

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

***MED25* roll hariliku müürlooga õhulõhede regulatsioonis ja arengus**

Magistritöö

30 EAP

Kaspar Koolmeister

Juhendajad PhD Hanna Hõrak,

PhD Liina Jakobson,

Professor Hannes Kollist

TARTU 2019

Infoleht

***MED25* roll hariliku müürlooga õhulõhede regulatsioonis ja arengus**

Taimelehtede ja varte pinnal olevad õhulõhed on väikesed poorid atmosfääri süsihappegaasi ammutamiseks, kaasneva mõjuna kaotab taim õhulõhede kaudu ka vett. Õhulõhed on võimelised reageerima mitmetele keskkonnatingimustele oma suuruse muutmise läbi, mis aitab taimel näiteks põuatingimustes elutähtsat vett säästa. Taimede õhulõhede regulatsiooni täpsem mõistmine on seetõttu väga vajalik selleks, et tulevikus luua muutuvate keskkonnatingimustega paremini toime tulevaid taimi. Praegusel hetkel on õhulõhede regulatsioonist punases valguses vähe teada ja olemasolevad teooriad on vastuolulised. Seetõttu uuriti käesolevas töös *MED25* kui võimaliku õhulõhede punase valguse regulatsiooni komponendi rolli õhulõhede regulatsioonis ja arengus metsiktüüpi hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) Col-0 ökotüüpi taimede ja *MED25* katkestusega mutantide abil. Töö tulemustest selgus, et *MED25* omab olulist rolli õhulõhede avanemises ja sulgumises ning nende arengus.

Õhulõhe, taim, gaasivahetus, punane valgus, areng

CERCS: B310 Soontaimede füsioloogia, B225 Taimegeneetika

Role of *MED25* in stomatal regulation and development in *Arabidopsis thaliana*

Stomata are small pores in plant epidermis which act as a gateway for CO₂ to enter and water to escape the plant leaf. Stomata are capable of changing their aperture in response to various environmental factors, which helps them conserve water in drought conditions. Further understanding of plant stomatal movements is therefore necessary for future development of plants that can better cope with changing environmental conditions. Stomatal regulatory pathways in response to red light are not well known and existing theories are controversial. To combat this issue, experiments assessing the effect of *MED25*, a possible stomatal red light regulator, on stomatal development and regulation were conducted. *Arabidopsis thaliana* Col-0 ecotype and plant lines with dysfunctional *MED25* were used for the experiments. Results of the study indicate that *MED25* has an important role in stomatal red light opening reactions and development.

Stomata, plant, red light, development, gas exchange

CERCS: B310 Physiology of vascular plants, B225 Plant genetics

Sisukord

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1 HARILIK MÜÜRLOOK.....	8
1.2 ÕHULÕHED	8
1.2.1 Õhulõhede avanemine	9
1.2.2 Õhulõhede sulgumine	9
1.3 ÕHULÕHEDE AVANEMINE VALGUSE MÕJUL	10
1.3.1 Punane valgus	10
1.3.2 Sinine valgus.....	13
1.4 ÕHULÕHEDE REGULATSIOON CO ₂ MÕJUL	14
1.5 ÕHULÕHEDE SULGUMINE ABSTSIISHAPPE MÕJUL.....	16
1.6 KESKKONNATINGIMUSTE MÕJU ÕHULÕHEDE INDEKSI KUJUNEMISELE	16
1.7 MED25 (PFT1) - MEDIAATORKOMPLEKSI SUBÜHIK	16
2 EKSPERIMENTAALOSA	19
2.1 TÖÖ EESMÄRGID	19
2.2 MATERJAL JA METOODIKA	19
2.2.1 Kasutatud taimed.....	19
2.2.2 Taimede kasvatamine	20
2.2.3 Gaasivahetuskatsete aparatuur	20
2.2.4 Gaasivahetuskatsete läbiviimine	22
2.2.5 Transgeensete taimeliinide valmistamine.....	23
2.2.6 <i>Nicotiana benthamiana</i> mööduv transformatsioon.....	27
2.2.7 <i>GUS</i> värvimine ja <i>GFP</i> ekspressiooni jälgimine	27
2.2.8 Õhulõhede tiheduse ja indeksi määramine lehejäljenditelt	28
2.2.9 Andmeanalüüs ja statistika	28
2.3 TULEMUSED.....	29
2.3.1 <i>MED25</i> ekspressioon on sulgrakkudes rikastatud.....	29
2.3.2 <i>T-DNA</i> asukoht <i>MED25</i> geenis	29
2.3.3 Õhulõhede avanemine punase valguse mõjul.....	30
2.3.4 Õhulõhede avanemine sinise valguse mõjul	31
2.3.5 Õhulõhede sulgumine pimeduse mõjul	31
2.3.6 Õhulõhede sulgumine abstsiihappe mõjul.....	32
2.3.7 Õhulõhede sulgumine kõrge CO ₂ kontsentratsiooni mõjul.....	33
2.3.8 Õhulõhede avanemine madala CO ₂ kontsentratsiooni mõjul	34

2.3.9	Õhulõhede tihedus, indeks ja suurus	35
2.3.10	MED25 transgeeniga komplementeeritud med25 liinid.....	36
2.3.11	pMED25:GFP-GUS mööduv ekspressioon <i>Nicotiana benthamiana</i> 's	37
2.3.12	MED25 promooteri ekspressioonimuster	38
2.4	ARUTELU	39
2.4.1	MED25 roll õhulõhede reaktsioonide regulatsioonis ja juhtivuses	39
2.4.2	MED25 roll õhulõhede arengus ja tiheduse kujunemises.....	40
2.4.3	Transgeensed liinid.....	42
2.4.4	PHYB mõju õhulõhede CO ₂ reaktsioonidele ja indeksile	44
2.4.5	Vastamata küsimused ja uurimise tulevikusuunad	44
2.4.6	Järeldused.....	45
	KOKKUVÕTE	46
	RESÜMEE	47
	TÄNUAVALDUSED.....	48
	KASUTATUD KIRJANDUS.....	48
	KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	55
	LISAD.....	56
	LISA 1.....	56
	LISA 2.....	57
	LIHTLITSENTS	58

Kasutatud lühendid

ABA, *abscisic acid* - abstsiihape, mitmeid stressivastuseid algatav taimehormoon

AHA1, *Arabidopsis thaliana* H⁺-ATPASE ISOFORM 1 - *Arabidopsis thaliana* H⁺-ATPaasi isovorm

AKT1, ARABIDOPSIS THALIANA K⁺ TRANSPORTER 1 - *Arabidopsis thaliana* kaaliumi sissevoolu kanal

BHP, BLUE LIGHT-DEPENDENT H⁺-ATPASE PHOSPHORYLATION - valk, mis reguleerib H⁺-ATPaasi fosforüleerimist sinise valguse mõjul

BLUS1, BLUE LIGHT SIGNALING 1 - kinaas, mis osaleb sinise valguse signaalirajas

CA, CARBONIC ANHYDRASE - karboonhappe anhüdraas

CO, CONSTANS - osaleb õitsemise regulatsioonis pika päeva tingimustes

COP1, CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 - konstitutiivne fotomorfogeen 1, represserib valguse mõjutatud arengulisi protsesse

CRY1, CRYPTOCHROME 1 - krüptokroom 1, sinise valguse retseptor

CRY2, CRYPTOCHROME 2 - krüptokroom 2, sinise valguse retseptor

DCMU, 3-(3,4-diklorofenüül)-1,1-dimetüülurea - fotosünteesi inhibiitor

ERA1, ENHANCED RESPONSES TO ABA1 – kannab üle ABA vahendatud signaale

FT, FLOWERING LOCUS T, õitsemise lookus T, õitsemise alustamise regulaator

GFP, GREEN FLUORESCENT PROTEIN - laialdaselt markerina kasutatav valk

GHR1, GUARD CELL HYDROGEN PEROXIDE-RESISTANT 1 - pseudokinaas, mis reguleerib õhulõhede sulgumist

GORK, GATED OUTWARDLY-RECTIFYING K⁺ CHANNEL - kaaliumioone rakust välja viiv kanal

GUS, BETA- GLUCURONIDASE - taimebioloogias kasutatav reportergeeni süsteem

HT1, HIGH LEAF TEMPERATURE 1 – õhulõhede sulgumist ja avanemist reguleeriv kinaas

KAT1, POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 1 - *Arabidopsis thaliana* kaaliumi sissevoolu kanal

KAT2, POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 2 - *Arabidopsis thaliana*
kaaliumi sissevoolu kanal

LED, *light emitting diode* - valgust kiirgav diod

MED25, MEDIATOR25 - transkriptsiooni mediaatorkompleksi subühik, teise nimega PFT1

MPK4, MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 4 - mitogeen aktiveeritud kinaas 4

MPK12, MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 12 - mitogeen aktiveeritud kinaas 12

OST1, OPEN STOMATA 1 - kinaas, mis reguleerib õhulõhede sulgumist ja avanemist

PFT1, PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1 - transkriptsiooni mediaatorkompleksi subühik, teise nimega MED25

PHOT1, PHOTOTROPIN1 - fototropiin 1, sinise valguse retseptor

PHOT2, PHOTOTROPIN2 - fototropiin 2, sinise valguse retseptor

PHYB, PHYTOCHROME B - fütokroom b, üks punase valguse retseptoritest

PP1, PROTEIN PHOSPHATASE 1 - valgu fosfataas 1, toimib sinise valguse signaalirajas

PP2C, PROTEIN PHOSPHATASE 2C - valgu fosfataas 2C, osaleb õhulõhede sulgumises
ABA mõjul

PRSL1, PP1 REGULATORY SUBUNIT2, LIKE PROTEIN 1 - PP1 reguloorne subühik,
oluline ABA signaalirajas

PYL, PYR1- LIKE - PYR1 taoline valk ABA retseptor

PYR1, PYRABACTIN RESISTANCE 1 - pürabaktiini resistentsus 1, ABA retseptor

RCAR, REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTORS - ABA retseptorite
reguloorsed komponendid, ABA retseptor

SAS, SHADE AVOIDANCE SYNDROME - varju vältimise sündroom

SLAC1, SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1 - aeglane anioonkanal 1, viib ioone
rakust välja

SLAH3, SLAC1 HOMOLOG 3 - SLAC1 homoloog 3, viib ioone rakust välja

T-DNA, transfer DNA – ülekantud DNA järjestus

Taimegeneetika nomenklatuur: *GEEN*, VALK, *mutant*, triviaalnimetus

Sissejuhatus

Taimed seovad fotosünteesides süsihappegaasi suuremateks orgaanilisteks ühenditeks, kõrvalproduktina eraldub atmosfääri hapnik, mis on eluks vajalik kõikidele aeroobsetele organismidele. Kogu inimkonna poolt tarbitav toiduenergia on samuti otseselt või kaudselt taimede poolt toodetud. Seetõttu on taimede sügavam mõistmine perspektiivne investering inimkonna toiduga varustamiseks ka tulevikus.

Atmosfäärist süsihappegaasi ammutamiseks on taimelehtedes väikesed poorid, mida kutsutakse õhulõhedeks. Lisaks süsihappegaasi sissevoolule kaotavad taimed õhulõhede kaudu ka vett, kuid vesi on taimedele paljudes tingimustes piiratud ressurss. Õhulõhe koosneb kahest sulgrakust ja nende vahele moodustuvast õhupilust. Sulgrakud suudavad oma turgori muutmise abil kiiresti reguleerida õhupilu suurust vastavalt erinevatele keskkonnatingimustele. Õhulõhed avanevad valguse, madala süsihappegaasi kontsentratsiooni ja kõrge õhuniiskuse toimel ning sulguvad pimeduse, kõrge süsihappegaasi kontsentratsiooni, madala õhuniiskuse ja patogeenide mõjul. Valgus on väga tugev avanemistegur, kuid õhulõhed ei reageeri erineva lainepikkusega valgusele ühtemoodi. Sinine valgus põhjustab väga kiire ja tugeva õhulõhede avanemisreaktsiooni, kuid punasele valgusele reageerivad õhulõhed aeglasemalt ja nõrgemalt.

Molekulaarsed mehhanismid õhulõhede avanemisel sinises valguses on praeguseks võrdlemisi hästi uuritud. Siiski on punase valguse mõjul toimuva avanemise molekulaarsed mehhanismid siiani suuresti teadmata ja teadlaste seas valitseb ebakõla. Eksisteerib mitmeid üksteisele vastuolulisi teooriaid, kuid ilmselt peitub tõde kuskil vahepeal. Õhulõhede regulatsiooni paremaks mõistmiseks punases valguses on paslik täiendada teadmisi võimalike signaaliradade komponentide tuvastamise näol.

MED25 oli varem teada kui geen, mis mõjutab taimerakkude kasvu ja arengut. Kuna *MED25* ekspressioon oli sulgrakkudes rikastatud, oli käesoleva töö eesmärk uurida *MED25* rolli taime õhulõhede regulatsioonis ja arengus. Selleks kasutati mudeltaimena hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) Col-0 ökotüüpi ja mutantseid taimeliine. Taimede õhulõhede juhtivus määrati gaasivahetusseadmetega, mis mõõdavad taimedest eralduva veeauru koguse ja arvutavad selle järgi õhulõhede juhtivuse. Õhulõhede arengu uurimiseks valmistati taimelehtedest lehejäljendid ja määrati neilt õhulõhede tihedus ja indeks võimalike arenguliste mõjude tuvastamiseks. Lisaks valmistati transgeensed komplementatsiooni ja lokaliseerimise taimeliinid *MED25* funktsiooni täpsemaks välja selgitamiseks.

Töö koostati Tartu Ülikooli tehnoloogainstituudis taimsete signaalide uurimiserühmas.

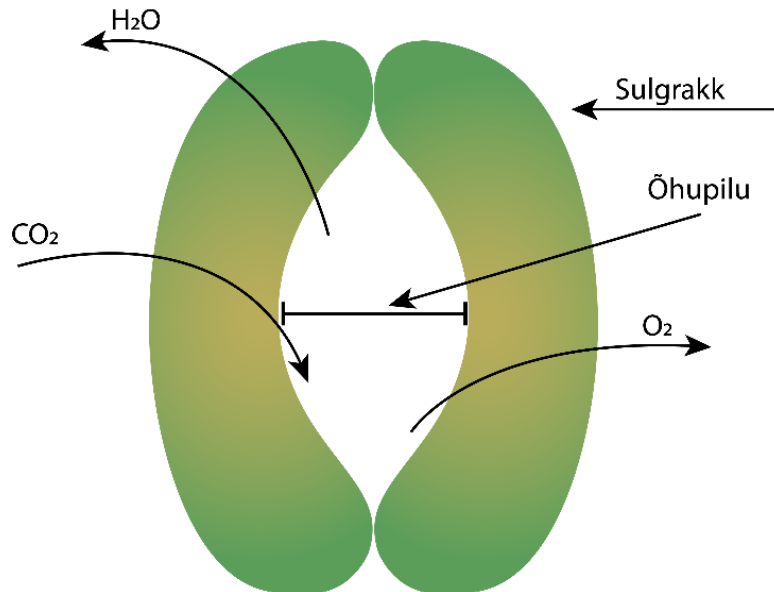
1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Harilik müürlook

Harilik müürlook ehk *Arabidopsis thaliana* on taimebioloogias katteseemnetaimedest enim uuritud ja laialdasemalt kasutatav mudel organism (Koorneef ja Meinke, 2010). Harilik müürlook on kapsalaadsete seltsi kuuluv laia loodusliku levikuga taim. Tema looduslik leviala hõlmab Euroopat, Aasiat ja Põhja-Ameerikat. Taimel on väga kiire elutsükl, seemnest on võimalik uus seeme saada kuue nädalaga (Meinke *et al.*, 1998). Lühike elutsükl, väike suurus, suur seemnete hulk, väike genoom ja madal kordusjärjestuste hulk genoomis teevad hariliku müürlooga väga sobilikuks mudel organismiks (Goodman *et al.*, 1995). Harilikul müürloogal on diploidne viie kromosoomipaariga 156 miljoni aluspaari suurune genoom, katteseemnetaimede hulgas on tema genoom üks väiksemaid (Krämer, 2015).

1.2 Õhulõhed

Õhulõhed on soon- ja sammaltaimede epidermis asuvad poorid, mida leidub kõikidel maapealsetel taimeosadel. Õhulõhe moodustub kahest spetsialiseerunud rakust, mida kutsutakse sulgrakkudeks, avast sulgrakkude vahel kutsutakse õhupiluks. Õhulõhede kaudu pääseb taimelehe sisemusse fotosünteesiks vajalik süsihappegaas, kuid samal ajal väljuvad taimest ka vesi ja hapnik (Joonis 1.). Sulgrakud reguleerivad turgorimuutuse abil õhulõhede avatust, vastavalt taime vajadustele ja keskkonnatingimustele (Blatt, 2000). Lisaks õhulõhede avatusele, mõjutavad keskkonnatingimused ka nende arvukust ja arengut (Schoch *et al.*, 1980). Õhulõhede sulgumise kutsuvad esile veepuudus, pimedus, kõrge süsihappegaasi tase ja madal õhuniiskus (Shimazaki *et al.*, 2007). Seevastu valgus ja süsihappegaasi taseme langus põhjustavad õhulõhede avanemise (Zeiger, 1983). Õhulõhede kaudu taimest eralduv vesi tekitab ksüleemitorudes tõusva vedelikuvoo, mis on vajalik mullas sisalduvate toitainete kättesaamiseks (Kollist *et al.*, 2014).



Joonis 1. Joonisel on kujutatud õhulõhe, mis koosneb kahest sulgrakust ja nende vahele moodustuvast õhupilust. Õhupilu kaudu väljuvad taimest veeaur ja hapnik ning siseneb süsihappegaas.

1.2.1 Õhulõhede avanemine

Õhulõhede avamiseks aktiveeritakse H^+ -ATPaas prootonpumbad, mis viivad prootonid (H^+) rakust välja. Selle tulemusena plasmamembraan hüperpolariseerub ja kaaliumioonid (K^+) liiguvad rakku läbi KAT1 (POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 1 - *Arabidopsis thaliana* kaaliumi sissevoolu kanal), KAT2 (POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 2 - *Arabidopsis thaliana* kaaliumi sissevoolu kanal) ja AKT1 (ARABIDOPSIS THALIANA K^+ TRANSPORTER 1 - *Arabidopsis thaliana* kaaliumi sissevoolu kanal) ionikanalite (Schachtman *et al.*, 1992; Pilot *et al.*, 2001; Szyroki *et al.*, 2001). Lisaks membraani hüperpolariseerumisele viib kaaliumkanalite aktiveerimiseni ka teine signaal, selleks on apoplasti hapestumine prootonite rakust väljavoolu tõttu (Daszkowska-Golec ja Szarejko, 2013). Kaaliumioonide sissevoolu tasakaalustamiseks transporditakse apoplastist rakku ka Cl^- ja NO_3^- ioonid ning raku sees tekib tärglisse lagundamise produktina malaat²⁻ (Daszkowska-Golec ja Szarejko, 2013). Ioonide sissevool sulgrakkudes põhjustab osmootse rõhu tõusu, mis toob kaasa vee sissevoolu rakku. See omakorda paneb sulgrakud paisuma ja nende vahele tekib õhupilu - õhulõhed avanevad.

1.2.2 Õhulõhede sulgumine

Õhulõhede sulgumiseks inhibeeritakse H^+ -ATPaasi töö ja aktiveeritakse anioonkanalid, mis transpordivad Cl^- , NO_3^- ja malaat²⁻ ioone rakust välja, nende sündmuste tulemusel plasmamembraan depolariseerub (Roelfsema *et al.*, 2004; Roelfsema ja Hedrich, 2005). Sulgrakkudes on S-tüüpi ehk aeglaste anioonkanalid ja R-tüüpi ehk kiired anioonkanalid. S-

tüüpi anioonkanalid ei sulgu kunagi täielikult ning reageerivad membraanipotentsiaali muutustele aeglaselt. R-tüüpi anioonkanalid avanevad kiiresti membraani depolarisatsiooni tõttu ning sulguvad uuesti hüperpolarisatsiooni korral (Schroeder ja Keller, 1992). Olulised S-tüüpi kanalid õhulõhede sulgumisel on SLAC1 (SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1 - aeglane anioonkanal 1, viib ioone rakust välja) ja SLAH3 (SLAC1 HOMOLOG 3 - SLAC1 homoloog 3, viib ioone rakust välja), kuna nende kanalite puudumise korral ei suuda taim õhulõhesid normaalselt sulgeda (Vahisalu *et al.*, 2008; Geiger *et al.*, 2011). Membraani depolariseerumise tulemusena käivitub GORK (GATED OUTWARDLY-RECTIFYING K⁺ CHANNEL - kaaliumioone rakust välja viiv kanal), mille kaudu liiguvad kaaliumioonid sulgrakust apoplasti (Ache *et al.*, 2000). Ioonide väljumise tõttu osmootne rõhk langeb ja vesi väljub sulgrakkudest. Vee väljavool põhjustab sulgrakkude kokkutõmbumise ja õhulõhed sulguvad.

1.3 Õhulõhede avanemine valguse mõjul

Üks õhulõhede avanemise stiimul on valgus. Avanemisreaktsiooni põhjustavad sinine ja punane, kuid mitte roheline valgus (Sharkey ja Raschke, 1981). Seejuures sinine valgus avab õhulõhesid punasest valgusest tunduvalt enam (Sharkey ja Raschke, 1981). Valge valgus sisaldab endas kõiki nähtava lainepikkusega valguseid ja seetõttu toimub valges valguses õhulõhede avanemisreaktsioon nii sinise kui ka punase valguse signaalide abil.

1.3.1 Punane valgus

Punase valguse tajumiseks on taimedel punast ja kaugpunast valgust tajuvad fütokroomid (fotoretseptorid), mis reguleerivad taimede kasvu ja arengut (Quail, 2002). Fütokroome on taimedes kokku viis: fütokroomid A, B, C, D ja E (Kaiserli ja Chory, 2016). Kõigil fütokroomidel on mitu konserveerunud domeeni, milleks on valkudega interakteeruv domeen, valgustundlik moodul, fütokroom spetsiifiline domeen ja histidiin-kinaasidele sarnane domeen (Kaiserli ja Chory, 2016). Fütokroomid saavad esineda homo- ja heterodimeeridena ja olla kahes valgusmuutlikus seisundis: Pr (punast valgust neelav vorm) ja Pfr (kaugpunast valgust neelav vorm) (Kaiserli ja Chory, 2016). Punase valguse neeldumisel muutuvad fütokroomid bioloogiliselt aktiivsesse Pfr seisundisse ja liiguvad signaaliülekandeks rakutuuma. Kui Pfr seisundis fütokroomid neelavad kaugpunast valgust, siis muutuvad nad tagasi inaktiivsesse Pr seisundisse, mis võimaldab fütokroomidel toimida valgustundlike molekulaarsete lülitena (Kevei *et al.*, 2007).

