

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

**Õhulõhede regulatsiooni uurimine epidermise lõikude ja gaasivahetusmeetodite  
võrdluses harilikus müürloogas abstsessiidide toimetel**

Bakalaureusetöö

(12 EAP)

Jaanika Unt

Juhendajad Maris Nuhkat MSc

Hannes Kollist PhD

TARTU 2018

## **Õhulõhede avatuse muudu võrdlus epidermise lõikude ja gaasivahetusmeetodite vahel harilikus müürloogas abstsiihappe toimel**

Taimed reguleerivad fotosünteesiks vajaliku süsihappegaasi sisenemist ja transpiratsioonil väljuva veeauru hulka, sulgedes ja avades õhulõhesid. Töö eesmärgiks oli Tartu Ülikooli Taimsesignaali uurimisrühmas sisse töötada meetodika õhulõhede avatuse mõõtmiseks isoleeritud epidermiselõikudega. Tulemusi võrreldi tervetest taimedest mõõdetud gaasivahetusandmetega. Stiimulina kasutati. Kahe katsemeetodiga võrreldi õhulõhesid sulguma ajendava fütohormooni abstsiihappe (ABA) toimet *Arabidopsis thaliana* ABA signaal- ja biosünteesiraja mutantidel *ost2-2D*, *ost1-3*, *nced3/5* ja metsiktüüpi Col-0 liinil. Isoleeritud epidermisega tehtud katsetes täheldati väiksemat ABA põhjustatud õhulõhede sulgumist kui gaasivahetuskatsetega saadud tulemustes. Ilmnes ka erinevusi mutantide õhulõhede käitumisel terves taimes ja isoleeritud epidermises. Saadud tulemused näitavad, et õhulõhede regulatsiooni paremaks iseloomustamiseks on kasulik rakendada erinevaid meetodikaid.

Märksõnad: õhulõhed, abstsiihappe, epidermise katsed, gaasivahetus

CERCS kood: CERCS kood: B225 – Taimeneetika

### **Comparison of stomatal regulation between epidermal peel and gas-exchange experiments in thale cress in response to abscisic acid**

Plants regulate the balance of CO<sub>2</sub> uptake and transpiration by opening and closing stomatal pores. In studying the specifics of stomatal regulation, various experimental methods have yielded conflicting results. The aim of this thesis was to develop an experimental technique to study stomatal regulation in isolated epidermal peels. Obtained results were compared with experiments of intact plant gas exchange. The experimental stimulus was abscisic acid (ABA), a plant hormone responsible for stomatal closure. *Arabidopsis thaliana* mutants with deficiencies in stomatal closure and/or ABA signalling or synthesis were used as subjects — *ost2-2D*, *ost1-3* and *nced3/5*. These were compared to the wild-type Col-0 strain. Differences in the behaviour of stomata in isolated epidermal peels and whole plants and the smaller extent of stomatal closure observed in epidermal peels point to the benefits of using different methods in parallel to study stomatal behaviour.

Key words: stomata, abscisic acid, epidermal peels, gas-exchange

CERCS code: B225 – Plant genetics

# SISUKORD

SISUKORD.....	3
TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID: .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	8
1.1 Õhulõhed .....	8
1.2 Õhulõhede regulatsioon.....	9
1.2.1 Õhulõhede avanemine .....	9
1.2.2 Õhulõhede sulgumine.....	10
1.3 Abstsiihape.....	12
1.3.1 ABA transport taimedes .....	13
1.3.2 ABA biosüntees.....	14
1.4 Õhulõhede käitumine sõltuvalt katsemeetodist .....	15
1.4.1 Erinevad katsemeetodid .....	15
1.4.2 Erinevused katsemeetodite vahel .....	16
1.4.3 ABA toime sulgrakkudele katsetes .....	16
1.5 Kasutatud taimeliinid.....	18
<i>OST2-2D</i> .....	18
<i>OST1-3</i> .....	18
<i>NCED3/5</i> .....	19
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	20
2.1 Töö eesmärgid .....	20
2.2 Materjal ja meetodika .....	20
2.2.1 Taimede kasvatamine .....	20
2.2.2 Katseaparatuur gaasivahetuskatseteks.....	21
2.2.3 Epidermisekatsete läbiviimine .....	23
2.2.4 Andmeanalüüs .....	24

3. TULEMUSED JA ARUTELU.....	26
3.1 Kasutatud taimeliinide fenotüübid .....	26
3.2 Pilootkatse epidermise lõikudega .....	27
3.3 Õhulõhede avatused kontrollkatsetes .....	28
3.4 Mutantide õhulõhede juhtivus tavatingimustel.....	29
3.5 Gaasivahetuskatsed ABA toimel .....	31
3.6 ABA vastus õhulõhedes epidermise lõikudel.....	32
3.7 Epidermisekatsete rakendamise ja edasiarendamise .....	36
KOKKUVÕTE.....	38
RESÜMEE .....	39
TÄNUSÕNAD .....	41
KIRJANDUSE LOETELU .....	42
LISAD .....	50
LIHTLITSENTS .....	51

## TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID:

AAO3 - Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (abstsiisaldehyüdi oksüdaas)

ABA – Abstsiishape

ABA2 - ARABIDOPSIS THALIANA ABA DEFICIENT 2

ABCG25/40 – ATP-BINDING CASSETTE FROM SUBFAMILY G 25/40

ABI1/2 – ABA INSENSITIVE 1/2

AHA1-11 – *Arabidopsis thaliana* plasma membraane H<sup>+</sup>-ATPase isoforms 1-11

AKT1 – ARABIDOPSIS THALIANA K<sup>+</sup> TRANSPORTER 1

ALMT12 – ALUMINIUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 12

ANOVA – Dispersioonanalüüs (*analysis of variance*)

*cdi3* – *Carbon Dioxide Insensitive 3*

Col-0 – *Arabidopsis thaliana* Columbia metsiktüüpi liin

CPK – Ca<sup>2+</sup>-DEPENDENT PROTEIN KINASE

GORK – GATED OUTWARDLY RECTIFYING K<sup>+</sup> CHANNEL

H<sup>+</sup>-ATPaas – ATP energiat vajav H<sup>+</sup> kanal

KAT1/2 – POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 1/2

NCED – 9-*cis*-epoksükarotenoidi dioksügenaas

*nced3/5* – 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase 3/5, Col-0 taustaga T-DNA topelmutant

NCED3/NCED5 – NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 3/5

NRT1/PTR – NITRATE TRANSPORTER 1/ PEPTIDE TRANSPORTER

OST1 – OPEN STOMATA 1

*ost1-3* – *open stomata 1*, Col-0 taustaga T-DNA mutant

*ost2-2D* – *open stomata 2*, mutant Col-0 taustaga

PHOT1/2 – PHOTOTROPIN 1/2

*ppm* – parts per million (osakest miljoni osakese kohta)

PYR/PYL/RCAR – PYRABACTIN RESISTANCE/PYR1-LIKE/REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR

QUAC1 – QUICKLY-ACTIVATING ANION CHANNEL 1

*rcd3* – *Radical-induced cell death 3*

SEM – *Standard Error of the Mean* (aritmeetilise keskmise standardviga)

SLAC1 – SLOW ANION CHANNEL ASSOCIATED 1

SLAC1 – SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1

SLAH3 – SLAC1 HOMOLOGUE 3

SnRK2E/SnRK2.6 – SNF1-RELATED PROTEIN KINASE

ZEP - zeaksantiini epoksüdaas

VDP – vapour-pressure deficit (veeauru rõhu defitsiit)

## SISSEJUHATUS

Õhulõhed on avased taimede lehtedel ja vartel, mida ümbritsevad kaks sulgrakku. Läbi õhulõhede toimub taimede gaasivahetus ümbritseva keskkonnaga. Fotosünteesiks vajaliku süsihappegaasi ja transpiratsioonil väljuva vee hulka reguleeritakse sulgrakkude avamise ja sulgemisega. Sulgrakud kaitsevad taime ka patogeenide ja rakku sisenevate saasteainete eest. Nimetatud põhjuste tõttu on õhulõhede regulatsioon oluline taime arenguks ja kasvuks.

Õhulõhede avatus sõltub erinevatest stiimulitest, näiteks õhuniiskusest, süsihappegaasi ja osooni kontsentratsioonist, valgusintensiivsusest ning hormoonidest. Õhulõhede avanemiseks liiguvad sulgrakkudesse ioonid ja vesi, misjärel tõuseb turgorrõhk, sulgrakud paisuvad, toimub nende väljapoole kõverdumine ja õhulõhe avaneb. Sulgumiseks toimub ionide ja vee liikumine vastupidi: raku seest rakust välja.

Õhulõhede regulatsioon on keerukas süsteem, sisaldades mitmeid erinevaid signaaliradu sulgrakkude sees, mis tunnetavad muutusi nii ümbritsevas keskkonnas kui reageerivad ka teistest kudetest ja taimeosadest pärinevatele signaalidele. Sulgrakkude käitumist vastusena keskkonnastiimulitele uuritakse erinevate meetoditega, mis kasutavad mõõtmisobjektina kas tervet taime, lehte või lehelt eraldatud epidermist ning hindavad õhulõhede avatust kas otseselt õhulõhe poori muutuse mõõtmisega või kaudselt lehepinna transpiratsiooni põhjal.

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli võrrelda kahte õhulõhede regulatsiooni hindavat meetodit: mõõtes õhulõhede avatust isoleeritud epidermises ja jälgides tervete taimede gaasivahetust. Epidermise katsed sooritati uurimisgrupis esmakordselt ning on mõeldud teed rajama järgnevatele sarnastele töödele. Katsetes kasutati õhulõhede sulgumist esilekutsuva stiimulina fütohormoon abtsiishapet ja uuriti selle mõju nimetatud hormooni regulatsiooni- ja biosünteesirajas häiritud taimebioloogia mudelorganismi *Arabidopsis thaliana* mutantides.

Töö koostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi Taimesignaalide uurimisrühmas.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Õhulõhed

Veekao vähendamiseks katab taimi vahajas vett mitteläbilaskev kiht kutiikula (Jones jt., 2013; Araujo jt., 2013). Lehtedelt auruvast veest üksnes ligi 5% pääseb läbi kutiikula keskkonda (Taiz ja Zeiger, 2002). Vee- ja gaasivahetuse eest taime ja ümbritseva atmosfääri vahel vastutavad selleks spetsiaalselt välja kujunenud poorid taimede pinnal – õhulõhed (Dong jt., 2010).

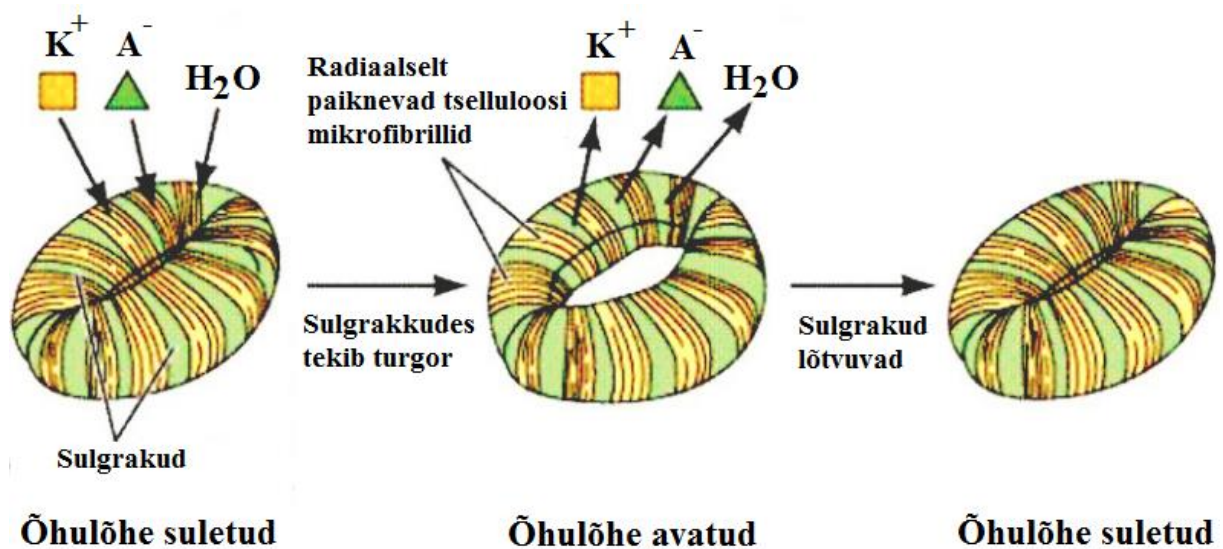
Õhulõhe kompleksi moodustavad kaks spetsialiseerunud sulgrakku, nende vahele jääv õhupilu ning paljude liikide puhul ka sulgrakke ümbritsevad kaasrakud (Taiz ja Zeiger, 2002). Taimebioloogia mudeltaime hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) sulgrakkudel kaasrakud puuduvad, neid ümbritsevad tavalised epidermiserakud. Õhulõhesid võib leida üle kogu taime võrse, kuid peamiselt esinevad need lehtede ja varte pinnal. (Jones jt., 2013). Lehtedel võivad õhulõhed paikneda nii alumisel kui ka ülemisel küljel. Harilikul müürloogal asetsevad õhulõhed peamiselt (65%) lehe alaküljel (Jones jt., 2013). Enamikel kaheidulehelistel taimedel on õhulõhed oakujulised pikkusega 10-80 µm ja laiusega 6-50 µm (Jones jt., 2013; Willmer ja Fricker, 1983).

Õhulõhede kaudu siseneb taime CO<sub>2</sub>, mis on vajalik fotosünteesiks. Samuti on õhulõhed olulised vee aurustumiseks, tagades taime läbiva ksüleemivoolu, mis kindlustab vee ning mineraalainete jaotumise taimes, ning vahendades taimede termoregulatsiooni (Dong jt., 2010). Taimede jaoks on oluline hoida tasakaalus läbi pooride siseneva CO<sub>2</sub> ja väljuva veeauru hulk.

Sulgrakkudele on iseloomulikud sisemised ja välimised lateraalsed seinapaksendused pooripoolsetel külgedel. Lisaks on neil radiaalselt paiknevad tselluloosi mikrofibrillid rakuseinte tugevdamiseks (Taiz ja Zeiger, 2002). Nimetatud tunnused võimaldavad sulgrakkudel muuta kuju vee sisse- või väljavoolul, mille tulemusel õhulõhed vastavalt avanevad või sulguvad (Jones jt., 2013). Täiendavalt sisaldavad sulgrakud erinevalt teistest epidermiserakkudest kloroplaste. Õhulõhed kaitsevad taime liigse veekao, patogeenide ja rakku sisenevate saasteainete eest (Kollist jt., 2011).

## 1.2 Õhulõhede regulatsioon

Õhulõhede avanemiseks liiguvad sulgrakkudesse ioonid ja vesi, mille tõttu toimub sulgrakkudes turgorrõhu tõus. Seeläbi sulgrakud paisuvad ja eemalduvad üksteisest, toimub nende väljapoole kõverdumine ja õhulõhe avaneb (Sharpe jt., 1987). Õhulõhede sulgumine toimub vastupidiselt – ioonid ja vesi transportitakse rakkudest välja (Jones jt., 2013). Ioonide ning teiste ainete kiireks transportimiseks läbi sulgraku plasmamembraanide on välja kujunenud pumpade, kotransporterite ja ionikanalite süsteem. Õhulõhed reageerivad vastusena muutuvatele keskkonnafaktoritele, näiteks valguse intensiivsus ja selle kvaliteet, suhteline õhuniiskus, CO<sub>2</sub> ning O<sub>3</sub> kontsentratsioon (Taiz ja Zeiger, 2002; Hetherington ja Woodward, 2013). Lisaks on sulgrakkude regulatsioonil oluline fütohormoon abstsissihape (edaspidi ABA) (Taiz ja Zeiger, 2002).



**Joonis 1** Õhulõhede sulgumine ja avanemine. (Joonis on modifitseeritud. Joonise algallikas: Purves jt., 1994) Nooled tähistavad katioonide (K<sup>+</sup>), anioonide (A<sup>-</sup>) ja vee liikumissunda õhulõhede regulatsioonil.

### 1.2.1 Õhulõhede avanemine

Sulgrakkude regulatsioonil oluliseimad osmootselt aktiivsed ained K<sup>+</sup>, sahharoos ja anioonid NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> ning malaat. Nende ainete kontsentratsiooni kasv sulgrakkudes vähendab veepotentsiaali. Vesi liigub difusiooni teel õhulõhesid ümbritsevatest kõrgema veepotentsiaaliga aladelt madalama veepotentsiaaliga sulgrakkudesse.

