TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

TÜ TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Geenide *RAF6* (*At4g24480*) ja *GC1* (*At1g22690*) ekspressioonimustrite uurimine hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) lehe epidermirakkudes

Bakalaureusetöö

12 EAP

Greete Urvak

Juhendaja Dr. Hanna Hõrak

TARTU 2022

INFOLEHT

Geenide *RAF6* (*At4g24480*) ja *GC1* (*At1g22690*) ekspressioonimustrite uurimine hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) lehe epidermirakkudes

Keskkonna ning taime vahelist gaasivahetust vahendavad õhulõhed, mis on poorid taime epidermis. Õhulõhede tööd mõjutades on võimalik taimi keskkonnatingimuste, sealjuures põua, suhtes vastupidavamateks teha. Teada on, et õhulõhede töös ja arengus osalevad paljud geenid, mis on seotud sulgrakkude arengu ja käitumise reguleerimisega vastusena keskkonnamuutustele. Käesolevas töös uurisin kahe sellise geeni *RAF6* (*At4g24480*) ja *GC1* (*At1g22690*) ekspressioonimustreid hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) epidermirakkudes. Selleks konstrueerisin RAF6 ja GC1 promootorite ja GUS reportergeeniga taimeliinid, milles geenide promootorite aktiivsust epidermis GUS-värvumise teel hindasin. Katses selgus, et mõlemad geenid on aktiivsed õhulõhede sulgrakkudes.

Taim, õhulõhe, At4g24480, RAF6, At1g22690, GC1, sulgrakk

CERCS: B310 Soontaimede füsioloogia

Gene expression patterns of *RAF6* (*At4g24480*) and *GC1* (*At1g22690*) in the epidermal cells of thale cress (*Arabidopsis thaliana*).

Pores in plant epidermis called stomata mediate the gas exchange between plants and their environment. Affecting stomata is a possibility for making plants more durable to harsh environmental changes, including drought. Genes that are active in stomata are known to be connected to guard cell regulation during environmental changes. Here, the gene expression patterns of two genes *RAF6* (*At4g24480*) and *GC1* (*At1g22690*) were studied in the epidermal cells of thale cress (*Arabidopsis thaliana).* For this, RAF6 and GC1 promoter plant lines with GUS reporter were constructed to measure promoter activity in epidermal cells using GUS staining. The results showed that both genes are active in mature stomatal guard cells.

Plant, stomata, At4g24480, RAF6, At1g22690, GC1, guard cell

CERCS: B310 Physiology of vascular plants

SISUKORD

Kasutatud lühendid 5

Sissejuhatus 7

1. **Kirjanduse ülevaade** 8

1.1. Õhulõhed ja nende roll gaasivahetuses 8

1.2. Õhulõhede arengu peamine skeem, rakkude tüübid 9

1.3. Olulisemate geenide rollid õhulõhede arengus 10

1.3.1. SPCH, MUTE ja FAMA transkriptsioonifaktorid 11

1.3.2. EPF1 ja EPF2 signaalid 13

1.3.3. STOMAGEN 14

1.4. Õhulõhede sulgumine fütohormoon abstsiishappe mõjul 15

1.5. AT1G22690 ehk GC1 (GASA9) geen 16

1.6. At4g24480 ehk RAF6 (AtARK3) geen 17

2. Töö eesmärgid 18

3. Metoodika 19

3.1. Taimede kasvatamine transformatsiooniks 19

3.2. Molekulaarne kloneerimine ja plasmiidide valmistamine 19

3.2.1 PCR praimerite disain, promootorite PCR ning PCR produktide puhastamine ja restriktsioon 20

3.2.2 Vektori restriktsioon ning agaroosgeelist puhastamine 22

3.2.3 Inserdi ja vektori ligatsioon 22

3.2.4 Rakkude transformatsioon ja selektsioon 22

3.2.5. Koloonia PCR 23

3.2.6. Plasmiidi eraldamine, kontsentratsiooni määramine ja sekveneerimine 23

3.3. *Agrobacteriumi* ja taimede transformeerimine 25

3.4. Transgeensete taimede selektsioon 26

3.5. GUS värvimine, preparaatide valmistamine ja pildistamine 26

4. Tulemused 28

4.1. GC1 ja RAF6 ekspressioonimuster õhulõhedes Arabidopsis eFP Browser andmetel 28

4.2. Transgeensete taimeliinide iseloomustamine 29

4.2.1. GUS-signaali andvad liinid 30

4.2.2. GUS-signaaliga rakutüübid 31

4.2.2.1. pGC1::GUS 31

4.2.2.2. pRAF6::GUS 33

5. Arutelu 37

Kokkuvõte 39

Resümee 40
Tänusõnad 42
Töös kasutatud kirjandus 43
Töös kasutatud veebiallikad 46
LISA 1 47
Lihtlitsents 48

Kasutatud lühendid

ABA – *abscisic acid*, abstsiishape, hormoon, mis reguleerib taime õhulõhede sulgumist

bHLH – *basic helix-loop-helix*, aluseline heeliks-ling-heeliks domeen, õhulõhede transkriptsioonifaktorite DNAga seondumise domeen

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

CIAP - *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, veise sisikonna aluseline fosfataas, eemaldab DNAl 3' ja 5' fosfataasid

CPK – *calcium-dependent protein kinase*, kaltsiumist sõltuv proteiinkinaas, osaleb õhulõhedes signaali ülekandes

EPF1 – At2g20875, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 1, õhulõhede omavahelise paiknemise mustreid mõjutav peptiid

EPF2 – At1g34245, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2, õhulõhede omavahelise paiknemise mustreid mõjutav peptiid

ERL – At5g62230, ERECTA-LIKE 1, ERECTAga homoloogne ja sama funktsiooniga retseptorkinaas

ER/ERECTA – At2g26330, retseptor-proteiinkinaas, mis seob koos TMM kaasretseptoriga EPF1/EPF2/STOMAGENi peptiide

FAMA – At3g24140, bHLH transkriptsioonifaktor, mis suunab sulgraku emarakkude diferentseerumist sulgrakkudeks ja lõpetab eellasrakkudes jagunemise

GC1 – GUARD CELL 1, At1g22690/GASA9, gibberelliini poolt reguleeritud perekonna valk

GUS – *β – glucoronidase*, beeta-glükuronidaas reportervalk

LRR – *leucine-rich repeat*, leutsiinirikas motiiv näiteks TMM retseptoritel

MAPK – *mitogen activated protein kinase*, mitogeeni-aktiveeritud proteiinkinaaside perekond, mis reguleerivad õhulõhede arengus bHLHde tööd

MUTE – At3g06120, bHLH transkriptsioonifaktor, mis reguleerib meristemoidide diferentseerumist sulgraku emarakkudeks

OST1 – OPEN STOMATA 1, At4g33950, kaltsiumist sõltumatu ABA poolt aktiveeritud proteiinkinaas

Raf-kinaasid – seriin/treoniin spetsiifilised proteiinkinaaside perekond, osalevad MAPK kaskaadis

RAF6 – At4g24480, proteiinkinaaside superperekonda kuuluv valk

SCREAM (SCRM) – At3g26744, INDUCER OF CBF EXPRESSION 1, bHLH motiivi sisaldav transkriptsioonifaktor

SnRK2 – *sucrose nonfermenting 1-related protein kinase 2* perekonna kinaasid, fosforüleerivad transkriptsioonifaktoreid ning ioonkanaleid, indutseerivad õhulõhede sulgumist

SPCH – At5g53210.1, bHLH transkriptsioonifaktor, vajalik õhulõhe arenguliini rakkude asümmeetriliste rakujagunemiste alustamiseks

STOMAGEN – At4g12970, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR LIKE 9, tsüsteiinirikas valk, mis stimuleerib õhulõhede tekkimist

TF – transkriptsioonifaktor

TMM – At1g80080, TOO MANY MOUTHS, retseptorvalk, mis koos ERECTA perekonna valkudega EPF peptiide seob

3B MAPKKK – 3B type *mitogen activated protein kinase kinase kinase*, mitogeeni-aktiveeritud proteiinkinaasid, mis reaktiveerivad OST1

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

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

Sissejuhatus

Taime ning keskkonna gaasivahetust viivad läbi õhulõhed, mis on väikesed poorid taime lehtedel. Õhulõhede tööd reguleerivad kaks sulgrakku, mis paarina õhupilu ümbritsevad ning sõltuvad oma töös lehe- ning rakusisestest signaalidest. Signaale nagu ABA (abstsiishape) vallandatakse taimes reaktsioonina keskkonnamuutustele, sealjuures ka põuale, ning sulgrakud reageerivad õhupilu sulgemisega. Õhulõhed on avatud kui sulgrakkude turgorrõhk on kõrge ning kinni kui ioonide kontsentratsioon, mida põhjustab ABA signaali aktiveerimine ning anioonkanalite avanemine, langeb. Ioonide väljavool põhjustab vee väljumise, mis omakorda vähendab turgorrõhku sulgrakus ning sulgeb õhupilu. Avatud õhulõhe vahetab aktiivselt keskkonnaga veeauru ning liigne avatus põhjustab taime närtsimist. Õhulõhede avatust või õhulõhede arengut ning arvukust epidermis mõjutades on võimalik teha taim vastupidavamaks keskkonnatingimuste muutustele nagu põud. Taime vastupidavamaks tegemine põuale on aktuaalne teema arvestades maakera keskmise temperatuuri tõusu ning ekstreemsete kliimaolude esinemissageduse suurenemist. Õhulõhetunnuste muutmiseks on oluline kõigepealt uurida ning mõista õhulõhede arengus ning käitumises osalevate geenide rolli taimes.

Antud töö eesmärgiks oli uurida geenide *RAF6* (*At4g24480*) ja *GC1* (*At1g22690*) ekspressioonimustreid hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) epidermirakkudes, et hinnata nende aktiivsust õhulõhe arenguliini rakkudes. Uurimustöös kasutasin hariliku müürlooga Col-0 metsiktüüpi taimi. Geenide promootorite aktiivsust epidermirakkudes määrasin GUS-reportergeeni, GUS-värvimise ja valgusmikroskoobi abil, mille jaoks konstrueerisin pRAF6::GUS ja pGC1::GUS vektorid ning transformeerisin hariliku müürlooga taimi.

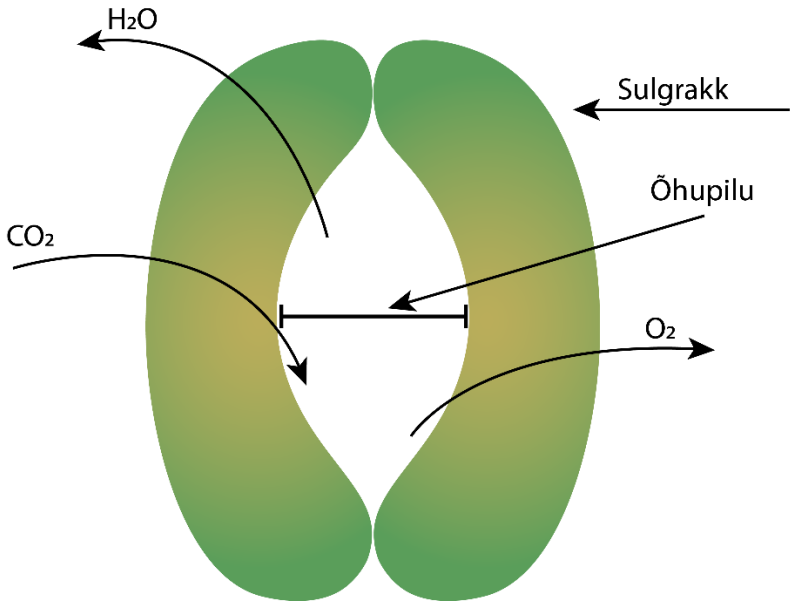
Uurimuse viisin läbi Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudi taimefüsioloogia laborites.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Õhulõhed ja nende roll gaasivahetuses

Õhulõhed on väikesed poorid taime lehtedel, mille kaudu toimub ümbritseva keskkonna ja taime vahel gaasivahetus (Wang et al., 2013). Süsteemina sõltub õhulõhede töö turgorrõhust, selle suurenemine põhjustab õhulõhede avanemise ja võimaldab gaasivahetust (Merilo et al., 2017). Õhulõhede sulgumist põhjustavad keskkonnatingimuste muutused nagu külm, kuivus ja mehhaaniline vigastus, millele aitab taimes reageerida ABA, mis vahendab nii stressi- kui normaaltingimuste (näiteks pimedus) põhjustatud õhulõhede sulgumist (Hubbard et al., 2010). Õhulõhede avatust taime tasandil kirjeldab õhulõhede juhtivus.

Õhulõhede avatust kontrollivad kaks sulgrakku, mis ümbritsevad keskel paiknevat õhupilu (Merilo et al., 2017). Taim omastab selle õhupilu kaudu CO_2, mida ta fotosünteesiks kasutab, ning väljutab keskkonda veeauru ja hapnikku (joonis 1.). Veeauru väljutamisel mõjutavad taimed niimoodi neid ümbritsevat keskkonda ja reguleerivad kliimaolusi. Ainult vihmametsades on aastane õhulõhede transpiratsioonitase kaks korda kõrgem kui kogu atmosfääris sisalduv veeauru hulk ($32 \cdot 10^5$ kg aasta kohta vihmametsas, $15 \cdot 10^5$ kg aasta kohta atmosfääris) (Hetherington & Woodward, 2003). Sellist transpiratsioonitaset põhjustab sama veeauru korduv õhulõhede läbimine ning vihmana alla sadamine. Seega on õhulõhede rohkus ja aktiivsus olulised tunnused, mis mõjutavad globaalset kliimat.

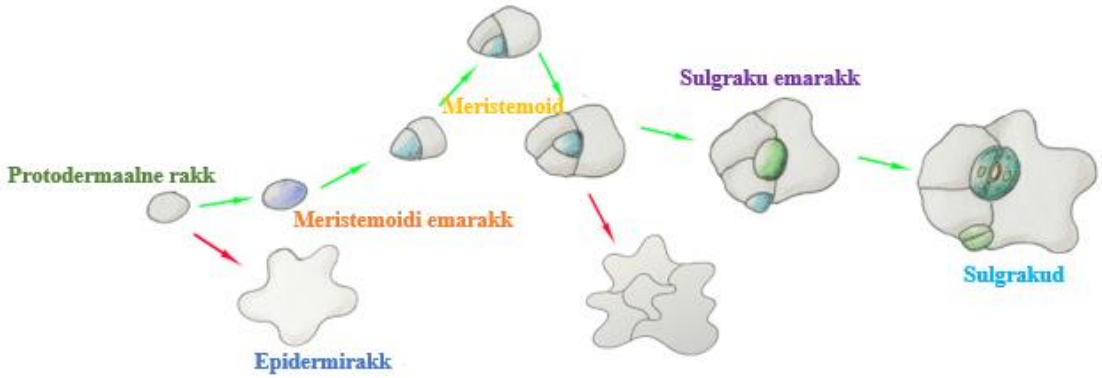


Joonis 1. Õhulõhe ehitus. Autor: Kaspar Koolmeister.

Rohkem õhulõhesid või suurema avatusega õhulõhed suurendavad lisaks transpiratsioonile ka taimes süsihappegaasi omastamist, luues potentsiaali saada rohkem saaki (Wang et al., 2013). Samas põhjustavad rohked või avatud õhulõhed taimedes põuatundlikkust (Belin et al., 2006). Vähemate või kinnisemate õhulõhedega transpireerib taim küll vähem, kuid peab see-eest paremini ekstreemsematele keskkonnatingimustele vastu ja on põuakindlam (Hara et al., 2006; Hara et al., 2009).

1.2. Õhulõhede arengu peamine skeem, rakkude tüübid

Õhulõhede areng, rohkus ja täpne muster lehel sõltuvad keskkonnatingimustest ja taimesisestest signaalidest nagu ABA. Õhulõhed saavad alguse diferentseerumata protodermaalsetest rakkudest, millest osadest arenevad meristemoidi emarakud (*meristemoid mother cell*, MMC) (Plesch et al., 2002). Asümmeetriliselt jaguneb meristemoidi emarakk kolmnurgakujuliseks meristemoidrakuks (meristemoidiks), mis võib veel (korduvalt) asümmeetriliselt edasi jagunedes tekitada veel meristemoide; või diferentseeruda ümaraks sulgraku emarakuks (*guard mother cell*, GMC) (Herrmann & Torii, 2020). Sulgraku emarakk on sümmeetriliselt jagunedes aluseks sulgrakkudele, mis ümbritsevad õhupilu, ja mille paar moodustab õhulõhe (joonis 2.). Õhulõhede puhul on tähtis, et erinevad õhulõhed teineteisega kontaktis poleks ja seega asetseb iga raku vahel vähemalt üks tavaline epidermirakk; arvatakse, et selline paiknemine on oluline gaasivahetuseks (Hara et al., 2007). Liiga lähedane kontakt lähedal paiknevate õhulõhede puhul võib viia sulgrakkude ebaefektiivse tööni, kus ühe õhulõhe sulgrakud teise õhulõhe tööd segaksid. On avastatud, et sellist õhulõhede mustrit reguleeritakse aga lokaalselt ehk iga õhulõhe reguleerib enda ümbrust, mõjutades teiste rakkude jagunemise suunda enda ümber (Lau & Bergmann, 2012). Pärast moodustumist signaliseerivad õhulõhed naabritele rakujagunemise lõpetamiseks ning peatavad otseses kontaktis olevate eellasrakkude küpsemise, luues nii enda ümber enda tööks vajaliku niši (Hara et al., 2007; Lau & Bergmann, 2012).