Fütokroomide võime tajuda punast ja kaugpunast valgust kvantitatiivselt teeb võimalikuks ka nende omavahelise suhte tajumise. Kõrge punase ja kaugpunase valguse suhe on heade

valgusolude indikaator, madal suhe annab aga märku otsese päikesevalguse puudumisest (Casal, 2013). Vastusena madalale punase ja kaugpunase valguse suhtele esineb taimedel SAS (SHADE AVOIDANCE SYNDROME - varju vältimise sündroom), mis tingib mitmeid arengu muutusi, näiteks on taimede lehed õhemad ja pikemate leherootsudega, klorofüllis sisaldus lehtedes on madalam ning taimed panustab rohkem pikkuskasvule (Mclaren ja Smith, 1978; Smith ja Whitelam, 1997).

Õhulõhede avanemisreaktsiooni punases valguses on võimalik kaugpunase valgusega elimineerida (Talbot *et al.*, 2002; Talbot *et al.*, 2003). Kuna fütokroomide aktivatsioon toimub punases valguses ja inaktivatsioon kaugpunases valguses, võib Talbot *et al.*, 2002; 2003 tulemusi arvestades oletada, et fütokroomid osalevad punases valguses toimivas õhulõhede avanemisreaktsioonis. *PHYTOCHROME B* (*PHYB*, *FÜTOKROOM B* - fütokroom b, üks punase valguse retseptoritest) kodeerib punase valguse retseptorit fütokroom B (Sharrock ja Quail, 1989). Katsetes *FÜTOKROOM B* ala- ja üleekspressiooni mutantidega on näidatud, et õhulõhede avanemine punases valguses on positiivses seoses fütokroom B fotoretseptori hulga taimes (Wang *et al.*, 2010). See viitab fütokroom B osalusele signaalirajas, mis avab õhulõhed vastusena punasele valgusele. Samas uuringus teostati katsed ka sinises valguses ning tulemused olid sarnased punase valgusega, mis võib tähendada seda, et fütokroom B toimib õhulõhede regulatsioonis laiahaardelisemalt kui vaid punase valguse reaktsioonides (Wang *et al.*, 2010).

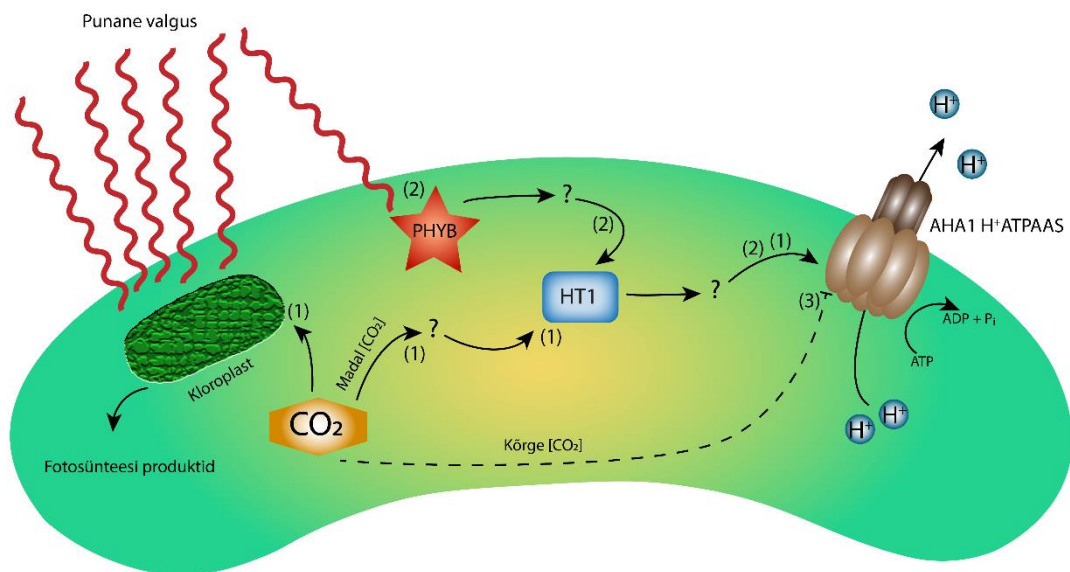
Sulgrakkude membraanipotentsiaali mõõtmise läbi on tuvastatud, et lokaalne sinise valguse kiir ühele õhulõhele hüperpolariseerib sulgrakkude plasmamembraani ja algatab avanemisreaktsiooni, sama katse punase valguse kiirega aga avanemisreaktsiooni ei tekita (Roelfsema *et al.*, 2001). Lehe laiema ala valgustamisel punase valgusega sulgrakkude plasmamembraan hüperpolariseerub ja õhulõhed avanevad, kuid membraanipotentsiaali mõõtmiste andmetel tundub see protsess olevat identne reaktsiooniga madalalale CO₂ kontsentratsioonile (Roelfsema *et al.*, 2002). Neid tulemusi arvesse võttes tundub tõenäoline, et sulgrakud ei reageeri otse punasele valgusele, vaid fotosünteesi käigus langenud lehesisesele CO₂ kontsentratsioonile (Roelfsema *et al.*, 2002). Antud teooriat toetavad ka eksperimendid, kus kõigepealt rakendati tugevat fotosünteesi inhibiitorit DCMU (3-(3,4-diklorofenüül)-1,1-dimetüülurea - fotosünteesi inhibiitor) ning seejärel uuriti avanemisreaktsioone erinevates valgustingimustes. Fotosünteesi inhibeerimise tulemusena ei avanud taimed õhulõhesid punase valguse toimel, kuid sinises valguses oli avanemisreaktsioon ainult osaliselt häiritud (Schwartz ja Zeiger, 1984). Ülalkirjeldatud teooriat ei toeta aga eksperimendid, kus rakusisest CO₂ kontsentratsiooni hoitakse konstantsel väärtusel ning taim on punase valguse tingimustes.

Õhulõhed avanevad punases valguses ka konstantse rakusise CO₂ kontsentratsiooni korral, mis annab alust arvata, et eksisteerib spetsiifiline signaalirada õhulõhede regulatsiooniks punases valguses (Messinger *et al.*, 2006).

Mitmete uuringute tulemusel on näidatud, et õhulõhede avanemine punases valguses on sõltuv fotosünteesist (Sharkey ja Raschke, 1981; Schwartz ja Zeiger, 1984). Õhulõhede avanemiseks punases valguses fosforüleeritakse AHA1 (*Arabidopsis thaliana* H⁺-ATPASE ISOFORM 1 - *Arabidopsis thaliana* H⁺-ATPaasi isovorm) prootonpump ja selle protsessi toimimiseks on vajalik fotosüntees (Ando ja Kinoshita, 2018). Ühe variandina fotosünteesi vajalikkuse selgitamiseks on pakutud kõrge rakusise CO₂ kontsentratsiooni inhibeeriv mõju AHA1 prootonpumbale (Edwards ja Bowling, 1985). Selle teooria kohaselt on madal rakusine CO₂ kontsentratsioon abiks õhulõhede avanemisel punases valguses, kuid madal CO₂ tase ei ole iseseisvalt signaal avanemiseks. Eksperimentaalselt on tõestatud, et madala CO₂ kontsentratsiooni korral pimeduses ei toimu AHA1 prootonpumba fosforüleerimist (Ando ja Kinoshita, 2018). Need tulemused näitavad, et fotosünteesi käigus alanenud CO₂ kontsentratsioon pole piisav selgitamaks õhulõhede avanemist punases valguses.

Punases valguses õhulõhede avanemisel on ühe olulise komponendina tuvastatud HT1 (HIGH LEAF TEMPERATURE 1 - õhulõhede sulgumist ja avanemist reguleeriv kinaas) kinaas (Matrosova *et al.*, 2015). Uuringus kasutati *ht1* mutantseid taimi ning leiti, et mutantidel on kadunud õhulõhede reaktsioonid punasele valgusele (Matrosova *et al.*, 2015). Samades mutantides säilisid vastused sinisele valgusele ja häireid ei tuvastatud ka punase valguse poolt reguleeritud arengulistest protsessidest. Uurimaks võimalust, et punases valguses õhulõhede avanemine toimib läbi madala CO₂ kontsentratsiooni, viidi läbi eksperimendid CA (CARBONIC ANHYDRASE - karboonhappe anhüdraas) mutantidega, millel on puudulik avanemist vastus madalale CO₂ signaalile. Võrreldi õhulõhede avanemist punase valguse ja madala CO₂ kontsentratsiooni tingimustes ning selgus, et punases valguses toimus õhulõhede avanemine, kuid madala CO₂ tingimustes mitte (Matrosova *et al.*, 2015).

Pole veel üheselt selge, kas õhulõhede avanemine punases valguses (Joonis 2.) on tingitud fotosünteesiga kaasnevast CO₂ kontsentratsiooni langusest, spetsiifilisest punase valguse poolt esilekutsutud avanemisreaktsioonist või nende kombinatsioonist. Arvestades uuringute tulemusi AHA1 prootonpumba fosforüleerimisest (Ando ja Kinoshita, 2018) ja konstantse CO₂ kontsentratsiooniga sooritatud katsetest (Messinger *et al.*, 2006), tundub tõenäoline, et õhulõhede avanemine punases valguses on komplekssem, kui vaid madala CO₂ kontsentratsioonist tingitud õhulõhede avanemine. Üksikasjade välja selgitamiseks vajavad õhulõhede reaktsioonid punases valguses täiendavat uurimist.



Joonis 2. Punase valguse mõjul toimuvad protsessid sulgrakkudes. (1) Punase valguse mõjul toimub kloroplastis fotosüntees ja sulgrakusisene CO₂ kontsentratsioon langeb. HT1 saab signaali madalast CO₂ kontsentratsioonist ning algatab signaaliülekanne, mis viib AHA1 H⁺-ATPaasi aktiveerimiseni. (2) PHYB tajub punase valguse kiirgust ja algatab signaaliülekanne teadmata komponentidele, signaal jõuab HT1 kinaasini, mis algatab signaaliülekanne AHA1 H⁺-ATPaasi aktiveerimiseks. (3) CO₂ kontsentratsiooni langedes vabaneb AHA1 H⁺-ATPaas kõrge CO₂ kontsentratsiooni inhibitsioonist ja võimaldab õhulõhede avanemise.

1.3.2 Sinine valgus

Sinine valgus on õhulõhedele väga tugev avanemistegur, punase valgusega võrreldes on avanemisreaktsioonid sinises valguses kordades kiiremad ja suurema amplituudiga (Sharkey ja Raschke, 1981). Kui taime hoida pideva punase valguse tingimustes ja umbes minutiks lisada oluliselt nõrgem sinine valgus, siis õhulõhed avanevad kiiresti, saavutavad maksimaalse avatuse umbes 15 minuti möödudes ja avatus taastub algväärtusele ühe tunni möödudes (Iino *et al.*, 1985).

Taimedes on praegu teada kahte tüüpi sinise valguse retseptoreid - fototropiinid [PHOT1 (PHOTOTROPIN 1 - fototropiin 1, sinise valguse retseptor) ja PHOT2 (PHOTOTROPIN 2 - fototropiin 2, sinise valguse retseptor)] ja krüptokroomid [CRY1 (CRYPTOCHROME 1 - krüptokroom 1, sinise valguse retseptor) ja CRY2 (CRYPTOCHROME 2 - krüptokroom 2, sinise valguse retseptor)] (Cashmore *et al.*, 1999; Briggs ja Christie, 2002). Krüptokroomide evolutsioonilised eellased on fotolüaasid, mis tegelevad näiteks inimorganismis ultraviolettkiirguse poolt tekitatud DNA kahjustuste parandamisega (Sancar, 1994). Taimedes reguleerivad krüptokroomid olulisi sinise valgusega seotud arenguprotsesse ja ööpäevaseid rütme, kuid õhulõhede regulatsioonis ei ole neil seni olulist rolli tuvastatud (Christie, 2007; Boccalandro *et al.*, 2012).

PHOT1 ja PHOT2 retseptorite funktsioonid on üksteist täiendavad ja vajadusel ka asendavad, kummagi retseptori üksikmutandid suudavad endiselt reageerida sinisele valgusele (Kinoshita *et al.*, 2001). Mõlema retseptori puudulikkusega topeltmutandid samas ei ava õhulõhesid sinise valguse tingimustes, mis kinnitab PHOT1 ja PHOT2 retseptorite olulisust õhulõhede reageerimisel sinisele valgusele (Kinoshita *et al.*, 2001).

Sinise valguse mõjul fototropiinid autofosforüleeruvad ja algatavad signaaliülekanne õhulõhede avamiseks (Kinoshita *et al.*, 2001; Christie, 2007). Aktiveeritud fototropiinid fosforüleerivad edasiseks signaaliülekanne kinaasi BLUS1 (BLUE LIGHT SIGNALING 1 - kinaas, mis osaleb sinise valguse signaalirajas), mis omakorda kannab signaali edasi fosfataasile PP1 (PROTEIN PHOSPHATASE 1 - valgu fosfataas 1, toimib sinise valguse signaalirajas) ja selle reguleatorsele subühikule PRSL1 (PP1 REGULATORY SUBUNIT 2-LIKE PROTEIN 1 - PP1 reguleatorne subühik, oluline ABA signaalirajas) (Takemiya *et al.*, 2006; Takemiya *et al.*, 2013; Takemiya ja Shimazaki, 2016). Sinise valguse signaalirajas on veel teada Raf-tüüpi kinaas BHP (BLUE LIGHT-DEPENDENT H⁺-ATPASE PHOSPHORYLATION - valk, mis reguleerib H⁺-ATPaasi fosforüleerimist sinise valguse mõjul), mis interakteerub BLUS1 ja PP1 signaaliraja komponentidega ning ka PHOT1 ja PHOT2 retseptoritega, kuid mitte H⁺-ATPaasiga (Hayashi *et al.*, 2017). Komponenti, mis sinise valguse signaalirajas õhulõhede avamiseks otseselt H⁺-ATPaasi aktiveerib, pole veel tuvastatud.

Võrreldes õhulõhede avanemisega punases valguses, on sinise valguse avanemisreaktsioonide molekulaarsed protsessid võrdlemisi hästi teada. Sinise valguse toimel õhulõhede avanemise protsessis on identifitseeritud signaali vastu võtvad fotoretseptorid ja suur osa signaaliraja komponentidest, kuid endiselt on veel teadmata, kuidas reguleeritakse H⁺-ATPaasi fosforüleerimist.

1.4 Õhulõhede regulatsioon CO₂ mõjul

Taimede õhulõhed muudavad oma avause läbimõõtu vastusena muutuvale keskkonna CO₂ kontsentratsioonile, tagades fotosünteesiks ühtlase CO₂ juurdevoolu (Raschke, 1975). Ei ole täpselt selge, kuidas taimed CO₂ kontsentratsiooni muutuseid tajuvad, kuid praegused tulemused viitavad sellele, et karboonhappe anhüdraasid on olulised juba varajastes CO₂ regulatsiooni etappides (Hu *et al.*, 2010). Karboonhappe anhüdraasid konverteerivad lahustunud CO₂ bikarbonaadiks ja prootoniteks ning praeguste tulemuste põhjal on teada, et puuduliku karboonhappe anhüdraasi aktiivsusega taimedel on õhulõhede reageerimine CO₂ kontsentratsiooni muutustele tugevalt häiritud (Hu *et al.*, 2010). Komplementeerides samu

taimi inimesest pärit karboonhappe anhüdraasiga taastus taimede võime reguleerida õhulõhede avatust vastusena CO₂ kontsentratsiooni muutustele. Siit on võimalik järeldada, et taimed kasutavad CO₂ kontsentratsiooni hindamiseks bikarbonaadi taset (Hu *et al.*, 2010).

Üks keskne komponent CO₂ mõjul toimivas õhulõhede regulatsioonis on HT1 kinaas. Eksperimentide tulemused näitavad, et *HT1* mutantsete alleelidega taimede õhulõhed kaotavad täielikult võime reageerida CO₂ kontsentratsiooni muutustele (Hashimoto *et al.*, 2006; Hashimoto-Sugimoto *et al.*, 2016; Hõrak *et al.*, 2016). HT1 aktiivus on kontrollitud mitogeen-aktiveeritud kinaaside MPK4 (MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 4 - mitogeen aktiveeritud kinaas 4) ja MPK12 (MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 12 - mitogeen aktiveeritud kinaas 12) poolt, mis on sarnaselt HT1-le hädavajalikud õhulõhede regulatsioonis vastusena muutuva CO₂ kontsentratsioonile (Hõrak *et al.*, 2016; Jakobson *et al.*, 2016; Tõldsepp *et al.*, 2018). Tavasihtuatsioonis inhibeerib HT1 OST1 (OPEN STOMATA 1 - kinaas, mis reguleerib õhulõhede sulgumist ja avanemist) kinaasi aktiivsust, kuid kõrge CO₂ kontsentratsiooni korral on HT1 inhibeeritud MPK4 ja MPK12 poolt, mis vabastab OST1 inhibitsiooni alt (Tian *et al.*, 2015; Hõrak *et al.*, 2016; Jakobson *et al.*, 2016; Tõldsepp *et al.*, 2018). Inhibitsiooni alt vabanenud OST1 on võimeline aktiveerima SLAC1 anioonkanali, mis algatab õhulõhede sulgumise kõrge CO₂ kontsentratsiooni tingimustes (Vahisalu *et al.*, 2008; Geiger *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Vahisalu *et al.*, 2010). Näidatud on ka GHR1 (GUARD CELL HYDROGEN PEROXIDE-RESISTANT1 - pseudokinaas, mis reguleerib õhulõhede sulgumist) pseudokinaasi toimimine osaliselt kattuvast signaalirajas, mille funktsiooni kadumise korral on taimedel õhulõhede sulgumine oluliselt häiritud (Hõrak *et al.*, 2016; Sierla *et al.*, 2018).

Süsihappegaasi kontsentratsiooni langedes avavad taimed fotosünteesi optimaalse efektiivsuse tagamiseks õhulõhed (Raschke, 1975), kuid vastavast signaalirajast on tänaseni veel vähe teada. Õhulõhede avanemisest madala CO₂ tingimustes on hetkel teada, et HT1 kinaas on oluline lüli, mille puudumise korral ei reageeri õhulõhed CO₂ kontsentratsiooni muutustele (Hashimoto *et al.*, 2006). Samuti ei reageeri madalale CO₂ kontsentratsioonile *calca4* karboonhappe anhüdraaside topeltnutant (Hu *et al.*, 2010). Olulised on ka MPK4 ja MPK12, mille puudumisel samuti õhulõhed ei reageeri CO₂ kontsentratsiooni muutustele (Hõrak *et al.*, 2016; Jakobson *et al.*, 2016; Tõldsepp *et al.*, 2018). Signaaliraja lõpuks aktiveeritakse H⁺-ATPaas, mis algatab õhulõhede avanemisprotsessi, kuid teisi signaaliraja komponente ei ole hetkel leitud.

1.5 Õhulõhede sulgumine abstsiihappe mõjul

ABA (*abscisic acid*, abstsiihappe) on fütohormoon, mis reguleerib taimede kasvu ja arengut ning vastuseid abiootilistele ja biootilistele stressiteguritele (Cutler *et al.*, 2010). ABA põhjustab taimede õhulõhede kiire sulgumise ja olenevalt kontsentratsioonist võib mõju kesta mitmeid päevi (Mittelheuser ja Steveninck, 1969; Jones ja Mansfield, 1970). ABAst tingitud signaalirada õhulõhede sulgumiseni on molekulaarsel tasemel seni kõige paremini kirjeldatud. ABA seondub PYR1 (PYRABACTIN RESISTANCE 1 - pürabaktiini resistentsus 1, ABA retseptor), PYL (PYR1-LIKE - PYR1 taoline valk, ABA retseptor) ja RCAR (REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTORS - ABA retseptorite regulatoorsed komponendid, ABA retseptor) retseptoritele, mis moodustavad suure valkude perekonna (Gonzalez-Guzman *et al.*, 2012). ABA ja retseptorite kompleksid seonduvad omakorda PP2C (PROTEIN PHOSPHATASE 2C - valgu fosfataas 2C, osaleb õhulõhede sulgumises ABA mõjul) fosfataasidega, inaktiveerides viimased. Aktiivses olekus inhibeerivad PP2C fosfataasid OST1 kinaasi (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Tischer *et al.*, 2017), ABA mõjul vabaneb OST1 inhibitsioonist ja toimub SLAC1 anioonkanali aktivatsioon õhulõhede sulgumiseks (Geiger *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009).

1.6 Keskkonnatingimuste mõju õhulõhede indeksi kujunemisele

Taimede jaoks olulised õhulõhede tihedust ja indeksit (õhulõhede arv jagatud õhulõhede ja teiste epidermirakkude summaga samal pindalal) mõjutavad keskkonnategurid on CO₂ kontsentratsioon ja valguse hulk. Kõrgema CO₂ kontsentratsiooni tingimustes kasvades on õhulõhede tihedus madalam ning kõrgema valgusintensiivsuse korral on õhulõhede tihedus kõrgem (Schoch *et al.*, 1980; Casson ja Gray, 2008).

Lisaks suuremale õhulõhede tihedusele toob kõrgem valgusintensiivsus kaasa ka õhulõhede indeksi kasvu (Casson *et al.*, 2009). Kõrge intensiivsusega monokromaatilises punases valguses kasvanud taimedel oli kõrgem õhulõhede indeks, kuid kui samu taimi töödeldi fotoperioodi lõpus lisaks kaugpunase valgusega, ilmnes õhulõhede indeksi vähenemine (Boccalandro *et al.*, 2009; Casson *et al.*, 2009). Punase ja kaugpunase valguse omavaheline seos viitab fütokroomide olulisele rollile õhulõhede arengus (Casson *et al.*, 2009). Suurimad arengulised häired tekivad fütokroom B fotoretseptori puudumisel, mistõttu on hetkel fütokroomide seast omistatud peamine tähtsus õhulõhede arengus just sellele fotoretseptorile (Casson *et al.*, 2009).