Õhulõhede avanemiseks on esmalt tarvis H<sup>+</sup>-ATPaaside (ATP energiat kasutav H<sup>+</sup> pump) vahendatud prootonite väljavool sulgrakkudest (Daszkowska-Golec ja Szarejko, 2013). *Arabidopsise* sulgrakkudes on ekspresseeritud 11 multigeense perekonna P<sub>3A</sub>-tüüpi ATPaasi,

mida nimetatakse vastavalt AHA1-AHA11 (*Arabidopsis thaliana* plasma membraane H<sup>+</sup>-ATPase isoforms 1-11) (Palmgren jt., 2001; Baxter jt., 2003.) Põhiliselt ekspresseeritakse sulgrakkude protoplastides AHA1, AHA2 ja AHA5 (Ueno jt., 2005). H<sup>+</sup>-ATPaaside töö on positiivselt reguleeritud sinise valguse ja fütohormoonide auksiinide poolt, seda inhibeerivad ABA ja Ca<sup>2+</sup> (Daszkowska-Golec ja Szarejko, 2013). Sinise valguse toimel autofosforüleeruvad harilikus müürloogas fotoretseptorid fototropiinid PHOT1 ja PHOT2 (PHOTOTROPIN 1/2). Nendes fototropiinides toimuv muutus algatab signaalülekanalid, mille tulemusena aktiveeritakse H<sup>+</sup>-ATPaas (Kinoshita jt., 2001).

H<sup>+</sup> väljavool tsütoplastmast hüperpolariseerib plasmamembraani, mis tagab K<sup>+</sup> ionide sissevoolu sulgrakkudesse läbi membraanpotentsiaalset sõltuvate spetsiifiliste kanalite (Assmann jt., 1985; Schroeder jt., 1987; Raschke jt., 1988). K<sup>+</sup> sissevoolu sulgrakkudesse vahendavad heteromeersed *Shaker*-tüüpi kanalid KAT1 (POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 1), KAT2 (POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 2), AKT1 (ARABIDOPSIS THALIANA K<sup>+</sup> TRANSPORTER 1) ja AKT2 (ARABIDOPSIS THALIANA K<sup>+</sup> TRANSPORTER 2) (Szyroki jt., 2001; Lebaudy jt., 2008; Hedrich, 2012). Kotransporterite tegevuse käigus liiguvad seejärel sulgrakkudesse ka Cl<sup>-</sup> ja NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, kuid nende transporterite molekulaarne taust on siiani teadmata (Pandey jt., 2007). Peamise anioonina osaleb õhulõhede avanemises tärglase lõhustamisel saadav malaat, mida teadaolevalt kannab sulgrakku ABC transporterite perekonda kuuluv ABCB14 (Lee jt., 2008).

### 1.2.2 Õhulõhede sulgumine

Õhulõhede sulgumisel on keskne roll anioonkanalitel, mis lülituvad ümber avatud ja suletud olekute vahel vastavalt teguritele, mis neid kontrollivad (Kollist jt., 2011). Anioonkanalite avanemine depolariseerib sulgrakkude plasmamembraani (Kwak jt., 2008). Membraanpotentsiaali muutus vallandab omakorda K<sup>+</sup> väljavoolu kanalid (Kim jt., 2010). Selle tulemusena langeb rakus veepotentsiaal, vesi väljub rakust, osmootne rõhk väheneb ning õhulõhed sulguvad (Kollist jt., 2011).

Õhulõhede plasmamembraanis paiknevad anioonkanalid jagatakse aktivatsiooniaja järgi aeglasteks (S-tüüpi) ja kiireteks (R-tüüpi) (Schroeder ja Keller, 1992). R-tüüpi pingesõltuvate kanalite aktivatsioon/deaktivatsioon toimub millisekundite jooksul (Keller jt., 1989; Hedrich jt., 1990). S-tüüpi nõrgalt pingesõltuvatel anioonkanalitel kestab aktivatsiooniperiood kümneid sekundeid (Schroeder ja Hagiwara, 1989). Peamised kirjeldatud anioonkanalid sulgrakkude plasmamembraanides on S-tüüpi SLAC1 (SLOW ANION CHANNEL

ASSOCIATED 1) ja selle homoloog SLAH3 (SLAC1 HOMOLOGUE 3) ning R-tüüpi ALMT12 (ALUMINIUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 12) ehk QUAC1 (QUICK-ACTIVATING ANION CHANNEL 1) (Vahisalu jt., 2008; Meyer jt., 2010; Geiger jt., 2011).

### 1.2.2.1 S-tüüpi anioonkanalite tööpõhimõte

SLAC1 isoleeriti geneetiliselt osoonitundlikust *rcd* (*Radical-induced Cell Death 3*) ja CO<sub>2</sub> mitte reageeriva *cdi3* (*Carbon Dioxide Insensitive 3*) hariliku müürlooga mutantidest (Kangasjärvi jt., 2005; Vahisalu jt., 2008; Negi jt., 2008). SLAC1 perekonda kuulub harilikus müürloogas viis erinevat valku. Sulgrakkude plasmamembraanis esinevad nendest SLAC1 ja SLAH3, mis mõlemad moodustavad S-tüüpi anioonkanaleid (Geiger jt., 2011). Funktsioneeriva SLAC1 mutantidel ei esine sulgrakkude vastust nii endogeensetele faktoritele kui ka keskkonnastiimulitele (Kollist jt., 2011). SLAC1 on vajalik õhulõhede sulgemiseks vastusena CO<sub>2</sub>, ABA, O<sub>3</sub>, valgus- ja niiskusmuutustele, Ca<sup>2+</sup> kontsentratsiooni tõusule, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ja NO (Vahisalu jt., 2008).

SLAC1 avanemisel vabanevad sulgrakkudest anioonid. Plasmamembraan depolariseerumisel aktiveeritakse GORK (GATED OUTWARDLY-RECTIFYING K<sup>+</sup> CHANNEL) kanalid, mis vabastavad K<sup>+</sup> sulgrakkudest. Koos kaaliumioonidega liigub sulgrakkudest välja vesi. Sulgrakkude ruumala väheneb ja õhulõhed sulguvad (Geiger jt., 2009).

Nii SLAC1 kui ka SLAH3 valgud aktiveeritakse fosforüleerimise teel (Geiger jt., 2009). Aktivatsioon saab toimuda Ca<sup>2+</sup> mittesõltuva proteiinkinaasi OST1 (OPEN STOMATA 1) või Ca<sup>2+</sup> sõltuva proteiinkinaasi (CPK) perekonna valkude poolt (Geiger jt., 2009; 2011). Mõlemad regulatsioonirajad on aktiveeritavad ABA poolt (Kollist jt., 2011, Geiger jt., 2011). OST1 vahendab nii S-tüüpi kui ka R-tüüpi anioonkanalite aktiivsust (Geiger jt., 2009; Lee jt., 2009; Imes jt., 2013). SLAH3 aktiveerimiseks on vajalik ka nitraat, mis annab põhjust arvata, et SLAH3 võib olla ühenduslüliks põuastressi ja nitraadi metabolismi ning signalisatsiooni vahel (Geiger jt., 2011, Zheng jt., 2015). Proteiinkinaas OST1, tuntud ka kui SnRK2E ja SnRK2.6 (*SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2*), on olulise tähtsusega SLAC1-sõltuva S-tüüpi anioonkanali täielikuks aktivatsiooniks (Geiger jt., 2009; Lee jt., 2009). OST1 fosforüleerib seriinjääke SLAC1 hüdrofiilses N-terminuse fragmendis anioonkanali aktiivsuse tagamiseks (Vahisalu jt., 2010).

SLAC1 fosforüleerivad kinaasid (OST1 ja CPK) on sulgrakkudes 2C proteiinfosfataaside (PP2C) kontrolli all, mis kuuluvad Mg<sup>2+</sup>- ja Mn<sup>2+</sup>- sõltuvate seriin-treoniin fosfataaside rühma

(Ma jt., 2009). Kirjeldatud klaster A–alarühma 2C proteiinfosfataasi rühma prototüüpideks on valgud ABI1 ja selle homoloog ABI2 (*ABA INSENSITIVE 1 AND 2*) (Merlot jt., 2001; Ma jt., 2009). PP2Cd interakteeruvad füüsiliselt erinevates kombinatsioonides SnRK2dega ning on võimelised inaktiveerima viimase läbi mitmete seriini-treoniini jääkide defosforüleerimise (Umezawa jt., 2009; Yoshida jt., 2006).

SnRK2 vabastamiseks PP2C-sõltuva negatiivse kontrolli alt on vajalikud PYR/PYL/RCAR (*PYRABACTIN RESISTANCE/ PYR1-LIKE/ REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTORS*) perekonna valkude seondumine PP2Cdega (Park jt., 2009; Umezawa jt., 2009). PYR/PYL/RCAR tüüpi valgud toimivad tsütosoolsete ABA retseptoritena, nende aktiveerimiseks on vajalik ABA olemasolu (Geiger jt., 2009; Ma jt., 2009; Park jt., 2009).

### 1.2.2.2 R-tüüpi kanalid

R-tüüpi ionkanaleid moodustavad valgud avastati alles hiljuti (Meyer jt., 2010, Sasaki jt., 2010). *Arabidopsis*es ekspresseeritakse 14 ALMT (*ALUMINIUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER*) geeniperekonna homoloogi, millest üksnes ALMT12 on kirjeldatud sulgrakkude plasmamembraanis (Kovermann jt., 2007; Meyer jt., 2010; Sasaki jt., 2010; Barbier-Brygoo jt., 2011). ALMT12 transpordib sulgrakkudes  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^-$  ja malaati (Meyer jt., 2010; Sasaki jt., 2010).

ALMT12 ei vaja aktiveerumiseks  $\text{Al}^{3+}$  olemasolu (Meyer jt., 2010). Seetõttu on esmane nimi eksitav ning selguse mõttes kasutatakse lühendit QUAC (*QUICK-ACTIVATING ANION CHANNEL*) (Hedrich jt., 1990; Kolb jt., 1995). ALMT12 mutantidel on halvenenud õhulõhede sulgumine vastusena pimedusele, kõrgenenud ABA,  $\text{CO}_2$  ja  $\text{Ca}^{2+}$  kontsentratsioonidele (Meyer jt., 2010). AtALMT12 mutantidega läbi viidud eksperimentide põhjal ei vastuta üksnes ALMT12 R-tüüpi anioonkanali moodustamise eest ning vajalikud on edasised katsed teiste komponentide väljaselgitamiseks.

## 1.3 Abstiishape

Abstiishape (ABA) on 15-süsinikuline terpenoid ja nõrk hape, mida kirjeldati esmakordselt juba 1960ndatel (Jones jt., 2013; Finkelstein, 2013). ABA on taimehormoon, mis osaleb taimedes mitmetes füsioloogilistes protsessides: embrüo arengus, seemnete idanemises, juurte ja võrsete kasvus, õite indutseerimises. Lisaks kujundab ABA vastust keskkonnastressidele, näiteks põud, soolsus, temperatuur, patogeenirünnak ning UV-kiirgus (Finkelstein, 2013). Vastupidiselt oma nimele ABA abstsissiooni ehk taimeosade eraldumist otsesel viisil esile ei

kutsu (Sharp jt., 2002). Antud töös keskenduti ABA poolt vahendatud õhulõhede sulgumisele, millele osutati juba 1969. aastal (Mittelhauser ja Van Steveninck, 1969).

Muutuvate keskkonnatingimuste tõttu on vaja reguleerivaid mehhanisme ABA taseme muutmiseks (Kim jt., 2010). See saavutatakse sulgrakkudes positiivse tagasiside põhimõttel (Bauer jt., 2013). Signaalmolekulina toimiva ABA kiired kontsentratsioonimuutused tagatakse selle vajaduspõhise sünteesi, lagundamise, molekuli inaktiveerimise ja kohaspetsiifilise transpordiga (Nambara ja Marion-Poll, 2005; Kim jt., 2010; Jones jt., 2013.) Osmootse stressi korral on võimalik ABA kontsentratsiooni kuni 30-kordne muutus (Harris jt., 1988).

### **1.3.1 ABA transport taimedes**

ABA transporti läbi plasmamembraani taimedes kinnitab selle leidumine ksüleemis (Boursiac jt 2013). Ksüleem koosneb surnud rakkudest ning seetõttu on selles ABA süntees välistatud. Samuti on tõestatud võrsetes sünteesitud ABA leidumine juurtes (Ikegami jt., 2009; Ernst jt., 2010; Goodger ja Schachtman, 2010). On näidatud ABA ja selle metaboliitide transporti nii rakusiseselt kui ka rakkudevaheliselt (Nambara ja Marion-Poll 2005; Seo ja Koshiba, 2011).

Kirjeldatud on kahte erinevat ABA transmembraanset liikumisviisi (Boursiac jt, 2013). Esimene põhineb ABA leidumisel rakkudes kahe erineva vormina: anioonsena (ABA<sup>-</sup>) ja protoneerituna (ABA-H). Nimelt sõltub protoneerituse suhe keskkonna happelisusest. Madalama pH-ga keskkonnas on ülekaalus ABA-H, mis suudab difundeeruda läbi lipiidse kaksikkihi transportereid vajamata. Tavatingimustel on soodustatud juurtes sünteesitud ABA difusioon rakkudesse ja ksüleemivedelik ei rikastu ABAga, mistõttu sihtkohaks olevatesse sulgrakkudesse see ei jõua (Boursiac jt., 2013). Stressitingimustes tõuseb ksüleemivedelikus ABA tase, mis suudab esile kutsuda õhulõhede sulgumise. Siiski on enamik ABA mittelaetud vormis ning seega jääb difusioon limiteerivaks etapiks ABA transpordil. Suurimaks takistuseks ABA liikumisel on selle väljumine rakkudest, mis anioonsle kujul ei läbi plasmamembraani. Siit järeldub vajadus ABA transpordiks selleks kindlate transporterite vahendusel, mis suudaksid tagada stabiilse hormooni liikumise.

Siiani on tuvastatud ABA transportereid kahest geeniperekonnast. 2010. aastal avastati hariliku müürlooga suurde ABC (ATP-BINDING CASSETTE) perekonda kuuluvad transporterid AtABCG25 ja AtABCG40 (Verrier jt., 2008; Kuromori jt., 2010; Kang jt., 2010). ABCG25 promootori aktiivsuse järgi on tehtud kindlaks, et vastav transporter paikneb juhtkudede plasmamembraanis ja on vastutav ABA juhtimise eest juhtkudedest välja

(Kuromori jt., 2010). ABCG40 on tugevalt ekspresseeritud sulgrakkudes ning selle abil siseneb ABA rakkudesse (Kang jt., 2010). Atabcg40 mutantide õhulõhede regulatsioon toimub eksogeense ABA ja osmootilise stressi korral viivitusega ning taimed on põuaaltimad.

Teiseks ABA transpordi eest vastutavaks geeniperekonnaks on NRT1/PTR (NITRATE TRANSPORTER 1/ PEPTIDE TRANSPORTER). Nimetatud perekonnas on tehtud kindlaks 4 ABA importerit, mille seast kõrgeima aktiivsusega ABA transpordil on NRT1.2 (Kanno jt., 2012). NRT1.2 paikneb juhtkudede parenhüümirakkude plasmamembraanis ja vahendab ABA liikumist juhtsoonte ning teiste kudede vahel. Lisaks ABAlle transpordib NRT1.2 ka nitraati. NRT1.2 mutantide puhul on täheldatud õhulõhede suurem avatus õisikutes, kuid mitte lehtedel (Kanno jt., 2012).

### **1.3.2 ABA biosüntees**

Taimed sisaldavad kahte eraldiseisvat ABA biosünteesirada: otsene ja kaudne. Otsese sünteesiraja puhul moodustatakse ABA 15-süsinikulisest ühendist farnesüülpürofosfaadist, kaudse puhul 40-süsinikulistest ( $C_{40}$ ) karotenoididest (Zeebart ja Creelman., 1988). Taimedes viiakse süntees läbi karotenoidide modifitseerimise kaudu (Seo ja Koshiba, 2002; Nambara ja Poll, 2013). ABA biosünteesirada hõlmab 3 põhilist etappi: varajased reaktsioonid väikeste fosforüleeritud ühenditega, keskmised reaktsioonid mittetsükliilise  $C_{40}$ -ühendi karotenoidi prekursori moodustumiseks ja viimaks 15-süsinikulise ABA eelühendi ksantoksiini teke (Milborrow, 2001). Esimesed kaks etappi pole piiravad ABA sünteesil, seetõttu keskendutakse üksnes viimasele (Sindhu ja Walton, 1988).

#### **1.3.2.1 Hilised reaktsioonid ABA biosünteesirajas**

Kindlaks on tehtud 3 vastutavat ensüümi ABA biosünteesil: zeaksantiini epoksüdaas (ZEP) (Marin jt., 1996), 9-*cis*-epoksükarotenoidi dioksügenaas (NCED) (Schwartz jt., 1997) ja abstsiaaldehüüdi oksüdaas (AAO3) (Seo jt., 2000).

ZEP vastutab zeaksantiini konverteerimise eest epoksükarotenoidideks 9'*cis*-violaksatiiniks ja 9'*cis*-neoksantiiniks läbi vaheühendi anteraksantiini (Marin jt., 1996). NCED katalüüsib saadud epoksükarotenoidide lagunemise 15-süsinikuliseks ühendiks ksantoksiiniks ja metaboliidiks (Schwartz jt., 2003). Ksantoksiin oksüdeeritakse abstsiaaldehüüdiks lühikeseahelalise dehüdrogenaasi või reduktaasi abil, mida kodeerib harilikus müürloogas geen ABA2 (ARABIDOPSIS THALIANA ABA DEFICIENT 2) (Schwartz jt., 1997; Cheng jt., 2002; Frey jt., 2012). Edasi konverteeritakse abstsiaaldehüüd tsütosoolis ABAs, mida

katalüüsib ensüüm AAO (Seo jt., 2000). *Arabidopsis*es on leitud 3 AAO geeni, millest AAO3 poolt kodeeritaval ensüümil eeldatakse olevat peamine funktsioon (Seo jt., 2000).

