

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
BOTAANIKA OSAKOND

**Akvaporiinide roll taimede veevahetuses ja peamiste neid kodeerivate
geenide fragmentide järjestuste analüüs kolmes odrasordis (*Hordeum
vulgare*)**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Raili Randmäe

Juhendajad PhD Eele Õunapuu-Pikas

PhD Hanna Hõrak

Tartu 2026

INFOLEHT

Akvaporiinide roll taimede veevahetuses ja peamiste neid kodeerivate geenide fragmentide järjestuste analüüs kolmes odrasordis (*Hordeum vulgare*)

Akvaporiinid on transmembraansed poore moodustavad valgud, mis mängivad olulist rolli mitmetes taime eluks vajalikes protsessides. Üheks tähtsamaks neist on veevahetus, mille käigus taim omastab mullast vett, toimub selle transport läbi taimeosade ning viimaks vabastatakse üleliigne õhulõhede kaudu atmosfääri. Käesoleva töö esimeses osas antakse ülevaade veevahetuse ja akvaporiinide teoreetilisest taustast. Eksperimentaalses osas kirjeldatakse katseid, mis viidi läbi, et võimaldada kolme hariliku odra sordi (*Hordeum vulgare* L. 'Golden Promise', *Hordeum vulgare* L. 'Vanille' ja *Hordeum vulgare* L. 'Marta') valitud akvaporiinide geeniekspressiooni analüüsi. Selleks paljundati nende geenide fragmendid PCR-iga ja sekveneeriti ning võrreldi saadud järjestusi referentsgenoomiga ja omavahel. Seejärel hinnati, kas saadud järjestuste põhjal on võimalik disainida kõikidele sortidele sobivaid primereid qPCR-i läbi viimiseks.

Märksõnad: akvaporiinid, TIP, PIP, veevahetus, harilik oder

CERCS: B225 Taimeneetika

The role of aquaporins in plant water relations, and partial sequencing of their major encoding genes in three barley (*Hordeum vulgare*) varieties

Aquaporins are transmembrane pore-forming proteins that play an important role in several processes necessary for a plant to thrive. One of the most significant of those is plant water relations, in which a plant absorbs water from the soil, followed by its transport through the plant's parts and finally the release of excess into the atmosphere through stomata. The first part of this thesis gives an overview of the theoretical background of plant water relations and aquaporins. The experimental part describes tests run on three barley varieties (*Hordeum vulgare* L. 'Golden Promise', *Hordeum vulgare* L. 'Vanille', and *Hordeum vulgare* L. 'Marta') to analyze the expression of chosen aquaporin genes. For that, fragments of those genes were amplified through PCR and sequenced. Then assessments were made, whether or not qPCR primers suitable for all the varieties could be designed based on those sequences.

Key words: aquaporins, TIP, PIP, plant water relations, barley

CERCS: B225 Plant genetics

SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Taimede veevahetus.....	8
1.1.1. Vee omastamine juurte kaudu.....	8
1.1.2. Vee transport läbi taime keha	10
1.1.3. Veekaotus transpiratsiooni teel	11
1.2. Akvaporiniidid	12
1.2.1. Akvaporiniidide struktuur	13
1.2.2. Plasmamembraanisisesed valgud (<i>Plasma membrane intrinsic proteins</i>)	13
1.2.2.1. PIP1	14
1.2.2.2. PIP2	14
1.2.3. Tonoplastisisesed valgud (<i>Tonoplast intrinsic proteins</i>)	14
1.2.4. Akvaporiniidide ekspressiooni ja aktiivsuse regulatsioon	15
1.2.4.1. Akvaporiniidide transkriptsiooniline regulatsioon.....	15
1.2.4.1.1. Akvaporiniidide ekspressiooni regulatsioon põuatingimustes.....	16
1.2.4.1.2. Fütohormoonide ja metallide mõju akvaporiniidide regulatsioonile.....	16
1.2.4.2. Akvaporiniidide posttranslatsiooniline regulatsioon	17
1.2.4.2.1. Fosforüülimine.....	17
1.2.4.2.2. Ubikvitineerimine.....	18
1.2.4.3. Akvaporiniidide aktiivsuse regulatsioon tetramerisatsiooni teel.....	18
1.2.4.4. pH taseme mõju akvaporiniidide aktiivsuse regulatsioonile	19
1.2.4.5. Akvaporiniidide paiknemine ja liikumine rakus	19
1.3. Akvaporiniidide roll veevahetuses ja taimede vastupidavuses stressitingimustele.....	19
1.3.1. PIP akvaporiniidide ekspressioon ja aktiivsus stressitingimustes.....	20
1.3.2. TIP akvaporiniidide ekspressioon ja aktiivsus stressitingimustes.....	21
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	23
2.1. Töö eesmärgid.....	23
2.2. Materjal ja meetodika	23
2.2.1. Uuritavad odrasordid ning geenid.....	23
2.2.2. Taimede kasvatamine ning geneetilise materjali eraldamine.....	24
2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR).....	25
2.2.4. Geelelektroforees	26
2.2.5. PCR-produktide puhastamine ja DNA kontsentratsiooni mõõtmine	27

2.2.6. Sekveneerimissegude valmistamine.....	27
2.2.7. Sekveneerimistulemuste analüüs	27
2.2.7. Korduskatsed	28
2.3. Tulemused	31
2.3.1. Sekveneerimistulemuste ülevaade.....	31
2.3.2. Joondustes esinevad erisused	32
2.3.2.1. Akvaponiiniid	32
2.3.2.1.1. PIP1;1	32
2.3.2.1.2. PIP1;3	33
2.3.2.1.3. PIP2;1	34
2.3.2.1.4. PIP2;2	35
2.3.2.1.5. PIP2;5	36
2.3.2.1.6. TIP1;1	36
2.3.2.1.7. TIP1;2	36
2.3.2.2. Referentsgeenid qPCR-i jaoks	37
2.3.2.2.1. EF-1	37
2.3.2.2.2. GADPH	39
2.3.2.2.3. SIP2;1	41
2.3.2.2.4. UPL7.....	41
2.4. ARUTELU	43
2.4.1. Akvaponiiniide geenide uurimise olulisus.....	43
2.4.2. Metoodilised väljakutsed odra geenide analüüsil.....	43
2.4.3. Tulemuste hinnang ja järeldused	44
KOKKUVÕTE	45
RESÜMEE	46
TÄNUSÕNAD	48
KASUTATUD KIRJANDUS	49
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	56
LISAD.....	57
LIHTLITSENTS	60

KASUTATUD LÜHENDID

MIP – *membrane intrinsic protein*, membraanisisene valk

PIP – *plasma membrane intrinsic protein*, plasmamembraanisisene valk

TIP – *tonoplast intrinsic protein*, tonoplastisisene valk

ABA - abstsiiishape

SISSEJUHATUS

Viimaste aastate jooksul on maailmas aset leidnud hulganisti suuri ja laialdase mõjuga sündmusi. Koroonapandeemia, kliimamuutused ning eri piirkondi hõlmavad konfliktid on inimeste toiduturvalisuse varasemast enam proovile pannud (The Economist Group, 2022). Erinevate põhjuste koostoimel on tekkinud olukord, kus toit ei ole enam piisavalt kättesaadav, seda kas tootmisraskuste või kasvavate hindade tõttu. Ühe lahendusena, peamiselt kliimaprobleemide ja mageveepuuduse kontekstis, nähakse toidusüsteemi uuendamist selliseks, et tagada selle vastupidavus ka keerulisemates tingimustes.

Veetransport on taimede puhul üks elutähtsamaid protsesse, mis on otseselt seotud nii nende kasvamise kui ka arenguga (Suslov, 2025). Et taimefüsioloogia üheks laiemaks eesmärgiks on leida võimalusi taimede vastupidavuse edendamiseks, keskendub veetranspordi uurimine suuresti stressitingimustele. Olenevalt kindlast eesmärgist saab sellele aga läheneda erinevate nurkade alt. Näiteks see, kuidas taimede veevahetust mõjutab põud, millest on kirjutanud Zhang *et al.* (2025) või see, kuidas akvaporiiinid protsessis esinevaid tõrkeid kõrvaldada aitavad, nagu on oma uurimuses kirjeldanud Suslov (2025).

Akvaporiiinid on üks oluline element taimede põuatundlikkuse uurimisel (Zhang *et al.*, 2025). Nende peamine tähtsus seisneb selles, et need mängivad suurt rolli taimede üldises võimes viia läbi veevahetust. Läbi vee ning muude vajalike molekulide transportimise aitavad need tagada taime ioonilist tasakaalu ja piisavat veehulka stressitingimustega toime tulemiseks. Tavapärastes tingimustes võimaldavad akvaporiiinid veevahetusel toimuda suuremas mahu, põua puhul aga hakkab tööle kaitsemehhanism, mis aitab vett taimes säilitada.

Mullast vee omastamisel mängivad akvaporiiinid rolli siis, kui vesi peab juure ja ksüleemi vahel läbima vähemalt ühte membraani ega liigu ainult apoplastis (Knipfer ja Fricke, 2010). On leitud, et hariliku odra (*Hordeum vulgare*) puhul akvaporiiinidel see roll on. Kuna tegemist on ka ühe laiemalt levinud toiduks kasvatatava teraviljaga, on selliste seoste uurimine oluline, et kaardistada keeruliste kliimatingimuste mõju meie toidulauale ning leida viise, kuidas taimede vastupidavust tõsta.

Käesolev lõputöö koosneb nii teoreetilisest kui ka praktilisest osast. Teoreetilise osa eesmärgiks oli anda ülevaade taimede veevahetusest, kirjeldada akvaporiiinide ehitust, klassifikatsiooni ja regulatsiooni ning kirjeldada nende osalust taimede veevahetuses. Praktilise osa eesmärgiks oli määrata hariliku odra kolme sordi (*Hordeum vulgare* L. 'Golden Promise', *Hordeum vulgare* L.

‘Marta’, *Hordeum vulgare* L. ‘Vanille’) peamiste akvapiinide osalised geenijärjestused ning analüüsida, kas ja millisel määral esineb akvapiinide geenijärjestustes erinevusi sortide vahel. Praktilise osa tulemused võimaldavad edaspidi uurida erinevate keskkonnaparameetrite mõju nende odrasortide akvapiinide geeniekspressioonile.

Töö koostati Tartu Ülikooli ökoloogia ja maateaduste instituudis (TÜ ÖMI) botaanika osakonnas, eksperimentaalne osa viidi läbi Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis (TÜ TI).

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Taimede veevahetus

Taimed omastavad läbi juurte mullast suures koguses vett, aga metaboolsete vajaduste katmiseks kasutavad sellest reaalsuses üsna väikest osa (Chary ja Reddy, 2004). Ülejääk väljutatakse taime maapealsete osade kaudu, enamasti aurustununa. Kuigi läbi aurustumise liigub taimest üsna palju vett välja, on üldine kadu väike, kuna vee aurustumisel rakukestast tekib tugev tõmbejõud, mille abil taim mullast pidevalt vett juurde omastab (Passioura, 2010). Seda protsessi tervikuna nimetatakse taime veevahetuseks (ingl *plant water relations*) ning sisuliselt saab selle jagada kolmeks etapiks: vee omastamine juurte kaudu, transport läbi taime keha ja veekaotus transpiratsiooni teel (Chary ja Reddy, 2004).

1.1.1. Vee omastamine juurte kaudu

Esimeses ja kõige keerukamas etapis toimub vee sisenemine mullast juurtesse. Eelmainitud veeringluse toimimiseks on oluline, et taime juurestiku veeimamisvõime ei oleks piiravaks teguriks. Kui juured vett omastavad, siis veepotentsiaal nendega kokku puutuvass mullas ehk risosfääris langeb (Chavarria ja Santos, 2012). Veepotentsiaal (ψ) näitab mingis keskkonnas oleva vee potentsiaalset energiat puhta veega võrrelduna. Kuigi tegemist on keemilise potentsiaaliga, on taimefüsioloogid rõhu olulisuse tõttu taimedes seda just läbi rõhu käsitlenud, mistõttu saab seda kirjeldada kui osmootse, gravimeetrilise ja õhu rõhkude ning maatrikspotentsiaali summat (Passioura, 2010; Scharwies ja Dinneny, 2019). Selle tagajärjena tekib risosfääri ning seda omakorda ümbritseva mulla vahel veepotentsiaali gradient, mistõttu Chavarria ja Santose (2012) uurimuse järgi hakkab vesi liikuma taime suunas. Vee liikumiskiirus mullast juurde on sõltuv erinevatest faktoritest, näiteks taime veevajadusest, mullatüübist ja selle hüdraulilisest juhtivusest ning mulla veesisaldusest (Chavarria ja Santos, 2012; Krounbi ja Lazarovitch, 2011). Mulla veesisaldust omakorda võivad mõjutada selle poorsus ja orgaaniline koostis (Scharwies ja Dinneny, 2019).

Oluline roll on ka taime enda juurestikul (Chavarria ja Santos, 2012). Kuna juurte imamisvõime sõltub otseselt nende ja mulla vahelise kokkupuutepinna suurusest, on pikemad ja puitumata juured võtmetähtsusega selle parandamises. Juurestiku suurust ning seeläbi võimet vett omastada mõjutavad tugevalt ka mulla orgaaniline koostis ja tekstuur (Junchao *et al.*, 2023). Leiti, et suurema tihedusega substraadil kasvanud taimede juurestiku biomass oli oluliselt väiksem kui väiksema

tihedusega substraadi puhul. Sellega seoses suudab niiskemates piirkondades väiksem juurestik ning sellest tulenevalt ka väiksem risosfäär katta kogu taime veevajaduse, mistõttu sealsed taimed kuigi pikki juurestikke ei vaja; kuivemates kohtades seevastu võib juurestik moodustada kuni 90% taimede biomassist, kuna veevajaduse rahuldamiseks on vaja kasutada suuremat ala (Chavarria ja Santos, 2012; Junchao *et al.*, 2023).

Juurteni jõudes oleneb vee imendumine veepotentsiaali gradiendist risosfääri ja juureksüleemi vahel (Chavarria ja Santos, 2012). Antud gradient saab tekkida kahe erineva absorptsiooniprotsessi tulemusena. Osmootne imendumine on tavapärane madala transpiratsioonaktiivsusega taimede puhul ning eeldatavateks tingimusteks on üldiselt kõrged õhutemperatuurid ja piiramatult veevarustus mullas, aga transpiratsioon ehk taimaurumine on piiratud näiteks lehtede puudumise tõttu. Sellisel juhul kogunevad ksüleemitorukestesse liigsed varuained, näiteks sahharoos, vähendades ksüleemi veepotentsiaali võrreldes mulla veepotentsiaaliga (Kramer ja Boyer, 1995, viidatud Chavarria ja Santos, 2012 kaudu). Selle tulemusel tekib gradient ja saab toimuda vee imendumine ning juuresisese rõhu tõusmine, põhjustades omakorda gutatsiooni ehk tilkvee eraldumist veelõhede kaudu. Passiivse absorptsiooni puhul on transpiratsioonimaht kõrgem. Tänu sellele on näha rõhupotentsiaali olulisust juureksüleemi ja risosfääri vahelise gradiendi tekitamisel. Taime transpiratsiooniline aktiivsus tekitab vee massvoolu ning juurtest saab passiivne vee sissevõtuorgan.

Vee edasiseks liikumiseks juure väliskihist ehk epidermist sisemisse kihti ehk endodermi on kolm peamist rada. Apoplastilises rajas liigub vesi läbi rakuvaheruumi ilma rakkudesse sisenemata ja ühtegi membraani läbimata. Sümplastilises rajas liigub vesi rakust rakku mööda plasmodesme ehk peenikesi tsütoplasmaühenduste kimpe. Rakku sisenemiseks peab vesi läbima rakumembraani. Transmembraanses rajas on eelnevad variandid kombineeritud: vesi liigub rakust rakku korduvalt rakku sisenedes ja sealt väljudes, läbides järjepidevalt rakumembraane. Seega liigub vesi vaheldumisi nii sümplastis kui apoplastis. Kuigi antud radade täpne olulisus ei ole veel lõpuni selge, on leitud seoseid, mille kohaselt madala transpiratsioonilise aktiivsusega taimedes esineb sageli sümplastiline transport ja kõrge transpiratsioonilise aktiivsuse puhul apoplastiline transport (Boyer, 1986, viidatud Chavarria ja Santos, 2012 kaudu; Steudle, 2001). Endodermis asub ka hüdrofoobne Caspari vöö, kus vee liikumine apoplastis on takistatud ning edasiliikumiseks peab vesi sisenema rakkudesse ja läbima rakumembraane. See tagab vee ja mineraalide filtreerumise enne nende edasi liikumist ja seeläbi ka selektiivsuse (Vilakar *et al.*, 2025).

1.1.2. Vee transport läbi taime keha

Juurte kaudu sisenemise järel peab vesi liikuma edasi taime maapealsetesse osadesse. Erinevalt esimesest etapist on selle mehhanismide ümber olnud rohkem diskussioone, kuna vesi liigub läbi ksüleemi, mille moodustavad valdavalt surnud rakud, mistõttu transporti tuleb seletada ilma otseste energiaallikateta. 19. sajandi lõpus pakuti selle selgitamiseks välja kohesiooni-tõmbe teooria (ingl *cohesion-tension theory*), mille järgi on vee liikumine taimede varres seotud transpiratsiooniga (Chavarria ja Santos, 2012; Steudle, 2002). Antud teooria järgi tekitab transpiratsioon ksüleemis tõmbejõu ning veemolekulide vaheliste vesiniksidemete mõjul tekib juurtest lehtedeni ulatuv veesammas, mille liikumissuund on suurema veepotentsiaaliga juurtest varte ning lehtede poole, kus potentsiaal on väiksem (Chavarria ja Santos, 2012). Siin mängivad olulist rolli ka kapillaarjõud. Vesi liigub taimedes mööda ksüleemi ning täidab pidevalt lehtede rakuvahe ruumi. Kui vesi lehtede kaudu aurub, asendatakse see ksüleemi moodustavate trahheede ja trahheidide õõnsuses oleva veega. See, kumba veetranspordiks kasutatakse, on liigispetsiifiline. Mõlemad nimetatud juhtkoed koosnevad pikkadest rakkudest, esimesed on üherakulised ja teised mitmerakulised torujad struktuurid.

Kuigi vesi moodustab sellest suure osa, kuulub ksüleemimahla koostisesse veel mitmeid erinevaid molekule (Takamatsu *et al.*, 2023). Märkimisväärsimatest metallidest saab välja tuua kaaliumi, baariumi, alumiiniumi ja mangaani, mittemetallidest näiteks kloori, SO_4^{2-} ja üldiselt väävlit.

Kui ksüleemi veevoolus esineb tõrkeid, tekitab see taimes märkimisväärset stressi. Ksüleemi toimimist võivad pärssida näiteks veepuudus, soolsus, madalad temperatuurid või patogeenid (Cornelis ja Hazak, 2022). On leitud, et veepuuduse mõjul tõuseb pinge ksüleemi juhtkudedes, mille tagajärjel tekivad veevoolus katked ning blokaadid. Sarnast mõju on täheldatud ka kasvukeskkonna liigkõrgete soolatasemete puhul. Samas on selgunud, et kõrged temperatuurid ksüleemi oluliselt ei mõjuta, kuna see koosneb surnud rakkudest, mistõttu võime vett juhtida säilib ka siis, kui seda ümbritsevad elusrakud kannatada on saanud (Van de Wal *et al.*, 2017).

Selleks, et vesi pääseks edasi taime lehtedesse, peab see ksüleemist välja liikuma. Et seda teha, tuleb läbida ksüleemi parenhüüm ja pärgrakud, misjärel peab vesi liikuma mööda mesofüllist (Barbour *et al.*, 2017). See kujutab endast vee liikumise teel üsna märkimisväärset takistust, kuna läbida tuleb mitmeid membraane nii rakkudesse sisenemiseks kui sealt väljumiseks.

Erinevate keskkonnategurite mõju vee liikumisele lehtedes on valdavalt üsna sarnane, põhjustades veevoolus katkeid ja seeläbi puudulikku veevarustust ning kuivamist (Muries Bosch *et al.*, 2019).

Samas on taimelehtedel võime vett vajaduse korral ka säilitada ja vajadusele vastavalt ümber paigutada, mida kirjeldatakse lehe veevarude mahtuvusena (ingl *leaf water storage capacitance*), et seeläbi veepuudusega paremini toime tulla.

1.1.3. Veekaotus transpiratsiooni teel

Veevahetuse kolmandaks etapiks on transpiratsioon ehk taimaurumine, mis on kogu veevahetuses liikumapanevaks jõuks. Caemmerer ja Baker (2007) on oma artiklis välja toonud, et tegemist on fotosünteesiga vältimatult kaasneva protsessiga. Selleks, et vesi taimedest piiramatult aurustuda ei saaks, on need kaetud vett mitteläbilaskvate kihtidega, milles asuvad õhulõhed (ingl *stomata*). Õhulõhede toimimises mängivad olulist rolli mitmed (keskkonna)tegurid: valgus, CO₂ kontsentratsioon atmosfääris ja taimehormoonid on olulised faktorid, mis võivad mõjutada nii õhulõhede arengut kui ka avatust (Hetherington ja Woodward, 2003). Nende kaudu toimub taime ning seda ümbritseva keskkonna vahel gaasivahetus. Kuna fotosünteesi ja üldise ainevahetuse jaoks on vaja CO₂, avab taim selle omastamiseks oma õhulõhed. Et aga taimedel ei ole membraane, mis oleks samaaegselt süsihappegaasi jaoks läbitavad ja vee jaoks läbimatud, kaasneb sellega veekadu. See, kui palju õhulõhed avanevad, oleneb neid ümbritsevate sulgrakkude turgorist ja selle regulatsiooniga püüab taim tasakaalustada CO₂ sidumist ja kaotatud vee hulka. (Caemmerer ja Baker, 2007; Muries Bosch *et al.*, 2019; Nilson ja Assmann, 2007). Nilson ja Assmann (2007) on oma uurimuses maininud, et sulgrakkude turgori muutuseid põhjustab raku veepotentsiaali muutus, mille toob endaga kaasa ionide (K⁺, Cl⁺, malaat²⁻) kontsentratsioonide kõikumine. Õhulõhede avanemine toimub kõrgema ja sulgumine madalama kontsentratsiooni tagajärjel. Antud artiklis käsitletakse ka seda, et õhulõhede avanemist ja sulgumist mõjutavad lisaks ka taimehormoonid, täpsemalt abstsissihape (ABA). Konkreetselt on käsitletud põuatingimusi, mille käigus abstsissihape taime varres koguneb ning õhulõhede suletust soodustab, aidates taimel läbi vee säilitamise selle puudusega substraadis toime tulla (Nilson ja Assmann, 2007). Antud protsessis mängib olulist rolli ka taime hüdrauliline juhtivus, ehk parameeter, millega iseloomustatakse vee liikumise efektiivsust taime juhtkudedes (Krieger ja Schymansky, 2023). Selle näitaja abil on võimalik hinnata, kas ksüleemis liikuv vesi on piisav, et korvata vee aurustumisega kaasnevat kadu.

1.2. Akvaporiniidid

Akvaporiniidid ehk veekanalid on transmembraansed poore moodustavad valgud, mis mängivad olulist rolli taimede vastupidavuses erinevate tingimuste suhtes (Gautam ja Pandey, 2021; Maurel *et al.*, 2015). Nende peamiseks funktsiooniks on osalemine vee ja ka teiste väikeste neutraalsete lahustunud ainete ja lahustunud gaasimolekulide selektiivses transpordis läbi bioloogiliste membraanide, näiteks veemolekulide rakkudevahelises transpordis rakkude sisemusse ning organellideni (Chaumont *et al.*, 2000; Muries Bosch *et al.*, 2019; Prado ja Maurel, 2013). Akvaporiniidid moodustavad rakkudevahelisi tundeid, läbi mille saab vesi elektrostaatiliste jõudude mõjul mõlemas suunas liikuda. Neid esineb taimede kõigis osades: juurtes, varres, lehtedes, õites ja ka seemnetes (Maurel ja Chrispeels, 2001). Kuigi akvaporiniidid leidub peaaegu kõigis elusorganismides, on taimede puhul teistega võrreldes täheldatud suuremat hulka nende homolooge (Javot *et al.*, 2003; Maurel ja Chrispeels, 2001). Samuti võib neid taimede puhul leida peaaegu kõikides rakusisestes struktuurides, näiteks plasmamembraanis, tonoplastis, endoplasmaatilises retiikulumis, Golgi kompleksis ja kloroplastis (Li *et al.*, 2014).