1.7 MED25 (PFT1) - mediaatorkompleksi subühik

PFT1 (PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1 - transkriptsiooni mediaatorkompleksi subühik, teise nimega MED25) valk identifitseeriti esmalt kui varju vältimise positiivne

regulaator (Cerdán ja Chory, 2003). Hiljem tuvastati, et PFT1 on homoloogne transkriptsiooni mediaatorkompleksi subühikuga MED25 (MEDIATOR25 - transkriptsiooni mediaatorkompleksi subühik, teise nimega PFT1) (Bäckström *et al.*, 2007). Mediaatorkompleksi põhifunktsioon on DNA-le seondunud transkriptsioonifaktorite signaalide edastamine RNA polümeraas II-le (Allen ja Taatjes, 2015).

MED25 on oluline taimede raku suuruse ja arvu määramisel, vähese MED25 ekspressiooni korral on taimede organid metsiktüüpi taimede omadest oluliselt suuremad, üleekspressiooni korral aga hoopis väiksemad (Xu ja Li, 2011). Võttes arvesse, et madala MED25 ekspressiooniga mutantidel on ka rakud suuremad ja arvukamad, arvatakse, et MED25 kontrollib rakkude kasvu ja paljunemist (Xu ja Li, 2011).

MED25 on oluline soola- ja põuastressiga toimetulekuks (Elfving *et al.*, 2011). MED25 funktsiooni häirega mutandid on metsiktüüpi taimedega võrreldes oluliselt soolatundlikumad (Elfving *et al.*, 2011). Hariliku müürlooga mutandid, millel on defektne MED25, on põuale oluliselt vastupidavamad kui metsiktüüpi taimed, 86,2% mutantidest elas põua üle samas, kui metsiktüüpi taimedest suutis seda teha vaid 33,3% (Elfving *et al.*, 2011). GUS markeriga ekspressiooni lokalisatsiooni uurides selgus, et MED25 ekspresseerub tugevalt õhulõhedes, mis võib selgitada põuale vastupidavust (Fornero *et al.*, 2017).

MED25 mutantidel esineb hilise õitsemise fenotüüp, *phyB med25* topeltmutant õitses samuti hiljem, kuigi *phyB* mutandid on teadaolevalt varased õitsejad. See viitab MED25 tugevale seotusele PHYB-ga õite arengu signaalirajas (Cerdán ja Chory, 2003) ja sellele, et MED25 asub õitsemise signaalirajas PHYB-st allavoolu. On teada, et PHYB annab ebasoodsates valgusoludes signaali edasi MED25-le, et reguleerida FT (FLOWERING LOCUS T - õitsemise lookus T, õitsemise alustamise regulaator) ekspressiooni (Cerdán ja Chory, 2003). MED25 annab signaali edasi CO (CONSTANS - osaleb õitsemise regulatsioonis pika päeva tingimustes) transkriptsioonifaktorile, mis algatab FT transkriptsiooni õitsemise alustamiseks (Iñigo *et al.*, 2012). Transkriptsioonifaktor CO on reguleeritud krüptokroomide ja fütokroomide poolt ning toimib keskse komponendina taimede fotoperioodi reguleerimises (Iñigo *et al.*, 2012).

Hetkel on teada, et MED25 on oluline taime arengulisteks protsessideks nagu õitsemise algatamine ja rakkude suuruse ning arvukuse kontroll (Xu ja Li, 2011; Iñigo *et al.*, 2012). Huvitavaks omaduseks on ka seos põua- ja soolastressiga ning kõrge ekspressioon sulgrakkudes (Elfving *et al.*, 2011; Fornero *et al.*, 2017), viimane võib tähendada osalust õhulõhede

regulatsioonis, mis on väärt edasist uurimist. Seni ei ole MED25 mutantidega teostatud gaasivahetusuuringuid, mistõttu ei ole teada MED25 mõju õhulõhede juhtivusele.

2 Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärgid

Selgitada välja *MED25* mõju õhulõhede regulatsioonile ja arengule. All olevate punktidenä on loetletud täpsustatud eesmärgid.

- Selgitada, kas ja kuidas mõjutab *MED25* õhulõhede avanemisreaktsioone sinise ja punase valguse ning madala CO₂ kontsentratsiooni toimel.
- Selgiada, kas ja kuidas mõjutab *MED25* õhulõhede sulgumisreaktsioone pimeduse, ABA ja kõrge CO₂ kontsentratsiooni toimel.
- Selgitada, kas ja kuidas mõjutab *MED25* õhulõhede tihedust, indeksit ja suurust.
- Taastada *MED25* funktsioon komplementeerides *med25-1* ja *med25-2* mutante *MED25* cDNA järjestusega.
- *MED25* transkriptsiooni toimumiskoha väljaselgitamine *MED25* promooteri reguleeritud GFP (GREEN FLUORESCENT PROTEIN - laialdaselt markerina kasutatav valk) ja GUS (BETA- GLUCURONIDASE - taimebioloogias kasutatav reportergeeni süsteem) markervalku kodeeriva lokaliseerimise vektoriga transformeeritud metsiktüüpi Col-0 taimede abil.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Kasutatud taimed

Eksperimentideks kasutatavateks taimedeks olid *A.thaliana* Col-0 ökotüüp ning mutandid *med25-1* (*SALK_059316*), *med25-2* (*SAIL_92_A10*), ja *phyB* (*SALK_022035*). Mutantsed taimeliinid olid pärit T-DNA (transfer DNA – ülekantud DNA järjestus) kogudest (Sessions *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2003). Metsiktüüpi Col-0 taimed olid eksperimentides kasutusel kontrolltaimedena. Gaasivahetuskatsete taimi kasvatati alguses nädal aega lühikese päeva valgusrežiimiga kasvutoas ning viidi pärast seda kasvukappi. Transformeerimiseks kasvatati taimi kaks nädalat lühikese päeva valgusrežiimiga kasvutoas ning pärast seda viidi pika päeva režiimiga kasvutuppa õitsemise kiirendamiseks. Kasutatud taimekasvatuskappideks olid Snijders Scientific Microclima Arabidopsis MCA1600-3lp6-E, mille kasvatustingimused olid järgnevad: valgusintensiivsus 100-150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, suhteline õhuniiskus 60-70%, temperatuur päeval 23°C ja öösel 18°C ning valgusrütmiks oli 12 h valgust ja 12 h pimedust. Kasvatustingimused kasvutubades olid järgnevad: valgusintensiivsus 100-150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, suhteline õhuniiskus 40-80%, temperatuur päeval 23°C ja öösel 18°C ning lühikese päeva

valgusrütmiks oli 12 h valgust ja 12 h pimedust ning pika päeva puhul 16 h valgust ja 8 h pimedust.

2.2.2 Taimede kasvatamine

Gaasivahetuskatsetes kasutatavad taimed külvati spetsiaalsetesse gaasivahetussüsteemiga sobivatesse gaasivahetuspottidesse (Kollist *et al.*, 2007). Gaasivahetuspotid on plastikust, nelinurkse kujuga ja nende peale on kinnitatud klaasplaat. Klaas on mõeldud taime maapealse osa ja kasvusubstraadi eraldamiseks, taimede kasvatamiseks on klaasi keskele puuritud 3-5 mm läbimõõduga koonusjas auk. Pottide põhjas on 4 auku, mis on mõeldud taimede kastmiseks altniisutuse põhimõttel. Kasvusubstraat koosnes turbast (Kekkilä), vermikuliidist ja veest mahusuhtega 2:1:1,5. Pottidesse lisati 250 grammi substraati ja klaasplaat asetati potile peale nii, et see puutuks kokku kasvusubstraadiga.

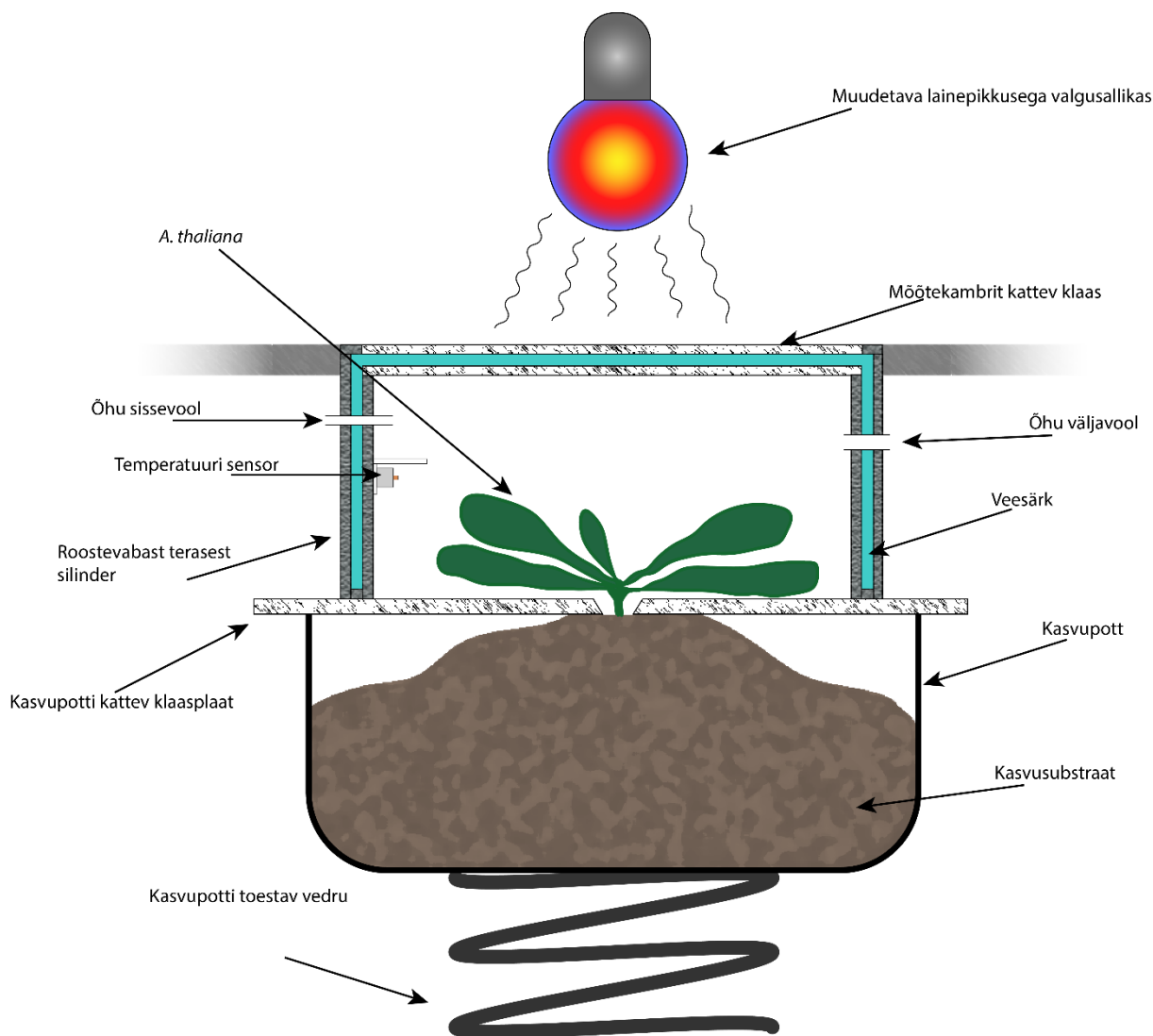
Enne külvamist hoiti taimede seemneid vähemalt kolm päeva +4°C vees, selline töötlus mimikeerib seemnetele talveperioodi esinemist ja seemned idanevad kiiremini ja ühtlasemalt. Vesisuspensioonis seemned külvati automaatpipeti abil läbi klaasplaadis oleva augu mullapinnale. Niiskuse tõstmiseks idanemisperioodil asetati klaasplaadi augu kohale tagurpidi Petri tass. Umbes nädal pärast külvamist olid taimed harvendamiseks piisavalt suured, harvendamine toimus pintsettide abil ja igasse potti jäeti kasvama üks taim. Pärast harvendamist hoiti Petri tassi potil veel umbes kolm päeva. Taimi kasteti üks kord nädalas altniisutuse meetodiga. Potid asetati kastmiseks vesivanni ja hoiti seal kuni nende kogumass oli umbes 340 ± 10 g. Col-0 ja *med25-1* taimedel kulus katseteks sobiva suuruseni (taime lehepindala > 5 cm²) kasvamiseks umbes 24 päeva, *med25-2* taimedel umbes 27 päeva ja *phyB* taimedel umbes 22 päeva. Külvamisajad valiti vastavalt kasvukiirusele.

2.2.3 Gaasivahetuskatsete aparatuur

Gaasivahetuskatsete seadmed on arendatud ja valmistatud töögrupi siseselt ja on täiustatud variandid varasemast seadmest (Joonis 3.; Kollist *et al.*, 2007). Katseteks kasutati kahte erinevat süsteemi – Sogd ja Jyrkki 2. Need seadmed koosnevad mõõtekambritest, CO₂ ja H₂O analüsaatorist (Li-Cor Li-7000), muudetava intensiivsusega LED (*light emitting diode* - valgust kiirgav diod) valgustitest (punane, sinine ja valge), termostaatidest, pumpadest, arvutist, CO₂ ja N₂ (ainult Jyrkki 2) gaasiballoonidest ja KOH kolonnist. Mõlemad seadmed on oma ehituselt ja tööpõhimõttelt sarnased. Määratakse mõõtekambris siseneva ja väljuva õhu CO₂ ja H₂O kontsentratsioonid ning arvutatakse nende vahe, mis annab infot, kui palju vett taimest transpireerus ja kui palju süsinikdioksiidi taim neelas.

Gaasivahetussüsteemidel on kaheksa roostevabast terasest silindrikujulist pealt klaasiga kaetud mõõtekambrit. Mõõtekambritel on kahekihilised seinad, mille vahele moodustub läbi termostaadi ringlev veesärk kambri temperatuuri ühtlasena hoidmiseks. Kambri sisetemperatuuri jälgimiseks asub seal temperatuuri sensor.

Õhu sisenemisava mõõtekambrisse on väiksem kui väljumisava. See tekitab õhu sisenemise suurel kiirusel võrreldes väljumisega ja segab efektiivselt kambri oleva õhu. Kambrist läbi käinud õhk liigub edasi CO₂/H₂O analüsaatorisse, mis edastab oma näidu arvutisse gaasivahetustarkvarale. See spetsiaalselt gaasivahetussüsteemide jaoks programmeeritud tarkvara arvutab mõõdetud andmete põhjal taimede õhulõhede juhtivuse. Jyrkki 2 gaasivahetussüsteemi puhul mõõdetakse esmalt võrdluseks 30 sekundit kambrisse sisenevat õhku ja seejärel 30 sekundit kambrist väljuvat õhku, kokku teeb see ühe kambri mõõteajaks ühe minuti. Ühes eksperimendis mõõdeti korraga nelja taime, mistõttu saadi üks ajapunkt iga 4 minuti järel kambri kohta, ülejäänud neljas kambri stabiliseeriti samal ajal taimed järgmiseks katseks. Sogd gaasivahetussüsteemi puhul kasutatakse CO₂/H₂O analüsaatori mõlemat mõõtekanalit ja selle abil mõõdetakse kambrisse sisenevat referentsõhku kambrist väljuva õhuga samaaegselt. Mõõteperioodiks on endiselt 30 sekundit ja kasutades nelja mõõtekambrit korraga saab kambri kohta ühe ajapunkti iga kahe minuti järel. Sogd gaasivahetussüsteemiga on vajalik, et üks mõõtekamber jääks alati CO₂/H₂O analüsaatori kalibreerimiseks vabaks. Sellel põhjusel mõõdeti Sogd süsteemiga korraga kolm taime + vaba kamber kalibreerimiseks.



Joonis 3. Gaasivahetusseadme mõõtekambri üldine skeem.

2.2.4 Gaasivahetuskatsete läbiviimine

Taimede kasvamisel läbi klaasplaadis oleva augu jääb taime varre ja klaasi vahele vaba ruumi, mille kaudu saavad kasvusubstraadist gaasid mõõtekambrisse eralduda ja katsetulemused ei oleks seeläbi enam täpsed. Selle avause sulgemiseks tihendati taimevarre ja klaasplaadi vaheline ala taimele ohutu vahaga (100 g vaseliini, 5 g mesilasvaha, 5 g parafiini). Kõik taimed pildistati digitaalkaameraga (Sony RX-100) vahetult enne eksperimenti, igale pildile lisati 30 x 10 mm millimeeterpaber mõõtkavaks. Taimede pindala mõõdeti piltide abil ImageJ rakendust kasutades (Schneider *et al.*, 2012).

Pärast ettevalmistusi asetati iga taim eraldi mõõtekambrisse ja oodati nende õhulõhede juhtivuse stabiliseerumist uutes tingimustes (24°C õhutemperatuur ja 65-75% suhteline õhuniiskus), taimed loeti stabiilseteks, kui nende õhulõhede juhtivus püsis ühtlasena vähemalt 16 minutit. Pärast taimede õhulõhede juhtivuse stabiliseerumist lisati stiimul õhulõhede avanemiseks või sulgumiseks. Õhulõhede avanemiseks kasutati 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intensiivsusega

punast või sinist valgust ning madalat süsihappegaasi kontsentratsiooni (100 ppm), õhulõhede sulgemiseks kasutati pimedust, ABA lahust ja kõrget süsihappegaasi kontsentratsiooni (800 ppm). Taimede õhulõhede juhtivust mõõdeti tunni aja jooksul pärast stiimuli lisamist. Avanemiskatseteks valguse mõjul hoiti taimi kõigepealt valgust mitte läbi laskva kattega pimendatud mõõtekambrites kuni nende stabiliseerumiseni. Avanemisreaktsiooni algatamiseks eemaldati mõõtekambritelt katted ja taimedele paistev valgus algatas õhulõhede avanemise. Pimeduse mõjul sulgumiskatseteks stabiliseerusid taimed valge valgusega mõõtekambrites ning pärast stabiliseerumist kaeti kambrid valgust mitte läbi laskva kattega. ABA mõjul õhulõhede sulgumiskatses stabiliseeriti taimed valge valguse käes. Pärast taimede stabiliseerumist pritsiti neid neli korda eelnevalt valmistatud 10 µM ABA lahusega (10 µM ABA (Carbosynth Ltd.); 0,1% etanooli; 0,024% Silwet L-77 (Momentive)) ja kuivatati poti klaasilt üleliigne lahus, seejuures hoidudes taime puutumast. Õhulõhede sulgemiseks kõrge CO₂ taseme mõjul stabiliseeriti taimed kõigepealt valge valguse käes 400 ppm CO₂ kontsentratsiooniga (normaalväärtus). Pärast õhulõhede juhtivuse stabiliseerumist tõsteti mõõtekambrites olevat CO₂ kontsentratsiooni manostaadi abil 800 ppm-ni. Õhulõhede avanemiseks madala CO₂ taseme mõjul stabiliseeriti taimed kõigepealt valge valguse käes. Süsihappegaasi kontsentratsiooni langetamiseks ühendati enne katse algust süsteemi õhuvoo vahele KOH kolonn, mis langetab CO₂ kontsentratsiooni 50-100 ppm peale. Taimede stabiliseerumise ajaks reguleeriti CO₂ kontsentratsioon kambris normaalväärtusele. Pärast taimede stabiliseerumist vähendati CO₂ sisaldus kambris väärtusele 100 ppm, mis algatas õhulõhede avanemise.

2.2.5 Transgeensete taimeliinide valmistamine

Transgeensete taimeliinide valmistamiseks tehti lokalisatsiooni ja komplementatsiooni vektorid. Lokalisatsiooni vektoritega transformeeriti *A. thaliana* Col-0 taimed *MED25* transkriptsiooni toimumiskoha visualiseerimiseks. Komplementatsiooni vektor sisestati *med25-1* ja *med25-2* taimeliinidesse rikutud *MED25* geeni funktsiooni taastamiseks.

2.2.5.1 Huvipakkuva DNA lõigu amplifitseerimine

DNA lõikude amplifitseerimiseks PCR reaktsiooniga kasutati Phusion polümeraasi (Thermo Scientific) veaparanduse aktiivsuse tõttu. Kasutatud primerid on välja toodud Lisa 1, tabelis 1. *MED25* promooterjärjestuse amplifitseerimiseks praimerite MED25pro F+PstI ja MED25pro R+EcoRI abil kasutati varasemalt kolleegi poolt eraldatud *A. thaliana* genoomset DNA-d. DNA järjestus GFP-GUS liitvalgu jaoks amplifitseeriti praimerite GFP F+EcoRI ja GFP R+HpaI abil kolleegilt saadud 35S:GFP-GUS(no intron)/pGEM-T Easy vektorilt.

Produkti eraldamiseks PCR reaktsioonisegust teostati proovidega geelelektroforees 1% agarooši (Fisher bioreagents) geelis etiidumbromiidiga (0,5 µg/ml) 100 V pingega. Produkti asukoht geelil visualiseeriti UV laual (Clever Scientific Ltd) ja see lõigati geelist skalpelliga välja. Järgnevalt eraldati DNA geelist Favorprep Gel/PCR purification mini kit (Favorgen) komplektiga vastavalt tootja protokollile.

MED25 cDNA kloneerimiseks eraldati esmalt RNA Col-0 taimedest E.Z.N.A Plant RNA kit (OMEGA BIO-TEK) komplekti abil. Saadud RNA alusel cDNA sünteesimiseks teostati pöördtranskriptsioon Revertaid (Thermo Scientific) pöördtranskriptaasiga. Kuna *MED25* cDNA-lt sünteesitud DNA järjestust (*MED25GEN* F+EcoRI ja *MED25GEN* R+HpaI) ei õnnestunud teadmata põhjustel agarosgeelist ega PCR reaktsioonisegust piisaval hulgal välja puhastada, siis kloneeriti *MED25* cDNA järjestus CloneJET PCR cloning kit (Thermo Scientific) komplekti abil vastavalt tootja protokollile pJET1.2/blunt vektorisse ja kasutati seda edasisel lõppvektori kloneerimisel.

