

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Õhulõhede tihedus, indeks ja juhtivus ABA signaalraja ja õhulõhede arengu mutantidel

Bakalaureusetöö

12 EAP

Hanna Vask

Juhendajad PhD Pirko Jalakas,

PhD Ebe Merilo

TARTU 2021

INFOLEHT

Õhulõhede tihedus, indeks ja juhtivus ABA signaalraja ja õhulõhede arengu mutantidel

Taime gaasivahetus – CO₂ difundeerumine taime ja vee aurustumine taimelehtedest – toimub läbi õhulõhede, mis on taimelehtede pinnal asuvad väikesed sulgrakkudega ümbritsetud poorid. Muutes õhupilu avatust sõltuvalt keskkonnatingimustest, saab taim transpiratsioonist tingitud veekadu kiiresti reguleerida. Pikemas ajaskaalas saab transpiratsiooni reguleerida ka õhulõhede tiheduse muutmisega. Mõistes õhulõhesid iseloomustavaid tunnuseid ja nendevahelisi seoseid ning kuidas mingi geen õhulõhede arengut või funktsiooni mõjutab, on võimalik luua taimi, mis sobivad paremini tulevikukliimasse. Sellest ajendatult uuriti käesolevas töös seoseid õhulõhede tiheduse, indeksi ja juhtivuse vahel hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) Col-0 metsiktüüpi ning ABA signalisatsiooni ja biosünteesi, samuti õhulõhede arengu häiretega taimedes. Töö tulemuste põhjal selgus, et defektid ABA signalisatsioonis mõjutavad õhulõhede arengut, kuid mitte nii konkreetselt kui siis, kui defektsed on õhulõhede arenguga seotud geenid. Samas on ABA signaalraja defektidel väga suur mõju õhulõhede juhtivusele.

Õhulõhe, taim, gaasivahetus, õhulõhede tihedus, õhulõhede indeks, õhulõhede juhtivus, õhulõhede areng

CERCS: B310 Soontaimede füsioloogia

Stomatal density, index and conductance in *Arabidopsis thaliana* ABA signalling and stomatal development mutants

Gas exchange in plants – CO₂ influx into the plant and water evaporation – is regulated by small pores on the surface of the leaves called stomata. Stomata are able to change rapidly the size of their aperture in response to endogenous and environmental signals. Being able to change the aperture is vital during drought adaption. In longer time scale, plants can also regulate their transpiration via stomatal density. Understanding the relations between different stomatal traits will enable to create plants that are more sustainable in future climate. This thesis aimed to study the connections between stomatal density, index and conductance in *Arabidopsis thaliana* Col-0 wild type and its mutants of ABA signalling and biosynthesis, as well as stomatal development. Results of this study show that defects in ABA signalling and synthesis affect the development of stomata, but not as significantly as mutations in genes which are related to the stomatal development directly. Stomatal conductance, on the other hand, is strongly affected by defects in ABA synthesis and signalling.

Stomata, plant, gas exchange, stomatal density, stomatal index, stomatal conductance, stomatal development

CERCS: B310 Physiology of vascular plants

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Harilik müürlook.....	8
1.2. Õhulõhed.....	8
1.2.1. Õhulõhede areng.....	9
1.2.1. Õhulõhede arengut mõjutavad tegurid	11
1.2.2. Õhulõhede tihedus	11
1.2.3. Õhulõhede juhtivus.....	12
2. EKSPERIMENTAALOSA	14
2.1. Töö eesmärgid.....	14
2.2. Materjalid ja meetodikad	14
2.2.1. Kasutatud taimed	14
2.2.2. Taimede kasvatamine	15
2.2.3. Lehejäljendite tegemine.....	15
2.2.4. Õhulõhede tiheduse ja indeksi määramine, juhtivuse mõõtmine	15
2.2.5. Statistiline analüüs.....	16
2.3. Tulemused.....	18
2.3.1. Õhulõhede tihedus	18
2.3.2. Õhulõhede indeks	20
2.3.3. Õhulõhede juhtivus.....	22
2.3.4. Korrelatsioon õhulõhede tiheduse ja juhtivuse vahel	23
2.4. Arutelu	24
2.4.1. Metsiktüüp Col-0 õhulõhede tihedus ja juhtivus.....	24
2.4.2. Mutantide <i>abi1-1</i> , <i>quac1-1slac1-3slah3-1</i> ja <i>abi1-1quac1-1slac1-3slah3-1</i> õhulõhede tihedus ja juhtivus.....	24
2.4.3. <i>Nced3nced5</i> ja <i>epf1epf2</i> tihedus ja juhtivus	25
2.4.4. Töös kasutatud taimede õhulõhede tihedus, indeks ja juhtivus.....	26

KOKKUVÕTE	28
SUMMARY	29
TÄNUAVALDUSED.....	30
KASUTATUD KIRJANDUS	31
LISAD	36
Lisa 1.....	36
Lisa 2.....	37
LIHTLITSENTS.....	38

KASUTATUD LÜHENDID

[CO ₂]	süsihappegaasi kontsentratsioon
ABA	ABSCISIC ACID; abstsiihape, taimehormoon
ABI1	ABA INSENSITIVE 1; ABA-signaalraja negatiivne regulaator, 2C tüüpi fosfataas
EPF	EPIDERMAL PATTERNING FACTOR; epidermi mustri moodustumise faktor, signaalvalk
GMC	GUARD MOTHER CELL; sulgrakkude emarakk
MMC	MERISTEMOID MOTHER CELL; meristemoidi emarakk
NCED3/5	NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 3/5; 9-cis-epoksükarotenoid dioksügenaas, ABA biosünteesi võtmeensüüm
PP2C	PROTEIN PHOSPHATASE 2C; 2C tüüpi proteiinfosfataas, ABA signaalraja negatiivne regulaator
PYR/PYL/RCAR	PYRABACTIN RESISTANCE/PYR-LIKE/REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR; ABA retseptor
QUAC1/ALMT12	QUICK-ACTIVATING ANION CHANNEL 1/ALUMINIUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 12; kiirelt aktiveeruv sulgraku anioonkanal/alumiiniumi kaudu aktiveeritud malaadi transporter 12
SD	STOMATAL DENSITY; õhulõhede tihedus
SI	STOMATAL INDEX; õhulõhede indeks
SLAC1	SLOW TYPE ANION CHANNEL 1; aeglast tüüpi sulgraku anioonkanal
SLAH3	SLAC1 HOMOLOGUE 3; aeglast tüüpi sulgraku anioonkanal, SLAC1 homoloog
SLGC	STOMATAL LINEAGE GROUND CELL; õhulõhe eellasliini põhirakk

SISSEJUHATUS

Taimed, fotosünteesivad organismid, vajavad orgaaniliste ühendite tootmiseks lisaks päikeseenergiale ja mineraalainetele ka vett ja süsinikdioksiidi. Fotosünteesi kõrvalproduktina eraldub kõikidele aeroobsete organismidele vajalik hapnik. Nii süsihappegaasi sisenemine taime kui ka hapniku vabanemine toimuvad õhulõhede kaudu. Läbi õhulõhede aurustub ka taimede jaoks eluliselt oluline vesi.

Õhulõhed on taimelehtede pinnal asuvad väikesed sulgrakkudega ümbritsetud poorid, mille kaudu leiab aset taime gaasivahetus – taime difundeerub CO₂ ja toimub transpiratsioon (vee aurumine taimelehtedest). Vett aurustub õhulõhede kaudu proportsionaalselt kordades enam, kui siseneb taime süsihappegaasi. Õhulõhed on võimelised transpiratsiooni õhupilu laiuse muutmise reguleerima. Õhulõhede avatuna hoidmise kasumlikkus sõltub keskkonnast: kui muld või atmosfäär on kuivad, tuleks veeкао vähendamiseks õhupilu laiust vähendada. Kui vett on piisavalt, aitab õhulõhede avatuna hoidmine tõsta fotosünteesi ja sellega ka produktsiooni. Üldiselt on põllumajanduslike taimede õhulõhede juhtivus positiivses korrelatsioonis saagiga, kinnitades õhulõhede avatuna hoidmise olulisust (Roche, 2013). Pikemas ajaskaalas saab transpiratsiooni reguleerida ka õhulõhede tiheduse muutmise – sel juhul tehakse õhulõhesid lehe pinnaühiku kohta rohkem või vähem (Hetherington ja Woodward, 2003). Võib öelda, et õhulõhede tihedus ja juhtivus kujutavad endast pikemas ja lühemas ajaskaalas toimuvat transpiratsiooni reguleerimise vahendit. Mõistes seoseid õhulõhede tiheduse ja juhtivuse vahel, samuti õhulõhedega seotud tunnuste varieerumist taimes ning ja teades, kuidas mingi geen õhulõhede arengut või funktsiooni mõjutab, on võimalik aretada taimi, mis suudavad säilitada oma optimaalse kasvu ja funktsioneerimise ka ekstreemsetes keskkonnatingimustes.

Käesoleva töö eesmärk oli uurida, kuidas mõjutavad defektid ühelt poolt taimse stressihormooni abstsissiishappe (ABA) sünteesis ja signaalraja geenides ning teisalt õhulõhede arengut mõjutavates geenides selliseid õhulõhedega seotud tunnuseid nagu õhulõhede tihedus, indeks ja juhtivus. Uuriti korrelatsiooni õhulõhede tiheduse ja juhtivuse vahel ABA signalisatsiooni ja sünteesi ning õhulõhede arengu mutantidel. Õhulõhede tiheduse, indeksi ja juhtivuse uurimiseks kasutati hariliku müürlooga metsiktüüpi Col-0 ja mutantseid taimeliine. Taimelehtedest valmistati lehejäljendid, millelt sai mikroskoobi abil määrata õhulõhede tihedust ja indeksit. Taimede õhulõhede juhtivuse mõõtmiseks kasutati gaasivahetusseadet, mis mõõdab mõõtekambrisse siseneva ja sealt väljuva õhu veeauru kontsentratsioonide vahest transpiratsiooni ning arvutab mõõdetud lehetemperatuuri kasutades õhulõhede juhtivuse. Teadmised õhulõhede tiheduse, indeksi ja juhtivuse seoste kohta aitavad hinnata võimalusi

tulevikus paremini hakkamasaavate taimede aretamiseks. Näiteks teraviljadel on näidatud, et ka siin töös uuritud geenide EPF1 ja EPF2 ekspressiooni muutmisega loodi põuatolerantsed riisi- ja odraliinid (Caine jt, 2018; Hughes jt, 2017).

Töö teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Harilik müürlook

Harilik müürlook (ld *Arabidopsis thaliana*) on taimeteaduses tuntud kui väga oluline mudelorganism. Seda tänu taime lühikesele elutsüklile (6–8 nädalat), iseviljastumisele, vähenõudlikkusele kasvutingimuste osas ja võrdlemisi väikesele genoomile (Krämer, 2015). Ühtlasi on harilik müürlook esimene taim, mille viiest kromosoomist koosnev genoom täielikult sekveneeriti. See on andnud võimaluse tuvastada alates 2000. aastast taimespetsiifilisi ja põllumajanduskultuuride saagikusega seotud geene (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

1.2. Õhulõhed

Õhulõhed on taimelehe pinnal, epidermis, asuvad poorid, mis koosnevad õhupilust ja seda ümbritsevast kahest sulgrakust. Sulgrakkude kuju järgi jaotatakse õhulõhed hantlikujulisteks (esinevad kõrrelistel) ja neerukujulisteks (esinevad teistel maismaataimedel sh harilikul müürloogal) (Hetherington ja Woodward, 2003). Neid võib moodustuda lehe ühele või mõlemale küljele (Zoulas jt, 2018). Olenevalt liigist ja keskkonnatingimustest võivad õhulõhed olla 10–80 µm pikad (Hetherington ja Woodward, 2003) ning hõlmata umbes 5% lehe pindalast (Willmer ja Fricker, 1996). Evolutsioonilises skaalas oli õhulõhede moodustumise aluseks taimede kolimine maismaale, kus ellujäämiseks oli oluline vähendada veekadu maapealsetes kudedes. Nii kujunes õhulõhede kõige olulisemaks ülesandeks reguleerida taime transpiratsiooni. Õhulõhedel on ka teisi rolle, näiteks CO₂ omastamine ja taime jahutamine (Martin ja Glover, 2007).

