

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

***ABCG18* ja *ABCG19* ekspressioonimuster harilikus müürloogas (*Arabidopsis thaliana*) ja
roll õhulõhede arengus**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Heiki Reila

Juhendaja Dr. Hanna Hõrak

TARTU 2025

INFOLEHT

***ABCG18* ja *ABCG19* ekspressioonimuster harilikus müürloogas (*Arabidopsis thaliana*) ja roll õhulõhede arengus**

Taimedele on õhulõhed olulise tähtsusega. Õhulõhe moodustab kaks sulgrakku, mille vahel on õhupilu, mis avaneb või sulgub vastavalt turgori muudatustele sulgrakkudes. Antud uurimistöös uurisin geenide *ABCG18* ja *ABCG19* ekspressioonimustrit harilikus müürloogas (*Arabidopsis thaliana*), täpsemalt epidermirakkudes ja seemikutes, keskendudes peamiselt õhulõhedele. Töös konstrueerisin promootor-GUS reportersüsteemiga transgeensed taimeliinid, kus GUS geen oli vastava *ABCG* geeni promootori kontrolli all. Lisaks kasutasin hariliku müürlooga Col-0 metsiktüüpi ja häiritud *ABCG17*, *ABCG18* ja *ABCG19* geeni funktsiooniga taimeliine. Leidsin, et *ABCG18* ja *ABCG19* geenid on aktiivsed taime epidermis ja õhulõhedes. Uurides õhulõhede tihedust, ei leidnud mutantliinide ja metsiktüüpi taimede vahel erinevusi.

Taim, õhulõhe, taimefüsioloogia, taimegeneetika, *ABCG17*, *ABCG18*, *ABCG19*.

CERCS: B225 Taimegeneetika

Expression pattern of the *ABCG18* and *ABCG19* genes in mouse-ear cress (*Arabidopsis thaliana*) and their importance in stomatal development

Stomata are of great importance to plants. Stomata are formed by two guard cells and an air gap between, which opens or closes depending on turgor pressure change in guard cells. In this research I investigated the expression pattern of the *ABCG18* and *ABCG19* genes in mouse-ear cress (*Arabidopsis thaliana*). In this work I constructed transgenic plant lines with promotor-GUS reporter system, in which the GUS gene was under the control of a the respective *ABCG* gene promotor. In addition, I used wild-type plant lines Col-0 and knock-out *ABCG17*, *ABCG18* and *ABCG19* gene function plants. I found out that the *ABCG18* and *ABCG19* genes are active in the plant epidermis and stomata. When examining the density of stomata, no differences were found between mutant lines and wild-type plants.

Plant, stomata, plant physiology, plant genetics, *ABCG17*, *ABCG18*, *ABCG19*

CERCS; B225 Plant genetics

SISUKORD

Kasutatud lühendid ja terminid.....	5
Sissejuhatus	7
1. Kirjanduse ülevaade	8
1.1. Õhulõhed.....	8
1.1.1. Õhulõhede arengu mehhanismid	8
1.2. Abstsiiishape (ABA) ja selle transport	9
1.2.1. ABA roll õhulõhede arengus.....	10
1.3. ABCG-transporterid	10
1.3.1. ABC-transporterid ABCG18 ja ABCG19	11
2. Eksperimentaalosa.....	12
2.1. Töö eesmärgid.....	12
2.2. Materjalid ja meetodikad	13
2.2.1. Töös kasutatud taimeliinid.....	13
2.2.2. Taimede kasvatamine.....	13
2.2.3. Molekulaarne klonereimine ja plasmiidide valmistamine	14
2.2.4. Transformatsioon <i>Escherichia coli</i> rakkudesse.....	16
2.2.5. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformatsioon	17
2.2.6. Taimede transformatsioon ja selekteerimine.....	17
2.2.7. Seemnete steriliseerimine	18
2.2.8. GUS värvimine, preparaate valmistamine ja pildistamine	18
2.2.9. Silikoonist lehejäljendite tegemine	19
2.2.10. Õhulõhede tihedus ja statistiline analüüs.....	19
2.3. Tulemused.....	20
2.3.1. Transgeensetes taimedes <i>ABCG18</i> ja <i>ABCG19</i> ekspresioonimustri hindamine.....	20
2.3.2. Õhulõhede tihedus <i>abcg17</i> , <i>abcg18</i> ja <i>abcg19</i> mutantides.....	23
2.4. Arutelu	25

2.4.1. GUS värvimine.....	25
2.4.2. Õhulõhede tihedus.....	25
Kokkuvõte	26
Resümee	27
Tänuõnad	28
Kirjanduse loetelu.....	29
Töös kasutatud veebiallikad:	31
Lisad	33
Lihtlitsents	35

Kasutatud lühendid ja terminid

ABA – *abscisic acid*, abstsiihape, fütohormoon taimes

Abaksiaalne külg – taime lehe põhiteljest eemal paiknev, tavaliselt alumine külg

ABCG17 – *ATP-binding cassette G17*, aktiivtransportvalk, mis seob adenosiin trifosfaati, mida kodeerib *ABCG17*

ABCG18 – *ATP-binding cassette G18*, aktiivtransportvalk, mis seob adenosiin trifosfaati, mida kodeerib *ABCG18*

ABCG19 – *ATP-binding cassette G19*, aktiivtransportvalk, mis seob adenosiin trifosfaati, mida kodeerib *ABCG19*

ABCG25 – *ATP-binding cassette G25*, aktiivtransportvalk, mis seob adenosiin trifosfaati, mida kodeerib *ABCG25*

ABCG40 – *ATP-binding cassette G40*, aktiivtransportvalk, mis seob adenosiin trifosfaati, mida kodeerib *ABCG40*

Adaksiaalne külg – taime lehe põhiteljepoolne, tavaliselt ülemine külg

bHLH - *basic helix-loop-helix*, aluseline heeliks-ling-heeliks, õhulõhede transkriptsiooni-faktorite DNAGA seondumise domeen

CEF – cefotaxime, tsefotaksiim, antibiootikum

CIAP - *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, veise sisikonna aluseline fosfataas, mis eemaldab DNA 3' ja 5' fosfataatühmed

Col-0 – *Arabidopsis thaliana* Columbia ökotüüp, standardne metsiktüüpi mudelorganism

FAMA – aluseline heeliks-ling-heeliks transkriptsioonifaktor, soodustab sulgraku emarakkude diferentseerumist sulgrakkudeks ja takistab tekkinud sulgrakkude edasist jagunemist

GC – *guard cell*, sulgrakk

GMC – *guard mother cell*, sulgraku emarakk

GUS – *beta-glucuronidase*, geeniekspressiooni reporter beeta-glükuronidaas

HYG - *hygromycin B*, antibiootikum hügromütsiin

M – *meristemoid*, meristemoidrakk

MS – *Murashige and Skoog medium*, sööde taimede kasvatamiseks

MUTE –aluseline heeliks-ling-heeliks valk, mis kontrollib meristemoidi diferentseerumist õhulõhede arengus

OST1 - kaltsiumist sõltumatu ABA-aktiveeritud proteiinkinaas

p35S – lillkapsa mosaiigiviiruse promootor 35S

SPCH – SPEECHLESS, aluseline heeliks-ling-heeliks transkriptsioonifaktor, mis on vajalik asümmeetriliseks rakujagunemiseks õhulõhede arengus

Geenide nimed ja info pärinevad TAIR andmebaasist (arabidopsis.org).

Taime valkude nimed on läbivate suurtähtedega, geenide nimed läbivate suurtähtedega ning kursiivis ja mutantide nimed läbivate väiketähtedega kursiivis, vastavalt valdkonna traditsioonidele.

Sissejuhatus

Taime lehtede pindmises koes on väikesed poorid ehk õhulõhed, mis reguleerivad taimes erinevaid füsioloogilisi protsesse. Taimedele on õhulõhed, mis reguleerivad gaasivahetust, olulise tähtsusega, võimaldades CO₂ liikumist fotosünteesiks ja taimest lahkuva vee hulga kontrollimist ning O₂ liikumist taimest välja. Ilma nendeta ei suudaks taimed enda elutegevuseks vajaliku energiat toota. Õhulõhede omadused, näiteks nende tihedus ja suurus, mõjutavad oluliselt taimede saagikust ja ellujäämist. Õhulõhe moodustab kaks sulgrakku, mille vahel on õhupilu, mis avaneb või sulgub vastavalt turgori muudatustele sulgrakkudes. Õhulõhede avatust reguleerivad turgorrõhu muudatused sulgrakkudes. Muidugi ei saa ära unustada ka erinevate geenide mõju õhulõhede arengule ja õhulõhede tihedusele lehe alumisel ja ülemisel pinnal.

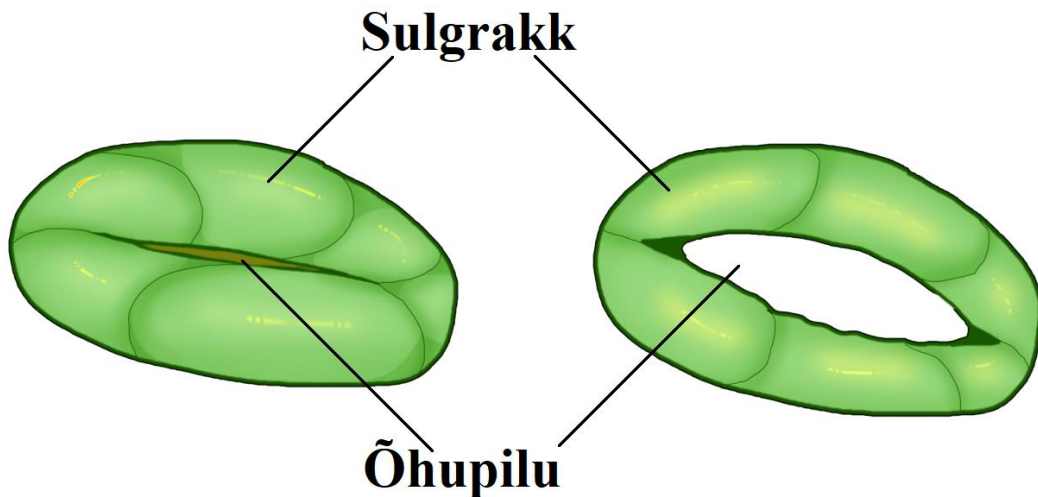
Antud uurimistöös uurisin geenide *ABCG18* ja *ABCG19* ekspressioonimustrit harilikus müürloogas (*Arabidopsis thaliana*), täpsemalt epidermirakkudes ja seemikutes, keskendudes peamiselt õhulõhedele. Töös kasutasin hariliku müürlooga Col-0 metsiktüüpi ja häiritud *ABCG17*, *ABCG18* ja *ABCG19* geeni funktsiooniga taimeliine. Lisaks valmistasin transgeenseid Col-0 taimeliine, mis sisaldasid kas p*ABCG18*-GUS või p*ABCG19*-GUS reportersüsteemi. Kasutasin GUS-värvimist ja valgusmikroskoopiat, et uurida vastavate, *ABCG18* ja *ABCG19*, geenide promootorite aktiivsust.