2.2.5.2 Vektorite konstrueerimine

Taimede transformeerimiseks vajalike vektorite valmistamiseks kasutati pUBQ-PAM2-GFP-pCambia1390 binaarset vektorit (Lisa 2, Joonis 1.). Alustuseks lisati vektorisse *MED25* geeni promooterit sisaldav DNA järjestus pikkusega 1879 aluspaari. Selleks lõigati pUBQ-PAM2-GFP-pCambia1390 vektorit ja *MED25* promooterit sisaldavat järjestust EcoRI Fast Digest (Thermo Scientific) ja PstI Fast Digest (Thermo Scientific) restriктаasidega 15 min 37°C. Edasi puhastati restriktisoonisegust soovitud produkt geelelektroforeesi abil samal viisil nagu kirjeldatud peatükis 2.2.5.1. Järgnevalt ligeeriti promooter vektorisse T4 DNA ligaas (Thermo Scientific) ensüümi kasutades (1 tund toatemperatuuril) ning saadi vektor proMED25:GFP-pCambia1390. Vektorit kontrolliti PCR-ga (*MED25pro* F+PstI, *MED25pro* R+EcoRI) ja sekveneerimisega. Antud vektor sisaldab juba GFP valku kodeerivat DNA järjestust ning seega saadi üks lokaliseerimise vektor. Saadud vektorist valmistati edasi veel üks lokaliseerimise vektor ja komplementatsiooni vektor. Lokaliseerimise vektori valmistamiseks sisestati GFP-GUS liitvalku kodeeriv DNA järjestus pikkusega 2352 aluspaari proMED25-GFP-pCambia1390 vektorisse. Selleks lõigati proMED25-GFP-pCambia1390 vektorit ja GFP-GUS DNA järjestust EcoRI (Thermo Scientific) ja HpaI (Thermo Scientific) restriктаasidega 1 tund 37°C. Edasi puhastati restriktisoonisegust soovitud produkt geelelektroforeesi abil samal viisil nagu kirjeldatud peatükis 2.2.5.1. Järgnevalt ligeeriti GFP-GUS valku kodeeriv DNA järjestus vektorisse proMED25-GFP-pCambia1390 T4 DNA ligaas (Thermo Scientific) ensüümi kasutades (1 tund toatemperatuuril) ning saadi vektor proMED25:GFP-GUS-pCambia1390. Vektorit kontrolliti PCR-ga (GFP F+EcoRI, GFP R+HpaI) ja sekveneerimisega.

Komplementatsiooni vektori valmistamiseks sisestati *MED25* cDNA järjestus pikkusega 2511 aluspaari proMED25-GFP-pCambia1390 vektorisse. Selleks lõigati proMED25-GFP-pCambia1390 ja *MED25* cDNA järjestust sisaldav pJET1.2/blunt (CloneJET komplektist, Thermo Scientific) vektorit EcoRI (Thermo Scientific) ja HpaI (Thermo Scientific) restriktasididega 1 tund 37°C. Kuna *MED25* cDNA järjestust ei õnnestunud agarosgeelist teadmata põhjustel välja puhastada kasutati ligeerimiseks restriksioonisegu ja proMED25-GFP-pCambia1390 lõigatud ja puhastatud vektorit. Ligeerimine teostati T4 DNA ligaas (Thermo Scientific) ensüümi kasutades (1 tund toatemperatuuril), saadi vektor proMED25-MED25(cDNA)-pCambia1390. Vektorit kontrolliti PCR-ga (MED25GEN F+EcoRI, MED25GEN F2, MED25GEN R+HpaI, MED25GEN R2, MED25GEN R3) ja sekveneerimisega.

2.2.5.3 *Escherichia coli* transformeerimine

Escherichia coli transformeerimiseks kasutati tüve DH10B. Alustuseks lisati 1,5 ml tuubi 20 µl ligeerimissegule, 60 µl vett ja 20 µl 5 x KCM (0,5 M KCl (Serva); 0,15 M CaCl₂ (Scharlau); 0,25 M MgCl₂ (Scharlau)). Saadud segule lisati 120 µl laboris kolleegi poolt valmistatud kompetentseid *E. coli* rakke, mis olid eelnevalt jää peal sulatatud. Järgnevalt inkubeeriti saadud segu 20 - 30 minutit jääs ja tehti kuumašokk 42°C 90 sekundit vesivannis, pärast mida viidi segu otse jääle. Edasi lisati tuubi 500 µl LB (Sigma-Aldrich) söödet ja inkubeeriti 1 tund 37°C juures loksutil (New Brunswick Scientific). Järgnevalt plaaditi 200 µl saadud bakterikultuurist LB (Sigma-Aldrich) + 50 µg/ml kanamütsiiniga (Roth) selektiivsöötmega Petri tassile. Tasse inkubeeriti üleöö 37°C inkubaatoris (Labnet) ja kontrolliti kolooniate teket. Resistentsete kolooniate olemasolul teostati PCR reaktsioon transformatsiooni õnnestumise kinnitamiseks.

2.2.5.4 *Agrobacterium tumefaciens* transformeerimine

Agrobacterium tumefaciens transformeerimiseks kasutati tüve GV3101 laboris kolleegi poolt valmistatud kompetentseid rakke. Esmalt lisati 20 µl jäätunud rakkudele 300 - 500 ng plasmidi ja teostati kohene kuumašokk töötlus 37°C juures 5 minutit. Järgnevalt lisati rakkudele 300 µl LB söödet ja inkubeeriti 28°C loksutil 1 tund. Pärast inkubatsiooni plaaditi kõik rakud LB (Sigma-Aldrich) + 50 µg/ml kanamütsiiniga (Roth) selektiivsöötmega Petri tassile ja inkubeeriti 3 päeva 28°C inkubaatoris (Labnet). Õnnestunud transformatsiooni korral ilmusid tassile kolooniad.

2.2.5.5 Säilikute valmistamine

Edukalt transformeeritud bakterikultuuride pikaajaliseks säilitamiseks valmistati neist säilikud. Säiliku valmistamiseks võeti selektsiooniplaadilt üks sobilik koloonia ning kasvatati üleöö 3 ml

LB söötmes (Sigma-Aldrich) koos 50 µg/ml kanamütsiiniga. Kui bakterikultuur oli edukalt kasvanud, pipeteeriti 500 µl kultuuri krüotuubi ja lisati 500 µl 50% steriilset glütserooli (Lach-Ner) ja segati pipetiga suspendeerides. Saadud säilik viidi -80°C külmikusse.

2.2.5.6 Hariliku müürlooga transformeerimine *Agrobacterium tumefaciens*-iga

Transformeerimiseks kasutati õitsvaid hariliku müürlooga taimi, mida kasvatati viie kaupa ühes potis (8 x 8 x 6 cm). Õitsemise indutseerimiseks kasvatati taimi pika päeva tingimustes. Esmalt kasvatati eelnevalt valmistatud *A. tumefaciens* säilikutest üleöö kaks starterkultuuri 3 ml-s LB söötmes (Sigma-Aldrich) koos 50 µg/ml kanamütsiiniga (Roth). Starterkultuuridest tehti edasi transformeerimiskultuur, kumbki starterkultuur viidi edasi 30 ml ruumalale, söötmeks kasutati LB-d ja lisati kanamütsiin. Kultuure kasvatati kuni optilise tiheduseni 1 (mõõdetud lainepikkusel 600 nm). Edasi viidi kultuurid üle 50 ml tuubidesse ja tsentrifugeeriti 3220 g juures 10 minutit (Eppendorf Centrifuge 5810 R), pärast seda sööde eemaldati ja bakterid resuspendeeriti 50 ml 5% suhkrulahuses, lisati ka 25 µl Silwet L-77 (Momentive) detergenti (lõppkontsentratsioon 0,05%) transformatsiooniefektiivsuse tõstmiseks. Transformeerimiseks sukeldati hariliku müürlooga õisikuvarded 1-2 minutiks transformeerimissegusse. Taim asetati kandikule pikali niiskete salvrätide peale ning niisked salvrätid asetati ka taime peale, luues niiodi niiske keskkonna, mis on bakteritele nakatamiseks sobilik. Niiskes keskkonnas olevaid taimi hoiti 24 tundi pimedas ning pärast seda viidi tagasi tavalistesse kasvutingimustesse.

2.2.5.7 Transformeeritud taimede selektsioon

Transformatsiooni efektiivsus ei ole 100% ja seetõttu oli vaja transformeeritud seemneid kasvatada selektiivsöötmele huvipakkuvate taimede eraldamiseks. Enne külvamist steriliseeriti seemned steriliseerimislahusega [70% etanool; 0,1% Triton X-100 detergent (Amresco)], eesmärgiga ennetada soovimatute mikroorganismide, eelkõige *A. tumefaciens* kasvu söötmetassil. Selektiivsöötmeks kasutati fütoagarit (Duchefa), mis sisaldas endas MS söödet [Murashige ja Skoog basal medium (Phyto technology laboratories)], hügromütsiini (20 µg/ml, Phyto technology laboratories) ja tsefotaksiimiga (cefotaxime, 100 ng/ml, Phyto technology laboratories). Igale neljakandilisele (12 x 12 cm) eelmainitud söötmega Petri tassile külvati umbes 100 µl seemneid, tassid suleti Nanopore teibiga (3M) ja viidi inkubaatorisse (Sanyo versatile environmental test chamber MLR-351; 21°C; 16 tundi valgus/ 8 tundi pimedus) kasvama. Tassidel idanesid peaaegu kõik seemned, kuid ainult transgeensetel taimedel oli hügromütsiini resistentsus ja tänu sellele ka võimekus söötmele kasvatada. Resistentsed taimi oli võimalik eristada juure kasvu vaadeldes, resistentsed taimed kasvasid söötme sisse pika mitme cm pikkuse niitja juure, mitteresistentsed taimed suutsid kasvatada vaid < 5 mm pikkuse juure. Huvipakkuvad taimed istutati plaatidelt edasi kasvupottidesse või

gaasivahetuspottidesse. Transformatsiooni õnnestumist kontrolliti markergeeni (hügromütsiini resistentsusgeen) esinemisega transformeeritud taimedes, selleks teostati PCR reaktsioon Hph1 ja Hph2 praimeritega.

2.2.6 *Nicotiana benthamiana* mööduv transformatsioon

N. benthamiana mööduvaks transformeerimiseks kasvatati kõigepealt vajalikke vektoreid sisaldavaid *A. tumefaciens* rakke üleöö 2 ml LB söötmes koos 50 µg/ml kanamütsiiniga (Roth). Järgnevalt tsentrifuugiti saadud kultuure 5000 g juures 5-7 minutit ja eemaldati supernatant. Sade resuspendeeriti infiltratsiooni puhvris [10 mM MES (Serva), pH 5,6; 10 mM MgCl₂ (Scharlau); 150 mM atsetosüringoon (Phyto technology laboratories)]. Kõikide kultuuride ruumala suurendati vastava mahuni, et saavutada OD (optiline tihedus) 0,5 (600 nm). Saadud segu jäeti umbes tunniks ajaks toatemperatuurile seisma. Segu viimiseks *N. benthamiana* lehtedesse kasutati nõelata süstlaid, lehe pinda kahjustati vähesel määral süstla otsaga, et lihtsustada infiltratsioonilahuse lehte tungimist. Bakterite lehte viimiseks suruti lehe pind vastu süstla otsa ning süstiti, õnnestunud protseduuri korral värvus leht tumeroheliseks mesofüllil pääsenud infiltratsioonisegu tõttu. Pärast edukat infiltratsiooni viidi taimed tagasi kasvutubadesse ning transformatsiooni õnnestumist kontrolliti umbes 2-5 päeva pärast.

2.2.7 GUS värvimine ja GFP ekspressiooni jälgimine

GUS värvimist kasutati *MED25* ekspressioonimustri uurimiseks. GUS värvimiseks fikseeriti taimelehed 1,5 ml augustatud kaanega tuubis jääkülmas atsetoonis 20 minutit. Järgnevalt pesti lehte kaks korda 100 mM fosfaatpuhvriga (Na₃PO₄), pärast seda lisati 1 ml GUS värvimise lahust [2 mM hekstsüaanoferraat(III) (Amresco); 2 mM hesktsüaanoferraat(II) (Sigma-Aldrich); 5% metanool (Sigma-Aldrich); 0,15 ng/ml X-Gluc (Direct UK); 50 mM Na₃PO₄ (Scharlau); 0,05% Triton X-100 (Amresco)] ning sooritati vaakuminfiltratsioon värvimislahuse lehte liikumise hõlbustamiseks. Vaakuminfiltratsiooni teostamiseks kasutati vaakumi generaatorit MAXI dry plus Heto vacuum centrifuge, augustatud kaantega tuubides proovid asetati vaakumgeneraatori kambrisse ja tekitati alarõhk, kuni proove ümbritsev värvimisseg hakkas keema. Pärast vaakuminfiltratsiooni jäeti proovid toatemperatuurile pimedusse seisma üleöö, edasi eemaldati proovidelt värvimislahus ja lisati klorofüllil eemaldamiseks 70% etanool, etanoolis hoiti proove vähemalt 24 tundi. Järgnevalt uuriti proove valgusmikroskoobiga Zeiss SteREO Discovery. V20.

GFP ekspressiooni jälgimiseks lokalisatsiooni vektoriga transformeeritud taimede kudedes kasutati Zeiss SteREO Discovery. V20 mikroskoopi. Fluorestsentsi jälgiti Zeiss filter set 38

filtrikomplekti abil (ergastus 470/40 nm; emissioon 525/50 nm; ergastuseks kasutati HXP 120 UV-lampi).

2.2.8 Õhulõhede tiheduse ja indeksi määramine lehejäljenditel

Lehejäljendid võeti taimedelt pärast gaasivahetuskatseid. Taimed olid jäljendite tegemise ajal umbes 30 päeva vanused. Lehejäljendite tegemiseks kasutati Xantoprem L blue hambajäljendi pastat (Kulzer) ja kõvendit (Activator Universal Plus Heraeus). Jäljendipasta ja kõvendi segati omavahel kokku ja seejärel määrati lehe alumisele küljele mõne millimeetri paksune kiht segu. Seejärel lasti jäljenditel 10-15 minutit kuivada ja eemaldati leht jäljendilt. Järgnevalt määrati jäljendile õhuke kiht läbipaistvat küünelakki (Wild and Mild) ja kuivatati toatemperatuuril 10-15 minutit. Pärast seda kleebiti küünelaki pinnale tükk läbipaistvat teipi, mis seejärel eemaldati jäljendi pinnalt koos küünelakiga ning kleeplint kleebiti preparaadi alusklaasile. Õhulõhede tiheduse määramiseks pildistati mikroskoobi (Zeiss SteREO Discovery. V20) abil preparaati lehe keskosa lähedalt. Pildistatava ala suurus oli 300 x 400 µm. Fookustasapinna erinevuse tõttu pildistati ühte preparaati kihiti, et oleks kõik õhulõhed märgatavad. Lehejäljendite fotodelt määrati õhulõhede tihedus ja epidermirakkude tihedus kasutades rakendust ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). Kõigepealt selekteeriti vaba käega 70-85% vaateväljast, inverteeriti värvid ja määrati selekteeritud ala pindala. Järgnevalt loendati määratud alasse jäävate õhulõhede ja epidermirakkude arv, viimase puhul loendati ainult rakud, mis jäid vähemalt 50% ulatuses selekteeritud välja sisse. Saadud andmetest arvutati õhulõhede ja epidermirakkude tihedus pindalaühiku kohta ning arvutati õhulõhede indeks. Õhulõhe pindala määramiseks kasutati ImageJ laiendust ObjectJ, mille abil mõõdeti õhulõhe pikkus ja laius ning arvutati pindala kasutades ellipsi pindala valemit ($S_{\text{ellips}} = \pi * 0,5 * \text{õhulõhe pikkus} * 0,5 * \text{õhulõhe laius}$).

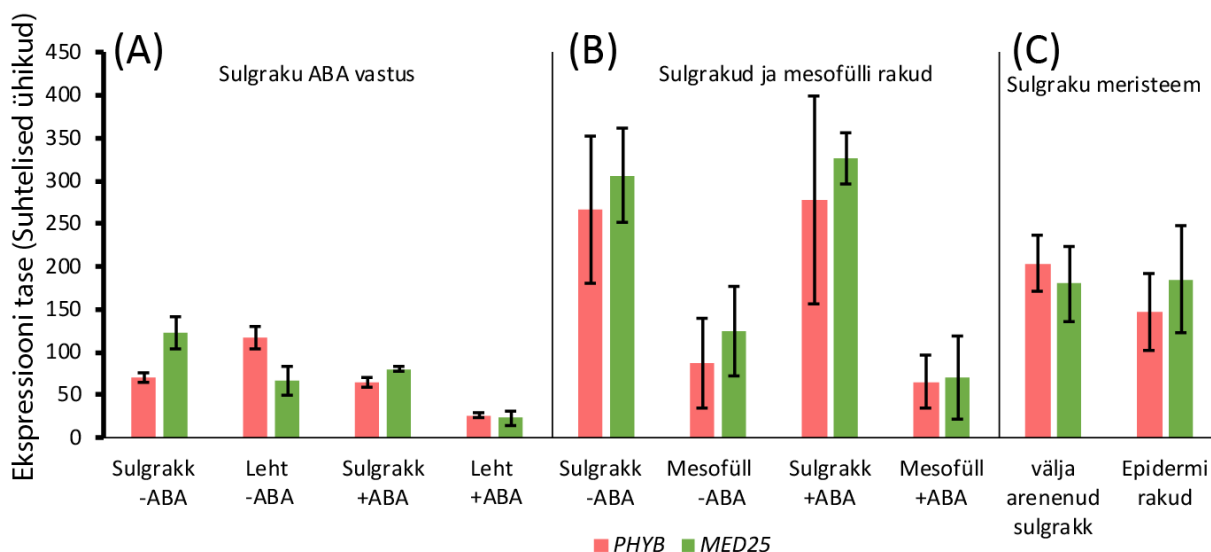
2.2.9 Andmeanalüüs ja statistika

Gaasivahetuskatsetest saadud õhulõhede juhtivused keskmistati ja arvutati õhulõhede reaktsiooni amplituud (õhulõhede juhtivus enne stiimulit - õhulõhede juhtivus reaktsiooni lõpus) ja saadud tulemusest võeti absoluutarv. Katsetes, kus õhulõhede juhtivus kõigepealt suurenes ja lõpuks langes valiti amplituudi arvutamiseks ajapunkt, mis oli enamikul taimeliinidest avanemise maksimum. Lisaks reaktsiooni amplituudile arvutati ka õhulõhede avanemis- või sulgumiskiirus (reaktsiooni kiirus). Kiiruse leidmiseks määrati õhulõhede reaktsioonikõveratelt lineaarse tõusuga lõik pärast stiimuli rakendamist ning arvutati õhulõhede juhtivuse muutus antud aja jooksul ühe minuti kohta (keskmine avanemiskiirus defineeritud aja jooksul). Statistiliseks analüüsiks kasutati ühefaktoriaalset ANOVA testi ning *post-hoc* analüüsiks ebavõrdse valimi jaoks kohandatud Tukey testi. Statistiliste analüüside jaoks kasutati rakendust Past3 (Hammer *et al.*, 2010)

2.3 Tulemused

2.3.1 *MED25* ekspressioon on sulgrakkudes rikastatud

Huvipakkuvate taimeliinide leidmiseks otsiti projekti varasemas faasis esmalt võimalikke punase valguse mõjul avanemises olulisi geene, millel on rikastatud ekspressioon sulgrakkudes. Kandidaatgeenide jaoks telliti T-DNA liinid ja teostati esialgne fenotüüpide analüüs. *MED25* oli üks kandidaatgeenidest, kuna tal oli sulgrakus rikastatud ekspressioon mitme erineva kiibianalüüsi tulemusel (Joonis 4. A, B (Yang *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2010)). *MED25* geeni mutantidel leiti võimalik fenotüüp ja valiti edasiseks uuringuks. *PHYB* valiti võrdluseks kui punase valguse retseptor, millel on teadaolev seos õhulõhedega.



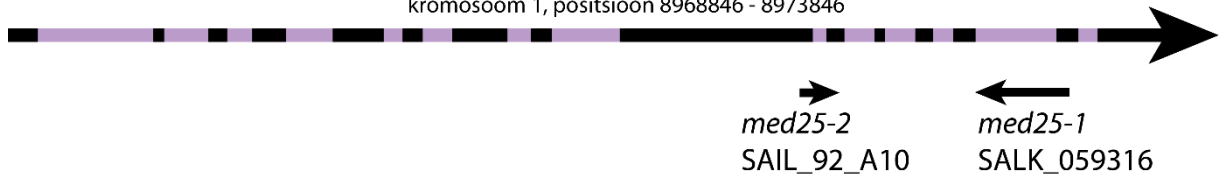
Joonis 4. Geenide ekspressiooni tasemed eri taimekudedes, andmed pärinevad *Arabidopsis eFP browser at bar.utoronto.ca* andmebaasist (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>, Winter *et al.*, 2007). (A) *MED25* ja *PHYB* ekspressioonitasemed sulgrakkudes ja lehtedes koos ja ilma ABA töötluseta (Pandey *et al.*, 2010). (B) *MED25* ja *PHYB* ekspressioonitasemed sulgrakkudes ja mesofüllis koos ja ilma ABA töötluseta (Yang *et al.*, 2008). (C) *MED25* ja *PHYB* ekspressioonitasemed välja arenenud sulgrakkudes ja epidermi rakkudes (Adrian *et al.*, 2015).

2.3.2 T-DNA asukoht *MED25* geenis

Katsetes kasutatud *MED25* mutantide seemned on tellitud *Nottingham Arabidopsis Stock Centre*-st ja olid laboris varasemalt genotüüpiseeritud. Mutantidel *med25-1* ja *med25-2* oli erinev T-DNA asukoht geenis (Joonis 5.). *SALK T-DNA Express: Arabidopsis Gene Mapping Tool* veebirakenduse järgi asub *med25-1* mutandil T-DNA geeni lõpuosas, *med25-2* mutandil aga 2/3 kogupikkuse juures. Seega on võimalik, et *med25-1* taimedes transkribeeritakse korrektne *MED25* järjestus pikemalt.