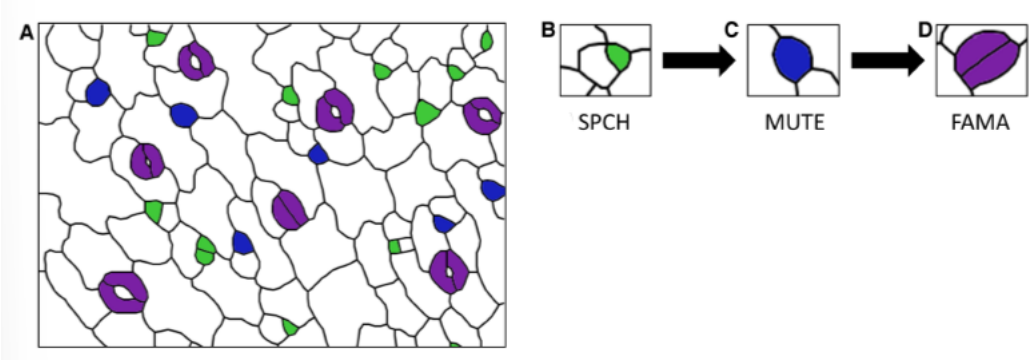


Joonis 2. Õhulõhe arengu peamine skeem, originaaljoonis on tõlgitud. Protodermaalne rakk siseneb õhulõhe arenguliini ning hakkab jagunema ja diferentseeruma kas epidermirakuks või meristemoidi emarakuks. Meristemoidi emarakk läbib järjestikulisi asümmeetrilisi rakujagunemisi ja tekitab väikseid rakke - meristemoide. Meristemoid diferentseerub sulgraku emarakuks, mis sümmeetriliselt jagunedes moodustab sulgrakud (Qi & Torii, 2018).

1.3. Olulisemate geenide rollid õhulõhede arengus

Õhulõhede arengut ja erinevate rakufaaside vahetust reguleerivad mitmed faktorid, täpsemalt heeliks-ling-heeliks (*basic helix-loop-helix*, bHLH) Ia tüüpi transkriptsioonifaktorid (TF) SPEECHLESS (SPCH), MUTE ja FAMA (Chater et al., 2016). Transkriptsioonifaktorid funktsioneerivad heterodimeeridena koos bHLH valkudega SCRM2 ja SCREAM, aktiveerides signaaliraja järgnevates etappides toimivate sihtmärkide ekspressiooni (Lampard et al., 2008; Lau & Bergmann, 2012). Mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaasid (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) reguleerivad bHLH transkriptsioonifaktoreid taime epidermis ning vahendavad nii õhulõhede paiknemiseks olulisi signaale (Lampard et al., 2008). MAPKde kaskaadi reguleerivad taime epidermis signaalpeptiidid nagu EPF1, EPF2 ja STOMAGEN koostöös TMM ja ERECTA1 perekonna retseptoritega, et mõjutada õhulõhede paiknemist ja tihedust epidermis (Hara et al., 2007; Xue et al., 2020). Signaalpeptiidid on olulised, et epidermis õhulõhede paiknemist *'one cell spacing*' reegli järgi mõjutada ehk iga õhulõhe vahel oleks üks tavaline epidermirakk (Geisler et al., 2000).

1.3.1. SPCH, MUTE ja FAMA transkriptsioonifaktorid



Joonis 3. Transkriptsioonifaktorite ekspressioonisignaali leidumine arenevates õhulõhedes, näha on SPCH esinemist protodermaalsetes rakkudes, MUTE esinemist meristemoidides ning FAMA esinemist sulgrakkudes (Zoulias, 2018).

SPCH, MUTE ja FAMA töötavad teineteise järel kaskaadina õhulõhe arengus ning mõjutavad erinevaid üleminekufaase, et rakutüüpi määrata (joonis 3.). Ehituselt on nad omavahel sarnased, olles 50-60 aminohapet pikad ja koosnedes kahest domeenist, aluseline (*basic*) ja heeliks-ling-heeliks (*helix-ling-helix*, HLH), mille eesmärgiks on vastavalt DNAga seondumine ja dimeeri moodustamine (MacAlister et al., 2006). Transkriptsioonifaktorid sarnanevad teineteisega 40% ulatuses ning nende domeenid kattuvad 90% ulatuses, viidates sellele, et transkriptsioonifaktoritel on sarnane roll rakus (Lau & Bergmann, 2012).

SPCH algatab ja reguleerib protodermaalsete rakkude asümmeetrilist rakujagunemist ning paiknemist epidermis. Lisaks reguleerib ka protodermaalsete rakkude diferentseerumist meristemoidi emarakkudeks ning omakorda reguleerib nende asümmeetrilist rakujagunemist (Lee et al., 2014). Geen ise kodeerib 364-aminohappelist proteiini, millel on bHLH transkriptsioonifaktorile kohaselt DNAga seondumise domeen, HLH domeen ja tuuma lokalisatsiooni signaali domeen (MacAlister et al., 2006). Müürlooga genoomis seondub SPCH transkriptsioonifaktor 8327 DNA regioonile, millest 70% on geenide promootorites. Neist seondumiskohtadest on enamik seotud signaali ülekandega, meristemoidide rakusaatusega ja rakujagunemisega, mis viitab geeni rollile õhulõhede arengus (Lau et al., 2014). SPCH promootori kontrolli all GUS reportergeeni ekspresseerivates taimedes (pSPCH::GUS) oli näha geeni ekspressiooni areneva lehe epidermis, nii diferentseerumata rakkudes kui ka kahes naaberrakus korraga, mis viitas aktiivselt jagunevale rakupopulatsioonile (MacAlister et al., 2006). Homosügootsed *spch-1* mutandid, kus geeni funktsioon oli välja lülitatud, ei moodustunud õhulõhesid, seega SPCH geeni välja lülitades ei sisene protodermaalne rakk õhulõhe arenguliini ning selle asemel moodustub terve epidermi ulatuses ainult epidermirakke (*pavement cells*). SPCH geeni üleekspressioon viis ebaregulaarsete rakkude tekkimiseni epidermis, rohkem oli

rakujagunemisi ning toodeti ka rohkem õhulõhesid (MacAlister et al, 2007; Casson & Gray, 2008). Seega on töötav SPCH geen vajalik nii protodermaalses rakus õhulõhe arenguliini aktiveerimiseks kui ka asümmeetrilise rakujagunemise algatamiseks, kuid selle ekspressiooni vähendamine oleks potentsiaalne viis põuakindlamate taimede loomiseks.

MUTE lõpetab meristemoidi emaraku asümmeetrilise rakujagunemise ning suunab värske sulgraku emaraku diferentseerumist sulgraku omadustega rakuks ja võimendab selle sümmeetrilist rakujagunemist (Casson & Gray, 2008; Lee et al., 2014). MUTE geeni mittefunktsionaalse mutandi puhul jagunevad meristemoidi emarakud asümmeetriliselt liiga palju ning ei diferentseeru sulgraku emarakkudeks, kuna õhulõheliini rakkude areng peatub meristemoidi emaraku rakufaasis. MUTE geeni üleekspressiooni puhul koosnes epiderm peaaegu vaid õhulõhedest (Pillitteri et al., 2006). MUTE geeni üleekspressioon näitas, et kõik epidermirakud on võimelised õhulõhe arenguliini sisenema ja õhulõhedeks diferentseeruma, kuid taim pole eluvõimeline ning närtsib noorelt, kuna tekkinud õhulõhede areng on olnud vale (Pillitteri & Torii, 2012). MUTE promootori kontrolli all GUS reportergeen (pMUTE::GUS) näitas promootori aktiivsust rakkudes, mis olid paar asümmeetrilist rakujagunemist läbinud ning selle aktiivsuse jääke oli näha veel sulgraku emarakkudes ja lõpuni diferentseerumata sulgrakkudes, viidates sellele, et MUTE osaleb transkriptsioonifaktorina sulgrakkude emarakkudeks diferentseerumisel (Pillitteri et al., 2006).

FAMA vahendab sulgraku emaraku viimast sümmeetrilist rakujagunemist: lõplikku üleminekut sulgrakuks, sulgrakkude sümmeetrilist paiknemist õhupilu ümber, et need funktsionaalsed oleksid, ja õhulõhe arenguliini rakkude rakujagunemise lõpetamist (Ohashi-Ito & Bergmann, 2006; MacAlister et al., 2006). Peale sulgrakkude väljakujunemist peatab FAMA edasised rakujagunemised; FAMA promootoris on mitu bHLH seondumissaiti, mis viitab sellele, et geen suudab end ise reguleerida (Ohashi-Ito & Bergmann, 2006). FAMA geeni mittefunktsionaalse mutandi puhul toodetakse õhulõhede asemel „fama kasvajaid“, mida põhjustab sulgraku emarakkude kontrollimatu rakujagunemine (Ohashi-Ito & Bergmann, 2006; Lee et al., 2014). FAMA üleekspressiooni puhul moodustuvad taimedel küll õhulõhed, kuid õhulõhede sulgrakud ei paardu ning tekivad mittefunktsionaalsed õhulõhed (Ohashi-Ito & Bergmann, 2006). Lisaks õhulõhe arenguliini rakkudele suudeti FAMA üleekspressiooniga teisi rakke, ka juurerakke, suunata diferentseeruma õhulõhedeks, kuid taimed mittefunktsionaalsete õhulõhede ja paardumata sulgrakkudega polnud elujõulised, näidates, et FAMA on vajalik funktsionaalsete õhulõhede moodustumiseks (Ohashi-Ito & Bergmann, 2006; MacAlister et al., 2006).

1.3.2. EPF1 ja EPF2 signaalid

Rakuväliseid signaale vahendavad EPF perekonna peptiidid: EPF1, EPF2 ja STOMAGEN (ka EPFL9). EPF1 on inhibiitor, mis koos EPF2ga õhulõhede tekkimist alla surub, ja STOMAGEN on aktivaator, mis õhulõhede tekkimist soodustab (Zeng et al., 2020). Omavahel on EPF1 ja EPF2 sarnasemad, jagades väga sarnast N-terminaalset sekreteeritavat signaalpeptiidi, millele järgneb lõikamisjärjestus ja C-terminaalne osa, millest pärast N-terminaalse osa eemaldamist moodustub toimiv peptiid. Rakupinnal võtavad EPF peptiidsignaale vastu leutsiini-rikkad ERECTA (ER) perekonna retseptorkinaasid ja retseptorvalkTMM (Hara et al., 2007; Casson & Gray, 2008).

EPF1 on tähtis rakk-rakk signaal, mida sekreteerivad hilisemates rakufaasides meristemoidid ja sulgraku emarakud, et õhulõhesid positsioneerida ja ühe-raku-vahe reeglit epidermil kehtestada; naaberrakud püüavad signaali kinni tänu TMM retseptoritele (Hara et al., 2007; Casson & Gray, 2008; Hermann & Torii, 2020). Mittefunktsionaalsetes mutantides on täheldatud asümmeetrilise õhulõhede paiknemise ehk ühe-raku-vahe reegli eiramist ning õhulõhesid oli epidermis rohkem kui normaalselt (Hara et al., 2007; Casson & Gray, 2008). See-eest EPF1 üleekspresseerivates mutantides vähenes õhulõhede arvukus epidermis, mõnel lehel need üldse puudusid. EPF1 mõjutab seega spetsiifiliselt õhulõhede arengut, EPF1 üleekspresseerivad taimed olid väiksed ja viljatud, kuid taimedel oli suurenenud vastupidavus põuale vähenenud õhulõhede arvu tõttu (Hara et al., 2007; Hara et al., 2009). Geeni aktiivsus tuvastati noorte lehtede meristemoidides ja noortes sulgrakkudes; ja lisaks ka kohtades, kus paiknesid õhulõhede arenguliini protodermaalsed rakud (Hara et al., 2007). Asitõendid viitavad, et EPF1 osaleb õhulõhede arengus juba esimestest faasidest alates ja mõjutab nende paiknemist vastavalt ühe-raku-vahe reeglile.

EPF2 ekspresseeritakse taimes nooremates rakkudes kui EPF1, kuna seda leidub just õhulõhede eellasrakkudes (*precursor cells*), varastes meristemoidi emarakkudes ning varastes meristemoidides (Hara et al., 2009; Hunt & Gray, 2009). Geen on oluline inhibeerimaks liigsete rakkude sisenemist õhulõhe arenguliini ja selle ekspressioon mõjutab õhulõhede paiknemist lehel. Tänu EPF2le läbivad asümmeetrilisi rakujagunemisi vaid valitud epidermirakud, mis diferentseeruvad edasi meristemoidideks ja õhulõhe eellasliini põhirakkudeks (*stomatal lineage ground cell*, SLGC), mis on õhulõhesid ümbritsevate epidermirakkude alusteks. EPF2 mittefunktsionaalsetes mutantides on epidermil täheldatud palju väikesid õhulõhe eellasrakkudele omaste tunnustega rakke õhulõhede asemel. Võimalik, et rohkem epidermaalseid rakke ning õhulõhe eellasliini rakke sisenesid õhulõhe arenguliini (Hunt & Gray, 2009; Hara et al., 2009). Üleekspresseeritud geeniga mutandis oli nagu EPF1 korral ka vähenenud õhulõhede arvukus

epidermil, mis andis taimele suurema põuavastupidavuse (Hughes et al., 2017). EPF2 promootori aktiivsust tuvastati samuti vaid noortes lehtedes, kus signaal lehe arenedes vaid meristemoidides ja sulgraku emarakkudes oli ehk geen osaleb õhulõhede varasemas arengus, täpsemalt meristemoidide asümmeetrilises jagunemises ja diferentseerumises (Hunt & Gray, 2009).

Kuna nii EPF1 kui EPF2 seonduvad TMMiga kas vastavalt ERL1-TMM või ER-TMM kompleksi kaudu, on mõlemad ka olulised negatiivsed regulaatorid õhulõhede arengus. EPF peptiidide TMM kompleksile seondudes aktiveerub MAPK kinaaside kaskaad, mis viib omakorda SPCH lagundamiseni (Hara et al., 2009; Jewaria et al., 2013). SPCHi lagundamine on oluline protodermaalsete rakkude õhulõhe arenguliini sisenemise peatamiseks; SPCHi degradeerimist põhjustab täpsemalt EPF2 seondumine TMM-ER retseptorkompleksiga, mis otseselt SPCH aktiivsust naaberrakkudes alla surub (Pillitteri & Torii, 2012; Hermann & Torii, 2020). Sarnaselt põhjustab MUTEi inhibitsiooni EPF1-ERL1 kompleks; MUTE indutseerib ERL1 ekspressiooni, mis seob EPF1 signaali endaga ning inhibeerib omakorda MUTEi, luues negatiivse tagasiside ringi ning kehtestab ühe-raku-vahe reeglit naaberrakkudes (Hermann & Torii, 2020).

1.3.3. STOMAGEN

STOMAGEN (EPFL9) kuulub EPF tsüsteiinirikaste peptiidide superperekonda ning sarnaneb struktuurilt kahe eelnevalt mainitud peptiidiga (Hunt et al., 2010; Kondo et al., 2009). Geen kodeerib 102 aminohappelist EPFL9 eelpeptiidi, mille C-terminaalne osa koos kuue tsüsteiinijäägiga on vajalikud 45-aminohappelise STOMAGENi valmis peptiidi korrektseks voltumiseks (Kondo et al., 2009). Erinevalt EPF1 ja EPF2 geenidest reguleerib STOMAGEN õhulõhede paiknemist ja kobarate moodustumist (*clustering*) positiivselt, lisaks ekspresseeritakse geeni mesofülli rakkudes mitte õhulõhe arenguliini rakkudes. Õhulõhe kobarad tekivad, kui õhulõhed rikuvad ühe-raku-vahe reeglit ning paiknevad mitmekesi kõrvuti (Abrash & Bergmann, 2010; Hunt et al., 2010). Mittefunktsionaalse geeniga mutantides ja üldiselt vähenenud STOMAGENi tasemega taimedes täheldati õhulõhe eellasrakkude (*stomatal precursor cell*) arengu peatumist varastes arengufaasides, mis viis vähenenud õhulõhede moodustumiseni (Hunt et al., 2010). Geeni üleekspresseerimine viis õhulõhede arvukuse suurenemiseni epidermis, kus peaaegu terve epiderm lõpuks õhulõhedest koosnes. STOMAGENi üleekspressioon *epf1* ja *epf2* mutantide taustal võimendas samuti õhulõhede arvukust ning tihedust lehel, lisaks suurenes õhulõhe kobarate arvukus epidermis, mis näitab, et EPFL9 reguleerib õhulõhede arengut teistest EPF perekonna peptiididest sõltumatult (Hunt, 2010). Samuti konkureerib EPFL9 teiste EPF perekonna peptiididega ER-TMM retseptoritele seondumisel. STOMAGENi promootori kontrolli all GUS

reportergeeniga transgeensetes taimeliinides oli näha STOMAGENi signaali lehe sisemistes mesofülli rakkudes, aga mitte epidermis (Kondo et al., 2009). Seega võiks olla STOMAGENi mittefunktsionaalse mutandi kasutamine kasulik viis põuakindlamate taimede saamiseks, kuna taimedel oleks vähem õhulõhesid.