## **1.4 Õhulõhede käitumine sõltuvalt katsemeetodist**

### **1.4.1 Erinevad katsemeetodid**

Õhulõhede juhtivust määrab õhulõhede apertuur ehk õhulõhe poori laius ja õhulõhede tihedus epidermises. Kui õhulõhed on rohkem avatud, siis transpiratsioon ja gaasivahetus taimes suureneb. Mida suurem õhulõhede tihedus, seda enam kasvab ka õhulõhede juhtivus.

Õhulõhede avatust on mõõdetud nii otsesel teel apertuuri mõõtmisega kui ka kaudselt gaasivahetuskatsetega (Trejo jt., 1995; Mott jt., 2008, Kollist jt., 2007). Varasemalt on täheldatud olulisi erinevusi stiimulite mõjus kahe meetodi vahel, mille uurimine oli ka üheks selle töö eesmärgiks. Enamasti on mõõdetud õhulõhede apertuuri isoleeritud epidermise lõikudelt (näiteks Merlot jt., 2007, Angeli jt., 2013). Meetod võimaldab paremini kontrollida õhulõhesid ümbritsevat keskkonda, muutes lahuses olevate ainete kontsentratsioone. Isoleeritud epidermises on õhulõhed eemaldatud ülejäänud taimekudedest, mis võimaldab uurida ainult õhulõhedest endast lähtuvaid signaale. Samas võib see osutada puuduseks mõistmaks õhulõhede regulatsiooni terviklikku toimimist taimes. Lisaks võivad toimuda muutused sulgrakkude homöostaasis epidermise eraldamise käigus, näiteks kiires reaktiivsete hapnikuühendite süntees (Suzuki jt., 2011), mis võivad tekitada ettearvamatuid mõjusid sulgrakkude käitumises.

Kaudselt saab mõõta õhulõhede avatust gaasivahetuskatsetes, kus hinnatakse õhulõhede juhtivust taimest toimuva transpiratsiooni kaudu. Suur osa avaldatud gaasivahetuskatsete andmeid põhineb terve taime ühe lehe mõõtmisel (nt Angeli jt., 2013). Õhulõhede juhtivust ja selle regulatsiooni on hinnatud ka taimest eraldatud lehtedes (nt Hedrich jt., 2001). Sellistes katsetes saavad signaalid sulgrakkude regulatsiooniks pärineda ka taime teistest lehtedest või mesofüllirakkudest, mida epidermisekatsetes pole võimalik tuvastada. Terves lehes mõjutavad sealhulgas õhulõhesid ka ümbritsevad epidermiserakud, mis avaldavad sulgrakkudele survet. Katsed tervete taimedega pole levinud, sest puudub sobilik aparatuur gaasivahetuse mõõtmiseks. Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis on vastav katseseade olemas (Kollist jt. 2007, Merilo jt. 2014).

### 1.4.2 Erinevused katsemeetodite vahel

Katsetes mõõdetud õhulõhede avatus võib sõltuda parasjagu kasutatavast meetodist. Seda on näidatud mitmete stiimulite puhul. Erinevaid tulemusi on saadud isoleeritud epidermise ja terviklike lehtede vahel vastusena niiskustaseme, CO<sub>2</sub>, valguse muutusele ja ABA töötlusele.

Mott jt. (2008) vaatlesid *Tradescantia pallida* ja *Pisum sativum* taimede õhulõhede reageerimist vastusena kõrgeenenud CO<sub>2</sub> kontsentratsioonile ja valgusele. Tervetes lehtedes läbi viidud katses sulgusid *T. pallida* ja *P. sativum* õhulõhed tõstetud CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni ja pimeduse korral. *Vicia faba* lehtedes õhulõhede sulgumist seevastu ei toimunud. Isoleeritud epidermises ei toimunud õhulõhede vastust kummalegi stiimulile mitte üheski taimes. Kui aga eraldatud epidermis asetati mesofüllile, siis *T. pallida* ja *P. sativum* suutsid taastada õhulõhede sulgumise. Veelgi enam, toime ilmnas ka eraldatud epidermise lõigu asetamisel teise liigi mesofüllile. Sama katse puhul jäi *V. faba* jätkuvalt tundetuks. Siit saab järeldada, et ka liikide vahel võivad olla erinevused stiimulitele reageerimisel.

Fujita jt. (2013) sooritasid katseid *Commelina communis* lehetükkide, isoleeritud epidermise ja mesofüllile asetatud epidermistega. Nii punases kui ka sinises valguses sulgusid lehetükkide õhulõhed vastusena tõstetud CO<sub>2</sub> kontsentratsioonile ning avanesid tavapärasemast madalamal kontsentratsioonil. Epidermise lõikudes olevad õhulõhed reageerisid punase valguse käes vaevu suurenenud CO<sub>2</sub> kontsentratsioonile. Valges valguses tingis kõrgendatud CO<sub>2</sub> tase epidermise lõikude õhulõhedes samasuguse vähese vastuse, kuid tavapärasest madalamal CO<sub>2</sub> kontsentratsioonil õhulõhed avanesid. Epidermis asetatuna mesofüllile reageeris sarnaselt lehesegmendile.

Nende ja lisaks mõnede teiste (Hashimoto jt., 2006; Shope jt., 2008; Sibbernsen ja Mott, 2010) katsete toel jõuti järelduseni, et õhulõhede avanemisel ning sulgumisel on vastutavaks mesofüllist pärinevad signaalid. Selle teooria kohaselt võib mesofüll toota ühendeid, mis kas sulgevad õhulõhed või muudavad sulgrakud vastuvõtlikuks erinevatele stiimulitele (Mott jt., 2009). Välja on pakutud ka fotosünteesi osalus mesofüllist lähtuvates signaalides (Fujita jt., 2013).

### 1.4.3 ABA toime sulgrakkudele katsetes

ABA biosüntees reguleerib õhulõhede apertuuri põuastressi puhul ning selle peamine toimumiskoht on lehestik (Holbrook jt., 2002; Christmann jt., 2007). ABA on signaalmolekulina väga mobiilne, kuid siiani pole selgelt teada, kuidas selle transport

erinevate taimeosade, sealhulgas sulgrakkude vahel mõjutab füsioloogilisi vastuseid (Merilo jt., 2015).

Vastusena põuastressile ekspresseeritakse biosünteesi eest vastutavaid ensüüme NCED, ABA2 ja AAO3 juhtkudede parenhüümirakkudes (Cheng jt., 2002; Koiwai jt., 2004; Endo jt., 2008). See annab aimu, et põuatingimustes võidakse transportida ABA kudede vaheliselt mööda juhtsooni (Xu jt., 2013). Lehtedes sünteesitakse ABA peamiselt juhtkoos floemi kastrakkudes (Endo jt., 2008; Kuromori jt., 2014). On leidnud kinnitust, et ka sulgrakud suudavad toota ABA. Seejuures on välja pakutud teooria ABA üksnes lokaalsest toimest õhulõhedede sulgumisel (Bauer jt., 2013)

Trejo jt. (1993;1995) pakkusid katsete põhjal välja, et mesofüll võib kataboliseerida ABA, vähendades eksogeense ABA toimet tervetes lehtedes võrreldes epidermise lõikudega. Shatil-Cohen jt. (2011) tulemusel lehe hüdrauliline juhtivus veele vähenes, sest ABA pärssis kimbuümbrise rakkude läbitavust veele. Need tulemused annavad aimu, et mesofüll suudab kontrollida õhulõhede sulgumist ja teooria ABA üksnes lokaalsest toimest sulgrakkudes on küsitav. ABA lisamisel transpiratsioonivoogu ja hormooni pritsimisel rosettidele saadi epidermisekatsetega vastuolulised tulemused (Pantin jt., 2014). Mutantidel, mis olid ABA suhtes tundetud epidermise lõikudes, kujunes selge vastus kahe teise nimetatud meetodi rakendamisel. Sellel põhinevad järeldused, et ABA kontrollib õhulõhede juhtivust lisaks lokaalsele signaliseerimisele sulgrakkudes ka läbi teise kõrvalise signalisatsiooniraja, mis lähtub lehe sisemistest kudedest.

F. Darwin (1898) näitas õhulõhede sulgumist vastusena vähenenud suhtelisele õhuniiskusele (kirjanduses ka veeauru rõhu defitsiit (VPD)), mille täpsemaid mehhanisme on hakatud uurima alles viimasel ajal. Õhulõhed sulguvad põuastressi korral ABA toimet, mille tõttu on pakutud ABA toimet VPD-seotud õhulõhede sulgumises. Esimest korda tõestasid sulgrakkudes toimuvat autonoomset ABA sünteesi vastusena vähenenud suhtelisele õhuniiskusele Bauer jt. (2013). Viimased uurimused on näidanud sulgrakkudes ja floemi kastrakkudes sünteesitud ABA võrdväärset osalust VPD-seotud õhulõhede vastuses gaasivahetuskatsetes (Merilo jt., 2018). Siiski jääb selgusetuks, milline on sulgrakkudes ja floemi kastrakkudes sünteesitava ABA vaheline füsioloogiline toime erinevatel tingimustel ja ajaskaalas (Merilo jt., 2018). Hiljuti on välja pakutud teooria, mille kohaselt kiire õhulõhede sulgumise vastusena muutunud keskkonnatingimustele kutsub esile mesofüllis sünteesitud ABA (McAdam jt., 2018).

ABA mõju uurimisel saadud vastuolulised andmed võivad tuleneda rakendatud meetodikatest, nagu näidatud õhuniiskuse, valguse ja CO<sub>2</sub> puhul. Erinevates taime piirkondades sünteesitud ABA osaluse kindlakstegemiseks õhulõhede regulatsioonis on hakatud uurima ABA biosünteesi- või signalisatsiooniraja mutante. ABA-puudulike ja ABA-tundetute mutantidel on näidatud kõrgenenud õhulõhede juhtivus tavaolekus (Merilo jt., 2018). Samas uurimustöös tehti kindlaks OST1 proteiinkinaasi olulisus õhulõhede juhtivuse reguleerimisel vastusena õhuniiskuse vähenemisele, kuid regulatsioon võib toimuda ka ABAsst sõltumatult.

## 1.5 Kasutatud taimeliinid

Katsete jaoks kasvatati nelja hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) erinevat liini. Lisaks metsiktüüpi Columbia (Col-0) ökotüübile kasutati mutante *ost2-2D*, *ost1-3* ja *nced3/5*. Kõigil nimetatud mutantidel on häiritud ABA sünteesi- või signalisatsioonirada.

### ***OST2-2D***

*ost2-2D* mutant isoleeriti infrapunavalguses pildistamise ehk termopildistamise abil Col-0 liini muteeritud populatsioonist, kust otsiti taimi, mille õhulõhed olid võrreldes algse fenotüübiga pimedas rohkem avatud (Merlot jt., 2007). OST2 (*OPEN STOMATA 2*) geen kodeerib sulgrakkude peamist plasmamembraani H<sup>+</sup>-ATPaasi AHA1 (Harper jt., 1990). Antud mutandi teises kromosoomis OST2 lookuses on dominantne mutatsioon, mille toime muutub plasmamembraani H<sup>+</sup>-ATPaas alaliselt aktiivseks (Merlot jt., 2002).

Katsetel epidermise lõikudega ei toimunud *ost2-2D* mutandis õhulõhede sulgumist vastusena eksogeensele ABAlle (Merlot jt., 2007). Tervete taimede puhul on näidatud vastupidiselt transpiratsiooni selget vähenemist (Pantin jt., 2013). Merlot jt. (2007) näitasid epidermiskatsetega siiski *ost2-2D* õhulõhede reageerimist valgusele ja CO<sub>2</sub> kontsentratsioonide muutustele ning mutandi õhulõhede apertuuri sarnasust metsiktüübiga (Col-0) (Merlot jt., 2007). Kuigi Merlot jt (2002) kirjeldasid *ost2-2D* fenotüübil kujunevaid nekrootilisi kahjustusi, siis Nuhkat (2013) seda ei täheldanud.

### ***OST1-3***

*ost1-3* on Col-0 päritoluga T-DNA mutant (Yoshida jt., 2002; Xue jt., 2011). Varasemalt isoleeriti juhuslikult taimede termopildistamise abil veel kaks OST1 geeniperekonna mutanti: *ost1-1* ja *ost1-2* (Mustilli jt., 2002). Vastavate mutantide lehetemperatuur oli põuatingimustes ~1°C madalam võrreldes metsiktüübiga, mis tuleneb *ost1* võimetusest

limiteerida veekadu transpiratsioonil põuastressi juures. *ost1-3* reageeris kiirele niiskustaseme langusele närbumisega (Yoshida jt., 2002). Sarnaselt *ost2* mutandile ei reageeri *ost1-1*, *ost1-2*, *ost1-3* mutantide õhulõhed ABAle katsetel epidermise lõikudega (Mustilli jt., 2002; Yoshida jt., 2002), samuti ka tervete taimede korral on mutant tundetu. Kuigi *ost1-3* on tavatingimustes kõrgem õhulõhede juhtivus, siis suurenenud apretuuri õhulõhedel pole täheldatud (Xue jt., 2011).

OST1 kodeerib ABA poolt aktiveeritavat  $\text{Ca}^{2+}$ -mittesõltuvat proteiinkinaasi ja mõjutab anioonkanali SLAC1 aktivatsiooni. OST1 seostub füüsiliselt SLAC1-ga, põhjustades selle fosforüleerimise ja aktivatsiooni (Geiger jt., 2009). Kui SLAC1 ei fosforüleerita, siis õhulõhede sulgumist vastusena ABAle ei toimu ning kuivastressis *ost1-3* mutandid näruvad kõrgeks transpiratsiooni tõttu. OST1 mutante on mitmetes kirjanduslikes allikates nimetatud ka kui *snrk2e* ja *snrk2.6* mutantideks. Nimetused tulenevad Snf1-seotud proteiinkinaaside perekonnast 2, mida antud lookus kodeerib (Yoshida jt., 2002).

### ***NCED3/5***

*nced3/5* mutant on saadud kahe metsiktüübi ökotüübi (Col-0) T-DNA mutandi *nced3* ja *nced5* omavahelisel ristamisel (Frey jt., 2012).

NCED perekonna geenid katalüüsivad biokeemiliste uuringute järgi ABA biosünteesi võtmeetapiks peetavat epoksükarotenoidide lõhustumist (Sindhu ja Walton, 1988). *Arabidopsis*es on leitud 9 NCED perekonna geeni, millest kolm osalevad teadaolevalt ABA biosünteesis (Iuchi jt., 2001). NCED geenid on tugevalt ekspresseeritud vastusena taime kasvusignaalidele ja stressitingimustele (Finkelstein, 2013).

NCED3 peetakse peamiseks vastutavaks geeniks põuastressil kujunevas ABA vastuses (Iuchi jt., 2001). Põuastressi katsetes esines *nced3* mutantidel selge seos vähenenud endogeense ABA ja kõrgeks transpiratsiooni taseme vahel (Iuchi jt., 2001, Frey jt., 2012). NCED5 geeni häirumisel ei esinenud selget erinevust metsiktüübiga, kuid selle toime ilmneb kooskõlas teiste NCED perekonna geenidega. NCED5 võimendab põuatingimustel NCED3 geeni mõju. Vegetatiivsetes kudedes oli pärsitud *nced3/5* mutantide kasv, veekadu oli üksikmutantidest suurem ja endogeense ABA tase vähenes nii stressi- kui tavatingimustes võrreldes *nced3* mutandiga (Frey jt., 2012). ABA kontsentratsioon topelmutandis on oluliselt madalam metsiktüübi lehtede tasemest (Chater jt., 2015, Frey jt., 2012; Merilo jt., 2018). Topelmutantide leherosetid jäävad taime kasvu käigus tunduvalt väiksemateks metsiktüübist, mis kinnitab ABA positiivset regulatsiooni taimekasvul (Cheng jt., 2002, Frey jt., 2012).

*nced3/5* mutantide õhulõhede tihedus epidermises on suurenenud (Chater jt., 2015). Merilo jt. (2018) näitasid õhulõhede oluliselt kõrgemat juhtivust *nced3/5* mutandil.