Uurimistöö viisin läbin Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudi taimefüsioloogia laboris.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Õhulõhed

Õhulõhed on taime epidermis paiknevad väikesed avused, mis reguleerivad taime erinevaid füsioloogilisi protsesse läbi gaasivahetuse. Õhulõhe koosneb kahest sulgrakust, mille vahel paiknev õhupilu avaneb või sulgub vastavalt turgori muutustele sulgrakkudes (Joonis 1). Õhulõhe avanemist põhjustab K^+ soolade või suhkrute kuhjumine sulgrakkudes, langetades vee potentsiaali, mis omakorda toob kaasa vee liikumise rakkudesse (Shimazaki jt, 2007). Taime ja atmosfääri vahelist gaasivahetust reguleerivate õhulõhede areng on suuresti mõjutatud keskkonnast (Driesen jt, 2023). Õhulõhede omadused, näiteks nende tihedus ja suurus, mõjutavad oluliselt taime saagikust ja ellujäämist.



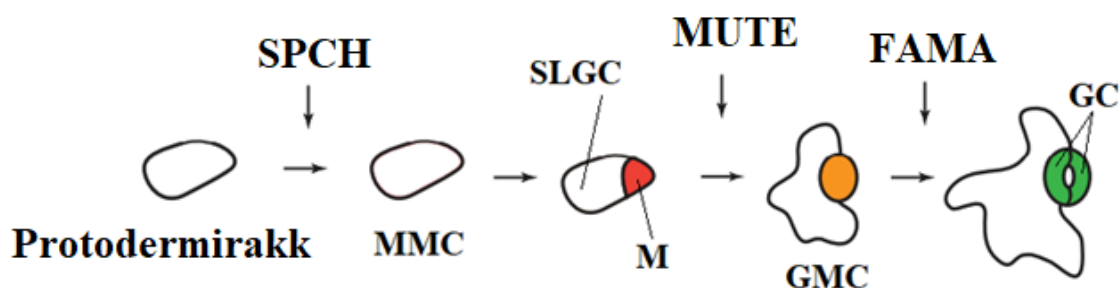
Joonis 1. Õhulõhede sulgumine ja avamine. Joonise koostas Riku Brigita Ottson.

1.1.1. Õhulõhede arengu mehhanismid

Peamiselt on taimed hüpostomaatsed ehk nende õhulõhed paiknevad lehtede alumisel (abaksiaalsel) küljel (Muir, 2015). Samas, paljudel rohttaimedel, kaasa arvatud *Arabidopsis thaliana*, on täheldatud märkimisväärset õhulõhede arvu ka lehe ülemisel (adaksiaalsel) pinnal (Jalakas jt, 2024). Enamasti on taime õhulõhede arengu ja funktsiooni kohta ammutatud teadmisi abaksiaalsete õhulõhede uurimistöödest ning seetõttu teatakse adaksiaalsetest õhulõhedest vähem.

Taimelehe arengu käigus rakkude jagunemine toimub areneva lehe alumises osas ja diferentseerumine lehe tipule lähemal (Lau & Bergmann, 2012). *Arabidopsis thaliana* õhulõhed arenevad välja läbi spetsialiseerunud epidermi rakuliini ehk õhulõhede arenguliini. Esiteks protodermirakk diferentseerub meristemoidi emarakuks (MMC, *meristemoid mother cell*), mis

edasi jaguneb asümmeetriliselt kaheks – suurem õhulõhe arenguliini põhirakk (SLGC, *stomatal lineage ground cell*) ja väiksem kolmnurkne meristemoidrakk (M, *meristemoid*). Meristemoid võib diferentseeruda sulgraku emarakuks (GMC, *guard mother cell*), jaguneda uuesti või hoopis kasvada ja diferentseeruda sillutisrakuks (*pavement cell*). Sulgraku emarakk jaguneb lõpuks sümmeetriliselt kaheks sulgrakuks (GC, *guard cell*). Kirjeldatud diferentseerumise rada on illustreeritud joonisel 2.



Joonis 2. *Arabidopsis thaliana* õhulõhede diferentseerumise rajal on näha protodermirakku, meristemoidi emarakku (MMC, *meristemoid mother cell*), õhulõhede arenguliini põhirakku (SLGC, *stomatal lineage ground cell*), meristemoidraku (M, *meristemoid*), sulgraku emarakku (GMC, *guard mother cell*) ja sulgrakke (GC, *guard cell*). Lisaks on joonisel ka transkriptsioonifaktorid SPCH, MUTE ja FAMA. Joonise modifitseerisin, originaal on pärit Lau & Bergmann, 2012 tööst.

Õhulõhede arengut reguleerivad erinevad transkriptsioonifaktorid. Geen *SPEECHLESS* (*SPCH*) kodeerib aluselist heeliks-ling-heeliks (bHLH, *basic helix-loop-helix*) transkriptsioonifaktorit, mis on vajalik rakkude asümmeetriliseks jagunemiseks (MacAlister jt, 2007). *MUTE* on olulisel kohal meristemoidi edasise arengusuuna jaoks, selle puudumisel meristemoidid lõpetavad jagunemise, samas üleekspressiooni korral jaguneb terve epiderm sulgrakkudeks (Pillitteri jt, 2007). Viimaseks, *FAMA*, mis soodustab GMC jagunemist, takistab tekkinud sulgrakkude edasist jagunemist (Ohashi-Ito & Bergmann, 2006).

1.2. Abstsiihape (ABA) ja selle transport

Abstsiihape (ABA) on fütohormoon, mille peamisteks funktsioonideks on osalemine taime erinevates kasvuprotsessides: reguleerib taime seemnete idanemise kulgu, taime kasvu, organellide suuruse määramist ning lehtede langemist. ABA reguleerib õhulõhede sulgumist ning on oluline endogeenne sõnumivahetaja biootilise ja abiootilise stressi vastustes taimes (Raghavendra jt, 2010). Stressivabades tingimustes püsib ABA tase madalal (Xiong 2003), samas taseme normaalvahemik on vajalik võrsete ja eriti lehtede arenguks (Sharp jt, 2000).

Seemnete arengus aitab ABA vältida enneaegset idanemist, soodustades puhkeseisundit, kuivataluvust ja neutraliseerib teisi hormone (Boursiac jt, 2013).

ABA on nõrk hape, mida taimed sünteesivad karotenoididest (Finkelstein, 2013). pH 4,7 juures ABA on tasakaalus anioonse ja protoneeritud vormi vahel (Boursiac jt, 2013). Happelisemas pH keskkonnas on rohkem protoneeritud vorme, millel puuduvad laengud ning on seeläbi võimelised ilma transporterite abita vabalt difundeeruma läbi membraani lipiidse kaksikkihi (Boursiac jt, 2013)

ABA transporterid on selle hormooni toimimiseks olulised. On leitud, et AIT1 (ABA-IMPORTING TRANSPORTER 1), ABA importijana, omab olulist funktsiooni õhulõhede ava reguleerimises (Kanno jt, 2012). *Arabidopsis thaliana* ABA transporter, DTX50 (DETOXIFICATION EFFLUX CARRIER 50), mängib olulist rolli ABA vahendatud kasvu pärssimises ja põuaoludele reageerimises (Zhang jt, 2014). Enamik teisi teadaolevaid ABA transportereid on ABCG-transporterid.

1.2.1. ABA roll õhulõhede arengus

Kui ABA tase on kõrge, näiteks põua ajal, aktiveeritakse õhulõhede eellasrakkudes olevad SnRK2 valgud, mis fosforüülivad transkriptsioonifaktori SPCH, pärssides seeläbi õhulõhede arengut (Yang jt, 2022). Vastupidiselt, vee olemasolul, ABA tase langeb, mistõttu õhulõhede areng toimub normaalselt. ABA lagundamise häirega *Arabidopsis thaliana* mutantidel esines vähem õhulõhesid, kuid ABA-defitsiitsel *aba2-2* mutandil nähti pikaajalist meristemoidrakkude ja sulgraku emarakkude moodustumist, mis tõi kaasa suurenenud õhulõhede arvu (Tanaka jt, 2013).

ABA vahendatud signaaliülekanDES, on SnRK2 proteiinkinaasil OPEN STOMATA1 (OST1) keskne roll, mida näitab *ost1* mutanditel häirunud õhulõhede sulgumine, kuigi õhulõhede areng toimub *ost1* mutandis normaalselt (Jalakas jt, 2018). Õhulõhede tihedust *Arabidopsis thaliana* abaksiaalsel ja adaksiaalsel küljel reguleerib abstsiaishape erinevalt. Võimalik, et ABA pärssib õhulõhede arengut lehe adaksiaalses küljes rohkem kui abaksiaalses (Jalakas jt, 2024).

1.3. ABCG-transporterid

Adenosiin trifosfaati siduvad transporterid ehk ABC-transporterid on peamised aktiivtransportvalgud, mida leidub igas elusorganismis. Eukarüootides paiknevad nad nii plasmamembraanis kui ka erinevate organellide membraanides. ABC transportvalgud on sageli seostatud erinevate protsessidega, näiteks aukiini ja abstsiaishape transportis (Kang jt, 2011). Seetõttu omavad nad olulist rolli taime toitumises ja arengus, organite kasvus, abiootilise stressi vastuses ja reaktsioonides keskkonna muutustele. ABC transportvalgud on jaotatud kaheksaks alamperekonaks. Neist kõige suurem on ABC perekonna G transportvalgud, mis jagunevad kaheks – 28 poolsuurt (ABCG1-ABCG28) ja 15 täissuuruses (ABCG29-ABCG43)

transporterit (Gräfe & Schmitt, 2020). Pikemat aega on arvatud, et selle perekonna valkude peamine või isegi ainus ülesanne on olnud toksiinide metaboliseerimine ja neist lahti saamine (Zhang jt, 2021). Tänapäevaks on avastatud, et erinevatel ABCG transpordivalkudel on eri ülesanded.

Mitmed ABC-transporterite perekonna G transportvalgud omavad funktsiooni ABA transpordis. Teadaolevalt *Arabidopsis thaliana* ABCG25 kodeerib valku, mis omab ABA signaalirajas olulist kohta ABA transportijana (Kuromori jt, 2010). Sarnast rolli ABA transpordis on täheldatud ABCG40 (Kang jt, 2010). ABA transportereid on palju ja leiti, et neist ühe või mõne puudumine ei mõjutanud õhulõhede käitumist (Merilo jt, 2015)

1.3.1. ABC-transporterid ABCG18 ja ABCG19

Arabidopsis thaliana ABA homöostaasi reguleerivad adenosiin trifosfaati siduvad transporterid ABCG17 ja ABCG18, soodustades ABA importi (Zhang jt, 2021). Mõlemad ABA importerid, ABCG17 ja ABCG18, kontrollivad ka seemnete suurust, reguleerides ABA transpordi tasemeid (Zhang jt, 2025). Vaatamata ABCG17 ja ABCG18 rollile, ABCG19 puhul ei leitud erilist mõju ABA transpordile (Zhang jt, 2021).

ABC transporterit AtWBC19 (ABCG19) seostatakse antibiootikumi kanamütsiini resistentsusega, selle puudumisel kaotab *Arabidopsis thaliana* kanamütsiini vastu resistentsuse (Mentewab jt, 2014). ABCG19 kanamütsiini resistentsust saab transformatsiooniga edasi kanda *Escherichia coli* rakku, mis muidu on kanamütsiini vastu tundlik, aga täielikku kanamütsiini resistentsust ABCG19 bakteritele ei taga (Burris jt, 2008).