1.4. Õhulõhede sulgumine fütohormoon abstsiishappe mõjul

Taimes toodetakse abstsiishapet (*absicic acid*, ABA) reaktsioonina keskkonnafaktorite, näiteks põua, mõjule ning see aitab taimel stressitingimustega kohaneda. Üks neist viisidest, kuidas kohaneda, on õhulõhede avatuse reguleerimine, mida ABA lisaks õhulõhede arengule ning arvukusele mõjutab (Brandt et al., 2012). ABA pidev kõrge tase taimes tuleneb sellest, et fütohormoon osaleb lisaks stressitingimustes ka normaaltingimustes õhulõhede töös, aidates neil näiteks pimeduses sulguda (Waadt et al., 2014). ABA signalisatsiooniks on vajalikud PYR/PYL/RCAR retseptorid, klaad A tüüpi PP2C proteiinfosfataasid, SnRK proteiinkinaasid ja SnRKde regulatsiooniks veel Raf kinaasid (Saruhashi et al., 2015).

ABA signaalrajas osalevad seriini ja treoniini fosfataasid, mis jaotatakse PP2A ja PP2C gruppideks. PP2C on ABA signaalraja negatiivne reguleerija ning sõltub magneesiumi- ja mangaanioonidest, seda inhibeerivad ABA seondamisel PYR/PYL/RCAR perekonna retseptorid (Hubbard et al., 2010). Kui ABA signaalrada pole aktiveeritud siis PP2Cd defosforüülivad oma märklaudu ja takistavad õhulõhede sulgumist. ABA signaali olemasolul seondub fütohormoon PYR/PYL/RCAR retseptoritega, mis inaktiveerivad fosfataasidega seondudes PP2C, sellest ka negatiivne regulatsioon (Saruhashi et al., 2015). PP2C märklaudade fosforüülimine teiste valkude poolt, nagu SnRKd, aktiveerib omakorda ABA vastuse (Fernando & Schroeder, 2016).

PYR/PYL/RCAR valkudel on ABA ja PP2C seondumiseks sobiva kujuga süvendid (Brandt et al., 2012). Retseptorid paiknevad nii tsütoplasmas kui rakutuumas, mis tähendab, et ABA signaali edasikandumiseks PYR/PYL/RCAR kaudu peab signaal tulema raku seest (Fernando & Schroeder, 2016; Brandt et al., 2012). PYR/PYL kuuikmutant rikutud ABA retseptoritega kasvas eluvõimeliselt küll 100 µM ABA söötmel, kuid kasvavate taimede õhulõhed olid rohkem avatud kui normaalselt, mis viis taime kõrge transpireerimiseni. Rikutud retseptorid põhjustasid ka ABA poolt SnRK2 mitte-aktiveerimist ning lisaks oli ABAst sõltuv geenieksprессioon madal (Gonzalez-Guzman et al., 2012). Liigselt avatud õhulõhed viitavad sellele, et PYR/PYL/RCAR ABA sidumine on oluline õhulõhede korrektseks tööks.

PP2C fosfataaside inhibeerimine ABA mõjul viib müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) SnRK2 kinaaside aktiveerimiseni, mis on vajalikud õhulõhede sulgemise indutseerimiseks (Waadt et al., 2014). Sulgumist indutseerivad kinaasid anioonikanalite kaudu, neist põhiline on aeglast tüüpi anioonkanal SLAC1, mida fosforüülib kaltsiumist sõltumatu kinaas OPEN STOMATA 1 (OST1), avades anioonide väljavoolu sulgrakkudest (Brandt et al., 2012). OST1 on PP2C fosfataasi poolt negatiivselt reguleeritud ehk ABA signaali puudumisel inhibeerib ja defosforüleerib see kinaasi(Hubbard et al., 2010; Brandt et al., 2012). Siiani on näidatud, et OST1 on vaja teiste sulgraku kinaaside aktiveerimiseks, kuid tõenäoliselt on see kinaas ise kaudselt kaltsiumioonide taseme poolt reguleeritud (Hubbard et al., 2010). Õhulõhede sulgumises ABA mõjul osalevad ka 3B perekonna Raf-tüüpi kinaasid, mis panustavad OST1 reaktiveerimisse fosforüülimise kaudu. Raf-tüüpi kinaasid osalevad nii ABAst sõltumatu osmootilise stressi korral kui ka vastusena ABA stiimulile (Saruhashi et al., 2015).

ABA retseptorite või muude ABA signaalraja komponentide puudumisel on taimed vastuvõtlikumad põuatingimustele, kuna õhulõhede arvukus on kontrolli alt väljas ning avatus suurem kui normaalselt (Belin et al., 2006; Fernando & Schroeder, 2015; Merilo et al., 2017). Väga madal ABA taseme mutandis põhjustas suurenenud õhulõhede arvukust ning veekadu; ABA biosünteesi häirega mutandid närtsisid ning surid pikaajalise põua tõttu (Fernando & Schroeder, 2015; Merilo et al., 2017). Mõlemad katsed mutantidega näitavad seda, et ABA on vajalik nii õhulõhede töö reguleerimiseks kui abiootilisele stressile vastupidamiseks. Võimendatud ABA signaaliga mutandi puhul võiks teoorias täheldada siis vähenenud õhulõhede arvukust epidermis ning suurenenud tundlikkust keskkonnatingimuste muutustele, mis võib taimes nii head kui halba tähendada. Suurenenud ABA biosünteesiga mutandi puhul võiks jällegi täheldada suuremat vastupidavust pikaajalisele põuale, kuna õhulõhed sulguksid kiiremini ning oleksid madalama avatusega. Väiksem avatus mõjutaks taime süsihappegaasi omastamist ja seega vähendaks taime kasvu ning saagikust.

1.5. AT1G22690 ehk GC1 (GASA9) geen

GC1 geen on üks kõige kõrgemalt ekspresseeritud geene täiskasvanud sulgrakus ning seetõttu on tema promootor kasulik vahend uurimistöös kasutamiseks, sest sulgrakus aktiivset promootorit kasutades loodetakse saada kõrget ekspressioonitaset ka teiste geenidega (Yang et al., 2008; Wang et al., 2013). *GC1* geeni ekspressiooni kõrget taset seostatakse just täiskasvanud õhulõhedega ehk pole suurt teada selle kohta, kas geen on aktiivne ka õhulõhede eellasrakkudes või kas see on õhulõhede arenguks oluline. Lisaks mudelorganismile *Arabidopsis thaliana* oli geeni ekspressioon

kõrge ka *Nicotiana* perekonna taimedes, mis näitab, et promootor töötab ka teiste taimede sulgrakkudes (Yang et al., 2008). *GC1* geenieksрressiooni mõjutas kõige rohkem osmootiline stress, mis vähendas oluliselt geenieksрressiooni; külm, põud ja ABA mõjutasid samuti geenieksрressiooni (Yang et al., 2008). Geeni promootor on 1716 aluspaari pikk, selle -1693 kuni -1140 aluspaaride vahemik on sulgraku promootori aktiivsust represseeriv ala. Vahemikust -1140 aluspaarist kuni -443 asuvad aga elemendid, mis võimendavad sulgraku promootori aktiivsust. Selleks, et pGC1 oleks sulgrakuspetsiifiline, asuvad vahemikus -861 kuni -224 aluspaari kaheksa (T/A)AAAG elementi, mis kartulis tõestatult promootori sulgrakuspetsiifiliseks teevad (Plesch et al., 2002; Yang et al., 2008). (T/A)AAAG elementi rikkudes oleks võimalik promootorit kasutada ka teistes rakkudes.

GC1 geeni enda funktsiooni taimes pole veel teada; teada on vaid, et *pGC1* ekspressioonitase on kõrge täiskasvanud sulgrakkudes. Kõrge ekspressioonitase just sulgrakkudes viitab sellele, et geen on potentsiaalselt seotud õhulõhede avanemise, sulgumise või arenguga (Yang et al., 2008). Enda katses soovisin kindlaks teha geeni ekspressiooni noortes ning arenevates õhulõhe arenguliini rakkudes.

1.6. At4g24480 ehk RAF6 (AtARK3) geen

RAF6 kuulub B3 RAF proteiinkinaaside superperekonda (*B3 Raf-like MAP kinase kinase* kinases, B3-MAPKKKs), mis osalevad ABA signaalide edastamises ja vahendavad müürloogas põuatingimustele reageerimist õhulõhede sulgumise näol (Saruhashi et al., 2015). Kuna kinaaside perekond reageerib abiootilisele stressile, nimetatakse neid ka ARK ehk *abiotic sress-responsive Raf-like kinases*, mida aktiveerivad fosforüleerides SnRK2 kinaasid ning mis ise samuti SnRK2 kinaase aktiveerivad (Saruhashi et al., 2015; Katsuta et al., 2020). *RAF6* geeni ekspressiooni tõuseb vastusena ABAga töötlemisele (Katsuta et al., 2020.) Mutantides, kus lisaks teistele *RAF* geenidele ka *RAF6* tööd segati, ilmnes noortel taimedel peale idanemisfaasi tundetus ABA suhtes, samas ABA poolt reguleeritud geenide töö ise ei muutnud (Katsuta et al., 2020). Samas jällegi teine *raf* mutant, UV-valguse poolt mutageniseeritud ja ABA söötmel kasvatatud, näitas samuti tundetust ABA suhtes ning aeglustunud vastust veepuudusele (Saruhashi et al., 2015). Mõlemad tulemused näitavad seda, et *RAF* geenidel, sealhulgas *RAF6*, on oluline roll ABA ja madala niiskuse poolt aktiveeritud õhulõhede sulgumises. On teada, et RAF6 on oluline õhulõhede sulgumises, aga me ei tea, kas oluline ka eellasrakkudes ja õhulõhede arengus. Enda katses soovisin kindlaks teha seda, kas geen on aktiivne ka arenevates õhulõhe arenguliini rakkudes.

2. Töö eesmärgid

Töö eesmärgiks on iseloomustada geenide *RAF6* ja *GC1* ekspressioonimustrit taime epidermirakkudes, uurides geenide promootorite aktiivsust GUS-reportergeeni, GUS-värvimise ja valgusmikroskoobi abil. GUS-värvimine võimaldab näha geeni promootorite aktiivsust õhulõherakkudes ning kui peaksid värvuma ka õhulõhede eellasrakud, siis saan järeldada geenide võimaliku rolli kohta õhulõherakkude arenguprotsessis. Seega töö spetsiifilised eesmärgid olid: andmebaasi põhjal *RAF6* ja *GC1* geenide ekspressioonimustrite iseloomustamine, promootor::GUS järjestust sisaldavate vektorite konstrueerimine *Escherichia coli* abil, puhastatud plasmiidi *Agrobacterium tumefaciens* tüvesse transformeerimine, *Arabidopsis thaliana* taimede transformeerimine *Agrobacteriumiga* ning promootorite aktiivsuse analüüsimine epidermis GUS-värvimise teel.

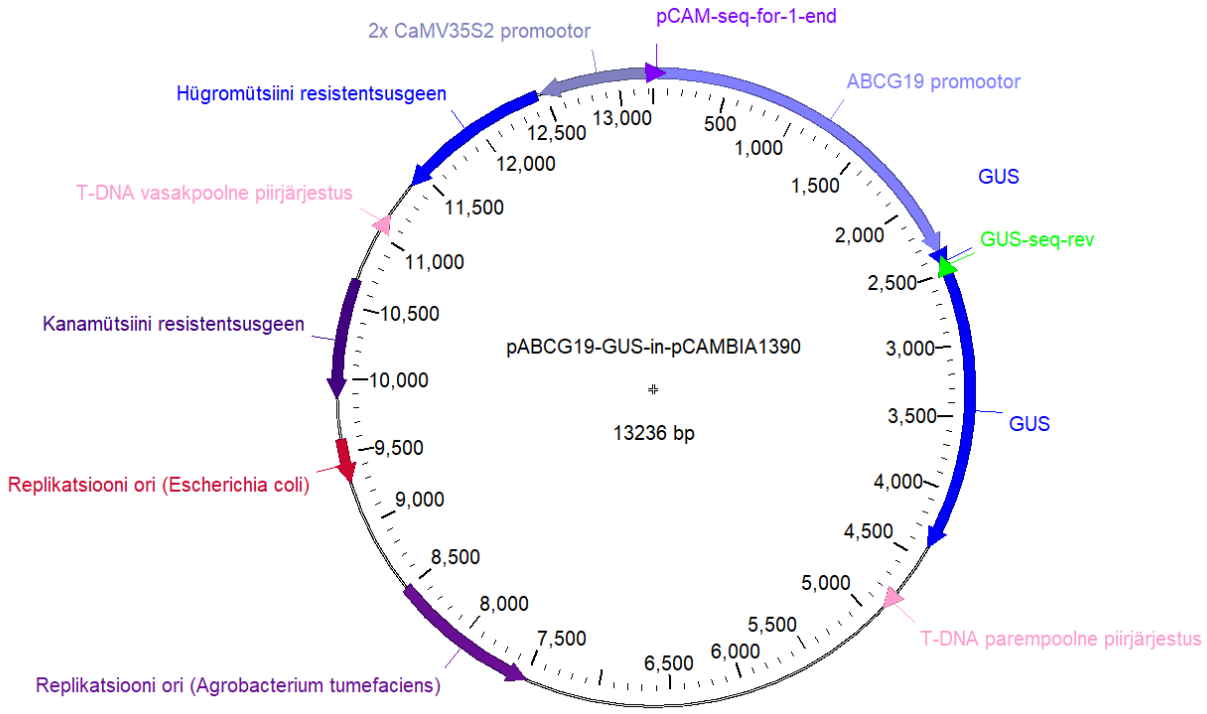
3. Metoodika

3.1. Taimede kasvatamine transformatsiooniks

Hoidsin katseteks kasutatavaid *Arabidopsis thaliana* Col-0 liini seemneid kaks päeva vees 4°C külmkapis, et seemnete idanemist stimuleerida. Kasvatamiseks kasutasin keskmise suurusega taimepotte (8 x 8 x 6 cm) ning täitsin need 4:2:3 mahusuhtega turba (Pruun 025 W, Kekkilä), vermikuliidi (No 2, Vermipu) ja kraaniveega. Seemned külvasin mullale 100 µl pipetiga ning kolmese kordusena, kus silma järgi püüdsin igasse kordusesse vaid paar seemet pipeteerida. Külvasin 6 poti jagu taimi kummagi transgeeni jaoks, kuhu peale idude harvendamist 3 taime poti kohta alles jäi. Vegetatiivse kasvufaasi ajal kasvatasin taimi lühipäevatoas, kus valgus-pimedustsükkel oli 10h valgust, 14h pimedust. Õitsemisfaasis viisin taimed pikapäevatuppa, kus neid 16 h valgustati ja 8 tundi pimeduses hoiti. Mõlemas toas oli õhuniiskus 60% ning valgustugevus 250 $\mu molm^{-2}\ s^{-1}$. Taimed olid valmis transformatsiooniks kui nende õiepungad olid välja arenenud, kuid mitte veel avanenud.

3.2. Molekulaarne kloneerimine ja plasmiidide valmistamine

Konstruktide loomiseks paljundasin geenide *RAF6* (*At4g24480*) ja *GC1* (*At1g22690*) promootorite järjestusi PCRi abil, pärast mida lõikasin saadud PCR produkte Thermo Scientific restriktsiooniensüümidega PstI ja SalI tund aega. Geenide *RAF6* ja *GC1* promootorid kloneerisin *E. Coli* plasmiidi pABCG19::GUS::pCAMBIA-1390 (laboris varem valmistatud), kus oli GUS-reportergeen (joonis 4.) Lõpptulemuseks olid vektorid pRAF6::GUS::pCAMBIA-1390 ning pGC1::GUS::pCAMBIA-1390 (joonised 5. ja 6.).



Joonis 4. pABCG19-GUS-in-pCAMBIA1390 plasmiid. Plasmiidi valmistas laboris Heiki Reila.