**Tabel 1** Katsetes kasutatud hariliku müürlooga liinide kirjeldus

Liin	Kirjeldus	Päritolu	Geen		Viide
			<i>Arabidopsises</i> <sup>1</sup>	Muutus geenis	
<i>ost1-3</i>	OST1 kinaasi töö häirimine	Col-0	AT4G33950.1	T-DNA sisestus OST1 geenis	Yoshida jt., 2002
<i>ost2-2D</i>	alaliselt aktiivne H <sup>+</sup> -ATPaas	Col-0	AT2G18960.1	2 missense mutatsiooni C→T; G→A	Merlot jt., 2002, 2007
<i>nced3/5</i>	häiritud NCED isovormide ekspressioon	Col-0	AT3G14440.1 AT1G30100.1	T-DNA sisetused NCED geenides	Iuchi jt., 2001 Frey jt., 2012
Col-0	Metsiktüüp				

<sup>1</sup> Tair

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Tartu Ülikooli taimsete signaalide uurimisrühmas on leitud teatud mutantide õhulõhede käitumises erinevusi varasemalt kirjanduses avaldatuga. Erinevusi on täheldatud eelkõige katsetega, kus õhulõhede avatuse-suletuse regulatsiooni on jälgitud isoleeritud epidermises. Töö esimeseks eesmärgiks oli välja arendada uurimisrühmas esmakordselt kasutatava meetodi tehnika epidermise lõikude uurimiseks. Pilootprojekti tulemusi võrreldi uurimisrühmas spetsiaalselt tervete taimede gaasivahetuskatseteks loodud seadeldise tulemustega. Stiimulina kasutati abstsiihapet, mida on kerge mõlemas süsteemis kasutada ja mille toime on põhjalikult kirjeldatud.

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Taimede kasvatamine

Seemnete idanemise stimuleerimiseks ja ühtlustumiseks hoiti neid vähemalt kolm päeva enne külvamist vees, külmkapis temperatuuril 4°C. Kasvustraadina kasutati 1:1 mahusuhtes vermikuliidi ja turba segu, millele lisati pooles mahus vett. Vermikuliit suurendab segus mulla

veemahutavust. Taimed kasvatati 12-tunnise päevapikkusega ruumis, et pärssida reproduktsiooniorganite väljakujunemist ja seeläbi vältida taimede füsioloogias muutusi katsete jooksul. Kasvuks sobilikku temperatuuri hoiti kasvuruumis 18-20°C juures, valgusintensiivsus oli 90-130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Piisava niiskustaseme tagamiseks asetati kuni idulehtede tekkimiseni külvi kohale Petri tass või plastikkate. Taimede harvendamine toimus nädal pärast külvi, potti jäeti kasvama üks taim. Piisava niiskustaseme hoidmiseks kasteti taimi kahel-kolmel korral nädalas. Katseteks kasutati 4 nädala vanuseid taimi. Vajadusel kasvatati taimi pikemalt, eelkõige aeglasema kasvukiirusega *nced3/5* mutante.

Gaasivahetuskatsete taimed kasvatati vastava katseseadeldisega sobituvates neljakandilistes plastikpottides (suurusega 10x10x6 cm), mis täideti 250 grammi kasvusubstraadiga. Kasvupotile asetati selle suurusega vastavuses 0,25 cm paksune poleeritud klaasplaat, mille keskmes oli ligikaudu 3 mm läbimõõduga kooniline ava. Klaas asetub potile 45° nurga all, mis jätab poti nurgad lahti ning võimaldab õhu liikumist üle substraadi. Klaaspind pressiti vastu kasvusubstraadist moodustatud kuhja kasvupotis. Seemned külvati automaatpipetiga klaasplaadi keskel olevasse auku mullapinnale. Spetsiaalsete pottide kasutamine tagab taimeroseetide eraldamise kasvupinnasest ja juurtest, et vältida gaaside liikumist mullast ja ümbritsevast keskkonnast mõõtekambritesse. 2-4 päeva enne katse algust täideti klaasi ja taimevarre vahele jääv ava pookevahaga (AS Agropol DT).

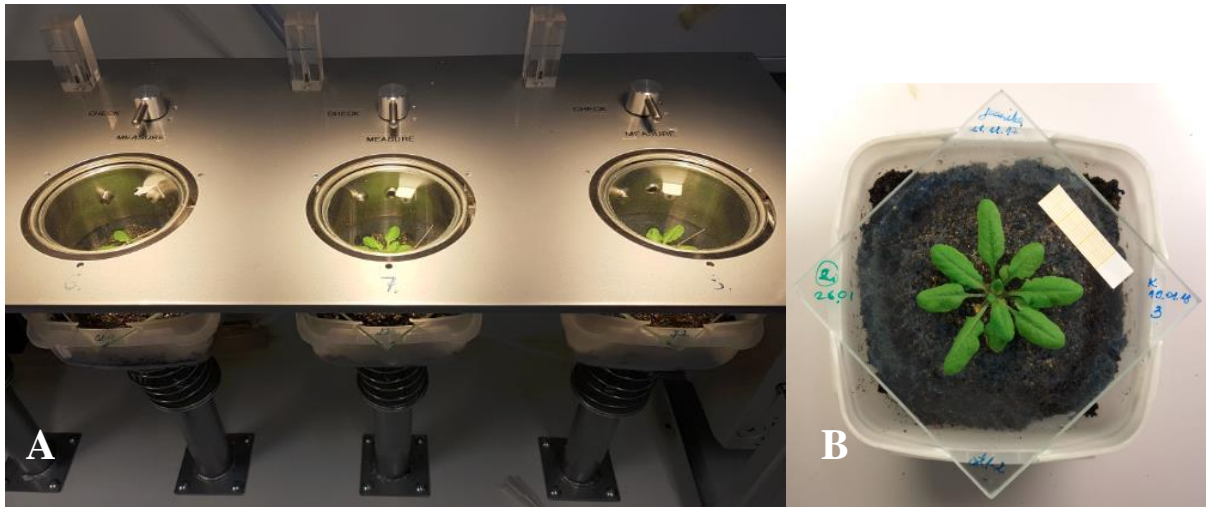
Epidermisekatsete taimede kasvatamiseks kasutati musti plastikust kasvupotte, mis täideti 170 grammi kirjeldatud kasvusubstraadiga. Seemned külvati lahtiselt mullapinnale poti keskel. Taimi kasvatati samas ruumis ja samadel tingimustel kui gaasivahetuskatseteks kasutatud taimi 4 nädalat.

### **2.2.2 Katseaparatuur gaasivahetuskatseteks**

Gaasivahetuskatseteks spetsiaalselt konstrueeritud seadeldis võimaldab mõõta terve taime gaasivahetust iseloomustavaid parameetreid kaheksas eraldiseisvas mõõtekambris (Kollist jt., 2007). Katseseade võimaldab mõõtekambrites muuta O<sub>3</sub> ja CO<sub>2</sub> kontsentratsioone, õhuniiskust, valguse intensiivsust ja selle spektrit. Aparatuur on ühendatud õhu koostist analüüsiva seadmega Li-cor (Li-7000), selle mõõtetulemused kuvatakse spetsiaalse arvutiprogrammi abil reaalsajas arvutiekraanile. Ühtlasi salvestab programm tulemused ja kuvatud andmeid saab hiljem analüüsida.

Mõõtekambrid on 7,8 cm sisemise diameetriga ja 3,5 cm kõrgusega roostevabast terasest silindrid. Klaasiga kaetud pottides taimed viiakse kambrisse altpoolt. Potte toestab vedru,

surudes kambri poleeritud servad nelinurkse klaasi vastu. Silinder on ülalt kaetud klaasiga, mille läbi pääseb valgus taimedeni.



**Joonis 2** Taimede gaasivahetuse mõõtmiseks kasutatud seadeldis. **A.** Kolm hariliku müürlooga taime asetatuna gaasivahetuse mõõtmise küvetti. **B.** Gaasivahetuskambritega sobituv klaasplaadiga kaetud kasvupott koos selles kasvava taimega.

Igasse kambrisse tekitati termostaadi abiga 70-80% suhteline õhuniiskus. Mõõtekambrite temperatuur oli 24-25°C, valgustugevus  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ja  $\text{CO}_2$  kontsentratsioon  $\sim 400$  ppm. Taimede gaasivahetuse iseloomustamiseks mõõdeti  $\text{CO}_2$  ja veeauru sisaldus mõõtekambri sisenavas ja sealt väljuvas õhus ning mõõtekambrite temperatuur.

Uute tingimustega harjumiseks hoiti taimi enne katse algust  $\sim 1$  tund mõõtekambrites, mille jooksul taimede õhulõhede juhtivus stabiliseerus. Iga kambri uuritavate väärtuste mõõtmiseks seadistati 1 minut: 30 sekundit referentsväärtuse mõõtmiseks ja 30 sekundit mõõdetavale kambrile. Antud töös sooritati katseid korraga 4 kambriga. Kõigepealt mõõdeti 8 tsükli (32 min) jooksul igas kambris taime õhulõhede juhtivus tavatingimustel. Seejärel eemaldati taim kambrit ning pritsiti neljast erinevast küljest  $5 \mu\text{M}$  ABA lahuse või kontroll-lahusega. Töötluste tarvis lahuste valmistamiseks kasutati ( $\pm$ )-ABA (tootja: Carbosynth Ltd.) lahust, detergendi (Silwet L-77, tootja: PhytoTechnology Laboratories) ja destilleeritud vett (mQ, Millipore Milli-Q masinast). Kontroll-lahuses ABA puudub. Detergent aitab lahusel paremini märjata lehe hüdrofoobset kutiikulat, seda lisati mahus  $1 \mu\text{l}/5$  ml. Iga 2-3 katse järel valmistati uus lahus, sest ABA on madala kontsentratsiooniga lahuses toatemperatuuril labiilne, samas kui detergendi toime väheneb madalate temperatuuride juures. Liigse niiskuse vältimiseks mõõtekambris kuivatati üleliigne lahus taime ümbritsevalt klaasilt. Taim viidi tagasi

mõõtekambrisse ning katset jätkati veel 1 tunni jooksul (25 tsükli). Pärast pritsimist ei imendu lahus koheselt, seetõttu ei saanud esimesi mõõtepunkte tulemustes kajastada.

Ühte ja sama taime kasutati esmalt kontroll-lahusega katse tarvis ning vähemalt päevase vahega ABA lahusega pritsimisel. ABAga töödeldud taime enam ei kasutatud. Katseid tehti 4-7 taimega ühest liinist, kokku sooritati 3 katseseeriat.

Taime leheroseti pindala kindlakstegemiseks pildistati digitaalkaameraga Pentax K100D taim enne mõõtekambrisse paigutamist koos skaalaga (10x30 millimeetripaber). Fotodelt mõõdeti taimede pindalad pilditöötlusprogrammis ImageJ (versioon 1.51r), kasutades polügoon-tööriista.

### **2.2.3 Epidermiskatsete läbiviimine**

Epidermiskatseted on sooritatud protokoll järgi, mis on arendatud Sheffieldi Ülikooli molekulaarse taimebioloogia professori Julie Grey töörühmas (isiklik kommunikatsioon). *Arabidopsis thaliana* õhulõhed esinevad peamiselt lehtede alakülgedel, millelt eraldati ka antud katseteks epidermis. Selleks lõigati taimelt leht ning tehti sisselõige lehe alaküljele, suunaga keskroo juurest lehe servani. Pintsettidega haarati tehtud sisselõikest kinni ning rebiti õrnalt, kuni ilmus nähtavale mesofüllist eraldunud enam-vähem läbipaistev epidermis. Epidermiselõigu külge jäänud leheosa lahutati lõikamisega. Samamoodi talitati ka lehe teise poolega. Niiviisi saadi sarnased epidermaalsed lõigud kahe erineva töötluse tarvis. Lõigud epidermisest asetati 5 cm läbimõõduga Petri tassidele 5 ml avanemispuhvriga kontroll-lahusesse või 5  $\mu\text{M}$  ABA lahusesse. Avanemispuhvri koostises oli 50mM KCl, 10 mM MES puhvrit (tootja: Sigma Company Co) ja destilleeritud vett (mQ, Millipore Milli-Q masinast). Avanemispuhvri pH kohandati pH-meetriga (Hanna Instruments, mudel pH211) väärtuseni 6,2, kasutades KOH. Kokku kasutati igalt taimelt kolme keskmise vanusega lehte.

Petri tassid epidermiselõikudega asetati spetsiaalsele seadmele, mis tagas tasside temperatuuri nende kinnitamise aluse all oleva termostateeritud veevanniga (23° C). Õhulõhede avanemiseks valgustati vesivanni selle all olevate halogeenlampidega (valgusintensiivsus 140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Lõigud jäeti vähemalt kaheks tunniks kohanema lahustesse valguskambrites. Kambritesse asetatud Petri tassid võeti õhulõhede ülespildistamiseks välja samas järjekorras sinna asetamisega.

Lõigud asetati filterpaberit ja pintsette kasutades alusklaasile ja pandi peale katteklase. Piltide tegemiseks kasutati ZEISS Examiner.D1 mikroskoopi, 40-kordse suurendusega objektiiviga

(Plan-Neofluar 40x/0.75) ja SPOT Pursuit USB kaamerat. Iga taime iga töötuse jaoks pildistati 7-8 pilti kasutades programmi VisiView. Epidermise pildistamiseks valiti piirkonnad, mis ei hõlmaks mesofüllid sisaldavat ala, kus rakud oleksid elusad ja millel paikneks vähemalt 2 ülesvõttel piisava teravusega õhulõhet.

## 2.2.4 Andmeanalüüs

### 2.2.4.1 Gaasivahetuskatsed

Gaasivahetuskatsete andmeid analüüsiti spetsiaalse Exceli arvutustabeliga, mis arvutab õhulõhede juhtivuse gaasivahetuskambritest saadud parameetrite põhjal. Kõik graafikutel olevad andmed on taimeliinide keskmised väärtused ja nende standardvead. Statistiline andmeanalüüs teostati programmiga Statistica (version 7.1), kus meetoditena kasutati ühe- või kahefaktorilist ANOVAt ja *post hoc* testina Tukey testi liinidevaheliste erinevuste kindlaksmääramiseks ja selle põhjal õhulõhede juhtivuste grupeerimiseks või statistiliselt oluliste erinevate tulemuste saamiseks liinisiseselt valimi põhjal.

Epidermisekatsete ja gaasivahetuskatsete tulemuste omavaheliseks võrdlemiseks arvutati õhulõhede juhtivuse muutus. Analüüsiks kasutati kahefaktorilist ANOVAt ja Tukey testi. Selleks kasutati 60. minutil mõõdetud punkti ja õhulõhede juhtivust enne pritsi ja arvutati valemiga:

1.1.

$$\Delta g_s = \frac{60_{min} - g_{s_{alg}}}{g_{s_{alg}}}$$

kus  $60_{min}$  – gaasivahetuskatsetes pärast ABA pritsi mõõdetud 60. minuti punkti väärtus;  $g_{s_{alg}}$  – õhulõhede keskmine juhtivus enne pritsi

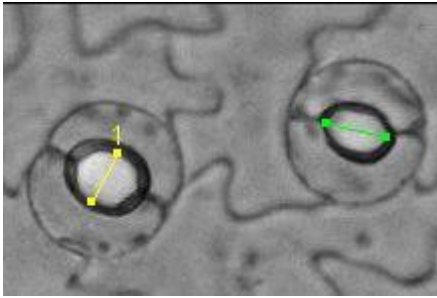
### 2.2.4.2 Epidermisekatsed

Epidermisekatsete piltide analüüsimiseks kasutati ImageJ pistikprogrammi ObejctJ'd. Õhulõhede mõõtmine toimus pimekatsena: enne mõõtmist nimetati pildid ümber, et vältida kallutatud tulemuste saamist. Igalt pildilt mõõdeti kahe õhulõhe poori avatuse laiused ja pikkused.. Mõõdetud andmete põhjal arvutati Exceli programmi kasutades poori lihtsustatud ringi pindala valemiga:

1.2

$$S = \pi \frac{p}{2} \times \frac{c}{2}$$

kus  $p$  – õhulõhe poori diameeter;  $c$  – õhulõhede kompleksi diameeter



**Joonis 3** Mõõdetud õhulõhe poori laius (paremal) ja pikkus (vasakul).

Bioloogiliseks korduseks loeti sama töötlusega üks taim, mille parameetrite saamiseks keskmistati kõikidelt selle taime õhulõhedelt ( $n=14$ ) mõõdetud väärtused. Ilma ABA töötlusteta poori pindalad keskmistati iga liini jaoks, et saada õhulõhede avatus tavatingimustel. Andmeid analüüsiti sarnaselt gaasivahetuskatsetega ühefaktorilist ANOVAt ja *post hoc* testina Tukey testi. Gaasivahetuskatsetega võrdlemiseks arvutati õhulõhede pooripindalade muutus. Võrdluseks gaasivahetusmeetodiga kasutati kahefaktorilist ANOVAt ja Tukey testi. Suhtelist muutust arvutati järgneva valemiga:

1.3

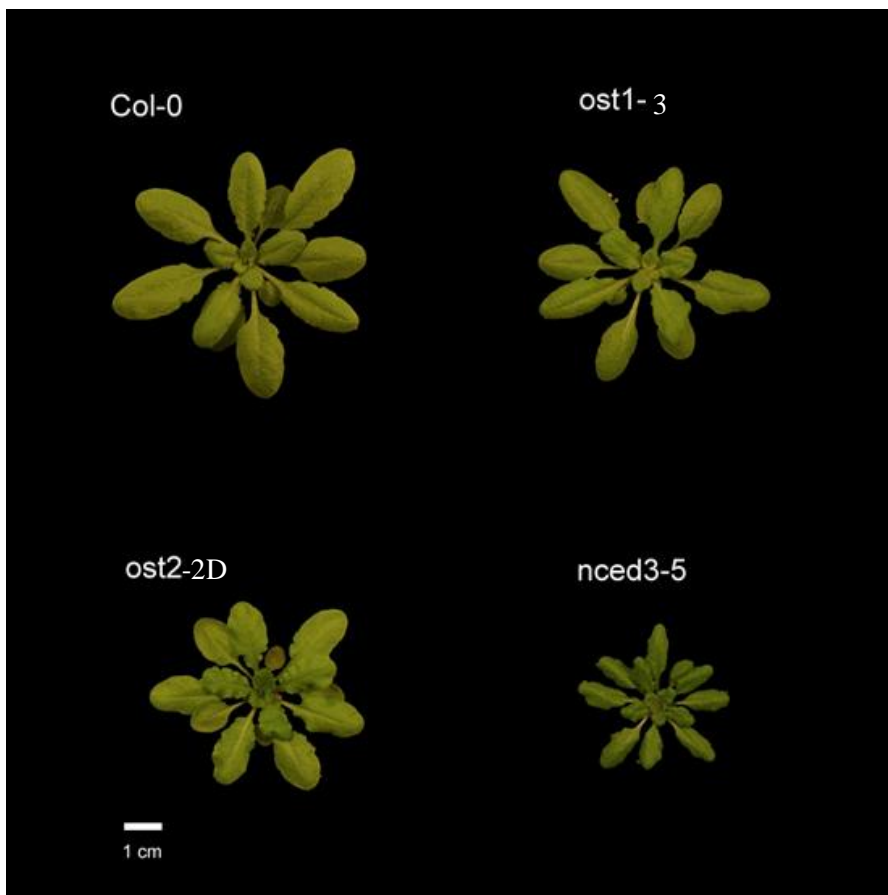
$$\Delta S (\%) = \frac{ABA^+ - ABA^-}{ABA^-}$$

kus  $ABA^+$  - õhulõhe poori pindala ABA töötlusel;  $ABA^-$  - õhulõhe poori pindala ABA töötlusteta sama taime puhul

### 3. TULEMUSED JA ARUTELU

#### 3.1 Kasutatud taimeliinide fenotüübid

Paljud hariliku müürlooga metsiktüübid on omavahel eristatavad fenotüübiliselt rosettide kuju ja lehtede paiknemise poolest. Kõik katsetes kasvatatud taimed olid metsiktüüpi Col-0 päritoluga. Uuritavates mutantidest osutus fenotüübiliselt metsiktüübile kõige sarnasemaks *ost1-3*, mille kuju ja kasv ei erinenud metsiktüübist. Samuti ei erinenud *ost2-2D* kasvukiirus märkimisväärselt metsiktüübist, kuid lahknes lainja leheserva kuju poolest. Merlot jt. (2007) kirjeldasid *ost2-2D* 1-2 nädala vanustel taimedel nekrootilisi lehti, kuid sarnaselt Nuhkat (2013) katsetele, antud katsetes seda ei täheldatud. Häiritud ABA biosünteesiga mutandi *nced3/5* kasv on oluliselt aeglasem võrreldes teiste liinidega, mida on täheldatud ka varem (Frey jt., 2012). Lisaks keerdusid *nced3/5* mutandi lehed kasvades allapoole rulli ning olid pealtvaates silmnähtavalt ebahütlasema lehepinnaga. Neid fenotüüpe võib põhjustada *nced3/5* taimede suurenenud transpiratsioon ja NCED geeniperekonna mõju vegetatiivsele kasvule (Iuchi jt., 2001, Cheng jt., 2002; Frey jt., 2012).



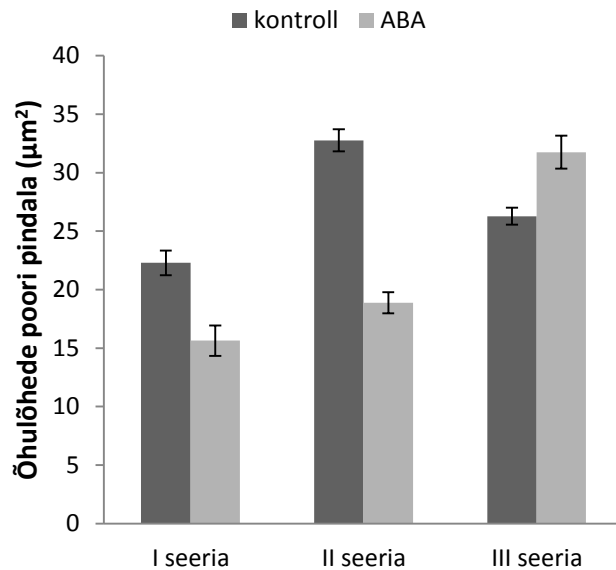
Joonis 4 Pildid 4 nädala vanustest hariliku müürlooga liinide Col-0, *ost1-3*, *ost2-2D* ja *nced3/5* taimedest. Pildil on skaala pikkusega 1 cm.

Nii *ost1-3* kui ka *ost2-2D* mutantidel on häiritud ABA signalisatsioonirada (Merlot jt., 2002; 2007; Mustilli jt., 2002). *nced3/5* ei suuda toota mutatsioonide tõttu piisavas koguses ABA. Visuaalse fenotüübi põhjal saab väita, et *nced3/5* mutatsioon ABA biosünteesirajas on suurema mõjuga fenotüübi väljakujunemisel kui *ost1-3* ja *ost2-2D* õhulõhede avatuse-suletuse regulatsioonis olulised mutatsioonid.

### **3.2 Pilotkatse epidermise lõikudega**

Katsetulemuste esmasel analüüsimisel jäi silma kardinaalselt erinev mõõtmistulemus metsiktüübi Col-0 kontrolltaimede 3. katsesarja tulemustes võrreldes kahe eelnevaga (Joonis 5). Kolmandas katseseerias õhulõhede poori avatus hoopiski suurenes vastusena ABAle. Kuna ABA rolli õhulõhede avanemises pole täheldatud, siis edasistel arvutustel seda katseseeriat koos teiste vastavas seerias saadud tulemustega arvesse ei võetud. Selline kõrvalekalle iseloomustab hästi, kui keeruline on tagada stabiilsus antud meetodi rakendamise puhul. Tulemus võib sõltuda, eksperimentaatori vilumusest epidermise tükkide eraldamisel. Gaasivahetuskatsetel on mõõteandmete saamine ja kindlate keskkonnatingimuste kontroll mehhaniseeritud. Lisaks saab vaadelda stiimulite toimet reaalajas arvutiekraanil, mis võimaldab koheselt tuvastada kõrvalekaldeid tavapärasest.

Epidermise eemaldamisel ülejäänud kudedest tekib koes stressiseisund. Epidermise lõigud kohanevad küll kaks tundi lahuses, kuid mõõtmise käigus tuleb neile asetada kattedklaas, mis võib taas tekitada stressi. Seetõttu peab olema eriti hoolikas, et rakud ei saaks kahjustada. Esmakordsel katsemeetodi läbiviimisel polnud meetod veel laboris korralikult välja töötatud. Seetõttu tuli parima meetodikani jõudmiseks alguses katsetada. Algselt võttis kogenematuse tõttu õigete lehe piirkondade leidmine pildistamiseks ja mikroskoobi sättimine kauem aega. See viivitus võis põhjustada muutusi õhulõhede apertuuris. Esialgu kujunes probleemiks kattedklaasi ja epidermise vahele jääv õhk, mis raskendas õhulõhede pildistamist. Õhumullide vältimiseks kasutati vastava töötluse lahusesse kastetud filterpaberit. See võte parandas oluliselt piltide kvaliteeti.

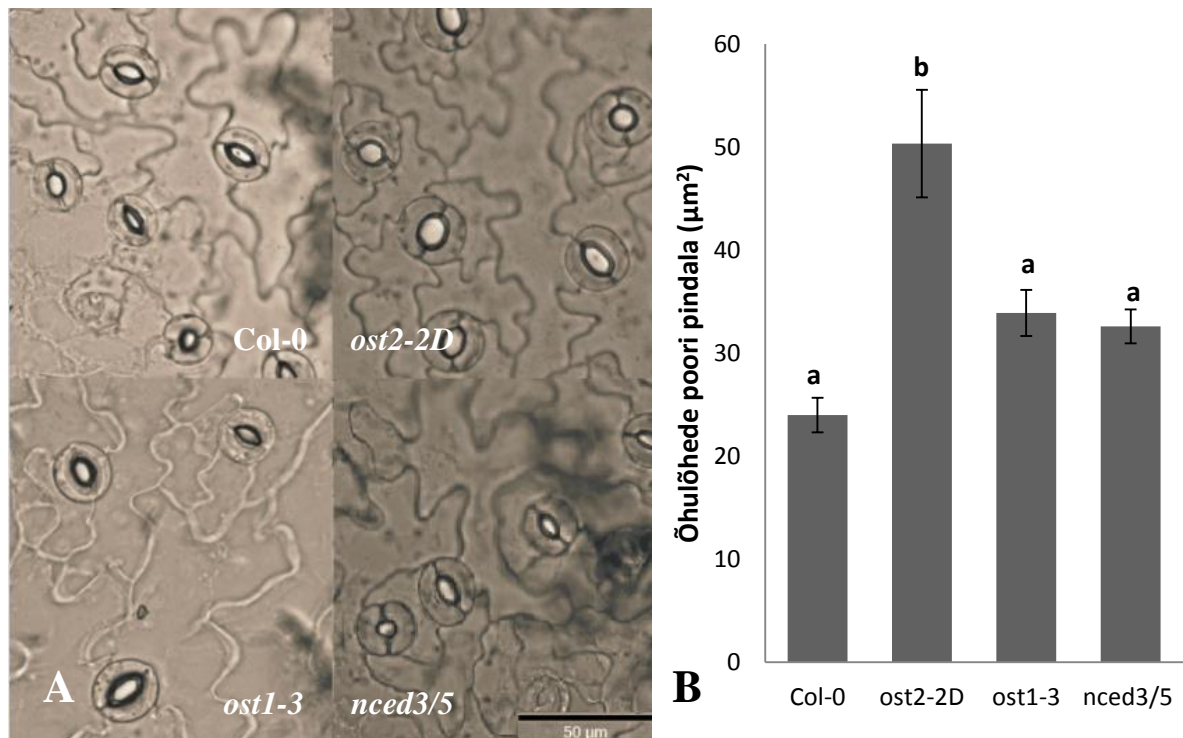


**Joonis 5 Metsiktüübi Col-0 õhulõhede poori pindalad vastusena abstsiihappele kolmes sooritatud katseseerias.** Epidermisetükkidega sooritati 3 katseseeriat (I, II, III), mille käigus võrreldi õhulõhede poori pindalaid vastusena kontroll-lahusele ja abstsiihappe lahusele. III katseseeria tulemused pole vastavuses ABA rolliga õhulõhede sulgumisel. Toodud on keskmistatud tulemused ( $n=6$ )  $\pm$ SEM.

Üldjuhul sooritati gaasivahetus- ja epidermise katsed eraldi, mis tähendas katseseeria taimede kasvatamist erinevatel aegadel. Kuna kasvutingimused kasvuruumi sees erinevad teatud määral (näiteks valguses osas), siis see tingis kasutatud taimede suurema varieeruvuse nii katseseeria kui ka katsetevahelises ulatuses. Parima tulemuse tagamiseks tuleks edaspidi ühe katseseeria taimed kasvatada mõlema meetodika jaoks üheaegselt. Samuti võiks üles pildistada epidermise katsetel ka terved taimed, nagu tehti gaasivahetuskatsetel. See annab võimaluse tagantjärele võrrelda üldist taimede füsioloogilist seisundit.

### 3.3 Õhulõhede avatused kontrollkatsetes

Ka enne piltide analüüsi oli võimalik visuaalselt selgelt eristada *ost2-2D* mutandi õhulõhesid (Joonis 6A). Merlot jt. (2007) saadud andmete põhjal õhulõhe apertuur *ost2-2D-1* sarnaneb metsiktüübiga, kuid erineb antud geeni teise mutandi *ost2-1D* puhul. Piltidelt oli võimalik *ost2-2D* mutandi õhulõhesid ära tunda suurenenud õhulõhekompleksi ja avatumate õhulõhede poolest. See vaatlustulemus vastandub Merlot jt. (2007) järeldustele. *nced3/5* mutandi puhul oli raskendatud epidermise koe eraldamine mesofüllist. See kajastus ka fotodel, millelt võis leida rohkem mesofüllirakke ja nende vahel paiknevaid õhulõhesid. *ost1-3* õhulõhed silmale nähtavalt piltidel metsiktüübist ei eristunud.



**Joonis 6 Hariliku müürlooga liinide õhulõhede avatus tavatingimustel. A.** Tüüpilised pildid 2 tundi pärast epidermise lõikude töötlust kontroll-lahusega. Skaala on pikkusega 50 µm. **B.** Õhulõhede poori pindala (µm<sup>2</sup>) arvatuna pildidelt, mille näidised on toodud joonise A osas. Joonisel on toodud keskmistatud tulemused (n=12) ±SEM. Statistilise analüüsi jaoks kasutati ühefaktorilist ANOVA ja Tukey *post hoc* testi, mille põhjal oluliselt erinevad rühmad on tähistatud tähtedega (p<0,05).

Õhulõhe apertuuri pindala mõõtetulemused kattuvad epidermise pildidelt vaadelduga – *ost2-2D* õhulõhed on märgatavamalt suuremad teistest (Joonis 6B). *nced3/5* ja *ost1-3* õhulõhed on omavahel suuruse poolest väga sarnased, kuid nende poori pindala on siiski natuke kõrgem metsiktüübist. Saadud tulemuste statistiline analüüs tuvastas kaks erinevat gruppi (p<0,05). Metsiktüüpi Col-0, *ost1-3* ja *nced3/5* pooride pindala oli statistiliselt sarnane ning *ost2-2D* vastav mõõdetud suurus märkimisväärselt erinev (p<0,05).

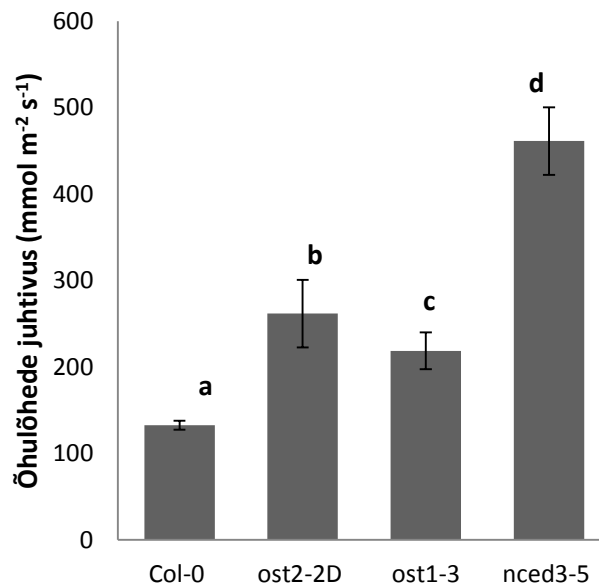
### 3.4 Mutantide õhulõhede juhtivus tavatingimustel

Gaasivahetuskatsetes tuvastati kõigil uuritud mutantidel kõrgem õhulõhede juhtivus tavatingimustel võrreldes metsiktüübiga (Joonis 7). Kuna kõik eksperimentides kasutatud taimed on seotud ABA signalisatsiooni- või sünteesiraja häirumisega, siis viitab see ABA seotusele õhulõhede juhtivuse määramisel.

Metsiktüübist oluliselt kõrgemat õhulõhede juhtivust on *ost1-3* ja *nced3/5* mutantidel näidanud ka Merilo jt. (2018), *ost2-2D* puhul Pantin jt. (2013). Kõige sarnasem õhulõhede juhtivus metsiktüübile oli *ost1-3* taimedel, mis sarnanesid metsiktüübiga ka õhulõhede

avatus osas epidermisekatsetes. Antud katsetes oli aga *nced3/5* topeltmutandi õhulõhede juhtivus ligi 4 korda kõrgem metsiktüübist. Pantin jt. (2013) kohaselt on Col-0 taustaga ABA sünteesirea mutantide õhulõhede juhtivus korrelatsioonis lehtedes leiduva ABA tasemega. Kuna NCED3 ja NCED5 katalüüsivad ABA sünteesirajas olulist reaktsiooni, siis võib eeldada, et neis taimeliinides on oluliselt madalam ABA tase ja seeläbi kõrgem õhulõhede juhtivus.