Suuresti saab akvaporiniidid oma järjestuse ja asukoha alusel jagada viieks suuremaks perekonnaks, milleks on plasmamembraanisisesed valgud (PIP) ning tonoplastisisesed valgud (TIP), millele keskendutakse ka käesolevas töös; *nodulin intrinsic proteins* (NIP), *small basic intrinsic proteins* (SIP) ja *X intrinsic proteins* (XIP) (Chaumont *et al.*, 2000). Lisaks on leitud kolm väiksemat alam perekonda *GlpF-like intrinsic proteins* (GIP), *hybrid intrinsic proteins* (HIP) ja *large intrinsic proteins* (LIP), mis on omased evolutsioonis varem arenenud taimedele nagu vetikad ja samblad (Hussain *et al.*, 2020).

Näiteks harilikus nisus (*Triticum aestivum* L.) leitud 113-st akvaporiniidid kodeerivast geenist 51 kuuluvad PIP-perekonda, 29 TIP-perekonda, 29 NIP-perekonda ja 4 XIP-perekonda (Madrid-Espinoza *et al.*, 2018). Harilikus odras identifitseeritud 40 akvaporiniidid kodeeriva geeni seas on tuvastatud 19 PIP-i, 11 TIP-i, 8 NIP-i ja 2 SIP-i (Hove *et al.*, 2015).

Selektiivsuse põhjal saab akvaporiniidid jagada kaheks funktsionaalseks rühmaks: nn “tavapärased” (ingl *orthodox*) akvaporiniidid, mis on läbitavad ainult veele, ja akvagliitseroporiiniidid, mis on läbitavad ka teistele väiksematele molekulidele, nt gliitseroolile (Gena *et al.*, 2011).

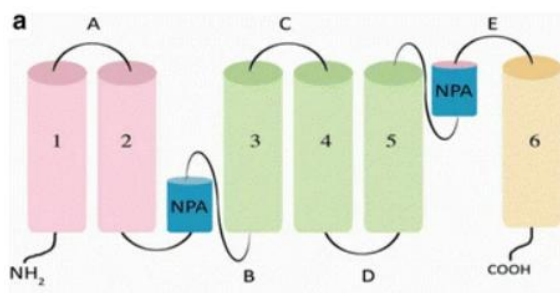
On leitud, et membraanid, milles akvaporiniidid esinevad, on 5-100 korda parema vee läbilaskevõimega kui need, milles need puuduvad (Bognia *et al.*, 1999, viidatud Gena *et al.*, 2011 kaudu). Elavhõbe on üks tuntumaid akvaporiniidid inhibiitoreid. Taimedes, mida HgCl₂-ga töödeldi, täheldati olulist

langust nende võimes vett juhtida (Lovisolo ja Schubert, 2006). Sellest võib järeldada, et akvaporiiinide roll taimede veevahetuse regulatsioonis on märkimisväärne.

Kuigi veetransport on üks akvaporiiinide kesksemaid rolle taimedes, on nende olemasolu märkimisväärse tähtsusega ka muude funktsioonide toimimiseks. Näiteks erinevate NIP-ide puhul on leitud, et need on oluliseks läbipääsuteeks boorile ja ränile, TIP-id aitavad juhtida ammooniumi ja ammoniaaki ning PIP1;2 on seostatud süsihappegaasi transpordiga. (Li *et al.*, 2014)

1.2.1. Akvaporiiinide struktuur

Struktuuriliselt koosnevad akvaporiiinid kuuest transmembraanest alfa-heeliksist koos tsütosooli poole suunatud C- ja N-terminaalsete otstega (Kapilan *et al.*, 2018). Lisaks kuuluvad nende ehitusse viis heeliksiga seotud aasa A-E. Aasad B ja D asuvad tsütoplasmas sees, aasad A, C ja E aga sellest väljaspool. Tsütoplasmasisesed aasad B ja D on väga hüdrofoobsed ja sisaldavad asparagiin-proliin-alaniini (NPA), mis ulatub läbi kogu poori. NPA on üks võtmelemente akvaporiiinide toimimise tagamisel. Aasadega B ja D on ühendatud ka tsütoplasmaväline aas C ning see on vajalik tunneli läbilaskvuseks. (Joonis 1)



Joonis 1. Akvaporiiini ehituse lihtsustatud skeem (Kapilan *et al.*, 2018).

1.2.2. Plasmamembraanisisesed valgud (*Plasma membrane intrinsic proteins*)

Plasmamembraanile omased valgud (PIP-id) moodustavad akvaporiiinide suurima perekonna, näiteks *Arabidopsis* perekonna genoomi 35-st akvaporiiine kodeerivast geenist 13 on PIP-ide geenid (Gupta ja Sankararamakrishnan, 2009). Üldiselt on leitud, et umbes 40% taimedes leiduvatest akvaporiiinidest kuuluvad PIP-ide perekonda (Yanegg *et al.*, 2014). Enim leidub neid taimeosades, kus veehulga kõikumised on suurimad, näiteks juhtkoed ja õied. Usutakse, et PIP-ide uurimisel võib olla võtmetähtsus stressi suhtes parema taluvusega põllukultuuride arendamises (Kumar *et al.*, 2018).

PIP-ide C-terminaalses otsas on mitu tavapärasest aminohapet. Mõningate erinevuste põhjal (C-terminaalse otsa pikkus, aminohappelised asendused, vee läbilaskvus, rakulised funktsioonid) jagatakse PIP-id veel kaheks alamrühmaks: PIP1 ja PIP2 (Kapilan *et al.*, 2018). Samas on leitud, et alamrühmade aminohapped on ligi 80% ulatuses sarnased (Bienert *et al.*, 2018).

1.2.2.1. PIP1

PIP1-alamrühma kuulub viis isovormi ja võrreldes PIP2-ga on nende N-terminaalsed otsad pikemad ja C-terminaalsed lühemad (Maurel, 2007). PIP1 valke leidub valdavalt plasmamembraanis. Nende vee läbilaskvust ei peeta eriti heaks ning mõned neist ei suuda toimida iseseisvalt ja peavad PIP2 monomeeridega moodustama heterotetrameere (Chaumont *et al.*, 2000; Fetter *et al.*, 2004; Gautam ja Pandey, 2021). Sellegi poolest on PIP1 valkudel oluline roll taime füsioloogilistes protsessides, sh juurte veeomastamise regulatsioonis ja kogu taime veevahetuses ning stressireaktsioonides (nt külmataluvus). Samuti peetakse osasid PIP1-sid lisaks veele ka glütserooli ja süsihappegaasi transportijateks.

1.2.2.2. PIP2

PIP2-rühma kuulub kaheksa isovormi, mis on samuti lokaliseeritud peamiselt taimerakkude plasmamembraanis. Neid peetakse veekanalitena tõhusamateks kui PIP1 valkused ning arvatakse, et need on ka rakkudevahelise veetranspordi peamiseks rajaks (Kapilan *et al.*, 2018). PIP1-ga võrreldes on PIP2-le omased lühem N-terminaalne ja pikem C-terminaalne ots. Lisaks on PIP2 puhul esimese tsütoplasmaaväliste aasa küljes 4-10 aminohapet enam. Antud omadused võivad mängida olulist rolli rakkudevahelise veetranspordi toimimises kõikides taimeosades. Näiteks on funktsionaalseid PIP2 isovorme leitud ka taimede reproduktiivorganites (Bots *et al.*, 2004). Kuna rakkudevaheline veeliikumine on oluline aspekt taimede sugulise paljunemise käigus, rõhutab see PIP2 akvaporinide tähtsust lisaks taimede veevahetusele ka nende paljunemises. Sellest lähtub ka, et lisaks kogu taime tasandile mängivad PIP2-d olulist rolli ka organi tasandil veetasakaalu reguleerimises.

1.2.3. Tonoplastisisesed valgud (*Tonoplast intrinsic proteins*)

Nagu nimi viitab, leidub tonoplastisisesid valke (TIP-e) enim just tonoplastis ehk vakuole ümbritsevates membraanides (Kapilan *et al.*, 2018). Mitmetes taimedes on leitud viis TIP isovormi (Chinnasamy *et al.*, 2021; Fleurat-Lessard *et al.*, 2005). Kuna tonoplastis on akvaporine rohkem

kui rakumembraanis, on ka selle vee läbilaskevõime oluliselt kõrgem. Tänu sellele saavad toimuda vajalikud kohandused tsütoplasma osmootse tasakaalu säilitamiseks ning turgori hoidmine (Fleurat-Lessard *et al.*, 2005). Lisaks osalevad TIP akvaporiiinid lahustunud ainete (glütserool, urea ja ammoniaak) transpordis (Chinnasamy *et al.*, 2021). Taime arengus mängivad TIP-id olulist rolli lehtede arengus, juurte kasvamises ja seemnete idanemises (Ayadi *et al.*, 2019).

1.2.4. Akvaporiiinide ekspressiooni ja aktiivsuse regulatsioon

Geeniekspressiooni käigus sünteesitakse geneetilise informatsiooni põhjal valke. Selle regulatsioon on protsess, kus geen transkribeeritakse ning mRNA transleeritakse funktsionaalseks valguks. Kapilan *et al.* (2018) on oma artiklis öelnud, et akvaporiiinide roll taimedes tõestati esmakordselt läbi nende geeniekspressiooni uurimise erinevates keskkonnatingimustes. Akvaporiiinide ekspressiooni mõjutavateks faktoriteks võivad olla näiteks vee kättesaadavus, soolsus, madalad või kõrged temperatuurid ja taime füüsilised kahjustused (Kapilan *et al.*, 2018). Lisaks mängivad siin rolli ka füto- ehk taimehormoonid nagu giberelliin ja abtsiinhape (Liang *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2007). Kapilan *et al.* (2018) põhjal on akvaporiiinide veetransport keerukas protsess, hõlmates erinevaid mehhanisme ja faktoreid. Membraanivalkude ekspressiooni reguleeritakse rakuspetsiifiliselt hormoonide ja keskkonnatingimuste toimele ning selleks võib olla mitmeid erinevaid signaaliradasid (Kapilan *et al.* 2018). Iga akvaporiiini sünteesiva geeni ekspressiooni mõistmine on erinevate transkriptsiooniliste, translatsiooniliste ja posttranslatsiooniliste sammude tõttu keeruline (Maurel ja Chrispeels, 2001). On aga erinevaid mehhanisme, millega saab nende geenide regulatsiooni toimimist kirjeldada. Selle mõistmine on oluline, kuna akvaporiiinide avaldumist on otseselt seostatud taime võimega vett transportida (Kapilan *et al.*, 2018).

1.2.4.1. Akvaporiiinide transkriptsiooniline regulatsioon

Akvaporiiinide geeniekspressiooni uurimine on tõestanud, et nende transkriptsioonis toimub erinevate stressitekitajate ja arengufaaside käigus hulgaliselt muutuseid, eelkõige selliseid, mis puudutavad akvaporiiinide geenide transkriptsiooni kontrollivaid transkriptsioonifaktoreid (Yang *et al.*, 2026). Stressitingimused, mis akvaporiiinide transkriptsioonilist regulatsiooni võivad mõjutada, on näiteks abiootiline stress (põud, soolsus, ebasoodsad temperatuurid) ja metallioonide üleküllus.

1.2.4.1.1. Akvaporiinide ekspressiooni regulatsioon põuatingimustes

Taimedes laialt levinud AP2/ERF (APETALA2/*ethylene-responsive element binding factors*) transkriptsioonifaktoritest ühed abiootilise stressi kontekstis enimuuritud on DREB (*dehydration response element binding*) valgud (Feng *et al.*, 2020, viidatud Yang *et al.*, 2026 kaudu). On leitud, et DREB-tüüpi transkriptsioonifaktorid avalduvad peamiselt põuatingimustes ning enim taime juurtes (Liao *et al.*, 2017). Samuti täheldati nende avaldumise märkimisväärset kasvu liigsoolsuse puhul, temperatuuristresside mõjud olid aga väiksemad. Et uurida DREB transkriptsioonifaktorite mõju akvaporiinide geenide avaldumisele, võrreldi 7-päevase põuatingimustes kasvatamise järel suurendatud MsDREB6.2 valgu hulga taimi kontrolltaimedega. Leiti, et esimestes oli teistega võrreldes akvaporiinide geenide ekspressioon tõusnud PIP-geeni puhul 15 ja TIP-geeni puhul 12 korda. Katse tulemustest saab järeldada, et põua mõjul akvaporiinide geeniekspressioon DREB transkriptsioonifaktorite vahendusel tõuseb.

1.2.4.1.2. Fütohormoonide ja metallide mõju akvaporiinide regulatsioonile

Tsütokiniin on fütohormoon, mille olemasolu aktiveerib ARR1 ja ARR12 (*type B Arabidopsis Response Regulators*) transkriptsioonifaktorid. Antud transkriptsioonifaktorid seonduvad NIP1;1 ja NIP6;1 geenide promootoriga, mistõttu viimaste ekspressioon tõuseb. Kuna antud akvaporiinid toimivad läbipääsuteena arseeni jaoks, tähendab nende tugevam avaldumine arseeni kogunemist, mille tagajärjel on juurte kasv pärsitud. Taimedes, mille puhul tsütokiniini transkriptsioonifaktorid ARR1 ja ARR12 eemaldati, täheldati kõnealuste akvaporiinide madalamat ekspressiooni, muutes taimed arseeni suhtes vastupidavamaks. (Zhang *et al.*, 2024)

Liang *et al.* (2012) uurisid oma töös kolme fütohormooni (abstsiihappe, giberelliini ja salitsüülhappe) mõju TIP-e kodeerivale geenile. Tulemused näitasid, et esimesed kaks tekitasid antud geeniprodukti hulga märkimisväärse tõusu lehtedes ja juurtes, samas kui viimane seda vähendas. Sellest tulenevalt on võimalik väita, et taimehormoonid on otseselt seotud nii akvaporiinide arvukuse kasvamisega kui ka langemisega, mängides seeläbi olulist rolli taimede stressivastustes (Liang *et al.*, 2012). Ühtlasi võib abstsiihappe reguleerida ka akvaporiinide otsest funktsiooni ja ka õhulõhede sulgumist (Kapilan *et al.* 2018; Nilson ja Assmann, 2007).

Maurel *et al.* (2015) artiklis on öeldud, et elavhõbe on kõige levinum element, mida nii taime- kui loomarakkudes akvaporiinide blokeerimiseks kasutatakse. Arvatakse, et see takistab vee läbilaskvust akvaporiinide tsüsteiinijääkide tioolrühmadega seondudes. Antud andmed aga on

suuresti oletuslikud ja nende üldistusjõulisust on seatud küsimärgi alla, kuna uuringud on näidanud, et on akvaporiiine, millel ei teki antud interaktsiooniks vajalikke tsüsteiinijääke, ning akvaporiiine, mille puhul blokeerimise asemel aktiivsus hoopis tõusnud on. (Maurel *et al.*, 2015)

1.2.4.2. Akvaporiiinide posttranslatsiooniline regulatsioon

Posttranslatsiooniliseks modifikatsiooniks nimetatakse biokeemilist protsessi, mille käigus sihtmärkvalkude aminohappejäägid seonduvad kovalentselt funktsionaalsete keemiliste ühenditega. Taimeakvaporiiinides on selliste protsessidena täheldatud näiteks fosforüülimist, ubikvineerimist, metüleerimist, atsetüleerimist, glükosülatsiooni ja N-terminaalset atsetüleerimist, millest esimest kahte on enim uuritud (Li ja Wang, 2017; Yang *et al.*, 2026). Modifikatsioonidel võib akvaporiiinidele olenevalt funktsionaalse ühendi lisamise ajast ja kohast olla erinev mõju, neid kas stabiliseerides, lagundades, aktiveerides või inaktiveerides (Yang *et al.*, 2026).

1.2.4.2.1. Fosforüülimine

Akvaporiiinide avanemine ja sulgemine (ingl *gating*) on oluline osa sellest, kui suurel hulgal vett need läbi lasta suudavad. Johansson *et al.* (1998) on oma uurimuses tõestanud, et selle aktiivsust saab reguleerida näiteks läbi fosforüülimise ehk fosfaatrühma (PO₄) seostumise mingi orgaanilise ühendiga, siinkohal valguga. Eelnevast lähtudes on Aroca *et al.* (2005) uurinud, milline on fosforüülimise efekt akvaporiiinide läbilaskvusele stressitingimustes, milleks antud artiklis oli madal temperatuur. Leiti, et kuigi mRNA ekspressioon külmatingimustes langes, siis fosforüülimine suutis akvaporiiine hoida tavapärasega võrreldes sarnaselt avatuna, lubades vee liikumisel vajalikul määral toimida (Aroca *et al.* 2005).

Fosforüülimine on otseselt seotud ka taimeõite keskkonnatingimustest tuleneva ajutise avanemise ja sulgumisega. Soodsate tingimuste (näiteks piisav valgus ja/või optimaalne temperatuur) puhul tekib järsk Ca²⁺ ionide juurdevool taime õielehtede tsütosooli. Emajuurte perekonda kuuluva *Gentiana scabra* näitel aktiveerib see ensüümi GsCPK16, mis katalüüsib GsPIP2;2 C-terminaalse otsa seriinijääkide fosforüülimist. Fosforüülimise tulemusena akvaporiiinid avanevad, taastades vee läbilaskevõime ning tõstes rakkude turgorit, misjärel õied avanevad. Tingimuste muutudes (valguse vähenedes ja/või temperatuuri langedes) Ca²⁺ ionide juurdevool peatub, takistades fosforüülimist, ja õied sulguvad. (Nemoto *et al.*, 2022)

1.2.4.2.2. Ubikvitineerimine

Ubikvitineerimine hõlmab ubikvitiinimolekulide kovalentset seondumist erinevate valkude lüsiinijääkidega (Yang *et al.*, 2026). Valkude voltumine endoplasmaatilises retiikulumis on kõikides eukarüootsetes rakkudes oluline protsess, aga valesti voltunud valkude kogunemine võib tekitada stressi, mis omakorda võib põhjustada voltumata valkude vastust (ingl *unfolded protein response*, UPR), mille käigus viiakse valkude voltumine taas vajadustega vastavusse (Howell, 2013, viidatud Liu ja Howell, 2016 kaudu). Endoplasmaatilise retiikulumiga seotud valkude degradatsioon (ingl *endoplasmic reticulum-associated protein degradation*, ERAD) on süsteem, mis voltumata või valesti voltunud valke lagundab (Liu ja Howell, 2016).

Akvaporiinidega seoses on leitud, et teatud ubikvitiini ligaasid mõjutavad nende hulka, teiste seas ka ERAD-süsteemiga seotud UBC32 ensüüm ja RHA2b, mis moodustavad funktsionaalse ubikvitineerimiskompleksi. Antud kompleks interakteerub PIP-perekonna akvaporiinidega, märgistades need ubikvitiiniga lagundamiseks. Selline akvaporiinide degradeerimine aitab vältida nende liigset arvukust ja tagada nende stabiilsust. Läbi selle võib see aidata ka taimede põuatundlikkust vähendada, takistades vajaliku vee väljumist taimest. (Chen *et al.*, 2021)

1.2.4.3. Akvaporiinide aktiivsuse regulatsioon tetramerisatsiooni teel

Fetter *et al.* (2004) on leidnud, et akvaporiinid, spetsiifilisemalt PIP-id, on võimelised membraanis moodustama stabiliseerivaid tetrameere. Lisaks stabilisatsioonile võimaldab see neil efektiivsemalt toimida transpordikanalitena (Kapilan *et al.*, 2018). Eriti puudutab see PIP1 rühma valke, mis omaette on PIP2 valkudest väiksema vee läbilaskevõimega, aga moodustades koos viimastega heterooligomeere, muutuvad need efektiivsemaks (Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006; Fetter *et al.*, 2004). Siiski on leitud ka PIP2 vorme, mille toimine on tõhusam PIP1-ga moodustatud heterotetrameerides või teise PIP2-ga moodustatud homotetrameerides (Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006; Bienert *et al.*, 2018).

Pärmirakkudes akvaporiinide läbilaskevõimet uurides on tuvastatud, et rakkudes, milles on avaldunud ainult PIP2;1 akvaporiinid, suureneb membraani läbilaskvus oluliselt, samas nendes, kus on avaldunud vaid PIP1;1 või PIP2;2 akvaporiinid jääb tase sarnaseks rakkudega, kus neid ekspresseerunud ei ole. Järgnenud katsed on tõestanud, et viimased kaks suurendavad membraani läbilaskevõimet ainult PIP2;1-ga koos ekspresseerudes. (Bienert *et al.*, 2018)

1.2.4.4. pH taseme mõju akvaporinide aktiivsuse regulatsioonile

Kuigi pH ja akvaporinide toimimise seotus ei ole veel täielikult selge, on seda siiski uuritud (Kapilan *et al.*, 2018). Yaneff *et al.* (2016) artiklis on kirjeldatud, et PIP2 akvaporinide puhul on täheldatud nende suletud olekut kindlates tingimustes, näiteks madal pH, Ca^{2+} kontsentratsiooni tõus ja defosforüülimine. Täpsemini on öeldud, et PIP2 valkude B-aosas leiduvad seriini jäägid suudavad käituda pH sensorina ning tsütosooli liighappelisuse korral akvaporinid läbipääsuks sulgeda, samas neutraalse pH taastudes taas avada (Yaneff *et al.*, 2016). Sellest võiks järeldada, et tegemist on ohuvastusega, mille abil akvaporinid suudavad taime kaitsta näiteks mullasaaste või patogeenide põhjustatud kahjustustest tingitud ebasobiva happelisuse laiema leviku eest.

1.2.4.5. Akvaporinide paiknemine ja liikumine rakus

Kuigi nimetus võiks viidata, et PIP akvaporine leidub peaaesjalikult plasmamembraanis, ei ole see alati nii. Uurides kolme PIP-i omadusi, on selgunud, et kui PIP2;1 avaldub küll suuresti plasmamembraanis ja vähemal määral rakusisestes struktuurides, siis PIP1;1 ja PIP2;2 valke leidub valdavalt just viimastes. Plasmamembraanis on PIP1;1 ja PIP2;2 avaldumist täheldatud vaid siis, kui need koekspressseeruvad koos PIP2;1-ga, näidates, et sellel võib olla funktsioon teiste akvaporinide transpordis. (Bielert *et al.*, 2018)

Akvaporinide asetust ja liikumist võib mõjutada ka stress. Harilikus müürloogas (*Arabidopsis thaliana*) on uuritud seda näiteks soolastressi kontekstis (Boursiac *et al.*, 2005). Katsete käigus on leitud, et esimese 45 minuti jooksul pärast kokkupuudet soolaga ei toimu muutuseid ei PIP ega TIP akvaporinide asukohas. Peale 45 minutit on aga täheldatud TIP1;1 eraldumist tonoplasti membraanist ning nende endotsütoosi vesiikulilaadsetesse struktuuridesse. PIP akvaporinide puhul on sarnane liikumine plasmamembraanist vesiikulitesse toimunud hiljem, kaks ja enam tundi peale soolaga kokku puutumist. Aeglaselt toimuvate ümberkorralduste põhjal võib oletada, et esmane muutus membraanide vee läbilaskevõimes ei tulene mitte sellest, et akvaporine stressitingimuste tõttu membraanidelt eemaldataks, vaid pigem nende mehaanilisest sulgemisest (nt nagu kirjeldatud peatükis 1.2.4.2.1.).

1.3. Akvaporinide roll veevahetuses ja taimede vastupidavuses stressitingimustele

Veevahetuse toimimiseks peab vesi taimes liikuda saama. Selleks peab vesi suutma läbida rakumembraane, mille läbilaskvus on aga väga piiratud ning selektiivne. Veetranspordi võimaldamiseks ongi rakumembraanides veespetsiifilised kanaleid moodustavad valgud ehk

akvaporiiinid (Preston *et al.*, 1992). Et maismaataimed peavad suutma toime tulla veevarustuse ebastabiilsusega, on neil välja arenenud võime akvaporiiinide aktiivsust reguleerida (Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006). Lisaks on oluliseks näitajaks ka akvaporiiinide arvukus, mida mõjutavad mitmed erinevad faktorid, muuseas nii biotilised kui ka abiotilised stressorid keskkonnas.