Esialgset avaldamata tulemused laboris viitasid sellele, et ABCG19 võib mõjutada õhulõhede arengu mustreid. Lisaks ABCG19 lähedalt uurimisele, võeti vastu ka otsus kaasata töösse ABCG19 lähedased sugulased ABCG18 ja ABCG17.

2. Eksperimentaalosa

2.1. Töö eesmärgid

- Iseloomustada geenide *ABCG18* ja *ABCG19* ekspressioonimustrit taimedes, luues selleks vajalikud promootor-GUS (p*ABCG18*-GUS ja p*ABCG19*-GUS) reportertaimede liinid.
- Analüüsida geenide *ABCG17*, *ABCG18* ja *ABCG19* rolli õhulõhede paiknemise kujunemisel lehtedes, uurides häiritud *ABCG17*, *ABCG18* või *ABCG19* geeni funktsiooniga taimeliinide õhulõhede paiknemise mustreid.

2.2. Materjalid ja meetodikad

2.2.1. Töös kasutatud taimeliinid

Tabel 1. Kasutatud taimeliinid

Genotüüp	Kirjeldus	Allikas
Col-0	Metsiktüüp	Laboris varem olemas
Col-0 - pABCG18-GUS	pABCG18-GUS promootor-reporter taimeliin	Töö käigus loodud
Col-0 - pABCG19-GUS	pABCG19-GUS promootor-reporter taimeliin	Töö käigus loodud
<i>abcg17</i>	<i>ABCG17</i> mutant Col-0 taustas	Laboris varem olemas
<i>abcg18-1</i>	<i>ABCG18</i> mutant Col-0 taustas	Laboris varem olemas
<i>abcg18-2</i>	<i>ABCG18</i> mutant Col-0 taustas	Laboris varem olemas
<i>abcg19-1</i>	<i>ABCG19</i> mutant Col-0 taustas	Laboris varem olemas
<i>abcg19-2</i>	<i>ABCG19</i> mutant Col-0 taustas	Laboris varem olemas
<i>abcg19-3</i>	<i>ABCG19</i> mutant Col-0 taustas	Laboris varem olemas
<i>abcg19-4</i>	<i>ABCG19</i> mutant Col-0 taustas	Laboris varem olemas

2.2.2. Taimede kasvatamine

Transformatsiooniks kasutasin laboris olevaid *Arabidopsis thaliana* taimeliini Col-0 seemneid. Enne külvamist stimuleerisin neid, et soodustada ühtlast idanemist. Selleks hoidsin neid 5 päeva enne külvamist 1,5 ml veega täidetud tuubides temperatuuril 4°C. Seemnete külvamiseks segasin esmalt kokku kasvusegu, mis koosnes mahusuhtega 3:1:2 turbast (Pruun 025 W, Kekkilä), vermikuliidist (Vermikuliit Medium 0–4 mm, TopGreen) ja kraaniveest (AS Tartu Veevärk), millega täitsin 30 keskmise suurusega (8 x 8 x 6 cm) taimepotti. Kasutades 100 µl pipetti, kandsin pottide kolme erinevasse kohta umbes 5 seemet – kokku 15 seemet ühe poti kohta. Pärast külvi asetasin anumad kahele kandikule ning katsin läbipaistvate plastikkaantega, et soodustada niiskemat keskkonda. Kandikud asetasin kontrollitud tingimustega kasvuruumi ehk lühipäevatuppa, kus valguse intensiivsus oli 250 µmol m⁻² s⁻¹ ning fotoperiood 10 h valgust ja 14 h pimedust. Temperatuur kõikus päeval 22-28°C, öösel 19-21°C ning õhuniiskus vastavalt 40-50% ja 60-80%. Kui taimed hakkasid õitsema, asetasin nad edasi pikapäevatuppa, kus erinevalt lühipäevatoast oli valgust 16 h ja pimedust 8 h. Kaks nädalat pärast külvamist

harvendasin taimi nii, et igasse potti jäi kasvama kolm taime. Transformatsiooniks sobisid taimed, mille õiepungad olid välja arenenud ent mitte avanenud.

GUS-värvimise jaoks kasvasin T4 transgeenseid taimi MS (Murashige & Skoog) fütoagari söötmeplaatidel. Söötme koostis: MS (lõppkonts 0,5x), MES (lõppkonts 2,5 mM), sahharoos (lõppkonts. 1%), KOH (pH tiitrimiseks), fütoagar (lõppkonts. 0,6%), pH 5,7. Steriliseeritud seemned külvasin söötmeplaatidele laminaarkapi tööpinnal 20 µl pipetiga, katsin plaadid ning asetasin umbes kaheks nädalaks lühipäevatoa tingimustega kasvukappi.

Õhulõhede tiheduse mõõtmiseks kasvasin taimi kontrollitud tingimustega kasvukapis (Microclima Arabidopsis MCA1600-3LP6-E, Snijders Scientific). Sealne valgustugevus oli 250 µmol m⁻²s⁻¹ ja fotoperiood oli 10 h valgust ja 14 h pimedust. Temperatuur kasvukapis oli päeval 23 °C ja öösel 19 kraadi ning õhuniiskus vastavalt 60% ja 80%.

2.2.3. Molekulaarne kloonimine ja plasmiidide valmistamine

ABCG19 ja *ABCG18* promootorite paljundamiseks ja plasmidi GUS-geeni ette kloonimiseks disainisin praimerid (Tabel 2.), kasutades *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR) andmebaasi (www.arabidopsis.org) ja ApE programmi (Davis & Jorgensen, 2022). Kõigepealt eraldasid p35S-GUS-pCAMBIA1390 plasmidi (laboris eelnevalt olemas) 3 ml ühe *Escherichia coli* (DH10β) koloonia LB vedelsöötimest, kasutades FavorGeni pool toodetud FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit'i (<https://www.favorgen.com/data/manual/files/1743496768419737378.pdf>) vastavalt tootja protokollile. Järgmisena valisin ThermoFisheri DoubleDigest kalkulaatorit (<https://www.thermofisher.com/ee/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html>) kasutades sobiva puhvri plasmidi lõikamiseks. Selleks segasin kokku 50 µl lõikamisegu (5 µl 10x puhver O (Thermo Fisher Scientific, lõppkonts. 1x), 4 µl p35-GUS-pCAMBIA1390 (lõppkonts. 20 ng/µl) 39 µl deoniseeritud vett ning 1 µl 10 U/µl restriktasi PstI (lõppkonts. 0,2 U/µl) ja 1 µl 10 U/µl restriktasi Sall (lõppkonts. 0,2 U/µl), mida inkubeerisin 1 h 37 °C juures. Lõigatud vektori otste kokku kleepumise vältimiseks lisasin 1,5 µl 1 U/µl CIAP'i (Invitrogen, lõppkonts. 0,03 U/µl) ja inkubeerisin veel 1 h samades tingimustes. Lõigatud plasmiidile lisasin 10 µl 6x TAE laadimisvärvi (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM EDTA; 50% glütserool; 0,25% broomfenoolisiline, lõppkonts. 1x) ning kontrollisin lõikuse õnnestumist 1% agarosgeelis (60 ml 0,5 M TAE puhver, 0,6 g agarooosi, 6 µl 10 000x GelGreen (Biotium), lõppkonts. 1x). Seejärel puhastasin lõigatud plasmidi agarosgeelist, kasutades FavorGeni FavorPrep GEL/PCR Purification Kit'i geeli protokolliga (<https://www.favorgen.com/data/manual/files/1679534782968656194.pdf>). Tulemuseks sain restriktasiddega, PstI ja Sall, lõigatud ja

puhastatud plasmidi fragmendi, kust oli p35S (lillkapsa mosaiigiviiruse promootor 35S) fragment välja lõigatud.

Tabel 2. Töös kasutatud praimerid

Märklaud	Praimeri nimi	Praimeri järjestus	Kirjeldus
<i>ABCG18</i> promootor	PstI-pABCG18-for-2	tcagCTGCAGaccaagaggttatcgctagtatacaagcg-cac	Päripidi praimer <i>ABCG18</i> promootori paljundamiseks
<i>ABCG18</i> promootor	SalI-pABCG18-rev-2	tcagGTCGACcctcaacgatttagttaactatTTTTGGTgatgg-aagtttaacg	Äraspidi praimer <i>ABCG18</i> promootori paljundamiseks.
<i>ABCG19</i> promootor	PstI-pABCG19-for-2	cagCTGCAGGattaacatcatcgactagtcaattttggaagag-aaaacttgccattaac	Päripidi praimer <i>ABCG19</i> promootori paljundamiseks.
<i>ABCG19</i> promootor	SalI-pABCG19-rev-2	tcagGTCGACcggacggcgctggttagagttttggc	Äraspidi praimer <i>ABCG19</i> promootori paljundamiseks.
	pCAM1390-seq-for-1	CGTGCTCCAC-CATGTTGGGC	Päripidi sekveneerimispraimer GUS järjestuse ees paikneva järjestuse kontrollimiseks plasmiidis
	GUS-seq-rev	gccgtcgagtttttgattcac	Äraspidi sekveneerimispraimer GUS järjestuse ees paikneva järjestuse kontrollimiseks plasmiidis
<i>ABCG19</i> promootor	pABCG19-in-rev	ccgtgataaaggcaatttggc	Äraspidi sekveneerimispraimer <i>ABCG19</i> promootorjärjestuse kontrollimiseks plasmiidis
<i>ABCG19</i> promootor	pABCG19-in-for	gccaaattgcctttatcacgg	Päripidi sekveneerimispraimer <i>ABCG19</i> promootorjärjestuse kontrollimiseks plasmiidis
<i>ABCG18</i> promootor	pABCG18-in-rev	cgtgagtacttactaactacgatacc	Äraspidi sekveneerimispraimer <i>ABCG18</i> promootorjärjestuse kontrollimiseks plasmiidis
<i>ABCG18</i> promootor	pABCG18-in-for	ggtatcgtagtagagtactcacg	Päripidi sekveneerimispraimer <i>ABCG18</i> promootorjärjestuse kontrollimiseks plasmiidis

Kasutades FavorGeni FavorPrep Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit'i (<https://www.favorgen.com/data/manual/files/1743496859535521619.pdf>) eraldasini *Arabidopsis thaliana* metsiktüüpi taimede (Col-0) genoomse DNA, millelt paljundasini *ABCG18* ja *ABCG19* geenide promootoralad, kasutades PCR'i ja primereid (Tabel 2.). Reaktsioonisegus kasutasini 0,5 µl Phusion polümeraasi (Thermo Fisher Scientific, lõppkonts. 0,02 U/µl), 10 µl 5x HF puhvrit (lõppkonts. 1x), 25 µl deioniseeritud vett, 5 µl 2 mM dNTP-sid (lõppkonts. 0,2 mM), 5 µl genoomset Col-0 DNA-d, 2,5 µl 10 µM äraspidi-praimerit (lõppkonts. 0,5 µM) ja 2,5 µl 10 µM päripidi-praimerit (lõppkonts. 0,5 µM). PCR programmi

esimene etapp kestis 3 min temperatuuril 98 °C. Seejärel algas PCR tsükkel ehk teine etapp, DNA ahelate lahutamine, mis kestis 15 sekundit 98 °C juures. Kolmas etapp, praimerite seondumine, kestis 20 sekundit 53 °C juures. PCR tsükli lõpp ehk neljas etapp, DNA sünteesimine, kestis 1 minut ja 15 sekundit temperatuuril 72 °C. Tsükkel kordus 35 korda. Viiendal etapil, DNA sünteesimine, hoiti temperatuuri 72°C juures 7 minutit ning lõppes 12 °C juurde jahutamisega. Sel korral kontrollitiprodukte (5 µl produkt, 1 µl 6x TAE värv, lõppkonts. 1x) etiidiumbromiidiga 1% agarosgeelis (0,25 g agaros, 25 ml 0,5x TAE puhver, 2,5 µl 0,5 mg/ml etiidiumbromiidi lahust, lõppkonts. 0,05 µg/ml). Allesjäänud osa PCR produktidest puhastasin reaktsioonisegust FavorGeni FavorPrep GEL/PCR Purification Kit'i PCR protokolliga.

