

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

Triinu Arjus

HT1 kinaasi roll õhulõhede regulatsioonis tomat

Magistritöö

30EAP

Juhendajad prof. Hannes Kollist

Kaspar Koolmeister, MSc

Tartu 2020

Infoleht

HT1 kinaasi roll õhulõhede regulatsioonis tomat

Õhulõhed on taimede vartel ja lehtedel asuvad kahe sulgrakuga ümbritsetud avased, mille kaudu toimub taime gaasivahetus ümbritseva keskkonnaga. Kuna fotosünteesiks vajaliku süsihappegaasi omistamise arvelt kaotab taim transpiratsiooni tõttu vett on õhulõhede oluline ülesanne reageerida keskkonna tingimuste muutustele. Õhulõhede regulatsiooni mõistmine aitab luua kliimamuutustele vastupidavamaid taimi. Üks võtmekomponent õhulõhede reageerimisel keskkonna CO₂ muutustele on HT1 kinaas, mille rolli on näidatud harilikus müürloogas. Käesolevas töös uuriti HT1 kinaasi paralleelset toimimist tomat, mis on oluline põllukultuur. Selleks kasutati tomati sordi M82 *HT1* topelmutantseid (*tht1-1/tht1-2*) ja kontrollina M82 metsiktüüpi taimi, mõõtes nende reageerimist erinevatele stiimulitele gaasivahetuskatsetes ning põuast tuleneva stressi taluvust. Tulemustest selgus, et mutantsed tomatitaimed ei reageeri CO₂ kontsentratsiooni muutustele ning peavad põua tingimustes paremini vastu kui metsiktüüpi taimed.

Õhulõhe, tomat, HT1 kinaas, gaasivahetus, põud

CERCS: B310 Soontaimede füsioloogia , B225 Taimogeneetika

The role of the HT1 kinase in stomatal regulation of tomato plants

Stomata are small pores on plant stems and leaves which are formed by two guard cells. Their role is to facilitate plant gas exchange with the surrounding environment. In order to obtain carbon dioxide for photosynthesis the plant loses water during transpiration, hence it is an important task for the guard cells to react to the changing environment. Understanding the stomatal regulation is necessary for creating plants that are more economical and resilient to harsh conditions. One key component for stomatal reactions to the CO₂ changes in the surrounding environment is HT1 kinase, which has been previously described in *A. thaliana*. In this thesis the role of HT1 kinase was studied in tomato, an important crop species. Tomato line M82 double-mutant *HT1* (*tht1-1/tht1-2*) plants were used for gas exchange and drought stress experiments, M82 line wild-type were used as control plants. The mutant tomato plants do not react to changes in CO₂ concentration and have better drought tolerance than wild-type plants.

Stoma, tomato, HT1 kinase, gas-exchange, drought

CERCS: B310 Physiology of vascular plants, B225 Plant Genetics

Sisukord

Infoleht	2
Sisukord	3
Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	7
1. Kirjanduse ülevaade	8
1.1 Solanum lycopersicum ehk kultiveeritud tomat	8
1.2 Õhulõhed ja nende regulatsioon	9
1.2.1 Õhulõhede avanemine	10
1.2.2 Õhulõhede sulgumine	11
1.3 Õhulõhede regulatsioon vastusena CO2 muutustele	12
1.4 HT1 kinaas	14
1.5 Õhulõhede regulatsioon vastusena valgusele ja pimedusele	17
1.5.1 Reageerimine valgusele	18
1.5.2 Reageerimine pimedusele	19
1.6 ABA ehk abtsiishape	20
1.7 Veekasutuse efektiivsus	21
1.8 Taimede tsirkadiaanne ehk ööpäevane rütm	22
2. Eksperimentaalosa	25
2.1 Töö eesmärgid	25
2.2 Materjal ja meetodika	25
2.2.1 Geenmuundatud tomatid	25
2.2.2 Taimede kasvatamine	26
2.2.3 Katsepartuur	27
2.2.4 Katsete läbiviimine	29
2.2.4.1 Gaasivahetus	29
CO2 kontsentratsiooni muutustele reageerimise osa	29
Veeauru rõhu defitsiidile (VPD-le) reageerimise osa	29
ABAga pritsimine	30
2.2.4.2 Põuastressi katse	30
Märg- ja kuivmass	31
2.2.5 Andmeanalüüs	32
2.3 Tulemused	33
2.3.1 Gaasivahetus	33
2.3.1.1 Õhulõhede öine juhtivus	33
2.3.1.2 Õhulõhede avanemine valguse toimetel	34
2.3.1.3 Õhulõhede reageerimine CO2 muutustele	34
2.3.1.4 Õhulõhede reageerimine VPDle	37

2.3.1.5 Õhulõhede reageerimine ABAle	37
2.3.1.6 Veesäästmise hindamine gaasivahetuse tulemuste põhjal	38
2.3.2 Põuastress	39
2.3.2.1 Märg- ja kuivmass	41
2.4 Arutelu	42
2.4.1 HT1 kinaasi roll õhulõhede regulatsioonil	42
2.4.2 Öine juhtivus ning avanemine valguse toimet	44
2.4.3 Reageerimine CO2 taseme muutustele	44
2.4.4 Õhulõhede sulgumine vastusena VPD ja ABA rakendamisele	45
2.4.5 Põuastress	46
Kokkuvõte	48
Resümee	49
Tänuavaldused	50
Kasutatud kirjandus	51
Kasutatud veebiaadressid	57
Lisad	58
Lihtlitsents	62

Kasutatud lühendid

β CA1 - β -karboonhappe anhüdraas 1

β CA4 - β -karboonhappe anhüdraas 4

ABA - abstsiiishape

ABCB14 - ABC TRANSPORTER 14, sulgrakkudesse malaati transportiv kanal

ABI1 - ABSCISIC ACID INSENSITIVE 1, ABA signaalrajas osalev fosfataas

ABI2 - ABSCISIC ACID INSENSITIVE 1, ABA signaalrajas osalev fosfataas

AKT1 - ARABIDOPSIS THALIANA K^+ TRANSPORTER 1, sulgrakkudesse K^+ ioone transportiv kanal

ALMT12 - ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 12, õhulõhede sulgumisel osalev R-tüüpi anioonkanal

BHP - BLUE LIGHT-DEPENDENT H^+ -ATPASE PHOSPHORYLATION, õhulõhede sinisele valgusele reageerimisel osalev kinaas

BLUS1 - BLUE LIGHT SIGNALING 1, õhulõhede sinisele valgusele reageerimisel osalev kinaas

CBC1 - CONVERGENCE OF BLUE LIGHT AND CO_2 1, õhulõhede regulatsioonis osalev kinaas

CBC2 - CONVERGENCE OF BLUE LIGHT AND CO_2 2, õhulõhede regulatsioonis osalev kinaas

CCA1 - CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1, müürlooga ööpäevast rütmi reguleeriv valk

CHL1 - DUAL AFFINITY NITRATE TRANSPORTER 1, NO_3^- ioone sulgrakkudesse transportiv kanal

COP1 - CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1, õhulõhede regulatsioonis osalev valk

CRY1 - CRYPTOCHROME 1, krüptokroom; sinise valguse tajumise retseptor

CRY2 - CRYPTOCHROME 2, krüptokroom; sinise valguse tajumise retseptor

GHR1 - GUARD CELL HYDROGEN PEROXIDE-RESISTANT 1, õhulõhede regulatsioonis vastusena CO_2 kontsentratsiooni muutustele osalev pseudokinaas

GORK - GATED OUTWARDLY-RECTIFYING K^+ CHANNEL, sulgrakkudest K^+ ioone välja transportiv kanal

H^+ -ATPaas - prootonpump, mis osaleb õhulõhede regulatsioonis

HT1 - HIGH LEAF TEMPERATURE 1, võtmekinaas õhulõhede regulatsioonis vastusena CO_2 kontsentratsiooni muutustele

KAT1 - POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 1, sulgrakkudesse K^+ ioone transportiv kanal

KAT2 - POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 2, sulgrakkudesse K⁺ ioone transportiv kanal

LHY - LATE ELONGATED HYPOCOTYL, müürlooga ööpäevast rütmi reguleeriv valk

MAP - MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES; MAPKs, rakusiseste protsesside regulatsioonis osalevate kinaaside perekond

MPK4 - MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 4, õhulõhede regulatsioonis osalev kinaas

MPK12 - MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 12, õhulõhede regulatsioonis osalev kinaas

OST1 - OPEN STOMATA 1, õhulõhede regulatsioonis osalev kinaas

PHOT1 - PHOTOTROPIN 1, fototropiin; sinise valguse tajumise retseptor

PHOT2 - PHOTOTROPIN 2, fototropiin; sinise valguse tajumise retseptor

PIP1 - PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1, akvaporiin, mille kaudu siseneb CO₂ rakku

PIP2 - PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2, akvaporiin, mille kaudu siseneb CO₂ rakku

PP1 - PROTEIN PHOSPHATASE 1, õhulõhede sinisele valgusele reageerimisel osalev fosfataas

PP2C - PROTEIN PHOSPHATASE 2C, ABA signaalrajas osalev fosfataas

PRSL1 - PP1 REGULATORY SUBUNIT 2- LIKE PROTEIN 1, PP1 fosfataasi subühik

PYL - PYR1- LIKE, RCAR hulka kuuluv ABAga seonduv regulatoorne valk

PYR1 - PYRABACTIN RESISTANCE 1, RCAR hulka kuuluv ABAga seonduv regulatoorne valk

RCAR - REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTORS, ABAga seonduv retseptor

SLAC1 - SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1, õhulõhede sulgumisel osalev S-tüüpi anioonkanal

SLAH3 - SLAC1 HOMOLOG 3, sulgrakkudest peamiselt NO₃⁻ ioone välja transportiv S-tüüpi anioonkanal

SP - SELF PRUNING, tomati kasvu reguleeriv valk

TOC1 - TIMING OF CAB EXPRESSION 1, müürlooga ööpäevast rütmi reguleeriv valk

VPD, *Vapour pressure deficiency* - veeauru rõhu defitsiit

WUE, *Water Use Efficiency* - veekasutuse efektiivsus

Sissejuhatus

Globaalne soojenemine ning kliimamuutused avaldavad mõju põllumajandusele, ohustades jätkusuutlikku põlluharimist traditsioonilistes põllumajanduspiirkondades. Vähenenud sademete või ebaühtlaste vihmaperioodide tõttu on taimede kasv häiritud, mis omakorda põhjustab saagikuse langust. Põlluharimise säilitamiseks kuivemates piirkondades tuleb leida viise, kuidas põllukultuure muutuval tingimustele paremini vastupidavamaks teha.

Taimed seovad atmosfäärist süsihappegaasi, mida kasutatakse fotosünteesil orgaaniliste ühendite sünteesiks. Süsihappegaasi omistamise arvelt kaotavad taimed ümbritsevasse keskkonda vett transpiratsiooni tõttu. Gaasivahetus toimub läbi vartel ja lehtedel asuvate mikroskoopiliste pooride, mida nimetatakse õhulõhedeks. Õhulõhe koosneb kahest sulgrakust ning sulgrakkude vahele jäävast õhupilust, mille avatust reguleeritakse sulgrakkude turgori muutmise abil. Õhulõhed on võimelised kiiresti reageerima keskkonna tingimuste muutustele, avanedes vastusena valgusele, kõrgele õhuniiskusele ning madalale CO₂ kontsentratsioonile. Sulgumist põhjustavateks stiimuliteks on kõrge CO₂ tase, ABA, madal õhuniiskus või patogeenide rünnak. Avatud õhulõhede kaudu kaotavad taimed transpiratsiooni tõttu enamuse ammutatud veest, seega üheks variandiks muutuval kliimale vastupidavamate taimede aretamiseks on õhulõhede regulatsiooniga manipuleerimine.

CO₂ taseme muutustele reageerimiseks on oluline roll HT1 kinaasil, mille puudumisel on õhulõhede regulatsioon tugevalt häiritud. Varasemates töodes hariliku müürloogaga on *ht1* mutantsed taimed CO₂ kontsentratsiooni muutustele tundetud ning õhulõhede juhtivus on langenud retsessiivsete mutantide puhul, mille tõttu kaotavad taimed vähem vett. Antud töö eesmärgiks oli uurida HT1 kinaasi paralleelset toimimist olulises põllukultuuris - kultiveeritud tomatil (*S. lycopersicum*). Selleks kasutati liini M82 metsiktüüpi ning *HT1* mutantseid tomatitaimi, jälgides nende õhulõhede reageerimist erinevatele stiimulitele gaasivahetuse katsetes ning vastupidavust põuastressile.

Töö koostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis taimsete signaalide uurimisrühmas koostööna Iisraeli ülikooli töörühmaga (Dr. Assaf Mosquna, The Robert H. Smith Institute of Plant Sciences and Genetics in Agriculture, Faculty of Agriculture, Hebrew University of Jerusalem)

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 *Solanum lycopersicum* ehk kultiveeritud tomat

Harilik tomat kuulub maavitsaliste (*Solanaceae*) sugukonda, mis sisaldab üle 3000 liigi. Sinna alla kuuluvad ka näiteks kartul, baklažaan, vääristubakas ja vürtspaprika. Tomat on pärit Lõuna-Ameerikast ning Euroopasse toomisel langes tomati geneetiline mitmekesisus, mis on umbes 5% lähedase metsiku liigi geneetilisest mitmekesisusest (Menda *et al.*, 2014). Selektiivse ristamise tulemusel on *S. lycopersicum* haigustele vähem resistentne, seetõttu on tomatikasvatajad ristanud kultiveeritud liine tagasi lähedaste metsikute liikidega alates aastast 1917 (Menda *et al.*, 2014). Tomateid kasvatatakse peamiselt kasvuhoonetes ja kõrgema CO₂ kontsentratsiooni juures, soodustamaks taimede kasvu (Yelle *et al.*, 1990). Kartuli järel on tomat üks maailmas enim tarbitavaid köögivilju, teaduses kasutatakse tomatit põllukultuuri ning vilja arengu uurimise mudelorganismina, seega on tomatitaimedes toimuvate molekulaarsete protsesside mõistmine oluline (Foolad ja Panthee, 2012). Aastal 1994 oli tomat nimega FLAVR SAVR esimene inimtarbeks müümise FDA (Food and Drug Administration, Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Raviamet) heakskiidu saanud geneetiliselt muundatud taim (Kramer ja Redenbaugh, 1994). Esimene sekveneeritud tomati genoom kuulus kultiveeritud liinile Heinz 1706, mis avaldati aastal 2012 (Sato *et al.*, 2012). Tomatil on 12 kromosoomi ning tema diploidne genoom on 900Mb suurune, mis sisaldab ligikaudu 35000 valku kodeerivat geeni (Sato *et al.*, 2012).

Kultiveeritud tomati genoomi uuringutel kasutatakse mudelorganismina Micro-Tom (*Micro tomato*) liini, mis on kasvult väike, lühikese elutsükliga, lihtne kasutada agrobakteri-vahendatud transformatsiooni läbiviimiseks ja erineb standartsetest tomati kultivaaridest kahe kasvu reguleeriva geeni poolest (Meissner *et al.*, 1997; Martí *et al.*, 2006). Micro-Tom liini üheks kääbuskasvu reguleerivaks geeniks on *SP* (SELF PRUNING), mille fenotüüpi täheldati ka mutantides M82 liinis (Pnueli *et al.*, 1998). Tomati M82 kultiveeritud liini on kirjeldatud põuatundlikuna (Gong *et al.*, 2010) ja teda on kasutatud teadustöös tomatitaimede omaduste uurimisel erinevate tomatiliinide ristamistel (Eshed ja Zamir, 1994; Pnueli *et al.*, 1998; Bolger *et al.*, 2014). M82 genoom sekveneeriti aastal 2014 ja genoomi järjestamiseks kasutati referentsina varasemalt sekveneeritud liini Heinz genoomi (Bolger *et al.*, 2014). Võrrelduna metsiku tomati genoomiga on M82 variatsioonidega rikastatud kromosoomides 4, 5 ja 11, mis arvatavasti on tulenenud liini *S. pimpinellifolium*'iga

ingressioonist. Vastavalt sekveneermisandmetele tõlgendamisele on metsiku tomati viljad tugevama maitsega kui kodustatud tomati viljad, sest viimases on lenduvate orgaaniliste ühendite tootmine vähenenud. Samas kultiveeritud tomatis on toimunud selektsioon mõru maitse vastu (Bolger *et al.*, 2014).

1.2 Õhulõhed ja nende regulatsioon

Õhulõhed on taimede lehtedel ning vartel paiknevad mikroskoopilised avaused, mille kaudu toimub gaasivahetus ümbritseva keskkonnaga. Need avaused ehk õhupilud on ümbritsetud kahe sulgrakuga ning sulgrakkude ülesanne on oma turgori muutmise abil reguleerida poori avatust vastusena väliskeskkonna ja taime sisekeskkonna stiimulitele (Joonis 1) (Kollist *et al.*, 2014). Muutustele reageerimine võib toimuda nii minutite jooksul kui ka palju aeglasemalt, näiteks kesta generatsioonide jooksul aastatuhandeid (Hetherington ja Woodward, 2003). Gaasivahetus väliskeskkonnaga on vajalik fotosünteesi jaoks süsihappegaasi omistamiseks, lisaks tekitab õhulõhede kaudu väljuv veeaur juurtest varte ja lehtede poole vee ja vees lahustunud mineraalide liikumise gradiendi (Kollist *et al.*, 2014).

Lisaks sulgrakkudele mõjutab osadel liikidel suure tõenäosusega poori avatust sulgrakke ümbritsevate epidermaalsete rakkude turgori muutused. Epidermaalsed rakud suruvad sulgrakke üksteise poole kokku, et nende vahele saaks tekkida avaus (Franks *et al.*, 1998). Katteseemnetaimede epidermaalsed rakud on sulgrakkudest suuremad, seega õhulõhede avanemiseks peab sulgrakkudes tekkiv turgor olema neid ümbritsevate rakkude omast oluliselt kõrgem (Wu *et al.*, 1985). Õhulõhede sulgumine võib olla häiritud, kui epidermaalsete rakkude turgor langeb, mille tulemusel õhulõhe hoopis avaneb (Iwanoffi efekt). Samal põhimõttel võib õhulõhede avanemine olla häiritud, kui epidermaalsetes rakkudes on kõrge turgor aga sulgrakkudes madal, mille tõttu surutakse õhulõhe mehaaniliselt kinni.

Sulgrakkude vakuoolid osalevad samuti õhulõhede regulatsioonil, muutes vakuooli lõigustatust, vakuoolis sisalduvaid ühendeid ning vakuooli membraanis paiknevad pumbad ja ionikanalid käituvad tsütoplasma suhtes plasmamembraani omadele vastupidiselt - õhulõhede avanemisel täidetakse vakuoolid ionide ja orgaaniliste ühenditega, õhulõhede sulgemisel väljutatakse ionid vakuoolidest tsütoplasmasse (Kollist *et al.*, 2014).

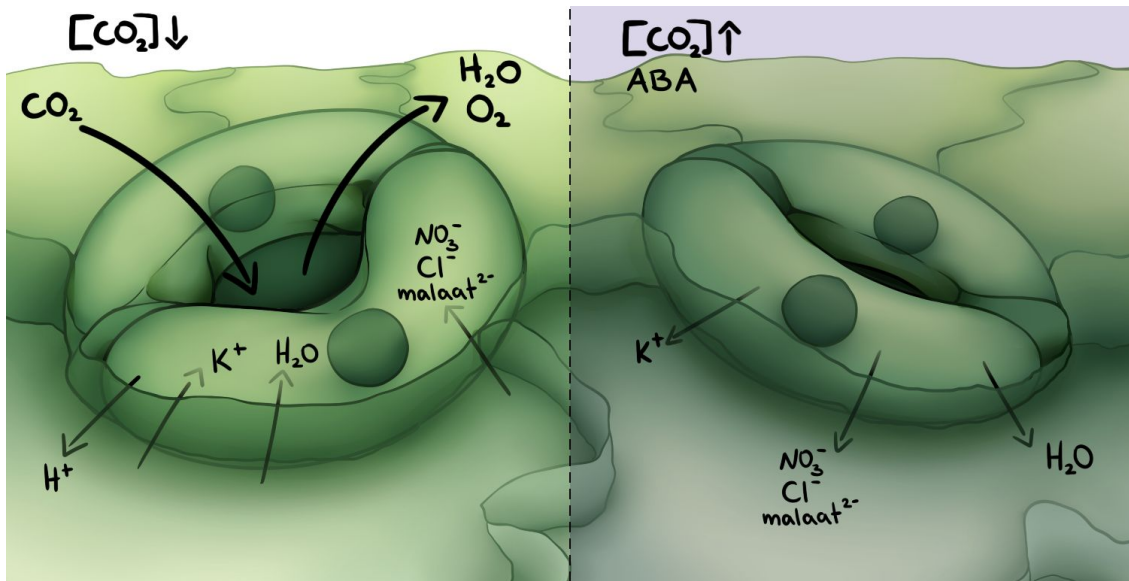
1.2.1 Õhulõhede avanemine

Õhulõhede avanemine toimub valguse käes ning süsihappegaasi kontsentratsiooni langemisel. Pooari avanemiseks aktiveeritakse sulgrakkude plasmamembraanis paiknevad H⁺-ATPaasid, mis pumpavad prootonid tsütoplastist apoplasti, mille tulemusel tekib membraani hüperpolariseeritus (Shimazaki ja Kondo, 1987). See on vajalik polarisatsioonist sõltuvate K⁺ kanalite aktiveerimiseks, mille tagajärjel liiguvad K⁺ ioonid sulgrakkudesse (Schroeder *et al.*, 1984). Harilikus müürloogas on K⁺ ioone sulgrakkude sisse transportivateks kanaliteks *Shaker*-tüüpi KAT1 (POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 1) ja KAT2 (POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 2) ning AKT1 (ARABIDOPSIS THALIANA K⁺ TRANSPORTER 1) (Szyroki *et al.*, 2001). Tänu rakkudesse sisenenud K⁺ ioonidele tekib positiivne laeng, mille kompenseerimiseks liiguvad rakkudesse CHL1 (DUAL AFFINITY NITRATE TRANSPORTER 1) kanali kaudu NO₃⁻ ioonid (Guo *et al.*, 2003). Lisaks sisenevad sulgrakkudesse apoplastist Cl⁻ ioonid kuid Cl⁻ ja teisi anioone transportivaid kanaleid pole veel kirjeldatud (Kollist *et al.*, 2014). Orgaanilistest ühenditest osalevad õhulõhede avanemisel osmootiliselt aktiivsed sukroos ja malaat, mis transporditakse rakkudesse või tekitatakse sulgraku siseselt tärglise lagundamisel (Santelia ja Lawson, 2016; Flütsch *et al.*, 2020). Malaati raku sisse importiv kanal on ABCB14 (ABC TRANSPORTER 14), mille puudumisel on õhulõhede avanemine aeglustunud kuid sulgumine kõrge CO₂ kontsentratsiooni korral kiirem (Lee *et al.*, 2008). Anioonide puhul ei ole sulgrakud nii valivad kuid katioonidest on eelistatud K⁺ ioonid (Humble ja Hsiao, 1970). Lisaks on õhulõhed võimelised avanema ka ilma plasmamembraani läbivate anioonideta, sest raku sees sünteesitud orgaanilised ühendid neutraliseerivad K⁺ ioonide laengu 91% ulatuses (Raschke ja Schnabl, 1978). Anioonide, orgaaniliste ühendite ja K⁺ ioonide kontsentratsiooni tõus sulgrakkudes tekitab madala veepotentsiaali, mis omakorda põhjustab vee sisenemise rakkudesse. Tõusnud turgori tõttu võtavad täitunud sulgrakud kaarja kuju, avades nende vahel paikneva õhupilu. Kaarja kuju tekkimine on võimalik tänu sulgrakkude tippudes paiknevatele tselluloossetele mikrofiibrile (Aylor *et al.*, 1973; Carter *et al.*, 2017). Sulgrakkude ventraalsel poolel (pool kuhu tekib õhupilu) on rakukest paksenenud, mis raku ruumala suurenedes ei veni ning aitab rakul taluda õhulõhede avanemisest ja sulgumisest tulenevat stressi (Carter *et al.*, 2017).