Vee säilitamine keerulistes tingimustes (liigsoolsus, põud, ebasobivad temperatuurid) on keerukas, aga väga oluline tegevus, tagamaks taime ellujäämine. Et seda võimalikuks teha, on taimedel mitmeid stressivastuseid nendega toime tulemiseks ja veetaseme kontrollimiseks, millest ühena saab välja tuua akvaporiiinide regulatsiooni (Siemens ja Zwiazek, 2003). Kui piisava veevarustusega taime puhul on akvaporiiinide ekspressioon kõrge ja võimaldab veevahetusel toimuda üsna suures mahu, siis stressitingimustes, milleks näiteks Zhang *et al.* (2025) uurimuses loeti veepuudust ehk põuda, langes ekspressioon märkimisväärselt. See näitab, et taimedes toimub kaitsemehhanism, mille tulemusena hakatakse vett läbi kanalite sulgemise säilitama. (Zhang *et al.*, 2025)

Uurimaks, kuidas akvaporiiinid rakkudevahelise veetranspordi kaudu veevahetuse juures esinevate probleemide puhul abiks saavad olla, blokeeriti Suslovi (2025) uurimuses taime juures apoplastiline rada, mida vesi taimes liikudes üldiselt eelistab. Kuna juurest vesi enam tavapäraselt läbi ei pääsenud, langes ka taime veevahetuse määr. Leiti, et akvaporiiinide inhibiitori lisamisel rakkude difusioonivõime tõusis, mis näitas, et valgud suutsid blokaadist sõltumata luua tunneleid vee läbipääsuks. See omakorda viis ka veetranspordi taas tavapärasele tasemele. Sellest võib järeldada, et erinevad stressitekitajad mõjutavad tugevalt taimede veevahetust, aga samas ka, et akvaporiiinidel on võimekus taimi nendes olukordades kas kaitsta, aidates vett säilitada, või probleeme kõrvaldada, luues endale omaseid tunneleid. (Suslov, 2025)

1.3.1. PIP akvaporiiinide ekspressioon ja aktiivsus stressitingimustes

Jang *et al.* (2004) uurimistöös keskenduti erinevate PIP valkude geenide avaldumisele erinevates stressitingimustes. Stressoritena käsitleti madalat temperatuuri, veepuudust, liigsoolsust ja abstsissihappe lisamist. Lisaks näidati, milliseid PIP akvaporiiine mingites taimeosades leidub, näiteks juurtes leidub PIP1;1, PIP2;2 ja PIP2;3 valke rohkem kui taime maapealsetes osades. Stressivastustest leiti, et põuatingimuste puhul langes suurema osa PIP-e kodeerivate geenide ekspressioon märkimisväärselt, juurtes siiski rohkem kui maapealsetes osades. Liigsoolsuse puhul olid tulemused erinevad – suurema osa geenide ekspressioon kasvas, PIP1;5 oma aga nii juurtes

kui ka maapealsetes osades ja PIP2;6 oma maapealsetes osades langes. Madala temperatuuri (4°C) puhul langes maapealsetes osades ekspressioon kõikidel peale PIP2;5 ja PIP2;6, juurtes oli tõusnud ekspressiooniga akvaporinide geene veidi rohkem - PIP1;4, PIP2;1, PIP2;5 ja PIP2;6. Viimaks uuriti abstsissiisshappe mõju ning tulemused olid sarnased liigsoolsusega. (Jang *et al.*, 2004) Vääristubaka (*Nicotiana tabacum* L.) puhul on täheldatud, et põua puhul on PIP1;1 ja PIP2;1 ekspressioon märkimisväärselt langenud. Samas on aga leitud, et vee kättesaadavuse paranedes taastub ka PIP-ide avaldumine sarnasele tasemele pideva veevarustatusega taimedega (Mahdiah *et al.*, 2008).

Siit joonistub välja, et kuigi PIP-idel on veetranspordis oluline roll, siis stressitingimustes võib nende olulisus seisneda pigem peenhäälestuste tegemises. Erinevad vastused stressoritele viitavad sellele, et PIP-id võivad vähendada nende tekitatavat kahju, näiteks põuatingimustes vett kanalite sulgemise kaudu säilitades või vastupidi, suurendades vee läbilaskvust homöostaasi säilitamiseks liigsoolsuse puhul.

Törnroth-Horsefield *et al.* (2006) artiklis uuriti, millised on täpsemalt molekulaarsed mehhanismid, millega PIP-id oma läbilaskvust reguleerivad. Leiti, et D-aasal, mis on kõikides PIP-ides pikk ja painduv ning asub tsütoplasmas, on võime poor mehaaniliselt sulgeda, liikudes avausse ja blokeerides vee liikumise. Selle toimumist antud artiklis käsitleti fosforüleerimise ja tsütoplasma pH kontekstis. Tulemused näitasid, et kui PIP-i seriini jäägid on fosforüleerunud, on poor avatud olekus, kui aga defosforüleerunud, siis suletud; kui tsütoplasma pH langeb, ehk muutub happelisemaks, siis histidiini jäägid protoneeruvad, soodustades suletud olekut. Selline D-aasa blokaad on kiire ja tagasipööratav, mistõttu on tegemist ühe olulisema mehhanismiga, eriti esmase stressivastusena. (Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006)

1.3.2. TIP akvaporinide ekspressioon ja aktiivsus stressitingimustes

Hariliku nisu puhul on täheldatud, et osmootse stressi korral 12 TIP-e kodeeriva geeni ekspressioon 25-st on tõusnud, suuremal osal neist ka mitmekordselt (Madrid-Espinoza *et al.*, 2018). Päevalille (*Helianthus annuus*) uurides on leitud, et TIP7 ja TIP1;1 ekspresseeruvad taime kõikides osades, aga avaldumise jaotus võib sordi põuatundlikkusest olenevalt olla erinev (Safdar *et al.*, 2018). Näiteks põuatundliku sordi puhul avaldub TIP7 enim juurtes, vähem vartes ja nõrk ekspressioon on õites, samas kui põua suhtes hea taluvusega sordi puhul on avaldumine juurtes marginaalne ning lehtedes, vartes ja õites nõrk. Kahe sordi põuatundlikkus ristanis on TIP-ide ekspressioon üldiselt

kõrgem kui mõlemal vanempõlvkonna sordil ning jaotumine TIP7 puhul näitab kõrget ekspressiooni lehtedes, vartes ja juurtes, olles madalam vaid õites. TIP1;1 avaldumine ristandis on üldjoontes sarnane, aga erinevalt eelnevast on täheldatud kõrget ekspressiooni õites ning madalamat lehtedes. Sellest võib järeldada, et antud stressitingimustes on TIP-ide avaldumine seotud vajadusega vett vakuoolist välja tuua, aidates taimedel turgorit säilitada.

Soolsusest tingitud stressi puhul on aga nähtud vastupidist efekti, ehk suurema osa TIP akvaporinide ekspressiooni langemist (Boursiac *et al.*, 2005). Näiteks juurtes rohkearvuliselt esinevate TIP1;1 ja TIP1;2 mRNA ekspressioonitase langes taime soolaga töötlemise järel järsult madalale ning sarnast mõju on täheldatud ka TIP2;1 puhul. TIP-id, mis veetranspordis olulist rolli ei mängi, olulisi muutuseid ei näidanud. Selle põhjal võib väita, et soolsuse puhul toimivad TIP-id taimerakke kaitsva mehhanismina, takistades sellega suuremahulist vee väljavoolu vakuoolist ning ennetades selle tagajärjel tekkida võivat osmootset stressi.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eksperimentaalse peamiseks eesmärgiks oli kolme odrasordi ('Marta', 'Vanille' ja 'Golden Promise') akvaporinide ja kontrollgeenide järjestuste analüüs, et leida kõigis sortides ühesugused järjestused, mille põhjal on võimalik disainida praimerid vastavate akvaporinide geenide ekspressiooni analüüsiks qPCR-i abil.

Töö eksperimentaalse viidi läbi osana uurimisrühma suuremast katsest, mille käigus uuritakse madala õhuniiskuse mõju kolme odrasordi veevahetusele ja õhulõhetunnustele. Eesmärgiks on uurida, kas ja kuidas madal õhuniiskus mõjutab akvaporinide geeniekspressiooni. Katse läbiviimiseks aga on esmajoones vaja leida kõikidele uuritavatele sortidele sobivad praimerid geeniekspressiooni analüüsiks.

Käesolevate eksperimentide eesmärkideks on:

- 1) genoomse DNA eraldamine kolmest odrasordist;
- 2) polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) uuritavate geenide fragmentide paljundamiseks;
- 3) PCR produktide sekveneerimine ja järjestuste analüüs.

2.2. Materjal ja meetoodika

2.2.1. Uuritavad odrasordid ning geenid

Harilik oder (*Hordeum vulgare*) on üks laiemalt levinud toiduks kasvatatavaid teravilju. Lisaks selle praktilisele väärtusele on tegemist ka liigiga, mille kasv ja saagikus on muude keskkonnatingimuste seas väga otseselt seotud ka vee kättesaadavusega ning tänu sellele on odra puhul akvaporinide gene ka rohkelt uuritud (Ferioun *et al.*, 2024; Hove *et al.*, 2015).

Sortidest osutusid valituteks 'Golden Promise', 'Marta' ja 'Vanille'. Esimene neist on levinud ja laialt kajastatud mudelsort, teised aga uuemad ning vähem uuritud. 'Golden Promise' võeti tänu oma dokumenteeritusele töösse "testsordina", mille suhtes teisi võrrelda.

Uuritavate odrasortide ja geenide valik oli langetatud uurimisrühmas juba varasemalt. Selle puhul oli olulisimaks aspektiks nende varasem uuritus ning geenide, artiklite põhjal leitud, kõrge ekspressioonitase lehtedes. Kuna odra puhul on tuvastatud suurema osa oluliste akvaporinide

kodeerivate geeniperekondade leidumine, nagu tõestasid ka Hove *et al.* (2015), oli võimalik uurimise alla võtta üsna laiapõhjaline valim.

Nimekiri uuritavatest geenidest:

Akvaporiinid:

- 1) PIP1;1;
- 2) PIP1;3;
- 3) PIP2;1;
- 4) PIP2;2;
- 5) PIP2;5;
- 6) TIP1;1;
- 7) TIP1;2,

Referentsgeenid qPCR jaoks:

- 1) EF-1;
- 2) GADPH;
- 3) SIP2;1;
- 4) UPL7.

2.2.2. Taimede kasvatamine ning geneetilise materjali eraldamine

Töö esimese etapina oli vaja kasvatada taimed, millest geneetilist materjali eraldada. Et tagada piisav taimse materjali hulk, pandi igast sordist kasvama kolm seemet kolme potti ($10 \times 10 \times 11$ cm), st üheksa seemet iga sordi kohta. Taimi kasvatati turba ja vermikuliidi segus (mahuvahekord vastavalt 2:1) ruumis valgusintensiivsusega $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (10 h päevast valgus, 14 h pimedus), päevase temperatuuriga 23°C ja öisega 19°C ning 60% suhtelise õhuniiskusega.

DNA eraldamine teostati 14 päeva kasvanud taimedest. Selleks lõigati igast sordist taimede küljest olenevalt suurusest 1-2 lehte ning paigutati 1,5 ml katsutitesse. Sinna lisati ka 600 μl DNA eraldamise puhvrit (100 mM TRIS pH 8,0, 50 mM EDTA pH 8,0, 500 mM NaCl) ning 1-1,3 mm läbimõõduga klaaskuule. Taimset materjali purustati CapMix (3M Company, Saint Paul, MN, USA) kapslisegajas 10 sekundit. Segu tsentrifuugiti 5 minutit $21\,300 \times g$ kiirendusel ning 500 μl saadud supernatandist pipeteeriti uude katsutisse 500 μl isopropanooli juurde. Supernatant ja isopropanool segati raputades ning segu tsentrifuugiti taas 5 minutit $21\,300 \times g$. Katsutist

eemaldati supernatant ning sadestunud DNA kuivatati õhu käes, misjärel see lahustati 100 µl milliQ vees.

2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR-i kasutati paljundamiseks uuritavate akvaporiniinide geenide lõpuosa fragmente otrade DNA-st. Enim kasutatud reaktsioonisegu sisaldas 27,5 µl milliQ vett, 10 µl 5x Phusion GC puhvrit (lõppkontsentratsioon 1x), 5 µl 0,2 mM dNTP (lõppkontsentratsioon 0,02 mM), 5 µl firma Integrated DNA Technologies 10 mM praimereid (2,5 µl päripidi praimerit + 2,5 µl äraspidi praimerit, kummagi lõppkontsentratsioon 0,5 mM) (Lisa 1), 2 µl eraldatud genoomset odra DNA-d ning 0,5 µl DNA polümeraasi Phusion (2 U/µl, lõppkontsentratsioon 0,02 U/µl) või FIREPol (5 U/µl, lõppkontsentratsioon 0,05 U/µl), andes kogumahuks 50 µl.

PCR-id viidi esmalt läbi testsordina kasutatava 'Golden Promise'-ga, et kontrollida praimerite toimivust.

Reaktsioone viidi olenevalt kättesaadavusest läbi SimplyAmp Thermal Cycler (Applied Biosciences, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) või ESCO Aeris Thermal Cycler (Esco Micro Pte. Ltd., Changi, Singapur) PCR masinaga järgmise programmiga:

- 1) eelsoojendamine 98°C, 1 minut;
- 2) denaturatsioon 98°C, 10 sekundit;
- 3) praimerite seondumine 64°C, 20 sekundit;
- 4) DNA ahelate süntees 72°C, 1 minut;
- 5) järelsüntees 72°C, 7 minutit.

Etappe 2-4 korrati 35 korda.

Järgmisel korral viidi 'Golden Promise'-ga positiivse tulemuse andnud praimeritega PCR läbi sama reaktsioonisegu ning programmiga ka sortidega 'Marta' ja 'Vanille'.

Ebaõnnestunud PCR-e kõigi kolme sordiga korrati. Reaktsioon viidi läbi paralleelselt uute praimerite seondumistemperatuuridega 62°C ja 66°C.

Jätakuvalt ebaõnnestunud proovidele telliti uued praimerid (Lisa 2).

Tabel 1. Esimeste PCR-ide tulemused.

	‘Golden Promise’			‘Vanille’			‘Marta’		
	62°C	64°C	66°C	62°C	64°C	66°C	62°C	64°C	66°C
EF-1		+			+			+	
GADPH		+			+			+	
PIP1;1		+			+			+	
PIP1;3		+			+			+	
PIP2;1*	-	-	-						
PIP2;2		+			+			+	
PIP2;5*		+			+		-	-	-
SIP2;1		+			+			+	
TIP1;1*		-		-	-	-	-	-	-
TIP1;2		+		+	-	-	+	-	-
UPL7		+			+			+	

(+) - Nõrk signaal geelelektroforeesil.

* - Telliti uued praimerid.

2.2.4. Geelelektroforees

PCR-produktide visualiseerimiseks viidi nendega läbi geelelektroforees. Selleks valmistati 1% kontsentratsiooniga agarooosgeel, mis sisaldas 0,5 g Fisher Bioreagents agarooosi ja 50 ml 0,5x TAE puhvrit. Agarooosi ning puhvri segu viidi mõned korrad mikrolaineahjus keemiseni, misjärel lisati sinna tilk (arvestuslikult 20 µl) etiidiumbromiidi (0,5 mg/ml, lõppkontsentratsiooniga 0,2 µg/ml).

Kuna PCR-i reaktsioonisegu pigmenti ei sisaldanud, valmistati geelile kandmiseks segu 5 µl-st PCR-produktist ja 2 µl-st 6x laadimisvärvist (lõppkontsentratsiooniga 1,7x), mis kanti eelnevalt valmistatud geelile ning fragmentide suuruste tuvastamiseks lisati 3 µl DNA suurusmarkerit (Thermo Scientific GeneRuler 1 kb). Elektroforeesid viidi olenevalt kättesaadavusest läbi Enduro Gel XL Ultra V-2 (Labnet International, Inc., Edison, NJ, USA) või Mupid One (Advance Co., Ltd., Tokyo, Jaapan) geelivannis toatemperatuuril 0,5x TAE puhvris 15 minuti jooksul olenevalt kasutatud geelivannist pingel 7,41 V/cm või 7,14 V/cm.

Tulemuste visualiseerimiseks kasutati GelDoc Go Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) UV-transilluminaatorit.

2.2.5. PCR-produktide puhastamine ja DNA kontsentratsiooni mõõtmine

PCR-produktide puhastamine viidi läbi kasutades FavorPrep Gel/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN Biotech Corp., Ping Tung, Taiwan) vahendeid ja protokollid.

Puhastatud DNA kontsentratsiooni määramiseks kasutati NanoDrop spektrofotomeetrit. Selleks tehti spektrofotomeetriga *blank*-mõõtmine 2 µl milliQ veega ning tehti mõõtmised 2 µl puhastatud proovidega.

2.2.6. Sekveneerimissegude valmistamine

Sekveneerimissegud valmistati 200 µl PCR-katsutitesse. Esmalt tehti 10 mM praimeritest (päripidi ja äraspidi eraldi) 10-kordsed lahjendused, et saada kontsentratsiooniks 1 mM ning sekveneerimissegusse lisati 1,6 µl lahjendatud praimerit. PCR-produkti nõutavaks koguseks oli ette antud 30-50 ng. Proovidest, mille NanoDropi tulemus sellesse vahemikku jäi, lisati segusse 1 µl ja teiste koguseid modifitseeriti vastavalt mõõdetud kontsentratsioonidele.

Proovide puhul, mille NanoDropiga mõõdetud kontsentratsioon erines oluliselt etteantud 30-50 ng vahemikust, valmistati sekveneerimissegusid kaks: üks, mille puhul eeldati, et NanoDrop tulemus on korrektne ning mille puhul lisati sekveneerimissegusse puhastatud PCR produkti vastavalt sellele eeldusele, ja teine, mille puhul oletati, et tegelik PCR-produkti kontsentratsioon jääb sekveneerimiseks nõutu piiridesse ning mida lisati 1 µl.

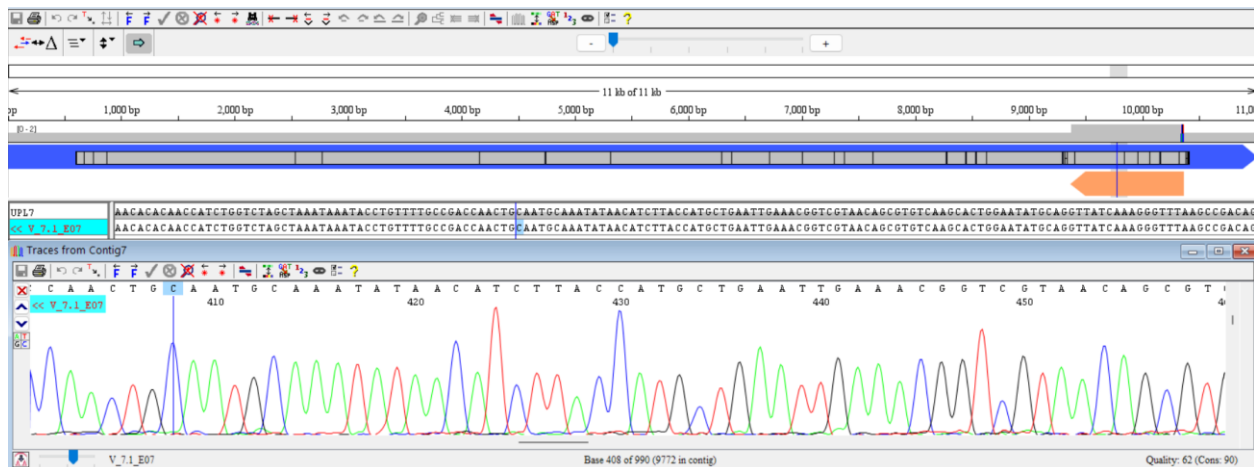
Valmistatud segud viidi sekveneerimiseks Tartu Ülikooli genoomika tuumiklaborisse.

2.2.7. Sekveneerimistulemuste analüüs

Tuumiklaborist saadud järjestuste analüüsimiseks kasutati vabavarana kättesaadavat programmi CodonCode Aligner V. 12.0.4 (CodonCode Corporation, Centerville, MA, USA) (Joonis 2).

PCR-proovidest saadud sekventsidsid joondati referentsgenoomi järjestustega ning võrreldi, kas ja mis mahus on olemas kattuvused. Osasid sekveneerimisse saadetud proovide järjestusi ei olnud liigväikese kattuvuse tõttu võimalik referentsjärjestustega assambleerida. Ülejäänute puhul pöörati tähelepanu peamiselt kontiigide keskmisele osale. Kohtades, kus proovi ja referentsi vahel esinesid ebakõlad, võeti võrdluseks lahti ka sekvenaatorist tulnud pilt ning püüti tuvastada, kas erisused on tingitud mutatsioonidest või on tegemist masina lugemisveaga.

Kuigi mudelsordina oli antud töös kasutusel 'Golden Promise', olid referentsjärjestused loodud sordiga *Hordeum vulgare* L. 'Morex', mistõttu võeti tulemuste võrdlemisel arvesse ka seda, et sortide vahel võib geenijärjestustes esineda erisusi, mis ei ole tingitud ei mutatsioonidest ega lugemisvigadest.



Joonis 2. Näide sekveneerimistulemuste visualiseerimisest programmiga CodonCode Aligner (autori pilt).

Tulemuste all esitatavad joondused on assambleeritud programmiga ApE - A plasmid Editor (v.3.1.9, M. W. Davis, <https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ap/>).

2.2.7. Korduskatsed

Korduskatsed viidi läbi nii nende proovidega, mille puhul esmane PCR tulemust ei andnud ja mille jaoks telliti uued praimerid, kui ka nendega, mille puhul sekveneerimine ebaõnnestus.

Reaktsioonisegu koostis oli samasugune, nagu on toodud välja peatükis 2.2.3., ning programmi osas rakendati seondumistemperatuuri 62°C (vt Tabel 1).

Produktidele teostati geelelektroforees samadel tingimustel, nagu on loetletud peatükis 2.2.4.

Tulemuseta proovidega korrati PCR-i paralleelselt järgmiste muudatustega:

- 1) Seondumistemperatuuriks 64°C ja ensüümiks Phusion;
- 2) Seondumistemperatuuriks 62°C ja ensüümiks FIREPol.

Ensüümi vahetamise ajendiks oli asjaolu, et FIREPol on Phusioniga võrreldes vähem tundlik väliste mõjutajate (nt temperatuuri) suhtes ja suudab DNA-d amplifitseerida ka siis, kui praimerite ja matriitsahelate kattuvus ei ole täielik.

Kuigi ensüümivahetus andis mõnel puhul paljulubavaid tulemusi, ei saanud kõiki läbi viidud PCR-e lugeda täielikult õnnestunuteks (Tabel 2), mistõttu teatud proovidega korraldati katset ka 56°C seondumistemperatuuri juures.

Jätkuvalt rahuldava tulemuseta proovidele telliti taas uued praimerid (Lisa 3).

Ülejäänud proovide puhul teostati PCR-produkti puhastamine ja kontsentratsiooni mõõtmine NanoDropiga (peatükk 2.2.5.) ning valmistati sekveneerimissegud (peatükk 2.2.6.), et need sekveneerimiseks Tartu Ülikooli genoomika tuumiklaborisse saata.

Tabel 2. Esimeste kordus-PCR-ide tulemused.

	‘Golden Promise’						‘Vanille’						‘Marta’					
	Phusion			FIREPol			Phusion			FIREPol			Phusion			FIREPol		
	56	62	64	56	62	64	56	62	64	56	62	64	56	62	64	56	62	64
EF-1		-	-		+									-	-		+	
GADPH(**)		-	-	-	+									-	-	+	+	
PIP1;1		-	-		+									-	-		+	
PIP1;3														-	-		+	
PIP2;1*		+						+	(+)	-	(+)			+		-		
PIP2;5*		+						+						+				
SIP2;1														-	-		+	
TIP1;1*(**)		-	-	-	-			-	-	-	-			-	-		-	
UPL7														-	-		+	

(+) - Nõrk signaal geelelektroforeesil.

* - Kasutatud uusi praimereid (Lisa 2).

** - Telliti uued praimerid (Lisa 3).

Kahe praimeripaari puhul, mis vajasis täiendavat katsetamist (TIP1;1 ja GADPH), viidi kõikide sortidega läbi uued PCR-id ning geelelektroforeesid.

Esmalt viidi reaktsioon läbi FIREPol ensüümi ja 62°C seondumistemperatuuriga, kuna varasemalt oli antud kombinatsioon andnud kõige positiivsemaid tulemusi. PCR ja geelelektroforees viidi läbi samamoodi, nagu mainitud peatükkides 2.2.3 ja 2.2.4..

Kuna geelil näitasid tulemust ainult ‘Golden Promise’ ja ‘Marta’ GADPH proovid (Tabel 3), katsetati järgmiseks reaktsiooni 55°C seondumistemperatuuriga, muid tingimusi muutmata. Nõrk

positiivne tulemus ilmnes siin ka 'Vanille' GADPH proovis. Kõik TIP1;1 proovid olid jätkuvalt tulemuseta.

Tabel 3. Teiste kordus-PCR-ide tulemused.

	'Golden Promise'		'Vanille'		'Marta'	
	62°C	55°C	62°C	55°C	62°C	55°C
GADPH	+	(+)	-	(+)	+	-
TIP1;1	-	-	-	-	-	-

(+) - Nõrk signaal geelelektroforeesil.

