

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

Defektse *MED25* mõju hariliku müürlooga õhulõhede regulatsioonile

Bakalaureusetöö

12 EAP

Erki Eelmets

Juhendajad MSc Kaspar Koolmeister,

PhD Hanna Hõrak

TARTU 2020

Infoleht

Defektse *MED25* mõju hariliku müürlooga õhulõhede regulatsioonile

Taimede välises rakukihis on väiksed poorid, mille kaudu ammutatakse süsihappegaasi, kuid samaaegselt transpireerub vesi. Neid poore nimetatakse õhulõhedeks ning need on võimelised reageerima keskkonnatingimuste muutustele avanedes ja sulgudes. Niiviisi säästavad taimed vett näiteks stressitingimustes. Õhulõhede regulatsiooni täpsem kirjeldamine oleks kasulik muutuvale kliimale paremini adapteeruvate taimede loomisel. Selles töös uuriti *MED25* defektide potentsiaalset seost punase valguse toimeliste reaktsioonidega mudeltaimes harilik müürlook. Katseid tehti metsiktüüpide Col-0 ja Col-3 ning *MED25* geenikatkestustega liinidega. Uuringu tulemustes ilmnes *MED25* mõju õhulõhede reaktsioonivõimele punases valguses ja kõrge süsihappegaasi kontsentratsiooni korral, aga tuvastati ka *MED25* potentsiaalne negatiivselt reguleeriv roll kõrge süsihappegaasi kontsentratsiooni toimelistes õhulõhede sulgumisreaktsioonides.

Õhulõhe, taim, areng, gaasivahetus, *MED25*

CERCS: B310 Soontaimede füsioloogia, B225 Taimegeneetika

The effect of *MED25* gene disruptions on stomatal regulation in *Arabidopsis thaliana*

There are small pores in the epidermis of plants through which the uptake of carbon dioxide and the transpiration of water occur. These pores are called stomata and have the ability to react to the change in environmental conditions by opening or closing. This is how plants save water during drought. A better understanding of plant stomatal movements could prove beneficial to future development of plants better suited to the changing climate. The main focus of this study was to determine how different disruptions in the *MED25* gene would affect the stomatal conductance of *Arabidopsis thaliana*. The *A. thaliana* ecotypes Col-0 and Col-3 and various *MED25* T-DNA mutants were used in this study. The results showed that *MED25* in fact has an effect on stomatal regulation in red light but also in high environmental carbon dioxide concentration. A novel discovery was also made indicating a negative regulatory role to *MED25* in stomatal reaction to high environmental carbon dioxide concentration.

Stomata, plant, development, gas exchange, *MED25*

CERCS: B310 Physiology of vascular plants, B225 Plant genetics

Sisukord

INFOLEHT	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1 HARILIK MÜÜRLOOK	8
1.2 ÕHULÕHED	8
1.2.1 Õhulõhede avanemise ja sulgumise molekulaarsed mehhanismid.....	9
1.3 ÕHULÕHEDE REGULATSIOON	10
1.3.1 Punane valguse toimelised reaktsioonid	10
1.3.2 Sinine valguse toimelised reaktsioonid	12
1.3.3 CO ₂ toimelised reaktsioonid.....	13
1.3.4 ABA toimelised reaktsioonid	14
1.4 MED25.....	15
1.4.1 Seni tuntud funktsioonid.....	15
2 EKSPERIMENTAALOSA	18
2.1 TÖÖ EESMÄRGID.....	18
2.2 MATERJAL JA METOODIKA	18
2.2.1 Taimeliinid	18
2.2.2 Taimikasvatus	18
2.2.3 Gaasivahetuskatsete aparatuur	19
2.2.4 Gaasivahetuskatsed	21
2.2.5 DNA eraldus.....	22
2.2.6 PCR	22
2.2.7 Gelelektroforees.....	23
2.2.8 Andmeanalüüs	23
2.3 TULEMUSED	24
2.3.1 T-DNA insertioonide asukohad.....	24
2.3.2 Mutantsete med25-3 liinide genotüüpiseerimine	25
2.3.3 Mutantsete med25-4 liinide genotüüpiseerimine	26
2.3.4 Mutantsete med25-5 liinide genotüüpiseerimine	27
2.3.5 Gaasivahetuskatsed punases valguses	28
2.3.6 Gaasivahetuskatsed sinises valguses	29
2.3.7 Gaasivahetuskatsed madala CO ₂ kontsentratsiooni juures.....	30
2.3.8 Gaasivahetuskatsed kõrge CO ₂ kontsentratsiooni juures.....	31
2.3.9 Gaasivahetuskatsed ABA manulusel.....	32

2.4	ARUTELU	33
2.4.1	<i>T-DNA insertiooniga taimeliinide isoleerimine</i>	33
2.4.2	<i>Tähelepanekud gaasivahetuskatsetest.....</i>	33
2.4.3	<i>MED25 mõju õhulõhede reaktsioonivõimele.....</i>	34
2.4.4	<i>MED25 geenikatkestuse asukoha mõju õhulõhede regulatsioonile</i>	35
2.4.5	<i>Järeldused.....</i>	36
	KOKKUVÕTE.....	37
	RESÜMEE.....	38
	KASUTATUD KIRJANDUS.....	39
	KASUTATUD VEEBIAADRESSID	46
	LISAD.....	47
	LISA 1	47
	LISA 2	47
	LIHTLITSENTS	48

Kasutatud lühendid

ABA, *abscisic acid* – abstsiihape, mitmeid stressivastuseid algatav taimehormoon

AHA1, *Arabidopsis thaliana* H⁺-ATPASE ISOFORM 1 – *Arabidopsis thaliana* H⁺-ATPaasi isovorm

AKT1, ARABIDOPSIS THALIANA K⁺ TRANSPORTER 1 – *Arabidopsis thaliana* kaaliumi sissevoolu kanal

BHP, BLUE LIGHT-DEPENDENT H⁺-ATPASE PHOSPHORYLATION – sinise valguse toimeline H⁺-ATPaasi fosforüleerimist reguleeriv valk

BLUS1, BLUE LIGHT SIGNALING 1 – sinise valguse signaalirajas osalev kinaas

CA, CARBONIC ANHYDRASE – karboonhappe anhüdraas

CO, CONSTANS – pika päeva tingimustes osalev õitsemist reguleeriv transkriptsioonifaktor

CRY1, CRYPTOCHROME 1 – krüptokroom 1, sinise valguse retseptor, ei osale õhulõhede regulatsioonis

CRY2, CRYPTOCHROME 2 – krüptokroom 2, sinise valguse retseptor, ei osale õhulõhede regulatsioonis

DCMU, 3-(3,4-diklorofenüül)-1,1-dimetüülurea – fotosünteesi inhibiitor

FT, FLOWERING LOCUS T – õitsemise lookus T, õitsemise alustamise regulaator

GHR1, GUARD CELL HYDROGEN PEROXIDE-RESISTANT 1 – õhulõhede sulgumist reguleeriv pseudokinaas

GORK, GATED OUTWARDLY-RECTIFYING K⁺ CHANNEL – kaaliumioonide väljavoolukanal

HT1, HIGH LEAF TEMPERATURE 1 – õhulõhede sulgumist ja avanemist reguleeriv kinaas

KAT1, POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 1 – *Arabidopsis thaliana* kaaliumi sissevoolu kanal

KAT2, POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 2 – *Arabidopsis thaliana* kaaliumi sissevoolu kanal

LED, *light emitting diode* – valgust kiirgav diood

MED, MEDIATOR – transkriptsiooni mediaatorkompleks

MED25, MEDIATOR25 – transkriptsiooni mediaatorkompleksi subühik, teise nimega PFT1

MPK4, MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 4 – mitogeen aktiveeritud kinaas 4

MPK12, MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 12 – mitogeen aktiveeritud kinaas 12

OST1, OPEN STOMATA 1 – õhulõhede avanemist ja sulgumist reguleeriv kinaas

PFT1, PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1 – transkriptsiooni mediaatorkompleksi subühik, teise nimega MED25

PHOT1, PHOTOTROPIN1 – fototropiin 1, sinise valguse retseptor, tähtis õhulõhede regulatsioonis

PHOT2, PHOTOTROPIN2 – fototropiin 2, sinise valguse retseptor, tähtis õhulõhede regulatsioonis

PHYB, PHYTOCHROME B – fütokroom B, punase valguse retseptor

PP1, PROTEIN PHOSPHATASE 1 – valgu fosfataas 1, osaleb sinise valguse signaalirajas

PP2C, PROTEIN PHOSPHATASE 2C – valgu fosfataas 2C, osaleb ABA mõjul õhulõhede sulgumises

PRSL1, PP1 REGULATORY SUBUNIT2-LIKE PROTEIN 1 – PP1 reguloorne subühik, oluline ABA signaalirajas

PYL, PYR1- LIKE – PYR1 taoline valk, ABA retseptor PYR/PYL/RCAR valkude perekonnast

PYR1, PYRABACTIN RESISTANCE 1 – pürabaktiini resistentsus 1, ABA retseptor PYR/PYL/RCAR valkude perekonnast

RCAR, REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTORS – ABA retseptorite reguloorsed komponendid, ABA retseptor PYR/PYL/RCAR valkude perekonnast

SAS, SHADE AVOIDANCE SYNDROME – varju vältimise sündroom

SLAC1, SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1 – aeglane anioonkanal 1, anioonide väljavoolu kanal

SLAC3, SLAC1 HOMOLOG 3 – SLAC1 homolog 3, anioonide väljavoolu kanal

T-DNA, transfer DNA – ülekantud DNA järjestus

Sissejuhatus

Taimed ammutavad fotosünteesi käigus atmosfäärist süsihappegaasi väikeste pindmiste pooride kaudu ning samaaegselt toimub nendest ka vee transpireerumine. Taimede puhul on vesi piiratud ressurss ning seetõttu on oluline piirata liigset veekadu. Neid pindmisi poore nimetatakse õhulõhedeks ning need koosnevad kahest sulgrakust ning nende vahele moodustuvast õhupilust. Sulgrakud reguleerivad õhupilu avatust turgormuutuste abil ning on niiviisi kiiresti võimelised reageerima keskkonnatingimuste muutustele.

Õhuõhed avanevad valguse, madala süsihappegaasi kontsentratsiooni ning kõrge õhuniiskuse toimel. Õhulõhed sulguvad pimeduse, kõrge süsihappegaasi kontsentratsiooni, madala õhuniiskuse, patogeensete organismide ja abtsiishappe mõjul. Valgus on õhulõhedele tugev avanemissignaali ning sinisele ja punasele valgusele reageerivad taimed erinevalt – reaktsioon sinisele valgusele on tugevam ja kiirem kui reaktsioon punasele valgusele.

Senini on kirjeldatud geeni *MED25* mõju nii taimede kasvule kui ka arengule ning on näidatud, et *MED25* ekspresseerub tugevalt sulgrakkudes. Selle töö eesmärk oli uurida kuidas mõjutavad katkestused *MED25* geeni erinevates positsioonides õhulõhede regulatsiooni. Mudeltaimena kasutati selles töös hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) metsiktüüpe Col-0 ja Col-3 ning nende taustal loodud mutantseid taimeliine. Gaasivahetusseadmetega määrati taimede õhulõhede juhtivus, arvutades seda eraldunud veeauru koguse alusel.

See töö koostati Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis taimsete signaalide uurimisrühmas ning on jätk Koolmeister, 2019 uurimusele.

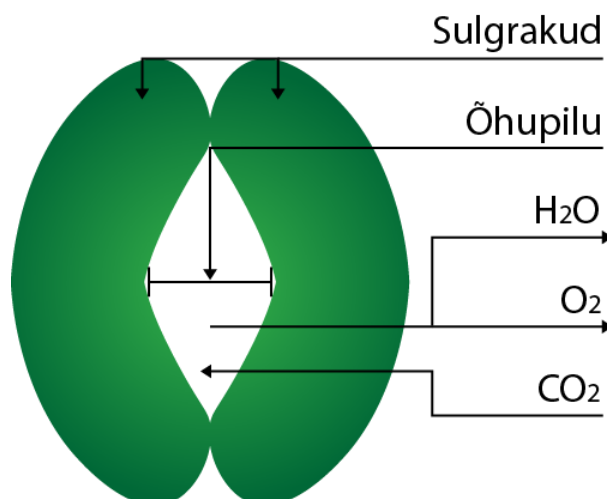
1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Harilik müürlook

Arabidopsis thaliana ehk harilik müürlook on väike taim, mis kuulub kapsalaadsete seltsi. Taimel on lühike elutsükkel – juba 6 nädalat peale külvamist valmivad uued seemned (Meinke *et al.*, 1998). Hariliku müürlooga looduslik leviala hõlmab Lääne-Euraasiat ja Põhja-Aafrikat (Hoffmann, 2002). Harilik müürlook on kõikidest katteseemnetaimedest uurituim ning on ka üks laialdasemalt kasutatav mudelorganism taimebioloogias (Koornneef ja Meinke, 2010). Mudelorganismiks geneetikas sobib harilik müürlook oma lühikese elutsükli, väikese suuruse, suure seemnete arvu, madala kordusjärjestuse arvu ning väikese 157 miljonist aluspaarist koosneva diploidse genoomi tõttu. (Goodman *et al.*, 1995; Krämer, 2015).

1.2 Õhulõhed

Õhulõhed on mikroskoopilised poorid taimede maapealsete osade pealmises rakukihis, mis võimaldavad gaasivahetust taime sise- ja väliskeskonna vahel. Õhulõhe struktuurse üksuse moodustavad kaks spetsialiseerunud rakku, mida nimetatakse sulgrakkudeks ning nende vahele jääv avaus, mida nimetatakse õhupiluks (Joonis 1, Zeiger *et al.*, 1987). Sulgrakud reguleerivad õhulõhede avatust turgori muutuste kaudu. Taimed avavad õhulõhed CO₂ ammutamiseks atmosfäärist ning suurenenud CO₂-omastamise võimega kaasneb ka suurem transpiratsioonist tulenev veekadu. Põua või mõne muu stressitingimuse esinenemisel reageerivad õhulõhed sulgudes, et niiviisi veekadu minimaliseerida ja stressitingimusi suurema tõenäosusega üle elada (Blatt, 2000).



Joonis 1. Joonisel on kujutatud õhulõhe. See koosneb kahest sulgrakust ja nende vahele moodustuvast õhupilust. Õhupilu kaudu väljuvad taimest veeaur ja hapnik ning siseneb süsihappegaas.

