

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
Tehnoloogiainstituut

Andres Pallon

***Arabidopsis thaliana* CRK kinaaside roll õhulõhede  
regulatsioonis**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad: Dr. Ebe Merilo

Dr. Hannes Kollist

Kaitsmisele lubatud .....

Juhendaja .....

*allkiri, kuupäev*

Tartu 2014

## Sisukord

1	Sissejuhatus .....	3
1.1	Õhulõhed.....	4
1.2	Abstiishape.....	5
1.3	Õhulõhede reageerimine pimedusele, kõrgele CO <sub>2</sub> -le ja O <sub>3</sub> -le .....	7
1.4	RLK ja CRK .....	9
1.5	Magistritöö eesmärk ja hüpoteesid .....	12
2	Metoodika.....	13
2.1	Taimed.....	13
2.2	Gaasivahetussüsteem.....	14
2.3	Mõõtmised .....	14
2.4	Andmetöötlus .....	15
3	Tulemused .....	17
3.1	Absoluutne õhulõhede juhtivus.....	17
3.2	CO <sub>2</sub> katsed .....	18
3.3	Pimeduskatsed.....	19
3.4	O <sub>3</sub> katsed .....	20
4	Arutelu .....	24
5	Kokkuvõte .....	29
6	Tänuavaldused .....	31
7	Summary.....	32
8	Kasutatud kirjanduse loetelu.....	34
	Lisad.....	41

# 1 Sissejuhatus

Maailma magevee varud on vähenemas ja seetõttu tuleb leida võimalusi nende säästlikumaks kasutamiseks. Kuivemates piirkondades piirab juba praegu veepuudus oluliste toidutaimede tootmist ja kliimamuutuste stsenaariumid ennustavad neil aladel põuaperioodide sagedamist ja pikenedamist. Probleem on saamas aktuaalseks ka Euroopas, kus kliimaga seotud riskide tõttu suureneb oht, et saagikus langeb (Trnka 2011). On ennustatud, et järgneva 50 aasta jooksul tõuseb maailma rahvaarv üle 9 miljardi inimese, mistõttu toidu ja vee tarbimine kasvab. Nii suure rahvaarvu toitmiseks on vaja tõsta toidutootmist praegusega võrreldes 70% (Brutnell & Frommer 2012). See omakorda tähendab nii suurenevat põllukultuuride kui ka vee tarbimist. Hinnanguliselt kulub ühe inimese päevase toidunormi tootmiseks ligi 3000 liitrit puhast vett (Comprehensive Assessment of Water Management in Agriculture 2007). Probleeme tekitab ka üha kasvav lihanõudlus – ühe kilogrammi liha tootmiseks kulub ligikaudu 3500 liitrit värsket vett ja 10–20 kg teravilja (Brutnell & Frommer 2012). Seetõttu on taimeteaduse üks peamisi eesmärke tõsta põllumajanduse produktiivsust, tootes taimi, mis on suurema vee kasutamise efektiivsusega (WUE – ingl. k Water-Use Efficiency) ning mis vajavad vähem väetamist (Foley jt 2011).

Vee kasutamise efektiivsus (WUE) viitab vee kogusele, mis kulub biomassi tootmiseks või fotosünteesi käigus  $\text{CO}_2$  sidumiseks. Fotosünteesil põhinev vee kasutamise efektiivsus on fotosünteesi käigus saadud süsiniku ning transpiratsiooniga kaotatud vee suhe. Kuna võimalused tõsta fotosünteesi intensiivsust on limiteeritud, siis on sisuliselt ainus võimalus WUE tõstmiseks vähendada õhulõhede kaudu kaotatud vee hulka ehk transpiratsiooni (Lambers jt 1998). Taimedes on transpireeritud vee hulk alati kordades suurem kui seotud  $\text{CO}_2$  hulk. See on tingitud sellest, et veemolekuli difusioonirada on lühem ja taime-atmosfääri vaheline kontsentratsiooni gradient, mis soodustab vee aurumist taimest, on kõrgem kui gradient, mis soodustab  $\text{CO}_2$  sissevõtmist (Fitter & Hay 2002). Carlson (1980) arvutas, et looduslikes tingimustes kulutab taimeleht minimaalselt 109 veemolekuli ühe  $\text{CO}_2$  molekuli assimileerimiseks. Reaalsuses võib see arv olla veelgi kõrgem.

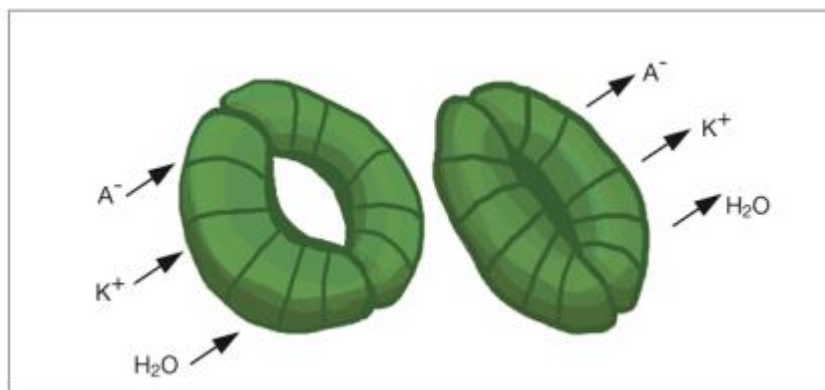
Vesi on taimedele hädavajalik, omades keskset rolli taime kasvul ja fotosünteesil. Vee ja toitainete transport taimes saab alguse juurtest, kust vesi mööda juure ja varre ksüleemitorusid kõrgematesse taimeosadesse juhatakse. Selline gravitatsiooni eiramine on võimalik tänu alarõhule, mis tekib evapotranspiratsioonil taimelehe ja atmosfääri vahel. Selleks, et saaks toimuda vee liikumine mullast juurtesse, peab mulla veepotentsiaal olema kõrgem kui juurte rakkudes. See juhtub tõenäolisemalt just märjemates pinnastes, kus mulla veepotentsiaal on kõrge (Jones jt 2013). Taimede veevajadus võib olla väga suur, näiteks 1 hektari nisu kasvatamiseks kulub 60 tonni vett päevas. Kõigest 5% pinnasest saadud veest kasutatakse taimekasvuks ja ligi 90% saadud veest väljub läbi õhulõhede (Fitter & Hay 2002).

## 1.1 Õhulõhed

Enamik taime maapealseid osasid on kaetud epidermisega, mille välimine kiht on omakorda kaetud kutiikula, vahakihi ja trihoomide ehk karvadega. Vett mitteläbilaskev kutiikula takistab veekadu läbi lehepinna. Seetõttu toimub enamus taimelehe ja atmosfääri vahelisest gaasivahetusest epidermises paiknevate õhulõhede kaudu (Jones jt 2013). Õhulõhed on mikroskoopilised avad taimelehtede ja varte epidermis. Nende kaudu pääseb taime süsihappegaas, mis on taime eluks tähtis toitaine, ja väljub hapnik, mis on vajalik aeroobsete organismide eluks. Antud protsessi tunneme fotosünteesina. Õhulõhed asetsevad lehe pinnal korrapäratult ning iga pilu on ümbritsetud paarikaupa asetsevate oa- või hantlikujuliste sulgrakkudega (Hetherington & Woodward 2003). Viimaste omapäraks on asümmeetriline ehitus: sulgrakkude kokkupuutuvad seinad on paksud ning vee sisseimamisel tekib nende vahele ovaalne õhulõhe. Sulgrakkude funktsioon on reguleerida õhulõhede avatust ning seeläbi kaitsta taime, eelkõige liigse veekao, kuid ka saasteainete ja patogeenide sissepääsu eest (Kollist jt 2010). Õhulõhed osalevad ka taime üldises termoregulatsioonis, kuna transpiratsioon jahutab lehte (Jones jt 2013).

Õhulõhede avanemine/sulgumine on reguleeritud sulgrakkude rakusisese osmootse rõhu ehk turgori muutumise kaudu. Turgor kasvab, kui ionide, peamiselt  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $NO_3^-$  ja

malaadi kontsentratsioon sulgrakus tõuseb, alandades ka rakusisest veepotentsiaali. Vee liikumine toimub difusiooni seadusi järgides; seega liigub vesi kõrgema potentsiaaliga piirkonnast madalama potentsiaaliga piirkonda. Ioonide ning teiste ainete kiireks transportimiseks läbi sulgraku membraanide on selles keeruline raku energiavarustusest ning biofüüsikalistest ja –keemilistest näitajatest sõltuv pumpade ja kanalite süsteem. Sulgrakkude välismembraanis asuvad sensorvalgud fikseerivad tingimuste halvenemise, käivituvad vastavad signaalrajad ning ioonkanalid avanevad, viies ioonid sulgrakkudest välja. Sellega kaasneb sulgraku turgorrõhu langus, vee väljavool ning õhulõhede sulgumine. Rakendades taimetele madalat süsihappegaasi või tõstes valguse intensiivsust, toimub vastupidine protsess, kus ioonid ja vesi liiguvad sulgrakkudesse, sulgrakud paisuvad ja õhulõhed avanevad (Schroeder jt 2001, Kollist jt 2010 ja 2011). Õhulõhed sulguvad õhuniiskuse langemisel, CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni tõusmisel ja pimeduses (Merilo jt 2013). Samuti reageerivad õhulõhed osoonile, mille kontsentratsioon on troposfääris viimase paarisaja aasta jooksul kasvanud kordades ja selle negatiivne mõju põllumajanduse saagikusele on suur (Ashmore jt 2005).



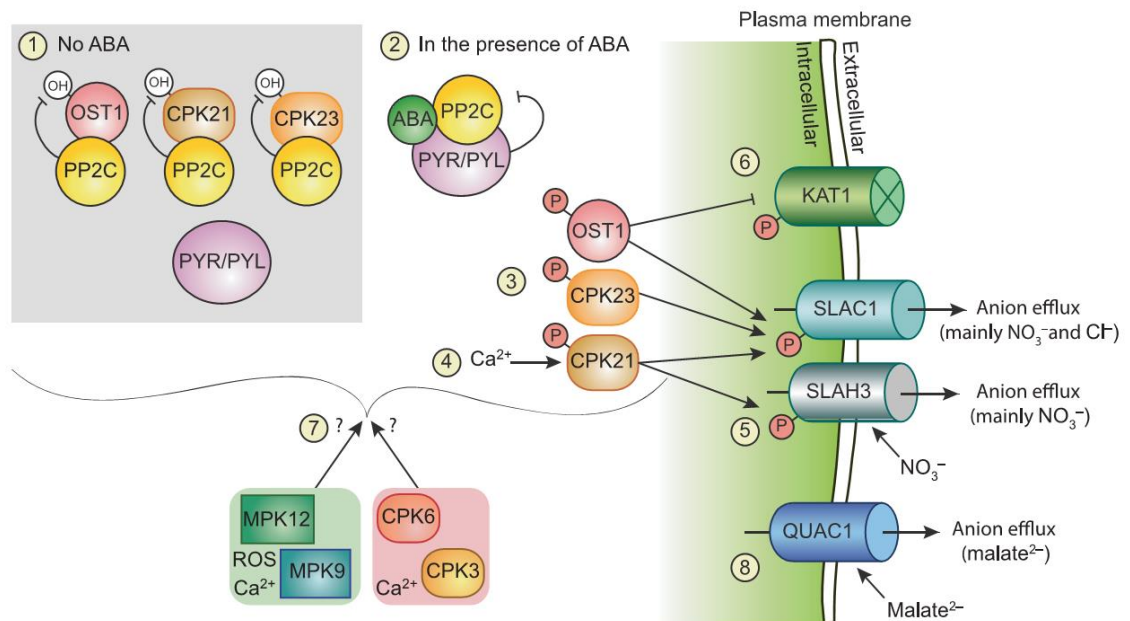
**Joonis 1.** Avatud (vasakul) ja suletud (paremal) õhulõhe. Nooled näitavad anioonide (A<sup>-</sup>), katioonide (K<sup>+</sup>) ja vee (H<sub>2</sub>O) liikumissuunda sulgrakkude paisumisel ja kokkutõmbumisel. Allikas: Kollist jt (2010).

## 1.2 Abstiisihape

Pidevalt muutuvates keskkonnatingimustes ellujäämiseks on taimede täpne õhulõhede regulatsioon hädavajalik (Moldau jt 2011). Nagu öeldud, sulgrakkude paisumine ja kokkutõmbumine toimub läbi osmooselt aktiivsete ioonide sisse- ja väljavoolu. Ioonide

voogu kontrollib ioonkanalite ja transporterite aktiveerimine/inaktiveerimine (Kollist jt 2011). Lisaks ioonkanalitele kaasatakse õhulõhede sulgumisse erinevaid proteiinkinaase, -fosfataase ja retseptoreid. Õhulõhede sulgumise juures mängib olulist rolli abstsiiishappe (ABA) retseptorkompleks. ABA on taimehormoon, mille rolliks on reguleerida taime kasvu ja reageerimist abiootilisele stressile, näiteks põuale (Cutler jt 2010). ABA retseptorkompleks moodustub sulgrakkude tsütoplasmas PYR/PYL/RCAR (Pyrabactin Resistance/PYR1-Like/Regulatory Component of ABA Receptor) retseptorite ja tüüp 2C fosfataaside (PP2C) vahel, kui ABA kontsentratsioon tõuseb (Joonis 2). ABA retseptoritega seondumine inhibeerib PP2C-d ning kinaas OPEN STOMATA 1 (OST1) ja  $\text{Ca}^{2+}$ -sõltuvad kinaasid (CPK-d) aktiveeruvad (Ma jt 2009, Park jt 2009, Kollist jt 2011, Merilo jt 2013).

OST1 (tuntud ka kui SnRK2) on proteiinkinaas, mis aktiveerib nii aeglast kui ka kiiret tüüpi anioonkanaleid. OST1-poolse fosforüleerimise järel SLOW ANION CHANNEL 1 (SLAC1) kanal aktiveerub, tuues kaasa anioonide väljavoolu sulgrakust ja õhulõhe sulgub (Vahisalu jt 2010, Kollist jt 2011). SLAC1 on valk, mis asub sulgraku plasmamembraanis ning funktsioneerib aeglast tüüpi anioonkanalina (Vahisalu jt 2010). ABA puudumisel PP2C-d talitavad negatiivsete regulaatoritena ja inhibeerivad SLAC1 aktiveerimist OST1 ja CPK-de poolt (Geiger jt 2009, 2010; Kollist jt 2011). ABA retseptorkompleks, mis koosneb seega ABA retseptoritest, PP2C-dest, OST1-st ja SLAC1-st, mängib olulist rolli osooni ( $\text{O}_3$ ), madala õhuniiskuse ja pimeduse poolt esilekutsutud õhulõhede sulgumisel ning osaleb ka kõrge  $\text{CO}_2$  poolt esilekutsutud sulgumises (Merilo jt 2013).



**Joonis 2.** Sulgrakkude ionkanalite regulatsioon ABA retseptorkompleksi poolt. (1) ABA puudumisel (hall kast) defosforüleeritakse OST1, CPK21 ja CPK23 PP2C-de poolt. (2) ABA juuresolekul haaratakse PP2C-d ABA ja tema retseptorite (PYR/PYL) kompleksi, millega kaasneb PP2C-de inaktivatsioon. (3) Selle tagajärjel aktiveeruvad kinaasid, mis fosforüleerivad SLAC1 ja anioonid väljuvad sulgrakkudest. (6) Kaaliumi sissevoolukanal KAT1 fosforüleeritakse samuti OST1 poolt, kuid erinevalt SLAC1-st KAT1 inaktiveerub OST1-ga fosforüleerumisel. Allikas: Kollist jt (2011).

### 1.3 Õhulõhede reageerimine pimedusele, kõrgele CO<sub>2</sub>-le ja O<sub>3</sub>-le

Käesolevas magistritöös uuriti õhulõhede reaktsioone pimedusele, kõrgele CO<sub>2</sub> kontsentratsioonile ja osoonile. Seetõttu on asjakohane lühike kokkuvõtte nimetatud keskkonnafaktorite poolt käivitatud protsessidest õhulõhede sulgrakkudes, mis lõpuks viivad õhulõhede sulgumisele.