Puhastatud PCR produkte lõikasin sarnaselt nagu on eelnevalt kirjeldatud plasmiidide lõikamist. Erinevalt plasmiidide lõikamisest, oli PCR-segust puhastatud DNA (PCR produkt, *ABCG18* või *ABCG19* promootorjärjestus, Tabel 2.) kogus 40 µl ja deioniseeritud vee maht 3 µl ning CIAP'i lisamise ja inkubeerimise etappi ei teostatud. Lõigatud DNA puhastasin uuesti eelnevalt kirjeldatud FavorPrep kitiga.

Lõpuks ligeerisin PCR produkti ja vektori. Selleks pipeteerisin kokku 14 µl puhastatud ja lõigatud PCR produkti, 3 µl puhastatud ja lõigatud plasmidi, 2 µl 10x T4 puhvrit (Thermo Fisher Scientific, lõppkonts. 1x) ja 1 µl T4 DNA ligaasi (Thermo Fisher Scientific, lõppkonts. 0,25 U/µl), mida inkubeerisin 1 h toatemperatuuril. Lõpptulemuseks sain kaks vektorplasmidi pABCG18-GUS-pCAMBIA1390 (Lisa 1) ja pABCG19-GUS-pCAMBIA1390 (Lisa 2), mida kasutasin *Escherichia coli* rakkudesse transformeerimisel.

2.2.4. Transformatsioon *Escherichia coli* rakkudesse

Pärast inkubeerimist võtsin 15 µl ligatsioonisegu transformatsiooniks, millele lisasin 65 µl deioniseeritud vett, 20 µl 5x KCM (koostis: 0,5 M KCl, 0,15 M CaCl₂, 0,25 MgCl₂, lõppkonts. 0,45x) ja 120 µl DH10β kompetentseid *Escherichia coli* rakke (eelnevalt laborandi poolt valmistatud). Transformatsioonisegu inkubeerisin esmalt 20 min jääl, millele järgnes 90 sek kuumašokk 42 °C juures. Pärast šokki asetasin segu 1 min tagasi jääle, lisasin 1 ml LB söödet ning asetasin 1 h loksutisse 37 °C juurde inkubeerima. Pärast tsentrifugeerimist (Eppendorf Centrifuge 5420, rootor FA-24x2) transformeerimisega 2250 g 2 min. Laminaarkapi tööpinnal eemaldasid enamuse supernatandist, suspendeerisin rakud ja plaatisin LB kanamütsiini (50 µg/ml) söötmeplaatidele.

Järmisel päeval märgistasin ära kasvanud kolooniad. Igalt plaadilt võtsin autoklaavitud hambaorgiga (Transpen Oy) tüki kuuest erinevast kolooniast ja segasin PCR tuubis 10 µl

deioniseeritud vees. Esmalt lüüsisin rakud 95 °C juures 10 min. Seejärel lisasin tuubidesse 2 µl deioniseeritud vett, 2 µl 10x puhver B (tootja Solis BioDyne, lõppkonts. 1x), 2 µl 25 mM MgCl₂ (lõppkonts. 2,5 mM), 2 mM dNTPsid (lõppkonts. 0,2 mM), 2,5 µl 10 µM päripidi-praimer (Tabel 1, pCAM 1390-seq-for-1, lõppkonts. 0,5 µM), 2,5 µl 10 µM äraspidi-praimer (Tabel 1, pABCG19-in-rev, lõppkonts. 0,5 µM) ja Taq polümeraasi (FirePol, Solis Biodyne, lõppkonts. 0,05 U/µl). Seejärel asetasin segu PCR masinasse ja käivitasin programmi: 3 min 95 °C, 25x tsükkel (DNA ahelate lahutamine 15 sek 95 °C, praimerite seondumine 20 sek 53 °C, DNA süntees 90 sek 72 °C), 7 min 72 °C ning lõpp 12 °C juures.

Sekveneerimiseks määrasin plasmiidide kontsentratsioonid NanoDrop (ND-1000) spektrofotomeetriga. Edasi viisin plasmidi proovid koos sekveneerimipraimeritega (Tabel 2.) Tartu Ülikooli Genoomika tuumiklaborisse sekveneerimiseks. Hiljem kontrollisin sekveneerimistulemusi ApE tarkvaraga ning valisin välja transformatsiooniks kaks plasmidi.

2.2.5. *Agrobacterium tumefaciens* transformatsioon

Promootor-reporteri süsteemi sisaldavad plasmiidid transformeerisin *Agrobacterium tumefaciens* tüvesse GV3101, milleks kasutasin 100 µl kompetentseid rakke (eelnevalt laboris valmistatud) ja 1 µg plasmidi. Esmalt asetasin segu 30 minutiks jääle, millele järgnes 3 min temperatuurišokk 37 °C juures. Seejärel lisasin rakusegule 1 ml LB söödet ja inkubeerisin loksutis 90 minutit 28 °C juures. Pärast loksutit tsentrifugeerisin 4600 g juures 2 min, eemaldasid enamuse supernatandist ning resuspendeerisin rakud. Lõpuks plaatisin transformeeritud bakterirakud LB söötmeplaadile, kuhu oli lisatud gentamütsiini (25 µg/ml) ja kanamütsiini (50 µg/ml), ning inkubeerisin 2 päeva 28 °C juures.

2.2.6. Taimede transformatsioon ja selekteerimine

Taimede transformatsiooniks lisasin esmalt 5 ml LB vedelsöötmesse kanamütsiini (lõppkonts. 50 µg/ml), gentamütsiini (25 µg/ml) ning väikese koguse eelnevalt kasvatatud transformeeritud *A. tumefaciens* bakterirakke. Inokuleeritud söötme asetasin üleöö 28 °C loksutisse. Järgmisel päeval valmistasin 50 ml sama selektiivsöödet, millele lisasin üleöö kasvanud rakud ning asetasin uuesti üleöö 28 °C loksutisse. Kolmandal päeval tsentrifugeerisin rakukultuuri 10 min 3220 g, eemaldasid supernatandi ning resuspendeerisin rakud, lisades 50 ml sahharoosilahust (lõppkonts. 5%). Pärast segunemist lisasin rakulahusele 25 µl detergendi SILWET L-77 (Momentive, lõppkonts. 0,05%).

Transformatsiooniks asetasin taimede kandiku põhja vees niisutatud paberrätikud. Seejärel kastsin taimede õied minutiks rakulahusesse, asetasin nad külili ning katsin niisutatud paberrätikutega. Kandikule asetasin plastikkaane ja jätsin üleöö lühipäeva kasvutappa.

Järgmisel päeval eemaldasid kaane ja paberrätikud ning tõstsin taimed püstisesse asendisse. Taimed (T0) kasvasid kuni seemnete valmimiseni, milledest saab kasvatada T1 põlvkonna taimi, mis sisaldavad juhuslikult genoomi sisenenud promootor-reporter konstrukti.

2.2.7. Seemnete steriliseerimine

Seemned korjasin sõelumise abil, neist osa steriliseerisin katsete jaoks. Selleks asetasin seemned 1,5 ml tuubi kuhu lisasin 750 µl steriliseerimislahust (70% etanool, 0,1% Triton-X100) ning segasin ülepea-rotatoril 15 minutit. Seejärel eemaldasid lahuse laminaarkapi tööpinnal ning pesin seemneid 750 µl autoklaavitud deioniseeritud veega. Pesu kordasin kaks korda. Lõpuks lisasin seemnetele 750 µl steriilist deioniseeritud vett ning säilitasin kolm päeva pimedas, temperatuuril 4°C.

Steriliseeritud transformeeritud taimede seemned külvasin selektiivsõotmeplaatidele (tsefotaksiim, Phytotechnologies Lab, lõppkonts 50 µg /ml ja hügromütsiin, Cayman Chemicals, lõppkonts. 25 µg/ml) ja kasvasin lühipäevatoa tingimustes kaks nädalat. Tõenäoliselt sisaldavad elusad taimed promootor-reporter konstrukti, seega valisin välja kõige elujõulisemad taimed ning istutasin ümber. Saadud taimed on esimese põlvkonna ehk T1 taimed, kus kromosoomistik on transgeeni suhtes heterosügootne. Kuna katseteks on vaja homosügootseid taimi, siis T1 taimedest peab kasvatama kolmanda (T3) või neljanda põlvkonna ehk T4 taimed. Selle kasvatamise ja selekteerimise viisid läbi laboritöötajad.

2.2.8. GUS värvimine, preparaate valmistamine ja pildistamine

Taimerakud, kus ekspresseerub GUS-reportervalk, värvuvad substraadiga (X-Gluc, Thermo Fisher Scientific) töödeldes siniseks. Nii on võimalik visualiseerida *ABCG18* ja *ABCG19* geenide promootorite aktiivsust taime kudedes. GUS värvimise protokoll põhineb Stanislav Vitha protokollil (https://microscopy.tamu.edu/wp-content/uploads/2018/08/GUS_Localization_in_plants.pdf).

Esmalt lisasin taime epidermi tüki, mille eemaldasid lehe alumiselt pinnalt, 1,5 ml tuubi koos 1 ml 90% atsetooniga. Tuubid asetasin jääle ning inkubeerisin 20 min, millele järgnes 1x NaP puhviga (2x NaP puhver: 0,1 M NaH₂PO₄ ja 0,1 M Na₂HPO₄, pH 7,2) pesu. Et veenduda atsetooni jääkide eemaldamises, kordasin pesu. Seejärel eemaldasid proovid jäält ja lisasin 1 ml GUS-värvimislahust (1 ml lahuse koostis: 405 µl deioniseeritud vett, 500 µl 2x NaP puhvrit, 50 µl metanooli (lõppkonts. 5%), 20 µl 100 mM kaalium ferritsüaniidi lahust (2 mM), 20 µl 100 mM kaalium heksatsüanoferraat(III) lahust (2 mM), 0,5 mg X-Gluci (lõppkonts. 0,5 mg/ml), 5 µl 10% Triton X-100 (lõppkonts. 0,05%)). Taime kudesid inkubeerisin toatemperatuuril otsese valguse eest kaitstult üks tund. Taimes oleva klorofüllid eemaldamiseks asetasin pärast

värvumist taime tükid 70% etanooli ning inkubeerisin üleöö toatemperatuuril otsese valguse eest kaitstult.