1.2.1 Õhulõhede avanemise ja sulgumise molekulaarsed mehhanismid

Õhulõhed avanevad H^+ -ATPaas protonpumpade aktivatsioonil, millega väljutatakse protonid (H^+) sulgrakkudest ning nende plasmamembraan hüperpolariseerub. Selle protsessi tulemusena algab kaaliumioonide (K^+) sissevoolu rakku läbi ionikanalite. Kaaliumioonide sissevoolus osalevad kolme tüüpi kanalid: KAT1 (POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 1 – *Arabidopsis thaliana* kaaliumi sissevoolu kanal), KAT2 (POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 2 – *Arabidopsis thaliana* kaaliumi sissevoolu kanal) ja AKT1 (ARABIDOPSIS THALIANA K^+ TRANSPORTER 1 – *Arabidopsis thaliana* kaaliumi sissevoolu kanal) (Schachtman *et al.*, 1992; Pilot *et al.*, 2001; Szyroki *et al.*, 2001). Kaaliumioonide sissevooluga kaasneb rakusisese laengu muutus. Rakusisese laengu kompenseerimiseks on sulgrakkudes kaks mehhanismi. Esimeseks ja peamiseks nendest on tärklise lagundamine – protsess, mille üheks produktiks on malaat²⁻ (Willmer ja Fricker, 1996). Teine tasakaalustamise mehhanism on Cl^- ja NO_3^- -ioonide transport apoplastist rakku (Shimazaki *et al.*, 2007; Daszkowska-Golec ja Szarejko, 2013). Kaaliumioonide sissevool põhjustab rakusisese osmootse rõhu tõusu ja seeläbi ka suurenenud vee sissevoolu, millest tingitud turgorimuutus paisutab sulgrakke. Sulgrakkude paisumine toimub ebäühtlaselt, mistõttu tekib nende vahele õhupilu – õhulõhe avaneb (Shimazaki *et al.*, 2007).

Õhulõhede sulgemine on avanemise vastandprotsess – kui õhulõhede avanemise mehhanism seisneb osmootse rõhu tõstmises, siis õhulõhede sulgemine aga puhkeseisundile kohase osmootse rõhu taastamises. Sulgemiseks inhibeeritakse H^+ -ATPaasi aktiivsus ja aktiveeritakse anioonkanalid, mille vahendusel transporditakse Cl^- , NO_3^- ja malaat²⁻ ioone rakust välja. Anioonkanaleid on sulgrakkudes kahte tüüpi: aeglated ehk S-tüüpi kanalid ja kiired ehk R-tüüpi kanalid. (Roelfsema *et al.*, 2004; Roelfsema ja Hedrich, 2005). S-tüüpi anioonkanalid on aeglated reageerima membraanipotentsiaali muutusele ning pole võimelised täielikult sulguma. Erinevalt S-tüüpi anioonkanalitest avanevad R-tüüpi anioonkanalid membraani depolariseerumise korral kiirelt ning sulguvad hüperpolarisatsiooni tulemusel täielikult (Schroeder ja Keller, 1992). Kahe S-tüüpi anioonkanali puudumisel on täheldatud häireid taimede võimes sulgeda õhulõhesid, mis iseloomustab nende olulisust. Need kanalid on SLAC1 (SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1 – aeglane anioonkanal 1, anioonide väljavoolukanal) ja SLAH3 (SLAC1 HOMOLOG 3 – SLAC1 homolog 3, anioonide väljavoolukanal) (Vahisalu *et al.*, 2008; Geiger *et al.*, 2011). Rakumembraan depolariseerub H^+ -ATPaasi inhibitsiooni ja anioonkanalite avamise tagajärjel ning käivitub GORK (GATED OUTWARDLY-RECTIFYING K^+ CHANNEL – kaaliumioonide väljavoolu kanal). GORK

juhhib kaaliumioonid tagasi apoplasti, mistõttu taastub puhkeseisundile kohane osmootne rõhk ja õhulõhe sulgub (Ache *et al.*, 2000).

1.3 Õhulõhede regulatsioon

Õhulõhede reaktsiooni põhjustavad valgus, muutus suhtelises õhuniiskuses, muutus CO₂ kontsentratsioonis ja fütohormoonid (Wang *et al.*, 2010). Õhulõhede avanemisreaktsiooni põhjustavad sinine, punane ja valge valgus. Reageerimine toimub valge valguse puhul üheaegselt nii sinise kui ka punase valguse signaalile, kuna valge valgus ühendab endas kogu nähtavat spektrit. Reaktsiooni seevastu ei esine rohelise valguse käes, mille lainepikkus jääb punase ja sinise valguse vahele (Sharkey ja Raschke, 1981; Shimazaki *et al.*, 2007).

1.3.1 Punane valguse toimelised reaktsioonid

Erinevatel lainepikkustel valgust tajutakse erinevate fotoretseptoritega ja signaaliradadega (Assmann ja Shimazaki, 1999). Punast ja ka kaugpunast valgust tajuvad fütokroomid. Need fotomorfogeensed valgud reguleerivad ka taimede kasvu ja kujunemist. Harilikus müürloogas on kokku viis erinevat fütokroomi: fütokroomid A, B, C, D, ja E. Fütokroomid esinevad kahes valgustundlikus seisundis nii hetero- kui ka homodimeeridena. Need seisundid on Pr (punast valgust neelav vorm) ja Pfr (kaugpunast valgust neelav vorm) (Mancinelli, 1994; Quail, 2002; Kaiserli ja Chory, 2016).

Punase valguse mõjul lülituvad fütokroomid bioloogiliselt aktiivsesse seisundisse Pr. Kaugpunane valgus inaktiveerib fütokroomid tagasi passiivsesse seisundisse Pfr (Mancinelli, 1994; Kevei *et al.*, 2007). Need seisundid ei saa samaaegselt esineda ning on näidatud, et punase valguse reaktsiooni saab maha suruda kaugpunase valgusega ja vastupidi (Talbot *et al.*, 2002; Talbot *et al.*, 2003). Fütokroomide omadus esineda kahes valgustundlikus seisundis võimaldab kvantitatiivselt tajuda punast ja kaugpunast valgust ning nende vahelist suhet. Kõrge suhe väljendab häid valgusolusid ning madal suhe otsese päikesevalguse puudumist (Casal, 2013). *PHYB* kodeerib punase valguse retseptorit PHYB (PHYTOCHROME B – fütokroom B, punase valguse retseptor) (Sharrock ja Quail, 1989). *PHYB* ala- ja üleekspressiooni mutantidega on näidatud, et õhulõhede reaktsiooni tugevus punasele ja sinisele valgusele korreleerub positiivselt PHYB retseptori hulgaga taimes (Wang *et al.*, 2010). See viitab, et PHYB tähtsus õhulõhede regulatsioonis ei piirdu vaid vastusega punasele valgusele. Mõõtes valgusreaktsioone fotosünteesi inhibeerimise järel, tuvastati, et sinise valguse reaktsioon oli osaliselt häiritud ning reaktsioon punasele valgusele puudus täielikult (Schwartz ja Zeiger, 1984). Selleks manustati tugevat fotosünteesi inhibiitorit DCMU (3-(3,4-diklorofenüül)-1,1-dimetüülurea – fotosünteesi inhibiitor). Eelnevate katsete tulemustele vastuoluliselt esines

katsetes, kus rakusisest CO₂ kontsentratsioon hoiti konstantsena, endiselt avanemisreaktsioon vastusena punasele valgusele. See toetab teooriat, et õhulõhede reguleerimiseks punases valguses ei piisa üksnest muutustest fotosünteesis, vaid eksisteerib eraldiseisev signaalirada (Messinger *et al.*, 2006).

Katsetes, kus mõõdeti sulgrakkude membraanipotentsiaali, täheldati, et ühele õhulõhele suunatud sinise valguse kiir kutsub esile sulgrakkude plasmamembraani hüperpolariseerumise ja algatab avanemisreaktsiooni (Roelfsema *et al.*, 2001; Roelfsema *et al.*, 2002). Analoogsete katsete puhul punases valguses plasmamembraan ei hüperpolariseerunud ega esinenud avanemisreaktsiooni, kuid laiema pinna valgustamisel esines reaktsioon. Nende katsete tulemused viitavad võimalusele, et sulgrakkude reaktsioon punasele valgusele on põhjustatud fotosünteesi tõttu langenud rakusisese CO₂ kontsentratsioonist (kaudse reaktsiooni teooria).

Punasele valgusele reageerimise mehhanism on mingil määral fotosünteesiga seotud (Sharkey ja Raschke, 1981; Schwartz ja Zeiger, 1984). Ando ja Kinoshita, 2018 uuringu tulemus kinnitas seda eeldust, kuna õhulõhede avanemine punases valguses toimub prootonpumba AHA1 (*Arabidopsis thaliana* H⁺-ATPASE ISOFORM 1 – *Arabidopsis thaliana* H⁺-ATPaasi isovorm) fosforüleerimisel. Prootonpumba fosforüleerimine on aga fotosünteesist sõltuv protsess, kuna pimeduses madala CO₂ kontsentratsiooni juures prootonpump ei fosforüleeru (Ando ja Kinoshita, 2018). Fotosünteesi ja punase valguse reaktsiooni vahelise seos võib tuleneda potentsiaalselt kõrge rakusisese CO₂ kontsentratsiooni inhibeerivast mõjust prootonpumbale AHA1 (Edwards ja Bowling, 1985). Selle teooria kohaselt pole madal CO₂ kontsentratsioon iseseisev signaal õhulõhede avanemiseks, aga see-eest osaleb täiendavalt punase valguse toimelises avanemisreaktsioonis.

Punase valguse signaalirajas tuvastati suur tähtsus kinaasil HT1 (HIGH LEAF TEMPERATURE 1 – õhulõhede sulgumist ja avanemist reguleeriv kinaas). Defektset kinaasi kodeerivad mutantsete *ht1* taimede õhulõhed ei olnud punasele valgusele reaktsioonivõimelised (Hashimoto *et al.*, 2006; Matrosova *et al.*, 2015; Hashimoto-Sugimoto *et al.*, 2016), aga neil säilis võime reageerida sinisele valgusele (Matrosova *et al.*, 2015). Samas ei täheldatud häireid punase valguse reguleeritavates arenguprotsessides. Kaudse reaktsiooni teooria kontrolliks katsetati ka defektset CA (CARBONIC ANHYDRASE - karboonhappe anhüdraas) kodeerivaid taimi. CA on oluline komponent rakusisese CO₂ kontsentratsiooni tajumisel. Karboonhappe anhüdraasse aktiivsuse puudumisel peaks kaudse reaktsiooni teooria kohaselt puuduma mutantsetel liinidel võime reageerida punasele valgusele. Katsetes näidati, et mutantsete *ca* taimed ei olnud võimelised reageerima CO₂ kontsentratsiooni langusele, aga neil säilis võime reageerida punasele valgusele (Matrosova *et al.*, 2015).

Mitmed teooriad eksisteerivad punase valguse signaaliraja kohta, kuid puudub ühene selgus selle täpsete mehhanismide osas – kas õhulõhede avanemine punases valguses on tingitud fotosünteesi käigus langenud CO₂ kontsentratsioonist, eraldiseisvast reaktsioonist punasele valgusele või nende kombinatsioonist. Alapeatükis kirjeldatud katsete tulemused ajendavad arvamust, et õhulõhede punase valguse signaalirada sisaldab enam komponente, kui on senini kirjeldatud. Seetõttu oleks signaaliraja paremaks mõistmiseks tarvis täiendavate uuringute tegemine.

1.3.2 Sinine valguse toimelised reaktsioonid

Sinist valgust tajuvaid fotoretseptoreid on taimedes kahte tüüpi – fototropiinid ja krüptokroomid. Fototropiinid jaotuvad kaheks: PHOT1 (PHOTOTROPIN 1 – fototropiin 1, tähtis õhulõhede regulatsioonis) ja PHOT2 (PHOTOTROPIN 2 - fototropiin 2, tähtis õhulõhede regulatsioonis) (Briggs *et al.*, 2001; Briggs ja Christie, 2002). Kinoshita *et al.*, 2001 uuringu tulemustes selgus, et fototropiinid funktsioneerivad üksteist täiendavalt või asendavalt – kummagi retseptori üksikmutantidel säilib võime reageerida sinisele valgusele, mis mõlema retseptori topelmutantidel puudub. Seetõttu on fototropiinid olulised õhulõhede avanemiseks sinise valguse mõjul (Kinoshita *et al.*, 2001).

Fototropiinide sinise valgusega valgustamine põhustab nende autofosforüleerumist (Kinoshita *et al.*, 2001; Christie, 2007). Fototropiinid fosforüleerivad signaalirajas edasi proteiinkinaasi BLUS1 (BLUE LIGHT SIGNALING 1 - sinise valguse signaalirajas osalev kinaas), mis edastab signaali fosfataasile PP1 (PROTEIN PHOSPHATASE 1 – valgu fosfataas 1, osaleb sinise valguse signaalirajas) ja selle regulatoorsele subühikule PRSL (PP1 REGULATORY SUBUNIT2-LIKE PROTEIN 1 – PP1 regulatoorne subühik, oluline ABA signaalirajas) (Takemiya *et al.*, 2006; Takemiya *et al.*, 2013a; Takemiya *et al.*, 2013b; Takemiya ja Shimazaki, 2016). Sinise valguse signaalirajas on oluline komponent ka Raf-tüüpi kinaas BHP (BLUE LIGHT-DEPENDENT H⁺-ATPASE PHOSPHORYLATION – sinise valguse toimeline H⁺-ATPaasi fosforüleerimist reguleeriv valk). BHP interakteerub mitmete sinise valguse signaaliraja komponentidega nagu näiteks BLUS, PP1 ja ka retseptoritega PHOT1 ja PHOT2 (Hayashi *et al.*, 2017).

Sarnaselt fototropiinidele jaotuvad ka krüptokroomid kaheks: CRY1 (CRYPTOCHROME 1 – krüptokroom 1, sinise valguse retseptor, ei osale õhulõhede regulatsioonis) ja CRY2 (CRYPTOCHROME 2 – krüptokroom 2, sinise valguse retseptor, ei osale õhulõhede regulatsioonis) (Cashmore *et al.*, 1999). Krüptokroomid ei oma otsest mõju õhulõhede

regulatsioonile – need valgud reguleerivad taimedes sinise valguse seoselisi arenguprotsesse ning ööpäevast tsüklit (Sancar, 1994; Christie, 2007; Boccalandro *et al.*, 2012).

Sinine valgus on õhulõhedele väga tugev avanemissignaali (Sharkey ja Raschke, 1981). Sinise valguse avanemisreaktsioonide molekulaarsed mehhanismid on punase valguse molekulaarsete mehhanismidega võrreldes tuntumad. Kuigi sinise valguse signaalirajas on tuvastatud signaali tajuvad fotoretseptorid ja mitmed muud olulised komponendid, esineb ka selles rajas suundi, mis vajavad täiendavat uurimist. Üheks potentsiaalseks uurimissuunaks võiks olla väljaselgitamine, kuidas reguleeritakse H⁺-ATPaasi fosforüleerimist.