Pimeduse toimel käivituv õhulõhede sulgumine teostub kahte signaalrada pidi. Esimene signaalrada toimub fototropiinide ja plasmamembraani H<sup>+</sup>-ATPaasi vahendusel. Fototropiinid on sinise valguse retseptorid – valgustundlikud seriini/treoniini kinaasid, mis sinise valguse toimel autofosforüleeruvad (Shimazaki jt 2007). Katsed on näidanud, et sinise valguse signaalraja lõpus aktiveerub plasmamembraanis H<sup>+</sup>-ATPaas, käivitub prootonite pumpamine tsütosoolist apoplasti ning plasmamembraan hüperpolariseerub. Selle tagajärjel avanevad katioone läbilaskvad kanalid, toimub katioonide sissevool

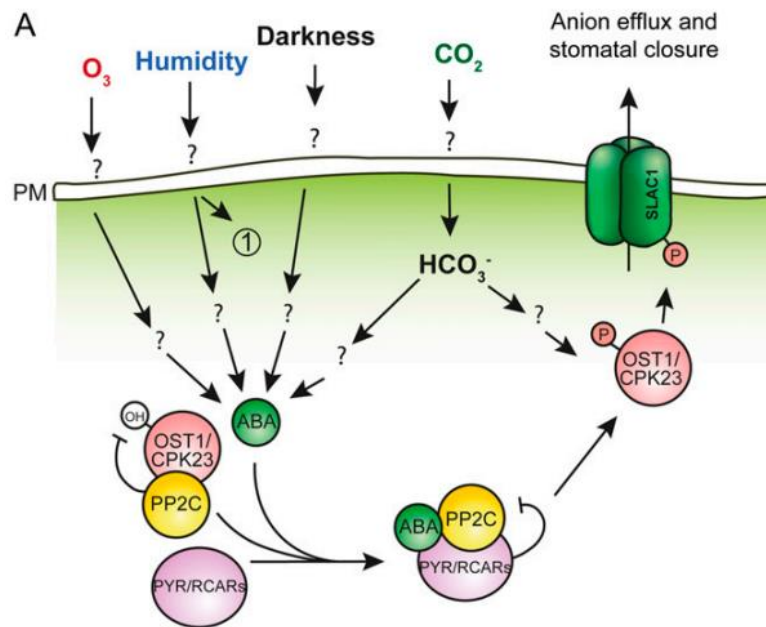
sulgrakku ning õhulõhed avanevad (Shimazaki jt 2007). Pimeduse rakendamisel fototropiinid inaktiveeruvad. Teiseks, pimedas fotosüntees peatub, mis toob kaasa süsihappegaasi kontsentratsiooni kasvu lehe sees ja anioonkanalite aktiveerumise, lisaks inaktiveeritakse  $H^+$ -ATPaas (Roelfsema jt 2002). ABA retseptorkompleksi võtmemutantides oli õhulõhede sulgumine pimeduses häiritud, mis viitab, et nimetatud signaalüksus osaleb protsessis (Merilo jt 2013).

Õhuõhede regulatsioon kõrge  $CO_2$  toimel algab karboanhüdraasidest, mis katalüüsivad bikarbonaadi teket  $CO_2$ -st (Xue jt 2011), kinaas HT1 osaleb raja negatiivse regulaatorina (Hashimoto jt 2006). Signaalraja olulisteks lõplülideks on OST1 ja SLAC1, nende puudumisel on kõrges  $CO_2$ -s toimuv õhulõhede sulgumine oluliselt häiritud (Vahisalu jt 2008; Xue jt 2011; Merilo jt 2013). Merilo jt katsed (2013) näitasid, et ka teistes ABA signaalüksuse mutantides oli kõrges  $CO_2$ -s toimuv õhulõhede sulgumine häiritud. Raja vahepealsete etappide osas on selgusetus veel suur. Näiteks pole selge, kas signaliseerimine toimub vahetult sulgrakkudes või talitlevad mesofüllirakud signaali sulgrakku vahendajatena (Fujita jt 2013).

Troposfäärne osoon on kasvuhoonegaas, mille kontsentratsioon on jätkuvalt tõusmas ning  $O_3$  kahjustab nii looduslikku keskkonda kui ka inimeste tervist (Klumpp jt 2006). Kõrgemad  $O_3$  doosid tekitavad taimedel nähtavaid kahjustusi ning pärsivad kasvu (Alexander jt 1985). Läbi õhulõhede lehte sisenenud osoon ja tema lagunemisel tekkinud reaktiivsed hapniku ühendid (ROS) reageerivad rakukesta, apoplasti ja plasmamembraani komponentiga, mille tagajärjeks on rakusurm, lehekahjustused ning vähenenud saagikus (Musselman jt 2006). Õhulõhede sulgumisel osooni toimel ROS-ide kontsentratsioon sulgrakkudes suureneb, mis viib OST1 aktiveerumiseni. Selle tagajärjel aktiveeritakse anioonkanal SLAC1 ning õhulõhed sulguvad. Siiski,  $O_3$  poolt indutseeritud õhulõhede sulgumine, mille käigus õhulõhede juhtivus väheneb umbes 60%-ni algsest juhtivusest, on ajutine ning järgneva tunni jooksul toimub taastumine (Vahisalu jt 2010).

Kokkuvõtteks saab öelda, et ABA retseptorkompleks mängib olulist rolli õhulõhede sulgumises, reageerides sellistele keskkonnastiimulitele nagu süsihappegaas, pimedus,

õhuniiskus ja osoon. Selgusetuks on siiski jäänud, kuidas signaal nende stiimulite olemasolust jõuab rakuvaheruumist rakku, kus ABA retseptorkompleks lokaliseerub (Merilo jt 2013). Üheks võimaluseks on, et signaaliülekanDES osalevad plasmamembraanis funktsioneerivad retseptortüüpi kinaasid (*Receptor-like kinases* RLK), mis võivad kanda signaali apoplastist rakusisesse ruumi.



**Joonis 3.** Õhulõhede sulgumine keskkonnafaktorite mõjul. Osooni puhul osalevad kõik ABA retseptorkompleksi komponendid õhulõhede sulgumisel. Pimedas toimuv õhulõhede sulgumine toimub rakusiseses CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni tõusu ning H<sup>+</sup>-ATPaasi inaktiveerumise tõttu. Ka kõrge CO<sub>2</sub> juures toimuv õhulõhede sulgumine käib läbi OST1 ja SLAC1 aktiveerumise. Küsimärgid tähistavad, et signaali ülekanDumise viisid rakuvaheruumist rakku on ebaselged. Allikas: Merilo jt (2013).

### 1.4 RLK ja CRK

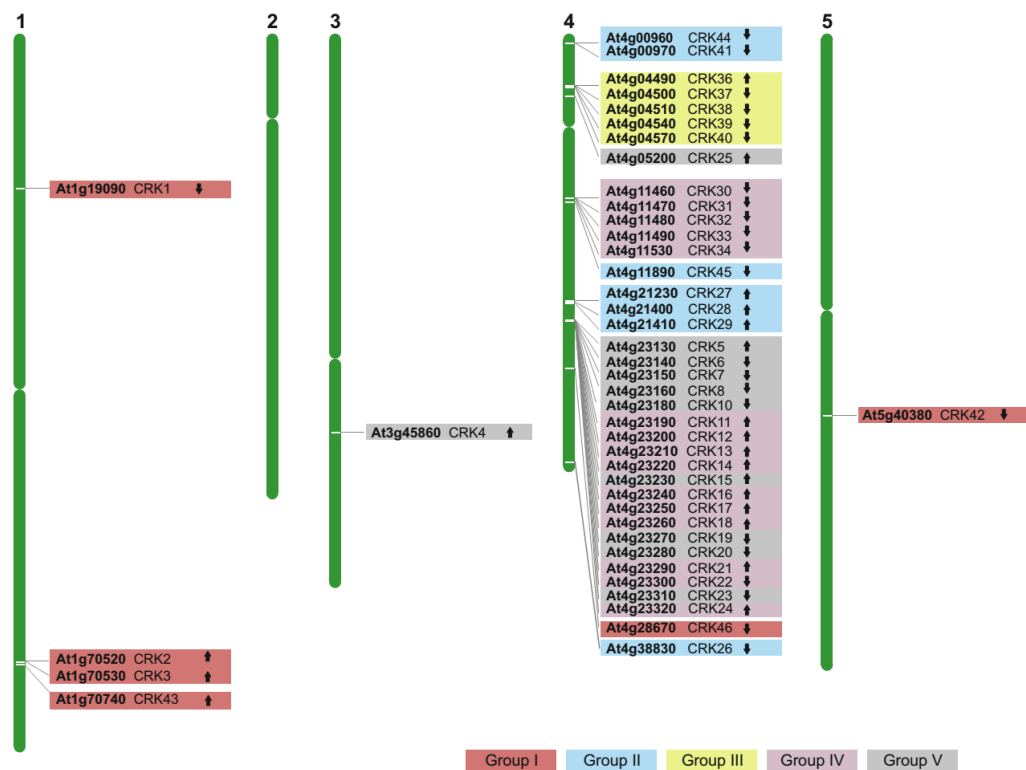
Signaalide tajumine rakumembraanis olevate retseptorite kaudu on elavate organismide jaoks väga oluline. Taimedes on arenenud keeruline signaliseerimine apoplast-rakk ja rakk-rakk vaheliseks kommunikeerumiseks, mis aitab tajuda väliskeskkonnas toimuvaid muutusi (Shiu & Bleecker 2001b). Vastusena sisemistele ja välistele muutustele käivitatakse rakusisesed signaalide kaskaadid retseptorkinaaside poolt. Retseptorkinaasid on tavaliselt transmembraansed valgud, koosnedes rakuvälisest signaali tajumise domäänist, mis on kinnitunud transmembraanse domääniga rakusisesse

kinaasse domääni külge (Shiu & Bleecker 2003). Loomades ja taimedes on evolutsiooni käigus sarnaste funktsioonidega süsteemid arenenud erinevalt. Loomarakkudes kasutatakse signaali äratundmiseks retseptortüüpi türosiinkinaase, kuid taimedes täidavad sarnast funktsiooni seriini/treoniini, aga ka türosiini retseptortüüpi kinaasid (Shiu & Bleecker 2001b, Oh jt 2012, Bojar jt 2014).

Retseptortüüpi/Pelle kinaasid (*Receptor-like/Pelle kinases*, lüh RLK) on perekond taimes olevaid transmembraanseid valke. Vastupidiselt loomadele sisaldavad taimegenoomid suurel hulgal retseptortüüpi kinaase, näiteks *Arabidopsis thaliana* (e.k müürlook) ja riisi genoomid sisaldavad vastavalt 600 ja 1100 RLK-d (Shiu jt 2004). *Arabidopsises* on 60% kinaasidest RLK-d ja peaaegu kõik transmembraansed kinaasid müürloogas on RLK-d (Shiu & Bleecker 2003). RLK-de rakuväline regioon koosneb ühest või enamast domäänist, mille järgi jagatakse RLK-d erinevateks perekondadeks. RLK-d kontrollivad taimedes mitmeid erinevaid füsioloogilisi protsesse, näiteks taime arengu regulatsiooni, hormoonide signaliseerimist ning reageerimist rakuvälistele keskkonnastiimulitele (Wrzaczek jt 2010). Kuigi retseptortüüpi kinaasid moodustavad märkimisväärse osa müürlooga genoomist, on siiski ainult väheste RLK valkude funktsioonid täpselt kirjeldatud (Shiu & Bleecker 2001a). Vähem kui 2% identifitseeritud RLK-de kohta on teada nende funktsioon, veel vähem on teada nende signaalkomponentide ja ligandide kohta (Shiu & Bleecker 2001b). Teadaolevate funktsioonidega RLK-deks on näiteks LRR (*Leucine-Rich Repeat*)-RLK, FLAGELLIN SENSING 2 (FLS2), mis on bakteriaalse peptiidi, flagelliini (flg22) retseptor (Chinchilla jt 2006). LRR-RLK CLV1 (Clark jt 1993, Katsir jt 2011) tajub taime valku CLAVATA3 (CLV3) ning LRR-RLK BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 (BRI1) käitub steroidhormoonide retseptorina (He jt 2000).

RLK/Pelle kinaaside perekond on jagatud rakuvälise ligandiga seostumise domääni järgi 45-ks erinevaks RLK alamperekonnaks (Shiu & Bleecker 2001b), millest üks suurimaid on tsüsteiinirikaste retseptortüüpi kinaaside (*Cysteine-Rich receptor-like protein Kinase* lüh. CRK, ka *domain of unknown function 26* [DUF26] RLK) alamperekond. CRK-sid eristab teistest RLK-dest domään DUF26 (tuntud ka kui stress-antifung PF01657), mis asub rakuvälises regioonis. DUF26 koosneb kolmest tsüsteiini

jäägist, mis moodustuvad C-X<sub>8</sub>-C-X<sub>2</sub>-C struktuuri (Chen 2001). CRK-de üldtunnused sarnanevad teistele RLKdele. Tüüpiline CRK-de struktuur koosneb rakuvälisest regioonist, transmembraansesest domäänist ja rakusisesest seriini/treoniini kinaasest domäänist (Idänheimo jt 2014). Kolm CRK alamperekonna liiget koosnevad ainult tsütoplasma domäänist sarnaselt retseptortüüpi tsütoplasma kinaasidega (RLCKs) (Shiu & Bleecker 2003). *Arabidopsis* CRK perekonnas on 44 liiget, mis teeb temast ühe suurima RLK alamperekonna. CRK perekonna liikmed on jagatud erinevatesse rühmadesse. Koguni 19 CRK-d paikneb üksteise järel neljandas kromosoomis. Väiksemad CRK-de rühmad asuvad ka esimeses, kolmandas ja viiendas kromosoomis (Joonis 4). Retseptortüüpi kinaasid arenesid taimedes varajastes evolutsiooni staadiumites ja CRK-de omapärased kobarad neljandas kromosoomis on ilmselt tekkinud geenide pikaajalisel duplitseerumisel. Geenide duplitseerumine on toonud kaasa uued mutatsioonid, mis omakorda on võimaldanud CRK-del paremini ära tunda patogeene või muid stressisignaale (Lehti-Shiu jt 2009).



**Joonis 4.** CRK geenide positsioonid *Arabidopsis thaliana* kromosoomides. Nooled tähistavad geenide orienteeritust. Allikas: Bourdais jt.

Sarnaselt teiste RLK-dega on vaid väheste CRK-de konkreetne funktsioon kindlaks tehtud. On näidatud, et CRK-d osalevad taime kaitsemehhanismide käivitumises patogeenide vastu ning osmootsele stressile reageerimises (Czernic jt 1999). Samuti osalevad CRK-d taime programmeeritud rakusurma regulatsioonil (Chen jt 2003). Katsed mutandiga, kus CRK13 oli üleekspressioneeritud, näitasid mutandi suuremat tolerantsust *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pto*) bakteriaalsele patogeenile (Acharya jt 2007). Mutantidel, mis üle-ekspressioneerisid *CRK4*, *CRK5*, *CRK19* ja *CRK20*, ilmnis hüpersensitiivne reaktsioon ehk iseeneslik rakusurm (Chen jt 2004). Taimeliinides, kus oli rikitud *CRK20* funktsioon oli *Pto* kasv vähenenud (Ederli jt 2011). Rikutud *CRK36-ga* mutandil oli suurenenud tundlikkus abstsissiinile ja osmootsele stressile (Tanaka jt 2012). Kuigi on pakutud, et CRK-d mängivad tähtsat rolli reageerimisel keskkonnas toimuvatele muutustele, on siiski üllatav, kui vähe on teada selle RLK perekonna füsioloogiliste ja biokeemiliste funktsioonide kohta.

### **1.5 Magistritöö eesmärk ja hüpoteesid**

CRK konsortsium, kuhu kuuluvad teadlased seitsmest Euroopa riigist, võttis ette CRK geeniperekonna iseloomustamise. Selleks telliti NASC-ist (Nottingham Arabidopsis Stock Centre) *Arabidopsis thaliana* CRK mutantide kollektsioon ning karakteriseeriti nende fenotüüpe, selgitamaks CRK-de rolli taimede kasvus, arengus ning reaktsioonides abiootilistele ja biootilistele faktoritele. Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli teha kindlaks CRK-de roll õhulõhede regulatsioonis. Selleks tein gaasivahetuskatseid 48 *crk* mutandiga. Töö konkreetne eesmärk oli välja selgitada, milliste CRK-de puudumine toob kaasa muutusi õhulõhede avatuses normaaltingimustel ja häirituse õhulõhede reageerimisel pimedusele ning CO<sub>2</sub> ja O<sub>3</sub> kontsentratsioonide kasvule.

CRK konsortsiumi töö tulemused, sealhulgas käesoleva magistritöö materjal, on koondatud artiklile (Bourdais jt), mis on saadetud avaldamiseks ajakirjale PLoS Genetics.

## 2 Metoodika

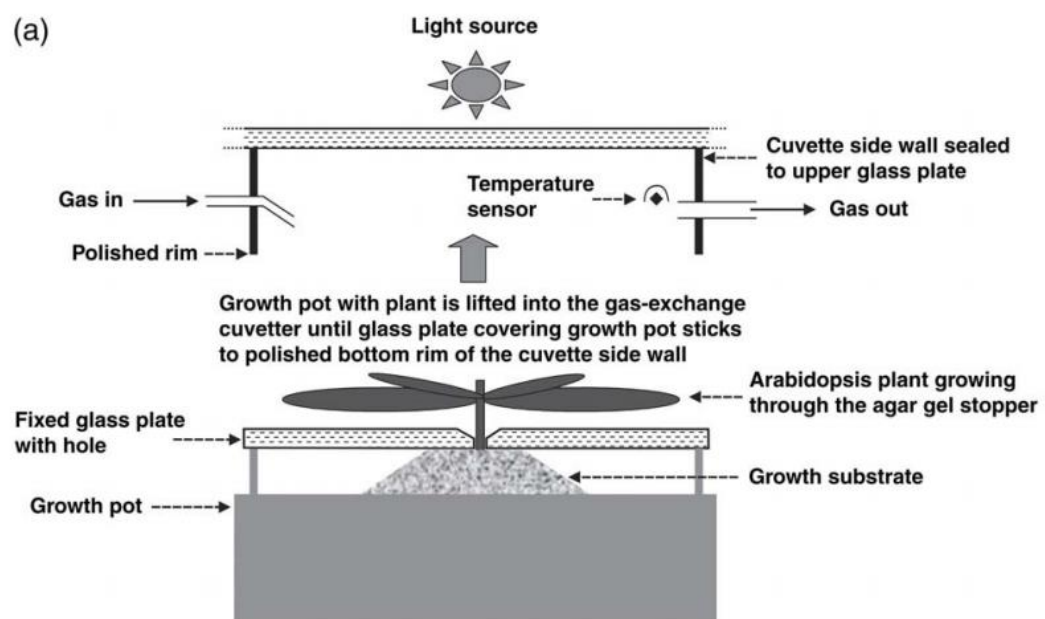
### 2.1 Taimed

Katsetes kasutati müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) rikitud CRK-dega mutante. Positiivseks kontrolliks oli metsiktüüp Columbia (Col-0) ning negatiivseks kontrolliks mutant *ost1-3*. Col-0 õhulõhed sulguvad kõigi uuritud stiimulite toimetel, kuid *ost1-3* omad reageerivad neile väga vähe (Merilo jt 2013). Kokku kasutati eksperimentides 48 erinevat CRK mutanti, neist 7 puhul (*crk1*, *crk7*, *crk10*, *crk19*, *crk21*, *crk23*) oli olemas kaks erinevat mutantset liini. Katsetest puudusid *crk27*, *crk34* ja *crk44* liinid. Kõik CRK T-DNA insertiooni (*insertion*) liinid saadi NASC-ist (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, <http://arabidopsis.info/>) ja T-DNA insertiooni mõju vastavate CRK-de ekspressioonile tehti kindlaks PCR meetodiga meie koostööpartnerite laborites (Lisatabel 1; Lisajoonis 2). PCR näitas, et vaatamata T-DNA insertioonile ei olnud 8 mutandi (*crk10.3*, *crk10.4*, *crk15*, *crk21.1*, *crk26*, *crk30*, *crk36*, *crk43.1* ja *crk43.2*) puhul antud geeni transkriptsioon langenud. Seega ei saa neid mutante uurides teha järeldusi konkreetse CRK rolli kohta uuritavates protsessides. Siiski said ka need 8 mutanti katsetesse kaasatud.