Et püüda ka TIP1;1 juures siiski mingeid positiivseid tulemusi näha, viidi läbi viimane PCR, milles kombineeriti erinevaid päripidi ja äraspidi praimerite paare (st nt HvTIP1;1-seq-for + HvTIP1;1-seq-rev2 jne). Kõikide sortide puhul katsetati kõiki võimalikke kombinatsioone. Reaktsioon viidi läbi ensüümiga Phusion 60°C seondumistemperatuuri juures. Geelelektroforeesi järel selgus aga, et ka see tulemusteni ei viinud.

2.3. Tulemused

Tulemuste visualiseerimiseks loodi joondused, kus assambleeriti iga sordi iga geeni päri- ja äraspidi praimerite PCR produktid vastavate geenide referentsgenoomi järjestustega. Võrdluseks võeti ette joonduste keskmised osad, et vältida sekveneerimise alguses ja lõpus esineda võivaid lugemisvigu.

Tulemused on esitatud kahes osas: sekveneerimistulemuste koondtabel, kus tuuakse välja, kas saadud järjestuste ja referentsgenoomi vahel esineb erisusi, ning täpsem ülevaade järjestustest, kus erisusi leidub.

2.3.1. Sekveneerimistulemuste ülevaade

Tabelis 4 on antud ülevaade sekveneerimistulemustest, mis on kategoriseeritud vastavalt sellele, kas aktsepteeritav järjestus õnnestus saada ning kas saadud järjestustes esineb referentsjärjestuste suhtes erisusi.

Tabel 4. Sekveneerimistulemuste koondtabel.

	Erisuste esinemine referentsgenoomiga võrreldes					
	‘Golden Promise’		‘Vanille’		‘Marta’	
	päripidi	äraspidi	päripidi	äraspidi	päripidi	äraspidi
Akvaporiinid:						
PIP1;1	Jah	Jah	Jah	Jah	Jah	Jah
PIP1;3	Jah	Jah	Jah	Jah	*	*
PIP2;1	*	Ei	*	*	Ei	Ei
PIP2;2	*	Jah	Jah	Ei	*	*
PIP2;5	Ei	*	*	*	Ei	Ei
TIP1;1	X	X	X	X	X	X
TIP1;2	*	*	*	*	*	*
Referentsgeenid:						
EF-1	Jah	Jah	Jah	Jah	Jah	*
GADPH	Jah	Jah	Jah	Jah	Jah	Jah
SIP2;1	Ei	Jah	Ei	Ei	Ei	Ei
UPL7	Ei	Ei	Ei	Ei	Jah	Jah

X - amplifikatsioon PCR-iga ei õnnestunud.

* - amplifikatsioon PCR-iga õnnestus, sekvensi kattuvus referentsiga väike/puudub.

2.3.2. Joondustes esinevad erisused

2.3.2.1. Akvaporiiniid

2.3.2.1.1. PIP1;1

Joonisel 3 kujutatud järjestuste võrdlusest ilmneb, et kõik erisused on kahe järjestuse vahel kattuvad, ehk tõenäoliselt on tegemist 'Golden Promise' PIP1;1 geenijärjestuses päriselt esinevate muutustega.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP1;1 2201>TTGCCCTCGGCGTAGCAGCAACCACTGCCTTGTGGGAGCGGGACAATGACTTAAGTGTCCATTATAGACTACTAGTATTACTAGACCTTCATGATAACA>2300
G_4F_H03 422>TTGCCCTCGGCGTAGCAGCAACCACTGCCTTGTGGGAGCGGGACAATGACTTAAGTGTCCATTATAGACTACTAGTATTACTAGACCTTCATGATAACA>518
G_4R_G03 670>TTGCCCTCGGCGTAGCAGCAACCACTGCCTTGTGGGAGCGGGACAATGACTTAAGTGTCCATTATAGACTACTAGTATTACTAGACCTTCATGATAACA>574

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP1;1 2301>TTCATCATTATCTA-----G-G-----AAATAA-TGTAGC-G-C-----T-----G-T-T-C-C-G---C-T-----TACTATAATAAGTGCT>2355
G_4F_H03 519>TTCATCATTATCTAATCGCTGAGTTCCGAAATAAATGTAGCAGCAGAAATTTGGATTAGTTTTCCTCAACTACATTTATTTAGTACTATAATAAGTGCT>618
G_4R_G03 573>TTCATCATTATCTAATCGCTGAGTTCCGAAATAAATGTAGCAGCAGAAATTTGGATTAGTTTTCCTCAACTACATTTATTTAGTACTATAATAAGTGCT>474

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP1;1 2356>GACATATCCATAAAAACTTCGCGTTTGCAGTGGATCTTCTGGGTTCGGCCCTTCATCGGCGCCGCGCTGGCCGCCATCTACCACCAAGTGGTCATCAGAG>2455
G_4F_H03 619>GACATATCCATAAAAACTTCGCGTTTGCAGTGGATCTTCTGGGTTCGGCCCTTCATCGGCGCCGCGCTGGCCGCCATCTACCACCAAGTGGTCATCAGAG>718
G_4R_G03 473>GACATATCCATAAAAACTTCGCGTTTGCAGTGGATCTTCTGGGTTCGGCCCTTCATCGGCGCCGCGCTGGCCGCCATCTACCACCAAGTGGTCATCAGAG>374

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP1;1 2456>CGATCCCATTCAGACCAAGTCCTAAGCTGCTGTCTACAAAGAAAGATGCCATCCCAACCCGAAGAGCAAAGTGCCTGTTCTGAGTGAATTTCTTTCTGAT>2555
G_4F_H03 719>CGATCCCATTCAGACCAAGTCCTAAGCTGCTGTCTACAAAGAAAGATGCCATCCCAACCCGAAGAGCAAAGTGCCTGTTCTGAGTGAATTTCTTTCTGAT>818
G_4R_G03 373>CGATCCCATTCAGACCAAGTCCTAAGCTGCTGTCTACAAAGAAAGATGCCATCCCAACCCGAAGAGCAAAGTGCCTGTTCTGAGTGAATTTCTTTCTGAT>274

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP1;1 2556>GGGGGGGGCCCTCTCTTCCCATCGTCCGTTTACCGTGGAATTCGAATTTGCTTCCAAAGTTTGATGTACTGCTCTTGTCTTGTCTCTTGTCTCT>2655
G_4F_H03 819>GGGGGGGGCCCTCTCTTCCCATCGTCCGTTTACCGTGGAATTCGAATTTGCTTCCAAAGTTTGATGTACTGCTCTTGTCTTGTCTCTTGTCTCT>906
G_4R_G03 273>GGGGGGGGCCCTCTCTTCCCATCGTCCGTTTACCGTGGAATTCGAATTTGCTTCCAAAGTTTGATGTACTGCTCTTGTCTTGTCTCTTGTCTCT>186
```

Joonis 3. Erisused 'Golden Promise' PIP1;1 geeni praimeritega proovide ja referentsi vahel.

Joonisel 4 kujutatud järjestuste võrdlusest ilmneb, et ükski tuvastatud erisus sekventsides vahel ei kattu. Seetõttu on alust arvata, et tegemist on sekveneerimisvigadega, mitte 'Vanille' PIP1;1 geenijärjestuses päriselt esinevate muutustega.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP1;1 2397>GGTCGGCCCCCTTCATCGGCGCCGCGCTGGCCGCCATCTACCACCAAGTGGTCATCAGAGCGATCCCATTCAGACCAAGTCCCTAAGCTGCTGTCTACAAAG>2496
V_16.1_G08 423>GGTCGGCCCCCTTCATCGGCGCCGCGCTGGCCGCCATCTACCACCAAGTGGTCATCAGAGCGATCCCATTCAGACCAAGTCCCTAAGCTGCTGTCTACAAAG>324
V_16.2_H08 613>GGTCGGCCCCCTTCATCGGCGCCGCGCTGGCCGCCATCTACCACCAAGTGGTCATCAGAGCGATCCCATTCAGACCAAGTCCCTAAGCTGCTGTCTACAAAG>712

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP1;1 2497>AAAGATGCCATCCCAACCCGAAGAGCAAAGTGCCTGTTCTGAGTGAATTTCTTTCTGATGGGGGGCGC-CCTCTCT-TCCCATCGTCCGTG-TTACCGTG>2593
V_16.1_G08 323>AAAGATGCCATCCCAACCCGAAGAGCAAAGTGCCTGTTCTGAGTGAATTTCTTTCTGATGGGGGGCGC-CCTCTCT-TCCCATCGTCCGTG-TTACCGTG>227
V_16.2_H08 713>AAAGATGCCATCCCAACCCGAAGAGCAAAGTGCCTGTTCTGAGTGAATTTCTTTCTGATGGGGGGCGC-CCTCTCT-TCCCATCGTCCGTG-TTACCGTG>812
```

Joonis 4. Erisused 'Vanille' PIP1;1 geeni praimeritega proovide ja referentsi vahel.

Joonisel 5 kujutatud järjestuste võrdlusest ilmneb, et kõik erisused on kahe järjestuse vahel kattuvad, ehk tõenäoliselt on tegemist 'Marta' PIP1;1 geenijärjestuses päriselt esinevate muutustega.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP1;1 2452>AGAGCGATCCCATTCAGAGCAAGTCCTTAAGCTGCTGCTACAAAGAAAGATGCCATCCCAACCCGAAGAGCAAACTGCGTGTTCTGAGTGAATTTCTTTC>2551
M_4F_G06 714>AGAGCGATCCCATTCAGAGCAAGTCCTTAAGCTGCTGCTACAAAGAAAGATGCCATCCCAACCCGAAGAGCAAACTGCGTGTTCTGAGTGAATTTCTTTC-813
M_4R_F06 378>AGAGCGATCCCATTCAGAGCAAGTCCTTAAGCTGCTGCTACAAAGAAAGATGCCATCCCAACCCGAAGAGCAAACTGCGTGTTCTGAGTGAATTTCTTTC<279

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP1;1 2552>TGATGGGGGGCGGCCCTCTCTCCCATCGTCCGTTGTTACCGTGGAATTCGAATTTGCTTCCAAAGTTTGATGTAAGTCTGCTTGGCTCTTGTCTTGTCTTG>2651
M_4F_G06 814>TGATGGGGGGCGGCCCTCTCTCCCATCGTCCGTTGTTACCGTGGAATTCGAATTTGCTTCCAAAGTTTGATGTAAGTCTGCTTGGCTCTTGTCTTGTCTTG-901
M_4R_F06 278>TGATGGGGGGCGGCCCTCTCTCCCATCGTCCGTTGTTACCGTGGAATTCGAATTTGCTTCCAAAGTTTGATGTAAGTCTGCTTGGCTCTTGTCTTGTCTTG-191

```

Joonis 5. Erisused 'Marta' PIP1;1 geeni praimeritega proovide ja referentsi vahel.

Joonisel 6 kujutatud joondusest on näha, et kuigi kõikides järjestustes esineb teatud erisusi (Joonis 3-5), on olemas arvestatava pikkusega regioone kõikidele sortidele sobivate qPCR-i praimerite disainimiseks.

```

      *           *           *           *           *           *           *
PIP1;1 2348>TAAGTCTGCACATATCCATAAAAAACTTCGCGTTTGCACTGGATCTTCTGGGTGGGCCCCCTCATCGGCGCGCGCTGGCGCCCATCTACCAACGAGTGGT>2447
G_4F_H03 611>TAAGTCTGCACATATCCATAAAAAACTTCGCGTTTGCACTGGATCTTCTGGGTGGGCCCCCTCATCGGCGCGCGCTGGCGCCCATCTACCAACGAGTGGT>710
G_4R_G03 481>TAAGTCTGCACATATCCATAAAAAACTTCGCGTTTGCACTGGATCTTCTGGGTGGGCCCCCTCATCGGCGCGCGCTGGCGCCCATCTACCAACGAGTGGT>382
M_4F_G06 100>TAAGTCTGCACATATCCATAAAAAACTTCGCGTTTGCACTGGATCTTCTGGGTGGGCCCCCTCATCGGCGCGCGCTGGCGCCCATCTACCAACGAGTGGT>70
M_4R_F06 447>TAAGTCTGCACATATCCATAAAAAACTTCGCGTTTGCACTGGATCTTCTGGGTGGGCCCCCTCATCGGCGCGCGCTGGCGCCCATCTACCAACGAGTGGT>383
V_16_1_G08 472>TAAGTCTGCACATATCCATAAAAAACTTCGCGTTTGCACTGGATCTTCTGGGTGGGCCCCCTCATCGGCGCGCGCTGGCGCCCATCTACCAACGAGTGGT>373
V_16_2_H08 564>TAAGTCTGCACATATCCATAAAAAACTTCGCGTTTGCACTGGATCTTCTGGGTGGGCCCCCTCATCGGCGCGCGCTGGCGCCCATCTACCAACGAGTGGT>663

      *           *           *           *           *           *           *
PIP1;1 2448>CATCAGAGCGATCCCATCAAGACCAAGTCTCAAGCTGCTGCTACAAAGAAAGATGCCATCCCAACCCGAAGACAACTGCGTGTCTGAGTGAATTC>2547
G_4F_H03 711>CATCAGAGCGATCCCATCAAGACCAAGTCTCAAGCTGCTGCTACAAAGAAAGATGCCATCCCAACCCGAAGACAACTGCGTGTCTGAGTGAATTC>810
G_4R_G03 381>CATCAGAGCGATCCCATCAAGACCAAGTCTCAAGCTGCTGCTACAAAGAAAGATGCCATCCCAACCCGAAGACAACTGCGTGTCTGAGTGAATTC>822
M_4F_G06 100>CATCAGAGCGATCCCATCAAGACCAAGTCTCAAGCTGCTGCTACAAAGAAAGATGCCATCCCAACCCGAAGACAACTGCGTGTCTGAGTGAATTC>809
M_4R_F06 382>CATCAGAGCGATCCCATCAAGACCAAGTCTCAAGCTGCTGCTACAAAGAAAGATGCCATCCCAACCCGAAGACAACTGCGTGTCTGAGTGAATTC>823
V_16_1_G08 372>CATCAGAGCGATCCCATCAAGACCAAGTCTCAAGCTGCTGCTACAAAGAAAGATGCCATCCCAACCCGAAGACAACTGCGTGTCTGAGTGAATTC>273
V_16_2_H08 664>CATCAAGCGATCATTCAGACCAAGTCTCAAGCTGCTGCTACAAAGAAAGATGCCATCCCAACCCGAAGACAACTGCGTGTCTGAGTGAATTC>763

      *           *           *           *           *           *           *
PIP1;1 2548>TTTCTGATGGGGGGCGG-CCTCTCT-TCCCATCGTCCGTG-TTACCGTGGAAAT-CAAATTTGTCT-TCCAAGTTTGATGACTGCTCTTGCTCTTGCTC>2642
G_4F_H03 811>TTTCTGATGGGGGGGGG-CCTCTCT-TCCCATCGTCCGTG-TTACCGTGGAAAT-CAAATTTGTCT-TCCAAGTTTGATGACTGCTCTTGCTCTTGCTC>893
G_4R_G03 281>TTTCTGATGGGGGGGGG-CCTCTCT-TCCCATCGTCCGTG-TTACCGTGGAAAT-CAAATTTGTCT-TCCAAGTTTGATGACTGCTCTTGCTCTTGCTC>199
M_4F_G06 100>TTTCTGATGGGGGGGGG-CCTCTCT-TCCCATCGTCCGTG-TTACCGTGGAAAT-CAAATTTGTCT-TCCAAGTTTGATGACTGCTCTTGCTCTTGCTC>892
M_4R_F06 282>TTTCTGATGGGGGGGGG-CCTCTCT-TCCCATCGTCCGTG-TTACCGTGGAAAT-CAAATTTGTCT-TCCAAGTTTGATGACTGCTCTTGCTCTTGCTC>200
V_16_1_G08 722>TTTCTGATGGGGGGGGG-CCTCTCT-TCCCATCGTCCGTG-TTACCGTGGAAAT-CAAATTTGTCT-TCCAAGTTTGATGACTGCTCTTGCTCTTGCTC>194
V_16_2_H08 764>TTTCTGATGGGGGGGGG-CCTCTCT-TCCCATCGTCCGTG-TTACCGTGGAAAT-CAAATTTGTCT-TCCAAGTTTGATGACTGCTCTTGCTCTTGCTC>893

```

Joonis 6. Joondus kõikide sortide PIP1;1 geeni praimerite proovide ja referentsiga.

2.3.2.1.2. PIP1;3

Joonisel 7 kujutatud järjestuste võrdlusest ilmneb, et erisus on kahe järjestuse vahel kattuv, ehk tõenäoliselt on tegemist 'Golden Promise' PIP1;3 geenijärjestuses päriselt esineva muutusega.

*
*
*
*
*
*
*
*
*
*

PIP1;3 1400>AATCACTGACTGAGTGATGAGGTGGAACGATTAAAACTGACGGGAAACATGCAGATTTTGGCGCGCTGCCGATCGGGTTCGCGGTGTTCTCGGTGCA>1499
 G_3.1_E09 695<AATCACTGACTGAGTGATGAGGTGGAACGATTAAAACTGACGGGAAACATGCAGATTTTGGCGCGCTGCCGATCGGGTTCGCGGTGTTCTCGGTGCA>596
 G_3.2_F09 250>AATCACTGACTGAGTGATGAGGTGGAACGATTAAAACTGACGGGAAACATGCAGATTTTGGCGCGCTGCCGATCGGGTTCGCGGTGTTCTCGGTGCA>349

Joonis 7. Erisus 'Golden Promise' PIP1;3 geeni praimeritega proovide ja referentsi vahel.

Joonisel 8 kujutatud järjestuste võrdlusest ilmneb, et kõik erisused on kahe järjestuse vahel kattuvad, ehk tõenäoliselt on tegemist 'Vanille' PIP1;3 geenijärjestuses päriselt esinevate muutustega.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIPI1;3 1299>CACCGTCTTCTCCGCCACCGACGCCAAGCGCAGCGCCAGAGACTCCACGTCCTCCCGTAAGTATACGGTTCCGCGCGCGCGCTGTCGAATCGATCAATCAT>1398
V_3.1_C12 781<CACCGTCTTCTCCGCCACCGACGCCAAGCGCAGTSCCAGAGACTCCACGTCCTCCCGTAAGTATACGGTTCCGCGCGCGCGCTGTCGAATCGATCAATCAT>682
V_3.2_D12 100>CACCGTCTTCTCCGCCACCGACGCCAAGCGCAGTSCCAGAGACTCCACGTCCTCCCGTAAGTATACGGTTCCGCGCGCGCGCTGTCGAATCGATCAATCAT>199

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIPI1;3 1399>CAATCACTGACTGAGTGATGAGGTGGAAGTAACTGACGGGAAACATGCAGATTTTGGCGCGCGCTGCCGATCGGGTTCGCGGTGTTCTTGGTGC>1498
V_3.1_C12 681<CAATCACTGACTGAGTGATGAGGTGAAGTAACTGACGGGAAACATGCAGATTTTGGCGCGCGCTGCCGATCGGGTTCGCGGTGTTCTTGGTGC>583
V_3.2_D12 200>CAATCACTGACTGAGTGATGAGGTGAAGTAACTGACGGGAAACATGCAGATTTTGGCGCGCGCTGCCGATCGGGTTCGCGGTGTTCTTGGTGC>298

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIPI1;3 1499>ACCTGGCGACGATCCCCATCACGGGCACCGGCATCAACCCGGCGAGGTCCCTCGGCGCGCGCATCATCTACAACAAGAAGCAGGCGTGGGACGACACCGT>1598
V_3.1_C12 582<ACCTGGCGACGATCCCCATCACGGGCACCGGCATCAACCCGGCGAGGTCCCTCGGCGCGCGCATCATCTACAACAAGAAGCAGGCGTGGGACGACACCGT>483
V_3.2_D12 299>ACCTGGCGACGATCCCCATCACGGGCACCGGCATCAACCCGGCGAGGTCCCTCGGCGCGCGCATCATCTACAACAAGAAGCAGGCGTGGGACGACACCGT>398

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIPI1;3 1599>AAGAATCAATCATTATGAGTTTAATATAAGCTTGAAGATGATCATGCATGGTAATTTGGCGCTGGCTAGGGACTGATCGGTTCGGTATCTTCTTGAAC>1698
V_3.1_C12 482<AAGAATCAATCATTATGAGTTTAATATAAGCTTGAAGATGATCATGCATGGTAATTTGGCGCTGGCTAGGGACTGATCGGTTCGGTATCTTCTTGAAC>383
V_3.2_D12 399>AAGAATCAATCATTATGAGTTTAATATAAGCTTGAAGATGATCATGCATGGTAATTTGGCGCTGGCTAGGGACTGATCGGTTCGGTATCTTCTTGAAC>498

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIPI1;3 1699>TTGGCAGTGGATCTTCTGGGTGGGACCGTTTCATCGGCGCGCGCTGGCGGCGATCTACCACGTGGTGGTGATCAGGGCGATCCCTTCAAGAGCCGCGC>1798
V_3.1_C12 382<TTGGCAGTGGATCTTCTGGGTGGGACCGTTTCATCGGCGCGCGCTGGCGGCGATCTACCACGTGGTGGTGATCAGGGCGATCCCTTCAAGAGCCGCGC>283
V_3.2_D12 499>TTGGCAGTGGATCTTCTGGGTGGGACCGTTTCATCGGCGCGCGCTGGCGGCGATCTACCACGTGGTGGTGATCAGGGCGATCCCTTCAAGAGCCGCGC>598

```

Joonis 8. Erisused 'Vanille' PIP1;3 geeni praimeritega proovide ja referentsi vahel.