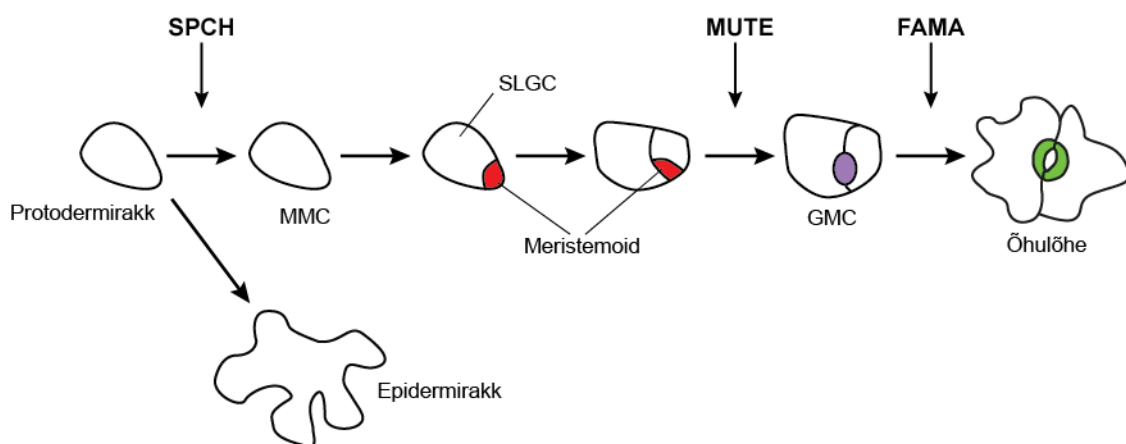
Õhulõhede peamine funktsioon on tagada taime gaasivahetus – läbi õhupilu difundeerub taimelehte fotosünteesiks vajalik süsihappegaas ning vabanevad veeaur ja hapnik. Gaasivahetuse reguleerimiseks muudab taim õhupilu avatust. Selleks, et õhulõhe avaneks, kogunevad K⁺, anioonid ja suhkur sulgrakkudesse, algatades nii vee liikumise rakku. Sulgrakud paisuvad ja õhupilu laius suureneb. Õhulõhe sulgumine on vastupidine protsess: ioonid ja vesi väljuvad sulgrakust (Schroeder jt, 2001).

Et tagada efektiivne gaasivahetus, on taimele oluline saavutada võimalikult optimaalne õhulõhede tihedus pinnaühiku kohta ja nende paiknemine epidermis (Larkin jt, 1997) – õhulõhede jaotumine epidermis võiks olla võimalikult ühtlane (Martin ja Glover, 2007). Taimedel on kujunenud välja ühe-raku-reegel, mis tähendab seda, et kahe õhulõhe vahele peab

jääma vähemalt üks epidermirakk (Larkin jt, 1997). Arvatakse, et selline muster tõstab gaasivahetuse efektiivsust, minimeerides seejuures veekadu (Papanatsiou jt, 2016). Reegli järgimise eest vastutavad rakkude väljaarenemise protsessi reguleerivad kompleksed signaalrajad.

1.2.1. Õhulõhede areng

Õhulõhede moodustumiseks läbivad õhulõhede eellasrakud asümmeetrilised ja sümmeetrilised rakujagunemised (Joonis 1). Esimeseks etapiks on protodermi raku arenemine meristemoidi emarakuks (MMC), mis jaguneb asümmeetriliselt. Jagunemisjärgselt tekib väiksem meristemoid ja suurem õhulõhe eellasliini põhirakk (SLGC). Järgmiseks etapiks on neli erinevat võimalust: 1) SLGC jaguneb, mille tulemusel moodustub kaks epidermirakuga eraldatud meristemoidi; 2) meristemoid läbib jagunemisi, mille tulemusel moodustub veel SLGC-sid; 3) meristemoid areneb sulgrakkude emarakuks (GMC); 4) SLGC ja/või meristemoid väljuvad jagunemisest. Sulgrakkude emarakul on diferentseerumiseks kaks varianti – kas väljuda rakujagunemisest või poolduda ja moodustada seeläbi kaks sulgrakku. Kirjeldatud rakujagunemist reguleerivad kolm transkriptsioonifaktorit: SPCH (SPEECHLESS), MUTE ja FAMA. (Zoulias jt, 2018)



Joonis 1. Hariliku müürlooga õhulõhede arengu modifitseeritud joonis (Jalakas, 2019) protodermirakust õhulõheni.

Kolm transkriptsioonifaktorit – SPCH, MUTE ja FAMA – reguleerivad õhulõhede arengu ajal rakkude jagunemist ja diferentseerumist. Õhulõhede areng algab, kui protodermirakk diferentseerub meristemoidi emarakuks (MMC). MMC jaguneb asümmeetriliselt moodustades kompleksi õhulõhe eellasliini algrakust (SLGC) ja meristemoidist (punane). Meristemoid diferentseerub sulgrakkude emarakuks (GMC, lilla), mis pooldub sümmeetriliselt, moodustades kaks sulgrakku (roheline). Antud joonis kujutab üht õhulõhede arengu suunda, võimalikud SLGC väljumised õhulõhede eellasliinist on märkimata.

SPCH seondub kokku 8327 hariliku müürlooga geenisaidiga. Nendest umbes 70% on rakujagunemise, peptiidsignaalide ja meristemoidrakkude saatuse reguleerimisega seotud geenide promootorid (Lau jt, 2014). SPCH üleprodutseerimine päädib epidermiga, mis koosneb enamasti lõpuni jagunemata rakkudest. See vihib SPCH rollile kontrollida asümmeetrilist jagunemist ja rakujagunemise võimendamist. (MacAlister jt, 2006; Pillitteri jt, 2007)

MUTE vastutab meristemoidide GMCdeks diferentseerumise eest. Mutatsioon MUTES viib rakujagunemise peatumiseni juba meristemoidi staadiumis. Hariliku müürloogaga tehtud katsetest johtub, et MUTE üleekspressiooni korral koosneb epidermis peamiselt õhulõhedest. (MacAlister, 2006; Pillitteri jt, 2007)

FAMA reguleerib GMCde sümmeetrilist jagunemist ehk vastutab sulgrakkude moodustumise eest. FAMA termineerib pöördumatult meristemoidse rakujagunemise ning aktiveerib otseselt geene, mis on vajalikud sulgrakkude funktsioneerimiseks (Ohashi-Ito ja Bergmann, 2006).

Eelnimetatud transkriptsioonifaktorid on suhteliselt jäiga peptiidse signaalraja kontrolli all. Kolm selle signaalraja valku hariliku müürlooga lehtedes on: EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 1 ja 2 (EPF1, EPF2), mis avalduvad õhulõhede eellasliini rakkudes (Hara jt, 2007; Hara jt, 2009; Hunt ja Gray, 2009) ning STOMATOGEN (STOM/EPF-LIKE 9 (EPFL9)), mis avaldub mesofüllirakkudes (Sugano jt, 2009, Hunt jt, 2010). EPF1 ja EPF2 reguleerivad õhulõhede arengut negatiivselt (Lin jt, 2017), samas STOM reguleerib õhulõhede arengut positiivselt (Sugano jt, 2009; Hunt jt, 2010). Kuigi nii EPF1 kui ka EPF2 reguleerivad SPCH valgu taset (Jewaria jt, 2013), erinevad nende funktsioonid märgatavalt. EPF2 osaleb õhulõhede arengus varem, reguleerides SPCH ekspressiooni ning seega meristemoidide asümmeetrilist jagunemist (Hara jt, 2009). EPF1 kontrollib aga ühe-raku-reeglit meristemoidide hulgas (Hara jt, 2007) ning mängib rolli GMCde autokriinses regulatsioonis ja SLGCde õhulõhede eellasliini astumise inhibeerimises (Qi jt, 2017). EPF1 puudumine viib ühe-raku-reegli rikkumiseni, mille tagajärjeks on kahest-kolmest õhulõhest koosnevad kogumikud (Hara jt, 2007). Vastupidiselt STOMi üleekspresseerimise tulemusena tekkinud õhulõhede tiheduse suurenemisele (Sugano jt, 2009; Hunt jt, 2010), viib EPF1 või EPF2 üleproduktioon õhulõhede tiheduse vähenemiseni (Hara jt, 2007; Hunt ja Gray 2009). *Epf2* (EPF2 puudub) mutantide õhulõhede indeks (õhulõhede protsent kõikidest epidermirakkudest) väheneb – koos õhulõhede tiheduse kasvuga hoogustub ka rakujagunemine (Hara jt, 2009; Hunt ja Gray, 2009; Sugano jt, 2010; Hunt jt, 2010).

EPFide mõju õhulõhede arengule on uuritud palju harilikus müürloogas ning viimastel aastatel on hakatud tähelepanu pöörama ka põllumajandustaimedele. Vaatamata sellele, et hariliku müürlooga ja kõrreliste õhulõhede kuju ja muster on erinevad, on molekulaarne

kontroll õhulõhede arengu üle reguleeritud sarnaselt. Sellest tulenevalt on hakatud läbi viima katseid, kus uuritakse kõrrelisi, mille *EPF* ortolooge on manipuleeritud. Hughes jt (2017) ja Caine jt (2018) avaldatud tulemustes selgus, et *EPF* üleekspresseeritavates odra ja riisi taimedes oli õhulõhede tihedus ja juhtivus võrreldes kontrolltaimedega madalamad. Samas oli viljasaak sama suur (Hughes jt, 2017) või isegi suurem (Caine jt, 2018). Odra puhul ilmnes ka tähelepanuväärselt efektiivsem veekasutus ja põuataluvus (Hughes jt, 2017), geneetiliselt manipuleeritud riis pidas kontrolltaimedest paremini vastu nii kõrgel temperatuuril kui ka põuatingimustes (Caine jt, 2018). Sellised tulemused annavad lootust teraviljakasvatuse säilimiseks ka üha enam pealetungivas kliimamuutuses.

1.2.1. Õhulõhede arengut mõjutavad tegurid

Õhulõhede arengukäik pole pelgalt transkriptsioonifaktorite eestvedamisel toimuv epidermirakkude diferentseerumine õhulõhedeks. Arengu käigus vastuvõetavaid otsuseid mõjutavad ka taimehormoonid ja keskkonnategurid (Qi ja Torii, 2018). Keskkonnateguritest mõjutavad õhulõhede arengut eriti valguse intensiivsus, süsihappegaasi kontsentratsioon atmosfääris ja vee kättesaadavus (Dow ja Bergmann, 2014). Taimehormoonidest näiteks brassinosteroidid, auksiin ja abtsiishape (Qi ja Torii, 2018).

Täiskasvanud taimelehed on suutelised infot väliskeskkonna kohta signaliseerima arenevatele lehtedele, mis siis omakorda modifitseerivad vastavalt neile signaalidele õhulõhede arengut (Lake jt, 2001). Siinkohal tuleb mängu teadmine, et protodermi raku sisenemine õhulõhe eellasliini ei tähenda veel, et protodermi rakust õhulõhe kujuneb – eellasliinis olevatel rakkudel on võimalik erinevatel etappidel eellasliinist välja astuda ja areng peatada. Selline paindlikkus võimaldab areneval lehel vastata lokaalsetele ja globaalsetele signaalidele, samuti keskkonnatingimustele (Zoulas jt, 2018).

1.2.2. Õhulõhede tihedus

Olenevalt taimeliigist võib õhulõhede tihedus epidermis jääda vahemikku 5–1000 õhulõhet ruutmillimeetri kohta (Willmer ja Fricker, 1996). Suur varieeruvus on põhjustatud nii taimeliikide erinevustest kui ka keskkonnamõjudest. Õhulõhede tihedust mõjutavad näiteks valguse intensiivsus ja kvaliteet, vee kättesaadavus, ööpäevarütm, osooni ja süsihappegaasi kontsentratsioonid atmosfääris. Enim on uuritud õhulõhede tiheduse muutust $[CO_2]$ suhtes – süsihappegaasi kontsentratsiooni suurenedes õhulõhede tihedus väheneb (Holroyd jt, 2008).