Seemned pandi enne istutamist vette ning hoiti kaks-kolm päeva külmkapis, 4–6 °C juures. Seemned külvati kergplastikust pottidesse mõõtmetega 10 x 10 x 6 cm, milles oli vermikuliidi ja turba segu vahekorras 1:1 v/v. Potti kattis klaasplaat (10 x 10 cm, paksus 0,25 cm), mille keskel oli 3 mm läbimõõduga koonusekujuline auk, kust taim läbi kasvas, nii et juured jäid klaasi alla ja maapealsed osad klaasi peale. Klaas oli asetatud poti servadega võrreldes 45° nurga all, et toimuks mulla gaasivahetus. Taimi kasvatati kontrollitud tingimustega kasvukambrites (AR-66LX ja AR-22L; Percival Scientific, USA ning MCA1600; Snijders Scientific, Belgia), milles oli 12h/12h valguse-pimeduse režiim temperatuuridel 23°C/18°C ja 150 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> fotosünteesiliselt aktiivset valgust, õhuniiskus hoiti 70–75% juures. Veedefitsiidi vältimiseks kasteti taimi regulaarselt 1–2 korda nädalas.

## 2.2 Gaasivahetussüsteem

Katseid tehti gaasivahetussüsteemis, mida on täpsemalt kirjeldanud Kollist jt (2007). Antud süsteem on mõeldud väikese lehepindalaga (3–22 cm<sup>2</sup>) taimede, eelkõige müürlooga mõõtmiseks. Gaasivahetussüsteem töötab läbivoolu põhimõttel ning sellega saab korraga mõõta maksimaalselt 8 taimet. Ühe kambri mõõtmiseks kulub 2 minutit, mille jooksul seade salvestab arvutisse CO<sub>2</sub>, veeauru ja osooni kontsentratsioonid kambri sisse- ja väljuvas õhuvoolus. Katsetes saab muuta erinevaid keskkonnafaktoreid (õhu CO<sub>2</sub> ja O<sub>3</sub> kontsentratsioone, õhuniiskust, valgust) ning uurida nende muutuste mõju õhulõhede juhtivusele (g<sub>s</sub>).



**Joonis 5.** Taimede gaasivahetuse mõõtmisüsteemi ühe kambri skeem. Allikas: Kollist jt (2007).

## 2.3 Mõõtmised

Mõõtmised toimusid ajavahemikus juuli–detsember 2013 ja lisakatsed viidi läbi 2014. aasta märtsis. Katsetes kasutati taimi lehepindalaga 3,5–20 cm<sup>2</sup>. Enamik *crk* liine olid antud lehepindala juures 21–26 päeva vanad, välja arvatud *crk2*, mille kasvukiirus oli teiste mutantidega võrreldes aeglasem (Lisajoonis 1) ning seepärast tehti eksperimente

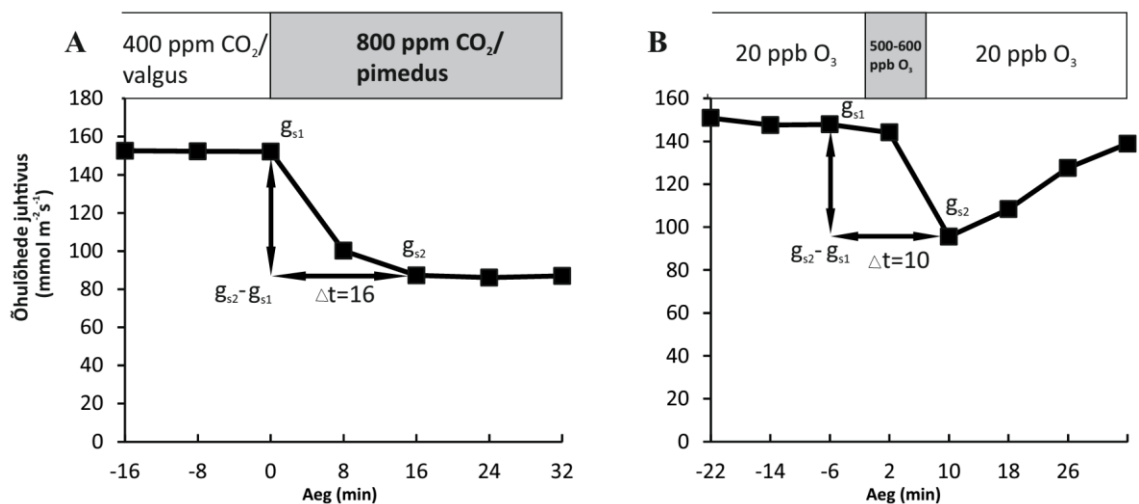
26–32-päevaste *crk2* mutantidega. Sarnane fenotüüp tuvastati ka Bourdais jt poolt. Katsetes oli kokku üle 250 taime, kõigiga tehti kolm eksperimenti. Esimesel päeval viidi läbi kõrge CO<sub>2</sub> katse, teisel päeval toimus pimeduskatse ning kolmandal osoneerimine. Igas katses oli olenevalt mutandist korduste arv (n) 3–10, Col-0 n oli vastavalt 35, 40 ja 43 CO<sub>2</sub>- , pimedus- ja O<sub>3</sub>-katsetes.

Üks päev enne gaasivahetuskatseid kaeti klaasi keskel olev auk varre ümbert mesilasvahaga, tagamaks mõõtekambri hermeetilisus. Enne taimede asetamist kambritesse tehti neist pilt fotoaparaadiga Pentax K100 D. Fotosid kasutati lehepindala arvutamiseks. Gaasivahetuskambrites hoiti taimi 150 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> valguse, 65% õhuniiskuse, 23–25°C temperatuuri ja 400 ppm CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni juures, kuni g<sub>s</sub> oli stabiliseerunud (ligikaudu 1h). Katsetes kasutati korraga nelja kambrit kaheksast, mis võimaldas saada ühest kambrist andmeid iga 8 minuti tagant. Pimeduskatsetes kaeti kambriid stabilisatsiooniperioodi lõppedes ükshaaval valguskindlalt. CO<sub>2</sub> katsetes tõsteti süsihappegaasi kontsentratsioon kambriid 400 ppm tasemelt 800 ppm-ni ning O<sub>3</sub> katsetes osoneeriti taimi 4 minuti jooksul 500-600 ppb osooniga. Pimedust ja kõrget CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni rakendati, kui kambri mõõtmise oli lõpetatud ehk esimene mõõdetud punkt saadi kaheksandal minutil. Osoneerimist alustati kambri mõõtmise alguses ehk esimesed kaks õhulõhede juhtivuse ajapunkti saadi teisel ja kümnendal osoneerimise minutil. Kõikides eelnevalt mainitud eksperimentides mõõdeti õhulõhede juhtivust 32 minuti jooksul pärast antud keskkonnafaktori muutmist.

## 2.4 Andmetöötlus

Taimedest tehtud fotode põhjal arvutasin roseti summaarse lehepindala pilditöötlusprogrammide ImageJ (versioon 1.47) või GIMP (versioon 2.8) abil. Täpne lehepindala on vajalik transpiratsiooni ning õhulõhede juhtivuse arvutamiseks. Katse lõppedes analüüsiti saadud andmeid spetsiaalse Exceli baasil töötava programmiga, mis arvutab gaasivahetuskambrisse siseneva ja väljuva õhu veeauru kontsentratsioonide erinevusest, lehepindalast ja õhuvoolu kiirusest lähtudes transpiratsiooni ning edasi lehetemperatuuri arvesse võttes õhulõhede juhtivuse (g<sub>s</sub>). Edasises andmetöötluses

arvutasin taimede 1)  $g_s$  absoluutsed ja relatiivsed käigid ajas, normaliseerimiseks kasutasin kahe viimase töötuseelse  $g_s$  keskmist ning 2) õhulõhede absoluutsed ja relatiivsed sulgumised 10-ndal ( $O_3$ ) ning 16-ndal minutil ( $CO_2$  ja pimedus), kasutades valemeid  $g_{s2}-g_{s1}$  ja  $(g_{s2}-g_{s1})/g_{s1}$ , kus  $g_{s1}$  on kahe viimase töötuseelse  $g_s$  keskmine ning  $g_{s2}$  on õhulõhede juhtivus 10-ndal või 16-ndal minutil (Joonis 6). Osooni puhul on 10-nda minuti sulgumine analoogne Vahisalu jt (2010) poolt mõõdetud kiire, kuid mööduva õhulõhede sulgumisega, mis toimus 10 minuti jooksul pärast osoneerimise algust, kui  $g_s$ -i väärtus vähenes 40% võrreldes töötuseelse väärtusega. Õhulõhed püsisid suletuna järgnevad 10 minutit, edasi algas  $g_s$  taastumine (Vahisalu jt 2010). Andmetöötlusse võeti need tulemused, kus lehtede pindala oli üle  $3,5 \text{ cm}^2$  ja õhulõhe juhtivuse varieerumine enne stiimuli rakendamist oli väiksem kui 15%.



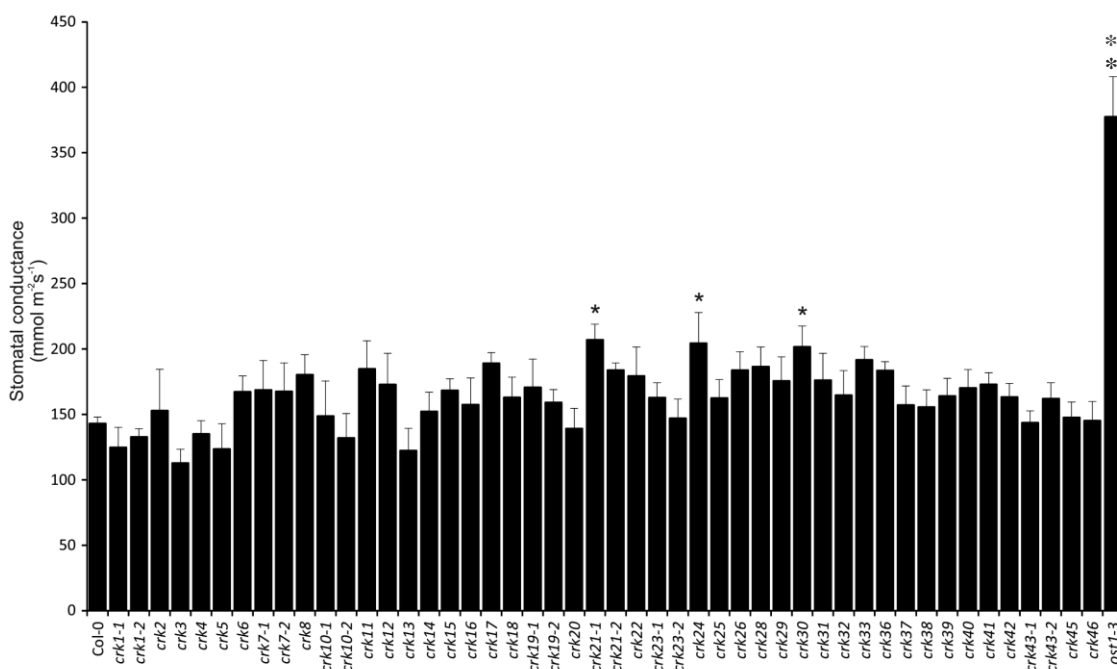
**Joonis 6.** Õhulõhede juhtivuse muutumise arvutamine  $CO_2$ /pimeduse (A) ja osoneerimise katsetes (B).  $g_{s1}$  on töötus-eelne õhulõhede juhtivus ning  $g_{s2}$  on  $CO_2$ /pimeduse katsetes õhulõhede juhtivus 16-ndal minutil ja osoneerimisel  $g_{s2}$  on õhulõhede juhtivus 10-ndal minutil.

Õhulõhede sulgumiste erinevuste võrdlemiseks kasutasin programmi Statistica 7.1, rakendasin ANOVAt ja mitmest võrdlemistesti Dunnett (GLM ja ANOVA), kus funktsioonitunnusteks olid töötuseelsed õhulõhede juhtivused ning absoluutsed ja relatiivsed õhulõhede sulgumised 10-ndal ja 16-ndal minutil. Kui tunnus ei allunud normaaljaotusele, kasutasin logaritmimist. Statistilise olulisuse piirväärtuseks võtsin  $p < 0.05$ .

### 3 Tulemused

#### 3.1 Absoluutne õhulõhede juhtivus

Uuritud liinide keskmine õhulõhede juhtivus normaaltingimustes varieerus vahemikus 113–207  $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Joonis 7). Metsiktüübi Col-0 keskmine juhtivus oli 143 ( $\pm 5$ )  $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Statistiliselt oluliselt kõrgema õhulõhede juhtivusega olid mutantid *crk21.1* ( $p=0,015$ ), *crk24* ( $p=0,010$ ) ja *crk30* ( $p=0,044$ ). Sellist mutanti, mille  $g_s$  oleks olnud oluliselt madalam kui metsiktüübil, ei olnud. RT-PCR analüüsist (Lisajoonis 2) selgus, et *CRK30* ekspressioon ei olnud võrreldes metsiktüübiga vähenenud, seetõttu selle mutandi kõrgemast juhtivusest ei saa järeldada, et *CRK30* on oluline õhulõhede avatuse määramises. Samas *CRK21.1* ja *CRK24* ekspressioon oli oluliselt vähenenud.

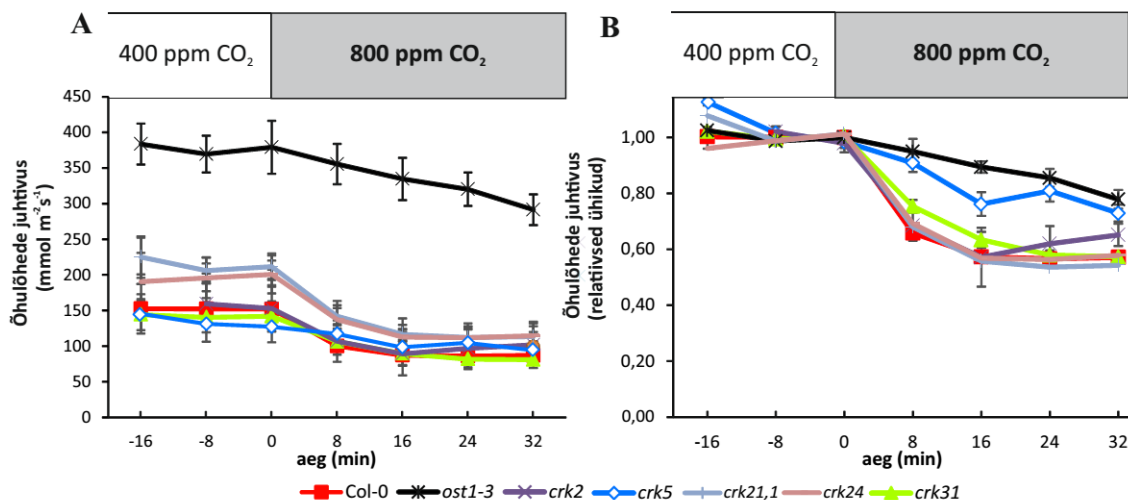


**Joonis 7.** *CRK* mutantide, *ost1-3* ja Col-0 metsiktüübi õhulõhede juhtivus ( $g_s$ ) normaaltingimustel ( $n=3-10$ , Col-0  $n=49$ ,  $\pm$ SEM). Tärid tähistavad mutantide statistiliselt olulist erinevust metsiktüübist \*  $p<0,05$  ja \*\*  $p<0,01$ .

