

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

***IQD19* geeni ekspressioonimuster ja roll hariliku müürlooga
(*Arabidopsis thaliana*) õhulõhede arengus**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Marilin Poogen

Juhendaja Dr. Hanna Hõrak

TARTU 2024

INFOLEHT

***IQD19* geeni ekspressioonimuster ja roll hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) õhulõhede arengus**

Õhulõhed koosnevad kahest sulgrakust ning nende vahele jäävast avausest ning nende kaudu toimub taime ja keskkonna vaheline gaasivahetus ning veekao reguleerimine. Õhulõhede uurimine ning mõistmine, kuidas geenid nende arengut ja funktsioone mõjutavad, aitab tulevikus luua taimi, mis oleksid põuakindlamad ning seejuures toodaksid head saaki. Käesolevas töös konstrueerisin promotori-GUS reportersüsteemiga transgeensed taimeliinid ja uurisin nende abil geeni *IQD19* (*AT4G14750*) ekspressioonimustrit taimes. Leidsin, et geen on aktiivne õhulõhedes, juhtsoontes, juurtes ning tolmukaniidis. Uurisin õhulõhede paiknemise mustreid *IQD19* geeni funktsiooni häirega mutantides ja võrreldes metsiktüüpi taimedega suuri erinevusi ei leidnud. Küll aga oli plaadil kasvatatud *IQD19*-defektsetel seemikutel madalam lehe ülemise ja alumise külje õhulõhede tiheduste suhe.

Taim, õhulõhe, AT4G14750, IQD19, sulgrakk, õhulõhede areng

CERCS: B225, taimegeneetika

Expression pattern and role of the *IQD19* gene in stomatal development in *Arabidopsis thaliana*

Stomata consist of two guard cells and an opening between them, and regulate gas exchange between the plant and the environment and plant water loss. Studying stomata and understanding how genes affect their development and functions will help in the future to create plants that are more drought resistant and produce good yield. In this work, I constructed transgenic plant lines with a promoter-GUS reporter system and studied the expression pattern of the *IQD19* (*AT4G14750*) gene in the plant using them. I found that the *IQD19* gene is active in stomata, vasculature, roots and anther filaments. I examined the patterns of stomatal location in *IQD19* loss-of-function mutants and found no major differences compared to wild-type plants. However, *IQD19*-defective seedlings grown on a plate had a lower ratio of upper and lower leaf side stomatal densities.

Plant, stomata, AT4G14750, IQD19, guard cell, stomatal development

CERS: B225, Plant genetics

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Õhulõhede funktsioon ja areng	8
1.2. Õhulõhede paiknemine lehe ülemisel ja alumisel küljel.....	10
1.3. Asümmeetrilised jagunemised ja rakkude polaarsus õhulõhede arengus.....	11
1.3. IQD perekonna valgud	13
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	16
2.1. Töö eesmärgid.....	16
2.2. Materjalid ja meetodikad	17
2.2.1. Kasutatud taimed.....	17
2.2.2. Taimede kasvatamine	18
2.2.3. Molekulaarne kloonimine ja plasmiidide valmistamine	19
2.2.3.1. PCR praimerite disain, promotori PCR ning PCR produktide puhastamine ja restriktsioon	19
2.2.3.2. Vektori restriktsioon ja agarosgeelist puhastamine	22
2.2.3.3. IQD19 promotori ja lõigatud vektori ligatsioon.....	22
2.2.3.4. Bakterirakkude transformatsioon ja selektsioon.....	23
2.2.3.5. Koloonia PCR.....	23
2.2.3.6. Plasmidi eraldamine, kontsentratsiooni määramine ning sekveneerimine.....	24
2.2.4. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ja taimede transformeerimine.....	24
2.2.5. Transgeensete taimede selektsioon.....	25
2.2.6. Mutantsete <i>iqd19-2</i> ja <i>iqd19-3</i> taimede isoleerimine	26
2.2.7. GUS-värving, preparaatide valmistamine ja pildistamine.....	27
2.2.8. Aluselise fuksiiniga värvimine	28
2.2.9. Lehejäljendite tegemine	28
2.2.10. Õhulõhede tiheduse ja indeksi määramine.....	29
2.2.11. Statistiline analüüs.....	30
2.3. Tulemused.....	30
2.3.1. <i>IQD19</i> ekspresioonimuster taimedes.....	30

2.3.2. Õhulõhemustrid seemikute idulehtedes	35
2.3.3. Lehe alumise ja ülemise külje õhulõhede tihedus idu- ja pärislehtedes.....	37
2.3.4. Idu- ja pärislehtede ülemise ja alumise külje õhulõhede tiheduse suhe	39
2.4. Arutelu	42
2.4.1. <i>IQD19</i> ekspressioonimuster taimedes.....	42
2.4.2. Õhulõhede tihedus ja tiheduste suhe	43
KOKKUVÕTE.....	45
RESÜMEE	46
TÄNUAVALDUSED.....	47
KIRJANDUSE LOETELU.....	48
LISAD	53
Lisa 1. Plasmiid p35S-GUS-pCAMBIA1390.....	53
Lisa 2. Plasmiid pIQD19–GUS–pCAMBIA1390	54
Lisa 3. Täiskasvanud taimede kümnenda lehe õhulõhede kogutihedus	55
Lisa 4. Täiskasvanud taimede kümnenda lehe õhulõhede indeks.....	56
Lisa 5. 11-päevaste taimede idulehtede õhulõhede kogutihedus	57
Lisa 6. 11-päevaste taimede idulehe õhulõhede indeks	58
LIHTLITSENTS.....	59

KASUTATUD LÜHENDID

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

ARF – *auxin response factor*, auksiini vastuses osalev valk

BASL – BREAKING OF ASYMMETRY IN THE STOMATAL LINEAGE, osaleb meristemoidi emaraku polaarsuse määramisel

BRXL – BREVIS RADIX–LIKE, valgud, mis osalevad meristemoidi emaraku polaarsuse määramisel koostöös BASL valkudega

CaM – *calmodulin*, kalmoduliin, kaltsiumioonide siduja

CEF – *cefotaxime*, tsefotaksiim, antibiootikum

CIAP – *calf-intestinal alkaline phosphatase*, veise sisikonna aluseline fosfataas, eemaldab DNA–lt 5' fosfataatühmed

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

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

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

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

FAMA – heeliks-ling-heeliks transkriptsioonifaktor, mis suunab sulgraku emarakkude diferentseerumist sulgrakkudeks ja takistab sulgrakkude edasist jagunemist

GC – *guard cell*, sulgrakk

GMC – *guard mother cell*, sulgraku emarakk

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

HYG – *hygromycin B*, hügromütsiin B, antibiootikum

IQD – valgudomeen, mis koosneb 67 konserveerunud aminohapest ning seondub kalmoduliiniga

IQD19 – IQ-DOMAIN 19, IQ-domeeni (IQD-d) sisaldav valk 19

M – meristemoid

MES – *2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid*, 2-(N-morfoliin)etaansulfoonhape, pH puhver

MMC – *meristemoid mother cell*, meristemoidi emarakk

SPCH – SPEECHLESS, transkriptsioonifaktor, vajalik õhulõhede arenguliini rakkude asümmeetriliste rakujagunemiste alustamiseks

MS – Murashige–Skoogi sööde

MT – *microtubule*, mikrotoruke

MUTE – transkriptsioonifaktor, reguleerib meristemoidide diferentseerumist sulgraku emarakkudeks

OPL – OCTOPUS-LIKE, valgud osalevad meristemoidi emaraku polaarsuse määramisel ning võrreldes BASL, POLAR ja BRXL valkudega paiknevad meristemoidi emaraku vastaspoolsusel

PCR – *polymerase chain reaction*, polümeraasi ahelreaktsioon

POLAR – POLAR LOCALIZATION DURING ASYMMETRIC DIVISION AND REDISTRIBUTION, osaleb meristemoidi emaraku polaarsuse määramisel

SLGC – *stomatal lineage ground cell*, õhulõhede arenguliini põhirakk

TAIR – *The Arabidopsis Information Resource*, hariliku müürlooga andmebaas

UTR – *untranslated region* ehk mittetransleeritav ala

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

Taime valkude nimed on läbivalt tähistatud suurte tähtedega, geenide nimed läbivalt suurte tähtedega ning kursiivis ja mutantide nimed läbivate väikeste tähtedega kursiivis, vastavalt valdkonna traditsioonile.

SISSEJUHATUS

Õhulõhed reguleerivad taime ja keskkonna vahel toimuvat gaasivahetust. Õhulõhed koosnevad kahest sulgrakust ning nende vahele jäävast pilust, nende funktsioneerimist reguleerivad erinevad taimesisised ja -välised signaalid ning taimehormoonid. Õhulõhede avatus sõltub turgorrõhust, mida mõjutab ionide ja vee sisaldus sulgrakkudes. Lisaks sellele mõjutavad erinevad geenid õhulõhede arengut ning moodustumist, kas siis suurendades õhulõhede tihedust lehepinnal või vähendades seda. Õhulõhede arenguga seotud geenide ekspressioonitaseme muutmise kaudu saab mõjutada õhulõhede tihedust ja on võimalik luua taimi, mis oleksid vastupidavad erinevatele keskkonnatingimustele. Selleks on vaja aga täpselt mõista, kuidas õhulõhed töötavad ning arenevad. IQD valgud on taimespetsiifilised kalmoduliini siduvad valgud ning on olulised paljudes taime arenguga seotud protsessides. IQD valkude perekond on suur ning paljude funktsioon ei ole seni teada.

Käesolevas töös uurisin geeni *IQD19 (AT4G14750)* ekspressioonimustrit hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) taimedes, keskendudes eelkõige õhulõhedele ja õhulõhe arenguliini rakkudele. Selleks konstrueerisin pIQD19-GUS reportersüsteemi sisaldavad transgeensed mudeltaime hariliku müürlooga taimeliinid. *IQD19* geeni promootori aktiivsuse määramiseks kasutasin GUS-värvimist ning valgusmikroskoopiat. Uurisin ka *IQD19* geeni funktsiooni häirituse mõju õhulõhede mustritele hariliku müürlooga seemikutes ja täiskasvanud taimedes, et testida, kas *IQD19* mõjutab õhulõhede arengut.

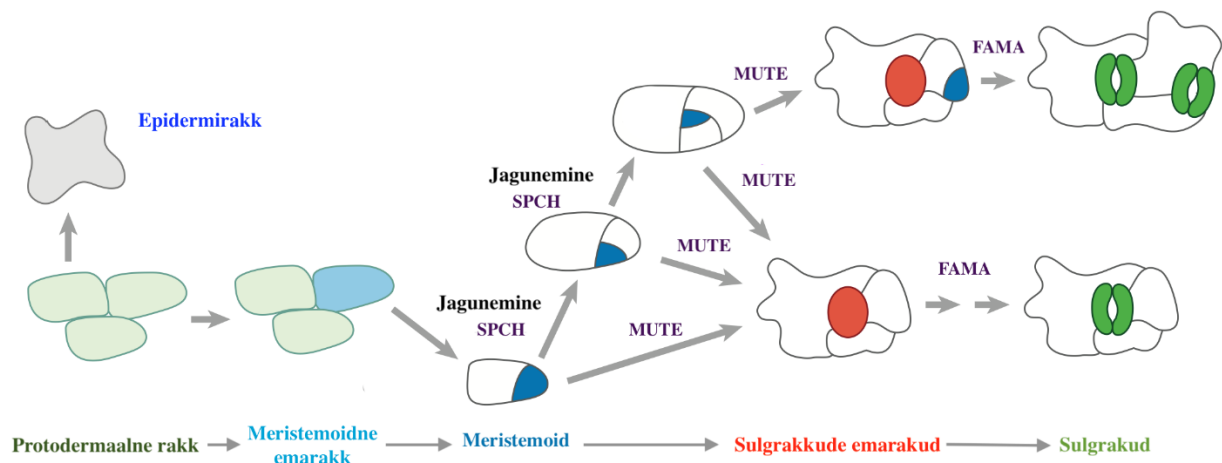
Uurimuse viisin läbi Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi taimefüsioloogia laboris.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Õhulõhede funktsioon ja areng

Õhulõhed on pilud taime lehtedel ja vartel, mis koosnevad sulgrakkudest ja nende vahele jäävast avausest (Naudeau ja Sack, 2002). Õhulõhede funktsiooniks on läbi viia gaasivahetust ümbritseva keskkonna ja taime vahel, reguleerida süsihappegaasi omastamise kaudu fotosünteesi toimimist ning kontrollida veekadu transpiratsiooni kaudu. Õhulõhed kontrollivad gaasivahetust enda sulgumise ja avamisega, mis on mõjutatud keskkonnatingimustest (Kwak jt., 2008). Valgus ja kõrge õhuniiskus põhjustavad õhulõhede avanemist, pimedus ja madalam õhuniiskus õhulõhede sulgumist. Õhulõhede avamine ja sulgumine toimub läbi signaaliradade, mis kontrollivad sulgrakkude turgorrõhu muutust, seda vahendavad ionide ja vee liikumine sulgrakkudesse ja nendest välja (Driesen jt., 2020).

Lehe arengu algul koosneb leht protodermaalsetest rakkudest, mis võivad diferentseeruda epidermirakkudeks, karvarakkudeks või õhulõhedeks (Larkin jt., 1996; Serna jt., 2002). Hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) õhulõhede areng saab alguse meristemoidi emarakust (*meristemoid mother cell*, MMC). Selle asümmeetrilise jagunemise tulemusena tekib kolmnurgakujuline meristemoidrakk, mis võib omakorda asümmeetriliselt edasi jaguneda, tekitades veel meristemoide. Moodustunud meristemoidid võivad pärast jagunemist edasi areneda sulgrakkude emarakkudeks (*guard mother cell*, GMC), mis on suutelised jagunema sümmeetriliselt kaheks, moodustades kaks sulgrakku (Joonis 1). Sellise arengulise jagunemise tulemusena kujuneb õhulõhede paiknemine lehe pinnal, kus õhulõhed on üksteisest eraldatud vähemalt ühe epidermirakuga (Geisler jt., 2000). Paljude taimede puhul on loomulik, et õhulõhede tihedus väheneb CO₂ kontsentratsiooni suurenemisega ning tihedus suureneb, kui valguse intensiivsus on kõrge (Ticha, 1982; Woodward, 1987).



Joonis 1. Õhulõhe arengu üldine skeem. Protodermaalne rakk võib kohe diferentseeruda epidermirakuks või siseneda õhulõhede arenguliini ja sealt edasi diferentseeruda meristemoidi emarakuks või epidermirakuks. Meristemoidi emarakk jaguneb asümmeetriliselt ja tekitab väiksemaid õhulõhede eellasrakke – meristemoide. Seejärel diferentseerub meristemoid sulgraku emarakuks, mis omakorda sümmeetriliselt jagunedes tekitab sulgrakud (Pillitteri ja Torii, 2012). FAMA – transkriptsioonifaktor, vajalik sulgrakkude diferentseerumiseks ja nende identiteedi säilitamiseks (Ohashi-Ito jt., 2006). SPCH – transkriptsioonifaktor, vajalik asümmeetrilisteks jagunemisteks (MacAlister jt., 2007). MUTE – transkriptsioonifaktor, mis lõpetab asümmeetrilised jagunemised ja on oluline sulgrakkude emarakkude diferentseerumiseks (Pillitteri jt., 2007). Originaaljoonis (Pillitteri ja Torii, 2012) on tõlgitud ja muudetud.

Õhulõhede diferentseerumise etappide läbiviimiseks on vajalikud transkriptsioonifaktorid. Geen *SPCH* (*SPEECHLESS*) kodeerib põhilist heeliks–ling–heeliks transkriptsioonifaktorit, mis on vajalik hariliku müürlooga õhulõhede arenguliini esimese asümmeetrilise jagunemise jaoks (MacAlister jt., 2007; Pillitteri jt., 2007). Transkriptsioonifaktor MUTE vastutab meristemoidi edasise arengusuuna eest, selle geeni puudumisel õhulõhede diferentseerumine katkeb meristemoidi staadiumis ja õhulõhesid ei teki (Pillitteri jt., 2007). Tähtis roll on ka transkriptsioonifaktoril FAMA, mille aktiivsus on vajalik sulgrakkude diferentseerumise soodustamiseks ning nende edasise jagunemise peatamiseks (Ohashi–Ito jt., 2006). Need kolm transkriptsioonifaktorit kontrollivad õhulõhede arengut kolmes etapis: initsiatsioon, meristemoidide diferentseerumine ning sulgrakkude morfogenees (Joonis 1) (Pillitteri jt., 2007).

Rakkude jagunemise ja arengu häired võivad põhjustada õhulõhede liialt lähestikku paiknemist, mis takistab nende normaalset toimimist. Kui sulgrakkude töö on häirunud, siis võib see mõjutada taime fotosünteesi, gaasivahetuse ja transpiratsiooni efektiivsust (Bergmann ja Lau, 2012; Hunt ja Gray, 2009; Hara jt., 2007). Õhulõhede mustri moodustamine on reguleeritud lokaalselt, mis

tähendab, et iga sulgrakk avaldab mõju teda ümbritsevatele keskkonnale, mõjutades signaalidega ümbritsevate arenevate rakkude jagunemise suunda. Külgnevate rakkude õhulõhedeks arenemise takistamise regulatsioon toimib sekreteeritavate peptiidide kaudu, milleks on EPF1 (EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 1) ja EPF2 (EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2) peptiidid (Bergmann ja Lau, 2012; Hunt ja Gray, 2009; Hara jt., 2007). Arenevad õhulõhed ja sulgrakud saavad kõrvalolevatele rakkudele signaali, mis surub alla ümbritsevate rakkude arenemist sulgrakkudeks, mille tõttu saab luua iga õhulõhe enda jaoks sobiva ruumi funktsioneerimiseks (Bergmann ja Lau, 2012; Hunt ja Gray, 2009; Hara jt., 2007).

1.2. Õhulõhede paiknemine lehe ülemisel ja alumisel küljel

Suurem osa taimi on hüpostomaatsed ehk õhulõhed asuvad ainult lehe alumisel pinnal (abaksiaalne epiderm) (Muir, 2015). Harilikul müürloogal on ka lehe ülemisel (adaksiaalsel) pinnal palju õhulõhesid. Teadmised õhulõhede arengu ja funktsiooni kohta põhinevad üldiselt abaksiaalsete õhulõhede uuringutel ning adaksiaalsetest õhulõhedest on vähe teada (Jalakas jt., 2024, eeltrükk). On leitud, et taimehormoon abtsiishape (ABA) reguleerib õhulõhede jaotust lehe ülemise ja alumise pinna vahel (Jalakas jt., 2024, eeltrükk). Ka mitmetel õhulõhede arengut mõjutavate geenide mutantidel oli muutunud õhulõhede jaotumine lehe ülemise ja alumise pinna vahel. ABA biosünteesi mutantidel esineb võrreldes kontrolltaimedega lehe ülemisel pinnal veidi suurem õhulõhede tihedus kui alumisel küljel. See võib tuleneda sellest, et ABA pärsib suhteliselt rohkem õhulõhede arengut adaksiaalses epidermis (Jalakas jt., 2024, eeltrükk). Kui erinevad õhulõhede arengu regulaatorid olid puudu, siis muutus lehe ülemise ja alumise pinna õhulõhede tiheduste suhe, mis viitab, et õhulõhede areng lehe eri pindadel on vähemalt osaliselt sõltumatult reguleeritud (Jalakas jt., 2024, eeltrükk).