Siinkohal ilmneb vastuolu: ühelt poolt on *ost2-2D* suurem õhulõhede avatus, kuid palju madalam õhulõhede juhtivus kui *nced3/5* mutandil ja teisalt *nced3/5* väiksem õhulõhede avatus ning suurem juhtivus. *ost2-2D* taimede suurem õhulõhede avatus on seletatav selle mutandi põhilise plasmamembraani H<sup>+</sup>-ATPaasi alalise aktiivsusega (Merlot jt. 2007, ehk mõni viide veel). Mida avatumad õhulõhed, seda suurem on ka transpiratsioon tavatingimustel. Antud tulemuse üheks selgituseks on *nced3/5* liinide suurem õhulõhede tihedus epidermises, mis on tingitud ABA takistavast rollist õhulõhede väljakujunemisel (Chater jt., 2015). Samuti aitab see paremini mõista, miks sarnaste õhulõhe poori pindaladega *ost1-3* ja *nced3/5* õhulõhede juhtivus on väga erinev.



**Joonis 7 Hariliku mürlooga nelja erineva liini õhulõhede juhtivus (mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) tavatingimustel.** Joonisel keskmistatud tulemused (n=15-20) ±SEM. Statistilise analüüsi jaoks kasutati ühefaktorilist ANOVA ja Tukey *post hoc* testi, millega saadud erinevused on tähistatud tähtedega (p<0,05).

### 3.5 Gaasivahetuskatsed ABA toimel

Gaasivahetuskatses uuriti, kuidas mõjutab 5  $\mu\text{M}$  ABA lahus õhulõhede juhtivust ABA sünteesi- ja signaalrajas häiritud mutantidel. Selleks uuriti enne ja pärast ABA pritsimist õhulõhede juhtivuses toimunud muutust tervetes taimedes. Vahetult pärast pritsimist toimunud mõõtmisi tulemustes ei kajastata, sest lehed olid veel märjad ja seega ei olnud võimalik õhuniiskuse mõõtmise abil hinnata õhulõhede juhtivust.

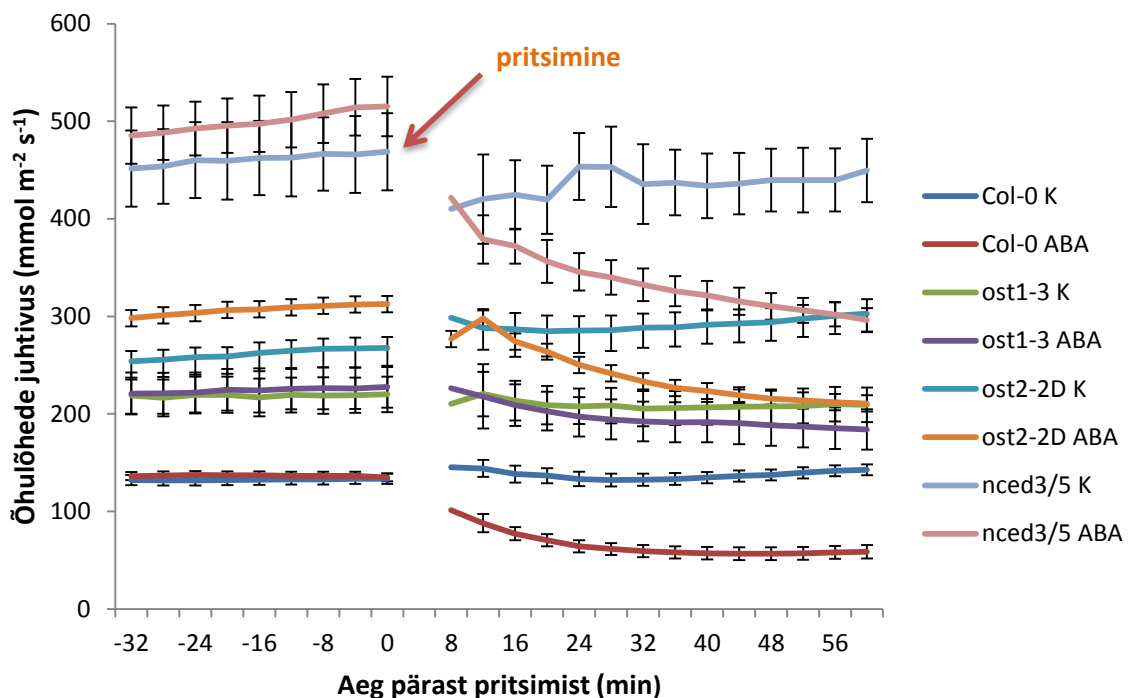
Metsiktüübi Col-0 taimedes tuvastati selge õhulõhede juhtivuse kahanemine peale ABAGA töötlemist (Joonis 8). Varasemalt kirjandusest teada, et *ost1-3* õhulõhede juhtivus püsib muutumatuna, kui tervet taime on pritsitud ABA lahusega (Merlot jt., 2018). Sooritatud katsed andsid samasuguse tulemuse. Kõigil teistel liinidel langes õhulõhede juhtivus peale pritsimist ABAGA. Varasemates epidermisekatsetes *ost2-2D* taimedega on näidatud, et antud mutatsioon põhjustab õhulõhede ABA tundetuse (Merlot jt. 2007). Hiljem on osutatud, et eksogeenselt ksüleemivoolu lisatud ABA või pritsimine ABAGA vähendab *ost2-2D* õhulõhede juhtivust (Pantin jt., 2013). Ka siin töös läbi viidud gaasivahetuskatsetes saadi *ost2-2D* taimedega sarnane tulemus, mis oli vastupidine epidermisekatsetele.

Võrreldes pooride pindalasiid eristusid selgelt *ost2-2D* taimed, mis erineb Merlot jt. (2002) tulemustest. *ost2-2D* mutatsiooni tagajärjel on muutunud sulgrakkude peamine  $\text{H}^+$ -ATPaas AHA1 alaliselt aktiivseks.  $\text{H}^+$ -ATPaasid hüperpolariseerivad plasmamembraani, mis aktiveerib  $\text{K}^+$  sissevoolu kanalid, vesi liigub rakku ja kasvab sulgrakku turgorrõhk. Pidevalt aktiivne AHA1 põhjustab pideva õhulõhede avatuse ja takistab õhulõhede sulgumist (Nuhkat, 2013). Käesolevas töös leiti kooskõlas varasema kirjandusega, et *ost2-2D* õhulõhed ei sulgu ABA mõjul epidermises, aga sulguvad terve lehega tehtud katsetes (Merlot jt., 2007; Pantin jt., 2014). Kuna metsiktüübis on võimalik õhulõhede sulgumine ka epidermise lõikudes, siis järelilikult näitab *ost2-2D* vastava reaktsiooni puudumine ja selle olemasolu tervetes taimedes, et ABA sulgumine saab toimida kahel erineval viisil. Arvestades saadud tulemusi, siis võib oletada, et need reaktsiooniviisid suudavad üksteist teatud määral kompenseerida. Taoline talitusviis tagab taimedele eluliselt olulise õhulõhede regulatsiooni kindlama toimumise.

ABA sünteesireas häiritud *nced3/5* mutant näitas kõige tugevamat vastust pritsitud eksogeensele ABAl võrreldes teiste mutantidega. Tähelepanuväärselt polnud *nced3/5* ka veel 60. minutitel jõudnud stabiilsele platoole ABA vastuses, Col-0 kontroll ja *ost2-2D* olid selle saavutanud. Selle põhjuseks võib välja tuua *nced3/5* mutandi algse kõrge õhulõhede juhtivuse, mis on põhjustatud suuremast ja ehk ka talituslikult varieeruvamast õhulõhede

populatsioonist. Õhulõhede talitluslik funktsionaalsus on küll olemas, kuid õhulõhede tihedus püsib muutumatuna.

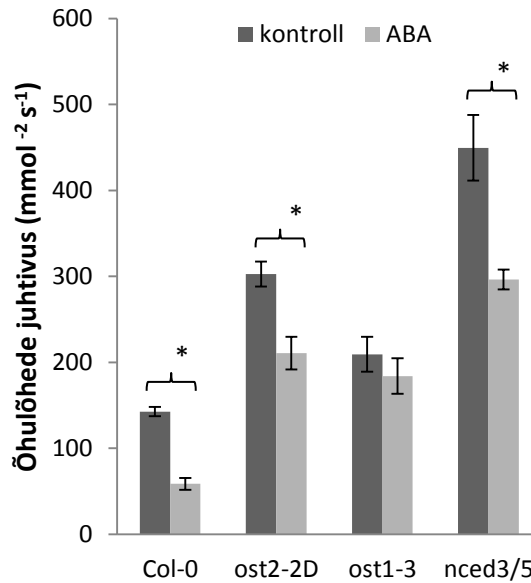
Gaasivahetuskatsete selgema erinevuse väljendamiseks kontroll-lahuse ja ABA vahel on välja toodud iga taimeliini keskmistatud 60. minuti punktid, mil töötlus oli saavutanud antud katse jooksul oma maksimaalse toime (Joonis 9). Võrdlus kontroll-lahusega pritsitud taimede õhulõhede juhtivusega näitab ABA toime ulatust. Statistiline erinevus leiti kolme taimeliini erinevate töötluste vahel, milleks olid Col-0 ( $p=0,025$ ), *ost2-2D* ( $p=0,0086$ ); *nced3/5* ( $p=3,2*10^{-6}$ ).



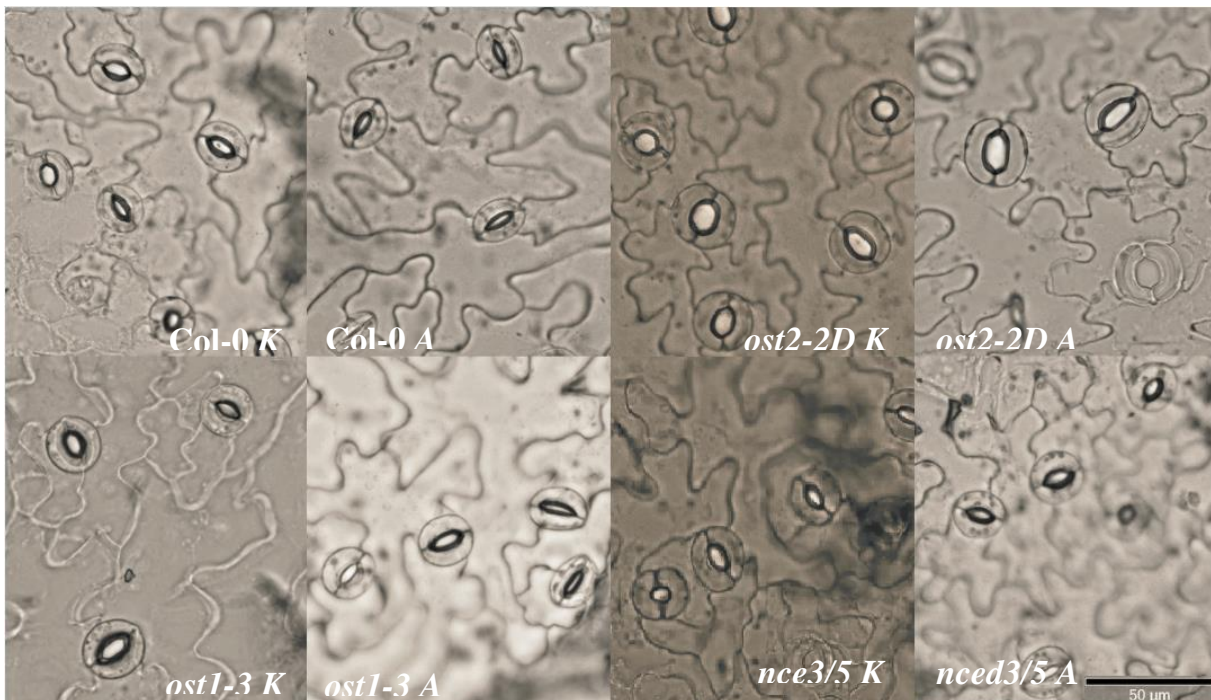
**Joonis 8 Õhulõhede reaktsioon abstsiihappele gaasivahetuskatsetes.** Taimi pritsiti kontroll-lahuse (K) või 5 $\mu$ M abstsiihappega (ABA) noolega näidatud hetkel (0 min). Kontrollpunkti tulemused ajahetkel 4 (min) on graafikult välja jäetud pärast pritsi tõusnud niiskuse tõttu mõõtmiskambrites. Joonisel on katsete keskmistatud tulemused ( $n=15-20$ ) $\pm$  SEM.

### 3.6 ABA vastus õhulõhedes epidermise lõikudel

Järgnevalt analüüsiti ABA mõju õhulõhede avatusele epidermise katsetes. Visuaalselt oli võimalik eristada sulgunud õhulõhesid Col-0, *ost1-3* ja *nced3/5* mutaatide epidermise piltidel vastusena ABAlle (Joonis 10). *ost2-2D* puhul ei olnud märgata silmale nähtavat erinevust kahe töötluste vahel, mida näitas ka piltide analüüs. Samadele tulemusteni on jõutud varemgi (Merlot jt. 2007).



**Joonis 9 Õhulõhede juhtivuse erinevus kontroll-lahuse (K) ja ABAGA pritsitud taimedel.** Kasutatud on gaasivahetuskatsetel mõõdetud 60. minuti punkte. Joonisel keskmistatud tulemused (n=15-20) ±SEM. Statistilise analüüsi jaoks kasutati kahefaktorilist ANOVA ja Tukey *post hoc* testi. Statistiliselt erinevad rühmad on tähistatud tärniga (Col-0 p=0,025; *ost2-2D* p=0,0086; *nced3/5* p=3,2\*10<sup>-6</sup>)



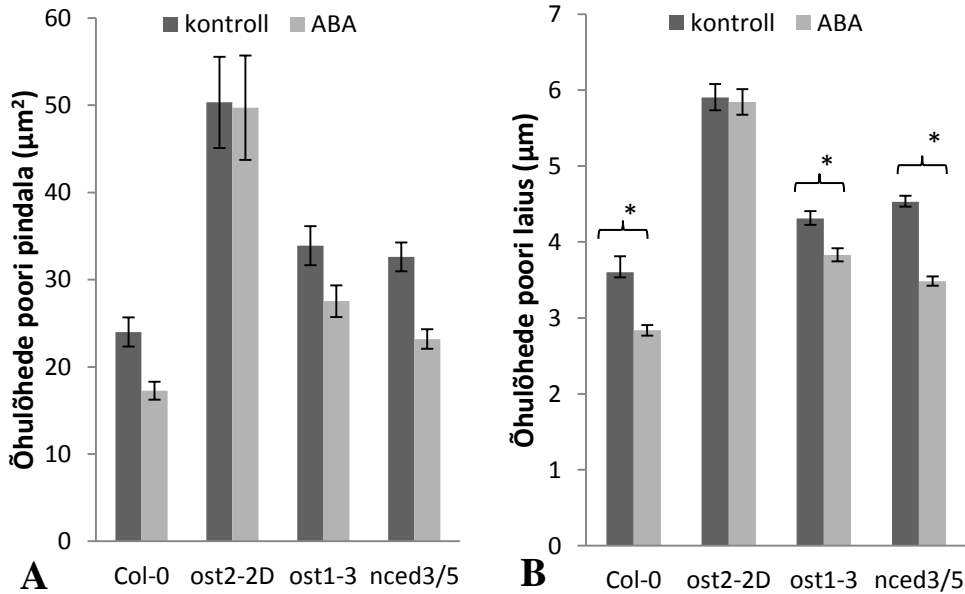
**Joonis 10 Pildid epidermiskatsetest.** Joonisel on välja toodud iga liini tüüpiline pilt õhulõhdedest kontroll-lahuse (K) ja 5 µM ABAGA (A). All paremal on toodud skaala suurusega 50 µm.