1.3.3 CO₂ toimelised reaktsioonid

Õhulõhed avanevad ja sulguvad vastusena muutustele keskkonna CO₂ kontsentratsioonis. Seeläbi tagatakse ühtlane CO₂ juurdevool fotosünteesiks (Raschke, 1975). Sulgrakud tajuvad rakusisest CO₂ kontsentratsiooni, mis on ühtlasi tingitud keskkonna CO₂ kontsentratsioonist, ja on selle muutustele võimelised kiirelt reageerima (Fitzsimons ja Weyers, 1983; Mott, 1988). Kuidas sulgrakud rakusisese CO₂ kontsentratsiooni muutust tajuvad pole täpselt teada. Arvatavasti on varajastes regulatsiooni etappides olulised karboonhappe anhüdraasid. Need ensüümid katalüüsivad lahustunud süsihappegaasist bikarbonaadi ja prootoni moodustumist. Defektse karboonhappe anhüdraase aktiivsusega taimedel täheldati tugevalt häiritud õhulõhede reaktsioonivõimet CO₂ kontsentratsiooni muutustele (Hu *et al.*, 2010). Komplementeerides samu liine endogeensete karboonhappe anhüdraaside asemel inimesest pärit karboonhappe anhüdraasidega, täheldati CO₂ kontsentratsiooni seoselise reaktsioonivõime taastumist. Nende katsete tulemused toetavad hüpoteesi, et sulgrakud ei taju otseselt CO₂ kontsentratsiooni muutust, vaid sellega kaasnevat muutust bikarbonaadi tasemes (Hu *et al.*, 2010).

CO₂ kontsentratsiooni muutuste tajumisel on suur tähtsus tuvastatud Raf-tüüpi kinaasil HT1. Katsetes defektset kinaasi kodeerivate *ht1* taimedega täheldati, et need olid reaktsioonivõimetud muutustele CO₂ kontsentratsioonis (Hashimoto *et al.*, 2006; Matrosova *et al.*, 2015; Hashimoto-Sugimoto *et al.*, 2016). Mutantsete *ht1* liinide reaktsioonivõimes valgusele, abtsiishappele ja suhtelise õhuniiskuse muutustele ei esinenud häireid (Hashimoto *et al.*, 2006; Hashimoto-Sugimoto *et al.*, 2016). HT1 aktiivsust reguleerivad mitogeen-aktiveeritud kinaasid MPK4 (MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 4 – mitogeen aktiveeritud kinaas 4) ja MPK12 (MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 12 – mitogeen aktiveeritud kinaas 12). MPK4 ja MPK12 on hädavajalikud komponendid CO₂ kontsentratsiooni muutuste tajumisel (Töldsepp *et al.*, 2018). Nendel kinaasidel on HT1

aktiivsust inhibeeriv toime ning arvatakse, et nad aktiveeruvad keskkonna CO₂ kontsentratsiooni tõusul. HT1 on aga kinaasi OST1 (OPEN STOMATA 1 – õhulõhede avanemist ja sulgumist reguleeriv kinaas) inhibiitor ning HT1 aktiivsuse langedes aktiveerub OST1 (Tian *et al.*, 2015; Hashimoto-Sugimoto *et al.*, 2016; Hõrak *et al.*, 2016; Jakobson *et al.*, 2016). OST1 kinaas aktiveerib omakorda SLAC1 anioonkanali – algab õhulõhede sulgumisreaktsioon keskkonna CO₂ kontsentratsiooni tõusu tõttu (Vahisalu *et al.*, 2008; Geiger *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Vahisalu *et al.*, 2010). Katsetes on selgunud, et õhulõhede sulgumisel kõrge CO₂ taseme mõjul on oluliseks komponendiks ka pseudokinaas GHR1 (GUARD CELL HYDROGEN PEROXIDE-RESISTANT1 – õhulõhede sulgumist reguleeriv pseudokinaas). Seda järelitati *GHR1* defektsete taimede tugevalt häiritud õhulõhede sulgumise reaktsioonivõimest (Hõrak *et al.*, 2016; Sierla *et al.*, 2018).

CO₂ kontsentratsiooni languse reaktsiooni signaaliraja kohta on võrreldes CO₂ kontsentratsiooni tõusu raja kohta vähem teada. CO₂ kontsentratsiooni languse signaalirajas on tuvastatud karboonhappe anhüdraasid, kinaas HT1 ja seda reguleerivad kinaasid MPK4 ja MPK12 (Hu *et al.*, 2010; Tõldsepp *et al.*, 2018). Nende valkude puudumine või mutatsioon neid kodeerivates geenides tõi kaasa õhulõhede vähenenud või kadunud reaktsiooni CO₂ kontsentratsiooni langusele. Seejuures karboonhappe anhüdraaside puhul polnud olulised spetsiifilised geenid, vaid ensümaatilise aktiivsuse esinemine ning defektseid liine eksogeensete karboonhappe anhüdraasidega komplementeerides taastus reaktsioonivõime (Hu *et al.*, 2010). See-eest HT1, MPK4 ja MPK12 on bioloogiliselt aktiivsed vaid tervikliku komplektina (Hashimoto *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2010; Hõrak *et al.*, 2016; Jakobson *et al.*, 2016; Tõldsepp *et al.*, 2018). Õhulõhede avanemisprotsess madala CO₂ taseme mõjul algab H⁺-ATPaasi aktiveerimisega, aga kuidas see toimub ja mis on signaaliraja ülejäänud komponendid, vajab täiendavat uurimist.

1.3.4 ABA toimelised reaktsioonid

Fütohormoon ABA (*abscisic acid*, abstsiihape) on endogeenne signaalmolekul, mis osaleb vastuses nii biootilistele kui ka abiootilistele stressitekitajatele. ABA reguleerib taimedes muuseas kasvu ja arengut (Melotto *et al.*, 2006; Werner *et al.*, 2006; Adie *et al.*, 2007; Hirayama ja Shinozaki, 2007). ABA signaalirada algab ABA seondumisega retseptoritele PYR1 (PYRABACTIN RESISTANCE 1 – pürabaktiini resistentsus 1, ABA retseptor), PYL (PYR1-LIKE – PYR1 taoline valk, ABA retseptor) ja RCAR (REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTORS – ABA retseptorite reguleerivad komponendid, ABA retseptor) (Gonzalez-Guzman *et al.*, 2012). ABA ja retseptorite kompleksid inhibeerivad PP2C (PROTEIN PHOSPHATASE 2C – valgu fosfataas 2C, osaleb ABA mõjul õhulõhede

sulgumises) fosfataaside ensümaatilist aktiivsust nendega seondudes, vabastades niiviisi OST1 kinaasi PP2C fosfataaside inhibeerivast toimest (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Gonzalez-Guzman *et al.*, 2012; Tischer *et al.*, 2017). OST1 aktiveerumisega kaasneb anioonkanali SLAC1 aktivatsioon, mis toob kaasaõhulõhede sulgumise (Geiger *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009). Eelnevalt kirjeldatud signaaliradadega võrreldes on ABA signaalirada kõige täpsemini kirjeldatud – abtsiishappe signaalist kuni õhulõhede sulgumiseni.

1.4 MED25

Eukarüootides, seal hulgas taimedes, toimub RNA süntees RNA polümeraas II ja viiest üldisest transkriptsioonifaktorist moodustuva kompleksi abil. Need osalevad promootori tajumises, transkriptsiooni mulli loomises ja transkriptsiooni initsieerimises (Conaway ja Conaway, 1993). RNA polümeraas II aktiivsus sõltub koaktivaator MED (MEDIATOR – transkriptsiooni mediaatorkompleks) kompleksist, mis edastab signaale promootorile seondunud reguloorsetelt transkriptsioonifaktoritelt RNA polümeraas II kompleksile (Kornberg, 2005). MED on hästikirjeldatud valkude kompleks, mille erinevatel subühikud, seal hulgas MED25 (MEDIATOR25 – transkriptsiooni mediaatorkompleksi subühik, teise nimega PFT1) reguleerivad geeniekspressiooni. MED kompleksi erinevad subühikud interakteeruvad mitmete erinevate reguloorset tähtsust omavate signaaliradadega (Bourbon *et al.*, 2004; Björklund ja Gustafsson, 2005; Malik ja Roeder, 2005).

1.4.1 Seni tuntud funktsioonid

Cerdán ja Chory, 2003 uuringus kirjeldati valku PFT1 (PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1 – transkriptsiooni mediaatorkompleksi subühik, teise nimega MED25) kui tuuma valku, mis osaleb phyB signaalirajas ja kutsus esile õitsemist ebaoptimaalsete valgustingimuste korral. Hilisemas uuringus tuvastati, et PFT1 valk on homoloogne MED kompleksi subühikuga MED25 (Bäckström *et al.*, 2007).

Cerdán ja Chory, 2003 uuringus täheldati *MED25* defektsetel taimeliinidel hilist õitsemist, *PHYB* defektsetel taimeliinidel varajast õitsemist ning nende topeltmutandil taaskord hilist õitsemist. See viitab võimalusele, et *MED25* on oluline õite arengut reguleerivas signaalirajas, kus ta paikneb allavoolu *PHYB*-st, kuna *MED25* õitsemise fenotüübiline erinevus oli dominantne. Muuseas on tuvastatud, et *PHYB* edastab ebasoodsate valgustingimustega adapteerumiseks signaali *MED25*-le, et niiviisi reguleerida *FT* (*FLOWERING LOCUS T* – õitsemise lookus T, õitsemise alustamise regulaator) ekspressiooni (Cerdán ja Chory, 2003). *MED25* edastab signaali transkriptsioonifaktorile *CO* (*CONSTANS* – pika päeva tingimustes osalev õitsemist reguleeriv transkriptsioonifaktor), signaliseerides niiviisi *FT* transkriptsiooni

alguse. Nii fütokroomid kui ka krüptokroomid reguleerivad CO aktiivsust, väljendades CO keskset rolli öö ja päeva tsüklite regulatsioonis (Iñigo *et al.*, 2012).

MED25-1 on täheldatud ka mõju taime rakkude kasvule ja paljunemisele. *MED25* ekspressiooni supresseerides esinevad taimedel metsiktüübiga võrreldes märgatavalt suuremad organid (Xu ja Li, 2011). Muuseas kasvasid rakud suuremaks ja kasvas ka nende arvukus. *MED25* üleekspressiooni korral täheldati vastupidist mõju – rakkude mõõdukas ja arvukus langesid ning mutantsetel taimedel esinesid väiksemad organid. (Xu ja Li, 2011)

Defektset *MED25* kodeerivatel taimedel on täheldatud kõrgeenenud tundlikkust keskkonna soolsusele, kuid ka oluliselt tõusnud vastupidavust põuaatingimustele. See annab alust arvata, et *MED25* on oluline soola- ja põuaastressi vastust reguleerivates signaaliradades (Elfving *et al.*, 2011). On näidatud, et *MED25* ekspresseerub tugevalt õhulõhedes – see võib selgitada *MED25* defektsete taimede vastupidavusvõime tõusu (Fornero *et al.*, 2017).

Senini on *MED25* tähtsust kirjeldatud arengulistest protsessides, kus ta mõjutab nii õitsemist kui ka üldist rakkude mõõtu ja arvukust (Xu ja Li, 2011; Iñigo *et al.*, 2012). Lisaks omab *MED25* tähtsust põua- ja soolastressi vastuse reguleerimisel (Elfving *et al.*, 2011; Fornero *et al.*, 2017). Seda võiks potentsiaalselt põhjendada seos õhulõhede regulatsiooniga, kuid põhjapanevate järelduste tegemiseks on vajalikud täiendavad uuringud.

Potentsiaalset *MED25* seost õhulõhede regulatsiooniga on uuritud gaasivahetuskatsetega. Selles uuringus täheldati, et *MED25* defektsetel mutantidel esineb häireid õhulõhede reaktsioonides (Koolmeister, 2019). Reaktsioon punasele valgusele oli selgelt häiritud, kuid ka sinise valguse ja ABA reaktsioonides esines madalama reaktsioonivõime trend. Selles uuringus katsetati kahte erinevat *MED25* defektset liini *med25-1* (SALK_059316) ja *med25-2* (SAIL_92_A10). Kuigi mõlemal uuritud taimeliinil oli defektne *MED25*, kehtivad ülal mainitud häired õhulõhede regulatsioonis vaid *med25-2* liini kohta. See liin oli loodud metsiktüübi Col-3 taustal, mida selles uuringus ei kasutatud – selles uuringus kasutati kontrolltaimena liini Col-0 (Koolmeister, 2019). Hariliku müürlooga metsiktüübid Col-0 ja Col-3 on üksteisele geneetiliselt väga sarnased (Ahn *et al.*, 2013). Arvestades kahe metsiktüübi suurt geneetilist sarnasust võiks eeldada, et Koolmeister, 2019 tulemused on mõlema katsetatud mutantse liini puhul arvestatavad. Kuigi selles uuringus täheldati statistiliselt erinevat punase valguse reaktsioonivõimet Col-0 metsiktüübi ja mutantse *med25-2* liini vahel, ei esinenud statistilist erinevust *med25-1* võrdlusel metsiktüübiga (Koolmeister, 2019). Seetõttu ei olnud võimalik põhjapanevaid järeldusi teha *MED25* rolli osas õhulõhede regulatsioonis. *MED25*

mõju õhulõhede regulatsioonile võiks paremini avalduda, kui kaasata edaspidistes uuringutesse teisi *MED25* mutante.

2 Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärgid

Selgitada *MED25* rolli hariliku müürlooga õhulõhede regulatsioonis. Täpsemad uurimisküsimused olid järgmised:

- Kas ja kuidas mõjutab defektne *MED25* õhulõhede avanemise protsesse sinise ja punase valguse ning madala CO₂ taseme korral.
- Kas ja kuidas mõjutab defektne *MED25* õhulõhede sulgemise protsesse abtsiishappe manuluse ning kõrge CO₂ taseme korral.
- Kas ja kuidas mõjutab katkestuse asukoht *MED25* geenis õhulõhede regulatsiooni.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Taimeliinid

Katses kasutati taimeliine:

- *A.thaliana* metsiktüübid Col-0 ja Col-3
- *A.thaliana* mutandid *med25-1* (SALK_059316), *med25-2* (SAIL_92_A10), *med25-3* (SALK_080230), *med25-4* (SALK_129555), *med25-5* (SALK_094588)

Mutantsed taimeliinid pärinesid T-DNA (transfer DNA – ülekantud DNA järjestus) kogudest (Sessions *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2003). Iga mutantse liini *MED25* geenis oli T-DNA insertiooniga tekitatud geenikatkestus, kuid selle asukoht varieerus liiniti. Mutantid liinid *med25-1*, *med25-3*, *med25-4* ja *med25-5* olid loodud liini Col-0 taustal ja mutantne liin *med25-2* oli loodud liini Col-3 taustal. Metsiktüüpe Col-0 ja Col-3 kasutati katses kontrolltaimedena.

