

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
ÕKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
OECOLOGICUM

**Geeni *TMM* roll lehe õhulõhede paigutuse kujunemises harilikus müürloogas
(*Arabidopsis thaliana*) ja odras (*Hordeum vulgare*)**

Magistritöö
30 EAP
Eliisabeth Laul

Juhendajad professor Hanna Hõrak,
PhD Ljudmilla Timofejeva,
PhD Kristiina Laanemets

Tartu 2026

Infoleht

Geeni *TMM* roll lehe õhulõhede paigutuse kujunemises harilikus müürloogas (*Arabidopsis thaliana*) ja odras (*Hordeum vulgare*)

Taimelehtedes on pisikesed avaused, õhulõhed, mida kasutab taim fotosünteesiks vajaliku süsihappegaasi omastamiseks ning vee transpireerimiseks. Õhulõhede arengu signaalirajas omab olulist rolli geen *TOO MANY MOUTHS (TMM)*, mis mõjutab nii õhulõhede paiknevust kui tihedust ja seda lehe alumisel ja ülemisel küljel erinevalt. Kuidas *TMM* geen toimib põllumajanduslikult oluliste kõrreliste õhulõhede arengus, ei ole teada. Käesolevas töös uuriti geeni *TMM* rolli õhulõhede paigutumise kujunemisel nii odras (*Hordeum vulgare*) kui ka harilikus müürloogas (*Arabidopsis thaliana*). Selleks loodi *tmm* mutantsed odrad, ning komplementeeriti hariliku müürlooga *tmm* mutante terve *TMM* geeniga. Töös hariliku müürloogaga nähti olulist seost *TMM* geeni mõju ja lehe alumise külje õhulõhede tiheduse vahel. Samuti saadi *tmm* mutantsed ning häirunud *TMM* geeniga odrad, mille õhulõhede paiknevusest on aimata seda, et odra puhul *TMM* geeni funktsiooni kadu õhulõhede suhet märkimisväärselt ei mõjuta.

Õhulõhe, taim, õhulõhede arengu signaalirada, taimegeneetika, geen, oder, harilik müürlook

CERCS: B225 Taimegeneetika, B310 Soontaimede füsioloogia, T490 Biotehnoloogia, B390 Taimekasvatuse

The role of gene *TMM* in stomatal patterning in *Arabidopsis thaliana* and *Hordeum vulgare*

Plant leaves contain small pores called stomata, which are used for the uptake of carbon dioxide necessary for photosynthesis and for the transpiration of water. The gene *TOO MANY MOUTHS* (*TMM*) plays a critical role in the stomatal development signaling pathway, influencing both stomatal patterning and density differently on the abaxial and adaxial leaf surfaces. However, the specific function of the *TMM* gene in stomatal development in agriculturally significant grass species remains unknown. In the present study, the role of the *TMM* gene in determining stomatal distribution was investigated in both barley (*Hordeum vulgare*) and *Arabidopsis thaliana*. To achieve this, *tmm* mutant barley lines were generated, and *Arabidopsis tmm* mutants were complemented with a wild-type *TMM* gene. The research involving *Arabidopsis* revealed a significant effect of complementation with the *TMM* gene on stomatal density of the abaxial leaf surface in the *tmm* mutants. Furthermore, the analysis of the obtained *tmm* mutant and *TMM*-disrupted barley lines suggests that the loss of *TMM* gene function in barley does not significantly impact stomatal distribution between leaf surfaces.

Stomata, plant, stomata development, plant genetics, gene, barley, *Arabidopsis thaliana*

CERCS: B225 Plant genetics, B310 Physiology of vascular plants, T490 Biotechnology, B390 Phytotechny

Sisukord

Infoleht.....	1
Kasutatud lühendid.....	6
Sissejuhatus.....	8
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	9
1.1 Harilik müürlook (<i>Arabidopsis thaliana</i>).....	9
1.1.1 Harilik müürlook mudelorganismina.....	9
1.2 Oder (<i>Hordeum vulgare</i>).....	9
1.3 Õhulõhed.....	10
1.3.1 Õhulõhede jaotus lehepindade vahel.....	12
1.3.2 Õhulõhede areng ja signaalirada harilikus müürloogas.....	12
1.3.2.1 Õhulõhede areng harilikus müürloogas.....	12
1.3.2.2 Õhulõhede arengu signaalirajad harilikus müürloogas.....	14
1.3.3 Õhulõhede areng ja signaalirada kõrrelistes (<i>Poaceae</i>).....	16
1.3.3.1 Õhulõhede areng kõrrelistes.....	16
1.3.3.2 Õhulõhede arengu signaalirajad kõrrelistes.....	17
1.4 Geen TMM.....	19
1.4.1 Geeni TMM roll kõrrelistes.....	19
1.5 Aretustehnoloogiatest.....	20
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	21
2.1 TÖÖ EESMÄRGID.....	21
2.2 MATERJAL JA METOODIKA.....	21
2.2.1 Odra TMM geeni punktmutatsioonide loomine.....	21
2.2.1.1 Plasmiidvektorite loomise põhimõtetest.....	21
2.2.1.1.1 Positsioon 1 ja 2.....	22
2.2.1.1.2 Oligonukleotiidide hübridiseerimine gRNA loomiseks positsiooni 3 jaoks.....	23
2.2.1.1.3 Vektori lõikamine ja gRNA vektorisse ligeerimine (Positsioon 3)...	24
2.2.1.1.4 Oligonukleotiidide hübridiseerimine gRNA loomiseks (Positsioon 4).	25
2.2.1.1.5 Vektori lõikamine ja gRNA vektorisse ligeerimine (Positsioon 4)...	26
2.2.1.1.6 <i>E. coli</i> (<i>Escherichia coli</i>) transformatsioon plasmiididega.....	26
2.2.1.1.7 Plasmiidide eraldamine ja sekveneerimine.....	27
2.2.1.1.8 Lõppvektori loomine.....	27
2.2.1.2 Lõppvektori viimine agrobakterisse.....	29
2.2.1.2.1 Agrobakteri ettevalmistamine taimede nakatamiseks.....	30
2.2.1.3 Odra transformeerimine.....	31
2.2.1.3.1 Odra taimede kasvatamine.....	31

2.2.1.3.2 Odra embrüote eraldus.....	31
2.2.1.3.3 Odra embrüote nakatamine agrobakteriga.....	31
2.2.1.4 Regenerantide kasvatamine.....	33
2.2.1.5 Transformeeritud otrade DNA eraldus.....	34
2.2.1.5.1 T0 regenerantide geneetilise materjali analüüsid.....	34
2.2.1.6 T1 põlvkonna taimede kasvatamine.....	34
2.2.1.7 T1 taimede geneetilise materjali analüüsid.....	35
2.2.1.7.1 T1 põlvkonnas transgeeni esinemise testimine MLO+Cas9 praimeritega.....	35
2.2.1.7.2 T1 põlvkonna transgeeni testimine D53+Hygr praimeritega.....	35
2.2.1.7.3 T1 põlvkonna otrades T1 ja T2 sihtmärkpiirkonna amplifitseerimine.. 35	35
2.2.1.8 Odra fenotüübi analüüsid.....	36
2.2.1.8.1 Odra õhulõhede juhtivuse mõõtmine.....	36
2.2.1.8.2 Lehejäljendite võtmine transformeeritud otradelt.....	36
2.2.1.8.3 Õhulõhede anatoomia analüüs lehejäljenditelt.....	36
2.2.2 Hariliku müürlooga tmm mutandi komplementeerimine TMM geeniga.....	37
2.2.2.1 Transformeeritava müürlooga tmm mutantide kasvatamine.....	37
2.2.2.2 Plasmiidide disainimine hariliku müürlooga transformeerimiseks.....	37
2.2.2.2.1 AtTMM komplementatsioonivektori loomine.....	37
2.2.2.2.1.1 TMM promootori paljundamine genoomselt DNA-lt.....	37
2.2.2.2.1.2 Produkti kontrollimine geelil ja produkti puhastamine.....	38
2.2.2.2.1.3 Restriktaasidega lõikamine.....	38
2.2.2.2.1.4 Vektorplasmidi ettevalmistus.....	38
2.2.2.2.1.5 Ligatsioon.....	39
2.2.2.2.1.6 Plasmiidide viimine Escherichia coli-sse.....	39
2.2.2.2.1.7 Koloonia PCR.....	39
2.2.2.2.1.8 Plasmiidide sekveneerimine.....	40
2.2.2.2.1.9 AtTMM geeni lisamine promootoriga vektorisse.....	40
2.2.2.2.1.10 Vektorplasmidi pCAM1390-v2-TMMPROM ettevalmistus.....	41
2.2.2.2.1.11 Transformatsioon E.coli-sse ja koloonia PCR.....	41
2.2.2.2.1.12 Sekveneerimine.....	41
2.2.2.3 Hariliku müürlooga vektorite viimine agrobakterisse.....	42
2.2.2.4 Hariliku müürlooga transformeerimine.....	42
2.2.2.5 Geneetiliselt muundatud hariliku müürlooga taimede sõelumine.....	43
2.2.2.5.1 Seemnete steriliseerimine laminaari all ja transgeensete taimede kasvatamine.....	43
2.2.2.6 Õhulõhede jäljendite võtmine transformeeritud hariliku müürlooga taimedelt.....	43
2.2.2.7 Transformeeritud hariliku müürlooga lehejäljendite analüüs.....	44
2.3 Tulemused.....	44
2.3.1 Odra transformeerimiseks loodud plasmiidid.....	44

2.3.2	Transformeeritud otrade T0 põlvkond.....	44
2.3.3	Transformeeritud otrade T0 regenerandid olid transgeensed.....	44
2.3.4	T0 odrataimed olid TMM sihtmärkide regioonis muteerunud.....	45
2.3.5	Transformeeritud otrade T1 põlvkonna taimed olid kõik transgeensed.....	46
2.3.6	Transformeeritud odra T1 põlvkonna taimedes olid mutatsioonid TMM sihtmärkide regioonis.....	47
2.3.7	Õhulõhetunnused transformeeritud T1 põlvkonna otrades.....	50
2.3.8	Hariliku müürlooga tmm mutantide komplementeerimine.....	52
2.4	Arutelu.....	54
2.4.1	TMM geeni mutatsioonidega odrad.....	54
2.4.2	TMM geeniga tmm mutandi komplementeerimise mõju harilikus müürloogas.....	56
2.5	Kokkuvõte.....	57
RESÜMEE.....		58
Tänuavaldused.....		59
Kirjanduse loetelu.....		59
Kasutatud veebiaadressid.....		68
Lisad.....		69
Lisa 1.	pHvL1P3-TMM-T1.....	69
Lisa 2.	pHvL1P4-TMM-T2.....	70
Lisa 3.	Praimerite tabel.....	71
Lisa 4.	Geelelektroforeesi protokoll.....	73
Lisa 5.	Koloonia PCR-i tsükleri (Mastercycler, nexus GX2) programm.....	74
Lisa 6.	CI sööde (Callus induction).....	75
Lisa 7.	CI selektiivsööde (Callus induction).....	76
Lisa 8.	R sööde.....	77
Lisa 9.	Kallusest arenenud odra regenerant.....	78
Lisa 10.	DNA eralduse CTAB (tsetüül-trimetüül-ammooniumbromiid) protokoll.....	79
Lisa 11.	Transgeenitesti (MLO+Cas9) protokoll.....	80
Lisa 12.	TMMprom_pCAMBIA1390-V2.....	81
Lisa 13.	TMMprom_AtTMM_pCAMBIA1390-V2.....	82
Lisa 14.	TMMprom_HvTMM_pCAMBIA1390-V2.....	83
Lisa 15.	T1 põlvkonna odrad.....	84
Lisa 16.	TMM regiooni spetsiifiline PCR.....	85
Lisa 17.	Lõppvektor.....	86
Lisa 18.	Transgeenitest D53+Hygr.....	87
Lihtlitsents.....		88

Kasutatud lühendid

BZU3 (BIZUI3) - maisis esinev ensüüm, mis osaleb õhulõhede kompleksi morfogeneesis ja rakukesta moodustamises

Cas9 - bakterist *Streptococcus pyogenes* pärit nukleaaas

Col-0 - *Arabidopsis thaliana* metsiktüüpi mudelliin

CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) – klasterdunud regulaarsete vahedega lühikesed palindroomsed kordused

CTAB, *cetyltrimethylammonium bromide* - tsetüültrimetüülammooniumbromiid, pindaktiivne aine, mida kasutatakse DNA eraldamise lahuses

EPF1, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 1 - peptiid, mis surub alla õhulõhede moodustumist

EPF2, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 - peptiid, mis surub alla õhulõhede moodustumist

EPFL9 (STOMAGEN) - signaalpeptiid, mis stimuleerib õhulõhede moodustumist

EPP, EPP1, *epf-processing proteinases* - proteaasid, mis aktiveerivad EPF peptiide

ERECTA - leutsiinirikas retseptor-tüüpi kinaas

ERL1/2, ERECTA-LIKE 1/2 - leutsiinirikkad ERECTA perekonna retseptor-tüüpi kinaasid

FAMA – transkriptsioonifaktor, mis suunab sulgraku emarakkude arenemist sulgrakkudeks ning takistab sulgrakkude edasist jagunemist

GC, *guard cell* - sulgrakk

GMC, *guard mother cell* - sulgrakkude emarakk

GP, Golden Promise - odrasort (enimkasutatud mudelliin)

ICE1 - transkriptsioonifaktor, mis osaleb õhulõhede arengurajas

MAPK (ingl. k. *mitogen-activated protein kinase*) - mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaas

MKK4/5–MPK3/6 - mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaaside signaali kaskaad õhulõhede signaalirajas

MMC, *meristemoid mother cell* - meristemoidi emarakk

MQ, Milli-Q vesi - ultrapuhas vesi, takistusega 18,2 MΩ.cm temperatuuril 25°C

MUTE - transkriptsioonifaktor, mis reguleerib meristemoidide arengut sulgrakkude emarakkudeks

OD₆₀₀ (*Optical Density*) - optiline tihedus lainepikkusel 600 nm

PAM, *Protospacer Adjacent Motif* - NGG järjestus DNAs, mille tunneb ära Cas9 ensüüm

PCR, POLYMERASE CHAIN REACTION - polümeraasi ahelreaktsioon

SCREAM (SCRM) - transkriptsioonifaktor, mis osaleb õhulõhede signaalirajas

SD, *stomatal density* - õhulõhede tihedus

SDD1, STOMATAL DENSITY AND DISTRIBUTION 1 - geen, mis osaleb hariliku müürlooga õhulõhede arengu signaalirajas

SLGC, *stomatal lineage ground cell* - õhulõhede arenguliini põhirakk

SPCH – SPEECHLESS, transkriptsioonifaktor, vajalik õhulõhede arenguliini rakkude asümmeetriliste rakujagunemiste alustamiseks

SR, *stomatal ratio* - õhulõhede tiheduste suhe (lehe ülemise külje õhulõhede tihedus/lehe alumise külje õhulõhede tihedus)

T0 - odra regenerantide põlvkond (transformeeritud kallustest regenereeritud taimed)

T1 - T0 otrade järglaspõlvkond

TAE, TRIS-ACETATE-EDTA - geelelektroforeesil kasutatav puhver

T-DNA, TRANSFER DNA - geenijärjestus, mis paikneb T-DNA piirjärjestuste vahel ja liigub agrobakteri vahendusel taime genoomi

TMM, TOO MANY MOUTHS - retseptorilaadne valk, osaleb hariliku müürlooga õhulõhede signaalirajas

Sissejuhatus

Kuna inimkond seisab praegu silmitsi kiiresti muutuvate kliimatingimustega ja põllukultuurid kannatavad üha enam abiootilise stressi all (põud, üleujutused, tõusev temperatuur) siis on eriti kriitiliselt vajalik omandada sügavad teadmised taimede füsioloogia toimemehhanismidest, et optimeerida taimede omadusi aretuse läbi toidujulgeoleku tagamiseks. Kuna suur osa inimestele olulisi põllumajanduskultuure on kõrrelised (nt oder ja nisu) siis on vaja lisaks mudelorganismide uurimisele ka uurida paralleelselt kõrrelisi.

Taimede reaktsioonide plastilisus keskkonnatingimustele on tihedalt seotud õhulõhedega. Õhulõhed on soontaimede epidermis leiduvad mikroskoopilised avaused, mis koosnevad õhupilust ja seda ümbritsevast kahest sulgrakust. Need avaused on taimede elutegevuseks kriitilise olulisusega, reguleerides fotosünteesiks vajaliku süsihappegaasi omastamist ja transpiratsiooni kaudu vee kasutuse efektiivsust.

Õhulõhede kujunemine ja jaotumine lehepindade vahel on juhitud läbi erinevate ensüümide ja valkude keeruka töö ning keskkonnategurite poolt. Õhulõhede normaalseks arenguks vajaliku signaaliülekanne süsteemi toimimiseks on taimedel erinevad geenid, millest üheks on geen *TMM*. Geen *TMM* toodab retseptorilaadset valku TOO MANY MOUTHS, mis toimib retseptorina üsna õhulõhede moodustamise signaaliraja alguses. Seeläbi reguleerib geen *TMM* õhulõhede kujunemist ja mustrit epidermis.

Praeguseks on geeni *TMM* rolli kirjeldatud enamasti mudeltaimes harilik müürlook (*Arabidopsis thaliana*). Märkimisväärne avastus on olnud see, et *TMM* geen reguleerib lehe alumise ja ülemise külje õhulõhede arengut oluliselt erinevalt. Kuna üldiselt teatakse lehe ülakülje õhulõhedest ja erisustest õhulõhede arenemise protsessides lehe eri pindade vahel vähe, siis geeni *TMM* uurimine võib just nendes küsimustes meile uusi vajalikke teadmisi tuua.

Kõrrelistes, nagu näiteks oder (*Hordeum vulgare*), on geeni *TMM* roll veel võrdlemisi ebaselge ning vajab põhjalikku uurimist. Kuna kõrreliste õhulõhede areng erineb kaheiduleheliste taimede õhulõhede arengust märkimisväärselt, siis ka geeni *TMM* roll võib kõrrelistes olla teistsugune kui näiteks kaheidulehelises harilikus müürloogas.

Töö koostati Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis molekulaarse taimefüsioloogia uurimisrühmas ja Maaelu Teadmuskeskuse taimebiotehnoloogia osakonnas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Harilik müürlook (*Arabidopsis thaliana*)

Harilik müürlook on kaheiduleheline (*Dicotyledoneae*) ristõieliste (*Brassicaceae*) sugukonda kuuluv rohhtaim. Kogu taime kõrgus on 10-40 cm, lehtede pikkus kuni 5 cm ja laius kuni 1 cm (eElurikkus, 04.2026). Globaalseks levialaks on Euroopa, Aasia, Põhja-Aafrika ja Ameerika. Eestis on harilik müürlook looduslikult esinev (*Go Botany*, 04.2026).

1.1.1 Harilik müürlook mudelorganismina

Harilik müürlook on olnud kasutuses mudelorganismina juba üle 40 aasta.

Eriliseks teeb hariliku müürlooga tema lühike kasvuperiood, iseviljastuvad õied, väike kasv ja väike genoomi suurus (Leutwiler et al., 1984). Harilikku müürlooka on mainitud erinevates töödes taimede mudelorganismina mitmeid kordi juba alates eelmisest sajandist. Suur läbimurre tuli siis, kui aastal 2000 sekveneeriti hariliku müürlooga genoomne DNA “*The Arabidopsis Genome Initiative*”-i poolt (AGI, 2000). Saadud sekvents kattis 115,4 miljonit aluspaari 125 miljonist aluspaarist (AGI, 2000).

Harilikule müürloogale keskenduvald töid oli juba aastal 2008 PubMed andmebaasis 3500 artiklit (Koornneef & Meinke, 2010). MASC (*Multinational Arabidopsis Steering Committee*) andmetel oli 2020. aasta seisuga 5960 artiklit, milles on viidatud hariliku müürlooga genoomsele sekventsile (Provart et al., 2021). 2022-23 MASC raportis kirjutatakse, et andmebaasis *Bio-Analytic Resource* (BAR) oli hariliku müürlooga kohta artikleid ligikaudu 67 000 (MASC, 2023). Harilik müürlook on sageli just see mudelorganism, kus tehakse avastusi taimes toimuvate mehhanismide kohta ja neid teadmisi saab kanda üle teistele taimedele, näiteks põllukultuuridele (Yaschenko et al., 2025).

1.2 Oder (*Hordeum vulgare*)

Oder (*Hordeum vulgare*) on üheiduleheline (*Monocotyledoneae*) kõrreliste (*Poaceae*) sugukonda kuuluv kultuurteravili. Oder on umbes 10 000 aastat tagasi (Badr et al., 2000) inimeste poolt kultuuristatud teravili, mis leiab kasutust loomasöödana ja linnase tootmises. Odra kasutamine inimeste toiduna on tänapäevalgi mõnes maailma kultuuris, eriti Aasias ja

Põhja-Aafrikas, oluline ning kogu maailmas on taas tõusmas huvi odra vastu selle toiteväärtuse tõttu (Baik & Ullrich, 2008).

Eestis toodeti aastal 2025 kokku 335 113 tonni otra (Statistikaamet, 2025). Keskmine globaalne odra tootmine 2016-2025 aastatel oli 148,67 miljonit tonni, mis on kolmandal kohal nisu (778,49 miljonit tonni) ja riisi (513,2 miljonit tonni) järel (USDA, Foreign Agricultural Service, 2026). Odra on nisuga võrreldes parem mudelorganism sellepärast, et odra on diploidne ja väiksema genoomiga kui nisu, mis on heksaploidne (Brenchley et al., 2012).

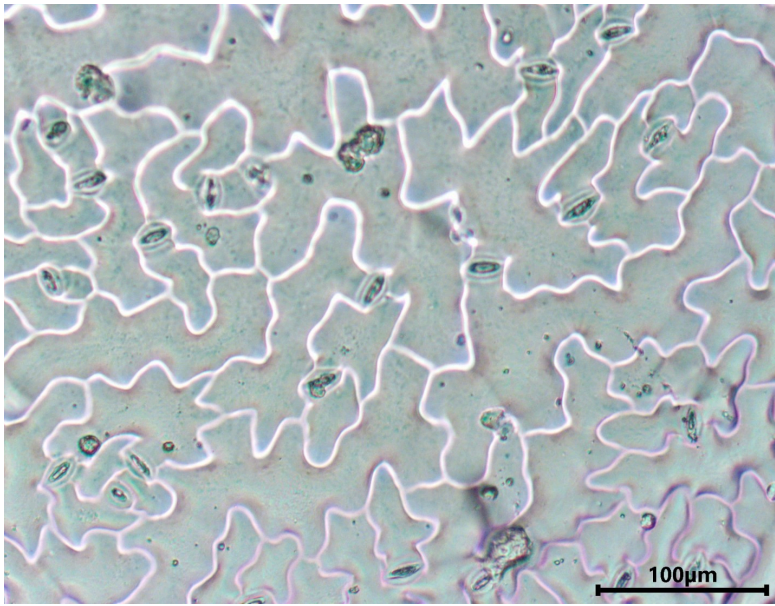
Esimesed mutatsioonide uuringud odra kohta toimusid juba aastal 1928, kui Rootsi geneetikud Hermann Nilsson-Ehle ja Åke Gustafsson tegid eksperimente tahtlikult tekitatud mutatsioonidega odra. Aastal 1953 loodi Rootsi valitsuse eestvedamisel teoreetiliste ja rakenduslike mutatsiooniuringute uurimisrühm (*Group for Theoretical and Applied Mutation Research*). Mutatsioonide loomiseks kasutati röntgenkiirgust, UV-kiirgust, sinepigaasi ja naatriumasiidi. Kuna odra oli üks selle tööühikute põhilisi uuritavaid organisme, lõi see väga palju uut vajalikku informatsiooni odra geneetika kohta, mis teeb odra omakorda väga atraktiivseks uurimisobjektiks (Lundqvist, 2014).

Odra on kõrrelise kohta suhteliselt väikese genoomiga diploidne taim, mille genoom on sekveneeritud ja millel on 14 kromosoomi ($2n = 14$). Nende omaduste pärast sobib odra teraviljade mudelorganismiks (*The International Barley Genome Sequencing Consortium*, 2012; Mascher et al. 2017; Saisho & Takeda 2011).

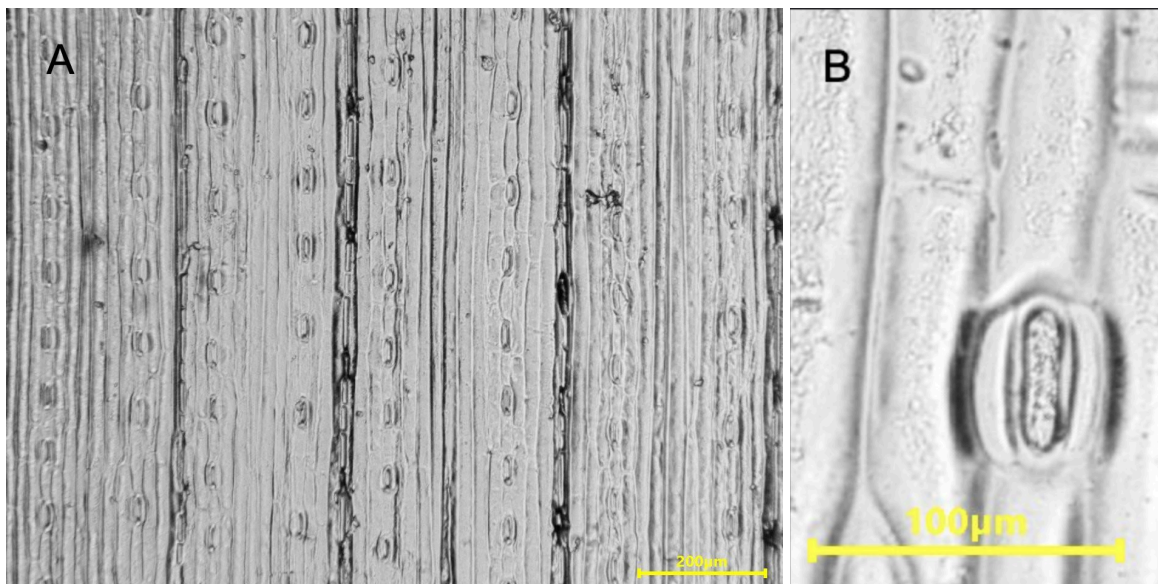
1.3 Õhulõhed

Õhulõhed on soontaimede epidermis leiduvad mikroskoopilised poorid, mis koosnevad õhupilust ja seda ümbritsevast kahest sulgrakust (Nadeau & Sack, 2002; Yan et al., 2014). Need on taimedele vajalikud selleks, et omastada fotosünteesiks vajaliku süsihappegaasi ning transpireerida vett (Jones, 1998). Õhulõhede kujunemine ja jaotumine lehepindade vahel on juhitud keeruka rakkudevahelise signaaliülekanne süsteemi ja keskkonnategurite poolt (Hörak, 2026).

Hariliku müürlooga õhulõhed koosnevad kahest rakust ja nende sulgrakud on neerukujulised. Õhulõhed paiknevad hajusalt sillutisrakkude vahel (Joonis 1). Kõrreliste õhulõhed koosnevad aga neljast rakust: hantlikujulistest sulgrakkudest ja neid paralleelselt ümbritsevatest kaasrakkudest. Samuti paiknevad kõrreliste õhulõhed sirgetes ridades sillutisrakkudega eraldatult ja paralleelselt juhtsoontega (Joonis 2, Berg & Raissig (2025)).



Joonis 1. Hariliku müürlooga (Col-0 metsiktüüp) adaksiaalse ehk ülemise lehe külje õhulõhed. Valgusmikroskoobi pildil lehepinna jäljendist on näha õhulõhed ning sakilise kujuga epidermi sillutisrakud. Joonisel mõõtskaala 100 mikromeetrit, foto autor Kārlis Dieviņš (2026).



Joonis 2. Odra (sort Golden Promise) abaksiaalse ehk alumise lehe külje õhulõhed. Valgusmikroskoobi pildid lehejäljenditest, (A) mõõtskaala pikkus 200 mikromeetrit, joonisel näha hantlikujuliste sulgrakkudega õhulõhesid, mis paiknevad üksteise kohal reas piki juhtsooni; (B) mõõtskaala pikkus 100 mikromeetrit, joonisel näha hantlikujuliste sulgrakkudega õhulõhet lähemalt, õhulõhe on avatud olekus.

1.3.1 Õhulõhede jaotus lehepindade vahel

Enamik taimi on hüpostomaatsed, mis tähendab, et õhulõhed asuvad ainult lehe alumisel ehk abaksiaalsel küljel (Muir, 2015). Siiski on paljud taimed amfistomaatsed, sealhulgas mudeltaim harilik müürlook, ehk õhulõhed paiknevad mõlemal lehe poolel (Jalakas et al., 2024; Vráblová et al., 2017). Amfistomaatsetel taimedel on õhulõhede tihedus tavaliselt suurem lehe abaksiaalsel küljel, kuid võib ka olla vastupidi, näiteks paljudel kõrreliste ja põllukultuuride liikidel (oder, nisu, riis) võib adaksiaalne (lehe ülakülje) õhulõhede tihedus olla suurem või sarnane abaksiaalsega, sõltuvalt liigist ja kasvutingimustest (Fan et al., 2025). Metsiktüüpi hariliku müürlooga puhul jääb tavaline adaksiaalse ja abaksiaalse õhulõhede tiheduse suhtarv (ülemine ehk adaksiaalne/alumine ehk abaksiaalne) vahemikku 0,4 kuni 1 (Berger & Altmann, 2000; Franks et al., 2015; Hronková et al., 2015; Jalakas et al., 2024).