Taimede õhulõhede areng, avanemine ja sulgumine on reguleeritud keskkonnatingimustega (Kwak jt., 2008). *STOMAGEN* kodeerib mesofüllis toodetud peptiidi, mis soodustab õhulõhede arengut ning kõrge valguse intensiivsuse puhul tõuseb *STOMAGEN*'i ekspressioon (Hronkova jt., 2015). Lisaks sellele on leitud, et antud geeni puudumine vähendab õhulõhede tihedust lehe alumisel, aga mitte ülemisel küljel. Õhulõhede arengut mõjutab ka valgus lehe erinevatel külgedel erinevalt, stimuleerides suhteliselt rohkem ülemise külje õhulõhede arengut (Hronkova jt., 2015). Ka teised uurimistööd on näidanud, et keskkonnatingimused võivad mõjutada lehe pealmise ja alumise külje

õhulõhede arengut erinevalt, näiteks puuvillas muutusid õhulõhetunnused madala õhuniiskuse tingimustes peamiselt lehe ülemisel küljel (Devi ja Reddy, 2018). Madala õhuniiskuse tingimustes oli õhulõhede tihedus suurem ja need olid väiksemad, samas kui epidermirakud olid laiemad (Devi ja Reddy, 2018). Katsed erinevate hariliku müürlooga *epf*-mutantidega on näidanud, et madala õhuniiskuse juures suureneb õhulõhede tihedus ning lehe ülemisel küljel esineb suhteliselt rohkem õhulõhesid kui lehe alumisel küljel (Tulva jt., 2023, eeltrükk). Sellised õhulõhede muutused on olulised selleks, et taim suudaks reguleerida paremini vee aurustumist lehe pinnalt ning ka fotosünteesi. Erinevad uuringud näitavad, et on oluline uurida õhulõhede paiknemise ja arengu mustreid lehe mõlemal küljel, et mõista paremini õhulõhede rolli taimefüsioloogias (Devi ja Reddy, 2018; Tulva jt., 2023, eeltrükk).

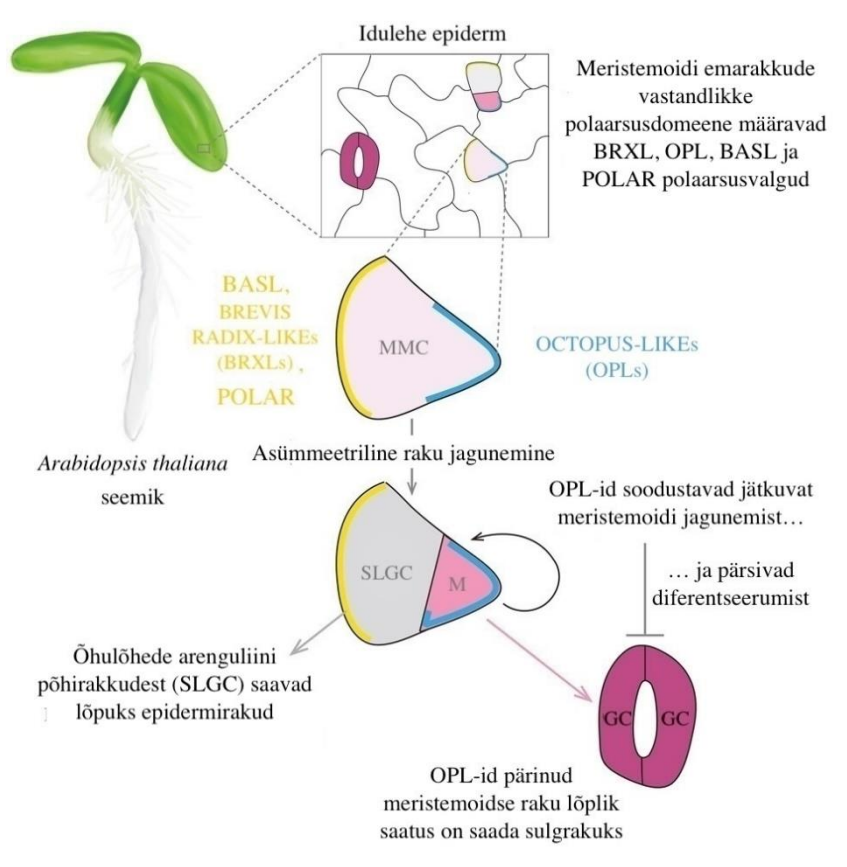
1.3. Asümmeetrilised jagunemised ja rakkude polaarsus õhulõhede arengus

Õhulõhede arengu puhul on asümmeetriliseks jagunemiseks oluline rakkude polaarsus (Robinson jt., 2011). Meristemoidi emarakud jagunevad asümmeetriliselt, mis on mõjutatud ümbritsevate rakkude poolt ja on reguleeritud sisemise orienteeritud polaarsusega (Bergmann ja Lau, 2012; Guo jt., 2021b). Polaarsus väljendub raku jagunemise suunas ja tütarakkude suuruses, polaarsuse jälgimiseks kasutatakse fluorestseeruvaid liitvalke (Wallner jt., 2023). Peamised valgud, mis määravad meristemoidide emaraku polaarsuse on BASL (BREAKING OF ASYMMETRY IN THE STOMATAL LINEAGE), POLAR (POLAR LOCALIZATION DURING ASYMMETRIC DIVISION AND REDISTRIBUTION), BRXL (BREVIS RADIX-LIKE) ja OPL (OCTOPUS-LIKE) valgud (Bergmann ja Lau, 2012; Dong jt., 2009; Pillitteri jt., 2011; Wallner jt., 2023). Vastavalt sellele, mis raku poolustel vastavad valgud paiknevad, tagatakse rakkude polaarsuse moodustumine ja asümmeetriline jagunemine (Joonis 2).

Valk BASL on keskne sõlmpunkt asümmeetrilisel rakkude jagunemisel; see on kinnitunud meristemoidi emaraku ühele küljele enne selle asümmeetrilist jagunemist (Wallner jt., 2023; Dong jt., 2009). Selline lokaliseerumine võimaldab tekitada rakus polaarsust, kuna polariseeritud valk suudab mõjutada tuuma paiknemist ja raku jagunemistasandit. BASL paiknemine rakus on polaarselt sirbina ühel raku poolusel ja selle pärib õhulõhede arenguliini põhirakk (SLGC – *stomatal lineage ground cell*, Joonis 2). Lisaks BASL valgule on vajalikud ka BRXL perekonna

valgud, mis paiknevad polaarselt rakkude perifeersetes domeenides ning koos BASL valkudega on vajalikud asümmeetrilisteks raku jagunemisteks (Rowe jt., 2019, eeltrükk).

POLAR valgu lokalisatsioon rakus sarnaneb BASL valgu omaga, see paikneb algfaasis asümmeetrilistelt jagunevates rakkudes ühtlaselt, kuid pärast esimest jagunemist esineb ainult nendes tütarakkudes, mis jagunevad edasi asümmeetriliselt (Pillitteri jt., 2011). Õhulõhede arenguliini põhirakus, kuhu on pärandunud POLAR valk, kujuneb POLAR asukoht jälle polaarneks. Seejuures paikneb POLAR raku sellel poolusel, mis on eemal eelmisel jagunemisel tekkinud rakust, kindlustades sellega, et järgmisel asümmeetrilisel jagunemisel tekkiv meristemoid paikneb võimalikult kaugel eelmisest (Pillitteri jt., 2011). BASL valk kindlustab POLAR valgu polaarset paiknemist ja aitab viimasel teisi polaarsete seotud valke polaarset lokaliseerida (Houbaert jt., 2018; Pillitteri jt., 2011).

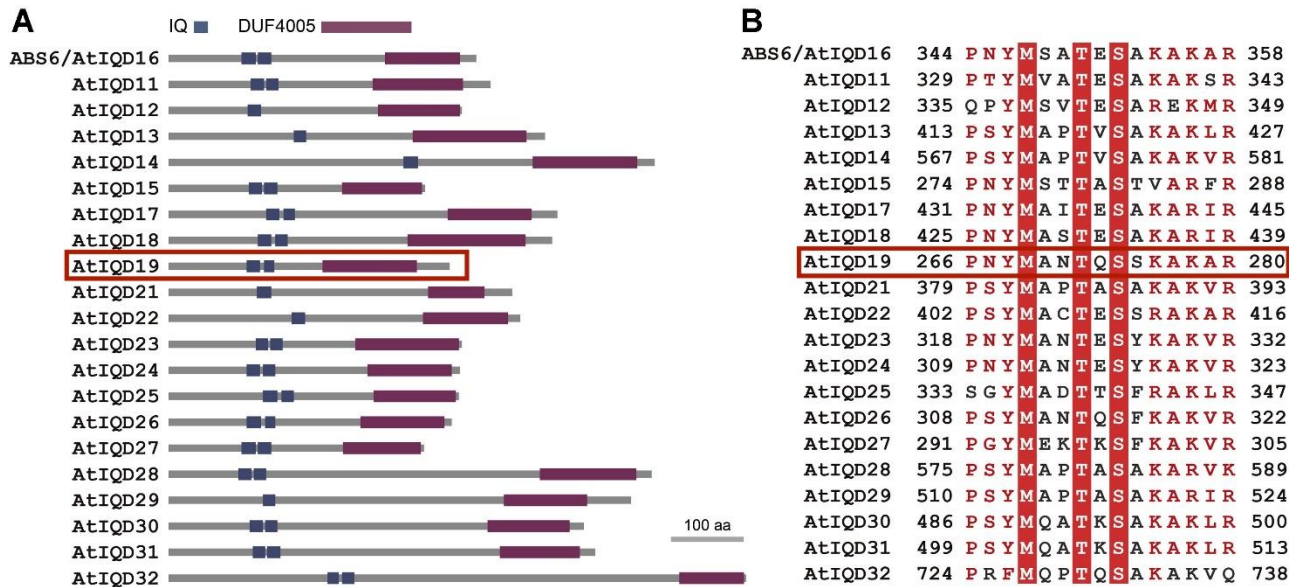


Joonis 2. Rakkude polaarne jagunemine. Meristemoidi emarakkude (MMC) vastandliku polaarsete määravad polaarsusvalgud – BRXL, OPL, BASL, POLAR. Meristemoidi emarakk jaguneb asümmeetriliselt ning tekib meristemoid (M) ja õhulõhede arenguliini põhirakk (SLGC). OPL-id soodustavad meristemoidide edasist jagunemist ning pärsivad diferentseerumist. Meristemoid diferentseerub lõpuks sulgrakkudeks, mis moodustavad õhulõhe. Wallner jt., (2023), originaaljoonis tõlgitud ja täiendatud.

OPL valgud paiknevad BASL, POLAR ja BRXL-i valkudega võrreldes meristemoidi emaraku vastaspoolusel (Wallner jt., 2023) (Joonis 2). On täheldatud, et meristemoidi emarakkudes polariseeruvad OPL-valgud enne asümmeetrilist jagunemist ning seejärel päranduvad tekkivasse väiksemasse tütarakku – meristemoidi. Selline polariseerumine on oluline asümmeetriliseks jagunemiseks ja tekitab kaks eraldi polaarsuse süsteemi, millest üks tagab õhulõhede arenguliini põhiraku ja teine meristemoidi moodustumise ning diferentseerumise (Wallner jt., 2023).

1.3. IQD perekonna valgud

IQD perekonna geene on nüüdseks tuvastatud mitmetel liikidel, kuid esmalt identifitseeriti need harilikus müürloogas ja riisis (Abel jt., 2005). IQD valkude perekond on suur ning jaguneb klassideks. IQ motiive on kahte tüüpi: Ca^{2+} -sõltumatud ja Ca^{2+} -sõltuvad IQ motiivid (Abel jt., 2013). Erinevate uuringute tulemusena on leitud, et näiteks IQD1 valk seondub mikrotorukestega, kuid on võimeline seonduma ka üheaahelaliste nukleiinhapetega, seega võivad IQD valgud potentsiaalselt mõjutada RNA paiknemist rakus ja geeniekspressiooni (Joonis 3) (Abel jt., 2013). IQD valgud on taimespetsiifilised kalmoduliini siduvad valgud, mis sisaldavad IQ67-domeeni (IQD). IQD on 67 konserveerunud aminohapest koosnev valgudomeen, mida iseloomustab kolme kalmoduliini siduva motiivi ainulaadne paigutus (Abel jt., 2005). Vastav domeen toimib Ca^{2+} sensorina, mis on oluline taime arenguprotsesside reguleerimisel ja reageerimisel mitmetele abiootilistele ja biootilistele tingimustele (Guo jt., 2021a). Harilikus müürloogas paiknevad erinevad IQD valgud erinevates taimeraku osades – tuumas, tsütoplasmas, plasmamembraanis või mikrotorukestel (Bürstenbinder jt., 2017b). Hiljutised uuringud on näidanud IQD perekonna valkude seoseid mikrotorukeste ja rakujagunemise reguleerimisega (Kumari jt., 2021; Li jt., 2021). Lisaks on leitud, et IQD perekonna valgud võivad reguleerida transkriptsiooni ja taimehormoone, mis on olulised taime kasvu reguleerimisel (Welsh, 2021, doktoritöö).

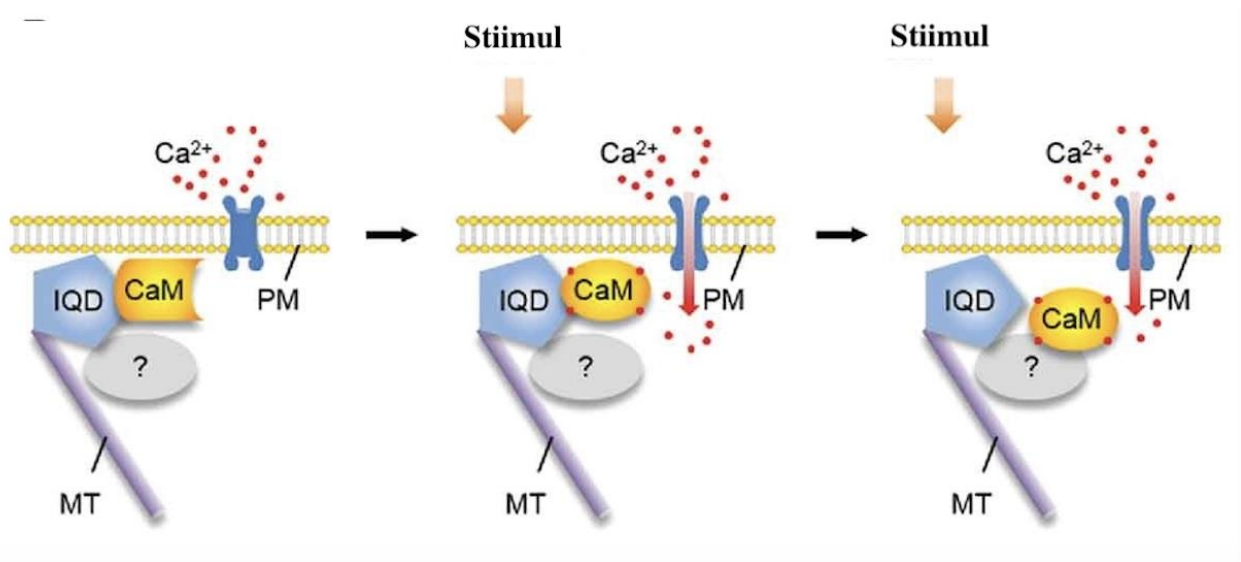


Joonis 3. DUF4005 domeen on uudne mikrotorukestega seonduv domeen hariliku müürlooga IQD valgude alamperekonnas. (A) DUF4005 domeeni sisaldavad hariliku müürlooga IQD valgud ja nende vastava domeeni konserveerunud osa joendus (B). Punaste riskülikutega on välja toodud töös uuritav IQD19 valk. Li jt., (2021), originaaljoonist on muudetud.

Transgeensetes hariliku müürlooga taimedes on leitud, et erinevad IQD valgud võivad mõjutada ka rakukuju ja taimede kasvu. Näiteks IQD25, IQD16 ja IQD11 üleekspressioonides taimedes on muutunud epidermirakkude kuju (Bürstenbinder jt., 2017b). Taimede mikrotorukestel on oluline roll rakkude jagunemise ja raku kuju reguleerimisel ning nad moodustavad dünaamilise rakusisese võrgustiku (Mitra jt., 2019). Ka IQD5 seondub mikrotorukestega, stabiliseerib neid ja reguleerib mikrotorukeste dünaamikat, mis mõjutab nende paiknemist rakkudes ning selle kaudu epidermirakkude kuju (Liang jt., 2018). Lisaks on näidatud, et IQD5 võib mõjutada epidermirakkude morfogeneesi tselluloosi rakukestadesse ladestumise reguleerimise kaudu (Mitra jt., 2019). IQD18 on siduvaks valgus kalmoduliini ja mikrotorukeste vahel (Wendrich jt., 2018, eeltrükk). *IQD18* geeni ekspressioon toimub kõige aktiivsemalt noortes, jagunevates kudedes ning IQD18 üleekspressioon põhjustab idulehtedes spiraalset fenotüüpi. Sellest saab järeldada, et IQD18 kontrollib näiteks tsütoskeleti paigutust ja selle kaudu mõjutab organite kuju (Wendrich jt., 2018, eeltrükk). Oluline roll on ka IQD21 valgul, mis asub plasmamembraanis ja mikrotorukestel ja mõjutab epidermirakkude kuju (Feng jt., 2022). IQD21 tugev üleekspressioon vähendab epidermirakkude soppide arvu ja soppide pikkust (Feng jt., 2022).

Meristemirakkude jagunemine ja aktiivsus on taime arenemise ajal väga rangelt kontrollitud. Taimehormoon auksiin on oluline rakkude jagunemisel ja taime arengus (Lavy ja Estelle, 2016). IQD valgud vahendavad auksiini signaale ning seeläbi mõjutavad raku kuju moodustamist ning

kasvu (Joonis 4) (Bürstenbinder jt., 2017a). Aukiin indutseerib tsütosoolse kaltsiumioonide kontsentratsiooni tõusu ja selle kaudu võib auksiin reguleerida IQD funktsiooni posttranslatsiooniliselt (Bürstenbinder jt., 2017a). Lisaks reguleerib auksiin hariliku müürlooga *IQD15* geeni ja tema lähimate sugulaste ekspressioonitaset (Wendrich jt., 2018, eeltrükk). IQD19 valgust on väga vähe teada, kuid on leitud, et see asub raku tsütoplasmas, tsütoskeletis ning raku membraanis (Bürstenbinder jt., 2017b). Mõned IQD valgud, näiteks IQD19, võivad potentsiaalselt olla olulised ka rakkude jagunemise reguleerimisel õhulõhede arenguliinis.



Joonis 4. Mudel IQD valkude rolli kohta rakkudes. Välja on pakutud mudel, kus IQD valgud toimivad signaaliülekanne platvormina, seondudes mikrotorukeste (MT) ja kalmoduliiniga (CaM) plasmamembraani (PM) Ca^{2+} -kanalite lähedal. Stiimuli mõjul aktiveeruvad Ca^{2+} -kanalid, Ca^{2+} -ioonid liiguvad raku ja seonduvad kalmoduliiniga, võimaldades edasist Ca^{2+} -signaaliülekannet. Bürstenbinder jt., (2017a), originaaljoonist on muudetud ja tõlgitud.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

- Selgitada, millistes kudedes ja rakutüüpides on *IQD19* promootor aktiivne, keskendudes eelkõige lehe epidermirakkudele.
- Selgitada, kas ja kuidas *IQD19* geeni funktsiooni häire mõjutab õhulõhede paiknemise mustreid hariliku müürlooga lehtedes.

2.2. Materjalid ja meetodikad

2.2.1. Kasutatud taimed

Tabel 1. Katsetes kasutatud hariliku müürlooga taimeliinid.