3.2.1 PCR praimerite disain, promootorite PCR ning PCR produktide puhastamine ja restriktsioon

Praimerid tellisin vastavalt promootorite järjestustele (järjestus TAIR andmebaasist (arabidopsis.org), 2000 bp *RAF6* puhul ja 1267 bp *GC1* puhul) ettevõttest Integrated DNA Technologies ning praimerite seondumistemperatuuri disainisin ApE tarkvara (Davis & Jorgensen, 2022) kasutades. Soovisin, et praimerite seondumistemperatuur jääks vahemikku 55-62°C. Praimerid on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Katseteks disainitud praimerid.

Geen	**Praimeri nimi**	**Praimeri järjestus**	**Eesmärk**
GC1	PstI-pGC1-for	tgacctgcagtcaaaatagtgtttagttttggac	Päripidi praimer pGC1 promootori kloneerimiseks pABCG19-GUS-CAMBIA-1390 vektorisse
GC1	SalI-pGC1-rev	tgacgtcgacatttcttgagtagtgattttgaag	Äraspidi praimer pGC1 promootori kloneerimiseks pABCG19-GUS-CAMBIA-1390 vektorisse
RAF6	PstI-pat4g24480-for	tgacctgcagatgtcaatagtgtttgtttatgaaggaa	Päripidi praimer Pat4g24480 promooteri kloneerimiseks

			pABCG19-GUS-CAMBIA-1390 vektorisse
RAF6	SalI-pat4g24480-rev	tgagtcgacttcgttaaaatctcactctgaaagc	Äraspidi praimer Pat4g24480 promooteri kloneerimiseks pABCG19-GUS-CAMBIA-1390 vektorisse
RAF6	pat4g24480-seq-for	ttcgtgcgtctgtatccagg	Päripidi sekveneerimispraimer *pRAF6* järjestuse keskmise osa kontrollimiseks plasmiidis
	GUS-seq-rev2	tcacgggttggggtttctac	Äraspidi sekveneerimispraimer GUS järjestuse ees paikneva järjestuse kontrollimiseks plasmiidis
	pCAM1390-seq-for-1	cgtgctccaccatgttgggc	Päripidi sekveneerimispraimer GUS järjestuse ees paikneva järjestuse kontrollimiseks plasmiidis

Huvipakkuvate (*RAF6* ja *GC1*) geenide promootorid paljundasin Thermo Scientific Phusion polümeraasiga. Reaktsioonisegus kasutasin ühe PCR proovi jaoks Phusion polümeraasi 0,5 µl (lõppkonts. 0,02 U/µl), 5x Phusion HF puhvrit 10 µl (lõppkonts. 1x), 2 mM dNTPsid 5 µl (lõppkonts. 0,2 mM), 10 µM päripidi-praimerit 2,5 µl (lõppkonts. 0,5 µM), 10 µM äraspidi-praimerit 2,5 µl (lõppkonts. 90,5 µM), genoomset Col-0 DNAd 2 µl ja ülejäänu 50 µl-ist oli mQ vesi. Kasutades Thermofisher.com lehekülge (https://www.thermofisher.com/ee/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html) sain praimerite seondumistemperatuuri (*RAF6* 62°C ja *GC1* 58°C) ja valisin vastavalt PCR reaktsiooni seondumistemperatuuri. PCR programmi esimene samm oli 98°C ja kestis 30 sek. Sellele järgnes PCR tsükkel, mis algas 98°C 10 sek (DNA ahelate lahutamine), seejärel 58°C (praimerite seondumine) 20 sek ning siis 72°C 1 min (DNA süntees). Tsüklit korrati 35 korda. Pärast seda oli ühekordne DNA sünteesi etapp 72°C 7 min, pärast mida programm lõppes toatemperatuuril.

Kasutasin proovideks 5 µl PCR produkti ja 2 µl 6x laadimisvärvi, mis omavahel segasin (värvi lõppkonts. 1,7x). PCR produkte lahutasin etiidiumbromiidiga värvitud (lõppkonts. ~0,2 µg/ml) 1% lõppkonts. Agaroosgeelil elektroforeesivannis jooksutades (8,7 V/cm) ning signaali kontrollisin UV-valguslaual.

PCR produktid puhastasin reaktsioonisegust Favorgen PCR puhastamise komplektiga vastavalt tootja protokollile.

PCR produkte lõikasin Thermo Scientific restriktsiooniensüümidega PstI (lõppkonts 0,2 U/µl konts.) ja SalI (lõppkonts. 0,2 U/µl), reaktsioonisegusid hoidsin 1 h 37°C kapis. Peale seda puhastasin Favorgen FavorGen™ Gel/PCR puhastamise komplektiga vastavalt tootja protokollile.

3.2.2 Vektori restriktsioon ning agaroosgeelist puhastamine

Lisaks geenide promootorite PCRile tegin ka vajaliku vektori (pABCG19-GUS-CAMBIA-1390) lõikamise, kuhu hiljem geenide promootorid kloneerida. Vektori lõikamiseks pipeteerisin kokku 10 x puhver O-d 5 µl (1x lõppkonts.), 3 µl vektorit (vektori konts. 329,8 ng/µl, lõppkonts. 19,8 ng/µl), 1 µl PstI restriktsiooniensüümi (lõppkonts. 0,2 U/µl), 1 µl SalI restriktsiooniensüümi (lõppkonts. 0,2 U/µl), ja 40 µl mQ vett. Restriktsioonisegu hoidsin üleöö 37°C kapis. Enne geelile kandmist lisasin restriktsioonisegule 1 µl Invitrogen CIAP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*) ensüümi (lõppkonts. 0,4 U/µl), mis fosfaatotsad eemaldas; reaktsioon toimus 30 min 37°C kapis. Agaroosgeeli, millele kandsin proovid, värvisin fluorestseeruva DNA värvi GelRediga (Biotium, lõppkonts 1 x) ja tegin 1% lõppkontsentratsiooniga.

Lõigatud vektorite eemaldamiseks agaroosgeelilt lõikasin pikad fluorestseeruvad vektori DNA tükid geelist välja, nii ettevaatlikult kui sain ning eemaldasin veel neilt lisageeli. Mikrotsentrifuugituubi sisestasin 300 mg geeli ning puhastasin Favorgen FavorPrep™ Gel/PCR puhastamise komplektiga vastavalt tootja protokollile

3.2.3 Inserdi ja vektori ligatsioon

Ligeerimiseks pipeteerisin kokku 14 µl lõigatud ja puhastatud PCR produkti, 3 µl lõigatud ja puhastatud plasmiidi, 2 µl T4 puhvrit (lõppkonts. 1x) ja 1 µl Thermo Scientific T4 DNA ligaasi (lõppkonts. 0,25 U/µl). Reaktsioon toimus toatemperatuuril tund aega.

3.2.4 Rakkude transformatsioon ja selektsioon

Ligatsioonisegu transformeerisin kuumašoki teel. Inkubeerisin laborandi poolt valmistatud DH10β kompetentseid *Escherichia coli* rakke (120 µl) koos ligatsioonisegu (10 µl), mQ (70 µl) ja 5x

KCMga (5x KCM = 0.5 M KCl, 0,15 M $CaCl_2$, 0,25 $MgCl_2$) (20 µl, lõppkonts. 0,45x) jääl 30 min, millele järgnes kuumašokk 42°C 90 sek, uuesti jääl 1 min inkubeerimine ning siis koos LB söötmega (1 ml) 60 min loksutil 37°C juures loksutamist.

Rakkude plaatimiseks tsentrifuugisin 1 ml transformeeritud segu 4600 g 1 min Eppendorf FA-24x2 5420 rootoriga, eemaldasin osa söötmest, nii et rakkude peale jäi ~200 µl vedelikku, mille sees laminaari all rakke suspendeerisin. Rakusegu plaatisin LB kanamütsiiniga (50 µg/ml) söötmeplaatidele. Järgmisel päeval oli rakukasvu juba näha.

3.2.5. Koloonia PCR

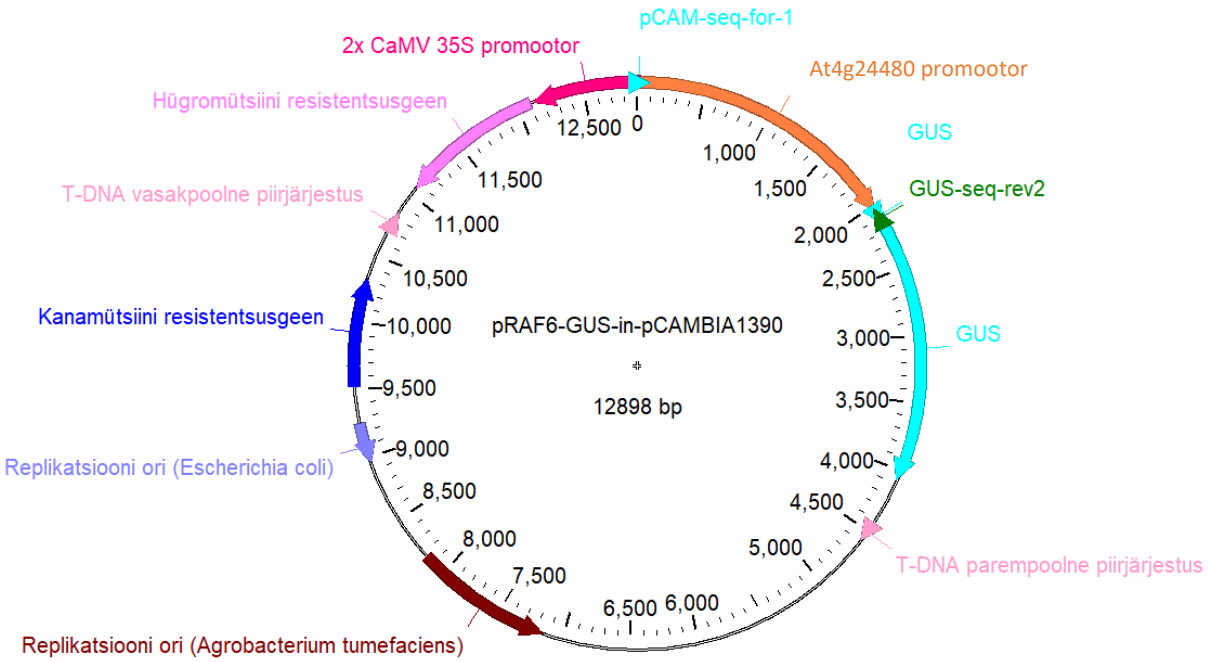
Kasvanud kolooniatest võtsin juhuslikult igalt plaadilt alguses 6 proovi märgistades vastavalt, ning teostasin koloonia PCRi. Proove võtsin pipeti otsaga kolooniaid õrnalt kraapides ning suspendeerisin 10 µl mQ PCR tuubi sees. Baktereid lüüsisin 10 min PCR masinas 95°C juures. Peale seda lisasin bakterisegule (kõike 2 µl) mQ, 10x puhver B (lõppkonts. 1x), 25 mM $MgCl_2$ (lõpponts. 2,5 mM) ja 2 mM dNTPsid (lõppkonts. 0,2 mM) ning lisaks 1 µl 10 µM pCAM1390-seq-for-1 praimerit (Tabel 1., lõppkonts. 0,5 µM) ja 1 µl 10 µM RAF6 või GC1 praimerit (Tabel 1., SalI-pat4g24480-rev või SalI-pGC1-rev, lõppkonts. 0,5 µM). Segule lisasin Solis Biodyne FIREPOL polümeraasi 0,2 µl (lõppkonts. 0,05 U/µl) ning teostasin protokolli põhjal PCRi, kus seondumistemperatuur oli 55°C peale pandud.

PCR programmi esimene samm oli 95°C ja kestis 3 min. Sellele järgnes PCR tsükkel, mis algas 95°C 15 sek (DNA ahelate lahutamine), seejärel 55°C (praimerite seondumine) 20 sek ning siis 72°C 2,5 min (DNA süntees). Tsüklit korrati 25 korda. Pärast seda oli ühekordne DNA sünteesi etapp 72°C 7 min, pärast mida programm lõppes toatemperatuuril.

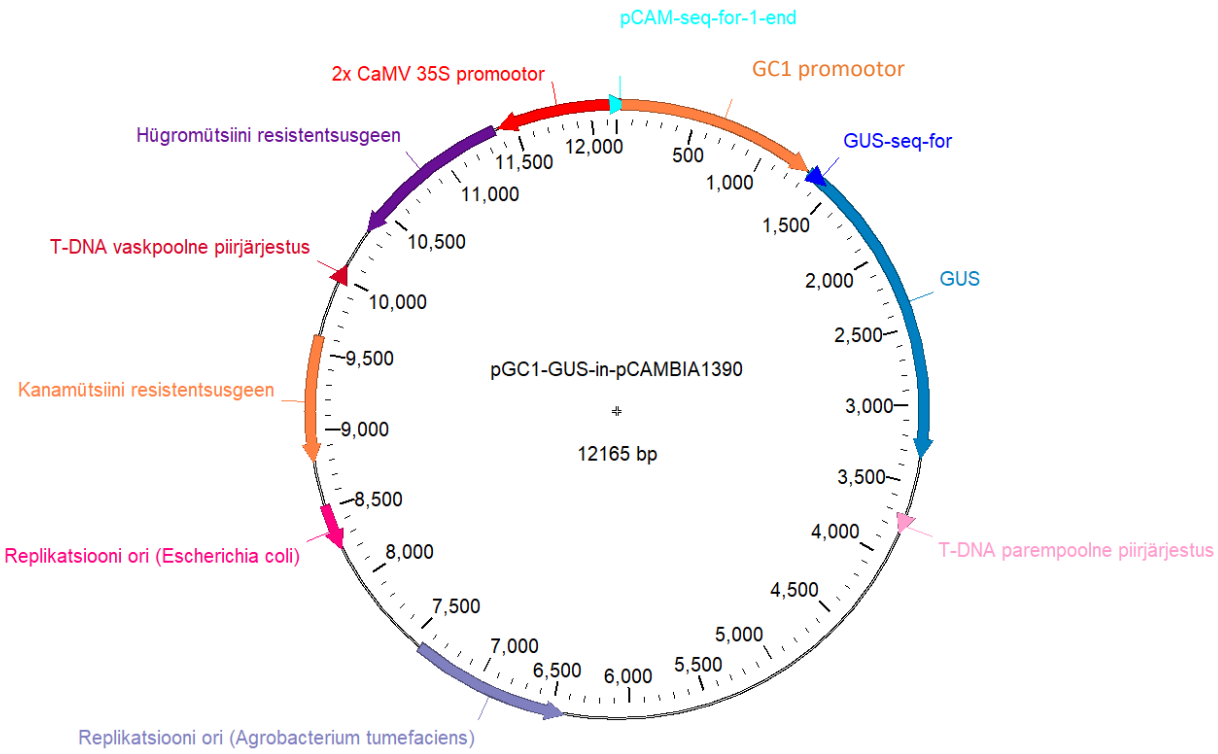
3.2.6. Plasmiidi eraldamine, kontsentratsiooni määramine ja sekveneerimine

Sobivad kolooniad, mis sisaldasid loodud plasmiidi, panin edasi kasvama üleöö 37°C loksutisse 5 ml LB vedelsöötmesse, millele oli lisatud 50 µg/ml lõppkontsentratsiooniga kanamütsiini. Järgmisel päeval eraldasin plasmiidi bakterikultuurist tootja protokolli põhjal, kuid 5 ml söötme asemel võtsin kaks korda 1,5 ml söödet tsentrifuugimiseks. Söötmest kogutud rakud töötlesin Favorgen FavorPrep™ Plasmid Extraction komplektiga järgides tootja protokolli. Eraldatud plasmiidide kontsentratsiooni määrasin NanoDrop spektrofotomeetriga ning hiljem kasutasin Tartu Ülikooli sekveneerimise täisteenust vektoritesse kloneeritud järjestuste kontrollimiseks. Plasmiidi sekveneerimiseks kasutasin praimereid pCAM1390-seq-for-1, GUS-seq-rev2 ja pat4g24480-seq-for (Tabel 1).

Sekveneerimistulemusi kontrollisin ApE tarkvara abil ning selle põhjal valisin proovid, mida *Agrobacterium tumefaciensi* ja seejärel taimede transformatsiooniks kasutada. Eesmärk oli kontrollida, kas minu paljundatud järjestused sisenesid plasmiidi vigadeta. Lõplikes plasmiididest pidid olema nii GUS-reportergeen, antibiootikumiresistentsusgeenid kui ka uuritavate geenide promootorid olemas (joonised 5. ja 6.).



Joonis 5. pRAF6(pAt4g24480)::GUS::pCAMBIA 1390 plasmiid koos sisestatud *at4g24480* (*RAF6*) promootorjärjestusega.



Joonis 6. pGC1(At1g22690)::GUS::pCAMBIA-1390 plasmiid koos sisestatud *GC1* promootorjärjestusega.