On täheldatud, et õhulõhede areng on adaksiaalses ja abaksiaalses epidermis osaliselt erinevalt reguleeritud (Jalakas et al., 2024). Tundub, et lehe ülakülg on arenguliselt tundlikum välistele teguritele ja kohandab oma õhulõhede arvu vastavalt keskkonnatingimustele rohkem kui lehe alakülg (Hronková et al., 2015; Tulva et al., 2024; Jalakas et al., 2024). Samas kirjeldati päevalilledel (*Helianthus annuus*), et abaksiaalse, ehk alumise lehe külje õhulõhed, on keskkonnategurite, eriti valguse suhtes tundlikumad ja arenguliselt paindlikumad kui ülakülje õhulõhed (Pleva et al., 2026).

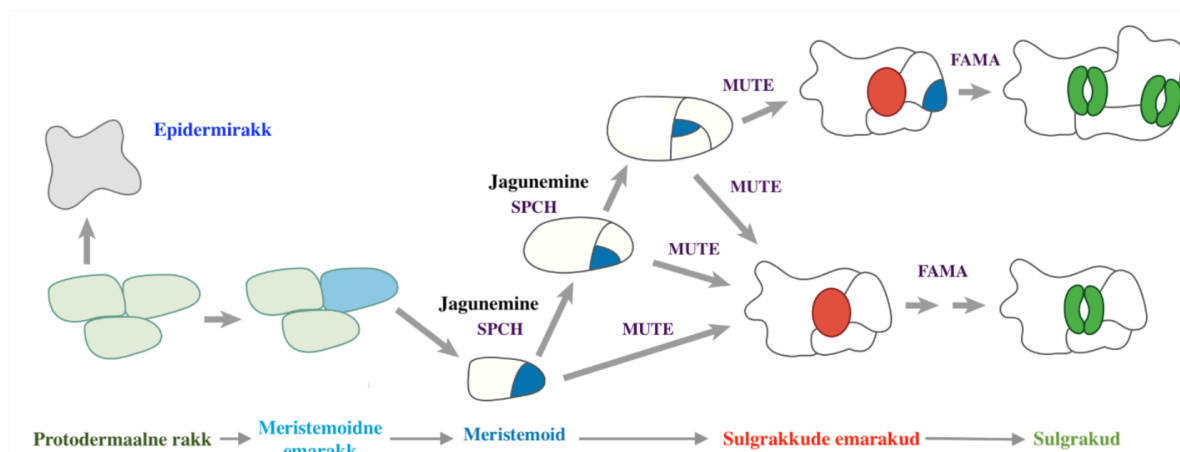
1.3.2 Õhulõhede areng ja signaalirada harilikus müürloogas

Järgnevas peatükis on käsitletud õhulõhede arengut ja signaaliradasid kaheidulehelistel hariliku müürlooga näitel.

1.3.2.1 Õhulõhede areng harilikus müürloogas

Harilikus müürloogas algab õhulõhede areng protodermi rakust (Joonis 3), millest kujuneb välja meristemoidi emarakk (ingl. k. *meristemoid mother cell*, lühend MMC, Lau & Bergmann (2012)). MMC jaguneb ebasümmeetriliselt ja tekitab väikese meristemoidraku ja suurema tütararakuna õhulõhede arenguliini põhiraku (ingl. k. *stomatal lineage ground cell*, lühend SLGC, Spiegelhalder & Raissig (2021)). Meristemoid võib seejärel veel ebasümmeetriliselt jaguneda, tekitades veel meristemoide ja õhulõhede arenguliini põhirakke, või muutuda sulgrakkude emarakuks (ingl. k. *guard mother cell*, lühend GMC, Geisler et al. (2000)). GMC jaguneb sümmeetriliselt kaheks sulgrakuks (ingl. k. *guard cell*, lühend GC).

Õhulõhede arenguliini põhirakk areneb omakorda kas epidermi sillutisrakuks või jaguneb asümmeetriliselt ja tekitab teise meristemoidi, mis paikneb eemal varem moodustunud meristemoidist. Normaalselt arenevas epidermis saavad kõigist meristemoididest lõpuks õhulõhed (Joonis 3, Lau & Bergmann, (2012). Korrektsse õhulõhede arengu regulatsiooni puhul on ka oluline niinimetatud “ühe raku reegel”, mis tähendab, et kahe õhulõhe vahel on vähemalt üks epidermi sillutisrakk (Hronková et al., 2015; Geisler et al., 2000).



Joonis 3. Õhulõhede arengurada harilikus müürloogas (originaaljoonis Pillitteri & Torii (2012); tõlkinud Poogen (2024)). Hallid nooled näitavad arengu suundasid. Lilla tekstiga on märgitud transkriptsioonifaktorid, mis mõjutavad vastavaid rakutüüpide üleminekuid õhulõhede arengurajas. Halli värvi on epidermi sillutisrakk. Rakutüübid on tähistatud sama värvi tekstiga nagu vastav rakk. Musta värvi tekst märgib jagunemisi.

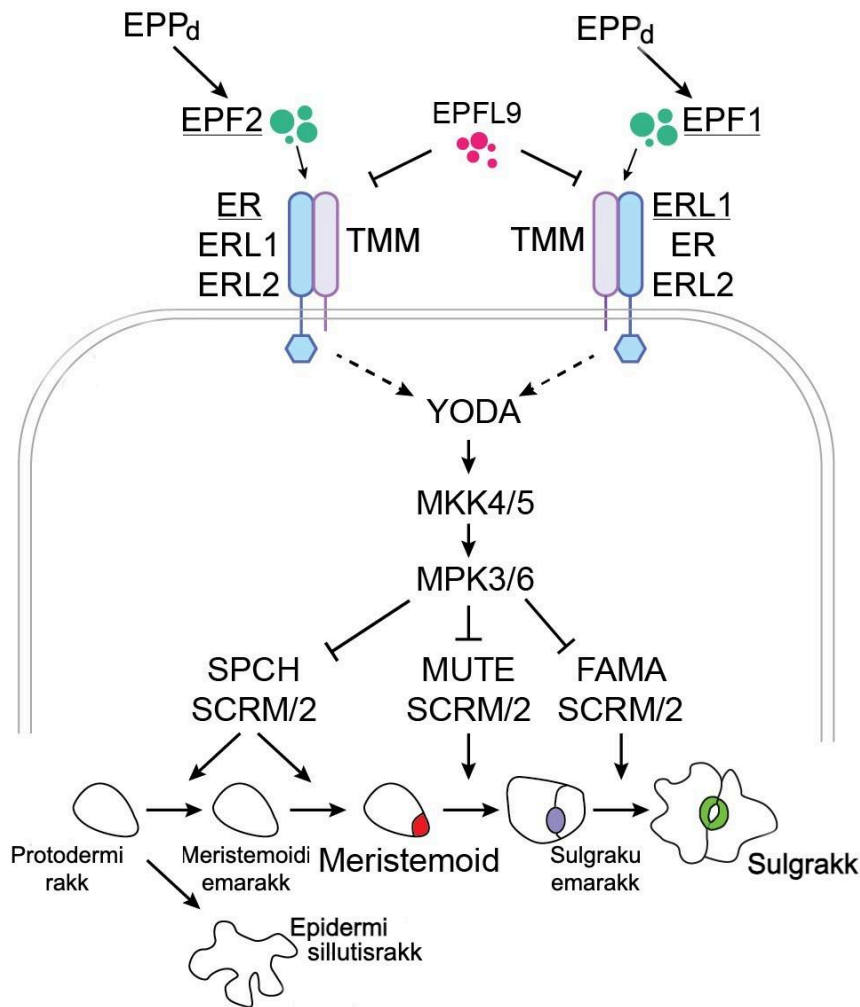
Harilikus müürloogas on kolm lähedalt seotud transkriptsioonifaktorit, mis vajalikud õhulõhede peamiste rakutüüpide üleminekute toimumiseks. Nendeks on SPEECHLESS (SPCH), MUTE ja FAMA (MacAlister et al., 2007; Pillitteri et al., 2007; Ohashi-Ito & Bergmann, 2006). Õhulõhede arenguraja alustamise, esmase rakkude jagunemise ja meristemoidi loomise eest vastutab SPCH (Kanaoka et al., 2008; MacAlister et al., 2007; Pillitteri et al., 2007). Järgmist etappi ehk meristemoidi üleminekut sulgrakkude emarakuks (GMC) juhib MUTE (MacAlister et al., 2007; Pillitteri et al., 2007) ning sulgrakkude lõplikku diferentseerumist ning nendevahelise avause moodustumist suunab FAMA (Kanaoka et al., 2008; Ohashi-Ito & Bergmann, 2006).

1.3.2.2 Õhulõhede arengu signaalirajad harilikus müürloogas

Õhulõhede areng on reguleeritud epidermi rakkudes läbi erinevate ensüümide ja valkude töö (Yang & Sack, (1995), Joonis 4). Arvati, et hariliku müürlooga õhulõhede arengu signaalirada algab SDD1 (STOMATAL DENSITY AND DISTRIBUTION 1) ensüümist (Berger and Altmann, 2000; Von Groll et al., 2002), mis lõikab propeptiide, moodustades bioloogiliselt aktiivsed signaalpeptiidid, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 1 (EPF1) ja EPF2, mis suruvad alla õhulõhede moodustumist (Hara et al., 2007; Hunt & Gray, 2009). Aasta 2026 kevadel ilmus aga artikkel, mis kummutas selle arvamuse SDD1 kohta ja asendas selle proteaaside EPP-dega (EPF-PROCESSING PROTEINASES, Meng et al. (2026)). Just eriti EPP1, EPP5 ja EPP6 ekspresseeruvad samades rakutüüpides, kus EPF-id ning on hädavajalikud küpsete EPF-peptiidide tekkeks. Kuigi SDD1 on võimeline EPF eellasmolekule lõikama katseklaasis (*in vitro*), näitavad katsed taimedega, et elustaimes (*in vivo*) sõltub EPF1 ja EPF2 formeerumine peamiselt EPP-dest (Meng et al., 2026).

EPF1 ja EPF2 peptiidid seonduvad ERECTA perekonna valkudega, membraanis paiknevate leutsiinirikaste retseptori-laadsetele kinaasidega ER, ERECTA-LIKE 1 (ERL1) või ERL2 (Shpak et al., 2005) ja sellega kompleksis paikneva retseptorilaadse valguga TOO MANY MOUTHS (TMM) (Yang & Sack (1995); Lee et al. (2012); Lin et al. (2017)). EPF1/EPF2 seondumist inhibeerib nendega konkureeriv signaalpeptiid EPFL9 (STOMAGEN, Hronková et al. (2015)).

EPF1/2 seondumine retseptorkompleksiga aktiveerib seni tuvastamata mehhanismi abil mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaaside signaaliülekanne kaskaadi, mis koosneb YODA–MKK4/5–MPK3/6-st (Bergmann et al., 2004; Shpak et al., 2005). Aktiveeritud kaskaad pärssib õhulõhede tootmist läbi kolme bHLH transkriptsioonifaktori SPCH, MUTE (MacAlister et al., 2007; Pillitteri et al., 2007) ja FAMA (Ohashi-Ito and Bergmann, 2006) ja nende partnervalkude SCREAM (SCRM) ja SCRM2 (Kanaoka et al., 2008) kaudu. Seega TMM valgu roll on osaleda õhulõhede moodustumist pärssivas signaalirajas (Nadeau & Sack, 2002).



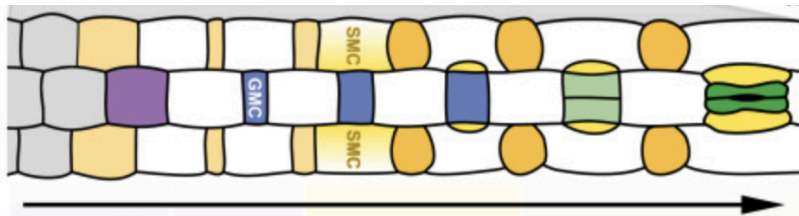
Joonis 4. Õhulõhede arengu signaalirada (Jalakas et al. (2024); joonis on tõlgitud ja muudetud). Õhulõhede signaalirada algab EPP-dega, mis aktiveerivad EPF2 ja EPF1 (rohelistes mullikeses). EPF1 ja EPF2 seonduvad retseptorkompleksiga, mis koosneb kinaasidest ER, ERL1 ja ERL2 (helesinine) ja valgust TMM (helelilla), samal ajal konkureerib EPFL9 (roosad mullikesed) EPF-dega retseptorkompleksile seondumises, inhibeerides signaalirada. Teadaolevalt vallandab EPF1 või EPF2 seondumine retseptorkompleksiga YODA–MKK4/5–MPK3/6 signaaliülekanne. See signaaliülekanne pärsib õhulõhede tootmist, pärssides SPCH, MUTE ja FAMA ja nende partnervalkude SCREAM (SCRM) ja SCRM2 tööd. Joonise alumises osas näha seda, mis õhulõhede arenguetapis mis valgud töötavad. Meristemoidrakk on märgitud punasega, sulgraku emarakk lillaga ja sulgrakud rohelisega. Valgena on näidatud õhulõhet ümbritsevad epidermi sillutisrakud.

1.3.3 Õhulõhede areng ja signaalirada kõrrelistes (*Poaceae*)

Järgnevas peatükis on käsitletud õhulõhede arengut ja signaaliradasid üheidulehelistel odra ja suvi-aruluste (*Brachypodium distachyon*) näidetel.

1.3.3.1 Õhulõhede areng kõrrelistes

Kõrreliste õhulõhede areng toimub rangelt lineaarses joones epidermirakkude ridades ning alati lehe roodude vahetus läheduses (Joonis 5, Berg & Raissig (2025)). Kõrreliste sulgrakkude kuju ja kaasrakkude olemasolu võimaldab neil võrreldes neerukujuliste kaasrakkudeta õhulõhedega gaasivahetust kiiremini reguleerida (Franks & Farquhar, 2007; Raissig et al., 2017).



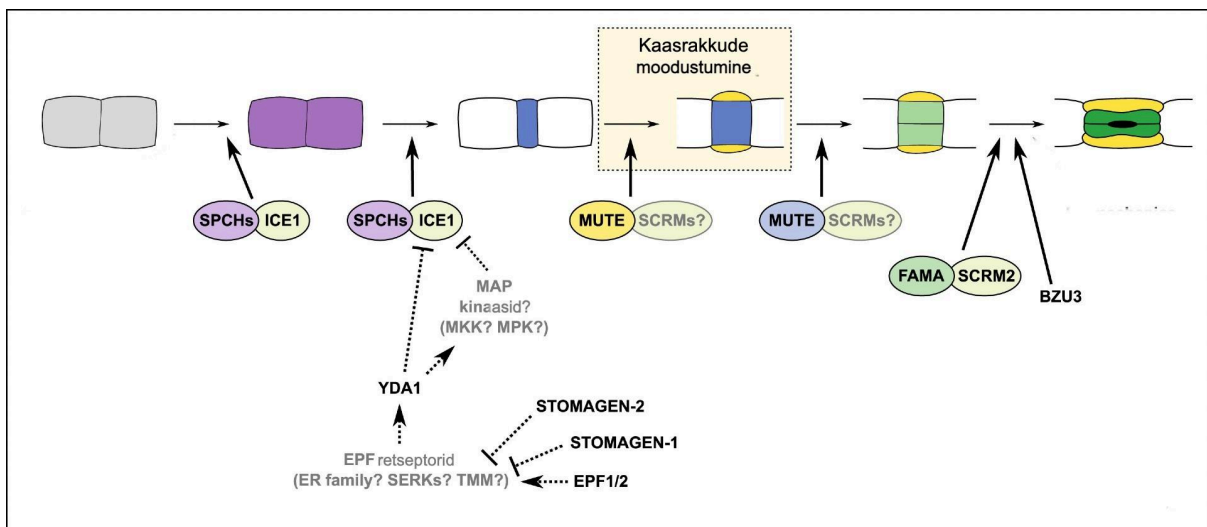
Joonis 5. Õhulõhede arengurada kõrrelistes, suvi-aruluste näitel (Berg & Raissig, 2025). Halli värviga on tähistatud protodermi rakud, lilla värviga õhulõhede arenguliini eellasrakk, oranžiga trihhoomide eellasrakud, sinisega sulgraku emarakud (GMC). Kollase gradientvärviga ala tähistab kaasrakkude emarakkude (SMC) moodustumist. Kollasega on värvitud diferentseerunud õhulõhede kaasrakud. Helerohelisega on värvitud sulgrakkude eellasrakud ja tumedama rohelisega diferentseerunud sulgrakud. Nool suunaga paremale näitab õhulõhede arenguraja suunda.

Kõrreliste õhulõhede areng algab protodermi rakkudest, mis diferentseeruvad trihhoomide (karvarakud) või õhulõhede arenguliini eellasrakkudeks ja panevad aluse õhulõhede ja karvarakkude ridadele. Õhulõhede arenguliini eellasrakk jaguneb seejärel asümmeetriliselt sulgrakkude emarakuks (GMC) ja õhulõhede vaheliseks rakuks (Spiegelhalter & Raissig, 2021). Siis tekivad kaasrakkude emarakud (ingl. k. *subsidiary mother cells*, SMCs), mis jagunevad pikiteljel asümmeetriliselt, tekitades kaasrakud (SC). Sulgrakkude emarakk jaguneb seejärel samuti pikiteljel, kuid sümmeetriliselt, ja moodustub kaks sulgrakku, mille vahele tekib avaus (Berg & Raissig, 2025; Spiegelhalter & Raissig, 2021).

Kõrrelistes on õhulõhede arenguraja etapid juhitud sarnaste transkriptsioonifaktorite poolt nagu harilikus müürloogas, kuid nende funktsioonid on kohanenud kaasrakkude loomiseks ja hantlikujuliste sulgrakkude moodustamiseks.

1.3.3.2 Õhulõhede arengu signaalirajad kõrrelistes

Õhulõhede arenguraja alustamise ja rakkude spetsialiseerumise eest vastutavad hariliku müürlooga vastavate valkude homologid SPEECHLESS1 (SPCH1) ja SPCH2 koos partnervalguga ICE1/SCRM (Raissig et al., 2017; Wu et al., 2019). Samuti on õhulõhede arengu signaaliraja alustamisel oluline roll mesofüllist pärineval STOMAGEN-1 (tuntud ka kui EPFL9 või EPFL9-1) ning selle paraloožil EPFL10 (EPFL9-2, STOMAGEN-2) (Karavolias et al., 2023; Karavolias et al., 2024), mis stimuleerivad õhulõhede teket, konkureerides samade retseptoritega seondumise pärast õhulõhede arengu inhibiitoritega (Berg & Raissig, (2025), joonis 6). STOMAGEN-1 ja EPFL10 valgud on signaalirajas vajalikud selleks, et stimuleerida õhulõhede teket ja seeläbi suurendada õhulõhede tihedust lehe pinnal (Hronková et al., 2015). Kõrreliste EPF1 ja EPF2 vähendavad lehe õhulõhede tihedust, kuid on ebaselge, kas see toimub varajaste sümmeetriliste jagunemiste ajal või hiljem pärast sulgraku emaraku (GMC) moodustumist (Karavolias et al., 2023; Ferguson et al., 2024; Hughes et al., 2017). Kaasrakkude moodustamise etappi juhib MUTE (Raissig et al., 2017; Wang et al., 2022) ning sulgrakkude lõplikku diferentseerumist ning poori moodustumist suunavad FAMA ja SCRM2 (Liu et al. (2009), McKown et al. (2023), joonis 6).



Joonis 6. Õhulõhede moodustumise signaalirada kõrrelistes (Berg & Raissig, 2025, joonis on tõlgitud ja muudetud). Halli värviga on tähistatud protodermi rakud, valge värviga epidermi rakud, lilla värviga õhulõhede arenguliini eellasrakud, sinisega sulgrakkude emarakk. Helekollast värvi ruut tähistab kaasrakkude emarakkude moodustumist. Tumekollasega on värvitud diferentseerunud õhulõhede kaasrakud. Helerohelised on sulgrakkude emarakud ja tumerohelised diferentseerunud sulgrakud. Väikesed nooled suunaga paremale näitavad õhulõhede arenguraja suunda. Suuremad musta värvi nooled näitavad transkriptsioonifaktorite ja teiste valkude rolli õhulõhede arengurajas. Punktiirjoonega nooled viitavad oletatavatele interaktsioonidele, mis vajavad katselist kinnitust. Halliga märgitud tekst viitab hariliku müürlooga uuringutest tuletatud signaaliraja komponentidele.

Kõrreliste õhulõhede arengu geneetiline regulatsioon põhineb spetsiifilistel transkriptsioonifaktoritel, mille järjestikune toimimine määrab rakkude saatuse ja kuju (Berg & Raissig, 2025). Arengutee alguses initsieerivad arvatavasti õhulõhede rakuliini alustamist transkriptsioonifaktorid SPCH1 ja SPCH2 (Berg & Raissig, 2025; Raissig et al., 2016). Sulgrakkude emaraku faasis on peamiseks regulaatoriks transkriptsioonifaktor MUTE, mis vastutab sulgrakkude emaraku korrektse jagunemise eest ning liigub naaberrakkudesse, et aktiveerida ka kõrval paiknevaid rakke ja toetada kaasrakkude moodustumist (Berg & Raissig, 2025; Raissig et al., 2017; Spiegelhalder et al., 2024). Sulgrakkude lõplikku diferentseerumist ja õhulõhe avause moodustumist suunab arvatavasti kõrrelistel transkriptsioonifaktor SCRM2 ja samuti on selles etapis oluline ka transkriptsioonifaktor FAMA, mis ei toimi kõrrelistes täpselt samamoodi nagu harilikus müürloogas (Liu et al., 2009; Raissig et al., 2017; McKown et al., 2023). Kogu õhulõhe kompleksi lõplikku morfogeneesi mõjutab BZU3 (BIZUI3), mis reguleerib rakukesta sünteesi ja valkude glükosüülimist, olles hädavajalik korrektse õhulõhe kuju saavutamiseks (Zhou et al., 2023; Berg & Raissig, 2025).

Eeldatakse, et EPF-de reguleeritud signaalrada toimib kõrrelistes sarnaselt hariliku müürloogaga (Spiegelhalder & Raissig, 2021; Berg & Raissig, 2025). Arvatakse, et ka kõrrelistes EPF perekonna peptiidid kinnituvad retseptorilaadsetest kinaasidest moodustuvale retseptorkompleksile, kus võivad osaleda ERECTA, TMM ja SERK (SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE), kuid vastavate geenide roll kõrreliste õhulõhede arengus ei ole veel lõpuni selge (Joonis 6, Berg & Raissig (2025)). Samuti pole selge, kas kõrreliste õhulõhede arengus osalevad mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaasid (MAPK) ja signaalikaskaad, mis koosneb YODA (joonisel kirjas YDA), MKK4/5/7/9 ja

MPK3/6 valkudest, mis lõpuks pärsib SPCH aktiivsust ja seeläbi inhibeerib õhulõhede loomist (Chen, 2024; Berg & Raissig, 2025).

1.4 Geen *TMM*

Geen nimega *TMM* ehk *TOO MANY MOUTHS* on oluline taimede (eelkõige mudeltaime hariliku müürlooga) õhulõhede loomise regulatsiooni signaaliülekande rajas, reguleerides õhulõhede kujunemist, jaotust ja mustrit epidermis (Nadeau & Sack, 2002). *TMM* geeni peetakse õhulõhe arengu allasurujaks (Joonis 4). Lehe abaksiaalsel küljel põhjustab *tmm* mutatsioon õhulõhede massilist üleproduktsooni ja suurte kobarate teket (Geisler et al. 1998).

Odra *TMM* geen on 1482 aluspaari pikk ja harilikul müürloogal 1491 aluspaari (NCBI, *Nucleotide Database*, vaadatud mai 2026). *TMM* geen kodeerib valku, mis kuulub leutsiinirikaste kordustega (LRR) retseptori sarnaste valkude (LRR-RLP) perekonda (Yan et al. 2014). Valku mass on umbes 54 kD ja see koosneb 496 aminohappest. Sellel on 10 taimset tüüpi LRR-domeeni (leutsiinirikas regioon) ja arvatav transmembraanne domeen (Nadeau & Sack, 2002). See valk paikneb raku pinnal (plasmamembraanis) ning seda ekspresseeritakse õhulõhede eellasrakkudes (meristemoidides) ja noortes sulgrakkudes (Nadeau & Sack, 2002). Fenotüübid *tmm* mutandil on järgmised: kõige iseloomulik tunnus on "ühe raku reegli" rikkumine, kus õhulõhed tekivad vahetus kontaktis üksteistega. Kobarates on sageli 2–5 või rohkem õhulõhet (Yan et al. 2014). Idulehtedes ja pärislehtedes tekib mutantidel oluliselt rohkem õhulõhesid kui metsiktüüpi taimedel (Geisler et al. 1998). Samuti ei ole *tmm* mutantide vartes ega hüpokotüülis õhulõhesid, küll aga on lehtedes neil õhulõhesid rohkem (Yang and Sack 1995; Geisler et al., 1998).

Suur *tmm* mutandis esinev erinevus metsiktüübiga võrreldes on ka õhulõhede paiknevuses lehe eri külgedel. Mutatsioon mõjutab tugevamalt lehe alumist (abaksiaalset) külge, kus esineb massiline õhulõhede üleproduktsoon ja tekivad suured õhulõhede kobarad. Lehe ülemisel (adaksiaalsel) küljel on õhulõhede tihedus ja indeks metsiktüübiga sarnane või isegi madalam kui metsiktüüpi Col-0 taimedel (Geisler et al., 1998, Vráblová et al., 2017, Jalakas et al., 2024).

1.4.1 Geeni *TMM* roll kõrrelistes

Ehkki *TMM* geenil on kriitiline roll mudelorganismi hariliku müürlooga õhulõhede mustri reguleerimisel, on selle täpne funktsioon kõrrelistes (*Poaceae*) veel suuresti ebaselge ning

eksperimentaalselt kinnitamata (Berg & Raissig, 2025; Cheng & Raissig, 2023). Müürlooga puhul on teada, et *TMM* funktsiooni kadumine põhjustab õhulõhede kobarate teket ja tugevat asümmeetriat lehe ülemise ja alumise poole arengus, kuid kõrreliste puhul on sellised seosed alles uurimisjärgus (Hörak, 2026; Jalakas et al., 2024).

1.5 Aretustehnoloogiatest

ÜRO üks eesmärkidest on rakendada jätkusuutlikke põllumajandustavasid, mis suurendavad kohanemisvõimet kliimamuutuste, äärmuslike ilmastikutingimuste, põua, üleujutuste ja muude katastroofidega (FAO, 2026). Selle eesmärgi täitmiseks tuleb suurendada teadmisi põllukultuuride geneetiliste ressursside kohta ja luua võimekus kiireks sortide optimeerimiseks. Süstemaatiline taimearetus sai alguse 19. sajandil Mendeli geneetika printsiipide rakendamisest ja inimeste poolt juhitud ristamisest. 20. sajandil lisandusid sellele füüsikaline ja keemiline mutatsioonide loomine, et kunstlikult kiirendada geneetilise varieeruvuse teket ja õppida taimede geneetika kohta. 21. sajandil on toimunud murrangulised biotehnoloogilised ja geneetilised avastused. Näiteks CRISPR-Cas9 (ingl. k. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR-associated protein 9*) tehnoloogia kasutamine eukarüootsetes rakkudes (Cong et al., 2013) on viinud aretustehnoloogiad täiesti uuele tasemele, kus on võimalik varasematele teadmistele tuginedes luua täpseid muutusi taimede geenides ja seeläbi luua erinevate omadustega sorte, mis vastavad kliimamuutuste väljakutsetele (Ahmadzai et al., 2024; Sun et al., 2024).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 TÖÖ EESMÄRGID

Töö laiem eesmärk oli uurida, mis roll on geenil *TMM* õhulõhede paiknemise kujunemisel harilikus müürloogas ja odras, et mõista *TMM* geeni rolli kaheidulehelises ja üheidulehelises taimes. Töö kitsamad eesmärgid olid:

- 1) luua *tmm* mutatsiooniga odraliinid ja uurida, kas ja kuidas muutub õhulõhede paiknevus saadud otradel,
- 2) testida, kas hariliku müürlooga *tmm* mutandi komplementatsioon funktsionaalse hariliku müürlooga *TMM* geeniga või odra *TMM* geeniga taastab metsiktüübile omase normaalse õhulõhede paiknemise.

2.2 MATERJAL JA METOODIKA

Järgnevas peatükis on kirjeldatud geneetilise muundamise meetodid odra ja müürlooga jaoks eraldi.