### 3.2 CO<sub>2</sub> katsed

Töö põhiosa joonistel on käsitletud vaid valitud mutantide õhulõhede juhtivuste käigud, valiku aluseks oli huvipakkuvate fenotüüpide olemasolu. Bourdais jt tulemuste põhjal paistis liin *crk2* silma nii muutustega kasvukiiruses, arengus kui ka stressireaktsioonides (näiteks oluliselt vähenenud *flg22*-indutseeritud ROS-ide produktsioon), seetõttu lisati antud mutandi tulemused põhiosa joonistele. Liinid *crk5* ja *crk31* valiti põhiosa joonistele, kuna nende mutantide õhulõhede regulatsioon oli selgelt häiritud (vt allpool) ning liinid *crk21.1* ja *crk24*, kuna nende mutantide  $g_s$  oli metsiktüübist oluliselt kõrgem (Joonis 7). Lisaks ülalloeletud mutantidele esitati põhiosa joonistel 8–10 alati ka positiivne kontroll Col-0 ja negatiivne kontroll *ost1-3* ning need *crk* mutandid, mille õhulõhede sulgumine antud faktori toimel oli statistiliselt oluliselt erinev metsiktüübist. Õhulõhede sulgumised nii absoluutsetes (Joonis 11) kui ka suhtelistes (Joonis 12) ühikutes on esitatud põhiosas kõigi mutantide kohta. Lisajoonistel 4–9 on välja toodud kõikide mutantide õhulõhede juhtivuste ajalised käigud antud stiimuli toimel.

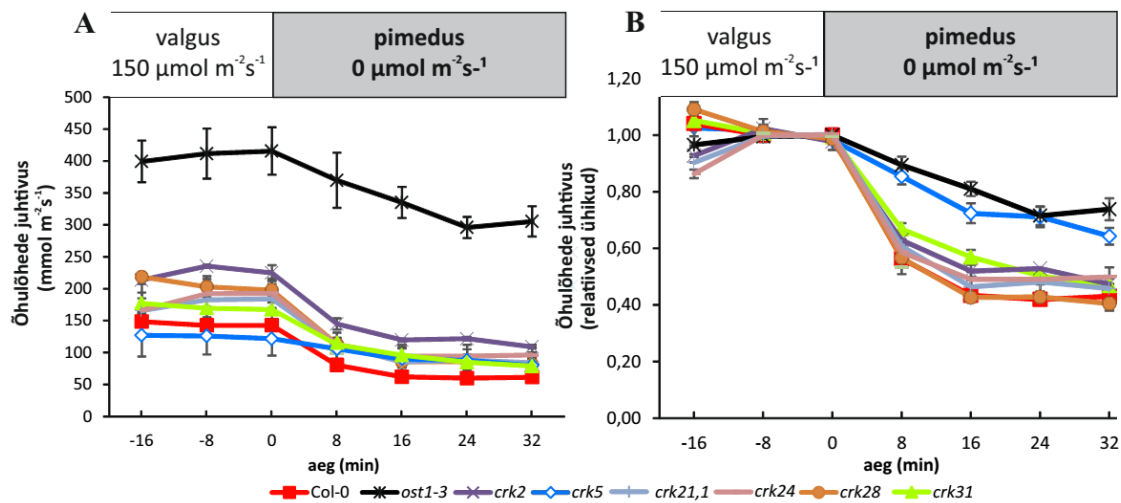
Süsihappegaasi kontsentratsiooni tõustes iseloomustab Col-0 õhulõhede juhtivuse ajaliskäiku kiire ja järsk langus, millele järgneb stabiliseerumine uuel, madalamal  $g_s$  väärtusel (Joonis 8). Enamik *crk* mutante käitusid nagu Col-0, erinedes CO<sub>2</sub> poolt indutseeritud õhulõhede sulgumises vähe. Erandiks on *crk5*, mille suhteline sulgumisreaktsioon kõrge CO<sub>2</sub> toimel sarnanes CO<sub>2</sub>-insensitiivse mutandi *ost1-3* omaga (Joonis 8-B). Joonised 11-A ja 12-A kajastavad kõigi CRK mutantide CO<sub>2</sub> poolt indutseeritud absoluutseid ja relatiivseid õhulõhede sulgumisi 16-ndal minutil. Selgus, et *crk5* sulgumine kõrge CO<sub>2</sub> toimel oli nii absoluutselt kui ka relatiivselt väljendatuna statistiliselt oluliselt ( $p=0,006$  ja  $p=0,014$ ) madalam kui Col-0 kontrolltaimedel.



**Joonis 8.** Mutantide *crk2*, *crk5*, *crk21.1*, *crk24*, *crk31*, *ost1-3* ja Col-0 metsiktüübi õhulõhede juhtivuste ajalised käigud kõrgema CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni rakendamisel absoluutsetes (A) ja suhtelistes (B) ühikutes (n=3-10, Col-0 n=35, ±SEM). Ajahetkel 0 tõsteti CO<sub>2</sub> kontsentratsioon 400 ppm-i pealt 800 peale.

### 3.3 Pimeduskatsed

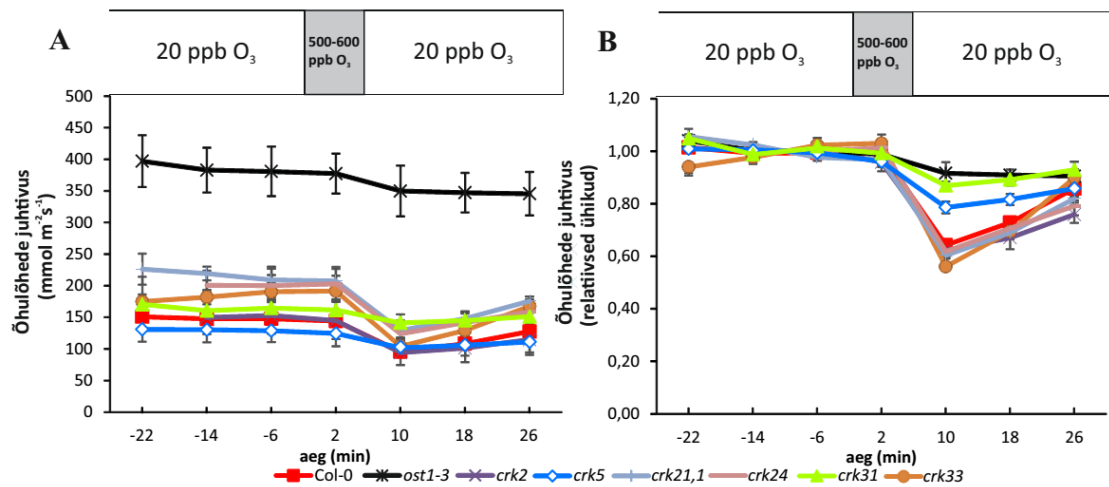
Metsiktüübil Col-0 langeb õhulõhede juhtivus pimeduses kiiresti ja järsult, reaktsioon on väga sarnane kõrges CO<sub>2</sub>-s toimuva õhulõhede sulgumisega. Suurim  $g_s$  langus toimus esimese 8 pimedusminuti jooksul, edasi stabiliseerus  $g_s$  uuel, 44% madalamal väärtusel võrreldes normaaltingimuste väärtusega. Metsiktüübiga sarnane õhulõhede sulgumise käik pimeduses iseloomustas enamikku CRK mutante. Kõige olulisemalt erines *crk5* – tema suhteline  $g_s$  käik pimedas oli sarnane *ost1-3* omaga ning 16-nda minuti absoluutsed ja relatiivsed sulgumised olid statistiliselt oluliselt erinevad metsiktüübist ( $p=0,00001$  ning  $p=0,031$ ) (Joonis 11-B ja 12-B). Relatiivne sulgumine oli metsiktüübiga võrreldes väiksem veel mutandil *crk31*, samas kui absoluutne sulgumine oli statistiliselt oluliselt suurem mutandil *crk28* ( $p=0,047$ ). See oli ilmselt seotud *crk28* kõrgema õhulõhede juhtivusega, sest suhtelistes ühikutes sulgus *crk28* sarnaselt metsiktüübiga.



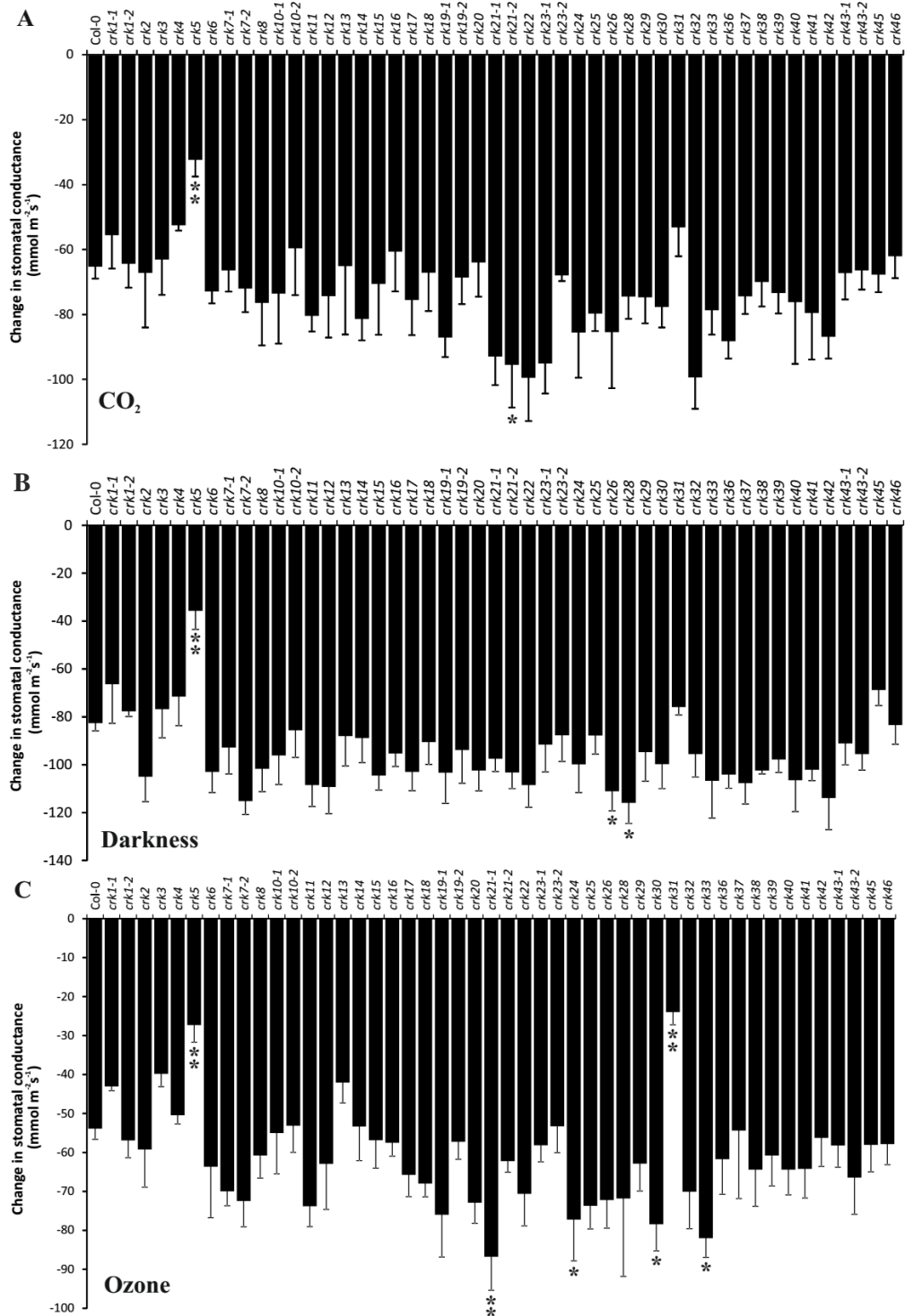
**Joonis 9.** Mutantide *crk2*, *crk5*, *crk21.1*, *crk24*, *crk28*, *crk31*, *ost1-3* ja Col-0 metsiktüübi õhulõhede juhtivuste käigud pimeduses absoluutsetes (A) ja suhtelistes (B) ühikutes (n=3-10, Col-0 n=40, ±SEM). Pimedust rakendati ajahetkel 0.

### 3.4 O<sub>3</sub> katsed

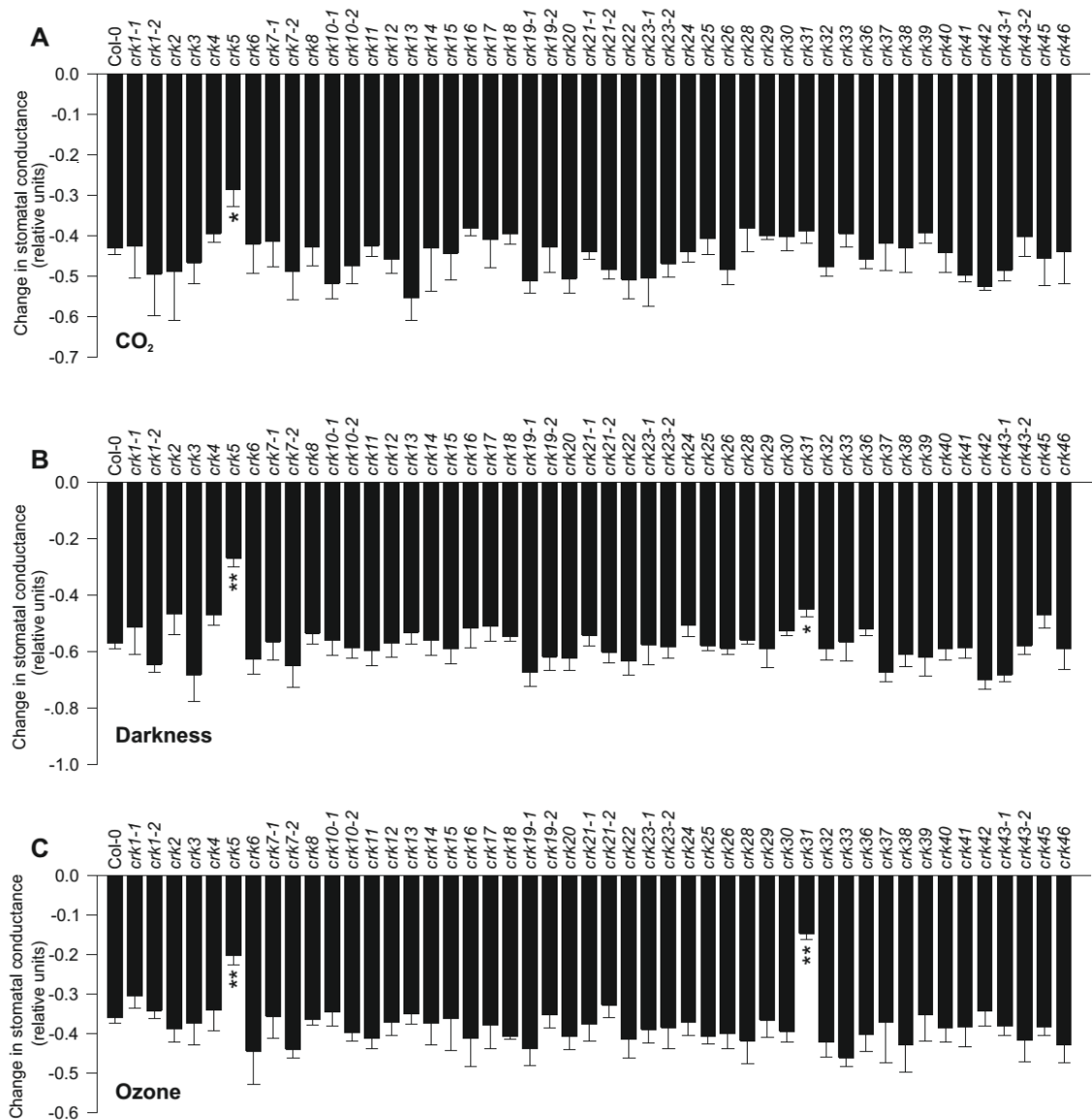
Col-0 õhulõhede juhtivus langes 4 minuti pikkuse osoneerimise järel kiiresti ja järsult, kuid selline sulgumine oli möödud (Joonis 10). Esimese 10 minutiga  $g_s$  langes ning seejärel algas järk-järguline taastumine. Töötluseelne õhulõhede juhtivuse väärtus taastus metsiktüübil 34 minutit pärast osoneerimise algust. Enamiku *crk* mutantide puhul sarnanes õhulõhede O<sub>3</sub> poolt indutseeritud sulgumise käik metsiktüübiga, kuid *crk5* ja *crk31* puhul  $g_s$  ajalised käigud erinesid Col-0 omast (Joonis 10-B). Joonised 11-C ja 12-C kujutavad absoluutseid ja relatiivseid õhulõhede sulgumisi 10 minutit pärast osoneerimise algust. Metsiktüübiga võrreldes olid statistiliselt oluliselt madalamad sulgumised nii absoluutselt kui ka relatiivselt väljendatuna mutantidel *crk5* (p=0,003 ja p=0,0004) ning *crk31* (p=0,00009 ja p=0,00002). Liinide *crk5* ja *crk31* omavaheline statistiline erinevus relatiivsel sulgumisel oli samuti oluline (p=0,055). Teised *crk* mutandid ei erinenud suhtelise sulgumise osas metsiktüübist, kuid absoluutsetes ühikutes oli *crk21.1* (p=0,0003), *crk24* (p=0,013) ja *crk33* (p=0,025) O<sub>3</sub>-toimeline õhulõhede sulgumine metsiktüübist suurem. Antud erinevusi võib seletada nende mutantide kõrgema absoluutse õhulõhede juhtivusega (Joonis 7), sest relatiivsetes ühikutes sulgusid nad kõrge osooni juures sarnaselt metsiktüübiga.



**Joonis 10.** Mutantide *crk2*, *crk5*, *crk21.1*, *crk24*, *crk31*, *crk33*, *ost1-3* ja metsiktüübi Col-0 õhulõhede juhtivuste käigud osoneerimisel absoluutsetes (A) ja suhtelistes (B) ühikutes (n=3-10, Col-0 n=43, ±SEM). Neljaminutilise O<sub>3</sub> pulssi kontsentratsiooniga 500-600 ppb anti ajahetkel 0.