Seemikute puhul oli GUS-värvimise protsessis ainus erinevus lahuse infiltratsiooni soodustamine vakumeerimise abil. Selleks tegin tuubi korkidesse väikese augu ja asetasin proovid pärast substraadi lisamist vaakumpumbaga (StonyLab, YQ-701092) ühendatud eksikaatorisse ning lasin lahusel keema minna. Sarnaselt epidermi värvimisega, hiljem inkubeerisin seemikuid GUS-lahuses ning siis eemaldasid klorofüllid.

Järgmisel päeval valmistasin värvunud taimekoe tükkidest preparaadid. Selleks lisasin mikroskoobi preparaadi alusklaasile taime tüki koos veetilgaga, mille peale asetasin pealisklaasi. Preparaate vaatlesin Kern Optics valgusmikroskoobi 10-, 20- ja 40-kordse suurendusega objektiiviga ning pildistasin Kern Optics Microscope Camera ODC 832 kaamera (10-kordne suurendus) ja MicroscopeVIS2.0 Pro tarkvaraga.

2.2.9. Silikoonist lehejäljendite tegemine

Lehejäljendid valmistasin taimedest, mis olid kasvanud 6 nädalat. Selleks märgistasin 5. nädalal taime 10. lehe. Jäljendi moodustamiseks lõikasin taime küljest lehe, mille omakorda lõikasin keset taimerootsu pooleks. Lehe alumise ja ülemise külje eristamiseks kasutasin kahte erinevat värvi silikoone. Alumise lehe külje katsin oranži polümeeriseguga (Zhermack Oranwash L ja Indurent gel), ülemise sinisega (Coltene Speedex Light Body ja Activator). Pärast polümeriseerimist eemaldasid silikoonvormidest taime tükid. Vormi katsin läbipaistva küünelakiga (BUK), lasin mõni hetk toatemperatuuril kuivada ning katsin läbipaistva kleplindiga. Teibile kinnitunud küünelaki kihi asetasin preparaadi alusklaasile. Preparaate vaatlesin Kern Optics valgusmikroskoobi 20-kordse suurendusega objektiiviga ning tegin videod Kern Optics Microscope Camera ODC 832 kaamera (10-kordne suurendus) ja MicroscopeVIS2.0 Pro tarkvaraga.

2.2.10. Õhulõhede tihedus ja statistiline analüüs

Õhulõhede tiheduste leidmiseks määrasin videotelt ala pindala ning loendasid õhulõhede täiskasvanud ja eellasrakke nii lehe alt kui ka ülevalt, kasutades programmi ImageJ (Schneider jt, 2012).

Kogutud andmete põhjal arvutasin:

- 1) lehe ülemise külje õhulõhede tiheduse ehk SD ülemine ($SD_{\text{ülemine}} = S/A$, kus S on õhulõhede arv ja A on ala pindala (mm^2))
- 2) lehe alumise külje õhulõhede tiheduse ehk SD alumine ($SD_{\text{alumine}} = S/A$)
- 3) õhulõhede tiheduste suhte ($SD_{\text{ülemine}}/SD_{\text{alumine}}$)

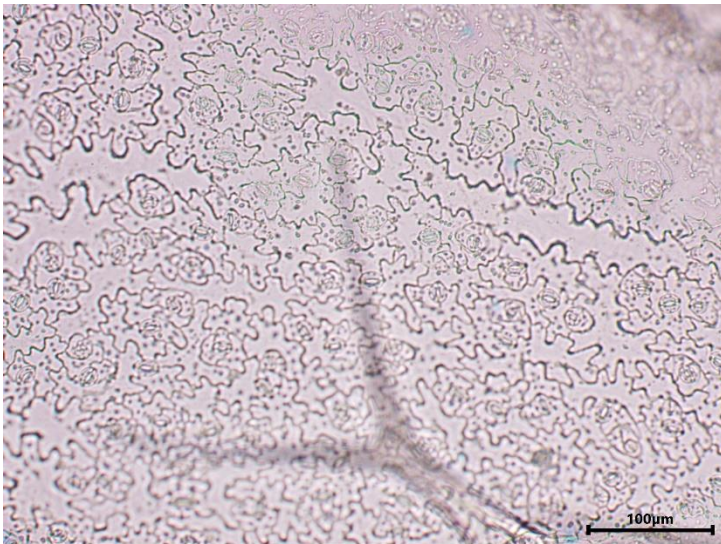
Statistiliseks analüüsiks kasutasin programmi Statistica (versioon 7.0). Kõikide töös kasutatud taimeliinide kohta arvutasin keskmised tunnuste väärtused ja nende võrdlemiseks kasutasin dispersioonanalüüsi ehk ühefaktorilist ANOVAt (olulisusnivoo $\alpha=0,05$).

2.3. Tulemused

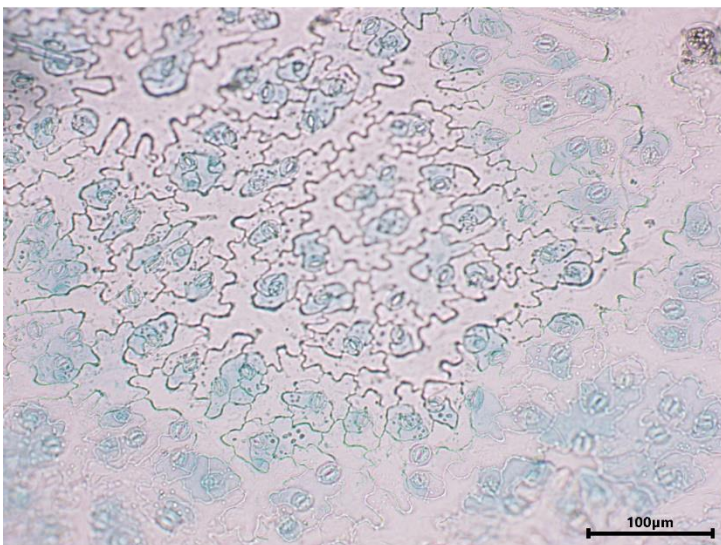
2.3.1. Transgeensetes taimedes *ABCG18* ja *ABCG19* ekspressioonimustri hindamine

ABCG18 ja *ABCG19* ekspressioonimustri hindamiseks kasutasin loodud transgeensete taimeliinide GUS-värvimist. Taimerakud, kus *GUS* geen avaldub *ABCG19* või *ABCG18* promootori kontrolli all, värvuvad pärast substraadiga töötlemist siniseks. GUS-värvimist viisin läbi nii taime epidermis kui ka seemikutes. Kontrolliks kasutasin metsiktüüpi taimeliini Col-0.

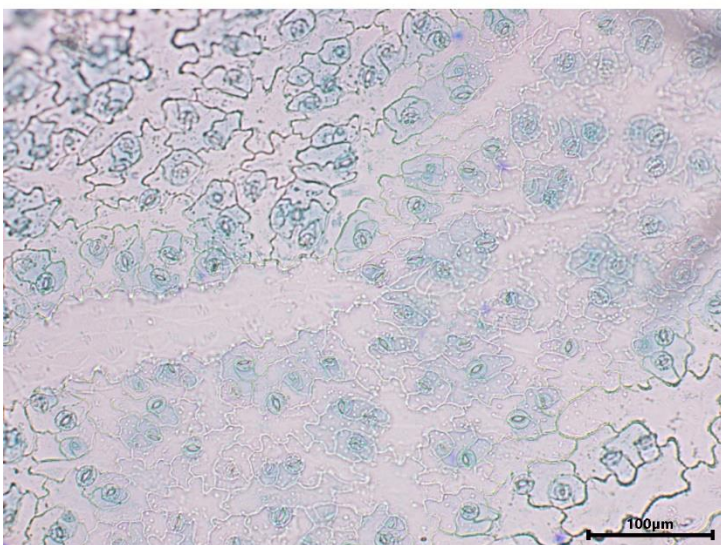
Epidermi GUS-värvimine (Joonis 3.) andis eeldatavaid tulemusi. Geenide *ABCG18* ja *ABCG19* promootorid on aktiivsed õhulõhedes ja neid ümbritsevates epidermi rakkudes, kuna värvusid siniseks nii sulgrakud kui ka neid ümbritsevad rakud. Värvimise tulemusi kinnitab ka negatiivne kontroll, metsiktüüp Col-0, mis ei värvunud.



1) Col-0



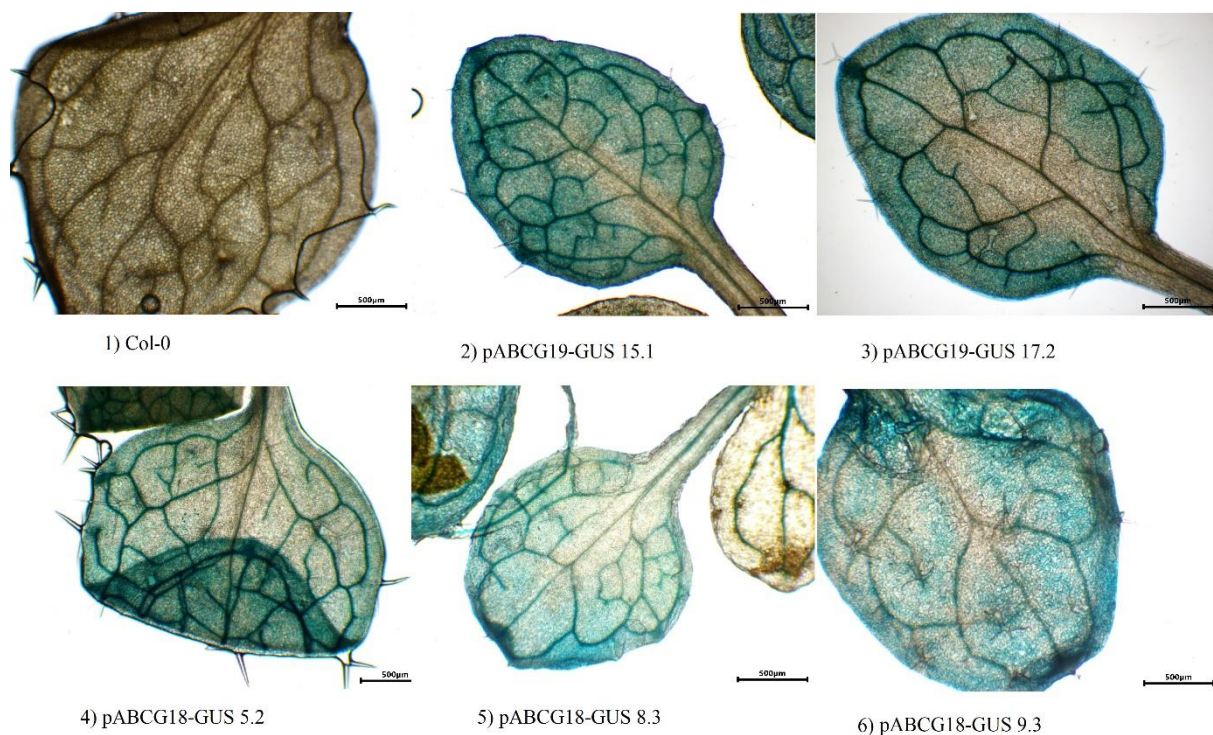
2) pABCG18-GUS 8.3



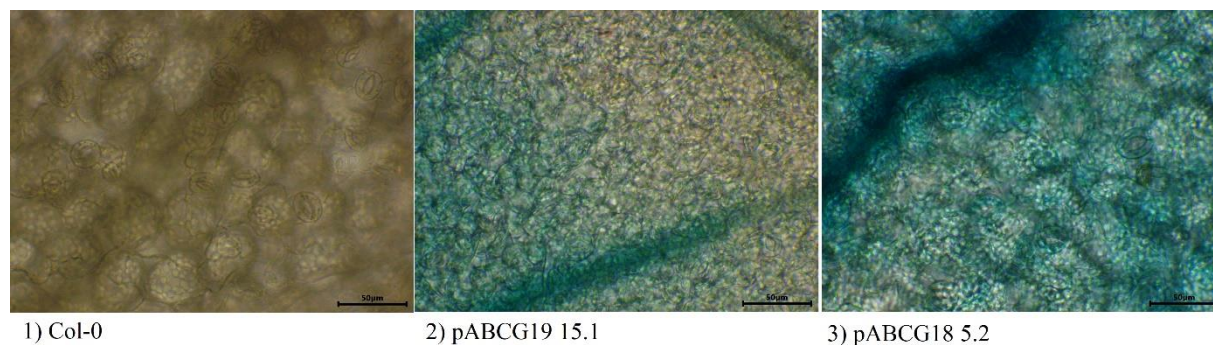
3) pABCG19-GUS 17.2

Joonis 3. GUS signaal lehe epidermis. Pildistatud 200-kordse suurendusega. Mõõteskaala on 100 μm pikk.