MEDIATOR 25 (AT1G25540)

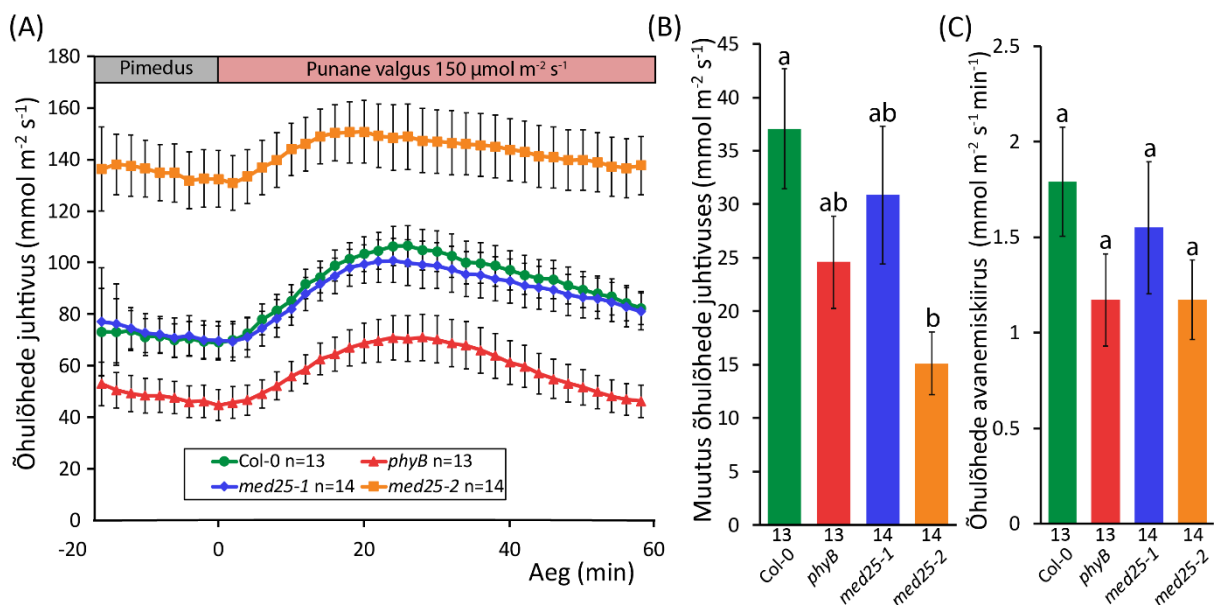
kromosoom 1, positsioon 8968846 - 8973846



Joonis 5. Mutantide *med25-1* ja *med25-2* T-DNA asukoht *MED25* geenis on joonisel tähistatud nooltega, pikk nool tähistab *MED25* geeni kogupikkust, eksonid on tähistatud mustaga ja intronid lillaga. Joonis on valmistatud *SALK T-DNA Express: Arabidopsis Gene Mapping Tool* veebirakenduse (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) andmete põhjal. Joonisele on märgitud uuringus kasutatud mutandid *med25-1* ja *med25-2*.

2.3.3 Õhulõhede avanemine punase valguse mõjul

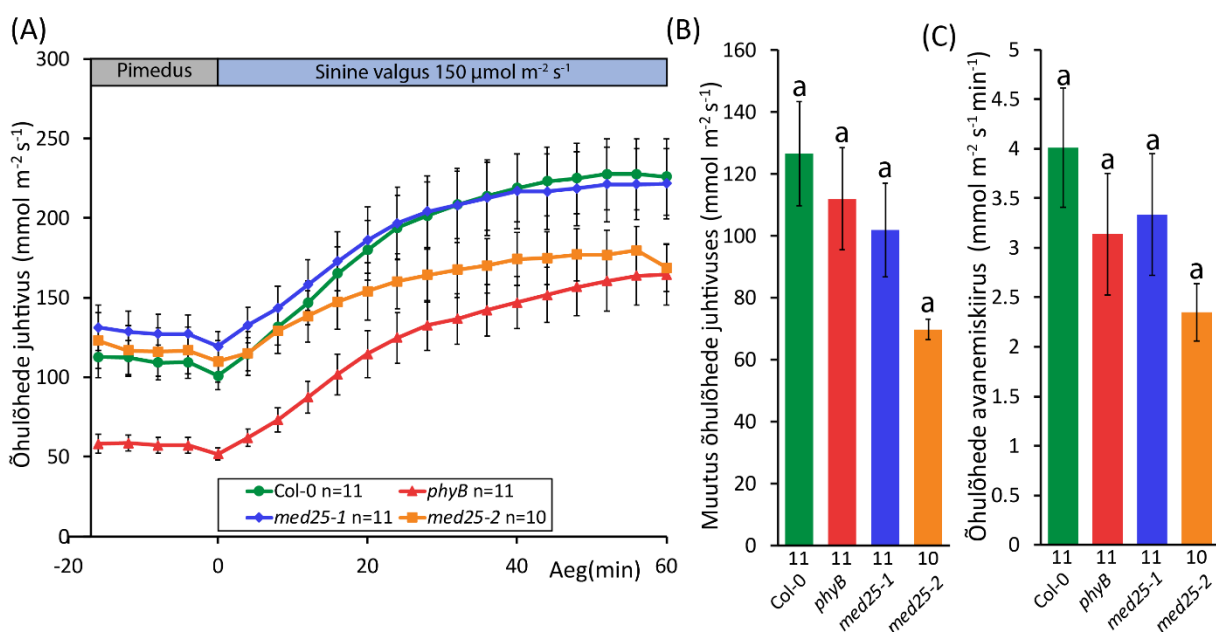
Katses kasutatud *MED25* mutandid olid üksteisest võrdlemisi erinevate reaktsioonidega, *med25-1* taimed meenutasid rohkem Col-0 taimi, omades sarnast õhulõhede juhtivust pimeduses ja õhulõhede avanemist vastusena punasele valgusele (Joonis 6. A). Õhulõhede juhtivus pimeduses oli *med25-2* taimedel kõrgem ja avanemisreaktsioon nõrgem. Punase valgusega gaasivahetuskatsete tulemustest selgus, et *med25-2* mutant avanes metsiktüüpi Col-0 taimedest statistiliselt oluliselt vähem ($p=0,023$; Joonis 6. A,B). Õhulõhede juhtivus *phyB* taimedel oli teistest alati madalam, kuid avanemisel olulist erinevust ei esinenud. Õhulõhede avanemiskiiruses ei leitud statistiliselt olulisi erinevusi ($p=0,311$; Joonis 6. C).



Joonis 6. (A) Õhulõhede juhtivus ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) punase valguse mõjul avanemise katses. (B) Muutus õhulõhede juhtivuses 24 minuti jooksul ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) punase valguse mõjul. (C) Õhulõhede keskmine avanemiskiirus ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{min}^{-1}$) ajavahemikul 14 minutit pärast punase valguse stiimulit. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud ning vearistid näitavad \pm standardviga. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja *post-hoc* testiks kasutati Tukey testi, üksteisest statistiliselt erinevad grupid on tähistatud tähtedega (a, b). Valimi suurus on tähistatud joonisel legendis (A) ja tulpade all (B; C).

2.3.4 Õhulõhede avanemine sinise valguse mõjul

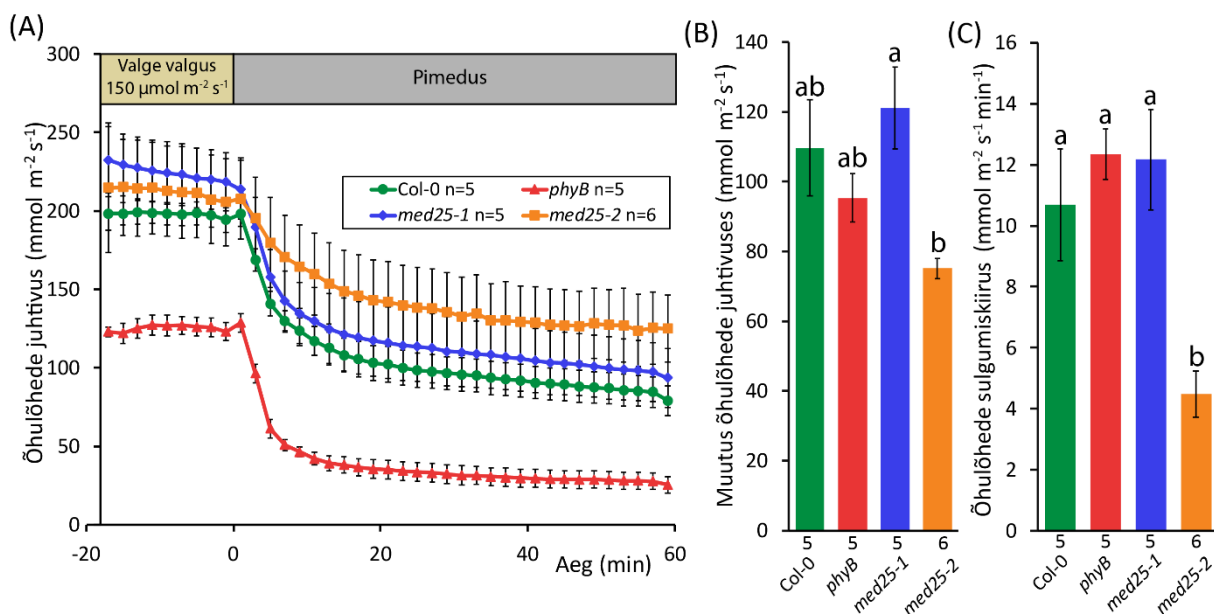
Õhulõhede avanemise amplituudis sinises valguses ei leitud statistiliselt olulisi erinevusi ühegi uuritud taimeliini vahel ($p=0,058$; Joonis 7. A, B), olulisi erinevusi ei tuvastatud ka avanemiskiiruste vahel ($p=0,240$; Joonis 7. C). Tulemusi võrreldes oli *med25-2* taimede puhul märgata trendi väiksemale õhulõhede avanemisele (Joonis 7. A, B) ja avanemiskiirusele (Joonis 7. C) sinises valguses. Kaks *MED25* mutantide liini käitused jällegi erinevalt, *med25-2* taimede avanemisreaktsioon sinisele valgusele oli nõrgem kui *med25-1* taimedel, mis käitused sarnaselt Col-0 taimedele. Õhulõhede juhtivus *phyB* taimedel oli teistest kogu katse jooksul madalam, kuid avanemisreaktsioon meenutas Col-0 taimede oma.



Joonis 7. (A) Õhulõhede juhtivus ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sinise valguse mõjul avanemise katses. (B) Muutus õhulõhede juhtivuses 56 minuti jooksul ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sinise valguse mõjul. (C) Õhulõhede keskmine avanemiskiirus ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{min}^{-1}$) ajavahemikul 16 minutit pärast sinise valguse stiimulit. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud ning vearistid näitavad \pm standarddviiga. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga. Valimi suurus on tähistatud joonisel legendis (A) ja tulpade all (B; C).

2.3.5 Õhulõhede sulgumine pimeduse mõjul

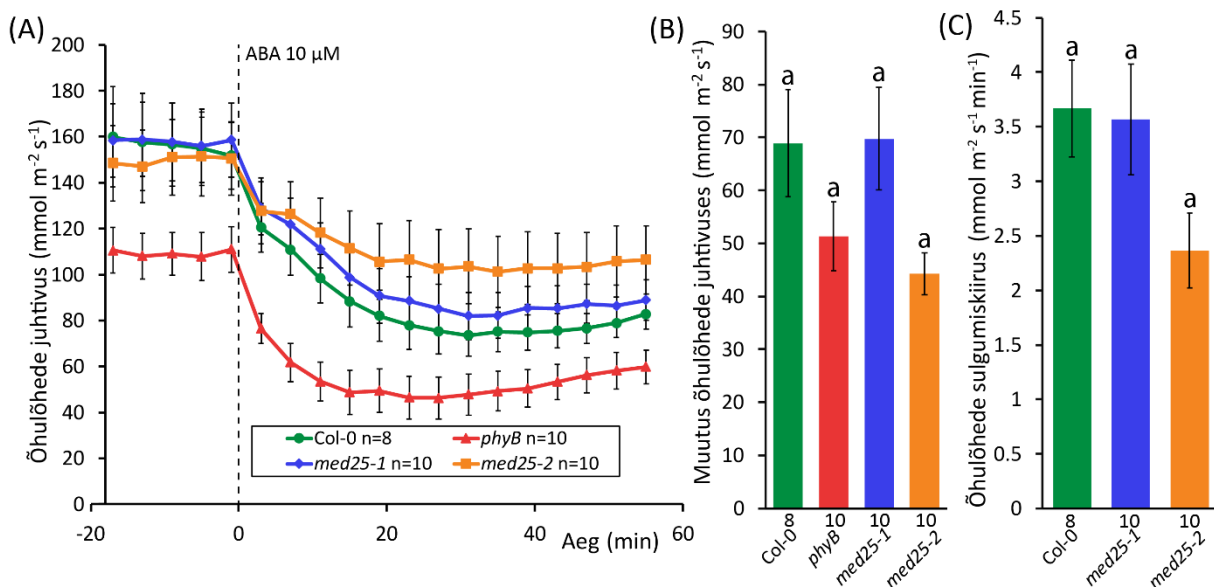
Pimeduse mõjul leiti statistiliselt oluline erinevus õhulõhede sulgumises *med25-1* ja *med25-2* taimeliinide vahel ($p=0,047$), kuid teiste liinide vahel olulisi erinevusi ei tuvastatud (Joonis 8. A, B). Õhulõhede sulgumiskiirus oli *med25-2* taimedel teistest statistiliselt oluliselt aeglasem ($p=0,002$; Joonis 8. C).



Joonis 8. (A) Õhulõhede juhtivus ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pimeduse mõjul sulgumise katses. (B) Muutus õhulõhede juhtivuses 57 minuti jooksul ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pimeduse mõjul. (C) Õhulõhede keskmine sulgumiskiirus ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{min}^{-1}$) ajavahemikul 5 minutit pärast pimeduse stiimulit. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud ning vearistid näitavad \pm standardviga. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja *post-hoc* testiks kasutati Tukey testi, üksteisest statistiliselt erinevad grupid on tähistatud tähtedega (a, b). Valimi suurus on tähistatud joonisel legendis (A) ja tulpade all (B; C).

2.3.6 Õhulõhede sulgumine abstsiihappe mõjul

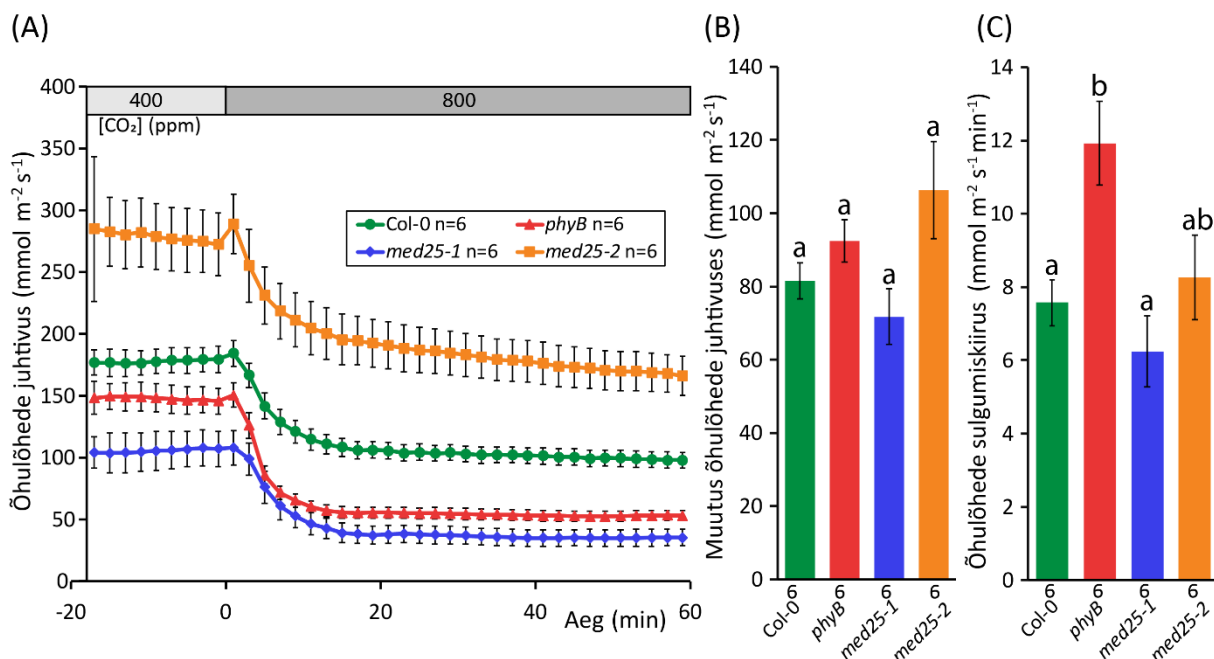
Abstsiihappe mõjul õhulõhede sulgumises statistiliselt olulisi erinevusi erinevate taimeliinide vahel ei tuvastatud ($p=0,058$; Joonis 9. A, B). Õhulõhede sulgumiskiiruses ei leitud samuti olulisi erinevusi ($p=0,080$; Joonis 9. C), sulgumiskiirust *phyB* taimedele ei arvatatud, kuna sulgumisreaktsioonis puudus klassikaline lineaarne faas. Trendi vähemale ja aeglasemale õhulõhede sulgumisele vastusena ABA töötlusele oli siiski näha *med25-2* taimede puhul (Joonis 9. A, B, C).



Joonis 9. (A) Õhulõhede juhtivus ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ABA mõjul sulgumise katses. (B) Muutus õhulõhede juhtivuses 55 minuti jooksul ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ABA mõjul. (C) Õhulõhede keskmine sulgumiskiirus ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{min}^{-1}$) ajavahemikul 19 minutit pärast ABA pritsimist. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud ning vearistid näitavad \pm standardviga. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA analüüsiga. Valimi suurus on tähistatud joonisel legendis (A) ja tulpade all (B; C).

2.3.7 Õhulõhede sulgumine kõrge CO_2 kontsentratsiooni mõjul

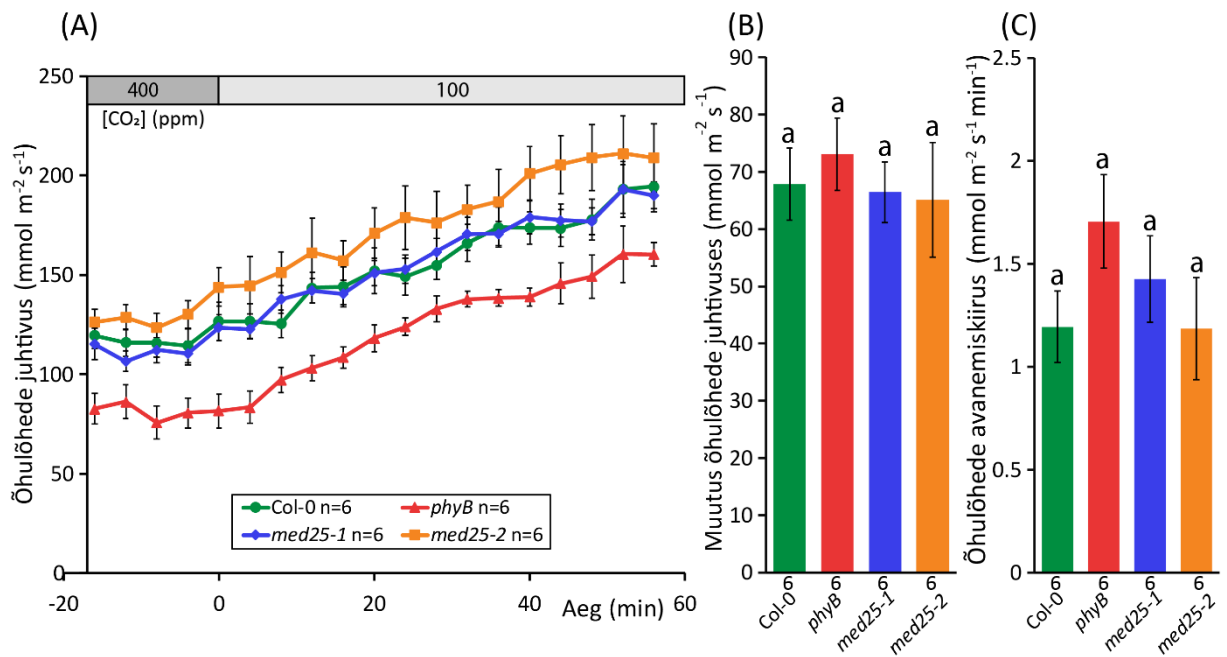
Õhulõhede sulgumisel kõrge CO_2 kontsentratsiooni mõjul leiti statistiliselt oluline ($p=0,010$) erinevus *phyB* õhulõhede sulgumiskiiruses võrreldes Col-0 ja *med25-1* taimedega, *phyB* õhulõhed avanesid kiiremini (Joonis 10. A, C). Õhulõhede juhtivuse amplituudis eri taimeliinide vahel statistiliselt olulisi ($p=0,087$) erinevusi ei leitud (Joonis 10. A, B).



Joonis 10. (A) Õhulõhede juhtivus ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) CO₂ mõjul sulgumise katses. (B) Muutus õhulõhede juhtivuses 59 minuti jooksul ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) CO₂ mõjul. (C) Õhulõhede keskmine sulgumiskiirus ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{min}^{-1}$) ajavahemikul 5 minutit pärast CO₂ stiimulit. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud ning vearistid näitavad \pm standarddviaga. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja *post-hoc* testiks kasutati Tukey testi, üksteisest statistiliselt erinevad grupid on tähistatud tähtedega (a, b). Valimi suurus on tähistatud joonisel legendis (A) ja tulpade all (B; C).

2.3.8 Õhulõhede avanemine madala CO₂ kontsentratsiooni mõjul

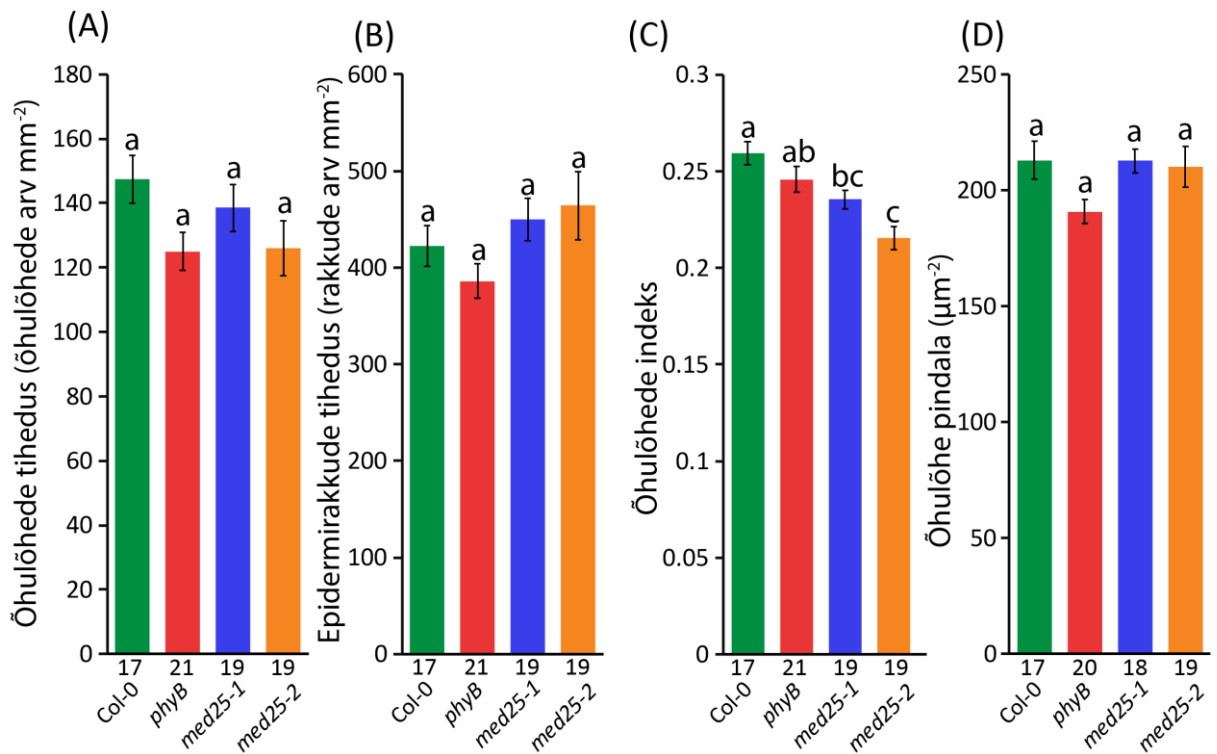
Õhulõhede avanemisel madala CO₂ kontsentratsiooni mõjul ei leitud statistiliselt olulisi erinevusi õhulõhede avanemise amplituudis ($p=0,872$; Joonis 11. A, B) ega kiiruses ($p=0,308$; Joonis 11. C).