ABA töötluste omavaheliseks liinisiseseks võrdluseks kasutati iga liini keskmistatud pooripindalade väärtuseid (Joonis 11A). Arvuliselt eksisteerisid töötlustel lahknevused pooripindalade väärtuses kolmel liinil: *ost1-3*, *nced3/5* ja Col-0. Statistiliselt polnud siiski

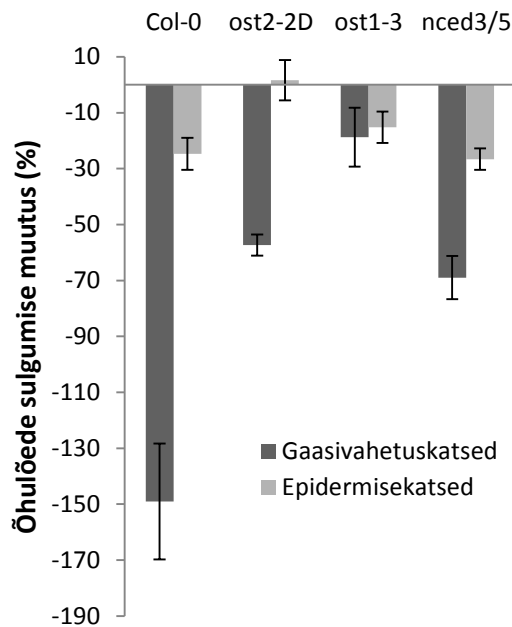
võimalik tõestada üheski liinis märkimisväärset erinevust mõõdetud suuruste vahel (analüüsil kasutatud kahefaktorilist ANOVA testi ja *post hoc* testina Tukey). Varasemast on teada, et õhulõhed sulguvad isoleeritud epidermistes ABA toimel (Treijo jt., 1995, Merlot jt., 2007). Et antud väärtuse põhjal polnud võimalik eristada statistiliselt olulisi erinevusi metsiktüübi kontroll- ja ABA-töötluste vahel, siis ei saa luua poori pindalaid võrreldes seoseid ka teiste liinide ABA tundlikkuse suhtes

Epidermisekatsed on sooritatud vastavalt Sheffieldi Ülikooli Molekulaarse bioloogia ja biotehnoloogia uurimissuuna loodud protokollile (isiklik kommunikatsioon). Selle põhjal arvutati õhulõhede sulgumise hindamiseks poori pindala (valem 1.1). Arvutamisel on valemis kasutatud lisaks apertuurile ka poori pikkust. Katse alguses tehti eeldus, et selle parameetri väärtus erineb minimaalselt. Katse andmetest järeldus, et tegelik nähtu ei vastanud eeldustele (Vaata Lisa 1). Õhulõhe poori pikkuse suur varieeruvus tõstab omakorda arvutatud poori pindalade väärtuste varieeruvust, mis võib olla põhjuseks, miks ANOVA testil ei saadud statistilisi erinevusi. Seega ei pruugi poori pindala olla sobiv parameeter ühe liini sisese töötluste mõju iseloomustamiseks. Seetõttu vaadeldi ka poori apertuuri muutust, mida on varasemalt kirjanduses kõige rohkem kasutatud (Joonis 11B) (Mustilli jt., 2002; Yoshida jt., 2002; Merlot jt., 2007). Statistiline analüüs poori laiuste väärtustega andis võrreldava tulemuse epidermise piltidelt nähtuga. Välja arvatud *ost2-2D*, suutsid kolm teist liini vastusena ABAlle õhulõhede avatust reguleerida. Vastandlikult Yoshida jt. (2002) tulemusele muutus ka *ost1-3* õhulõhede apertuur katse käigus väiksemaks. Tasub äramärkimist, et varasemalt on tavaliselt kasutatud kõrgemat ABA kontsentratsiooni kui käesolevates katsetes (Yoshida jt., 2002, Merlot jt., 2007). Seega ei saa *ost1-3* ebaharilik käitumine olla põhjustatud kasutatud ABA ebaloomulikult kõrge kontsentratsioonist.

Kahe katsemeetodi mõõtmistulemused on erinevates mõõtühikutes, mida ei saa võrrelda. Omavaheliseks võrdluseks arvutati mõlema katse puhul õhulõhede sulgumise muutus protsentides algsest. Epidermisekatsetes oli õhulõhede sulgumise muutus märkimisväärselt väiksem gaasivahetuskatsetest (Joonis 12). Et *ost1-3* mutandi õhulõhed ei sulgu gaasivahetuskatsetes vastusena ABAlle, siis ongi selles mutandis õhulõhede avatuse muutus väikesem. Lisaks nähti antud töös ebaharilikku õhulõhede sulgumist *ost1-3* mutandis epidermisekatsetes, mis omakorda vähendab kahe katsemeetodi tulemustest arvutatud muutuse erinevust.



**Joonis 11 A** Õhulõhede poori pindalade võrdlus 2 tunni jooksul kontroll-lahuse (K) ja abstiishappega (ABA) töötlusel. Statistilise analüüsi jaoks kasutati kahefaktorilist ANOVA ja Tukey *post hoc* testi. Statistiliselt oluliselt erinevaid rühmasid ei tekkinud ( $p > 0,05$ ). **B** Hariliku müürlooga kasutatud liinide õhulõhede poori laius töötlustel. Kahe tunni vältel abstiishappe või kontroll-lahusega töödeldud epidermise lõikude piltidelt mõõdetud õhulõhede poori avatus. Joonisel keskmistatud tulemused ( $n=12$ )  $\pm$ SEM. Statistiliselt erinevad rühmad on tähistatud tärniga (Col-0  $p=5,1 \cdot 10^{-6}$ ; ost1-3  $p=0,0410$ ; nced3/5  $p=3,2 \cdot 10^{-6}$ )



**Joonis 12** Õhulõhede sulgumise muutus (%) kahe erineva katsemeetodi puhul. Joonisel epidermisekatsete ( $n=12$ ) ja gaasivahetuskatsete ( $n=15-20$ ) keskmistatud tulemused  $\pm$ SEM.

### 3.7 Epidermisekatsete rakendamise ja edasiarendamise

Epidermisekatsete tehes oli suur olulisus mõõtmise täpsusel ja igal katsel tuli juurde tähelepanekuid, mida saaks paremini teha. Kindlasti tuleb jälgida, et lahusesse asetamisel jääks kutiikula üles-poolsele. Vastasel korral vähendab või lausa takistab kutiikula vahajas kiht töötamise mõju epidermisele. Katsetes on parem kasutada pisemaid eraldatud epidermise osi, mis ei keerdu nii lihtsalt kokku ja millega saab paremini toimetada. Soovitatav on jätta isoleeritud epidermise külge transportimiseks Petri tassilt katteklaasile mesofülliga riba. Petri tassilt alusklaasile viimiseks oli hea kasutada lahusesse kastetud paberfiltrit, samuti on see hea tehnika vältimaks õhu sattumist katteklaasi ja alusklaasi vahele. Õhulõhed varieeruvad nii lehe kui ka taime tasandil piirkonniti (Weyers 1995). Seetõttu on oluline saada lõigud võimalikult sarnastelt aladelt. Seda põhimõtet üritati järgida, kuid ometi oli see alguses keerulisem, millest võisid tuleneda erinevused katseseeriade vahel.

Õhulõhede sulgumist oli võimalik selgelt näha epidermise lõikudest tehtud piltidelt. Kahefaktoriline ANOVA ja *post hoc* testi kontroll-lahuse ja ABA lahuse mõju võrdlemiseks ei näidanud olulist erinevust õhulõhede poori pindalades. Muidugi ei ole silmamõõt teaduses adekvaatseks kriteeriumiks, kuid viga võib otsida ka võrdluse meetodikas. Peamistes epidermise lõike uurivates katsetes on kasutatud õhulõhede poori apertuuri ning katseid analüüsides selgus, et ka käesolevas töös oli apertuur sobiv ühe liini sees toimuvate muutuste iseloomustamiseks. Samas selgus, et ka õhulõhede poori pikkus pole muutumatu väärtus. Seetõttu on suurema poori pikkusega õhulõhel poori muutmiseks vajalik väiksem muutus apertuuris. Seega erinevate genotüüpide õhulõhede võrdlemiseks võib siiski olla kasulik poori pindalade kõrvutamise. Kui peaks tekkima tarvidus tõestas poori pindala mõõtmise täpsust, võib kaaluda ImageJ programmi polügoon tööriista kasutamist.

Epidermisekatseted võimaldavad uurida vahetult õhulõhede toimuvaid muutusi. See on ühtlasi ka puuduseks, sest saab uurida üksnes väga spetsiifiliselt sulgrakkudes ekspresseeritavaid gene. Lisaks võivad õhulõhesid mõjutada mujalt taimest pärinevad signaalid, mille mõju epidermisekatsetes ei tuvasta. ABA ei ole ainus stiimul, mida saab antud meetodi puhul sulgrakkudele rakendada. Sarnaselt võivad ka teised taimehormoonid määrata õhulõhede sulgumist ja avanemist. Kokkuvõtvalt võib öelda, et sissetöötatud meetod on rakendatav. Epidermise lõikude ja gaasivahetuskatsetes saadud tulemuste võrdluses ilmselgelt erinevused kahe genotüübi õhulõhede vastuses. Pea kõikides liinides oli õhulõhede sulgumise muutumine epidermise lõikudes väiksem kui gaasivahetuskatsetes õhulõhede juhtivuse muutus. Seetõttu on soovitatav tulevikus epidermisekatsetega paralleelselt sooritada katseid,

kus õhulõhede käitumist jälgitakse terves taimes. Käesolevas töös saadud tulemused kutsuvad ka ettevaatlikkusele kirjanduses leiduvate õhulõhede avatust iseloomustavate tulemuste tõlgendamisel.

## KOKKUVÕTE

Pidevalt muutuvates keskkonnatingimustes on õhulõhede ülesanneteks tagada fotosünteesiks piisava CO<sub>2</sub> hulga sisenemine taime ja vahendada vee väljumist taimest. Läbi õhulõhede saavad siseneda taime ka patogeenid ja saasteained. Seetõttu on oluline uurida mehhanisme, mis reguleerivad õhulõhede avanemist ja sulgumist vastusena erinevatele biotilistele ja abiotilistele stiimulitele. Õhulõhede juhtivust määrab õhulõhede apertuur ehk õhulõhe poori laius ja õhulõhede tihedus epidermises. Õhulõhe poori ümbritsevate sulgrakkude käitumist on uuritud erinevaid meetodeid kasutades. Õhulõhede avatust saab mõõta otsesel viisil õhulõhede apertuuri mõõtes kui ka kaudselt jälgides gaasivahetust taime ja atmosfääri vahel.

Käesolevas bakalaureusetöös uuriti kahte erinevat õhulõhede avatust hindava meetodit. Esimeseks nendeks oli laboris olemasolev gaasivahetussüsteem ning teiseks töötati sisse isoleeritud epidermise lõikudelt õhulõhede apertuuri mõõtmine. Antud töö üheks eesmärgiks oligi viimati nimetatud meetodi toimimise tagamine. Teiseks sooviti võrrelda kahest meetodist saadavaid tulemusi, hindamaks epidermisekatsete töökindlust. Selleks kasutati nelja erinevat hariliku müürlooga genotüüpi, mida töödeldi õhulõhede sulgumist stimuleeriva abstsiiishappe lahusega.

Kuigi kolmest sooritatud katseseeriast ühte ei olnud vastukäivate tulemuste tõttu võimalik kasutada, võib kokkuvõtvalt siiski öelda, et antud meetodil on perspektiivi. Meetodi usaldusväärsuse tõstmiseks on mõistlik kõrvutada saadud tulemusi tervetes lehtedest või taimest mõõdetud väärtustega. Töö käigus nähti erinevusi meetodite vahel, mis on suuremalt jaolt kooskõlas varasemalt avaldatud andmetega. Selle tööga võeti kasutusse uus meetod, mis võimaldab TÜ Taimesignaalide uurimiserühmas mitmekesistada õhulõhede regulatsiooni uurimist.

# RESÜMEE

## Comparison of stomatal regulation between epidermal peel and gas-exchange experiments in thale cress in response to abscisic acid

Jaanika Unt

Summary

Stomata are a type of pore present on the leaves and stalks of plants. They facilitate gas exchange with the outside environment. In varying conditions, it is important for a plant to balance the assimilation of carbon dioxide with the loss of water through transpiration. Thus, plants have evolved mechanisms that allow stomata to be opened and closed in response to environmental inputs.

Various experimental methods have been employed to study the behaviour of stomata. However, the results obtained are often conflicting. For example, some mutants currently studied at the UT Plant Signal Research Group often behave differently to what is described in even the latest literature. Conflicts between findings have been especially profound in studies of stomatal opening in plant epidermis isolates.

The research group has already developed a unique gas exchange measurement system to study whole-plant stomatal conductance. The aim of this undergraduate thesis is to develop a novel technique to also study the same process in epidermal peels. This permits whole-plant data to be compared to the behaviour of these peels.

Specifically, the chosen stimulus to study was abscisic acid (ABA), an important plant hormone involved in the closing of stomata. For both the whole-plant and epidermal peel experiments, the behaviour in response to ABA is especially simple to study. The *Arabidopsis thaliana* mutants *ost1-3*, *ost2-2D* and *nced3/5* were studied in this experiment, which all have deficiencies in the ABA synthesis or signalling pathway. Their stomatal behaviour was compared to the Columbian wild-type strain Col-0.

It is important to note that experiments with epidermal peels largely depend on the individual technique of a researcher. Thus, a robust parameter has to be used to describe the openness of stomata. We found that although the area of the pore was a suitable descriptor, the simplified circle area equation is not suitable. Additionally, after a representative number of

experiments, it was possible to give recommendations for future experiments to other researchers within the team.

By performing ABA-response experiments in both epidermal peels and whole plants, conflicts in previous literature were confirmed. For example, *ost2-2D* was unresponsive in peel experiments, while whole plants substantially change their stomatal conductance. An additional paradox was found between *ost2-2D* and *nced3/5*. While *ost2-2D* had larger stomatal pores, the conductance of *nced3/5* was still higher. This can be explained by the higher density of stomata in the *nced3/5* epidermis. Also, it has been suggested that ABA does not only act locally on guard cells, but also through a secondary pathway.

## **TÄNUSÕNAD**

Täna väga Hannes Kollistit, kes ilma igasuguse kõhklemiseta võttis noore bakalaureusetudengi uurimisrühma. Poleks suutnud paremat seltskonda leida, kelle kõrval enda katseid läbi viia. Täna kogu oma südamest enda juhendajat Maris Nuhkatit, kelle piitsutamise ja toeta ei oleks see töö valminud. Alati nii mõistev ja kindlameelne, mis minu peataolekut tihti suutis rahustada. Ei suuda väljendada piisavalt tänutunnet, minu jaoks oli see tõesti oluline.

## KIRJANDUSE LOETELU

Araujo, W.L., Fernie, A.R. ja Nunes-Nesi, A. (2011). Control of stomatal aperture: a renaissance of the old guard. *Plant Signal Behav.* 6: 1305-11.

Assmann, S. M., Simoncini, L. ja Schroeder, J. I. (1985). Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. 318: 285-287.

Barbier-Brygoo, H., De, Angeli, A., Filleur, S., Frachisse, J. M., Gambale, F., Thomine, S. ja Wege, S. (2011). Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks. *Annu Rev Plant Biol.* 62: 25-51.

Bauer, H., Ache, P., Lautner, S., ... Hedrich, R. (2013). The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell-autonomous ABA synthesis. *Curr Biol.* 23: 53-7.

Baxter, I., Tchieu, J., Sussman, M. R., Boutry, M., Palmgren, M. G., Gribskov, M., Harper, J. F. ja Axelsen, K. B. (2003). Genomic Comparison of P-Type ATPase Ion Pumps in *Arabidopsis* and Rice. *Planet Physiol.* 132: 618-28.

Boursiac, Y., Leran, S., Corratgé-Faillie, C., Gojon, A., Krouk, G. ja Lacombe, B. (2013). ABA transport and transporters. *Trends Plant Sci.* 18: 325-33.

Cathryn, J., Mittelheuser, ja Van Steveninck, R. F. M. (1969). Stomatal Closure and Inhibition of Transpiration induced by (RS)-Abscisic Acid. *Nature.* 221: 281-82.

Chater, C., Peng, K., Movahedi, M., Dunn, J. A., Walker, H. J., Liang, Y. K., McLachlan, D. H., Casson, S., Isner, J. C., Wilson, I., Neill, S. J., Hedrich, R., Gray, J. E. ja Hetherington, A. M. (2015). Elevated CO<sub>2</sub>-Induced Responses in Stomata Require ABA and ABA Signaling. *Curr Biol.* 25: 2709-16.

Cheng, W. H., Endo, A., Zhou, L., ... Sheen, J. (2002). A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell.* 14: 2723-43.

Christmann, A., Weiler, E. W., Steudle, E. ja Grill, E. (2007). A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *Plant J.* 52: 167-74.

Darwin, F. R. S. (1898) Observations on stomata. *Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B.* 190: 531-621.

Daszkowska-Golec, A. ja Szarejko, I. (2013). Open or Close the Gate – Stomata Action Under the Control of Phytohormones in Drought Stress Conditions. *Frot Planet Sci.* 4: 138.

De Angeli, A., Zhang, J., Meyer, S. ja Martinoia E. (2013). AtALMT9 is a malate-activated vacuolar chloride channel required for stomatal opening in *Arabidopsis*. 1804.

Dong, J. ja Bergmann, D.C. (2010). Stomatal patterning and development. *Curr. Topp Dev Biol.* 91: 267-97.