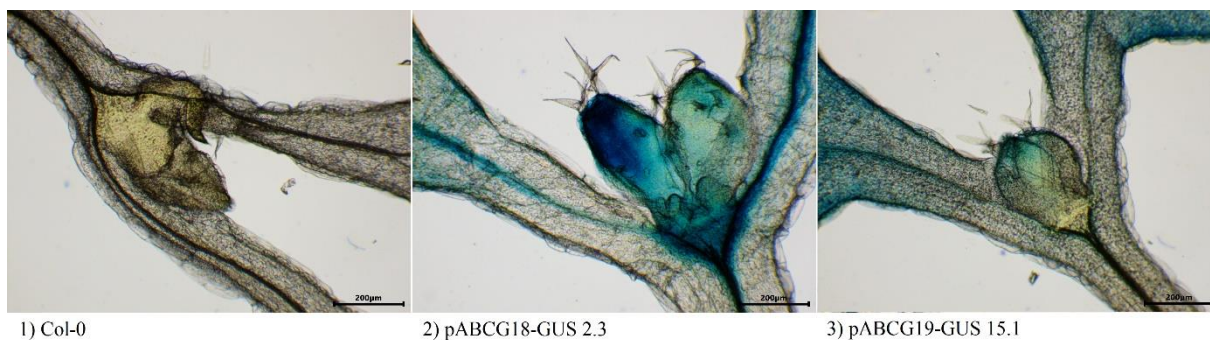
Ka seemikutes, pärast GUS-värvimist, täheldasin ootuspäraseid tulemusi – transgeensete taimede koed värvusid, metsiktüüp aga ei värvunud. Vaadeldes seemikute lehti (Joonis 4 ja 5) oli märgata värvumist terves lehelabas ja juhtsoontes. Lisaks märkasid ka seemikute arenevates lehtedes (Joonis 6) ja juurtes (Joonis 7) värvumist.



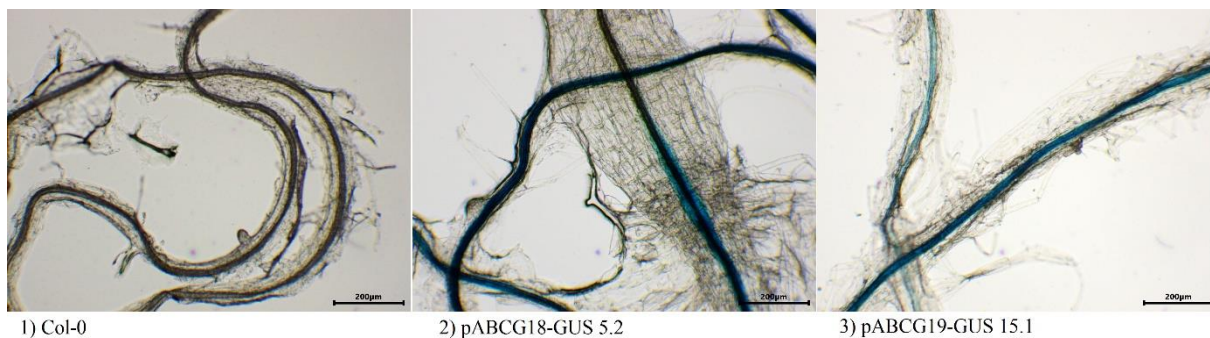
Joonis 4. GUS signaal lehtedes. Pildistatud 40-kordse suurendusega. Mõõteskaala on 500 µm pikk.



Joonis 5. GUS signaal lehtedes. Pildistatud 400-kordse suurendusega. Mõõteskaala on 50 µm pikk.



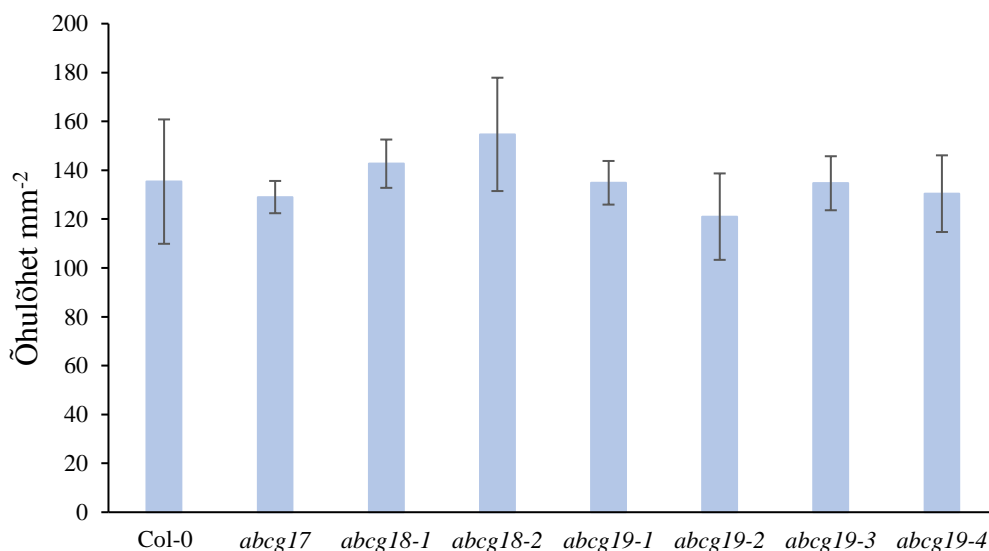
Joonis 6. GUS signaal taime seemikutes. Pildistatud 100-kordse suurendusega. Mõõteskaala on 200 µm pikk.



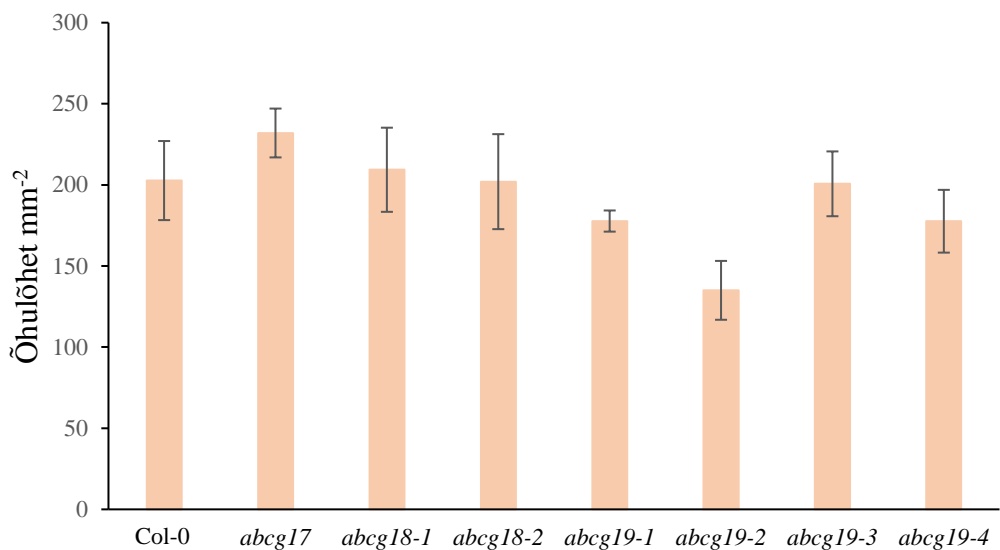
Joonis 7. GUS signaal taime seemikute juurtes. Pildistatud 100-kordse suurendusega. Mõõteskaala on 200 µm pikk.

2.3.2. Õhulõhede tihedus *abcg17*, *abcg18* ja *abcg19* mutantides

Õhulõhede tihedusi uurides ei esinenud *ABC17*, *ABC18* ega *ABC19* geeni defektiga taimede ja metsiktüüpi taimede vahel erinevusi ei lehe ülemiste (Joonis 8) ega alumiste (Joonis 9) õhulõhede tiheduses.

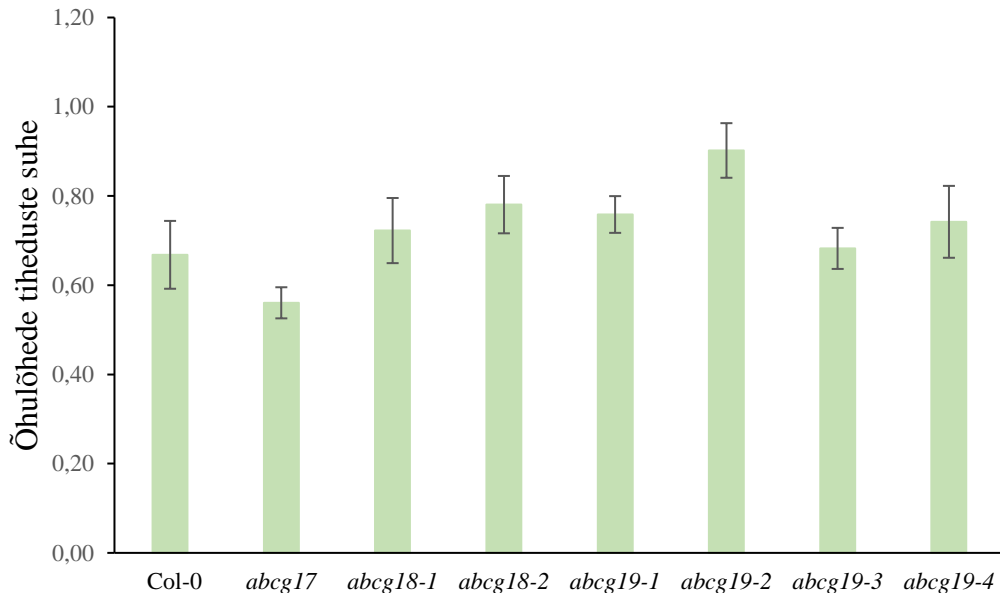


Joonis 8. Ülemiste õhulõhede tihedus. Joonis näitab taime lehe ülemise külje õhulõhede arvu ühe ruutmillimeetri kohta. Valimi suurus $n=6$. Tulbad esitavad keskmisi, vearibad näitavad standarddviaga. Rühmade vahelisi statistilisi erinevusi ühefaktorilise dispersioonanalüüsiga ei leitud ($p = 0.93$)



Joonis 9. Alumiste õhulõhede tihedus. Joonis näitab taime lehe alumise külje õhulõhede arvu ühe ruutmillimeetri kohta. Valimi suurus $n=6$. Tulbad esitavad keskmisi, vearibad näitavad standardviga. Rühmade vahelisi statistilisi erinevusi ühefaktorilise dispersioonanalüüsiga ei leitud ($p = 0.40$)

Erinevate *ABCG* geenide mutantide õhulõhede tiheduste suhet vaadates (Joonis 10) on näha, et see on sarnane metsiktüüpi Col-0 taimede õhulõhede tiheduste suhtega.