3.3. *Agrobacteriumi* ja taimede transformeerimine

Promootor-reporteri konstruktid transformeerisin *Agrobacterium tumefaciens* tüvesse GV3101. Transformatsiooniks võtsin 1000 ng plasmiidi ning 100 µl *Agrobacteriumi* kompetentseid rakke (laborandi valmistatud). Reaktsiooniks inkubeerisin segu 25 min jääl ning siis tegin temperatuurišokki 3 min 37°C, pärast mida lisasin rakkudele 1 ml LB söödet ning inkubeerisin segu 2 h 28°C loksutis. Seejärel tsentrifuugisin segu 2 min 4600 g juures ning eemaldasin siis rakusademelt vedeliku, nii et ~200 µl jäi alles. Sademe resuspendeerisin allesjäänud vedelikus ning plaatisin selle LB söötmeplaatidele (+ kanamütsiin 50 µg/ml ja gentamütsiin 25 µg/ml). Plaate inkubeerisin 28°C juures 3 päeva. Seejärel kasutasin transformeeritud *Agrobacteriumit* hariliku müürlooga transformeerimiseks.

Kõigepealt lisasin 5 ml LB vedelsöötmele kanamütsiini ja gentamütsiini (lõppkonts. Vastavalt 50 µg/ml ja 25 µg/ml) ning seejärel inokuleerisin söötme väikse koguse kasvatatud transformeeritud *Agrobacterium* rakkudega. Rakud jätsin 28°C loksutisse üleöö kasvama. Järgmisel päeval lisasin laminaari all 50 ml LB söötmele 50 µg/ml kanamütsiini ja 25 µg/ml gentamütsiini ning 25 µl üleöö kasvatatud rakukultuuri rakke. Jälle kasvatasin rakke üleöö 28°C loksutil. Pärast seda tsentrifuugisin rakukultuuri 50 ml tuubis 10 min 1430 g kuni rakud olid tuubi põhja sadestunud. Sademe pealt vedeliku kallasin minema ning rakumassi resuspendeerisin 50 ml 5%

sahharoosilahuses. Raku-suhkrulahusele lisasin 25 µl SILWET L-77 (Momentive, lõppkonts. 0,05%).

Noori taimi, millel olid õied välja arenenud, kuid osa õisi avanemata, leotasin bakterikultuuri ja sahharoosilahuses. Enne leotamist lõikasin 10 päeva varem taimede varred kuni rosetini ära ning leotamiseks kasvasid uued värsked varred ja õiepungad asemele. Kandiku põhja asetasin paberrätikud, mida niisutasin veega. Taimed kastsin ühe kaupa raku-suhkruvedelikku ja hoidsin seal 1 min, tehes kindlaks, et taime kõik õied vedelikus sees oleksid. Hiljem asetasin taimepoti kandikule pikali ning asetasin veel paberrätikuid neile peale, mida niisutasin veepritsiga. Kandiku asetasin koos läbipaistmatu kattega kasvutuppa. Järgmine päev tõstsin taimed kandikul püsti ja eemaldasin paberrätikud, jätsin seemned valmima.

Seemnetest saab kasvatada transgeensed taimed, kus promootor-reporteri konstruktid juhuslikult taime genoomi sisenenud on.

3.4. Transgeensete taimede selektsioon

Külvasin transformeeritud taimede seemned kuuele antibiootikumiga söötmeplaadile (hügromütsiin, lõppkonts. 25 µg/ml), kolm plaati ühe transgeeniga seemnete jaoks, ning umbes 100 µl seemneid plaadi kohta. Taimed, mis plaadil ellu jäid olid edukalt transformeerunud ja seega pidanuks sisaldama ka promootorkonstrukti. Ühe geeni kohta valisin kolmelt plaadilt 25 kõige elujõulisemat taime ning istutasin nad väikestesse pottidesse ümber (6 x 6 x 5.5 cm). Pottidesse panin 4:2:3 mahusuhtega segatult vastavalt turvast (Pruun 025 W, Kekkilä), vermikuliiti (No 2, Vermipu) ja kraanivett. Kahe nädalaga oli juba suuremat kasvu näha ning edasiselt lähtusin lisaks tõdemusest, et kõige elujõulisemad jätan ellu seega kängu jäänud taimed viskasin minema. Lõpuks jäi *GC1* promootori transgeeniga taimi umbes 18 alles ning *RAF6* promootori transgeeniga taimi 22 alles.

3.5. GUS värvimine, preparaatide valmistamine ja pildistamine

Kuna GUS-reportervalku ekspresseerivad taimerakud värvuvad substraadiga (X-Gluc, Thermo Fisher) töödeldes siniseks, on võimalik näha *RAF6* ja *GC1* geenide promootorite aktiivsust taimes. GUS-värvimise protokoll põhineb Stanislav Vitha protokollil (https://microscopy.tamu.edu/wp-content/uploads/2018/08/GUS_Localization_in_plants.pdf).

pGC1::GUS ja pRAF6::GUS transformeeritud taimede lehed korjasin enne taime õitsemist. Värvimiseks kasutasin ühe lehe epidermitükki, mille eraldasin lehest kasutades pintsette ja kääre.

Taimekoe fikseerimiseks hoidsin alguses proovi 90% atsetoonis 20 min peale mida loputasin neid kaks korda 1X NaP puhvriga (2X NaP puhver: 0,1 M NaH_2PO_4 ja 0,1 M Na_2HPO_4, pH 7,2), et viimnegi atsetoonijääk eemaldada. Peale NaP pesemist kandsin proovidele GUS-värvimislahuse (1 ml jaoks: 405 µl vett, 500 µl 2X NaP (lõppkonts. 1x), 50 µl metanooli (lõppkonts. 5%), 20 µl 100 mM kaalium ferritsüaniidi lahust (2 mM), 20 µl 100 mM kaalium heksatsüanoferraat(III) lahus (2 mM), 0,5 mg X-Gluci (lõppkonts. 0,5 mg/ml), 5 µl 10% Triton X-100 (lõppkonts. 0,05%)) ning hoidsin proove pimedas keskmiselt kaks päeva (kolm oli maksimum). Osa proovidest värvusid tunni jooksul, sealne promootori signaal oli tugevam ning neis proovides, kus see nõrgem oli, jätsin proovid kolmeks päevaks värvilahusesse seisma. Peale proovide värvimist eemaldasin GUS-värvimislahuse ja hoidsin proove 70% etanoolis. Preparaatide tegemiseks asetasin taimekoe tükid mikroskoobi preparaadi alusele veetilga sisse ning peale panin pealisklaasi. Kern Optics valgusmikroskoobis vaatlesin proove 20-kordse suurendusega ning pildistamiseks kasutasin Kern Optics Microscope Camera ODC 832 kaamerat ja MicroscopeVIS2.0 Pro tarkvara. Eduka pildi saamiseks otsisin kõige õhemad epidermialad, kus õhulõhesid üksikute ridadena näha oli.

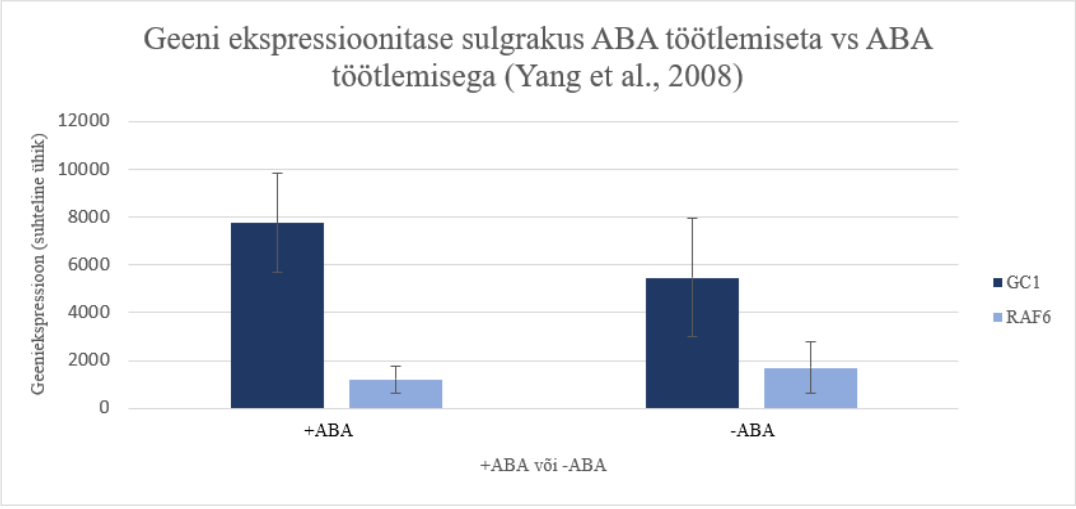
4. Tulemused

4.1. GC1 ja RAF6 ekspressioonimuster õhulõhedes Arabidopsis eFP Browser andmetel

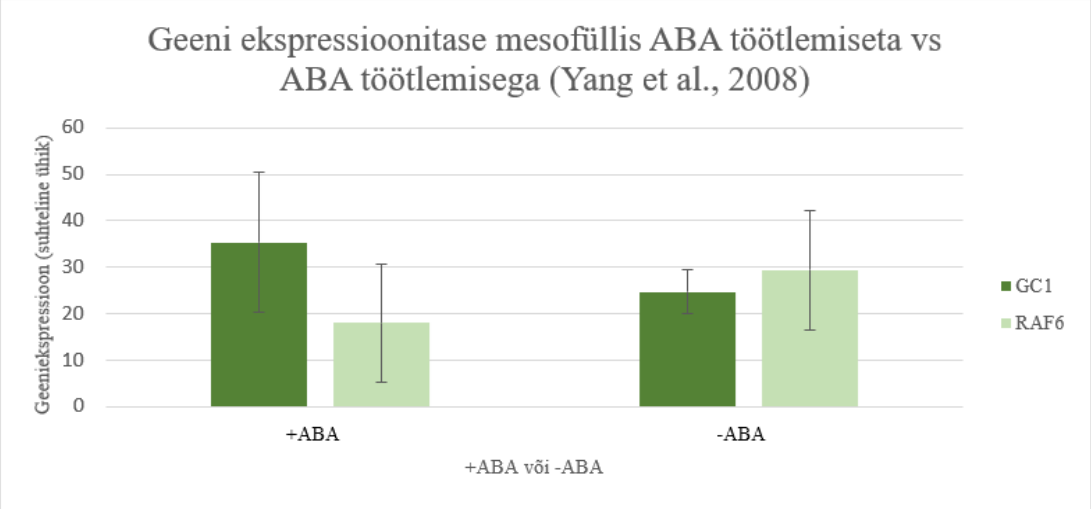
Uuritavate geenide paremaks kirjeldamiseks uurisin kõigepealt taustainfoks Arabidopsis eFP Browser andmebaasist (http://bar.utoronto.ca/efp//cgi-bin/efpWeb.cgi) geenide eskpressiooni kohta. Andmebaasis on koondatud geenieksрessiooni andmed mitmetest erinevatest uuringutest, mis avaldatakse suhteliste ühikutena. Andmebaasis kasutatavad suhtelised ühikud annavad üldise arusaama geenide aktiivsuse kohta erinevates kudedes.

GC1 geeni ekspressioonitase on andmebaasi põhjal kõrgeim sulgrakus (~7500), kuid lisaks ka lehes (~750) (joonised 7. ja 9.). Mesofüllis on *GC1* ekspressioonitase madal (joonis 8.). ABA töötlemiseta on *GC1* ekspressioonitase valdavalt veidi kõrgem kui ABAga töötlemisel, kuid ei ole teada, kas see erinevus on statistiliselt oluline (joonised 7., 8. ja 9.) Suurimat erinevust kahe vahel on näha joonisel 7., kus erinevus on ~2000 suhtelist ühikut.

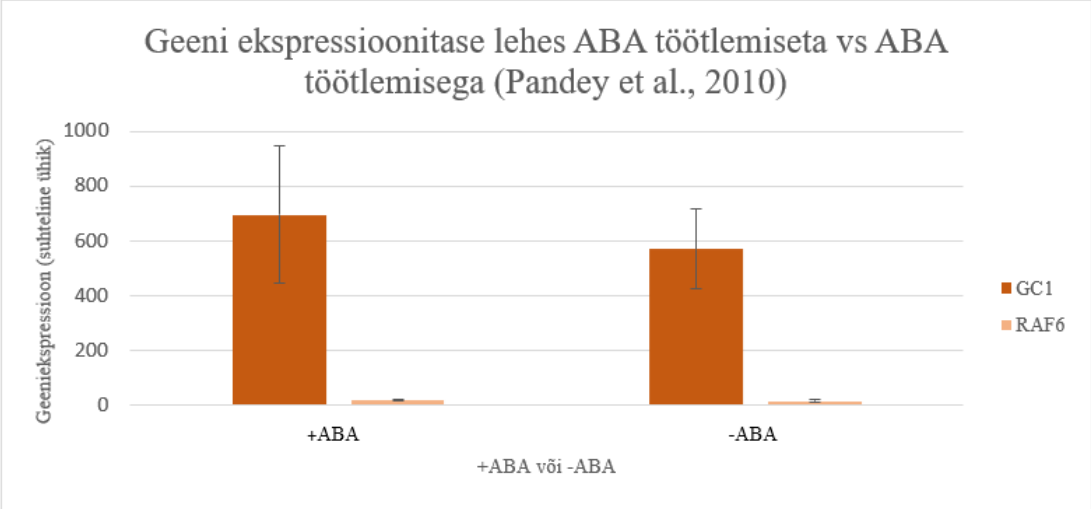
Võrreldes jooniseid 7., 8. ja 9. omavahel on näha suurt vahet *RAF6* suhtelises ekspressioonitasemes sulgrakkudes (~1500), mesofüllis (~15) ja lehes (~10). ABAga töötlemisel (50 µM, 3 h Pandey et al. 2010 uurimuses, kust on pärit lehe andmed ja 100 µM 4 h Yang et al. 2008 uurimuses, kust on pärit sulgrakkude ja mesofülli andmed) *RAF6* ekspressioonitase palju ei muutunud (joonised 7., 8. ja 9.).



Joonis 7. Geenide *At1g22690* (*GC1*) ja *At4g24480* (*RAF6*) ekspressioonitasemed *Arabidopsis thaliana* ABAga töötlemata (-ABA) ja töödeldud (+ABA) sulgrakkudes. Keskmine koos standardhälbega, andmed Arabidopsis eFP Browser, Yang et a., 2008 uuringu põhjal.



Joonis 8. Geenide *At1g22690* (*GC1*) ja *At4g24480* (*RAF6*) ekspressioonitasemed *Arabidopsis thaliana* ABAga töötlemata (-ABA) ja töödeldud (+ABA) mesofülli rakkudes. Keskmine koos standardhälbega, andmed Arabidopsis eFP Browser, Yang et a., 2008 uuringu põhjal

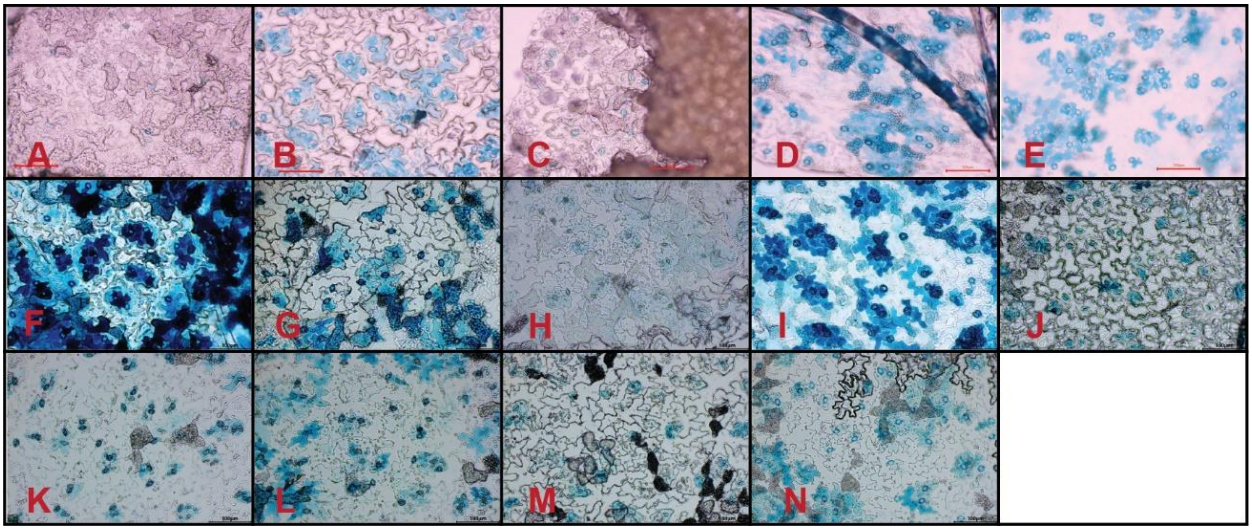


Joonis 9. Geenide *At1g22690* (*GC1*) ja *At4g24480* (*RAF6*) ekspressioonitasemed *Arabidopsis thaliana* ABAga töötlemata (-ABA) ja töödeldud (+ABA) lehtedes. Keskmine koos standardhälbega, andmed Arabidopsis eFP Browser, Pandey et al., 2010 uuringu põhjal.