Joonis 11. (A) Õhulõhede juhtivus ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) madala CO_2 mõjul avanemise katses. (B) Muutus õhulõhede juhtivuses 56 minuti jooksul ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) madala CO_2 mõjul. (C) Õhulõhede keskmine avanemiskiirus ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{min}^{-1}$) ajavahemikul 32 minutit pärast madala CO_2 stiimulit. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud ning vearistid näitavad \pm standarddviiga. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga. Valimi suurus on tähistatud joonisel legendis (A) ja tulpade all (B; C).

2.3.9 Õhulõhede tihedus, indeks ja suurus

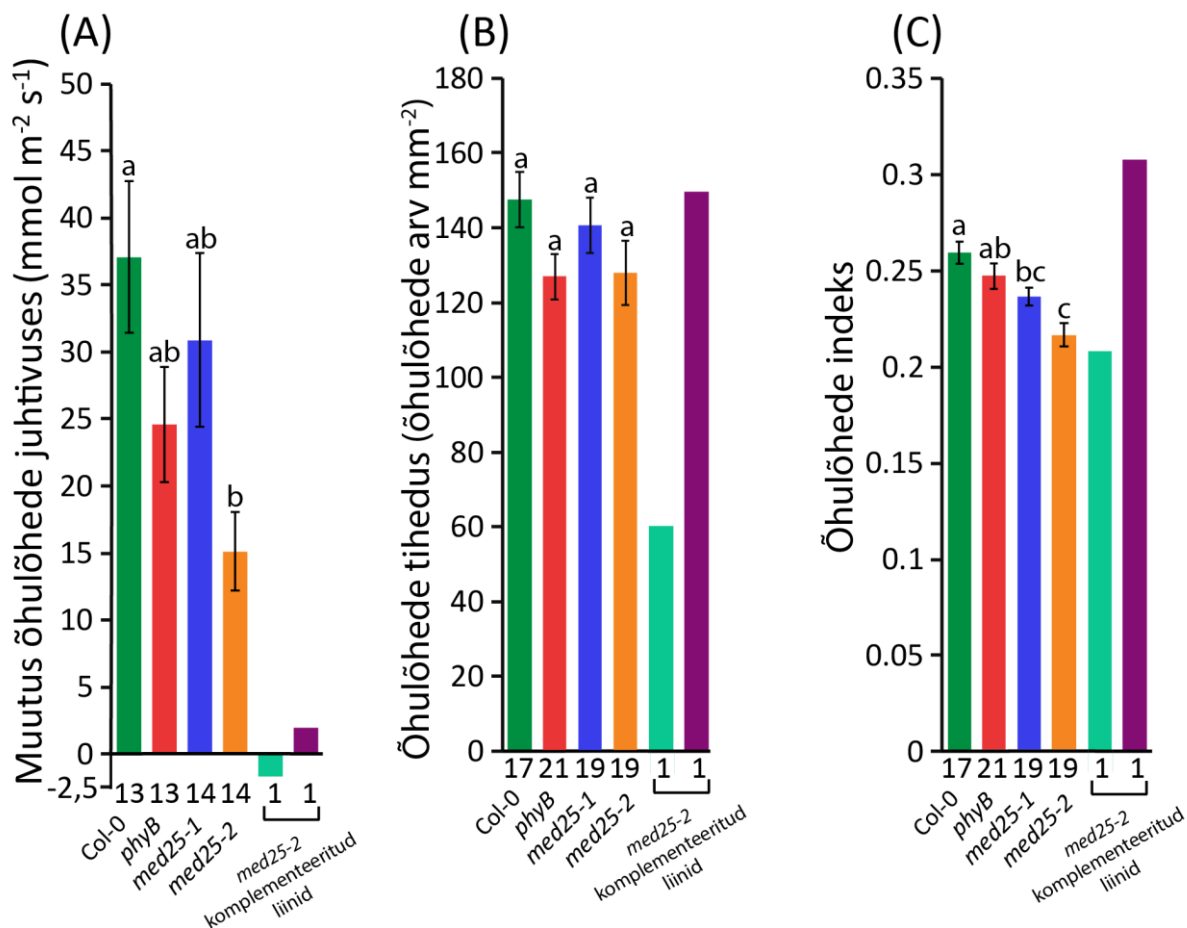
Õhulõhede tiheduse mõõtmistest ei leitud statistiliselt olulisi erinevusi eri taimeliinide vahel ($p=0,123$; Joonis 12. A). Samuti ei leitud epidermirakkude tiheduses eri taimeliinide vahel statistiliselt olulisi erinevusi ($p=0,132$; Joonis 12. B). Õhulõhede indeks oli Col-0 taimedest oluliselt ($p<0,05$) madalam *med25-1* ja *med25-2* taimedel (Joonis 12. C). Lisaks oli *med25-2* taimedel õhulõhede indeks oluliselt madalam ka *phyB* taimedest. Õhulõhe kompleksi pindalas ei leitud eri taimeliinide vahel statistiliselt olulisi erinevusi ($p=0,086$; Joonis 12. D).



Joonis 12. Kujutatud on tulemused leheajäljendite loendusandmete põhjal. (A) Õhulõhede tihedus pindalaühiku kohta (õhulõhede arv mm⁻²). (B) Epidermirakkude tihedus pindalaühiku kohta (rakkude arv mm⁻²). (C) Õhulõhede indeks. (D) Õhulõhe pindala (μm²). Katsete tulemused on joonisel keskmistatud ning vearistid näitavad ± standardviga. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja *post-hoc* testiks kasutati Tukey testi, üksteisest statistiliselt erinevad grupid on tähistatud tähtedega (a, b, c). Valimi suurus on tähistatud tulpade all.

2.3.10 *MED25* transgeeniga komplementeeritud *med25* liinid

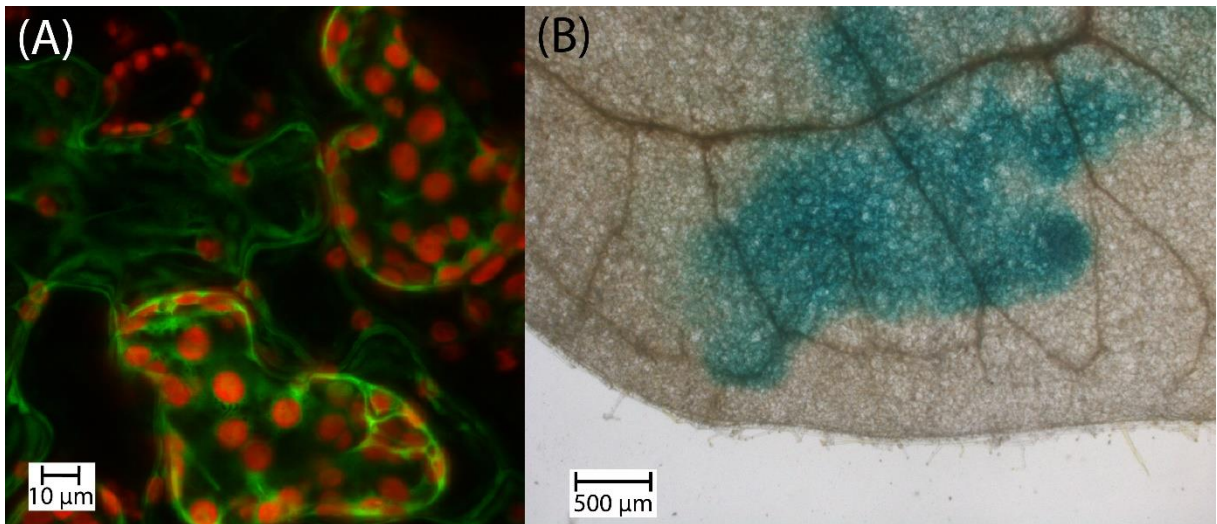
Komplementeeritud liinide puhul, kus *MED25* geen ekspresseeriti *MED25* promooteriga *med25-1* ja *med25-2* taimedes, olid tulemused oodatust võrdlemisi erinevad. Õhulõhede avanemisreaktsiooni taastumist punase valguse mõjul avanemise gaasivahetuskatsetes ei leitud (Joonis 13. A). Kahel *med25-2* taustal komplementeeritud liinil hoopis kadus punasest valgusest tingitud avanemisreaktsioon (Joonis 13. A). Antud tulemuste edasi uurimiseks mõõdeti komplementeeritud taimedel ka õhulõhede tihedust. Õhulõhede tihedus oli mõlemal komplementeeritud liinil üksteisest võrdlemisi erinev (Joonis 13. B). Õhulõhede indeksi tulemused olid mõlemal punasele valgusele mitte reageerinud komplementeeritud taimeliinil jällegi erinevad (Joonis 13. C).



Joonis 13. Kujutatud on komplementeeritud taimeliinide gaasivahetuskatsete tulemused ja analüüsid lehejäljenditelt võrrelduna Col-0; *phyB*; *med25-1*; *med25-2* taimeliinidega. Komplementeeritud taimeliinidest on lihtsuse huvides joonisel esitatud vaid kaks liini, millel puudus õhulõhede avanemisreaktsioon punases valguses. Paneelil (A) on muutus õhulõhede juhtivuses punases valguses ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Paneel (B) iseloomustab õhulõhede tihedust (õhulõhede arv mm^{-2}). Paneel (C) näitab õhulõhede indeksit. Katsete tulemused on joonisel keskmistatud ning vearistid näitavad \pm standarddviaga. Statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja *post-hoc* testiks kasutati Tukey testi, üksteisest statistiliselt erinevad grupid on tähistatud tähtedega (a, b, c). Valimi suurus on tähistatud tulpade all.

2.3.11 pMED25:GFP-GUS mööduv ekspressioon *Nicotiana benthamiana*'s

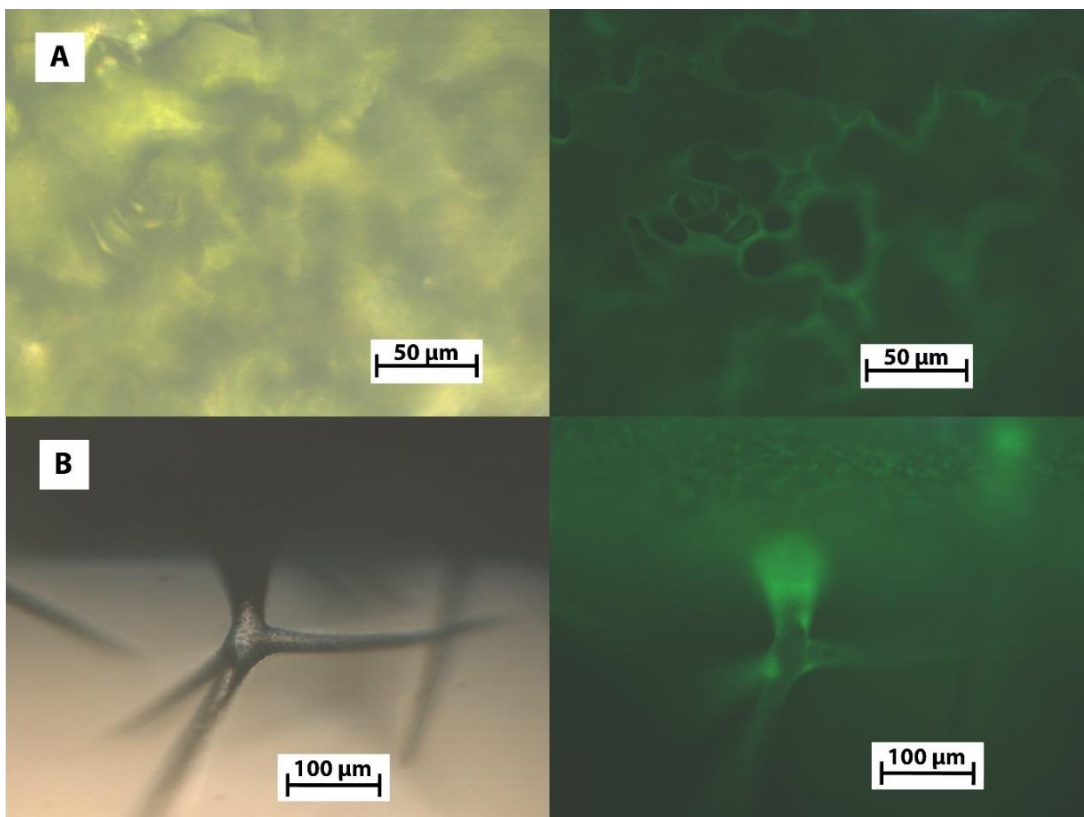
GFP-GUS liitvalgu toimimise testimiseks tehti tubaka mööduv transformatsioon, et ekspresseerida seal pMED25:GFP-GUS. Mööduva ekspressiooni indutseerimine *N. benthamiana* taimedes oli edukas. GFP signaali olemasolu (Joonis 14. A) ja GUS töötuse edukus (Joonis 14. B) on tõestuseks konstrukti toimimisele.



Joonis 14. (A) Konfokaalmikroskoobi foto *N. benthamiana* taimedes indutseeritud mööduvast ekspressioonist pMED25:GFP-GUS konstruktiga. (B) Stereomikroskoobi foto pMED25:GFP-GUS konstrukti mööduvast ekspressioonist *N. benthamiana* taime lehes pärast edukat GUS töötlust.

2.3.12 *MED25* promooteri ekspressioonimuster

Lokalisatsiooni konstruktiga pMED25:GFP transformeeriti metsiktüüpi Col-0 taimi *MED25* ekspressioonimustri tuvastamiseks. T1 põlvkonna taimi fluorestsentsmikroskoobiga uurides märgati GFP signaali epidermirakkudes (Joonis 15. A) ja trihhoomides (Joonis 15. B).



Joonis 15. (A) Valgusmikroskoobi ja GFP filtriga fotod pMED25:GFP konstruktiga transformeeritud *A. thaliana* Col-0 ökotüübi taimedest. Fotodelt on näha GFP signaal epidermis. (B) Fotod pMED25:GFP konstruktiga transformeeritud *A. thaliana* Col-0 ökotüübi taimedest. Fotodelt on näha GFP signaal trihhoomides.

2.4 Arutelu

2.4.1 *MED25* roll õhulõhede reaktsioonide regulatsioonis ja juhtivuses

Gaasivahetuskatsete tulemustest on näha, et *med25-2* taimeliinil tunduvad olema häiritud õhulõhede reaktsioonid punasele (Joonis. 6 B) ja sinisele valgusele (Joonis. 7 A, B, C) ning ka pimedusele (Joonis. 8 C), süsihappegaasile (Joonis. 10 A, B) ja ABA-le (Joonis. 9 A, B, C). Sellised laiaulatuslikud häired õhulõhede käitumises võivad viidata *MED25* üldisemale rollile õhulõhede regulatsioonis. Võimalik on ka struktuursete ja arenguliste kõrvalekallete mõju.

Punases valguses avanesid *med25-2* taimede õhulõhed Col-0 metsiktüüpi taimedest statistiliselt oluliselt vähem (Joonis. 6 B). See viitab *MED25* geeni seotusele õhulõhede regulatsiooniga punases valguses. Teisel *MED25* mutandil *med25-1* ei leitud õhulõhede avanemisel punases valguses statistiliselt olulisi erinevusi. Teadaoleva punase valguse fenotüübiga *phyB* taimeliinil oli *med25-2* mutandiga väga sarnane avanemiskiirus (Joonis 6. C) ning vähenenud oli ka avanemise amplituud (Joonis. 6 B), kuid õhulõhed avanesid siiski rohkem kui *med25-2* taimedel. Õhulõhede juhtivus oli samas *med25-2* taimedel enam kui kaks korda *phyB* taimedest suurem (Joonis. 6 A). Seega olid *med25-2* ja *phyB* taimede reaktsioonid punases valguses sarnase profiiliga; kui arvestada siinkohal nende omavahelist seost õite arengu signaalirajas (Cerdán ja Chory, 2003), ei saa välistada nende omavaheliste interaktsioonide olemasolu ka punase valguse signaalirajas.

Uuritud *MED25* mutantidest oli *med25-2* liinil sinises valguses metsiktüüpi taimedest märgatavalt madalam õhulõhede avanemise amplituud (Joonis. 7 B). Antud fenotüüp on sarnane *ERA1* (ENHANCED RESPONSES TO ABA1 - kannab üle ABA vahendatud signaale) mutandiga *eral-2*, mis sarnaneb *med25-2* taimedele ka pimeduse, ABA ja kõrge CO₂ põhjustatud sulgumisreaktsioonide poolest (Jalakas *et al.*, 2017). Õhulõhede juhtivus stabiilses olekus on *eral-1* taimedel aga pigem madalam kui Col-0 taimedel (Jalakas *et al.*, 2017), kuid *med25-2* taimedel pigem kõrgem. Seega esinevad nimetatud liinide õhulõhede reageerimisel stiimulitele sarnasused, kuid õhulõhede juhtivus on neil erinev. Mõlema geeni mutantidel on kirjeldatud suurenenud vastupidavust põuastressile (Pei *et al.*, 1998; Elfving *et al.*, 2011); arvestades nende sarnaseid õhulõhede reaktsioone on võimalik, et nende valgud interakteeruvad õhulõhede regulatsioonis omavahel. Edaspidi oleks tarvilik uurida *MED25* ja *ERA1* võimalikke omavahelisi interaktsioone ja teha kindlaks, kas nad toimivad samas signaalirajas.

Mutantidega *med25-1* ja *med25-2* läbi viidud erinevate katsete tulemused erinesid märkimisväärselt. Gaasivahetuseksperimentides olid *med25-1* taimeliini tulemused alati Col-0 taimedele sarnased, samas *med25-2* taimede õhulõhed avanesid punase valguse mõjul vähem,

kui Col-0 (Joonis 6. B) ja sulgusid pimeduses oluliselt aeglasemalt (Joonis 8. C). Statistiliselt oluline erinevus kahe mutantse taimeliini vahel esines õhulõhede sulgumise amplituudis ja kiiruses pimeduse mõjul (Joonis. 8 B, C). Kahe *MED25* mutandi omavahelise erinevuse põhjuseid võib selgitada T-DNA erinev asukoht *MED25* geenis (Joonis 5.). T-DNA asukoht *med25-2* taimedes on geeni kodeeriva osa algusele lähemal, mis tähendab, et *MED25* geeni järjestus transkribeeritakse arvatavasti lühemalt kui *med25-1* taimede puhul. Sellest võib järeldada, et *med25-1* taimede puhul on geeniproduct veel suuresti funktsionaalne ja seetõttu erinevad liinid üksteisest fenotüübi poolest märkimisväärselt. Teisalt ei saa välistada ka võimalust, et *med25-2* taimeliinis on veel teisi meile teadmata mutatsioone, mis võivad põhjustada fenotüübilisi erinevusi võrreldes metsiktüübiga.

On näidatud, et õhulõhede regulatsiooni mõjutavad olulisel määral ka rakukesta omadused. Sulgrakkude rakukestade mehaaniliste omaduste muutudes on õhulõhede regulatsioon häiritud, kaotades märkimisväärse osa normaalsest avanemise-sulgumise amplituudist (Amsbury *et al.*, 2016). Katsetega on näidatud, et töödeldes taimelehtede epidermi arabinoosi lagundava ensüümiga väheneb rakukesta elastsuse vähenemise tõttu oluliselt ka õhulõhede reageerimisvõime (Jones *et al.*, 2003). Rakukesta arabinoosi sisalduse muutusega kaasnevate probleemidega toimetulekus on *MED25* geenil oluline roll rakukesta komponentide transkriptsiooni regulatsioonis (Seguela-Arnaud *et al.*, 2015). Arvestades *MED25* kontrolli rakukesta koostise üle on võimalik, et *med25-2* mutandi õhulõhede regulatsiooni häirete kujunemisel, kus on häiritud õhulõhede vastused mitmetele stiimulitele, mängivad rolli muutused rakukesta koostises.

2.4.2 *MED25* roll õhulõhede arengus ja tiheduse kujunemises

Õhulõhede indeks oli mõlemal *MED25* mutandil metsiktüüpi Col-0 liiniga võrreldes statistiliselt oluliselt madalam (Joonis 12. C). Õhulõhede tihedus (Joonis 12. A) ja õhulõhe pindala (Joonis 12. D) oli samas metsiktüüpi taimedele sarnane. Arvestades *MED25* seotust rakkude suuruse reguleerimisega on see tulemus üllatav, sest varem on *MED25* alaekspressiooni korral täheldatud suurenenud rakke ja organeid (Xu ja Li, 2011). Suurenenud rakkude ja metsiktüüpi Col-0 taimedega sarnast õhulõhede tihedust arvestades võiks pigem oodata hoopis madalamast epidermirakkude tihedusest tingitud kõrgemat õhulõhede indeksit. Epidermirakkude tiheduse tulemustest ilmneb, et *med25-1* ja *med25-2* taimedel on trend pigem kõrgema epidermirakkude tiheduse suunas (Joonis 12. B), mis viitab hoopis väiksemale epidermirakkude suurusele. See oleks aga vastuolus Xu ja Li 2011 uuringu tulemustega, kus *med25-2* taimeliinil olid Col-0 taimedega võrreldes suuremad epidermirakud. Paraku ei analüüsinud Xu ja Li 2011 lehejäljendeid ja seega pole võimalik võrrelda andmeid õhulõhede

tiheduse ja indeksi kohta. Kasvutingimused Xu ja Lin 2011 uuringus olid võrreldavad siinsetega, kuid täpsustamata on jäetud valgusintensiivsus ja suhteline õhuniiskus. Juhul, kui Xu ja Lin 2011 kasutasid erinevat valgusintensiivsust, võib tulemuste erinevus sellest põhjustatud olla.