Genotüüp	T-DNA asukoht	Kirjeldus	Allikas
Col-0		metsiktüüp	Laboris varem olemas
IQD19 promootori aktiivsuse hindamine kudedes ja rakutüüpides			
pIQD19-GUS Col-0 3.1		<i>IQD19</i> promootor-reporter Col-0 taustas	Loodud selles töös
pIQD19-GUS Col-0 4.3		<i>IQD19</i> promootor-reporter Col-0 taustas	Loodud selles töös
pIQD19-GUS Col-0 5.3		<i>IQD19</i> promootor-reporter Col-0 taustas	Loodud selles töös
<i>IQD19</i> geeni funktsiooni häirega taimeliinid			
<i>iqd19-1</i> (GK-626C11)	Esimese eksoni või 5' UTR alas sõltuvalt transkriptist	eeldatavasti häirib <i>IQD19</i> geeni funktsiooni	Laboris varem olemas
<i>iqd19-2</i> (GK-324C07)	Kolmanda eksoni alas	eeldatavasti häirib <i>IQD19</i> geeni funktsiooni	Isoleeritud selles töös
<i>iqd19-3</i> (SALK_151458C)	5' UTR alas	võib häirida <i>IQD19</i> geeni funktsiooni	Isoleeritud selles töös

2.2.2. Taimede kasvatamine

Katseks kasutatavaid seemneid hoidsin 3 päeva veega täidetud 1,5 ml tuubis temperatuuril +4 °C pimedas, selleks et soodustada idanemist (vernalisatsiooniperiood). Külvasin seemned mullale 100 µl pipetiga, igasse potti 3-4 seemet. Kasvatamiseks kasutasin keskmisi taimepotte (8 x 8 x 6 cm) ning kasvusubstraati, mis koosnes 4:2:3 mahusuhtega turbast (Pruun 025 W, Kekkilä), vermikuliidist (No 2, Vernipu) ning kraaniveest. Kasvatasin alguses taimi katte all, selleks et niiskust hoida. Nädal pärast külvamist harvendasin taimi nii, et igasse potti jäi kasvama üks taim. Vegetatiivse kasvufaasi ajal hoidsin taimi lühipäevatoas, kus valgus-pimedus tsükkel oli 10 h valgust, 14 h pimedust. Õitsemisfaasis olevad taimed kasvasid edasi pikapäevatoas, kus oli 16 h valgust ning 8 h pimedust. Mõlemas toas oli õhuniiskus 60%, valgustugevus 250 µmol m⁻²s⁻¹ ning temperatuur päeval 23 °C ja öösel 19 °C. Õhulõhede anatoomilise analüüsi katseks kasvatasin taimi kasvukapis (Microclima Arabidopsis MCA1600-3LP6-E, Snijders Scientific), kus valgus-pimedus tsükkel oli 10 h valgust ja 14 h pimedust, õhuniiskus oli päeval 60% ning öösel 80%, valgustugevus oli 250 µmol m⁻²s⁻¹ ning temperatuur päeval oli 23 kraadi ja öösel 19 kraadi.

GUS-värvinguks kasvatasin osa taimi ka MS HYG + CEF (*hygromycin B* – hügromütsiin, *cefotaxime* – tsefotaksiim) fütoagari söötmeplaadil (Murashige-Skoog (MS) sööde fütoagariga, koostis: MS (lõppkonts. 0,5x), MES (lõppkonts. 2,5 mM), suhkur (lõppkonts. 1%), pH reguleerimiseks KOH, fütoagar (lõppkont. 0,6%), hügromütsiin (Cayman Chemicals, lõppkonts. 25 µg/ml) ning tsefotaksiim (Phytotechnologies Lab, lõppkonts. 50 µg/ml), pH 5,7. Aluselise fuksiiniga värvimiseks kasvatasin taimi ilma antibiootikumita MS söötmeplaadil. Plaadile pandavad seemned olid enne steriliseeritud. Steriliseerimiseks kallasin väikse osa seemneid tühja tuubi põhja ning lisisin neile 750 µl 70% etanooli ja 0,1% Triton X-100 lahust. Lahuse ja seemnetega tuubid olid 15 minutit rotaatoris (*end-over-end rotator*), pärast mida tsentrifuugisin (5000 g) paar sekundit, et seemned põhja vajuksid. Seejärel eemaldasid seemnetelt lahuse ning pesin 750 µl mQ veega, kordasin protsessi kaks korda. Lõpuks peale vee lisamist panin kolmeks päevaks seemned 4 °C külmkappi vernalisatsiooniperioodi soodustamiseks. Pärast vernalisatsiooni külvasin seemned 20 µl pipetiga steriilsetes tingimustes MS söötmeplaadile. Seemikud söötmeplaatidel, mis olid aluselise fuksiini värvimise jaoks, kasvasid 11 päeva lühipäevatoa tingimustes ning seemneplaadid, mis olid GUS-värvingu jaoks, kasvasid 14 päeva lühipäevatoa tingimustes.

2.2.3. Molekulaarne kloneerimine ja plasmiidide valmistamine

Col-0 genoomselt DNA-lt amplifitseerisin *IQD19* promootori (pIQD19), kasutasin praimereid PstI-pIQD19-for ja SalI-pIQD19-rev (Tabel 2) ning viisin läbi PCR vastavalt protokollile. Saadud produkti lõikasin Thermo Scientific restriksiooniensüümidega PstI ja SalI tund aega 37 kraadi temperatuuril. Vektorit p35S-GUS-pCAMBIA1390 (Lisa 1, varem laboris olemas) lõikasin samuti PstI ja SalI ensüümidega ning ligeerisin lõigatud IQD19 promootoriga. Sain tulemuseks pIQD19-GUS-pCAMBIA1390 (Lisa 2). Täpsemalt on etapid kirjeldatud järgnevates alapeatükkides.

2.2.3.1. PCR praimerite disain, promootori PCR ning PCR produktide puhastamine ja restriksioon

Praimerid tellisin vastavalt promootori järjestusele (järjestus *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR) andmebaasist arabidopsis.org) ettevõttest Integrated DNA Technologies ning praimerid disainisin promootori järjestuse põhjal ApE programmis (Davis & Jorgensen, 2022). Promootori pikkuseks oli 2060 nukleotiidi enne geeni algust, valitud eelduse põhjal, et nii pikas alas peaks asuma *IQD19* promootorelemendid. Praimerid on välja toodud tabelis 2.

Tabel 2. Katsetes kasutatud praimerid

Märklaud	Praimeri nimi	Praimeri järjestus	Eesmärk
pIQD19	PstI-pIQD19-for	gtctgcagagttttgtatacta atccctgatactaataaac	Päripidi praimer pIQD19 promootori kloneerimiseks
pIQD19	SalI-pIQD19-rev	gtcgtcgactattatcttctgta aactcaaaccacc	Äraspidi praimer pIQD19 promootori kloneerimiseks
pIQD19	pCAMBIA1390–seq– for–1	CGTGCTCCACCAT GTTGGGC	Päripidi sekvenerimispraimer GUS järjestuse ees paikneva järjestuse

			(pIQD19) kontrollimiseks plasmiidis
pIQD19	GUS-seq-rev-2	tcacgggttggggtttctac	Äraspidi sekvenerimispraimer GUS järjestuse ees paikneva järjestuse (pIQD19) kontrollimiseks plasmiidis
pIQD19	pIQD19-seq-1	tgtgatgtatagatatctcttga atagtc	Sekvenerimispraimer pIQD19 järjestuse keskmise osa kontrollimiseks plasmiidis
<i>iqd19-2</i>	IQD19-for-2	TCCTATAAACCTG TCCTCTTCG	Päripidi praimer <i>iqd19-2</i> genotüübi kontrollimiseks (metsiktüüpi alleel)
<i>iqd19-2</i>	IQD19-rev-2	AGGCGAGGAAAG CATTAAGAG	Äraspidi praimer <i>iqd19-2</i> genotüübi kontrollimiseks (metsiktüüpi ja mutantne alleel)
<i>iqd19-2</i>	GABI-LB	ATATTGACCATCAT ACTCATTGC	Päripidi praimer <i>iqd19-2</i> genotüübi kontrollimiseks (mutantne alleel)
<i>iqd19-3</i>	SALK-LB	ATTTTGCCGATTT CGGAAC	Päripidi praimer <i>iqd19-3</i> genotüübi

			kontrollimiseks (mutantne alleel)
<i>iqd19-3</i>	IQD19-for-3	TTAATGCTTTCCT CGCCTACC	Päripidi praimer <i>iqd19-3</i> genotüübi kontrollimiseks (metsiktüüpi alleel)
<i>iqd19-3</i>	IQD19-rev-3	TATCCAACGAATA AGGCAAGG	Äraspidi praimer <i>iqd19-3</i> genotüübi kontrollimiseks (metsiktüüpi ja mutantne alleel)

IQD19 geeni promootori amplifitseerimine Thermo Scientific Phusion polümeraasiga. Reaktsioonisegus kasutasin ühe PCR reaktsiooni jaoks Phusion polümeraasi 0,5 µl (lõppkonts. 0,02 U/µl), 5x Phusion HF puhvrit 10 µl (lõppkonts. 1x), 2 mM dNTP-sid 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. 0,5 µM), genoomset Col-0 DNA-d 2 µl. Reaktsioonisegu maht viidi mQ veega 50 µl-ni. PCR programmi esimene etapp oli 30 sekundit 98 °C juures. Järgmisena tuli PCR tsükkel, mis kestis 10 sekundit 98 °C juures, selleks et DNA ahelad lahutada ning edasi 20 sekundit 60 °C juures, et praimerid saaksid seonduda. Lõpuks 1 minut ja 15 sekundit 72 °C juures, et sünteesida DNA. Tsükkel kordus 35 korda, pärast mida oli ühekordne DNA sünteesi etapp 7 minutit 72 °C juures ning programm lõppes toatemperatuuril.

Segasin 5 µl PCR produkti ning 2 µl 6x laadimisvärvi (lõppkonts. 1,7x) ja lahutasin PCR-i produkti etiidiumbromiidiga värvitud (lõppkonts. ~0,2 µg/ml) agarosgeelil (lõppkonts. 1%). Agarosgeeli jooksutasin elektroforeesivannis pingega 8,7 V/cm ning produkti visualiseerisin UV-kiirguses. PCR produkti puhastasin reaktsioonisegust Favorgen™ Gel/PCR puhastamise komplektiga vastavalt tootja protokollile.

Puhastatud PCR produkti lõikasin Thermo Scientific reaktsiooniensüümidega PstI (lõppkonts. 0,2 U/ μ l) ja SalI (lõppkonts. 0,2 U/ μ l), kasutasin puhver O–d (Thermo Scientific) (lõppkonts. 1x). Reaktsioonisegu inkubeerisin tund aega 37 °C juures ning peale seda puhastasin Favorgen™ Gel/PCR puhastamise komplektiga vastavalt tootja protokollile.

2.2.3.2. Vektori restriksioon ja agarosgeelist puhastamine

Lisaks geeni promootori PCR-ile tegin vajaliku vektori (p35S-GUS-pCAMBIA1390) (Lisa 1) lõikamise, kuhu hiljem ligeerisin geeni promootori. Vektori lõikamiseks pipeteerisin kokku 5 μ l 10x puhver O-d (Thermo Scientific, lõppkonts. 1x), 4 μ l vektorit (vektori konts. ~260 ng/ μ l, lõppkonts. ~20 ng/ μ l), 1 μ l PstI restriksiooniensüümi (Thermo Scientific) (lõppkonts. 0,2 U/ μ l), 1 μ l SalI restriksiooniensüümi (Thermo Scientific) (lõppkonts. 0,2 U/ μ l) ja reaktsioonisegu mahu viisin mQ veega 50 μ l-ni. Restriksioonisegule lisasin tunni möödudes 1 μ l Invitrogen CIAP (*calf intestinal alkaline phosphatase*) ensüümi (lõppkonts. 0,4 U/ μ l), mis lõikas ära vektoril olevad 5' fosfaatrühmad, sejärel inkubeerisin üleöö temperatuuril 37 °C.

Restriksiooni edukust kontrollisin agarosgeelil (lõppkonts. 1%), mis sisaldas fluorestseeruvat DNA värvi GelRedi (Biotium, lõppkonts. 1x) ning reaktsioonisegule lisasin laadimisvärvi (lõppkonts. 1x). Lõigatud vektori eemaldamiseks agarosgeelilt lõikasin vektori DNA-d sisaldavad tükid geelist välja ning puhastasin DNA, kasutades Favorgen FavorPrep™ Gel/PCR puhastamise komplekti vastavalt tootja protokollile.

2.2.3.3. IQD19 promootori ja lõigatud vektori ligatsioon

Ligeerimiseks segasin kokku 14 μ l lõigatud ja puhastatud *IQD19* promootori PCR produkti, 3 μ l lõigatud ja puhastatud vektorit, 2 μ l Thermo Scientific T4 puhvrit (lõppkonts. 1x) ja 1 μ l Thermo Scientific T4 DNA ligaasi (lõppkonts. 0,25 U/ μ l). Reaktsiooni inkubeerisin tund aega toatemperatuuril.

2.2.3.4. Bakterirakkude transformatsioon ja selektsioon

Transformatsioonisegu valmistamiseks segasin kokku 10 µl ligatsioonisegu, 70 µl mQ vett, 20 µl 5x KCM (5x KCM = 0,5 M KCl, 0,15 M CaCl₂, 0,25 MgCl₂) (lõppkonts. 1x) ning laboris valmistatud DH10β kompetentsed *Escherichia coli* rakud (120 µl). Transformatsioonisegu hoidsin jääl 20 minutit, sellele järgnes kuumašokk 90 sekundit temperatuuril 42 °C. Pärast kuumašokki panin segu jääle ning lisasin steriilsetes 1 ml steriilset LB söödēt ning edasi inkubeerisin segu 60 minutit temperatuuril 37 °C loksutis.

Inkubeerimise möödudes tsentrifugeerisin transformeeritud segu 4602 g juures ühe minuti. Eemaldasın osa söötmetest ja resuspendeerisin rakud ~200 µl söötmes. Rakusegu kandsin LB söötmeplaadile, mis sisaldas antibiootikumi kanamütsiin (Alfa Aesar, 50 µg/ml). Plaatē inkubeerisin üleöö temperatuuril 37 °C ning järgmisel päeval oli plaadil ellujäänud rakkude poolt moodustatud kolooniaid näha.

2.2.3.5. Koloonia PCR

Kasvanud kolooniatest võtsin juhuslikult ning märgistasin ära 8 kolooniat, mille DNA-d kasutasin PCR-i jaoks. Märgistatud kolooniatest pärit bakterirakud suspendeerisin 10 µl mQ vees ja lüüsisin 95 °C juures. Järgmiseks lisasin bakteriseegule 2 µl mQ vett, 2 µl 10x puhver B (Solis BioDyne) (lõppkonts 1x), 2 µl 25 mM MgCl₂ (lõppkonts. 2,5 mM) ja 2 µl 2 mM dNTP-sid (lõppkonts. 0,2 mM) ning lisaks 1 µl 10 µM pCAMBIA-1390-seq-for-1 (lõppkonts. 0,5 µM) ja SalI-pIQD19-rev (lõppkonts. 0,5 µM) praimerid, kõige viimasena lisasin 0,2 µl Solis BioDyne FIREPol DNA polümeraasi (lõppkonts. 0,05 U/µl).

Viisin läbi protokollī põhjal PCR-i. PCR esimene etapp kestis 3 minutit 95 °C juures, millele järgnes PCR tsükkel, mis algas 95 °C 15 sekundit – DNA ahelate lahutamiseks ning edasi 55 °C 20 sekundit, et praimerid saaksid seonduda ja 72 °C juures 2 minutit 15 sekundit, et saaks toimuda DNA süntees. Tsükkel kordus 25 korda ning järgnes ühekordse DNA sünteesi etapp 7 minutit 72 °C temperatuuril, pärast mida programm lõppes toatemperatuuril.

2.2.3.6. Plasmidi eraldamine, kontsentratsiooni määramine ning sekveneerimine

Koloonia PCR produktid lahutasin agarosgeelil samadel tingimustel nagu kirjeldatud alapeatükis

2.2.3.1. Kolooniad, mis PCR põhjal sisaldasid konstrueeritud plasmidi pIQD19–GUS–pCAMBIA1390, inokuleerisin 5 ml LB vedelsöötmesse, millele oli lisatud 50 µl/ml kanamütsiini (Alfa Aesar) ning inkubeerisin üleöö 37 °C juures loksutis. Järgmisel päeval eraldas plasmidi bakterikultuurist Favorgen FavorPrep™ Plasmid Extraction komplektiga, vastavalt tootja protokollile, kasutades rakkude eraldamiseks 3 ml bakterikultuuri 5 ml-st.

Eraldatud plasmiidide kontsentratsiooni määramiseks kasutasin NanoDrop spektrofotomeetrit ning hiljem kasutasin Tartu Ülikooli sekveneerimise täisteenust vektorisse kloneeritud järjestuse kontrollimiseks. Plasmidi sekveneerimiseks kasutasin primereid pCAMBIA1390–seq–for-1, GUS–seq–rev-2 ning pIQD19–seq-1. Sekveneerimistulemusi kontrollisin ApE tarkvaraga ja selle põhjal valisin õige järjestusega plasmiidid, mida taimede transformatsiooniks kasutada.

2.2.4. *Agrobacterium tumefaciens* ja taimede transformeerimine

Promootor-reporter süsteemi sisaldava plasmidi pIQD19–GUS–pCAMBIA1390 transformeerisin *Agrobacterium tumefaciens* tüvesse GV3101. Transformeerimiseks võtsin 1000 ng plasmidi ning 100 µl *Agrobacteriumi* kompetentseid rakke, mis olid laboris eelnevalt valmistatud.

Reaktsiooniks inkubeerisin segu 25 minutit jääl ning seejärel tegin kuumašoki temperatuuril 37 °C 3 minutit, peale seda lisasin rakkudele 1 ml LB söödet ning inkubeerisin segu 28 °C loksutis 2 tundi. Pärast inkubeerimist tsentrifugeerisin segu 2 minutit 4602 g juures ning eemaldas rakusademelt vedeliku, nii et ~200 µl jäi alles. Sademe resuspendeerisin ning plaatisin LB söötmeplaadile, mis sisaldas 25 µg/ml gentamütsiini (Phytotechnologies Lab) ja 50 µg/ml kanamütsiini (Alfa Aesar). Plaatide inkubeerisin 3 päeva 28 °C juures.

Hariliku müürlooga transformeerimiseks kasutasin transformeeritud *Agrobacteriumi*. Selleks lisasin 5 ml LB vedelsöötmele kanamütsiini (Alfa Aesar) ja gentamütsiini (lõppkonts. vastavalt 50 µg/ml ja 25 µg/ml) ning inokuleerisin söötme väikese koguse kasvatatud transformeeritud *Agrobacteriumi* rakkudega. Rakud kasvasid üleöö 28°C loksutis. Järgmisel päeval lisasin steriilsetes tingimustes 50 ml LB söötmele 50 µg/ml kanamütsiini (Alfa Aesar) ja 25 µg/ml gentamütsiini (Phytotechnologies Lab) ning 25 µl üleöö kasvanud rakke. Kasvatasin rakke üleöö 28 °C loksutis. Järgneval päeval tsentrifugeerisin rakukultuuri 50 ml tuubis 10 minutit (1792 g) seni,

kuni rakud olid põhja vajunud. Eemaldasini supernatandi ning resuspendeerisin rakumassi 50 ml suhkrulahuses (lõppkonts. 5%). Segasin segu ning lisasin 25 µl detergenti SILWET L-77 (Momentive, lõppkonts. 0,05%).