2.2.1 Odra *TMM* geeni punktmutatsioonide loomine

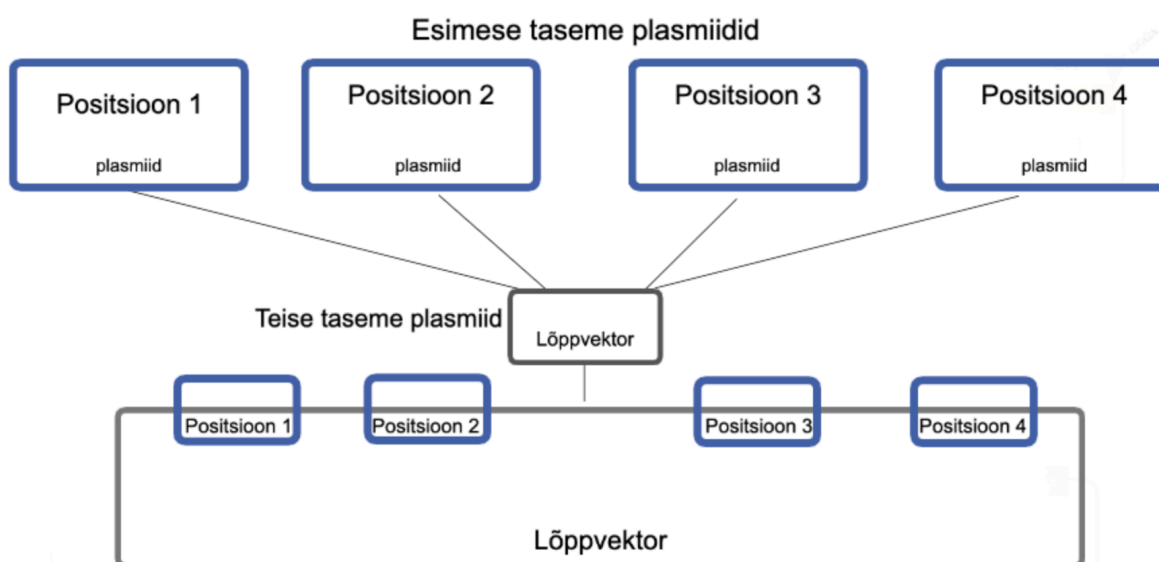
Järgnevad peatükid kirjeldavad odra punktmutatsioonide loomise protsessi, milles kasutati agrobakteri vahendatud plasmiidvektori transformatsiooni CRISPR-Cas9 süsteemi taime genoomi viimiseks, mis võimaldas tekitada mutatsioone *TMM* geeni järjestuses. Kogu eksperimentaalses osas toimus Jõgeval, Maaelu Teadmuskeskuse taimebiotehnoloogia osakonna laboris.

2.2.1.1 Plasmiidvektorite loomise põhimõtetest

Selleks, et luua vajalikud plasmiidvektorid odra transformeerimiseks, disainisime odra *TMM* geeni järjestuse järgi kaks gRNA-d (ingl. k. *guide RNA*, giid-RNA), et kokku panna kahe erineva geenisisese sihtmärgiga (ingl. k. *target*-iga) plasmiidvektor. Plasmiidvektori kokkupanek toimus *Golden Gate* (Engler et al., 2008; Silva & Patron, 2017) meetodi põhimõtete abil ning taimes mutatsiooni tekitamist võimaldas CRISPR/Cas9 tehnoloogia (Cong et al., 2013).

Golden Gate meetodi põhimõte on see, et on võimalik lõigata ja lüüa erinevaid plasmide samaaegselt samade ensüümidega, et luua plasmidvektor nii, et algselt mitmes erinevas plasmidis paiknevad järjestused paigutuksid aktseptorplasmidi õiges järjekorras ja moodustaksid tervikliku lõppvektori. Korrektse paardumise tagamiseks kasutatakse spetsiifilisi üksteisega sobituvaid rippuvaid DNA otsasid (Engler et al., 2008).

Odra transformeerimiseks vajalikud geneetilised järjestused viidi kokku ühele aktseptorplasmidile (Joonis 7). Vektori visualiseerimine ja disain toimus programmis *Snapgene* (*Dotmatics*, snapgene.com) ja oligonukleotiidide disainimiseks kasutati veebilehekülge CRISPOR.com.



Joonis 7. *Golden Gate* kahetasandiline klonereimisskeem. Esimese taseme plasmiididest (sinised) viiakse järjestused, mida soovitakse lõppvektoris viia positsioonidesse 1-4, kokku (jooned) teise taseme lõppvektoris. Joonise alumises osas on näha suurendatud lõppvektorit koos sinna sisestatud plasmidide fragmentidega.

2.2.1.1.1 Positsioon 1 ja 2

Kasutatud esimesed kaks vektorit olid juba valmis plasmiidid pICSL11059 (Addgene, plasmiid #68263, positsioon 1) ja Cas9 ensüümi järjestusega pICSL11056 (Addgene, plasmiid #68258, positsioon 2). Need plasmiidid on loodud sobituma *Golden Gate* meetodiga ja omavad sobivaid *BpiI* ensüümi äratundmisjärjestusi. Mõlemad plasmiidid sisaldavad antibiootikumi resistentsusgeeni bakteris paljundamiseks (resistentsus karbenitsilliinile/ampitsilliinile).

Plasmiidis pICSL11059 on hügomütsiini resistentsusgeeni kodeeriv järjestus (*hptII*), mille ekspressiooni kontrollivad lillkapsa mosaiikviiruse regulaatorelemendid (promootor ja terminaator, Amack & Antunes (2020)).

Plasmiidis pICSL11056 on ensüümi Cas9 kodeeriv järjestus bakterilt *Streptococcus pyogenes*, mis kodeerib valku koos rakutuuma lokaliseerimise signaali aminohappe järjestusega (SpCas9:NLS). Seda käivitab maisi ubikvitiini promootor (P-ZmUbi) ja termineerib nopaliini sünteesi terminaator agrobakterist (T-AtNos, Harwood (2019)).

2.2.1.1.2 Oligonukleotiidide hübridiseerimine gRNA loomiseks positsiooni 3 jaoks

Positsioon 3 jaoks gRNA loomiseks kasutatud oligonukleotiidid (Tabel 1) on disainitud nii, et nad sobituksid *TMM* geeni sihtmärk 1 piirkonna järjestusega (Tabel 2). Rippuvad otsad (ingl. *overhang*) on loodud vastavalt ensüümi *BpiI* äratundmisjärjestustele. Disainitud gRNA sisaldab PAM järjestust, mis on CRISPR/Cas9 puhul NGG (N tähistab seda, et N võib olla üks neljast nukleotiidist: A, T, G, C).

Tabel 1. Kasutatud DNA oligonukleotiidid positsiooni 3 gRNA loomiseks. Punasega on märgitud rippuvad otsad. Sinisega on märgitud sihtmärk 1-ga paarduv järjestus.

Nimi	Järjestus
TMM_Cas9-T1-F (EL1)	5' CTTGGCGACGACCAACGTCAGCG 3'
TMM_Cas9-T1-R (EL2)	3' CGCTGCTGGTTGCAGTCGCC AAA 5'

Tabel 2. Sihtmärk 1. Rohelisega märgitud järjestus tähistab PAM järjestust. Sinisega on märgitud DNA-ga paarduv gRNA järjestus.

Sihtmärk	Järjestus
Sihtmärk 1 komplementaarne ahel (PAM)	GGCGACGACCAACGTCAGCGCGG

Hübridiseerimiseks kasutati oligonukleotiide TMM_Cas9-T1-F (EL1) ja TMM_Cas9-T1-R (EL2, Tabel 2). Hübridiseerimise reaktsioonisegu oli järgmine: 10 µM kontsentratsiooniga praimerid EL1 ja EL2 (mõlema lõppkonts. 2 µM), hübridiseerimise puhver (Koostis: 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) 6 µl (lõppkonts. 6 mM Tris-HCl, 30 mM NaCl, 0,6 mM EDTA). Toimus DNA ahelate denatureerimine 3 min 95°C, seejärel lülitati soojusplokk välja ja lasti oligonukleotiididel aeglaselt renatureeruda 1-2 tundi samas soojusblokkis, et

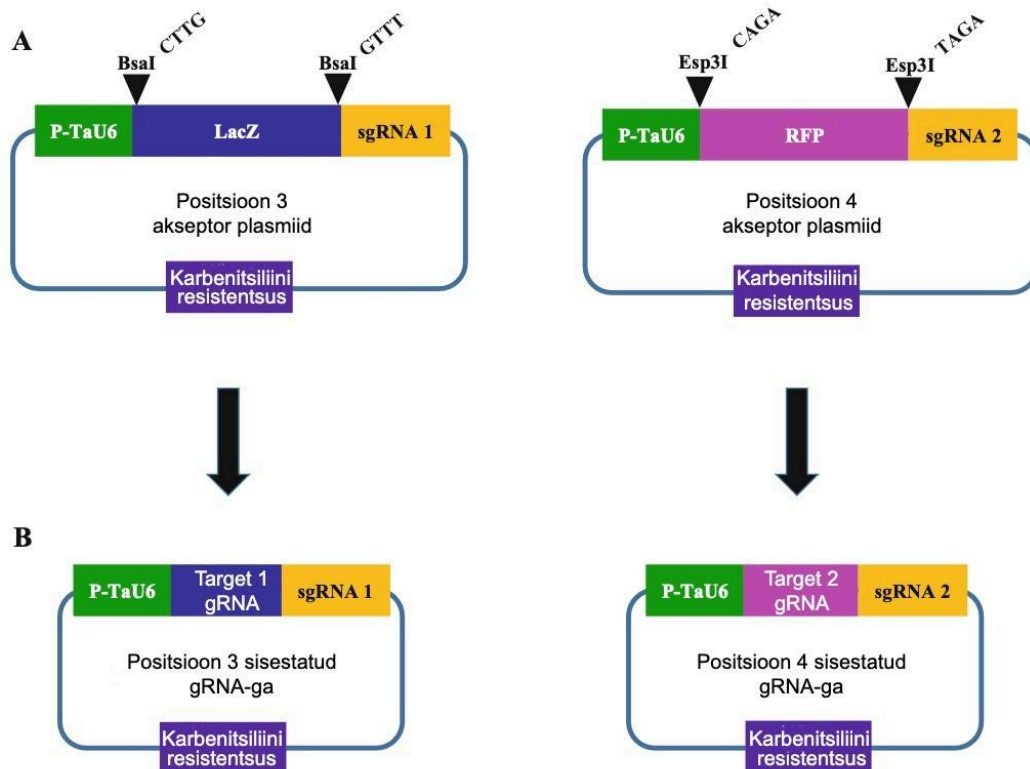
tagada korrektne paardumine ja 4 nukleotiidi pikkuste rippuvate DNA otste tekkimine mõlemasse otsa.

2.2.1.1.3 Vektori lõikamine ja gRNA vektorisse ligeerimine (Positsioon 3)

Hübridiseeritud oligonukleotiidid (EL1+EL2) Positsiooni 3 jaoks viidi plasmidi pHvL1P3-GA (Addgene, plasmiid #112027, plasmidi suurus 4500 aluspaari). Sellel plasmiidil on ampitsiliini resistentsuse järjestus, mis on analoogne karbenitsiliini resistentsusega ja seepärast kirjeldatud töös karbenitsiliini resistentsusena, kuna laboris kasutatud antibiootikum oli karbenitsilliin. Vektori pHvL1P3-GA lõikamiseks kasutati ensüümi *BsaI*. Positsiooni 3 selektiivmarker on LacZ järjestus. Kui vektorisse viidava järjestuse ligeerimine õnnestub, asendab see LacZ järjestuse ja kolooniad tulevad valget värvi (LacZ olemasolu teeb bakterikolooniad visuaalselt siniseks) LacZ selektsiooni toimimiseks lisati söötmesse 20 mg/mL X-gal ja 100 mM IPTG-d. Plasmidis on ka hariliku nisu (*Triticum aestivum*) P-TaU6 promootor ja gRNA tugijärjestust (ingl. k. *scaffold*, sgRNA, Joonis 8) kodeeriv osa (Harwood, 2019), mis jääb lõppvektoris sisse ja võimaldab taimes gRNA ekspressiooni P-TaU6 promootori kontrolli all.

Reaktsioonisegu (lõppruumala 10 µl) koostis oli järgmine: plasmiid pHvL1P3-GA (lõppkonts 10,92 ng/µl), gRNA (EL1+EL2) 1 µl, T4 ligaasi puhver (Thermo Scientific, lõppkonts. 1x), restriksiooniensüüm *BsaI* (Thermo Scientific, alternatiivne nimi *Eco31I*, lõppkonts. 0,5 U/µl), T4 ligaas (lõppkonts. 0,5 U/µl).

Seejärel asetati segu termotsüklerisse (Mastercycler, nexus GX2) programmiga: 37°C 30 sek, seejärel 26x korduv tsükkel, kus on 37°C 3 min ja siis 16°C 4 min, seejärel lõpetavad etapid 50°C 5 min ja 80°C 5 min ning siis jahtumine 10°C kuni programmi peatumiseni. Saadud Positsioon 3 plasmidi nimeks sai pHvL1P3-TMM-T1 (Lisa 1, Joonis 20).



Joonis 8. Kloneerimisskeem gRNade jaoks (Harwood, 2019). Positsiooni 3 ja Positsiooni 4 aktseptorplasmiidid (A), mis peale ligeerimist (noolled alla) saavad *BsaI* või *Esp3I* ensüümide äratundmisjärjestuste vahele gRNA (B). Rohelise värviga on näidatud P-TaU6 promootor ja tumekollasega gRNA tugijärjestused sgRNA1 ja sgRNA2.

2.2.1.1.4 Oligonukleotiidide hübridiseerimine gRNA loomiseks (Positsioon 4)

Neljanda positsiooni gRNA loomiseks kasutatud oligonukleotiidid (Tabel 3) on disainitud nii, et nad sobituksid *TMM* geen sihtmärk 2 piirkonnaga (Tabel 4). Rippuvad otsad (ingl. k. *overhang*) on loodud vastavalt ensüümi *BpiI* äratundmisjärjestustele. Disainitud gRNA sisaldab PAM järjestust.

Tabel 3. Kasutatud oligonukleotiidid positsiooni 4 gRNA loomiseks. Punasega on märgitud DNA rippuvad otsad. Sinisega on märgitud sihtmärk 2-ga paarduv järjestus.

Nimi	Järjestus
(EL5) TMM_Cas9-T2-F	5' CAGACTTGTGCCGGGGCGAGTTCACGGTTT 3'
(EL6) TMM_Cas9-T2-R	3' GAACACGGCCCCGCTCAAGTGCCCAAAATCT 5'

Tabel 4. Sihtmärk 2 järjestus. Sinisega on märgitud DNA-ga paarduv gRNA järjestus. PAM on märgitud rohelisega.

Sihtmärk	järjestus
Sihtmärk 2 (päripidi suunal) (PAM2)	5' GTGCCGGGGCGAGTTCACGGTGG 3'

Hübridiseerimiseks kasutati oligonukleotiide TMM_Cas9-T2-F (EL5) ja TMM_Cas9-T2-R (EL6) (Tabel 4). Hübridiseerimise reaktsioonisegu oli järgmine: 10 µM kontsentratsiooniga praimerid EL5 ja EL6 (lõppkonts. 2 µM), hübridiseerimise puhver (lõppkonts. 6 mM Tris-HCl, 30 mM NaCl, 0,6 mM EDTA). Denatureerimine ja renatureerimine tehti samamoodi nagu eelmises peatükis EL1 ja EL2 oligonukleotiidide puhul.

2.2.1.1.5 Vektori lõikamine ja gRNA vektorisse ligeerimine (Positsioon 4)

Hübridiseeritud oligod EL5 ja EL6, ehk Positsiooni 4 gRNA, sisestati plasmidi pHvL1P4-GA (Positsioon 4). Vektori pHvL1P4-GA lõikamiseks kasutati ensüümi *Esp3I*. Positsioon 4 selektiivmarker on RFP (ingl. k. *Red fluorescent protein*) järjestus, mille vektorisse viidav gRNA asendab. Plasmidis on ka hariliku nisu (*Triticum aestivum*) P-TaU6 promootor ja gRNA tugijärjestust kodeeriv ala (Harwood (2019), joonis 8). Reaktsioonisegu ja tsükleri (Mastercycler, nexus GX2) programm oli samasugune nagu peatükis 2.2.1.1.3. Saadud plasmidi nimeks sai pHvL1P4-TMM-T2 (Lisa 2, joonis 21).

2.2.1.1.6 *E. coli* (*Escherichia coli*) transformatsioon plasmiididega

Mõlema plasmidi (pHvL1P3-TMM-T1 ja pHvL1P4-TMM-T2) puhul tehti kompetentsesse rakkudesse (*E.coli* tüvi TOP10) transformatsioon sama protokoll järgi.

E.coli kompetentrakud (50 µl) sulatati jääl 20 min ja lisati rakkudele plasmidi 3 µl (pHvL1P3-TMM-T1 plasmidi 321 ng ja pHvL1P4-TMM-T2 plasmidi 333 ng). Seejärel lasti rakkudel plasmiidiga seguneda 20 min jääl. Järgmisena teostati rakkudele kuumašokk temperatuuriblokil 42°C 1 min. Seejärel rakud puhkasid uuesti jääl 5 min ja peale seda lisati LB söödet 250 µl. Järgnevad 1 h loksusid bakterirakud kiirusega 180 pööret minutis (rpm) temperatuuril 37°C loksutis. Siis külvati rakud LB söötmega petri tassidele, milles antibiootikum karbenitsilliin (lõppkonts. 100 µg/ml). Saadi transformeeritud *E.coli* bakterid pHvL1P3-GA plasmidi ja pHvL1P4-GA plasmiidiga.

2.2.1.1.7 Plasmiidide eraldamine ja sekveneerimine

Kasvanud bakterikolooniad inokuleeriti vedelasse LB söötmesse antibiootikumiga karbenitsilliin (lõppkonts. 100 µg/ml) ja kasvatati üleöö 37°C loksutil, loksumiskiirusega 200 pööret minutis (rpm). Järgmisel päeval eraldati plasmiidne DNA Favorgen FavorPrep™ plasmidi eraldamise komplektiga.

Saadud puhastatud plasmiididele tehti restriksioon ja saadeti kontrollimiseks ka sekveneerimisele TÜ genoomika instituudi tuumiklaborisse. Plasmidi pHvL1P3-GA sekveneeriti praimeriga EL1 ja plasmidi pHvL1P4-GA praimeriga EL2 (Lisa 3 Tabel 8). Sekveneerimistulemusi analüüsiti veebipõhises tarkvaraplatvormis Benchling (benchling.com) ja programmis ApE (Davis & Jorgensen 2022). Restriksioonisegu oli järgmine: 10x puhver G (Thermo Scientific, lõppkonts. 1x), plasmiid pHvL1P3-TMM-T1 (lõppkogus. 1 µg) või plasmidi pHvL1P4-TMM-T2 (lõppkogus 1 µg), ensüüm *PvuII* (lõppkonts. 0,5 U/µl). Reaktsioonisegu hoiti 37°C temperatuuril 4 h. Seejärel laaditi restriksioonisegu koos laadimisvärviga 1% agarosgeelile (Lisa 4) ja analüüsiti geelelektroforeesil TAE puhvris (1 h, 0,67 V/cm²). Geelipilt visualiseeriti UV valguses.

2.2.1.1.8 Lõppvektori loomine

Lõppvektoris pandi kokku plasmiidid pICSL11059 (Positsioon 1), pICSL11056 (Positsioon 2), pHvL1P3-TMM-T1 (Positsioon 3) ja pHvL1P4-TMM-T2 (Positsioon 4, Tabel 5). Lõppvektori loomiseks kasutatud aktseptorvektor oli pAGM8031 (Joonis 9).

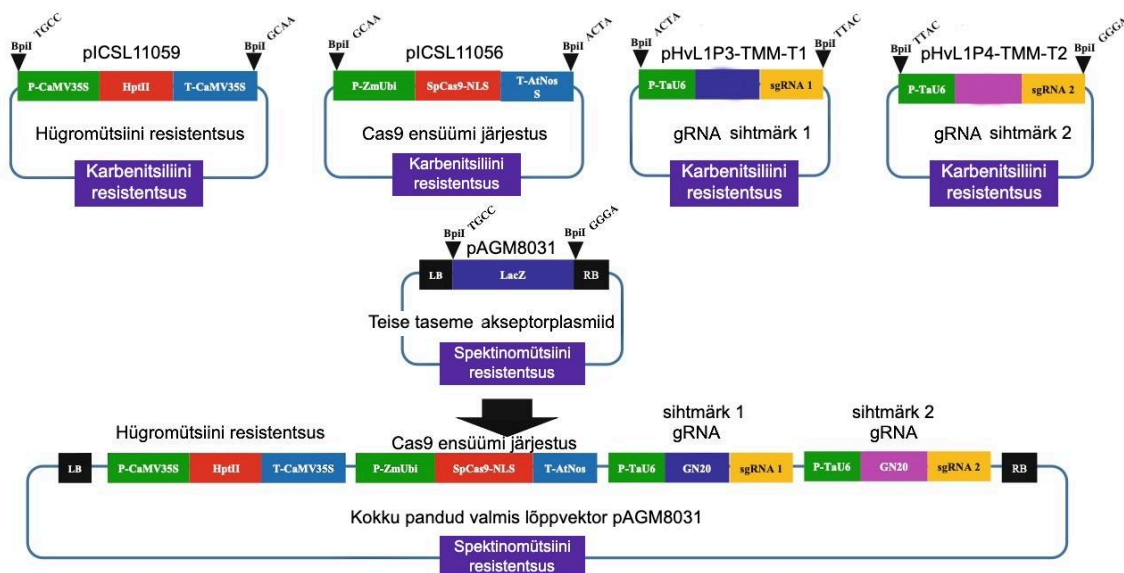
Tabel 5. Lõppvektori loomiseks kasutatud plasmiidid. *BpiI* ja *BsaI* on sama äratundmisjärjestusega ensüümi erinevad nimed.

Plasmidi nimi	Sisestus	Eesmärk	Positsioon	Restriksiooni-ensüüm
pICSL11059	Hügromütsiini resistentsus	hügromütsiini resistentsuse loomine	1	<i>BpiI</i>
pICSL11056	Cas9 ensüümi järjestus	Cas9 ensüümi tootmine	2	<i>BpiI</i>
pHvL1P3-TMM-T1	EL1+EL2 gRNA	DNA lõikamine sihtmärk 1 piirkonnas	3	<i>BsaI</i> , <i>BpiI</i>

pHvL1P4-TMM-T 2	EL5+EL6 gRNA	DNA lõikamine sihtmärk 2 piirkonnas	4	<i>Esp3I, BpiI</i>
pAGM8031	eelneva nelja plasmidi <i>BpiI</i> äratundmisjärjestuste vahel paiknevad fragmendid	taime viidavate DNA järjestuste koondamine ühte vektorisse	2. taseme aktseptor	<i>BpiI</i>

Plasmiid pAGM8031 (Addgene, plasmiid #48037) on binaarvektor spektinomütsiini resistentsusgeeniga ja lacZ järjestusega (β -galaktosidaas, Weber et al. (2011)) kahe *BpiI* ensüümi äratundmisjärjestuse vahel, mis toimib bakteris selektsioonimarkerina.

Lõppvektori loomiseks ligeeriti pAGM8031 plasmidi lacZ asemele neli eelnevatest plasmiididest pärit fragmenti ehk osad, mille *BpiI* kõigist esimese taseme plasmiididest välja lõikas. Lõppvektoris paiknevad need järjestused T-DNA vasaku piirjärjestuse (ingl. k *left border*, LB) ja parema piirjärjestuse (ingl. k *right border*, RB) vahel. Piirjärjestused on 25 nukleotiidi pikad järjestused, mille tunnevad ära agrobakteri valgud ja mis võimaldavad piirjärjestuste vahel paikneval T-DNA siseneda taime genoomi (Howard et al., 1989).



Joonis 9. Lõppvektori valmistamise skeem (Harwood, 2019, joonis on tõlgitud). Näidatud on plasmiidid pICSL11059 (Positsioon 1), pICSL11056 (Positsioon 2), pHvL1P3-TMM-T1 (Positsioon 3) ja pHvL1P4-TMM-T2 (Positsioon 4) koos kõikide lõppvektoris T-DNA piiridesse jäävate järjestustega (rohelisega on näidatud promootorid, punasega valku kodeerivad alad; sinise, roosa ja kollasega RNAd kodeerivad alad) ja antibiootikumide

resistentsusgeenidega (lillad riskülikud). Sinisega on näidatud aktseptorplasmiidis asendatav LacZ geen. Joonise alumises osas on suur lõppvektor koos sisestatud järjestustega.

Reaktsioonisegu koostis lõppvektori valmistamisel oli järgmine: plasmiidid pICSL11059 (Positsioon 1), pICSL11056 (Positsioon 2), pHvL1P3-TMM-T1 (Positsioon 3), ja pHvL1P4-TMM-T2 (lõppkogus 300 ng iga plasmidi, kokku 1200 ng plasmide), aktseptorplasmiid (lõppkogus 100 ng), 10x T4 ligaasi puhver (lõppkonts. 1x), *BpiI* (Thermo Scientific, kasutatud ensüümi analoogi *BbsI*, lõppkonts. 0,5 U/μl) ja T4 ligaas (lõppkonts. 0,5 U/μl). Termotsükleri programm on kirjutatud peatükis 2.2.1.1.3. Loodud vektori nimeks sai pAGM8031-Hygr-Cas9-TMM-gRNA1-gRNA2 (pikkus 14919 aluspaari).

Seejärel tehti plasmidi *E. coli*-sse transformeerimine, mille protokoll oli samasugune, nagu on kirjas peatükis 2.2.1.1.6. Baktereid transformeeriti pAGM8031-Hygr-Cas9-TMM-gRNA1-gRNA2 plasmiidiga segus lõppkogusega ~300 ng proovi kohta. Transformeeritud bakterid külvati selektiivsöötmega petri tassidele, milles antibiootikum spektinomütsiin (lõppkonts. 50 μg/ml) ja LacZ-i jaoks vajalikud X-gal (20 mg/ml) ja IPTG (100 mM). Söötmel kasvanud valged kolooniad (sinised kolooniad ei ole transformeerunud) inokuleeriti LB vedelsöötmesse antibiootikumiga spektinomütsiin (lõppkonts. 50 μg/ml) ja kasvatati üleöö temperatuuril 37°C kraadi loksutis loksumiskiirusega 200 pööret minutis (rpm). Kasvanud bakterisuspensioonist eraldati plasmiidid sama moodi nagu peatükis 2.2.1.1.7. Sobivad plasmiidid saadeti sekveneerimisele TÜ genoomika instituudi tuumiklaborisse praimeritega EL1 ja EL2. Sekveneerimistulemusi analüüsiti veebipõhises tarkvaraplatvormis *Benchling* (benchling.com) ja programmis ApE (Davis & Jorgensen 2022).

2.2.1.2 Lõppvektori viimine agrobakterisse

Agrobakteri (*Agrobacterium tumefaciens*) vahendatud transformatsioon on meetod biotehnoloogias, mis kasutab bakteri loomulikku võimet viia osa oma DNA-st (T-DNA, ehk ingl. k. *transfer DNA*) taime genoomi (Gelvin, 2017). Cas9 valku kodeerivat järjestust kasutatakse agrobakteri vahendatud transformatsioonis selleks, et tekitada geneetilisi muudatusi taime genoomis täpselt valitud kohtadesse. Cas9 kodeeriv järjestus koos muu T-DNA järjestusega siseneb taime genoomi aga ikkagi juhuslikku kohta (Azizi-Dargahlou & Pouresmaeil, 2024).

Lõppvektor pAGM8031-Hygr-Cas9-TMM-gRNA1-gRNA2 (Lisa 17, Joonis 27) viidi agrobakteri (*Agrobacterium tumefaciens*) tüvesse AGL1. Agrobakteri AGL1 tüves on kromosoom C58, milles on rifampitsiini resistentsuse geen ja abiplasmiid pTiB0542, milles on karbenitsiliini resistentsuse geen (Lazo et al., 1991).

Agrobakteri transformeerimiseks teostati elektroporatsioon. Elektroporatsiooni protokoll oli järgmine: kompetentse agrobakteri AGL1 säilikud (-80°C kapist) sulatati jääl, samal ajal sulati ka lõppvektori plasmiid pAGM8031-Hygr-Cas9-TMM-gRNA1-gRNA2. Elektroporatsiooni jaoks kasutatavad küvetid pandi jäässe jahtuma. 50 µl agrobakteri rakkudele lisati 3 µl plasmidi (lõppkogus 780 ng). Segu loksutati kergelt ja lasti seista 5 min jääl. Seejärel pipeteeriti bakterisegu küveti ja teostati elektroporatsioon (Eppendorf Eporator®) tugevusel 2000 V (10 kV/cm), korralti kaks korda. Seejärel lisati LB sööde ja pipeteeriti segu tagasi 1,5 ml pisikatsutisse. Bakteritel lasti kasvada loksutis 28°C kiirusega 200 pööret minutis (rpm) 1 h ja 30 min. Seejärel külvati bakterid LB söötmetassidele, milles antibiootikumid rifampitsiliin (lõppkonts. 25 µl/ml), karbenitsiliin (lõppkonts. 100 µl/ml) ja spektinomütsiin (lõppkonts. 50 µl/ml) ja kasvatati 28°C kapis 48 h.

Kasvanud bakterikolooniatega tehti koloonia PCR. Kasutatud praimerid olid LT-29-F päripidi praimer ja äraspidi praimer LT-30-R (Lisa 3 Tabel 8).