Teades süsihappegaasi kontsentratsiooni ja õhulõhede tiheduse suhet, on võimalik fossiilidelt loetud õhulõhede arvu põhjal hinnata ajaloolist CO₂ hulka atmosfääris (Martin ja Glover, 2007).

Vaatamata sellele, et *Arabidopsis thaliana* on õhulõhed lehe mõlemal küljel, produtseerivad hariliku müürlooga lehed märgatavalt rohkem õhulõhesid lehe alumisele küljele (Zoulas jt, 2018). Selle põhjuseks peetakse õhulõhede rolli veekaotuses: lehe alumine külg on väliskeskkonna mõjude eest paremini kaitsud – lehe pind kuumeneb vähem, mille tõttu on transpiratsioon madalam. Seega näib, et evolutsiooniliselt on olnud mõistlikum paigutada enam õhulõhesid lehe alumisele küljele vältimaks liigset vee aurustumist (Martin ja Glover, 2007).

1.2.3. Õhulõhede juhtivus

Taime eluks vajalike funktsioonide efektiivse toimimise eelduseks on tasakaalustatud gaasivahetus taime ja atmosfääri vahel – fotosünteesiks vajaliku CO₂ omastamine peab olema maksimaalne ja transpiratsiooniline veekadu minimaalne. Selle eest vastutavad õhulõhed, mis reageerivad nii välistele kui ka sisemistele stiimulitele ning kohandavad seeläbi õhupilu avatust (Lawson ja Blatt, 2014). Õhupilu avatuse reguleerimise kaudu saab taim muuta õhulõhede juhtivust ehk CO₂ hulga sisenemist lehte või lehest aurustunud veeauru mahtu vastavalt vajadusele. Juhtivuse mõõtühikuks on mmol m⁻² s⁻¹.

Kuigi õhulõhed moodustavad vaid väikese osa lehe pinnast, enamasti vähem kui 3%, liigub ligikaudu 98% difundeerunud süsihappegaasist ja aurustunud veest läbi nende väikeste pooride (Lawson ja Blatt, 2014). Kuna õhulõhede tihedus, suurus ja reageerimiskiirus on seotud – väikesed õhulõhed on kiirema reageerimisvõimega kui suured õhulõhed – kombineerivad taimed õhulõhede erinevaid omadusi vastavalt keskkonnatingimustele. Näiteks suure tihedusega paiknevad väikesed õhulõhed võimaldavad lehel kiiresti muutuvates keskkonnatingimustes kiiresti korrigeerida lehe juhtivust (Drake jt, 2013).

Lehe õhulõhede juhtivust võimaldab kiiresti muuta õhupilu avatuse suurendamine/vähendamine. Veestressi korral toodab taim stressihormooni, abstsissihapet (ABA). Aktiveerub ABA signaalrada, mille tulemusel õhulõhed sulguvad, et vähendada vee transpiratsiooni lehest. ABA signaalrada koosneb tsütoplasmas paiknevatest retseptoritest PYR1 (PYRABACTIN RESISTANCE 1)/PYL (PYR1-LIKE)/RCAR (REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTORS), mis ABA juuresolekul moodustavad kolmikkompleksi ABA, retseptorite ja 2C tüüpi proteiinfosfataaside (PP2Cde) vahel. Selles protsessis osaleb ka antud töös uuritud ABI1, üks sulgrakkudes ekspresseeruv PP2C fosfataas (Umezawa jt, 2009). Moodustunud kompleksis PP2C-d inaktiveeruvad, võimaldades proteiinkinaasi OPEN STOMATA 1 (OST1) aktiveerumist (Ma jt, 2009; Park jt, 2009). OST1

aktiveerib omakorda sulgrakkudes paiknevad aeglast tüüpi anioonkanalid (SLAC1/SLAH3) ja kiirelt aktiveeruva anioonkanali (QUAC1), ajendades nii õhulõhede sulgumist (Geiger jt, 2009; Imes jt, 2013). Õhulõhede sulgumist indutseerib ka ABI1, PP2C fosfataas, mille puudumisel on taim ABA tundetu (Umezawa jt, 2009).

Taimedel, milles on funktsionaalset SLAC1 vähe (*slac1* mutandid), on reageerimine keskkonna- ja endogeensetele signaalidele õhulõhede sulgumise näol halvenenud (Negi jt, 2008; Vahisalu jt, 2008). Lisaks on *slac1* mutandiga läbi viidud veekaotuskatsete puhul täheldatud, et *slac1* kaotab ligi 50% rohkem vett kui Col-0 (metsiktüüp Columbia-0). See viitab SLAC1 mutandi kõrgemale õhuõhede juhtivusele vaatamata sellele, et Col-0 ja *slac1* õhulõhede tihedused on sarnased (Vahisalu jt, 2008). Ka gaasivahetuskatsed kinnitavad, et *slac1* taimede õhulõhede juhtivus on metsiktüübiga võrreldes kõrgem (Vahisalu jt, 2008; Vahisalu jt, 2010; Merilo jt, 2013). SLAC1 homoloog on SLAH3 (Negi jt, 2008; Vahisalu jt, 2008). SLAH3 *knockout* mutandil (*slah3*) muutusi õhulõhede fenotüübis võrreldes metsiktüübiga täheldatud pole (Jalakas jt, 2021). Sulgraku plasmamembraanis ekspresseeritud ALMT12 ehk QUAC1 mutandil, millel on QUAC1 funktsioon kahjustatud, on halvenenud reageerimine nii pimedusele kui ka ABAle (Sasaki jt, 2010; Meyer jt, 2010).

ABA signaalraja võtmeensüümi 9-cis-epoksükarotenoid dioksügenaas (NCED) kodeerib harilikus müürloogas viit geeni – antud töös on huvipakkuvad just *NCED3* ja *NCED5*. Taimedes, kus funktsionaalset *NCED5* ei esine, olulisi erinevusi võrreldes metsiktüübiga ei avaldu. Küll aga mängib ABA sünteesis olulist rolli *NCED3*. Kui defektsed geenid *NCED3* ja *NCED5* kombineerida, väheneb taime vegetatiivne kasv, suureneb veekadu kuni dehüdratsioonini ja väheneb ABA tase nii normaalsetes kui ka stressitingimustes. (Frey jt, 2011)

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

- Uurida, kuidas mõjutavad defektid ABA sünteesis, signalisatsioonis ja õhulõhede arengus vastavates *knockout* mutantides õhulõhede tihedust, indeksit ja juhtivust.
- Uurida, kui sarnased on sama taime erinevate lehtede (6. ja 8. lehe) õhulõhede tihedus ja indeks.
- Uurida, milline on korrelatsioon hariliku müürlooga ABA sünteesi, signalisatsiooni ja õhulõhede arengu mutantide õhulõhede tiheduse ja juhtivuse vahel.

2.2. Materjalid ja meetodikad

2.2.1. Kasutatud taimed

Tabel 1. Katsetes kasutatud hariliku müürlooga mutandid. Kõik mutandid on metsiktüüp Col-0 taustal

Genotüüp	Mutatsioon	Kirjeldus	Viide
Col-0		Metsiktüüp	
ABA signaalraja mutandid			
<i>abi1-1</i>	Punktmutatsioon geenis <i>ABI1</i>	Häiritud seondumine PYR/RCAR saidiga; ei allu ABA-toimelisele inaktivatsioonile; ABA-tundetu	(Umezawa jt, 2009)
<i>quac1-1slac1-3slah3-1</i>	T-DNA insertioon geenides <i>QUAC1</i> , <i>SLAC1</i> ja <i>SLAH3</i>	Suurenenud õhulõhede juhtivus; häiritud õhulõhede regulatsioon; ABA-tundetu	(Jalakas jt, 2021)
<i>abi1-1quac1-1slac1-3slah3-1</i>	Punktmutatsioon geenis <i>ABI1</i> ning T-DNA insertioon geenides <i>QUAC1</i> , <i>SLAC1</i> ja <i>SLAH3</i>	Nelja ABA signaalraja defekti kombinatsioon: kolm defektset anioonkanalit + inaktivatsioonile allumatu PP2C. ABA-tundetu	Varem avaldamata
<i>nced3nced5</i>	T-DNA insertioon geenides <i>NCED3</i> ja <i>NCED5</i>	Tugevalt ABA defitsiitne	(Frey jt, 2012; Merilo jt, 2018)
Õhulõhede arengu mutant			
<i>epf1epf2</i>	T-DNA insertioon geenides <i>EPF1</i> ja <i>EPF2</i>	Suurenenud õhulõhede tihedus; ühe-raku-reegli eiramine	(Hunt ja Gray, 2009)

2.2.2. Taimede kasvatamine

Enne külvamist hoiti seemneid vähemalt 3 päeva veega täidetud 1,5 ml tuubis +4°C juures pimedas, et soodustada idanemist. Automaatpipetti kasutades külvati 3–4 seemet kasvusubstraati, mis koosnes turbast, vermikuliidist ja veest, mahusuhtes 2 : 1 : 1,5. Umbes nädal pärast külvamist jäeti harvendamisega igasse potti kasvama üks taim. Taimi kasteti kaks korda nädalas altniisutuse meetodil ning kasvatati kasvutoas järgmistel kasvutingimustel: valgusintensiivsus $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, suhteline õhuniiskus öösel 35–45% ja päeval 40–50%, temperatuur päeval 25–27°C ja öösel 19,5°C. Valgusrütmiks oli 10 tundi valgust ja 14 tundi pimedust.

2.2.3. Lehejäljendite tegemine

Lehejäljendid võeti taimede 6. ja 8. lehelt. Nimetatud lehed märgistati olenevalt taimede suurusest 20.–30. päeval, kasutades erinevat värvi niite. Lehejäljendite võtmisel olid 1. korduse taimed 35 päeva, 2. korduse taimed 36 päeva (*abi-1-1* taimed vastavalt 30 ja 46 päeva) ja 3. korduse taimed 35 päeva vanad. Lehejäljendite tegemiseks kasutati hambajäljendi pastat (Kulzer Xantropen L Blue) ja kõvendit (Kulzer Activator Universal Plus), mille segu määriti lehe alumisele pinnale. Segul lasti toatemperatuuril kuivada ning leht eemaldati jäljendilt. Seejärel kaeti jäljend läbipaistva küünelaki (Wild&Mild) kihiga, millel lasti toatemperatuuril kuivada. Tahenenud küünelaki pinnale asetati jäljendist veidi suurem läbipaistva teibi riba, mis eemaldati jäljendilt koos küünelaki kihiga ning kleebiti preparaadi alusklaasile.

2.2.4. Õhulõhede tiheduse ja indeksi määramine, juhtivuse mõõtmine

Täiskasvanud 6. ja 8. lehe õhulõhede tiheduse määramiseks pildistati preparaate mikroskoobi (Zeiss SteREO Discovery. V20) abil 3,5x objektiiviga. Üht preparaati pildistati fookustasapindade erinevuse tõttu kihiti 2-mikromeetrise intervallidega, et fotodel oleks kõik õhulõhed nähtavad. Pildistatava ala suurus oli 582,27 x 327,53 μm . Tiheduse ja indeksi määramiseks kasutati programmi ImageJ. Esmalt määrati fotol oleva ala pindala ning loeti kokku kõik vähemalt 50-protsendi ulatuses sel alal näha olevad õhulõhed. Järgmisena selekteeriti, mõõdeti ja inverteeriti rohkem kui pool vaateväljast, millelt loendati epidermirakud.

Fotodelt (Joonis 8) saadud andmete põhjal arvutati:

1) õhulõhede tihedus

$$SD = \frac{S}{A},$$

kus SD – õhulõhede tihedus,

S – õhulõhede arv,

A – pindala (mm²);

2) epidermirakkude tihedus

$$ED = \frac{E}{A},$$

kus ED – epidermirakkude tihedus,

E – epidermirakkude arv,

A – pindala (mm²);

3) õhulõhede indeks

$$SI = \frac{SD}{ED + SD} \times 100\%,$$

kus SI – õhulõhede indeks,

SD – õhulõhede tihedus,

ED – epidermirakkude tihedus.