1.2.2 Õhulõhede sulgumine

Õhulõhede sulgumist põhjustavateks stiimuliteks on pimedus, kõrge CO₂ kontsentratsioon, ABA (abstsiishape), õhuniiskuse langus, patogeenid või keskkonna saasteained.

Õhulõhede sulgemiseks tuleb langetada sulgrakkude turgorit. Kõigepealt inaktiveeritakse H⁺-ATPaasid ja aktiveeritakse kanalid anioonide rakust välja transportimiseks. Anioonkanaleid on kahte tüüpi - R-tüüpi kiired (*Rapid*) kanalid aktiveeruvad kiiresti membraani depolarisatsiooni mõjul ja inaktiveeruvad uuesti hüperpolarisatsiooni toimele ning S-tüüpi aeglased (*Slow*) anioonkanalid reageerivad membraanipotentsiaali muutustele aeglaselt (Schroeder ja Keller, 1992). R-tüüpi kanalitest on kirjeldatud ALMT12 (ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 12), mille puudumisel õhulõhede sulgumine on häiritud vastusena pimedusele, ABAle ja kõrgele CO₂ tasemele (Meyer *et al.*, 2010). S-tüüpi kanalitest on oluline SLAC1 (SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1), mille puudumisel on õhulõhed pidevalt avatud ning ei suuda sulguda erinevate stiimulite mõjul (Vahisalu *et al.*, 2008). Teine oluline S-tüüpi kanal on SLAH3 (SLAC1 HOMOLOG 3), mis spetsialiseerub rakust NO₃⁻ ionide välja transportimisele (Geiger *et al.*, 2011). Plasmamembraani depolariseerumisel aktiveerub K⁺ ionide *Shaker*-tüüpi kanal GORK (GATED OUTWARDLY-RECTIFYING K⁺ CHANNEL), mis suunab K⁺ ionid tagasi apoplasti (Ache *et al.*, 2000). Ioonide väljumisel sulgrakkudest tõuseb veepotentsiaal, mille tõttu väljub rakkudest koos ionidega vesi. Väljunud ionide ja vee tõttu langeb rakkude turgor, mille tõttu ei ole nad võimelised kaarjat kuju hoidma ning nende vahel paiknev õhupilu suletakse.



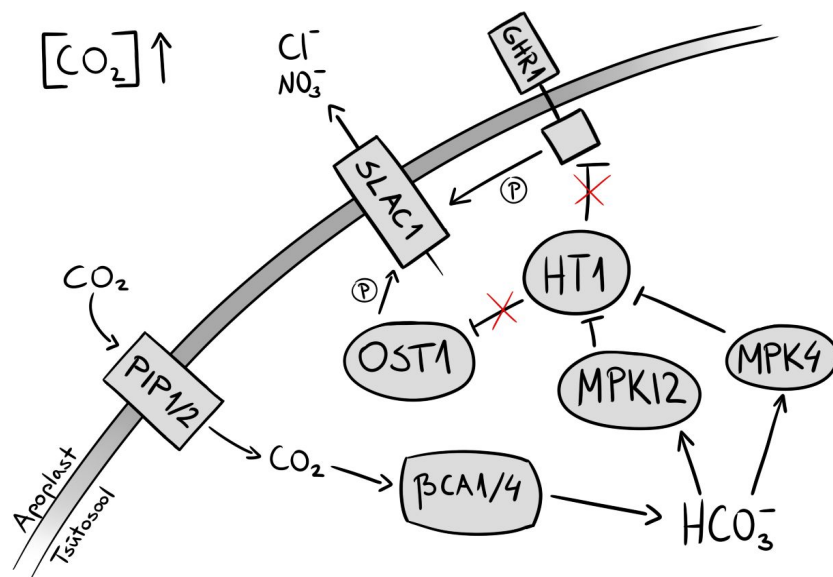
Joonis 1. Õhulõhe avatuna ja suletuna. Valguse või madala CO_2 kontsentratsiooni toimel õhulõhed avanevad. Rakust väljuvad H^+ ioonid ning sisenevad K^+ ioonid, anioonid ja vesi, mille tulemusel rakk võtab kaarja kuju õhupilu avanemiseks. Sulgumine toimub pimeduses, kõrge $[CO_2]$ või ABA toimel. Prootonite väljapumpamine peatub ning rakust väljuvad K^+ ioonid, anioonid ja vesi, mille tulemusel turgor väheneb ja rakk vajub kokku.

1.3 Õhulõhede regulatsioon vastusena CO_2 muutustele

Esmakordselt uuriti õhulõhede reageerimist CO_2 kontsentratsiooni muutustele aastal 1948 ning täheldati, et madalal CO_2 kontsentratsioonil toimub õhulõhede avanemine ja kõrgemal kontsentratsioonil sulgumine (Heath, 1948). Lisaks tervele taimele on CO_2 muutustele võimelised reageerima ka ära lõigatud lehed, lehe tükid, epidermise tükid ja isoleeritud õhulõhed (Morison, 1978). Kahekordse ($\sim 800ppm$) CO_2 kontsentratsiooni juures võib õhulõhede juhtivus langeda kuni ligikaudu 40% (Morison, 1978). Keskkonna muutuvale CO_2 tasemele reageerimine on vajalik, et tagada fotosünteesiks ühtlane CO_2 juurdevool (Raschke, 1975), samas pidev atmosfääri süsihappegaasi kontsentratsiooni tõus vähendab õhulõhede avatust ning juhtivust (Medlyn *et al.*, 2008). Pikemas perspektiivis on õhulõhede areng samuti mõjutatud CO_2 taseme tõusust - juba aastal 1987 näidati, et õhulõhede areng lehe epidermises on pärsitud keskkonna CO_2 kontsentratsiooni tõusmisel, mille tulemusel õhulõhede arvukus lehe kohta väheneb (Woodward, 1987). Vähem avatud õhulõhed ja nende arvukuse langus toob kaasa transpiratsiooni languse, mis omakorda põhjustab lehtede temperatuuri tõusu (Engineer *et al.*, 2016). Evaporatsiooni langemisel ei liigu taimes vesi juurtest üles ning kuumenenud lehed lähevad stressi, mis võib pikema aja vältel taimet kahjustada.

Teadmised CO₂ muutustele reageerimisest molekulaarsel tasemel on veel lünklikud. Varasemalt on näidatud, et taimed tajuvad süsihappegaasi kontsentratsiooni muutuseid lehe sees sulgrakkude all asuva ruumi ehk substomataalse õõnsuse CO₂ kontsentratsiooni kaudu (C_i) (Raschke, 1975). Edasiste uuringutega avastati, et CO₂ rakkudesse jõudmiseks on vajalikud PIP1 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1) ja PIP2 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2) akvaporiniidid (Heckwolf *et al.*, 2011) (Joonis 2) ning taimed ei taju CO₂ kontsentratsiooni otseselt vaid kasutavad bikarbonaadi taset viimase hindamiseks (Hu *et al.*, 2010). Varajastes CO₂ regulatsiooni etappides on olulised karboonhappe anhüdraasid, mis konverteerivad lahustunud süsihappegaasi prootoniteks ja bikarbonaadiks (HCO₃⁻). Mutantsed taimed, millel puudus karboonhappe anhüdraaside (β CA1 ja β CA4) aktiivsus, ei olnud võimelised normaalselt CO₂ muutustele reageerima, samas reageerimine sinisele valgusele ja ABAle toimis häirimatult. Taimede võime reageerida CO₂ kontsentratsiooni muutustele taastus peale komplementatsiooni inimesest pärit karboonhappe anhüdraasiga (α CAII), seega karboonhappe anhüdraasid vastutavad bikarbonaadi tekke eest, tänu millele taimed on võimelised reageerima CO₂ muutustele (Hu *et al.*, 2010).

Järgmised olulised CO₂ signalisatsioonis osalevad kinaasid on MAP (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES; MAPKs) hulka kuuluvad MPK4 (MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 4) ja MPK12 (MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 12) (Hörak *et al.*, 2016; Jakobson *et al.*, 2016). Madala CO₂ kontsentratsiooni puhul on MPK4/12 inaktiivsed ning kõrge [CO₂] korral toimub MPK4/12 interaktsioon HT1 (HIGH LEAF TEMPERATURE 1) kinaasiga tema inhibeerimiseks (vt. peatükk "1.4 HT1 kinaas"). HT1 inhibitsioonil vabaneb OST1 (OPEN STOMATA 1) kinaas, mis omakorda interakteerub anioonkanali SLAC1 N-terminusega ja fosforüleerimisega aktiveerib anioonkanali õhulõhede sulgemiseks (Geiger *et al.*, 2009). Näidatud on ka GHR1 (GUARD CELL HYDROGEN PEROXIDE-RESISTANT 1) pseudokinaasi osalust CO₂ signaalrajas (Hörak *et al.*, 2016). GHR1 on samuti võimeline aktiveerima SLAC1 anioonkanalit ning GHR1 puudumisel on õhulõhede sulgumine märgatavalt häiritud. Hüpoteesi kohaselt võib HT1 interakteeruda otse SLAC1 kanali N-terminusega kuid teooriat pole veel tõestatud (Hörak *et al.*, 2016).



Joonis 2. CO₂ kontsentratsiooni tõusule reageerimine. CO₂ siseneb sulgrakkudesse PIP1 ja PIP2 akvoporiinide kaudu ning karboonhappe anhüdraasid β CA1 ja β CA4 konverteerivad süsihappegaasi bikarbonaadiks (HCO₃⁻). HCO₃⁻ kogust tajuvad MPK4 ja MPK12 kinaasid, mis inhibeerivad HT1 kinaasi. HT1 kinaasi inhibeerimisel vabanevad GHR1 ja OST1, mis aktiveerivad SLAC1 kanali anioonide rakust välja transportimiseks.

1.4 HT1 kinaas

HT1 on Raf-kinaasi sarnane seriin/treoniin/türosiin proteiinkinaas (Hashimoto-Sugimoto *et al.*, 2016), mis on oluline komponent õhulõhede reageerimisel keskkonna süsihappegaasi kontsentratsiooni muutustele (Hashimoto *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2015; Hõrak *et al.*, 2016). Lisaks on näidatud Raf kinaaside osalust ABAle ja abiootilisele stressile reageerimisel (Lin *et al.*, 2020; Takahashi *et al.*, 2020) ning HT1 kinaasi olulisust õhulõhede reageerimisel punasele valgusele, sõltumata CO₂ kontsentratsiooni muutustest (Matrosova *et al.*, 2015). HT1 kinaasi aktiivsus ei sõltu Ca²⁺ ionide kontsentratsioonist (Hashimoto *et al.*, 2006), küll on aktiivsuseks vajalikud Mg²⁺ ionid (Hashimoto-Sugimoto *et al.*, 2016). Harilikus müürloogas paikneb HT1 kinaasi 2123 aluspaari pikkune geen esimeses kromosoomis. Geenil on 3 eksonit ja 2 intronit (ThaleMine, AT1G62400). HT1 ekspresseeritakse peamiselt täiskasvanud lehtede sulgrakkudes, vähesel määral ka lehtedes, vartes, juurtes ja õites (Hashimoto *et al.*, 2006). HT1 on 390 aminohappe pikkune 44kDa molekulmassiga (UniProt, Q2MHE4) valk, mis lokaliseerub sulgrakkude plasmamembraaniga, valgul puuduvad transmembraansed domeenid (Tian *et al.*, 2015). HT1 valgul on proteiinkinaasidele iseloomulikud konserveerunud katalüütilised domeenid, välja arvatud subdomeen I (Hanks *et al.*, 1988; Hashimoto *et al.*, 2006). HT1 kinaasi 113 positsioonis olev lüsiinijääk vastab enamikes

proteiinkinaasides kõrgelt konserveerunud aktiivsele ATP sidumissaidile, mis on kinaasi aktiivsuseks hädavajalik (Joonis 3). Arginiin positsioonis 211 on konserveerunud aktiivsait (Hashimoto *et al.*, 2006).

HT1 kinaasi nimi, HIGH LEAF TEMPERATURE 1, tuleneb kinaasi avastamise loost, kus soojuskaamera abil leiti kaks mutantset *A. thaliana* liini (*ht1-1* ja *ht1-2*) (Hashimoto *et al.*, 2006). Mõlema liini taimede lehtede temperatuur oli madala [CO₂] juures kõrgem võrreldes metsiktüüpi taimedega, kuid nii mutantide kui ka metsiktüüpi taimede õhulõhede arvukuse vahel ei leitud olulist erinevust, mis viitas, et mutantide õhulõhed ei avanenud vastusena rakendatud stiimulile. Mutandi *ht1-1* puhul oli [CO₂] muutustele reageerimine märgatavalt häiritud ning *ht1-2* puhul puudusid reaktsioonid täielikult, samas mõlemad liinid suutsid reageerida teistele stiimulitele (valgus, pimedus, ABA ja fusikoktsiin). Siit saab järeldada, et HT1 on oluline lüli sulgrakkude [CO₂] muutustele reageerimiseks (Hashimoto *et al.*, 2006).

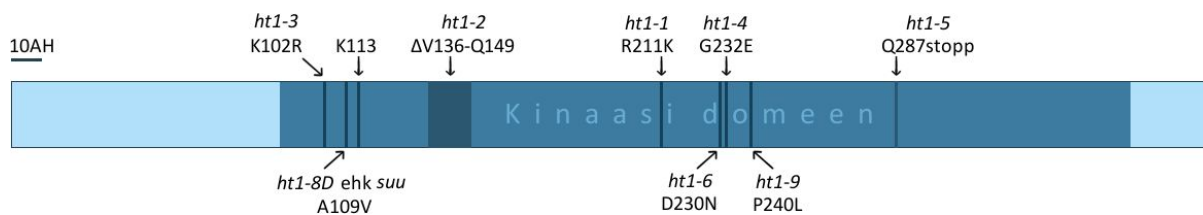
Müürlooga *ht1-1* taimedes oli toimunud HT1 geenis punktmutatsioon positsioonis 796, mille tulemusel vahetus valgus katalüütiliselt aktiivse positsiooni arginiin 211 lüsiini vastu (Joonis 3) (Hashimoto *et al.*, 2006). Mutandis *ht1-2* oli toimunud aluspaari asendus positsioonis 448, mis põhjustas positsioonide 406-447 deletsiooni ja see omakorda valgus 14 aminohappejäägi kadumise III ja IV subdomeenis (positsioonid 136-149). Mõlema mutandi õhulõhede juhtivus oli võrreldes metsiktüüpi taimedega madalam ehk õhulõhed olid rohkem suletud (Hashimoto *et al.*, 2006; Hõrak *et al.*, 2016).

Uued mutantsed HT1 alleelid *ht1-3*, *ht1-4*, *ht1-5*, *ht1-6* ja *ht1-7* isoleeriti 10 aastat hiljem ning ainult *ht1-3* alleeli puhul täheldati huvitavat dominantset fenotüüpi (Hashimoto-Sugimoto *et al.*, 2016). Taimed *ht1-3* alleeliga samuti ei reageerinud süsihappegaasi kontsentratsiooni muutustele, kuid nende õhulõhed olid pidevalt avatud. Metsiktüüpi taimede ristamisel *ht1-3* taimedega saadi heterosügootsed taimed, mille lehetemperatuur oli kõrge ~800ppm [CO₂] juures samuti madalam, mis andis märku rohkem avatud õhulõhedest. *ht1-3* alleelilt toodetud HT1 valgus on 102 positsioonis lüsiin asendatud arginiiniga (Joonis 3), mis ei asu proteiinkinaaside kõrgelt konserveerunud alas, seega võib tegu olla HT1 kinaasile omase regiooniga, mis on vajalik teiste sihtmärkidega interakteerumiseks või mõjutab aminohappejäägi asendamine kinaasi ruumilist struktuuri. Ülejäänud HT1 retsessiivsete mutantide puhul olid muutused toimunud kinaasi katalüütiliselt

aktiivses domeenis (Joonis 3) ning õhulõhede juhtivus sarnanes *ht1-1* ja *ht1-2* mutantidele (Hashimoto-Sugimoto *et al.*, 2016).

Veel üks isoleeritud dominantse fenotüübiga HT1 mutant on *ht1-8D* ehk *suu*, millel sarnaselt *ht1-3* mutandile on õhulõhed rohkem avatud ja puudub reageerimine [CO₂] muutustele (Hõrak *et al.*, 2016). Antud mutandi puhul on toimunud kinaasis ATP seondumissaidi lähedal positsioonis 109alaniini asendus valiiniga (Joonis 3), mille tulemusel on HT1 kinaas aktiivne, aga interaktsioonid MPK4/12 valkudega on häiritud. MPK12 inhibeerib HT1 kinaasi autofosforülatsiooni kui ka substraatide fosforülatsiooni HT1 poolt, kuid *suu* puhul oli inhibitsiooni tase oli oluliselt langenud, tänu millele olid õhulõhed rohkem avatud. MPK4 puhul toimib HT1 inhibitsioon tõenäoliselt valgu struktuuri kaudu, mitte MPK4 kinaasi aktiivsuse tõttu. Samas kannuskonna ootsüütides *in vitro* konstruktidena näidati, et ilma kinaaseta aktiivsuseta HT1 (konserveerunud 113 positsioonis on lüsiin asendatud trüptofaaniga) on võimeline inhibeerima SLAC1 anioonkanali avanemist OST1 ja GHR1 kaudu (Hõrak *et al.*, 2016). Seega peab veel edasi uurima, kas HT1 kinaas toimib sulgrakkudes läbi mõne teise domeeni abil sihtmärgi fosforüleerimisega, sihtmärgiga seondumise kaudu või on hoopis interaktsioonideks oluline kinaasi konformatsioon.

Mutantne HT1 alleel nimega *ht1-9* alleel isoleeriti hoopis õhulõhede valgusreaktsioone uurivas töös, kus avastati CBC1 (CONVERGENCE OF BLUE LIGHT AND CO₂ 1) ja CBC2 (CONVERGENCE OF BLUE LIGHT AND CO₂ 2) kinaasid, mis sarnaselt HT1 kinaasile reguleerivad anioonkanalite aktiivsust õhulõhede sulgemiseks või avanemiseks (Hiyama *et al.*, 2017). *ht1-9* kinaasil oli positsioonis 240 proliin asendatud leutsiiniga (Joonis 3), mille tulemusel puudus mutandil kinaasne aktiivsus ja seda mutanti kasutati kontrollina, kui uuriti CBC1/2 osalust CO₂ signaalsüsteemi rajas. Samamoodi nagu *ht1-9* ei reageerinud ka *cbc1 cbc2* topeltmutant [CO₂] muutustele kuid suutis reageerida ABAle. Pimeduses madala [CO₂] juures oli *cbc1* ja *cbc2* üksikmutantide õhulõhede avanemine häiritud ning *cbc1 cbc2* topeltmutant suutis õhulõhesid avada valguse käes ja madala [CO₂] tingimustes ainult vähesel määral. Lisaks näidati *in vitro* katsetega, et HT1 on võimeline seonduma CBC1/2 valkudega ja neid fosforüleerima. Nendest tulemustest saab järeldada, et CBC1 ja CBC2 kinaasid seovad omavahel õhulõhede reageerimise valgusele ning CO₂ kontsentratsiooni muutustele, interakteerudes HT1 kinaasiga CO₂ signaalarajas (Hiyama *et al.*, 2017).



Joonis 3. Hariliku müürlooga HT1 kinaasi valgu kaart. Joonisel on märgitud kirjeldatud mutatsioonide positsioonid, 113 positsiooni ATP sidumissait ja kinaasi katalüütiline domeen. *ht1-7* mutatsiooniga liinis toimus T-DNA insertioon *HT1* geeni teise eksonisse, mille tulemusel ei olnud võimalik funktsionaalset HT1 valku toota (Hashimoto-Sugimoto *et al.*, 2016).

Kultiveeritud tomati (*S. lycopersicum*) õhulõhede regulatsioonil osalevat HT1 kinaasi pole veel nii põhjalikult uuritud kui hariliku müürlooga puhul. Nagu paljud teised geenid on ka tomati võimalikud *HT1* ehk *tHT1* geenide positsioonid ning funktsioonid ennustatud erinevate tomatiliinide genoomide sekveneerimisandmete põhjal (Kevei *et al.*, 2015). Üks tomati ennustatud seriin/treoniin/türosiin proteiinkinaasi regioon ehk tHT1-1 on Solyc11g012050 (Kevei *et al.*, 2015), mis asub tomati 11. kromosoomis. Regioonis toodetakse 374 aminohappe pikkust ja 43kDa molekulmassiga kinaasi omadustega valku (UniProt, K4D610) mille valgujärjestus kattub müürlooga HT1 valguga 82,6% ulatuses. Teine ennustatud tHT1 regioon ehk tHT1-2 on 4. kromosoomis paiknev Solyc04g014690, mis on müürlooga *HT1* geeni ortoloog (inetbio.org). Antud regioonile vastav valk on 377AH pikkune ning molekulmassiga 43kDa (UniProt, A0A3Q7FXT8) ja kattuvus müürlooga HT1 kinaasiga on 83,4%. tHT1-1 ja tHT1-2 valgujärjestused on omavahel 91,4% identsed. tHT1-2 puhul on näidatud kinaasi *in vitro* autofosforülatsiooni kui ka inhibitsiooni tMPK12 kinaasi poolt (Töldsepp, 2019). Antud võrdlused ja leiud viitavad HT1 analoogsele rollile tomatil, kuid täpseid mehhanisme peab veel lähemalt uurima. Näiteks võib iseloomustada ülejäänud teadaolevad CO₂ signalisatsiooni rajas osalevate komponentide geneetilised järjestused tomatil ning nii mutantide abil kui ka *in vitro* kinaaside interaktsioone testides näidata müürloogas kirjeldatud raja toimimist tomati õhulõhede regulatsioonil.