Koloonia PCR protokoll oli järgmine: MQ vesi 5,8 µl, 10X Green Buffer 2 µl (lõppkonts. 1X), 10 mM dNTP 0,4 µl (lõppkonts. 0,2 mM), 10 µM LT-29-F praimer 0,8 µl (lõppkonts. 0,4 µM), 10 µM LT-30-R praimer 0,8 µl (lõppkonts. 0,4 µM), DreamTaq DNA polymerase 0,2 µl (lõppkonts. 0,05 U/µl). Segu pandi termotsüklerisse (Lisa 5). Valmis PCR segu kontrolliti geelil (Lisa 4).

Saadud bakterikolooniatest tehti säilikud 1 ml pisikatsutitesse steriilses glütseroolis (glütserooli lõppkonts. 30%) -80°C kapis säilitamiseks ja edaspidisteks embrüote nakatamisteks.

2.2.1.2.1 Agrobakteri ettevalmistamine taimede nakatamiseks

Õige sisestatud plasmiidiga transformeeritud agrobakteri AGL1 säilik (-80°C kapist) sulatati jääl ja lisati 10 ml steriilset LB söödet, antibiootikume ei lisatud. Segu inkubeeriti üleöö (umbes 18 h) 28°C loksutis, loksumiskiirusega 200 pööret minutis (rpm).

Järgmisel päeval mõõdeti rakukultuuri optiline tihedus, et kontrollida selle vastavust nakatamiseks. Mõõdetud OD₆₀₀ (*Optical Density*)= 0,65 ehk 1 x 6,5⁹ rakku ml kohta (mõõdetud spektrofotomeetriga BioCat GmbH, NanoPhotomeeter NP80). Optimaalseim rakkude kontsentratsioon transformatsioonis kasutamiseks on vahemikus OD₆₀₀= 0,5 - 0,8.

2.2.1.3 Odra transformeerimine

2.2.1.3.1 Odra taimede kasvatamine

Kasutatud odrasort oli Golden Promise, mis valiti selle järgi, et seda sorti saab edukalt transformeerida *Agrobacterium tumefaciens* abil ja Maaelu Teadmuskeskuse taimebiotehnoloogia osakonnas on kõik olemas selle odrasordi geneetiliseks muundamiseks.

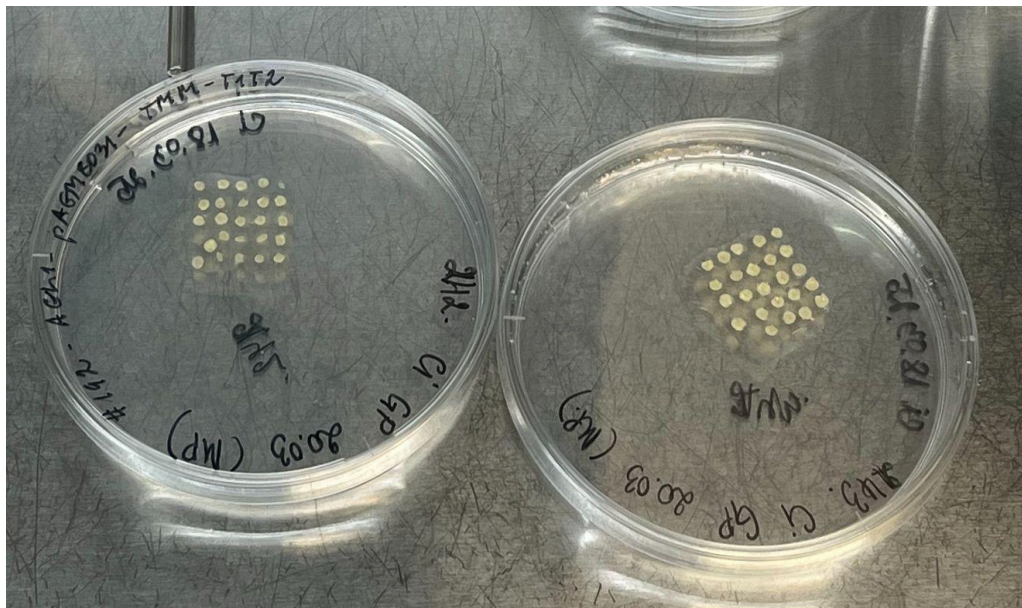
Kasutatud odrataimed embrüote eraldamiseks kasvasid kasvuhuones. Odrad kasvasid 2-liitrites kasvupottides, turbasubstraadis, lisatud vermikuliidi (1l/10l mulla kohta) ja aeglaselt vabaneva väetisega (Osmocote graanulid, 240g/60l mulla kohta). Temperatuur oli vahemikus 18-22°C talveperioodil ja suvel 19-30°C. Kasvuhuone õhuniiskus oli 30-60% ja valgusrežiim 20 h valgust ja 4 h pimedust (kiirkasvatus, *speed breeding*). Taimi kasvatati piimja küpsusfaasini, kus embrüod on juba loodud, kuid transformatsiooniks piisavalt väikesed. Siis eraldati viljapead taimedelt ning neist eraldati embrüod.

2.2.1.3.2 Odra embrüote eraldus

Kõigepealt lõigati viljapealt maha kõik ohted ja eraldati terad viljapeast. Rohelised odra seemned steriliseeriti (2 min 70% EtOH ja 2x loputus dest. veega, 4 min 2,5% Cl lahuses ja 4 x loputus dest. veega laminaari all). Seejärel eraldati odra seemnetest tõmbkapi all väga noored ja ebaküpsed embrüod, kasutades suurendavat binokulaarset stereomikroskoopi ning pandi embrüod 9 cm läbimõõduga petri tassidele Ci söötmele (koostis lisas 6). Kokku asetati ühele tassile 25 embrüot. Petri tassid suleti parafilmiga (Parafilm M®) ja asetati kinnisesse penoplastist kasti, ruumi kus on keskmiselt 23°C sooja. Kõigepealt taastusid embrüod Ci söötmega tassil kaks päeva ja seejärel nakatati laminaari all embrüoid LB söötmes kasvanud transformeeritud agrobakteriga.

2.2.1.3.3 Odra embrüote nakatamine agrobakteriga

Söötmele olnud embrüotele lisati 200 µL pipetiga igale embrüole eraldi tilk transformeeritud agrobakteri vedelkultuuri, optilise tihedusega $OD_{600} = 0,65$. Bakterisuspensiooniga embrüoid inkubeeriti laminaari all 20 min (Joonis 10).

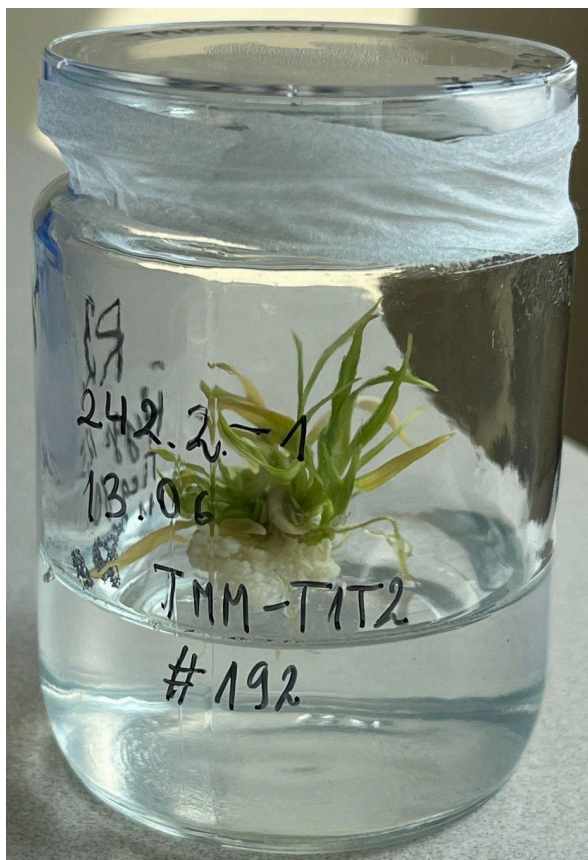


Joonis 10. Just nakatatud odra embrüod laminaari all Ci söötmetassidel.

Siis asetati Petri tassid 45° nurga alla laua suhtes, pipeteeriti ülejäänud voolav bakterisuspensioon tassilt ja embrüotel lasti kuivada veel 15 min. Järgmisena tõsteti nakatatud embrüod hajusalt uuele Ci söötmetassile (koostis lisas 6). Petri tassid suleti parafilmiga ja asetati pimedasse karpi temperatuurile 23°C kolmeks päevaks. Kolme päeva möödudes tõsteti embrüod uuele Ci söötmele, et indutseerida kalluse tekkimist. Seda söödet nimetatakse selektiivsöötmele, sest sellesse on lisatud antibiootikumid tikartsilliin (160 µg/ml) ja hügromütsiin (50 µg/ml) ning vask (CuSO₄, lõppkonts. 5 µM). Selektiivsöötmele olid embrüod 2 nädalat temperatuuril 23°C, seejärel tõsteti need uuele Ci selektiivsöötmele (koostis lisas 7) ja hoiti veel 2 nädalat. Peale seda tõsteti kallused uuele Ci selektiivsöötmele, kusjuures ühe petri tassi kallused jagati kahele tassile. Oluline printsiip siinjuures oli see, et samast embrüost tekkinud kallused tõsteti alati koos ühelt tassilt teisele.

Peale kuut nädalat kalluste indutseerimist olid kallused valmis regenereeruma. Selles faasis areneb ja sureb palju kalluseid. Kallused, millele hakkas tekkima rohelist lehekudet, tõsteti regeneratsioonisöötmele (Lisa 8) ja asetati kasvukappi (Phcbi, mudel MLR-352H-PE, õhuniiskus kapis 85% (õhuniiskus purgi sees võis erineda) ja temperatuur 24°C, 16 h valgust ja 8 h pimedust, valgustugevus 269,86 µmol m⁻² s⁻¹. Kasvukapis arenes osadele kallustele roheline lehekude ning juured, kuid päris lehte kasvatama hakkas vaid üks kalluste kogumik (tekkinud ühest embrüost). See kallus tõsteti esimesele regeneratsioonisöötmele ehk R-söötmele (koostis lisas 8) 7.05.2025 ja teisele R-söötmele tõsteti 28.05.2025, mil regenereeruv kallus tõsteti eraldi omaette söötmele. Seda regenereeruvat kallust kasvatati

paari suurema lehe loomiseni kasvukapis ja tõsteti uutele R-söötmetele 13.06.2025 (Joonis 11) ja 16.07.2025.



Joonis 11. Kallusest arenenud regenerant R söötmel.

2.2.1.4 Regenerantide kasvatamine

Kui ühest embrüöst arenenud regenerant (Joonis 11) oli piisavalt suur (Lisa 9 Joonis 22), jaotati ta viieks (juurte ja kalluse kobarate vahelt) ning tõsteti iga osa eraldi mullaga potti ja viidi kasvuhoonesse, 2 l pottidesse turbamulda, millesse segatud vermikuliiti vahekorras 1l/10l mulla kohta, koos aeglaselt vabaneva väetisega (Osmocote graanulid, 240 g 60 l mulla kohta). Kasvuhoone temperatuur suvel oli vahemikus 19-35°C ja õhuniiskus 30-60%. Valgusrežiim oli 20 h valgust ja 4 h pimedust ning valgustugevus 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Taimi kasvatati kuni seemnete küpsemiseni kasvuhoones. Taimede kasvamise vahemik oli 6.08.2025 kuni jaanuar 2026. Taimedel tehti kasvuperioodi jooksul kahjuritõrjet. Kasutatud vahendid: roheline seebi (Mayer) lahus, NeemAzal-T/S (Baltic Agro) ja insektitsiid Evure (ADAMA Makhteshim Ltd.). Kasvuhoones kasutatud kasurid: nematoodide liik *Steinernema feltiae* (toode ENTONEM, Koppert) ja röövlesta liik *Amblyseius swirskii* (Koppert).

2.2.1.5 Transformeeritud otrade DNA eraldus

T0 (kallusest regenereerunud põlvkond) taimedelt eraldati DNA, et analüüsida tekkinud mutatsioone. DNA eraldati CTAB protokolliga (Lisa 10). T1 taimede DNA eraldati nii käsitsi CTAB protokolliga (Lisa 10) kui ka robotiga. DNA eraldus tehti robotiga *Opentrons Flex Robot* automeeritud pipeteerimisplatvormiga Opentrons FLEX kasutades MagMAX Plant magnetkuulikeste põhise protokolliga (*Applied Biosystems*) komplektiga “MagMAX™ Plant DNA Isolation Kit”. Keskmise saadud DNA-de kontsentratsioon oli 32,3 ng/μl, mõõdetud spektrofotomeetriga (BioCat GmbH, NanoPhotomeeter NP80).

2.2.1.5.1 T0 regenerantide geneetilise materjali analüüs

Taimedele tehti transgeeni esinemise kontrollimise PCR (Lisa 11) Cas9 (praimerid LT32 ja LT77, Lisa 3 Tabel 8) ja PCR toimimise kontrollimise PCR MLO markeritega (praimerid Mol9 ja LT15, Lisa 3 Tabel 8).

Samuti tehti regenerantidele *TMM* piirkonnale spetsiifiliste praimeritega PCR (Lisa 16), et uurida eeldatavalt muteerunud geeni piirkonda (Joonis 13). Kasutatud praimerid olid EL15 ja EL16 (Lisa 3 Tabel 8). Kuna geelil tekkisid topelt-produktid, lõigati mõlemad geelist välja ja puhastati PCR produkti puhastamise komplektiga (Thermo Scientific, GeneJET). Produktid sekveneeriti TÜ genoomika instituudi tuumiklaboris. Sekveneerimistulemusi analüüsiti veebipõhises tarkvaraplatvormis Benchling (benchling.com) ja programmis ApE (Davis & Jorgensen 2022).

2.2.1.6 T1 põlvkonna taimede kasvatamine

T0 põlvkonna taimedest saadud seemneid steriliseeriti 7 min 5% kloori lahuses, seejärel loputati 4 korda destilleeritud veega ning siis 2 min 70% etanooli sees, mille järel loputati uuesti destilleeritud vees 2 korda ning pandi seemned idanema klaasist steriilsetele petri tassidele niiske paberi peale (Fisher Scientific, Filter paper, Qualitative) kuni idude ja koleoptilide arenguni ning pandi taimed seejärel kassetitesse (4 x 4 x 5,5 cm) kasvama. Kasvama läinud T0 taimede järglased on nimetatud järjestikuste numbritega, näiteks T0 liini 179 järglased on vastavalt T1 põlvkonna taimed märgistustega 179-1, 179-2, 179-3 ja nii edasi. Kokku kasvatati 63 T1 taime.

Taimed kasvasid kasvuhoones alates jaanuarist 2026 (talveperiood) kuni suveni 2026, lampide all valgustugevusega ($500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ja valgusrežiimiga 16 tundi valgust ja 8 tundi pimedust, temperatuurivahemik 18-30°C ja õhuniiskus 30-60%.

Viljapeade loomise järgus nakatusid T1 põlvkonna odrad jahukastega (*Blumeria graminis f. sp. hordei*).

2.2.1.7 T1 taimede geneetilise materjali analüüsid

2.2.1.7.1 T1 põlvkonnas transgeeni esinemise testimine MLO+Cas9 praimeritega

Transgeenitest tehti kõikidele 63 T1 põlvkonna odrale. Genoomne DNA eraldati taimedest CTAB protokolliga (Lisa 10) ja tehti transgeenitest: PCR praimeritega MLO+Cas9, et kontrollida transgeeni esinemist taimede genoomis (Lisa 11). MLO praimerid toimivad kontrollina, kuna amplifitseerivad piirkonda, mis on odra DNAs olemas, ja Cas9 praimerid amplifitseerivad transgeeni ehk T-DNA piirkonda. Cas9 praimerid olid LT32 ja LT77 (Lisa 3 Tabel 8) ja MLO praimerid Mol9 ja LT15 (Lisa 3 Tabel 8). Kuna tulemus ei olnud täiesti selge, siis korraldati transgeenitesti teiste praimeritega (D53+Hygr).

2.2.1.7.2 T1 põlvkonna transgeeni testimine D53+Hygr praimeritega

Transgeeni olemasolu testimiseks kasutati PCR praimerite komplekti, mis võimaldab detekteerida transgeene vaatamata kodeeritava Cas valgu tüübile (Lisa 18). Selles on D53 geeni praimerid (Hv_D53_RT_F3 ja KN9) ja hügromütsiini resistentsusgeeni praimerid (LT103 ja Hyg_RT_R2, lisa 3 Tabel 8). D53 praimerid toimivad kontrollina, kuna amplifitseerivad piirkonda, mis on odra DNAs olemas ja Hygr praimerid amplifitseerivad transgeenilt hügromütsiini resistentsusgeeni järjestust.

2.2.1.7.3 T1 põlvkonna otrades T1 ja T2 sihtmärkpiirkonna amplifitseerimine

Selleks, et sekveneerida T1 ja T2 sihtmärkpiirkonda *TMM* geenis, tehti PCR (Lisa 16) praimeritega EL19 ja EL18 (Lisa 3 Tabel 8). Produktid lahutati agarosgeelil (Lisa 4), lõigati geelist välja ja puhastati Favorgen FavorPrep™ Gel/PCR puhastamise komplektiga. Puhastatud produktid saadeti sekveneerimisele praimeritega EL19 ja EL16 (Lisa 3 Tabel 8). Sekveneerimistulemusi analüüsiti veebipõhises tarkvaraplatvormis *Benchling* (benchling.com) ja programmis ApE (Davis & Jorgensen 2022).

2.2.1.8 Odra fenotüübi analüüs

2.2.1.8.1 Odra õhulõhede juhtivuse mõõtmine

Valitud 20-lt odralt mõõdeti kolme kõrresõlme faasis õhulõhede juhtivust poromeetriga (LI-COR, LI-600). Mõõdeti eraldi mõlemat lehe külge. Samadelt lehtedelt võeti peale seda õhulõhede jäljendid.

2.2.1.8.2 Lehejäljendite võtmine transformeeritud otradelt

Õhulõhede jäljend võeti T1 taimedelt kasvufaasis, kus oder loob palju võrseid ja lehti. Taimede keskmine vanus oli 55 päeva (vanused varieerusid idandamise kuupäevade erinevuse pärast). Jäljendi võtmiseks kasutati oranži hambajäljendi ja aktivaatori segu Zhermack Orangwash L.. Jäljend võeti elusalt lehelt, mis valiti iga taime puhul puhma keskosast. Jäljendipasta asetati kahe väikese (35 x 10 mm) petri tassi peale ning pigistati lehe keskosale, kattes lehe abaksiaalse ning adaksiaalse poole. Segu tahkudes lõigati leht taimelt ära, eemaldati leht jäljendisegu vahelt ning lõigati tahkunud segu adaksiaalne ja abaksiaalne jäljendikülge eraldi. Lehejäljendi koha peale tahkunud jäljendisegul tehti läbipaistva küünelakiga (BUK) õhuke kiht ning tõmmati laki kiht kuivades läbipaistvale teibile. Teip jäljendi lakiga asetati mikroskoobi alusklaasile.

2.2.1.8.3 Õhulõhede anatoomia analüüs lehejäljenditelt

Nii transformeeritud odral kui ka harilikul müürloogal tehti mikroskoobiga (Kern OBF 133; Kern & Sohn GmbH) preparaadist läbi kõikide pinnajäljendi kihtide videod, (suurendus odra preparaadidel 100x ja hariliku müürlooga puhul 200x). Saadud videomaterjali pealt loendati kokku õhulõhede arv ja mõõdeti vaadatava ala pindala, programmiga ImageJ (Schneider et al., 2012). Loendati vaid rakud, mis jäid vähemalt 50% ulatuses selekteeritud vaatevälja sisse.

Kasutades õhulõhede loendamise andmeid arvutati õhulõhede tihedus SD (ingl. k. *stomatal density*) mõlema lehe külje jaoks ja õhulõhede tiheduste suhe (SD ülemine / SD alumine) ehk SR (ingl. k. *stomatal ratio*).

2.2.2 Hariliku müürlooga *tmm* mutandi komplementeerimine *TMM* geeniga

2.2.2.1 Transformeeritava müürlooga *tmm* mutantide kasvatamine

Komplementatsiooni tegemiseks kasutatud taimedeks olid *A. thaliana* Col-0 metsiktüübi taustaga *tmm* mutandid. Mutandi täisnimi on *tmm stkr1* (Jalakas et al., 2024). Töö hariliku müürloogaga toimus Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudi laboris. Taimi kasvatati lühipäeva toas, fotoperioodiga 10/14, valgusintensiivsusega $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperatuuril 23°C/19°C ja suhtelisel õhuniiskusel 60%. Potid olid suurusega 8 x 8 x 6 cm, kolm taime poti kohta.

2.2.2.2 Plasmiidide disainimine hariliku müürlooga transformeerimiseks

Komplementatsiooni vektorite idee on selles, et *tmm* mutanti komplementeeritakse *TMM* geeniga ja kui see taastab normaalse fenotüübi, siis on toimunud komplementatsioon. Müürlooga *tmm* mutandi jaoks oli plaan teha odra *TMM* geeniga komplementaarvektor (et testida, kas odra *TMM* käitub samamoodi kui hariliku müürlooga geen) ja müürlooga enda *TMM* geeniga komplementaarvektor. Kuna odra *TMM* geeni ei õnnestunud odra genoomselt DNA-lt amplifitseerida, siis tehti katse ainult hariliku müürlooga *AtTMM* komplementaarvektoriga ja kontrollina kasutati *AtTMM-promootor* vektorit, kus oli hariliku müürlooga *TMM* geeni promootor, aga mitte geen ise.

Valitud plasmidi harilikku müürlooka viimiseks kasutati binaarset vektorplasmidi pCAMBIA1390-v2. Vektor pCAMBIA1390-v2 sisaldab hügomütsiini (Hyg) ja kanamütsiini (Kan) resistentsuse geene, mis on hädavajalikud transformeerunud bakterite indikatsiooniks ja transgeensete taimede selektsiooni protsessis.

Plasmidi järjestus sisestati programmi ApE (Davis & Jorgensen 2022) ning sellele järjestusele vastavalt disainiti vektorid pCAM1390-TMMPROM (Lisa 12 Joonis 23) ja pCAM1390-TMMPROM-AtTMM (Lisa 13 Joonis 24) ning pCAM1390-TMMPROM-HvTMM (Lisa 14 Joonis 25).

2.2.2.2.1 *AtTMM* komplementatsioonivektori loomine

2.2.2.2.1.1 *TMM* promootori paljundamine genoomselt DNA-lt

Esiteks paljundati hariliku müürlooga (Col-0) genoomse DNA põhjal (PCR) *TMM* geeni promootor, pikkusega 654 aluspaari. Selleks kasutati praimereid PstI-TMMprom-for ja SnaBI-TMMprom-rev (Lisa 3 Tabel 8).

Reaktsioonisegu koostis ja tingimused olid järgmised: genoomset Col-0 DNA-d 2 µl, 5x Phusion HF puhvrit 10 µl (lõppkonts. 1x), 2 mM dNTP-d 5 µl (lõppkonts. 0,2 µM), 10 µM päripidi-praimerit 2,5 µl (lõppkonts. 0,5 µM), 10 µM äraspidi-praimerit 2,5 µl (lõppkonts. 0,5 µM), Phusion polümeraasi 0,5 µl (Thermo Scientific, lõppkonts. 0,02 U/µl). Reaktsioonisegu maht oli 50 µl.

Termotsükleris kestis esimene etapp 98°C 30 sekundit, järgmised etapid kordusid 35x, nendest esimene 98°C denaturatsiooni etapp 10 sekundit, praimerite seondumine 60°C 20 sekundit, DNA süntees 72°C 45 sekundit. Lõpetavad kaks viimast etappi olid 7 minutit 72°C ja 21°C temperatuur proovide tsüklerist välja võtmiseni. Kaane temperatuur tsükleris oli 105°C ja kasutatud tsükleri mudel Aeris™ Thermal mudel D48.

2.2.2.2.1.2 Produkti kontrollimine geelil ja produkti puhastamine

Proovidest laaditi geelile (Lisa 4) 5 µl PCR segu ja 2 µl 6x laadimisvärvi (lõppkonts. 1,7 x). Agarosgeelil lasti joosta elektroforeesivannis pingega 100 V 15 min (0,67 V/cm²). Saadud õige pikkusega produkt puhastati ülejäänud PCR reaktsioonisegust Favorgen FavorPrep™ Gel/PCR puhastamise komplektiga.

2.2.2.2.1.3 Restriktaasidega lõikamine

Järgmisena lõigati produkti (*TMM* promootor) *PstI* ja *SnaBI* restriktaasidega.

Restriktsioonisegu koostis oli järgnev: 10x restriktsiooniensüümide puhvrit 5 µl (Fastdigest, Thermo Scientific™, lõppkonts. 1x), puhastatud *TMM* promootori produkti 35 µl, 10 U/µl *SnaBI* ensüümi 1 µl (Thermo Scientific™, lõppkonts. 0,2 U/µl) ja 10 U/µl *PstI* ensüümi 1 µl (Thermo Scientific™, lõppkonts. 0,2 U/µl). Reaktsioonisegu lõppruumala oli 50 µl. Segu seisis 15 min 37°C kapis ja seejärel puhastati restriktaasidega lõigatud produkt Favorgen FavorPrep™ Gel/PCR puhastamise komplektiga.

2.2.2.2.1.4 Vektorplasmidi ettevalmistus

pCAM1390-v2-TMMPROM loomiseks kasutati plasmidi pCAM1390-v2. Plasmidi lõikamiseks kasutati restriktaase *PstI* ja *SnaBI* (FastDigest, Thermo Scientific) 15 min 37°C temperatuuril. Reaktsioonisegu koostis oli järgmine: restriktsiooniensüümide puhver (Fastdigest, Thermo Scientific™, lõppkonts 1x), plasmiid pCAM1390-v2 (lõppkogus 100 ng), *SnaBI* ensüüm (Thermo Scientific™, lõppkonts. 0,2 U/µl) ja *PstI* ensüüm (Thermo Scientific™, lõppkonts. 0,2 U/µl); reaktsioonisegu lõppkogus 50 µl.

Järgmisena töödeldi restriктаasidega lõigatud plasmidi veise soolestiku aluselise fosfataasiga (CIAP, Invitrogen™). Restriksioonisegule lisati CIAP ensüümi (lõppkonts. 0,4 U/μl) ja hoiti segu 1 h 37°C kapis. CIAPiga töötlemise eesmärk on lõigata 5' fosfaadid vektori otstest ära. Seejärel puhastati lõigatud vektor reaktsioonisegust Favorgen FavorPrep™ Gel/PCR puhastamise komplektiga.

2.2.2.2.1.5 Ligatsioon

Geeni *TMM* lõigatud ja puhastatud promootor lisati puhastatud ja lõigatud vektorisse pCAM1390-v2. Ligatsioonisegu koostis oli järgmine: 14 μl *TMM* promootorfragmenti, 3 μl vektorit, 2 μl 10 x T4 ligaasi puhvrit (lõppkonts. 1 x) ja 1 μl 5 U/μl T4 ligaasi (lõppkonts. 0,25 U/μl). Segu koguruumala oli 20 μl ja segu inkubatsioon toimus toatemperatuuril üks tund. Saadi plasmiid nimega pCAM1390-v2-TMMPROM.

2.2.2.2.1.6 Plasmiidide viimine *Escherichia coli*-sse

Et loodud plasmidi paljundada, viidi plasmiid *Escherichia coli* (*E.coli*) kompetentsetesse rakkudesse. Selleks võeti 50 μl laborandi valmistatud kompetentseid rakke (tüvi *Turbo*) ja 3 μl ligatsioonisegu (ehk plasmidi pCAM1390-v2-TMMPROM) ja lasti seista rakkudel 20 min jääl. Seejärel tehti rakkudele termošokk 42°C 1 min. Peale termošokki lisati laminaari all 450 μl SOC (SOC söötme koostis: trüptoon 2%, pärmiekstrakt 0,55%, NaCl 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glükoos 20 mM) söödet ja pandi rakud taastuma ja kasvama 37°C loksutisse üheks tunniks. Kui rakud olid paljunenud, külvati nad LB agarsöötmele kanamütsiiniga (kanamütsiini lõppkonts. 50 μg/ml).

2.2.2.2.1.7 Koloonia PCR

Plaadile kasvanud bakterikolooniatest tehti koloonia PCR, et leida kolooniad, kus on korrektset fragmenti sisaldava plasmidi insertioon õnnestunud. *TMM* promootori sisestusega plasmidi jaoks kasutatud äraspidi-praimer oli SnaBI-TMMprom-rev ja päripidi-praimer oli PstI-TMMProm-for (Lisa 3 Tabel 8).

Koloonia PCR jaoks tehti rakkude lüüs 10 μl MQ vees: steriilse hambatikuga lisati osa kolooniast vette ja kuumutati termotsükleris 10 minutit 95°C. Seejärel lisati ülejäänud reaktsioonisegu komponendid. Koloonia PCR-i reaktsioonisegu oli järgmine: 10x puhver B (Solis BioDyne, SBD, lõppkonts. 1x), 25 mM MgCl₂ (SBD, lõppkonts 2,5 mM), 2 mM dNTP (Thermo Scientific, lõppkonts. 0,2 mM), 10 μM äraspidi-praimer (lõppkonts. 0,5 μM),

10 µM päripidi-praimer (lõppkonts. 0,5 µM), Firepol DNA polümeraas (SBD, lõppkonts. 0,05 U/µl). Reaktsiooni lõppkogus oli 20,2 µl.