35-päevaste taimede õhulõhede juhtivuse mõõtmiseks kasutati poromeetrit LI-600 (Licor Bioscience, Nebraska, US). Mõõtmised viidi läbi samas kasvutoas, kus taimi kasvatati, et vältida valgusintensiivsuse ja temperatuuri muutust. Olenevalt taime suurusest mõõdeti juhtivust võimaluse korral taime 6. ja/või 8. lehelt, enamasti aga ühelt vabalt valitud elujõuliselt ja piisavalt suurelt lehelt. Uuritav leht suleti mõõtekambrisse nii, et gaasivahetust mõõdeti lehe alumiselt küljelt. LI-600 poromeeter võimaldab *in situ* õhulõhede juhtivuse väärtuste mõõtmist, lähtudes transpiratsioonist ning lehe temperatuurist. Transpiratsioon arvutatakse mõõtekambrisse siseneva ja sealt väljuva õhu H₂O kontsentratsioonide vahest, lehe temperatuuri mõõdab infrapunaandur.

2.2.5. Statistiline analüüs

Õhulõhede tihedused, indeksid ja standardvead keskmistati iga töös kasutatud hariliku müürlooga mutandi kohta. Mutantide omavaheliseks võrdluseks rakendati ühefaktorilist ANOVAt ehk dispersioonanalüüsi. *Post-hoc* analüüsiks kasutati Tukey' testi, mis on

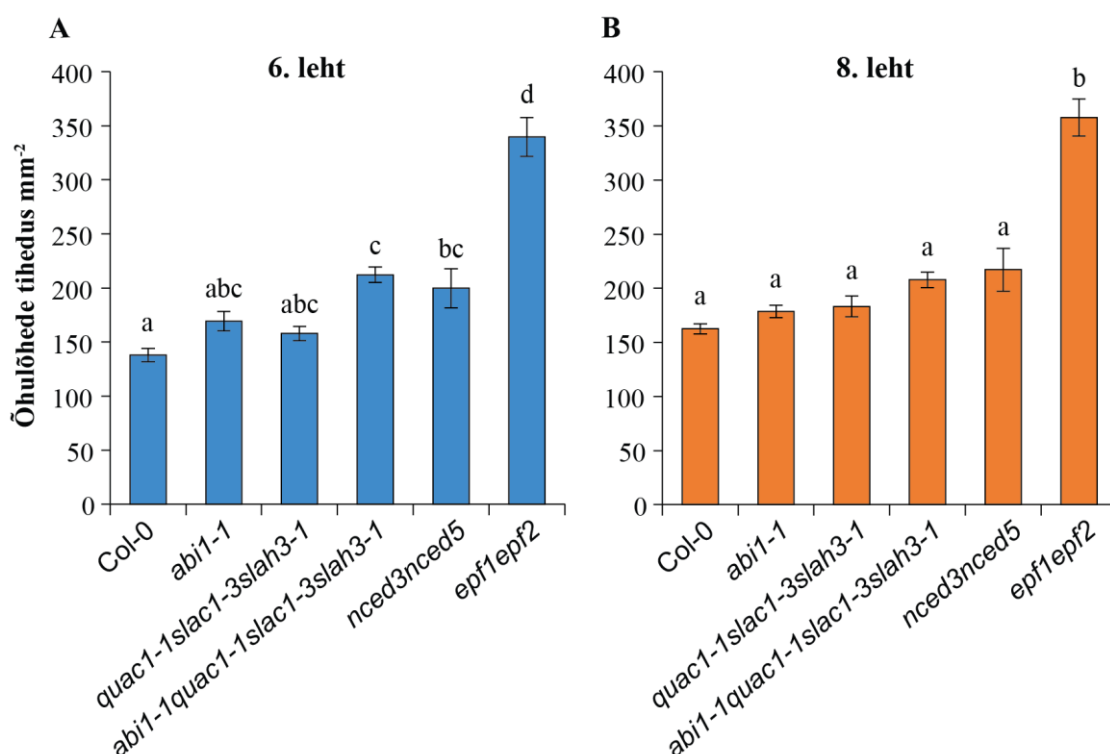
kohandatud analüüsimeetodite valimiseks. 6. ja 8. lehe tunnuste võrdlemiseks ühe genotüübi piires kasutati T-testi. Lineaarse regressiooni olulisuse kontrollimiseks kasutati üldise lineaarse mudeli regressioonanalüüsi. Statistilise andmeanalüüsi jaoks kasutati programmi Statistica.

2.3. Tulemused

2.3.1. Õhulõhede tihedus

6. lehe mõõtmised näitasid, et kõikidest uuritud taimedest eristus väga oluliselt õhulõhede arengu mutant *epf1epf2*, mille õhulõhede tihedus oli võrreldes metsiktüübiga ligikaudu 2,5 korda suurem (Joonis 2A). *abi1-1* ja *quac1-1slac1-3slah3-1* õhulõhede tihedused olid statistiliselt sarnased metsiktüübi Col-0 omaga. Metsiktüübist erinesid statistiliselt oluliselt nelikmutant ja ABA defitsiitne *nced3nced5*. Uuritud ABA signalisatsiooni ja biosünteesi mutantide (*abi1-1*, *quac1-1slac1-3slah3-1*, *abi1-1quac1-1slac1-3slah3-1* ja *nced3nced5*) õhulõhede tihedused omavahel statistiliselt oluliselt ei erinenud (Joonis 2A).

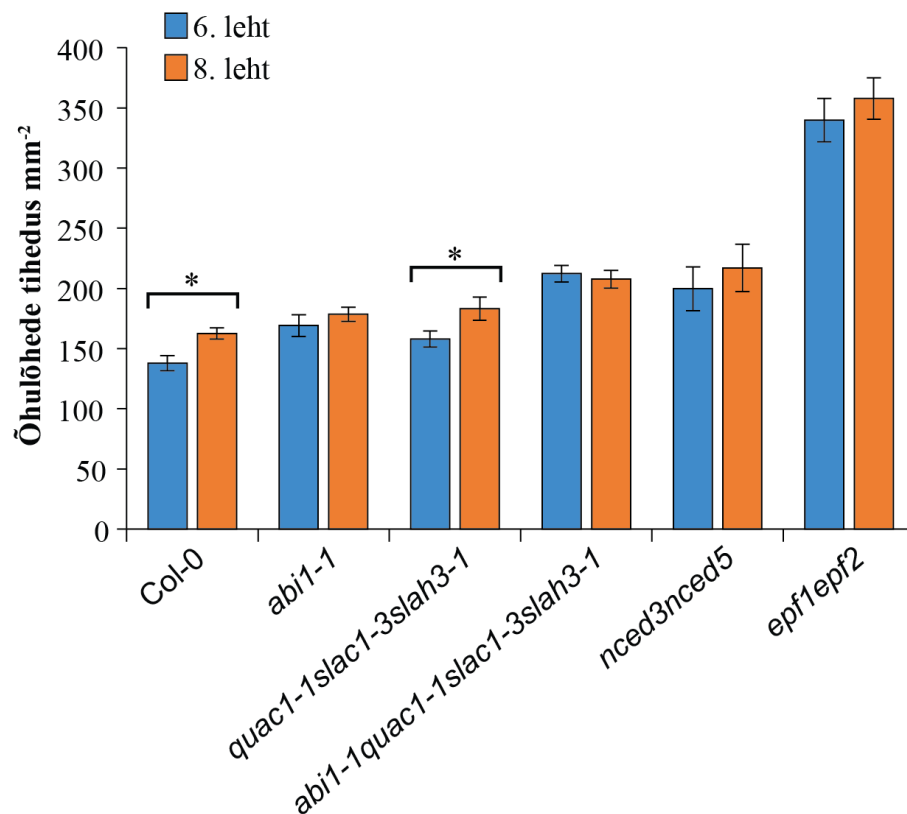
Kaheksanda lehe õhulõhede tiheduse varieeruvus oli võrreldes kuuenda lehega väiksem (Joonis 2B). Kuuest analüüsitud hariliku müürlooga mutandist oli teistest statistiliselt erinev üks mutant: *epf1epf2* õhulõhede tihedus oli oluliselt kõrgem. Võrreldes metsiktüübiga oli *epf1epf2* õhulõhede tiheduse erinevus kahekordne (Joonis 2B). Siiski on alust arvata, et ka 8. lehe puhul oleks Col-0 metsiktüübi ja ABA signaalraja mutantide varieeruvuse statistiline erinevus, kui eemaldada valimist teistest analüüsitud taimedest väga palju erinev *epf1epf2*.



Joonis 2. Hariliku müürlooga erinevate mutantide 6. (A) ja 8. (B) lehe õhulõhede tihedus.

Diagrammidel on katsete käigus saadud tulemuste keskmised väärtused. Tulpadel olevad vearistid näitavad $\pm$ standardviga. Statistilised erinevused, mis saadi, kasutades ühefaktorilist ANOVA ja Tukey *post-hoc* testi, on tähistatud erinevate tähtedega (a, b, c, d). Valimi suurus varieerus mutanditi 24st lehest 33 leheni.

Võrreldes taimede 6. ja 8. lehe õhulõhede tihedusi omavahel sama genotüübi piires selgus, et statistiliselt oluline erinevus kahe lehe tiheduse vahel oli metsiktüübil Col-0 ja ABA signalisatsiooni mutandil *quac1-1slac1-3slah3-1* (Joonis 3). Neil mõlemal oli 8. lehe õhulõhede tihedus suurem kui 6. lehel.

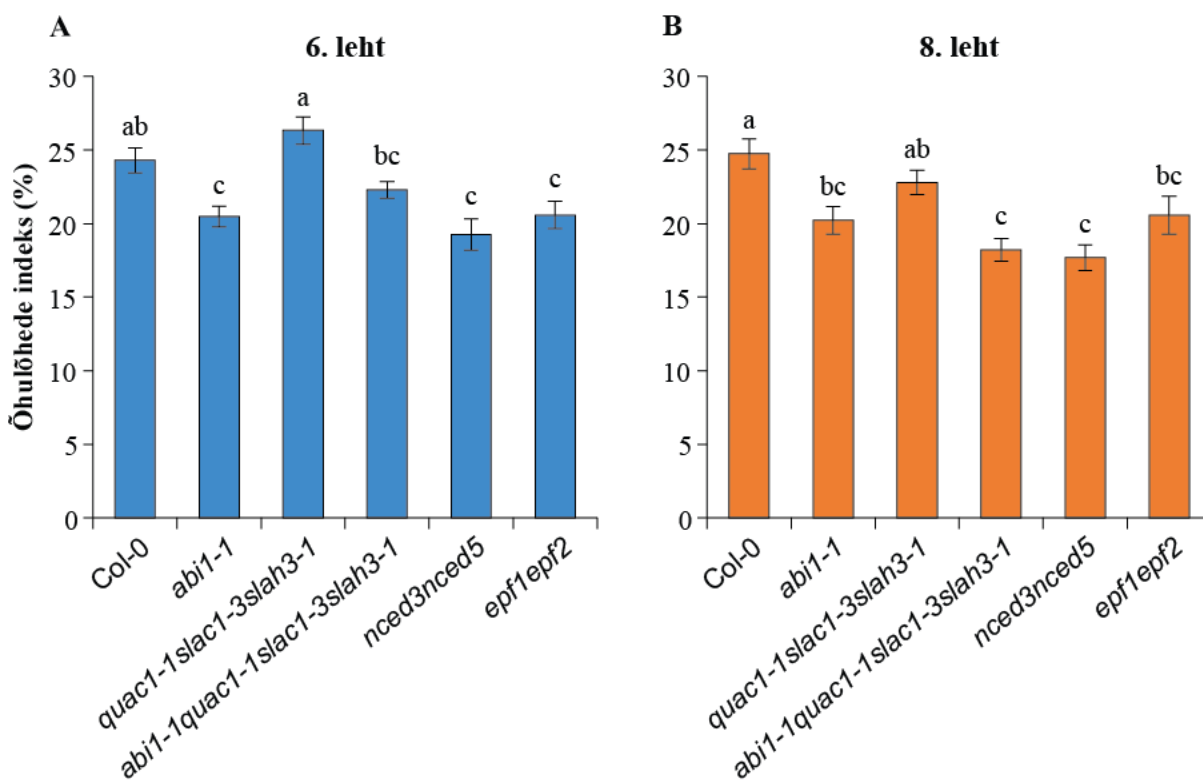


Joonis 3. Erinevate hariliku müürlooga mutantide õhulõhede tihedus mm^{-2} .