1.5 Õhulõhede regulatsioon vastusena valgusele ja pimedusele

Taimed on fotoautotroofid, kes fotosünteesi abil muudavad valgusenergia keemiliseks energiaks rakusiseste metaboolsete protsesside läbiviimiseks, seega valgus on nende elutegevuseks hädavajalik. Lisaks fotosünteesi toimimisele reguleerib valgus taimede kasvu,

õitsemist, ööpäevast rütmi, kloroplastide paiknemist rakkudes ja õhulõhede avatust (Kami *et al.*, 2010).

1.5.1 Reageerimine valgusele

Valgus on tugev õhulõhede avanemist põhjustav stiimul. Teadaolevalt reageerivad taimed punasele ja sinisele valgusele ning sinise valguse peale avanevad õhulõhed rohkem kui punase (Sharkey ja Raschke, 1981). Õhulõhed avanevad sinise valguse käes ka ümbritseva keskkonna kõrge CO₂ kontsentratsiooni puhul (Hiyama *et al.*, 2017). Valguse tajumiseks on taimedel mitmeid erinevaid retseptoreid - õhulõhede avanemiseks tajutakse sinist valgust fototropiinide PHOT1 (PHOTOTROPIN 1) ja PHOT2 (PHOTOTROPIN 2) (Kinoshita *et al.*, 2001) ja krüptokroomide CRY1 (CRYPTOCHROME 1) ning CRY2 (CRYPTOCHROME 2) (Ahmad ja Cashmore, 1993; Mao *et al.*, 2005) abil. PHOT1/2 puudumisel ei ole õhulõhed võimelised avanema (Kinoshita *et al.*, 2001), sest ilma nendeta ei toimu signaali ülekannet H⁺-ATPaaside aktiveerimiseks (Ueno *et al.*, 2005). Krüptokroomid CRY1/2 toimivad õhulõhede regulatsioonil pigem PHOT1/2 abistajatena, mida näitas *cry1 cry2* topeltnmutandi langenud võimekus reageerida sinisele valgusele (Mao *et al.*, 2005). Sinises valguses ergastatud fototropiinid fosforüleerivad kinaasi BLUS1 (BLUE LIGHT SIGNALING 1) (Takemiya *et al.*, 2013a), mis omakorda kannab signaali edasi PP1 (PROTEIN PHOSPHATASE 1) fosfataasile ja PP1 subühikule PRSL1 (PP1 REGULATORY SUBUNIT 2- LIKE PROTEIN 1) (Takemiya *et al.*, 2013b). Olulist rolli omavad ka fototropiinide ja HT1 kinaasiga interakteeruvad CBC1 ja CBC2 kinaasid, mis seovad omavahel sinise valguse ja süsihappegaasi signalisatsioonirajad (Hiyama *et al.*, 2017). Lisaks interakteerub signaalirajas oluline BHP kinaas (BLUE LIGHT-DEPENDENT H⁺-ATPASE PHOSPHORYLATION) PHOT1/2 fototropiinide ja BLUS1 kinaasiga kuid mitte H⁺-ATPaasidega (Hayashi *et al.*, 2017). Otseselt H⁺-ATPaasidega interakteeruvat ja neid aktiveerivat komponenti sinise valguse signaalirajas pole veel tuvastatud.

Punast ja kaugpunast valgust tajutakse fütokroomide abil (phyA-E) (Quail, 2002). Mürloogas on otseselt näidatud fütokroom B osalust õhulõhede avanemisel (Wang *et al.*, 2010) ning H⁺-ATPaaside aktiveerumist punase valguse toimel (Ando ja Kinoshita, 2018), kuid punase valguse signaalirada ei ole õhulõhede avanemisel nii põhjalikult uuritud kui sinise valguse oma. Sulgrakud ei pruugi otseselt punasele valgusele reageerida, pigem põhjustab õhulõhede avanemist lehesisene langenud CO₂ tase (Roelfsema *et al.*, 2002). Mesofüllis ja mesofüllis toimuva fotosünteesi olulisust õhulõhede avanemisele punases valguses näitas Fujita *et al.* (2013), kus ilma mesofüllita hariliku kummeliini epidermise riba õhulõhed ei

suutnud reageerida punases valguses CO₂ muutustele aga olid võimelised reageerima valges valguses, samas mesofülliga riba oli võimeline reageerima mõlemas tingimuses. Mesofüllil fotosünteesi rolli näidati lehtede töötlemisel fotosünteesi tugeva inhibiitoriga DCMU (3-3,4-diklorofenüül-1,1-dimetüül urea), mille tulemusel töödeldud lehed samuti ei olnud võimelised reageerima CO₂ muutustele punases valguses, küll aga valges valguses (Fujita *et al.*, 2013). Samas on näidatud, et õhulõhed reageerivad punasele valgusele ka juhul kui rakusisest CO₂ kontsentratsiooni hoitakse konstantsena, mis annab märku, et õhulõhede regulatsiooniks punases valguses eksisteerib iseseisev signaalirada (Messinger *et al.*, 2006). Fütokroomide puudumisel on õhulõhede avanemine valges valguses häiritud (Wang *et al.*, 2010). Samuti on avanemine häiritud CBC1 ja CBC2 kinaaside puudumisel (Hiyama *et al.*, 2017), mis viitab sellele, et valges valguses toimub õhulõhede avanemine sinise ja punase valguse retseptorite ning erinevate signaaliradade koostööna.

1.5.2 Reageerimine pimedusele

Pimeduses ei saa toimuda fotosünteesi, seega on taimedel otstarbekas õhulõhed sulgeda, et piirata transpiratsioonist põhjustatud veekadu. Siiski ei sulgu õhulõhed täielikult - olenevalt taime liigist ja kasvukeskkonna tingimustest võib öine transpiratsioon moodustada 10-20% päevasest transpiratsioonist, vahest ka kuni 50% (Snyder *et al.*, 2003; Daley ja Phillips, 2006). Öise juhtivuse olulisust ei osata veel täpselt seletada, teooriate kohaselt võib öine transpiratsioon olla vajalik toitainete täiendatud omastamiseks, ksüleemis päeval tekkinud õhutaskute veega täitmiseks või vältimaks liigse turgori tekkimist rakkudes, kuhu on kogunenud veepotentsiaali langust soodustavaid ühendeid (Snyder *et al.*, 2003; Cramer *et al.*, 2009). Osad taimed on kohastunud avama õhulõhed just öisel ajal - paksulehelised CAM (akronüüm inglise keelest *Crassulacean Acid Metabolism*) taimed avavad õhulõhed öösel karboksülaasi PEPC (fosfoenoolpüruvaat karboksülaas) abil süsiniku omistamiseks, mis malaadi (õunhappe) kujul ladustatakse mesofüllil vakuoolidesse ja hiljem päeval ajal, kui õhulõhed on suletud, vabaneb fotosünteesi toimet malaadi dekarboksüleerimisel RuBisCO (Ribuloos-1,5-bisfosfaat karboksülaas/oksügenaas) tegevuse jaoks CO₂ (Males ja Griffiths, 2017).

Taimede õhulõhede sulgumine pimeduses võib olla passiivne vastus valguse stiimuli puudumisele, kuid juba aastal 1966 täheldati kolme mutantse tomatiliini õhulõhede veidrat käitumist pimeduses (Tal, 1966). Nimelt olid kergesti närbuvate mutantide (*notabilis*, *flacca*, ja *sitiens*) õhulõhed avatud ka peale 12 tundi kestnud pimedust (Tal, 1966). Samuti on sinise

valguse signaalirajas osaleva COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1) valgupuudumisel, CRY üleekspressioonil (Mao *et al.*, 2005) või defektse ABA (abstsiihape) signaal- või sünteesiraja korral (Merilo *et al.*, 2013; Pantin *et al.*, 2013) õhulõhed pimeduses avatud. Pimeduse toimelise sulgumise signaaliraja otsingutel on isoleeritud viis müürlooga mutanti (*opal1-5; open all night long*), kes ei sulgenud õhulõhesid terve öö vältel kuid olid võimelised reageerima ABA ja [CO₂] muutustele (Costa *et al.*, 2015). Antud leiud annavad selgelt märku, et õhulõhede pimeduses sulgemisel on tegu spetsiifilise signaalirajaga, mille toimimist ning komponente peab veel lähemalt uurima.

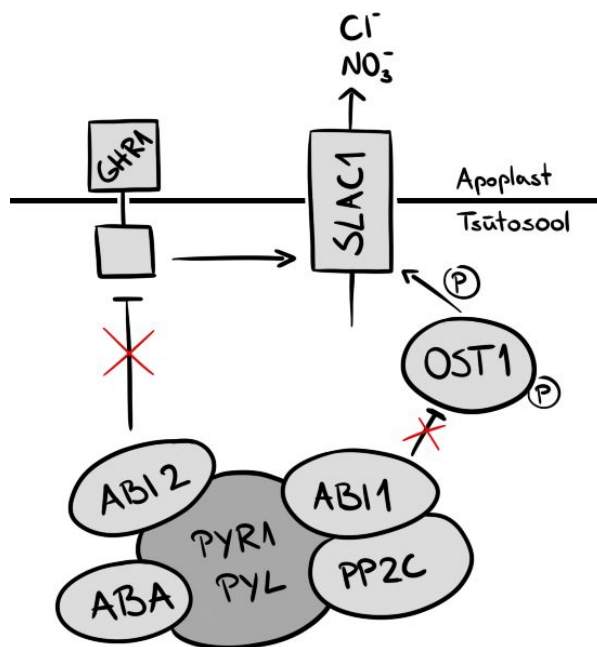
1.6 ABA ehk abstsiihape

ABA ehk abstsiihape on taimehormoon, mis osaleb mitmetes taimedes toimuvates protsessides (Cutler *et al.*, 2010). ABA reguleerib taimede kasvu ja arengut, soodustab seemnete puhkeseisundit, idanemist ja vee säästmist ning osaleb taimede vastustes biotilisele ja abiootilisele stressile. Lisaks taimedele leidub ABA seentes ning erinevates loomades, kaasa arvatud osades inimese kudedes (Li *et al.*, 2011).

ABA puhastati esmakordselt puuvilla taimest aastal 1963 ning esialgu tunni leitud ühendit kui abstsisiin II (Ohkuma *et al.*, 1963). Sama ühend tuli esile lisaks teistes töodes, kui otsiti erinevaid taimekasvu inhibiitoreid (Cornforth *et al.*, 1965; Koshimizu *et al.*, 1966) ning peagi sai selgeks, et abstsisiin II (mis nimetati ümber abstsiihappeks aastal 1968 (Addicott *et al.*, 1968)) on oluline fütohormoon, mis osaleb mitmetes erinevates taime kasvu reguleerivates protsessides.

Lisaks taimede kasvu mõjutamisele selgus ABA roll õhulõhede regulatsioonil töös mutantse tomatiliiniga *flacca*, mis veepuudusel närbus kiiresti, kuid peale ABA töötlust taimed taastusid (Imber ja Tal, 1970). Otsest ABA osalemist õhulõhede sulgemisel näidati töös väärtakja ja tubakataime lehtedega, kus ABA efekt toimus CO₂ muutustest tingitud reaktsioonidest iseseisvalt (Jones ja Mansfield, 1970). Edasiselt on abstsiihapet uuritud põhjalikult, tänu millele on selgunud ABA molekulaarne signaalirada õhulõhede sulgemisel (Joonis 4). ABAga seonduvad valgud ehk ABA retseptorid on RCAR (REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTORS) hulka kuuluvad PYR1 (PYRABACTIN RESISTANCE 1) ja PYL (PYR1- LIKE) retseptorid (Gonzalez-Guzman *et al.*, 2012). Moodustunud kompleksid seonduvad omakorda aktiivsete PP2C (PROTEIN PHOSPHATASE 2C) fosfataasidega, mis kompleksiga liitumisel inaktiveeruvad (Ma *et al.*, 2009). PP2C rühma kuuluva ABI1 (ABSCISIC ACID INSENSITIVE 1) fosfataasi inaktiivses olekus vabaneb sulgraku tsütoplasmas paiknev

OST1 kinaas inhibitsioonist, mille tulemusel aktiveerib OST1 anioonkanali SLAC1 õhulõhede sulgemiseks (Geiger *et al.*, 2009). Lisaks toimub ABA poolt SLAC1 aktivatsioon sulgraku plasmamembraanis asuva GHR1 kinaasi poolt kui ABA-retseptorite kompleksiga seondub ABI2 fosfataas, vabastades GHR1 kinaasi ABI2 inhibitsioonist (Hua *et al.*, 2012). ABA signaalirada jagab osa kinaase ning fosfataase süsihappegaasi signaalrajaga õhulõhede sulgemiseks, kuid mõlemad signaalrajad saavad toimida üksteisest sõltumatult.



Joonis 4. ABA signaalirada õhulõhede sulgemisel. ABA seondumisel PYR1 ja PYL valkudega moodustub kompleks PP2C fosfataasidega. ABI2 on PP2C hulka kuuluv fosfataas, mille kompleksiga liitumise tulemusel saab OST1 kinaas ja GHR1 aktiveerida SLAC1 anioonkanali. ABI1 on PP2C hulka kuuluv fosfataas, mille kompleksiga liitumisel vabaneb OST1 kinaas inhibitsioonist ja OST1 toimel saab toimuda SLAC1 aktivatsioon.

1.7 Veekasutuse efektiivsus

Maismaataimed seisavad pidevalt silmitsi dilemmaga - ühest küljest on kasvamiseks vaja pidevalt atmosfääriga aktiivselt gaase vahetada, et omistada fotosünteesiks vajalikku süsihappegaasi, teisalt peavad taimed gaasivahetust piirama, et vältida liigset veekadu transpiratsiooni teel. Taimede kasv ja veekaotus on olulised, kuid üksteise vastandprotsessid, mille interaktsioone on üsna keeruline piiritleda ning neid interaktsioone uuritakse mitmes valdkonnas nagu agronoomia, hüdroloogia ja taimefüsioloogia (Stanhill, 1986). Seega on veekasutuse efektiivsuse ehk WUE (akronüüm inglise keelsest terminist *Water Use Efficiency*) puhul üsna keeruline kindla definitsiooni määratlemine. Pigem sõltub definitsioon kontekstist - kas uuritav veehulk on taimes või taime kasvukeskkonnas, kas ajaskaala piirdub

teatud hetkel mõõdetud kaotatud veeauru ja omistatud CO₂ hulgaga või biomassi kogumisega või võrreldakse hoopis süsiniku omandamise efektiivsust (Bacon, 2009). Peamiselt käsitletakse WUEd kui lühiajaliselt mõõdetud CO₂ omistamise efektiivsust suhtena samal ajal lehe pinnalt aurustunud vee hulga suhtes või siis pikemas perspektiivis veekasutuse ja biomassi/viljasaagi omavahelise suhtena (Bacon, 2009).

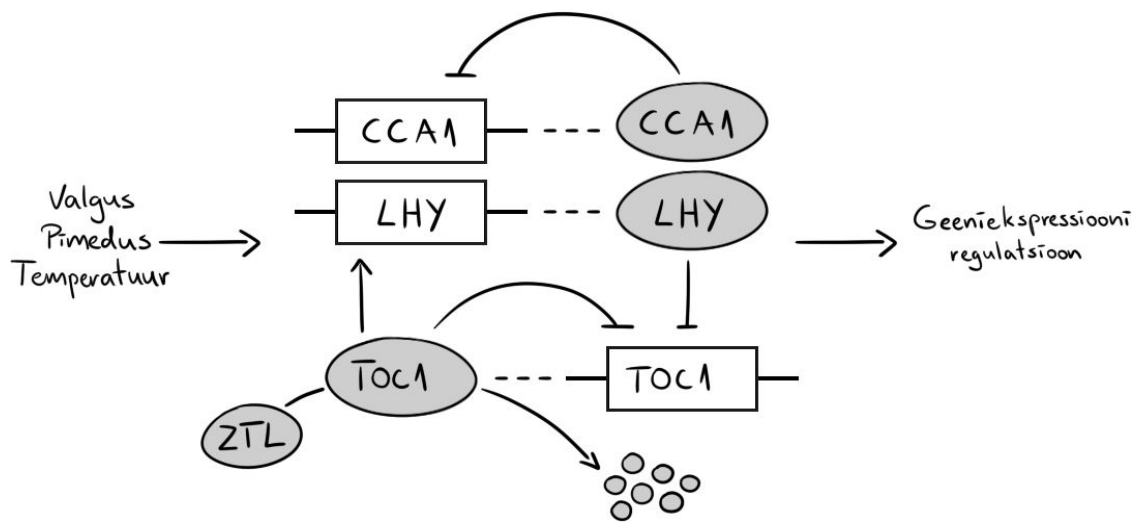
Globaalse kliima soojenemise tõttu on toimunud muutused ilmastikus, mis mõjutavad negatiivselt põlluharimist paljudes traditsioonilistes põllumajanduspiirkondades (Hansen *et al.*, 2006; Hoekstra ja Chapagain, 2011; Kotir, 2011; Craparo *et al.*, 2015). Taimede kasv on veepuudusel häiritud, mis on üks peamiseid viljasaagikuse languse põhjustajaid (Boyer, 1982). Maa pidevalt kasvava populatsiooni äratoitmiseks ja põlluharimise säilimiseks kuivemates regioonides tuleb põllukultuure muutuvale kliimale vastupidavamaks teha, mille üheks variandiks on õhulõhede regulatsiooniga manipuleerimine - nimelt taimed kaotavad suure enamuse veest õhulõhede kaudu tänu transpiratsioonile (Lawson ja Blatt, 2014). Transpiratsiooni saab piirata näiteks veeauru rõhu defitsiidi ehk VPD (akronüüm inglise keelest *Vapour Pressure Deficiency*) langetamise abil - kasvuhoones kõrgema relatiivse niiskuse hoidmisel olid tomatitaimede õhulõhed rohkem avatud kuid võrreldes kõrgema VPD käes kasvanud taimedega transpireerisid vähem vett, olid vähem stressis, kasvasid rohkem biomassi ja saaki ning kasvuhoone temperatuur püsis madalamana (Zhang *et al.*, 2017). Madala VPD juures kasvatatud taimede biomassi WUE kasvas 36,8% ning saagikuse WUE 39,1%, mis on tõestus transpiratsiooni ja taime kasvu omavahelisest seotusest ning selle omavahelise suhte edendamiseks (Zhang *et al.*, 2017).

1.8 Taimede tsirkadiaanne ehk ööpäevane rütm

Loomade ja taimede käitumine on suures osas sünkroniseeritud ööpäevase valguse ja pimeduse vaheldumise tsükliga, mida reguleerib n.ö. sisemine ehk tsirkadiaanne kell. Kella 24 tunnist rütmi aitavad reguleerida keskkonnast tulevad signaalid ning kell toimib ka juhul, kui vaadeldav organism viibib konstantsetes tingimustes (Schaffer *et al.*, 1998). Tsirkaadse kella toimimine aitab taimedel ette valmistuda päeva muutuvateks tingimusteks, andes neile kohanemisvõimelise eelise (Lin *et al.*, 2004). Näiteks on taimedes osad fotosünteesis osalevad molekulaarsed protsessid algatatud enne päikesetõusu, et taimed oleks valmis päevavalgust fotosünteesi jaoks maksimaalselt ära kasutama (Kreps ja Kay, 1997). Pikemas perspektiivis reguleerib kell taime kasvu ja õitsemist vastavalt aastaajale fotoperiodismi abil,

mis on päeva ja öö pikkuste tajumine ning nendele vastavalt reageerimine (Thomas ja Vince-Prue, 1996).

Rütmi toimimise keskmeks on negatiivse tagasiside põhjal toimiv ostsillaator, mis koosneb kolmest peamisest komponendist - sisestusrada, keskkonna signaalide tajumine ja nende edastamine kella reguleerimiseks; keskne ostsillaator, rütmi keskne tekitaja ja hoidja, mis toimib negatiivse tagasiside põhimõttel; ja väljundrada, ostsillaatori signaalide põhjal organismi protsesside reguleerimine (Mas, 2004). Hariliku müürlooga puhul on näidatud transkriptsiooni regulaatorite CCA1 (CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1), LHY (LATE ELONGATED HYPOCOTYL) ja TOC1 (TIMING OF CAB EXPRESSION 1) tugevat seotust tsirkadiaanse kellaga (Joonis 5) (Schaffer *et al.*, 1998; Wang ja Tobin, 1998; Strayer *et al.*, 2000). Varajastel hommikutundidel ekspresseeruvad CCA1 ja LHY on omavahel tihedalt seotud, reguleerides iseenda ja üksteise ekspressiooni (Schaffer *et al.*, 1998; Wang ja Tobin, 1998). CCA1 ja LHY geenide üleekspressioonil aga ka puudumisel on taimede ööpäevane rütm tugevalt häiritud ja nende omavahelised interaktsioonid viitavad negatiivse tagasiside regulatsioonile (Alabadi *et al.*, 2002). CCA1 puhul on näidatud ka osalust fütokroomide signaali edasikandmisel geeniekspressiooni reguleerimiseks (Wang *et al.*, 1997). Issenda ekspressiooni reguleeriv TOC1 osaleb samuti kella 24 tunnise ööpäeva rütmi säilitamisel ning TOC1 puudumisel on taimede fotoperioodi tajumine häiritud (Strayer *et al.*, 2000; Más *et al.*, 2003a). TOC1 ekspressioon on negatiivselt reguleeritud CCA1 ja LHY poolt, samas TOC1 soodustab CCA1 ja LHY ekspressiooni (Alabadi *et al.*, 2001). TOC1 kogust piirab ZTL (ZEITLUPE), lagundades TOC1 valke pimeduses kella rütmi säilitamiseks (Más *et al.*, 2003b). Keskse ostsillaatori rütmi säilitamise regulatsiooni ei ole veel lõpuni lahti seletatud, küll aga on näidatud erinevate komponentide, näiteks ELF4 (EARLY-FLOWERING 4) (Doyle *et al.*, 2002), TIC (TIME FOR COFFEE) (Hall *et al.*, 2003) ja CK2 (CASEIN KINASE 2) (Daniel *et al.*, 2004) osalust kella reguleerimisel.



Joonis 5. Hariliku müürlooga tsirkadiaanse kella keskne ostsillaator. CCA1 ja LHY on omavahel tihedalt seotud, reguleerides teineteise ja iseenda ekspressiooni ning inhibeerides *TOC1* ekspressiooni. *TOC1* soodustab *CCA1* ja *LHY* ekspressiooni ning inhibeerib iseenda oma. *ZTL* ülesanne on *TOC1* kogust piirata teda lagundades. Väliskeskkonna signaalid nagu valgus, pimedus ja temperatuur reguleerivad kella rütmi ning ostsillaatorist tulenevad signaalid reguleerivad taime geeniekspressiooni.

2. Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärgid

Varasemad tööd harilikus müürloogas on näidanud HT1 valgu rolli õhulõhede reageerimisel CO₂ kontsentratsiooni muutustele (Hashimoto *et al.*, 2006; Hõrak *et al.*, 2016).