Koloonia PCR-i tsükleri programm kulges järgmiselt: PCR programm algas esmase denatureerimisega temperatuuril 95°C 3 min. Sellele järgnes 25 tsükli, mis koosnesid denatureerimisest temperatuuril 95°C 15 s, praimerite seondumisest temperatuuril 52°C 20 s ning DNA sünteesist temperatuuril 72°C 45 s. Reaktsioon lõpetati lõpliku DNA sünteesiga temperatuuril 72°C 7 min ning seejärel hoiti temperatuuri 20°C kuni programmi lõpetamiseni.

Tsüklerist tulnud PCR produktidesse lisati 4 µl 6x laadimisvärvi (lõppkonts. 1x) ja pipeteeriti igast proovist 1% agarosgeelile (protokoll Lisa 4) 7 µl proovi, ja lahutati foreesil TAE puhvris 100 V 15 min (0,67 V/cm²).

Sobivad bakterikolooniad, mis sisaldasid plasmiidis *TMM* promootorit, kasvatati üleöö LB vedelsöötmes kanamütsiiniga (lõppkonts. 50 µl/ml) 37°C loksutis loksumiskiirusega 200 pööret minutis (rpm). Järgmisel päeval eraldati bakterisuspensioonist plasmiidne DNA plasmidi eraldamise komplektiga Favorgen, FavorPrep™.

2.2.2.2.1.8 Plasmiidide sekveneerimine

Valitud bakterikolooniatest eraldatud plasmiidne DNA saadeti täpsemaks uurimiseks sekveneerimisele TÜ genoomika instituudi tuumiklaborisse. Kasutatud praimerid päripidi praimer pCAM1390-seq-for-1 ja äraspidi praimer pCAM1390-seq-rev-2.

Sekveneerimiseks saadeti 300 ng plasmidi, 1,6 µl (1 µM) praimerit, MQ vett, et viia koguruumala 7,3 µl-ni. Sekveneerimistulemusi analüüsiti veebipõhises tarkvaraplatvormis *Benchling* (benchling.com) ja programmis ApE (Davis & Jorgensen 2022).

2.2.2.2.1.9 AtTMM geeni lisamine promootoriga vektorisse

Järgnevalt lisati juba valmis tehtud vektorisse pCAM1390-TMMPROM hariliku müürlooga *TMM* geen (*AtTMM*), pikkusega 1491 aluspaari.

Hariliku müürlooga *TMM* geeni paljundamiseks genoomselt DNA-t tehti PCR Phusion polümeraasiga (reaktsioonisegu kirjeldatud eelnevas lõigus 2.2.2.2.1.1) praimeritega SnaBI-AtTMM-for ja BamHI-AtTMM-rev (Lisa 3 Tabel 8) ja kontrolliti geelil (Lisa 4). Sobiv DNA fragment puhastati PCR segust komplektiga Favorgen FavorPrep™ Gel/PCR. Seejärel lõigati *AtTMM* produkti restriktasidega *SnaBI* ja *BamHI*. Restriktatsioonisegu ja tingimused on kirjeldatud alapeatükis 2.2.2.2.1.3. Kasutati *SnaBI* ensüümi (Thermo Scientific™, lõppkonts. 0,2 U/µl) ja *BamHI* ensüümi (Thermo Scientific™, lõppkonts. 0,2

U/μl). Seejärel puhastati restriктаasidega lõigatud produkt Favorgen FavorPrep™ Gel/PCR puhastamise komplektiga.

2.2.2.2.1.10 Vektorplasmidi pCAM1390-v2-TMMPROM ettevalmistus

pCAM1390-v2-TMMPROM lõikamiseks kasutati restriктаase *BamHI* ja *SnaBI* (FastDigest, Thermo Scientific™) 15 min 37°C temperatuuril. Reaktsioonisegu on kirjeldatud eelnevas peatükis 2.2.2.2.1.4. Reaktsioonisegus kasutati ensüüme *SnaBI* (Thermo Scientific™, lõppkonts. 0,2 U/μl) ja *BamHI* (Thermo Scientific™, lõppkonts. 0,2 U/μl). Järgnevalt lisati restriksiooniensüümide ja DNA 50 μl mahuga segule CIAP ensüümi (lõppkonts. 0,4 U/μl) ja lasti seista 1 h 37°C kapis. Seejärel puhastati restriктаasidega lõigatud produkt Favorgen FavorPrep™ Gel/PCR puhastamise komplektiga.

Lõigatud ja puhastatud plasmiid (pCAM1390-v2-TMMPROM) ja *AtTMM* produkt ligeeriti samamoodi nagu kirjeldatud peatükis 2.2.2.2.1.5. Saadi plasmiid pCAM1390-v2-TMMPROM-*AtTMM*.

2.2.2.2.1.11 Transformatsioon *E.coli*-sse ja koloonia PCR

Järgnev plasmidi viimine *E.coli*-sse ja tulemuse kontrollimine tehti samamoodi nagu peatükkides 2.2.2.2.1.6 ja 2.2.2.2.1.7. *E. coli* plasmidi pCAM1390-v2-TMMPROM-*AtTMM* esinemise kontrollimiseks bakterikolooniates kasutati koloonia PCR-is praimereid pCAM-1390-seq-rev-2 ja *AtTMM*-for. PCR-i produktide tulemusi kontrolliti geelil (protokoll Lisa 4). Tsüklerist tulnud PCR produktidesse lisati 4 μl 6x laadimisvärvi (lõppkonts. 1x) ja pipeteeriti igast proovist 1% agarosgeelile (Lisa 4) 7 μl ja lahutati elektrofooresil TAE puhvris 100 V 15 min (0,67 V/cm²). Sobivad bakterikolooniad kasvatati üleöö LB vedelsöötmes kanamütsiiniga (lõppkonts. 50 μl/ml) 37°C loksutis loksumiskiirusega 200 pööret minutis (rpm). Järgmisel päeval eraldati bakterisuspensioonist plasmiidne DNA plasmidi eraldamise komplektiga Favorgen, FavorPrep™.

2.2.2.2.1.12 Sekveneerimine

Sekveneerimisele saadeti plasmiid pCAM1390-v2-TMMPROM-*AtTMM* praimeritega *AtTMM*-for, *AtTMM*-rev, pCAM1390-seq-rev2 ja pTMM1-seq-for (Lisa 3 Tabel 8) TÜ genoomika instituudi tuumiklaborisse. Sekveneerimistulemusi analüüsiti veebipõhises tarkvaraplatvormis Benchling (benchling.com) ja programmis ApE (Davis & Jorgensen 2022)

2.2.2.3 Hariliku müürlooga vektorite viimine agrobakterisse

Järgnev etapp viidi läbi nii pCAM1390-v2-TMMPROM kui ka pCAM1390-v2-TMMPROM-AtTMM plasmiidiga. Vektori viimiseks agrobakterisse võeti 1 µg eraldatud plasmidi ja segati 100 µl *Agrobacterium tumefaciens* kompetentsete rakkudega (tüvi GV3101). Baktereid hoiti jääl 20-30 min. Seejärel tõsteti bakterid termostaati, mis oli eelkuumutatud 37°C peale ja inkubeeriti seal 3 min. Peale kuumašokki lisati bakteritele 1 ml LB söödet ja inkubeeriti 28°C loksutil kiirusel 200-250 pööret minutis (rpm) 1-2 h. Kasvanud bakterite segu tsentrifuugiti 2 min kiirendusel 4602 g. Supernatant, ehk söötmevedelik bakterisademe kohal eemaldati peaaegu täielikult ja agrobakteri sade resuspendeeriti järelejäänud söötmetilgas. Seejärel lisati kogu bakteritega sööde LB agarplaatidele, milles oli 25 µg/ml gentamütsiini ja 50 µg/ml kanamütsiini. Plaat inkubeeriti 3 päeva temperatuuril 28°C. Söötmele kasvasid bakterikolooniad, millel olid vastavad resistentsused.

2.2.2.4 Hariliku müürlooga transformeerimine

Hariliku müürlooga nakatamiseks kasutati eelnevalt ette kasvatatud plasmiididega pCAMBIA1390-TMMprom ja pCAMBIA1390-AtTMM transformeeritud agrobaktereid. Esimene kultuur baktereid inokuleeriti söötmeplaadilt 5 ml LB vedelsöötmesse antibiootikumidega kanamütsiin (lõppkonts 50 µg/ml) ja gentamütsiin (lõppkonts 25 µg/ml), kus nad kasvasid üleöö 28°C loksutis. Järgmisel päeval inokuleeriti 25 µl üleöökkultuuris kasvanud bakterid 50 ml LB söötmesse, millesse lisati kanamütsiini (lõppkonts 50 µg/ml) ja gentamütsiini (lõppkonts 25 µg/ml). Bakterid kasvasid uuesti üle öö 28°C loksutis. Järgmisel päeval bakterirakud tsentrifuugiti 50 ml tuubides 10 minutit kiirendusega 3220 g. Supernatant valati tuubist ära ja bakterisade resuspendeeriti 50 ml 5% suhkruahuses. Lahusele lisati peale suspendeerimist detergendi SILVET L-77 (Momentum, lõppkonts. 0,05%). Silvet töötab pindaktiivse ainenä ja aitab bakterilahusel õite pinnale lähemale pääseda.

Hariliku müürlooga transformeerimiseks kasutati *tmm sktr1* mutante, mida oli kasvatatud õisikute loomiseni. Plastikust suur alus kaeti niiskete paberrätikutega ning taimede õied koos vartega pisteti agrobakteri suspensiooni 2 minutiks. Taimed asetati peale transformeerimist niisketele rätikutele külili ning kaeti omakorda niiskete paberrätikutega ning teise alusega, et säilitada taimede ümber kõrge õhuniiskus. Nakatatud taimed olid üleöö pimedas ruumis toatemperatuuril. Järgmisel päeval tõsteti taimed tagasi vertikaalsesse asendisse ja eemaldati paberrätikud ning lasti seemnetel küpseda kuni koristuseni toas valgusrežiimiga 16 h valgus,

8 h pimedat, valgusintensiivsus $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, RH (suhteline õhuniiskus) 60%, ja temperatuuril varieeruvusega 19-23°C.

2.2.2.5 Geneetiliselt muundatud hariliku müürlooga taimede sõelumine

2.2.2.5.1 Seemnete steriliseerimine laminaari all ja transgeensete taimede kasvatamine

100 μl seemneid pandi 1,5 ml katsutitesse, neile lisati 750 μl steriliseerimislahust (Koostis: 70% EtOH ja 0,1% Triton-x100). Seemneid loksutati lahuses 15 min. Peale seda eemaldati ster. lahus ja pesti seemneid 750 μl MQ veega 2 korda ja kolmas MQ vesi jäeti seemnetele peale. Seejärel külvati seemned antibiootikumidega söötmeplaatidele (hügromütsiini (lõppkonts. 25 $\mu\text{g/ml}$) ja tsefotaksiimiga (lõppkonts. 50 $\mu\text{g/ml}$) MS fütoagari plaadid) ja pandi +4°C kappi kaheks päevaks. Peale seda asetati plaadid lühikese päeva kasvutuppa (10 h valgust ja 14 h pimedat, valgusintensiivsus $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, RH 60%, ja temperatuuri varieeruvus 19-23°C), kus nad olid 8 päeva. Peale seda eraldati pisikesed plaadil kasvanud taimed ja istutati väikestesse pottidesse (5,5 cm x 5,5 cm x 5 cm) mulda (turbamuld + vermikuliit, mahuvahekorras 2:1). Kui taimedele hakkasid kasvama õieraod, tõsteti nad pika päeva tuppa (51 päevaselt) ja pandi ümber kiled, et seemnete segunemist vältida. Pika päeva toas oli valgust 16 h, pimedat 8 h, valgusintensiivsus $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, suhteline õhuniiskus 40-80%, temperatuur valges 23°C ja pimedas 18°C.

2.2.2.6 Õhulõhede jäljendite võtmine transformeeritud hariliku müürlooga taimedelt

Õievarte loomise faasis kui transgeensed taimed olid 44 päeva vanad, võeti geenmuundatud taimede lehtedelt jäljendid. Abaksiaalse külje jäljendi tegemiseks kasutati oranži hambajäljendi ja aktivaatori segu Zhermack Orangwash L. ja adaksiaalse külje jäljendi tegemiseks sinist Coltene Speedex light body. Jäljend võeti igalt taimelt ühelt lehelt. Leht tehti skalpelliga pikuti pooleks, et saada mõlemad, abaksiaalse ja adaksiaalse lehe külje jäljend, samalt lehelt. Polümeriseeruma hakkav silikoonsegu tõmmati lehele ja jäeti tahkuma. Seejärel eemaldati leht tahkunud jäljendi seest ning pandi jäljendile lehe koha peale läbipaistev küünelakk (BUK). Kui lakk oli toatemperatuuril kuivanud, võeti lakikiht läbipaistva teibiga jäljendilt ning kleebiti klaasist mikroskoobi preparaadi alusklaasile.

2.2.2.7 Transformeeritud hariliku müürlooga lehejäljendite analüüs

Lehejäljendite hindamise protsessi on kirjeldatud lõigus 2.2.1.10.

Saadud õhulõhede andmete põhjal arvutasin:

- 1) õhulõhede tihedus (SD) abaksiaalsel küljel $SD = S_{ab}/A$
ja adaksiaalsel küljel $SD = S_{ad}/A$
 S_{ab} - õhulõhede arv vaateväljas abaksiaalsel küljel,
 S_{ad} - õhulõhede arv vaateväljas adaksiaalsel küljel,
 A - vaatevälja pindala (mm^2);
- 2) ülemise ja alumise külje õhulõhede tiheduste suhe (SR): $SR = SD_{\text{ülemine}} / SD_{\text{alumine}}$

2.3 Tulemused

2.3.1 Odra transformeerimiseks loodud plasmiidid

Töö tulemusena loodi odra *TMM* mutageniseerimiseks vajalike gRNA-de järjestusi kodeerivad plasmiidid ja lõppvektor (pAGM8031-Hygr-Cas9-TMM-gRNA1-gRNA2) odra transformeerimiseks.

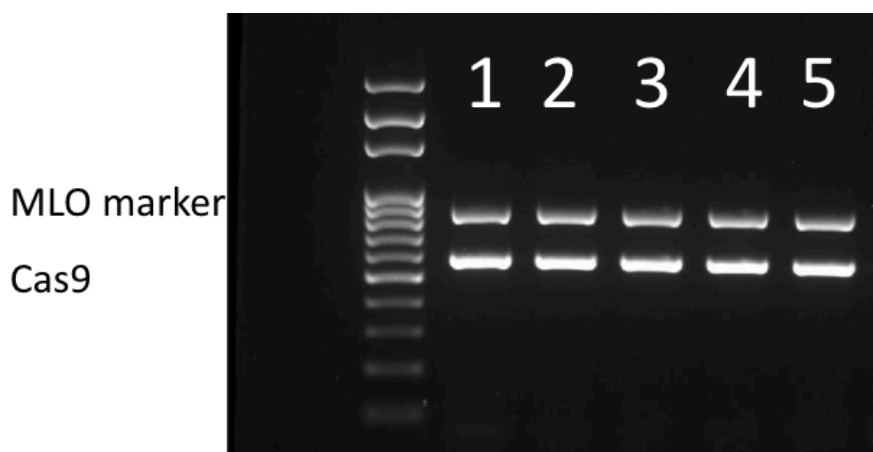
2.3.2 Transformeeritud otrade T0 põlvkond

Töö tulemusena loodi transgeensed odrataimed. Transformeeritud T0 põlvkonna taimi, ehk kallusest indutseeritud regenerante saadi kokku 5. T0 Regenerantide märgistus oli järgnev: 1=179, 2=180, 3=181, 4=182, 5=183.

Kõikidest nakatatud 154-st embrüost saadi kokku 154 kallust ja neist omakorda 5 regeneranti.

2.3.3 Transformeeritud otrade T0 regenerandid olid transgeensed

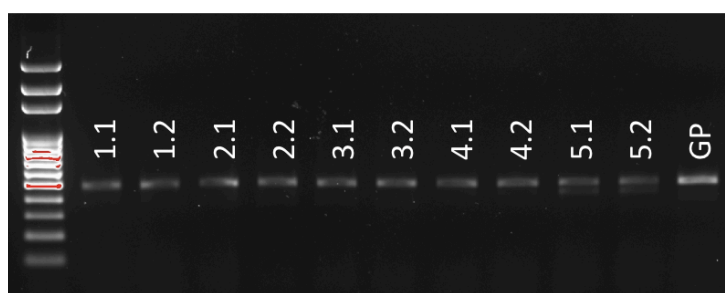
Transgeenitesti tulemusel selgus, et kõik regenerandid olid transgeensed, kuna neil esines Cas9-le kohase pikkusega PCR produkt geelil (Joonis 12).



Joonis 12. Transgeenitest regenerantidest praimeritepaaridega MLO ja Cas9 paljundamiseks. Esimene rida geelil (mustal taustal) vasakult on 1 kb DNA marker, numbrid 1-5 on T0 põlvkonna regenerandid. Geelipildi vasakus küljes toodud välja ka märgistused: ülemine produkt geelil tähistab MLO markerprodukti (kontroll) ja alumine Cas9 transgeeni markerprodukti. Taimedel 1-5 on alumine joon, ehk transgeen genoomis olemas.

2.3.4 T0 odrataimed olid TMM sihtmärkide regioonis muteerunud

Kõikide T0 põlvkonna taimedega tehti piirkonnaspetsiifiline PCR, et saada produkt *TMM* sihtmärkregioonist. PCR-i tulemusel oli näha, et mõnel juhul tekkisid eri suurustega produktid (Joonis 13). See võib indikeerida deletsiooni esinemist amplifitseeritud piirkonnas.



Joonis 13. Piirkonnaspetsiifiline PCR T0 taimedel praimeritega EL15 ja EL16. Proovid on laotud geelile kordustega (nr 1 taime proovi kaks korda 1.1 ja 1.2, jne). Esimene veerg on 1 kb DNA marker. Viimasel geelirajal on kontroll Golden Promise (GP). Kahte eri pikkusega produkti on näha proovides 5.1 ja 5.2.

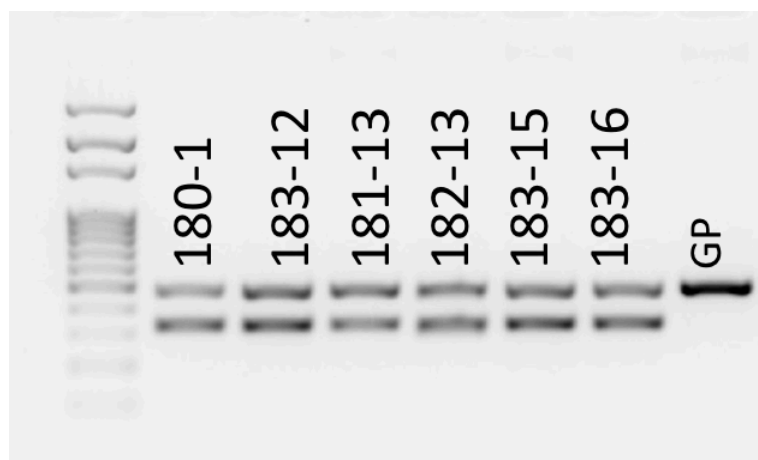
Sekveneerimistulemused kinnitasid mutageneesi toimumist. Kõikides taimedes oli toimunud mutatsioon sihtmärkide piirkonnas T1 (sihtmärk 1) ja T2 (sihtmärk 2) *TMM* geenis (Tabel 6).

Tabel 6. Regioonispetsiifilistest PCR produktidest saadud sekveneermistulemused.

Taim	T1 mutatsioon (+/-)	T2 mutatsioon (+/-)	geneetiline heterosügoot /homosügoot (HEZ/HOM)	Transgeen (+/-)
1 (179)	+	+	HEZ	+
2 (180)	+	+	HEZ	+
3 (181)	+	+	HEZ	+
4 (182)	+	+	HEZ	+
5 (183)	+	+	HEZ	+

2.3.5 Transformeeritud otrade T1 põlvkonna taimed olid kõik transgeensed

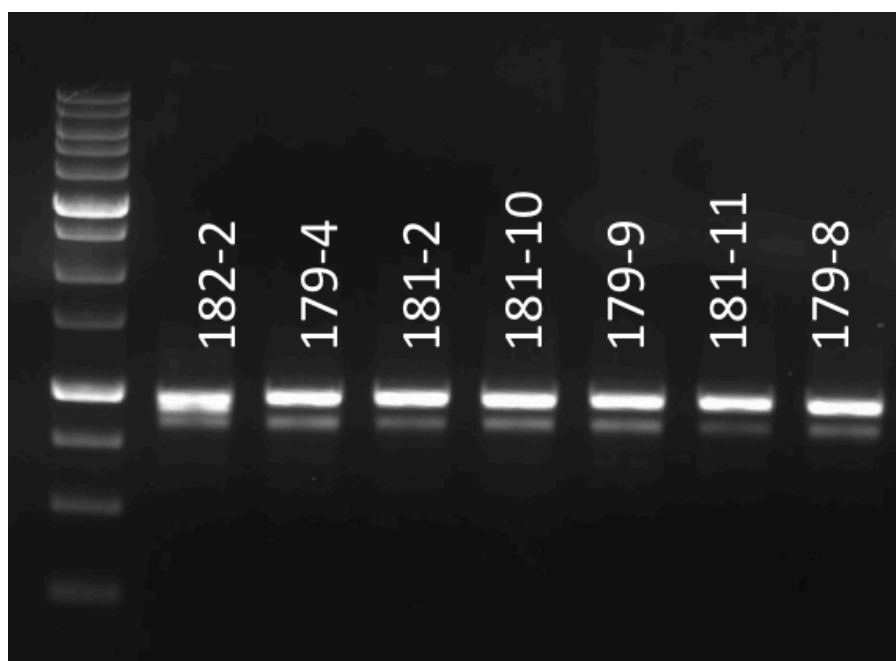
Transgeenitest näitas, et kõik T1 põlvkonna odrad olid transgeensed (Joonis 14). Kokku analüüsiti 63 T1 põlvkonna transformeeritud otra.



Joonis 14. T1 põlvkonna 6 taimet transgeenitest (D53/Hygr), millel on näha taimi nummerdusega 180-1, 183-12, 181-13, 182-13, 183-15, 183-16 ja kontrolli Golden Promise (GP). See on osa suurest geelipildist, kus on kõik T1 põlvkonna taimed sama tulemusega. Esimene veerg on 100 bp DNA marker. Tulemustest ülemine joon tähistab D53 produkti, mida kasutati kontrollina ja alumine rida tähistab Hygr praimerite produkti, mis näitab transgeeni olemasolu. Viimane on GP ehk Golden Promise, kontroll metsiktüüpi taimest.

2.3.6 Transformeeritud odra T1 põlvkonna taimedes olid mutatsioonid TMM sihtmärkide regioonis

T1 põlvkonna *TMM* geeni regioonispetsiifilise PCR-i tulemused viitasid mutageneesile *TMM* sihtmärkregioonis (topelt-produkt, joonis 15). Geelist lõigati produktid välja taimedel märgistusega 182-2, 179-4, 181-2, 181-10, 179-9, 181-11 ja 179-8, et saata produktid sekveneerimisele.



Joonis 15. TMM geeni regioonispetsiifilise PCR-i tulemused geelil praimeritega EL16 ja EL19. Geelil on näidatud 7 taime (182-2, 179-4, 181-2, 181-10, 179-9, 181-11, 179-8) 20-st analüüsitud taimest. Näha on kahte produkti (üks tugevama ja teine nõrgema signaaliga), mis lõigati geelist eraldi välja ja sekveneeriti eraldi.

Produktid saadeti sekveneerimisele. Kokku sekveneeriti 20 taime T1 põlvkonnast.

Sekveneerimise tulemused on nähtavad järgnevas tabelis (Tabel 7). Kuna kõik taimed olid geneetiliselt mutatsioonide suhtes heterosügootsed, oli kohati erinevates alleelides esinevate mutatsioonide defineerimine keeruline.

Tabel 7. Sekveneerimistulemused tabelis. Numbritega tulpades 3 ja 4 on näidatud odra *TMM* järjestuse positsioonid (pos.).

Taime number	Alleel	Sihtmärk 1	Sihtmärk 2	Eeldatav TMM funktsioonile mõju geeni
179-3	Alleel 1	T insertioon pos. 25 ja 26 vahel	deletsioon 68-85	tmm mutant
	Alleel 2	normaalne	deletsioon 86-102	
179-4	Alleel 1	T insertioon pos. 27	alates ~ pos. 85 mutatsioonid	tmm mutant
	Alleel 2	normaalne	alates ~ pos. 85 mutatsioonid	
179-7	Alleel 1	normaalne	deletsioon vahemikus 84-100	tmm mutant
	Alleel 2	mutatsioon alates pos. 27	raskesti defineeritav signaal	
179-8	Alleel 1	normaalne	deletsioon vahemikus 83-94	tmm mutant
	Alleel 2	deletsioon vahemikus 26-30	normaalne	
179-9	Alleel 1	normaalne	pos. 85 A asemel C (viib T-> P asenduseni valgus)	mutatsioonid TMM geenis, eeldatav TMM valk aminohappe asendusega
	Alleel 2	normaalne	deletsioon 85-86	
179-11	Alleel 1	normaalne	C deletsioon pos. 86	tmm mutant
	Alleel 2	normaalne	mutatsioonid alates pos 84	
180-1	Alleel 1	normaalne	asendus pos. 86 C -> G (viib T -> R asenduseni valgus)	mutatsioonid TMM geenis, eeldatav TMM valk aminohappe asendusega
	Alleel 2	deletsioon 27-34	A insertioon pärast pos. 85 ja veel mõned muutused	
181-1	Alleel 1	T insertioon pärast pos. 26	raskesti defineeritav signaal	mutatsioonid TMM geenis, TMM geeni poolt toodetud valk eeldatavalt normaalne
	Alleel 2	normaalne	eeldatavalt normaalne	
181-5	Alleel 1	normaalne	deletsioon 84-95	tmm mutant
	Alleel 2	T insertioon pärast pos. 26	C deletsioon pos. 84	
181-10	Alleel 1	normaalne	deletsioon 84-85	tmm mutant
	Alleel 2	normaalne	deletsioon vahemikus 82-94	
181-11	Alleel 1	normaalne	A deletsioon pos. 85 ja C-> G asendus pos. 87	tmm mutant

	Alleel 2	T insertioon pärast pos. 26	G insertioon pärast pos. 83 ja G-> C asendus pos. 90	
181-12	Alleel 1	normaalne	raskesti defineeritav signaal arvatava insertiooniga	<i>tmm</i> mutant
	Alleel 2	T insertioon pärast pos. 26	G-> A asendus pos. 79, lisaks arvatav deletsioon	
181-16	Alleel 1	T insertioon pärast pos. 26	normaalne	<i>tmm</i> mutant
	Alleel 2	normaalne	insertioon pärast pos. 88	
182-1	Alleel 1	raskesti defineeritav signaal	raskesti defineeritav signaal	<i>tmm</i> mutant
	Alleel 2	raskesti defineeritav signaal	raskesti defineeritav signaal	
182-2	Alleel 1	5 bp insertioon pos. 25 ja 26 vahel	9 bp insertioon pos. 83 ja 84 vahel	<i>tmm</i> mutant
	Alleel 2	raskesti defineeritav signaal	raskesti defineeritav signaal	
182-3	Alleel 1	suur insertioon	deletsioon pos. 86-88	<i>tmm</i> mutant
	Alleel 2	mutatsioon alates pos. 24	raskesti defineeritav signaal	
182-7	Alleel 1	normaalne	A insertioon pos. 85	<i>tmm</i> mutant
	Alleel 2	normaalne	T insertioon pos. 85	
183-2	Alleel 1	normaalne	G insertioon pärast pos. 86	<i>tmm</i> mutant
	Alleel 2	normaalne	deletsioon 80-86	
183-6	Alleel 1	pos. 40 asendus G-> T	deletsioon 82-88, asendunud AT-ga	<i>tmm</i> mutant
	Alleel 2	deletsioon 23-65	deletsioon 85-86	
183-11	Alleel 1	normaalne	deletsioon 85-86	<i>tmm</i> mutant
	Alleel 2	deletsioon 27-85	deletsioon 84-85	

Sekveneerimistulemuste põhjal saab liigitada T1 põlvkonna taimed funktsionaalse ja mittefunktsionaalse *TMM* geeniga taimedeks. Järeldused on ligikaudsed, kuna sekveneerimistulemuste signaalid on eri alleelide erinevate järjestuste ja mutatsioonide pärast segased, kuid võib arvata, et sekveneeritud taimedest on *TMM* geeni funktsioon kadunud

enamikus uuritud taimedes ja mingil määral säilinud järgmistes taimedes: 179-9, 180-1 ja 181-1.