Joonis 10. Õhulõhede tiheduste suhe. Joonis näitab taime lehe ülemise ja alumise külje õhulõhede tiheduste suhet. Valimi suurus $n=6$. Tulbad esitavad keskmisi, vearibad näitavad standardviga. Rühmade vahelisi statistilisi erinevusi ühefaktorilise dispersioonanalüüsiga ei leitud ($p = 0.74$)

2.4. Arutelu

2.4.1. GUS värvimine

GUS-reportervalgu signaali nägemine taime epidermis ja seemikutes näitab, et geenide *ABCG18* ja *ABCG19* promootorid on aktiivsed nii taime arenevates lehtedes, juurtes kui ka õhulõhedes. Transgeensete taimeliinide, p*ABCG18* 5.2, p*ABCG18*-GUS 8.3, p*ABCG18*-GUS 9.3, p*ACBG19*-GUS 15.1 ja p*ABCG*-GUS 17.2, värvunud seemikute lehed ja juured ning õhulõhed näitavad, et geenid *ABCG18* ja *ABCG19* on aktiivsed nendes piirkondades. Seega saab öelda, et nendel geenidel on arvatavasti funktsioon õhulõhedes. Seemikute kudede värvumine annab indikatsiooni, et geenid *ABCG18* ja *ABCG19* omavad funktsiooni taime kudede välja arenemisel. Kuna *ABCG18* on ABA transporter (Zhang jt, 2021), siis selle promootori aktiivsus seemikutes ja nendes arenevates lehtedes võib tähendada, et ABA transport läbi *ABCG18/19* võib olla oluline taime varajases arengus.

Töös loodud promootorliine saab kasutada ka selleks, et hinnata, kas ja kuidas GUS signaal muutub kui neid transgeenseid taimi töödeldakse ABA-ga. Huvitav oleks vaadelda, kas muutub GUS signaali asukoht või tugevus. See annaks parema arusaama geenide *ABCG18* ja *ABCG19* olemusest ja võimalikust rollist ABA transporteritena.

2.4.2. Õhulõhede tihedus

Katses uuritud metsiktüüpi Col-0 taimede ja geenide *ABCG17*, *ABCG18* ja *ABCG19* mutantide *abcg17*, *abcg18-1*, *abcg18-2*, *abcg19-1*, *abcg19-2*, *abcg19-3* ja *abcg19-4* õhulõhede tihedus ei olnud statistiliselt oluliselt erinev ei lehe ülemiste õhulõhede (Joonis 8.) ega alumiste õhulõhede puhul (Joonis 9).

Võib oletada, et häiritud geenid ei mõjuta eriliselt õhulõhede diferentseerumist. Samas on need tulemused üksikmutantidest, mille põhjal ei saa selgelt oletada, et *ABCG17*, *ABCG18* ega *ABCG19* ei oma mingit rolli õhulõhede arengus. Kirjandusest tuleb välja, et ABC-transporterite perekonna G valke on palju ning nad suudavad üpris hästi asendada üksteise rolle (Zhang jt, 2021, Merilo jt, 2015). Seega järelتان, et just geenide rollide üle võtmine võis juhtuda. Täpselt ei saa öelda, kas ühte geeni asendas mõni teine geen, näiteks *ABCG17* rolli võttis hoopis üle *ABCG18*. Võibolla asendas ühe geeni rolli hoopis aga mõlemad teised geenid, näiteks *ABCG18* rolli võttis üle nii *ABCG17* kui ka *ABCG19*. Selleks, et kontrollida *ABCG17*, *ABCG18* ja *ABCG19* rolli õhulõhede arengus täpsemalt, tuleks luua järgmisena hoopis kõrgemat järku mutante, kus taimel on samal ajal häiritud mitu geeni korraga. Topelt- või kolmikmutantide loomiseks tuleks kasutada näiteks CRISPR/Cas9 meetodit.

Kokkuvõte

Antud töö üheks eesmärgiks oli iseloomustada geenide *ABCG18* ja *ABCG19* ekspressioonimustrit *Arabidopsis thaliana*'s. Selleks konstrueerisin promootor-GUS reportersüsteemiga transgeensed taimeliinid, kus GUS geen oli vastava *ABCG* geeni promootori kontrolli all. Leidsin, et geenid on aktiivsed noortes taimedes, taime epidermis ja õhulõhedes, mis viitab, geenid *ABCG18* ja *ABCG19* omavad funktsiooni taime kudede välja arenemisel ja õhulõhedes.

Teiseks eesmärgiks oli analüüsida geenide *ABCG17*, *ABCG18* ja *ABCG19* rolli õhulõhede paiknemise kujunemisel lehtedes, milleks uurisin häiritud *ABCG17*, *ABCG18* ja *ABCG19* geeni funktsiooniga taimeliinide õhulõhede paiknemise mustreid. Uurides nii taime lehe ülemiste kui ka alumiste õhulõhede tihedust, ei leitud statistilisi erinevusi mutantliinide ja metsiktüüpi taimede vahel. Võib oletada, et häiritud geenid ei mõjuta eriliselt õhulõhede diferentseerumist. Samas on need tulemused üksikmutantidest, mille põhjal ei saa selgelt oletada, kas *ABCG17*, *ABCG18* ega *ABCG19* omab mingit rolli õhulõhede arengus. Eeldan, et geenide rolli ülevõtmine võis juhtuda, kuna see on üpris tavapärane juhtum ABC-transporterite perekonna G valkude puhul. Selleks, et kontrollida *ABCG17*, *ABCG18* ja *ABCG19* rolli õhulõhede arengus täpsemalt, tuleks luua kõrgemat järku mutante, kus transgeensel taimel on samal ajal häiritud mitu geeni korraga.

Resümee

Expression pattern of the *ABCG18* and *ABCG19* genes in mouse-ear cress (*Arabidopsis thaliana*) and their importance in stomatal development

Heiki Reila

Summary

Stomata are of great importance to plants, that are formed by two guard cells and an air gap between, which opens or closes depending on turgor pressure change in guard cells. Stomata regulate gas exchange which allows the movement of CO₂ for photosynthesis and controlling the amount of water leaving the plant and the movement of O₂ out of the plant.

One of the goals of this work was to characterize the expression pattern of the *ABCG18* and *ABCG19* genes in *Arabidopsis thaliana*. To do this, I constructed transgenic plant lines with a promoter-GUS reporter system, where the GUS gene was under the control of the respective gene promoters. I found that the genes are active in the seedlings, mature epidermis and stomata of the plant, which suggests that the *ABCG18* and *ABCG19* genes have a function in the development of plant tissues and in stomata.

The second goal was to analyze the role of the *ABCG17*, *ABCG18* and *ABCG19* genes in the development of stomatal density and location in leaves, for which I studied the stomatal location patterns of plant lines with disrupted *ABCG17*, *ABCG18* and *ABCG19* gene function. When examining the stomatal density on the upper and lower surfaces of the plant leaf, no statistically significant differences were found between the mutant lines and the wild-type plants. It can be assumed that the disrupted genes do not particularly affect stomatal differentiation. However, these results are from single mutants, which do not clearly suggest whether *ABCG17*, *ABCG18* or *ABCG19* have any role in stomatal development. I assume that gene role takeover may have occurred, as this is a fairly common occurrence for G proteins of the ABC transporter family. In order to test the role of *ABCG17*, *ABCG18* and *ABCG19* in stomatal development more precisely, higher-order mutants should be created, where several genes are disrupted at the same time in the transgenic plants.

Tänuõnad

Esiteks soovin südamest tänada oma juhendajat Dr. Hanna Hõrakut, kes andis mulle võimaluse enda käe all koostada antud töö, kes ei pelgand ühtegi küsimust, vaid leidis kõigile suurepäraseid vastused ning kes on olnud mulle suureks inspiratsiooniks. Lisaks soovin tänada ka, Mikk Välbet ja Ingmar Tulvat, kellega sai arutada iga teema üle, mis puudutas laboritööd. Lõpuks soovin tänada ka kõiki teisi Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudi taimefüsioloogia labori töötajaid imelise keskkonna loomisel ja seltskonna pakkumisel.

Kirjanduse loetelu

Boursiac, Y., Lérans, S., Corratgé-Faillie, C., Gojon, A., Krouk, G. & Lacombe, B. (2013). Trends in Plant Science, 18(6), 325-333

Burris, K., Mentewab, A., Ripp, S., & Stewart, N. Jr. (2018). An Arabidopsis thaliana ABC transporter that confers kanamycin resistance in transgenic plants does not endow resistance to Escherichia coli. Microbial Biotechnology 1(2), 191-195. doi:10.1111/j.1751-7915.2007.00010.x

Davis, M. W., & Jorgensen, E. M. (2022). ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program. Front. Bioinform, 2(818619). doi:10.3389/fbinf.2022.818619

Driesen, E., De Proft, M., & Saeys, W. (2023). Drought stress triggers alterations of adaxial and abaxial stomatal development in basil leaves increasing water-use efficiency. Horticulture Research, 10(6). doi:10.1093/hr/uhad075

Finkelstein, R. (2013). Abscisic Acid Synthesis and Response. The Arabidopsis Book, 11, e0166. doi:10.1199/tab.0166

Gräfe, K., & Schmitt, L. (2020). The ABC transporter G subfamily in Arabidopsis thaliana. Journal of Experimental Botany. doi:10.1093/jxb/eraa260

Jalakas, P., Merilo, E., Kollist, H., & Brosché, M. (2018). ABA-mediated regulation of stomatal density is OST1-independent. Plant Direct 2(9), e00082. doi:/10.1101/335810

Jalakas, P., Tulva, I., Bērziņa, N. M., & Hörak, H. (2024). Stomatal patterning is differently regulated in adaxial and abaxial epidermis in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany, 75(20), 6476-6488

Kang, J., Hwang, J., Lee, M., Kim, Y., Assmann, S. M., Martinoia, E., & Lee, Y. (2010) PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. The Proceedings of the National Academy of Sciences 107(5), 2355-2360. doi:10.1073/pnas.0909222107

Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretschmar, T., Lee, Y., & Martinoia, E. (2011). Plant ABC Transporters. Arabidopsis Book, 6(9), e0153