Sarnaselt õhulõhede reaktsioonidega, on ka *MED25* ja *ERA1* mutantide arengulised fenotüübid sarnased. Mõlemad on tundlikud ABA põhjustatud idanemise inhibitsioonile (Cutler *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2012; Jalakas *et al.*, 2017) ja mõlema geeni mutantide õite kujunemisel esinevad arengulised häired. Mutatsioonid *ERA1* geenis põhjustavad õite organite arvu suurenemise ja *MED25* mutantidel on märgata suuremaid organeid ja rakke (Running *et al.*, 1998; Xu ja Li, 2011). Seega mõjutavad õite arengut mõlemad geenid, kuid teevad seda erinevalt.

Metsiktüübist madalam õhulõhede indeks esines nii *med25-1* kui ka *med25-2* taimeliinidel (Joonis 12. C), kuid gaasivahetuskatsetes oli metsiktüüpi Col-0 taimedest erinev vaid *med25-2* taimeliin. On võimalik, et *MED25* produkt on piisavalt rikutud mõlemas taimeliinis arenguliste häirete esile kutsumiseks, kuid õhulõhede regulatsioonis vastusena punasele valgusele esineb funktsioonide kadu vaid *med25-2* taimedel. Lisaks viitavad andmed komplementatsiooniliinide lehejälgjenditelt sellele, et punase valguse vastus ja õhulõhede tihedus ei ole omavahel seotud, sest punasele valgusele mitte reageerinud komplementatsiooniliinide õhulõhede tihedus on teinetesisest väga erinev (Joonis 13. B). Kõrvale ei saa jätta ka lisamutatsioonide võimalikku olemasolu *med25-2* taimedel, mis võivad õhulõhede regulatsioonis häireid tekitada.

Gaasivahetuskatsetes mõõdetud õhulõhede juhtivus oli *med25-1* taimedel alati Col-0 taimede sarnane. Õhulõhede juhtivus *med25-2* taimedel oli teistest taimeliinidest tunduvalt kõrgem nii punase valguse katsele eelnenud pimeduses kui ka CO₂ katsetele eelnenud stabiliseerumisperioodil. Antud erinevusi teistes katsetes teadmata põhjustel ei esinenud. Et selgitada, kas ja missugustes tingimustes mõjutab *MED25* funktsiooni häirumine õhulõhede juhtivust ning kas see võiks olla seotud ka õhulõhede indeksi või rakukesta struktuuriga, on vajalik läbi viia täiendavaid katseid.

MED25 mutantidel oli küll metsiktüüpi taimedest madalam õhulõhede indeks, kuid mitte tihedus (Joonis 12. A). On veel ebaselge, kas ja kuidas mõjutavad need arengulised iseärasused õhulõhede regulatsiooni. Küsimuse täiendavaks uurimiseks võib mõõta teiste *MED25* T-DNA liinide õhulõhede indekseid ja reaktsioone.

2.4.3 Transgeensed liinid

Väga huvitavad tulemused ilmneseid komplementatsiooniliinide gaasivahetukatsetest punases valguses. Oodatud tulemust, kus õhulõhede regulatsioon oleks taastunud metsiktüüpi Col-0 taimedega sarnasele tasemele, ei leitud. Huvipakkuvaks tulemuseks oli kahel *med25-2* taustaga komplementatsiooniliinil puuduv õhulõhede reaktsioon punasele valgusele (Joonis 13. A). Reaktsiooni täieliku kadumise põhjused ei ole hetkel selged, kuid ühe võimalusena võib välja tuua *MED25* üleekspresseerimise tulemusena tekkinud ekspressiooni vaigistamise. Taimede transformeerimisel mitme sama geeni koopiaga tuvastati, et piisava koopiaarvu saavutamisel toimub ekspressiooni vaigistamine (Schubert *et al.*, 2004). Lävend, millest alates hakkab ekspressiooni vaigistamine toimuma, on geenispetsiifiline; näiteks taimede transformeerimisel *GUS* geeniga piisas Schubert *et al.*, 2004 uuringus lävendi ületamiseks kolmest koopiast ja *GFP* puhul toimus ekspressiooni vaigistamine alates viiest geenijärjestuse koopiast. Tasub mainida, et selles uuringus kasutati 35S tugevat promooterjärjestust ja autorid spekulatsioonid, et nõrgema promooteri kasutamisel ei pruugi sellist probleemi tekkida (Schubert *et al.*, 2004). *MED25* komplementatsiooniliinide puhul ei saa kindlalt öelda, kas funktsiooni kao põhjustas sarnane efekt. Arvestades, et antud töös kasutati nõrgemat ja *MED25* jaoks loomulikku *MED25* promooterit tundub ebatõenäoline, et ületati ekspressiooni vaigistamiseks vajalik lävend. Selles küsimuses selguse saamiseks oleks tarvis teostada *MED25* ekspressiooni taseme uuring komplementatsiooniliinides.

Üks võimalus on, et komplementeeritud taimede punase valguse reaktsiooni kadu on tingitud *med25-2* alleelilt ekspresseeruva osalise valgu ja taimes ekspresseeritud täispika *MED25* interaktsioonist. Teoreetiliselt võib eelmainitud interaktsioon põhjustada *MED25* funktsiooni täieliku häirimise, samas kui *med25-2* taimedes on see vaid osaliselt häiritud. Sarnane valgu funktsiooni kadu saavutati katsetes, kus poolik *COP1* (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 - konstitutiivne fotomorfogeen 1, represserib valguse mõjutatud arengulisi protsesse) geenijärjestus sisestati metsiktüüpi taimedesse (McNellis *et al.*, 1996). McNellis *et al.*, 1996 uuringus ei vähenenud transformeeritud taimedel *COP1* geeni transkriptsioon, kuid kadus funktsioon. Võimalike põhjustena sellele efektile toodi välja pooliku valgu seondumist komponentidele, mis toimivad koos *COP1* valguga. Teiseks võimalikuks põhjuseks pakuti *COP1* ja pooliku valgu omavaheliste interaktsioonide tekkimist ja seeläbi *COP1* funktsioneerimise takistamine. Kolmanda võimalusena pakuti välja kahe eelneva põhjuse koostoimet. Taolise mehhanismi toimel võis toimuda funktsiooni kadu ka *MED25* komplementatsiooniliinides, kuid oletades, et *MED25* moodustab omavahel komplekse tekib küsimus täieliku funktsiooni kao kohta. Antud juhul komplementeeriti

defektse *MED25* järjestusega taimi terve *MED25* cDNA järjestusega. McNellis *et al.*, 1996 transformeerisid metsiktüüpi taimi pooliku geenijärjestusega ning saavutasid funktsiooni kao. Oletades, et terve ja defektne valg moodustavad omavahel kompleksid võib jääda arusaamatuks edasine funktsiooni kadu võrreldes *MED25* mutantidega. Selle seletamiseks peaksid ainult defektse valgu poolt moodustatud kompleksid olema paremini funktsioneerivad kui defektse ja terve valgu kompleksid.

Cerdan ja Chory., 2013 komplementeerisid *MED25* mutantset taimeliini *MED25* genoomse järjestusega, kuid kasutasid tugevat 35S promooterit. Komplementatsiooni tulemusena said nad suurel hulgal vaigistatud *MED25* funktsiooniga taimi, kuid fenotüübilised kõrvalekalded ei olnud hullemad kui taustliinil. See on erinev käesoleva töö tulemustest, kus fenotüüp süvenes pärast komplementatsiooni. Võimalikke põhjuseid tulemuste lahknevuseks annab välja tuua mitu. Esiteks komplementeerisid Cerdan ja Chory., 2013 *MED25* mutantset liini 35S promooteriga, mis on potentsiaalselt palju tugevam kui *MED25* promooterjärjestus. Teiseks kasutasid nad *MED25* genoomset järjestust, mis võib anda võrreldes antud töös kasutatud cDNA järjestusega erinevaid tulemusi.

Komplementatsiooniliinide fenotüübi edasiseks uurimiseks võib metsiktüüpi Col-0 taimedesse sisestada *MED25* kodeeriva järjestuse kuni T-DNA alguseni *med25-2* taimeliinis. Teoreetiliselt võiks sellisel viisil valmistatud transgeensetel taimedel olla sarnane fenotüüp nagu praegustel komplementatsiooniliinidel. Lisaks aitab see aru saada, kas cDNA kasutamine genoomse asemel omab mõju tekkinud fenotüübile. Lisaks tuleks uurida ka täiendavaid komplementatsiooniliine.

Komplementeeritud taimeliinide puuduv õhulõhede avanemisreaktsioon punases valguses (Joonis 13. A) viitab *MED25* olulisusele punase valguse mõjul toimivas õhulõhede avanemises ning toetab fotosünteesist sõltumatu signaaliraja olemasolu. Teadaolevalt ei ava punases valguses õhulõhesid *HT1* mutandid (Matrosova *et al.*, 2015), kuid teisi punasele valgusele mitte reageerivaid taimeliine ei ole hetkel leitud. Arvestades sarnast fenotüüpi eksisteerib võimalus *MED25* ja *HT1* omavaheliste interaktsioonide toimumiseks punase valguse signaalirajas.

Lokalisatsioonikonstruktiga transformeeritud Col-0 taimedes tuvastati GFP signaal epidermirakkudes ja trihhoomides (Joonis 15. A). Tulemused langevad kokku varasemate uuringutega, kus leiti, et *MED25* omab olulist rolli papillide moodustumisel trihhoomides (Fornero *et al.*, 2017; Fornero *et al.*, 2019). Tegemist on siiski veel väga esialgsete tulemustega ning tulevikus on vajalik rohkemate liinide ja edasiste põlvkondade analüüs, mis võimaldaks ka *MED25* promooteri aktiivsust õhulõhedes täpsemalt hinnata.

2.4.4 **PHYB mõju õhulõhede CO₂ reaktsioonidele ja indeksile**

Õhulõhede reaktsioonidel süsihappegaasile oli *phyB* taimedel teistest taimeliinidest oluliselt suurem õhulõhede sulgumiskiirus kõrge CO₂ kontsentratsiooni mõjul (Joonis 10. C). Õhulõhede avanemiskiirus madala CO₂ mõjul oli *phyB* taimedel samuti teistest kiirem (Joonis 11. C), kuid erinevus ei olnud statistiliselt oluline. Nende tulemuste põhjal tunduvad *phyB* taimed olevat kiired reageerijad CO₂ taseme muutustele. On võimalik, et PHYB puudumine mõjutab õhulõhede CO₂ vastuseid HT1 kaudu, sest mõlemad paistavad olevat seotud nii punase valguse kui CO₂ signaaliradadega. Tegemist on siiski esialgse spekulatsiooniga ja küsimust vajab täiendavat uurimist.

Casson jt., 2009 demonstreerisid fütokroom B olulist rolli õhulõhede indeksi kujunemises, näidates, et *phyB* mutantidel oli võrreldes Col-0 taimedega oluliselt madalam õhulõhede indeks. Siin esitatud tulemustes ei esinenud *phyB* ja Col-0 taimede õhulõhede indeksite vahel olulist erinevust, kuid oli näha trendi *phyB* madalama õhulõhede indeksi suunas (Joonis 12. C). Erinevus tulemustes võib olla tekkinud sellest, et Casson jt., 2009 nägid õhulõhede indeksis vahet 175 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ valgusintensiivsusega kasvutingimustes, kuid 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ valgusintensiivsusega vahet ei esinenud. Käesolevas uuringus kasvasid taimed 100-150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ valgusintensiivsusega ja see ei pruugi ületada lävendit olulise erinevuse tekkeks.

2.4.5 **Vastamata küsimused ja uurimise tulevikusuunad**

Vastamata jäänud küsimuste lahendamiseks on vajalik tulevikus uuringut jätkata. Plaanis on analüüsida uusi *MED25* T-DNA liine, et kinnitada *MED25* defekti seos fenotüübiga ja välistada teadmata mutatsioonide osalus. Võimalik on valmistada ka ise uusi *MED25* liine (juhul kui seemnepangas ei leidu piisavalt liine), kasutades CRISPR-Cas9 meetodit, millega saab mutatsiooni tekkimise asukohta genoomis valida. Lisaks on vajalik uurida enamaid komplementeeritud taimeliine ja mõõta neis *MED25* taset, selgitamaks välja, kas punases valguses õhulõhesid mitte avanud taimede puhul on tegemist *MED25* ekspressiooni vaigistamisega. Samuti on tarvis uurida komplementatsiooniliinide õhulõhede käitumis vastuseid lisaks punasele valgusele ka muudele stiimulitele, et näha, kas õhulõhede reaktsiooni puudumine on spetsiifiline punasele valgusele. Lokalisatsiooniliinide põhjal saab täiendavalt uurida *MED25* promooteri ekspressioonimustrit. Veel on plaanis teostada sulgrakuspetsiifiline *MED25* ekspressiooni vaigistamine Col-0 ja *era1-2* taimedes ning *ERA1* vaigistamine Col-0 ja *MED25* mutantides. Sulgrakuspetsiifiline vaigistamine aitab vältida taime arenguliste probleemide (hiline õitsemine ja aeglasem kasv) esinemist ja seeläbi elimineerida võimalikud kõrvalised mõjutajad õhulõhede regulatsioonile. Sellisel viisil saab sulgrakuspetsiifilise vaigistatud geeniekspressiooniga *MED25* ja *ERA1* üksikmutandid ning topeltmutandid vaid ühe

vanema arenguliste häiretega. Sulgrakuspetsiifilist vaigistamist on varem edukalt kasutatud autoimmuunvastusest tingitud defektide vältimiseks *MPK4* mutandis (Hõrak *et al.*, 2016; Tõldsepp *et al.*, 2018). Komplementatsiooniliinide täiendavaks uurimiseks on võimalik lisada Col-0 taimedesse *MED25* kodeeriva järjestuse kuni T-DNA alguseni *med25-2* taimeliinis, mis võib aidata tuua selgust *MED25* cDNA kasutamise osas ning testida hüpoteesi, et õhulõhede reaktsioon punasele valgusele on komplementatsiooniliinides kadunud tervikliku ja defektse *MED25* valgu versiooni koekspressiooni tõttu. Lisaks eelnevale tasuks analüüsida *MED25* mutantide sulgrakkude rakukestade koostist.

2.4.6 Järeldused

Töö tulemustest järeldub, et *MED25* omab olulist mõju taimede õhulõhede regulatsioonile. Punases valguses toimuv õhulõhede avanemisreaktsioon oli *MED25* T-DNA taimeliinil selgelt pärsitud ning õhulõhede sulgumiskiirus pimeduse mõjul oli oluliselt aeglasem. Trendi häiretele õhulõhede reaktsioonis täheldati ka sinises valguses, kus õhulõhed avanesid märgatavalt vähem ning sulgusid vähem ka ABA töötamise järel. *MED25* rolli õhulõhede regulatsioonis kinnitavad ka tulemused transgeensete komplementatsiooniliinidega, mis kaotasid täielikult võime õhulõhesid punase valguse mõjul avada. *MED25* mõjutas oluliselt taimede õhulõhede arengut, *MED25* T-DNA liinidel oli metsiktüüpi Col-0 taimedest oluliselt madalam õhulõhede indeks. Käesolevast tööst võib järeldada, et *MED25* on oluline komponent nii taimede õhulõhede regulatsioonis kui arengus. Tulevikus teostatavad katsed aitavad tõenäoliselt lahendamata jäänud üksikasjad välja selgitada.

Kokkuvõte

Õhulõhede regulatsiooni vastusena punasele valgusele on vähe uuritud ja hetkel on teadlased selle protsessi molekulaarsete mehhanismide toimimise osas erimeelel. Ainus võimalus probleemile valguse heitmiseks on edasiste reguloorsete komponentide otsimine ja uurimine. Antud uurimuses on kirjeldatud *MED25* mõju *Arabidopsis thaliana* õhulõhede regulatsioonile ja arengule.

Töö tulemustest *MED25* T-DNA liinidega selgus, et *MED25* mutandi õhulõhed avanesid punases valguses vähem ning sulgusid pimeduses aeglasemalt. Trendi nõrgemale õhulõhede reaktsioonile nähti ka sinise valguse avanemiskatsetes ja ABA mõjul õhulõhede sulgumise reaktsioonides. Need tulemused näitavad *MED25* olulist rolli õhulõhede regulatsioonis ning täiendavad katsed tulevikus aitavad seda paremini hinnata ja täpsemalt mõista.

Katsetes kasutatud *MED25* T-DNA liinidel oli metsiktüüpi Col-0 taimedest madalam õhulõhede indeks. Õhulõhede tiheduse ega suuruse mõõtmiste tulemustes erinevusi ei esinenud. See näitab, et *MED25* mõjutab lisaks õhulõhede regulatsioonile ka nende arengut. Edaspidi tehtavad katsed teiste T-DNA liinidega aitavad mõju suurust ja olemust täpsemalt välja selgitada.

Uuritud T-DNA liine *MED25* cDNA järjestusega komplementeerides ei õnnestunud õhulõhede reaktsioone taastada. Tulemustest ilmnis hoopis täielik õhulõhede reaktsiooni kadu punase valguse mõjul avanemises, mis võib tähendada, et komplementatsiooni tulemusena hakati geeniekspressiooni taimedes vaigistama või oli terve ja defektse valgu omavaheliste interaktsiooni tulemusel *MED25* funktsioon täielikult häiritud. Komplementeeritud taimede õhulõhede tihedus varieerus isendite vahel tugevalt ja ei pakkunud seletust tekkinud fenotüübile. Tegemist on küll väga esialgsete tulemustega, kuid need viitavad siiski tugevalt *MED25* osalusele õhulõhede regulatsioonis.

MED25 on varem identifitseeritud kui õitsemise ja arengu regulaator, käesolev töö on aga esimene, mis viitab *MED25* olulisusele õhulõhede regulatsioonis. Täiendavatele küsimustele vastamine võimaldab teha suure sammu edasi taimede õhulõhede käitumise mõistmises, mis aitab tulevikus kaasa muutuvates keskkonnatingimustes edukate taimede arendamisele.

Resümee

Role of *MED25* in stomatal regulation and development in *Arabidopsis thaliana*

Kaspar Koolmeister

Summary

Plants assimilate carbon dioxide (CO₂) from the atmosphere and combine it into more complex molecules during photosynthesis; oxygen is also formed as a side product, making all aerobic life dependent on plants. Plant CO₂ uptake happens through small pores in plant epidermis called stomata. Each stoma is formed of two guard cells, which can regulate the aperture of the pore between them. During CO₂ uptake through stomata, plant also loses water in the process called transpiration, accordingly plants are constantly processing information to find the right balance between necessary CO₂ uptake and possible dehydration.

Guard cells react to various environmental stimuli to either open or close stomata. It is well known that light is one of the strongest stomatal opening factors, but stomatal response to light at different wavelengths is different. Blue light, for example causes very strong and rapid stomatal opening, but red light leads to slow and gradual stomatal opening reaction. Molecular mechanisms behind stomatal opening in blue light are reasonably well studied, but there is still very little known about stomatal opening in red light on a molecular level. Scientists have opposing theories about the inner workings responsible for the process and because of that more research is needed in the field.

To shed more light on stomatal regulation and development in red light we studied a potential role of MEDIATOR 25 (*MED25*). *Arabidopsis thaliana* Col-0 ecotype and *MED25* T-DNA mutants were used to study the role of *MED25* in stomatal regulation and development. Gas exchange analyses were conducted to study stomatal reactions, leaf imprints were made to identify possible stomatal developmental deviations. Localization and complementation transgenic plant lines were made to further study *MED25* function. The results showed that *MED25* has an effect on stomatal regulation in red light as stomata in mutant plants opened to a lesser degree. *MED25* also influenced stomatal development, because mutant lines had lower than wild-type stomatal index. Complete loss of stomatal reactions in red red light was observed in transgenic complementation lines, which was the opposite of predicted results, but this lends further support to the involvement of *MED25* in stomatal regulation to red light. Future research will explain the role of *MED25* more accurately and leads to new advances in understanding stomatal red light signaling.

Tänuavaldused

Täna kõik oma võrratuid juhendajaid, Hanna Hõrakut, Liina Jakobsoni ja Hannes Kollistit, kes lisaks meisterlikule juhendamisele olid alati sõbralikud vestluskaaslased. Oma kaas magistrandist saatusekaaslast Jenni Katri Pedorit täna meeleolukate teepauside ja diskussiooni ning lima eest. Täna kontorikaaslasi Pirko Jalakat, Mikk Välbet, Ingmar Tulvat ja Karin Johanssoni meeleolukalt tõise õhkkonna eest. Mikk Välbet ja Irina Rasulovat täna abi eest katsematerjalide ettevalmistusel ja Ebe Merilot täna hilisõhtuse külalislahkuse ja võileibade eest. Täna Yuh-Shuh Wangi nõuannete ja materjalide eest. Keeleliste ja grammatiliste nõuannete eest täna Laura-Helena Seppa. Täna Egon Meigast viimse hetke kosutava jäätise eest rasketel öötundidel. Lisaks eelnevale täna kõik taimsete signaalide uurimisrühma liikmeid suurepärase töökeskkonna eest.