Diagrammil on katsete käigus saadud tulemuste keskmised väärtused. Tulpadel olevad vearistid näitavad $\pm$ standardviga. Statistiliselt olulised erinevused ($p < 0,05$) 6. ja 8. lehe õhulõhede tiheduste väärtustes ühe mutandi piires, mis leiti, kasutades T-testi, on tähistatud tärniga (*). Valimi suurus varieerus mutanditi 24st lehest 33 leheni.

2.3.2. Õhulõhede indeks

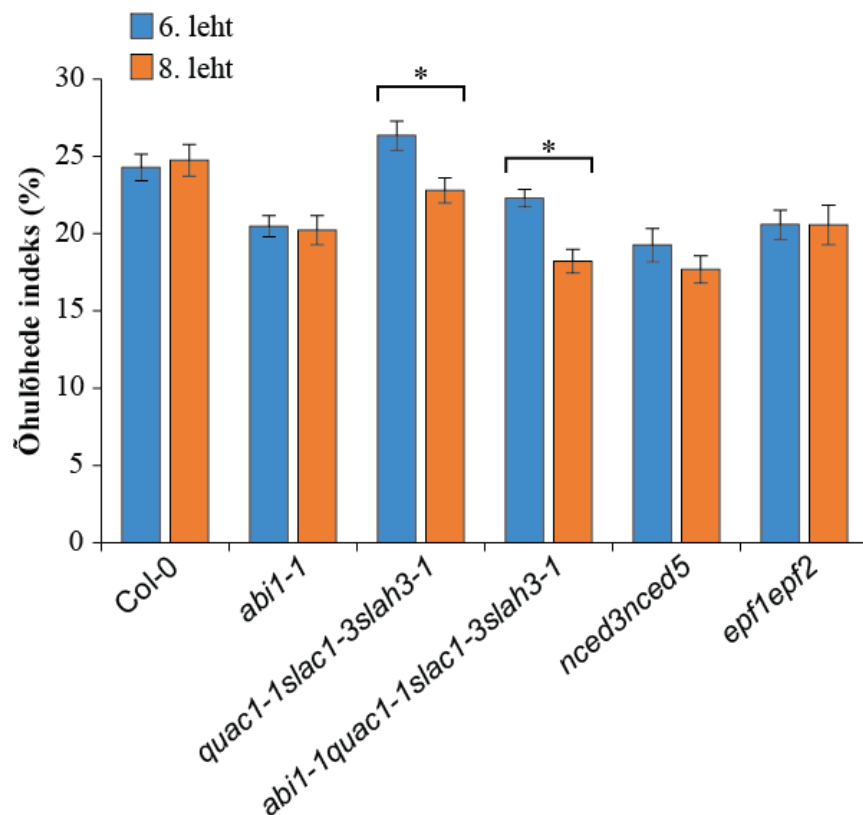
Tulemustest järeldus, et õhulõhede indeks oli töös uuritud mutantidel madalam kui metsiktüübil (Joonis 4). Seda ühe erandiga: anioonkanalite kolmikmutandi, *quac1-1slac1-3slah3-1*, õhulõhede indeks oli Col-0 vastava väärtusega statistiliselt sarnane, seda nii 6. kui ka 8. lehe puhul. Metsiktüübist oluliselt madalama õhulõhede indeksiga mutandid *abi1-1*, *abi1-1quac1-1slac1-3slah3-1*, *nced3nced5* ja *epf1epf2* olid omavahel statistiliselt sarnased (Joonis 4).



Joonis 4. Hariliku müürlooga erinevate mutantide 6. (A) ja 8. (B) lehe õhulõhede indeks (%).

Diagrammidel on katsete käigus saadud tulemuste keskmised väärtused. Tulpadel olevad vearistid näitavad $\pm$ standardviga. Statistilised erinevused, mis saadi, kasutades ühefaktorilist ANOVA ja Tukey *post-hoc* testi, on tähistatud erinevate tähtedega (a, b, c). Valimi suurus varieerus mutanditi 24st lehest 33 leheni.

Õhulõhede indeksite omavahelisel võrdlemisel ühe mutandi piires selgus, et 6. ja 8. lehe õhulõhede indeksid olid statistiliselt erinevad ABA signaalraja mutantidel *slac1-3slah3-1quac1-1* ja *abi1-1slac1-3slah3-1quac1-1* (Joonis 5).

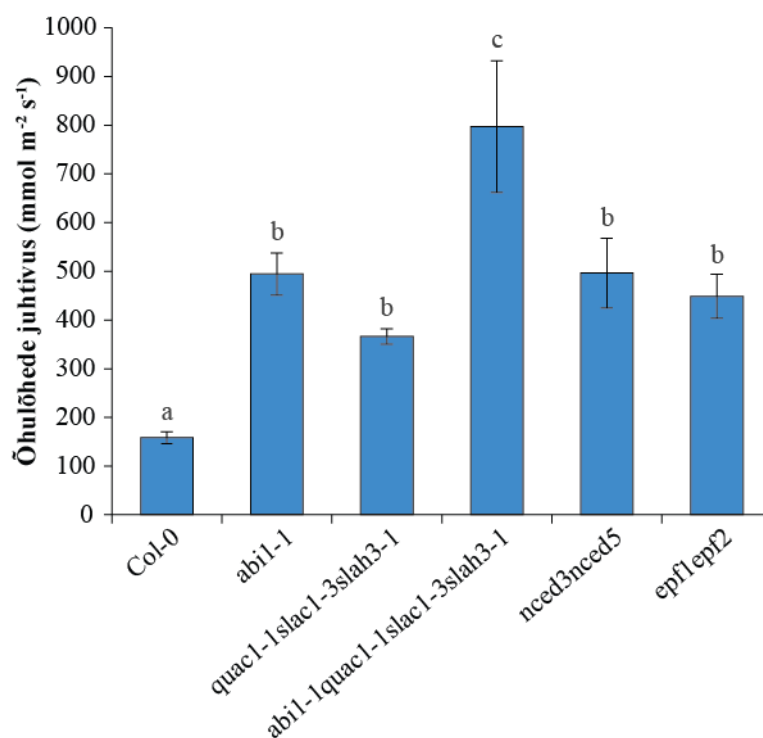


Joonis 5. Erinevate hariliku müürlooga mutantide õhulõhede indeks (%).

Diagrammil on katsete käigus saadud tulemuste keskmised väärtused. Tulpadel olevad vearistid näitavad $\pm$ standardviga. Statistiliselt olulised erinevused ($p < 0,05$) 6. ja 8. lehe õhulõhede tiheduste väärtustes ühe mutandi piires, mis leiti, kasutades T-testi, on tähistatud tärniga (*). Valimi suurus varieerus mutanditi 24st lehest 33 leheni.

2.3.3. Õhulõhede juhtivus

Madalaim õhulõhede juhtivus oli metsiktüübil Col-0, mille keskmine juhtivus oli $\sim 158 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Joonis 6). Kõrgeima juhtivusega oli nelikmutant *abi1-1slac1-3slah3-1quac1-1*, mille keskmine juhtivus oli metsiktüübi juhtivusest ca viis korda kõrgem. Col-0-ist kõrgema ja nelikmutandist madalama õhulõhede juhtivusega olid ABA sünteesi ja signalisatsiooni mutandid *abi1-1*, *slac1-3slah3-1quac1-1*, *nced3nced5* ja arengu mutant *epf1epf2* (Joonis 6).



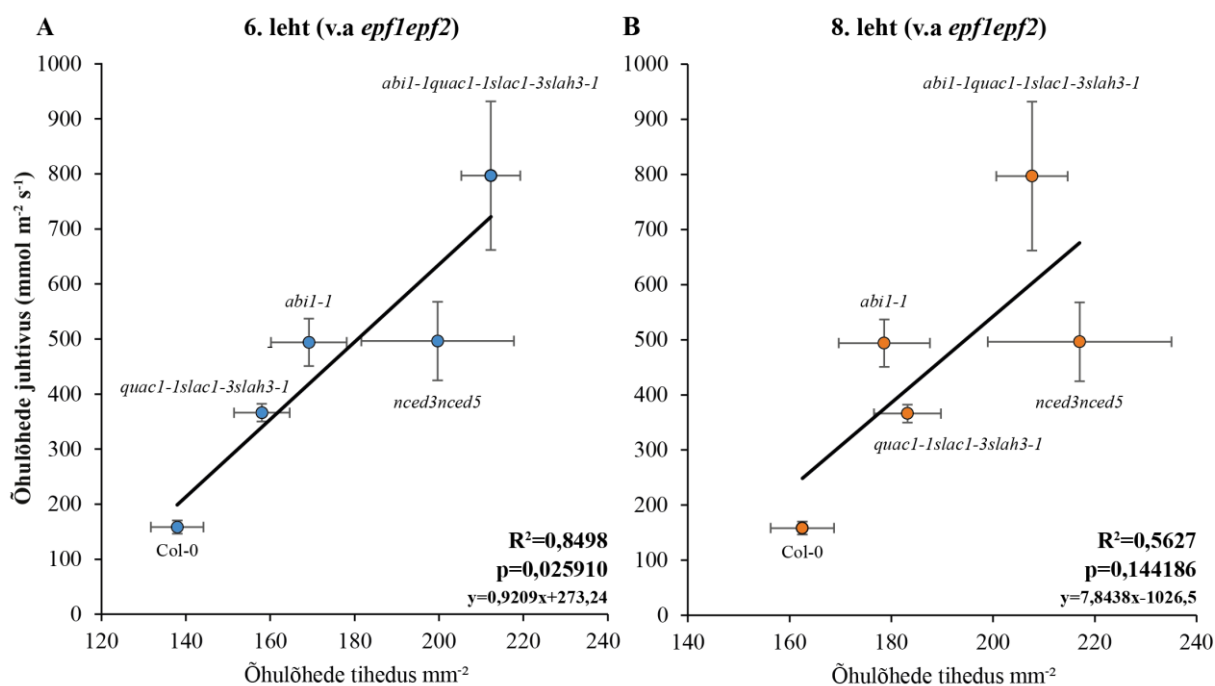
Joonis 6. Hariliku müürlooga erinevate mutantide õhulõhede juhtivuse väärtused ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Diagrammidel on katsete käigus saadud tulemuste keskmised väärtused. Tulpadel olevad vearistid näitavad $\pm$ standardviga. Statistilised erinevused, mis saadi kasutades ühefaktorilist ANOVA ja Tukey *post-hoc* testi, on tähistatud erinevate tähtedega (a, b, c, d). Valimi suurus varieerus mutanditi 5st taimest 16 taimeni.

2.3.4. Korrelatsioon õhulõhede tiheduse ja juhtivuse vahel

ABA sünteesi ja signaalraja mutantidel ilmnes õhulõhede tiheduse ja juhtivuse vahel positiivne korrelatsioon, mis oli statistiliselt oluline ($p < 0,05$) 6. lehel, ehkki sama tendents kajastus ka 8. lehel (Joonis 7).

Kui regressioonanalüüsi lisati ka arengu mutant *epf1epf2*, siis positiivne seos õhulõhede tiheduse ja juhtivuse vahel kadus (vt Lisa 2).



Joonis 7. Korrelatsioon õhulõhede juhtivuse ja tiheduse vahel 6. (A) ja 8. lehes (B).