4.2. Transgeensete taimeliinide iseloomustamine

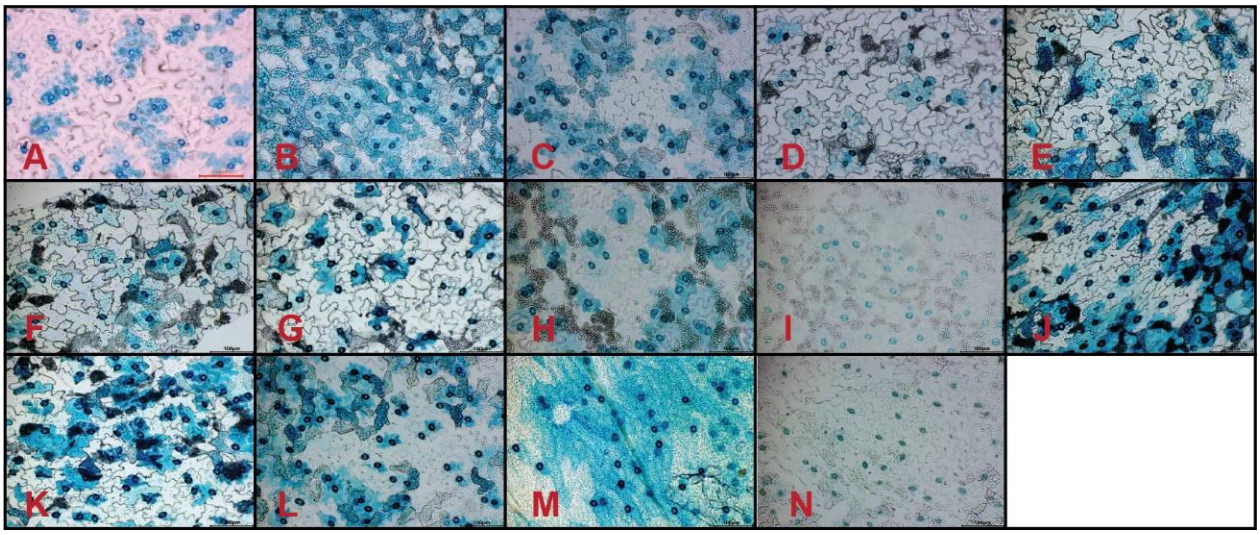
Katses värvisin pGC1::GUS ja pRAF6::GUS reporteriga taimi GUS-värvimislahusega (pt. 3.5). Taimed, kuhu GUS-reportergeen sisse oli läinud ning kas *GC1* või *RAF6* promootor epidermirakkudes aktiivne oli, olid õhulõhed ja neid ümbritsevad rakud siniseks värvunud. Kõik rakud ei värvunud, kuigi taimed olid kõik hügromütsiini resistentsusgeeniga, ei leidunud mõnedes proovides GUS signaali (lisa 1.). Tulemuste osas käsitlen ainult värvunud liine.

4.2.1. GUS-signaali andvad liinid



Joonis 10. GUS-värvunud pGC1::GUS taimede õhulõhed. Preparaadid A-N on õnnestunud värvumised, kõik erinevatelt taimedelt. Skaalariba on 100 µm pikk.

GUS-värvumisel värvusid 14 pGC1::GUS taime ning 14 pRAF6::GUS taime sulgrakud ja neid ümbritsevad rakud siniselt (Joonis 10. ja 11). Joonisel 10. F, G ja I on näha ka tugevat mesofüllirakkude ja -koe tumesinist värvumist. Joonisel 11. C, E, F, G, J, K ja L on samuti mesofüllirakud ja -kude tumesiniselt värvunud, tumedamalt või sama tumedalt kui sulgrakud ise. Katse põhjal võib järeldada, et transgeen töötab, mõlemad promootorid on sulgrakkudes ja mesofüllis aktiivsed ja taimeliine saab edasi uurida.



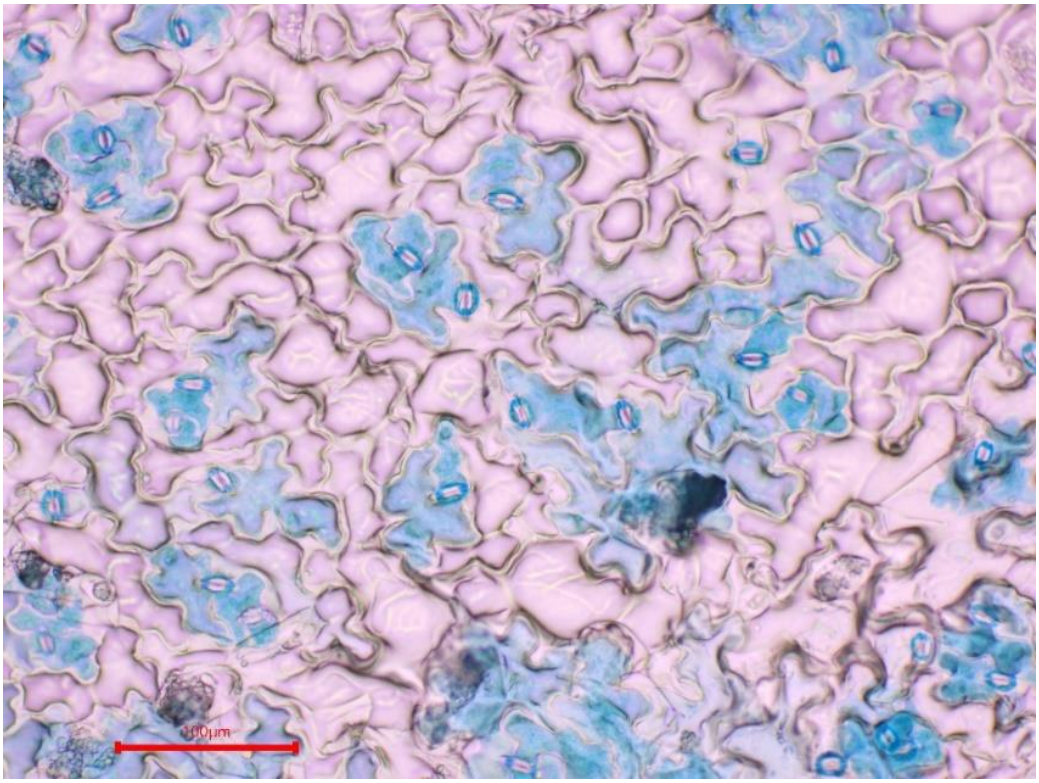
Joonis 11. GUS-värvunud pRAF6::GUS taimede õhulõhed. Preparaadid A-N on õnnestunud värvumised, kõik erinevatelt taimedelt. Skaalariba on 100 µm pikk.

4.2.2. GUS-signaaliga rakutüübid

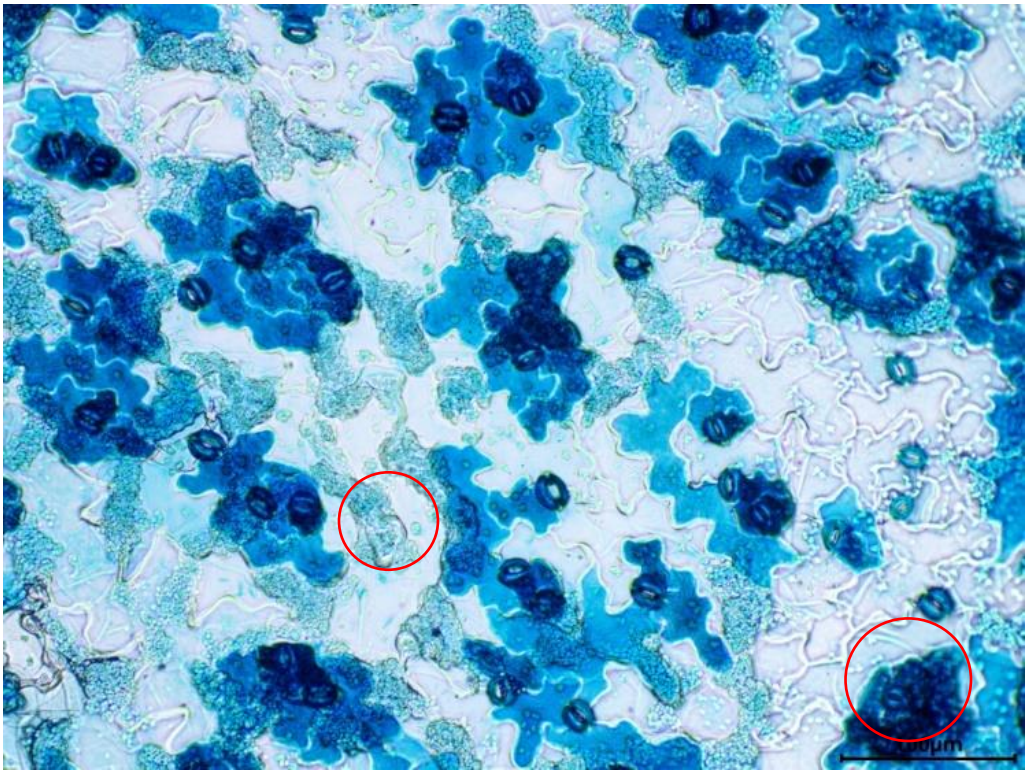
Ootuspäraselt olid just sulgrakud ning nendega seotud rakud värvunud siniselt. Näha oli samuti mesofülli koe värvumist siniseks, mis mõnevõrra segas epidermirakkude vaatlemist. Preparaate uurisin 20 x suurendusega ning püüdsin lokaliseerida noori rakke, milles promootorid aktiivsed olla võisid. Järgnevalt on toodud suuremalt mõned *GC1* ja *RAF6* promootorite aktiivsust illustreerivad pildid.

4.2.2.1. pGC1::GUS

pGC1::GUS taimedes värvusid sulgrakud ning nendega samast õhulõhe arenguliinist pärinevad epidermirakud (*pavement cell*) siniselt. Tavaliselt oli värvunud epidermirakkudeks 1-2 rakku, ühe sulgrakupaari ümber (joonis 12.), kuid leidus ka preparaate, kus valdavalt ainult sulgrakud värvusid (joonis 14.).

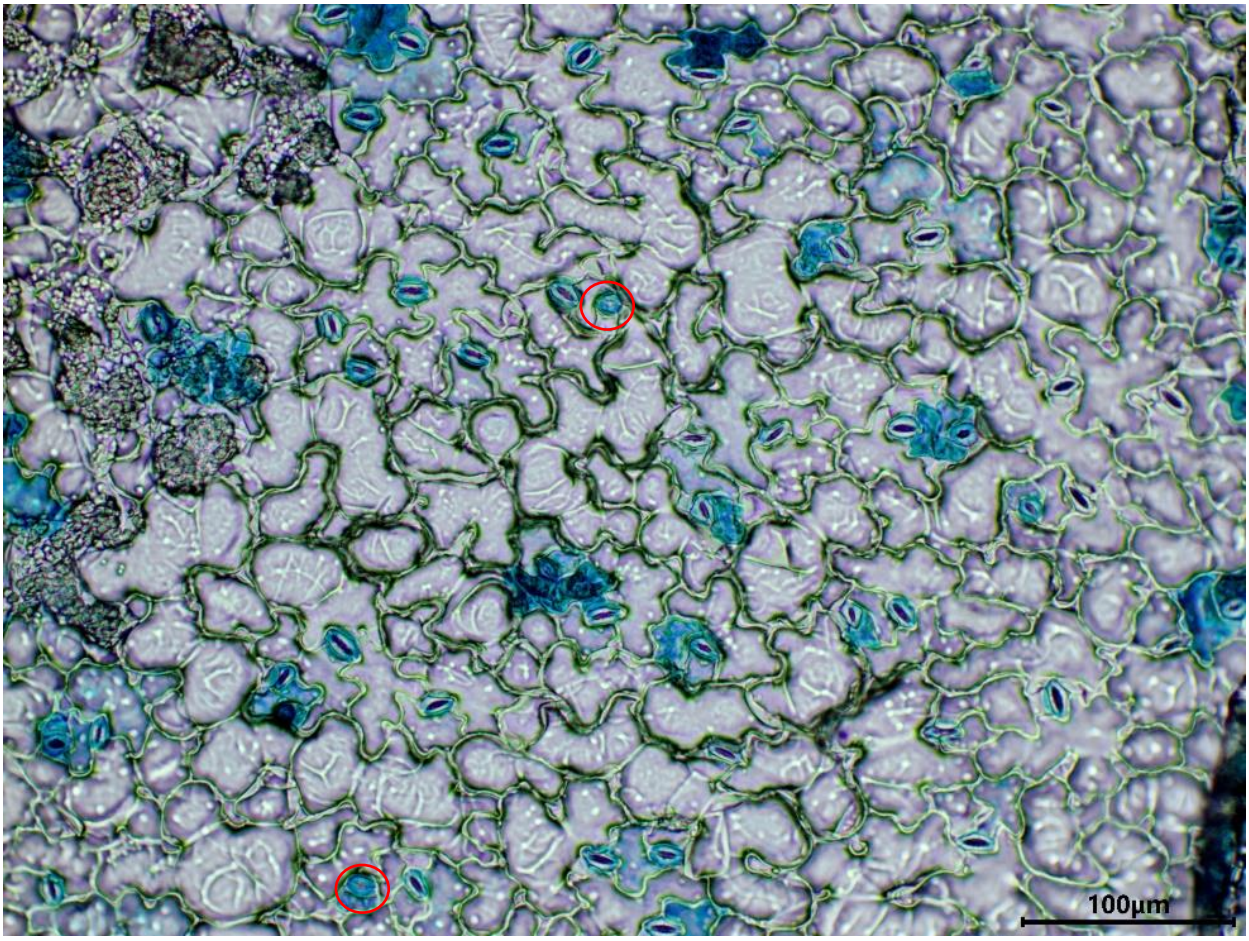


Joonis 12. pGC1::GUS liin number 22, B joonisel 10. Skaalariba on 100 µm pikk.



Joonis 13. pGC1::GUS liin number 19, F joonisel 8. Skaalariba on 100 µm pikk.

Joonisel 13. on lisaks epidermi- ja sulgrakkudele värvunud ka üsna palju mesofüllikude (punased ringid). Promootori aktiivsus on tõenäoliselt olnud tugev terves epidermis ning seetõttu on ka rohkem epidermirakke tugevamalt värvunud. Joonisel 13. pole silmnähtavalt ühtegi õhulõhede eellasrakku näha. Tugev värvumine häirib rakkude vahel vahet tegemisel.

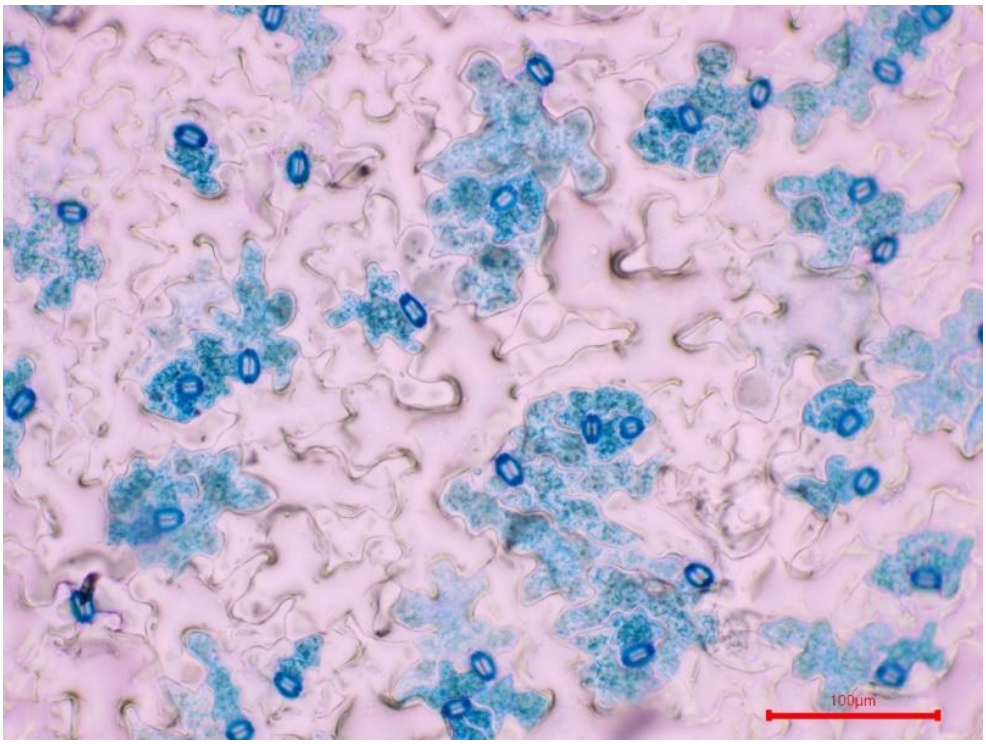


Joonis 14. pGC1::GUS liin number 25, J joonisel 8. Skaalariba on 100 µm pikk.