Antud töö eesmärgiks oli:

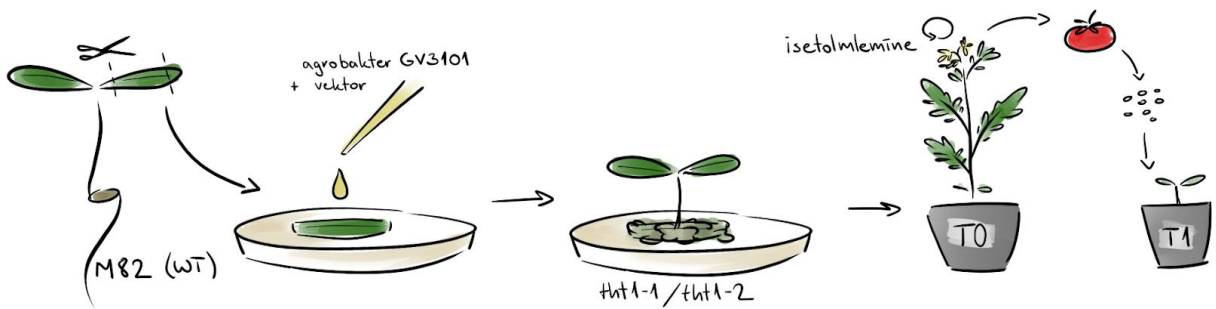
- selgitada välja tomati HT1 valgu roll õhulõhede reageerimisel vastusena erinevatele stiimulitele
- uurida *tht1-1/tht1-2* tomatitaimede veekasutuse efektiivsust ning kasvu normaalsetes ja põua tingimustes.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Geenmuundatud tomatid

Katsetes kasutatavad *tht1-1/tht1-2* (edaspidi viidatud ka kui HT1, HT1 või ht1) tomatid valmistati CRISPR/Cas9 meetodil ning mutantsete ja metsiktüüpi taimede seemned saadi koostöö raames Dr. Assaf Mosquna töörühmalt Iisraeli ülikoolist (The Robert H. Smith Institute of Plant Sciences and Genetics in Agriculture, Faculty of Agriculture, Hebrew University of Jerusalem).

Mutantsete *tHT1-1/tHT1-2* geenidega ehk *tht1-1/tht1-2* tomatite valmistamiseks kasutati M82 metsiktüüpi liini taimede idulehti (Joonis 6). Agrobakterisse (*Agrobacterium*, tüvi GV3101) viidi Golden Gate protokoll järgi konstrueeritud vektor (Lisa 2) ning bakteri abil toimus tomati kotransformatsioon. CRISPR/Cas9 abil muudeti tomati HT1 geene (Joonis 7). Transformeeritud idulehed jäeti söötmele kalluskude kasvatama. Aktiivse meristeemi ehk alkoega taimed tõsteti ümber juurte kasvu soodustavale söötmele ning juurte tekkimisel istutati taimed mullaga potti. Seemnete saamiseks toimus isetolmlemine. Mutantsete taimede *tht1-1* ja *tht1-2* järjestused kinnitati genotüpiseerimisega (praimerite järjestused toodud Lisa 3 all).



Joonis 6. *tth1-1/tth1-2* tomatite valmistamine. Metsiktüüpi taime (M82) lehetükis muudeti *tHT1-2* ja *tHT1-2* geene CRISPR/Cas9 abil ning lehetük asetati söötlele kasvama. Tekkinud kallusest eraldati mutantne taim (T0), indutseeriti juurte kasv ja taim istutati mullaga potti. Peale isetoimlemist saadud seemned (T1) idandati.

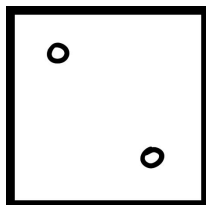


Joonis 7. Muutused tomati *HT1-1* ja *HT1-2* geenides. (A) *HT1-1* geen on deleteeritud 5 aluspaari teises eksonis, mille tulemusel toodetakse lühikest valku. (B) *HT1-2* geen on toimunud 1 aluspaari insertioon ja 7 aluspaari deletsioon teises eksonis, mille tulemusel samuti toodetakse lühikest proteiini. Mutantide kinnitamiseks kasutati DNA genotüüpiseerimist.

2.2.2 Taimede kasvatamine

Katsetes kasutati tomati (*Solanum lycopersicum*) liini M82 metsiktüüpi (edaspidi WT) ning CRISPR/Cas9 meetodil modifitseeritud taimi (*tth1-1/tth1-2*). Seemneid leotati ööpäev külmkapis (4°C) vees ning seejärel eelidantati 2-3 ööpäeva toatemperatuuril pimeduses niiskete salvrätikute vahel, et soodustada ühtlast idanemist ning valida välja elujõulisemad idandid. Taimi kasvatati 11 x 10 x 10,5 cm suurustes plastmassist pottides, mis olid täidetud kasvusubstraadiga (üks osa vermikuliiti, kaks osa Kekkilä turvast), millele lisati vett poole jagu eelnevast mahust.

Seemnete külvamiseks tehti kasvusubstraadi sisse seemne jaoks ~2 cm sügavune auk ning pintsettide abil asetati eelidandatud seeme augu sisse. Gaasivahetuse katsetes kasutatud taimede seemneid külvati 2 tükki samast liinist ühte potti nii, et taimed asetseksid teineteise suhtes diagonaalselt poti nurkade läheduses (Joonis 8). Põuakatsetes kasutatud taimede puhul külvati poti keskele 1 eelidandatud seeme.



Joonis 8. Gaasivahetuse katsetes kasutatud taimede külvamise skeem.

Peale külvamist kaeti augud kasvusubstraadiga pealt kinni, kasvusubstraadi pinda niisutati kergelt veepritsiga ning potid asetati kasvuruumi. Niiskuse hoidmiseks asetati pottide peale tugevast läbipaistvast kilest kate, mis eemaldati esimeste idulehtede tärkamisel (keskmiselt 3-4 päeva pärast külvamist) ja taimed asetati kasvukambrisse (Percival Intellus environmental controller AR-66LX) kasvama 70% õhuniiskuse juures, valgusrežiimiga 12h valgust (valgusintensiivsusel $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 23-26°C) ja 12h pimedust (13-18°C).

Gaasivahetuse katse taimi kasteti kaks korda nädalas altniisutuse meetodil. Potid asetati kuue kaupa vanni ning lisati keskeltläbi 1-1,5l vett, mis lasti keskeltläbi viie minuti jooksul kasvusubstraati imenduda. Põuakatses kasteti taimi kaks korda nädalas pealtniisustus meetodil kindla massini, detailid ja skeem lahti seletatud 2.2.4.2 peatükis.

Gaasivahetuse mõõtmine teostati 3 nädala vanuste taimedega.

2.2.3 Katseapartuur

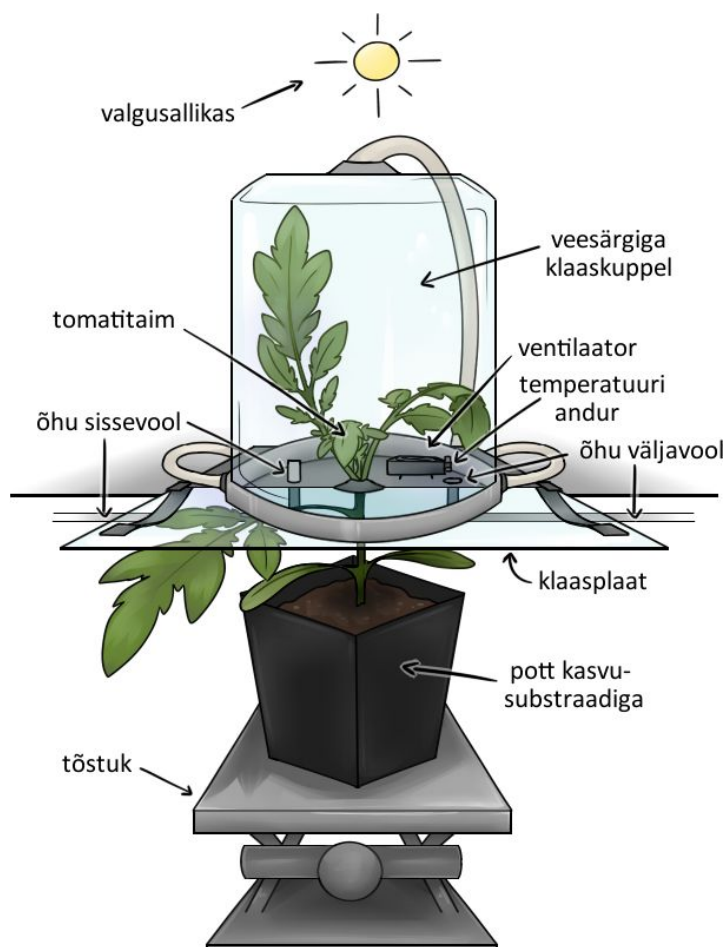
Gaasivahetuse katse seade on arendatud ja ehitatud töögrupi siseselt (Joonis 9). Gaasivahetuse mõõtmise seade koosneb mõõtekambritest, valgusallikatest, CO₂ ja N₂ gaasiballoonidest, CO₂ ja H₂O analüsaatorist (Li-Cor Li-7000), termostaadist, pumpadest, arvutist ja KOH kolonnist. Kokku on süsteemil neli kambrit ning kambri klaaskuppel asetatakse õhutihedalt taime peale. Klaaskuppel on kahekihiline ja kihtide vahel ringleb läbi termostaadi voolav veesärk kambri temperatuuri ühtlasena hoidmiseks. Kambrisest temperatuuri mõõdab ventilaatori küljele kinnitatud termomeeter.

Taime sisestamiseks kambrisse sai asetatud taimega pott väikese tõstuki peale ning seatud sobivale kõrgusele. Taime vars asetati kahe klaasplaadi vahele jäävasse avausse, klaasplaadid pandi omavahel servadest kokku ja tihendati plastiliiniga augu kohalt õhutihedaks. Seejärel asetati taimele peale kambri klaasist veesärgiga kuppel. Enne mõõtmist kontrolliti iga kambri õhutihedust.

Süsteemi tööpõhimõte on määrata kambrisse sisenenud ja väljunud õhu CO_2 ja H_2O kontsentratsioonid. CO_2 ja H_2O kontsentratsioonid määrab analüsaator, mille andmed edastatakse arvuti tarkvarale. Kambrisse sisenenud ja väljunud õhu CO_2 ja H_2O kontsentratsioonide erinevuste põhjal hindab tarkvara õhulõhede juhtivust vastavalt sellele, kui palju süsihappegaasi taim omistas ja kui palju transpireerus vett.

Antud süsteem mõõdab kordamööda iga kambrit eraldi, 1 minut kambrisse sisenevat ja 1 minut kambrist väljuvat õhku. Üks ring kokku ehk 4 kambri mõõtmine toimub 8 minuti jooksul.

Taoline meetod võimaldab taime gaasivahetust uurida ilma olulist stressi ja vigastusi tekitamata.



Joonis 9. Gaasivahetusseadme kambri skeem.

Veekasutusefektiivsuse katses kasutati taimede märgmassi ja kuivkaalu jaoks kaalu (mudel Kern PCB 1000-2) ning enne kuivkaalu mõõtmist kuivatati taimi ahjus (mudel Panasonic MIR-262-PE).

2.2.4 Katsete läbiviimine

2.2.4.1 Gaasivahetus

Katse jooksul lasti enne uut tüüpi stiimuli rakendamist taimedel stabiliseeruda. Valguse sisselülitamine, CO₂ kontsentratsiooni muutused ning ABa ga pritsimine toimusid iga kambri puhul individuaalselt, VPD rakendamine ning lõpetamine toimus samaaegselt iga kambri jaoks. Gaasivahetuse katse üldine skeem on toodud Joonisel 10.

Taimed asetati kambritesse õhtupoolikul ning kambriid kaeti väljastpoolt kinni musta riidega, tagamaks kambrites pimeduse. Süsteem jäeti üleöö tööle, et registreerida taimede öist gaasivahetust. Järgmise päeva hommikul kell 8 katted eemaldati, kambrite kohal olevad lambid lülitati sisse ning vaadeldi õhulõhede hommikust valguse toimel avanemist.

CO₂ kontsentratsiooni muutustele reageerimise osa

Peale normaaltingimustel (valge valgus 300 μmol m⁻² s⁻¹, CO₂ 400 ppm) õhulõhede juhtivuse stabiliseerumist rakendati kõrge CO₂ kontsentratsioon (800 ppm). Stiimulit rakendati 3 mõõtmise ringi (kokku 24 minutit), mille järel viidi CO₂ kontsentratsioon tagasi normaaltingimustele (400 ppm). Peale 3 ringi mõõtmist (24 min) rakendati madalat CO₂ kontsentratsiooni (100 ppm) samuti 3 mõõtmisringi (24 min) ning seejärel eemaldati esimese kambri referentsi mõõtmise ajal süsteemist KOH kolonn, mille tulemusel rakendus igale kambriale samaaegselt välisõhu (ligikaudu 400 ppm) CO₂ kontsentratsioon.

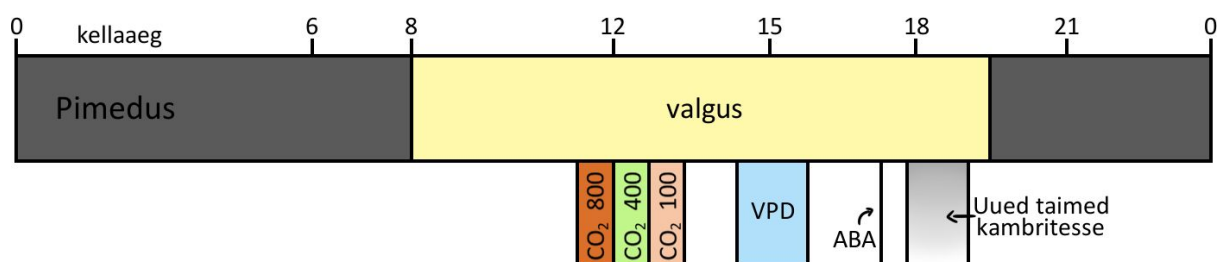
Veeauru rõhu defitsiidile (VPD-le) reageerimise osa

Peale CO₂ kontsentratsiooni muutuste osa lasti taimedel stabiliseeruda. Ligikaudu pool tundi enne VPD rakendamist täideti jääga VPD jaoks kasutatava spiraali ümbritsev anum, et spiraal enne katse algust maha jahutada. VPD rakendamiseks ehk relatiivse õhuniiskuse langetamiseks lülitati õhuvool süsteemi liikuma läbi jahutatud spiraali esimese kambri referentsi mõõtmise ajal. Ligikaudu tunni möödumisel lõpetati VPD stiimul esimese kambri referentsi mõõtmise ajal spiraali süsteemist välja lülitamisega.

ABAga pritsimine

10 μ M ABA töölahus valmistati 100mM *stock*-lahusest tehtud 10mM lähtelahusest (*stock*- ja töölahuse koostis toodud Lisa 1 all). Taimi piserdati vahetult peale kambri mõõtmist, et vältida ABA lahusest tuleneva lisaniiskuse mõju gaasivahetuse tulemustele. ABA lahusega töötlemise ajaks eemaldati kambri veesärgiga kuppel, taimetele piserdati pumppihustiga 10ml pudelist 10 μ M ABA lahust 5x korda, mille järel asetati kambri kuppel peale tagasi.

Peale õhulõhede sulgumist ABA toimel eemaldati taimed ükshaaval kambritest lehepindalade mõõtmiseks, mille järel asetati kambritesse uued taimed üleöö mõõtma.



Joonis 10. Gaasivahetuse katsete skeem.

Lehepindala mõõtmiseks katse lõpus eemaldati taimelt kambris olnud lehed, mis asetati klaaskatte alla koos millimeeterpaberi lõiguga (10 x 30 mm). Lehti pildistati (kaamera mudel: SONY DSC-RX100) ning piltidelt mõõdeti vabavaraga ImageJ (Schneider et al., 2012) lehtede pindalad, mida kasutati katsejärgsel andmete analüüsimisel.

2.2.4.2 Põuastressi katse

HT1 ja WT taimede jaoks võeti võrdne arv potte (10+10), igasse potti kaaluti sama kogus kasvusubstraati ning lisaks taimedega pottidele valmistati kolm tühja, ainult kasvusubstraadiga potti. Esimese katseseeria puhul lisati tühjad potid alles katse teises pooles ja teise seeria puhul lisati tühjad potid katse alguses. Katse algas taimede tärkamisel (2-3 päeva peale külvamist).

Taimi ja kasvusubstraadiga potte hoiti kasvukambris (Percival) ning võeti välja kaalumiseks või kastmiseks, mille juures arvestati eelnevalt maha tühja plastpoti kaal. Kaalumine toimus esmaspäeviti ja neljapäeviti, kõiki taimi ja tühje potte kasteti kindla võrdse massini pealtniisutus meetodiga teisipäeval ja reedel (Tabel 1, osa 1).

Viienda nädala alguses lõpetati poolte HT1 ja poolte WT taimede kastmine, kastmise asemel teostati ainult kaalumine (taimed 1-5) ning ülejäänud taimi kasteti edasi eelneva skeemi järgi (Tabel 1, osa 2). Tühjadest pottidest liitus põua osaga üks pott, ülejäänud kahe regulaarset niisutamist jätkati.

Tabel 1. Põuakatse üldine skeem.

Osa 1, Nädal 1- 4

	E	T	K	N	R	L	P
kõik taimed	kaalumine	kastmine	-	kaalumine	kastmine	-	-

Osa 2, Nädal 5-8

	E	T	K	N	R	L	P
pooled taimed (1-5)	kaalumine	kaalumine	-	kaalumine	kaalumine	-	-
teine pool taimi (6-10)	kaalumine	kastmine	-	kaalumine	kastmine	-	-

Regulaarse kastmise/kaalumise osa lõppes 8. nädala lõpus kastmata taimede nähtaval närbumisel. Taimi võrreldi paarikaupa (kastmata HT1 ja kastetud HT1; kastmata WT ja kastetud WT; kastmata HT1 ja kastmata WT; kastetud HT1 ja kastetud WT) ja pildistati (kaamera mudel Pentax KP), mille järel asetati kastmata (nii HT1 kui WT) taimed 1,5 tunniks veevanni altniisutus meetodiga kastma.

Põuastressi üle elanud taimede taastumist vaadeldi järgneval päeval (umbes 24 tunni möödudes kastmisest).

Märg- ja kuivmass

Põuastressi katses kasutatud taimedel mõõdeti nii märg- kui ka kuivmassi.

Märgmassi kaaluti 8. nädala keskel. Selleks tükeldati taimede kõik maapealseid osad (varred, lehed, õied) fooliumist kottidesse ning kaaluti (kaalu mudel Kern PCB 1000-2). Peale märgmassi kaalumist kuivatati 70°C juures (ahju mudel Panasonic MIR-262-PE). 72h tunni möödudes kaaluti kuivatatud taimed.

2.2.5 Andmeanalüüs

Gaasivahetuskatsetest saadud õhulõhede juhtivused keskmistati. Reaktsiooni amplituudi jaoks võrreldi juhtivust enne stiimuli rakendamist ja juhtivust vaadeldud reaktsiooni lõpus. Osade reaktsioonide puhul toimus stiimuli rakendamise lõpus muutusi õhulõhede juhtivuses, nendel juhtudel valiti amplituudi arvutamise jaoks ajapunkt, mis oli mõlemal liinil juhtivuse maksimum-või miinimum punkt. Valguses avanemise reaktsiooni puhul arvutati õhulõhede avanemiskiirus, mille jaoks leiti graafikult lineaarse tõusuga lõik peale valguse rakendamist ning selle baasil leiti antud vahemikus avanemiskiirus ühe minuti kohta. Statistilise analüüsi jaoks kasutati rakendust Past3, mille abil sooritati ühefaktoriline ANOVA test ja *post-hoc* testi jaoks kasutati Tukey testi.

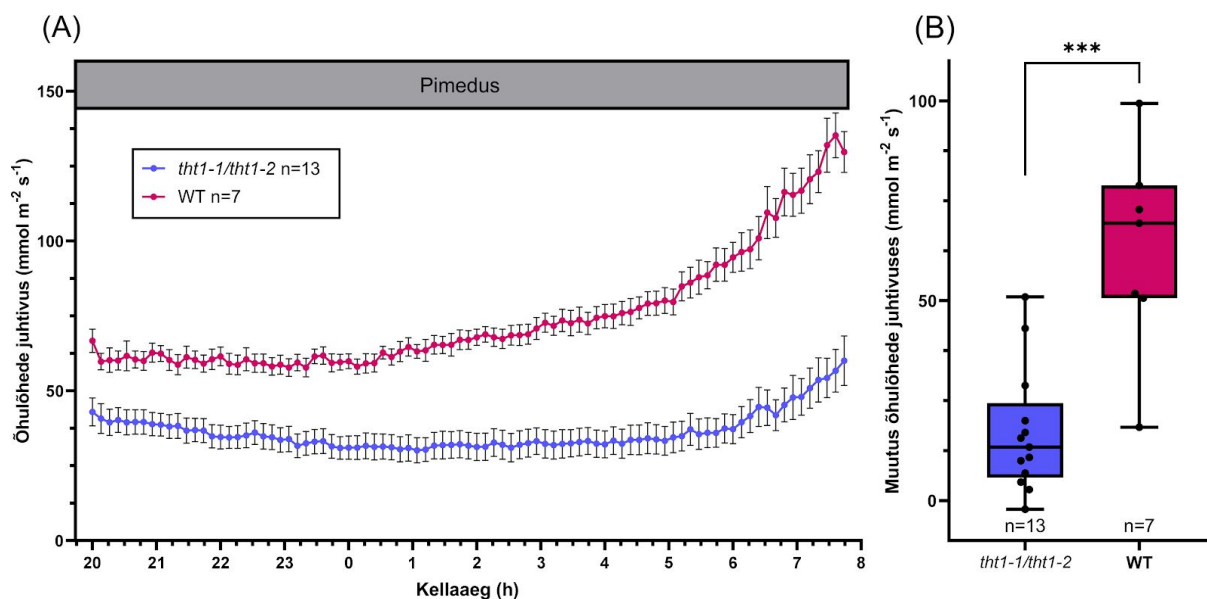
Põuastressi katse tulemused keskmistati iga päeva kohta, mille baasil leiti keskmine veehulga kulu ning kastmiseks kasutatud vee kogus iga nädala jooksul. Märg- ja kuivmassi määramisel saadud tulemused samuti keskmistati ning statistiline analüüs sooritati rakenduses Past3, kasutatdes ühefaktorialset ANOVA testi ja Tukey testi *post-hoc* analüüsiks.