Joonisel 9 kujutatud joondusest on näha, et kuigi järjestustes esineb teatud erisusi (Joonis 7-8), leiduvad olemasolevate andmete põhjal mõned arvestatava pikkusega regioonid mõlemale sordile sobilike qPCR-i praimerite disainimiseks.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIPI1;3 1398>TCAATCACTGACTGAGTGATGAGGTGGAAGTAACTGACGGGAAACATGCAGATTTTGGCGCGCGCTGCCGATCGGGTTCGCGGTGTTCTTGGTG>1497
V_3.1_C12 682<TCAATCACTGACTGAGTGATGAGGTGAAGTAACTGACGGGAAACATGCAGATTTTGGCGCGCGCTGCCGATCGGGTTCGCGGTGTTCTTGGTG>584
V_3.2_D12 199>TCAATCACTGACTGAGTGATGAGGTGAAGTAACTGACGGGAAACATGCAGATTTTGGCGCGCGCTGCCGATCGGGTTCGCGGTGTTCTTGGTG>297
G_3.1_E09 697<TCAATCACTGACTGAGTGATGAGGTGGAAGTAACTGACGGGAAACATGCAGATTTTGGCGCGCGCTCCGATCGGGTTCGCGGTGTTCTTGGTG>598
G_3.2_F09 248>TCAATCACTGACTGAGTGATGAGGTGGAAGTAACTGACGGGAAACATGCAGATTTTGGCGCGCGCTCCGATCGGGTTCGCGGTGTTCTTGGTG>347

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIPI1;3 1498>CACCTGGCGACGATCCCCATCACGGGCACCGGCATCAACCCGGCGAGGTCCCTCGGCGCGCGCATCATCTACAACAAGAAGCAGGCGTGGGACGACACG>1597
V_3.1_C12 583<CACCTGGCGACGATCCCCATCACGGGCACCGGCATCAACCCGGCGAGGTCCCTCGGCGCGCGCATCATCTACAACAAGAAGCAGGCGTGGGACGACACG>484
V_3.2_D12 298>CACCTGGCGACGATCCCCATCACGGGCACCGGCATCAACCCGGCGAGGTCCCTCGGCGCGCGCATCATCTACAACAAGAAGCAGGCGTGGGACGACACG>397
G_3.1_E09 597<CACCTGGCGACGATCCCCATCACGGGCACCGGCATCAACCCGGCGAGGTCCCTCGGCGCGCGCATCATCTACAACAAGAAGCAGGCGTGGGACGACACG>498
G_3.2_F09 348>CACCTGGCGACGATCCCCATCACGGGCACCGGCATCAACCCGGCGAGGTCCCTCGGCGCGCGCATCATCTACAACAAGAAGCAGGCGTGGGACGACACG>447

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIPI1;3 1598>TAAGAATCAATCATTATGAGTTTAATATAAGCTTGAAGATGATCATGCATGGTAATTTGGCGCTGGCTAGGGACTGATCGGTTCGGTATCTTCTTGAAC>1697
V_3.1_C12 483<TAAGAATCAATCATTATGAGTTTAATATAAGCTTGAAGATGATCATGCATGGTAATTTGGCGCTGGCTAGGGACTGATCGGTTCGGTATCTTCTTGAAC>384
V_3.2_D12 398>TAAGAATCAATCATTATGAGTTTAATATAAGCTTGAAGATGATCATGCATGGTAATTTGGCGCTGGCTAGGGACTGATCGGTTCGGTATCTTCTTGAAC>497
G_3.1_E09 497<TAAGAATCAATCATTATGAGTTTAATATAAGCTTGAAGATGATCATGCATGGTAATTTGGCGCTGGCTAGGGACTGATCGGTTCGGTATCTTCTTGAAC>398
G_3.2_F09 448>TAAGAATCAATCATTATGAGTTTAATATAAGCTTGAAGATGATCATGCATGGTAATTTGGCGCTGGCTAGGGACTGATCGGTTCGGTATCTTCTTGAAC>547

```

Joonis 9. Joondus 'Vanille' ja 'Golden Promise' PIP1;3 geeni praimerite proovide ja referentsiga.

2.3.2.1.3. PIP2;1

Kuigi joonduses (Lisa 4) on esindatud ainult õnnestunud järjestused, mida antud geeni puhul oli vähe, on nende põhjal kattuvus referentsjärjestusega täielik, millest võib järeldada, et on võimalik disainida kõikidele sortidele sobivad qPCR-i praimerid.

2.3.2.1.4. PIP2;2

Joonisel 10 kujutatud võrdluses on päripidi praimeriproovi sekveneerimise ebaõnnestumise tõttu esindatud ainult 'Golden Promise' PIP2;2 äraspidi praimeriproovi järjestus, mistõttu ei saa hinnata, kas tegemist on sekveneerimisvigadega või PIP2;2 geenijärjestuses päriselt esinevate muutustega.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP2;2 1401>AAGAAGGCCGATGGGACAACCACGTAAGCTACCTTCCGTCGTCTCCGTTAACCTCTACCACCTTGTGCTTGAATGCAAGAAGCTAACTGTGCATGACA>1500
643<|||||
G_14.1_C12 643<AAGAAGGCCGATGGGACAACCACGTAAGCTACCTTCCGTCGTCTCCGTTAACCTCTACCACCTTGTGCTTGAATGCAAGAAGCTAACTGTGCATGACA<544

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP2;2 1501>TGACATGCAGTGGATCTTCTGGGTCGGCCCGTTCGTCGGAGCGCTGGCGGCGGCGGCGTACCACCAGTACATCCTCGGGGCGGCGCCATCAAGGCGCTC>1600
543<|||||
G_14.1_C12 543<TGACATGCAGTGGATCTTCTGGGTCGGCCCGTTCGTCGGAGCGCTGGCGGCGGCGGCGTACCACCAGTACATCCTCGGGGCGGCGCCATCAAGGCGCTC<444

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP2;2 1601>GGCTCCTTCGGGAGCAGCCGAGCAACTGAGCAGCGCCGCAATAATTTAATGCAACGGTGGCAGTACTGCTCCTCGTGTCCATCCGGCGCTAGTATCC>1700
443<|||||
G_14.1_C12 443<GGCTCCTTCGGGAGCAGCCGAGCAACTGAGCAGCGCCGCAATAATTTAATGCAACGGTGGCAGTACTGCTCCTCGTGTCCATCCGGCGCTAGTATCC<344

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP2;2 1701>ACACAACCGGACGGGCTTCGTGTTGGCAGTACTGCTCCTCCATCGTGCCCATCCGGGCTCGTTCAGTGTCTGTGCATGCATGTGAGTGAGAGAGAGAG>1800
343<|||||
G_14.1_C12 343<ACACAACCGGACGGGCTTCGTGTTGGCAGTACTGCTCCTCCATCGTGCCCATCCGGGCTCGTTCAGTGTCTGTGCATGCATGTGAGTGAGAGAGAG<248

```

Joonis 10. Erisused 'Golden Promise' PIP2;2 geeni äraspidi praimeriga proovi ja referentsi vahel.

Joonisel 11 kujutatud võrdlusest ilmneb, et kõik erisused esinevad vaid 'Vanille' PIP2;2 päripidi praimeriga proovis V_14.2_D08, ehk tõenäoliselt on tegemist sekveneerimisvigadega

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP2;2 1201>AGATCGTCGGCACCTTCGTCTCGTCTACACCGTCTTCTCCGCCACCGACCCCAAGCGCAGCGCCCGGACTCCACAGTCCCGTGTGGCGCCGCTCCC>1300
831<AGATCGTCGGCACCTTCGTCTCGTCTACACCGTCTTCTCCGCCACCGACCCCAAGCGCAGCGCCCGGACTCCACAGTCCCGTGTGGCGCCGCTCCC<732
V_14.1_C08 204>AGATCGTCGACACCTTCGTCTCGTCTACACCGTCTTCTCCGCCACCGACCCCAAGCGCAGCGCCCGGACTCCACAGTCCCGTGTGGCGCCGCTCCC>302
V_14.2_D08

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP2;2 1301>CATCGGCTTCGCGCTCTTCATGTTGCACCTCGCCACCATCCCATCACCGGCACCGGCATCAACCCGCGCAGGAGCCTCGGCGCCGCGGTCTATCTACAAC>1400
731<CATCGGCTTCGCGCTCTTCATGTTGCACCTCGCCACCATCCCATCACCGGCACCGGCATCAACCCGCGCAGGAGCCTCGGCGCCGCGGTCTATCTACAAC<632
V_14.1_C08 303>ATCGCTTCGCGCTCTTCATGTTGCACCTCGCCACCATCCCATCACCGGCACCGGCATCAACCCGCGCAGGAGCCTCGGCGCCGCGGTCTATCTACAAC>402
V_14.2_D08

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP2;2 1401>AAGAAGGCCGATGGGACAACCACGTAAGCTACCTTCCGTCGTCTCCGTTAACCTCTACCACCTTGTGCTTGAATGCAAGAAGCTAACTGTGCATGACA>1500
631<AAGAAGGCCGATGGGACAACCACGTAAGCTACCTTCCGTCGTCTCCGTTAACCTCTACCACCTTGTGCTTGAATGCAAGAAGCTAACTGTGCATGACA<532
V_14.1_C08 403>AAGAAGGCCGATGGACAACACGTAAGCTACCTTCCGTCGTCTCCGTTAACCTCTACCACCTTGTGCTTGAATGCAAGAAGCTAACTGTGCATGACA>501
V_14.2_D08

```

Joonis 11. Erisused 'Vanille' PIP2;2 geeni praimeritega proovide ja referentsi vahel.

Joonisel 12 kujutatud joondusest on näha, et kuigi järjestustes esineb teatud erisusi (Joonis 10-11), leiduvad olemasolevate andmete põhjal mõned arvestatava pikkusega regioonid mõlemale sordile sobilike qPCR-i praimerite disainimiseks.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP2;2 1201>AGATCGTCGGGACCTTCGTCCTCGTCTACACCGTCTTCTCCGCCACCGACCCCAAGCGCAGCGCCGCGACTCCACGTCCCGGTGCTGGCGCGGCTCCC>1300
G_14.1_C12 843<AGATCGTCGGGACCTTCGTCCTCGTCTACACCGTCTTCTCCGCCACCGACCCCAAGCGCAGCGCCGCGACTCCACGTCCCGGTGCTGGCGCGGCTCCC>744
V_14.1_C08 831<AGATCGTCGGGACCTTCGTCCTCGTCTACACCGTCTTCTCCGCCACCGACCCCAAGCGCAGCGCCGCGACTCCACGTCCCGGTGCTGGCGCGGCTCCC>732
V_14.2_D08 204>AGATCGTCGACCTTCCTCTCGTCTACACCGCTTCTCTCCGCCAAGACCCCAAGCGCAGCGCCGCGACTCCACGTCCCGGTGCTGGCGCGGCTCCC>302

      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP2;2 1301>CATCGGCTTCGCGGTCTTCATGGTGCACCTCGCCACCATCCCCATCACCAGGACCGGCATCAACCCCGCCAGGAGCCTCGGCGCCGCGGTCTCTACAAC>1400
G_14.1_C12 743<CATCGGCTTCGCGGTCTTCATGGTGCACCTCGCCACCATCCCCATCACCAGGACCGGCATCAACCCCGCCAGGAGCCTCGGCGCCGCGGTCTCTACAAC>644
V_14.1_C08 731<CATCGGCTTCGCGGTCTTCATGGTGCACCTCGCCACCATCCCCATCACCAGGACCGGCATCAACCCCGCCAGGAGCCTCGGCGCCGCGGTCTCTACAAC>632
V_14.2_D08 303>CATCGCTTCATGGTGCACCTCGCCACCATCCCCATCACCAGGACCGGCATCAACCCCGCCAGGAGCCTCGGCGCCGCGGTCTCTACAAC>402

      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP2;2 1401>AAGAAGGCCGCGATGGGACAACCACGTAAGCTACCTTCCGTCGTCCTCCGTTAACCTCTACCACCTTGCTTGCAATGCAAGAAGCTAACTGTGCATGACA>1500
G_14.1_C12 643<AAGAAGGCCGCGATGGGACAACCACGTAAGCTACCTTCCGTCGTCCTCCGTTAACCTCTACCACCTTGCTTGCAATGCAAGAAGCTAACTGTGCATGACA>544
V_14.1_C08 631<AAGAAGGCCGCGATGGGACAACCACGTAAGCTACCTTCCGTCGTCCTCCGTTAACCTCTACCACCTTGCTTGCAATGCAAGAAGCTAACTGTGCATGACA>532
V_14.2_D08 403>AAGAAGGCCGCGATGGACAACACGTAAGCTACCTTCCGTCGTCCTCCGTTAACCTCTACCACCTTGCTTGCAATGCAAGAAGCTAACTGTGCATGACA>501

```

Joonis 12. Joondus 'Golden Promise' ja 'Vanille' PIP2;2 geeni praimeritega proovide ja referentsiga.

2.3.2.1.5. PIP2;5

Kuigi joonduses (Lisa 5) on esindatud ainult õnnestunud järjestused, mida antud geeni puhul oli vähe, on nende põhjal kattuvus referentsiga täielik, millest võib järeldada, et on võimalik disainida sobivad qPCR-i praimerid.

2.3.2.1.6. TIP1;1

Ühegi sordi ega praimerivariandi (Lisa 1, Lisa 2, Lisa 3) puhul ei õnnestunud geeni fragmente PCR-iga paljundada, mistõttu järjestused puuduvad. Tõenäoliselt vajavad praimerid täiendavat optimeerimist.

2.3.2.1.7. TIP1;2

Ühegi sordi puhul ei õnnestunud saada aktsepteeritavaid järjestusi.

2.3.2.2. Referentsgeenid qPCR-i jaoks

2.3.2.2.1. EF-1

Joonisel 13 kujutatud järjestuste võrdlusest ilmneb, et ükski tuvastatud erisus sekventsides vahel ei kattu. Seetõttu on alust arvata, et tegemist on sekveneerimisvigadega, mitte 'Golden Promise' EF-1 geenijärjestuses päriselt esinevate muutustega.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
EF-1  2698>GGAAGTGTGCCCCGTGGGCCGTGTTGAGACTGGTGTCAATCAAGCCTGGTATGGTTGTACCTTTGGGCCCACTGGTTTGACAACTGAGGTCAAGTCTGTT->2796
G_11.1_G11 834<GGAAGTGTGCCCCGTGGGCCGTGTTGAGACTGGTGTCAATCAAGCCTGGTATGGTTGTACCTTTGGGCCCACTGGTTTGACAACTGAGGTCAAGTCTGTT 735
G_11.2_H11 121>GAACTGTGCCCCGTGGGCCGTGTTGAGACTGGTGTCAATCAAGCCTGGTATGGTTGTACCTTTGGGCCCACTGGTTTGACAACTGAGGTCAAGTCTGTT->218

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
EF-1  2797>GAGATGCACCATGAGTCTCTCCTGGAGGCGCTTCCCGGTGACAATGTCGGCTTCAATGTCAAGAACGTTGCCGTGAAGGATCTGAAGCGTGGGTTTGTG>2896
G_11.1_G11 734<GAGATGCACCATGAGTCTCTCCTGGAGGCGCTTCCCGGTGACAATGTCGGCTTCAATGTCAAGAACGTTGCCGTGAAGGATCTGAAGCGTGGGTTTGTG 635
G_11.2_H11 219>GAGATGCACCATGAGTCTCTCCTGGAGGCGCTTCCCGGTGACAATGTCGGCTTCAATGTCAAGAACGTTGCCGTGAAGGATCTGAAGCGTGGGTTTGTG>318

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
EF-1  2897>CATCCAACCTCAAGGATGATCCTGCCAAGGAGGAGCCAACTTCACCTCCAGGTCATCATGAACCACTTGGTCAGATCGGCAATGGCTATGCCCC>2996
G_11.1_G11 634<CATCCAACCTCAAGGATGATCCTGCCAAGGAGGAGCCAACTTCACCTCCAGGTCATCATGAACCACTTGGTCAGATCGGCAATGGCTATGCCCC 535
G_11.2_H11 319>CATCCAACCTCAAGGATGATCCTGCCAAGGAGGAGCCAACTTCACCTCCAGGTCATCATGAACCACTTGGTCAGATCGGCAATGGCTATGCCCC>418
```

Joonis 13. Erisused 'Golden Promise' EF-1 geeni praimeritega proovide ja referentsi vahel.

Joonisel 14 kujutatud võrdluses on äraspidi praimeriproovi sekveneerimise ebaõnnestumise tõttu esindatud ainult 'Marta' EF-1 päripidi praimeriproovi järjestus, mistõttu ei saa hinnata, kas tegemist on sekveneerimisvigadega või EF-1 geenijärjestuses päriselt esinevate muutustega.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
EF-1  2601>CCTTCTTGAGGCTCTTGACCATCAATGAGCCCAAGAGGCCCTCAGACAAGCCCTGCGTCTTCCCTTCAGGATGTTTACAAGATTGGTGGCATTGGA>2700
M_9F_A08 129>|||||CCTTCTTGAGGCTCTTGACCATCAATGAGCCCAAGAGGCCCTCAGACAAGCCCTGCGTCTTCCCTTCAGGATGTTTACAAGATTGGTGGCATTGGA>228

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
EF-1  2701>ACTGTGCCCCGTGGGCCGTGTTGAGACTGGTGTCAATCAAGCCTGGTATGGTTGTACCTTTGGGCCCACTGGTTTGACAACTGAGGTCAAGTCTGTTGAGA>2800
M_9F_A08 229>|||||ACTGTGCCCCGTGGGCCGTGTTGAGACTGGTGTCAATCAAGCCTGGTATGGTTGTACCTTTGGGCCCACTGGTTTGACAACTGAGGTCAAGTCTGTTGAGA>328

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
EF-1  2801>TGACCATGAGTCTCTCCTGGAGGCGCTTCCCGGTGACAATGTCGGCTTCAATGTCAAGAACGTTGCCGTGAAGGATCTGAAGCGTGGGTTTGTGTCATC>2900
M_9F_A08 329>|||||TGACCATGAGTCTCTCCTGGAGGCGCTTCCCGGTGACAATGTCGGCTTCAATGTCAAGAACGTTGCCGTGAAGGATCTGAAGCGTGGGTTTGTGTCATC>428

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
EF-1  2901>CAACTCCAAGGATGATCCTGCCAAGGAGGAGCCAACTTCACCTCCAGGTCATCATGAACCACTTGGTCAGATCGGCAATGGCTATGCCCCAGTG>3000
M_9F_A08 429>|||||CAACTCCAAGGATGATCCTGCCAAGGAGGAGCCAACTTCACCTCCAGGTCATCATGAACCACTTGGTCAGATCGGCAATGGCTATGCCCCAGTG>528
```

Joonis 14. Erisused 'Marta' EF-1 geeni päripidi praimeriga proovi ja referentsi vahel.

Joonisel 15 on näha, et esimesed kaks lisa-T-d ja viimane tsütosiin (C) guaniini (G) asemel erinevate järjestuste vahel ei kattu, mistõttu võib neid pidada sekveneerimisvigadeks. Vahepealsed erisused on järjestustes kattuvad ning võib oletada, et tegemist on 'Vanille' EF-1 geenijärjestuses päriselt esinevate muutustega.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
EF-1 2799>GATGCACCATGAGTCTCTCCTGGAGGCGCTT-CCCGGTGACAATGTGCGGCTTCAATGTCAAGAACGTTGCCGTGAAGGATCTGAAGCGTGGG-TTTGTTG>2896
V_11.1_A08 731<GATGCACCATGAGTCTCTCCTGGAGGCGCTT-CCCGGTGACAATGTGCGGCTTCAATGTCAAGAACGTTGCCGTGAAGGATCTGAAGCGTGGG-TTTGTTG<632
V_11.2_B08 328>GATGCACCATGAGTCTCTCCTGGAGGCGCTT-CCCGGTGACAATGTGCGGCTTCAATGTCAAGAACGTTGCCGTGAAGGATCTGAAGCGTGGG-TTTGTTG>425

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
EF-1 2897>CATCCAACCTCAAGGATGATCCTGCCAAGGAGGAGGCCAACTTCACTCCCAAGGTCATCATCATGAACCACTTGGTCAGATCGGCAATGGCTATGCCCC>2996
V_11.1_A08 631<CATCCAACCTCAAGGATGATCCTGCCAAGGAGGAGGCCAACTTCACTCCCAAGGTCATCATCATGAACCACTTGGTCAGATCGGCAATGGCTATGCCCC<532
V_11.2_B08 426>CATCCAACCTCAAGGATGATCCTGCCAAGGAGGAGGCCAACTTCACTCCCAAGGTCATCATCATGAACCACTTGGTCAGATCGGCAATGGCTATGCCCC>525

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
EF-1 2997>AGTGTGGAGTGGCCACCTCCACATTGCTGTCAAGTTTGTGCTGAGTGGTGACCAAGATCGACAGGCGATCTGGTAAGGAGCTGGAGGCGCTGCCAAG>3096
V_11.1_A08 531<AGTGTGGAGTGGCCACCTCCACATTGCTGTCAAGTTTGTGCTGAGTGGTGACCAAGATCGACAGGCGATCTGGTAAGGAGCTGGAGGCGCTGCCAAG<432
V_11.2_B08 526>AGTGTGGAGTGGCCACCTCCACATTGCTGTCAAGTTTGTGCTGAGTGGTGACCAAGATCGACAGGCGATCTGGTAAGGAGCTGGAGGCGCTGCCAAG>625

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
EF-1 3097>TTCTCAAGAACGGTGATGCTGTGATCGTGAAGATGATCCCAACAGCCCATGGTTGTGGAGACCTTTGCCACCTACCTCTCTTGGCCGTTTGGCCG>3196
V_11.1_A08 431<TTCTCAAGAACGGTGATGCTGTGATCGTGAAGATGATCCCAACAGCCCATGGTTGTGGAGACCTTTGCCACCTACCTCTCTTGGCCGTTTGGCCG<332
V_11.2_B08 626>TTCTCAAGAACGGTGATGCTGTGATCGTGAAGATGATCCCAACAGCCCATGGTTGTGGAGACCTTTGCCACCTACCTCTCTTGGCCGTTTGGCCG>725

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
EF-1 3197>TGCCTGACATGAGACAACGGTTGCTGTGCGGTGTCATCAAGGGCGTGGAGAAGAGGACCCACCGGTGCCAAGGTTACCAAGGCTGCCATCAAGAGAA>3296
V_11.1_A08 331<TGCCTGACATGAGACAACGGTTGCTGTGCGGTGTCATCAAGGGCGTGGAGAAGAGGACCCACCGGTGCCAAGGTTACCAAGGCTGCCATCAAGAGAA<232
V_11.2_B08 726>TGCCTGACATGAGACAACGGTTGCTGTGCGGTGTCATCAAGGGCGTGGAGAAGAGGACCCACCGGTGCCAAGGTTACCAAGGCTGCCATCAAGAGAA>825

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
EF-1 3297>ATAGGCGCTATCTAGCGGAAGGATTTTGTTCGCGGTGCTGCTTTTGTGCTTCAAGTCTTATCCCGGGCGAGCAATGATCTGTCTGCTGTTAATTAC>3396
V_11.1_A08 231<ATAGGCGCTATCTAGCGGAAGGATTTTGTTCGCGGTGCTGCTTTTGTGCTTCAAGTCTTATCCCGGGCGAGCAATGATCTGTCTGCTGTTAATTAC<132
V_11.2_B08 826>ATAGGCGCTATCTAGCGGAAGGATTTTGTTCGCGGTGCTGCTTTTGTGCTTCAAGTCTTATCCCGGGCGAGCAATGATCTGTCTGCTGTTAATTAC>925

```

Joonis 15. Erisused 'Vanille' EF-1 geeni praimeritega proovide ja referentsi vahel.

Joonisel 16 kujutatud joondusest on näha, et kuigi järjestustes esineb teatud erisusi (Joonis 13-15), leiduvad olemasolevate andmete põhjal mõned arvestatava pikkusega regioonid kõikidele sortidele sobilike qPCR-i praimerite disainimiseks.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
EF-1 2696>TTGGAACCTGTGCCCGTGGGCGGTGTTGAGACTGGTGTCATCAAGCCTGGTATGGTTGTTACCTTTGGGCCCACTGGTTGACAACTGAGGTCAAGTCTGT>2795
M_9F_A08 224>TTGGAACCTGTGCCCGTGGGCGGTGTTGAGACTGGTGTCATCAAGCCTGGTATGGTTGTTACCTTTGGGCCCACTGGTTGACAACTGAGGTCAAGTCTGT>323
G_11.1_G11 836<TTGGAACCTGTGCCCGTGGGCGGTGTTGAGACTGGTGTCATCAAGCCTGGTATGGTTGTTACCTTTGGGCCCACTGGTTGACAACTGAGGTCAAGTCTGT>737
G_11.2_H11 119>TTGGAACCTGTGCCCGTGGGCGGTGTTGAGACTGGTGTCATCAAGCCTGGTATGGTTGTTACCTTTGGGCCCACTGGTTGACAACTGAGGTCAAGTCTGT>217
V_11.1_A08 834<TTGGAACCTGTGCCCGTGGGCGGTGTTGAGACTGGTGTCATCAAGCCTGGTATGGTTGTTACCTTTGGGCCCACTGGTTGACAACTGAGGTCAAGTCTGT>735
V_11.2_B08 225>TTGGAACCTGTGCCCGTGGGCGGTGTTGAGACTGGTGTCATCAAGCCTGGTATGGTTGTTACCTTTGGGCCCACTGGTTGACAACTGAGGTCAAGTCTGT>324

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
EF-1 2796>T-GAGATGCACCATGAGTCTCTCCTGGAGGCGCTT-CCCGGTGACAATGTGCGGCTTCAATGTCAAGAACGTTGCCGTGAAGGATCTGAAGCGTGGG-TTT>2892
M_9F_A08 324>T-GAGATGCACCATGAGTCTCTCCTGGAGGCGCTT-CCCGGTGACAATGTGCGGCTTCAATGTCAAGAACGTTGCCGTGAAGGATCTGAAGCGTGGG-TTT>420
G_11.1_G11 736<T-GAGATGCACCATGAGTCTCTCCTGGAGGCGCTT-CCCGGTGACAATGTGCGGCTTCAATGTCAAGAACGTTGCCGTGAAGGATCTGAAGCGTGGG-TTT<639
G_11.2_H11 218>T-GAGATGCACCATGAGTCTCTCCTGGAGGCGCTT-CCCGGTGACAATGTGCGGCTTCAATGTCAAACGTTGCCGTGAAGGATCTGAAGCGTGGG-TTT>314
V_11.1_A08 734<T-GAGATGCACCATGAGTCTCTCCTGGAGGCGCTT-CCCGGTGACAATGTGCGGCTTCAATGTCAAGAACGTTGCCGTGAAGGATCTGAAGCGTGGG-TTT<636
V_11.2_B08 325>T-GAGATGCACCATGAGTCTCTCCTGGAGGCGCTT-CCCGGTGACAATGTGCGGCTTCAATGTCAAGAACGTTGCCGTGAAGGATCTGAAGCGTGGG-TTT>421

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
EF-1 2893>GTTGCATCCAACCTCAAGGATGATCCTGCCAAGGAGGAGGCCAACTTCACTCCCAAGGTCATCATCATGAACCACTTGGTCAGATCGGCAATGGCTATG>2992
M_9F_A08 421>GTTGCATCCAACCTCAAGGATGATCCTGCCAAGGAGGAGGCCAACTTCACTCCCAAGGTCATCATCATGAACCACTTGGTCAGATCGGCAATGGCTATG>520
G_11.1_G11 638<GTTGCATCCAACCTCAAGGATGATCCTGCCAAGGAGGAGGCCAACTTCACTCCCAAGGTCATCATCATGAACCACTTGGTCAGATCGGCAATGGCTATG>539
G_11.2_H11 315>GTTGCATCCAACCTCAAGGATGATCCTGCCAAGGAGGAGGCCAACTTCACTCCCAAGGTCATCATCATGAACCACTTGGTCAGATCGGCAATGGCTATG>414
V_11.1_A08 635<GTTGCATCCAACCTCAAGGATGATCCTGCCAAGGAGGAGGCCAACTTCACTCCCAAGGTCATCATCATGAACCACTTGGTCAGATCGGCAATGGCTATG>536
V_11.2_B08 422>GTTGCATCCAACCTCAAGGATGATCCTGCCAAGGAGGAGGCCAACTTCACTCCCAAGGTCATCATCATGAACCACTTGGTCAGATCGGCAATGGCTATG>521

```

Joonis 16. Joondus kõikide sortide EF-1 geeni praimerite proovide ja referentsiga.