Enne taimede transformatsiooni lõikasin 10 päeva varem taimede õievarred kuni rosetini ära, et tekiks värsked õievarred ja õiepungad. Saadud taimede õievarsi, millel olid õied välja arenenud, kuid ei olnud veel valdavalt avanenud, leotasin ühekaupa bakterikultuuri ja suhkrulahuses. Hoidsin seal neid 1 minuti ning jälgisin, et kõik taime õied oleksid vedelikus sees. Seejärel asetasin taimed niisutatud paberrätikutega kaetud kandikule pikali ning asetasin neile pabersalvrätikud peale ning niisutasin veelkord veega. Kandikule asetasin peale läbipaistmatu katte ning hoidsin neid üleöö kasvutoas. Järgmisel päeval eemaldasini katte ning asetasin taimepotid püsti ning jätsin kasvutuppa kasvama seemnete valmimiseni. Kasvanud seemnetest kasvasin transgeensed taimed, mis sisaldasid juhuslikult taime genoomi sisenenud promootor–reporter konstrukti.

2.2.5. Transgeensete taimede selektsioon

Transformeeritud taimede seemned steriliseerisin samamoodi nagu punktis 2.2.2. kirjeldatud ning jätsin 3 päevaks 4 °C külmikusse, et soodustada ja ühtlustada idanemist. Seejärel külvasin need T0 taimede seemned (~100 µl) antibiootikumiga MS fütoagari söötmeplaadile (hügromütsiin (Cayman Chemicals), lõppkonts. 25 µg/ml ja tsefotaksiim (Phytotechnologies Lab), lõppkonts. 50 µg/ml). Seemneid kasvasin lühipäevatoa tingimustes 14 päeva. Taimed, mis plaadil ellu jäid, olid edukalt transformeerunud ning sisaldasid promootor–reporter konstrukti (T1 taimed). Transgeensete liinide selekteerimisel kasvasin taimi väikestes pottides (6 x 6 x 5,5 cm). Esimese põlvkonna transgeensed taimed (T1) kasvasid 22 päeva ning seejärel korjasin kõikidelt taimedelt väikseima lehe ning viisin läbi epidermi GUS–värvingu. Selle kaudu sain selekteerida taimeliinid, mis kindlasti sisaldasid GUS–reportervalku. Taimed, millel oli GUS–reportervalk aktiivne, jätsin alles ning kasvasin edasi kuni seemneteni – neid jäi lõpuks kokku 6 T1 taime.

T1 taimede seemnete (T2) steriliseerimine ning külvimine toimus samade meetoditega ning tingimustel nagu eelnevalt mainitud T0 taimede seemnetel. Külvasin 50 seemet antibiootikumidega MS söötmeplaadile (hügromütsiin (Cayman Chemicals), lõppkonts. 25 µg/ml ja tsefotaksiim (Phytotechnologies Lab), lõppkonts. 50 µg/ml), selleks et selekteerida taimed, mis sisaldasid pIQD19–GUS transgeeni ühte koopiat. 10 päeva möödudes olid taimed plaadil kasvanud piisavalt

suureks selleks, et leida hügomütsiiniresistentsete taimede osakaal. Kui resistentsusprotsent jäi 50-80% hulka, siis valisin plaadilt 5 taime ning istutasin väikestesse pottidesse. Taimed kasvasid seemnete valmimiseni.

Korjasin seemned ning sain T3 põlvkonna. Seemnete steriliseerimine ja idanemine toimusid samades tingimustes nagu eelmiste põlvkondade puhul. Kui vernalisatsioon oli tehtud, siis külvasin seemned antibiootikumidega MS söötmeplaadile (50 mg/ml hügomütsiini (Cayman Chemicals), lõppkonts. 25 µg/ml ja 100 mg/ml tsefotaksiim (Phytotechnologies Lab), lõppkonts. 50 µg/ml), et leida taimeliinid, kus hügomütsiiniresistenseid taimi oli 100% ehk saadud taimed sisaldasid pIQD19–GUS transgeeni genoomi ühes kohas ning olid selle suhtes homosügootid. Kui see oli saavutatud, siis istutasin 9 homosügootset taime edasi suurde potti (9 x 9 x 10 cm), mullasegu oli sama, mis eelnevatel kordadel. Taimed kasvasid seemnete valmimiseni ning seejärel korjasin kokku ja olin saanud T4 põlvkonna, millega tegin edasised katsed.

2.2.6. Mutantsete *iqd19-2* ja *iqd19-3* taimede isoleerimine

Mutantsete *iqd19-2* ja *iqd19-3* taimede isoleerimiseks külvasin ja kasvasin taimi nagu punktis 2.2.2 kirjeldatud. Taimed kasvasid lühipäevatoas ning 20 päeva pärast võtsin igalt taimelt ühe lehe, selleks et eraldada taime DNA. Tuubi, kus oli taime leht lisasin 600 µl taime DNA eraldamise puhvrit (koostis: TRIS (lõppkonts. 100 mM), EDTA (lõppkonts. 50 mM), NaCl (lõppkonts. 500 mM), pH 8) ning klaaskuule (3 tükki 1-1,3 mm läbimõõduga ja ~50 µl 0,4-0,6 mm läbimõõduga). Seejärel purustasin taimelehti Retsch purustajas kokku kaheksa minutit kiirusel $30 \frac{1}{s}$ ja tsentrifuugisin (21300 g) viis minutit. Samal ajal lisasin uutesse tuubidesse 500 µl isopropanooli. Pärast tsentrifuugimist lisasin isopropanoolile 500 µl taimetükkide supernatanti, segasin ja tsentrifuugisin uuesti samadel tingimustel. Eemaldasin supernatandi ja jätsin DNA sademe üleöö kuivama. Järgmisel päeval resuspendeerisin DNA sademe 100 µl-s mQ vees.

Eraldatud DNA-ga tegin PCR-i, kasutades primereid tabelist 2: esimene etapp kestis 3 minutit 95 °C juures, millele järgnes PCR tsükkel, mis algas 95 °C 15 sekundit – DNA ahelate lahutamiseks ning edasi 53 °C 20 sekundit, et praimerid saaksid seonduda ja 72 °C juures 1 minuti 30 sekundit, et saaks toimuda DNA süntees. Tsükkel kordus 35 korda ning järgnes ühekordne DNA sünteesi etapp 7 minutit 72 °C, pärast mida programm lõppes toatemperatuuril. PCR tulemusi vaatasin agarosgeelilt, nii nagu on kirjutatud punktis 2.2.3.1. Metsiktüüpi alleeli olemasolu *iqd19-2* puhul

testisin praimeritega IQD19-for-2 ja IQD19-rev-2 ning mutantse alleeli olemasolu praimeritega GABI-LB ja IQD19-rev-2. Mutandi *iqd19-3* puhul testisin metsiktüüpi alleeli olemasolu praimeritega IQD19-for-3 ja IQD19-rev-3 ning mutantse alleeli olemasolu praimeritega SALK-LB ning IQD19-rev-3. Jätsin alles taimed, kus oli ainult mutantse alleeli produkt, kasvasin seemnete valmimiseni ning järgmise põlvkonna seemnetega tegin katsed.

2.2.7. GUS-värving, preparaate valmistamine ja pildistamine

GUS-reportervalgu ekspresseerivad taimerakud värvuvad substraadiga (X-Gluc, ThermoFisher) töödeldes siniseks ning selle kaudu on võimalik näha *IQD19* promootori aktiivsust taimes. GUS-värvingu protokoll põhineb Stanislav Vitha protokollil (https://microscopy.tamu.edu/wp-content/uploads/2018/08/GUS_Localization_in_plants.pdf).

Taime fikseerimiseks eemaldasın lehe alumiselt pinnalt epidermi tüki, hoidsın esmalt 90 % atsetoonis 20 minutit ning seejärel loputasın 2 korda 1x NaP puhvriga (2 X NaP puhver: 0,1 M NaH₂PO₄ ja 0,1 M Na₂HPO₄, pH 7,2) selleks, et eemaldada atsetooni jääk. Peale NaP puhvriga pesemist kandsın proovile peale GUS-värvimislahuse (1 ml jaoks: 405 µl mQ vett, 500 µl 2 X NaP (lõppkonts. 1x), 50 µl metanooli (lõppkonts. 5%), 20 µl 100 mM kaalium ferrotsüaniidi lahust (2 mM), 20 µl 100 mM kaalium heksatsüanoferraadi(III) lahust (2 mM), 0,5 mg X-Gluc (lõppkonts. 0,5 mg/ml), 5 µl 10% Triton X-100 (lõppkonts. 0,05%)). Esmase selekteerimise tegin hästi kasvanud T1 transformeeritud taimede lehtedelt eraldatud epidermi tükkidega ning pärast värvimislahuse lisamist hoidsın proove üleöö pimedas. Seejärel eemaldasın GUS-värvimislahuse ja hoidsın proove üleöö 70% etanoolis klorofüllı eemaldamiseks. Samamoodi viisin läbi epidermitükkide GUS-värvimise T4 põlvkonna taimedega. T4-põlvkonna taimede seemiku, lehe ja õisiku värvisın ka GUS-värvimise meetodiga, kuid selleks, et GUS-värvimislahus vastavatesse kudedesse jõuaks, pidın kasutama vaakumfiltratsiooni. Selleks tegin proove ja värvimislahust sisaldavate tuubide kaane sisse väikese augu. Tuubid asetasın vaakumpumbaga (StonyLab, YQ-701092) ühendatud eksikaatorisse ning lasın kolm korda lahusel keema minna. Seejärel panın tuubid üleöö pimedasse ning järgmisel päeval eemaldasın GUS-värvimislahuse ja hoidsın proove üleöö 70% etanoolis.

Preparaatide valmistamiseks asetasin taimekoe tükid mikroskoobi preparaadi alusklaasile veetilga sisse ning peale asetasin pealisklaasi. Kern Optics 133C832 valgusmikroskoobis vaatlesin proove 40-, 100-, 200- ja 400-kordse suurendusega ning pildistamiseks kasutasin Kern Optics Microscope Camera ODC 832 kaamerat ja MicroscopeVIS2.0 Pro tarkvara.

2.2.8. Aluselise fuksiiniga värvimine

Aluselise fuksiiniga värvimiseks kasvasin Col-0, *iqd19-1*, *iqd19-2* ja *iqd19-3* taimeliine ilma antibiootikumita MS fütoagari söötmel 11 päeva. Seejärel valisin ilusamad seemikud ning panin need üleöö 25% äädikhappe ja 75% etanooli lahusesse. Järgmisel päeval tõstsin seemikud kloraalhüdraadi lahusesse (kloraalhüdraat:vesi:glütseriin, massisuhtes 8:2:1) ja hoidsin seal järgmise päevani. Järgneval päeval värvisin seemikuid aluselise fuksiiniga (lõppkonts. 5 mg/ml) nii, et panin pipetiga kaks tilka alusklaasil asuvale seemikule, lasin paar minutit lahusel mõjuda, et värv jõuaks kudedesse, ning seejärel loputasin mQ veega aluselise fuksiini maha. Seejärel valmistasin preparaadid ja pildistasin neid samamoodi nagu eelmises peatükis.

2.2.9. Lehejäljendite tegemine

Taimedel, mis olid kasvanud 20-30 päeva, märgistasin 10. lehe lehejäljendi tegemiseks niidiga. Taimed olid lehejäljendi võtmise ajal 35-päevased. Lehejäljendi tegemiseks kasutasin hambajäljendi ja aktivaatori segu (Zhermack Orangwash L), mille määrisin lehe alumisele küljele, ülemise lehe pinna jäljendi tegemiseks kasutasin hambajäljendi ja aktivaatori segu Coltene Speedex light body. Lasin segul toatemperatuuril polümeriseeruda ning seejärel eemaldasid lehe jäljendilt. Lehe pinnamustri saamiseks katsin jäljendi läbipaistva küünelaki (BUK) kihiga, mis kuivas kiirelt toatemperatuuril. Kuivanud küünelaki kihile asetasin peale läbipaistva teibi tüki, mille külge küünelaki kiht jäi ning kleepisin proovi preparaadi alusklaasile.

2.2.10. Õhulõhede tiheduse ja indeksi määramine

Täiskasvanud 10. lehe õhulõhede tiheduse määramiseks pildistasin preparaate valgusmikroskoobi (Kern Optics 133C832) abil 200 x suurendusega. Tiheduse ja indeksi määramiseks kasutasin programmi ImageJ (Schneider jt., 2012). Esmalt määrasin fotol oleva ala pindala ning lugesin kokku kõik nähtavad õhulõhed. Järgmisena valisin rohkem kui pool vaateväljast ning mõõtsin uuesti pindala, inverteerisin pildi värvid ning loendasin epidermirakud.

Fotodelt saadud andmete põhjal arvutasin:

$$1) \text{ õhulõhede tihedus } SD = \frac{S}{A}$$

SD – õhulõhede tihedus,

S – õhulõhede arv,

A – pindala (mm²);

$$2) \text{ epidermirakkude tihedus } ED = \frac{E}{A}$$

ED – epidermirakkude tihedus,

E – epidermirakkude arv,

A – pindala (mm²)

$$3) \text{ õhulõhede indeks } SI = \frac{SD}{ED + SD} \cdot 100\%$$

SI – õhulõhede indeks,

SD – õhulõhede tihedus,

ED – epidermirakkude tihedus.

4) ülemise ja alumise külje õhulõhede tiheduste suhe: SD ülemine / SD alumine, kus

SD ülemine – õhulõhede tihedus lehe ülaküljel,

SD alumine – õhulõhede tihedus lehe alaküljel

2.2.11. Statistiline analüüs

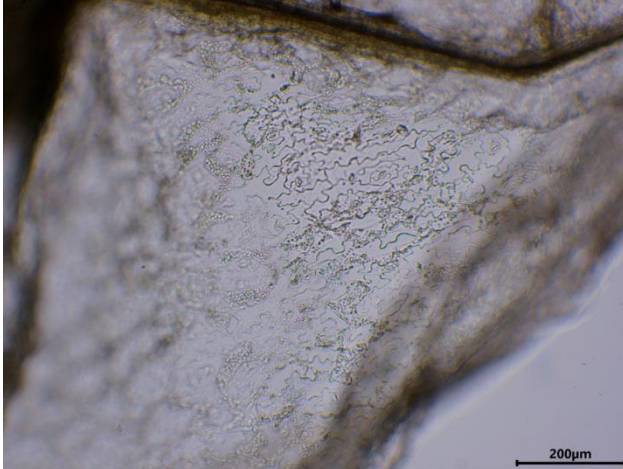
Õhulõhede tihedused, indeksid ja tiheduste suhted keskmistasin iga töös kasutatud hariliku müürlooga taimeliini kohta ja esitasin koos standardvea piiridega joonistel. Taimeliinide omavaheliseks võrdlemiseks kasutasin ühefaktorilist ANOVAt ehk dispersioonanalüüsi. *Post-hoc* analüüsiks kasutasin Tukey' testi, mis on kohandatud analüüsimaaks ebavõrdset valimit. Statistilise andmeanalüüsi jaoks kasutasin programmi Statistica (versioon 7.0).

2.3. Tulemused

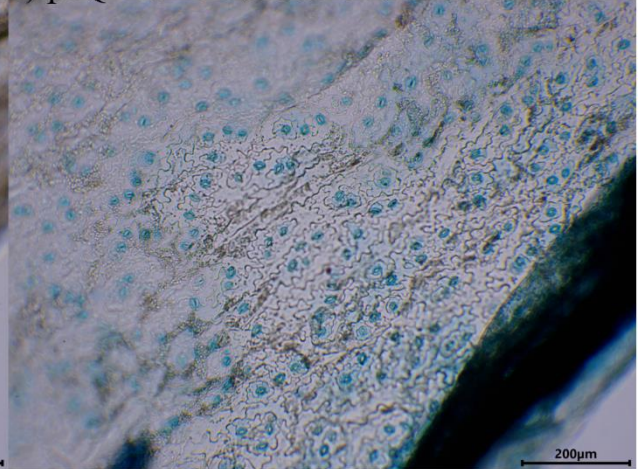
2.3.1. *IQD19* ekspressioonimuster taimedes

IQD19 ekspressioonimustri hindamiseks kasutasin GUS-värvingut. GUS-reportervalku ekspresseerivad taimerakud värvuvad substraadiga töödeldes siniseks ning selle kaudu on võimalik näha *IQD19* promootori aktiivsust taimes. Esimese GUS-värvimise tein T1 põlvkonna taimede epidermiga, selleks et teha esimene transgeensete taimede selektsioon. Jooniselt on näha, et nii sulgrakud kui neid ümbritsevad rakud on transgeensetes taimedes värvunud siniseks, see näitab, et transformeeritud taimed sisaldasid GUS-reportervalku õhuõhededes ja õhulõhesid ümbritsevates rakkudes (Joonis 5). Col-0 oli nii selles katses kui ka järgnevate katsete puhul kontrolliks.

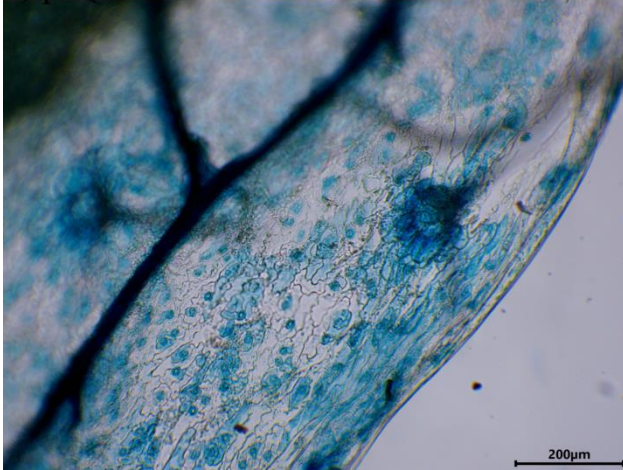
1) Col-0



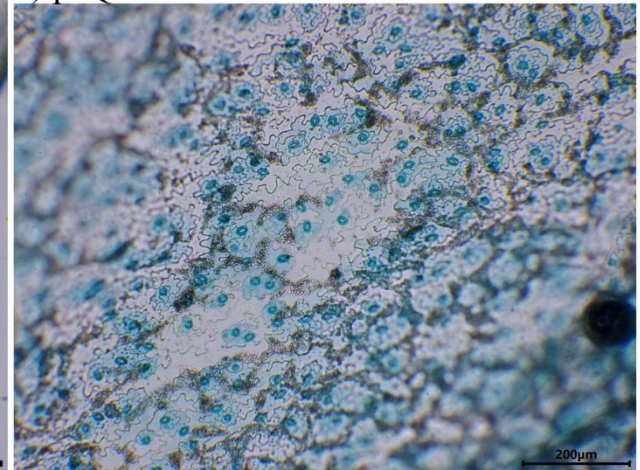
2) pIQD19-GUS Col-0 3.1



3) pIQD19-GUS Col-0 4.3



4) pIQD19-GUS Col-0 5.3



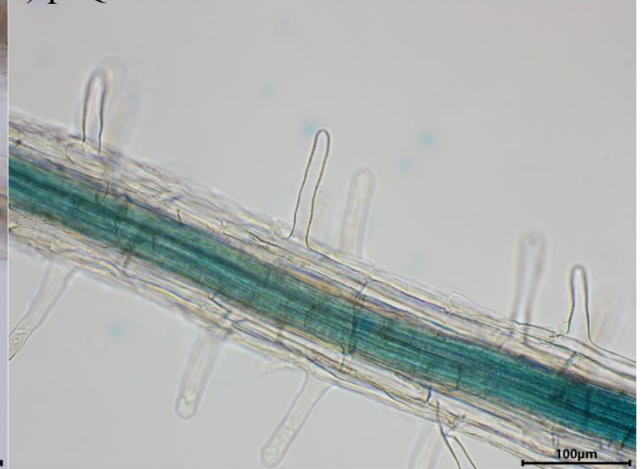
Joonis 5. GUS-värvitud pIQD19-GUS Col-0 liinid võrdluses metsiktüübiga (Col-0).
Pildistatud 100-kordse suurendusega ning mõõtskaala on 200 μm pikk.