2.2.2 Taimekasvatus

Gaasivahetuskatsetes kasutatud taimed külvati spetsiaalsetesse gaasivahetussüsteemiga sobivatesse gaasivahetuspottidesse (Kollist *et al.*, 2007). Gaasivahetuspotid olid valmistatud plastikust ning neile fikseeriti ruudukujulised klaasplaadid. Klaasplaadid fikseeriti eraldamaks taime maapealset osa kasvusubstraadist ning seetõttu oli eelnevalt puuritud klaasplaatide keskele 3-5 mm läbimõõduga koonuse kujulised augud. Pottide põhja oli eelnevalt puuritud 4 auku altniisutuse põhimõttel taimede kastmiseks. Kasvusubstraat koosnes turbast (Kekkilä), vermikuliidist ja veest mahusuhtega 4:2:3. Pottidesse lisati 250 grammi kasvusubstraati ja klaasplaadid fikseeriti pottidele niiviisi, et need oleks otseses kontaktis kasvusubstraadiga.

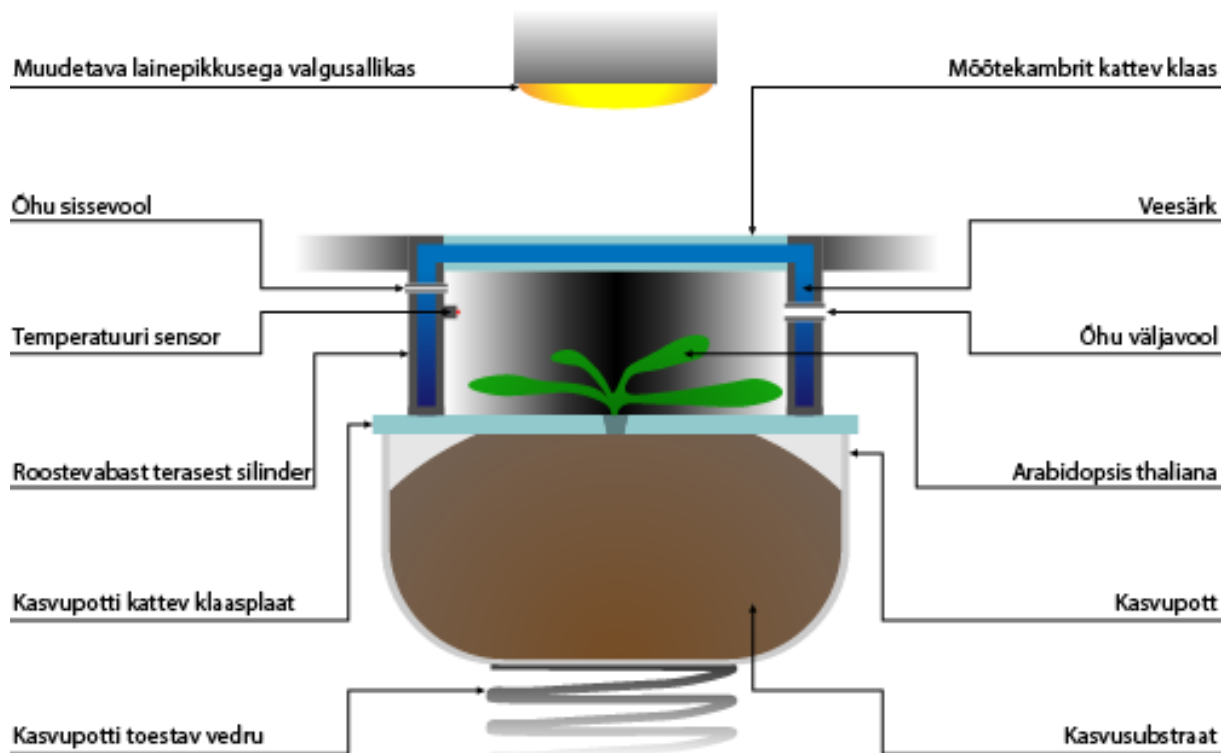
Külvamise eel leotati kõikide taimeliinide seemneid vähemalt kolm päeva +4°C vees. Sellise töötuse eesmärgiks oli jäljendada talveperioodi esinemist seemnetele, et kutsuda esile kiiremat ja ühtlasemat idanemist. Seemned külvati klaasplaadis oleva augu kaudu kasvusubstraadile automaatpipeti abil. Niiskuse kao minimaliseerimiseks idanemisperioodil asetati klaasplaadi augu kohale tagurpidi Petri tass. Nädal aega pärast külvamist harvendati pintsettide abil taimi nii, et igasse potti jäi kasvama vaid üks taim. Pärast harvendamist hoiti veel Petri tasse pottidel kolm päeva. Kastmine toimus kord nädalas altniisutuse meetodil. Potid asetati kastmiseks vesivanni ning hoiti kuni nende kogumass oli 340 grammi. Taimed kasvasid umbkaudu 24 päeva ning neid kasvatati kolme katseseeria jaoks erinevatel aegadel.

Gaasivahetuskatsete taimi kasvatati esialgu nädal aega lühikese päeva valgusrežiimiga kasvuruumis ning seejärel viidi kasvukappi. Taimekasvatuseks kasutatav kasvukapp oli Snijders Scientific Microclima Arabidopsis MCA1600-31p6-E, mille kasvutingimused olid järgnevad: valgusintensiivsus 100-150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, suhteline õhuniiskus 60-70%, temperatuur päeval 23°C ja öösel 18°C ning valgusrütmiks oli 12 h valgust ja 12 h pimedust. Lühikese päeva kasvuruumi kasvutingimused olid järgnevad: valgusintensiivsus 100-150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, suhteline õhuniiskus 40-80%, temperatuur päeval 23°C ja öösel 18°C ning valgusrütmiks oli 12 h valgust ja 12 h pimedust.

2.2.3 Gaasivahetuskatsete aparatuur

Gaasivahetuskatsete aparatuur on arendatud ja valmistatud töögrupi siseselt ja on täiustatud variant varasemast seadmest (Joonis 2; Kollist *et al.*, 2007). Süsteem koosneb mõõtekambritest, CO₂ ja H₂O analüsaatorist (Li-Cor Li-7000), muudetava intensiivsusega LED (*light emitting diode* - valgust kiirgav diod) valgustitest (punane, sinine ja valge), termostaadist, pumpadest, arvutist, CO₂ gaasiballoonist ja KOH kolonnist. Mõõdetakse mõõtekambrisse siseneva ja sellest väljuva õhu CO₂ ja H₂O kontsentratsioonid ning arvutatakse nende vahe, mis väljendab taimest transpireeruva vee ja fotosünteesi käigus seotud süsinikdioksiidi hulka.

Gaasivahetussüsteemidel on kaheksa mõõtekambrit. Need on silindrikujulised, valmistatud roostevabast terasest ja on pealt klaasiga kaetud. Mõõtekambritel on kahekihilised seinad, mille vahele moodustub läbi termostaadi ringlev veesärk. Veesärk hoiab kambri temperatuuri ühtlasena ning kambri sisetemperatuuri jälgitakse temperatuuri sensoriga.



Joonis 2. Gaasivahetusseadme mõõtekambri skeem.

Kambris oleva õhu ühtlane segamine tagatakse kambrisse siseneva ja kambrist väljuva õhu avade erineva suurusega. Kambrisse siseneva õhu ava on väljuva õhu avast väiksem ning seetõttu toimub ka kambrisse õhu sisenemine suuremal kiirusel võrreldes väljuva õhu omaga. Muuseas onavad paigutatud niiviisi, et kambrisse voolab õhk tekitades keeriseid ning selle tulemusel seguneb kambris olev õhk. Kambrist läbinud õhk liigub edasi $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ analüsaatorisse, mis edastab oma näidu arvutisse gaasivahetustarkvarale. See gaasivahetussüsteemide jaoks programmeeritud tarkvara arvutab mõõdetud tulemuste alusel taimede õhulõhede juhtivuse. Kõikide katsete puhul, välja arvatud ABA töötamise korral, mõõdeti ühes katses võrdluseks samaaegselt 30 sekundit kambrisse sisenevat õhku ja kambrist väljuvat õhku. Samaaegset mõõtmist võimaldab Li-Cor Li 7000, kuna sisaldab kaht analüsaatorit, mis mõõdavad paralleelselt referentsõhku ja kambrist väljuvat õhku. Ühes katses mõõdeti korraga nelja taime, mistõttu saadi üks ajapunkt kambrist iga 2 minuti järel. Gaasivahetussüsteemi opereerimisel on vajalik, et üks mõõtekamber oleks vaba $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ analüsaatori kalibreerimiseks. Seetõttu mõõdeti korraga nelja taime ning aeg-ajalt lülitati referentsi mõõtmiseks sisse ka üks tühi kambris. Kalibreerimise järel asetati vabasse nelja kambrisse järgmiseks katteks taimed stabiliseeruma. Taimed loeti stabiilseks, kui nende õhulõhede juhtivus püsis ühtlasena vähemalt 3 ajapunkti ehk siis valguskatsete ja süsihappegaasi katsete puhul 6 minutit. ABA katsete puhul mõõdeti korraga nelja või kaheksat taime. Nelja taime puhul mõõdeti kambrisse sisenevat õhku ja kambrist väljuvat õhku 60

sekundit ja kaheksa taime puhul 30 sekundit. Sel viisil saadi üks ajapunkt kambri kohta iga 4 minuti järel. Nelja kambriga mõõtmiste puhul kalibreeriti CO₂/H₂O analüsaatorilt analoogselt ülejäänud katsetega, aga kaheksa kambriga mõõtmiste puhul vabastati kalibreerimise ajaks üks kamber, kuhu pärast kalibratsiooni lõppu asetati tagasi katses osalev taim. Kalibreeriti enne taimede stabiliseerumist. ABA katsete korral loeti taimed stabiilseks kui nende õhulõhede juhtivus püsis stabiilsena vähemalt 3 ajapunkti ehk 12 minutit.

2.2.4 Gaasivahetuskatsed

Klaasplaat potil ei eralda kasvusubstraati taime maapealsest osast hermeetiliselt kuna taime vars ei täida klaasplaadil olevat auku täielikult. Hermeetilise eralduse tagamiseks tihendati taimevarre ja klaasplaadi vaheline ala taimele ohutu vahaga, mis koosnes vaseliinist, mesilasvahast ja parafiinist mahusuhtega 20:1:1. Taimi pildistati digitaalkaameraga (Sony RX-100) vahetult enne eksperimenti ning igale pildile lisati 30 x 10 mm millimeeterpaber mõõtkavaks. Taimede pindala mõõdeti fotodelt kasutades ImageJ tarkvara (Schneider *et al.*, 2012).

Nende ettevalmistuste järel asetati iga taim eraldi mõõtekambrisse ning oodati, et nende õhulõhede juhtivus stabiliseeruks uutes tingimustes (24°C õhutemperatuur ja 65-75% suhteline õhuniiskus). Õhulõhede juhtivuse stabiliseerumise järel lisati stiimul õhulõhede avanemiseks või sulgumiseks. Taimede õhulõhede juhtivust mõõdeti kõikide katsete tüüpide puhul vähemalt 40 minuti jooksul pärast stiimuli lisamist. Taimede ööpäevatsükli tõttu teostati gaasivahetuskatsed ajavahemikus 9:00-18:00.

Õhulõhede avanemiseks valguskatsetel kasutati punast või sinist valgust intensiivsusel 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Valguse mõjul avanemiskatsete eel hoiti taimi nende juhtivuse stabiliseerumiseni valgust mitte läbilaskva kattega pimendatud mõõtekambrites. Katse algatati, eemaldades mõõtekambrilt katted, mistõttu hakkas kambritele paistma punast või sinist valgust olenevalt katsest.

Õhulõhede avanemise ja sulgumise katsetel vastavalt madala ja kõrge süsihappegaasi kontsentratsiooni juures stabiliseeriti taimed eelnevalt valge valguse käes CO₂ kontsentratsiooni juures 400 ppm (normaalingimused). Õhulõhede juhtivuse stabiliseerumise järel algatati kõrge süsihappegaasi kontsentratsiooni katse tõstes mõõtekambrite CO₂ kontsentratsiooni 800 ppm-ni. Õhulõhede avanemiseks madala süsihappegaasi kontsentratsiooni juures ühendati katsele eelnevalt süsteemi õhuvoolu CO₂ eemaldamiseks KOH kolonn. Stabiliseerumise ajaks tõsteti CO₂ kontsentratsioon 400 ppm-ni

normaaltingimuste tagamiseks. Stabiliseerumise järel katse algatuseks langetati CO₂ kontsentratsioon kambris 100 ppm-ni.

Õhulõhede sulgemiseks ABA katsetel kasutati 10 µM ABA lahust (10 µM ABA (Carbosynth Ltd.); 0,1% etanooli; 0,024% Silwet L-77 (Momentive)). Taimed stabiliseeriti valge valguse käes ning seejärel algatati katse pritsides taimi neli korda eelnevalt valmistatud lahusega. Pritsimise järel kuivatati poti klaasilt üleliigne lahus niiviisi, et hoiduti taime puudutamast.

2.2.5 DNA eraldus

Eraldamaks DNA-d lõigati alustuseks taimest väike leht (umbes 5 mm²) ning asetati see 1,5 ml tuubi. Järgmisena lisati tuubi 100 µl erinevas suuruses klaasgraanuleid (Retsch) ja pipeteeriti automaatpipeti abil 600 µl DNA eraldamise puhvrit (200 mM Tris-Cl ja 250 mM NaCl). Seejärel asetati tuub raputajasse (Ivoclar Vivadent Silamat S6), masinat käitati 20 sekundit taimerakkude purustamiseks ning vabanenud DNA jäi lahustunud kujul puhvrisse. Peale rakkude lõhkumist tsentrifugeeriti tuubi 5 minutit 18407 rcf juures kasutades tsentrifugi Eppendorf 5424 (Eppendorf FA-45-24-11 Rotor) ning pipeteeriti 500 µl supernatanti ümber uude 1,5 ml tuubi. Sinna lisati 500 µl isopropanooli, segati pöörisevajaga (Scientific Industries Vortex-Genie 2 G560E) abil ja tuubi tsentrifugeeriti uuesti 5 minutit 18407 rcf juures ning eemaldati ettevaatlikult supernatant. Seejärel lisati 200 µl 70% etanooli vesilahust ja tsentrifugeeriti 30 sekundit 18407 rcf juures ning eemaldati taaskord ettevaatlikult supernatant. Peale etanooli lahusega pesemist jäeti tuub lahtise kaanega kuivama kuni kogu etanool oli tuubist aurustunud. Lõpetuseks lahustati tuubi põhja sadenenud DNA suspendeerides see 50 µl vees. DNA sisaldust kontrolliti spektrofotomeetriga (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer).