Regressioonanalüüs on tehtud mutantide keskmistatud tiheduste ja juhtivuste põhjal. Statistiliseks analüüsiks kasutati üldise lineaarse mudeli regressioonanalüüsi. Valimist on välja jäetud õhulõhede arengu mutant *epf1epf2*.

2.4. Arutelu

2.4.1. Metsiktüüp Col-0 õhulõhede tihedus ja juhtivus

Töö raames läbi viidud katsetest selgus, et hariliku müürlooga metsiktüübi Col-0 õhulõhede tihedus oli keskmiselt 150 õhulõhet mm^{-2} ja juhtivus umbes $160 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Joonis 2 ja 6). Sarnased tulemused leiab ka varem avaldatud andmetest, kus Col-0 õhulõhede tihedus oli ligilähedane või natuke kõrgem ja juhtivus võrdväärne (Jalakas jt, 2018; Merilo jt, 2018).

Tulemuste sarnasuse teeb huvitavaks asjaolu, et taimed on kasvanud erinevatel valgusintensiivsustel – varem avaldatud tulemused on saadud taimedelt, mis kasvasid valgusintensiivsusel $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Jalakas jt, 2018; Jalakas jt, 2021) ja käesoleva töö andmed on saadud taimedelt, mis kasvasid valgusintensiivsusel $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Kuna on teada, et valgusintensiivsus on tugev õhulõhede tiheduse mõjutaja (Gay ja Hurd, 1975; Lake jt, 2001), oleks võinud eeldada, et kõrgema intensiivsuse juures on õhulõhede tihedus positiivselt mõjutatud.

Erinevatel valgusintensiivsustel kasvanud taimede sarnase õhulõhede tiheduse ja juhtivuse põhjus võib peituda teiste kasvutingimuste erinevuses. Taimed, millelt pärinevad varem avaldatud andmed, kasvasid kasvukambris, kus suhteline õhuniiskus oli stabiilselt 70% ning temperatuur päeval 23°C ja öösel 18°C (Jalakas jt, 2018; Jalakas jt, 2021). Samas antud töös kasutatud taimed kasvasid kasvuruumis, kus suhteline õhuniiskus varieerus 35% ja 50 % vahel ning temperatuur oli päeval $25\text{--}27^{\circ}\text{C}$ ja öösel $19,5^{\circ}\text{C}$. On teada, et madalam õhuniiskus mõjutab õhulõhede juhtivust madalamas suunas (Merilo jt, 2018). Samas kõrgemal temperatuuril kasvanud taimede transpiratsioon ja juhtivus on kõrgemad, et tagada lehtede jahutamine. Kuumematel temperatuuridel kasvamine inhibeerib õhulõhede teket (Lau jt, 2018), ka kuivem õhk põhjustab õhulõhede tiheduse langust (Fanourakis jt, 2013), seega võib oletada, et kõrgema valgusintensiivsuse positiivset mõju õhulõhede juhtivusele ja tihedusele varjutas antud töös kuivema õhu ja kõrgema temperatuuri mõju.

Sellest võib järeldada, et hariliku müürlooga metsiktüübi Col-0 õhulõhede tihedust ja juhtivust iseloomustavad teatud optimaalsed väärtused ning keskkonna mõõdukas muutumine neid oluliselt ei mõjuta.

2.4.2. Mutantide *abi1-1*, *quac1-1slac1-3slah3-1* ja *abi1-1quac1-1slac1-3slah3-1* õhulõhede tihedus ja juhtivus

Vaatamata sellele, et *abi1-1* õhulõhede tihedus oli natuke suurem kui metsiktüübil, ei olnud vahe statistiliselt oluline (Joonis 2). See läheb vastuollu varem avaldatud tulemustega – Tanaka jt (2013) artiklis välja toodud tulemuste põhjal on *abi1-1* õhulõhede tihedus oluliselt kõrgem

Col-0 õhulõhede tihedusest, mis viitab sellele, et ABA signaalrada võib olla seotud õhulõhede arenguga.

Erinevused tulemustes võivad olla tingitud sellest, et käesolevas töös on mõõtmised teostatud täiskasvanud pärislehtedel, kuid Tanaka jt (2013) viisid mõõtmisi läbi idulehtedega. Idulehed arenevad embrüogeneesi käigus koos taime juure ja varre meristeemi arenguga. Väljaarenenud ehk n-õ pärislehed arenevad aga pärast idanemist. Seega võib õhulõhede tihedus idu- ja pärislehtedel erineda tulenevalt erinevast arenguetapist ja eeldatavasti ka geeniekspressioonist. Ka siinse töö tulemused näitasid, et sama mutandi eri lehtedel (6. ja 8. leht) võib olla erinev õhulõhede tihedus (Joonis 3). Samuti võib tulemustevahelist lahknevust seletada taimede kasvukeskkondade niiskuse erinevus. Kui antud töös kasutatud katsetaimed kasvasid tingimustel, kus niiskus kõikus ööpäevas 35–50 % vahel, siis Tanaka jt (2013) idulehtede proovid kasvasid plaatidel ligikaudu 100-protsendilise niiskuse juures.

Varem avaldatud andmed Col-0 ja anioonkanalite kolmikmutandi sarnase õhulõhede juhtivuse ja indeksi osas klapiivad käesoleva töö tulemustega (Jalakas jt, 2021; Joonis 2 ja 4): hariliku müürlooga metsiktüüp Col-0 ja ioonkanalite kolmikmutant *quac1-1slac1-3slah3-1* ei erine teineteisest õhulõhede tiheduse poolest. See viitab asjaolule, et anioonkanalid õhulõhede arengus ei osale.

Nelikmutant, kus on ühte taime kokku viidud neli defekti ABA signaalrajas – üks ABA-toimelisele inaktivatsioonile mitte-alluv 2C tüüpi fosfataas, mis on kombineeritud defektide kolmes anioonkanalis – näitab kõrget õhulõhede tihedust ja juhtivust (Joonis 2 ja 6). Sellest tulenevalt võib järeldada, et mutatsioonid eraldi ja mutatsioonid koos võivad taime fenotüübis avalduda eriilmeliselt.

2.4.3. *Nced3nced5* ja *epf1epf2* tihedus ja juhtivus

On näidatud, et ABA sisaldus lehtedes mõjutab õhulõhede tihedust – ABA defitsiitsetel mutantidel on oluliselt kõrgem õhulõhede tihedus kui metsiktüübil ning mutantidel, millel on ABA katabolism häiritud, on õhulõhede tihedus võrreldes metsiktüübiga oluliselt madalam (Chater jt, 2013; Tanaka jt, 2013; Jalakas jt, 2018). Selle teadmise põhjal peaks mutandil *nced3nced5*, milles on ABA produktsioon väiksem (Frey jt, 2011; Merilo jt, 2018), õhulõhede tihedus olema Col-0 õhulõhede tihedusest suurem. Kui 6. lehe *nced3nced5* õhulõhede tihedus oli tõepoolest metsiktüübist statistiliselt oluliselt suurem, siis 8. lehel polnud *nced3nced5* ja Col-0 tiheduste samasuunaline vahe enam statistiliselt oluline (Joonis 2). Leidis kinnitust, et ABA-defitsiitsete mutantide õhulõhede juhtivus on oluliselt suurem metsiktüübi omast (Merilo jt, 2013; Merilo jt, 2018; Jalakas jt, 2018), antud töös oli *nced3nced5* ja Col-0 vahe

kolmekordne (Joonis 6). Võrreldes käesolevas töös saadud *nced3nced5* juhtivust varem avaldatud sama mutandi andmetega (Merilo jt, 2018) tuleb välja, et juhtivuse tulemused on pisut madalamad, kuid needki tulemuste lahknevused võivad olla tingitud kasvutingimuste erinevusest (vt kasvutingimuste võrdlust punktis 2.4.1.). Vaatamata tulemuste erinevusele on põhitrend siiski olemas – *nced3nced5* juhtivus on suurem kui Col-0 metsiktüübil.

Õhulõhede arengu mutandi *epf1epf2* õhulõhede tihedus, indeks ja juhtivus vastasid eeldustele (Joonis 2, 4 ja 6). Toetudes varem avaldatud andmetele on teada, et *epf*-topeltnutandi õhulõhede tihedus on kõrgem kui metsiktüübil (Hunt ja Gray, 2009). Lisaks on täheldatud, et EPF2 puudumisel astub rohkem rakke õhulõhede eellasliini tõstes nii epidermirakkude arvu (Hunt ja Gray, 2009), millest tuleneb mutandi madal õhulõhede indeks. Antud töös oli õhulõhede juhtivus *epf1epf2* topeltnutandis kõrgem kui metsiktüübil, ehkki mitte nii kõrge, kui oleks võinud eeldada tema väga kõrge õhulõhede tiheduse põhjal. Varasemates töödes on leitud, et õhulõhede tiheduse muutus ei toonud endaga kaasa muutust juhtivuses: madalama tihedusega mutantides kompenseeris tihedust suurem avatus ja vastupidi (Büssis jt, 2006). Kuna arvatakse, et ühe-raku-reegliga kaasnev õhulõhede muster tõstab gaasivahetuse efektiivsust, minimeerides seejuures veekadu (Papanatsiou jt, 2016), võib *epf1epf2* ebaproportsionaalselt madal õhulõhede juhtivus olla tingitud mutatsioonist geenis *EPF1*. EPF1 puudumisel, mis vastutab ühe-raku-reegli järgimise eest, tekivad kahest-kolmest õhulõhest koosnevad kobarad (Hara jt, 2007). Nii on õhulõhedepilu maksimaalne avatus ja seetõttu ka juhtivuse tõus pärsitud vaatamata väga kõrgele õhulõhede tihedusele.

2.4.4. Töös kasutatud taimede õhulõhede tihedus, indeks ja juhtivus

Töös kasutatud taimede 6. ja 8. lehe õhulõhede tiheduse ja õhulõhede indeksi tulemustest järeldus, et õhulõhede tihedus ja indeks võivad ühe mutandi piires oluliselt erineda (Joonis 3 ja 5). Selline tulemus on oluline õhulõhede arengu tunnuste uurimise metodoloogia täiustamiseks – tulemuste võrdlemiseks oleks parem, kui uuritaks erinevas vanuses lehti ühe mutandi piires. Kuigi 6. ja 8. leht arenevad erineva põlvkonna lehtedest, 6. esimesest ja 8. kolmandast (Dengler, 2007), siis on selge, et antud töö valim ja variatsioon lehe vanuste vahel on liiga väike, et teha suuri järeldusi sellest, kuidas mõjutab lehe vanus õhulõhede arenguga seotud tunnuseid.

Indeksite tulemustest järeldub, et kõikide mutantide õhulõhede indeksid on kontrolltaim Col-0 indeksist madalamad – mutantidel on epidermirakke võrreldes õhulõhedega rohkem (Joonis 4). Kuna arengu mutandil *epf1epf2* on geeni *EPF2* korrektselt toimimine häiritud, astub palju rakke õhulõhede eellasliini, moodustades nii palju epidermirakke. Selle tulemusel

õhulõhede indeks mutandil *epf1epf2* väheneb (Hara jt, 2009; Hunt ja Gray, 2009; Sugano jt, 2010; Hunt jt, 2010).

Selgus, et kõrgem õhulõhede tihedus ei vii alati kõrgema juhtivuseni. Seda näitab puuduv korrelatsioon õhulõhede tiheduse ja juhtivuse vahel analüüsis, kus kõik uuritud mutandid on esindatud (Lisa 2, joonis 8). Samas, eemaldades regressioonanalüüsist *epf1epf2*, muutus positiivne korrelatsioon õhulõhede tiheduse ja juhtivuse vahel statistiliselt oluliseks (Joonis 7). See on seotud valitud mutantidega: ABA sünteesi ja signaalraja mutante iseloomustab lisaks kõrgemale tihedusele ka suurem õhupilu avatus (Jalakas jt, 2018). Suurem õhupilu avatus kombinatsioonis suurema õhulõhede tihedusega toob kaasa vältimatu tõusu õhulõhede juhtivuses. Samas, nagu näitavad *epf1epf2* andmed, ei pruugi kõrgem õhulõhede tihedus alati konverteeruda kõrgemaks juhtivuseks. Selle põhjuseks võibki olla see, et õhupilu avatus oli pigem väiksem.