- Endo, A., Sawada, Y., Takahashi, H., ... Nambara, E. (2008). Drought Induction of Arabidopsis 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase Occurs in Vascular Parenchyma Cells. *Plant Physiol.* 147: 1984-93.
- Ernst, L., Goodger, J. Q., Alvarez, S., Marsh, E. L., Berla, B., Lockhart, E., Jung, J., Li, P., Bohnert, H. J. ja Schachtman, D. P. (2010). Sulphate as a xylem-borne chemical signal precedes the expression of ABA biosynthetic genes in maize roots. *J Exp Bot.* 61: 3395-405.
- Finkelstein, R.R. 2013. Abscisic acid synthesis and response. *The Arabidopsis Book*, e0166.
- Frey, A., Effroy, D., Lefebvre, V., Seo, M., Perreau, F., Berger, A., Sechet, J. T. A., North, H. M. ja Marion-Poll A. (2012). Epoxycarotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members. *Plant J.* 70: 501-12.
- Fujita, T., Noguchi, K. ja Terashima, I. (2013). Apoplastic mesophyll signals induce rapid stomatal responses to CO<sub>2</sub> in *Commelina communis*. *New Phytol.* 199: 395-406.
- Geiger, D., Maierhofer, T., Al-Rasheid, K.A., ... Hedrich, R. (2011). Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Sci Signal.* 4.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., ... Hedrich, R. (2009). Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 21425-30.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., ... Hedrich, R. (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca<sup>2+</sup> affinities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 8023-8.
- Harper, J. F., Manney, L., DeWitt, N. D., Yoo, M. H. ja Sussman, M. R. (1990). The Arabidopsis thaliana plasma membrane H(+)-ATPase multigene family. Genomic sequence and expression of a third isoform. *J Biol Chem.* 265: 13601-8.
- Harris, M.J., Outlaw, W. H., Mertens, R. ja Weiler, E. W. (1988). Water-stress-induced changes in the abscisic acid content of guard cells and other cells of *Vicia faba* L. leaves as determined by enzyme-amplified immunoassay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85: 2584-8.
- Hashimoto, M., Negi, J., Young, J., Israelsson, M., Schroeder, J. I. ja Iba K. (2006). *Arabidopsis* HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO<sub>2</sub>. *Nat Cell Biol.* 8: 391-7.
- Hedrich R., Neimanis, S., Savchenko, G., Felle, H. H., Kaiser, W. M. ja Heber, U. (2001). Changes in apoplastic pH and membrane potential in leaves in relation to stomatal responses to CO<sub>2</sub>, malate, abscisic acid or interruption of water supply. *Planta.* 213: 594-601.
- Hedrich, R., Busch, H. ja Raschke, K. (1990). Ca<sup>2+</sup> and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *EMBO J.* 9: 3889-92.

- Hedrich, R. (2012). Ion channels in plants. *Physiol Rev.* 92: 1777-811.
- Hetherington, A. M. ja Woodward, F. I. (2003). The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature.* 424: 901-8.
- Hoekenga, O. A., Maron, L. G., Piñeros, M. A., ... Kochian, L. V. (2006). AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 9738-43.
- Holbrook, N. M., Shashidhar, V. R., James, R. A. ja Munns, R. (2002). Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: response of grafted plants to soil drying. *J Exp Bot.* 53:1503-14.
- Ikegami, K., Okamoto M., Seo, M. ja Koshiba, T. (2009). Activation of abscisic acid biosynthesis in the leaves of *Arabidopsis thaliana* in response to water deficit. *J Plant Res.* 122: 235-43.
- Imes, D., Mumm, P., Böhm, J., Al-Rasheid, K.A., Marten, I., Geiger, D. ja Hedrich, R. (2013). Open stomata 1 (OST1) kinase controls R-type anion channel QUAC1 in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J.* 74: 372-82.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. ja Shinozaki, K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 27: 325-33.
- Jason, Q. D. ja Schachtman, D.P. (2010). Re-examining the role of ABA as the primary long-distance signal produced by water-stressed roots. *Plant Signal Behav.* 5: 1298–301.
- Jones, R., Ougham, H., Thomas, H., ja Waaland, S. 2013. *The molecular life of plants.* Chichester, West Sussex; Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell.
- Kang, J., Hwang, J. U., Lee, M., Kim, Y. Y., Assmann, S. M., Martinoia, E. ja Lee, Y. (2010). PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 2355-60.
- Kangasjärvi, J., Jaspers, P. ja Kollist, H. (2005). Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant, Cell Environ.* 28: 1021-1036.
- Kanno, Y., Hanada, A., Chiba, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Matsui, M., Koshiba, T., Kamiya, Y ja Seo, M. (2012). Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109: 9653-8.
- Keller, B. U., Hedrich, R. ja Raschke, K. (1989). Voltage-dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *Nature.* 341: 450-453.
- Kim, T. H., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N. ja Schroeder J. I. (2010). Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO<sub>2</sub>, and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Annu Rev Plant Biol.* 61: 561-91.

- Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M. ja Shimazaki, K. (2001). Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature*. 414: 656-60.
- Koiwai, H., Nakaminami, K., Seo, M., Mitsunashi, W., Toyomasu, T. ja Koshihara, T. (2000). Tissue-Specific Localization of an Abscisic Acid Biosynthetic Enzyme, AAO3, in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 134: 1697-707.
- Kolb, H. A., Marten, I. ja Hedrich, R. (1995). Hodgkin-Huxley analysis of a GCAC1 anion channel in the plasma membrane of guard cells. *J Membr Biol*. 146: 273-82.
- Kollist, H., Jossier, M., Laanemets, K. ja Thomine, S. (2011). Anion channels in plant cells. *FEBS J*. 278: 4277–4292.
- Kovermann, P., Meyer, S., Hörtensteiner, S., Picco, C., Scholz-Starke, J., Ravera, S., Lee, Y. ja Martinoia, E. (2007). The *Arabidopsis* vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. *Plant J*. 52: 1169-80.
- Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., Moriyama, Y. ja Shinozaki, K. (2010). ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107: 2361-6.
- Kuromori, T., Sugimoto, E. ja Shinozaki, K. (2014). Intertissue Signal Transfer of Abscisic Acid from Vascular Cells to Guard Cells. *Plant Physiol*. 164: 1587-92.
- Kwak, J. M., Mäser, P., ja 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.
- Lebaudy, A., Hosy, E., Simonneau, T., Sentenac, H., Thibaud, J. B. ja Dreyer, I. (2008). Heteromeric K<sup>+</sup> channels in plants. *Plant J*. 54: 1076-82.
- Lee, M., Choi Y., Burla B., Kim Y.-Y., Jeon B., Maeshima M., Yoo J.-Y., Martinoia, E. ja Lee, Y. (2008). The ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO<sub>2</sub>. *Nature Cell Biol*. 10: 1217–23.
- Lee, S. C., Lan, W., Buchanan, B. B. ja Luan, S. (2009). A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106: 21419-24.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A. ja Grill, E. (2009). Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science*. 324: 1064-8.
- Marin, E., Nussaume, L., Quesada, A., Gonneau, M., Sotta, B., Hugueney, P., Frey, A. ja Marion-Poll, A. (1996). Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J*. 15: 2331-42.

- McAdam, S.A. M. ja Brodribb, T. J. (2018). Mesophyll cells are the main site of abscisic acid biosynthesis in water-stressed leaves. *Plant Physiol.* 177: 1-21.
- Merilo, E., Jalakas, P., Kollist, H. ja Brosché, M. (2015). The Role of ABA Recycling and Transporter Proteins in Rapid Stomatal Responses to Reduced Air Humidity, Elevated CO<sub>2</sub>, and Exogenous ABA. *Mol Plant.* 8:657-9.
- Merilo, E., Yarmolinsky, D., Jalakas, P., Parik, H., Tulva, I., Rasulov, B., Kilk, K. ja Kollist, H. (2018). Stomatal VPD Response: There Is More to the Story Than ABA. *Plant Physiol.* 176: 851-64.
- Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A. ja Giraudat, J. (2001). The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J.* 25: 295-303.
- Merlot, S., Leonhardt, N., Fenzi, F., ... Leung, J. (2007). Constitutive activation of a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. *EMBO J.* 26: 3216-26.
- Merlot, S., Mustilli, A. C., Genty, B., North, H., Lefebvre, V., Sotta, B., Vavasseur, A. ja Giraudat, J. (2002). Use of infrared thermal imaging to isolate Arabidopsis mutants defective in stomatal regulation. *Plant J.* 30: 601-9.
- Meyer, S., Mumm, P., Imes, D., Endler, A., Weder, B., Al-Rasheid, K. A., Geiger, D., Marten, I., Martinoia, E. ja Hedrich, R. (2010). AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in Arabidopsis guard cells. *Plant J.* 63: 1054-62.
- Milborrow, B. V. (2001). The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *J Exp Bot.* 52:1145-64.
- Mott, K. A. (2009). Opinion: stomatal responses to light and CO<sub>2</sub> depend on the mesophyll. *Plant Cell Environ.* 32: 1479-86.
- Mott, K. A., Sibbersen, E. D. ja Shope, J. C. (2008). The role of the mesophyll in stomatal responses to light and CO<sub>2</sub>. *Plant Cell Environ.* 31: 1299-306.
- Mustilli, A. C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F. ja Giraudat, J. (2002). Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell.* 14: 3089-99.
- Nambara, E ja Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol.* 56:165-85.
- Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Hashimoto, M. ja Iba, K. (2008). CO<sub>2</sub> regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature.* 452: 483-6.
- Nuhkat, M. (2013) Impaired stomatal closure: a case study of two types of Arabidopsis lines.

- Palmgren, M.G. (2001). Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases: Powerhouses for Nutrient Uptake. *Plant Physiol.* 171: 580-89.
- Pandey, S., Zhang, W. ja Assmann, S. M. (2007). Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. *FEBS Lett.* 581: 2325-36.
- Pantin, F., Monnet, F., Jannaud, D., Costa, J. M., Renaud, J., Muller, B., Simonneau, T. ja Genty, B. (2013). The dual effect of abscisic acid on stomata. *New Phytol.* 197: 65-72.
- Park, S. Y., Fung, P., Nishimura, N., ... Cutler, S. R. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science.* 324: 1068-71.
- Purves, W. K., Orians, G. H. ja Heller, H. C. 1994. *Life: The Science of Biology*, 4<sup>th</sup> ed. Sinauer, Sunderland. MA.
- Raschke, K., Hedrich, R., Reckmann, U. ja Schroeder, J. I. (1988). Exploring Biophysical and Biochemical Components of the Osmotic Motor that Drives Stomatal Movement. *Planet Biology.* 101: 283-94.
- Sasaki, T., Mori, I. C., Furuichi, T., Munemasa, S., Toyooka, K., Matsuoka, K., Murata, Y. ja Yamamoto, Y. (2010). Closing plant stomata requires a homolog of an aluminum-activated malate transporter. *Plant Cell Physiol.* 51: 354-65.
- Schroeder, J. I. and Hagiwara, S. (1989). Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature.* 338: 427-30.
- Schroeder, J. I. and Keller, B. U. (1992). Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 5025-29.
- Schroeder, J. I., Raschke, K. and Neher, E. (1987). Voltage dependence of K channels in guard-cell protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84: 4108-12.
- Schwartz, S. H., Qin, X. ja Zeevaart, J. A. (2003). Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiol.* 131: 1591-601.
- Schwartz, S. H., Tan, B. C., Gage, D. A., Zeevaart, J. A. ja McCarty, D. R. (1997). Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science.* 276: 1872-4.
- Seo, M. ja Koshiba, T. (2002). Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* 7:41-8.
- Seo, M., Peeters, A. J., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J. A., Koornneef, M., Kamiya, Y. ja Koshiba, T. (2000). The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 12908-13.
- Sharp, R. E. (2002). Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant Cell Environ.* 25: 211-22.

Sharpe, P. J. H., Wu, H.-I., ja Spence, R. D. (1987). Stomatal mechanics. *Stomatal Function*, E. Zeiger, G. Farquhar, ja I. Cowan, ed., Stanford University Press, Stanford, CA.

Shatil-Cohen, A., Attia, Z. ja Moshelion, M. (2011). Bundle-sheath cell regulation of xylemmesophyll water transport via aquaporins under drought stress: a target of xylemborne ABA? *Plant J.* 67: 72-80.

Shope, J. C., Peak, D., Mott, K. A. (2008). Stomatal responses to humidity in isolated epidermes. *Plant Cell Environ.* 31: 1290-8.

Sibbernsen, E. ja Mott, K. A. (2010). Stomatal responses to flooding of the intercellular air spaces suggest a vapor-phase signal between the mesophyll and the guard cells. *Plant Physiol.* 153: 1435-42.

Sindhu, R. K. ja Walton, D. C. (1988). Xanthoxin Metabolism in Cell-free Preparations from Wild Type and Wilty Mutants of Tomato. *Plant Physiol.* 88: 178-82.

Szyroki, A., Ivashikina, N., Dietrich, P., ... Hedrich, R. (2001). KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 2917-21.

Suzuki, N., Koussevitzky ja S., Miller G. (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ.* 35: 259-70.

Zeewart, J. A. A. ja Creelman, R. A. (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol.* 39: 439-73.

Zheng, X., He, K., Kleist, T., Chen, F. and Luan, S. (2015). Anion channel SLAH3 functions in nitrate-dependent alleviation of ammonium toxicity in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* 38: 74-86.

Taiz L., Zeiger E. 2010. *Plant Physiology*, 5<sup>th</sup> ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland Inc., MA.

Trejo, C. L., Clephan, A. L. ja Davies W. J. (1995). How Do Stomata Read Abscisic Acid Signals? *Plant Physiol.* 109: 803-11.

Ueno, K., Kinoshita, T., Inoue, S., Emi, T. and Shimazaki, K. (2005). Biochemical characterization of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activation in guard cell protoplasts of Arabidopsis thaliana in response to blue light. *Plant Cell Physiol.* 46: 955-63.

Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T. and Shinozaki, K. (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 17588-93.

Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y. F., ... Kangasjärvi, J. (2008). SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature.* 452: 467-91.

Vahisalu, T., Puzõrjova, I., Brosché, M., ... Kollist, H. (2010). Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *Plant J.* 62: 442-53.

Verrier, P. J., Bird, D., Burla, B., ... Theodoulou, F. L. (2008). Plant ABC proteins--a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci.* 13: 151-9.

Weyers, J. D. B., Poole, I., Lawson T. ja Raven, J. A. (1996). Variations in stomatal density and index: implications for palaeoclimatic reconstructions. *Plant Cell Environ.* 19: 705 – 12.

Willmer C., Fricker M. 1996. *Stomata*, 2<sup>nd</sup> ed. Chapman and Hall, London, UK.

Xue, S., Hu, H., Ries, A., Merilo, E., Kollist, H. ja Schroeder, J. I. (2011). Central functions of bicarbonate in S-type anion channel activation and OST1 protein kinase in CO<sub>2</sub> signal transduction in guard cell. *EMBO J.* 30: 1645-58.

Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Aronso, J., Ecker, J. R., ja Shinozaki, K. (2002). ABA-Activated SnRK2 Protein Kinase is Required for Dehydration Stress Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 43: 1473-83.

Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F. and Shinozaki, K. (2006). The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in Arabidopsis. *J Biol Chem.* 281: 5310-8.

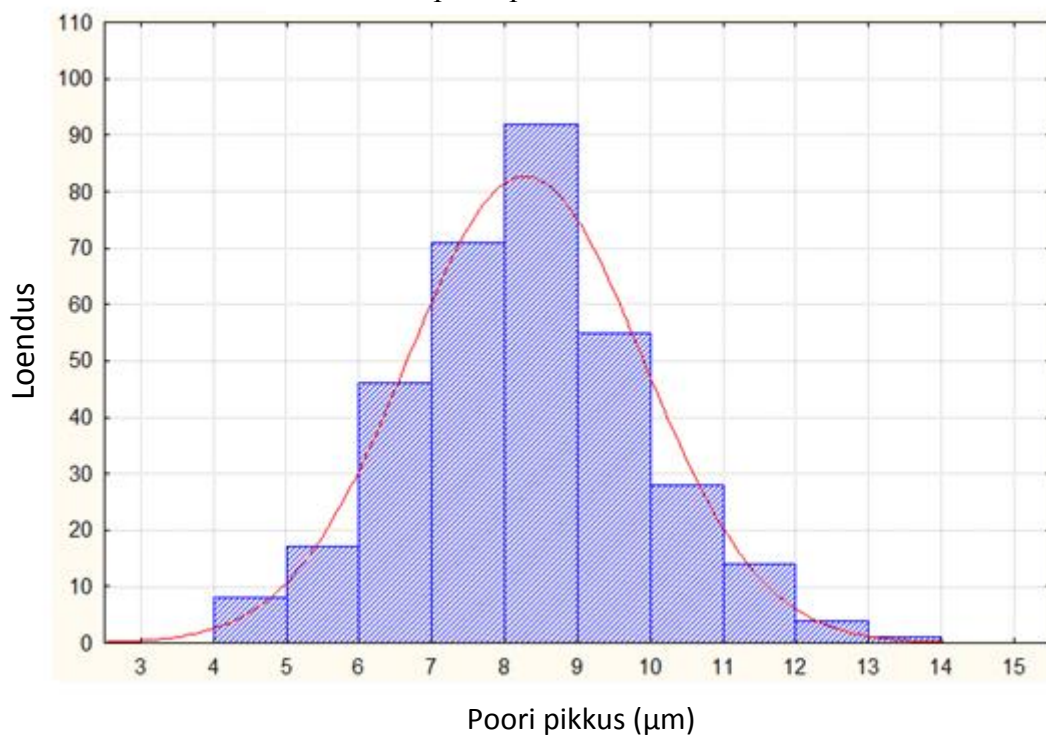
**KASUTATUD VEEBIAADRESSID:**

**TAIR:** The Arabidopsis Information Resource, <http://www.arabidopsis.org/> (09.05.2018)

# LISAD

## LISA 1

Õhulõhede poori pikkuse varieeruvus Col-0 liinil



## **LIHTLITSENTS**

**Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Jaanika Unt,

(sünnikuupäev 29.02.1996)

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

**Õhulõhede regulatsiooni uurimine epidermise lõikude ja gaasivahetusmeetodite võrdluses harilikus müürloogas abstsiihappe toimetel**

, mille juhendajad on Maris Nuhkat ja Hannes Kollist,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus 28.05.2018