2.3.2.2.2. GADPH

Joonisel 17 kujutatud järjestuste võrdlusest ilmneb, et kõik tuvastatud erisused on kahe järjestuse vahel kattuvad, ehk tõenäoliselt on tegemist 'Golden Promise' GADPH geenijärjestuses päriselt esinevate muutustega.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
GAPDH 3100>CGCATGTGTGACGATTCTACGAATATCGTTCCCGACTGCTCACTAATAGAGTACGCAAATTTATTTTCAGGGCTGCTCCGAGGGAAAGCTCAAGGGTATCA>3199
G1_A01 840<CGCATGTGTGACGATTCTACGAATATCGTTCCCGGATGTCACTAATAGAGTACGCAAATTTATTTTCAGGGCTGCTCCGAGGGAAAGCTCAAGGGTATCA<741
G2_B01 58>CGCATGTGTGACGATTCTACGAATATCGTTCCCGGATGTCACTAATAGAGTACGCAAATTTATTTTCAGGGCTGCTCCGAGGGAAAGCTCAAGGGTATCA>157

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
GAPDH 3200>TGGGTTACGTTGAGGAAGATTGGTCTCCACCGACTTCGTTGGTGACAGCAGGTATGCTCAATGCTGAATGCTGCTGGCAAAGCTACCGAGCGTTATC>3299
G1_A01 740<TGGGTTACGTTGAGGAAGATTGGTCTCCACCGACTTCGTTGGTGACAGCAGGTATGCTCAATGCTGAATGCTGCTGGCAAAGCTACCGAGCGTTATC<641
G2_B01 158>TGGGTTACGTTGAGGAAGATTGGTCTCCACCGACTTCGTTGGTGACAGCAGGTATGCTCAATGCTGAATGCTGCTGGCAAAGCTACCGAGCGTTATC>257

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
GAPDH 3300>AGATAGTAAGTCTTCCATTCTATATTTTATCATTATTAGGTCCAGCATCTTTGATGCTAAGGCTGGAATTGCTCTGAACGACCATTTTCGTCAGGCTT>3399
G1_A01 640<AGATAGTAAGTCTTCCATTCTATATTTTATCATTATTAGGTCCAGCATCTTTGATGCTAAGGCTGGAATTGCTCTGAACGACCATTTTCGTCAGGCTT>541
G2_B01 258>AGATAGTAAGTCTTCCATTCTATATTTTATCATTATTAGGTCCAGCATCTTTGATGCTAAGGCTGGAATTGCTCTGAACGACCATTTTCGTCAGGCTT>357

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
GAPDH 3400>GTCCTCGTGGTATGACAACGAGTGGGGTTACAGGTGAGTTGCCATAATGGATTATTCTACAACCTGCTGTCCAATGTCTATTTCATCGATTCTCTGT>3499
G1_A01 540<GTCCTCGTGGTATGACAACGAGTGGGGTTACAGGTGAGTTGCCATAATGGATTATTCTACAACCTGCTGTCCAATGTCTTTTCATCGATTCTCTGT>441
G2_B01 358>GTCCTCGTGGTATGACAACGAGTGGGGTTACAGGTGAGTTGCCATAATGGATTATTCTACAACCTGCTGTCCAATGTCTTTTCATCGATTCTCTGT>457

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
GAPDH 3500>AACACTTTGAATTTTTCTCTGCGCAACCGTGTTGTCGACCTGATCCGCCACATGGCCAAAGACCCAGTAGAGCGTTCTGCTTTCTCTTGGCGCCTGG>3599
G1_A01 440<AACACTTTGAATTTTTCTCTGCGCAACCGTGTTGTCGACCTGATCCGCCACATGGCCAAAGACCCAGTAGAGCGTTCTGCTTTCTCTTGGCGCCTGG<341
G2_B01 458>AACACTTTGAATTTTTCTCTGCGCAACCGTGTTGTCGACCTGATCCGCCACATGGCCAAAGACCCAGTAGAGCGTTCTGCTTTCTCTTGGCGCCTGG>557

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
GAPDH 3600>TCAGAGGTGCCCTTTGCTCTATGGGAATAAATGTGGATGGTGTGCGTAGACGCGCTGGTTCATGTTAGTTGGACATGAGTTACCATCTGTTTTCCGCACC>3699
G1_A01 340<TCAGAGGTGCCCTTTGCTCTATGGGAATAAATGTGGATGGTGTGCGTAGACGCGCTGGTTCATGTTAGTTGGACATGAGTTACCATCTGTTTTCCGCACC<241
G2_B01 558>TCAGAGGTGCCCTTTGCTCTATGGGAATAAATGTGGATGGTGTGCGTAGACGCGCTGGTTCATGTTAGTTGGACATGAGTTACCATCTGTTTTCCGCACC>657

```

Joonis 17. Erisused 'Golden Promise' GADPH geeni praimeritega proovide ja referentsi vahel.

Joonisel 18 esitatud järjestuste võrdlus näitab, et kõik tuvastatud erisused on kahe järjestuse vahel kattuvad, ehk tõenäoliselt on tegemist 'Vanille' GADPH geenijärjestuses päriselt esinevate muutustega.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
GAPDH 3292>GCGTTATCAGATAGTAAGTCTTCCATTCTATATTTTATCATTATTAGGTCCAGCATCTTTGATGCTAAGGCTGGAATTGCTCTGAACGACCATTTTCG>3391
V1_E01 637<GCGTTATCAGATAGTAAGTCTTCCATTCTATATTTTATCATTATTAGGTCCAGCATCTTTGATGCTAAGGCTGGAATTGCTCTGAACGACCATTTTCG<538
V2_F01 257>GCGTTATCAGATAGTAAGTCTTCCATTCTATATTTTATCATTATTAGGTCCAGCATCTTTGATGCTAAGGCTGGAATTGCTCTGAACGACCATTTTCG>356

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
GAPDH 3392>TCAAGCTTGTCTCGTGGTATGACAACGAGTGGGGTTACAGGTGAGTTGCCATAATGGATTATTCTACAACCTGCTGTCCAATGTCTATTTCATCGATT>3491
V1_E01 537<TCAAGCTTGTCTCGTGGTATGACAACGAGTGGGGTTACAGGTGAGTTGCCATAATGGATTATTCTACAACCTGCTGTCCAATGTCTTTTCATCGATT<438
V2_F01 357>TCAAGCTTGTCTCGTGGTATGACAACGAGTGGGGTTACAGGTGAGTTGCCATAATGGATTATTCTACAACCTGCTGTCCAATGTCTTTTCATCGATT>456

```

Joonis 18. Erisused 'Vanille' GADPH geeni praimeritega proovide ja referentsi vahel.

Joonisel 19 kujutatud järjestuste võrdlusest ilmneb, et kõik erisused on kahe järjestuse vahel kattuvad, ehk tõenäoliselt on tegemist 'Marta' GADPH geenijärjestuses päriselt esinevate muutustega.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *
GAPDH  3101>GCATGTGTGACGATTCTACGAATATCGTTCCCGAGATGTCATAATAGAGTACGCAAATTATTTTCAGGGCTGCTCCGAGGGAAAGCTCAAGGGTATCAT>3200
M1_C01 833<GCATGTGTGACGATTCTACGAATATCGTTCCCGAGATGTCATAATAGAGTACGCAAATTATTTTCAGGGCTGCTCCGAGGGAAAGCTCAAGGGTATCAT<734
M2_D01 60>GCATGTGTGACGATTCTACGAATATCGTTCCCGAGATGTCATAATAGAGTACGCAAATTATTTTCAGGGCTGCTCCGAGGGAAAGCTCAAGGGTATCAT>159

      *      *      *      *      *      *      *      *
GAPDH  3201>GGGTACGTTGAGGAAGATTGGTCTCCACCGACTTCGTTGGTGACAGCAGGTATGCTCAATGTCGTAATGCTGCTGGCAAAAGCTACCGAGCGTTATCA>3300
M1_C01 733<GGGTACGTTGAGGAAGATTGGTCTCCACCGACTTCGTTGGTGACAGCAGGTATGCTCAATGTCGTAATGCTGCTGGCAAAAGCTACCGAGCGTTATCA<634
M2_D01 160>GGGTACGTTGAGGAAGATTGGTCTCCACCGACTTCGTTGGTGACAGCAGGTATGCTCAATGTCGTAATGCTGCTGGCAAAAGCTACCGAGCGTTATCA>259

      *      *      *      *      *      *      *      *
GAPDH  3301>GATAGTAAGTCTTCCATTCTATATTTTATCATTATTATAGGTCCAGCATCTTTGATGCTAAGGCTGGAATTGCTCTGAACGACCATTTCGTCAGGCTTG>3400
M1_C01 633<GATAGTAAGTCTTCCATTCTATATTTTATCATTATTATAGGTCCAGCATCTTTGATGCTAAGGCTGGAATTGCTCTGAACGACCATTTCGTCAGGCTTG<534
M2_D01 260>GATAGTAAGTCTTCCATTCTATATTTTATCATTATTATAGGTCCAGCATCTTTGATGCTAAGGCTGGAATTGCTCTGAACGACCATTTCGTCAGGCTTG>359

      *      *      *      *      *      *      *      *
GAPDH  3401>TCTCGTGGTATGACAACGAGTGGGGTTACAGGTGAGTTGCCATAATGATTATTTTCTACAACCTGCTGTCGAATGCTCTATTTCATCGATTCACTTCTGTA>3500
M1_C01 533<TCTCGTGGTATGACAACGAGTGGGGTTACAGGTGAGTTGCCATAATGATTATTTTCTACAACCTGCTGTCGAATGCTCTATTTCATCGATTCACTTCTGTA<434
M2_D01 360>TCTCGTGGTATGACAACGAGTGGGGTTACAGGTGAGTTGCCATAATGATTATTTTCTACAACCTGCTGTCGAATGCTCTATTTCATCGATTCACTTCTGTA>459

```

Joonis 19. Erisused 'Marta' GAPDH geeni praimeritega proovide ja referentsi vahel.

Joonisel 20 kujutatud joondusest on näha, et kuigi järjestustes esineb teatud erisusi (Joonis 17-19), leiduvad olemasolevate andmete põhjal mõned arvestatava pikkusega regioonid kõikidele sortidele sobilike qPCR-i praimerite disainimiseks.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *
GAPDH  3291>AGCGTTATCAGATAGTAAGTGTCTCCATTCTATATTTTATCATTATTATAGGTCCAGCATCTTTGATGCTAAGGCTGGAATTGCTCTGAACGACCATTTC>3390
G1_A01 649<AGCGTTATCAGATAGTAAGTGTCTCCATTCTATATTTTATCATTATTATAGGTCCAGCATCTTTGATGCTAAGGCTGGAATTGCTCTGAACGACCATTTC<550
G2_B01 249>AGCGTTATCAGATAGTAAGTGTCTCCATTCTATATTTTATCATTATTATAGGTCCAGCATCTTTGATGCTAAGGCTGGAATTGCTCTGAACGACCATTTC>348
M1_C01 643<AGCGTTATCAGATAGTAAGTGTCTCCATTCTATATTTTATCATTATTATAGGTCCAGCATCTTTGATGCTAAGGCTGGAATTGCTCTGAACGACCATTTC<544
M2_D01 250>AGCGTTATCAGATAGTAAGTGTCTCCATTCTATATTTTATCATTATTATAGGTCCAGCATCTTTGATGCTAAGGCTGGAATTGCTCTGAACGACCATTTC>349
V1_E01 638<AGCGTTATCAGATAGTAAGTGTCTCCATTCTATATTTTATCATTATTATAGGTCCAGCATCTTTGATGCTAAGGCTGGAATTGCTCTGAACGACCATTTC<539
V2_F01 256>AGCGTTATCAGATAGTAAGTGTCTCCATTCTATATTTTATCATTATTATAGGTCCAGCATCTTTGATGCTAAGGCTGGAATTGCTCTGAACGACCATTTC>355

      *      *      *      *      *      *      *      *
GAPDH  3391>GTCAAGCTTGCTCGTGGTATGACAACGAGTGGGGTTACAGGTGAGTTGCCATAATGGATTATTTCTACAACCTGCTGTCGAATGCTCTATTTCATCGAT>3490
G1_A01 549<GTCAAGCTTGCTCGTGGTATGACAACGAGTGGGGTTACAGGTGAGTTGCCATAATGGATTATTTCTACAACCTGCTGTCGAATGCTCTATTTCATCGAT<450
G2_B01 349>GTCAAGCTTGCTCGTGGTATGACAACGAGTGGGGTTACAGGTGAGTTGCCATAATGGATTATTTCTACAACCTGCTGTCGAATGCTCTATTTCATCGAT>448
M1_C01 543<GTCAAGCTTGCTCGTGGTATGACAACGAGTGGGGTTACAGGTGAGTTGCCATAATGATTATTTCTACAACCTGCTGTCGAATGCTCTATTTCATCGAT>444
M2_D01 350>GTCAAGCTTGCTCGTGGTATGACAACGAGTGGGGTTACAGGTGAGTTGCCATAATGATTATTTCTACAACCTGCTGTCGAATGCTCTATTTCATCGAT>449
V1_E01 538<GTCAAGCTTGCTCGTGGTATGACAACGAGTGGGGTTACAGGTGAGTTGCCATAATGATTATTTCTACAACCTGCTGTCGAATGCTCTATTTCATCGAT<439
V2_F01 356>GTCAAGCTTGCTCGTGGTATGACAACGAGTGGGGTTACAGGTGAGTTGCCATAATGATTATTTCTACAACCTGCTGTCGAATGCTCTATTTCATCGAT>455

      *      *      *      *      *      *      *      *
GAPDH  3491>TCATTCTGTAACACTTTGAATTTTTTCTCTGCGAGCAACCGTGTTGTCGACCTGATCCGCCACATGGCCAAGACCCAGTAGAGCGTTCTGCTTTCTTGT>3590
G1_A01 449<TCATTCTGTAACACTTTGAATTTTTTCTCTGCGAGCAACCGTGTTGTCGACCTGATCCGCCACATGGCCAAGACCCAGTAGAGCGTTCTGCTTTCTTGT<350
G2_B01 449>TCATTCTGTAACACTTTGAATTTTTTCTCTGCGAGCAACCGTGTTGTCGACCTGATCCGCCACATGGCCAAGACCCAGTAGAGCGTTCTGCTTTCTTGT>548
M1_C01 443<TCATTCTGTAACACTTTGAATTTTTTCTCTGCGAGCAACCGTGTTGTCGACCTGATCCGCCACATGGCCAAGACCCAGTAGAGCGTTCTGCTTTCTTGT>344
M2_D01 450>TCATTCTGTAACACTTTGAATTTTTTCTCTGCGAGCAACCGTGTTGTCGACCTGATCCGCCACATGGCCAAGACCCAGTAGAGCGTTCTGCTTTCTTGT>549
V1_E01 438<TCATTCTGTAACACTTTGAATTTTTTCTCTGCGAGCAACCGTGTTGTCGACCTGATCCGCCACATGGCCAAGACCCAGTAGAGCGTTCTGCTTTCTTGT<339
V2_F01 456>TCATTCTGTAACACTTTGAATTTTTTCTCTGCGAGCAACCGTGTTGTCGACCTGATCCGCCACATGGCCAAGACCCAGTAGAGCGTTCTGCTTTCTTGT>555

      *      *      *      *      *      *      *      *
GAPDH  3591>GGCGCCTGGTCAGAGGTGCCCTTTGTCTATGGGAATAAATGTGGATGGTGTGCGCTAGACGCCTGGTTCATGTTAGTTGGACATGAGTTACCATCTGTTT>3690
G1_A01 349<GGCGCCTGGTCAGAGGTGCCCTTTGTCTATGGGAATAAATGTGGATGGTGTGCGCTAGACGCCTGGTTCATGTTAGTTGGACATGAGTTACCATCTGTTT<250
G2_B01 549>GGCGCCTGGTCAGAGGTGCCCTTTGTCTATGGGAATAAATGTGGATGGTGTGCGCTAGACGCCTGGTTCATGTTAGTTGGACATGAGTTACCATCTGTTT>648
M1_C01 343<GGCGCCTGGTCAGAGGTGCCCTTTGTCTATGGGAATAAATGTGGATGGTGTGCGCTAGACGCCTGGTTCATGTTAGTTGGACATGAGTTACCATCTGTTT<244
M2_D01 550>GGCGCCTGGTCAGAGGTGCCCTTTGTCTATGGGAATAAATGTGGATGGTGTGCGCTAGACGCCTGGTTCATGTTAGTTGGACATGAGTTACCATCTGTTT>649
V1_E01 338<GGCGCCTGGTCAGAGGTGCCCTTTGTCTATGGGAATAAATGTGGATGGTGTGCGCTAGACGCCTGGTTCATGTTAGTTGGACATGAGTTACCATCTGTTT<239
V2_F01 556>GGCGCCTGGTCAGAGGTGCCCTTTGTCTATGGGAATAAATGTGGATGGTGTGCGCTAGACGCCTGGTTCATGTTAGTTGGACATGAGTTACCATCTGTTT>655

```

Joonis 20. Joondus kõikide sortide GAPDH geeni praimerite proovide ja referentsiga.

2.3.2.2.3. SIP2;1

Joonisel 21 kujutatud võrdlusest ilmneb, et kõik erisused esinevad vaid 'Golden Promise' SIP2;1 päripidi praimeriga proovis G_10.1_C11, ehk tõenäoliselt on tegemist sekveneerimisvigadega

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
SIP2;1 3796>CGATTTTACATGCATGCATT-C-TTGG-TTGTCTC-AAAGATGTTGCATTGATGCTATCGAATACTTTTTTTT--CGAGAAAACGC-AAAGAGTTGCG>3888
G_10.1_C11 720<CGATTTTACATGCATGCATT-C-TTGG-TTGTCTC-AAAGATGTTGCATTGATGCTATCGAATACTTTTTTTT--CGAGAAAACGC-AAAGAGTTGCG>621
G_10.2_D11 306>CGATTTTACATGCATGCATT-C-TTGG-TTGTCTC-AAAGATGTTGCATTGATGCTATCGAATACTTTTTTTT--CGAGAAAACGC-AAAGAGTTGCG>398

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
SIP2;1 3889>TTTCTTTGTATTGAAAAGAAGGGG-AATTACAGCCTCCTAAGAGGTGGTTACAGCAGGTTGACAGATGTTCACTGCTAGCAAATAACTATCAAACCTTAGT>3987
G_10.1_C11 620<TTTCTTTGTATTGAAAAGAAGGGG-AATTACAGCCTCCTAAGAGGTGGTTACAGCAGGTTGACAGATGTTCACTGCTAGCAAATAACTATCAAACCTTAGT>521
G_10.2_D11 399>TTTCTTTGTATTGAAAAGAAGGGG-AATTACAGCCTCCTAAGAGGTGGTTACAGCAGGTTGACAGATGTTCACTGCTAGCAAATAACTATCAAACCTTAGT>497

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
SIP2;1 3988>GATAAACCATAAAAGCATTTTTATTACAGTAGAGTAACACCTAACATGCATTTTAGCTTGCTACATCTAATTCTTGAGATTGCATTTTCAGTTATGTAA>4087
G_10.1_C11 520<GATAAACCATAAAAGCATTTTTATTACAGTAGAGTAACACCTAACATGCATTTTAGCTTGCTACATCTAATTCTTGAGATTGCATTTTCAGTTATGTAA>421
G_10.2_D11 498>GATAAACCATAAAAGCATTTTTATTACAGTAGAGTAACACCTAACATGCATTTTAGCTTGCTACATCTAATTCTTGAGATTGCATTTTCAGTTATGTAA>597
```

Joonis 21. Erisused 'Golden Promise' SIP2;1 geeni praimeritega proovide ja referentsi vahel.

Joonisel 22 kujutatud joondusest on näha, et kuigi 'Golden Promise' äraspidi praimeriga proovi järjestustes esineb teatud erisusi (Joonis 21), on olemasolevate andmete põhjal olemas arvestatava pikkusega regioone kõikidele sortidele sobivate qPCR-i praimerite disainimiseks.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
SIP2;1 3795>ACGATTTTACATGCATGCATT-C-TTGG-TTGTCTC-AAAGATGTTGCATTGATGCTATCGAATACTTTTTTTT--CGAGAAAACGC-AAAGAGTTGCG>3887
M_8F_G07 305>ACGATTTTACATGCATGCATT-C-TTGG-TTGTCTC-AAAGATGTTGCATTGATGCTATCGAATACTTTTTTTT--CGAGAAAACGC-AAAGAGTTGCG>397
M_8R_F07 818<ACGATTTTACATGCATGCATT-C-TTGG-TTGTCTC-AAAGATGTTGCATTGATGCTATCGAATACTTTTTTTT--CGAGAAAACGC-AAAGAGTTGCG>726
G_10.1_C11 721<ACGATTTTACATGCATGCATT-C-TTGG-TTGTCTC-AAAGATGTTGCATTGATGCTATCGAATACTTTTTTTT--CGAGAAAACGC-AAAGAGTTGCG>622
G_10.2_D11 305>ACGATTTTACATGCATGCATT-C-TTGG-TTGTCTC-AAAGATGTTGCATTGATGCTATCGAATACTTTTTTTT--CGAGAAAACGC-AAAGAGTTGCG>397
V_10.1_G07 816<ACGATTTTACATGCATGCATT-C-TTGG-TTGTCTC-AAAGATGTTGCATTGATGCTATCGAATACTTTTTTTT--CGAGAAAACGC-AAAGAGTTGCG>724
V_10.2_H07 311>ACGATTTTACATGCATGCATT-C-TTGG-TTGTCTC-AAAGATGTTGCATTGATGCTATCGAATACTTTTTTTT--CGAGAAAACGC-AAAGAGTTGCG>403

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
SIP2;1 3888>GTTTCTTTGTATTGAAAAGAAGGGG-AATTACAGCCTCCTAAGAGGTGGTTACAGCAGGTTGACAGATGTTCACTGCTAGCAAATAACTATCAAACCTTAG>3986
M_8F_G07 398>GTTTCTTTGTATTGAAAAGAAGGGG-AATTACAGCCTCCTAAGAGGTGGTTACAGCAGGTTGACAGATGTTCACTGCTAGCAAATAACTATCAAACCTTAG>496
M_8R_F07 725<GTTTCTTTGTATTGAAAAGAAGGGG-AATTACAGCCTCCTAAGAGGTGGTTACAGCAGGTTGACAGATGTTCACTGCTAGCAAATAACTATCAAACCTTAG>627
G_10.1_C11 621<GTTTCTTTGTATTGAAAAGAAGGGG-AATTACAGCCTCCTAAGAGGTGGTTACAGCAGGTTGACAGATGTTCACTGCTAGCAAATAACTATCAAACCTTAG>522
G_10.2_D11 398>GTTTCTTTGTATTGAAAAGAAGGGG-AATTACAGCCTCCTAAGAGGTGGTTACAGCAGGTTGACAGATGTTCACTGCTAGCAAATAACTATCAAACCTTAG>496
V_10.1_G07 723<GTTTCTTTGTATTGAAAAGAAGGGG-AATTACAGCCTCCTAAGAGGTGGTTACAGCAGGTTGACAGATGTTCACTGCTAGCAAATAACTATCAAACCTTAG>625
V_10.2_H07 404>GTTTCTTTGTATTGAAAAGAAGGGG-AATTACAGCCTCCTAAGAGGTGGTTACAGCAGGTTGACAGATGTTCACTGCTAGCAAATAACTATCAAACCTTAG>502

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
SIP2;1 3987>TGATAAACCATAAAAGCATTTTTATTACAGTAGAGTAACACCTAACATGCATTTTAGCTTGCTACATCTAATTCTTGAGATTGCATTTTCAGTTATGTAA>4086
M_8F_G07 497>TGATAAACCATAAAAGCATTTTTATTACAGTAGAGTAACACCTAACATGCATTTTAGCTTGCTACATCTAATTCTTGAGATTGCATTTTCAGTTATGTAA>596
M_8R_F07 626<TGATAAACCATAAAAGCATTTTTATTACAGTAGAGTAACACCTAACATGCATTTTAGCTTGCTACATCTAATTCTTGAGATTGCATTTTCAGTTATGTAA>527
G_10.1_C11 521<TGATAAACCATAAAAGCATTTTTATTACAGTAGAGTAACACCTAACATGCATTTTAGCTTGCTACATCTAATTCTTGAGATTGCATTTTCAGTTATGTAA>422
G_10.2_D11 497>TGATAAACCATAAAAGCATTTTTATTACAGTAGAGTAACACCTAACATGCATTTTAGCTTGCTACATCTAATTCTTGAGATTGCATTTTCAGTTATGTAA>596
V_10.1_G07 624<TGATAAACCATAAAAGCATTTTTATTACAGTAGAGTAACACCTAACATGCATTTTAGCTTGCTACATCTAATTCTTGAGATTGCATTTTCAGTTATGTAA>525
V_10.2_H07 503>TGATAAACCATAAAAGCATTTTTATTACAGTAGAGTAACACCTAACATGCATTTTAGCTTGCTACATCTAATTCTTGAGATTGCATTTTCAGTTATGTAA>602
```

Joonis 22. Joondus kõikide sortide SIP2;1 geeni praimeritega proovide ja referentsiga.