2.3 Tulemused

2.3.1 Gaasivahetus

2.3.1.1 Õhulõhede õine juhtivus

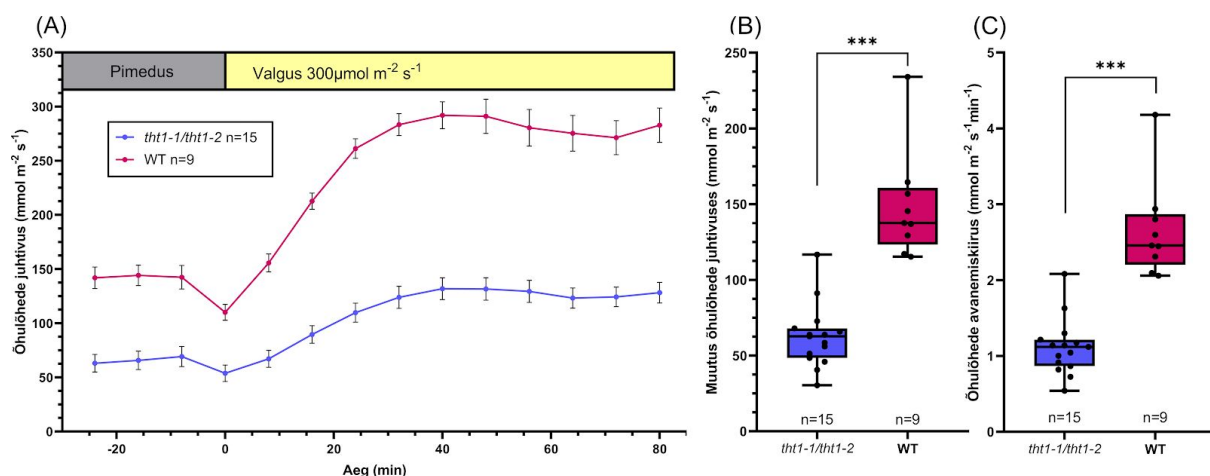
Gaasivahetuse katsetes mõõdeti taimede õhulõhede juhtivust öisel ajal (pimeduses) ilma teisi stiimuleid rakendamata. Metsiktüüpi taimede õhulõhede juhtivus oli kõrgem kui *tht1-1/tht1-2* mutantsete ehk HT1 taimede oma, lisaks alustasid metsiktüüpi taimed õhulõhede avanemist varem kui mutantset taimed (Joonis 11. A). Öö jooksul ja eriti mõned tunnid enne hommikust valguse rakendamist õhulõhede juhtivus tõusis ehk õhulõhed avanesid. Metsiktüüpi tomatite õhulõhede juhtivus hakkas aeglaselt tõusma alates 00:30-01:30 samas kui mutantsete tomatite õhulõhede juhtivus hakkas aeglaselt tõusma alles 05:30-06:30. Antud ajavahemikus kasvas metsiktüübi õhulõhede juhtivus ligikaudu 5 korda rohkem kui *tht1-1/tht1-2* juhtivus. Võrreldes metsiktüüpi taimedega avanesid mutantsete taimede õhulõhed kogu öö jooksul statistiliselt oluliselt vähem ($p < 0,001$; Joonis 11. B).



Joonis 11. (A) Õhulõhede õine juhtivus ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pimeduses 12 tunni jooksul vahemikus kell 20:00 - 8:00. Tulemused on joonisel keskmistatud ja vearistid tähistavad \pm standardviga. Valimi suurus on tähistatud joonisel legendis. (B) Õhulõhede õise absoluutse juhtivuse muutus 12 tunni jooksul. Graafikul on iga taime õhulõhede absoluutne juhtivuse muutus, kast tähistab kahte sisemist kvartiili ning horisontaalne joon kastis mediaani. Valimi suurus on tähistatud x-telje kohal, statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja post-hoc testiks kasutati Tukey testi, *** tähistab $p \leq 0,001$.

2.3.1.2 Õhulõhede avanemine valguse toimetel

Järgides taimede kasvuperioodi ööpäevast rütmi rakendati ka gaasivahetuskatsetes hommikul kell 8 (punkt 0) valge valgus ($300\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ja selle toimetel algas õhulõhede avanemine (Joonis 12. A). Õhulõhede juhtivus kasvas *tht1-1/tht1-2* taimedes $62,7 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ja metsiktüüpi taimedes vastavalt $137,5 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. *tht1-1/tht1-2* taimede õhulõhed avanesid statistiliselt vähem kui metsiktüüpi taimede õhulõhed ($p < 0,001$; Joonis 12. B) ning metsiktüüpi taimede õhulõhede avanemine toimus kiiremini võrreldes mutantsete taimedega ($p < 0,001$; Joonis 12. C). Metsiktüüpi tomati taimede õhulõhede avanemise kiirus oli rohkem kui kaks korda kiirem võrreldes HT1 taimedega, vastavalt $1,1$ ühikut ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{min}^{-1}$) *tht1-1/tht1-2* ning metsiktüüpi taimedel $2,5$ ühikut minutis.



Joonis 12. (A) Õhulõhede juhtivuse ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) muutus valguse käes. Tulemused on joonisel keskmistatud ja vearistid tähistavad \pm standardviga. Valimi suurus on tähistatud joonise legendis. (B) Õhulõhede absoluutne juhtivuse muutus 48 minutit pärast valguse rakendamist. (C) Õhulõhede keskmine avanemiskiirus 48 minuti jooksul ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{min}^{-1}$). Graafikul (B) on iga taime õhulõhede juhtivuse muutus ning graafikul (C) iga taime keskmine avanemiskiirus 48 minuti jooksul. (B) ja (C) graafikutel kast tähistab kahte sisemist kvartiili ning horisontaalne joon kastis mediaani. Valimi suurus on tähistatud x-telje kohal, statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja post-hoc testiks kasutati Tukey testi, *** tähistab $p \leq 0,001$.

2.3.1.3 Õhulõhede reageerimine CO_2 muutustele

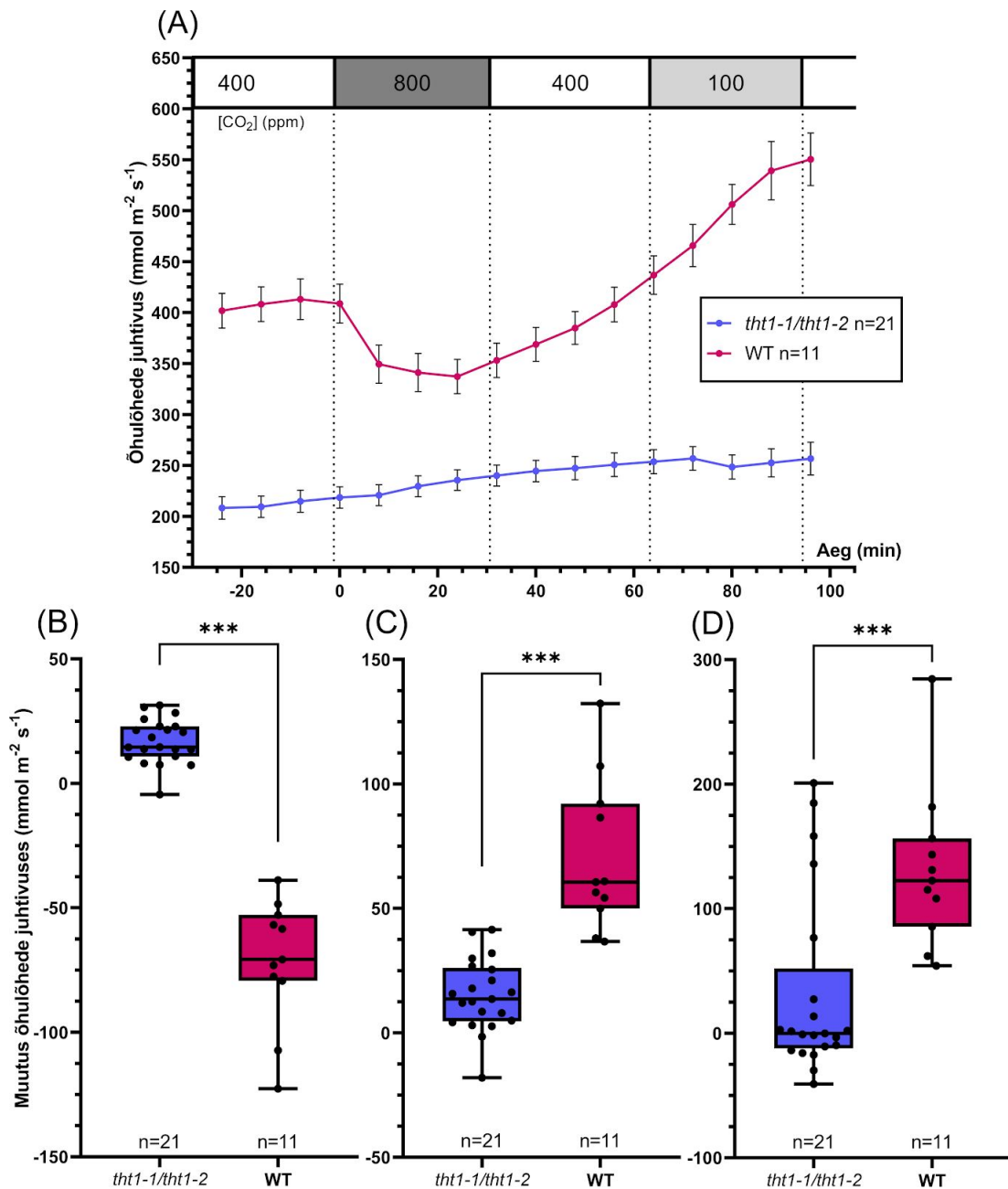
Kõrge (800ppm) ja madala (100ppm) süsihappegaasi kontsentratsiooni rakendamisel reageerisid metsiktüüpi taimede õhulõhed silmnähtavalt muutustele - $[\text{CO}_2]$ tõusmisel õhulõhed sulgusid, sest süsihappegaasi oli fotosünteesi toimimiseks piisavalt ning $[\text{CO}_2]$

langedes õhulõhed avanesid fotosünteesi jaoks vajaliku koguse süsihappegaasi omistamiseks (Joonis 13. A). Selgus, et HT1 taimedel puudub õhulõhede regulatsioon vastusena CO₂ kontsentratsiooni muutustele.

Üleminekul 400ppm kontsentratsioonilt 800ppm-le metsiktüüpi taimede õhulõhede juhtivus vähenes, kuid mutantsete taimede puhul toimus hoopis avanemine (Joonis 13. B). Metsiktüüpi taimede õhulõhede juhtivus langes 70,7 mmol m⁻² s⁻¹ võrra ning *tht1-1/tht1-2* õhulõhede juhtivus tõusis vaadeldud ajavahemikul 14,6 m⁻² s⁻¹.

Peale 24 minutit mindi tagasi 400ppm CO₂ kontsentratsiooni peale, mille tulemusel toimus õhulõhede avanemine mõlema liini puhul (Joonis 13, C). Võrreldes mutantse tomatiga tõusis metsiktüüpi taimede juhtivus statistiliselt oluliselt ligikaudu 4,5 korda rohkem.

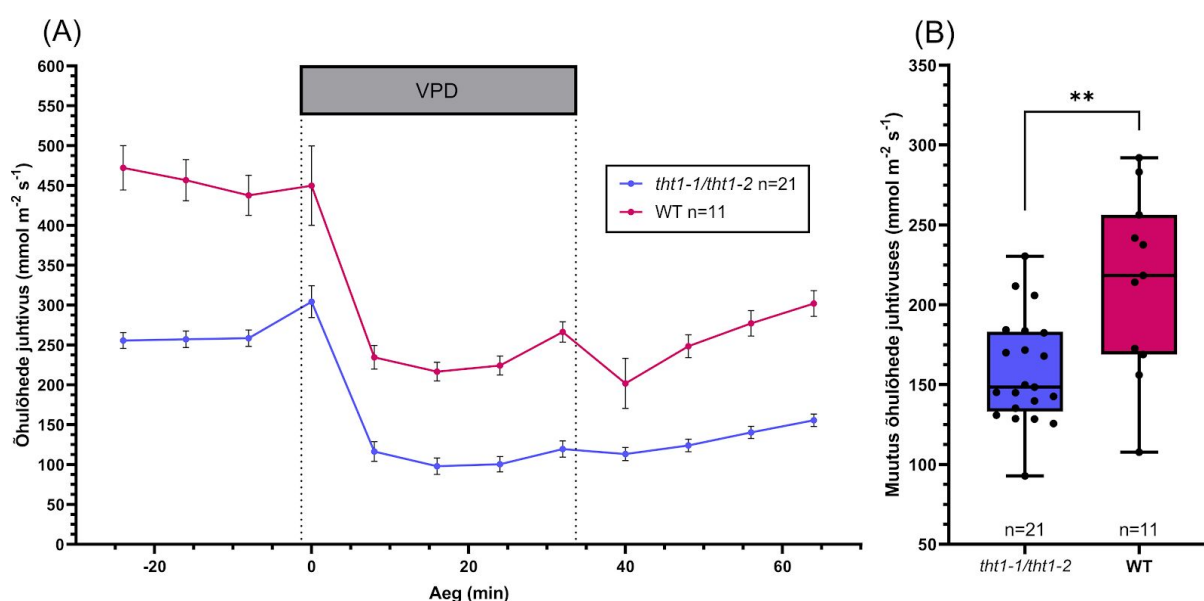
Madala CO₂ kontsentratsiooni (100ppm) rakendamisel avanesid WT taimede õhulõhed silmnähtavalt ($p < 0,001$; Joonis 13. D). HT1 taimede puhul praktiliselt ei täheldatud õhulõhede juhtivuses muutust (-0,2 m⁻² s⁻¹).



Joonis 13. (A) Õhulõhede juhtivuse ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) muutus erinevatel CO_2 kontsentratsioonidel. Tulemused on joonisel keskmistatud ja vearistid tähistavad \pm standardviga. Valimi suurus on tähistatud joonisel legendis. (B) Õhulõhede absoluutne juhtivuse muutus 24 minutit pärast 800ppm CO_2 kontsentratsiooni rakendamist. (C) Õhulõhede absoluutne juhtivuse muutus 24 minutit pärast 400ppm CO_2 kontsentratsiooni rakendamist. (D) Õhulõhede absoluutne juhtivuse muutus 24 minutit pärast 100ppm CO_2 kontsentratsiooni rakendamist. Graafikutel B,C,D on iga taime õhulõhede absoluutne juhtivuse muutus, kast tähistab kahte sisemist kvartiili ning horisontaalne joon kasti mediaani. Valimi suurus on tähistatud x-telje kohal, statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja post-hoc testiks kasutati Tukey testi, *** tähistab $p \leq 0,001$.

2.3.1.4 Õhulõhede reageerimine VPDle

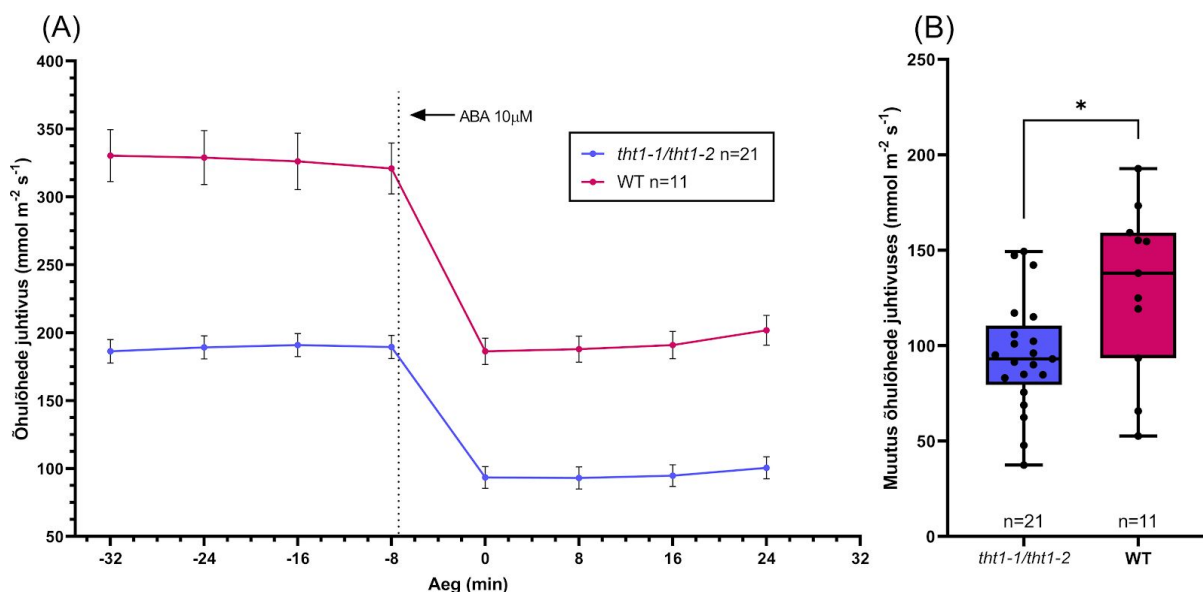
VPD ehk veeauru rõhu defitsiidile reageerimine on taimede reaktsioon alanenud keskkonna õhuniiskusele. VPD iseloomustab veeauru rõhkude erinevust lehe sees ja ümbritseva keskkonna vahel ehk jõudu, mis võimaldab transpiratsioonil toimida tänu vee molekulide välja liikumisele lehe seest. Stiimuli rakendamisele reageerisid mõlemad liinid sarnaselt, sulgedes oma õhulõhed. Siiski oli sulgumise reaktsioon statistiliselt oluliselt erinev ($p < 0,01$; Joonis 14. A). Mutantsete taimede õhulõhede juhtivus langes ligikaudu 1,5 korda vähem kui metsiktüüpi taimede juhtivus. VPD rakendamisel langes relatiivne õhuniiskus metsiktüüpi taimede mõõtekambrites keskmiselt 27% ja mutantsete taimede kambrites 32% (Lisa 4).



Joonis 14. (A) Õhulõhede juhtivuse ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) muutus veeauru defitsiidi rakendamisel. Tulemused on joonisel keskmistatud ja vearistid tähistavad \pm standarddviiga. Valimi suurus on tähistatud joonisel legendis. (B) Õhulõhede absoluutne juhtivuse muutus 24 minutit peale VPD rakendamist. Graafikul on iga taime absoluutne õhulõhede juhtivuse muutus, kast tähistab kahte sisemist kvartiili ning horisontaalne joon kastas mediaani. Valimi suurus on tähistatud x-telje kohal, statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja post-hoc testiks kasutati Tukey testi, ** tähistab $p \leq 0,01$.

2.3.1.5 Õhulõhede reageerimine ABAle

Peale taimede 10 μ M ABA lahusega töötlemist toimus sarnaselt VPDle mõlema liini puhul õhulõhede sulgumine (Joonis 15, A). *tht1-1/tht1-2* ja WT taimede omavaheline õhulõhede juhtivuse languse erinevus oli 1,5 kordne ning tulemused on statistiliselt erinevad ($p < 0,05$; Joonis 15, B).



Joonis 15. (A) Õhulõhede juhtivuse ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) muutus $10\mu\text{M}$ ABA lahusega töötlemisel. Tulemused on joonisel keskmistatud ja vearistid tähistavad \pm standardviga. Valimi suurus on tähistatud joonisel legendis. (B) Õhulõhede absoluutne juhtivuse muutus 16 minutit peale ABA lahusega töötlemist. Graafikul on iga taime õhulõhede absoluutne juhtivuse muutus, kast tähistab kahte sisemist kvartiili ning horisontaalne joon kastis mediaani. Valimi suurus on tähistatud x-telje kohal, statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja post-hoc testiks kasutati Tukey testi, * tähistab $p \leq 0,05$.

2.3.1.6 Veesäästmise hindamine gaasivahetuse tulemuste põhjal

Õhulõhede juhtivus näitab mitu mmol vett kaotab taim ruutmeetri lehepindala kohta sekundis, seega saab sellele näitajale tuginedes kaudselt hinnata taimede veekadu näiteks tundide, päevade ja kuu kaupa (Tabel 2).

Päeval valguse käes on õhulõhed rohkem avatud ja taimed transpireerivad vett rohkem. Päevase veekao hindamiseks 12 tunni jooksul on kasutatud pealelõunasel ajal (kella 12-13 paiku) mõõdetud õhulõhede keskmist juhtivust normaaltingimustes (400ppm CO_2 , valgusintensiivsus $300\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temp. $\sim 24^\circ\text{C}$). Päeval ajal kaotab metsiktüüpi liin ligikaudu poole rohkem vett ($313,4 \text{ L/m}^2$) kui *tht1-1/tht1-2* mutantne liin ($161,3 \text{ L/m}^2$).

Õise veekao hindamiseks 12 tunni jooksul mõlema tomatiliini puhul on kasutatud 10 tunni keskmist (kella 20:00 - 6:00 vahemik). Vastavalt sellele kaotavad metsiktüüpi taimed öö jooksul pimedas viibides $52,6 \text{ L/m}^2$ vett, mis on samuti ligi poole rohkem võrreldes *HT1* mutantsete taimede veekaoga, mis on vastavalt $26,5 \text{ L/m}^2$ lehepindala kohta.

Õise ja päevase veekao hinnangute kokupanekul saab ennustada mõlema tomatiliini veekadusid pikemas perspektiivis.

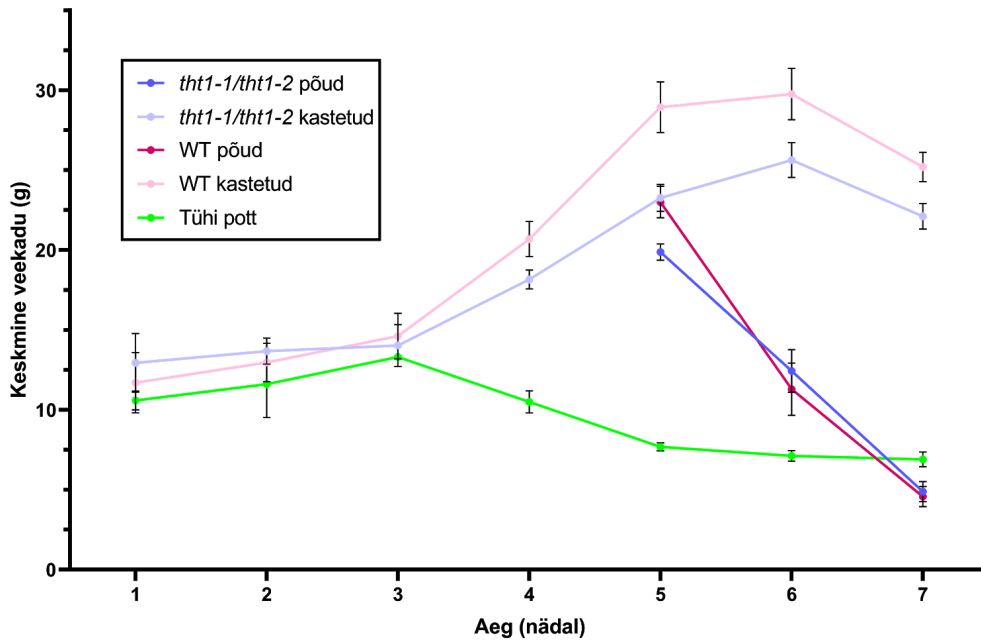
Tabel 2. Tomatiliinide *tht1-1/tht1-2* ja WT veekao hinnangud gaasivahetuse tulemuste põhjal (L/m² lehepindala kohta). Tabelis on toodud ligikaudne veekao hinnang 12 tunni kohta päevasel ajal (valguse käes), 12 tunni kohta öisel ajal (pimedas), ühe ööpäeva raames (24h) ning ühe kuu (30 päeva) kohta.

