								0,188	0,221	0,2	0,25	0,139	0,139	
					3								0,272	0,17	0,31	0,23	0,14	0,14	
186	<0,0001 33,8	<0,0001 54,64	<0,0001 8,45																FLAVONOIDI Quercetin-3-O-(caffeoyl)-sophoroside-7-O-glucoside (isomer)
					1	<0,0001 18,52		0,43	0,12	0,007	0,12	0,013	7,08	8,2	5,57	4,02	2,07	2,07	
					2	<0,0001 14,82		1	1	1	1	0,007	5,97	5,04	4,97	6,94	1,4	1,4	
					3	<0,0001 19,61		1	1	1	1	0,0006	2,82	2,36	2,477	2,351	0,991	0,991	
193	0,0001 9,8	<0,0001 110,3	0,12 1,91					1	0,78	0,78	1	0,2							FLAVONOIDI
					1								0,442	0,367	0,291	0,2	0,166		
					2								0,791	0,882	0,6	0,944	0,291		
					3								1,422	1,2	1,1	1,383	1		
196	0,201 1,651	0,124 2,436	0,811 0,396																FLAVONOIDI
					1								0,109	0,13	0,101	0,102	0,1		
					2								0,06	0,084	0,083	0,118	0,056		
					3								0,137	0,146	0,132	0,139	0,091		
198	0,007 4,742	<0,0001 101,045	0,112 1,971					0,882	0,315	0,882	0,882	0,217							FLAVONOIDI Quercetin-3-O-(sinapoyl)-sophoroside-7-O-glucoside
					1								0,332	0,417	0,287	0,263	0,188		
					2								0,152	0,163	0,162	0,233	0,101		
					3								0,114	0,109	0,072	0,077	0,062		
203	0,055 2,813	<0,0001 67,974	0,427 0,978																FLAVONOIDI Quercetin-3-O-(p-coumaroyl)-sophoroside-7-O-glucoside
					1								23,642	30,677	31,282	27,729	28,372		
					2								27,233	28,632	31,333	50,369	23,641		
					3								57,192	49,92	52,911	59,882	49,1		
206	0,537 0,805	0,0004 14,378	0,497 0,855																FLAVONOIDI Quercetin-3-O-glucoside
					1								4,161	4,344	3,21	2,59	3,311		
					2								4,633	3,717	3,233	5,062	5,6		
					3								2,454	2,061	2,619	1,99	1,832		