Mutatsioonide eeldatav mõju *TMM* geeni funktsioonile:

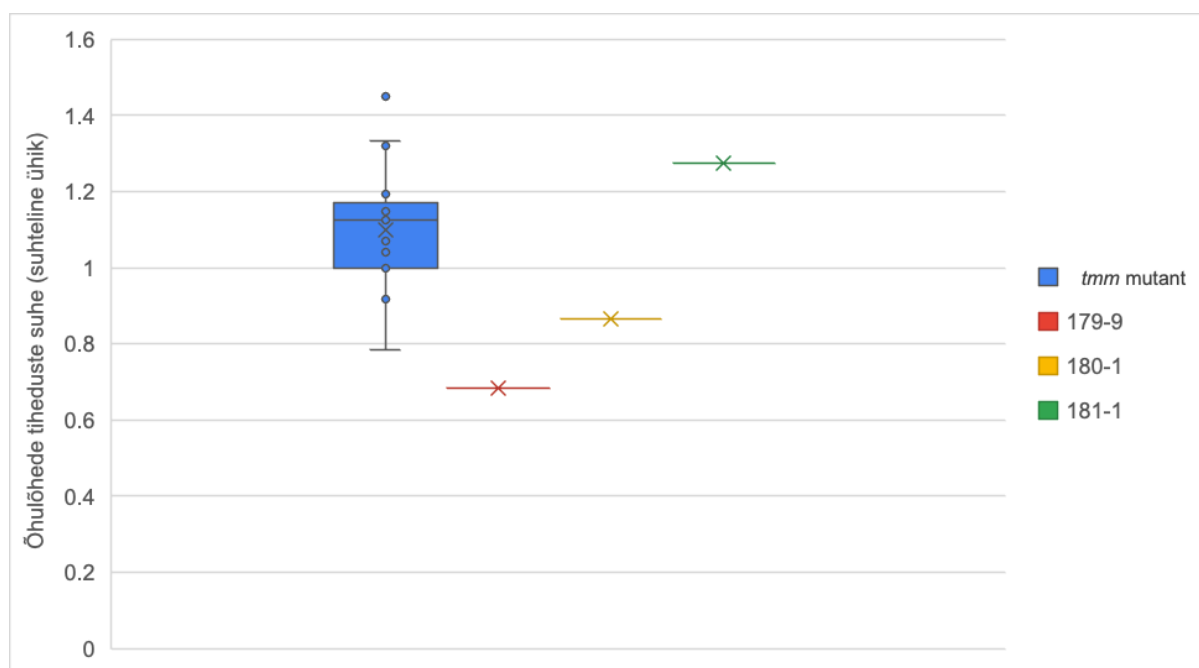
- 179-9 on sihtmärk 2 järjestuses ühe nukleotiidi muutus: A asemel C. Ootuspäraselt on sellelt alleelilt võimalik *TMM* geeniproducti toota, kuid saadud valgus on treoniini asemel vastavas valgu positsioonis proliin, mis eeldatavasti mõjutab valgu struktuuri ja toimimist.
- 180-1 on sihtmärk 2 järjestuses ühe nukleotiidi muutus: C asemel G, *TMM* geen ilmselt toodab muudetud valku, kus vastavas positsioonis on treoniin asendunud arginiiniga. Saadud *TMM* valgul võib, aga ei pruugi olla osaline funktsioon.
- 181-1 on võimalik, et ühes alleelis on nii sihtmärk 1 kui 2 normaalsed, seega on võimalik, et *TMM* valk toimib tavapäraselt.
- Ülejäänud 17 transformeeritud odras tundub sekveneerimistulemuste põhjal olevat mõlemas *TMM* alleelis vähemalt ühes sihtmärkjärjestuses mutatsioon, mis oodatavalt viib *TMM* funktsiooni kaotamiseni ehk taimed on *tmm* mutandid.

2.3.7 Õhulõhetunnused transformeeritud T1 põlvkonna otrades

Õhulõhetunnuseid mõõdeti samadel taimedel, mida sekveneeriti. Eeldatava *TMM* geenivariandi funktsionaalsuse järgi jaotatud sekveneeritud otradel mõõdeti õhulõhede juhtivust ning õhulõhede tihedusi. Taimedeks olid odra *tmm* mutandid (*TMM* geen täielikult mittefunktsionaalne) ja taimed, milles *TMM* geen võib-olla toimib (181-1, kus võib esineda üks terve *TMM* alleel) või toimib teistmoodi aminohappe asenduse tõttu (179-9 ja 180-1, joonis 16).

Kuigi statistiline analüüs ei olnud gruppide ebaühtlase jaotuse tõttu võimalik, näitasid mõõtmiste tulemused, et täieliku *TMM* geeni funktsiooni kadumisega otradel on õhulõhede tiheduste suhe vahemikus 0,8 - 1,2 (Joonis 16).

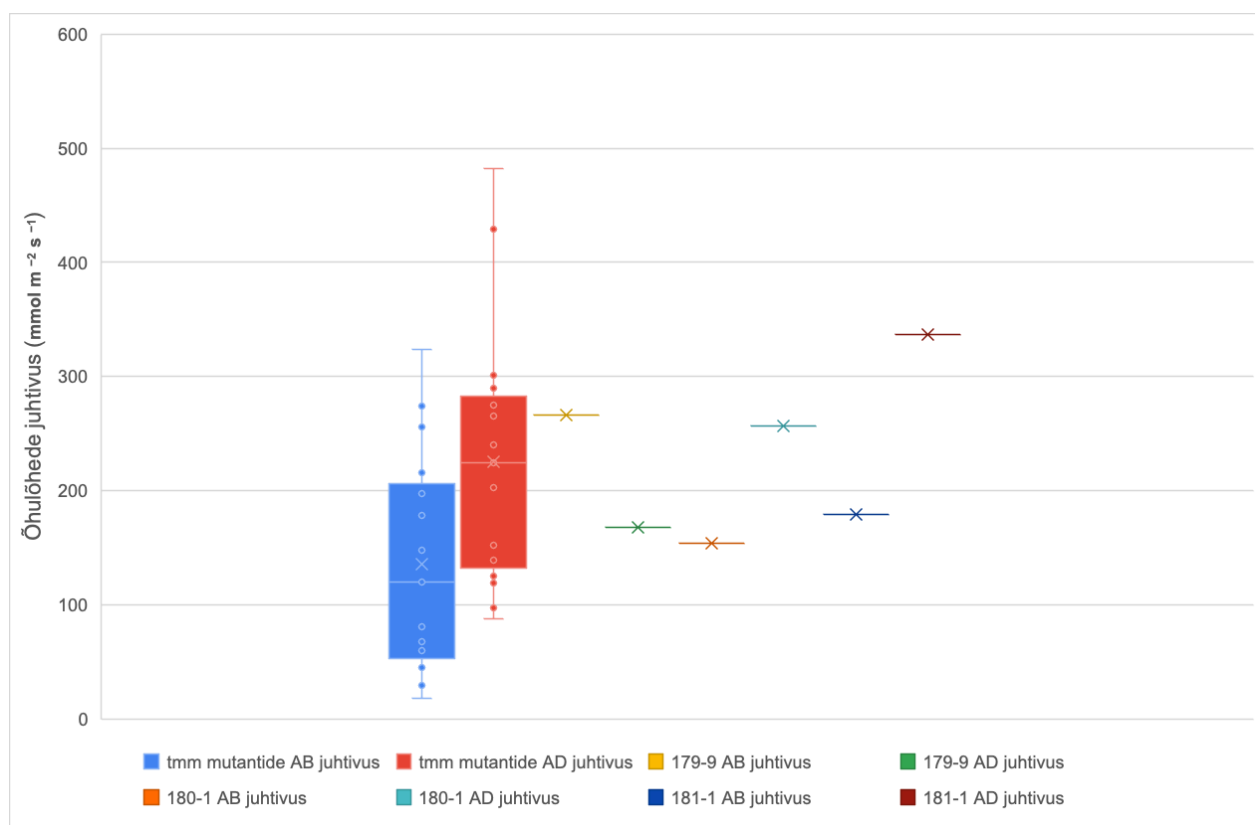
Osati toimiva *TMM* geeniga otradel oli õhulõhede tiheduste suhe väga varieeruv, neist kõige väiksem 179-9 taimel (0,68) ja kõige suurem taimel 181-1 (1,27). 180-1 taime õhulõhede tihedus oli 0,85 (Joonis 16). Kõige suurem õhulõhede tiheduste suhe oli ühel *tmm* mutant odral (Joonis 16). Kuigi tulemused on väga esialgsed, siis *tmm* mutantide tiheduste suhe paistab sarnane eeldatavalt normaalse *TMM*-ga taimega (181-1, kus vähemalt üks *TMM* geeni alleel on sekveneerimistulemuste põhjal normaalne).



Joonis 16. Õhulõhede tiheduste suhe T1 odra *tmm* mutantides. Karpdiagramm näitab *tmm* otrade õhulõhede tiheduste suhete jaotust, iga taim on näidatud ringiga. Ühekordsete ristide ja joontega on märgitud üksikute taimede õhulõhede tiheduste suhte väärtused. Karpdiagrammi horisontaalne joon näitab mediaani, rist karbis keskmist.

Õhulõhede juhtivus on näitaja, mis iseloomustab gaasivahetuse (peamiselt CO₂ omastamise ja veeauru eraldumise) kiirust lehe ja välisõhu vahel (Wang et al., 2022). Õhulõhede juhtivust mõõdeti samadelt lehtedelt, millelt võeti lehejäljendid ja koguti õhulõhede anatoomia andmed (Joonis 16). Poromeetriga mõõdeti eraldi nii alumise kui ka ülemise lehe külje õhulõhede juhtivus. Õhulõhede juhtivus tundus olevat suurem lehtede adaksiaalsetel külgedel aga ühes punktmutatsiooniga *TMM*-ga taimeliinis (taim 179-9) oli vastupidi (Joonis 17).

Hüpoteetilise normaalse *TMM* geeni funktsiooniga taime 181-1 õhulõhede ülemise lehe külje juhtivus (Joonis 17) oli suurem kui enamusel taimedest, samuti tema õhulõhede tiheduste suhe oli 1,24 (Joonis 16) ehk ülemisel küljel oli õhulõhede tihedus suurem.



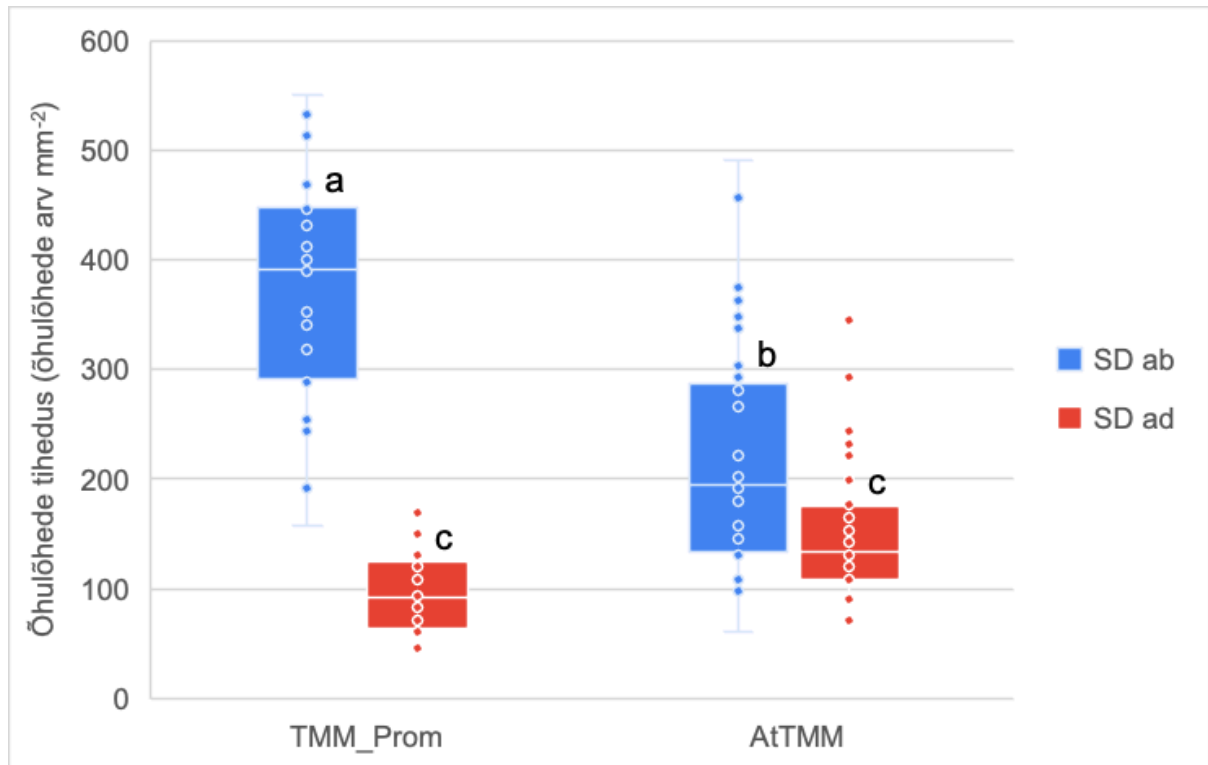
Joonis 17. T1 otrade *tmm* mutantide lehe alumise ja ülemise külje õhulõhede juhtivused. Karpdiagrammid näitavad *tmm* otrade õhulõhede juhtivuse jaotust, iga taim on näidatud ringiga. Ühekordsete ristide ja joontega on märgitud üksikute taimede õhulõhede juhtivuste väärtused. Karpdiagrammide horisontaalsed jooned näitavad mediaani, rist märgib keskmist. AD - adaksiaalne ehk ülemine, AB - abaksiaalne ehk alumine.

2.3.8 Hariliku müürlooga *tmm* mutantide komplementeerimine

Töö tulemusena loodi transgeensed taimeliinid, kus oli *tmm* mutanti komplementeeritud kas hariliku müürlooga *TMM* geeniga või kontrollvektoriga, kus oli *TMM* promootor, kuid mitte *TMM* geen.

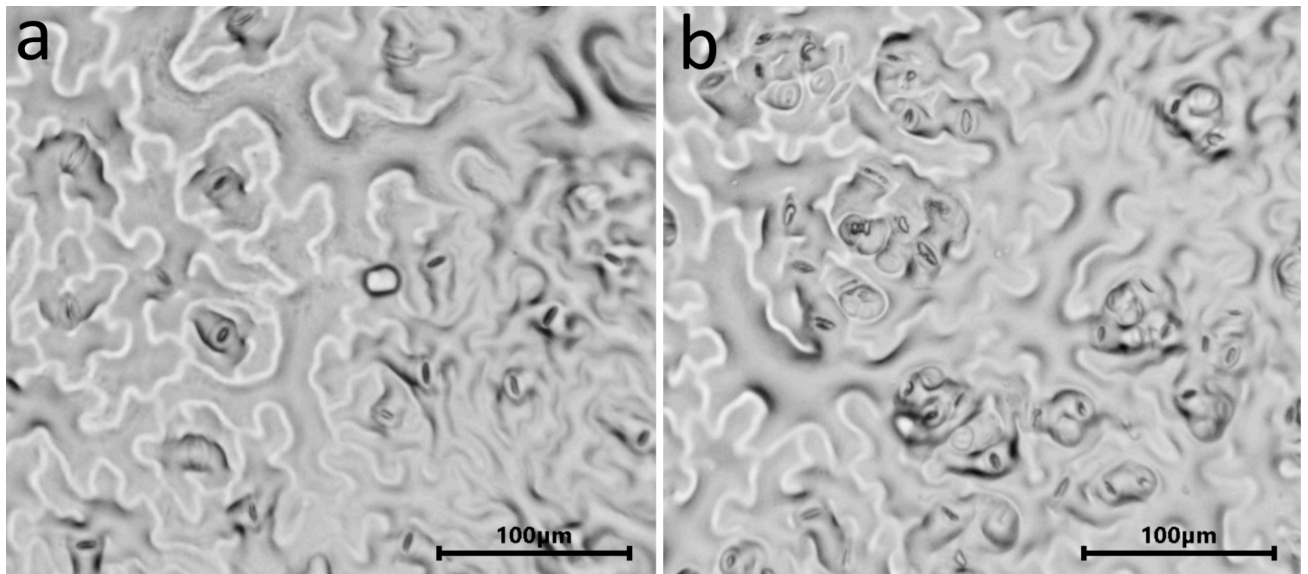
Kõikidelt saadud taimedelt analüüsiti õhulõhede tihedust. Kontrollgrupi moodustasid pCAM1390-TMMPROM plasmiidiga transformeeritud taimed (*TMM_Prom*) ja neid võrreldi taimedega, kuhu oli viidud hariliku müürlooga *TMM* geen koos selle promootoriga (*AtTMM*). Kahefaktoriline dispersioonanalüüs näitas, et õhulõhede tihedusele oli statistiliselt oluline mõju nii genotüübil ($F(1,128) = 13,93$; $p < 0,001$), lehe küljel ($F(1,128) = 109,89$; $p < 0,001$) kui ka nende tegurite interaktsioonil ($F(1,128) = 52,58$; $p < 0,001$). Oluline interaktsioon näitab, et *tmm* mutantide komplementeerimine *AtTMM* geeniga mõjutas õhulõhede tihedust erinevalt sõltuvalt lehe küljest.

Kontrollgrupil (TMM_Prom) oli abaksiaalse külje õhulõhede tihedus väga kõrge (keskmiselt $\sim 400 \text{ mm}^{-2}$) ja komplementeeritud grupis (AtTMM) oli abaksiaalne tihedus oluliselt madalam (keskmiselt $\sim 200\text{--}300 \text{ mm}^{-2}$, Joonis 18). Kontrollgrupi (TMM_Prom) ülemise külje õhulõhede tihedus oli madal ja sarnane komplementeeritud grupiga (Joonis 18). Seega komplementatsioon (terve *TMM* geeni lisamine) ei mõjutanud ülemise lehe külje õhulõhede tihedust oluliselt, kuid vähendas *tmm* mutantidel lehe alakülje õhulõhede tihedust (Joonis 18).



Joonis 18. Õhulõhede tihedus lehe ülemisel ja alumisel küljel. Karpdiagramm näitab tunnuse jaotust, keskne joon märgib mediaani, karbi piirid näitavad ülemist ja alumist kvartiili, valimi suurus $n = 26$ (TMM_Prom) ja $n = 40$ (AtTMM). Erinevad tähed tähistavad statistiliselt olulisi erinevusi gruppide vahel ($p < 0,05$; kahefaktoriline ANOVA Tukey *post hoc* testiga). ad - adaksiaalne ehk ülemine, ab - abaksiaalne ehk alumine, SD - õhulõhede tihedus.

Lehejäljenditest tehtud piltidelt on näha ka *tmm* mutantidele iseloomulikku õhulõhede klasterdumist, mis kadus hariliku müürlooga *TMM* geeniga komplementeeritud taimedes (Joonis 19).



Joonis 19. (a) AtTMM ehk komplementeeritud müürlooga abaksiaalse epidermi sillutisrakud ja õhulõhed. Õhulõhede paigutus on tavapärane, on näha “ühe raku reegel” ja õhulõhede klastreid ei ole. (b) TMM_Prom, ehk hariliku müürlooga *tmm* mutantide abaksiaalse epidermi sillutisrakud ja õhulõhed. On näha õhulõhede klastreid ja mittehajusat õhulõhede paigutumist. All paremal nurgas mõõtskaala 100 μl.

2.4 Arutelu

2.4.1 TMM geeni mutatsioonidega odrad

Töö käigus saadi üle 60 T1 põlvkonna odarataime. Tulemus, et kõik analüüsitud T1 põlvkonna taimed olid transgeensed, viitab sellele, et transgeene võis olla taimedesse sisenenud mitu, kuna ühe transgeeni puhul oleks ligikaudu veerand järglastest võinud olla transgeenivabad (Harwood, 2019). Kõik sekveneeritud 20 taime T1 põlvkonnast osutusid geneetiliselt heterosügootseteks. *TMM* geeni piirkonna muutusi on T1 põlvkonnas raske hinnata, kuna taimedes tekkinud mutatsioonid on T1 põlvkonnas veel erinevates alleelides erinevad. Küll aga nägime, et 17 taime sekveneeritavatest olid funktsionaalselt eeldatavalt *tmm* mutandid ehk *TMM* geen oli igas taimes mõlemas alleelis mingi mutatsiooniga, mis eeldatavalt rikub geeni funktsiooni. Kuna kõikides nendes taimedes oli ka transgeen sees, siis ei saa me välistada, et fenotüüpilised tunnused (Joonis 16-17 ja Lisa 15 Joonis 26), mida otrades nägime, on transgeeni genoomis esinemisest või selle genoomsest asukohast mõjutatud. Mõõdetud õhulõhede tiheduste andmetest nägime (Joonis 16), et *tmm* mutantidel oli õhulõhede tiheduste suhe sarnane Golden Promise odral varem leitud õhulõhede tiheduse

suhtega (1,2 suhtelist ühikut, Samantara et al. (2026)) jäädes suhtelise ühiku 1 ja 1,2 vahele (Joonis 16). Kuigi saadud tulemused vajavad rohkem täiendavat infot, milleks on tarvis luua otrade homosügootsed *tmm* mutandid ja analüüsida nende õhulõhetunnuseid, võib praeguste esialgsete tulemuste põhjal arvata, et *TMM* geeni funktsiooni häirumine odras, erinevalt harilikust müürloogast, õhulõhede tiheduste suhet ei mõjuta.

Õhulõhede juhtivused olid kõikidel mõõdetud taimedel suuremad lehe ülemisel küljel, välja arvatud taimel 179-9, millel oli juhtivus suurem hoopis lehe alumisel küljel (Joonis 17). Kõrgem mõõdetud juhtivus lehe ülaküljel on väga erinev tulemus võrreldes kaheiduleheliste õhulõhede juhtivusega, mis on tavaliselt suurem just alumisel lehe küljel (Hõrak, 2026, Tulva et al., 2025). See, et kõrrelistel on õhulõhede juhtivus suurem just lehe ülemisel küljel on kooskõlas ka teiste kaasaegsete uurimustega kõrrelistes, kus on näidatud, et just adaksiaalne lehe külge nii odras (Fan et al., 2025) kui ka nisis (Wall et al., 2022) on suurema õhulõhede juhtivusega.

Punktmutatsioon, mis on 179-9 taimes, võib mõjutada *TMM* geeni funktsiooni. Tulemustest on näha, et selle taime õhulõhede tiheduste suhe on väiksem ja alumise lehe pinna õhulõhede juhtivus on suurem kui ülemisel lehe pinnal ja analüüsitud otrade puhul on see eristuv tulemus (Joonis 16, joonis 17). Seega võiks tulevikus sihilikult komplementeerida hariliku müürlooga *tmm* mutanti taime 179-9 *TMM* geeni versiooniga ja ka tulevikus odra *tmm* mutante komplementeerida sama geeni (179-9 *TMM*) versiooniga, et testida, kuidas see konkreetne aminohappe asendus mõjutab *TMM* geeni funktsiooni ja õhulõhede paiknemist nii odras kui ka müürloogas.

Selleks, et kirjeldada geeni *TMM* täpset rolli odras, oleks vaja kasvatada transgeenivabad taimed ja teha veel katseid võrdlustes metsiktüüpi otradega. Selleks peaksid mutandid ja metsiktüübid kasvama täpselt samades kasvutingimustes, ning mõõdetav leht oleks vaja ka defineerida, kuna õhulõhede mustrites esineb ka taimesisene varieeruvus, olenevalt taime või lehe osast (Hõrak, 2026, Jalakas et al., 2024, Fan et al., 2025). Odra *tmm* mutandid on igatahes loodud ja nende abil saab tulevikus uurida *TMM* geeni rolli odra õhulõhde arengus ja paiknemises. Samuti võiks tulevikus uurida ka odra varre ja muude organite (õie osad, ohted) õhulõhede mustreid, sest näiteks harilikus müürloogas on leitud, et *TMM* geeni roll lehtedes ja silindrilikujulistel organites (hüpokotüül) õhulõhede moodustumisel on erinev (Nadeau & Sack, 2002). On kirjeldatud, et hariliku müürlooga *tmm* mutantides on lehe alaküljel rohkem õhulõhesid (Jalakas et al., 2024) kui metsiktüübil, aga varres pole näiteks õhulõhesid üldse (Bhave et al., 2009; Abrash & Bergmann, 2010). Õhulõhed esinevad taimedes ka näiteks õie

osadel (Bertolino et al., 2022) ja odra ohetel (Teare et al., 1972) ja ka nende uurimine võib olla oluline, et paremini mõista odra *TMM* funktsiooni erinevate organite õhulõhede arengus.

2.4.2 *TMM* geeniga *tmm* mutandi komplementeerimise mõju harilikus müürloogas

Hariliku müürlooga *tmm* mutantide komplementeerimine kinnitas, et *TMM* geen on õhulõhede mustri kujunemises ja lehe alumise külje õhulõhede arengu reguleerimises väga oluline, näiteks terve lisatud *TMM* geen taastas alumise lehe külje õhulõhede tiheduse (Joonis 19) sarnaseks metsiktüüpi hariliku müürlooga alumise külje õhulõhede tihedusega (Jalakas et al., 2024). Kontrollgrupil ehk *tmm* mutantidel (*TMM_Prom*) oli abaksiaalse külje õhulõhede tihedus väga kõrge, mis on *tmm* mutantide puhul oodatav (Geisler et al., 1998; Jalakas et al., 2024). Kontrollgrupi (*TMM_Prom*) ülemise külje õhulõhede tihedus oli väga madal, mis samuti vastab varasemale kirjandusele ja *tmm* mutantide kirjeldatud omadustele (Jalakas et al., 2024; Vráblová et al., 2017).

Terve *TMM* geeni lisamine ei muutnud õhulõhede tihedust ülaküljel statistiliselt oluliselt. See näitab meile, et *TMM* geenil on erinev roll abaksiaalse ja adaksiaalse lehe külje õhulõhede arengus. See toetab ka Jalakas et al., (2024) artiklis kirjeldatud, et lehe õhulõhede moodustumise arengurajad on lehe külgedel vähemalt osaliselt erinevalt reguleeritud.

TMM geeni on varem kirjeldatud kui mitme omadusega geeni (Nadeau & Sack, 2002), mis mõjutab õhulõhede eellasrakkude jagunemise mustreid (ühe raku reegel), õhulõhede tihedust ja rakkude identiteeti. Seda näeme ka *tmm* taimede (*TMM_Prom*) lehejäljenditest, kus lisaks suurele õhulõhede tihedusele on õhulõhede rakud ka kohati väga lähestikku ehk klasterdunud (Joonis 19). Sellele, et see on *tmm* mutantidele iseloomulik tunnus, viitavad ka varasemad artiklid (Yang & Sack, 1995; Geisler et al., 2000).

Töö tulemusena ei õnnestunud luua odra *TMM* geeniga harilikku müürlooka transformeeritavat plasmiidi, sest odra *TMM* geeni ei õnnestunud odra genoomselt DNA-lt paljundada ja sellega kloneerimisi teha ei saanud. Seega jäi töös testimata, kas odra *TMM* oleks taastanud hariliku müürlooga *tmm* mutantides normaalse õhulõhede paiknemise ja vähendanuks lehe alakülje õhulõhede tihedust. Edasine töö odra *TMM* geeni paljundamisega genoomselt DNA-lt vajaks optimeerimist. Kuna *TMM* geeni mõju kõrrelistes ei ole veel täpselt teada, oleks kõrrelise *TMM* geeni müürlooka komplementeerimise tulemus äärmiselt huvitav, et näha, kas ja kuidas odra *TMM* geen hariliku müürlooga õhulõhede jaotumist mõjutaks.

2.5 Kokkuvõte

Varasemates uuringutes õhulõhede kohta on kirjeldatud, et geen *TMM* mõjutab õhulõhede paiknevust. Mutatsioonid *TMM* geenis suurendavad õhulõhede tihedust alumisel lehe küljel ja ei mõjuta oluliselt õhulõhede tihedust lehe ülemisel küljel, ehk geen toimib lehe külgedel erinevalt. Samuti on kirjeldatud, et *TMM* geen mõjutab rakujagunemiste mustrit õhulõhede tekkimisel, toetades õhulõhede üksteisest eemal paiknemist ja aidates seeläbi hoida “ühe raku reeglit”. Kuigi *TMM* geeni roll on mudeltaimes harilik müürlook põhjalikult kirjeldatud, on selle funktsionaalsus ja asukohaspetsiifiline mõju kõrrelistes ebaselge.

Selles töös uuriti, kuidas geen *TMM* mõjutab õhulõhede paiknevust odras ja harilikus müürloogas. Selleks kasutati odras CRISPR/Cas9 süsteemi, et kutsuda esile muutusi odra *TMM* geenis, ja saadi 5 *tmm* mutantset kallusest indutseeritud otra, mis kõik olid transgeensed. Järgnevast põlvkonnast kasvatati kokku 63 taime, mis kõik olid transgeensed ja *TMM* mutatsioonide suhtes heterosügootsed taimed. Valitud 20-s taimes sekveneeriti *TMM* geeni sihtmärkjärjestused, millest järelalus, et 17 otra olid *tmm* mutandid (geen *TMM* mittefunktsionaalne) ja 3 osalise *TMM* geeni funktsionaalsusega. Samadel taimedel mõõdeti õhulõhede juhtivus ja võeti lehejäljendid. Saadud andmete põhjal on aimata seda, et odra puhul *TMM* geeni funktsiooni kadu õhulõhede suhet märkimisväärselt ei mõjuta. Edasised täpsemad katsed järgmise põlvkonna taimedega on vajalikud selleks, et saada homosügootsete mutatsioonidega odrad, et neid kasvatada koos metsiktüüpi kontrolliga, ning selgitada välja, kuidas *TMM* geeni funktsiooni puudumine õhulõhede paiknevust odras mõjutab.