Käesolevas töös uuritud õhulõhedega seotud tunnused õhulõhede indeks ja juhtivus kujutavad endast võimalust pikemas ajaskaalas või väga kiiresti transpiratsiooni ja sellega seotud veekadu kontrollida. Seega on need tunnused oluliseks võtmeks tulevikusortide aretamisel ning info õhulõhede tiheduse ja juhtivusega seotud aspektide kohta aitab mõista nutika sordiaretuse võimalusi.

KOKKUVÕTE

Õhulõhede uurimine on päevakajaline teema seoses tulevikuks prognoositava temperatuuri ja sademete hulga muutumisega. Nii olid ka käesoleva töö eesmärgid ajendatud huvist leida seoseid õhulõhede tiheduse, indeksi ja juhtivuse vahel hariliku müürlooga Col-0 metsiktüübis ja ABA signalisatsiooni ja biosünteesi mutantides, samuti õhulõhede arengu mutandis.

Õhulõhede tihedust ja indeksit mõõdeti ligikaudu 35-päevaste katsetaimede 6. ja 8. lehe lehejäljenditelt. Kuna harilik müürlook produtseerib enam õhulõhesid lehe alumisele küljele, võeti ka lehejäljendid lehe alumiselt küljelt. Õhulõhede juhtivuse mõõtmiseks samas vanuses taimedel kasutati poromeetrit, mis võimaldab teha *in situ* transpiratsiooni mõõtmisi.

Uurimuses saadud tulemused kinnitasid EPF1 ja EPF2 olulist mõju õhulõhede arengule. Mutatsioonid vastavates geenides *EPF1* ja *EPF2* põhjustavad ühe-raku-reegli eiramist ja paljude epidermirakkude astumist õhulõhede eellasliini. See toob omakorda kaasa kõrgema õhulõhede tiheduse ja madalama õhulõhede indeksi. Suurem õhulõhede tihedus võiks iseenesest viia potentsiaalselt väga kõrge õhulõhede juhtivuseni, kui sellega kaasneks ka õhulõhede optimaalne paiknemine epidermis ja suur õhupilu avatus. Tulemustest selgus, et *epf1epf2* mutandi õhulõhede juhtivus oli suurem kui metsiktüübil, kuid väiksem kui ABA signaalraja mutandil, mis näitab seda, et suurt õhulõhede tihedust kompenseeris väiksem õhulõhede avatus.

Töö käigus selgus, et defektid ABA biosünteesis ja signalisatsioonis vähendasid statistiliselt oluliselt õhulõhede indeksit võrreldes metsiktüübiga. Muutused õhulõhede tiheduses olid selge trendina olemas, kuid ei osutunud statistiliselt olulisteks. ABA sünteesi ja signaalraja mutantide õhulõhede juhtivus oli võrreldes Col-0 juhtivusega oluliselt kõrgem. Seega võib järeldada, et ABA signaalrajas asuvad geenid küll mõjutavad õhulõhede arengut, kuid nende mõju õhulõhede arengule on tunduvalt väiksem kui geenidel, mis on õhulõhede arenguga otseselt seotud. Samas ABA biosünteesi ja signaalraja defektide mõju õhulõhede juhtivusele on väga suur.

Õhulõhede juhtivus ja tihedus on tunnused, mis mõjutavad taime fotosünteesi läbi CO₂ sissevõtmise lehte, kuid teiselt poolt ka taime veekadu. Seega on nimetatud tunnused olulised tulevikukliimasse paremini sobivate taimede aretamisel ning võib öelda, et uuringud õhulõhede tihedusest ning juhtivusest toetavad tuleviku nutikat sordiaretust.

SUMMARY

Gas exchange in plants – CO₂ entering the plant and water evaporation – is regulated by small pores on the surface of the leaves. Pores, which are called stomata, are able to change rapidly the size of their aperture in response to endogenous and environmental signals. Being able to change the aperture is vital during drought adaption. In a longer time scale, plants can also regulate the transpiration via stomatal density. Understanding the relations between different stomatal traits will enable to create plants that are more sustainable in the future climate. The aim of this thesis was to study the effect of defects in ABA signalling, biosynthesis and stomatal development on stomatal traits (stomatal density, index and conductance).

Experiments were carried out on *Arabidopsis thaliana* Col-0 wild type and its ABA signalling and biosynthesis, as well as stomatal development mutants. As *Arabidopsis* forms more stomata on the lower surface of the leaf, the data of stomatal density and conductance were collected from the lower surface of the leaf.

The results showed that stomatal index of ABA signalling and biosynthesis mutants was significantly reduced compared to the Col-0 wild type, whereas the trend for higher stomatal density in these plants turned out to be non-significant. The stomatal conductance of ABA synthesis and signalling mutants was significantly higher compared to wild type. Thus, defects in ABA signalling do influence stomatal conductance more than stomatal development. Mutations in genes responsible for stomatal development (*EPF1* and *EPF2*) had a prominent effect on stomatal developmental traits. As the one-cell spacing rule is ignored (lack of *EPF1*) and a lot of protodermal cells enter the stomatal lineage, but never fully develop into stomata (lack of *EPF2*), the density of stomata was very high and index low in *epf1epf2* knockout mutant. Although high stomatal density is usually related to high conductance, in *epf1epf2* the conductance was lower than in the ABA signalling mutants. This can be explained by the reduced stomatal aperture due to violation of one-cell spacing rule.

Stomatal density and conductance are traits that affect photosynthesis and water loss of plants by being responsible for the diffusion of CO₂ and controlling the transpiration. So these traits are important for plant breeding to develop plants that are more fit to the changing climate – research into stomatal density and conductance supports smart plant breeding.

TÄNUAVALDUSED

Soovin südamest tänada oma juhendajaid, Pirko Jalakut ja Ebe Merilod, kes tegid teekonna minu esimese suure ja tähtsa töö valmimiseni väga meeldivaks. Seejuures tänan teid ka innustavate sõnade, kannatlikkuse ja mõistva suhtumise eest. Ühtlasi soovin tänada Hanna Hõrakut, kes oli oma lõputu positiivsusega alati valmis appi tõttama ja arusaamatuks jäänut lahti seletama, ning Mikk Välbet, kes aitas laboritoimetustega hakkama saada olles abiks nii nõu kui ka jõuga. Lõpetuseks tänan ka ülejäänud laborirahvast meeldiva seltskonna eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Büssis, D., von Groll, U., Fisahn, J., Altmann, T.** (2006). Stomatal aperture can compensate altered stomatal density in *Arabidopsis thaliana* at growth light conditions. *Functional Plant Biology*, 33:11, 1037–1043, doi: 10.1071/FP06078
- Caine, R. S., Yin, X., Sloan, J., ... Gray, J. E.** (2018). Rice with reduced stomatal density conserves water and has improved drought tolerance under future climate conditions. *New Phytologist*, 221:1, 371–384, doi: 10.1111/nph.15344
- Chater, C. C. C., Oliver, J., Casson, S., Gray, J. E.** (2014). Putting the brakes on: abscisic acid as a central environmental regulator of stomatal development. *New Phytologist*, 202:2, 376–391, doi: 10.1111/nph.12713
- Dengler, N. G.** (2007). The shoot apical meristem and development of vascular architecture. *Botany*, 84:11, 1660–1671, doi: 10.1139/b06-126
- Drake, P. L., Froend, R. H., Franks, P. J.** (2013). Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. *Journal of Experimental Botany*, 64:2, 495–505, doi: 10.1093/jxb/ers347
- Fanourakis, D., Heuvelink, E., Carvalho, S. M. P.** (2013). A comprehensive analysis of the physiological and anatomical components involved in higher water loss rates after leaf development at high humidity. *Journal of Plant Physiology*, 170:10, 890–898, doi: 10.1016/j.jplph.2013.01.013
- Frey, A., Effroy, D., Lefebvre, V., ... Marion-Poll, A.** (2011). Epoxycarotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members. *The Plant Journal*, 70:3, 501–512, doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04887.x
- Gay, A. P., Hurd, R. G.** (1975). The influence of light on stomatal density in the tomato. *New Phytologist*, 75:1, 37–46, doi: 10.1111/j.1469-8137.1975.tb01368.x
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., ... Hedrich, R.** (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 United States of America*, 106:50, 21425–21430, doi: 10.1073/pnas.0912021106

- 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, 1720–1725, doi: 10.1101/gad.1550707
- Hara, K., Yokoo, T., Kajita, R., Onishi, T., Yahata, S., Peterson, K. M., Torii, K. U., Kakimoto, T.** (2009). Epidermal Cell Density is Autoregulated via a Secretory Peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 in Arabidopsis Leaves. *Plant and Cell Physiology*, 50:6, 1019–1031, doi: 10.1093/pcp/pcp068
- Hetherington, A. M., Woodward F. I.** (2003). The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, 424, 901–908, doi: 10.1038/nature01843
- 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, doi: 10.1104/pp.16.01844
- Hunt, L., Gray, J. E.** (2009). The Signaling Peptide EPF2 Controls Asymmetric Cell Divisions during Stomatal Development. *Current Biology*, 19:10, 864–869, doi: 10.1016/j.cub.2009.03.069
- Hunt, L., Bailey, K. J., Gray, J. E.** (2010). The signalling peptide EPFL9 is a positive regulator of stomatal development. *New Phytologist*, 186:3, 609–614, doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03200.x
- Imes, D., Mumm, P., Böhm, J., Al-Rasheid, K. A. S., Marten, I., Geiger, D., Hedrich, R.** (2013). Open stomata 1 (OST1) kinase controls R-type anion channel QUAC1 in Arabidopsis guard cells. *The Plant Journal*, 74:3, 372–382, doi: 10.1111/tpj.12133
- Jalakas, P.** (2019). Unravelling signalling pathways contributing to stomatal conductance and responsiveness. Tartu.
- Jalakas, P., Merilo, E., Kollist, H., Brosché, M.** (2018). ABA-mediated regulation of stomatal density is OST1-independent. *Plant Direct*, 2:9, e00082, doi: 10.1002/pld3.82
- Jalakas, P., Nuhkat, M., Vahisalu, T., Merilo, E., Brosché, M., Kollist, H.** (2021). Combined Action of Guard Cell Plasma Membrane Rapid- and Slow-Type Anion Channels in Stomatal Regulation. *Plant Physiology*, doi: 10.1093/plphys/kiab202

- Jewaria, P. K., Hara, T., Tanaka, H., Kondo, T., Betsuyaku, S., Sawa, S., Sakagami, Y., Aimoto, S., Kakimoto, T.** (2013). Differential Effects of the Peptides Stomagen, EPF1 and EPF2 on Activation of MAP Kinase MPK6 and the SPCH Protein Level. *Plant and cell Physiology*, 54:8, 1253–1262, doi: 10.1093/pcp/pct076
- Krämer, U.** (2015). The Natural History of Model Organisms: Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife*, 4, doi: 10.7554/eLife.06100
- Lake, J. A., Quick, W. P., Beerling, D. J., Woodward, F. I.** (2001). Signals from mature to new leaves. *Nature*, 411, 154–154, doi: 10.1038/35075660
- Larkin, J. C., Marks, M. D., Nadeau, J., Sack, F.** (1997). Epidermal Cell Fate and Patterning in Leaves. *The Plant Cell*, 9, 1109–1120, doi: 10.1105/tpc.9.7.1109
- Lau, O. S., Davies, K. A., Chang, J., Adrian, J., Rowe, M. H., Ballenger, C. E., Bergmann, D. C.** (2014). Direct roles of SPEECHLESS in the specification of stomatal self-renewing cells. *Science*, 345:6204, 1605–1609, doi: 10.1126/science.1256888
- Lau, O. S., Song, Z., Zhou, Z., ... Bergmann, D. C.** (2018). Direct Control of SPEECHLESS by PIF4 in the High-Temperature Response of Stomatal Development. *Current Biology*, 28:8, 1273–1280, doi: 10.1016/j.cub.2018.02.054
- 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*, 32, 927–938, doi: 10.1101/gad.297580.117
- 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, doi: 10.1126/science.1172408
- MacAlister, C. A., Ohashi-Ito, K., Bergmann, D. C.** (2006). Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature*, 455, 537–540, doi: 10.1038/nature05491
- Martin, C., Glover, B. J.** (2007). Functional aspects of cell patterning in aerial epidermis. *Current Opinion in Plant Biology*, 10:1, 70–82, doi: 10.1016/j.pbi.2006.11.004
- Merilo, E., Laanemets, K., Hu, H., ... Kollist, H.** (2013). PYR/RCAR Receptors Contribute to Ozone-, Reduced Air Humidity-, Darkness-, and CO₂-Induced Stomatal Regulation. *Plant Physiology*, 162:3, 1652–1668, doi: 10.1104/pp.113.220608