2.3.2.2.4. UPL7

Joonisel 23 kujutatud järjestuste võrdlusest ilmneb, et esimene lisa-T ja hilisem lünk (*gap*) esinevad ainult äraspidi praimeriga järjestuses M_7R_D07, mistõttu võib eeldada, et tegemist on sekveneerimisvigadega. Ülejäänud erisused, mis kahe järjestuse vahel kattuvad, on tõenäoliselt 'Marta' UPL 7 geenijärjestuses päriselt esinevad muutused.

```

      *      *      *      *      *      *      *
UPL7  9501>CCCTT-ATCAAACTGGAAATATAAAATATAAGAAAAAGTAGACAGGCGTTTCAGGAAATATTTCTCTGATGTATAGTTTGGTAGTACCCATGTTATT>9599
M_7F_E07 154>CCCTT-ATCAAACTGGAAATATAAAATATAAGAAAAAGTAGACAGGCGTTTCAGGAAATATTTCTCTGATGTATAGTTTGGTAGTACCCATGTTATT>252
M_7R_D07 873>CCCTT-ATCAAACTGGAAATATAAAATATAAGAAAAAGTAGACAGGCGTTTCAGGAAATATTTCTCTGATGTATAGTTTGGTAGTACCCATGTTATT>774

      *      *      *      *      *      *      *
UPL7  9600>GCTGTCATACCACACGTCCTATGCTATTAGCTCGTGACTCTTTTCTTTTGTGCTAACAAATGGTAACGCGGTGAATATATGATGGGCATGTTTGTGCTG>9699
M_7F_E07 253>GCTGTCATACCACACGTCCTATGCTATTAGCTCGTGACTCTTTTCTTTTGTGCTAACAAATGGTAACGCGGTGAATATATGATGGGCATGTTTGTGCTG>352
M_7R_D07 773>GCTGTCATACCACACGTCCTATGCTATTAGCTCGTGACTCTTTTCTTTTGTGCTAACAAATGGTAACGCGGTGAATATATGATGGGCATGTTTGTGCTG>675

```

Joonis 23. Erisused 'Marta' UPL7 geeni praimeritega proovide ja referentsi vahel.

Joonisel 24 kujutatud joondusest on näha, et kuigi 'Marta' järjestustes esineb teatud erisusi (Joonis 23), leidub olemasolevate andmete põhjal arvestatava pikkusega regioone kõikidele sortidele sobivate qPCR-i praimerite disainimiseks.

```

      *      *      *      *      *      *      *
UPL7  9598>TTGCTGTCATACCACACGTCCTATGCTATTAGCTCGTGACTCTTTTCTTTTGTGCTAACAAATGGTAACGCGGTGAATATATGATGGGCATGTTTTCG>9697
G_7.1_E10 759<TTGCTGTCATACCACACGTCCTATGCTATTAGCTCGTGACTCTTTTCTTTTGTGCTAACAAATGGTAACGCGGTGAATATATGATGGGCATGTTTTCG>660
G_7.2_F10 260<TTGCTGTCATACCACACGTCCTATGCTATTAGCTCGTGACTCTTTTCTTTTGTGCTAACAAATGGTAACGCGGTGAATATATGATGGGCATGTTTTCG>359
V_7.1_E07 757<TTGCTGTCATACCACACGTCCTATGCTATTAGCTCGTGACTCTTTTCTTTTGTGCTAACAAATGGTAACGCGGTGAATATATGATGGGCATGTTTTCG>658
V_7.2_F07 248<TTGCTGTCATACCACACGTCCTATGCTATTAGCTCGTGACTCTTTTCTTTTGTGCTAACAAATGGTAACGCGGTGAATATATGATGGGCATGTTTTCG>347
M_7F_E07 251<TTGCTGTCATACCACACGTCCTATGCTATTAGCTCGTGACTCTTTTCTTTTGTGCTAACAAATGGTAACGCGGTGAATATATGATGGGCATGTTTTCG>350
M_7R_D07 775<TTGCTGTCATACCACACGTCCTATGCTATTAGCTCGTGACTCTTTTCTTTTGTGCTAACAAATGGTAACGCGGTGAATATATGATGGGCATGTTTTCG>677

      *      *      *      *      *      *      *
UPL7  9698>TGCCACCACGTTGGCATGCAAAACACACACCACTCTGGTCTAGCTAAATAAATACCTGTTTGGCCGACCAACTGCAATGCAAAATATAACATCTTACCATG>9797
G_7.1_E10 659<TGCCACCACGTTGGCATGCAAAACACACACCACTCTGGTCTAGCTAAATAAATACCTGTTTGGCCGACCAACTGCAATGCAAAATATAACATCTTACCATG>560
G_7.2_F10 360<TGCCACCACGTTGGCATGCAAAACACACACCACTCTGGTCTAGCTAAATAAATACCTGTTTGGCCGACCAACTGCAATGCAAAATATAACATCTTACCATG>459
V_7.1_E07 657<TGCCACCACGTTGGCATGCAAAACACACACCACTCTGGTCTAGCTAAATAAATACCTGTTTGGCCGACCAACTGCAATGCAAAATATAACATCTTACCATG>558
V_7.2_F07 348<TGCCACCACGTTGGCATGCAAAACACACACCACTCTGGTCTAGCTAAATAAATACCTGTTTGGCCGACCAACTGCAATGCAAAATATAACATCTTACCATG>447
M_7F_E07 351<TGCCACCACGTTGGCATGCAAAACACACACCACTCTGGTCTAGCTAAATAAATACCTGTTTGGCCGACCAACTGCAATGCAAAATATAACATCTTACCATG>450
M_7R_D07 676<TGCCACCACGTTGGCATGCAAAACACACACCACTCTGGTCTAGCTAAATAAATACCTGTTTGGCCGACCAACTGCAATGCAAAATATAACATCTTACCATG>577

      *      *      *      *      *      *      *
UPL7  9798>CTGAATTGAAACGGTCGTAACAGCGGTGTCAAGCACTGGAATATGCAGGTTATCAAAGGGTTTAAGCCGACAGAGCGCTGCCTGCTACTGAAGTTTGTGAC>9897
G_7.1_E10 559<CTGAATTGAAACGGTCGTAACAGCGGTGTCAAGCACTGGAATATGCAGGTTATCAAAGGGTTTAAGCCGACAGAGCGCTGCCTGCTACTGAAGTTTGTGAC>460
G_7.2_F10 460<CTGAATTGAAACGGTCGTAACAGCGGTGTCAAGCACTGGAATATGCAGGTTATCAAAGGGTTTAAGCCGACAGAGCGCTGCCTGCTACTGAAGTTTGTGAC>559
V_7.1_E07 557<CTGAATTGAAACGGTCGTAACAGCGGTGTCAAGCACTGGAATATGCAGGTTATCAAAGGGTTTAAGCCGACAGAGCGCTGCCTGCTACTGAAGTTTGTGAC>458
V_7.2_F07 448<CTGAATTGAAACGGTCGTAACAGCGGTGTCAAGCACTGGAATATGCAGGTTATCAAAGGGTTTAAGCCGACAGAGCGCTGCCTGCTACTGAAGTTTGTGAC>547
M_7F_E07 451<CTGAATTGAAACGGTCGTAACAGCGGTGTCAAGCACTGGAATATGCAGGTTATCAAAGGGTTTAAGCCGACAGAGCGCTGCCTGCTACTGAAGTTTGTGAC>550
M_7R_D07 576<CTGAATTGAAACGGTCGTAACAGCGGTGTCAAGCACTGGAATATGCAGGTTATCAAAGGGTTTAAGCCGACAGAGCGCTGCCTGCTACTGAAGTTTGTGAC>477

```

Joonis 24. Joondus kõikide sortide UPL7 geeni praimerite ja referentsiga.

2.4. ARUTELU

Töös uuriti kolme odrasordi ('Golden Promise', 'Vanille' ja 'Marta') akvaporiiinide geenide lõpuosa järjestusi, et leida järjestuse piirkondi, mis oleksid sobilikud kõikidele sortidele sobivate qPCR-i praimerite disainimiseks. Töö tulemuste põhjal on tulevikus võimalik uurida, kas ja kuidas mõjutab madal õhuniiskus akvaporiiinide geeniekspressiooni ning seeläbi ka veevahetust.

2.4.1. Akvaporiiinide geenide uurimise olulisus

Erinevate sortide uurimine ja võrdlemine on oluline, kuna akvaporiiinide ekspressioonis, näiteks stressitingimuste kontekstis, võib odra puhul nende vahel olla märkimisväärsed erinevusi (Hove *et al.*, 2015). Selleks aga, et tulevastel katsetel uurimust edasi viia, on vajalik leida praimerid, mis töötaksid kõikide uuritavate sortide puhul ning sellele antud töös ka keskenduti.

Uuritavaid geene oli töös 11: 7 akvaporiiini ja 4 referentsgeeni qPCR-i jaoks. Akvaporiiinidest olid enim esindatud PIP-perekonna valke kodeerivad geenid, mida võib seostada sellega, et just neid leidub taimedes teistest rohkem ning ühtlasi on need ka rakkudevahelises veetranspordis võtmetähtsusega (Gupta ja Sankararamakrishnan, 2009; Kapilan *et al.*, 2018; Yaneff *et al.*, 2014). Samuti on arvatud, et just PIP-ide uurimine võib olla eriliselt oluline ka parema stressitaluvusega põllukultuuride arendamisel (Kumar *et al.*, 2018).

2.4.2. Metoodilised väljakutsed odra geenide analüüsil

PCR-analüüsi käigus selgus, et ühe geeni (TIP1;1) fragmentide paljundamiseks valitud praimerid sobilikud ei olnud, kuna amplifikatsiooni ei toimunud ühegi sordi korral. Negatiivne tulemus võib olla seotud mitmete aspektidega. Kuna PCR-e viidi läbi piiratud valiku seondumistemperatuuridega, võib produktide saamiseks piisata reaktsioonitingimuste optimeerimisest. Praimeritega seonduvalt võib probleemiks olla asjaolu, et referentsjärjestused olid loodud sordiga 'Morex', millest tulenevalt võivad erinevused sortide järjestuste vahel olla väga suured ning referentssordi põhjal loodud praimeritega uuritavate sortide puhul amplifikatsiooni ei toimu.

60-st potentsiaalsest sekventsist 18 ei olnud piisavalt kvaliteetsed, et neid edasistes analüüsides käsitleda. Järjestuste puhul, mis olid oodatust (keskmiselt 900 nb) oluliselt pikemad (valdavalt 1300-1500 nb), on võimalik, et probleemiks võisid olla praimerid, mille seondumine ei olnud potentsiaalselt piisavalt spetsiifilised, amplifitseerides lisaks vajalikule ka ebavajalikku. Liialt

lühikeste (300-500 nb) ja/või vigaderohkete järjestuste puhul on variantideks näiteks produktide ebaefektiivne puhastamine, mistõttu sinna oli lisaks uuritavale DNA-le jäänud sisse muid osakesi, või ka sekvenaatori töö käigus tekkida võivad vead.

16 proovi puhul oli kattuvus saadud sekventsiga ja referentsjärjestuse vahel täielik ning erisusi ei leidunud. Nende jaotus oli sortide vahel üsna võrdne: 'Golden Promise' ja 'Vanille' puhul viis ning 'Marta' puhul kuus järjestust. Ometi ei suudetud antud katsetega tuvastada ühegi geeni praimerivariante, mille puhul kõikide odrasortide järjestused oleksid täielikult kattunud referentsgenoomi omaga. Teatud määral oli erisuste esinemine ootuspärane, kuna referentsgenoomid olid leitud sordi 'Morex' põhjal. Täielike kattuvuste saamine ei olnud seatud ka eraldi eesmärgiks, kuna sortidevaheline geneetiline varieeruvus võib põhjustada üksikuid nukleotiidseid varieeruvusi, mida tõestas ka see, et valdavalt olid saadud sekventsides ja referentsgenoomi vahel täheldatud erisused päri- ja äraspidi praimeritega proovide järjestustes kattuvad.

2.4.3. Tulemuste hinnang ja järeldused

Saadud tulemuste põhjal oli võimalik uuritud geenid jagada mitmesse rühma sõltuvalt sellest, kui perspektiivseks osutus nende kasutamine qPCR-i praimerite disainimiseks.

Praimerid, mida kasutati seitsme geeni (PIP1;1, PIP1;3, PIP2;2, EF-1, GADPH, SIP2;1 ja UPL7) fragmentide amplifitseerimiseks, andsid järjestused, mille põhjal kõikidele sortidele sobivate qPCR-i praimerite disainimine on tõenäoliselt võimalik. Kahe geeni (PIP2;1 ja PIP2;5) puhul kasutatud praimeritega saadud järjestused võiksid samuti edasiste praimerite disainiks sobida, aga võivad vajada veel katsetusi, kuna kõiki sekventse ei olnud madala kvaliteedi tõttu võimalik joondada. TIP1;2 vajab täiendavat uurimist, kuna vaatamata PCR-i käigus toimunud amplifikatsioonile ei õnnestunud ühegi sordi puhul saada arvestatavaid järjestusi.

Akvaporiinide uurimine on märkimisväärse tähtsusega taimede veevahetuse regulatsioonis, stressireaktsioonide tundma õppimises ja nende vastupidavuse parandamises. PIP-id on kanalid, mis suudavad end vee säilitamise nimel, näiteks madala õhuniiskuse tõttu kasvava transpiratsioonimäära puhul, ka mehaaniliselt sulgeda ja TIP-id need, mis hoiavad taimerakkudes ka veekao puhul turgorit (Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006; Safdar *et al.*, 2018).

Antud töö loob aluse edasisteks uuringuteks, et selgitada akvaporiinide regulatsiooni erinevates odrasortides ning selle mõjutatust madalast õhuniiskusest.

KOKKUVÕTE

Käesolevas bakalaureusetöös keskenduti 11 geeni, eelkõige akvaporinide, fragmentide paljundamisele PCR-iga, nende produktide sekveneerimisele ja saadud järjestuste analüüsimisele. Tulemustega püüti hinnata, kas kõigi uuritavate odrasortide ('Golden Promise', 'Vanille' ja 'Marta') jaoks on võimalik disainida ühised praimerid geeniekspressiooni analüüsiks.

Ühe geeni puhul ei leitud sobivaid primereid geenifragmentide PCR-iga paljundamiseks, mistõttu ei olnud neid võimalik ka sekveneerida.

Kõik saadud sekventsidsid ei andnud arvestatava kvaliteediga tulemust. Selle hindamiseks võrreldi neid referentsgenoomide järjestustega ning sellised, kus kattuvus oli väike (nt lühikesed ja/või erisusterohked järjestused), jäeti edasisest analüüsist välja.

Seitsme geeni puhul jõuti järeldusele, et kõikide uuritavate sortide jaoks sobivate qPCR-i praimerite disainimine võiks olla võimalik. Kahe geeni puhul leiti, et ühiste praimerite disainimine erinevatele sortidele võib olla võimalik, aga usaldusväärse hinnangu andmiseks tuleks teha täiendavaid katseid teatud proovide sekveneerimise ebaõnnestumise tõttu. Ühe geeni puhul on vaja läbi viia täiendavaid katseid, kuna kuigi kõikide sortide PCR-id toimisid, olid kõikide puhul saadud järjestused referentsiga võrdlemiseks liiga halva kvaliteediga.

Katsed valitud odrasortide ja geenidega jätkuvad, et uurida madala õhuniiskuse mõju kolme odrasordi veevahetusele ja õhulõhetunnustele. Edasiste eksperimentide eesmärgiks on välja selgitada, kas ja kuidas madal õhuniiskus akvaporinide geeniekspressiooni mõjutab.

RESÜMEE

The role of aquaporins in plant water relations, and partial sequencing of their encoding genes in three barley (*Hordeum vulgare*) varieties

Raili Randmäe

Summary

Plant water relations is one of the most necessary processes for a plant to thrive, in which excess water is released by stomata into the atmosphere, causing a loss of it that is balanced by continuously taking in additional water from the soil through roots (Passioura, 2010; Suslov, 2025). It can be divided into three phases: absorbing water through roots, transporting it through the plant's parts and releasing it through transpiration (Chary and Reddy, 2004). Aquaporins, also known as water channels, are transmembrane pore-forming proteins that are important for plant water relations as well as helping plants withstand different conditions better (Gautam and Pandey, 2021; Maurel *et al.*, 2015). They can be divided into a total of eight subfamilies based on their sequence and location: plasma membrane intrinsic proteins (PIPs), tonoplast intrinsic proteins (TIPs), nodulin intrinsic proteins (NIPs), small basic intrinsic proteins (SIPs), X intrinsic proteins (XIPs), GlpF-like intrinsic proteins (GIPs), hybrid intrinsic proteins (HIPs) and large intrinsic proteins (LIPs) (Chaumont *et al.*, 2000; Hussain *et al.*, 2020). The last three subfamilies have only been identified in lower plants such as algae and mosses. Most of the aquaporin genes studied in this thesis belong to the PIP subfamily as they have been found to be the most abundant in plants and also play a big part in water transport through cells (Gupta and Sankararamakrishnan, 2009; Kapilan *et al.*, 2018; Yaneff *et al.*, 2014).

The aim of this bachelor's thesis was to analyse sequences of aquaporin gene fragments by PCR and sequencing in three barley varieties (*Hordeum vulgare* L. 'Golden Promise', *Hordeum vulgare* L. 'Vanille' and *Hordeum vulgare* L. 'Marta') to assess whether or not qPCR primers suitable for gene expression analysis in all varieties could be designed based on those sequences.

To determine the results, barley plants of all three varieties were grown, and genomic DNA was extracted from them. That DNA was used to run PCRs, and the products that showed successful amplification through gel electrophoresis were purified. Sequencing mixtures made with the purified products and the primers used were sent to University of Tartu's Core Facility of Genomics where they were sequenced. Those sequences were analysed by aligning them with the respective

gene sequence of barley reference genome to determine if the sequencing was successful and if the sequences could be used for designing primers for qPCR.

The results showed that the primers used for one of the studied genes, TIP1;1, were not suitable to amplify their fragments through PCR despite multiple attempts with different program settings and primer sequences. Hence, sequencing was not possible for those genes, and further research is needed.

Out of the 66 potential sequences, 18 did not give a good-quality result. That was determined by aligning them with respective reference sequences and the ones that were either too short (usually around 300-500 nucleotide bases) or had many mismatches with the reference were excluded from further analysis.

The primers used for seven genes, PIP1;1, PIP1;3, PIP2;2, EF-1, GADPH, SIP2;1, and UPL7, were determined to have produced sequences with a high likelihood of successful qPCR primer design based on them. The primers used for two genes, PIP2;1 and PIP2;5, produced sequences that could possibly be successfully used to design qPCR primers but might need additional testing due to some lower quality, and thus, excluded sequences. The primers for one gene, TIP1;2, need further research as the PCRs were successful with all three of the barley varieties but none of them gave an acceptable sequencing result.

TÄNUSÕNAD

Esmalt sooviksin tänada oma juhendajaid, PhD Eele Õunapuu-Pikast ja professor, PhD Hanna Hõrakut. Nende tugi, kannatlikkus ja nõuanded on minu jaoks terve tööprotsessi jooksul olnud hindamatu väärtusega ning mind tohutult arendanud.

Samuti olen tänulik kõikidele TÜ tehnoloogiainstituudi usinatele ja toredatele inimestele, kes mulle laboris nii nõu kui jõuga abiks olid.

Viimaks läheb minu siiras tänu mu perele ja lähedastele, kes mind innustasid ning raskematel momentidel edasi liikuda aitasid, lõpetamata hetkekski minusse uskumist ja lubamata seda teha ka minul endal.

Seda tööd ei oleks olemas ilma teie kõigita. Aitäh!

KASUTATUD KIRJANDUS

- Aroca, R., Amodeo, G., Fernández-Illescas, S., Herman, E. M., Chaumont, F., Chrispeels, M. J. (2005). The Role of Aquaporins and Membrane Damage in Chilling and Hydrogen Peroxide Induced Changes in the Hydraulic Conductance of Maize Roots. *Plant Physiology*, 137(1), 341-353. <https://doi.org/10.1104/pp.104.051045>
- Ayadi, M., Brini, F., Masmoudi, K. (2019). Overexpression of a Wheat Aquaporin Gene, *TdPIP2;1*, Enhances Salt and Drought Tolerance in Transgenic Durum Wheat cv. Maali. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10). <https://doi.org/10.3390/ijms20102389>
- Barbour, M. M., Farquhar, G. D., Buckley, T. N. (2017). Leaf water stable isotopes and water transport outside the xylem. *Plant, Cell and Environment*, 40, 914-920. <https://doi.org/10.1111/pce.12845>
- Bienert, M. D., Diehn, T. A., Richet, N., Chaumont, F., Bienert, G. P. (2018). Heterotetramerization of Plant PIP1 and PIP2 Aquaporins Is an Evolutionary Ancient Feature to Guide PIP1 Plasma Membrane Localization and Function. *Frontiers in Plant Science*, 9(382). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00382>
- Bots, M., Feron, R., Uehlein, N., Weterings, K., Kaldenhoff, R., Mariani, T. (2004). PIP1 and PIP2 aquaporins are differentially expressed during tobacco anther and stigma development. *Journal of Experimental Botany*, 56(409), 113-121. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri009>
- Boursiac, Y., Chen, S., Lu, D.-T., Sorieul, M., van den Dries, N., Maurel, C. (2005). Early Effects of Salinity on Water Transport in Arabidopsis Roots. Molecular and Cellular Features of Aquaporin Expression. *Plant Physiology*, 132(2), 790-805. <https://doi.org/10.1104/pp.105.065029>
- Caemmerer, S., Baker, N. (2007). The Biology of Transpiration. From Guard Cells to Globe. *Plant Physiology*, 143(1), 3. <https://doi.org/10.1104/pp.104.900213>
- Chary, S. J., Reddy, S. M. (2004). *University botany. 3: Angiosperms, plant embryology and plant physiology*. New Age International.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Jung, R., Chrispeels, M. J. (2000). Plasma Membrane Intrinsic Proteins from Maize Cluster in Two Sequence Subgroups with Differential Aquaporin Activity. *Plant Physiology*, 122(4), 1025-1034. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1025>

Chavarria, G., Pessoa dos Santos, H. (2012). Plant Water Relations: Absorption, Transport and Control Mechanisms. *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*.
<https://doi.org/10.5772/33478>

Chen, Q., Liu, R., Wu, Y., ..., Xie, Q. (2021). ERAD-related E2 and E3 enzymes modulate the drought response by regulating the stability of PIP2 aquaporins. *The Plant Cell*, 33(8), 2883-2898. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab141>

Chinnasamy, G. P., Sundareswaran, S., Subramanian, K. S., Raja, K., Renganayaki, P. R., Marimuthu, S. (2021). Aquaporins and their implications on seeds: a brief review. *Journal of Applied and Natural Science*, 13(3), 970-980. <https://doi.org/10.31018/jans.v13i3.2830>

Li, C., Wang, W. (2017). Molecular Biology of Aquaporins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 969. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1057-0_1

Cornelis, S., Hazak, O. (2022). Understanding the root xylem plasticity for designing resilient crops. *Plant, Cell and Environment*, 45(3), 664-676. <https://doi.org/10.1111/pce.14245>

Feroun, M., Bouhraoua, S., Belahcen, D., Zouitane, I., Srhiouar, N., Louahlia, S., El Ghachtouli, N. (2024). PGPR consortia enhance growth and yield in barley cultivars subjected to severe drought stress and subsequent recovery. *Rhizosphere*, 31.
<https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2024.100926>