Paralleelselt tehti ka hariliku müürlooga *tmm* mutantide komplementeerimist terve hariliku müürlooga *TMM* geeniga. Selleks transformeeriti hariliku müürlooga *tmm* mutante *TMM* promootori kontolli all paikneva *TMM* geenijärjestusega, ning kontrollrühma *TMM* promootorjärjestusega, millel puudus *TMM* geenijärjestus. Transformeeritud taimede lehejäljenditest selgus, et lehe alumise külje õhulõhede tihedus on oluliselt seotud *TMM* geeni funktsiooniga. Komplementeeritud harilikus müürloogas vähenes alumise lehe külje õhulõhede tihedus oluliselt võrreldes kontrollrühmaga, ehk *tmm* mutantidega, mille alumise lehe külje õhulõhede tihedus oli kõrge. Saadud tulemuste põhjal saame järeldada, et *TMM* geen mõjutab harilikus müürloogas lehe alumise külje õhulõhede tihedust olulisel määral, ning et õhulõhede arengu regulatsioon on mõlemal hariliku müürlooga lehe küljel mingil määral erinevalt reguleeritud.

RESÜMEE

The role of gene *TMM* in stomatal patterning in *Arabidopsis thaliana* and *Hordeum vulgare*

Eliisabeth Laul

Summary

Previous studies on stomata have shown that the *TOO MANY MOUTHS (TMM)* gene influences stomatal distribution. Loss of *TMM* function increases stomatal density on the abaxial (lower) leaf surface and does not affect it on the adaxial (upper) surface; thus, the gene functions differently on each side of the leaf. It has also been reported that *TMM* affects cell divisions leading to stomatal differentiation within the epidermis, promoting the spacing of stomata and thereby helping to maintain the "one-cell spacing rule".

Although the role of the *TMM* gene has been thoroughly described in the model plant *Arabidopsis thaliana*, its functionality and location-specific effects in grasses remain less understood. In this study, the role of *TMM* gene in stomatal distribution in barley (*Hordeum vulgare*) and *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) were studied. CRISPR/Cas9 technology was used on barley embryos to induce mutations in the *TMM* gene. This process yielded five *tmm* mutant barley plants induced from one callus, all of which were transgenic. In the next generation, a total of 63 plants were grown, all of which were transgenic and heterozygous for mutations in the *TMM* locus. Sequencing of 20 selected plants revealed that 17 were *tmm* loss-of-function mutants (with a non-functional *TMM* gene) and three plants exhibited partial gene functionality. Stomatal conductance was measured and leaf imprints were taken from these 20 plants. Based on the obtained data, it appeared that the loss of *TMM* gene function in barley does not significantly affect the stomatal ratio. Further experiments with the next generation of plants are necessary to obtain barley with homozygous mutations in *TMM* locus and grow them alongside with wild-type controls to clarify how loss of the *TMM* gene function affects stomatal distribution in barley. In parallel, complementation of *Arabidopsis tmm* mutants was performed using the wild-type *Arabidopsis TMM* gene (*AtTMM*). This was achieved by transforming the *tmm* mutants with the *TMM* gene sequence driven by the *TMM* promoter, while the control group was transformed with only the *TMM* promoter sequence lacking a *TMM* coding region. Based on the results from the leaf imprints of the transformed plants, we found that stomatal density on the abaxial surface is significantly affected by the *TMM* gene. In complemented *Arabidopsis*, the abaxial stomatal density decreased significantly compared to the control group. Based on these results, we can conclude that the

TMM gene significantly influences abaxial stomatal density in *Arabidopsis* and that stomatal development is, to some extent, differently regulated on the two leaf surfaces.

Tänuavaldused

Tahan tänada oma imelisi juhendajaid Hanna Hõrakut, Ljudmilla Timofejevat ja Kristiina Laanemetsa selle põneva võimaluse ja hindamatute kogemuste eest!

Samuti soovin ma tänada kõiki laborikaaslasid Tehnoloogiainstituudist tõeliselt koduse õhkkonna ning lõbusate vestluste eest! Eriliselt tänan Ebe Merilot lahkuse eest, Pirko Jalakat heade vestluste ja lahenduste pakkumise eest ja Mikk Välbet kogu laboritarkuse jagamise eest laboris! Soovin tänada ka Ingmar Tulvat ja Yuh-Shuh Wangi kogu abi, toetuse ja nõuannete eest! Lisaks soovin tänada ka Maaelu Teadmuskeskuse Taimebiotehnoloogia osakonna liikmeid abivalmiduse ja lahkuse eest!

Kirjanduse loetelu

- Abrash, E. B., & Bergmann, D. C. (2010). Regional specification of stomatal production by the putative ligand CHALLAH. *Development*, 137(3), 447–455. <https://doi.org/10.1242/dev.040931>
- AGI, The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 796–815. <https://doi.org/10.1038/35048692>
- Ahmadzai, A. S., Hu, C., Amin, A. K., & Zahed, Z. (2024). Exploring the journey of plant breeding from ancient traditional practices to modern advancements. *Journal of Crop Improvement*, 38(6), 688–709. <https://doi.org/10.1080/15427528.2024.2391423>
- Amack, S. C., & Antunes, M. S. (2020). CaMV35S promoter – A plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology. *Current Plant Biology*, 24, 100179. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100179>
- eElurikkus*. Vaadatud aprill 2026
<https://elurikkus.ee/app/taxonomy/taxon/2849>
- Arabidopsis thaliana* Leucine-rich repeat (LRR) family protein (TMM), mRNA (Version NCBI Nucleotide Database Vaadatud mai 2026.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_106657.3

- <https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/arabidopsis/thaliana/>
- Azizi-Dargahlou, S., & pouresmaeil, M. (2024). Agrobacterium tumefaciens-Mediated Plant Transformation: A Review. *Molecular Biotechnology*, 66(7), 1563–1580. <https://doi.org/10.1007/s12033-023-00788-x>
- Badr, A., Müller, K., Schäfer-Pregl, R., El Rabey, H., Effgen, S., Ibrahim, H. H., Pozzi, C., Rohde, W., & Salamini, F. (2000). On the origin and domestication history of Barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution*, 17(4), 499–510. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026330>
- Baik, B.-K., & Ullrich, S. E. (2008). Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of Cereal Science*, 48(2), 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.02.002>
- Berg, L. S., & Raissig, M. T. (2025). Stomatal patterning and development in grasses. *Current Opinion in Plant Biology*, 88, 102808. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2025.102808>
- Berger, D., & Altmann, T. (2000). A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development*, 14(9), 1119–1131.
- Bergmann, D. C., Lukowitz, W., & Somerville, C. R. (2004). Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science*, 304(5676), 1494–1497. <https://doi.org/10.1126/science.1096014>
- Bertolino, L. T., Caine, R. S., Zoulias, N., Yin, X., Chater, C. C. C., Biswal, A., Quick, W. P., & Gray, J. E. (2022). Stomatal Development and Gene Expression in Rice Florets. *Plant and Cell Physiology*, 63(11), 1679–1694. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac120>
- Bhave, N. S., Vele, K. M., Nadeau, J. A., Lucas, J. R., Bhave, S. L., & Sack, F. D. (2009). TOO MANY MOUTHS promotes cell fate progression in stomatal development of *Arabidopsis* stems. *Planta*, 229(2), 357–367. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0835-9>
- Brenchley, R., Spannagl, M., Pfeifer, M., Barker, G. L. A., D’Amore, R., Allen, A. M., McKenzie, N., Kramer, M., Kerhornou, A., Bolser, D., Kay, S., Waite, D., Trick, M., Bancroft, I., Gu, Y., Huo, N., Luo, M.-C., Sehgal, S., Gill, B., ... Hall, N. (2012).

- Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature*, 491(7426), 705–710. <https://doi.org/10.1038/nature11650>
- Chen, L. (2024). Regulation of stomatal development by epidermal, subepidermal and long-distance signals. *Plant Molecular Biology*, 114(4), 80. <https://doi.org/10.1007/s11103-024-01456-7>
- Cheng, X., & Raissig, M. T. (2023). From grasses to succulents – development and function of distinct stomatal subsidiary cells. *New Phytologist*, 239(1), 47–53. <https://doi.org/10.1111/nph.18951>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, 339(6121), 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Davis, M. W., & Jorgensen, E. M. (2022). ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program. *Frontiers in Bioinformatics*, 2. <https://doi.org/10.3389/fbinf.2022.818619>
- De Marcos, A., Triviño, M., Fenoll, C., & Mena, M. (2016). Too many faces for *TOO MANY MOUTHS* ? *New Phytologist*, 210(3), 779–785. <https://doi.org/10.1111/nph.13827>
- Engler, C., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2008). A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLOS ONE*, 3(11), e3647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>
- Fan, M., Moss, K.-A., Jindal, P., Kasznicki, P., Davey, P., Laissue, P. P., & Lawson, T. (2025). Large-scale quantification of stomatal patterning in barley leaves overexpressing epidermal patterning factor 1 reveals differential stomatal density between the adaxial and abaxial surfaces and spatial heterogeneity that impact stomatal function. *New Phytologist*, 248(4), 1769–1783. <https://doi.org/10.1111/nph.70514>
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Vaadatud 3. mai 2026 <https://www.fao.org/sustainable-development-goals-data-portal/data/indicators/Indicator2.4.1-proportion-of-agricultural-area-under-productive-and-sustainable-agriculture/en>
- Ferguson, J. N., Schmuker, P., Dmitrieva, A., Quach, T., Zhang, T., Ge, Z., Nersesian, N., Sato, S. J., Clemente, T. E., & Leakey, A. D. B. (2024). Reducing stomatal density

- by expression of a synthetic epidermal patterning factor increases leaf intrinsic water use efficiency and reduces plant water use in a C4 crop. *Journal of Experimental Botany*, 75(21), 6823–6836. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae289>
- Franks, P. J., W. Doheny-Adams, T., Britton-Harper, Z. J., & Gray, J. E. (2015). Increasing water-use efficiency directly through genetic manipulation of stomatal density. *New Phytologist*, 207(1), 188–195. <https://doi.org/10.1111/nph.13347>
- Franks, P. J., & Farquhar, G. D. (2007). The Mechanical Diversity of Stomata and Its Significance in Gas-Exchange Control. *Plant Physiology*, 143(1), 78–87. <https://doi.org/10.1104/pp.106.089367>
- Geisler, M., Nadeau, J., & Sack, F. D. (2000). Oriented Asymmetric Divisions That Generate the Stomatal Spacing Pattern in Arabidopsis Are Disrupted by the too many mouths Mutation. *The Plant Cell*, 12(11), 2075–2086. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2075>
- Geisler, M., Yang, M., & Sack, F. D. (1998). Divergent regulation of stomatal initiation and patterning in organ and suborgan regions of the Arabidopsis mutants too many mouths and four lips. *Planta*, 205(4), 522–530. <https://doi.org/10.1007/s004250050351>
- Gelvin, S. B. (2017). Integration of Agrobacterium T-DNA into the Plant Genome. *Annual Review of Genetics*, 51(Volume 51, 2017), 195–217. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035320>
- Hara, K., Kajita, R., Torii, K. U., Bergmann, D. C., & Kakimoto, T. (2007). The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes & Development*, 21(14), 1720–1725. <https://doi.org/10.1101/gad.1550707>
- Harwood, W. A. (Toim). (2019). *Barley: Methods and Protocols* (Kd 1900). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8944-7>
- Howard, E. A., Winsor, B. A., De Vos, G., & Zambryski, P. (1989). Activation of the T-DNA transfer process in *Agrobacterium* results in the generation of a T-strand—protein complex: Tight association of VirD2 with the 5' ends of T-strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(11), 4017–4021. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.11.4017>
- Hronková, M., Wiesnerová, D., Šimková, M., Skůpa, P., Dewitte, W., Vráblová, M., Zažímalová, E., & Šantrůček, J. (2015). Light-induced STOMAGEN-mediated

- stomatal development in *Arabidopsis* leaves. *Journal of Experimental Botany*, 66(15), 4621–4630. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv233>
- Hughes, J., Hepworth, C., Dutton, C., Dunn, J. A., Hunt, L., Stephens, J., Waugh, R., Cameron, D. D., & Gray, J. E. (2017). Reducing Stomatal Density in Barley Improves Drought Tolerance without Impacting on Yield. *Plant Physiology*, 174(2), 776–787. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01844>
- Hunt, L., & Gray, J. E. (2009). The signaling peptide EPF2 controls asymmetric cell divisions during stomatal development. *Current Biology: CB*, 19(10), 864–869. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.069>
- Hõrak, H. (2026). Functional and developmental differences between adaxial and abaxial stomata in amphistomatous leaves. *New Phytologist*, 249(4), 1675–1686. <https://doi.org/10.1111/nph.70762>
- Jalakas, P., Tulva, I., Bērziņa, N. M., & Hõrak, H. (2024). Stomatal patterning is differently regulated in adaxial and abaxial epidermis in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 75(20), 6476–6488. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae354>
- Jones, H. G. (1998). Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *Journal of Experimental Botany*, 49(Special_Issue), 387–398. https://doi.org/10.1093/jxb/49.Special_Issue.387
- Kanaoka, M. M., Pillitteri, L. J., Fujii, H., Yoshida, Y., Bogenschutz, N. L., Takabayashi, J., Zhu, J.-K., & Torii, K. U. (2008). SCREAM/ICE1 and SCREAM2 Specify Three Cell-State Transitional Steps Leading to *Arabidopsis* Stomatal Differentiation. *The Plant Cell*, 20(7), 1775–1785. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060848>
- Karavolias, N. G., Patel-Tupper, D., Seong, K., Tjahjadi, M., Gueorguieva, G.-A., Tanaka, J., Gallegos Cruz, A., Lieberman, S., Litvak, L., Dahlbeck, D., Cho, M.-J., Niyogi, K. K., & Staskawicz, B. J. (2023). Paralog editing tunes rice stomatal density to maintain photosynthesis and improve drought tolerance. *Plant Physiology*, 192(2), 1168–1182. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad183>
- Karavolias, N. G., Patel-Tupper, D., Gallegos Cruz, A., Litvak, L., Lieberman, S. E., Tjahjadi, M., Niyogi, K. K., Cho, M.-J., & Staskawicz, B. J. (2024). Engineering quantitative stomatal trait variation and local adaptation potential by cis-regulatory editing. *Plant Biotechnology Journal*, 22(12), 3442–3452. <https://doi.org/10.1111/pbi.14464>

- Koornneef, M., & Meinke, D. (2010). The development of Arabidopsis as a model plant. *The Plant Journal*, 61(6), 909–921. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2009.04086.x>
- Lazo, G. R., Stein, P. A., & Ludwig, R. A. (1991). A DNA transformation-competent Arabidopsis genomic library in Agrobacterium. *Bio/Technology*, 9(10), 963–967. <https://doi.org/10.1038/nbt1091-963>
- Lau, O. S., & Bergmann, D. C. (2012). Stomatal development: A plant's perspective on cell polarity, cell fate transitions and intercellular communication. *Development*, 139(20), 3683–3692. <https://doi.org/10.1242/dev.080523>
- Lee, J. S., Kuroha, T., Hnilova, M., Khatayevich, D., Kanaoka, M. M., McAbee, J. M., Sarikaya, M., Tamerler, C., & Torii, K. U. (2012). Direct interaction of ligand-receptor pairs specifying stomatal patterning. *Genes & Development*, 26(2), 126–136. <https://doi.org/10.1101/gad.179895.111>
- Leutwiler, L. S., Hough-Evans, B. R., & Meyerowitz, E. M. (1984). The DNA of Arabidopsis thaliana. *Molecular and General Genetics MGG*, 194(1), 15–23. <https://doi.org/10.1007/BF00383491>
- Lin, G., Zhang, L., Han, Z., Yang, X., Liu, W., Li, E., Chang, J., Qi, Y., Shpak, E. D., & Chai, J. (2017). A receptor-like protein acts as a specificity switch for the regulation of stomatal development. *Genes & Development*, 31(9), 927–938. <https://doi.org/10.1101/gad.297580.117>
- Liu, T., Ohashi-Ito, K., & Bergmann, D. C. (2009). Orthologs of Arabidopsis thaliana stomatal bHLH genes and regulation of stomatal development in grasses. *Development*, 136(13), 2265–2276. <https://doi.org/10.1242/dev.032938>
- Lundqvist, U. (2014). Scandinavian mutation research in barley – a historical review. *Hereditas*, 151(6), 123–131. <https://doi.org/10.1111/hrd2.00077>
- MacAlister, C. A., Ohashi-Ito, K., & Bergmann, D. C. (2007). Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature*, 445(7127), 537–540. <https://doi.org/10.1038/nature05491>
- MASC, Multinational Arabidopsis Steering Committee (2023). The Multinational Arabidopsis Steering Committee Annual Report 2023. [Võrguväljaanne] <https://arabidopsiscommunity.org>
- Mascher, M., Gundlach, H., Himmelbach, A., Beier, S., Twardziok, S. O., Wicker, T., Radchuk, V., Dockter, C., Hedley, P. E., Russell, J., Bayer, M., Ramsay, L., Liu, H., Haberer, G., Zhang, X.-Q., Zhang, Q., Barrero, R. A., Li, L., Taudien, S., ... Stein,

- N. (2017). A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature*, 544(7651), 427–433. <https://doi.org/10.1038/nature22043>
- McKown, K. H., Anleu Gil, M. X., Mair, A., Xu, S.-L., Raissig, M. T., & Bergmann, D. C. (2023). Expanded roles and divergent regulation of FAMA in *Brachypodium* and *Arabidopsis* stomatal development. *The Plant Cell*, 35(2), 756–775. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac341>
- Meng, F., Huang, S., Liu, N., Liu, C., Li, M., Wen, J., Zhao, S., Wang, Z., Gou, X., Zhu, Y., & Hu, C. (2026). Subtilase-mediated maturation of EPF1 and EPF2 is crucial for stomatal patterning. *Nature Plants*. <https://doi.org/10.1038/s41477-026-02297-6>
- Muir, C. D. (2015). Making pore choices: Repeated regime shifts in stomatal ratio. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1813), 20151498. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1498>
- Nadeau, J. A., & Sack, F. D. (2002). Control of Stomatal Distribution on the *Arabidopsis* Leaf Surface. *Science*, 296(5573), 1697–1700. <https://doi.org/10.1126/science.1069596>
- Ohashi-Ito, K., & Bergmann, D. C. (2006). *Arabidopsis* FAMA Controls the Final Proliferation/Differentiation Switch during Stomatal Development. *The Plant Cell*, 18(10), 2493–2505. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.046136>
- Pillitteri, L. J., Sloan, D. B., Bogenschutz, N. L., & Torii, K. U. (2007). Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. *Nature*, 445(7127), 501–505. <https://doi.org/10.1038/nature05467>
- Pillitteri, L. J., & Torii, K. U. (2012). Mechanisms of Stomatal Development. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), 591–614. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105451>
- Pleva, J., Vráblová, M., & Vrábl, D. (2026). Carbon dioxide or photosynthetically active radiation? Evaluation of the significance of individual environmental factors that control leaf stomatal development. *Annals of Botany*, 137(4), 907–919. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaf249>
- Provart, N. J., Brady, S. M., Parry, G., Schmitz, R. J., Queitsch, C., Bonetta, D., Waese, J., Schneeberger, K., & Loraine, A. E. (2021). Anno genominis XX: 20 years of *Arabidopsis* genomics. *The Plant Cell*, 33(4), 832–845. <https://doi.org/10.1093/plcell/koaa038>

- Raissig, M. T., Matos, J. L., Anleu Gil, M. X., Kornfeld, A., Bettadapur, A., Abrash, E., Allison, H. R., Badgley, G., Vogel, J. P., Berry, J. A., & Bergmann, D. C. (2017). Mobile MUTE specifies subsidiary cells to build physiologically improved grass stomata. *Science*, 355(6330), 1215–1218. <https://doi.org/10.1126/science.aal3254>
- Saisho, D., & Takeda, K. (2011). Barley: Emergence as a New Research Material of Crop Science. *Plant and Cell Physiology*, 52(5), 724–727. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr049>
- Samantara, K., Laul, E., Meigas, E., Siil, I., Välbe, M., Kollist, H., Laanemets, K., Yarmolinsky, D., & Merilo, E. (2026). Arabidopsis OST1 homologs of barley are involved in stomatal regulation. *Journal of Experimental Botany*, 77(10), 3150–3160. <https://doi.org/10.1093/jxb/erag037>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Shpak, E. D., McAbee, J. M., Pillitteri, L. J., & Torii, K. U. (2005). Stomatal patterning and differentiation by synergistic interactions of receptor kinases. *Science*, 309(5732), 290–293. <https://doi.org/10.1126/science.1109710>
- Spiegelhalder, R. P., & Raissig, M. T. (2021). Morphology made for movement: Formation of diverse stomatal guard cells. *Current Opinion in Plant Biology, Cell signaling and gene regulation*, 63, 102090. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102090>
- Spiegelhalder, R. P., Berg, L. S., Nunes, T. D. G., Dörr, M., Jesenofsky, B., Lindner, H., & Raissig, M. T. (2024). Dual role of BdMUTE during stomatal development in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Development*, 151(20), dev203011. <https://doi.org/10.1242/dev.203011>
- Statistikaamet. Statistika and mebaas. (vaadatud aprill 2026) PM0281: PÕLLUMAJANDUSMAA JA -KULTUURID | Maakondade ja üksuste jaotus, Põllumajandusmaa/põllukultuur, Vaatusperiood ning Näitaja. Vaadatud 22. mai 2026 https://andmed.stat.ee/et/stat/majandus_pellumajandus_pellumajandussaaduste-tootmine_taimekasvatussaaduste-tootmine/PM0281/table/tableViewLayout2
- Stomatal Patterning and Differentiation by Synergistic Interactions of Receptor Kinases | *Science*. (s.a.). Salvestatud 13. mai 2026 <https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.1109710>

- Sun, L., Lai, M., Ghouri, F., Nawaz, M. A., Ali, F., Baloch, F. S., Nadeem, M. A., Aasim, M., & Shahid, M. Q. (2024). Modern Plant Breeding Techniques in Crop Improvement and Genetic Diversity: From Molecular Markers and Gene Editing to Artificial Intelligence—A Critical Review. *Plants*, 13(19), 2676. <https://doi.org/10.3390/plants13192676>
- Teare, I. D., Law, A. G., & Simmons, G. F. (1972). STOMATAL FREQUENCY AND DISTRIBUTION ON THE INFLORESCENCE OF *TRITICUM AESTIVUM*. *Canadian Journal of Plant Science*, 52(1), 89–94. <https://doi.org/10.4141/cjps72-011>
- The International Barley Genome Sequencing Consortium. (2012). A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*, 491(7426), 711–716. <https://doi.org/10.1038/nature11543>
- Tulva, I., Koolmeister, K., & Hõrak, H. (2024). Low relative air humidity and increased stomatal density independently hamper growth in young *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 119(6), 2718–2736. <https://doi.org/10.1111/tpj.16944>
- USDA Foreign Agricultural Service. Vaadatud 22. mai 2026 <https://www.fas.usda.gov/data/production/grains>
- Volpi e Silva, N., & Patron, N. J. (2017). CRISPR-based tools for plant genome engineering. *Emerging Topics in Life Sciences*, 1(2), 135–149. <https://doi.org/10.1042/ETLS20170011>
- Von Groll, U., Berger, D., & Altmann, T. (2002). The subtilisin-like serine protease SDD1 mediates cell-to-cell signaling during *Arabidopsis* stomatal development. *The Plant Cell*, 14(7), 1527–1539. <https://doi.org/10.1105/tpc.001016>
- Vráblová, M., Vrábl, D., Hronková, M., Kubásek, J., & Šantrůček, J. (2017). Stomatal function, density and pattern, and CO₂ assimilation in *Arabidopsis thaliana* *tmm1* and *sdd1-1* mutants. *Plant Biology*, 19(5), 689–701. <https://doi.org/10.1111/plb.12577>
- Wall, S., Violet-Chabrand, S., Davey, P., Van Rie, J., Galle, A., Cockram, J., & Lawson, T. (2022). Stomata on the abaxial and adaxial leaf surfaces contribute differently to leaf gas exchange and photosynthesis in wheat. *New Phytologist*, 235(5), 1743–1756. <https://doi.org/10.1111/nph.18257>
- Wang, Y., Wang, Y., Tang, Y., & Zhu, X.-G. (2022). Stomata conductance as a goalkeeper for increased photosynthetic efficiency. *Current Opinion in Plant Biology*, 70, 102310. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2022.102310>

- Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., & Marillonnet, S. (2011). A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. *PLOS ONE*, 6(2), e16765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016765>
- Wu, Z., Chen, L., Yu, Q., Zhou, W., Gou, X., Li, J., & Hou, S. (2019). Multiple transcriptional factors control stomata development in rice. *The New Phytologist*, 223(1), 220–232. <https://doi.org/10.1111/nph.15766>
- Yan, L., Cheng, X., Jia, R., Qin, Q., Guan, L., Du, H., & Hou, S. (2014). New phenotypic characteristics of three tmm alleles in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 33(5), 719–731. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1571-1>
- Yang, M., & Sack, F. D. (1995). The too many mouths and four lips mutations affect stomatal production in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 7(12), 2227–2239. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.12.2227>
- Yaschenko, A. E., Alonso, J. M., & Stepanova, A. N. (2025). *Arabidopsis* as a model for translational research. *The Plant Cell*, 37(5), koae065. <https://doi.org/10.1093/plcell/koae065>
- Zhou, Y., Zhang, T., Wang, X., Wu, W., Xing, J., Li, Z., Qiao, X., Zhang, C., Wang, X., Wang, G., Li, W., Bai, S., Li, Z., Suo, Y., Wang, J., Niu, Y., Zhang, J., Lan, C., Hu, Z., ... Song, C.-P. (2023). A maize epimerase modulates cell wall synthesis and glycosylation during stomatal morphogenesis. *Nature Communications*, 14(1), 4384. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40013-6>

Kasutatud veebiaadressid

<https://www.addgene.org/> (vaadatud 22.05.2026)

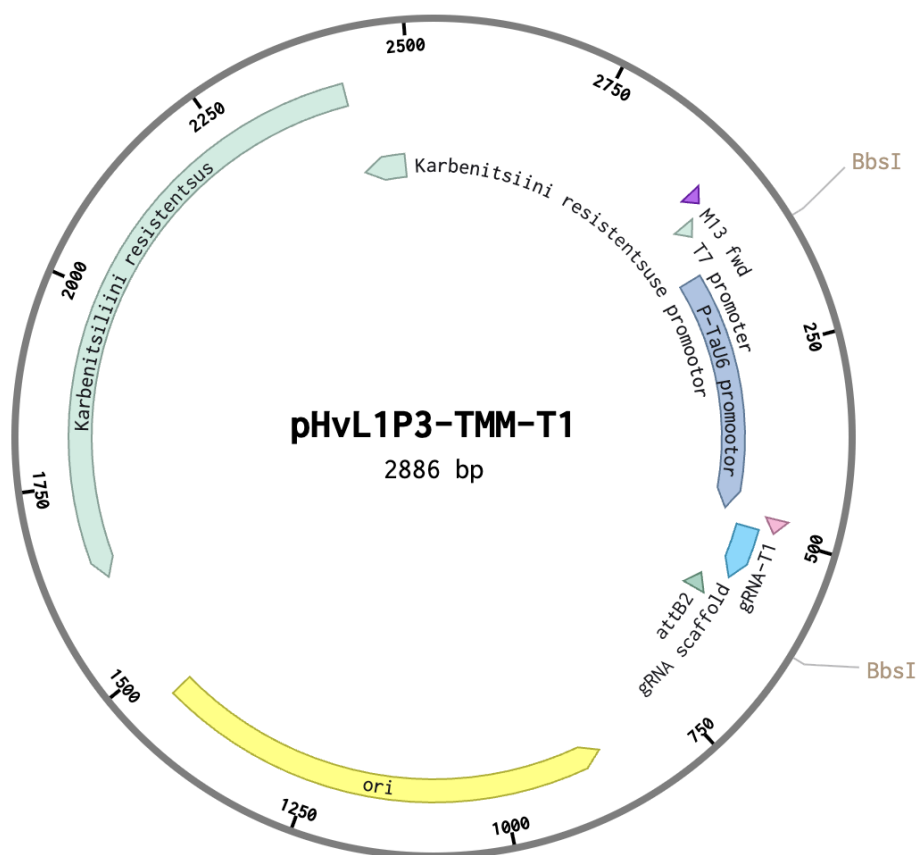
<https://crispor.gi.ucsc.edu/> (vaadatud 22.05.2026)

<https://www.benchling.com/> (vaadatud 22.05.2026)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> (vaadatud 22.05.2026)

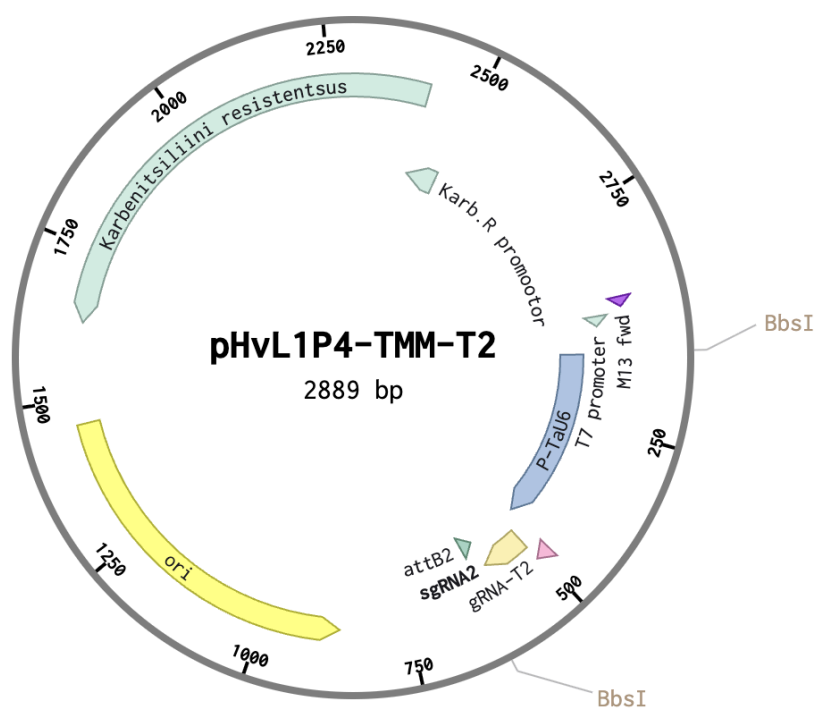
Lisad

Lisa 1. pHvL1P3-TMM-T1



Joonis 20. Odra transformeerimiseks loodud plasmiid pHvL1P3-TMM-T1. Sisestatud gRNA-T1 märgitud roosaga. *BbsI* = *BpiI*

Lisa 2. pHvL1P4-TMM-T2



Joonis 21. Odra transformeerimiseks loodud plasmiid pHvL1P4-TMM-T2.