	<i>tht1-1/tht1-2</i>	WT	erinevus (%)
Päevane veekadu (L/m ²)	161,3	313,4	51,5
Öine veekadu (L/m ²)	26,5	52,6	50,4
Ööpäevane veekadu (L/m ²)	187,8	366	51,3
Ühe kuu (30 päeva) veekadu (L/m ²)	5634	10980	

2.3.2 Põuastress

Gaasivahetuskatsetes saadud tulemused viitasid sellele, et tänu madalamale õhulõhede juhtivusele on *tht1-1/tht1-2* tomatitaimed oluliselt vett säästvamad kui metsiktüüpi taimed. Vastavalt sellele seati eesmärgiks uurida mutantsete ja metsiktüüpi tomatitaimede vastupidavust põuale. Põuastressile vastupidavuse hindamise katseskeem- ja kirjeldus on toodud peatükis 2.2.4.2.

Erinevused metsiktüüpi ja *tht1-1/tht1-2* taimede vee kaotamise keskmistes kogustes muutusid nähtavaks peale katse kolmandat nädalat (Joonis 16). Viiendal nädalal lõpetati poolte WT ja poolte mutantsete taimede kastmine, mille tulemusel hakkasid põuda kannatavate taimede veekao trendid langema. Vastavalt gaasvahetuskatsetest tehtud veesäästlikuse hinnangutele on põuastressi katse tulemustest näha, et *tht1-1/tht1-2* taimed kaotavad vähem vett kui metsiktüüpi tomatitaimed. Veekasutuse erinevust toetavad keskmised kastmiseks kulunud veekogused (Lisa 5).



Joonis 16. Põuastressi katse keskmised päevased kaotatud vee hulgad (g). Tulemused on joonisel keskmistatud ja vearistid tähistavad \pm standardviga. Kuni viienda nädalani on valimi suurus mõlema tomatiliini jaoks 20 taime, peale antud ajapunkti on valimite suurused 10 taime. Tühjade pottide valimi suurus on 6 potti.

Kastmata metsiktüüpi taimed vajusid silmnähtavalt longu 7.-8. nädala jooksul, kuid *HT1* mutantsed taimed mitte. Katse lõpuks olid regulaarselt kastetud taimed kasvult suuremad kui kastmata taimed nii *tht1-1/tht1-2* kui ka metsiktüüpi taimede puhul (Lisa 6).

Peale kastmist olid taimed enamjaolt hästi taastunud, paljudel kastmata taimedel olid alumiste lehtede servad pöördumatult kahjustunud, eriti silmnähtav kahjustus esines metsiktüüpi taimedel (Joonis 17).



Joonis 17. Põuastressi üle elanud metsiktüüpi taimede lehtede kahjustused peale kastmist ning põuast taastumist.

Põuakatse teise korduse lõpus mõõdeti mullaniiskuse mõõtjaga (ΔT Soil Moisture Kit - HH2 niiskusemõõtja ja ML3 sensor) kõikide pottide mulla niiskust (Lisa 7). Kastmata metsiktüüpi ja mutantsete tomatite potid on märgatavamalt kuivemad võrreldes kastetud pottidega. Kastmata tühi pott 1 on samuti niiskem kui kastmata taimedega potid aga kuivem kui kastetud potid.

2.3.2.1 Märg- ja kuivmass

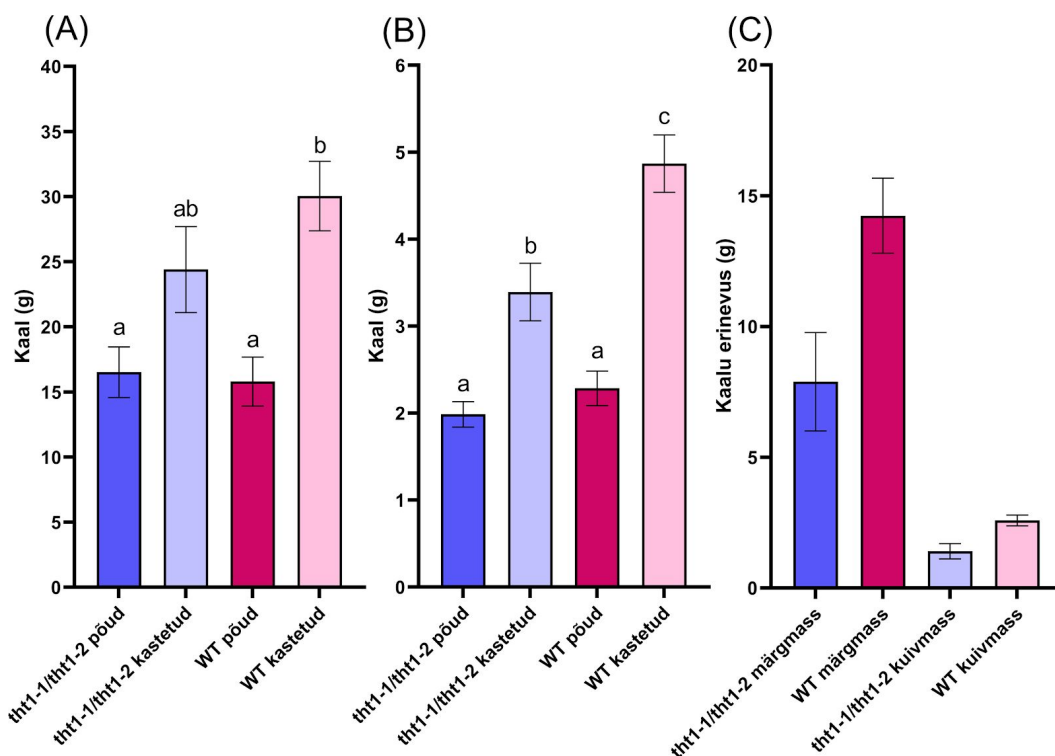
Peale põuastressi katse lõppu mõõdeti taimede märg- ja kuivmassi. Üldiselt olid põuda kannatanud taimed nii väiksema märg- kui ka kuivmassiga, võrreldes kastetud taimede tulemustega (Joonis 18. A,B)

Märgmassi puhul esines statistiliselt oluline erinevus kastmata *tht1-1/tht1-2* ja kastetud metsiktüüpi taimede vahel ($p=0,005$; Joonis 18. A). Lisaks erinesid statistiliselt oluliselt omavahel põua üle elanud metsiktüüpi taimede ja kastetud metsiktüüpi taimede massid ($p=0,003$).

Ahjus kuivatatud taimede kuivmassi tulemustes esines rohkem erinevusi (Joonis 19. B) - statistiliselt olulised erinevused esinesid põuda saanud ja kastetud *tht1-1/tht1-2* taimede vahel ($p=0,002$) ning kastetud *tht1-1/tht1-2* ja kastmata metsiktüüpi taimede puhul ($p=0,02$).

Lisaks oli kastetud metsiktüüpi taimede kuivmass statistiliselt oluliselt erinev teistest kolmest grupist ehk kastetud WT võrrelduna kastmata *tht1-1/tht1-2*-ga ($p<0,001$), kastetud WT võrrelduna kastetud *tht1-1/tht1-2*-ga ($p=0,001$) ning kastetud metsiktüüp võrrelduna kastmata metsiktüübiga ($p<0,001$).

Kastetud ja kastmata taimede märg-ja kuivmasside võrdlemiseks lahutati kastetud taimede massist kastmata taimede mass ning saadud erinevused on toodud Joonise 18 (C) graafikul. Metsiktüüpi ja mutantsete taimede masside erinevusi omavahel võrreldes on metsiktüüpi taimede erinevused ligi poole suuremad.



Joonis 18. (A) *tht1-1/tht1-2* ja metsiktüüpi taimede märgmassi võrdlus. (B) *tht1-1/tht1-2* ja metsiktüüpi taimede kuivmassi võrdlus. (C) Taimede kaalu erinevused. Iga tulba puhul on kastetud taimede keskmisest lahutatud põuas viibinud taimede massid, vasakul on märgmasside ja paremal kuivmasside erinevused. Tulemused on joonisel keskmistatud ja vearistid tähistavad \pm standarddviiga. Tähtedega (a,b,c) tähistatud grupid on üksteisest statistiliselt erinevad. (A) ja (B) puhul on valimi suurus iga tulba jaoks 10 taime ning statistiline analüüs teostati ühefaktorilise ANOVA testiga ja post-hoc testiks kasutati Tukey testi

2.4 Arutelu

2.4.1 HT1 kinaasi roll õhulõhede regulatsioonis

Gaasivahetuskatsete tulemustest selgus, et *tht1-1/tht1-2* tomati fenotüüp vastas varasemalt müürloogas kirjeldatud retsessiivse *ht1-2* mutandi madalale õhulõhede juhtivusele ning [CO₂] muutustele tundetule fenotübile (Hashimoto *et al.*, 2006). Tomati HT1 kinaaside DNA järjestused on ennustatud sekveneerimisandmete põhjal (Kevei *et al.*, 2015), mis on sarnased müürloogas kirjeldatud HT1 järjestustele (vt. peatükk 1.4). Varasemalt on näidatud

müürloogas HT1 interakteerumist MPK12 kinaasiga (Hõrak *et al.*, 2016) ning tomati HT1 interakteerumist tomati MPK12 kinaasiga on näidatud *in vitro* (Töldsepp, 2019), mis annab alust arvata, et kinaas toimib *in vivo* õhulõhede regulatsioonis paralleelselt müürloogas kirjeldatud rajale (vt. peatükk 1.3). Hariliku müürlooga puhul piisab HT1 kinaasi domeeni järjestusega manipuleerimisest CO₂ muutustele tundetu efekti saavutamiseks (Hashimoto *et al.*, 2006; Hashimoto-Sugimoto *et al.*, 2016). Küll ei ole teada, kas efekti avaldumine tomatis sõltub mõlema HT1 geeni olemasolust või saab sama efekti saavutada ainult ühe mutantse HT1 geeniga, sest mõlemad geenid on sarnased ja võivad omada reguleerivat funktsiooni. Sel juhul tuleks teha uued üksikmutandid või ristata *tht1-1/tht1-2* tomateid tagasi metsiktüüpi taimedega, genotüpiseerida järglased ning gaasivahetuskatsetega kirjeldada *tht1-1* ja *tht1-2* taimede fenotüüpe. Uute üksikmutantide tegemisel saab genereerida uusi mutatsioone tomati HT1 geenis või geenides sarnaselt varasemalt müürloogas kirjeldatud mutantidele. HT1 kinaasi puhul on leitud ka dominantseid mutatsioone, mille puhul õhulõhed on rohkem avatud, kuid samuti ei reageeri süsihappegaasi kontsentratsiooni muutustele (Hashimoto-Sugimoto *et al.*, 2016; Hõrak *et al.*, 2016). Kasvuhoonetes tomatite kasvatamise puhul võivad rohkem avatud õhulõhed mõjuda taimede kasvule pigem positiivselt, sest rohkem süsihappegaasi pääseb taime sisse fotosünteesi jaoks ning piisava niiskuse hoidmisel tõuseb veekasutuse efektiivsus (Zhang *et al.*, 2017). Seega tasub testida dominantse HT1 mutatsiooni efekti tomatitaimede kasvule.

Veel üheks variandiks on viia terve(d) tomati HT1 geen või geenid HT1 puudulikke harilikku müürlooga, eesmärgiga komplementeerida HT1 geeni funktsioon ja seega kinnitada tomati HT1 kinaasi paralleelset toimimist. Sellele lisaks võib *in vitro* kinaasi fosforülatsiooni testiga näidata, kas tomati HT1 kinaas on võimeline interakteeruma hariliku müürlooga OST1, MPK4, MPK12 ja GHR1 valkudega, kinnitamaks tomati homologse valguga osalemist teadaolevas CO₂ signaalirajas. Nii hariliku müürlooga kui ka tomati puhul tasub CO₂ muutustele reageerimiseks kasutatavat signaalirada edasi uurida, näiteks otsida veel HT1 kinaasiga interakteeruvaid ja CO₂ õhulõhede reguleeratsiooni komponente, mida HT1 reguleerib või kaudselt mõjutab. Ka tasub üle kontrollida, kas HT1 kinaas on võimeline mõjutama SLAC1 anioonkanali aktiveerumist *in vivo* (Hõrak *et al.*, 2016).

Nii müürlooga kui ka tomati HT1 kinaasi 3D struktuuri ja võimaliku multimeriseerumise väljaselgitamine aitab samuti kinaasi interaktsioone paremini ennustada ja kontrollida. Praegu teadaolev müürlooga HT1 kinaasi välja pakutud struktuurne mudel on ennustatud

HT1-le sarnase valgu põhjal (Hashimoto-Sugimoto *et al.*, 2016), mis ei pruugi olla korrektne. Lisaks tasub üle kontrollida *tht1-1/tht1-2* taimede õhulõhede arvukus ja suurus ning võrrelda neid metsiktüüpi taimede õhulõhedega, et kinnitada efekti esinemist häiritud õhulõhede regulatsiooni, mitte õhulõhede morfoloogia tõttu (Hashimoto *et al.*, 2006; Hõrak *et al.*, 2016).

2.4.2 Öine juhtivus ning avanemine valguse toimetel

Öise õhulõhede juhtivuse tulemustest on näha, et metsiktüüpi taimede õhulõhed alustasid aeglast avanemist öösel kella ühe paiku ning pimeduses avanemine kiirenes pärast kella viite hommikul (Joonis 11). Samas mutantsete *tht1-1/tht1-2* taimede õhulõhed hakkasid aeglaselt avanema pimedas pärast kella viite hommikul. Öise juhtivuse tõus on põhjustatud tsirkaadse kella rütmist, mis valmistab taimi ette algavaks päevaks ja võimaldab fotosünteesiks sobilikku perioodi maksimaalselt ära kasutada (Kreps ja Kay, 1997; Lin *et al.*, 2004). Öisel ajal oli metsiktüüpi taimede õhulõhede juhtivus kõrgem kui mutantsete taimede oma. Erinevus juhtivuses kui ka avanemise algusajaks võib tuleneda sellest, et HT1 kinaasi ära rikkumine mõjutab lisaks õhulõhede regulatsioonile ka teisi protsesse. Raf-kinaaside osalust on näidatud taimedes ABA signaalirajas ja osmootsele stressile reageerimisel (Lin *et al.*, 2020; Takahashi *et al.*, 2020), seega on võimalik, et HT1 kinaasi puudumisel on häiritud ööpäevast rütmi reguleeriv protsess ning selle tõttu avanevad *tht1-1/tht1-2* taimede õhulõhed hiljem. Võimalik, et mutantsed taimed on kohanenud madalama õhulõhede juhtivusega või ei suuda ületada HT1 kinaasi mutatsioonidest põhjustatud efekti, mille tõttu ei toimu öösel nii ulatuslikku õhulõhede avanemist kui täheldati metsiktüüpi taimede korral.

Hommikul kell 8 rakendatud valguses valguses toimus õhulõhede juhtivuse tõus (Joonis 12). Valguse rakendamine oli kohandatud vastavalt taimede kasvuperioodi ööpäevasele rütmile Percivali kasvukapis, samas katse alguse jooksul toimus üleminek suveajalt talveajale ning kasvukapis režiim ei muutunud, mis tähendas, et tegelikult algas taimede jaoks talveaja järgi päev kell 7, mitte 8. Tsirkaadse kella poolt reguleeritud öine õhulõhede juhtivuse tõus ja valguses avanemise amplituud on tänu valearvestusele mõjutatud, mille tõttu ei pruugi nii kogu öise ja valguses avanemise juhtivuse muutused olla täiesti korrektsed. Siiski, valgusele reageerimise reaktsioon on olemas mõlema liini puhul ja mõlemate juhtivused tõusid, kuid *tht1-1/tht1-2* taimede õhulõhed avanesid oluliselt aeglasemalt kui WT taimede õhulõhed (Joonis 12). Aeglasem avanemine on tõenäoliselt anioonkanalite, näiteks SLAC1 aktiivsuse

tagajärg, mille tõttu transporditakse õhulõhede sulgemiseks anioone sulgrakkudest välja ja õhulõhede avanemine on häiritud (Vahisalu *et al.*, 2008).

2.4.3 Reageerimine CO₂ taseme muutustele

CO₂ kontsentratsiooni muutustele reageerimisel metsiktüüpi taimede õhulõhed sulgusid vastusena kõrgele, 800 ppm CO₂ kontsentratsioonile ning avanesid vastusena normaalsele, 400 ppm ja madala, 100 ppm CO₂ taseme rakendamisele (Joonis 13). Samas *tht1-1/tht1-2* liini juhtivus näitas pidevat aeglaselt kasvavat õhulõhede juhtivuse trendi, olenemata CO₂ kontsentratsioonist. Antud efekti on täheldatud varasemates töödes müürlooga *ht1* mutantidega, kus gaasivahetuskatsetes toimus *ht1-2* taimede õhulõhede juhtivuses väike tõus olenemata rakendatud CO₂ stiimulist (Hashimoto *et al.*, 2006; Hashimoto-Sugimoto *et al.*, 2016). Kuna on näidatud HT1 kinaasi osalust ning olulisust signaalrajas õhulõhede sulgumisel vastusena kõrgele CO₂ kontsentratsioonile (Hõrak *et al.*, 2016) võib juhtivuse muutuse panna samuti ööpäevase rütmi arvele (Mas, 2004; Li *et al.*, 2020). Samas 100 ppm CO₂ kontsentratsiooni rakendamise tagajärjel toimunud trendi tõusu peatumine võib tuleneda ööpäevase rütmi põhjustatud avanemise haripunkti jõudmisest. Nimelt müürlooga retsessiivse *ht1-2* ja dominantse *ht1-3* mutatsioonidega taimedel esines sarnane fenomen - normaalse, 400ppm ja kõrge, 700; 800 või 2000 ppm [CO₂] juures toimus vaevumärgatav tõus ning madala, 100 ppm kontsentratsiooni rakendamisel täheldati koguni kerget langust (Hashimoto *et al.*, 2006; Hashimoto-Sugimoto *et al.*, 2016). Nähtust ei osatud müürlooga mutantide puhul seletada, kuid samuti sarnase nähtuse toimumine tomatis viitab võimalikule universaalsele efektile. Tehes gaasivahetuse katseid mutantsete HT1 taimedega madala CO₂ kontsentratsiooniga hommikul, lõunal ja õhtul saab määratleda ööpäevase rütmi mõju täheldatud fenomenile. Kui hommikul ajal toimub madala [CO₂] taseme rakendamisel õhulõhede avanemine võib arvatavasti tegu olla tsirkaadrütmi protsessiga, kui hommikul toimuks samamoodi trendi langus on arvatavasti tegu millegi muuga.

2.4.4 Õhulõhede sulgumine vastusena VPD ja ABA rakendamisele

Veeauru rõhu defitsiidi (VPD) rakendamisele reageerisid nii metsiktüüpi kui ka *tht1-1/tht1-2* taimed. Vastusena umbes 30% relatiivse õhuniiskuse langusele sulgusid nii metsiktüüpi kui ka HT1 mutantide õhulõhed (Joonis 14). Samuti toimus mõlema liini puhul vastusena ABAle õhulõhede sulgumine (Joonis 15). Mõlema sulgumisreaktsiooni puhul esines statistiliselt oluline erinevus, mis on tingitud metsiktüübi ja *tht1-1/tht1-2* taimede omavahelisest

õhulõhede juhtivuse erinevusest. CO₂ muutustele reageerimise (A) graafikul on näha *tth1-1/tth1-2* tundetus muutustele, kuid nii nagu valguse rakendamisel reageerivad mõlemad liinid VPDle ja ABAle. Lisaks toetab mutantse tomati metsiktüübile võrdset või koguni natuke suurema amplituudiga reageerimisvõimet relatiivsete õhulõhede juhtivuste võrdlemine (Lisa 8). Siit saab järeldada, et *HT1* mutantsete tomatitaimede ABA signaalirada on samamoodi funktsionaalne nagu hariliku müürlooga *ht1* taimedes (Hashimoto *et al.*, 2006; Hashimoto-Sugimoto *et al.*, 2016; Hõrak *et al.*, 2016). Nii VPD õhulõhede juhtivuse kui relatiivse õhuniiskuse graafikult on näha stiimuli rakendamise ajal kerget tõusu trendi, mis võib tuleneda VPD jaoks kasutatava spiraali ümber jää sulamisest ja seega spiraali soojenemisest. Samas ei toimunud õhulõhede tempokat avanemist peale kõrgema relatiivse õhuniiskuse taastamist. Kuna katse viidi läbi õhtupoolsel ajal oli õhulõhede avanemine piiratud tsirkaadse kella poolt, mis valmistas taimi ette saabuvaks ööks (Mas, 2004).

2.4.5 Põuastress

Pottide kaalumisel ja vastavalt sellele kastmiseks kasutatava vee hulga kontrollimisel saab hinnata taimede veekasutust. Seda meetodit kasutades on näha erinevust metsiktüüpi ja *tth1-1/tth1-2* taimede veekasutuste vahel. Katse tulemuste korrektsus on küsitav - andmete analüüsimisel oli näha märgatavaid erinevusi esimese ja teise katseseeria tulemuste vahel nii taimede veekasutuse, märg- ja kuivmassi osas. Suure tõenäosusega tekitasid erinevused tehnilised tõrked Percivali kasvukapiga, mille tulemusel ei olnud teise katseseeria taimede kasvutingimused samad mis esimese seeria ajal. Kasvukapi probleemid mõjutasid temperatuuri ja relatiivset õhuniiskust, mistõttu ei olnud nii mulla pinnalt kui ka taimede transpiratsioonist auruv veehulk stabiilne. Huvitaval kombel mõjusid temperatuuri kõikumised taimede kasvu soodustavalt, sest ebastabiilsetes tingimustes viibinud taimed olid kasvult suuremad ja vähem stressis kui kontrollitud temperatuuri ja õhuniiskuse tingimustes kasvanud taimed. Antud nähtusele ei ole loogilist seletust välja pakkuda, küll aga tasub fenomeni proovida tuleviku katsetes replitseerida nii müürlooga kui tomatitaimedega ning õnnestumise korral hakata põhjuseid välja selgitama.

Meetodi üheks miinuspooleks on jooksvalt hinnata kasvavate taimede massi. Poti ja potis olevale kasvusubstraadile lisandub järk-järgult taime mass, mis võib kaalu tõsta süsihappegaasist seotud süsiniku arvelt. Tänu taime kasvule on keeruline leida ajapunkt, kus taime transpiratsioon hakkab erinema mulla pinnalt aurunud vee kogusest. Alternatiivselt saab põuastressi mõju taimele hinnata regulaarse või paar korda nädala jooksul

gaasivahetuse mõõtmisel ilma teisi stiimuleid rakendamata - taime transpiratsioon on eraldatud mullast auruva vee kogusest ning usaldusväärsemateks tulemusteks saab omavahel võrrelda veekulu gaasivahetuse ning pottide kaalumise andmete abil (de Ollas *et al.*, 2019).