2.2.6 PCR

PCR viidi läbi kolme praimeriga ja selle teostamiseks pipeteeriti automaatpipeti abil ühte tuubi kokku 9,8 µl deioniseeritud vett, 2 µl 10X BD puhvrit (Solis BioDyne), 2 µl 2,5 mM dNTP lahust (Thermo Scientific) 2 µl 25 mM MgCl₂ (Solis BioDyne) lahust, 1 µl uuritava DNA lahust, 1 µl 10 µM LBb1.3 praimer lahust ning 1 µl 10 µM kumbagi liinispetsiifilise praimer lahust. Liinispetsiifilised praimerid valiti olenevalt taimest, mille DNA-d parasjagu uuriti. Reaktsiooni alustamiseks lisati tuubi 0,2 µl DNA polümeraasi (Firepol, Solis BioDyne). Seejärel asetati reaktsioonisegu PCR masinasse (Aeris Thermal Cycler) ja käivitati see. DNA amplifitseerimiseks kasutati kahte erinevat programmi. PCR programmid on välja toodud Lisa 2, tabelis 2.

2.2.7 Geelelektroforees

Tuvastamaks PCR käigus amplifitseeritud DNA lõikude pikkusi eraldati need üksteisest geelelektroforeesi käigus. Geelelektroforees viidi läbi 1% agarosgeelil. Agarosgeel valmistati lisades 100 ml 0,5X (kordse) Thermo Scientific TAE puhvrile (20 mM Tris, 10 mM etaanhape ja 0,5 mM EDTA) 1 g agarooosi (Fisher BioReagents) ning kuumutati kuni kogu agaros oli lahustunud. Seejärel lisati Pasteuri pipetiga 2 tilka 0,5 µg/ml etiidiumbromiidi, segati ja valati lahus geeli vormi. Geeli sisse asetati 2 kammi (13 või 26 hambaga olenevalt mitut proovi paralleelselt uuriti), et geeli tardudes tekiks sinna tühimikud (geeli hambad) kuhu edaspidi uuritava DNA lahus sisestada. Agarosgeeli lahus jäeti seejärel toatemperatuurile 45 minutiks tarduma. Geeli tardumise järel eemaldati kamm ettevaatlikult ja asetati koos vormiga Labnet Gel XL Ultra V-2 elektroforeesi vanni, mis oli eelnevalt täidetud 0,5X TAE puhvriga niiviisi, et kogu geel oli puhvriga kaetud.

PCR käigus amplifitseeritud 20 µl uuritava DNA lahusele pipeteeriti automaatpipeti abil 4 µl laadimisvärvi (Thermo Scientific 6X DNA Loading Dye) ja suspendeeriti. Lahust pipeteeriti siis geeli hambasse 10 või 20 µl (vastavalt 13 või 26 hambaga kammi tühimikesse) jättes kõige äärmise hamba vabaks markeri jaoks. Seda protsessi korrati erinevatesse geeli hammastesse olenevalt mitut DNA lahust paralleelselt jooksutati. Geeli äärmistesse hammastesse pipeteeriti markerit Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

Geeli valmistamise ning proovide sisestamise järel asetati vannile kaas peale ning käitati elektroforees pingel 100 V 40 minutit. Seejärel lülitati süsteem välja, eemaldati kaas ning võeti geel koos vormiga elektroforeesi vannist välja ja eemaldati geel vormi küljest ettevaatlikult. Geel asetati seejärel ultraviolet valguslauale (Cleaver Scientific UV Transilluminator MUV 21-254/312-220), valgustati ja pildistati digitaalkaameraga (Canon PowerShot S5 IS).

Õnnestunud genotüpiseerimise korral selgus geelilt, millised taimed olid metsiktüüpi homosügoidid (üks 1000kb produkt), mutantsed homosügoidid (üks produkt eeldatava produkti pikkuse vahemikus) ja heterosügoidid (kaks produkti).

2.2.8 Andmeanalüüs

Erinevate katseseeriade tulemused kõrvutati stiimuli kaupa ning katsete toorandmed teisendati suhtelistesse ühikutesse. Selleks jagati igas ajapunktis mõõdetud juhtivus väärtusega, mis mõõdeti samas katses viimasel ajapunktil enne stiimuli rakendamist. Seda protsessi korrati iga mõõdetud tulemusega.

Protsentuaalse juhtivuse arvutamiseks valiti eelnevalt välja iga gaasivahetuskatse tüübi kaupa ajapunkt, mil reaktsioon stiimulile jõudis haripunktini (maksimaalse või minimaalse väärtuseni olenevalt sellest, kas oli tegu avanemis- või sulgumisreaktsiooniga). Selleks valiti metsiktüüpi Col-0 taimede gaasivahetuskatsete tulemuste kõrgeima keskvaertuse ajapunkt. Niiviisi valiti punase valguse katsete puhul 27. ajapunkt, sinise valguse katsete puhul 53. ajapunkt, kõrge CO₂ kontsentratsiooni katsete puhul 39. ajapunkt, madala CO₂ kontsentratsiooni katsete puhul 55. ajapunkt ja ABA katsete puhul 38. ajapunkt.

Andmete statistiline analüüs teostati kasutades rakendust *PAST4* (Hammer *et al.*, 2001). Statistiliseks analüüsiks kasutati ühefaktorilist ANOVA testi. *Post-hoc* testiks kasutati Tukey testi.

2.3 Tulemused

2.3.1 T-DNA insertioonide asukohad

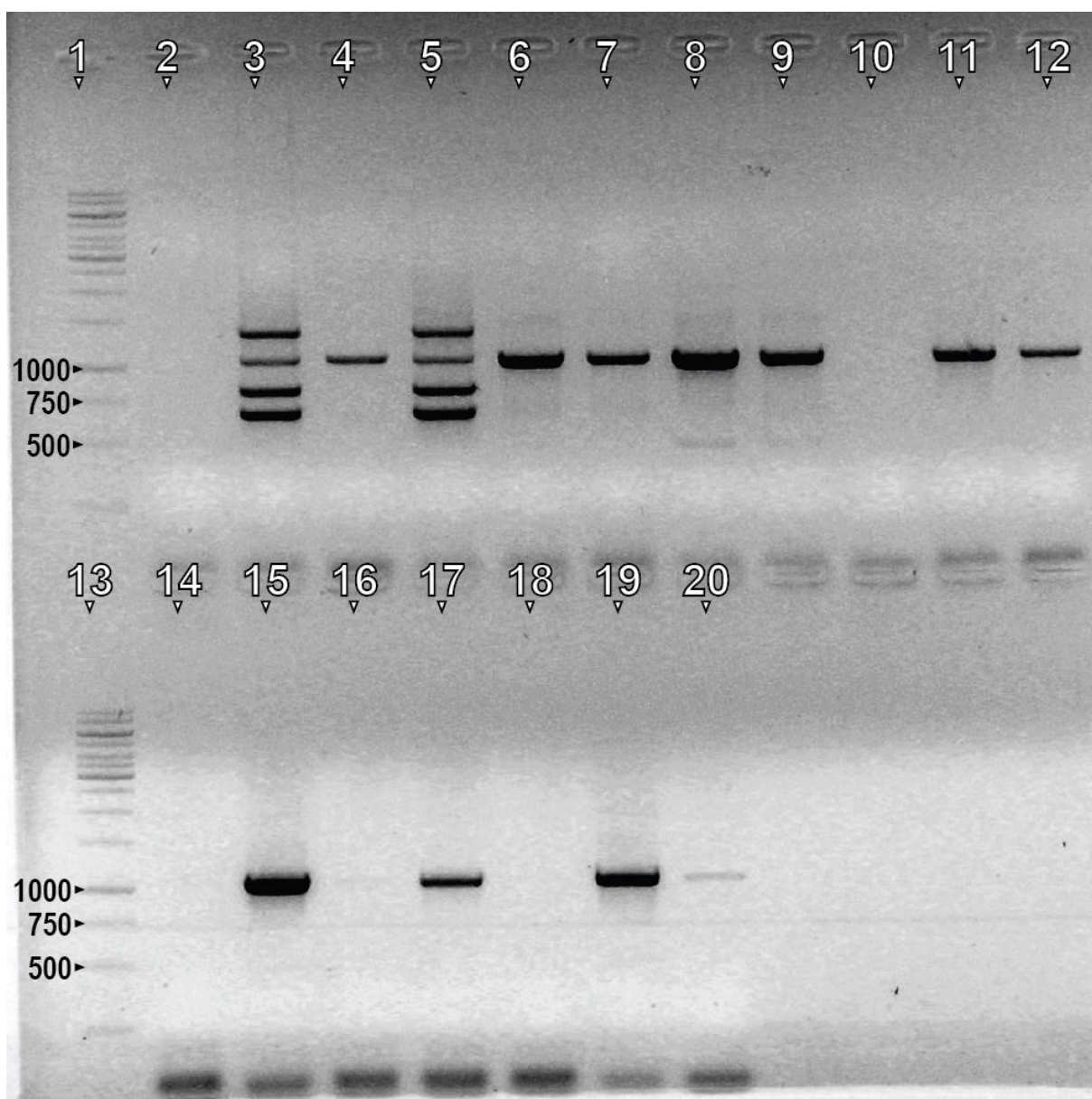
T-DNA insertioonide asukohtade tuvastamiseks uuritavates taimeliinides kasutati veebirakendust *SALK T-DNA Express: Arabidopsis Gene Mapping Tool* (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). Veebirakendusest pärinevate andmete põhjal koostati joonis (Joonis 3). Mutantsete taimeliinide *med25-1* ja *med25-2* T-DNA insertioonid asuvad eksonites, *MED25* lõpuosas, samas kui ülejäänud uuritavate mutantsete liinide T-DNA insertioonid asuvad *MED25* alguse alas. Nendest *med25-4* T-DNA insertioon asub ka eksonis, aga *med25-3* taimeliinis asub T-DNA insertioon intronis. Mutanstel taimeliinil *med25-5* asub T-DNA insertioon *MED25* promootoralas.



Joonis 3. Suurem nool joonisel märgib *MED25* geeni, millest punased osad tähistavad eksoneid ja mustad introneid. Noole ots tähistab transkriptsiooni suunda. *MED25* geeni tähistava noole kohal asetsevad nooled tähistavad T-DNA insertioonide asukohta ja suundi mutantsetes taimeliinides.

2.3.2 Mutantsete *med25-3* liinide genotüüpiseerimine

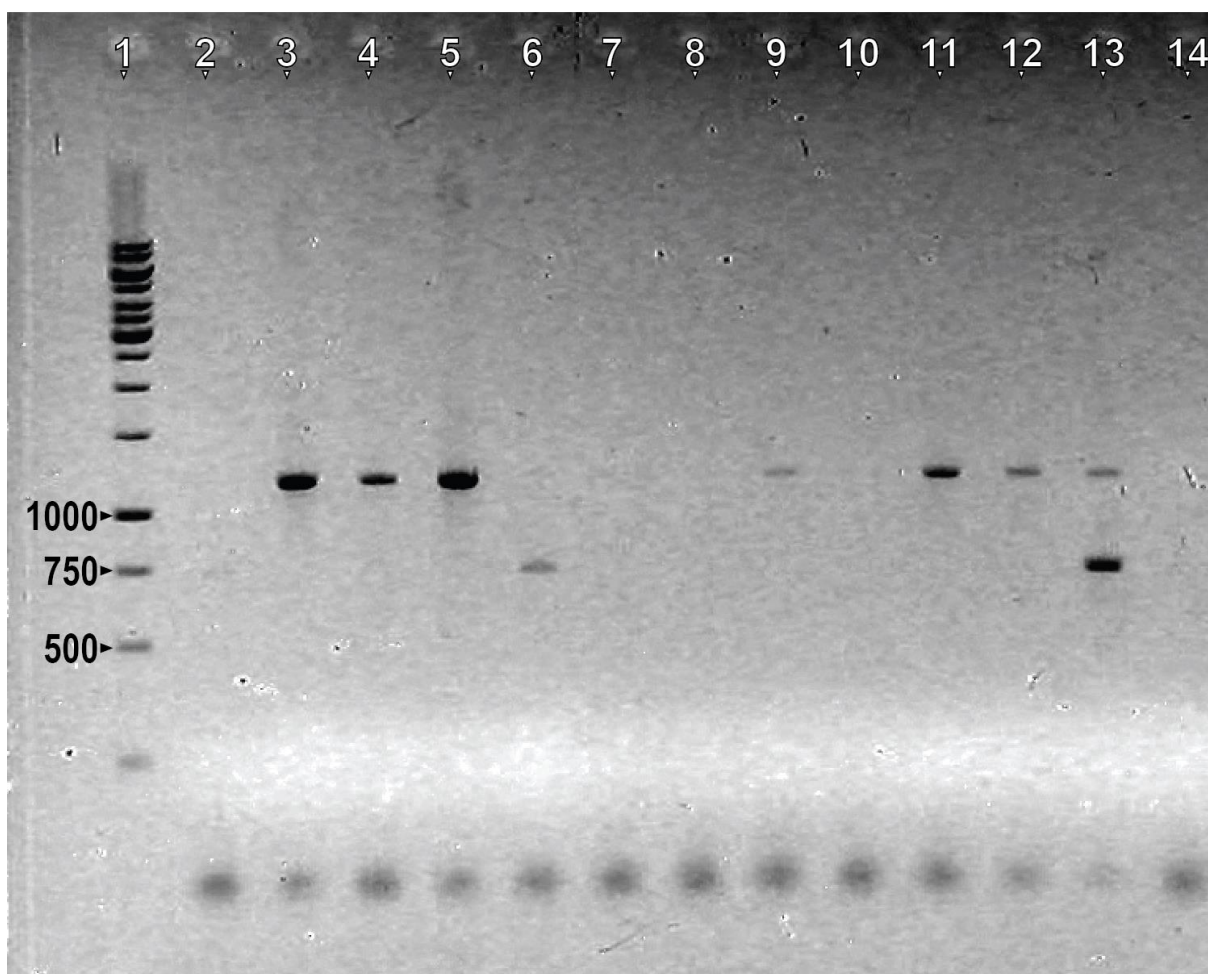
Mutantsete *med25-3* taimeliinide genotüüpiseerimisel ei leitud homosügootset T-DNA insertiooniga liini, mistõttu seda taimeliini edasisse töösse ei kaasatud (Joonis 4). DNA amplifitseerimiseks kasutati kolme praimeriga reaktsiooni, kus heterosügooti puhul peaks tekkima 2 produkti ja kummagi homosügooti puhul üks erineva pikkusega produkt. Tuvastati kindlalt vaid metsiktüüpi homosügootid radades 4, 6-9, 11, 12, 15, 17, 19 ja 20. Metsiktüüpi alleelide puhul oli eeldatav produkti pikkus umbkaudu 1000 kb. Potentsiaalselt tuvastati ka heterosügootsed liinid 3. ja 5. rajal, mille puhul esines metsiktüüpi homosügootiga sarnanev produkt, aga veel kolm produkti. Nendest 2 olid ka eeldatavas T-DNA insertiooniga liini suurusvahemikus (555-855 kb).



Joonis 4. Mutantsete *med25-3* taimede genotüüpiseerimiseks valmistatud agarosgeel. Radades 1 ja 13 on marker.