Kanno, Y., Hanada, A., Chiba, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Matsui, M., Koshihara, T., Kamiya, Y., & Seo, M. (2012). Identification of an abscisic acid transporter by functional

- screening using the receptor complex as a sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(24), 9653-9658. doi:10.1073/pnas.1203567109
- Kuromori, T., Mitsunori, S., & Shinozaki, K. (2018). ABA Transport and Plant Water Stress Responses. *Trends in Plant Science*, 23(6), 513-522. doi:10.1016/j.tplants.2018.04.001
- Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., Moriyama, Y., & Shinozaki, K. (2010). ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(5), 2361-2366. doi:10.1073/pnas.0912516107
- Lau, O. S., & Bergmann, D. C. (2012). Stomatal development: a plant's perspective on cell polarity, cell fate transitions and intercellular communication. *Development* 139(20), 3683-3692
- MacAlister, C. A., Ohaski-Ito, K. & Bergmann, D. C. (2007). Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature* 445(7127), 537-540 doi:10.1038/nature05491
- Mentewab, A., Matheson, K., Adebisi, M., Robinson, S., & Elston, B. (2014) RNA-seq analysis of the effect of kanamycin and the ABC transporter AtWBC19 on *Arabidopsis thaliana* seedlings reveals changes in metal content. *PLoS One* 13;9(10), e109310. doi:10.1371/journal.pone.0109310
- Merilo, E., Jalakas, P., Kollist, H., & Brosché, M. (2015). The Role of ABA Recycling and Transporter Proteins in Rapid Stomatal Responses to Reduced Air Humidity, Elevated CO₂, and Exogenous ABA. *Molecular Plant* 8(4), 657-659. doi:/10.1016/j.molp.2015.01.014
- Muir, C. D. (2015). Making pore choices: repeated regime shifts in stomatal ratio. *Proceedings of the Royal Society B* 282(1813), doi:/10.1098/rspb.2015.1498
- Ohashi-Ito, K. & Bergmann, D. C. (2006). *Arabidopsis* FAMA Controls the Final Proliferation/Differentiation Switch during Stomatal Development. *The Plant Cell*, 18(10), 2493-2505. doi:10.1105/tpc.106.046136
- Pillitteri, L. J., Sloan, D. B., Bogenschutz, N. L., & Torii, K. U. (2007). Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. *Nature* 445(7127), 501-505. doi:10.1038/nature05467
- Raghavendra, A. S., Gonugunta, V. K., Christmann, A., & Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science*, 15(7), 395-401

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671-675. doi:10.1038/nmeth.2089

Sharp, R. E., LeNoble, M. E., Else, M. A., Thorne, E. T., & Gherardi, F. (2000). Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. *Journal of Experimental Botany*, 51(350), 1575-1584. doi:10.1093/jexbot/51.350.1575

Shimazaki, K., Doi, M., Assmann, S. M., & Kinoshita, T. (2007). Light Regulation of Stomatal Movement. *Annual Review of Plant Biology*, 58(1), 219-247. doi:10.1146/annurev.arplant.57.03290

Zhang, H., Zhu, H., Pan, Y., Yu, Y., Luan, S., & Li, L. (2014). A DTX/MATE-Type Transporter Facilitates Abscisic Acid Efflux and Modulates ABA Sensitivity and Drought Tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 7(10), 1522-1532. doi:10.1093/mp/ssu063

Zhang, Y., Anfang, M., Rowe, J. H., Rizza, A., Li, Z., Su, N., Bar, H., Charrier, L., Geisler, M., Jones, A. M., & Shani, E. (2025) ABA importers ABCG17 and ABCG18 redundantly regulate seed size in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 121(6), e70096. doi:10.1111/tpj.70096

Zhang, Y., Kilambi, H. V., Liu, J., Bar, H., Lazary, S., Egbaria, A., Ripper, D., Charrier, L., Belew, Z. M., Wulff, N., Damodaran, S., Nour-Eldin, H. H., Aharoni, A., Ragni, L., Strader, L., Sade, N., Weinstain, R., Geisler M., & Shani, E. (2021), ABA homeostasis and long-distance translocation are redundantly regulated by ABCG ABA importers. *ScienceAdvances*, 7(43), 1-17. doi:10.1126/sciadv.abf6069

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

Xiong, L. (2003). Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant physiology*, 133(1), 29-36. doi:10.1104/pp.103.025395

Yang, X., Gavya, L., Zhou, Z., Urano, D., & Lau, S. (2022) Abscisic acid regulates stomatal production by imprinting a SnRK2 kinase-mediated phosphocode on the master regulator SPEECHLESS. *Science Advances* 8(40), eadd2063. doi:10.1126/sciadv.add2063

Töös kasutatud veebiallikad:

<https://www.favorgen.com/data/manual/files/1679534782968656194.pdf> viimane ligipääs 25.05.2025

<https://www.favorgen.com/data/manual/files/1743496768419737378.pdf> viimane ligipääs 25.05.2025

<https://www.favorgen.com/data/manual/files/1743496859535521619.pdf> viimane ligipääs 25.05.2025

https://microscopy.tamu.edu/wp-content/uploads/2018/08/GUS_Localization_in_plants.pdf viimane ligipääs 25.05.2025

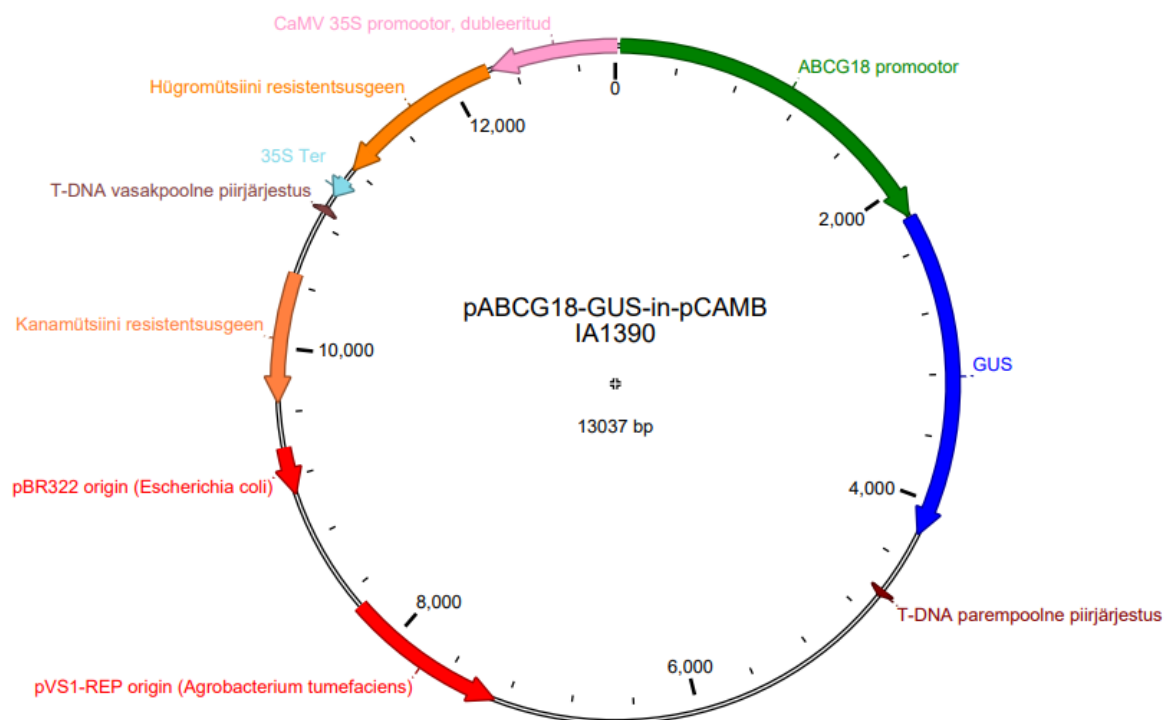
<https://www.thermofisher.com/ee/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html> viimane ligipääs 25.05.2025

<https://www.thermofisher.com/ee/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html> viimane ligipääs 25.05.2025

abidopsis.org ligipääs 25.05.2025

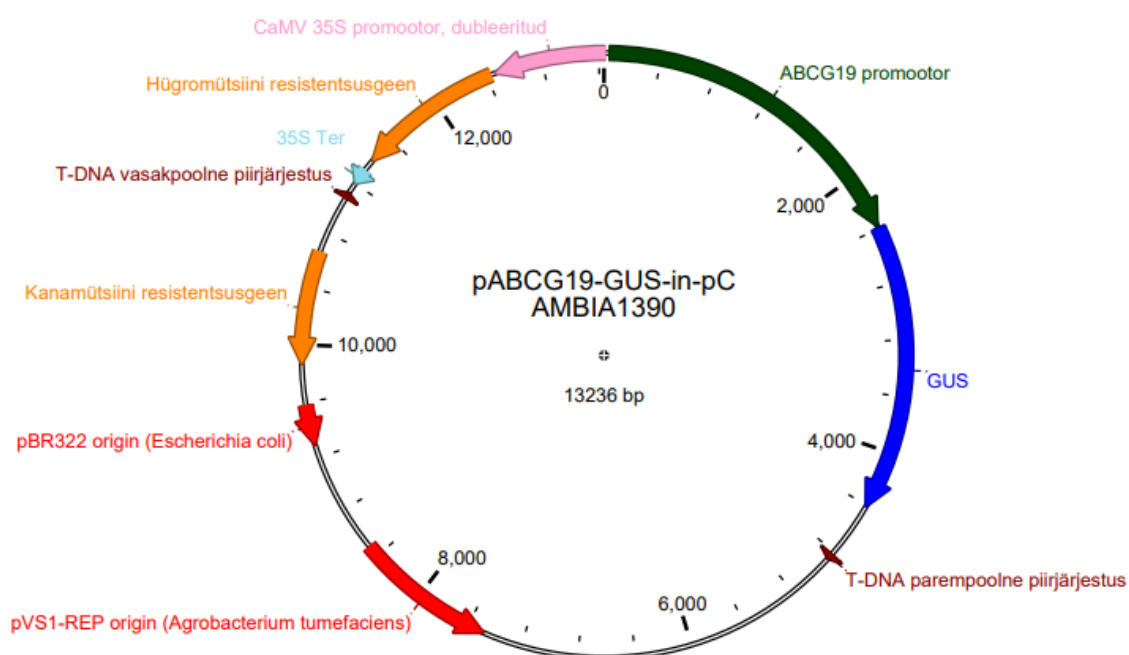
Lisad

Lisa 1. Plasmiid pABCG18-GUS-pCAMBIA1390



Joonis 11. pABCG18-GUS-pCAMBIA1390. Joonisel pole märgitud kõik, vaid olulisemad plasmidi regioonid.

Lisa 2. Plasmiid pABC19-GUS-pCAMBIA1390



Joonis 12. pABC19-GUS-pCAMBIA1390. Joonisel pole märgitud kõik, vaid olulisemad plasmidi regioonid.

Lihlitsents

Mina, Heiki Reila,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) minu loodud teose „ABCG18 ja ABCG19 ekspressioonimuster harilikus müürloogas (*Arabidopsis thaliana*) ja roll õhulõhede arengus“, mille juhendaja on Dr. Hanna Hõrak, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Heiki Reila

25.05.2025