Fetter, K., Van Wilder, V., Moshelion, M., Chaumont, F. (2004). Interactions between Plasma Membrane Aquaporins Modulate Their Water Channel Activity. *Plant Cell*, 16(1), 215-228.
<https://doi.org/10.1105/tpc.017194>

Fleurat-Lessard, P., Michonneau, P., Maeshima, M., Drevon, J.-J., Serraj, R. (2005). The Distribution of Aquaporin Subtypes (PIP1, PIP2 and γ -TIP) is Tissue Dependent in Soybean (*Glycine max*) Root Nodules. *Annals of Botany*, 96(3), 457-460.
<https://doi.org/10.1093/aob/mci195>

Gautam, A., Pandey, A. K. (2021). Aquaporins Responses under Challenging Environmental Conditions and Abiotic Stress Tolerance in Plants. *The Botanical Review*, 87(4), 467-495.
<https://doi.org/10.1007/s12229-021-09249-z>

- Gena, P., Pellegrini-Calace, M., Biasco, A., Svelto, M., Calamita, G. (2011). Aquaporin Membrane Channels: Biophysics, Classification, Functions, and Possible Biotechnological Applications. *Food Biophysics*, 6, 241-249. <https://doi.org/10.1007/s11483-010-9193-9>
- Gupta, A. B., Sankararamakrishnan, R. (2009). Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: Characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. *BMC Plant Biology*, 9(134). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-134>
- Hetherington, A. M., Woodward, F. I. (2003). The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, 424, 901-908. <https://doi.org/10.1038/nature01843>
- Hove, R. M., Ziemann, M., Bhawe, M. (2015). Identification and Expression Analysis of the Barley (*Hordeum vulgare* L.) Aquaporin Gene Family. *PLOS One*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128025>
- Hussain, A., Tanveer, R., Mustafa, G., Farooq, M., Amin, I., Mansoor, S. (2020). Comparative phylogenetic analysis of aquaporins provides insight into the gene family expansion and evolution in plants and their role in drought tolerant and susceptible chickpea cultivars. *Genomics*, 112(1), 263-275. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.02.005>
- Jang, J. Y., Kim, D. G., Kim, Y. O., Kim, J. S., Kang, H. (2004). An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 54, 713-725. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000040900.61345.a6>
- Javot, H., Lauvergeat, V., Santoni, V., Martin-Laurent, F., Güçlü, J., Vinh, J., Heyes, J., Franck, K. I., Schäffner, A. R., Bouchez, D., Maurel, C. (2003). Role of a Single Aquaporin Isoform in Root Water Uptake. *The Plant Cell*, 15(2), 509-522. <https://doi.org/10.1105/tpc.008888>
- Johansson, I., Karlsson, M., Shukla, V. K., Chrispeels, M. J., Larsson, C., Kjellbom, P. (1998). Water Transport Activity of the Plasma Membrane Aquaporin PM28A Is Regulated by Phosphorylation. *The Plant Cell*, 10(3), 451-459. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.3.451>
- Junchao, J., Chaodong, L., Zhangyue, C. (2023). Soil Texture Rather Than Water Potential Determines the Root:Shoot Ratio in Ryegrass and Alfalfa. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 23, 1297-1305. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-01121-2>

- Kapilan, R., Vaziri, M., Zwiazek, J. J. (2018). Regulation of aquaporins in plants under stress. *Biological Research*, 51(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0152-0>
- Knipfer, T., Fricke, W. (2010). Root pressure and solute reflection coefficient close to unity exclude a purely apoplastic pathway of radial water transport in barley (*Hordeum vulgare*). *New Phytologist*, 187(1), 159-170. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03240.x>
- Krieger, L., Schymanski, S. J. (2023). A new experimental setup to measure hydraulic conductivity of plant segments. *AoB PLANTS*, 15(4). <https://doi.org/10.1093/aobpla/plad024>
- Kumar, K., Mosa, K. A., Meselhy, A. G., Dhankher, O. P. (2018). Molecular insights into the plasma membrane intrinsic proteins roles for abiotic stress and metalloids tolerance and transport in plants. *Indian Journal of Plant Physiology*, 23, 721-730. <https://doi.org/10.1007/s40502-018-0425-1>
- Krounbi, L., Lazarovitch, N. (2011). Soil Hydraulic Properties Affecting Root Water Uptake. *Encyclopedia of Agrophysics*, 748-754. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3585-1_149
- Li, G., Santoni, V., Maurel, C. (2014). Plant aquaporins: Roles in plant physiology. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, 1840(5), 1574-1582. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.004>
- Liang, W., Li, L., Zhang, F., Liu, Y., Li, M., Shi, H., Li, H., Shang, F., Lou, C., Lin, Q., Li, J., Yang, X. (2012). Effects of abiotic stress, light, phytochromes and phytohormones on the expression of *OsAQP*, a rice aquaporin gene. *Plant Growth Regulation*, 69(1), 21-27. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9743-x>
- Liao, X., Guo, X., Wang, Q., Wang, Y., Zhao, D., Yao, L., Wang, S., Liu, G., Li, T. (2017). Overexpression of *MsDREB6.2* results in cytokinin-deficient developmental phenotypes and enhances drought tolerance in transgenic apple plants. *The Plant Journal*, 89(3), 510-526. <https://doi.org/10.1111/tpj.13401>
- Lin, W., Peng, Y., Li, G., Arora, R., Tang, Z., Su, W., Cai, W. (2007). Isolation and functional characterization of PgrTIPI, a hormone-autotrophic cells-specific tonoplast aquaporin in ginseng. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 947-956. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl255>
- Liu, J.-X., Howell, S. H. (2016). Managing the protein folding demands in the endoplasmic reticulum of plants. *New Phytologist*, 211(2), 418-428. <https://doi.org/10.1111/nph.13915>

- Lovisol, C., Schubert, A. (2006). Mercury hinders recovery of shoot hydraulic conductivity during grapevine rehydration: evidence from a whole-plant approach. *New Phytologist*, 172(3), 469-478. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01852.x>
- Madrid-Espinoza, J., Brunel-Saldias, N., Guerra, F. P., Gutiérrez, A., Del Pozo, A. (2018). Genome-wide identification and transcriptional regulation of aquaporin genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) under water stress. *Genes*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/genes9100497>
- Mahdieh, M., Mostajeran, A., Horie, T., Katsuhara, M. (2008). Drought Stress Alters Water Relations and Expression of PIP-Type Aquaporin Genes in *Nicotiana tabacum* Plants. *Plant and Cell Physiology*, 49(5), 801-813. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn054>
- Maurel, C., Chrispeels, M. J. (2001). Aquaporins. A Molecular Entry into Plant Water Relations. *Plant Physiology*, 125(1), 135-138. <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.135>
- Maurel, C. (2007). Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *FEBS Letters*, 581(12), 2227-2236. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.021>
- Maurel, C., Boursiac, Y., Luu, D.-T., Santoni, V., Shahzad, Z., Verdoucq, L. (2015). Aquaporins in Plants. *Physiological Reviews*, 95(4), 1321-1358. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2015>
- Muries Bosch, B., Mom, R., Benoit, P., ..., Venisse, J.-S. (2019). Aquaporins and water control in drought-stressed poplar leaves: A glimpse into the extraxylem vascular territories. *Environmental and Experimental Botany*, 162, 25-37. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.12.016>
- Nemoto, K., Niinae, T., Goto, F., Sugiyama, N., Watanabe, A., Shimizu, M., Shiratake, K., Nishihara, M. (2022). Calcium-dependent protein kinase 16 phosphorylates and activates the aquaporin PIP2;2 to regulate reversible flower opening in *Gentiana scabra*. *The Plant Cell*, 34(7), 2652-2670. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac120>
- Nilson, S. E., Assmann, S. M. (2007). The Control of Transpiration. Insights from Arabidopsis. *Plant Physiology*, 143(1), 19-27. <https://doi.org/10.1104/pp.106.093161>
- Passioura, J. B. (2010). Plant-Water Relations. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001288.pub2>

- Preston, G. M., Carroll, T. P., Guggino, W. B., Agre, P. (1992). Appearance of Water Channels in *Xenopus* Oocytes Expressing Red Cell CHIP28 Protein. *Science*, 256(5055), 385-387. <https://doi.org/10.1126/science.256.5055.385>
- Safdar, T., Tahir, M. H. N., Ali, Z., Ur Rahman, M. H. (2023). Exploring the role of HaTIPs genes in enhancing drought tolerance in sunflower. *Molecular Biology Reports*, 50(10), 8349-8359. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08679-9>
- Salvatierra, A., Mateluna, P., Toro, G., Solis, S., Pimentel, P. (2023). Genome-Wide Identification and Gene Expression Analysis of Sweet Cherry Aquaporins (*Prunus avium* L.) under Abiotic Stresses. *Genes*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/genes14040940>
- Scharwies, J. D., Dinneny, J. R. (2019). Water transport, perception, and response in plants. *Journal of Plant Research*, 132(3). <https://doi.org/10.1007/s10265-019-01089-8>
- Siemens, J. A., Zwiazek, J. J. (2003). Effects of water deficit stress and recovery on the root water relations of trembling aspen (*Populus tremuloides*) seedlings. *Plant Science*, 165(1), 113-120. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00149-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00149-3)
- Suslov, M. (2025). The Dynamics of Cell-to-Cell Water Transport and the Involvement of Aquaporins in Response to Apoplast Blockage in the Roots of Intact Maize Plants. *Cells*, 14(12), 902. <https://doi.org/10.3390/cells14120902>
- Zhang, P., Liu, F., Abdelrahman, M., Song, Q., Wu, F., Li, R., Wu, M., Herrera-Estrella, L., Phan Tran, L.-S., Xu, J. (2024). ARR1 and ARR12 modulate arsenite toxicity responses in *Arabidopsis* roots by transcriptionally controlling the actions of *NIP1;1* and *NIP6;1*. *The Plant Journal*, 120(4), 1536-1551. <https://doi.org/10.1111/tpj.17065>
- Zhang, J.-H., Gao, J., Wang, N., Yan, Y.-G., Zhang, G., Chen, Y., Zhang, M.-Y. (2025). Exogenous Melatonin Impacts Antioxidant Levels, Photosynthesis, and Aquaporin Genes in Drought-Stressed Licorice Induced by Polyethylene Glycol (PEG) 6000. *Russian Journal of Plant Physiology*, 72(5), 179. <https://doi.org/10.1134/S1021443725602939>

Takamatsu, T., Watanabe, M., Koshikawa, M. K. (2023). Convenient Sampling of Xylem Sap from Adult Tree Trunks and Analysis of Its Components. *Forests*, 14(2).

<https://doi.org/10.3390/f14020389>

The Economist Group (2022). Global Food Security Index 2022. *Economist Impact*.

https://impact.economist.com/sustainability/project/food-security-index/resources/Economist_Impact_GFSI_2022_Global_Report_Sep_2022.pdf

Törnroth-Horsefield, S., Wang, Y., Hedfak, K., Johanson, U., Karlsson, M., Tajkhorshid, E., Neutze, R., Kjellbom, P. (2006). Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature*, 439, 688-694. <https://doi.org/10.1038/nature04316>

Van de Wal, B. A. E., Windt, C. W., Leroux, O., Steppe, K. (2017). Heat girdling does not affect xylem integrity: an *in vivo* magnetic resonance imaging study in the tomato peduncle. *New Phytologist*, 215(2), 558-568. <https://doi.org/10.1111/nph.14610>

Vilakar, K., Sridhar, R., Arun, C. K. 2025. Water Relations and Transport Mechanisms in Plants, p. 36-55. In C. Behera, P. Dogra, G.-A. Prasath, P. Vijaykumar, S. G. Shinde (ed.), *Plant Science and Agriculture: Integrative Approaches for Crop Growth and Development*. Stella International Publication, Kurukshetra

Yan eff, A., Sigaut, L., Marques, M., Alle va, K., Pietrasanta, L. I., Amodeo, G. (2014).

Heteromerization of PIP aquaporins affects their intrinsic permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1), 231-236.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1316537111>

Yan eff, A., Sigaut, L., Gómez, N., Fandiño, C. A., Alle va, K., Pietrasanta, L. I., Amodeo, G.

(2016). Loop B serine of a plasma membrane aquaporin type PIP2 but not PIP1 plays a key role in pH sensing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1858(11), 2778-2787.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.08.002>

Yang, C., Medison, M. B., Li, Y., Shi, Y., Medison, R. G., Liu, H., Wang, Y. (2026).

Transcriptional and post-translational regulation of aquaporins in plants. *Stress Biology*, 6(27).

<https://doi.org/10.1007/s44154-026-00301-9>

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Eestikeelsete taimenimede andmebaas. Kasutatud 24.05.2026 <https://taimenimed.ut.ee>

LISAD

LISA 1. Töös kasutatud esialgsed praimerid.

Praimeri nimetus	Praimeri järjestus	Sulamistemperatuur	
HvEF-1-seq-for	5'-CTC GAA GGC CCG TTA TGA GG-3'	57,6°C	+
HvEF-1-seq-rev	5'-CAA GAC CAT TCA GGC AAT ACC AAC-3'	56,4°C	+
HvGADPH-seq-for	5'-TGT GGA TGT GTC AGT TGT TGA TC-3'	55,3°C	+
HvGADPH-seq-rev	5'-CGT TCT TAT ATT ATG GGA CGG GAG-3'	54,7°C	+
HvPIP1;1-seq-for	5'-CAT CGG GTT CGC CGT GTT CC-3'	61,3°C	+
HvPIP1;1-seq-rev	5'-CGA CCC AAC AGT TTC CCT CGA G-3'	59,8°C	+
HvPIP1;3-seq-for	5'-GTC TTC TAC ATC GTG ATG CAG TGC-3'	57,8°C	+
HvPIP1;3-seq-rev	5'-CGT CAA TTA ATT CGA TCG TCG TCC C-3'	57,7°C	+
HvPIP2;1-seq-for	5'-CTG TCA TCT ACA ACA CTG ACA AGG-3'	55,3°C	-
HvPIP2;1-seq-rev	5'-GAA TGG ATG CAG TAG ATC TTA AAC GG-3'	55,6°C	-
HvPIP2;2-seq-for	5'-CAT GAT CTT CGT CCT AGT CTA CTG C-3'	56,4°C	+
HvPIP2;2-seq-rev	5'-GAC AAA GAC AAG CCA TAC ATG CAT AC-3'	56,4°C	+
HvPIP2;5-seq-for	5'-GTG TCT TCC TTT CTT CAG GTG TTG-3'	55,9°C	!
HvPIP2;5-seq-rev	5'-GTC GTA ATG AAA AAG ACA TGC AAC AC-3'	55,3°C	!
HvSIP2;1-seq-for	5'-CTG GAG GAA TTA TGA ACC CTG CAT C-3'	57,5°C	+
HvSIP2;1-seq-rev	5'-GCA GGA TCA CAA AAT TGT CG-3'	57,1°C	+
HvTIP1;1-seq-for	5'-AGG GTT TGA TTG ATT TGA TAC AGG C-3'	55,7°C	-
HvTIP1;1-seq-rev	5'-CGA GAA TGC AAG TTT CTA GAG ATC C-3'	55,3°C	-
HvTIP1;2-seq-for	5'-GAG TTC ATA TCC ATG CTC ATC TTC G-3'	55,4°C	+
HvTIP1;2-seq-rev	5'-GGC ATC CAT CAC ACA TCA AGA ATG-3'	56,5°C	+
HvUPL7-seq-for	5'-GGA TTT TGA TGT TGA TGA TCT GCG G-3'	56,6°C	+
HvUPL7-seq-rev	5'-CAA ACC CGG TGT TCG AGC TG-3'	59,0°C	+

+ - edukas fragmentide paljundamine PCR-iga kõikide sortide puhul

! - vähemalt ühe sordi puhul amplifikatsiooni ei toimunud

- - ühegi sordi puhul amplifikatsiooni ei toimunud

LISA 2. Esimesed korduspraimerid.

Praimeri nimetus	Praimeri järjestus	Sulamistemperatuur	
HvPIP2;1-seq-for2	5'-GAG ACA TCA GTA CAT TAT CAT GGC-3'	53,3°C	+
HvPIP2;1-seq-rev2	5'-CCA ATT CTT TGA TTA CCA AAT TCT CC-3'	52,9°C	+
HvPIP2;5-seq-for2	5'-CAT GTT ATG TTT GGC TGT GTC TTC C-3'	56,5°C	+
HvPIP2;5-seq-rev2	5'-GTT TGG CGT TCG GTC GTA ATG-3'	56,8°C	+
HvTIP1;1-seq-for2	5'-GCC TCA GAA AGG AAG TCA GTA G-3'	54,8°C	-
HvTIP1;1-seq-rev2	5'-GAT CCA TAT TCC AAC TCA ACT GAA C-3'	53,8°C	-

+ - edukas fragmentide paljundamine PCR-iga kõikide sortide puhul

- - ühegi sordi puhul amplifikatsiooni ei toimunud

LISA 3. Teised korduspraimerid.

Praimeri nimetus	Praimeri järjestus	Sulamistemperatuur	
GADPH-seq-for2	5'-GGC TAT CAA GTA AGT CTT TGA TCT TG-3'	53,7°C	+
GADPH-seq-rev2	5'-CTC GCT CCG TCC TAT AAT ATA AAC AC-3'	54,8°C	+
TIP1;1-seq-for3	5'-GAT TTG ATA CAG GCT TTT TAG GTT G-3'	52,6°C	-
TIP1;1-seq-rev3	5'-CCA ACT CAA CTG AAC TTG AAA TTA C-3'	52,7°C	-

+ - edukas fragmentide paljundamine PCR-iga kõikide sortide puhul

- - ühegi sordi puhul amplifikatsiooni ei toimunud

LISA 4. 'Golden Promise' ja 'Marta' PIP2;1 järjestuste täieliku kattuvusega joondus referentsjärjestusega.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP2;1 3387>CTCTAACCATGGAGAATCAAATCGTTATAAAGATTGCTTCGGATATCCTACATCACATAATCTTCCAATGAAGCGGGCGCCTCTGGCGCTGATCTGCCTG>3486
G_1R_A03 545<CTCTAACCATGGAGAATCAAATCGTTATAAAGATTGCTTCGGATATCCTACATCACATAATCTTCCAATGAAGCGGGCGCCTCTGGCGCTGATCTGCCTG<446
M_1F_A06 580>CTCTAACCATGGAGAATCAAATCGTTATAAAGATTGCTTCGGATATCCTACATCACATAATCTTCCAATGAAGCGGGCGCCTCTGGCGCTGATCTGCCTG>679
M_1R_H05 531<CTCTAACCATGGAGAATCAAATCGTTATAAAGATTGCTTCGGATATCCTACATCACATAATCTTCCAATGAAGCGGGCGCCTCTGGCGCTGATCTGCCTG<432

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP2;1 3487>CCACGTGCTGATTGCTGTTTGTGTTTCGTGCACTGGATCTTCTGGGTGGGGCCACTGATCGGCGCCGCCATTGCCGCCGCCTACCACAGTATGTGCTGAG>3586
G_1R_A03 445<CCACGTGCTGATTGCTGTTTGTGTTTCGTGCACTGGATCTTCTGGGTGGGGCCACTGATCGGCGCCGCCATTGCCGCCGCCTACCACAGTATGTGCTGAG<346
M_1F_A06 680>CCACGTGCTGATTGCTGTTTGTGTTTCGTGCACTGGATCTTCTGGGTGGGGCCACTGATCGGCGCCGCCATTGCCGCCGCCTACCACAGTATGTGCTGAG>779
M_1R_H05 431<CCACGTGCTGATTGCTGTTTGTGTTTCGTGCACTGGATCTTCTGGGTGGGGCCACTGATCGGCGCCGCCATTGCCGCCGCCTACCACAGTATGTGCTGAG<332

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP2;1 3587>GGCCAGCGCCGCCAAGCTCGGGTCCTACAGGAGCAACTAAGTCGCCCGTAGCTCCGGCCGGACGCGCGAGGGGGGGCACTGAAGTGTAGATATGTGCGAA>3686
G_1R_A03 345<GGCCAGCGCCGCCAAGCTCGGGTCCTACAGGAGCAACTAAGTCGCCCGTAGCTCCGGCCGGACGCGCGAGGGGGGGCACTGAAGTGTAGATATGTGCGAA>246
M_1F_A06 780>GGCCAGCGCCGCCAAGCTCGGGTCCTACAGGAGCAACTAAGTCGCCCGTAGCTCCGGCCGGACGCGCGAGGGGGGGCACTGAAGTGTAGATATGTGCGAA>879
M_1R_H05 331<GGCCAGCGCCGCCAAGCTCGGGTCCTACAGGAGCAACTAAGTCGCCCGTAGCTCCGGCCGGACGCGCGAGGGGGGGCACTGAAGTGTAGATATGTGCGAA>232

```

Joonis 1. Joondus 'Golden Promise' ja 'Marta' PIP2;1 järjestuste ning referentsjärjestusega.

LISA 5. 'Golden Promise' ja 'Marta' PIP2;5 järjestuste täieliku kattuvusega joondus referentsjärjestusega.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP2;5 2900>TCAAGGCCCTCGGCTCCTTCAGGAGCAACGCGTAACGAGTTATCCATGTGATGTCATGCAAGATTGAAGCAATGGCGACCTGTGCTGTGTCCATCCATC>2999
G_2F_D03 322>TCAAGGCCCTCGGCTCCTTCAGGAGCAACGCGTAACGAGTTATCCATGTGATGTCATGCAAGATTGAAGCAATGGCGACCTGTGCTGTGTCCATCCATC>421
M_2F_C06 318>TCAAGGCCCTCGGCTCCTTCAGGAGCAACGCGTAACGAGTTATCCATGTGATGTCATGCAAGATTGAAGCAATGGCGACCTGTGCTGTGTCCATCCATC>417
M_2R_B06 639<TCAAGGCCCTCGGCTCCTTCAGGAGCAACGCGTAACGAGTTATCCATGTGATGTCATGCAAGATTGAAGCAATGGCGACCTGTGCTGTGTCCATCCATC<540

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP2;5 3000>CAAAGAGAAAGCCGCTTTTGCAACTTCTCGACAGTTCAGTTGGCCGCTGCAATGGTCGTGTTATTTATGTGTCGGCAGCTGCATATGCGTATGTGCCAG>3099
G_2F_D03 422>CAAAGAGAAAGCCGCTTTTGCAACTTCTCGACAGTTCAGTTGGCCGCTGCAATGGTCGTGTTATTTATGTGTCGGCAGCTGCATATGCGTATGTGCCAG>521
M_2F_C06 418>CAAAGAGAAAGCCGCTTTTGCAACTTCTCGACAGTTCAGTTGGCCGCTGCAATGGTCGTGTTATTTATGTGTCGGCAGCTGCATATGCGTATGTGCCAG>517
M_2R_B06 539<CAAAGAGAAAGCCGCTTTTGCAACTTCTCGACAGTTCAGTTGGCCGCTGCAATGGTCGTGTTATTTATGTGTCGGCAGCTGCATATGCGTATGTGCCAG<440

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
PIP2;5 3100>TCATGCGTGCCGTGTGTTGTAATTCGGTCCATGGGATCGCTTGCTTAATTAGCCCGCATTCTTTTCCTGTTTTAATTTAGCGACCATATGTATGATCG>3199
G_2F_D03 522>TCATGCGTGCCGTGTGTTGTAATTCGGTCCATGGGATCGCTTGCTTAATTAGCCCGCATTCTTTTCCTGTTTTAATTTAGCGACCATATGTATGATCG>621
M_2F_C06 518>TCATGCGTGCCGTGTGTTGTAATTCGGTCCATGGGATCGCTTGCTTAATTAGCCCGCATTCTTTTCCTGTTTTAATTTAGCGACCATATGTATGATCG>617
M_2R_B06 439<TCATGCGTGCCGTGTGTTGTAATTCGGTCCATGGGATCGCTTGCTTAATTAGCCCGCATTCTTTTCCTGTTTTAATTTAGCGACCATATGTATGATCG<340

```

Joonis 2. Joondus 'Golden Promise' ja 'Marta' PIP2;5 järjestuste ning referentsjärjestusega.

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Raili Randmäe,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose
„Akvaporiinide roll taimede veevahetuses ja peamiste neid kodeerivate geenide
fragmentide järjestuste analüüs kolmes odrasordis (*Hordeum vulgare*)“,

mille juhendajad on Eele Õunapuu-Pikas ja Hanna Hõrak,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli
digitaalarhiivi kuni autoriõiguste kehtivuse lõppemiseni;
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu
Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i litsentsiga
CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele
suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguste
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 tulevaid õigusi.

Raili Randmäe

25.05.2026