2.3.3 Mutantsete *med25-4* liinide genotüüpiseerimine

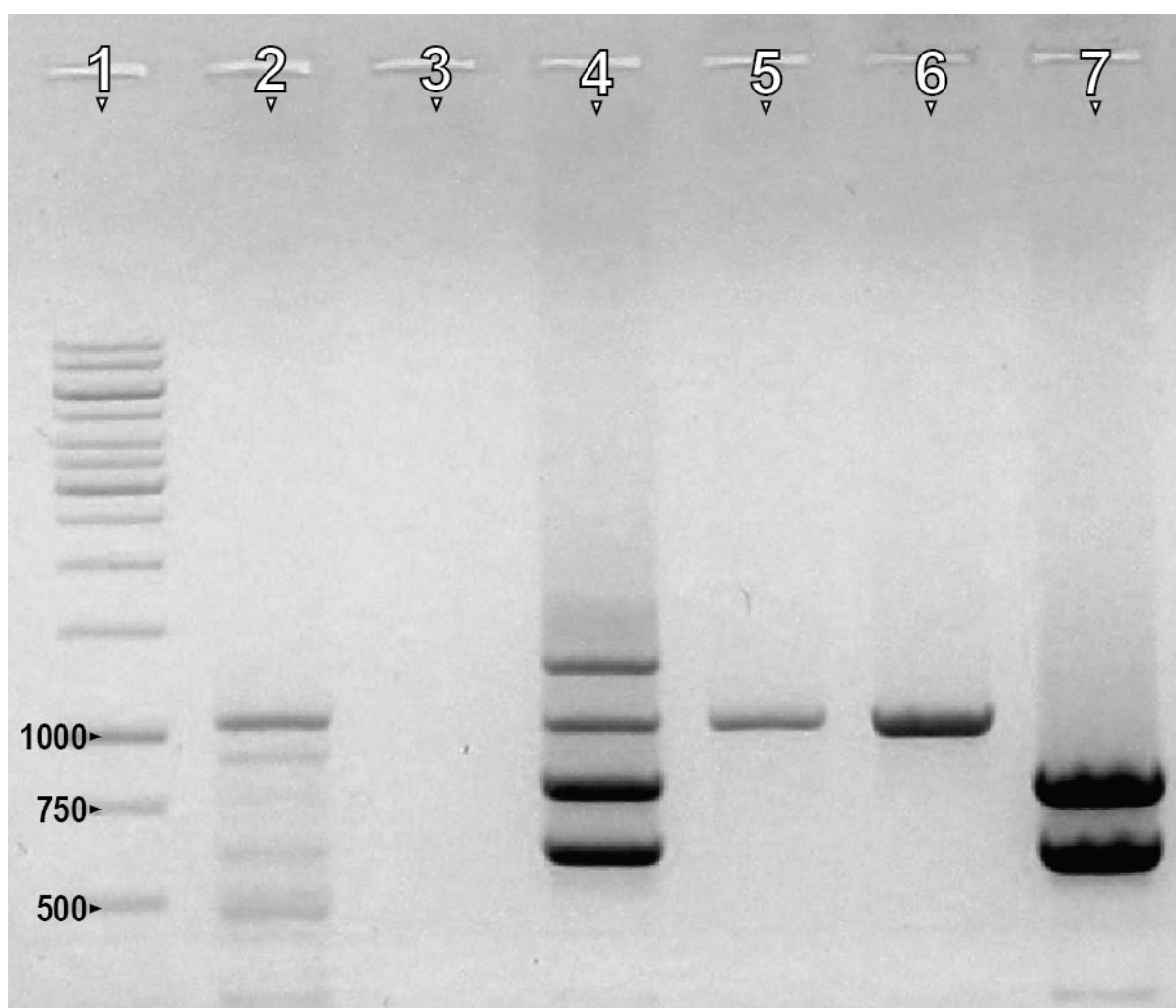
Mutantsete *med25-4* taimede genotüüpiseerimisel tuvastati T-DNA insertiooniga homosügootne liin, metsiktüüpi homosügootne liin ja ka heterosügootne liin (Joonis 5). DNA amplifitseerimiseks kasutati kolme praimeriga reaktsiooni, kus heterosügooti puhul peaks tekkima 2 produkti ja kummagi homosügooti puhul üks erineva pikkusega produkt. Metsiktüüpi alleelide puhul oli eeldatav produkt umbmaudu 1000 kb, mis esines radades 3-5, 9, 11 ja 12. T-DNA insertiooniga alleelide puhul esines produkt eeldatavas vahemikus (561-861 kb) rajal 6. Heterosügootsel liinil esinesid mõlemad ning need ka tuvastati 13. raja proovis.



Joonis 5. Mutantsete *med25-4* taimede genotüüpiseerimiseks valmistatud agarosgeel. Rajas 1 on marker.

2.3.4 Mutantsete *med25-5* liinide genotüpiseerimine

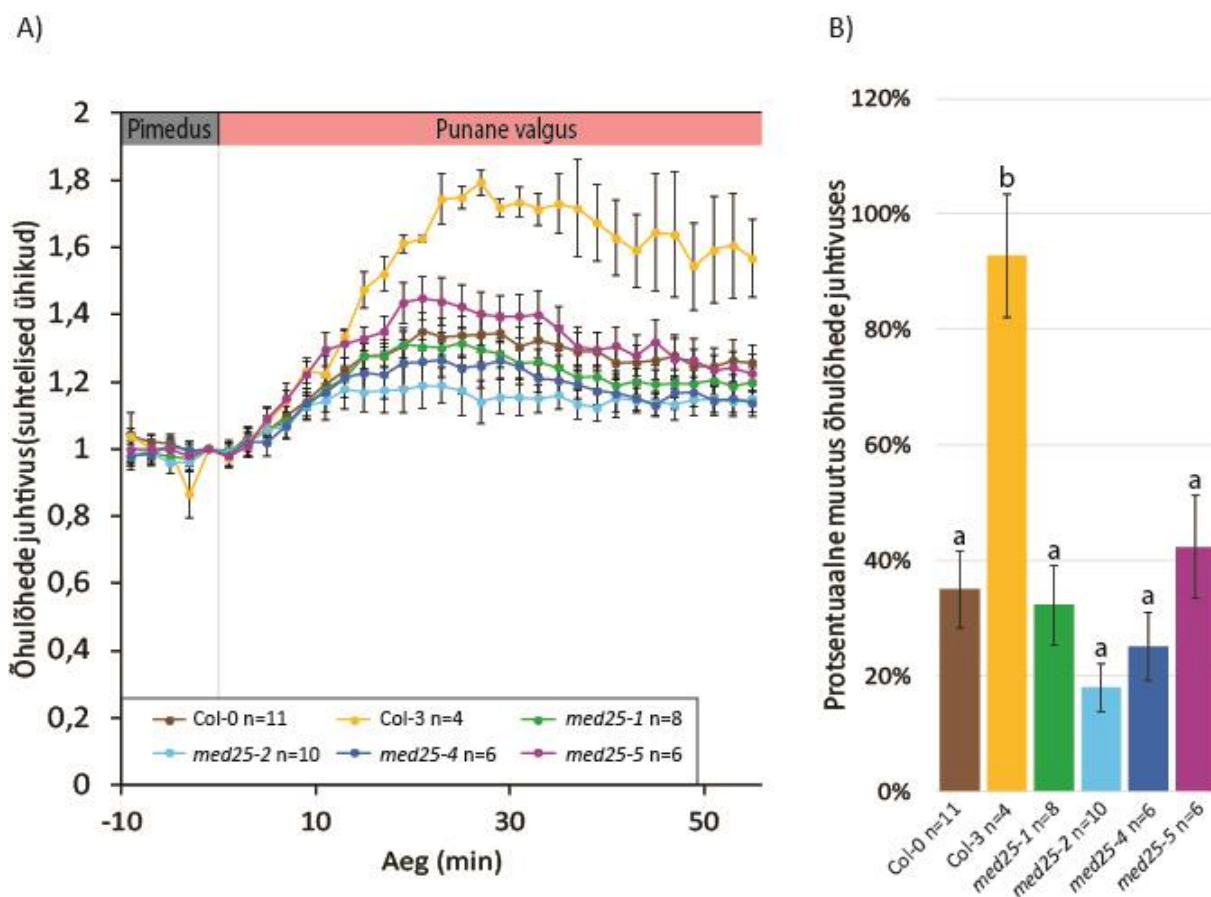
Mutantsete *med25-5* taimede genotüpiseerimisel tuvastati metsiktüüpi homosügootne liin ja potentsiaalselt ka T-DNA insertiooniga homosügootne liin. Heterosügooti esinemine on vaid oletatav (Joonis 6). DNA amplifitseerimiseks kasutati kolme praimeriga reaktsiooni, kus heterosügooti puhul peaks tekkima 2 produkti ja kummagi homosügooti puhul üks erineva pikkusega produkt. Metsiktüüpi liin tuvastati ühe kindla produkti esinemise järgi umbkaudu 1000 kb juures 5. ja 6. rajal joonisel. Proovis, mis oli 7. rajal, esines 2 produkti, mis jäid T-DNA insertiooniga proovi eeldatavasse vahemikku (501-801 kb), kuid ei esinenud metsiktüüpi alleelile vastavat produkti. Selles proovis on arvatavasti T-DNA insertiooniga homosügootne liin, kuna kuigi seal ei esine ühte kindlat produkti, on kaks esinevat produkti väga spetsiifiliselt taustast eraldatavad. Jooniselt 4. raja tulemus on ebaselge, kuid selles esinevad muuseas kummagi homosügooti proovidega analoogsed produktid.



Joonis 6. Mutantsete *med25-5* taimede genotüpiseerimiseks valmistatud agarosegeel. Rajas 1 on marker.

2.3.5 Gaasivahetuskatsed punases valguses

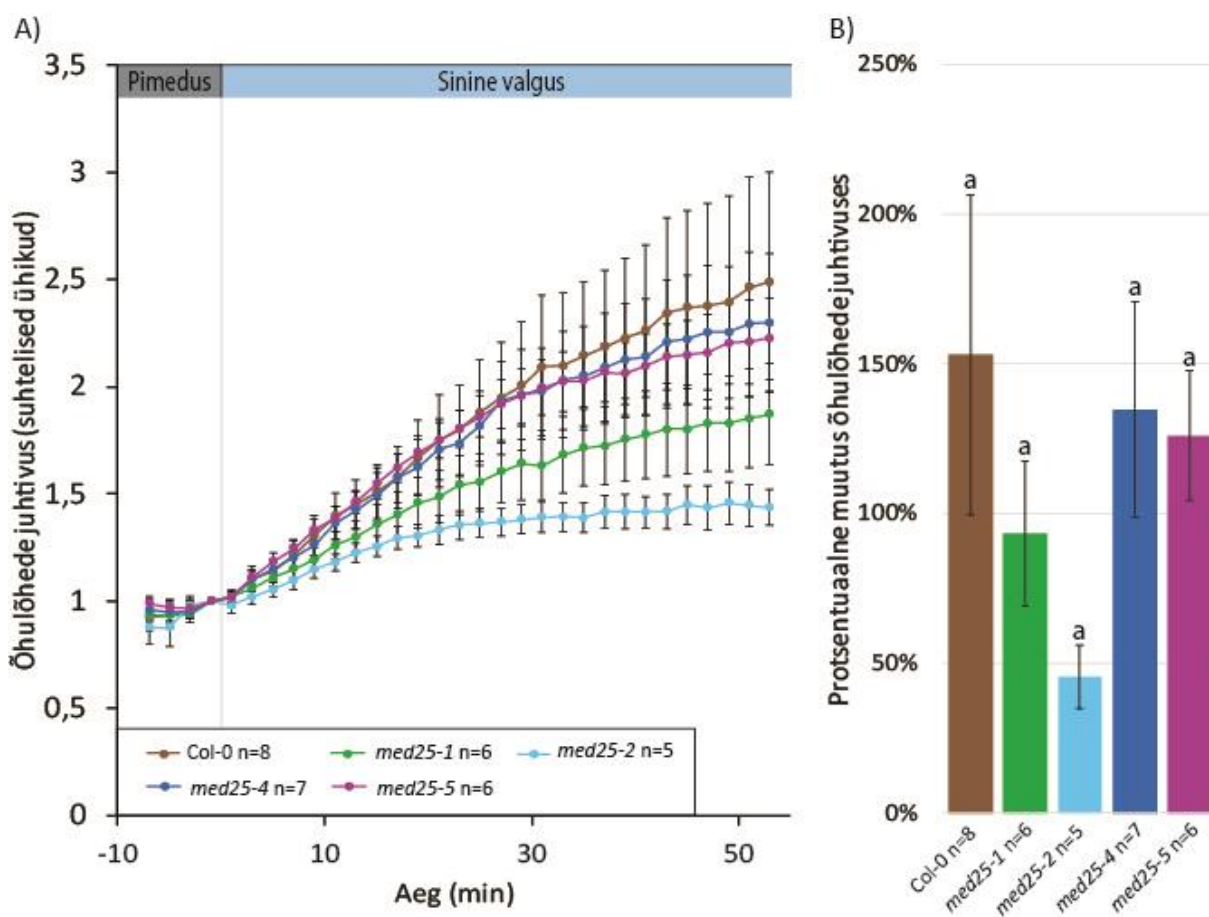
Gaasivahetuskatsetes punase valgusega tuvastati statistiliselt oluline erinevus ($p < 0,05$) Col-3 taime reaktsioonis (Joonis 7). Andmete statistiline erinevus esines kõikide ülejäänud taimeliinidega võrreldes. Ülejäänud taimeliinide katsete tulemuste võrdlusel ei esinenud olulist statistiliselt olulisi erinevusi. Mutantse *med25-2* taimeliini reaktsioon punasele valgusele oli vastavate kontrolltaimede reaktsioonist (Col-3) statistiliselt oluliselt nõrgem.



Joonis 7. Paneel A kujutab õhulõhede juhtivust (suhtelised ühikud) punase valguse mõjul avanemise katses. Paneelil B on tähistatud muutus õhulõhede juhtivuses 39. minutil pärast katse algust. Katsete tulemused on keskmistatud, teisendatud suhtelistesse ühikutesse ning vearistid tähistavad \pm standardviga. Statistiliseks analüüsiks kasutati ühefaktorilist ANOVAt koos Tukey *post hoc* testiga.