**Joonis 11.** Töös uuritud *crk* mutantide absoluutsed õhulõhede sulgumised 16-ndal minutil CO<sub>2</sub> (A) ja pimeduse (B) eksperimentides ning sulgumised 10-ndal minutil O<sub>3</sub> (C) katsetes. Tärnid tähistavad mutantide statistiliselt olulist erinevust metsiktüübist \* p<0,05 ja \*\* p<0,01. Vearistid tähistavad ±SEM (n≥3, Col-0 n≥35).



**Joonis 12.** Töös uuritud crk mutantide relatiivsed sulgumised 16-ndal minutil  $\text{CO}_2$  (A) ja pimeduse (B) eksperimentides ning sulgumised 10-ndal minutil  $\text{O}_3$  (C) katsetes. Tärnid tähistavad mutantide statistiliselt olulist erinevust metsiktüübist \*  $p < 0,05$  ja \*\*  $p < 0,01$ . Vearistid tähistavad  $\pm \text{SEM}$  ( $n \geq 3$ , Col-0  $n \geq 35$ ).

## 4 Arutelu

Taimedel on kohanemiseks pidevalt muutuv keskkonnas vaja täpset õhulõhede sulgumise ja avanemise regulatsiooni. Õhulõhede sulgumist kontrollib rakusisene ABA signalisatsioonirada, kuid see, kuidas signaalid erinevate keskkonnategurite muutumisest sulgrakku jõuavad, ei ole selge (Merilo jt 2013). Plasmamembraanis lokaliseeruvad tsüsteiinirikkad retseptortüüpi kinaasid (CRK) võivad olla retseptorid, mis vahendavad rakuvaheruumis esinevaid signaale rakku. CRK-de roll võib olla just ROS-idega seotud signaalide vahendamine rakuvaheruumist rakku, sest järjestikku asuvad tsüsteiinid CRK-de DUF26 domäänis muudavad CRK-d tundlikuks redokstasakaalu muutustele: oksüdeerijate toimel tekivad tsüsteiinijääkide vahel disulfiidsillad ning see omakorda muudab valgukonformatsiooni ja aktiivsust (Jones jt 2013). Minu magistritöö katsed moodustavad osa suurest projektist, mille eesmärk oli selgitada CRK-de rolli taimede kasvus, arengus ja stressireaktsioonides. Kõigi CRK perekonna geenide samaaegne karakteriseerimine ning sellele järgnenud statistiline analüüs lubas kujundada tervikpildi CRK-de üldistest ja spetsiifilistest rollidest taimes; nende geenide ühekaupa uurimine poleks sellist üldist ülevaadet võimaldanud.

Alustuseks võrdlen enda gaasivahetuskatsete tulemusi metsiktüübi Col-0 ja negatiivseks kontrolliks olnud mutandi *ost1-3* osas varem avaldatud tulemustega. Normaalingimustes oli *ost1-3* õhulõhede juhtivus võrreldes metsiktüübiga ligi 2 korda kõrgem (Joonis 7), see tulemus on sarnane varasematega (Xue jt 2011; Merilo jt 2013). Mutandi *ost1-3* ja metsiktüübi Col-0 reaktsioonid erinevatele keskkonnastiimulitele olid samuti sarnased varasemate tulemustega (Xue jt 2011; Merilo jt 2013; Vahisalu jt 2008 ja 2010). Pimeduse ja kõrge süsihappegaasi toimel reageeris Col-0 kiiresti esimese 10 minutiga, edasi õhulõhede juhtivus stabiliseerus umbes 40% madalamal  $g_s$  tasemel. Mutandi *ost1-3* õhulõhede sulgumine uuritud stiimulite mõjul oli tugevasti häiritud: osoneerimisel sulgumine praktiliselt puudus, samas oli väike reaktsioon kõrgele süsihappegaasile (umbes 10%-line) ja pimedusele (umbes 15%-line). Seega võib öelda, et kuna positiivsed ja negatiivsed kontrollid reageerisid ootuspäraselt, siis on antud

magistritöö gaasivahetuskatsed üldiselt õnnestunud ning võimaldavad teha järeldusi CRK-de rollist õhulõhede regulatsioonis.

CRK-dest olid kahe mutandi (*crk21.1* ja *crk24*) õhulõhed normaaltingimustes rohkem avatud kui metsiktüübil Col-0,  $g_s$  oli neil vastavalt 31 ja 30% kõrgem. Seega, üheks CRK-de rolliks võib olla õhulõhede basaalse avatuse kontrollimine tavatingimustel. Kuna ROS-ide tootmine toimub taimedes ka normaalse ainevahetuse tingimustes, võib oletada, et CRK21 ja CRK24 on seotud ROSide homeostaasi jälgimise või tagamisega normaalolekus. Sellega seonduvalt leiti, et mutandil *crk21.1* on rakuvaheruumis toimuv ROSide tootmine oluliselt vähenenud (Bourdaïs jt), pakkudes ühe potentsiaalse seletuse kõrgele  $g_s$ -le.

Õhulõhede sulgumine kõigi uuritud stiimulite mõjul oli häiritud mutandil *crk5*: nii pimeduse, kõrge CO<sub>2</sub> kui ka osooni mõjul jäid *crk5* õhulõhed pärast stiimuli rakendamist metsiktüübiga võrreldes rohkem avatuks. Oma tugevasti häiritud sulgumisega oli *crk5* sarnane negatiivse kontrolliga *ost1-3*, mis on üks võtmemutante ABA signaalkompleksis (Merilo jt 2013). Sellest võib järeldada, et CRK5 võib olla taimede õhulõhede regulatsioonis väga oluline, toimides nn võtmeregulaatorina erinevate keskkonnastresside puhul. Sulgumine O<sub>3</sub> mõjul oli tugevasti vähenenud ka mutandil *crk31*, seda võrreldes nii metsiktüübiga kui ka mutandiga *crk5*. See lubab oletada, et CRK31 osaleb õhulõhede reguleerimises spetsiifiliselt, olles eelkõige seotud osooni-toimelise sulgumisega.

Vahemärkusena võiks lisada, et minu poolt läbiviidud katsete tulemused CRK5 ja CRK31 mutantide õhulõhede fenotüüpide kohta on küll statistiliselt usaldusväärsed, kuid tuleb silmas pidada, et antud tulemuste alusel ei saa siiski veel lõplikke järeldusi antud CRK-de rolli kohta õhulõhede regulatsioonis teha. Eksisteerib võimalus, et *crk5* ja *crk31* fenotüübid olid põhjustatud T-DNA insertiooni käigus tekkinud mutatsioonidest mujal genoomis. Küsimuse lõplikuks selgitamiseks tuleks saada uusi mutantseid liine CRK5 ja CRK31 jaoks või konstrueerida transgeensed komplementatsiooniliinid, kus *crk5* ja *crk31* mutante transformeeritakse metsiktüüpi CRK5 ja CRK31 geenidega ning

kontrollitakse, kas selle tulemusel kaovad vastavate mutantide õhulõhedega seotud fenotüübid või mitte.

Minu töö tulemusel selgus, et need mutandid, mis olid normaaltingimustes rohkem avatud õhulõhedega, sulgusid stiimulite toimel normaalselt, kuid need mutandid, millel esinesid häired sulgumises, olid oma  $g_s$  poolest metsiktüübiga võrreldavad. See on huvitav tulemus, sest üldiselt on varasemad tulemused näidanud, et liinid, millel on tugevad häired keskkonnafaktorite toimelises õhulõhede sulgumises, on metsiktüübiga võrreldes märkimisväärselt enam avatud (Merilo jt 2013, Vahisalu jt 2010). Mutante, millel on metsiktüübiga sarnane õhuõhede juhtivus, kuid häiritud sulgumisreaktsioonid, kirjanduse andmetel varem kirjeldatud ei ole. Hashimoto jt (2006) identifitseerisid proteiinkinaasi HT1 (High Leaf Temperature 1), mille mutantide õhulõhed on metsiktüübiga võrreldes enam suletud, sellest ka nimi: kõrge lehetemperatuur. HT1 on CO<sub>2</sub>-indutseeritud õhulõhede sulgumisraja negatiivne regulaator. HT1 on ekspresseerunud sulgrakkudes ja taimeliinid, kus on HT1 toime häiritud, ei reageeri CO<sub>2</sub>-le: ei avane madalas CO<sub>2</sub>-s ega sulgu kõrges CO<sub>2</sub>-s (Hashimoto jt 2006). Lähtuvalt ülalmainitust võib öelda, et minu katsete tulemused viitavad sellele, et CRK5 ja CRK31 omavad spetsiifilist rolli just õhulõhede sulgumisreaktsiooni käivitamisel, kuid ei mõjuta üldist õhulõhede avatust normaaltingimustes.

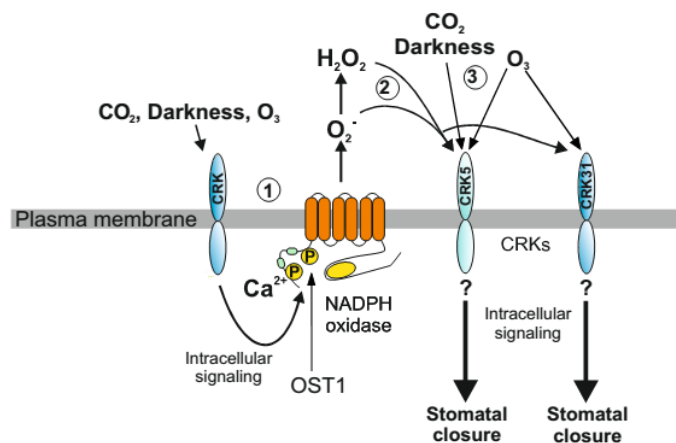
Vaadates õhulõhede regulatsioonis oluliste CRK-de mRNA taset sulgrakkudes ja kogu lehes, selgus, et *CRK5* ei ole ekspresseerunud mitte ainult sulgrakkudes, vaid pigem kogu mesofüllis (Bourdais jt; arabidopsis.org). Ka see on väga huvitav tulemus: enamasti on õhulõhede regulatsioonis osalevad geenid ekspresseerunud pigem sulgrakkudes. Seega võib küll öelda, et ühelt poolt on CRK5 väga oluline õhulõhede regulatsioonis abiootiliste faktorite toimel, kuid teisalt pole tegemist sulgrakuspetsiifilise geeniga. See viitab lehe kui terviku rollile õhulõhede käitumises. *CRK31* mRNA tase oli sulgrakkudes oluliselt kõrgem võrreldes kogu lehe tasemega, seega *CRK31* on sulgrakuspetsiifiline geen (Bourdais jt).

Bourdais jt uurisid muuhulgas, kas ja millised CRK-d on olulised õhulõhede regulatsioonis biootiliste faktorite toimel. Selgus, et *crk5* ja *crk31* õhulõhed ei sulgunud

ka biotiliste faktorite toimetel: mõlemal oli häiritud nii flg22- kui ka kitiinitoimeline (kitiin on seenpatogeenide rakukesta komponent) õhulõhede sulgumine. Samas, selliseid *crk* mutante, millel oli patogeensete mõjuainete toimeline õhulõhede sulgumine häiritud, oli suhteliselt palju (Bourdais jt). Nii *crk5* kui ka *crk31* puhul leiti, et tugeva valguse poolt indutseeritud ROS-ide tootmine kloroplastides oli neil võrreldes metsiktüübiga suurem. Mutandi *crk31* puhul leiti ühelt poolt madalam ROS-ide tootmine flg22 toimetel, kuid samas suurem tundlikkus osoonile: osoneerimisel ilmnesid rakukahjustused ning nähtavad lehekahjustused. Rakusurm ja kahjustused viitavad reaktiivsete hapnikuühendite kontsentratsiooni suurenemisele taimes (Jones jt 2013). Mutandil *crk5* leiti suurem tundlikkus bakteriaalse patogeeni *Pseudomonas syringae* suhtes, mis võib olla seotud sellega, et patogeenide-toimeline õhulõhede sulgumine on häiritud (Bourdais jt). Huvitaval kombel selgus samas, et ABA-indutseeritud sulgumine oli olemas nii *crk5* kui ka *crk31* taimedel (Bourdais jt). Bourdais jt tegid ka veekaokaseid, milles selgus, et pärast taime äralõikamist langes *crk5* ja *crk31* mutanite kaal kiiremini võrreldes metsiktüübiga Col-0. Suurem kaalukadu näitab, et nendel taimedel esines õhulõhede regulatsiooni häirituse tõttu suurenenud veekadu – see tulemus sobib minu poolt saadud tulemustega hästi kokku.

Seega võib öelda, et CRK5 ja CRK31 on olulised nii abiootiliste kui biotiliste faktorite toimelises õhulõhede regulatsioonis. ROSide tootmise võimendumine on omane nii biotilisele kui abiootilisele stressile. Samas võib arvata, et nimetatud CRK-d täidavad ka spetsiifilisi, individuaalseid rolle antud protsesside (õhulõhede sulgumine, ROSide tootmine erinevates kompartmentides jne) regulatsioonis. CRK-d on oma olemuselt kinaasid, mille ülesandeks ensüümina on fosforüleerimine. Sellest tulenevalt võib oletada, et CRK5 on vajalik mingi õhulõhede regulatsiooni signaalraja alguses oleva komponendi aktiveerimiseks, mis viib lõpuks õhulõhede sulgumiseni. Samas CRK31 aktiveerib mingit spetsiifiliselt O<sub>3</sub> või teiste ROS-de rajaga seotud komponenti. Selle edasiseks uurimiseks tuleks teha katseid, selgitamaks CRK5 ja CRK31 potentsiaalseid interaktsioonipartnereid rakus. Hüpotetiline CRK-de signaliseerimise mudel on välja toodud joonisel 13.

Kokkuvõtteks võib öelda, et 2 CRK-d (CRK21 ja CRK24) osalevad normaaltingimustes taimede basaalse õhulõhede avatuse määramisel. Samas, õhulõhede sulgumine uuritud keskkonnastiimulite toimetel oli *crk21* ja *crk24* mutantidel sarnane metsiktüübiga. Keskkonnafaktorite (pimedus, kõrge süsihappegaas ja osoon) toimelisel õhulõhede sulgumisel mängib tähtsat rolli CRK5. Kuna CRK5 on ekspresseerunud mitte ainult sulgrakkudes, vaid pigem mesofüllis, viitab see mesofüllis toimuvate protsesside olulisusele õhulõhede regulatsioonis. Järgnevalt oleks vaja uurida, kas CRK5 osaleb õhulõhede sulgumises muude stiimulite, nagu näiteks ABA ning madala õhuniiskuse toimetel ning kas ta osaleb ka õhulõhede avanemises vastavate faktorite (madal CO<sub>2</sub>, lisavalgus) toimetel. Teine katsetes eristunud mutant oli *crk31*, millel ilmnes häiritud sulgumine osoneerimisel. Seega võib arvata, et CRK31 roll õhulõhede regulatsioonis on spetsiifilisem ja seotud pigem osooniga. CRK31 spetsiifiline seotus osoneerimise/ROSidega ilmnes ka *crk31* mutandi suuremas O<sub>3</sub>-tundlikkuses. Kui CRK-d kontrollivad õhulõhede regulatsiooni, siis neid gene modifitseerides võib tulevikus olla võimalik konstrueerida stressikindlaid taimi.



**Joonis 13.** Hüpooteetiline CRK-de signaalseerimise mudel. (1) Plasmamembraanil asuvad retseptorkinaasid, k.a CRK-d, tunnevad ära keskkonnafaktorite (CO<sub>2</sub>, pimedus ja osoon) muutused, mis aktiveerivad NADPH oksüdaasi ja käivitub ROS-ide tootmine rakuvälises ruumis. Varem on näidatud, et ROS-ide tootmine kaasneb nii kõrge CO<sub>2</sub> (Kolla jt 2007), pimeduse (She jt 2010) kui ka osooni (Vahisalu jt 2010) poolt indutseeritud õhulõhede sulgumisega. NADPH oksüdaasid mängivad tähtsat rolli sulgrakkude ABA-toimelisel sulgumisel (Murata jt 2001) ja nende aktiveerimisel osaleb ka OST1 (Sirichandra jt 2009). CRK5 ja/või CRK31 võivad osaleda nii keskkonnafaktorite-toimelisel NADPH oksüdaasi aktiveerumisel (1) kui ka NADPH oksüdaasi poolt genereeritud ROS-ide tajumisel (2). Samuti on võimalik, et CRK-d tunnetavad otse keskkonnafaktorite (CO<sub>2</sub>, pimedus ja osoon) muutusi ja käivitavad signaalraja, mis viib õhulõhede sulgumiseni (3). Töös esitatud tulemused viitavad, et CRK31 funktsioneerib spetsiifiliselt O<sub>3</sub>-indutseeritud ja CRK5 kõigi kolme uuritud keskkonnafaktori-toimelisel õhulõhede sulgumisel. Küsimärgid tähistavad, et CRK5 ja CRK31 rakusisesed märklauad pole veel teada.

## 5 Kokkuvõte

Taimed reguleerivad süsihappegaasi omastamist ja veekadu lehepinnal paiknevate õhulõhede sulgemise ja avamisega. Pidevalt muutuv keskkonnas on õhulõhede regulatsioon taimede ellujäämiseks hädavajalik. Õhulõhede avatus sõltub neid moodustavate sulgrakkude turgorrõhust, mida omakorda kontrollivad plasmamembraanis asuvate pumpade ja ionikanalite süsteemid. Taimehormoon abtsiishape (ABA) tagab stressiolukorras õhulõhede sulgemise ABA retseptorkompleksi vahendusel, mis reguleerib erinevate ionikanalite ja pumpade koordineeritud inaktiveerumist/aktiveerumist ja ionide ja vee väljumist sulgrakkudest. Tsüsteiinirikkad retseptortüüpi kinaasid (CRK) on üheks võimalikuks stressisignaali edasikandjaks apoplastist raku sisse, kus asub ABA retseptorkompleks.