Edasised GUS-värvingud viisin läbi T4 põlvkonna taimedega. Kõigepealt värvisin plaadil kasvanud pIQD19-GUS Col-0 3.1, pIQD19-GUS Col-0 4.3, pIQD19-GUS Col-0 5.3 ning kontrolliks Col-0 taimede seemikuid, et näha, millistes taime kudedes GUS-reportervalk ekspresseerub. GUS signaal ja seega *IQD19* promootri aktiivsus esines seemikute juurtes ja lehtedes. Juured värvusid intensiivsemalt siniseks pIQD19-GUS Col-0 4.3 ja pIQD19-GUS Col-0 5.3 puhul (Joonis 6). Lehe epidermi värvimine näitas et lisaks õhulõhedele värvusid transgeensetes taimedes siniseks ka õhulõhesid ümbritsevad epidermirakud (Joonis 7).

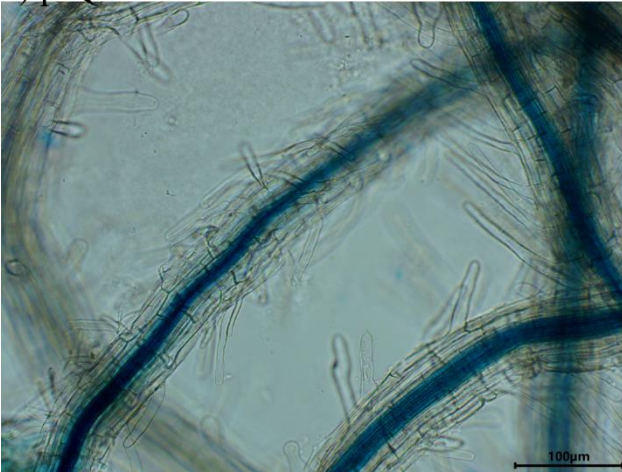
1) Col-0



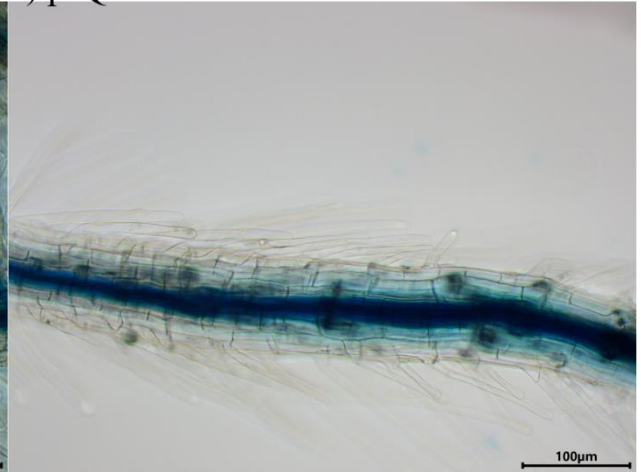
2) pIQD19-GUS Col-0 3.1



3) pIQD19-GUS Col-0 4.3

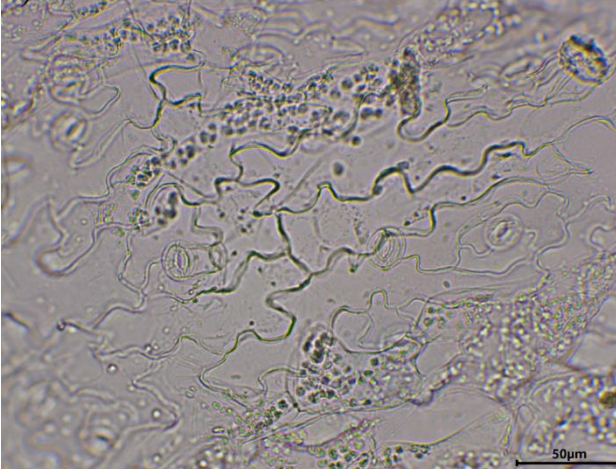


4) pIQD19-GUS Col-0 5.3

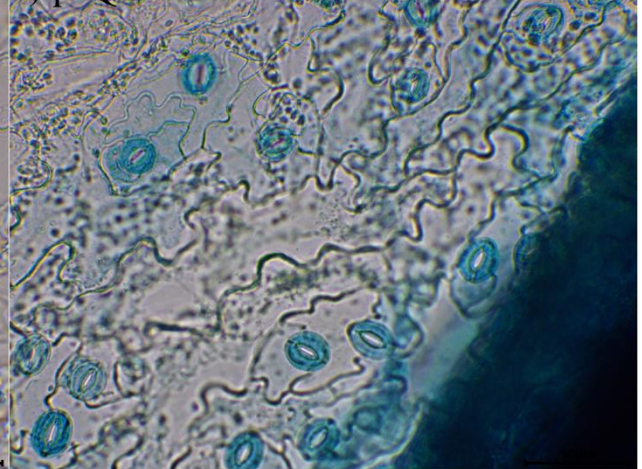


Joonis 6. GUS signaal seemikute juurtes. Pildistatud 200-kordse suurendusega ning mõõtskaala on 100 μm pikk.

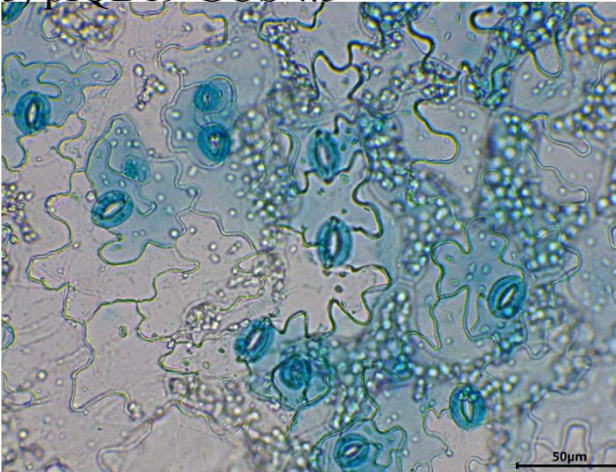
1) Col-0



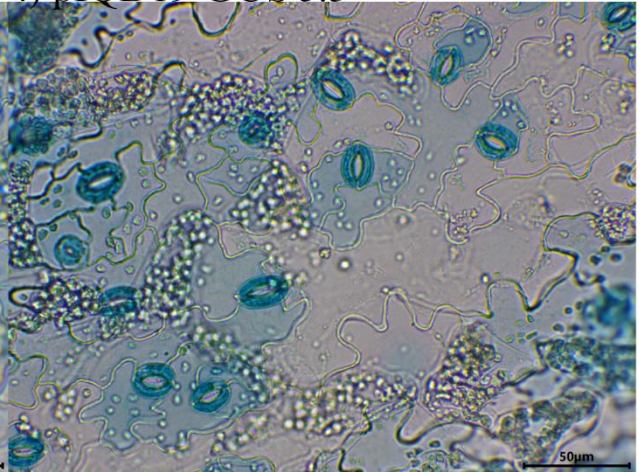
2) pIQD19-GUS 3.1



3) pIQD19-GUS 4.3



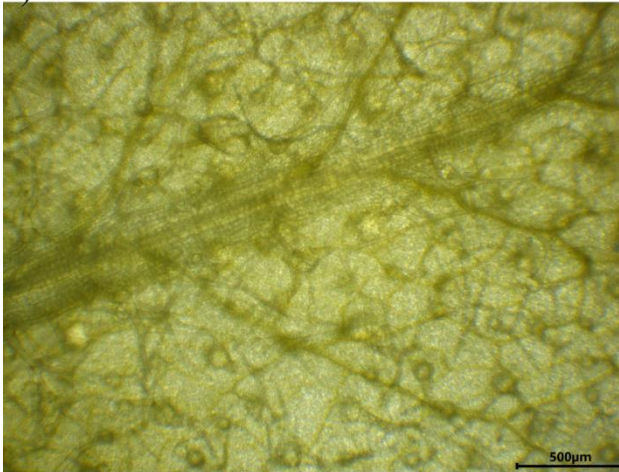
4) pIQD19-GUS 5.3



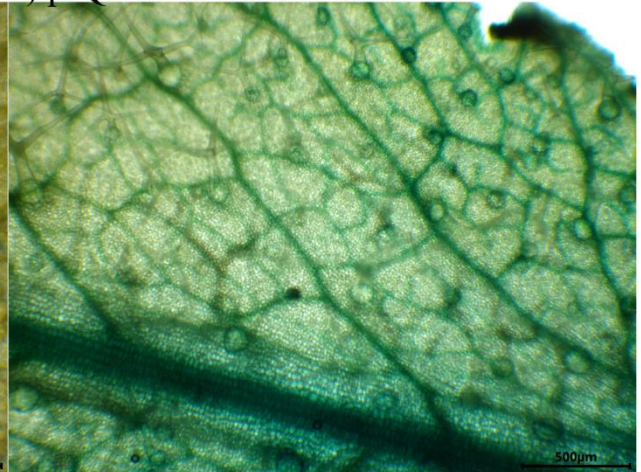
Joonis 7. GUS signaal lehe epidermis. Pildistatud 400-kordse suurendusega ning mõõtskaala on 50 μm pikk.

Lisaks tegin GUS-värvimist ka täiskasvanud taimede lehtede ja õitega. Antud katses värvisin terve lehe ning eraldi epidermi ei eraldanud, GUS signaali oli näha lehe juhtsoontes (Joonis 8). Õie värvimise puhul esines GUS signaal tolmukaniidis ja pIQD19-GUS Col-0 5.3 puhul ka õie kroonlehtede juhtsoontes (Joonis 9).

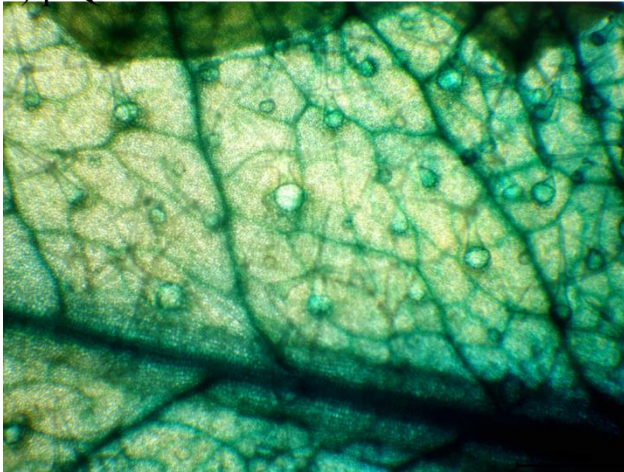
1) Col-0



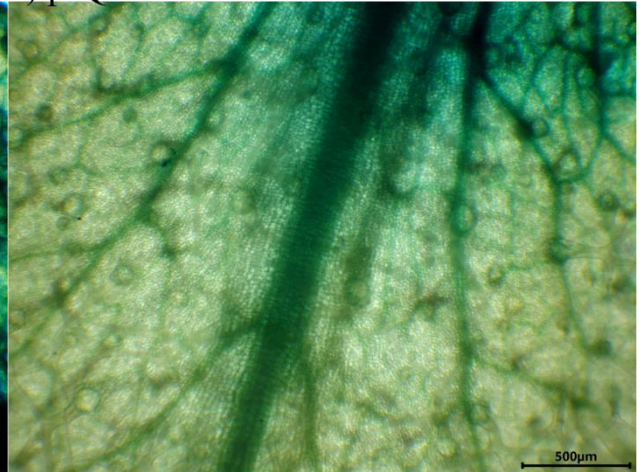
2) pIQD19-GUS Col-0 3.1



3) pIQD19-GUS Col-0 4.3



4) pIQD19-GUS Col-0 5.3



Joonis 8. GUS signaal lehtedes. Pildistatud on 40-kordse suurendusega ning mõõtskaala on 500 μm pikk.

1) Col-0



2) pIQD19-GUS Col-0 3.1



3) pIQD19-GUS Col-0 4.3



4) pIQD19-GUS Col-0 5.3

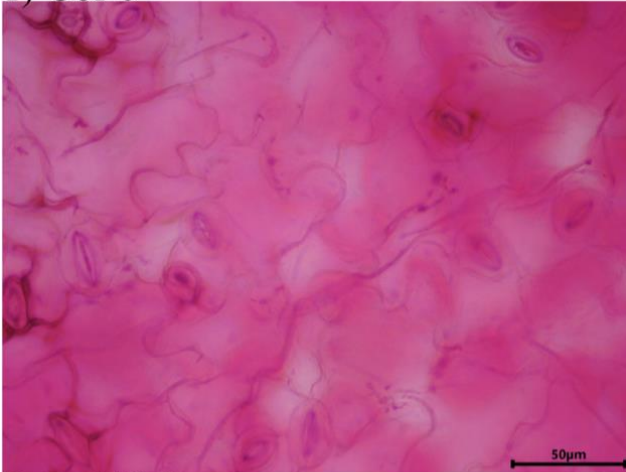


Joonis 9. GUS signaal õites. Pildistatud on 40-kordse suurendusega ning mõõtskaala on 500 μm pikk.

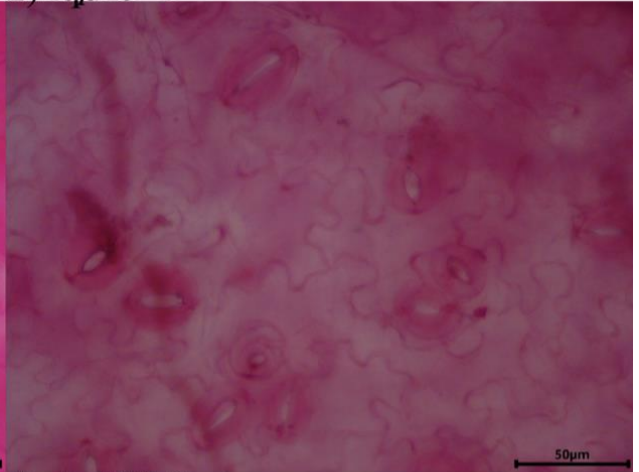
2.3.2. Õhulõhemustrid seemikute idulehtedes

Õhulõhede paiknemise mustri hindamiseks värvisin 11-päevaste *iqd* mutantide idulehti aluselise fuksiiniga ja uurisin lehe alumist ja ülemist pinda, kontrolliks oli metsiktüüp Col-0. Aluseline fuksiin värvis rakukestad ja võimaldas näha sulgrakkude paiknemist lehe mõlemal pinnal. Katsesest oli näha, et enamasti oli lehe alumisel küljel rohkem õhulõhesid kui ülemisel küljel (Joonis 10 ja 11). Mutantide puhul oli sagedamini näha ka sulgrakkude kobaraid ning seda esines nii lehe ülemisel kui ka alumisel küljel.