Põuastressi katse viimasel nädalal toimub nii metsiktüüpi kui *tht1-1/tht1-2* taimedes veekao langus. Nähtus on suure tõenäosusega juurte kasvuruumi puudumise tagajärg, sest väikestes pottides on tomatitaimede kasv häiritud ka piisava koguse vee ja toitainete kättesaadavusel (Ruff *et al.*, 1987). Tühja poti vee kaotamise langus tekkis juba peale kolmandat nädalat, sest selleks ajaks olid tomatitaimed piisavalt suureks kasvanud, et hakata lehtedega mullapinda varjutama. Varju tekkimisel ei aurustunud mulla pinnal vett valguse soojuse mõjul, tekitades tühjade pottide aurumises trendi languse. Lehtede varju abil mulla pinnalt vee aurumise vähendamine on üks viis taimede kasvatamisel vett säästa, milleks tuleb taimed üksteisele lähemale istutada (Zhang *et al.*, 2017).

Seitsmendal nädalal langeb põuaste taimede veekadu allapoole tühja poti aurumist. Kui seal kohal põuaste taimede veekaost arvestada tühja poti ehk mullapinna aurumine maha on tulemuseks negatiivne väärtus. Mullaniiskuse anduriga pottide mõõtmisest selgus, et põuaste taimedega potid on kuivemad kui kastmata tühi pott (Lisa 7). Taimede juured imavad mullast vee transpiratsiooni abil kiiremini välja, võrreldes vee passiivset aurumist mulla pinnalt. Seega tegu ei ole seal negatiivse transpiratsiooniga vaid mullapinna kuivamise kiiruste erinevusest tulelenud efektiga.

Märg- ja kuivmassi määramisel esines WT ja mutantsete tomatitaimede masside vahel statistiliselt oluline erinevus (Joonis 18). Metsiktüüpi taimed toodavad keskmiselt rohkem biomassi kui *tht1-1/tht1-2* mutantset taimed. WT kastetud taimede märgmassi oli umbes 17% rohkem võrreldes HT1 mutantse märgmassiga, samas kastmata taimede mass oli peaaegu võrdne. Kuivmassi võrreldes on kastetud taimede vaheline erinevus 27% ringis, kuid kastmata taimede puhul on keskmine kuivmass sarnane. HT1 mutantset taimed võivad küll kasvult väiksemad olla aga eelis metsiktüüpi taimede ees on pikemale põuale paremini vastu pidada, mida toetab katse lõpus kastmata *tht1-1/tht1-2* ja WT taimede visuaalne võrdlus (Lisa 6). Tomateid kasvatatakse peamiselt kasvuhoonetes kontrollitud tingimustes, seega tasuks paralleelne efekt saavutada näiteks avamaal kasvavas põllukultuuris ja uurida HT1 kinaasi mõju põllukultuuri kasvule ja saagikusele, kui veeressursid on limiteeritud.

Kokkuvõte

HT1 kinaasi vajalikkust õhulõhede reageerimiseks ümbritseva keskkonna süsihappegaasi taseme muutustele on varasemalt näidatud harilikus müürloogas. Mutatsioonid HT1 kinaasis põhjustasid õhulõhede võimetuse reguleerida õhupilu avatust vastusena CO₂ kontsentratsiooni muutustele. Antud kinaasi funktsioonide edasi uurimiseks muudeti CRISPR/Cas9 süsteemi abil kultiveeritud tomati M82 liini kahte geeni, mis sarnanesid müürlooga *HT1* järjestusele.

Gaasivahetuse katsete tulemustest selgus, et topeltnutantsete *tht1-1/tht1-2* tomatitaimede õhulõhed ei olnud samuti võimelised reageerima CO₂ kontsentratsiooni muutustele. Võrreldes metsiktüüpi tomatitaimedega oli mutantsete tomatite õhulõhede juhtivus madalam, mis vastas müürloogas kirjeldatud retsessiivsete *ht1* mutatsioonide fenotüübile. Samuti olid *tht1-1/tht1-2* taimede õhulõhed võimelised reageerima valgele valgusele, VPD rakendamisele ning ABAGA pritsimisele, kinnitades HT1 kinaasi toimimist omaette rajal. Müürloogas on näidatud CO₂ tundetu fenotüübi avaldumist ühe konkreetse HT1 kinaasiga manipuleerimisel. Tomati puhul tasub edaspidistes uuringutes testida, kas õhulõhede regulatsiooniks on vajalikud mõlemad ennustatud *THT1* geenidelt toodetavad kinaasid. On võimalik, et vaadeldud efekti saavutab ka *tht1-1* või *tht1-2* üksikmutantsetes tomatitaimedes.

Põuastressile vastupidavuse hindamisel oli katse lõpus visuaalselt näha, et kastmata metsiktüüpi taimed olid põua tulemusel närbunud, *tht1-1/tht1-2* taimed olid samas põuale hästi vastu pidanud. Taimede biomasse võrreldes olid WT taimed *tht1-1/tht1-2* taimedest oluliselt suurema massiga, kuid põua tingimustes ei esinenud WT ja *tht1-1/tht1-2* taimede masside vahel olulist erinevust. Seetõttu on kuivades tingimustes põuastressile vastupidavamate *tht1* mutantsete taimede kasvatamine kasulik. Üldiselt kasvatatakse tomatitaimi kasvuhoonetes kontrollitud mulla ja õhuniiskuse tingimustes, mille tõttu oleks kasulik katsetada *ht1* mutatsioonide põuakindluse efekti kuivas põlluharimispiirkonnas mõne avamaa põllukultuuriga.

Resümee

The role of the HT1 kinase in stomatal regulation of tomato plants

Triinu Arjus

Summary

The role of HT1 kinase in stomatal regulation in response to ambient CO₂ concentration change has previously been reported in *Arabidopsis thaliana*. As a result of mutations in HT1 kinase, stomata became unable to respond to changes in surrounding CO₂ levels. To further study HT1 functions, CRISPR/Cas9 method was used on cultivated tomato (*S. lycopersicum*) line M82 in order to manipulate two putative *HT1* genes, which were similar to *A. thaliana* *HT1* gene sequence.

The gas-exchange experiments showed the double-mutant *tht1-1/tht1-2* tomato plants were also unable to react to changes in ambient CO₂ concentration. Compared to the wild-type the mutant tomato plants displayed lower stomatal conductance, which corresponds to the previously described phenotype in *Arabidopsis* plants with recessive *ht1* mutations. The stomata of *tht1-1/tht1-2* plants were able to react to white light, VPD and ABA, confirming that HT1 functions in its own pathway. The CO₂-insensitive phenotype in *A. thaliana* manifests itself when only *HT1* has been manipulated with, however in tomato it remains to be addressed whether both putative HT1 kinases are required for stomatal regulation or same effect can be achieved with either *tht1-1* or *tht1-2* mutation.

From the drought-stress experiment it was observed that unwatered *tht1-1/tht1-2* plants handled the aridity better, compared to wilted unwatered WT counterparts. Watered WT tomatoes had greater biomass weight than *ht1* mutant plants, however in drought conditions the weights of WT and *ht1* mutant plants had no significant difference. Hence, in case of longer-lasting drought periods, it is more practical to grow the *tht1* plants, which can overcome water deficiency better than wild-type. Tomato plants are generally grown in greenhouses with controlled soil moisture and air humidity, thus it would be practical to test the *ht1* mutation drought-tolerance effect in field grown crop species, especially in generally arid regions.

Tänuavaldused

Soovin südamest tänada oma juhendajaid Hannes Kollistit ja Kaspar Koolmeistrit, kes olid alati sõbralikult valmis vastama ja aitama lõputult tekkinud küsimustega. Ükski tudeng ei oska paremaid juhendajaid soovida! Lisaks tänan Joachim Matthias Gerholdi ja Jenni Katri Pedorit Western bloti saladuste õpetamise eest. Kogu ülejäänud laborirahvast tänan alati positiivse, rõõmsameelse ja tegusa õhkkonna loomise eest. Samuti soovin tänada oma lähedasi, kes toetasid mind töö kirjutamisel.

Kasutatud kirjandus

- Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MRG, Hedrich R** (2000) GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. *FEBS Letters* **486**: 93–98
- Addicott FT, Lyon JL, Ohkuma K, Thiessen WE, Carns HR, Smith OE, Cornforth JW, Milborrow BV, Ryback G, Wareing PF** (1968) Abscisic Acid: A New Name for Abscisin II (Dormin). *Science* **159**: 1493–1493
- Ahmad M, Cashmore AR** (1993) HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**: 162–166
- Alabadi D, Oyama T, Yanovsky MJ, Harmon FG, Más P, Kay SA** (2001) Reciprocal Regulation Between TOC1 and LHY/CCA1 Within the *Arabidopsis* Circadian Clock. *Science* **293**: 880–883
- Alabadi D, Yanovsky MJ, Más P, Harmer SL, Kay SA** (2002) Critical Role for CCA1 and LHY in Maintaining Circadian Rhythmicity in *Arabidopsis*. *Current Biology* **12**: 757–761
- Ando E, Kinoshita T** (2018) Red Light-Induced Phosphorylation of Plasma Membrane H⁺-ATPase in Stomatal Guard Cells. *Plant Physiology* **178**: 838–849
- Aylor DE, Parlange J-Y, Krikorian AD** (1973) Stomatal Mechanics. *American Journal of Botany* **60**: 163–171
- Bacon M** (2009) *Water Use Efficiency in Plant Biology*. John Wiley & Sons
- Bolger A, Scossa F, Bolger ME, Lanz C, Maumus F, Tohge T, Quesneville H, Alseekh S, Sørensen I, Lichtenstein G, et al** (2014) The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum pennellii*. *Nature Genetics* **46**: 1034–1038
- Boyer JS** (1982) *Plant Productivity and Environment*. *Science* **218**: 443–448
- Carter R, Woolfenden H, Baillie A, Amsbury S, Carroll S, Healicon E, Sovatzoglou S, Braybrook S, Gray JE, Hobbs J, et al** (2017) Stomatal Opening Involves Polar, Not Radial, Stiffening Of Guard Cells. *Current Biology* **27**: 2974–2983.e2
- Cornforth JW, Milborrow BV, Ryback G, Wareing PF** (1965) Chemistry and Physiology of ‘Dormins’ In Sycamore: Identity of Sycamore ‘Dormin’ with Abscisin II. *Nature* **205**: 1269–1270
- Costa JM, Monnet F, Jannaud D, Leonhardt N, Ksas B, Reiter IM, Pantin F, Genty B** (2015) OPEN ALL NIGHT LONG: The Dark Side of Stomatal Control. *Plant Physiology* **167**: 289–294
- Cramer MD, Hawkins H-J, Verboom GA** (2009) The importance of nutritional regulation of plant water flux. *Oecologia* **161**: 15–24
- Craparo ACW, Van Asten PJA, Läderach P, Jassogne LTP, Grab SW** (2015) *Coffea arabica* yields decline in Tanzania due to climate change: Global implications. *Agricultural and Forest Meteorology* **207**: 1–10
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR** (2010) Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 651–679
- Daley MJ, Phillips NG** (2006) Interspecific variation in nighttime transpiration and stomatal conductance in a mixed New England deciduous forest. *Tree Physiol* **26**: 411–419
- Daniel X, Sugano S, Tobin EM** (2004) CK2 phosphorylation of CCA1 is necessary for its circadian oscillator function in *Arabidopsis*. *PNAS* **101**: 3292–3297
- Doyle MR, Davis SJ, Bastow RM, McWatters HG, Kozma-Bognár L, Nagy F, Millar AJ, Amasino RM** (2002) The ELF4 gene controls circadian rhythms and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **419**: 74–77
- Engineer CB, Hashimoto-Sugimoto M, Negi J, Israelsson-Nordström M, Azoulay-Shemer T, Rappel W-J, Iba K, Schroeder JI** (2016) CO₂ Sensing and CO₂ Regulation of Stomatal Conductance: Advances and Open Questions. *Trends in Plant Science* **21**: 16–30

- Eshed Y, Zamir D** (1994) A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *L. esculentum*: A tool for fine mapping of genes. *Euphytica* **79**: 175–179
- Flütsch S, Wang Y, Takemiya A, Violet-Chabrand SR, Klejchova M, Nigro A, Hills A, Lawson T, Blatt MR, Santelia D** (2020) Guard Cell Starch Degradation Yields Glucose for Rapid Stomatal Opening in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. doi: 10.1105/tpc.18.00802
- Foolad MR, Panthee DR** (2012) Marker-Assisted Selection in Tomato Breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences* **31**: 93–123
- Franks PJ, Cowan I R., Farquhar GD** (1998) A study of stomatal mechanics using the cell pressure probe. *Plant, Cell & Environment* **21**: 94–100
- Fujita T, Noguchi K, Terashima I** (2013) Apoplastic mesophyll signals induce rapid stomatal responses to CO₂ in *Commelina communis*. *New Phytologist* **199**: 395–406
- Geiger D, Maierhofer T, Al-Rasheid KAS, Scherzer S, Mumm P, Liese A, Ache P, Wellmann C, Marten I, Grill E, et al** (2011) Stomatal Closure by Fast Abscisic Acid Signaling Is Mediated by the Guard Cell Anion Channel SLAH3 and the Receptor RCAR1. *Sci Signal* **4**: ra32–ra32
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Stange A, Marten I, Bauer H, Ache P, Matschi S, Liese A, Al-Rasheid KAS, et al** (2009) Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *PNAS* **106**: 21425–21430
- Gong P, Zhang J, Li H, Yang C, Zhang C, Zhang X, Khurram Z, Zhang Y, Wang T, Fei Z, et al** (2010) Transcriptional profiles of drought-responsive genes in modulating transcription signal transduction, and biochemical pathways in tomato. *J Exp Bot* **61**: 3563–3575
- Gonzalez-Guzman M, Pizzio GA, Antoni R, Vera-Sirera F, Merilo E, Bassel GW, Fernández MA, Holdsworth MJ, Perez-Amador MA, Kollist H, et al** (2012) *Arabidopsis* PYR/PYL/RCAR Receptors Play a Major Role in Quantitative Regulation of Stomatal Aperture and Transcriptional Response to Abscisic Acid. *The Plant Cell* **24**: 2483–2496
- Guo F-Q, Young J, Crawford NM** (2003) The Nitrate Transporter AtNRT1.1 (CHL1) Functions in Stomatal Opening and Contributes to Drought Susceptibility in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **15**: 107–117
- Hall A, Bastow RM, Davis SJ, Hanano S, McWatters HG, Hibberd V, Doyle MR, Sung S, Halliday KJ, Amasino RM, et al** (2003) The TIME FOR COFFEE Gene Maintains the Amplitude and Timing of *Arabidopsis* Circadian Clocks. *The Plant Cell* **15**: 2719–2729
- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T** (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**: 42–52
- Hansen J, Sato M, Ruedy R, Lo K, Lea DW, Medina-Elizade M** (2006) Global temperature change. *PNAS* **103**: 14288–14293
- Hashimoto M, Negi J, Young J, Israelsson M, Schroeder JI, Iba K** (2006) *Arabidopsis* HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO₂. *Nature Cell Biology* **8**: 391–397
- Hashimoto-Sugimoto M, Negi J, Monda K, Higaki T, Isogai Y, Nakano T, Hasezawa S, Iba K** (2016) Dominant and recessive mutations in the Raf-like kinase HT1 gene completely disrupt stomatal responses to CO₂ in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **67**: 3251–3261
- Hayashi M, Inoue S, Ueno Y, Kinoshita T** (2017) A Raf-like protein kinase BHP mediates blue light-dependent stomatal opening. *Scientific Reports* **7**: 45586
- Heath OVS** (1948) Control of Stomatal Movement by a Reduction in the Normal Carbon Dioxide Content of the Air. *Nature*. doi: 10.1038/161179a0
- Heckwolf M, Pater D, Hanson DT, Kaldenhoff R** (2011) The *Arabidopsis thaliana* aquaporin AtPIP1;2 is a physiologically relevant CO₂ transport facilitator. *The Plant Journal* **67**: 795–804
- Hetherington AM, Woodward FI** (2003) The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* **424**: 901–908

- Hiyama A, Takemiya A, Munemasa S, Okuma E, Sugiyama N, Tada Y, Murata Y, Shimazaki K** (2017) Blue light and CO₂ signals converge to regulate light-induced stomatal opening. *Nature Communications* **8**: 1284
- Hoekstra AY, Chapagain AK** (2011) *Globalization of Water: Sharing the Planet's Freshwater Resources*. John Wiley & Sons
- Hörak H, Sierla M, Töldsepp K, Wang C, Wang Y-S, Nuhkat M, Valk E, Pechter P, Merilo E, Salojärvi J, et al** (2016) A Dominant Mutation in the HT1 Kinase Uncovers Roles of MAP Kinases and GHR1 in CO₂-induced Stomatal Closure. *The Plant Cell* tpc.00131.2016
- Hu H, Boisson-Dernier A, Israelsson-Nordström M, Böhmer M, Xue S, Ries A, Godoski J, Kuhn JM, Schroeder JI** (2010) Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO₂-controlled stomatal movements in guard cells. *Nature Cell Biology* **12**: 87–93
- Hua D, Wang C, He J, Liao H, Duan Y, Zhu Z, Guo Y, Chen Z, Gong Z** (2012) A Plasma Membrane Receptor Kinase, GHR1, Mediates Abscisic Acid- and Hydrogen Peroxide-Regulated Stomatal Movement in Arabidopsis. *The Plant Cell* **24**: 2546–2561
- Humble GD, Hsiao TC** (1970) Light-dependent Influx and Efflux of Potassium of Guard Cells during Stomatal Opening and Closing. *Plant Physiology* **46**: 483–487
- Imber D, Tal M** (1970) Phenotypic Reversion of Flacca, a Wilty Mutant of Tomato, by Abscisic Acid. *Science* **169**: 592–593
- Jakobson L, Vaahtera L, Töldsepp K, Nuhkat M, Wang C, Wang Y-S, Hörak H, Valk E, Pechter P, Sindarovska Y, et al** (2016) Natural Variation in Arabidopsis Cvi-0 Accession Reveals an Important Role of MPK12 in Guard Cell CO₂ Signaling. *PLOS Biology* **14**: e2000322
- Jones RJ, Mansfield TA** (1970) Suppression of Stomatal Opening in Leaves Treated with Abscisic Acid. *J Exp Bot* **21**: 714–719
- Kami C, Lorrain S, Hornitschek P, Fankhauser C** (2010) Chapter Two - Light-Regulated Plant Growth and Development. *In* MCP Timmermans, ed, *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press, pp 29–66
- Kevei Z, King RC, Mohareb F, Sergeant MJ, Awan SZ, Thompson AJ** (2015) Resequencing at ≥40-Fold Depth of the Parental Genomes of a *Solanum lycopersicum* × *S. pimpinellifolium* Recombinant Inbred Line Population and Characterization of Frame-Shift InDels That Are Highly Likely to Perturb Protein Function. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **5**: 971–981
- Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K** (2001) phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**: 656–660
- Kollist H, Nuhkat M, Roelfsema MRG** (2014) Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. *New Phytologist* **203**: 44–62
- Koshimizu K, Fukui H, Mitsui T, Ogawa Y** (1966) Identity of Lupin Inhibitor with Abscisic Acid and its Biological Activity on Growth of Rice Seedlings. *Agricultural and Biological Chemistry* **30**: 941–943
- Kotir JH** (2011) Climate change and variability in Sub-Saharan Africa: a review of current and future trends and impacts on agriculture and food security. *Environ Dev Sustain* **13**: 587–605
- Kramer MG, Redenbaugh K** (1994) Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: The FLAVR SAVR™ tomato story. *Euphytica* **79**: 293–297
- Kreps JA, Kay SA** (1997) Coordination of Plant Metabolism and Development by the Circadian Clock. *The Plant Cell* **9**: 1235–1244
- Lawson T, Blatt MR** (2014) Stomatal Size, Speed, and Responsiveness Impact on Photosynthesis and Water Use Efficiency[C]. *Plant Physiol* **164**: 1556–1570
- Lee M, Choi Y, Burla B, Kim Y-Y, Jeon B, Maeshima M, Yoo J-Y, Martinoia E, Lee Y** (2008)

- The ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂. *Nature Cell Biology* **10**: 1217–1223
- Li D, Wei J, Peng Z, Ma W, Yang Q, Song Z, Sun W, Yang W, Yuan L, Xu X, et al** (2020) Daily rhythms of phyto melatonin signaling modulate diurnal stomatal closure via regulating reactive oxygen species dynamics in *Arabidopsis*. *Journal of Pineal Research* **68**: e12640
- Li H-H, Hao R-L, Wu S-S, Guo P-C, Chen C-J, Pan L-P, Ni H** (2011) Occurrence, function and potential medicinal applications of the phytohormone abscisic acid in animals and humans. *Biochemical Pharmacology* **82**: 701–712
- Lin W-C, Lu C-F, Wu J-W, Cheng M-L, Lin Y-M, Yang N-S, Black L, Green SK, Wang J-F, Cheng C-P** (2004) Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis* NPR1 gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. *Transgenic Res* **13**: 567–581
- Lin Z, Li Y, Zhang Z, Liu X, Hsu C-C, Du Y, Sang T, Zhu C, Wang Y, Satheesh V, et al** (2020) A RAF-SnRK2 kinase cascade mediates early osmotic stress signaling in higher plants. *Nature Communications* **11**: 613
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E** (2009) Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science* **324**: 1064–1068
- Males J, Griffiths H** (2017) Stomatal Biology of CAM Plants. *Plant Physiology* **174**: 550–560
- Mao J, Zhang Y-C, Sang Y, Li Q-H, Yang H-Q** (2005) A role for *Arabidopsis* cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. *PNAS* **102**: 12270–12275
- Martí E, Gisbert C, Bishop GJ, Dixon MS, García-Martínez JL** (2006) Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *J Exp Bot* **57**: 2037–2047
- Mas P** (2004) Circadian clock signaling in *Arabidopsis thaliana*: from gene expression to physiology and development. *Int J Dev Biol* **49**: 491–500
- Más P, Alabadi D, Yanovsky MJ, Oyama T, Kay SA** (2003a) Dual Role of TOC1 in the Control of Circadian and Photomorphogenic Responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **15**: 223–236
- Más P, Kim W-Y, Somers DE, Kay SA** (2003b) Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **426**: 567–570
- Matrosova A, Bogireddi H, Mateo-Peñas A, Hashimoto-Sugimoto M, Iba K, Schroeder JI, Israelsson-Nordström M** (2015) The HT1 protein kinase is essential for red light-induced stomatal opening and genetically interacts with OST1 in red light and CO₂-induced stomatal movement responses. *New Phytologist* **208**: 1126–1137
- Medlyn BE, Barton CVM, Broadmeadow MSJ, Ceulemans R, Angelis De P, Forstreuter M, Freeman M, Jackson SB, Kellomäki S, Laitat E, et al** (2008) Stomatal conductance of forest species after long-term exposure to elevated CO₂ concentration: a synthesis. *New Phytologist* **149**: 247–264
- Meissner R, Jacobson Y, Melamed S, Levyatuv S, Shalev G, Ashri A, Elkind Y, Levy A** (1997) A new model system for tomato genetics. *The Plant Journal* **12**: 1465–1472
- Menda N, Strickler SR, Edwards JD, Bombarely A, Dunham DM, Martin GB, Mejia L, Hutton SF, Havey MJ, Maxwell DP, et al** (2014) Analysis of wild-species introgressions in tomato inbreds uncovers ancestral origins. *BMC Plant Biol* **14**: 287
- Merilo E, Laanemets K, Hu H, Xue S, Jakobson L, Tulva I, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez PL, Schroeder JI, Brosche M, et al** (2013) PYR/RCAR Receptors Contribute to Ozone-, Reduced Air Humidity-, Darkness- and CO₂-Induced Stomatal Regulation. *Plant Physiology* pp.113.220608
- Messinger SM, Buckley TN, Mott KA** (2006) Evidence for Involvement of Photosynthetic Processes in the Stomatal Response to CO₂. *Plant Physiology* **140**: 771–778
- Meyer S, Mumm P, Imes D, Endler A, Weder B, Al-Rasheid KAS, Geiger D, Marten I, Martinoia E, Hedrich R** (2010) AtALMT12 represents an R-type anion channel