Mõne preparaadi puhul oli näha promootori signaali ka väiksemates rakkudes, mis tõenäoliselt olid noored sulgrakud (joonis 14. punased ringid). Preparaadilt tulemuse tõlgendamine sõltus suuresti tehtud pildi tasandist, võimalik on, et nooreks sulgrakuks või värvitilgaks peetud kujutise asemel oli tegemist sulgrakkude eellasrakuga.

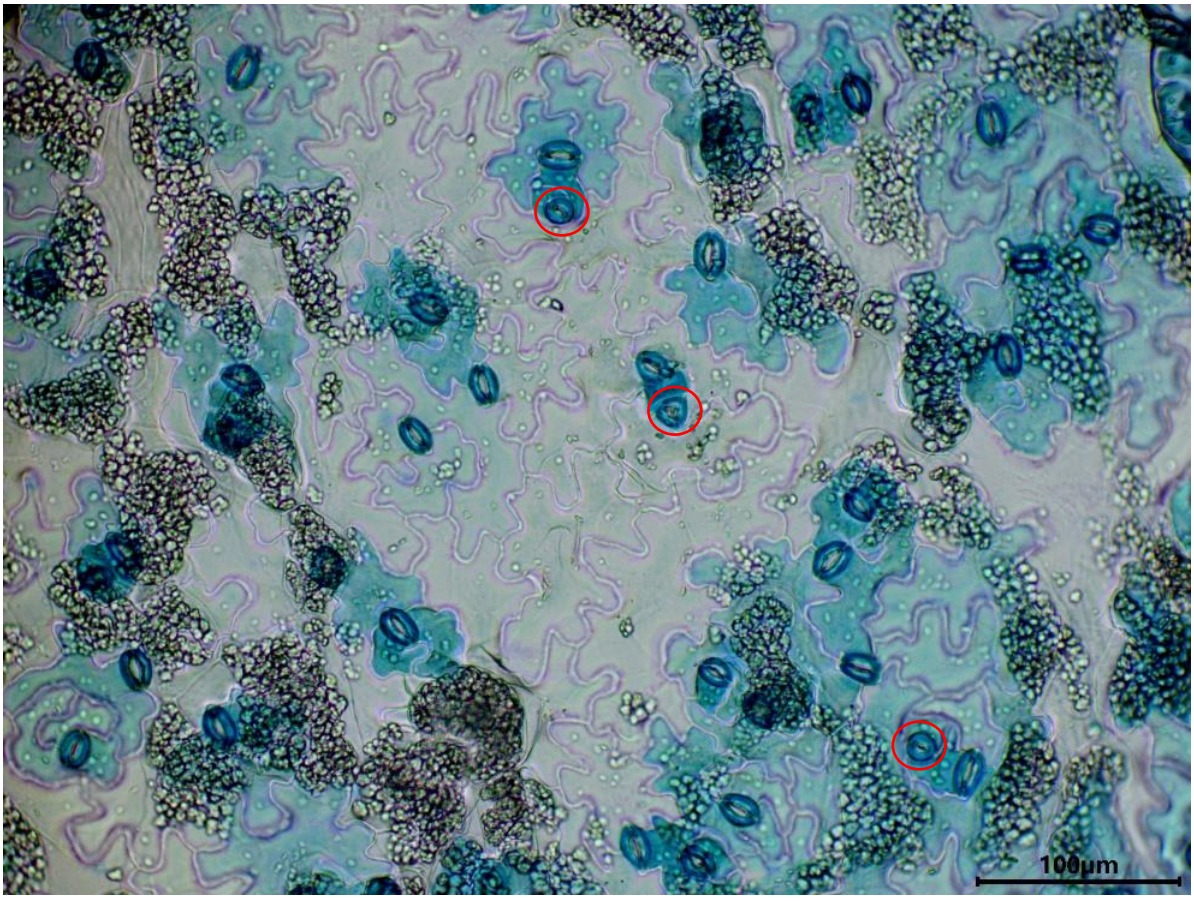
4.2.2.2. pRAF6::GUS

Sarnaselt pGC1::GUS taimedele värvusid ka pRAF6::GUS taimede sulgrakud ja neid ümbritsevad epidermirakud siniselt (joonis 15.). Erinevalt pGC1::GUS taimedest oli mitu preparaati, kus tundus, et signaal vaid sulgrakkudes endis oli (joonis 11.). Lisaks nagu teiste taimedega värvusid ka pRAF6::GUS epidermil mesofüllikude, olenevalt signaali tugevusest, kas helesiniseks, tumesiniseks või jäi loomulikult roheliseks.

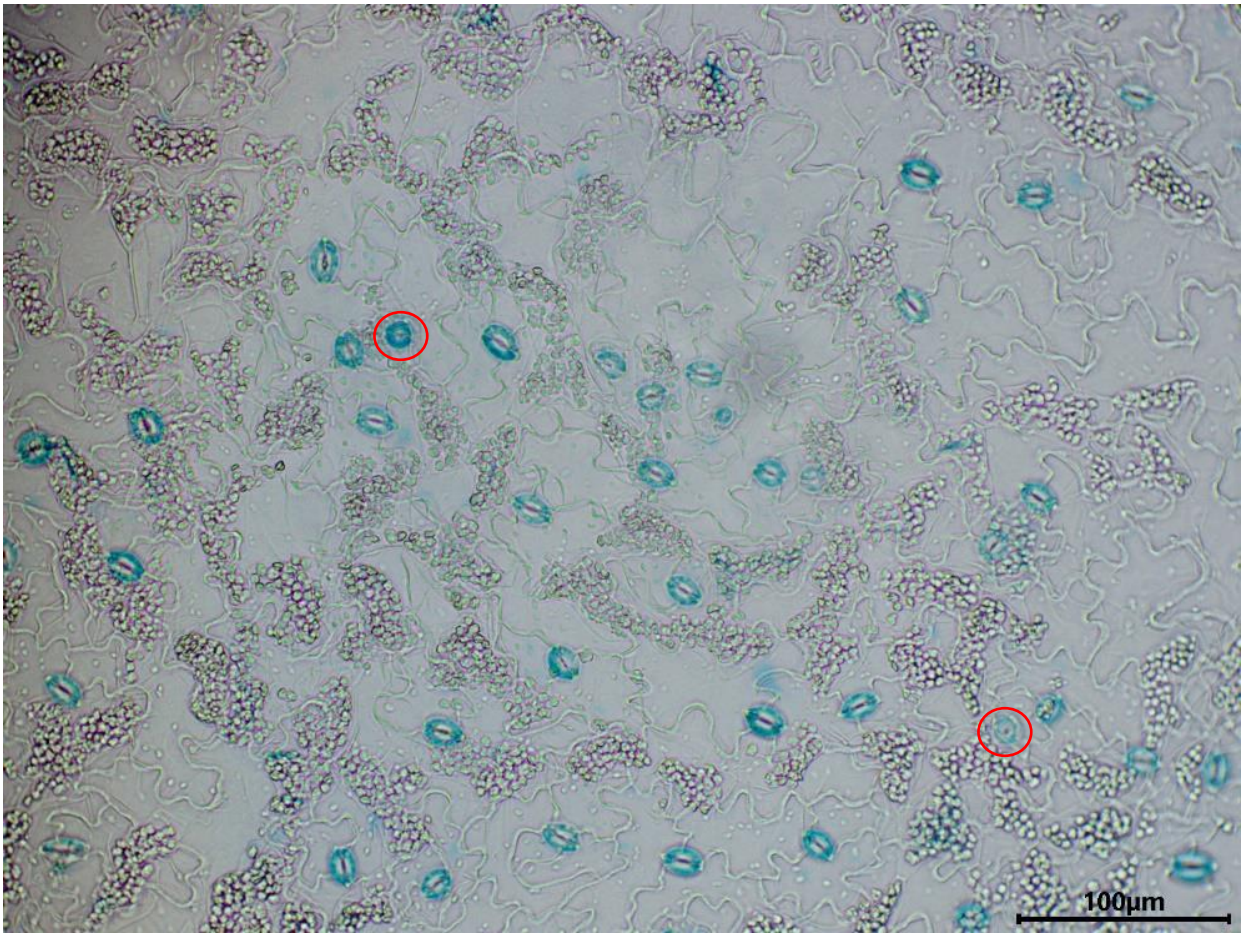


Joonis 15. pRAF6::GUS liin number 3, A joonisel 9. Skaalariba on 100 µm pikk.

Joonisel 16. on lisaks täiskasvanud sulgrakkudele näha ka nooremate sulgrakkude värvumist (punased ringid on ümber). Nooremad õhulõhed on kujult ümaramad ja natukene väiksemad kui täiskasvanud õhulõhed.



Joonis 16. pRAF6::GUS liin number 28, H joonisel 9. Skaalariba on 100 µm pikk.



Joonis 17. pRAF6::GUS liin number 17, I joonisel 9. Skaalariba on 100 µm pikk.

Noori sulgrakke on samuti näha ka joonisel 17. Ühe noore sulgraku promootori signaal tundub olevat nõrgem kui teise oma (joonis 17., punased ringid).

5. Arutelu

eFP andmebaasi põhjal olid mõlemad uuritavad geenid sulgrakkudes suhteliselt kõrgel tasemel ekspresseerunud ja GUS-värvimise tulemused kinnitasid neid andmeid. Tundub, et kui taimeliinis GUS signaal on tugevam, värvub ka rohkem epidermirakke, kuigi neis endis võib ekspressioonitase madalam olla kui sulgrakkudes.

GUS-reportervalgu signaali nägemine sulgrakkudes ning õhulõhe arenguliini epidermirakkudes viitab sellele, et geenide *GC1* ja *RAF6* promootorid on aktiivsed õhulõhedes. See omakorda viitab, et neil geenidel on funktsioon õhulõhedes. See on kooskõlas kirjanduse andmetega, mis näitavad, et RAF6, Raf-kinaaside superperekonna kinaas, osaleb ABA signaali edastamises õhulõhes ning aitab vahendada õhulõhede sulgumist reaktsioonina abiootilisele stressile nagu madal niiskus. (Saruhashi et al., 2015; Katsuta et al., 2020). Seni on teada vaid tema rollist täiskasvanud õhulõhede sulgumisel, kuid mitte tema seosest õhulõhede arenguga. *pGC1* oli juba enne uuringut teada tuntud kõrge ekspressioonitasemega geeni promootor sulgrakus, mille kontrolli alla teisi geene kõrgemaks ekspresseerumiseks panna sai (Yang et al., 2008).

Signaali täheldamine noortes sulgrakkudes (joonised 14., 16. ja 17.) viitab sellele, et geenid võivad osaleda ka õhulõhede arengus. Varaste õhulõhe arenguliini rakkude uurimiseks tuleks *pGC1* ja *pRAF6* promootor-reporter liine uurida taime varasemas arengustaadiumis, siis kui lehed alles moodustuvad. Noorte alles arenevate lehtede uurimise eelis on see, et näha on ka õhulõhede eellasrakke. Hetkel uuritavad taimed olid vanemad, kuna keskendusin transgeensete taimede seemnete korjamisele. Katses kasutatavaid lehti oli vaja uurida vaid GUS-signaali kinnitamiseks taimes ning taime selekteerimiseks. Järgmises põlvkonnas saaks uurida GUS värvumist noorte seemikute epidermis ning välja selgitada, kas promootorid on aktiivsed ka õhulõhede eellasrakkudes nagu meristemoidid või sulgraku emarakud.

Nii *GC1* kui *RAF6* promootorite signaali täheldati sulgrakkudes, kuid *RAF6* puhul tundus signaal olema õhulõhe spetsiifilisem, kuna rohkematel preparaatidel värvusid vaid sulgrakud siniselt (joonis 11.). Rakkude tume värvumine viitab ekspressioonitasemele sulgrakus ning seda ümbritsevas epidermis ja mesofüllis, kuid GUS-reportervalgu signaal ei ole kvantitatiivne, seega on raske öelda, kas sulgrakkudes oli uuritavate promootorite aktiivsus kõrgem kui muudes kudedes, näiteks mesofüllis. Samas oli andmebaasi andmetel mõlema geeni ekspressioonitase kõrge sulgrakkudes (joonis 7.), kus *GC1* mRNAd leidus kõigis tingimustes rohkem kui *RAF6*. Kõrgem ekspressioonitase nii sulgrakus, mesofüllis kui lehes (joonised 7., 8. ja 9.) võib viidata sellele, et

GC1 roll on õhulõhedes olulisem kui *RAF6* roll. ABA lisamisel taimele *RAF6* ekspressiooni tase nii sulgrakkudes kui mesofüllis oluliselt ei muutunud (joonised 7. ja 8.), kuigi on näidatud, et valk osaleb ABA signaaliülekandes nagu teised Raf-perekonna kinaasid (Saruhashi et al., 2015). Seega ei piisa geeniekspressioni andmete uurimisest alati, et otsustada geeni rolli üle. *GC1* ekspressioon tundub olevat ABA signaali poolt inhibeeritud (joonised 7., 8. ja 9.), kuid kirjanduses puudub seda kinnitavat tõestust.

Promootor-reporterliinid on aidanud kaardistada mitmete oluliste õhulõhede arengus osalevate geenide rolli (MacAlister et al., 2006; Pillitteri et al., 2006; Hara, 2007; Yang et al., 2008). *GC1* ja *RAF6* seost õhulõhede arenguga saab uurida katseks kasvatatud ja transformeeritud transgeensete taimeliinide järglastes.

Geenide *GC1* ja *RAF6* rollide täpsemaks uurimiseks tulevikus võiks luua deleteeritud või vaigistatud geeniga mutantliinid ning üleekspresseeritud geeniga mutantliini vastavalt mõlemale geenile. Eelkõige keskenduksin lisaeksperimendis geenide vaigistamise mõjudele ning sellele, kas geenide ekspressioonitaset vähendades mõjutaks see ka õhulõhede juhtivust või arengut. Geeni vaigistamisel spetsiifiliselt sulgrakkudes (kasutades sulgrakuspetsiifilist promootorit) on võimalik suruda alla *GC1* või *RAF6* funktsioon sulgrakkudes. Kasutades geeni vaigistamist, ilma neis geenides letaalseid mutatsioone taimele tekitamata, on eelis terve taimega manipuleerimise ees (Yang et al., 2008). Juhul kui geeni manipulatsioonid muudavad õhulõhede arvukust või avatust soodsas suunas, võib neist olla kasu ka põuakindlamate või paremini süsihappegaasi omastavate taimede loomiseks.

Kokkuvõte

Geenide *RAF6* ja *GC1* promootorite aktiivsuse mõõtmiseks konstrueerisin pRAF6(pAt4g24480)::GUS::pCAMBIA-1390 ja pGC1(pAt1g22690)::GUS::pCAMBIA-1390 plasmiidid. Seejärel kasutasin neid plasmiide *Agrobacterium tumefaciens* transformeerimiseks ning transformeeritud baktereid hariliku müürlooga transformeerimiseks. Taimede transformatsioon õnnestus, kuna taimed, kellel oli plasmiidis leiduv antibiootikumiresistentsusgeen (hügromütsiini resistentsusgeen) olemas, kasvasid selekteerival hügromütsiiniga söötmetel üles ja jäid ellu.

Arabidopsis eFP bBowser andmebaasi põhjal eeldasin, et mõlemad geenid on aktiivsed just sulgrakkudes, kus *GC1* näitas kordades kõrgemat ekspressioonitaset kui *RAF6*; mõlema geeni ekspressioonitase oli madalam nii mesofüllis kui lehes. ABA lisamisel proovidele *GC1* ekspressioonitase langes, kuid *RAF6* oma oluliselt ei muutunud.

Katsete tulemusena oli näha, et pRAF6::GUS ja pGC1::GUS transgeensete taimeliinide loomine õnnestus ning epidermirakud värvusid GUS värvides siniselt. Promootorite signaal oli kõige tugevam mõlema geeni puhul täiskasvanud sulgrakkudes, kuid oli näha ka signaali noortes sulgrakkudes. Signaali leidus ka õhulõhe arenguliinist pärit epidermirakkudes. Tulemuste kinnitamiseks peaksin uurima GUS signaali järgmise põlvkonna seemikutes, kus õhulõhe eellasrakke esineb.

Tulemuste põhjal võib järeldada, et eksperiment õnnestus ning nii *RAF6* kui *GC1* geenide promootorid on aktiivsed sulgrakkudes. Promootorite võimalik aktiivsus sulgrakkude eellasrakkudes vajab täiendavat uurimist. *RAF6* ja *GC1* geenide ekspressiooni vaigistades võib potentsiaalselt õhulõhede arvukust või tööd mõjutada, mis võiks taime vastupidavamaks keskkonnatingimuste muutustele teha.

Resümee

Gene expression patterns of *RAF6* (*At4g24480*) and *GC1* (*At1g22690*) in the epidermal cells of thale cress (*Arabidopsis thaliana*).