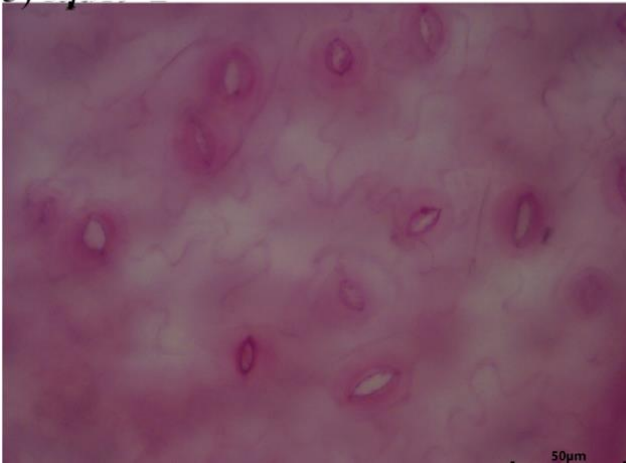
1) Col-0



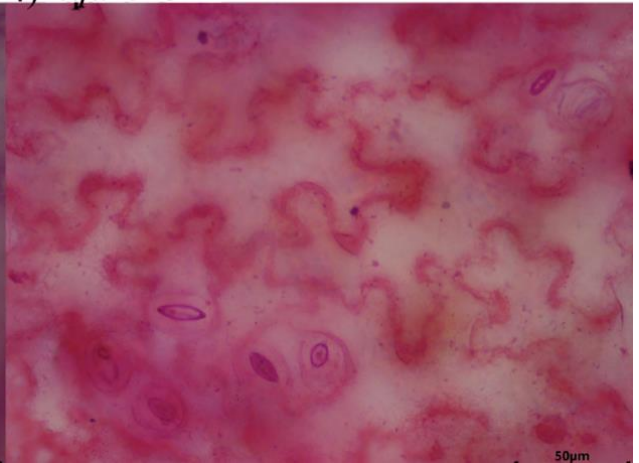
2) *iqd19-1*



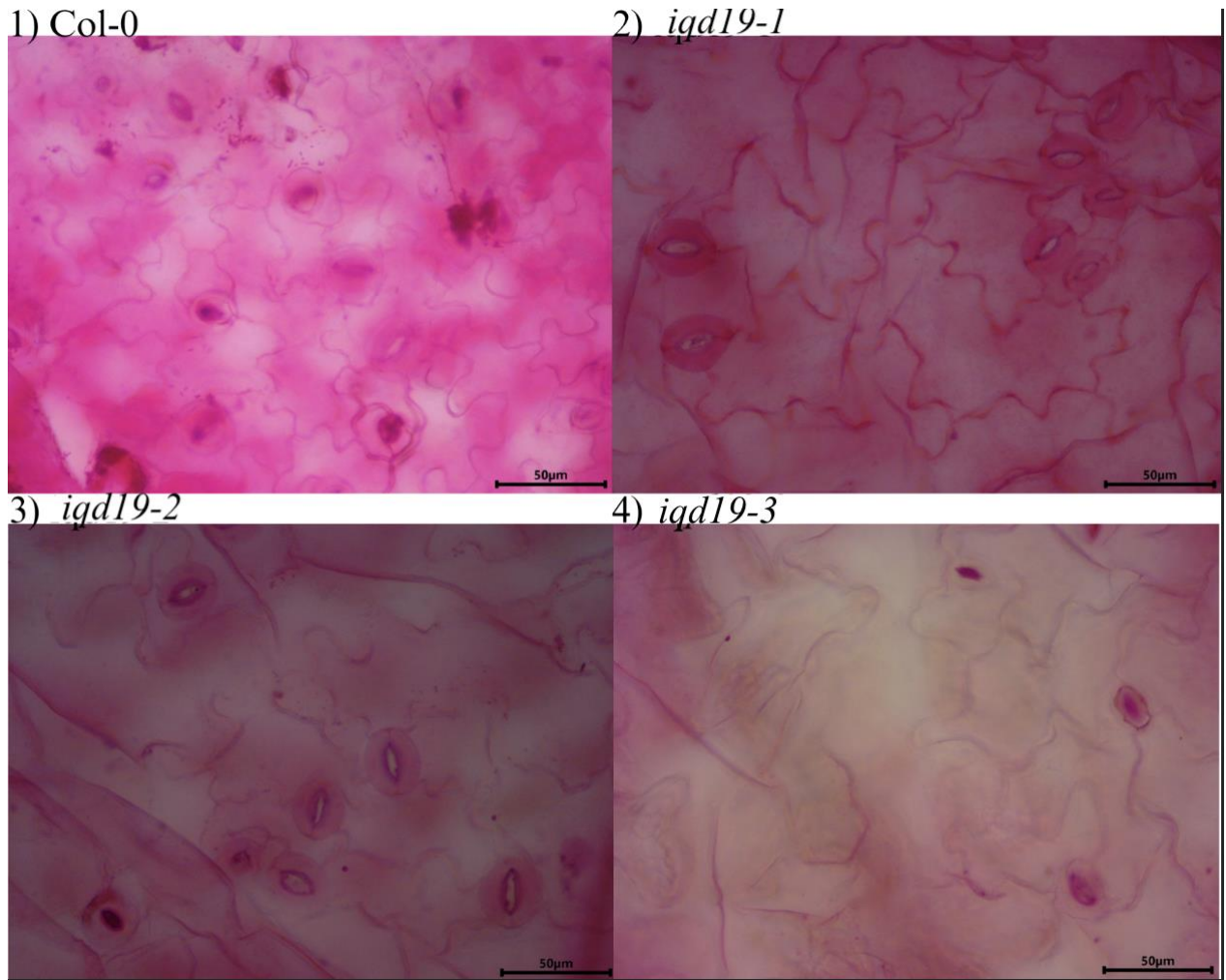
3) *iqd19-2*



4) *iqd19-3*



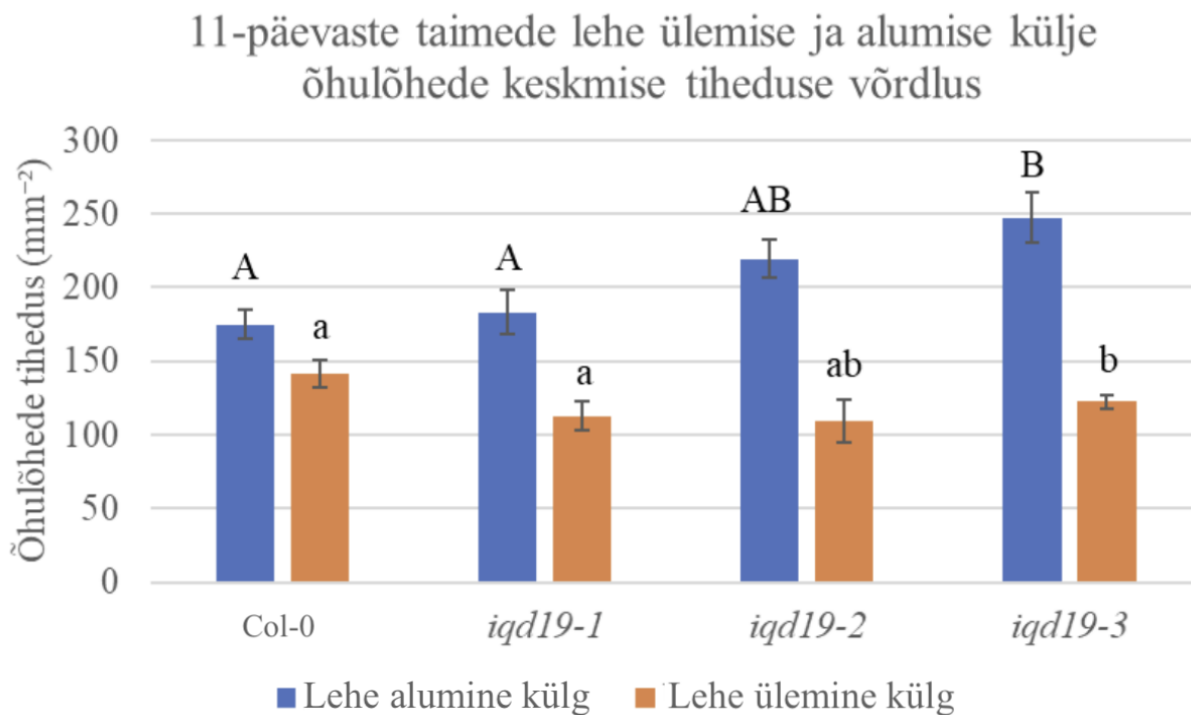
Joonis 10. Aluselise fuksiiniga värvitud seemikute idulehed, alumine külg. Pildistatud on 400-kordse suurendusega ning mõõtskaala on 50 μm pikk.



Joonis 11. Aluselise fuksiiniga värvitud seemikute idulehed, ülemine külj. Pildistatud on 400-kordse suurendusega ning mõõtskaala on 50 µm pikk.

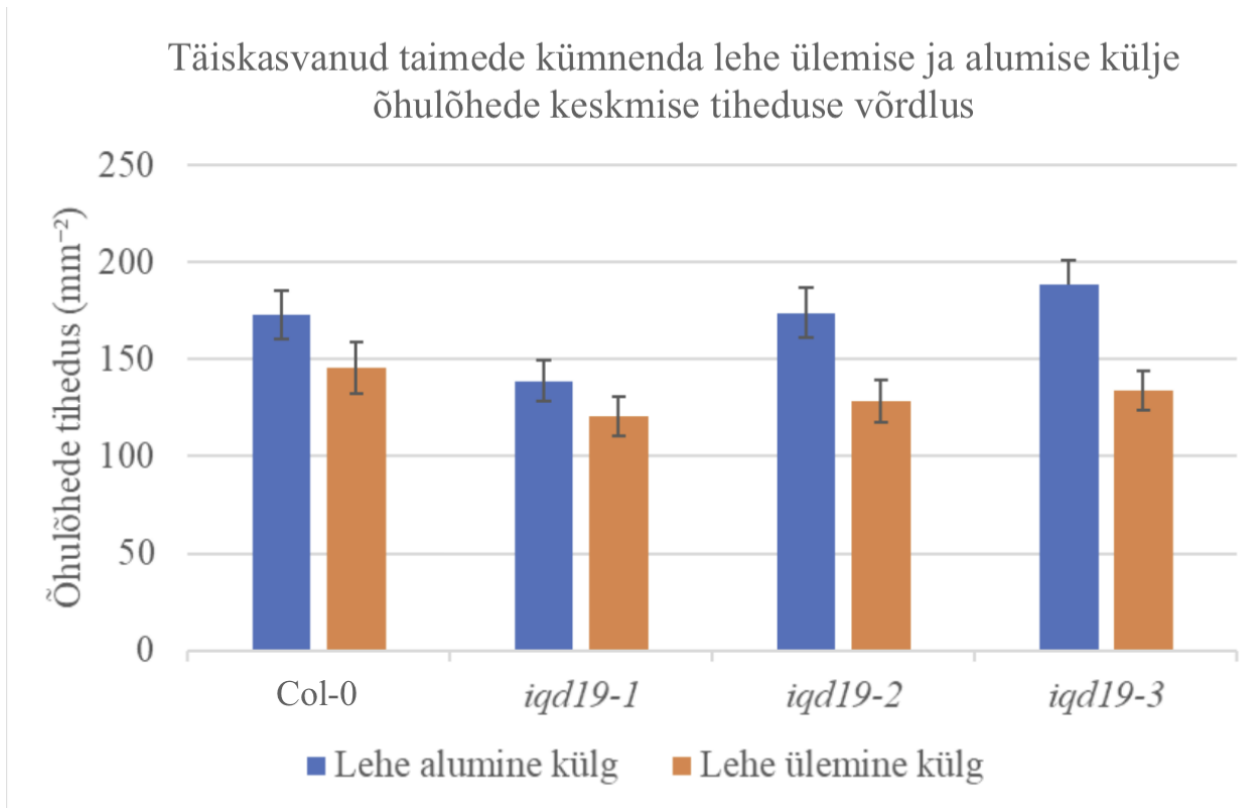
2.3.3. Lehe alumise ja ülemise külje õhulõhede tihedus idu- ja pärislehtedes

11-päevaste taimede idulehe ülemise ja alumise külje õhulõhede tiheduse võrdlus näitas, et võrreldes metsiktüübiga oli lehe alumise külje õhulõhede tihedus suurem ja ülemise lehe külje õhulõhede tihedus väiksem *iqd19-3* mutandil, aga mitte teistel uuritud *iqd19* mutantidel (Joonis 12).



Joonis 12. 11-päevaste taimede idulehe ülemise ja alumise külje õhulõhede keskmise tiheduse võrdlus. Diagrammidel on näidatud lehe ülemise ja alumise külje õhulõhede keskmist tihedust. Tulpadel olevad vearistid näitavad standardviga. Statistilised erinevused on saadud ühefaktorilise dispersioonanalüüsi ja Tukey *post-hoc* testi tulemusena ning on tähistatud erinevate tähtedega (A, a, B, b), kus trükitähed tähistavad alumise lehe külje analüüsi tulemusi ning väikesed tähed lehe ülemise külje analüüsi tulemusi; kattuvate tähtedega grupid ei erine üksteisest statistiliselt oluliselt. Valimi suurus oli 5-7 taime iga taimeliini kohta.

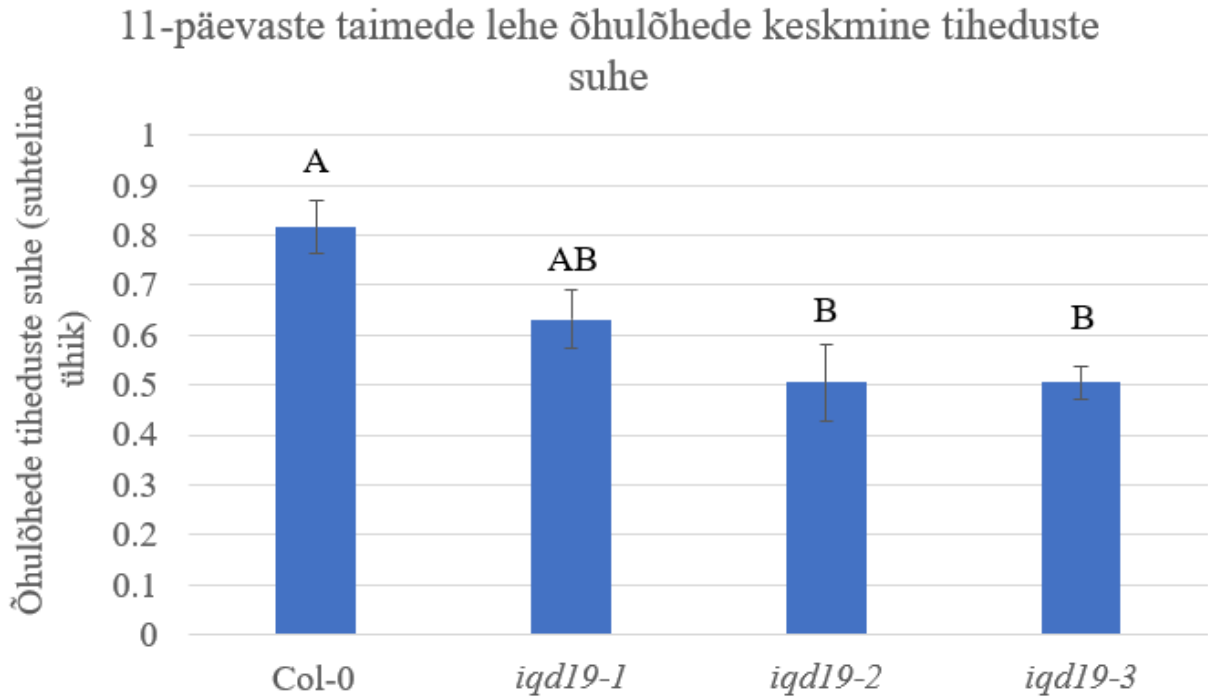
Samade mutantide täiskasvanud taimede kümnenda lehe ülemise ja alumise külje õhulõhede keskmise tiheduse võrdlus näitas, et võrreldes metsiktüübiga oli nii lehe alumise kui ülemise külje õhulõhede tihedus *iqd19* mutantidel statistiliselt sarnane metsiktüübiga (ühefaktoriline dispersioonanalüüs, joonis 13).



Joonis 13. Täiskasvanud taimede kümnenda lehe ülemise ja alumise külje õhulõhede keskmise tiheduse võrdlus. Diagrammidel on näidatud lehe ülemise ja alumise külje õhulõhede keskmist tihedust. Tulpadel olevad vearistid näitavad standardviga. Ühefaktorilise dispersioonanalüüsiga rühmade vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud. Valimi suurus oli 11-16 taime iga taimeliini kohta.

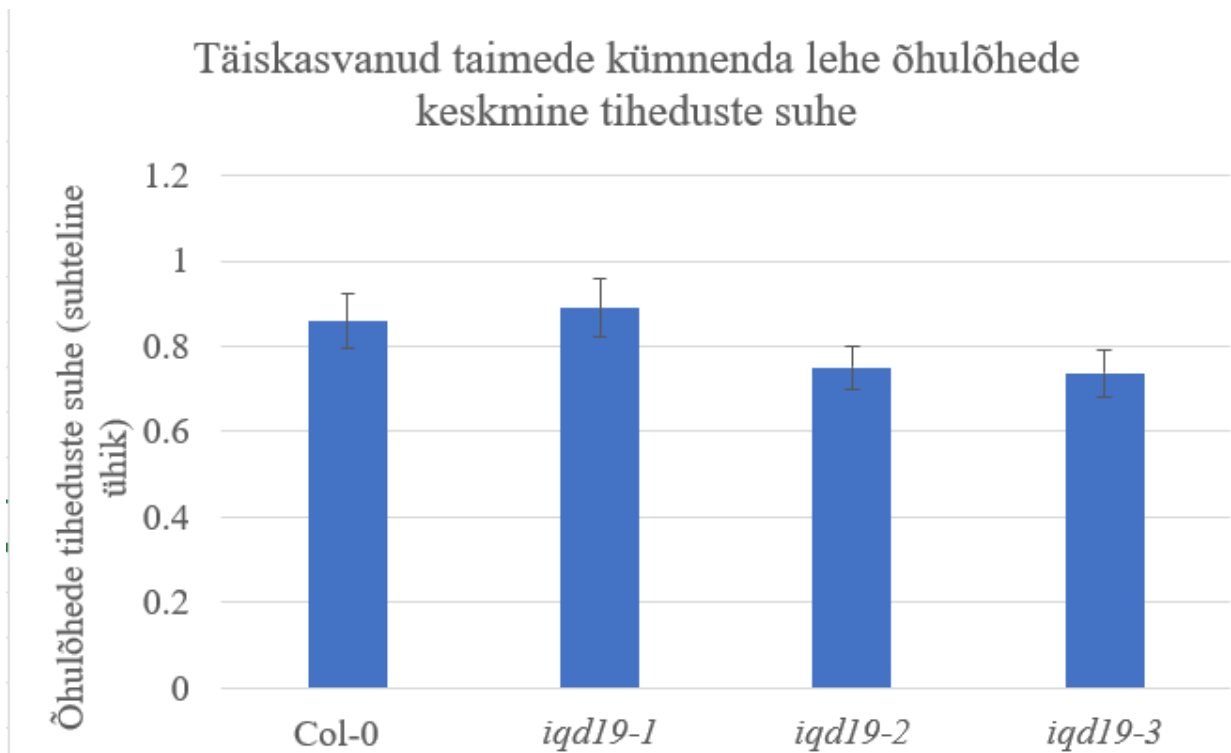
2.3.4. Idu- ja pärislehtede ülemise ja alumise külje õhulõhede tiheduse suhe

11-päevaste taimede idulehe ülemise ja alumise külje õhulõhede tiheduse suhe võrreldes Col-0 metsiktüübiga oli *iqd19-2* ja *iqd19-3* mutantidel statsistiliselt oluliselt väiksem (Joonis 14).



Joonis 14. 11-päevaste taimede idulehe õhulõhede tiheduste keskmine suhe. Diagrammidel on näidatud lehe ülemise ja alumise külje õhulõhede keskmist tiheduste suhet. Tulpadel olevad vearistid näitavad standardviga. Statistilised erinevused on saadud ühefaktorilise dispersioonanalüüsi ja Tukey *post-hoc* testi tulemusena ning on tähistatud erinevate tähtedega (A, B); kattuvate tähtedega grupid ei erine üksteisest statistiliselt oluliselt. Valimi suurus oli 5-7 taime iga taimeliini kohta.

Samade mutantide täiskasvanud taimede kümnenda lehe õhulõhede tiheduste suhe ei olnud *iqd19* mutantidel metsiktüübist statistiliselt oluliselt erinev (ühefaktoriline dispersioonanalüüs, joonis 15). Õhulõhede kogutihedus ega indeks ei olnud *iqd19* mutantides muutunud ei idu- ega pärislehtedes (lisa 3, lisa 4, lisa 5, lisa 6).



Joonis 15. Täiskasvanud taimede kümnenda lehe õhulõhede tiheduste keskmine suhe. Diagrammidel on näidatud lehe ülemise ja alumise külje õhulõhede keskmist tiheduste suhet. Tulpadel olevad vearistid näitavad standardviga. Ühefaktorilise dispersioonanalüüsiga rühmade vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud. Valimi suurus oli 11-16 taime iga taimeliini kohta.

2.4. Arutelu

2.4.1. *IQD19* ekspressioonimuster taimedes

GUS-värving T1 põvkonnas näitas, et transformatsioon oli toimunud edukalt ja *pIQD19-GUS* transgeen oli ilusti taime genoomi sisenenud (Joonis 5).

Plaadil kasvanud *pIQD19-GUS Col-0* taimede GUS-värvimisel oli näha juure intensiivset värvumist, mis näitab, et *IQD19* geen ekspresseerub taime varajases arengus ka juurtes ning võib seal mõjutada taime arengut (Joonis 6). Lehe epidermi värvimisel värvusid kõikidel liinidel õhulõhed siniselt, kuid *pIQD19-GUS Col-0 4.3* ja *pIQD19-Gus Col-0 5.3* puhul värvusid siniselt ka sulgrakke ümbritsevad epidermirakud (Joonis 7). Tugevamalt levinud signaal võib tähendada, et neis taimedes on transgeeni ekspressioonitase kõrgem. GUS-reportervalgu signaali nägemine õhulõhedes viitab sellele, et geeni *IQD19* promootor on aktiivne õhulõhedes, mis näitab et sel geenil on funktsioon õhulõhedes. Signaal esines ka eellasrakkudes ja mõne liini puhul õhulõhedega külgnevates epidermirakkudes, mis on õhulõhede arenguliinist pärit (Joonis 7). Selline ekspressioonimuster viitab sellele, et *IQD19* võiks olla seotud õhulõhede arenguga. *IQD19* valgu esinemine õhulõhedes on kooskõlas ka kirjandusega, kus on näidatud, et *IQD* perekonna valgud on olulised taime arenguprotsesside reguleerimisel ning ka reageerimisel mitmetele abiootilistele ja biootilistele tingimustele (Guo jt., 2021). Kui *IQD* perekonna valgud mõjutavad õhulõhede arengut, siis mõjutab see omakorda taime reageerimist keskkonnatingimustele, näiteks niiskustingimuste või CO₂ kontsentratsiooni muutustele.

Täiskasvanud taimede GUS-värvimisel oli näha, et nii lehe juhtsooned kui ka tolmukaniit värvusid siniselt, mis näitab, et ka täiskasvanud taimede lehe juhtsoontes, õie kroonlehtede juhtsoontes ja tolmukaniidis esineb *IQD19* valk. *IQD19* valgu ekspressioon tolmukaniidis võib olla seotud taimede viljakusega, kuid selleks on vaja teha edasisi uuringuid, et seda kindlalt väita.

GUS signaali esines eelkõige juhtsoontes – seda nii juurtes, lehtedes kui õie kroonlehtedes. See viitab, et *IQD19* promootor on neis kudedes aktiivne või toimub GUS reportervalgu või vastava mRNA transport taimes juhtsoonte kaudu.

Aluselise fuksiiniga *iqd19* idulehtede värvimisel oli esiteks näha seda, et alumisel lehe küljel on rohkem õhulõhesid kui ülemisel küljel (Joonis 10, Joonis 11). Teiseks oli näha, et idulehtedes esines õhulõhede kobaraid, mida oli rohkem näha mutantidel, kuid seda esines siiski ka *Col-0* taimedes. See võib tuleneda plaadil kasvatamisega kaasnevast kõrgest õhuniiskusest.