Kasutatud kirjandus

- Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MRG, Hedrich R** (2000) GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. *FEBS Lett* **486**: 93–98
- Adrian J, Chang J, Ballenger CE, Bargmann BOR, Alassimone J, Davies KA, Lau OS, Matos JL, Hachez C, Lanctot A, et al** (2015) Transcriptome Dynamics of the Stomatal Lineage: Birth, Amplification, and Termination of a Self-Renewing Population. *Dev Cell* **33**: 107–118
- Allen BL, Taatjes DJ** (2015) The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**: 155–166
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, et al** (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–657
- Amsbury S, Hunt L, Elhaddad N, Baillie A, Lundgren M, Verhertbruggen Y, Scheller HV, Knox JP, Fleming AJ, Gray JE** (2016) Stomatal Function Requires Pectin Demethyl-esterification of the Guard Cell Wall. *Curr Biol* **26**: 2899–2906
- Ando E, Kinoshita T** (2018) Red Light-Induced Phosphorylation of Plasma Membrane H⁺-ATPase in Stomatal Guard Cells. *Plant Physiol* **178**: 838–849
- Bäckström S, Elfving N, Nilsson R, Wingsle G, Björklund S** (2007) Purification of a Plant Mediator from *Arabidopsis thaliana* Identifies PFT1 as the Med25 Subunit. *Mol Cell* **26**: 717–729
- Blatt MR** (2000) Cellular Signaling and Volume Control in Stomatal Movements in Plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 221–241
- Boccalandro HE, Giordano CV, Ploschuk EL, Piccoli PN, Bottini R, Casal JJ** (2012) Phototropins But Not Cryptochromes Mediate the Blue Light-Specific Promotion of

Stomatal Conductance, While Both Enhance Photosynthesis and Transpiration under Full Sunlight. *Plant Physiol* **158**: 1475–1484

Boccalandro HE, Rugnone ML, Moreno JE, Ploschuk EL, Serna L, Yanovsky MJ, Casal JJ (2009) Phytochrome B Enhances Photosynthesis at the Expense of Water-Use Efficiency in Arabidopsis. *Plant Physiol* **150**: 1083–1092

Briggs WR, Christie JM (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* **7**: 204–210

Casal JJ (2013) Photoreceptor Signaling Networks in Plant Responses to Shade. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 403–427

Cashmore AR, Jarillo JA, Wu Y-J, Liu D (1999) Cryptochromes: Blue Light Receptors for Plants and Animals. *Science* **284**: 760–765

Casson S, Gray JE (2008) Influence of environmental factors on stomatal development. *New Phytol* **178**: 9–23

Casson SA, Franklin KA, Gray JE, Grierson CS, Whitelam GC, Hetherington AM (2009) phytochrome B and PIF4 Regulate Stomatal Development in Response to Light Quantity. *Curr Biol* **19**: 229–234

Cerdán PD, Chory J (2003) Regulation of flowering time by light quality. *Nature* **423**: 881–885

Chen R, Jiang H, Li L, Zhai Q, Qi L, Zhou W, Liu X, Li H, Zheng W, Sun J, et al (2012) The Arabidopsis Mediator Subunit MED25 Differentially Regulates Jasmonate and Abscisic Acid Signaling through Interacting with the MYC2 and ABI5 Transcription Factors. *Plant Cell* **24**: 2898–2916

Christie JM (2007) Phototropin Blue-Light Receptors. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 21–45

Cutler S, Ghassemian M, Bonetta D, Cooney S, McCourt P (1996) A Protein Farnesyl Transferase Involved in Abscisic Acid Signal Transduction in Arabidopsis. *Science* **273**: 1239–1241

Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010) Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 651–679

Daszkowska-Golec A, Szarejko I (2013) Open or Close the Gate – Stomata Action Under the Control of Phytohormones in Drought Stress Conditions. *Front Plant Sci* **4**: 3389

Edwards A, Bowling DJF (1985) Evidence for a CO₂ Inhibited Proton Extrusion Pump in the Stomatal Cells of *Tradescantia virginiana*. *J Exp Bot* **36**: 91–98

Elfving N, Davoine C, Benloch R, Blomberg J, Brännström K, Müller D, Nilsson A, Ulfstedt M, Ronne H, Wingsle G, et al (2011) The Arabidopsis thaliana Med25 mediator subunit integrates environmental cues to control plant development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 8245–8250

Fornero C, Rickerd T, Kirik V (2019) Papillae formation on Arabidopsis leaf trichomes requires the function of Mediator tail subunits 2, 14, 15a, 16, and 25. *Planta* **249**: 1063–1071

- Fornero C, Suo B, Zahde M, Juveland K, Kirik V** (2017) Papillae formation on trichome cell walls requires the function of the mediator complex subunit Med25. *Plant Mol Biol* **95**: 389–398
- Geiger D, Maierhofer T, AL-Rasheid KAS, Scherzer S, Mumm P, Liese A, Ache P, Wellmann C, Marten I, Grill E, et al** (2011) Stomatal Closure by Fast Abscisic Acid Signaling Is Mediated by the Guard Cell Anion Channel SLAH3 and the Receptor RCAR1. *Sci Signal* **4**: ra32–ra32
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Stange A, Marten I, Bauer H, Ache P, Matschi S, Liese A, Al-Rasheid KAS, et al** (2009) Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 21425–21430
- Gonzalez-Guzman M, Pizzio GA, Antoni R, Vera-Sirera F, Merilo E, Bassel GW, Fernández MA, Holdsworth MJ, Perez-Amador MA, Kollist H, et al** (2012) Arabidopsis PYR/PYL/RCAR Receptors Play a Major Role in Quantitative Regulation of Stomatal Aperture and Transcriptional Response to Abscisic Acid. *Plant Cell* **24**: 2483–2496
- Goodman HM, Ecker JR, Dean C** (1995) The genome of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 10831–10835
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD** PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. 10
- Hashimoto M, Negi J, Young J, Israelsson M, Schroeder JI, Iba K** (2006) *Arabidopsis* HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO₂. *Nat Cell Biol* **8**: 391–397
- Hashimoto-Sugimoto M, Negi J, Monda K, Higaki T, Isogai Y, Nakano T, Hasezawa S, Iba K** (2016) Dominant and recessive mutations in the Raf-like kinase *HT1* gene completely disrupt stomatal responses to CO₂ in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **67**: 3251–3261
- Hayashi M, Inoue S, Ueno Y, Kinoshita T** (2017) A Raf-like protein kinase BHP mediates blue light-dependent stomatal opening. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep45586
- Hörak H, Sierla M, Töldsepp K, Wang C, Wang Y-S, Nuhkat M, Valk E, Pechter P, Merilo E, Salojärvi J, et al** (2016) A Dominant Mutation in the HT1 Kinase Uncovers Roles of MAP Kinases and GHR₁ in CO₂-induced Stomatal Closure. *Plant Cell* **28**: tpc.00131.2016
- Hu H, Boisson-Dernier A, Israelsson-Nordström M, Böhmer M, Xue S, Ries A, Godoski J, Kuhn JM, Schroeder JI** (2010) Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO₂-controlled stomatal movements in guard cells. *Nat Cell Biol* **12**: 87–93
- Iino M, Ogawa T, Zeiger E** (1985) Kinetic properties of the blue-light response of stomata. *Proc Natl Acad Sci* **82**: 8019–8023
- Iñigo S, Alvarez MJ, Strasser B, Califano A, Cerdán PD** (2012) PFT1, the MED25 subunit of the plant Mediator complex, promotes flowering through CONSTANS dependent and independent mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant J* **69**: 601–612

- Jakobson L, Vaahtera L, Töldsepp K, Nuhkat M, Wang C, Wang Y-S, Hõrak H, Valk E, Pechter P, Sindarovska Y, et al** (2016) Natural Variation in *Arabidopsis* Cvi-0 Accession Reveals an Important Role of MPK12 in Guard Cell CO₂ Signaling. *PLOS Biol* **14**: e2000322
- Jalakas P, Huang Y-C, Yeh Y-H, Zimmerli L, Merilo E, Kollist H, Brosché M** (2017) The Role of ENHANCED RESPONSES TO ABA1 (ERA1) in *Arabidopsis* Stomatal Responses Is Beyond ABA Signaling. *Plant Physiol* **174**: 665–671
- Jones L, Milne JL, Ashford D, McQueen-Mason SJ** (2003) Cell wall arabinan is essential for guard cell function. *Proc Natl Acad Sci* **100**: 11783–11788
- Jones RJ, Mansfield TA** (1970) Suppression of Stomatal Opening in Leaves Treated with Abscisic Acid. *J Exp Bot* **21**: 714–719
- Kaiserli E, Chory J** (2016) The Role of Phytochromes in Triggering Plant Developmental Transitions. eLS. American Cancer Society, pp 1–11
- Kevei E, Schafer E, Nagy F** (2007) Light-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning of phytochromes. *J Exp Bot* **58**: 3113–3124
- Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K** (2001) phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**: 656–660
- Kollist H, Nuhkat M, Roelfsema MRG** (2014) Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. *New Phytol* **203**: 44–62
- Kollist T, Moldau H, Rasulov B, Oja V, Rämme H, Hüve K, Jaspers P, Kangasjärvi J, Kollist H** (2007) A novel device detects a rapid ozone-induced transient stomatal closure in intact *Arabidopsis* and its absence in *abi2* mutant. *Physiol Plant* **129**: 796–803
- Koornneef M, Meinke D** (2010) The development of *Arabidopsis* as a model plant. *Plant J* **61**: 909–921
- Krämer U** (2015) Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife* **4**: e06100
- Lee SC, Lan W, Buchanan BB, Luan S** (2009) A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 21419–21424
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E** (2009) Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science* **324**: 1064–1068
- Matrosova A, Bogireddi H, Mateo-Peñas A, Hashimoto-Sugimoto M, Iba K, Schroeder JI, Israelsson-Nordström M** (2015) The HT1 protein kinase is essential for red light-induced stomatal opening and genetically interacts with OST1 in red light and CO₂-induced stomatal movement responses. *New Phytol* **208**: 1126–1137
- Mclaren JS, Smith H** (1978) Phytochrome control of the growth and development of *Rumex obtusifolius* under simulated canopy light environments*. *Plant Cell Environ* **1**: 61–67

- McNellis TW, Torii KU, Deng XW** (1996) Expression of an N-terminal fragment of COP1 confers a dominant-negative effect on light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8**: 1491–1503
- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M** (1998) *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* **282**: 662–682
- Messinger SM, Buckley TN, Mott KA** (2006) Evidence for Involvement of Photosynthetic Processes in the Stomatal Response to CO₂. *Plant Physiol* **140**: 771–778
- Mittelheuser CJ, Steveninck RFMV** (1969) Stomatal Closure and Inhibition of Transpiration induced by (RS)-Abscisic Acid. *Nature* **221**: 281
- Pandey S, Wang R-S, Wilson L, Li S, Zhao Z, Gookin TE, Assmann SM, Albert R** (2010) Boolean modeling of transcriptome data reveals novel modes of heterotrimeric G-protein action. *Mol Syst Biol* **6**: 372
- Park S-Y, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, et al** (2009) Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science* **324**: 1068–1071
- Pei Z-M, Ghassemian M, Kwak CM, McCourt P, Schroeder JI** (1998) Role of Farnesyltransferase in ABA Regulation of Guard Cell Anion Channels and Plant Water Loss. *Science* **282**: 287–290
- Pilot G, Lacombe B, Gaymard F, Chérel I, Boucherez J, Thibaud J-B, Sentenac H** (2001) Guard Cell Inward K⁺ Channel Activity in *Arabidopsis* Involves Expression of the Twin Channel Subunits KAT1 and KAT2. *J Biol Chem* **276**: 3215–3221
- Quail PH** (2002) Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr Opin Cell Biol* **14**: 180–188
- Raschke K** (1975) Stomatal Action. *Annu Rev Plant Physiol* **26**: 309–340
- Roelfsema MRG, Hanstein S, Felle HH, Hedrich R** (2002) CO₂ provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *Plant J* **32**: 65–75
- Roelfsema MRG, Hedrich R** (2005) In the light of stomatal opening: new insights into ‘the Watergate.’ *New Phytol* **167**: 665–691
- Roelfsema MRG, Levchenko V, Hedrich R** (2004) ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *Plant J* **37**: 578–588
- Roelfsema MRG, Steinmeyer R, Staal M, Hedrich R** (2001) Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane. *Plant J* **26**: 1–13
- Running MP, Fletcher JC, Meyerowitz EM** (1998) The WIGGUM gene is required for proper regulation of floral meristem size in *Arabidopsis*. *Development* **125**: 2545–2553
- Sancar A** (1994) Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* **33**: 2–9

- Schachtman DP, Schroeder JI, Lucas WJ, Anderson JA, Gaber RF** (1992) Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA. *Science* **258**: 1654–1658
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW** (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**: 671–675
- Schoch P-G, Zinsou C, Sibi M** (1980) Dependence of the Stomatal Index on Environmental Factors during Stomatal Differentiation in Leaves of *Vigna sinensis* L.1. EFFECT OF LIGHT INTENSITY. *J Exp Bot* **31**: 1211–1216
- Schroeder JI, Keller BU** (1992) Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proc Natl Acad Sci* **89**: 5025–5029
- Schubert D, Lechtenberg B, Forsbach A, Gils M, Bahadur S, Schmidt R** (2004) Silencing in Arabidopsis T-DNA Transformants: The Predominant Role of a Gene-Specific RNA Sensing Mechanism versus Position Effects. *Plant Cell* **16**: 2561–2572
- Schwartz A, Zeiger E** (1984) Metabolic energy for stomatal opening. Roles of photophosphorylation and oxidative phosphorylation. *Planta* **161**: 129–136
- Seguela-Arnaud M, Smith C, Uribe MC, May S, Fischl H, McKenzie N, Bevan MW** (2015) The Mediator complex subunits MED25/PFT1 and MED8 are required for transcriptional responses to changes in cell wall arabinose composition and glucose treatment in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biol* **15**: 215
- Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G, McElver J, Patton D, Dietrich B, Ho P, Bacwaden J, Ko C, et al** (2002) A High-Throughput Arabidopsis Reverse Genetics System. *Plant Cell* **14**: 2985–2994
- Sharkey TD, Raschke K** (1981) Effect of Light Quality on Stomatal Opening in Leaves of *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiol* **68**: 1170–1174
- Sharrock RA, Quail PH** (1989) Novel phytochrome sequences in Arabidopsis thaliana: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev* **3**: 1745–1757
- Shimazaki K, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T** (2007) Light Regulation of Stomatal Movement. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 219–247
- Sierla M, Hõrak H, Overmyer K, Waszczak C, Yarmolinsky D, Maierhofer T, Vainonen JP, Salojärvi J, Denessiouk K, Laanemets K, et al** (2018) The Receptor-like Pseudokinase GHR1 Is Required for Stomatal Closure. *Plant Cell* **30**: 2813–2837
- Smith H, Whitelam GC** (1997) The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant Cell Environ* **20**: 840–844
- Szyroki A, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MRG, Ache P, Reintanz B, Deeken R, Godde M, Felle H, Steinmeyer R, et al** (2001) KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 2917–2921
- Takemiya A, Kinoshita T, Asanuma M, Shimazaki K** (2006) Protein phosphatase 1 positively regulates stomatal opening in response to blue light in *Vicia faba*. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 13549–13554

- Takemiya A, Shimazaki K** (2016) Arabidopsis phot1 and phot2 phosphorylate BLUS₁ kinase with different efficiencies in stomatal opening. *J Plant Res* **129**: 167–174
- Takemiya A, Yamauchi S, Yano T, Ariyoshi C, Shimazaki K** (2013) Identification of a Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 1 Which Mediates Blue Light Signaling for Stomatal Opening. *Plant Cell Physiol* **54**: 24–35
- Talbott LD, Shmayevich IJ, Chung Y, Hammad JW, Zeiger E** (2003) Blue Light and Phytochrome-Mediated Stomatal Opening in the npq1 and phot1 phot2 Mutants of Arabidopsis. *Plant Physiol* **133**: 1522–1529
- Talbott LD, Zhu J, Han SW, Zeiger E** (2002) Phytochrome and Blue Light-Mediated Stomatal Opening in the Orchid, *Paphiopedilum*. *Plant Cell Physiol* **43**: 639–646
- Tian W, Hou C, Ren Z, Pan Y, Jia J, Zhang H, Bai F, Zhang P, Zhu H, He Y, et al** (2015) A molecular pathway for CO₂ response in *Arabidopsis* guard cells. *Nat Commun* **6**: 6057
- Tischer SV, Wunschel C, Papacek M, Kleigrew K, Hofmann T, Christmann A, Grill E** (2017) Combinatorial interaction network of abscisic acid receptors and coreceptors from *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci* **114**: 10280–10285
- Töldsepp K, Zhang J, Takahashi Y, Sindarovska Y, Hōrak H, Ceciliato PHO, Koolmeister K, Wang Y-S, Vaahtera L, Jakobson L, et al** (2018) Mitogen-activated protein kinases MPK4 and MPK12 are key components mediating CO₂-induced stomatal movements. *Plant J* **96**: 1018–1035
- Vahisalu T, Kollist H, Wang Y-F, Nishimura N, Chan W-Y, Valerio G, Lamminmäki A, Brosché M, Moldau H, Desikan R, et al** (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* **452**: 487–491
- Vahisalu T, Puzōrjova I, Brosché M, Valk E, Lepiku M, Moldau H, Pechter P, Wang Y-S, Lindgren O, Salojärvi J, et al** (2010) Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *Plant J* **62**: 442–453
- Wang F-F, Lian H-L, Kang C-Y, Yang H-Q** (2010) Phytochrome B Is Involved in Mediating Red Light-Induced Stomatal Opening in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **3**: 246–259
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ** (2007) An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLOS ONE* **2**: e718
- Xu R, Li Y** (2011) Control of final organ size by Mediator complex subunit 25 in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **138**: 4545–4554
- Yang Y, Costa A, Leonhardt N, Siegel RS, Schroeder JI** (2008) Isolation of a strong *Arabidopsis* guard cell promoter and its potential as a research tool. *Plant Methods* **4**: 6
- Zeiger E** (1983) The Biology of Stomatal Guard Cells. *Annu Rev Plant Physiol* **34**: 441–474

Kasutatud veebiaadressid

<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi> (vaadatud 23.05.2019)

<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress> (vaadatud 23.05.2019)

Lisad

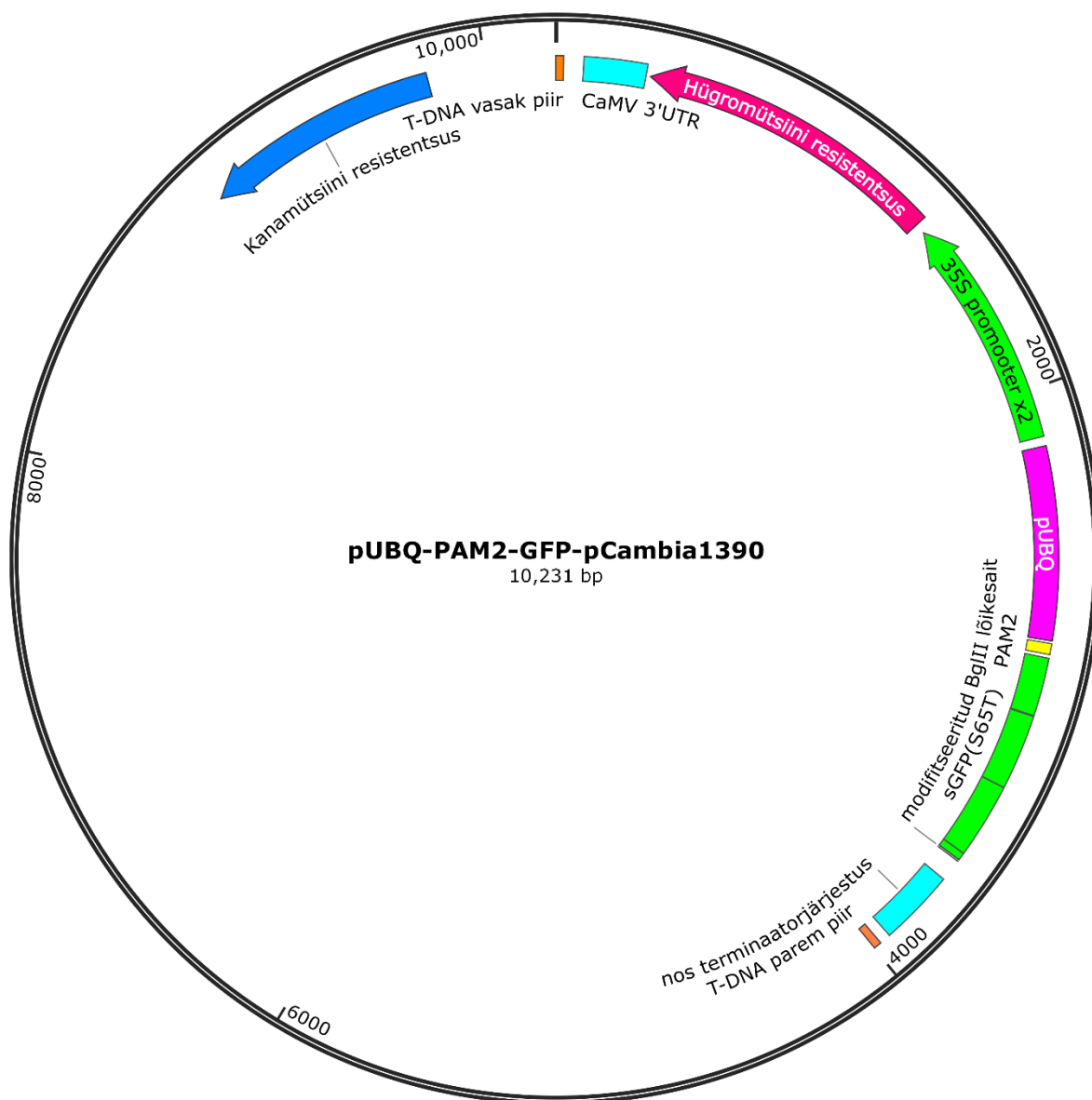
Lisa 1

Tabel 1. PCR reaktsioonides kasutatud primerid

Primer	Järjestus	GC%	Tm (°C)	Pikkus (bp)
MED25pro F+PstI	TGCTCTGCAGCCTTTCCATATTCTATCGAGCT	47	66	32
MED25pro R+EcoRI	TGCTGAATTCAGTCTCTGAGCGTTGTTG	46	63	28
MED25GEN F+EcoRI	TGCTGAATTCATGTCGTCGGAGGTGAAAC	48	64	29
MED25GEN R+HpaI	TGCTGTAACTTATCCCATGAAGCCAGCTC	47	64	30
MED25gen R2	GATTGTGAAGTCTGCATAGCC	48	55	21
MED25gen R3	TTGCCCAGTGACTGGAATAG	50	55	20
MED25gen F2	CAACAGCAACAGCAGCATC	53	56	19
GFP F+EcoRI	TGCT-GAATTC ATGGTGAGCAAGGGCGA	52	66	27
GFP R+HpaI	TGCT-GTTAAC-TCATTGTTTGCCTCCCTGCT	47	66	30
GFP R2	GTCGTGCTGCTTCATGTG	56	55	18
Hph1	CCACTATCGGCGAGTACTTC	55	55	20
Hph2	TAACAGCGGTCATTGACTGG	50	56	20

Lisa 2

Created with SnapGene®



Joonis 16. pUBQ-PAM2-GFP-pCambia1390 vektori kaart.

Lihlitsents

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kaspar Koolmeister,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) minu loodud teose *MED25* roll hariliku müürlooga õhulõhede regulatsioonis ja arengus,

mille juhendajateks on Hanna Hõrak, Liina Jakobson ja Hannes Kollist

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Kaspar Koolmeister

30.05.2019