Greete Urvak

Summary

Small pores, surrounded by two guard cells, in a plant epidermis called stomata mediate the gas exchange between plants and their environment. Stomatal regulation is a plant's defense against environmental changes like drought, extreme temperatures and pathogens. This regulation plays a role in minimizing vapour loss and increasing photosynthesis in plants, allowing the plant to acclimate to changes in the environment. Another important factor in minimizing or maximizing the plant's gas exchange is the amount of stomata on the epidermis, less stomata would help the plant to be more resistant to low humidity. Guard cells are responsible for closing and opening the stomata, their work is regulated by a handful of plant signals, like ABA (abscisic acid), and the ion channels inside the guard cell membrane. The ABA-signaling pathway is active in response to both normal and extreme environments, activation of ABA signal can make stomata more responsive to environmental changes. By affecting the development, amount or behavior of stomata, a plant can be transformed to be more resistant to extreme environmental changes like drought, which is becoming a problem in the world.

This research was carried out to describe the gene expression of two understudied genes *RAF6* (*At4g24480*) and *GC1* (*At1g22690*) in the model organism thale cress (*Arabidopsis thaliana*). By studying these genes, the knowledge aquired can potentially be made use of in future to engineer plants with altered *RAF6* and *GC1* expression to study their effects on stomata. The *pGC1* is a strong guard cell promotor that can be used for the high expression of other genes in guard cells. To analyze the genes' expression in epidermal cells, GUS reporter constructs with *pRAF6* and *pGC1* were made and transformed to thale cress. GUS reporter gives a blue signal in the presence of a substrate in tissues where the used promoter is active.

Results showed that both *pRAF6* and *pGC1* were active in mature guard cells, with the possibility of *RAF6* having acitivity in young guard cells as well. More experiments with young seedlings with respective transgenes should be made to see if the gene expression is present in younger

undifferentiated stomatal lineage cells as well. Guard cell specific silencing of *RAF6* or *GC1* expression may help to clarify their role in stomatal development and function.

Tänusõnad

Kõigepealt sooviksin tänada enda juhendajat Dr. Hanna Hõrakut, kelle valvsa ning hoolsa käe all ma oma katsed tehtud sain. Abi oli alati kättesaadav kui küsisin ning põhjalikud seletused ei jätnud miskit arusaamatuks. Sooviksin tänada ka taimefüsioloogia doktoranti Ingmar Tulvat, kellelt samuti alati abi võisin küsida ning kelle laua taga ma suure osa enda tööst teha sain. Lisaks soovin tänada ka taimefüsioloogia labori laboranti Mikk Välbet, tänu kellele katseteks vajaliku apparatuuri üles leidsin ning vajalikud lahused arvutatud sain. Tänan ka Kaspar Koolmeistrit lahkelt lubatud õhulõhe joonise ning abi eest, mida Kern valgusmikroskoobis ning Adobe Illustratoris programmide kasutamisel sain. Soovin tänada ka teisi taimefüsioloogia labori inimesi, kelle abile alati loota sain ning, kes ühte või teist viisi, moraalseks toeks olid.

Töös kasutatud kirjandus

Abrash, E. B., & Bergmann, D. C. (2010). Regional specification of stomatal production by the putative ligand Challah. *Development*, *137*(3), 447–455. https://doi.org/10.1242/dev.040931

Belin, C., de Franco, P.-O., Bourbousse, C., Chaignepain Stéphane, Schmitter, J.-M., Vavasseur, A., Giraudat Jérôme, Barbier-Brygoo Hélène, & Thomine Sébastien. (2006). Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells . *Plant Physiology*, *141*(4), 1316–1327. https://doi.org/10.1104/pp.106.079327

Brandt, B., Brodsky, D. E., Xue, S., Negi, J., Iba, K., Kangasjärvi, J., Ghassemian, M., Stephan, A. B., Hu, H., & Schroeder, J. I. (2012). Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched Abi1 PP2C phosphatase action. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(26), 10593–10598. https://doi.org/10.1073/pnas.1116590109

Casson, S., & Gray, J. E. (2008). Influence of environmental factors on stomatal development. *New Phytologist*, *178*(1), 9–23. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02351.x

Chater, C. C., Caine, R. S., Tomek, M., Wallace, S., Kamisugi, Y., Cuming, A. C., Lang, D., MacAlister, C. A., Casson, S., Bergmann, D. C., Decker, E. L., Frank, W., Gray, J. E., Fleming, A., Reski, R., & Beerling, D. J. (2016). Origin and function of stomata in the Moss Physcomitrella Patens. *Nature Plants*, *2*(12). https://doi.org/10.1038/nplants.2016.179

Fernando, V. C. D., & Schroeder, D. F. (2016). Role of aba in Arabidopsis Salt, drought, and desiccation tolerance. *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*. https://doi.org/10.5772/61957

Geisler, M., Nadeau, J., & Sack, F. D. (2000). Oriented asymmetric divisions that generate the stomatal spacing pattern in Arabidopsis are disrupted by the *too many mouths* mutation. *The Plant Cell*, *12*(11), 2075–2086. https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2075

Gonzalez-Guzman, M., Pizzio, G. A., Antoni, R., Vera-Sirera, F., Merilo, E., Bassel, G. W., Fernández, M. A., Holdsworth, M. J., Perez-Amador, M. A., Kollist, H., & Rodriguez, P. L. (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*(6), 2483–2496. https://doi.org/10.1105/tpc.112.098574

Hara, K., Kajita, R., Torii, K. U., Bergmann, D. C., & Kakimoto, T. (2007). The secretory peptide gene *epf1* enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes & Development*, *21*(14), 1720–1725. https://doi.org/10.1101/gad.1550707

Hara, K., Yokoo, T., Kajita, R., Onishi, T., Yahata, S., Peterson, K. M., Torii, K. U., & Kakimoto, T. (2009). Epidermal cell density is autoregulated via a secretory peptide,

epidermal patterning factor 2 in Arabidopsis leaves. *Plant and Cell Physiology*, *50*(6), 1019–1031. https://doi.org/10.1093/pcp/pcp068

Herrmann, A., & Torii, K. U. (2020). Shouting out loud: Signaling modules in the regulation of stomatal development. *Plant Physiology*, *185*(3), 765–780. https://doi.org/10.1093/plphys/kiaa061

Hetherington, A. M., & Woodward, F. I. (2003). The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, *424*(6951), 901–908. https://doi.org/10.1038/nature01843

Hubbard, K. E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E. D., & Schroeder, J. I. (2010). Early abscisic acid signal transduction mechanisms: Newly discovered components and newly emerging questions. *Genes & Development*, *24*(16), 1695–1708. https://doi.org/10.1101/gad.1953910

Hughes, J., Hepworth, C., Dutton, C., Dunn, J. A., Hunt, L., Stephens, J., Waugh, R., Cameron, D. D., & Gray, J. E. (2017). Reducing stomatal density in barley improves drought tolerance without impacting on yield. *Plant Physiology*, *174*(2), 776–787. https://doi.org/10.1104/pp.16.01844

Hunt, L., & Gray, J. E. (2009). The signaling peptide EPF2 controls asymmetric cell divisions during stomatal development. *Current Biology*, *19*(10), 864–869. https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.069

Hunt, L., Bailey, K. J., & Gray, J. E. (2010). The signalling peptide EPFL9 is a positive regulator of stomatal development. *New Phytologist*, *186*(3), 609–614. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03200.x

Jewaria, P. K., Hara, T., Tanaka, H., Kondo, T., Betsuyaku, S., Sawa, S., Sakagami, Y., Aimoto, S., & Kakimoto, T. (2013). Differential effects of the peptides stomagen, EPF1 and EPF2 on activation of MAP kinase MPK6 and the SPCH protein level. *Plant and Cell Physiology*, *54*(8), 1253–1262. https://doi.org/10.1093/pcp/pct076

Katsuta, S., Masuda, G., Bak, H., Shinozawa, A., Kamiyama, Y., Umezawa, T., Takezawa, D., Yotsui, I., Taji, T., & Sakata, Y. (2020). Arabidopsis raf-like kinases act as positive regulators of subclass III SNRK2 in osmostress signaling. *The Plant Journal*, *103*(2), 634–644. https://doi.org/10.1111/tpj.14756

Kondo, T., Kajita, R., Miyazaki, A., Hokoyama, M., Nakamura-Miura, T., Mizuno, S., Masuda, Y., Irie, K., Tanaka, Y., Takada, S., Kakimoto, T., & Sakagami, Y. (2009). Stomatal density is controlled by a mesophyll-derived signaling molecule. *Plant and Cell Physiology*, *51*(1), 1–8. https://doi.org/10.1093/pcp/pcp180

Lampard, G. R., MacAlister, C. A., & Bergmann, D. C. (2008). *arabidopsis* stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bhlh speechless. *Science*, *322*(5904), 1113–1116. https://doi.org/10.1126/science.1162263

Lau, O. S., Davies, K. A., Chang, J., Adrian, J., Rowe, M. H., Ballenger, C. E., & Bergmann, D. C. (2014). Direct roles of speechless in the specification of stomatal self-renewing cells. *Science*, *345*(6204), 1605–1609. https://doi.org/10.1126/science.1256888

Lee, E. K., Lucas, J. R., Goodrich, J., & Sack, F. D. (2014). Arabidopsis guard cell integrity involves the epigenetic stabilization of the*flp*and*fama*transcription factor genes. *The Plant Journal*, *78*(4), 566–577. https://doi.org/10.1111/tpj.12516

MacAlister, C. A., Ohashi-Ito, K., & Bergmann, D. C. (2006). Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature*, *445*(7127), 537–540. https://doi.org/10.1038/nature05491

Merilo, E., Yarmolinsky, D., Jalakas, P., Parik, H., Tulva, I., Rasulov, B., Kilk, K., & Kollist, H. (2017). Stomatal VPD response: There is more to the story than Aba. *Plant Physiology*, *176*(1), 851–864. https://doi.org/10.1104/pp.17.00912

Ohashi-Ito, K., & Bergmann, D. C. (2006). *arabidopsis* FAMA controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development. *The Plant Cell*, *18*(10), 2493–2505. https://doi.org/10.1105/tpc.106.046136

Pillitteri, L. J., & Torii, K. U. (2012). Mechanisms of stomatal development. *Annual Review of Plant Biology*, *63*(1), 591–614. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105451

Pillitteri, L. J., Sloan, D. B., Bogenschutz, N. L., & Torii, K. U. (2006). Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. *Nature*, *445*(7127), 501–505. https://doi.org/10.1038/nature05467

Plesch, G., Ehrhardt, T., & Mueller-Roeber, B. (2002). Involvement of TAAAG elements suggests a role for DOF transcription factors in guard cell-specific gene expression. *The Plant Journal*, *28*(4), 455–464. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01166.x

Saruhashi, M., Kumar Ghosh, T., Arai, K., Ishizaki, Y., Hagiwara, K., Komatsu, K., Shiwa, Y., Izumikawa, K., Yoshikawa, H., Umezawa, T., Sakata, Y., & Takezawa, D. (2015). Plant RAF-like kinase integrates abscisic acid and hyperosmotic stress signaling upstream of SNF1-related protein kinase2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(46). https://doi.org/10.1073/pnas.1511238112

Waadt, R., Hitomi, K., Nishimura, N., Hitomi, C., Adams, S. R., Getzoff, E. D., & Schroeder, J. I. (2014). FRET-based reporters for the direct visualization of abscisic acid concentration changes and distribution in Arabidopsis. *ELife*, *3*. https://doi.org/10.7554/elife.01739

Wang, Y., Noguchi, K., Ono, N., Inoue, S.-ichiro, Terashima, I., & Kinoshita, T. (2013). Overexpression of plasma membrane H + -atpase in guard cells promotes light-induced stomatal opening and enhances plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(1), 533–538. https://doi.org/10.1073/pnas.1305438111

Yang, Y., Costa, A., Leonhardt, N., Siegel, R. S., & Schroeder, J. I. (2008). Isolation of a strong Arabidopsis guard cell promoter and its potential as a research tool. *Plant Methods*, *4*(1). https://doi.org/10.1186/1746-4811-4-6

Zeng, S. M., Lo, E. K., Hazelton, B. J., Morales, M. F., & Torii, K. U. (2020). Effective range of non-cell autonomous activator and inhibitor peptides specifying plant stomatal patterning. *Development*. https://doi.org/10.1242/dev.192237

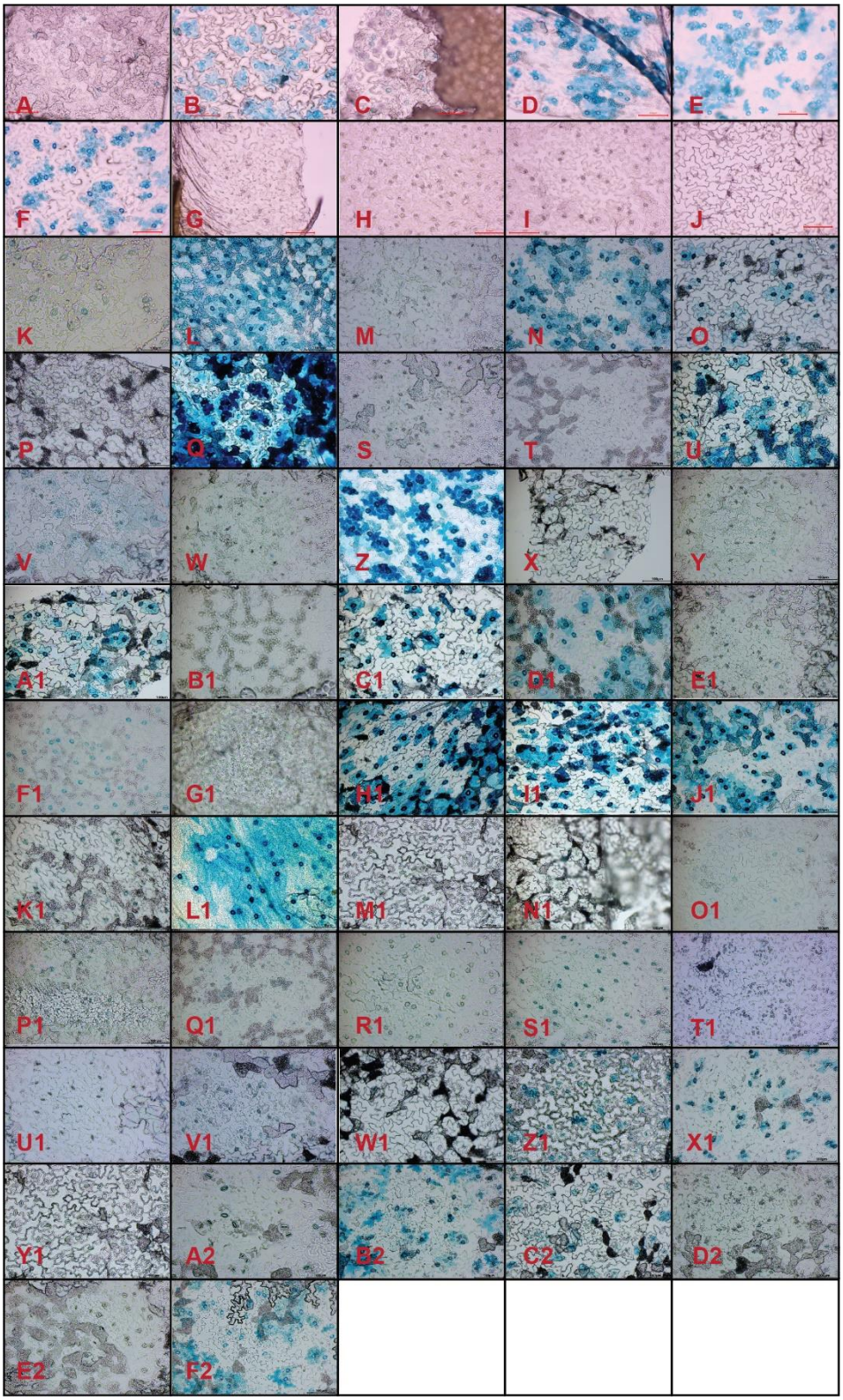
Töös kasutatud veebiallikad

https://microscopy.tamu.edu/wp-content/uploads/2018/08/GUS_Localization_in_plants.pdf ligipääs 15.05.2022

https://www.thermofisher.com/ee/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html ligipääs 17.05.2022

arabidopsis.org ligipääs 25.05.2022

LISA 1



Joonis 18. Kõik eksperimendiproovid, ka GUS-mittevärvunud preparaadipildid. Skaalariba on 100 µm pikk.

Lihtlitsents

Mina, Greete Urvak,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Geenide *RAF6* (*At4g24480*) ja *GC1* (*At1g22690*) ekspressioonimustrite uurimine hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) lehe epidermirakkudes“, mille juhendaja on Dr. Hanna Hõrak, 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 Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Greete Urvak

26.05.2022