Uurisin oma magistritöös *Arabidopsis thaliana* (e.k müürlook) 48 erineva rikitud CRK-ga mutandi õhulõhede juhtivusi normaaltingimustel ja nende õhulõhede reaktsioone pimedusele ning kõrgetele CO<sub>2</sub> ja O<sub>3</sub> kontsentratsioonidele - faktoritele, mis põhjustavad õhulõhede sulgemist. Selgitamaks CRK-de rolli õhulõhede regulatsioonis, tegin katseid spetsiaalses läbivoolu põhimõttel töötavas gaasivahetussüsteemis, mis võimaldab mõõta intaktsete taimede õhulõhede juhtivuste käiku reaalajas. Katsetes käsitletud CRK-de T-DNA mutandikollektsioon pärines NASC-ist (Nottingham Arabidopsis Stock Centre). CRK-sid on *Arabidopsise* genoomis 44, millest 41 olid esindatud 1-2 mutandiga minu gaasivahetuskatsetes. Kaheksa *crk* mutandi puhul selgus, et vastava geeni ekspressioon ei olnud võrreldes metsiktüübiga langenud.

Läbiviidud katsete tulemusel leidsin, et CRK-d osalevad õhulõhede regulatsioonis. CRK5 oli õhulõhede käitumise oluline regulaator, sest taimeliinidel, kus CRK5 oli rikitud, oli sulgumine uuritud keskkonnafaktorite (pimedus, kõrge CO<sub>2</sub> ja O<sub>3</sub>) mõjul oluliselt vähenenud. Huvitava tulemusena selgus, et normaaltingimustel oli *crk5* mutandi õhulõhede juhtivus võrreldav metsiktüübi omaga ning et CRK5 on ekspresseerunud kogu lehes, mitte eelistatult sulgrakkudes. See teeb CRK5-st üsna unikaalse õhulõhede regulatsioonis osaleva geeni/valgu, mis kindlasti väärib edasist

uurimist. CRK31 puudumine põhjustas oluliselt vähenenud õhulõhede sulgumist O<sub>3</sub> mõjul, viidates, et CRK31 täidab spetsiifilist rolli osooniga seotud reaktsioonides. Ka CRK31 mutantide õhulõhede juhtivus oli normaaltingimustel võrreldav kontrolltaimede omaga. Lisaks identifitseeriti kaks CRK-d (CRK21 ja CRK24), mis osalevad õhulõhede avatuse määramises normaaltingimustel.

Käesoleva töö tulemused näitasid, et CRK-d osalevad õhulõhede regulatsioonis ning identifitseerisid CRK5 kui üldise ja CRK31 kui O<sub>3</sub>-spetsiifilise regulaatori. Nendele tulemustele toetudes on võimalik edasi minna ja uurida, milliste teiste valkudega interakteeruvad CRK5 ja CRK31, ning kuidas vastavad signalisatsioonirajad üldiselt taimede stressireaktsioonide regulatsioonil toimivad.

## **6 Tänuavaldused**

Kõige rohkem tahaksin tänada oma juhendajaid Ebe Merilot ja Hannes Kollistit, kelle heade ideede ja juhendamisel antud lõputöö valmis. Suured tänud ka Taimsete signaalide uurimisrühma kollektiivile, kes küsija suu pihta kunagi ei löönud.

## 7 Summary

### The role of *Arabidopsis thaliana* CRK kinases in stomatal regulation

Plants regulate the uptake of CO<sub>2</sub> and loss of water through closing and opening of the apertures of stomatal pores that are located on the leaf epidermis. This regulation is vital for plant survival in the ever-changing environment. Stomatal pores are formed by two surrounding guard cells, which control stomatal aperture through changes in guard cell turgor pressure. Thus, stomatal aperture is controlled by the activation and inactivation of pumps and ion channels in guard cell membranes. In stress conditions, the plant hormone abscisic acid (ABA) triggers stomatal closure through ABA receptor complex which controls the activation of guard cell ion channels and pumps. However, signaling from the stress perception in the apoplast to the activation of cytosolic ABA receptor complex is not resolved. One potential way to pass stress signal from the apoplast into the cytoplasm, is to utilize cysteine-rich receptor-like kinases (CRK).

Here, I examined the course of stomatal conductance in 48 different *Arabidopsis thaliana* CRK knock-out mutants in normal conditions and their responses to closure-inducing stimuli (elevated CO<sub>2</sub>, darkness, pulse of O<sub>3</sub>). Experiments were carried out with custom-made gas exchange device, which allows to measure whole-plant stomatal conductance in real time. The collection of CRK T-DNA mutants were ordered from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC). Out of 44 identified *Arabidopsis*'s CRK-s I used mutants for 41 CRK-s in my gas exchange experiments, and 7 CRK-s were represented by two different mutant lines. Compared to wild type, eight *crk* lines didn't show reduced expression of respective *CRK gene* in RT-PCR-based analysis.

My experiments showed that several CRKs are involved in stomatal regulation. CRK5 is an important regulator of stomatal movements, because its knock-out mutants showed reduced responses to environmental factors (darkness, elevated CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>). It is noteworthy that the steady-state stomatal conductance of *crk5* mutants was similar to wild type in normal conditions, and *CRK5* expression was not restricted to the guard cells, but to a whole leaf. Thus, CRK5 seems to be a unique gene/protein involved in stomatal regulation that definitely deserves further studies. In response to O<sub>3</sub>, the lack

of CRK31 caused significantly reduced stomatal closure, showing that CRK31 performs specific role in ozone-induced stomatal reactions. The steady-state stomatal conductance of crk31 was also similar to that of wild type in normal conditions. In addition, two CRKs (CRK21 and CRK24) were identified, which might play a role in controlling the stomatal aperture in normal conditions.

The results of the present study showed that CRKs are involved in plant stomatal regulation, and identified CRK5 as a major and CRK31 as an O<sub>3</sub>-specific stomatal regulator. Based on these results it is possible to move forward and study, which proteins interact with CRK5 and CRK31 and how do these closure-inducing signal pathways function in general.

## 8 Kasutatud kirjanduse loetelu

**Acharya, B.R., Raina, S., Maqbool, S.B., Jagadeeswaran, G., Mosher, S.L., Appel, H.M., Schultz, J.C., Klessig, D.F., Raina, R.** (2007) Overexpression of CRK13, an *Arabidopsis* cysteine-rich receptor-like kinase, results in enhanced resistance to *Pseudomonas syringae*. *Plant Journal* 50, 488–499.

**Alexander, S.A., Bergdahl, D.R., Cameron, E.A., Chevone, B.I., Davis, D.D.** (1985) *Diagnosing Injury to Eastern Forest Trees*, pp. 2–9. Pennsylvania State University, Pennsylvania.

**Ashmore, M.R.** (2005) Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell and Environment* 28, 949–964.

**Bojar, D., Martinez, J., Santiago, J., Rybin, V., Bayliss, R., Hothorn, M.** (2014) Crystal structures of the phosphorylated BRI1 kinase domain and implications for brassinosteroid signal initiation. *Plant Journal* 78, 31–43.

**Bourdais, G., Burdiak, P., Gauthier, A., Nitsch, L., Salojärvi, J., Channabasavangowda, R., Idänheimo, N., Oracz, K., Kaufholdt, D., Pallon, A., et al.** Large-scale phenomics reveals novel roles for the *Arabidopsis* CRK receptor-like kinase family in plant development and stress response. Manuscript submitted to *PLoS Biology*.

**Brutnell, T., Frommer, W.B.** (2012) Food for thought. *The Scientist* 06-2012, 23–25.

**Carlson, P.S.** (1980) *The Biology of Crop Productivity*. Academic Press, New York.

**Chen, Z.** (2001) A Superfamily of Proteins with Novel Cysteine-Rich Repeats. *Plant Physiology* 126, 473–476.

**Chen, K., Du, L., Chen, Z.** (2003) Sensitization of defense responses and activation of programmed cell death by a pathogen-induced receptor-like protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 53, 61–74.

- Chen, K., Fan, B., Du, L., Chen, Z.** (2004) Activation of hypersensitive cell death by pathogen-induced receptor-like protein kinases from *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 56, 271–283.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., Felix, G.** (2006) The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *The Plant Cell* 18, 465–476.
- Clark, S.E., Running, M.P., Meyerowitz, E.M.** (1993) *CLAVATA1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* 119, 397–418.
- Comprehensive Assessment of Water Management in Agriculture.** (2007) *Water for Food, Water for Life: A Comprehensive Assessment of Water Management in Agriculture* (ed. Molden, D.), pp. 1–20. International Water Management Institute, London.
- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R., Abrams, S.R.** (2010) Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annual Review of Plant Biology* 61, 651–79.
- Czernic, P., Visser, B., Sun, W., Savoure, A., Deslandes, L., Marco, Y., Van Montagu, M., Verbruggen, N.** (1999) Characterization of an *Arabidopsis thaliana* receptor-like protein kinase gene activated by oxidative stress and pathogen attack. *The Plant Journal* 18, 321–327.
- Ederli, L., Madeo, L., Calderini, O., Gehring, C., Moretti, C., Buonauro, R., Paolocci, F., Pasqualini, S.** (2011) The *Arabidopsis thaliana* cysteine-rich receptor-like kinase CRK20 modulates host responses to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 infection. *Journal of Plant Physiology* 168, 1784–1794.
- Fitter, H.A., Hay, R.** (2002) *Environmental Physiology of Plants*, pp. 167–172. Academic Press, San Diego.
- Foley, J., Ramankutty, N., Brauman, K., Cassidy, E., Gerber, J.S., Johnston, M., Mueller, M.D., O’Connell, C., Ray, D.K., West, P.C., et al.** (2011) Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478, 337–342.

- Fujita, T., Noguchi, K., Terashima, I.** (2013) Apoplastic mesophyll signals induce rapid stomatal responses to CO<sub>2</sub> in *Commelina communis*. *New Phytologist* 199, 395–406.
- Geiger, D., Sherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K.A.S., et al.** (2009) Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The Unides States of America* 106, 21425–21430.
- Geiger, D., Sherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Wellmann, C., Al-Rasheid, K.A.S., Grill, E., et al.** (2010) Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca<sup>2+</sup> affinities. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The Unides States of America* 107, 8023–2028.
- Hashimoto, M., Negi, J., Young, J., Israelsson, M., Schroeder, J.I., Iba, K.** (2006) *Arabidopsis* HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO<sub>2</sub>. *Nature Cell Biology* 8, 391–U52.
- He, Z., Wang, Z.Y., Li, J., Zhu, Q., Lamb, C., Ronald, P., Chory, J.** (2000) Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. *Science* 288, 2360–2363.
- Hetherington, A.M., Woodward, F.I.** (2003) The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 424, 901–908.
- Idänheimo, N., Gauthier, A., Salojärvi, J., Siligato, R., Brosche, M., Kollist, H., Mahonen, A.P., Kangasjärvi, J., Wrzaczek, M.** (2014) The *Arabidopsis thaliana* cysteine-rich receptor-like kinases CRK6 and CRK7 protect against apoplastic oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 445, 457–462.
- Jones, R., Ougham, H., Thomas, H., Waaland, S.** (2013) *The Molecular Life of Plants*, pp. 525-569. Wiley-Blackwell, New Jersey.

- Katsir, L., Davies, K.A., Bergmann, D.C., Laux, T.** (2011) Peptide signaling in plant development. *Current Biology* 21, R356–R364.
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Vergne, P., Sifakis, N., Sanz, M.J., Rasmussen, S., Ro-Poulsen, H., Ribas, A., Penuelas, J., et al.** (2006) Ozone pollution and ozone biomonitoring in European cities Part II. Ozone-induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. *Atmospheric Environment* 40, 7437–7448.
- Kolla, V.A., Vavasseur, A., Raghavendra, A.S.** (2007) Hydrogen peroxide production is an early event during bicarbonate induced stomatal closure in abaxial epidermis of *Arabidopsis*. *Planta* 225, 1421–1429.
- Kollist, T., Moldau, H., Rasulov, B., Oja, V., Rämme, H., Huve, K., Jaspers, P., Kangasjärvi, J., Kollist, H.** (2007) A novel device detects a rapid ozone-induced transient stomatal closure in intact *Arabidopsis* and its absence in *abi2* mutant. *Physiologia Plantarum* 129, 796–803.
- Kollist, H., Moldau, H., Vahisalu, T.** (2010) Taimede osoonitaluvusest õhulõhede regulatsioonimehhanismideni. *Eesti Vabariigi Teaduspreemiad*, lk. 122–136. Eesti Teaduste Akadeemia, Tallinn.
- Kollist, H., Jossier, M., Laanemets, K., Thomine, S.** (2011) Anion channels in plant cells. *FEBS Journal* 278, 4277–4292.
- Lambers, H., Chapin III, F.S., Pons, T.L.** (1998) *Plant Physiological Ecology*, pp. 195–196. Springer-Verlag, New York.
- Lehti-Shiu, M.D., Zou, C., Hanada, K., Shiu, S.H.** (2009) Evolutionary History and Stress Regulation of Plant Receptor-Like Kinase/Pelle Genes. *Plant Physiology* 150, 12–26.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., Grill, E.** (2009) Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324, 1064–1068.

- Merilo, E., Laanemets, K., Hu, H., Xue, S., Jakobson, L., Tulva, I., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, P.L., Schroeder, J.I., Brosche, M., Kollist, H.** (2013) PYR/RCAR Receptors Contribute to Ozone-, Reduced Air Humidity-, Darkness-, and CO<sub>2</sub>-Induced Stomatal Regulation. *Plant Physiology* 162, 1652–1668.
- Moldau, H., Vahisalu, T., Kollist, H.** (2011) Rapid stomatal closure triggered by a short ozone pulse is followed by reopening to overshooting values. *Plant Signaling & Behavior* 6, 311–313.
- Murata, Y., Pei, Z.M., Mori, I.C., Schroeder, J.** (2001) Abscisic acid activation of plasma membrane Ca<sup>2+</sup> channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell* 13, 2513–2523.
- Musselman, R.C., Lefohn, A.S., Massman, W.J., Heath, R.L.** (2006) A critical review and analysis of the use of exposure- and flux-based ozone indices for predicting vegetation effects. *Atmospheric Environment* 40, 1869–1888.
- Oh, M.H., Clouse, S.D., Huber, S.C.** (2012) Tyrosine Phosphorylation of the BRI1 Receptor Kinase Occurs via a Post-Translational Modification and is Activated by the Juxtamembrane Domain. *Frontiers in Plant Science* 3, 175.
- Park, S.Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T-F.F., et al.** (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324, 1068–1071.
- Roelfsema, M.R.G., Hanstein, S., Felle, H.H., Hedrich, R.** (2002) CO<sub>2</sub> provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *Plant Journal* 32, 65–75.
- Schroeder, J.I., Kwak, J.M., Allen, G.J.** (2001) Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* 410, 327–330.

- She, X.P., Huang, A.X., Li, J., Han, X.Z.** (2010) Inhibition of dark-induced stomatal closure by fusicoccin involves a removal of hydrogen peroxide in guard cells of *Vicia faba*. *Physiologia Plantarum* 140, 258–268.
- Shimazaki, K-I., Doi, M., Assmann, S.M., Kinoshita, T.** (2007) Light Regulation of Stomatal Movement. *Annual Review of Plant Biology* 58, 219–247.
- Shiu, S.H., Bleecker, A.B.** (2001a) Plant Receptor-Like Kinase Gene Family: Diversity, Function, and Signaling. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* 113, re22.
- Shiu, S.H., Bleecker, A.B.** (2001b) Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* 98, 10763–10768.
- Shiu, S.H., Bleecker, A.B.** (2003) Expansion of the Receptor-Like Kinase/Pelle Gene Family and Receptor-Like Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 132, 530–543.
- Shiu, S.H., Karlowski, W.M., Pan, R., Tzeng, Y.H., Mayer, K.F., Li, W.H.** (2004) Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *The Plant Cell* 16, 1220–1234.
- Sirichandra, C., Gu, D., Hu, H.C., Davanture, M., Lee, S., Djaoui, M., Valot, B., Zivy, M., Leung, J., Merlot, S., et al.** (2009) Phosphorylation of the *Arabidopsis* AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Letters* 583, 2982–2986.
- Tanaka, H., Osakabe, Y., Katsura, S., Mizuno, S., Maruyama, K., Kusakabe, K., Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2012) Abiotic stress-inducible receptor-like kinases negatively control ABA signaling in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 70, 599–613.
- Trnka, M., Olesen, J.E., Kersebaum, K.C., Skjelvag, A.O., Eitzinger, J., Seguin, B., Peltonen-Sainio, P., Rotter, R., Iglesias, A., Orlandini, S., et al.** (2011) Agroclimatic conditions in Europe under climate change. *Global Change Biology* 17, 2298–2318.

**Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y-F., Nishimura, N., Chan, W-Y., Valerio, G., Lamminmäki, A., Brosché, M., Moldau, H., Desikan, R., et al. (2008)** SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* 452, 487–493.

**Vahisalu, T., Puzõrjova, I., Brosche, M., Valk, E., Lepiku, M., Moldau, H., Pechter, P., Wang, Y-S., Lindgren, O., Salojärvi, J., et al. (2010)** Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *The Plant Journal* 62, 442–453.