Lisa 3. Praimerite tabel

Tabel 8. Kõik kasutatud praimerite nimed ja järjestused.

Praimeri nimi	Päripidi (F) Äraspidi (R)	Praimeri järjestus 5'-3'
TMM_Cas9-T1-F (EL1)	F	5' CTTGGCGACGACCAACGTCAGCG 3'
TMM_Cas9-T1-R (EL2)	R	3' CGCTGCTGGTTGCAGTCGCCAAA 5'
(EL5) TMM_Cas9-T2-F	F	5' CAGACTTGTGCCGGGCGAGTTCACGGGTTT 3'
(EL6) TMM_Cas9-T2-R	R	3' GAACACGGCCCCGCTCAAGTGCCCAAAATCT 5'
EL15	F	5'-CCACCTCTTTCCCTCCATTT 3'
EL16	R	5'-GTG AAGCAGCGGTAGAAGAA 3'
EL18	R	5' -AGGTCGAGCAGTATGAGGT 3'
EL19	F	5' CCCATCCCGTGACCAACATT 3'
LT2	R	5' AGCGAGTCAGTGAGCGAG 3'
LT18	F	5' TAGGAGGGAATCGAACTAGGAATATTG 3'
LT-29-F	F	5' CTATCCCGCAAGACCCTTC 3'
LT-30-R	R	5' TTTGTAGAAACCATCGGGGC 3'
Mol9 (MLO)	F	5'-CGCCAGCAAACCAGACACAC-3'
LT15 (MLO)	R	5' TAGGTGACATGGAAGACCGC 3'
LT32 (Cas9)	R	5' CCGGCTTTATCCAACCTCAGAC 3'
LT77 (Cas9)	F	5' CCACGAGCACATCGCTAATC 3'
LT103 (HptII-Fw) (Hygr)	F	5' GGATTTCGGCTCCAACAATG 3'
Hyg_RT_R2 (Hygr)	R	5' GGATTTCGGCTCCAACAATG 3'
Hv_D53_RT_F3 (D53)	F	5' GCTGCTCTCATCCCTCAGG 3'
KN9 (D53)	R	5' CGGATATTACCAGGTCAAGCA 3'
SnaBI-AtTMM-for	F	5' ATGTACGTAATGGCACGATATGAATTCTTCC 3'
BamHI-AtTMM-rev	R	5'ATGGGATCCCTAACTAGATATTAGCATAAAAATGAAA 3'

PstI-TMMprom-for	F	5' ATGCTGCAGGAAGATTTGTATTTGGGTGATAGTC 3'
SnaBI-TMMprom-rev	R	5'ATGTACGTATTCTTAGTTGTTGTTGTTGTGTGAAT 3'
SnaBI-HvTMM-for	F	5' ATGTACGTAATGGCTTCGGCGCTGCT 3'
BamHI-HvTMM-rev	R	5' ATGGGATCCCTACAACAATGCAAGCTGCAAACACA 3'
SnaBI-HvTMM-for1	F	5' ATGTACGTAATGGCTTCGGCGCTGCTGTCC 3'
BamHI-HvTMM-rev1	R	5'ATGGGATCCCTACAACAATGCAAGCTGCAAACACACCAAAA CC 3'
SnaBI-HvTMM-for2	F	5' ATGTACGTAATGGCTTCGGCGCTGCTG 3'
BamHI-HvTMM-rev2	R	5'ATGGGATCCCTACAACAATGCAAGCTGCAAACACACCA 3'
BamHI-HvTMM-rev3	R	5' ATGGGATCCCTACAACAATGCAAGCTGCAAACAC 3'
pCAM1390-seq-rev-2	R	5' GGAAATTCGAGCTGGTCACCTG 3'
pCAMBIA-1390-seq-for-1	F	5' CGTGCTCCACCATGTTGGGC 3'
pTMM1-seq-for	F	5' GACAATTTCGAACCTAAACCGC 3'

Lisa 4. Geelelektroforeesi protokoll

PCR produkte kontrolliti 1% agarosgeelil (0,25 g agaros + 25 ml 0,5x TAE buffer (TAE 1x koostis: 40 mM Tris, 20 mM äädikhape, 1 mM EDTA) + 20 µl (1 tilk) etiidiumbromiidi (EtBr, säilelahus 0,5 mg/ml, ühes tilgas 20 µl, lõppkonts. ~0,4 µg/ml). Kasutati järgnevat meetodit: agaros kaalutakse kaalumispaberil ja pannakse klaasist kolbi. Lisatakse mõõdetud kogus TAE puhvrit, ning pannakse mikrolaineahju maksimaalsel tugevusel soojenema. Kui segu on keema läinud ja kontrollitud, et lahuses ei ole tükke ja agar on täielikult lahustunud, siis segu jahutatakse voolava külma vee all. Kui lahus on kolbi käega katsudes talutavalt kuum, siis on segu piisavalt jahtunud, et lisada EtBr. Segu keerutada kolbis, et EtBr seguneks lahusesse, ning siis valada segu õigesse vormi, kuhu on geelihambad juba sisestatud. Mullid pipeti otsikuga eemaldada ja lasta segul taheneda vähemalt 10 min.

Geelile lisada esimesse auku 1 kb või 100 bp DNA suurusmarkerit (GeneRuler, Thermo Scientific™).

Proovid laetakse geelile vastavalt eesmärgile: kas,

1. Tulemuste visualiseerimiseks:
5 µl PCR segu ja 2 µl 6x laadimisvärvi (lõppkonts. 1,7 x), või
2. PCR produkti geelist välja lõikamiseks:
20 µl proovi ja 3,3 µl 6x laadimisvärvi (lõppkonts. 0,85 x)

Agarosgeelil lastakse joosta elektrofooresivannis pingega 100 V 15 min (0,67 V/cm²).

Tulemus visualiseeritakse UV valgusplaadil ehk geeli dokumenteerimise süsteemiga (BioRad, GelDoc™ Go).

Lisa 5. Koloonia PCR-i tsükleri (Mastercycler, nexus GX2) programm

PCR programm algas esmase denatureerimisega temperatuuril 95°C 3 min. Sellele järgnes 35 tsükli, mis koosnesid denatureerimisest temperatuuril 95°C 30 sekundit, praimerite seondumisest temperatuuril 59,7°C 30 s ning pikendamisest temperatuuril 72°C 30 s. Reaktsioon lõpetati lõpliku pikendamisega temperatuuril 72°C 5 min ning seejärel hoiti proove temperatuuril 12°C kuni programmi lõpetamiseni.

Lisa 6. CI sööde (*Callus induction*)

Koostis kontsentratsioonides:

4,3 g/L “Murashige and Skoog” taimede soolade alus (Duchefa M0221), 30 g/L maltoos, 1,0 g/L kaseiini hüdrolüsaat, 10 mL/L CI vitamiinilahus, 2,5 mg/L Dicamba, 3,5 g/L agar. Söötme pH reguleeritakse väärtuseni 5,8 NaOH abil.

Lisa 7. CI selektiivsööde (*Callus induction*)

Koostis kontsentratsioonides:

4,3 g/L “Murashige and Skoog” taimede soolade alus (Duchefa M0221), 30 g/L maltoos, 1,0 g/L kaseiini hüdrolüsaat, 10 mL/L CI vitamiinilahus, 2,5 mg/L Dicamba, 3,5 g/L Phytigel (agar), 1,25 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5,0 μM), antibiootikumi tikartsilliin 160 $\mu\text{g/ml}$ ja hügromütsiin 50 $\mu\text{g/ml}$. Söötme pH reguleeritakse väärtuseni 5,8 NaOH abil.

Lisa 8. R sööde

Regeneratsiooni söötme koostis:

2,7 g/L K4 macro (Murashige and Skoog makroelemendid), 50 mg/L K-micro, 50 mg/L B5 vitamiinid, 37,5 µM NaFeEDTA, 0,5 mg/L 6-bensüülaminopuriin (BAP), 0,125 mM L-glutamiin, 20 g/L maltoos, 2,5 µM CuSO₄·5H₂O, 3,5 g/L Phytigel. Söötme pH reguleeritakse väärtuseni 5,8.

Lisa 9. Kallusest arenenud odra regenerant.



Joonis 22. Kallusest arenenud odra regenerant vahetult enne viieks taimeks eraldamist ja mulda istutamist.

Lisa 10. DNA eralduse CTAB

(tsetüül-trimetüül-ammooniumbromiid) protokoll

Taimeproovid korjati sügavatesse pisikatsutitesse (DeepWell) ja asetati sinna juurde igasse topsti 2 väikest 2-3 mm suurust metallkuulikest. Seejärel purustati taimeproovid QIAGEN TissueLyser II masinas 21/s 1 min. Seejärel tsentrifuugiti proovid suures tsentrifuugis (Hettich, ROTANTA 460 | R) 3756 g 2 min 10°C. Peale tsentrifuugimist lisati 500 µl CTAB puhvrit (Koostis lõppkonsentratsioonides: 100 mM Tris, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 1,4 M NaCl, 2% PVP, 1% Na₂SO₃) ja proove segati nipsutades ning siis inkubeeriti proove kuumakapis 60°C juures 30 min.

Peale inkubeerimist tsentrifuugiti proove 3000 g 15 min 10°C. Seejärel pipeteeriti uude tuubi 300-350 µl saadud supernatanti ning lisati võrdses koguses isopropanooli ja raputati. Proove inkubeeriti -20°C 15 kuni 20 min.

Proove tsentrifuugiti 7800 g 30 min temperatuuril 20°C. Supernatant valati ettevaatlikult välja ning koputati pisikatsuteid vastu puhast kätepaberit. Siis pesti sade sama koguse 70% etanooliga nagu eelnevalt isopropanooli puhul ja suspendeeriti.

Proove tsentrifuugiti uuesti 7800 g 20 min 10°C. Seejärel supernatant eemaldati.

Sade kuivatati fööniga 10 min ja lasti veel toatemperatuuril natuke kuivada. Sade lahustati 50 µl steriilses vees.

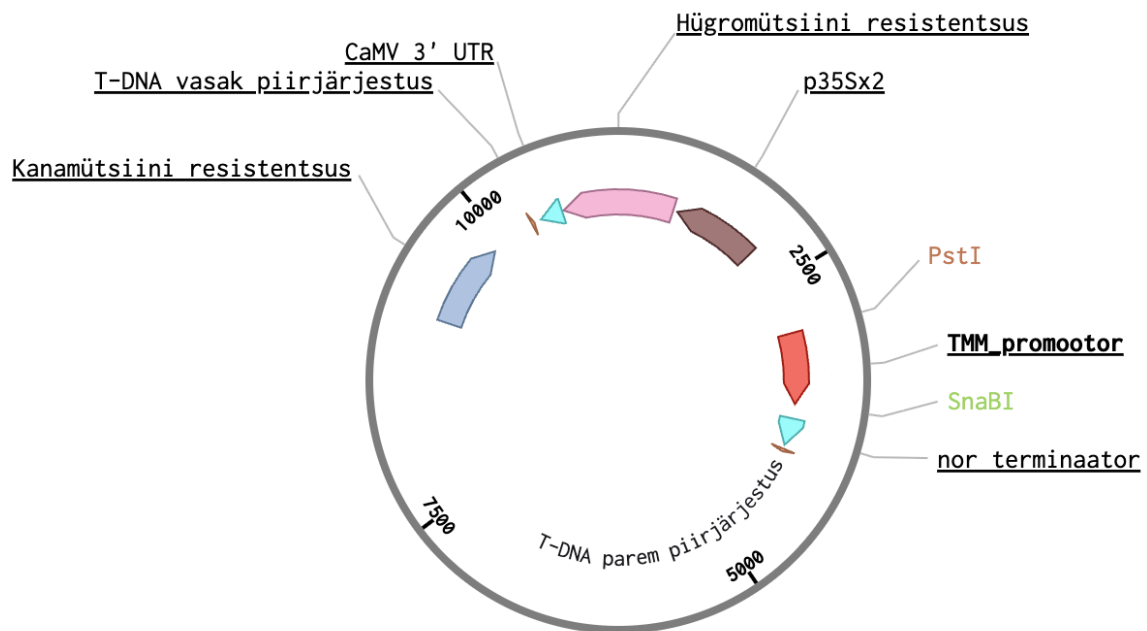
Lisa 11. Transgeenitesti (MLO+Cas9) protokoll

Cas9 praimerid LT32 ja LT77 (Lisa 3) ja MLO praimerid Mol9 ja LT15 (Lisa 3).

PCR reaktsioonisegu: Segu lõppmaht 15 μ l. Reaktsioon sisaldas 10 $\times$ Green puhvrit 1,5 μ l (lõppkonts. 1x), 10 mM dNTP segu 0,3 μ l (lõppkonts. 0,2 mM), 10 μ M päripidi-praimerit 0,3 μ l (lõppkonts. 0,2 μ M), 10 μ M äraspidi-praimerit 0,3 μ l (lõppkonts. 0,2 μ M), teist 10 μ M päripidi-praimerit 0,3 μ l (lõppkonts. 0,2 μ M) ning teist 10 μ M äraspidi-praimerit 0,3 μ l (lõppkonts. 0,2 μ M). Reaktsioonisegule lisati 0,15 μ l DreamTaq (5 U/ μ l) HOT Start DNA polümeraasi (lõppkonts. 0,05 U/ μ l), 10,85 μ l MQ vett ning 1 μ l odra genoomset DNA-d (lõppkogus $\sim$ 50 ng). Segu lõppmaht 15 μ l.

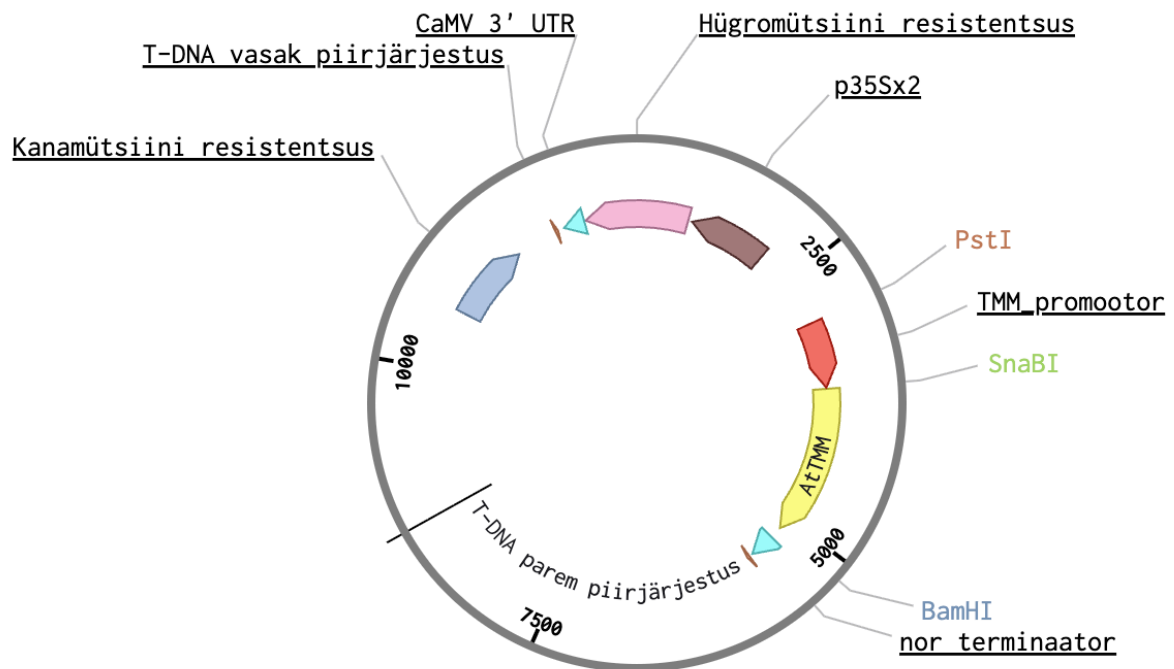
PCR programm algas esmase denatureerimisega temperatuuril 95 °C 3 minutit. Sellele järgnes 32 tsüklit, mis koosnesid denatureerimisest 95 °C kestusega 30 sekundit, praimerite seondumisest temperatuuril 58 °C kestusega 30 sekundit ning pikendamisest 72 °C juures 50 sekundit. Reaktsioon lõpetati viimase pikendamisega temperatuuril 72 °C 5 minutit ning seejärel hoiti proove temperatuuril 12 °C kuni programmi lõpetamiseni.

Lisa 12. TMMprom_pCAMBIA1390-V2



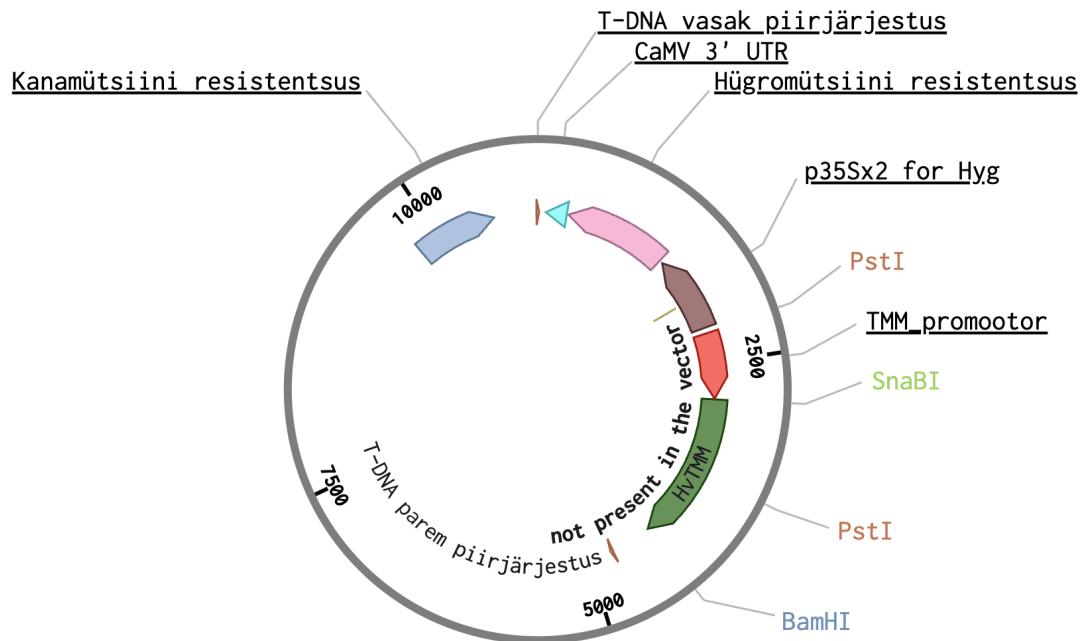
Joonis 23. Plasmiid sisestatud *TMM* promootoriga. Joonisel näha sisestatud *TMM* promootori järjestus (punane) ja vajalikud ensüümide äratundmisjärjestused *PstI* (pruun) ja *SnaBI* (roheline).

Lisa 13.TMMprom_AtTMM_pCAMBIA1390-V2



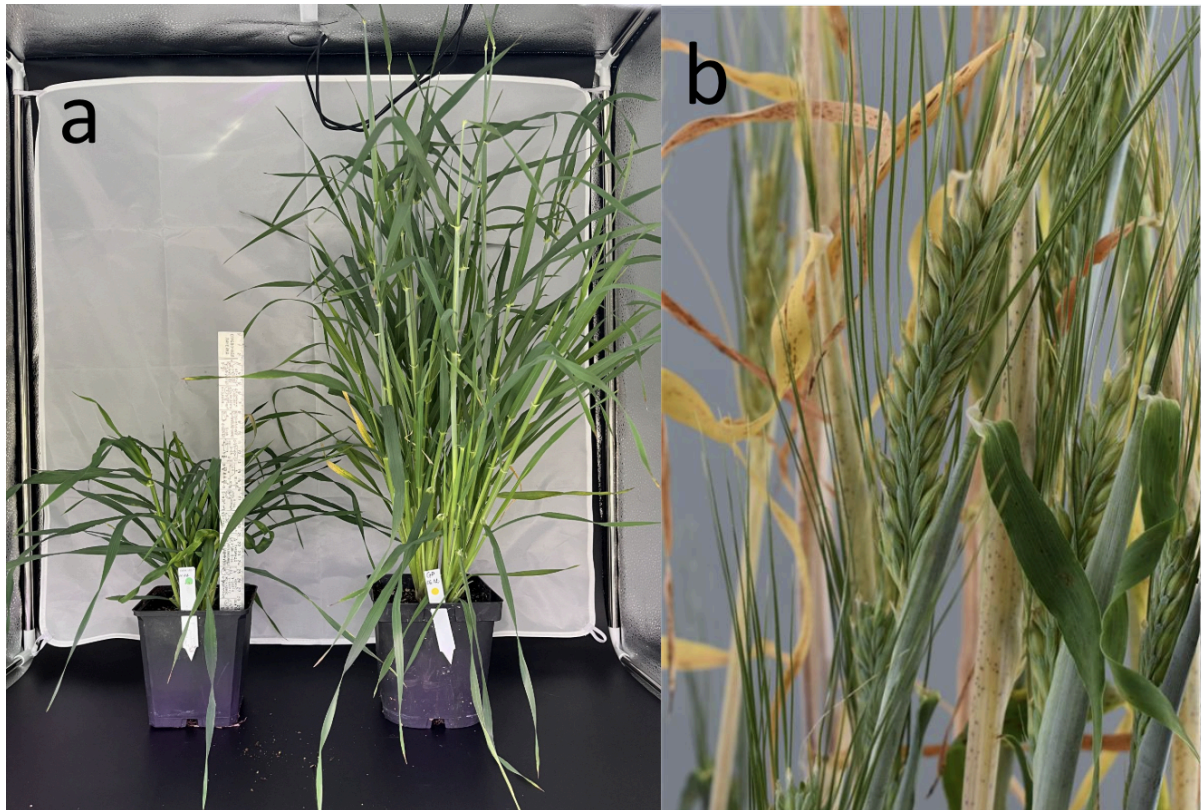
Joonis 24. Plasmiid sisestatud *TMM* promootoriga ja *AtTMM* geeniga.

Lisa 14. TMMprom_HvTMM_pCAMBIA1390-V2



Joonis 25. Plasmiid sisestatud *HvTMM* (odra *TMM*) järjestusega ja hariliku müürlooga *TMM* promootoriga.

Lisa 15. T1 põlvkonna odrad



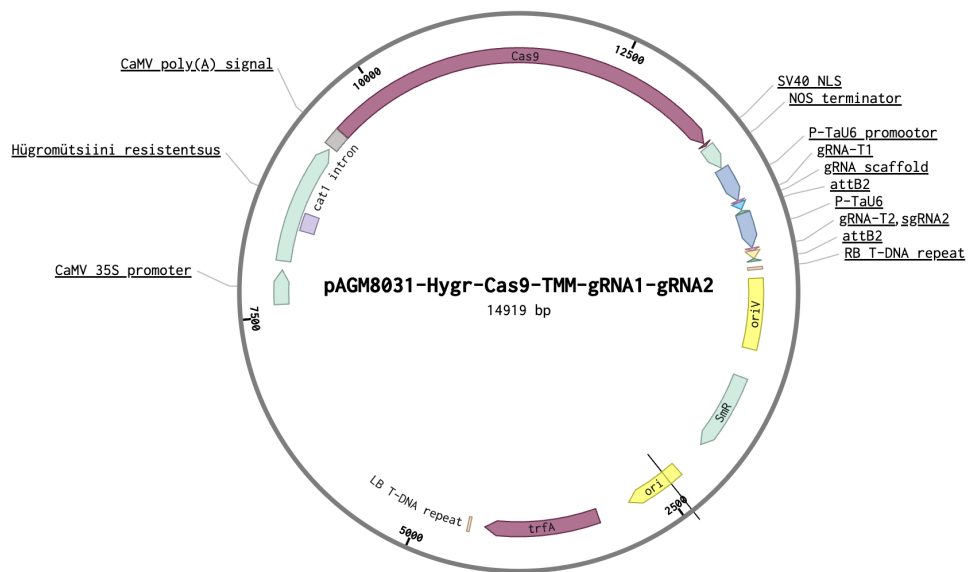
Joonis 26. (a) T1 põlvkonna transformeeritud taim 182-7 (vasakul) võrdluses 5 päeva noorema metsiktüüpi taimega (Golden Promise). Näha suurt kasvuerinevust, transformeeritud taim on palju väiksem ja krussis laiemate lehtedega. (b) T1 põlvkonna transformeeritud taime viljapea. Viljapeal on ebatavaline fenotüüp võrreldes teiste taimedega (Foto b. autor Liina Raudva).

Lisa 16. TMM regiooni spetsiifiline PCR

Reaktsioonisegu: 5x Phusion GC puhvrit 5 µl (lõppkonts. 1x), 10 mM dNTP segu 0,5 µl (lõppkonts. 0,2 mM), (10 µM) päripidi-praimerit EL15 või EL19 1,25 µl (lõppkonts. 0,5 µM) ning (10 µM) äraspidi-praimerit EL16 või EL18 1,25 µl (lõppkonts. 0,5 µM). Reaktsioonisegule lisati 0,75 µl 100% DMSO-d (lõppkonts. 3%), 0,25 µl (2 U/µl) Phusion DNA polümeraasi (lõppkonts. 0,02 U/µl), 15 µl MQ vett ning 1 µl DNA-d (~28 ng/µl). PCR reaktsiooni lõppmaht oli 25 µl. Oodatava PCR-produkti suurus oli 977 bp.

PCR programm algas esmase denatureerimisega temperatuuril 98 °C 30 sekundit. Sellele järgnes 32 tsüklit, mis koosnesid denatureerimisest temperatuuril 98 °C 15 sekundit, praimerite seondumisest temperatuuril 66 °C 30 sekundit ning produkti pikendamisest temperatuuril 72 °C 30 sekundit. Reaktsioon lõpetati viimase pikendamisega temperatuuril 72 °C 10 minutit. Seejärel hoiti proove temperatuuril 10°C programmi lõpetamiseni.

Lisa 17. Lõppvektor



Joonis 27. Odra transformeerimiseks loodud lõppvektor plasmiid pAGM8031-Hygr-Cas9-TMM-gRNA1-gRNA2.

Lisa 18. Transgeenitest D53+Hygr

Ühe proovi kohta kokku 15 µl. Segu: 10x Green buffer 1,5 µl (lõppkonts. 1x)

dNTP (10 mM) 0,3 µl (lõppkonts. 0,2) Primer F Hv_D53_RT_F3 (10 µM) 0,3 µl (lõppkonts. 0,2 µM), Primer R KN9 (10 µM) 0,3 µl (lõppkonts. 0,2 µM), Primer F LT103 (10 µM) 0,3 µl (lõppkonts. 0,2 µM), Primer R Hyg_RT_R2 (10 µM) 0,3 µl (lõppkonts. 0,2 µM), DreamTaq HOT Start polümeraas 0,15 µl (lõppkonts. 0,05 U/µl), vesi 10,85 µl, DNA 1 µl (lõppkonts. ~3,3 ng/µl).

PCR programm algas esmase denatureerimisega temperatuuril 95 °C 3 minutit. Sellele järgnes 5 tsüklit, mis koosnesid denatureerimisest temperatuuril 95 °C 30 s, praimerite seondumisest temperatuuril 65 °C 30 s ning pikendamisest temperatuuril 72°C 30 s. Seejärel viidi läbi 30 x korduv tsükel, mis koosnes denatureerimisest temperatuuril 95 °C 30 s, praimerite seondumisest temperatuuril 57 °C 30 s ning produkti pikendamisest temperatuuril 72 °C 50 s. Reaktsioon lõpetati viimase produkti pikendamisega temperatuuril 72 °C 5 minutit ning seejärel hoiti proove temperatuuril 10 °C kuni programmi peatamiseni.

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Eliisabeth Laul,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose
Geeni *TMM* roll lehe õhulõhede paigutuse kujunemises harilikus müürloogas (*Arabidopsis thaliana*) ja odras (*Hordeum vulgare*)

mille juhendajad on Hanna Hõrak, Ljudmilla Timofejeva, Kristiina Laanemets

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks
Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i
litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida,
levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost
ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega
isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Eliisabeth Laul

22.05.2026