Selles töös tehtud katsete põhjal on näha, et IQD19 valk esineb õhulõhedes ja neid ümbritsevates rakkudes ja võib mõjutada õhulõhede arengut ning võib-olla ka polaarsust rakujagunemise käigus. Katsed teiste IQD-perekonna valkudega on näidanud, et IQD valgud on suutelised seonduma mikrotorukestega, millel on oluline roll rakkude jagunemise ja raku kuju reguleerimisel (Mitra jt., 2019). Kuna *IQD19* promootor on aktiivne õhulõhedes ja neid ümbritsevates rakkudes, võib arvata, et *IQD19*-l on roll õhulõhedes ja/või nende arengus ning see võib samuti toimuda mikrotorukestega seondumise kaudu, kuid selle kinnitamiseks on vaja teha täiendavaid katseid.

2.4.2. Õhulõhede tihedus ja tiheduste suhe

IQD19 geeni funktsiooni häire õhulõhede tihedust ei mõjutanud üheski arengustaadiumis. Samas on kirjanduses tihti leitud, et IQD valkude üleekspressioon põhjustab muutusi näiteks epidermirakkude kujus (Bürstenbinder jt., 2017b). Küll aga geeni funktsiooni häirega mutantidel tihti selgeid fenotüüpe ei esine. See võib tuleneda sellest, et IQD geeniperekond on suur, kus ühe geeni funktsiooni võivad asendada selle lähedased sugulased ja seega üksikmutantidel ei pruugi arengulisi defekte esineda. Edasi uurimiseks tuleks teha *IQD19* üleekspressiooniliinid ja uurida, kas ja kuidas see mõjutab õhulõhede mustreid lehtedes.

Õhulõhede tiheduse suhte katsest tuli välja, et idulehtede ülemise ja alumise külje õhulõhede tiheduse suhe võrreldes metsiktüübiga oli *iqd19-2* ja *iqd19-3* mutantidel statistiliselt oluliselt väiksem (Joonis 14). Kuna kahel liinil kolmest esines muutunud õhulõhede suhte fenotüüp, siis võib arvata, et seda põhjustab siiski *IQD19* funktsiooni häire. Täiskasvanud taime lehtede puhul sellist erinevust välja ei tulnud. Seega antud katsete põhjal võib arvata, et IQD19 valk reguleerib suuremal määral õhulõhede arengut just idulehtedes või on tema puudumise mõju suurem plaadil kõrge õhuniiskuse tingimustes arenenud lehtedes. Õhuniiskuse puhul on näidatud, et see võib mõjutada õhulõhede tiheduste suhet, mida on kirjeldatud Tulva jt. (2023, eeltrükk) ning Devi ja Reddy (2018) artiklites. Seega erinev õhuniiskus plaadil kasvatatud seemikute katses ja kasvukapis kasvatatud taimede katses võib selgitada, miks ühes katses esines erinevus õhulõhede tiheduste suhtes ja teises mitte. Teine võimalik põhjus tulemuste erinevustele idu- ja pärislehtedes võib tulla nende lehtede arengulisest eripärast, sellele viitavad ka varasemad uuringud. Õhulõhede suhe idu- ja pärislehtedes võib olla erinev (arutatud eeltrükis Jalakas jt., 2024) ja mutatsioonid õhulõhede arenguga seotud geenides mõjutavad idulehtedes õhulõhede arengut rohkem kui pärislehtedes (Dow jt., 2014). Selleks, et kindlalt väita, et IQD19 valk mõjutab õhulõhede varajast arengut ning

võib mõjutada ka põuakindlust või paremat süsihappegaasi omastamist, tuleks teha veel täiendavaid katseid ning suurema hulga taimedega. Edasistes uuringutes saaks taimi kasvatada erinevatel keskkonnatingimustel ning jälgida, kuidas vastava mutatsiooniga taimed sellele reageerivad.

KOKKUVÕTE

Varasemate uuringute tulemusena on leitud, et IQD-perekonna valgud mõjutavad epidermirakkude kuju ja arengut ning seonduvad mikrotorukestega. Seega võib arvata, et mõnel neist võib olla roll ka õhulõhede arengus. Selle töö eesmärgiks oli uurida, kas *IQD19* geeniekspressioon on sulgrakkudes aktiivne ning millistes taime osades see veel esineb ning kas *IQD19* mõjutab ka õhulõhede moodustumist. Geeni *IQD19* promootori aktiivsuse analüüsiks konstrueerisin pIQD19-GUS reportersüsteemi sisaldavad transgeensed taimeliinid.

Käesolevas töös tehtud katsete tulemused näitasid, et *IQD19* promootor on aktiivne õhulõhedes, aga ka õhulõhedega külgnevates epidermirakkudes. *IQD19* ekspressioon õhulõhedes ja nendega külgnevates rakkudes viitab tema rollile õhulõhede arengus ja/või funktsioonis.

Seemikutes oli õhulõhede tihedus muutunud ainult ühel *iqd19* mutantsel taimeliinil ja teistel see metsiktüübist ei erinenud, mis viitab, et erinevuse põhjuseks ei olnud *IQD19* funktsiooni häire. Seega ei mõjutanud *IQD19* funktsiooni häire õhulõhede tihedust ei seemikutes ega täiskasvanud taimedes. Kaks *IQD19*-defektset taimeliini kolmest olid madalama õhulõhede tiheduste suhtega seemikutes, kuid mitte täiskasvanud taimede lehtedes, mis viitab, et *IQD19* mõjutab õhulõhede paigutumist lehe ülemise ja alumise külje vahel sõltuvalt lehe tüübist ja/või kasvutingimustest.

Tulemuste põhjal võib järeldada, et *IQD19* geeni promootor on aktiivne õhulõhedes, aga ka epidermirakkudes, juhtsoontes, juurtes ning tolmukaniidis. See näitab, et sel geenil võib olla potentsiaalselt oluline roll taime arengus erinevates taime osades. Selleks, et täpselt teada, kuidas see geen taime arengut erinevates taime osades mõjutab, tuleks teha täiendavaid katseid. Näiteks tasuks luua ja analüüsida geeni *IQD19* üleekspressiooniga taimeliine, kuna teised uuringud IQD-dega on näidanud, et tihti just nende üleekspressioonil on oluline mõju arengule. Samuti tasuks erinevate *IQD19* geeni mutatsioonidega taimi kasvatada erinevates keskkonnatingimustes (näiteks erinevad niiskustingimused) ning jälgida, kuidas taim sellisel juhul reageeriks.

RESÜMEE

Gene expression pattern and role of the *IQD19* in stomatal development in *Arabidopsis thaliana*

Marilyn Poogen

Summary

Stomata are formed by two guard cells and the opening between them. Stomata control plant gas-exchange and its response to changes in environmental conditions. If we understand how different proteins affect the development of the plant, including the amount and location of stomata, it is possible to understand how plants react to changes in the environment, and we could use this knowledge for breeding climate-resilient plants.

The aim of this work was to investigate the activity of the *IQD19* promoter in plants, with a special focus on stomata and stomatal lineage cells, and to see if loss-of-function of this gene affects stomatal development, including stomatal density and ratio.

I conducted experiments on the model plant *Arabidopsis thaliana*. Since previous studies have shown that IQD family proteins have an important role in plant epidermal development, I constructed transgenic plants expressing the *IQD19* promoter-GUS reporter system to investigate the expression pattern of the *IQD19* gene in plants. *IQD19* promoter was active in guard cells, some epidermal cells, vasculature, roots, as well as in anther filaments of adult plants. This indicates that this gene may have a potentially important role in plant development in different parts of the plant. I also investigated the role of *IQD19* in stomatal development using *iqd19* mutants and found that *iqd19* mutations did not affect stomatal density but reduced the stomatal density ratio in cotyledons of plate-grown seedlings. This may imply that the effect of IQD on stomatal arrangement in leaves depends on environmental conditions. In further experiments, it would be important to study stomatal patterning in plants overexpressing the *IQD19* gene and analyse their responses to different environmental conditions.

TÄNUAVALDUSED

Soovin südamest tänada enda juhendajat Hanna Hõrakut, kes oli alati abivalmis ning toetav sel tähtsal teekonnal. Kõikidele küsimustele oli tal alati vastus olemas koos põhjaliku selgitusega ning tema positiivne energia andis palju motivatsiooni. Lisaks soovin tänada ka Mikk Välbet ning Ingmar Tulvat, tänu kellele katseteks vajalikud materjalid ning aparatuurid olid olemas ning aitasid vajalikud vahendid üles leida. Lõpetuseks soovin tänada ka ülejäänud laboritöötajaid toreda seltskonna eest.

KIRJANDUSE LOETELU

- Abel S., Savchenko T., Levy M. (2005). Genome-wide comparative analysis of the IQD gene families in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *BMC Evolutionary Biology*, 20, 5-72.
- Abel S., Bürstenbinder K., Müller J. (2013). The emerging function of IQD proteins as scaffolds in cellular signaling and trafficking. *Plant Signaling and Behavior*, 8(6). DOI: 10.4161/psb.24369.
- Bergmann D. C., Lau O. S. (2012). Stomatal development: a plant's perspective on cell polarity, cell fate transitions and intercellular communication. *Development*, 139(20), 3683-3692. DOI: 10.1242/dev.080523.
- Bergmann D. C., Sack F. D. (2007). Stomatal Development. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 163-181. DOI: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.104023.
- Bürstenbinder K., Savchenko T., Müller J. (2013). Arabidopsis Calmodulin-binding Protein IQ67-Domain 1 Localizes to Microtubules and Interacts with Kinesin Light Chain-related Protein-1. *Plant Biology*, 288(3), 1871-1882. DOI: 10.1074/jbc.M112.396200.
- Bürstenbinder K., Mitra D., Quefwer J. (2017a). Functions of *IQD* proteins as hubs in cellular calcium and auxin signaling: A toolbox for shape formation and tissue-specification in plants? *Plant Signaling & Behavior*, 12(6). DOI: 10.1080/15592324.2017.1331198.
- Bürstenbinder K., Möller B., Plötner R., Stamm G., Hause G., Mitra D., Steffen A. (2017b). The *IQD* Family of Calmodulin-Binding Proteins Links Calcium Signaling to Microtubules, Membrane Subdomains, and the Nucleus. *Plant Physiology*, 173(3), 1692–1708. DOI: 10.1104/pp.16.01743.
- Chandler J.W. (2015). Auxin response factors. *Plant, cell and Environment*, 39(5), 1014-1028. DOI: 10.1111/pce.12662.
- Devi M. J., Reddy V. R. (2018). Transpiration Response of Cotton to Vapor Pressure Deficit and Its Relationship With Stomatal Traits. *Frontiers in Plant Science*, 9. DOI: 10.3389/fpls.2018.01572.
- Dong J., MacAlister C. A., Bergmann D. C. (2009). BASL Controls Asymmetric Cell Division in Arabidopsis. *Cell*, 137(7), 1320-1330. DOI: 10.1016/j.cell.2009.04.018.

Driesen E., Ende W. V. d., Proft M., D., Saets W. (2020). Influence of Environmental Factors Light, CO₂, Temperature and Relative Humidity on Stomatal Opening and Development. *Argonomy*, 10(12), 1975. DOI: 10.3390/argonomy10121975.

Feng X., Pan S., Tu H., ... Hu H. (2022). IQ67 DOMAIN protein 21 is critical for indentation formation in pavement cell morphogenesis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 65(3), 721-738. DOI: 10.1111/jipb.13393.

Geisler M., Sack F. D., Nadeau J. (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. DOI: 10.1105/tpc.12.11.2075.

Guo C., Zhou J., Li D. (2021a). New Insights Into Functions of IQ67-Domain Proteins. *Plant Science*, volume 18(11). DOI: 10.3389/fpls.2020.614851.

Guo X., Wang L., Dong J. (2021b) Establishing asymmetry: stomatal division and differentiation in plants. *New Phytologist*, 232(1), 60-67. DOI: 10.1111/nph.17613.

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 and Development*, 21(14), 1720-1725. DOI:10.1101/gad.1550707.

Houbaert A., Zhang C., Tiwari M., ... Russinova E. (2018). POLAR-guided signalling complex assembly and localization drive asymmetric cell division. *Nature*, 563, 574-578.

Hronkova M., Wiesneriva D., Šimkova M., Skupa P., Dewitte W., Vrablova M., Zažimalova E., Šantrucek J. (2015). Light-induced STOMAGEN-mediated stomatal development in *Arabidopsis* leaves. *Journal of Experimental Botany*, 66(15), 4621-4630. DOI: 10.1093/jxb/erv233.

Hunt L., Gray J. E. (2009). The Signaling Peptide EPF2 Controls Asymmetric Cell Divisions during Stomatal Development. *Current Biology*, 19(10), pages 864-869. DOI: 10.1016/j.cub.2009.03.069.

Jalakas P., Tulva I., Berzina N. M., Hörak H. (2024). Stomatal patterning is differently regulated in adaxial and abaxial epidermis in *Arabidopsis*. *BioRxiv*. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.02.22.581564v1> ligipääs 27.05.2024

Kumari P., Dahiya P., Livanos P., ... Bürstenbinder K. (2021). IQ67 DOMAIN proteins facilitate preprophase band formation and division-plane orientation. *Nature Plants*, 7, 739-747.

- Kwak J. M, Mäser P., Schroeder J. I. (2008). The Clickable Guard Cell, Version II: Interactive Model of Guard Cell Signal Transduction Mechanisms and Pathways. *The Arabidopsis Book* 6: e0114.
- Larkin J. C., Young N., Prigge M., David Marka M. (1996). The control of trichome spacing and number in Arabidopsis. *Development*, 122(3), 997-1005. DOI: 10.1242/dev.122.3.997.
- Lavy M., Estelle M. (2016). Mechanisms of auxin signaling. *Development*, 143(18), 3226-3229. DOI: 10.1242/dev.131870.
- Li Y., Huang Y., Wen Y., An L., Yu F., Liu X. (2021). The doimain of unknown function 4005 (DUF4005) in an Arabidopsis IQD protein functions in microtubule binding. *Journal of biological chemistry*, 297(1). DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100849.
- Liang H., Zhang Y., Martinez P., Rasmussen C. G., Xu T., Yang Z. (2018). The Microtubule–Associated Protein IQ67 DOMAIN5 Modulates Microtubule Dynamics and Pavement Cell Shape. *Plant Physiology*, 177(4), 1555-1568. DOI: 10.1104/pp.18.00558.
- Mitra D., Klemm S., Kumari P., Queqwer J., Möller B., Poeschl Y., Pflug P., Stamm G., Abel S., Bürstenbinder K. (2019). Microtubule–associated protein IQ67 DOMAIN5 regulates morphogenesis of leaf pavement cell in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 70(2), 529–543. DOI: 10.1093/jxb/ery395.
- Muir C. D. (2015). Making pore choices: repeated regime shifts in stomatal ratio. *Proceedings of the Royal Society B*, 282. DOI: 10.1098/rspb.2015.1498.
- Naudeau J. A., Sack F. D. (2002). Stomatal Development in Arabidopsis. *Arabidopsis Book*. 1: e0066.
- Ohashi–Ito K., Bergmann D. C. (2006). Arabidopsis Fama Controls the Final Proliferation/Differentiation Switch during Stomatal Development. *The Plant Cell*, 18(10), 2493-2505. DOI: 10.1105/tpc.106.046136.
- Pillitteri L. J., Sloan D. B., Bogenschutz N. L., Torii K. U. (2007) Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. *Nature*, 445, 501-505.
- Pillitteri L. J., Peterson K. M., Horst R. J., Torii K. U. (2011). Molecular Profiling of Stomatal Meristemoids Reveals New Component of Asymmetric Cell Division and Commonalities among

- Stem Cell Populations in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 23(9), 3260-3275. DOI: 10.1105/tpc.111.088583.
- Pillitteri L. J., Torii K. U. (2012) Mechanisms of Stomatal Development. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 591-614. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042811-105451.
- Robinson S., Reuille P. B. D., Chan J., Bergmann D., Prusinkiewicz P., Coen E. (2011). Generation of Spatial Patterns Through Cell Polarity Switching. *Science*, 333(6048), 1436-1440. DOI: 10.1126/science.1202185.
- Rowe M. H., Dong J., Weimer A. K., Bergmann D., C. (2019). A Plant-Specific Polarity Module Establishes Cell Fate Asymmetry in the Arabidopsis Stomatal Lineage. *BioRxiv*. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/614636v1> ligipääs 27.05.2024.
- Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9, 671–675.
- Serna L., Torres-Contreras J., Fenoll C. (2002). Clonal Analysis of Stomatal Development and Patterning in Arabidopsis Leaves. *Developmental Biology*, 241(1), 24-33. DOI: 10.1006/DBIO.2001.0506.
- Suzuki A., Ohno S. (2006). The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *Journal of Cell Science*, 119(6), 979-987. DOI: 10.1242/jcs.02898.
- Ticha I. (1982). Photosynthetic characteristics during ontogenesis of leaves. 7. Stomata density and sizes. *Photosynthetica*, 16(3), 375-471.
- Tulva I., Koolmeister K., Hörak H. (2023). Low relative air humidity and increased stomatal density independently hamper growth in young Arabidopsis. *BioRxiv*. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.10.24.563715v1.full> ligipääs 27.05.2024.
- Wallner E. S., Dolan L., Bergmann D. C. (2023). Arabidopsis stomatal lineage cells establish bipolarity and segregate differential signaling capacity to regulate stem cell potential. *Developmental Cell*, 58(18), 1643-1656. DOI: 10.1016/j.devcel.2023.07.024.

Wang L., Li H., Lv X., ... Lin J. (2015). Spatiotemporal Dynamics of the BRI1 Receptor and its Regulation by Membrane Microdomains in Living Arabidopsis Cell. *Molecular Plant*, volume 8(9), 1334-1349. DOI: 10.1016/j.molp.2015.04.005.

Welsh E. M. (2021). Function of IQD proteins in shoot organ growth. <https://ueaeprints.uea.ac.uk/id/eprint/81751/1/2021McKechie-WelshEPHD.pdf> ligipäas 27.05.2024.

Wendrich J. R., Yang B. J., Mijnhout P., Xue H. W., Weijers D. (2018). IQD proteins integrate auxin and calcium signalling to regulate microtubule dynamics during *Arabidopsis* development. *BioRxiv*. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/275560v1> ligipäas 27.05.2024.

Woodward F. I. (1987). Stomatal numbers are sensitive to increases in CO₂ from pre-industrial levels. *Nature*, 327, 617–618.