- required for stomatal movement in Arabidopsis guard cells. *The Plant Journal* **63**: 1054–1062
- Morison JI L.**, 1987. Intercellular CO₂ Concentration and Stomatal Response to CO₂. In: Zeiger E, Farquhar GD, Cowan IR, editors. *Stomatal Function*. Stanford, CA: Stanford University Press; p. 229–251
- Ohkuma K, Lyon JL, Addicott FT, Smith OE** (1963) Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science* **142**: 1592–1593
- de Ollas C, Segarra-Medina C, González-Guzmán M, Puertolas J, Gómez-Cadenas A** (2019) A customizable method to characterize Arabidopsis thaliana transpiration under drought conditions. *Plant Methods* **15**: 89
- Pantin F, Renaud J, Barbier F, Vavasseur A, Le Thiec D, Rose C, Bariac T, Casson S, McLachlan DH, Hetherington AM, et al** (2013) Developmental Priming of Stomatal Sensitivity to Abscisic Acid by Leaf Microclimate. *Current Biology* **23**: 1805–1811
- Pnueli L, Carmel-Goren L, Hareven D, Gutfinger T, Alvarez J, Ganai M, Zamir D, Lifschitz E** (1998) The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *Development* **125**: 1979–1989
- Quail PH** (2002) Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Current Opinion in Cell Biology* **14**: 180–188
- Raschke K** (1975) Stomatal Action. *Annual Review of Plant Physiology* **26**: 309–340
- Raschke K, Schnabl H** (1978) Availability of Chloride Affects the Balance between Potassium Chloride and Potassium Malate in Guard Cells of *Vicia faba* L. *Plant Physiology* **62**: 84–87
- Roelfsema MRG, Hanstein S, Felle HH, Hedrich R** (2002) CO₂ provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *The Plant Journal* **32**: 65–75
- Ruff MS, Krizek DT, Mirecki RM, Inouye DW** (1987) Restricted root zone volume: influence on growth and development of tomato. *AMERICAN SOCIETY FOR HORTICULTURAL SCIENCE, JOURNAL*, <https://worldveg.tind.io/record/9384>
- Santelia D, Lawson T** (2016) Rethinking Guard Cell Metabolism. *Plant Physiology* **172**: 1371–1392
- Sato S, Tabata S, Hirakawa H, Asamizu E, Shirasawa K, Isobe S, Kaneko T, Nakamura Y, Shibata D, Aoki K, et al** (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**: 635–641
- Schaffer R, Ramsay N, Samach A, Corden S, Putterill J, Carré IA, Coupland G** (1998) The late elongated hypocotyl Mutation of Arabidopsis Disrupts Circadian Rhythms and the Photoperiodic Control of Flowering. *Cell* **93**: 1219–1229
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW** (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *Nat Methods* **9**: 671–675
- Schroeder JI, Hedrich R, Fernandez JM** (1984) Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* **312**: 361–362
- Schroeder JI, Keller BU** (1992) Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *PNAS* **89**: 5025–5029
- Sharkey TD, Raschke K** (1981) Effect of Light Quality on Stomatal Opening in Leaves of *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiology* **68**: 1170–1174
- Shimazaki K, Kondo N** (1987) Plasma Membrane H⁺-ATPase in Guard-Cell Protoplasts from *Vicia faba* L. *Plant Cell Physiol* **28**: 893–900
- Snyder KA, Richards JH, Donovan LA** (2003) Night-time conductance in C₃ and C₄ species: do plants lose water at night? *J Exp Bot* **54**: 861–865
- Stanhill G** (1986) Water Use Efficiency. In NC Brady, ed, *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp 53–85
- Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Raman R, Somers DE, Más P, Panda S, Kreps JA, Kay SA**

- (2000) Cloning of the Arabidopsis Clock Gene TOC1, an Autoregulatory Response Regulator Homolog. *Science* **289**: 768–771
- Szyroki A, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MR, Ache P, Reintanz B, Deeken R, Godde M, Felle H, Steinmeyer R, et al** (2001) KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 2917–2921
- Takahashi Y, Zhang J, Hsu P-K, Ceciliato PHO, Zhang L, Dubeaux G, Munemasa S, Ge C, Zhao Y, Hauser F, et al** (2020) MAP3Kinase-dependent SnRK2-kinase activation is required for abscisic acid signal transduction and rapid osmotic stress response. *Nature Communications* **11**: 12
- Takemiya A, Sugiyama N, Fujimoto H, Tsutsumi T, Yamauchi S, Hiyama A, Tada Y, Christie JM, Shimazaki K** (2013a) Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening. *Nature Communications* **4**: 2094
- Takemiya A, Yamauchi S, Yano T, Ariyoshi C, Shimazaki K** (2013b) Identification of a Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 1 Which Mediates Blue Light Signaling for Stomatal Opening. *Plant Cell Physiol* **54**: 24–35
- Tal M** (1966) Abnormal Stomatal Behavior in Wilty Mutants of Tomato. *Plant Physiology* **41**: 1387–1391
- Thomas B, Vince-Prue D** (1996) *Photoperiodism in Plants*. Elsevier
- Tian W, Hou C, Ren Z, Pan Y, Jia J, Zhang H, Bai F, Zhang P, Zhu H, He Y, et al** (2015) A molecular pathway for CO₂ response in Arabidopsis guard cells. *Nature Communications* **6**: 6057
- Töldsepp K.**, 2019. The role of mitogen-activated protein kinases MPK4 and MPK12 in CO₂-induced stomatal movements. Doktoritöö, Tartu Ülikool.
- Ueno K, Kinoshita T, Inoue S, Emi T, Shimazaki K** (2005) Biochemical Characterization of Plasma Membrane H⁺-ATPase Activation in Guard Cell Protoplasts of Arabidopsis thaliana in Response to Blue Light. *Plant Cell Physiol* **46**: 955–963
- Vahisalu T, Kollist H, Wang Y-F, Nishimura N, Chan W-Y, Valerio G, Lamminmäki A, Brosché M, Moldau H, Desikan R, et al** (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* **452**: 487–491
- Wang F-F, Lian H-L, Kang C-Y, Yang H-Q** (2010) Phytochrome B Is Involved in Mediating Red Light-Induced Stomatal Opening in Arabidopsis thaliana. *Molecular Plant* **3**: 246–259
- Wang ZY, Kenigsbuch D, Sun L, Harel E, Ong MS, Tobin EM** (1997) A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an Arabidopsis Lhcb gene. *The Plant Cell* **9**: 491–507
- Wang Z-Y, Tobin EM** (1998) Constitutive Expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) Gene Disrupts Circadian Rhythms and Suppresses Its Own Expression. *Cell* **93**: 1207–1217
- Woodward FI** (1987) Stomatal numbers are sensitive to increases in CO₂ from pre-industrial levels. *Nature* **327**: 617–618
- Wu H, Sharpe PJH, Spence RD** (1985) Stomatal mechanics. III. Geometric interpretation of the mechanical advantage*. *Plant, Cell & Environment* **8**: 269–274
- Yelle S, Beeson RC, Trudel MJ, Gosselin A** (1990) Duration of CO₂ Enrichment Influences Growth, Yield, and Gas Exchange of Two Tomato Species. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **115**: 52–57
- Zhang D, Du Q, Zhang Z, Jiao X, Song X, Li J** (2017) Vapour pressure deficit control in relation to water transport and water productivity in greenhouse tomato production during summer. *Scientific Reports* **7**: 43461

Kasutatud veebiaadressid

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> (kasutatud 30.05.2020)

<https://www.uniprot.org/uniprot/Q2MHE4> (vaadatud 27.05.2020)

<https://bar.utoronto.ca/thalemine/portal.do?externalids=AT1G62400> (vaadatud 27.05.2020)

<https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=At1g62400> (vaadatud 27.05.2020)

<https://www.uniprot.org/uniprot/K4D610> (vaadatud 30.05.2020)

<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A3Q7FXT8> (vaadatud 30.05.2020)

https://www.inetbio.org/aranet/get_orthologs.php?species=20 (vaadatud 30.05.2020)

<http://taimenimed.ut.ee/> (vaadatud 28.04.2020)

<http://solanaceaesource.org/> (vaadatud 03.06.2020)

<https://www.uniprot.org/proteomes/UP000004994> (vaadatud 03.06.2020)

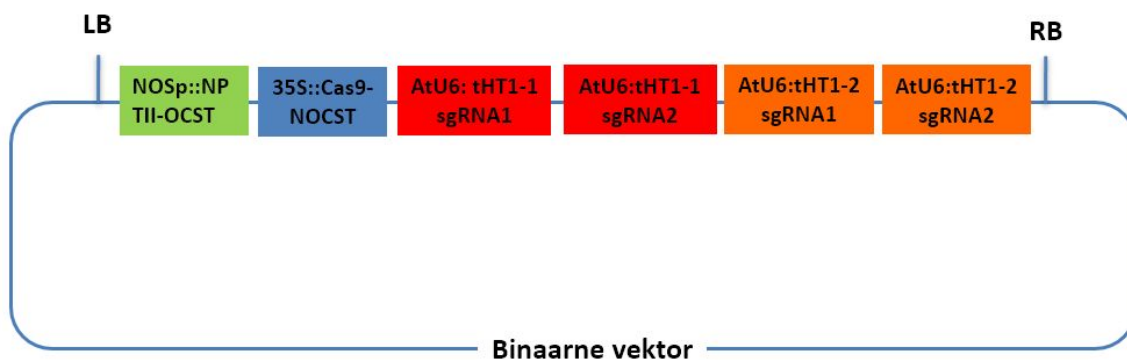
Lisad

Lisa 1

ABA stock lahus - 1ml stock 100mM (96% etanoolis), 0,0264g ABA pulbrit (264,32g/mol) 1ml 96% EtOH

ABA töölahus - 10ml 10µM: 10µl 10mM stock lahust, 2,4µl SILWET, ~10ml H₂O

Lisa 2



Joonis 19. Mutantsete HT1 (*tht1-1/tht1-2*) tomatite valmistamiseks konstrueeritud ja kasutatud binaarne vektor. Vektor sisaldab endas antibiootikumi (kanamütsiini) resistentsusgeeni.

Lisa 3

tht1-1/tht1-2 tomatite genotüüpiseerimisel kasutatud praimerite järjestused

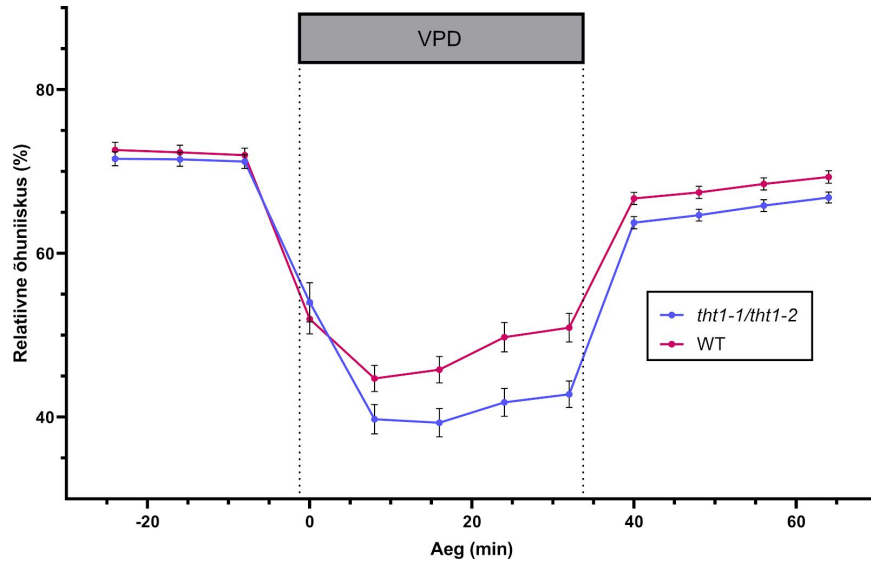
tHT1-1-F: ATTTGCGATCCTTGACTCGTAGT

tHT1-1-R: ATGTCCCAAATCTGCAACCTTG

tHT1-2-F: TGTAAGAAACCTCCCGTGTACTG

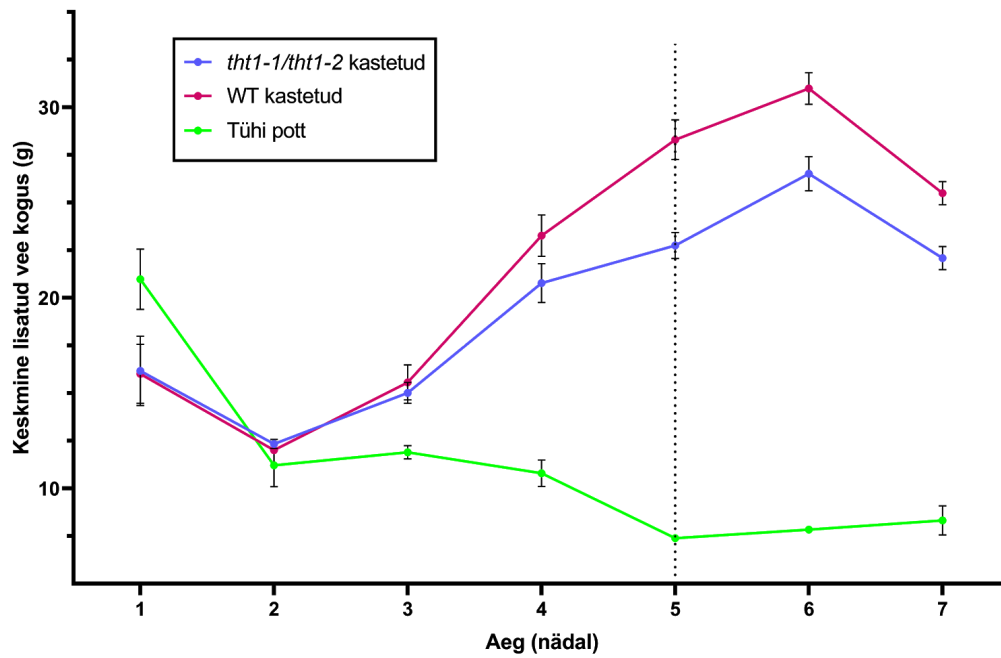
tHT1-2-R: CCTGAACTGGTGTCATTCCTTGA

Lisa 4



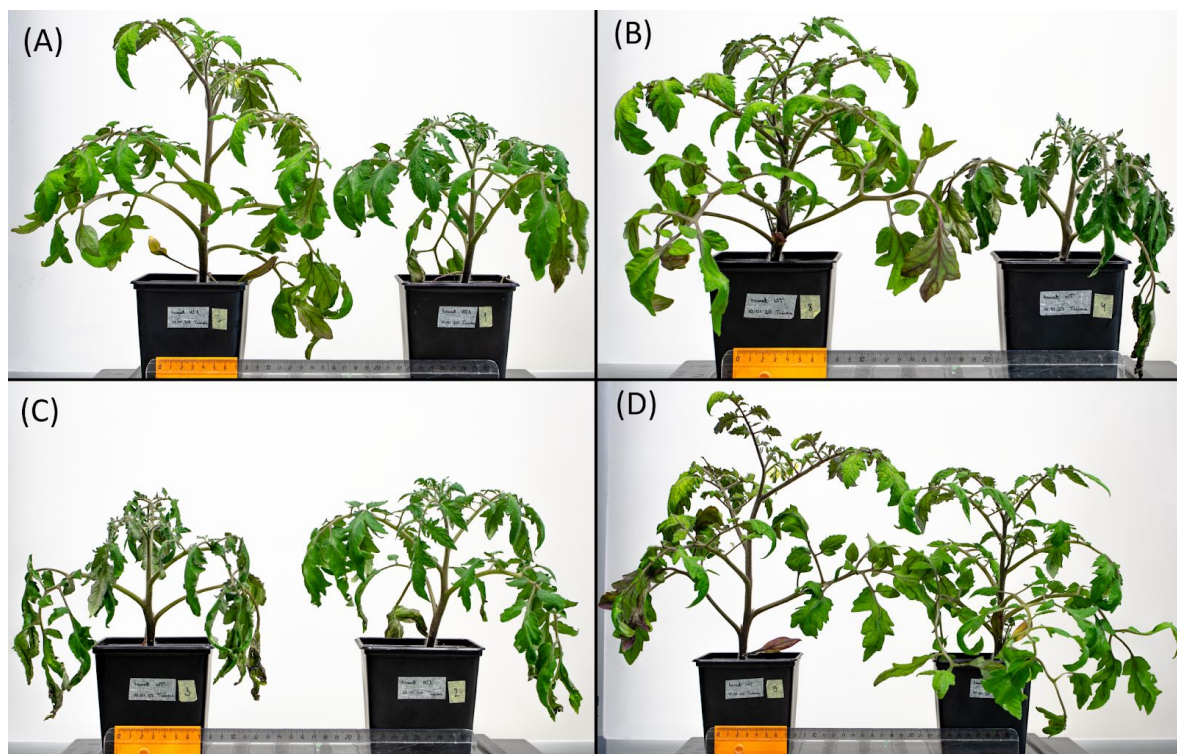
Joonis 20. Gaasivahetuse katsetes rakendatud VPD stiimuli relatiivse õhuniiskuse graafik. Tulemused on joonisel keskmistatud ja vearistid tähistavad \pm standarddviiga.

Lisa 5



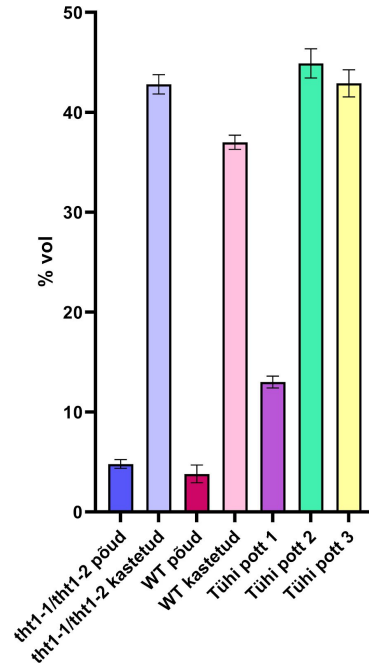
Joonis 21. Põuastressi katses keskmine kastmiseks kulunud veehulk (g). Tulemused on joonisel keskmistatud ja vearistid tähistavad \pm standarddviiga.

Lisa 6



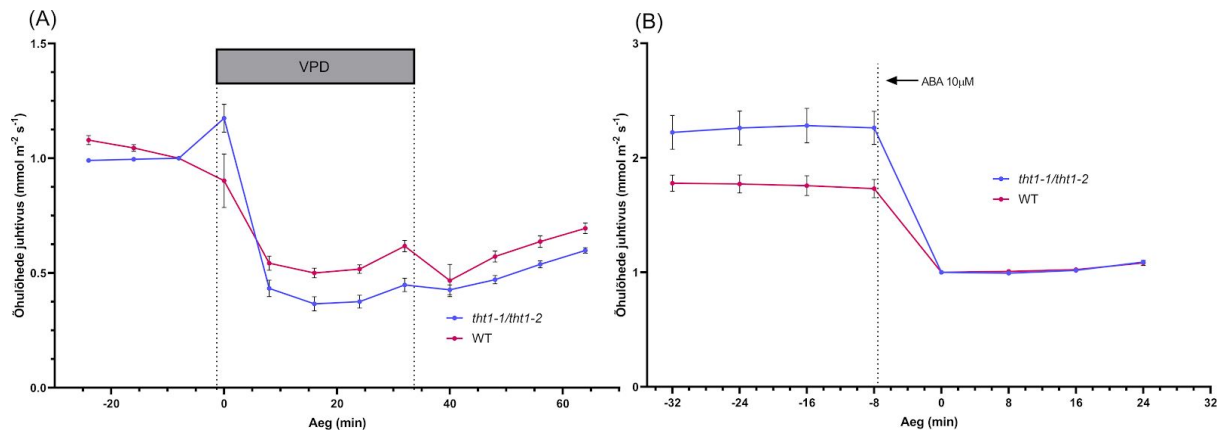
Joonis 22. Põuastressi katse taimede võrdlused. (A) Vasakul pool kastetud *tht1-1/tht1-2* taim, paremal kastmata *tht1-1/tht1-2* taim. (B) Vasakul pool kastetud metsiktüüpi taim, paremal kastmata metsiktüüpi taim. (C) Vasakul pool kastmata metsiktüüpi taim, paremal kastmata *tht1-1/tht1-2* taim. (D) Vasakul pool kastetud metsiktüüpi taim, paremal kastetud *tht1-1/tht1-2* taim.

Lisa 7



Joonis 23. Põuastressi teise katseseeria lõpus pottide mullaniiskuse mõõtmise tulemused. Taimedega pottide puhul on iga tulba kohta valimi suurus 5 potti, iga tühja poti tulba puhul on valimi suurus 1. Tulemused on joonisel keskmistatud ja vearistid tähistavad \pm standarddviiga.

Lisa 8



Joonis 24. Gaasivahetuse katsete õhulõhede relatiivsed õhulõhede juhtivuse muutused. (A) VPD reaktsiooni relatiivsed õhulõhede juhtivuse muutused. (B) ABA reaktsiooni relatiivsed õhulõhede juhtivuse muutused. Tulemused on joonisel keskmistatud ja vearistid tähistavad \pm standarddviiga.

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks

Mina, Triinu Arjus,

(sünnikuupäev: 26.06.1996)

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

HT1 kinaasi roll õhulõhede regulatsioonis tomatis,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **12.06.2023** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Triinu Arjus

12.06.2020, Tartus