2.3.6 Gaasivahetuskatsed sinises valguses

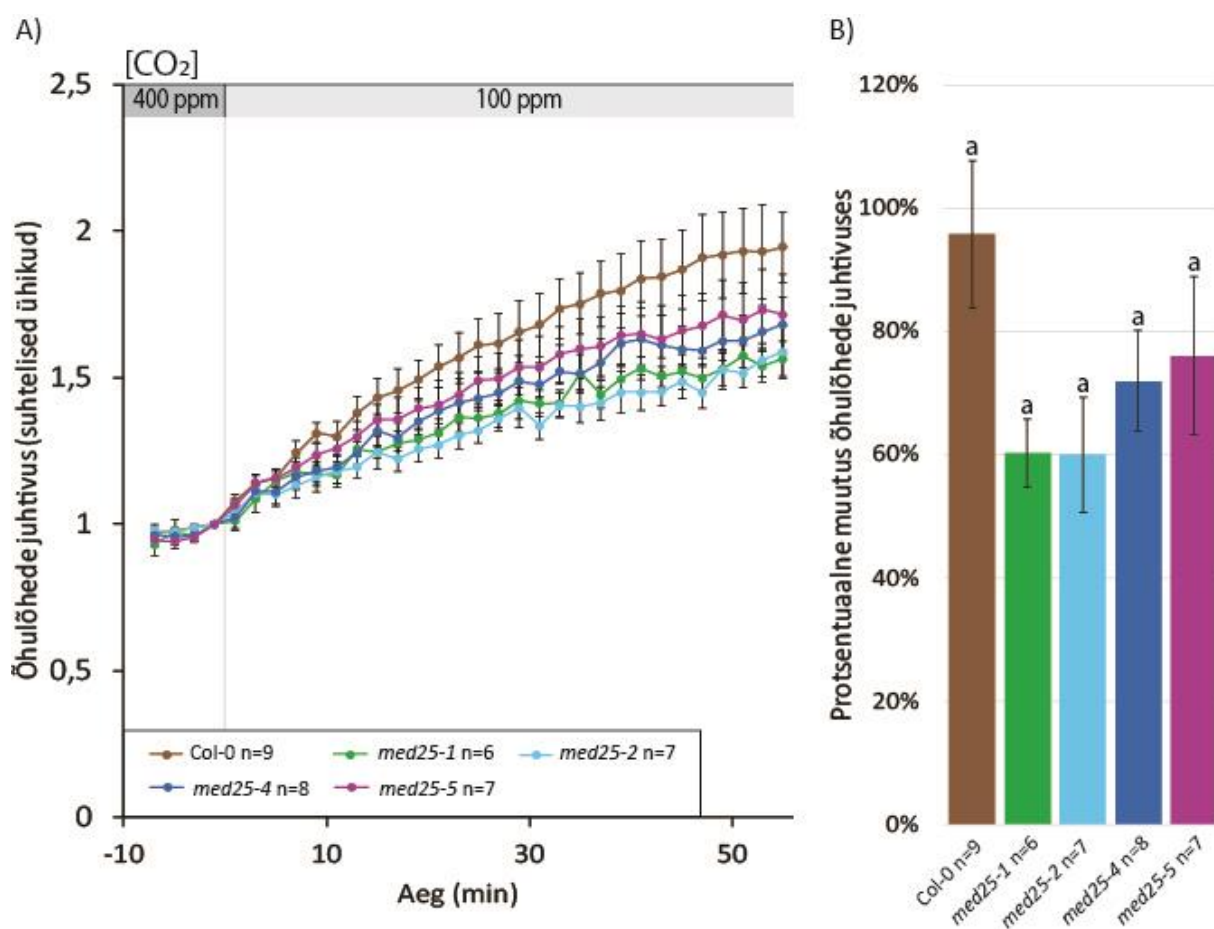
Gaasivahetuskatsetes sinise valgusega ei esinenud ühegi taimeliini puhul üksteisega võrreldes statistiliselt olulisi erinevusi (Joonis 8). Sarnaselt punase valguse katsetega esineb ka sinise valguse stiimulil mutantsel *med25-2* liinil nõrgema reaktsiooni trend, aga kuna katses puudus vastav metsiktüüp Col-3, vajab see täiendavat analüüsi.



Joonis 8. Paneel A kujutab õhulõhede juhtivust (suhtelised ühikud) sinise valguse mõjul avanemise katses. Paneelil B on tähistatud muutus õhulõhede juhtivuses 55. minutil peale katse algust. Katsete tulemused on keskmistatud, teisendatud suhtelistesse ühikutesse ning vearistid tähistavad \pm standardviga. Statistiliseks analüüsiks kasutati ühefaktorilist ANOVA-t.

2.3.7 Gaasivahetuskatsed madala CO₂ kontsentratsiooni juures

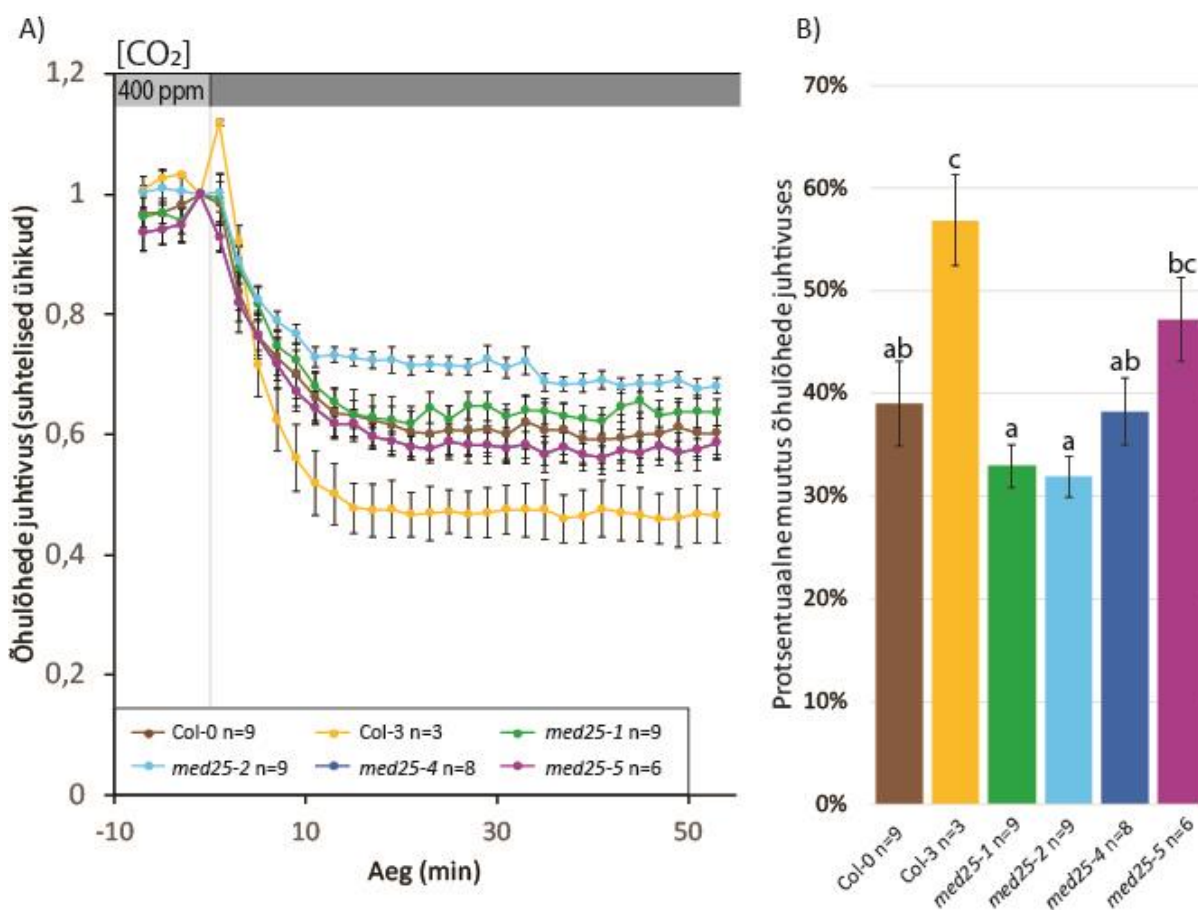
Gaasivahetuskatsete andmetel madala CO₂ kontsentratsiooni juures ei esinenud ühegi taimeliini puhul üksteisega võrreldes statistiliselt olulisi erinevusi (Joonis 10).



Joonis 10. Paneel A kujutab õhulõhede juhtivust (suhtelised ühikud) madala CO₂ kontsentratsiooni mõjul avanemise katses. Paneelil B on tähistatud muutus õhulõhede juhtivuses 53. minutil pärast katse algust. Katsete tulemused on keskmistatud, teisendatud suhtelistesse ühikutesse ning vearistid tähistavad \pm standarddviiga. Statistiliseks analüüsiks kasutati ühefaktorilist ANOVA-t.

2.3.8 Gaasivahetuskatsed kõrge CO₂ kontsentratsiooni juures

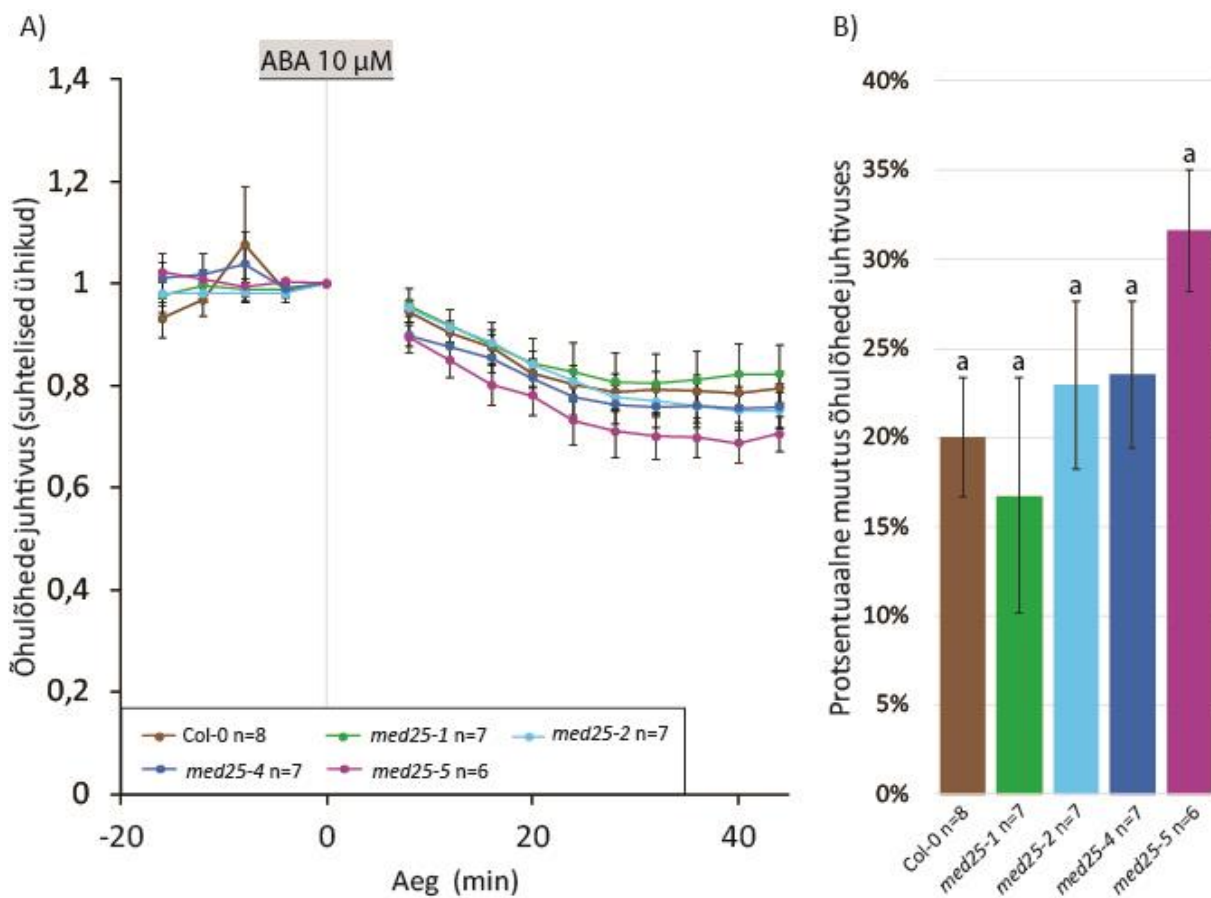
Gaasivahetuskatsete andmete põhjal kõrge CO₂ kontsentratsiooni juures tuvastati mitmeid statistiliselt olulisi erinevusi (Joonis 9). Col-3 metsiktüüpi liini reaktsiooni mõõtmistulemustes esines statistiliselt oluline erinevus ($p < 0,05$) *med25-2* reaktsiooniga võrreldes. Veel tuvastati statistiliselt oluline erinevus *med25-5* liini reaktsioonil *med25-1* liini reaktsiooniga võrrelduna.



Joonis 9. Paneel A kujutab õhulõhede juhtivust (suhtelised ühikud) kõrge CO₂ kontsentratsiooni mõjul sulgumise katses. Paneelil B on tähistatud muutus õhulõhede juhtivuses 27. minutil pärast katse algust. Katsete tulemused on keskmistatud, teisendatud suhtelistesse ühikutesse ning vearistid tähistavad \pm standarddviiga. Statistiliseks analüüsiks kasutati ühefaktorilist ANOVAt koos Tukey *post hoc* testiga.

2.3.9 Gaasivahetuskatsed ABA manusel

ABA manusel teostatud gaasivahetuskatsete andmetes ei esinenud statistiliselt olulisi erinevusi (Joonis 11).



Joonis 11. Paneel A kujutab õhulõhede juhtivust (suhtelised ühikud) ABA mõjul sulgumise katses. Jooniselt on välja jäetud 4. ajapunktil mõõdetud õhulõhede juhtivus, kuna katses pihustatud ABA lahus ei olnud veel kuivanud, mistõttu ei olnud võimalik korrektselt juhtivust mõõta. Paneelil B on tähistatud muutus õhulõhede juhtivuses 39. minutil peale katse algust. Katsete tulemused on keskmistatud, teisendatud suhtelistes ühikutesse ning vearistid tähistavad \pm standardviga. Statistiliseks analüüsiks kasutati ühefaktorilist ANOVA-t.

2.4 Arutelu

2.4.1 T-DNA insertiooniga taimeliinide isoleerimine

Mutantsetel *med25-3* taimeliinidel tuvastati genotüpiseerimisel metsiktüüpi homosügoot, aga T-DNA insertiooniga homosügooti ei suudetud tuvastada (Joonis 4). Arvestades asjaolu, et ülejäänud õnnestunud proovid osutusid homosügootseteks metsiktüüpi alleelideks tundub tõenäoline, et 3. ja 5. rajas uuritavad proovid sisaldavad heterosügootset DNA-d. Homosügootset T-DNA insertiooniga liini ei tuvastatud. Sellel võib olla mitmeid põhjuseid. Võimalik on, et juhtumisi ei testitud homosügootset T-DNA insertiooniga liini, aga see on väike, kuna kolmeteistkümnes õnnestunud proovis esines täpselt kahte tüüpi produkte. T-DNA homosügootse liini puudumise võiks põhjustada letaalsus, aga ka ebaoptimaalne PCR programm. Letaalsus ei ole kuigi tõenäoline, kuna mitmes töös on suudetud T-DNA insertiooniga *med25-3* homosügoot isoleerida (Xu ja Li, 2011; Liu *et al.*, 2019). Kindlate järeluste tegemiseks oleks vajalik täiendav uurimine, kus tuleks kummagi homosügooti tuvastamiseks geeni amplifitseerimine teostada eraldi reaktsioonides praimeritega LP ja RP ning LBB1.3 ja RP. Edasisse töösse ei kaasatud *med25-3* taimi, kuna ei suudetud tuvastada T-DNA insertiooniga homosügootse liini olemasolu.