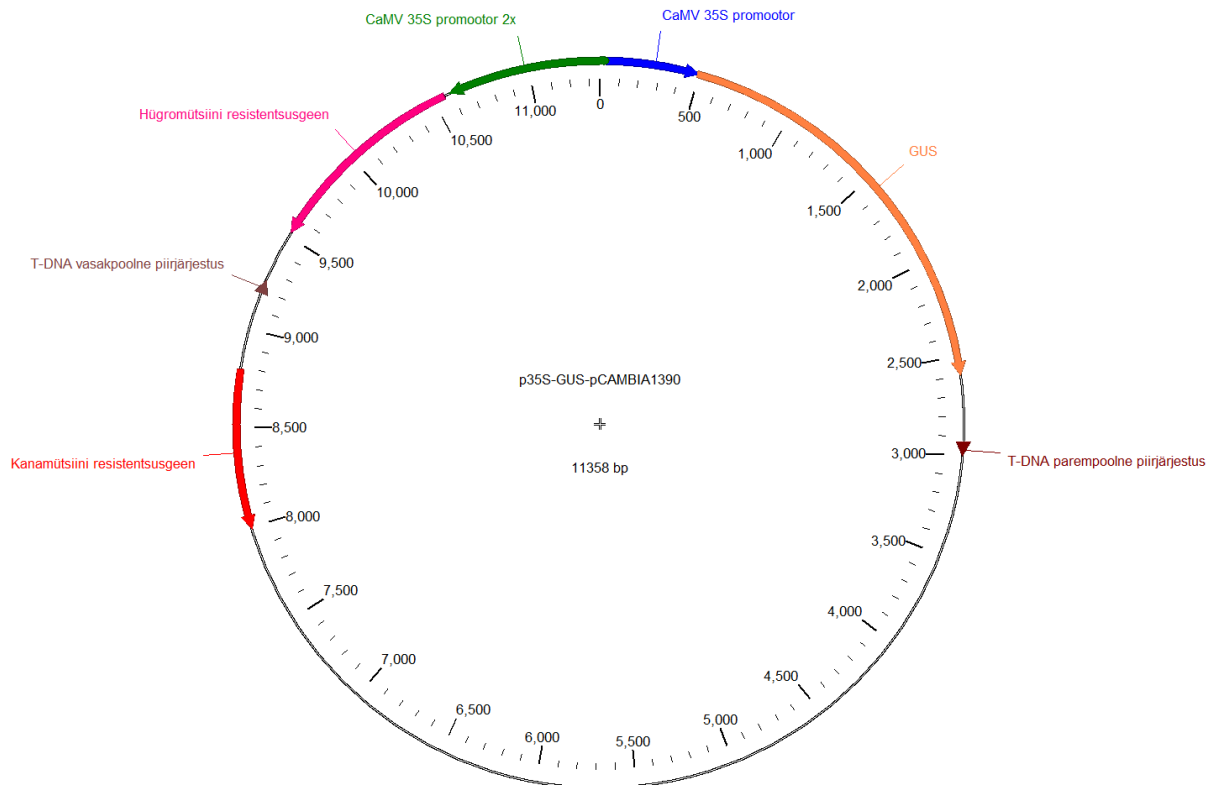
Töös kasutatud veebiallikad

arabidopsis.org ligipäas 23.05.2024

https://microscopy.tamu.edu/wp-content/uploads/2018/08/GUS_Localization_in_plants.pdf
ligipäas 23.05.2024

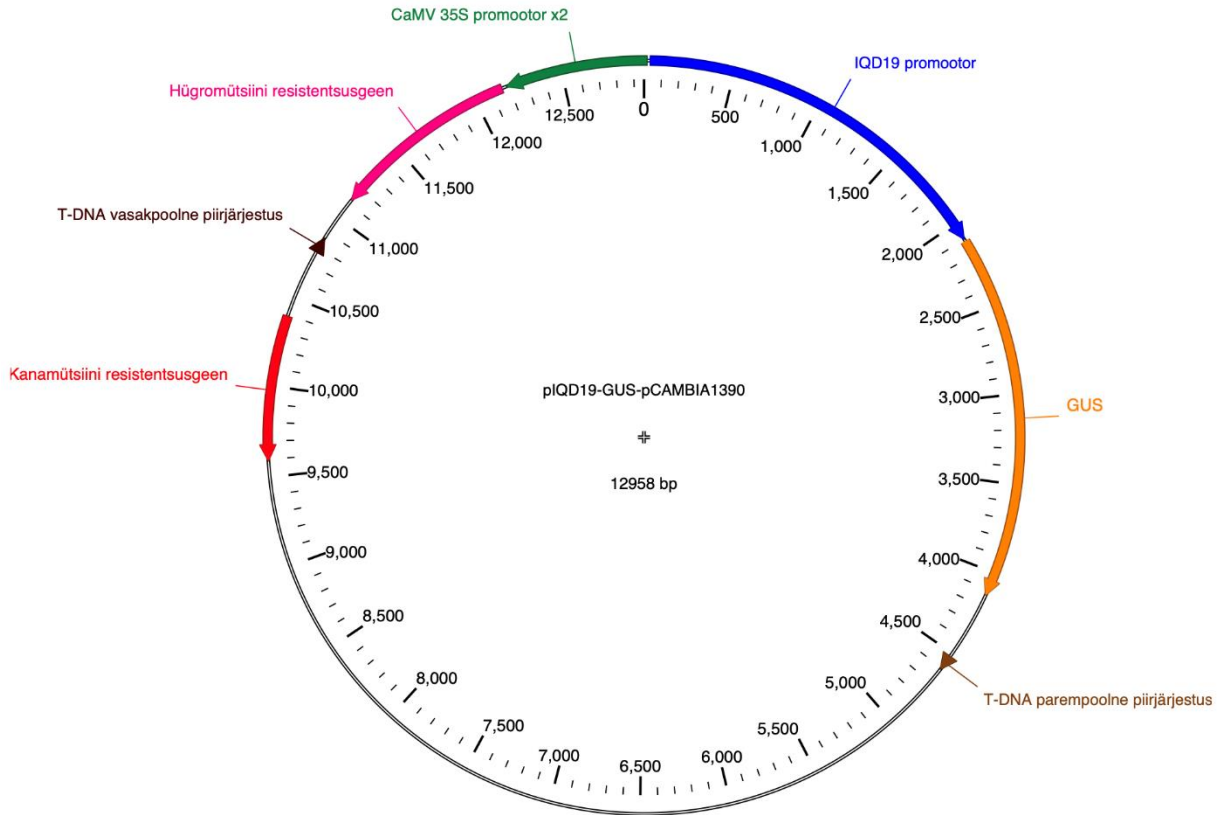
LISAD

Lisa 1. Plasmiid p35S-GUS-pCAMBIA1390



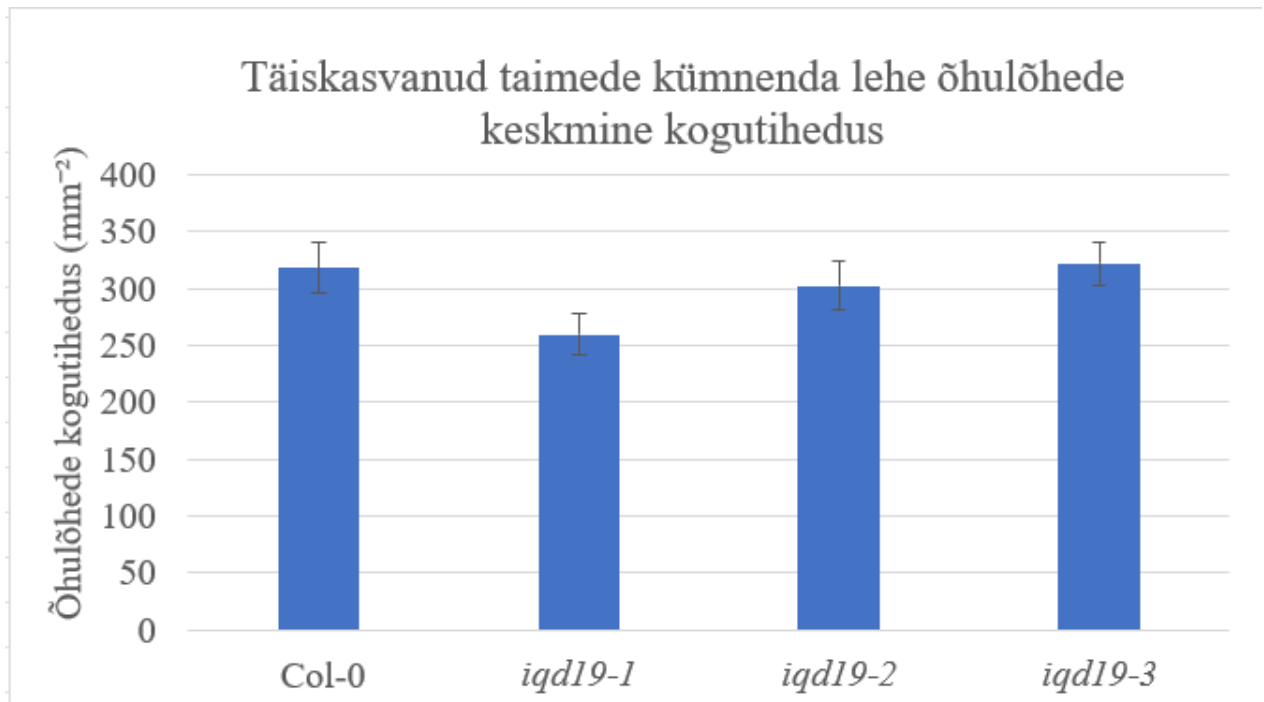
Joonis 1. p35S-GUS-pCAMBIA1390 plasmiid. Joonisel on toodud plasmidi olulisemad osad. Plasmidi kasutati klonerimisel algvektorina ja asendati selles GUS geeni ees paiknev CaMV 35S promootor *IQD19* promootoriga.

Lisa 2. Plasmiid pIQD19–GUS–pCAMBIA1390



Joonis 2. pIQD19–GUS–pCAMBIA1390 plasmiid. Joonisel on toodud plasmidi olulisemad osad. T–DNA piirjärjestuste vahel paiknev ala siseneb transformatsiooni käigus taime genoomi.

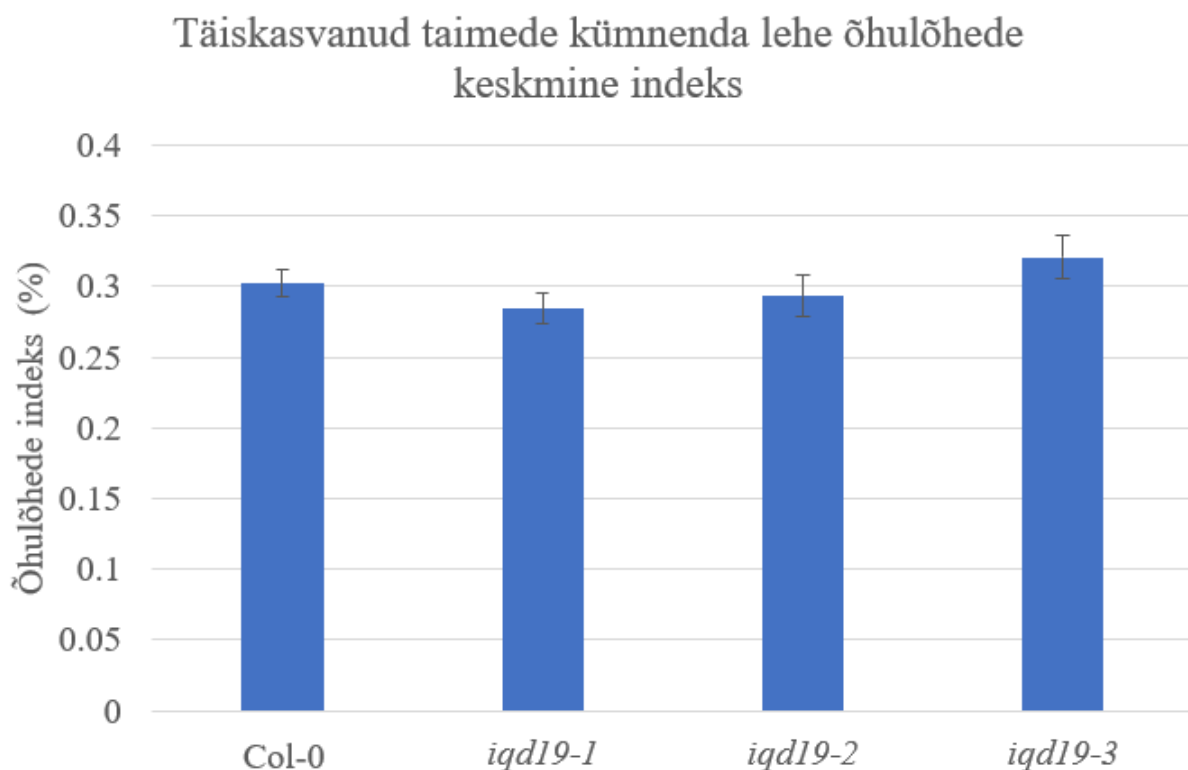
Lisa 3. Täiskasvanud taimede kümnenda lehe õhulõhede kogutihedus



Joonis 3. Täiskasvanud taimede kümnenda lehe õhulõhede keskmine kogutihedus.

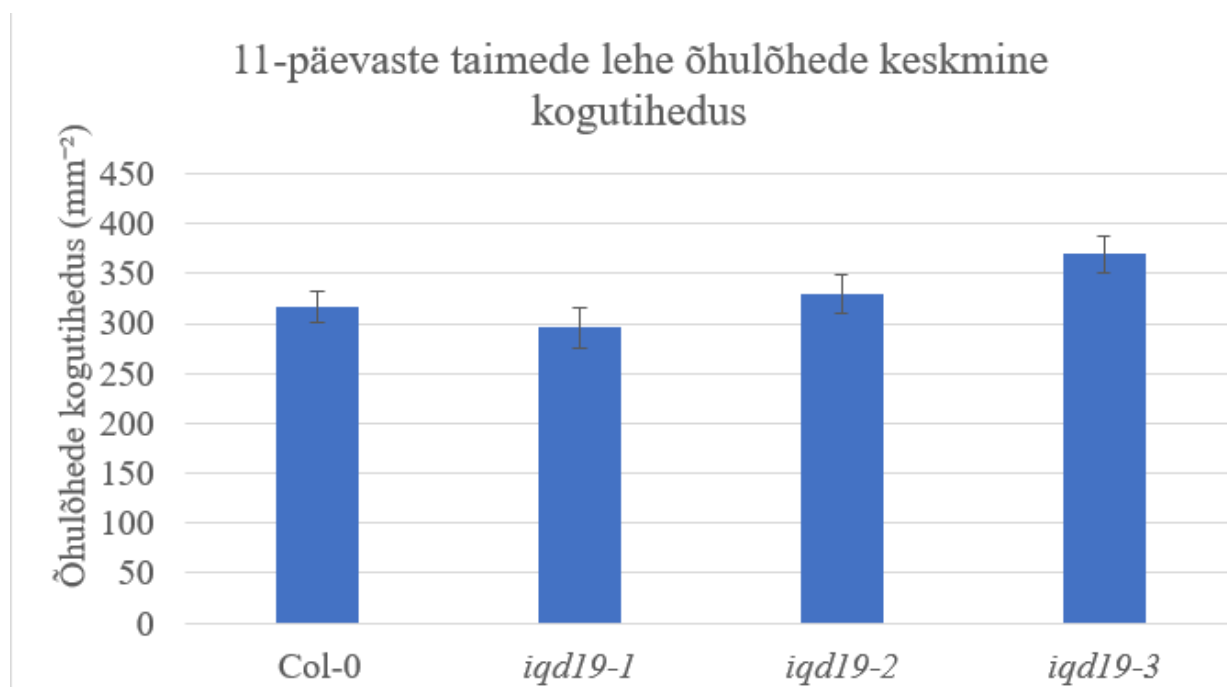
Diagrammidel on näidatud lehe ülemise ja alumise külje õhulõhede keskmist kogutihedust. Tulpadel olevad vearistid näitavad standardviga. Ühefaktorilise dispersioonanalüüsiga rühmade vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud. Valimi suurus oli 11-16 taime iga taimeliini kohta.

Lisa 4. Täiskasvanud taimede kümnenda lehe õhulõhede indeks



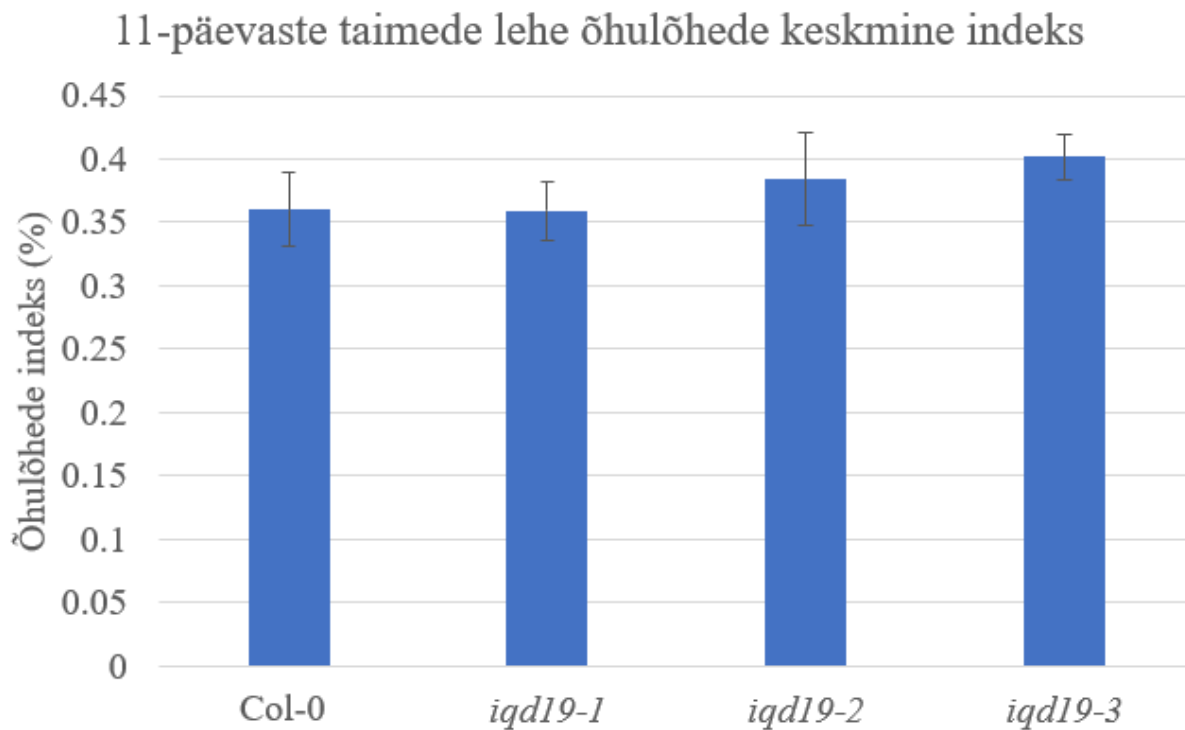
Joonis 4. Täiskasvanud taimede kümnenda lehe õhulõhede indeks. Diagrammidel on näidatud lehe ülemise ja alumise külje õhulõhede keskmist indeksit (õhulõhede proportsioon kõigist epidermirakkudest). Tulpadel olevad vearistid näitavad standardviga. Ühefaktorilise dispersioonanalüüsiga rühmade vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud. Valimi suurus oli 11-16 taime iga taimeliini kohta.

Lisa 5. 11-päevaste taimede idulehtede õhulõhede kogutihedus



Joonis 5. 11-päevaste taimede idulehe õhulõhede kogutihedus. Diagrammidel on näidatud lehe ülemise ja alumise külje õhulõhede keskmist kogutihedust. Tulpadel olevad vearistid näitavad standardviga. Ühefaktorilise dispersioonanalüüsiga rühmade vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud. Valimi suurus oli 5-7 taime iga taimeliini kohta.

Lisa 6. 11-päevaste taimede idulehe õhulõhede indeks



Joonis 6. 11-päevaste taimede idulehe õhulõhede indeks. Diagrammidel on näidatud lehe ülemise ja alumise külje õhulõhede keskmist indeksit (õhulõhede proportsioon kõigist epidermirakkudest). Tulpadel olevad vearistid näitavad standardviga. Ühefaktorilise dispersioonanalüüsiga rühmade vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud. Valimi suurus oli 5-7 taime iga taimeliini kohta.

LIHTLITSENTS

Mina, Marilin Poogen,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose “*IQD19* geeni ekspressioonimuster ja roll hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) õhulõhede arengus”, 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 Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Marilin Poogen

26.05.2024