- Merilo, E., Yarmolinsky, D., Jalakas, P., Parik, H., Tulva, I., Rasulov, B., Kilk, K., Kollist, H.** (2018). Stomatal VPD Response: There Is More to the Story Than ABA. *Plant Physiology*, 176:1, 851–864, doi: 10.1104/pp.17.00912
- Meyer, S., Mumm, P., Imes, D., Endler, A., Weder, B., Al-Rasheid, K. A. S., Geiger, D., Marten, I., Martinoia, E., Hedrich, R.** (2010). *AtALMT12* represents an R-type anion channel required for stomatal movement in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant Journal*, 63:6, 1054–1062, doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04302.x
- Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Hashimoto, M., Iba, K.** (2008). CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature*, 452, 483–486, doi: 10.1038/nature06720
- Ohashi-Ito, K., Bergmann, D. C.** (2006). *Arabidopsis* FAMA Controls the Final Proliferation/Differentiation Switch during Stomatal Development. *Plant Cell*, 18:10, 2493–2505, doi: 10.1105/tpc.106.046136
- Papanatsiou, M., Amtmann, A., Blatt, M. R.** (2016). Stomatal Spacing Safeguards Stomatal Dynamics by Facilitating Guard Cell Ion Transport Independent of the Epidermal Solute Reservoir. *Plant Physiol.*, 172:1, 254–263, doi: 10.1104/pp.16.00850
- Park, S.-Y., Fung, P., Nishimura, N., ... Cutler, S. R.** (2009). Absciscic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science*, 324:5930, 1068–1071, doi: 10.1126/science.1173041
- Pillitteri, L. J., Sloan, D. B., Bogenschutz, N. L., Torii, K. U.** (2007). Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. *Nature*, 445, 501–505, doi: 10.1038/nature05467
- Qi, X., Torii, K. U.** (2018). Hormonal and environmental signals guiding stomatal development. *BMC biology*, 19:1, 21–21, doi: 10.1186/s12915-018-0488-5
- Qi, X., Han, S.-K., Dang, J. H., Garrick, J. M., Ito, M., Hofstetter, A. K., Torii, K. U.** (2017). Autocrine regulation of stomatal differentiation potential by EPF1 and ERECTA-LIKE1 ligand-receptor signaling. *eLife*, doi: 10.7554/eLife.24102
- Roche, D.** (2015). Stomatal Conductance Is Essential for Higher Yield Potential of C₃ Crops. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34, 429–453, doi: 10.1080/07352689.2015.1023677
- Sasaki, T., Mori, I. C., Furuichi, T., Munemasa, S., Toyooka, K., Matsuoka, K., Murata, Y., Yamamoto, Y.** (2010). Closing Plant Stomata Requires a Homolog of an Aluminum-

Activated Malate Transporter. *Plant and Cell Physiology*, 51:3, 354–365, doi: 10.1093/pcp/pcq016

Schroeder, J. I., Allen, G. J., Hugouvieux, V., Kwak, J. M., Waner, D. (2001). Guard Cell Signal Transduction. *Ann. Rev. plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 52, 627–658, doi: 10.1146/annurev.arplant.52.1.627

Sugano, S. S., Shimada, T., Imai, Y., Okawa, K., Tamai, A., Mori, M., Hara-Nishimure, I. (2009). Stomagen positively regulates stomatal density in *Arabidopsis*. *Nature*, 463, 241–244, doi: 10.1038/nature08682

Tanaka, Y., Nose, T., Jikumaru, Y., Kamiya, Y. (2013). ABA inhibits entry into stomatal-lineage development in *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal*, 74:3, 448–457, doi: 10.1111/tpj.12136

The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408, 796–815, doi: 10.1038/35048692

Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T., Shinozaki, K. (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106:41, 17588–17593, doi: 10.1073/pnas.0907095106

Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y.-F., ... Kangasjärvi, J. (2008). SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature*, 452, 487–491, doi: 10.1038/nature06608

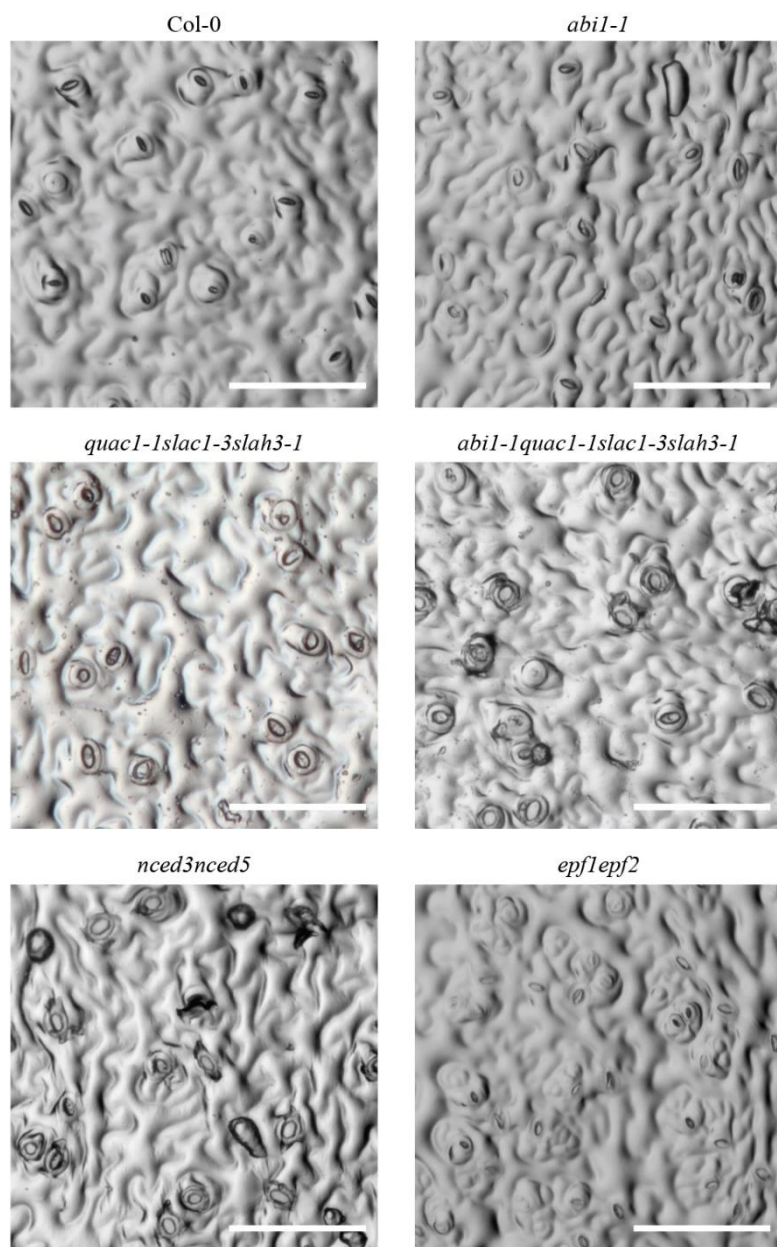
Vahisalu, T., Puzõrjova, I., Brosché, M., ... Kollist, H. (2010). Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *The Plant Journal*, 62:3, 442–453, doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04159.x

Willmer, C., Fricker, M. (1996). Stomata, Second Edition. London

Zoulías, N., Harrison, E. L., Casson, S. A., Gray, J. E. (2018). Molecular control of stomatal development. *Biochemical Journal*, 475:2, 441–454, doi: 10.1042/BCJ20170413

LISAD

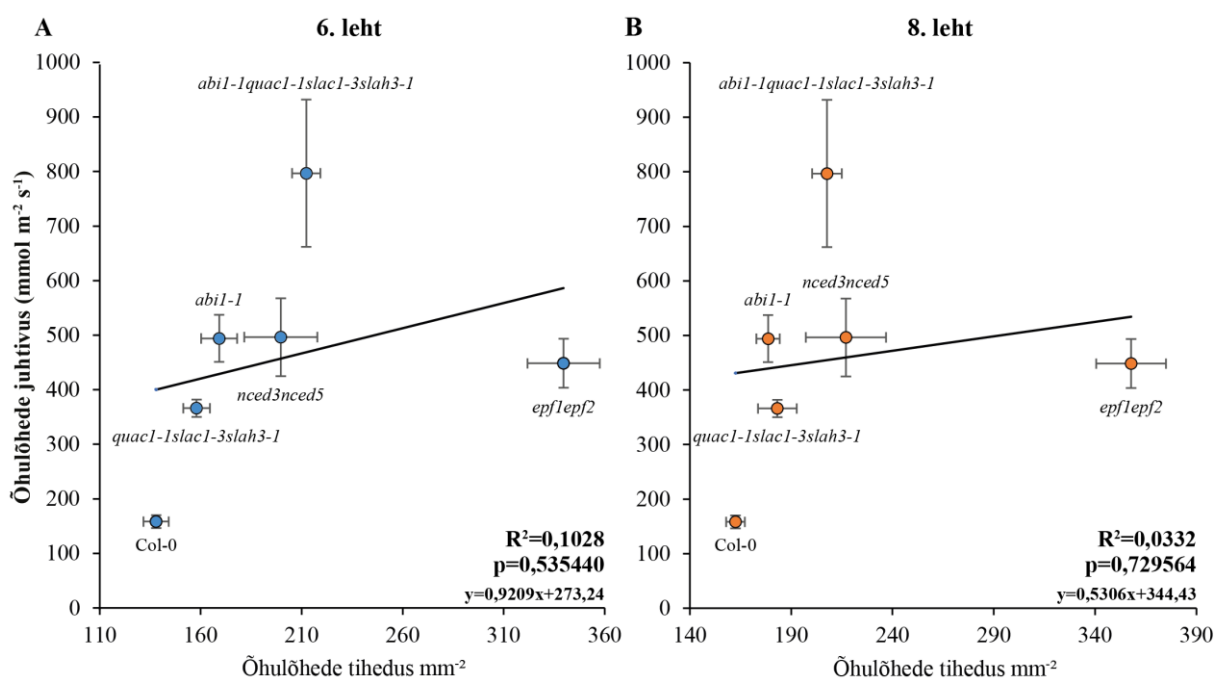
Lisa 1



Joonis 8. Näidisfotod töös kasutatud metsiktüüp Col-0 ja mutantide 6. lehe alumisest küljest, mida kasutati õhulõhede tiheduse ja indeksi määramiseks.

Taimed olid lehejäljendi võtmise ajal 35–36 päeva vanused. Fotod on tehtud Zeiss SteREO Discovery V20 mikroskoobiga kasutades 3,5-kordset objektiivi. Skaalariba tähistab 100 µm.

Lisa 2



Joonis 9. Korrelatsioon õhulõhede juhtivuse ja tiheduse vahel 6. (A) ja 8. lehes (B).

Regressioonanalüüs on tehtud mutantide keskmistatud tiheduste ja juhtivuste põhjal. Statistiliseks analüüsiks kasutati üldise lineaarse mudeli regressioonanalüüsi.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Hanna Vask,

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

Õhulõhede tihedus, indeks ja juhtivus ABA signaalraja ja õhulõhede arengu mutantidel,

mille juhendajad on Pirko Jalakas ja Ebe Merilo,

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

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

Hanna Vask

31.05.2021