**Wrzaczek, M., Brosche, M., Salojärvi, J., Kangasjärvi, S., Idäheimo, N., Mersmann, S., Robatzek, S., Karpinski, S., Karpinska, B., Kangasjärvi, J. (2010)** Transcriptional regulation of the CRK/DUF26 group of Receptor-like protein kinases by ozone and plant hormones in Arabidopsis. *BMC Plant Biology* 10, 95.

**Xue, S.W., Hu, H.H., Ries, A., Merilo, E., Kollist, H., Schroeder, J.I. (2011)** Central functions of bicarbonate in S-type anion channel activation and OST1 protein kinase in CO<sub>2</sub> signal transduction in guard cell. *Embo Journal* 30, 1645–1658.

### **Kasutatud veebiaadressid**

TAIR: The Arabidopsis Information Resource, <http://www.arabidopsis.org/>  
(17.05.2014)

uNASc: The European Arabidopsis Stock Centre, <http://www.arabidopsis.info/>  
(20.05.2014)

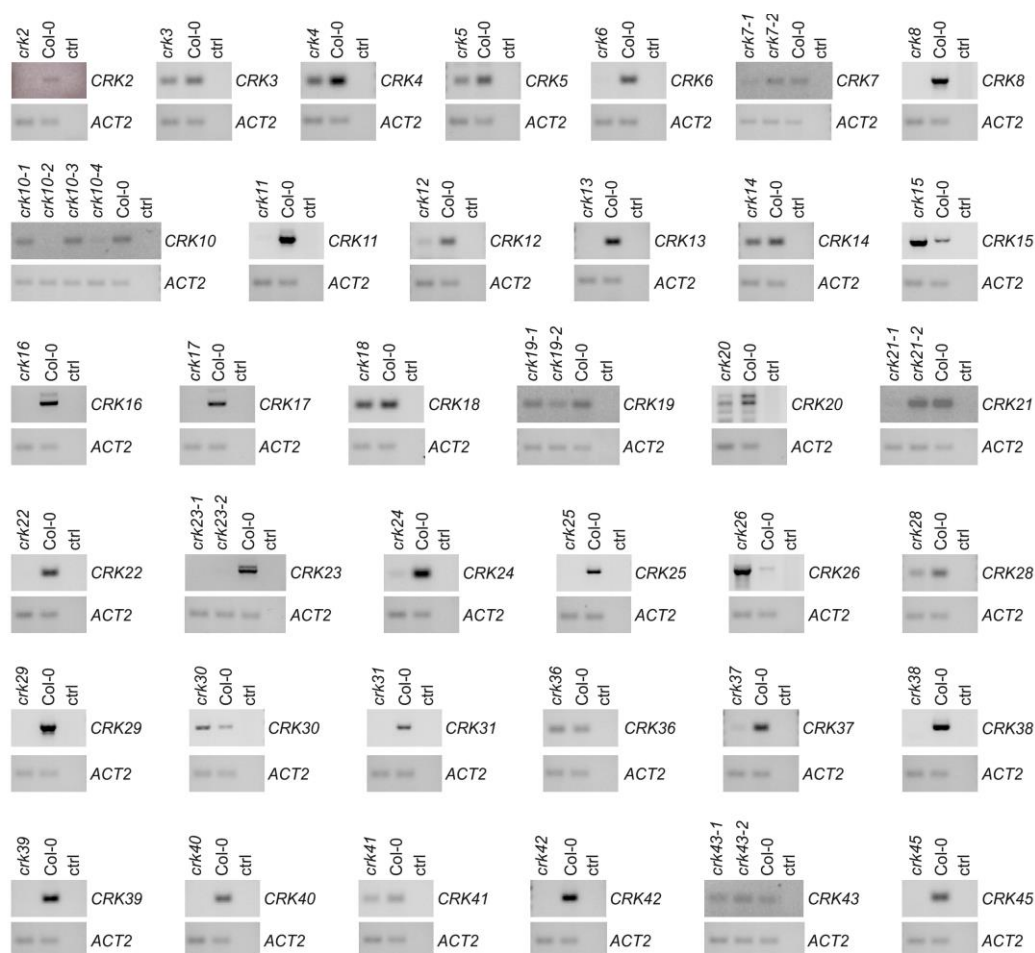
## Lisad



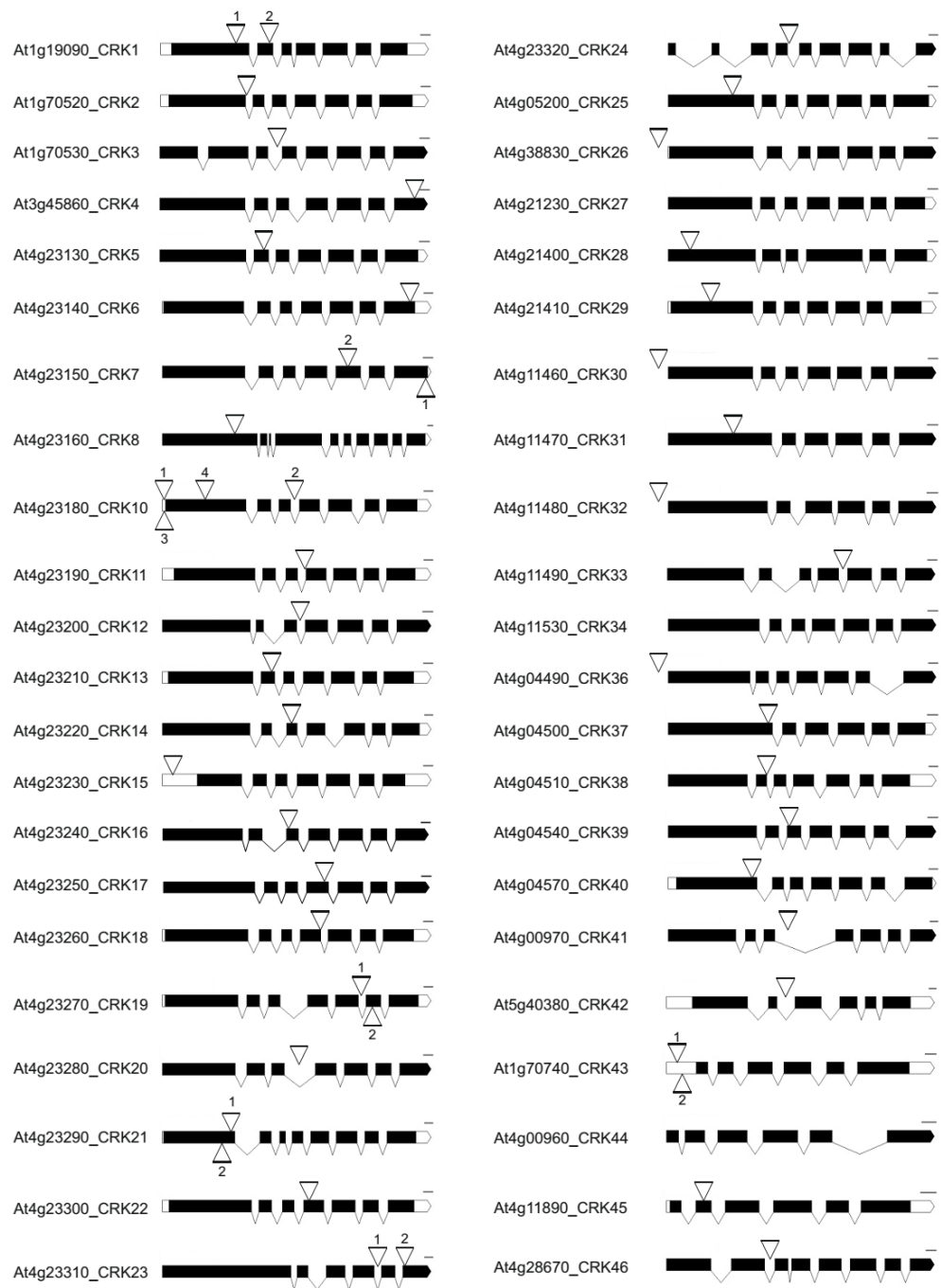
**Lisajoonis 1.** Mutandi *crk2* (ülemine) ja metsiktüübi Col-0 (alumine) 25-päevased taimed.

**Lisatabel 1.** CRK mutantide transkriptsiooni kokkuvõte. Allikas: Bourdais jt

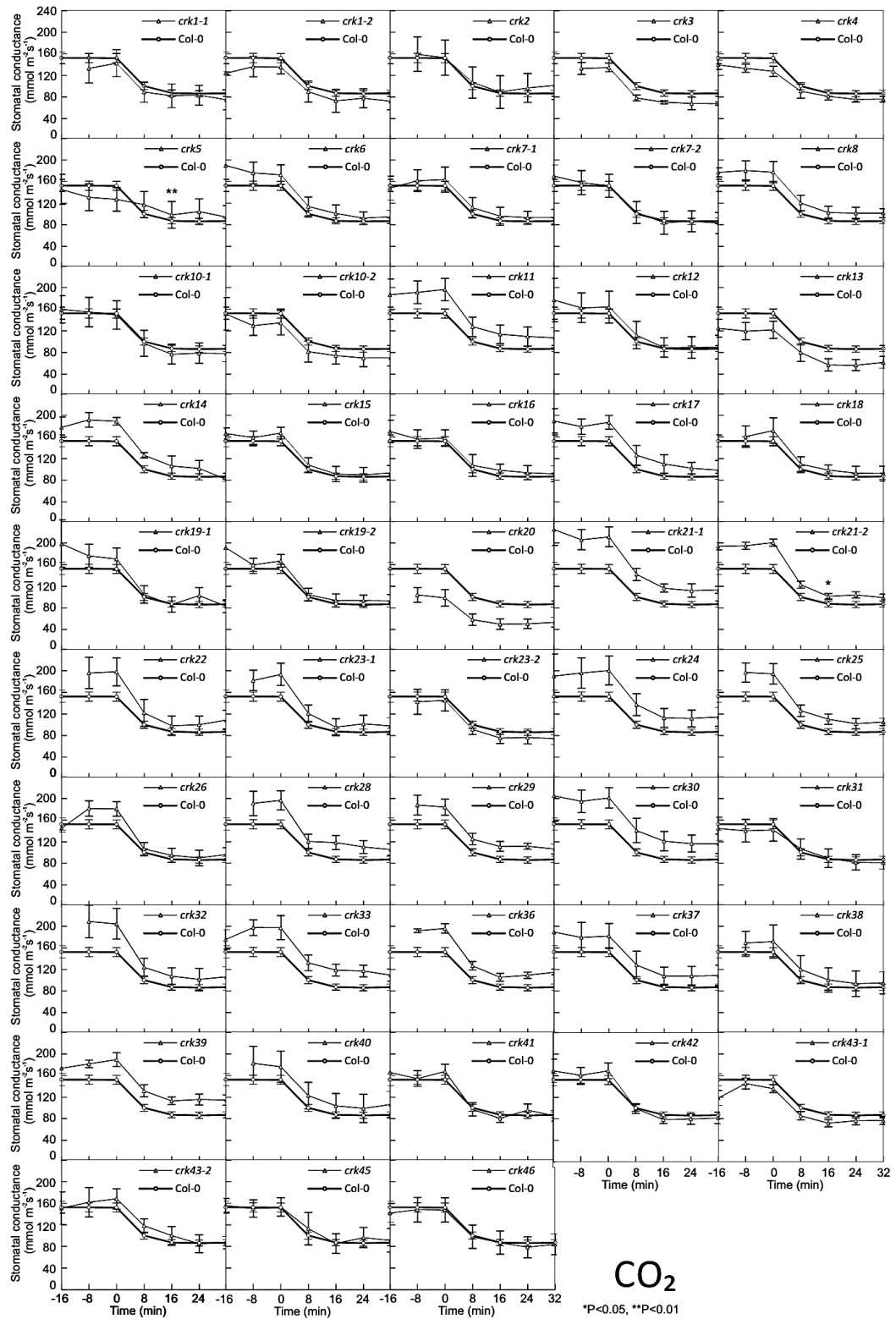
Total number of individual <i>crk</i> lines	50		
Transcript not detected in mutant	24 (52.2%)	19 with 1 insert	1 with 2 inserts
Transcript levels reduced in mutant	13 (28.3%)	4 with 1 insert	7 with 2 inserts
Transcript levels not changed or increased in mutant compared to wild type	8 (17.4%)	3 with 1 insert	4 with 2 inserts
Not determined (no transcript detected in Col-0)	4		
CRKs for which no homozygous insertion lines were obtained	3		
<b>Insert numbers</b>			
1 insert	27 (54.0%)		
2 inserts	13 (26.0%)		
>2 inserts	10 (20.0%)		



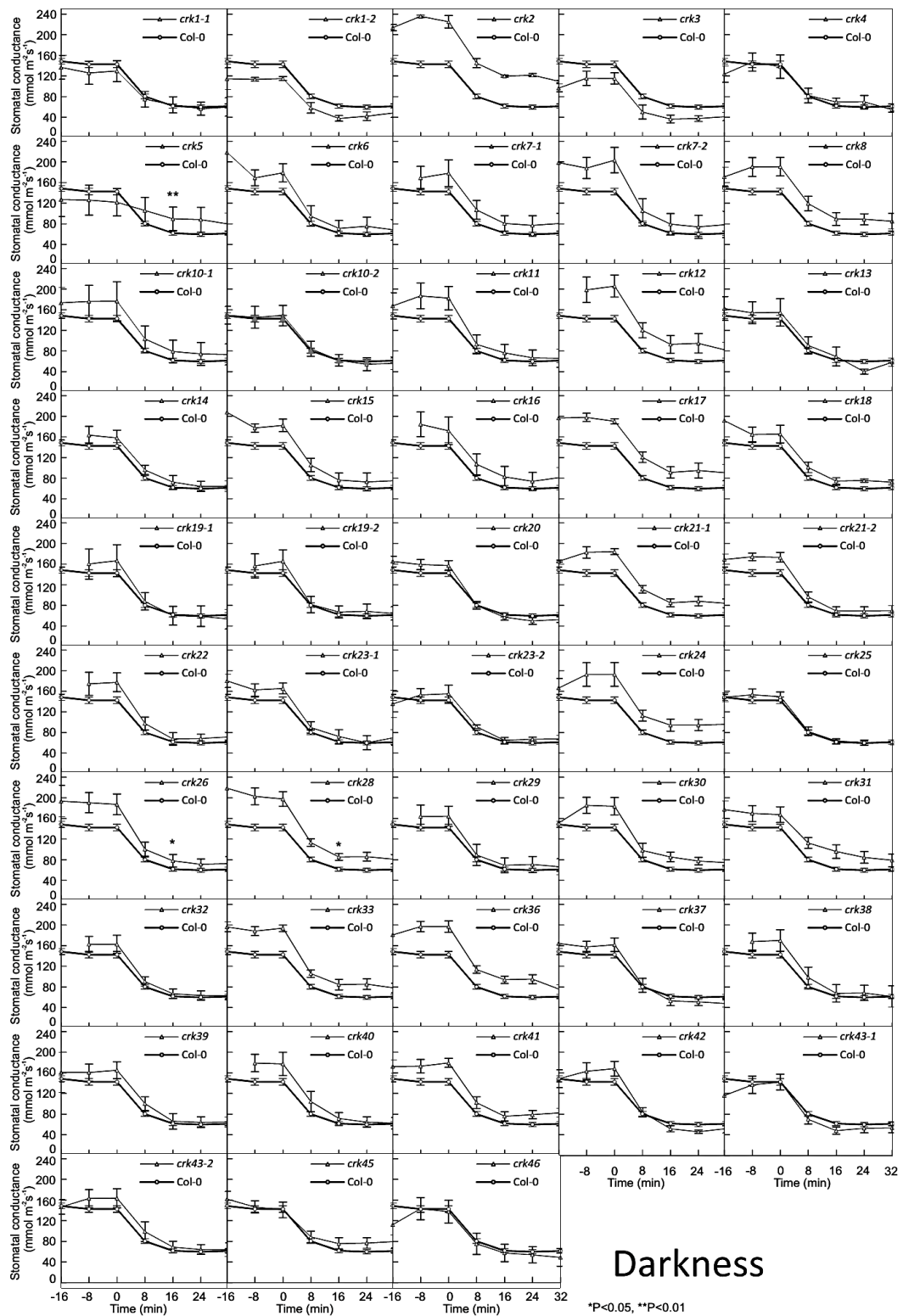
**Lisajoonis 2.** RT-PCR meetodil baseeruv *crk* mutantide vastavate CRKde ekspresseerumine võrreldes metsiktüübiga. Ülemised ja alumised kastid näitavad amplikonide produktsiooni, kasutades vastavalt *CRK* ja *ACT2* geenide spetsiifilisi primereid. Amplikone ei saadud üldse *CRK1*, *CRK32*, *CRK33* ja *CRK46* spetsiifilisi primereid kasutades. Tumedus näitab geeniekspressiooni taset.. Allikas: Bourdais jt.



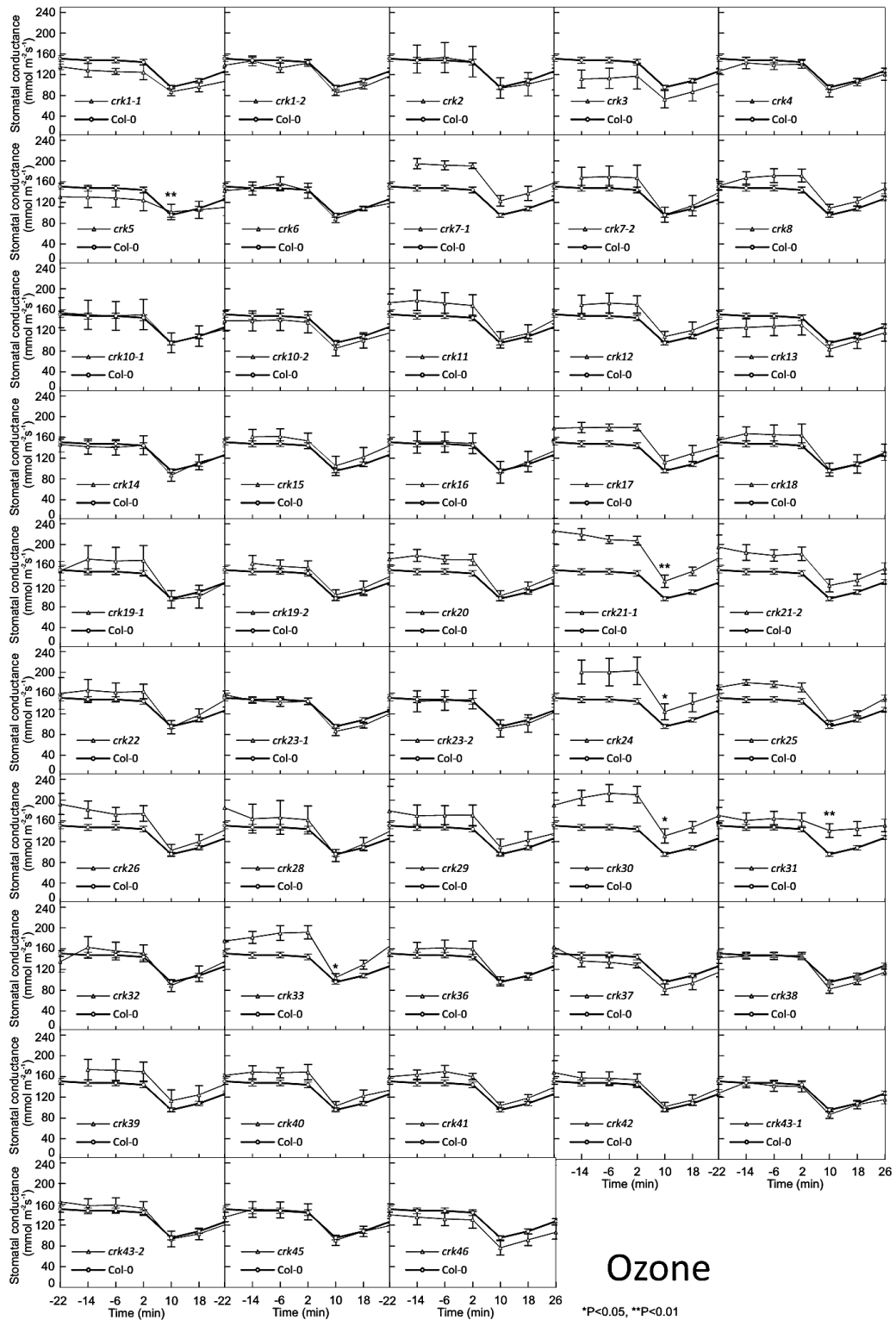
**Lisajoonis 3.** T-DNA insertioonide positsioonid *crk* mutantides. Allikas: Bourdais jt.



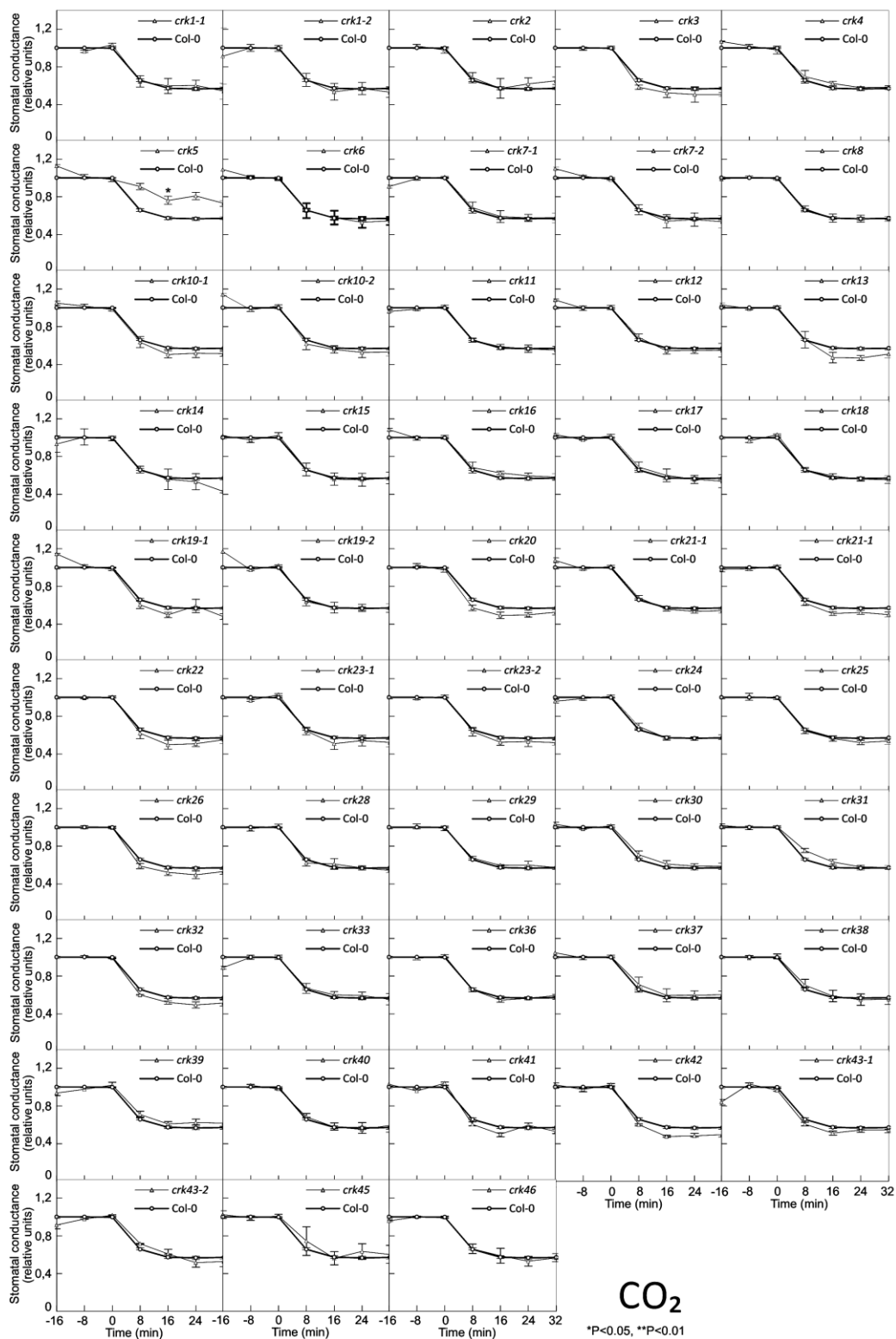
**Lisajoonis 4.** Töös uuritud *crk* mutantide keskmised õhulõhede juhtivuse käigud CO<sub>2</sub> katsetes. Tärnid tähistavad mutantide statistiliselt olulist erinevust metsiktüübist \* p<0,05 ja \*\* p<0,01. Vearistid tähistavad ±SEM (n≥3, Col-0 n=35). Ajahetkel 0 tõsteti CO<sub>2</sub> kontsentratsioon 400 ppm-i pealt 800 peale.



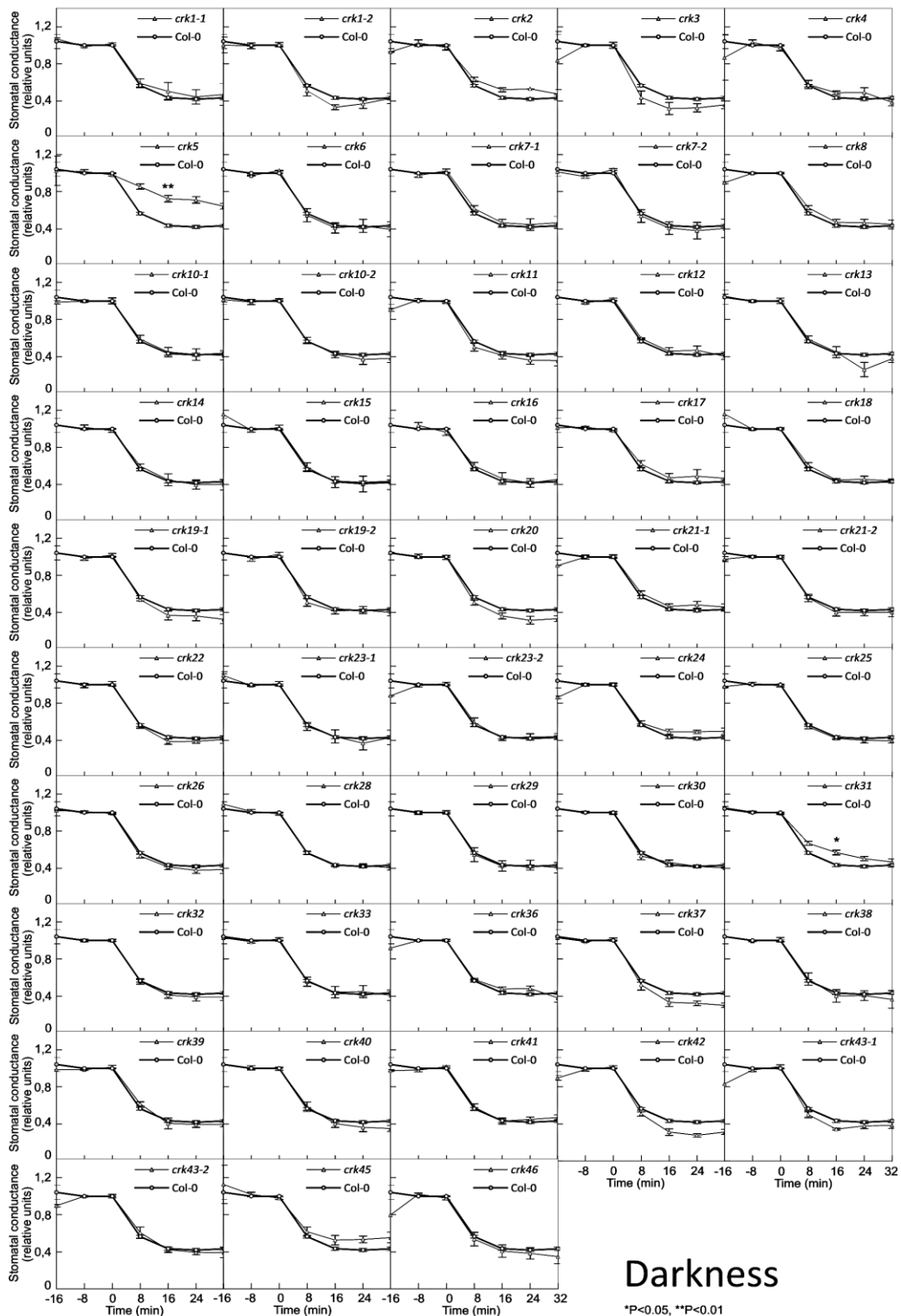
**Lisajoonis 5.** Töös uuritud *crk* mutantide keskmised õhulõhede juhtivuse käigud pimeduse katsetes. Tärnid tähistavad mutantide statistiliselt olulist erinevust metsiktüübist \*  $p < 0,05$  ja \*\*  $p < 0,01$ . Vearistid tähistavad  $\pm$ SEM ( $n \geq 3$ , Col-0  $n = 40$ ). Pimedust rakendati ajahetkel 0.



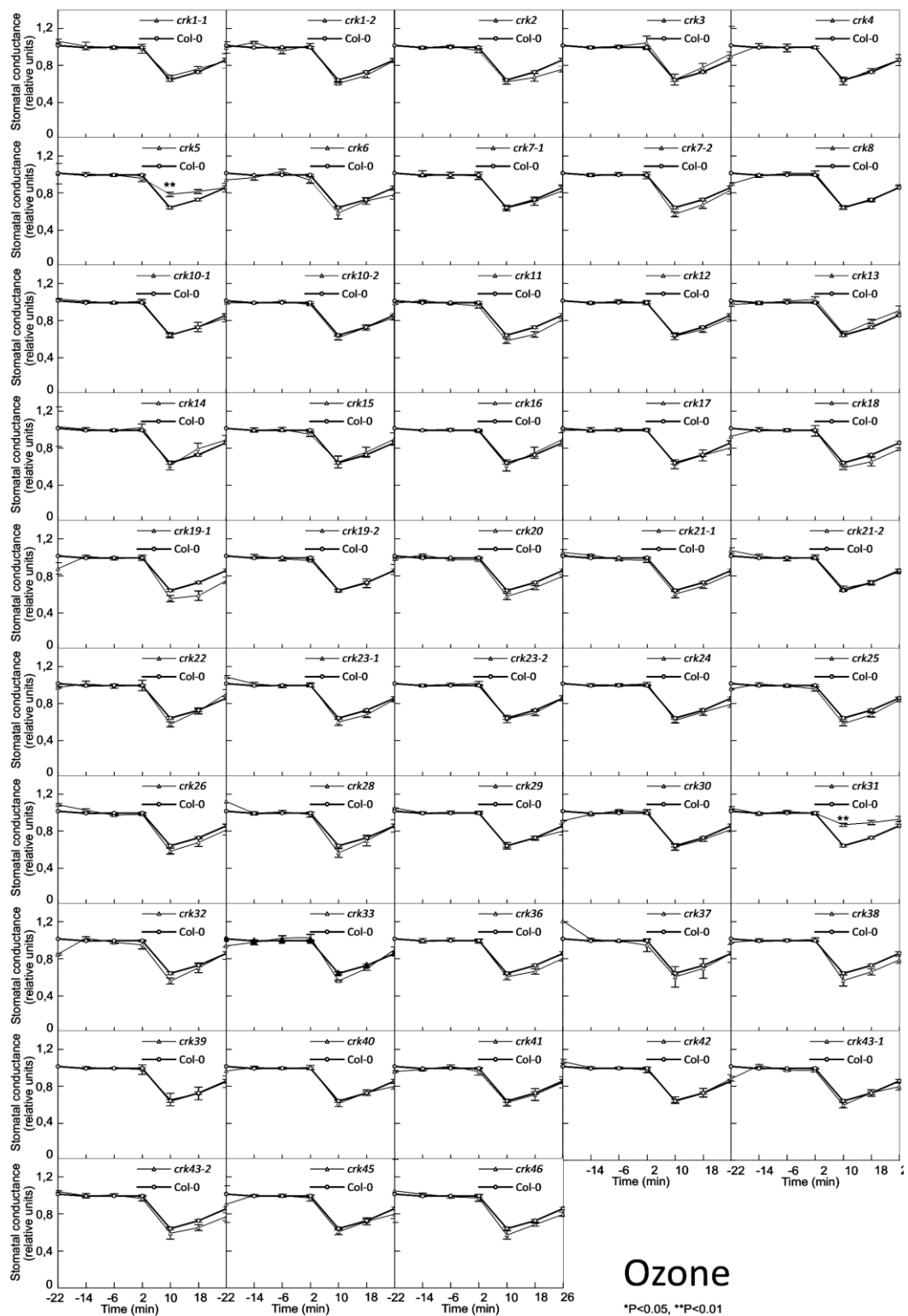
**Lisajoonis 6.** Töös uuritud *crk* mutantide keskmised õhulõhede juhtivuse käigud osooni katsetes. Tärnid tähistavad mutantide statistiliselt olulist erinevust metsiktüübist \*  $p < 0,05$  ja \*\*  $p < 0,01$ . Vearistid tähistavad  $\pm$ SEM ( $n \geq 3$ , Col-0  $n = 43$ ). Neljaminutilise  $O_3$  pulssi kontsentratsiooniga 500-600 ppb anti ajahetkel 0.



**Lisajoonis 7.** Töös uuritud *crk* mutantide keskmised relatiivsed õhulõhede juhtivuse käigud CO<sub>2</sub> katsetes. Tärnid tähistavad mutantide statistiliselt olulist erinevust metsiktüübist \* p<0,05 ja \*\* p<0,01. Vearistid tähistavad ±SEM (n≥3, Col-0 n=35). Ajahetkel 0 tõsteti CO<sub>2</sub> kontsentratsioon 400 ppm-i pealt 800 peale.



**Lisajoonis 8.** Töös uuritud *crk* mutantide keskmised relatiivsed õhulõhede juhtivuse käigud pimeduse katsetes. Tärnid tähistavad mutantide statistiliselt olulist erinevust metsiktüübist \*  $p < 0,05$  ja \*\*  $p < 0,01$ . Veariistid tähistavad  $\pm$ SEM ( $n \geq 3$ , Col-0  $n = 40$ ). Pimedust rakendati ajahetkel 0.



**Lisajoonis 9.** Töös uuritud *crk* mutantide keskmised relatiivsed õhulõhede juhtivuse käigud osooni katsetes. Tärnid tähistavad mutantide statistiliselt olulist erinevust metsiktüübist \*  $p < 0,05$  ja \*\*  $p < 0,01$ . Veariistid tähistavad  $\pm$ SEM ( $n \geq 3$ , Col-0  $n = 43$ ). Neljaminutilise  $O_3$  pulssi kontsentratsiooniga 500-600 ppb anti ajahetkel 0.

**Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, \_\_\_\_\_ Andres Pallon \_\_\_\_\_,  
(*autori nimi*)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose  
“Arabidopsis thaliana CRK kinaaside roll õhulõhede regulatsioonis“  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendajad on \_\_\_\_\_ Dr. Ebe Merilo ja Dr. Hannes Kollist \_\_\_\_\_,  
(*juhendaja nimi*)

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **27.05.2014**