Mutantsete taimeliinide *med25-4* ja *med25-5* genotüpiseerimisel õnnestus isoleerida homosügoot. Mutantset *med25-5* liini võiks veel täiendavalt kontrollida, kuna PCR produktides esines palju ebaspetsiifilisi produkte. Selle põhjuseks võib olla kolme praimeri kasutamine amplifitseerimisel, mille korral on suurem tõenäosus ebaspetsiifiliste produktide moodustumiseks.

2.4.2 Tähelepanekud gaasivahetuskatsetest

Gaasivahetuskatsete andmetes esines suur variatsioon, mille tõttu pole nende alusel täpseid järeldusi võimalik teha. Katseandmete arusaadavamaks väljendamiseks esitati need selles töös suhtelistes ühikutes. Suure variatsiooni võisid põhjustada näiteks ebavõrdsed valimi suurused või ka katsete teostamise kellaajaline varieeruvus (Li *et al.*, 2020). Arvatavasti oleks andmete variatsioon väiksem ja need oleks paremini võrreldavad, kui katsed oleks teostatud iga stiimuli kohta kindlalt piiritletud kellaajalisel vahemikul.

Col-3 taimeliini õhulõhede juhtivust mõõdeti vaid pilootkatseseerias. Sellel põhjustel esitati Col-3 vaid punase valguse ja kõrge CO₂ kontsentratsiooni gaasivahetuskatsete tulemused. Edasistest katsetest jäeti Col-3 välja, kuna kasvupinna puuduse tõttu ei olnud võimalik kõiki liine samaaegselt kasvatada. Katsetest välja jätmiseks valiti Col-3, kuna uuritavatest mutantsetest taimeliinidest oli vaid *med25-2* selle taustal loodud. Col-0 ja Col-3 on ühtlasi ka

geneetilistelt suuresti sarnased (Ahn *et al.*, 2013), mistõttu on eeldatav, et nende õhulõhede regulatsioonis ei esine olulisi erinevusi. Sellisel juhul võiks Col-0 taimi teoreetiliselt kasutada ka Col-3 taustal loodud mutantsete liinide kontrolliks

2.4.3 **MED25 mõju õhulõhede reaktsioonivõimele**

Punase valguse gaasivahetuskatsete tulemuste analüüsil ilmnes statistiliselt oluline erinevus Col-3 metsiktüübi ja kõikide teiste uuritud taimeliinide vahel (Joonis 7). Col-0 taimeliini reaktsioon ei erinenud statistiliselt oluliselt mutantsete liinide reaktsioonidest. See tulemus on iseäranne kuna Col-0 ja Col-3 liinide gaasivahetuskatsetest oodati sarnaseid tulemusi. Col-0 taimedel mõõdeti ebaharilikult madal juhtivus ning reaktsioon punasele valgusele oli nõrgem kui mutantsel *med25-5* taimeliinil. Koolmeister, 2019 uuringus liini Col-3 ei uuritud, aga see-est esines õhulõhede juhtivuses statistiliselt oluline erinevus liinide Col-0 ja *med25-2* vahel. Tulemuste analüüsil ilmnenud statistiline erinevus Col-3 ja *med25-2* liinide õhulõhede juhtivuses toetab Koolmeister, 2019 hüpoteesi *MED25* potentsiaalsest osalusest punase valguse signaalirajas. Samas seab suur erinevus metsiktüüpi Col-0 ja Col-3 taimede õhulõhede juhtivuses punases valguses kahtluse alla mõlema liini katsete tulemused. Seetõttu oleks põhjapanevate järelduste tegemiseks vaja täiendavaid uuringuid.

Kõrge CO₂ kontsentratsiooni seoselise sulgumisreaktsiooni mõõtmistulemustes esinesid mitmed statistiliselt olulised erinevused (Joonis 7). Col-3 metsiktüüpi taimeliinil esines statistiliselt oluliselt suurem reaktsioon mutandist *med25-2*. Samas esines Col-3 metsiktüübil statistiliselt oluliselt suurem reaktsioon ka metsiktüübist Col-0. Statistiliselt oluline erinevus Col-3 ja *med25-2* õhulõhede juhtivuses viitab *MED25* mõjule kõrge CO₂ kontsentratsiooni seoselise sulgumisreaktsiooni regulatsioonis. Koolmeister, 2019 uuringus ei esinenud statistiliselt olulisi erinevusi uuritud taimeliinide õhulõhede juhtivuses. Mutantne liin *med25-2* on metsiktüübi Col-3 taustal loodud, järelikult võiks uuringus ilmnenud statistilist erinevust kontrollida tulevastes katsetes.

Nii sinise valguse (Joonis 8), madala CO₂ kontsentratsiooni (Joonis 9) kui ka ABA toimeliste (Joonis 10) gaasivahetuskatsete tulemustes ei esinenud statistiliselt olulisi erinevusi Col-0 ja mutantsete liinide reaktsioonivõime vahel. Need tulemused langevad kokku Koolmeister, 2019 uuringuga, kus samuti ei esinenud katsetes nende stiimulitega statistiliselt olulisi erinevusi.

Valguskatsetes esines *med25-2* liinil madalama reaktsioonivõime trend kõikide teiste mutantsete liinidega võrreldes. Selle põhjuseks võiks olla näiteks alternatiivne mutatsioon. Sarnaselt tuvastati Jakobson *et al.*, 2016 uuringus mutatsioon *MPK12* geenis, kui uuriti

eeldatavalt *CAS* geeni suhtes defektset taimeliini. Üheks tulevaseks uurimissuunaks võiks olla *med25-2* liinis alternatiivsete mutatsioonide olemasolu kontrollimine.

Üldiselt ilmnemise statistiliselt olulised erinevused õhulõhede reaktsioonivõimes, kui kaasati katsetesse Col-3 taimed. Teoreetiliselt võiksid Col-0 ja Col-3 sarnaselt reageerida kõikidele selles uurimuses katsetatud stiimulitele. Gaasivahetuskatsetel erines nende metsiktüüpide reaktsioonivõime suuresti. Üks võimalus suuresti erinenud reaktsioonivõime põhjendamiseks oleks Col-0 seemnete vanus, kuna taimekasvatusel täheldati häiritud idanemist. Tulevikus võiks võrrelda Col-0 ja Col-3 taimeliinide õhulõhede reaktsioonivõimet. Kui katsetes peaks selguma, et nende metsiktüüpide reaktsioonivõime on sarnane, siis võiks potentsiaalselt neid üksteise taustal loodud mutantide kontrolltaimedena kasutada.

Katsete tulemused olid probleemsed ning tulevastes uuringutes tuleks iga stiimuli katsed sooritada samadel kellaaegadel, et niiviisi vähendada tsirkaadest tsüklilist tulenevate füsioloogiliste muutuste mõju õhulõhede regulatsioonile (Li *et al.*, 2020). Täpsemate tulemuste saavutamiseks võiks iga stiimuli mõju katsetada samadel taimeliinidel ning katsesse võiks kaasata ühtlase replikaatide arvu.

2.4.4 ***MED25* geenikatkestuse asukoha mõju õhulõhede regulatsioonile**

Teoreetiliselt põhjustab T-DNA insertioon geenikatkestuse. Geenikatkestuse tõttu kodeeritakse geenilt lühem produkt, mis peaks seetõttu kaotama oma funktsiooni osaliselt või tervenisti. Selles töös uuriti *MED25* defektseid liine, millest igas ühes oli tekitatud geenikatkestus erinevas kohas (Joonis 3). Mutantse taimeliini *med25-1* T-DNA insertioon paikneb *MED25* lõpu poole. Sellest võiks järeldada, et *med25-1* kodeerib suurema funktsionaalsusega produkti kui liin *med25-4*, mille *MED25* geenikatkestus on suhteliselt geeni alguses. Mutantse *med25-5* T-DNA insert asub promootoralas, mis võib põhjustada täielikku geeni funktsiooni kadu. Täielik geeni funktsiooni kadu oleks sellisel juhul põhjustatud rikutud promootoralast, millele DNA polümeraas poleks võimeline seonduma. Kuna promootorala on suur ja T-DNA inserdi täpne seostumissait pole teada, siis on ka võimalik, et T-DNA insertioon ei avalda mõju geeni funktsionaalsusele.

Gaasivahetuskatsete tulemuste suure varieeruvuse tõttu, aga ka kontrolltaimedele Col-0 ja Col-3 tulemuste omavaheline suure erinevuse tõttu on probleemne geenikatkestuse asukoha mõju selgitamine. Võimalik oli võrrelda vaid liine *med25-1*, *med25-4* ja *med25-5*, kuna *med25-2* on loodud Col-3 taustal. Võrreldavate liinide gaasivahetuskatsete tulemuste analüüsil esines statistiliselt oluline erinevus vaid kõrge CO₂ kontsentratsiooni seoses reaktsioonivõimes mutantsete liinide *med25-1* ja *med25-5* vahel (Joonis 9). See tulemus on iseäranine, kuna *med25-*

1 liini *MED25* peaks olema suuresti funktsionaalne, aga võrreldes *med25-5* liiniga esineb sellel statistiliselt madalam reaktsioonivõime. Selle põhjuseks võiks olla näiteks *MED25* negatiivne regulatoorne mõju õhulõhede sulgumisreaktsioonile kõrge CO₂ kontsentratsiooni tingimustes. Seda eeldust toetab ka asjaolu, et mutantse *med25-4* liini reaktsioonivõime on suurem kui liinil *med25-1*, aga väiksem kui *med25-5*. Põhjapanevate järelduste tegemiseks oleks vaja sooritada täiendavaid katseid. Tulevastes katsetes võiks kõrvuti uurida ühte metsiktüübi liini ning võimalikult paljusid erinevate T-DNA inserttsioonidega sama metsiktüübi taustal loodud taimeliine.

2.4.5 Järeldused

Uuringu tulemused viitavad sellele, et *MED25* omab mõju õhulõhede regulatsioonile. Gaasivahetuskatsete tulemused olid küll problemaatilised, aga tuvastati statistiliselt olulised erinevused T-DNA inserttsiooniga liini reaktsioonivõimes metsiktüüpi liini reaktsioonivõimega võrrelduna. Statistiliselt olulised erinevused ilmnisid nii punase valguse avanemisreaktsioonil kui ka kõrge CO₂ kontsentratsiooni seoselisel sulgumisreaktsioonil. Mõlema reaktsiooni puhul esines *MED25* defektsel taimeliinil statistiliselt oluliselt väiksem reaktsioonivõime. Ühtlasi täheldati ka potentsiaalset korrelatsiooni *MED25* geenikatkestuse asukoha ja kõrge CO₂ kontsentratsiooni seoselise sulgemisreaktsiooni vahel. Tulevastes uuringutes võiks uurimisteemat kitsendada kas ainult *MED25* tähtsuse selgitamisele avanemise ja sulgumise protsessidele või ainult erinevate *MED25* geeni defektide mõju selgitamisele õhulõhede regulatsioonis.

Kokkuvõte

Uuringus sooritatud gaasivahetuskatsetest *MED25* defektsete taimeliinidega kinnitati eelnevas uuringus püstitatud hüpoteesi *MED25* potentsiaalsest osalusest punase valguse signaalirajas. *MED25* defektse mutandi õhulõhedel esines oluliselt madalam reaktsioonivõime metsiktüübiga võrreldes, millest järeldati, et *MED25* omab tähtsust punase valguse avanemisreaktsioonis.

Gaasivahetuskatsetest selgus ka *MED25* potentsiaalne mõju õhulõhede sulgumisreaktsioonile kõrge süsihappegaasi kontsentratsiooni tingimustes. *MED25* defektse mutandi õhulõhede reaktsioonivõime osutus oluliselt madalamaks kui metsiktüübil. Eelnevas uuringus sellist korrelatsiooni ei täheldatud, aga püstitati hüpotees *MED25* üldisest mõjust õhulõhede regulatsioonile, mida selle uuringu tulemused ka toetavad.

MED25 mõju iseloomustamiseks sooritati katsed mitme erineva *MED25* defektse taimeliiniga, mis eeldatavasti kodeerivad erineval määral defektset *MED25* geeni. Taimeliin, mille *MED25* geenikatkestus oli promootoralas, reageeris oluliselt tugevamalt kõrgele süsihappegaasi kontsentratsioonile kui taimeliin, mille *MED25* geenikatkestus oli geeni lõpuosas. Nende liinide reaktsioonide omavahelisel võrdlusel täheldati esmakordselt potentsiaalset *MED25* negatiivset reguleerivat mõju sulgumisreaktsioonile kõrge süsihappegaasi kontsentratsiooni tingimustes. Seda hüpoteesi kinnitas katse liiniga, mille geenikatkestus oli *MED25* geeni keskosas ning millel esines vahepealne reaktsioonivõime fenotüüp.

Varasemalt on *MED25* kirjeldatud kui õitsemise ja arengu regulaatorit ning sellele eelnevas töös viidati ka *MED25* olulisusele õhulõhede regulatsioonis. See töö kinnitab eelneva töö hüpoteesi *MED25* mõju osas õhulõhede reaktsioonivõimele ning ühtlasi kirjeldab esmakordselt *MED25* kui potentsiaalset negatiivset regulaatorit kõrge süsihappegaasi kontsentratsiooni seoselises sulgumisreaktsioonis.

Resümee

The effect of *MED25* gene disruptions on stomatal regulation in *Arabidopsis thaliana*

Erki Eelmets

Summary

Plants assimilate carbon dioxide from the atmosphere through little pores in plant epidermis called stomata, through which water transpiration also occurs. As water is a vital but limited resource for plants, it is important to minimise water loss. Each stoma consists of two guard cells that regulate the aperture of the pore between them in order to maximise carbon dioxide intake and minimise water loss through transpiration.

Guard cells react to various different stimuli by either opening or closing the pore between them. Light is one of the strongest stomatal opening factors. The reaction to light differs at different wavelengths. Blue light causes a much stronger opening reaction than red light. The molecular mechanisms behind blue light induced stomatal opening are well studied. In contrast, the molecular mechanisms behind red light induced stomatal opening remain largely unknown. There are multiple prevalent theories trying to explain the inner workings behind the reaction to red light. Those theories are contradictory and a scientific consensus between them is yet to be reached.

In order to gain a better understanding of stomatal regulation in red light, a potential role of MEDIATOR 25 (*MED25*) was studied. The main focus of this study was to determine if and how various different disruptions in the *MED25* gene would affect the stomatal conductance of *Arabidopsis thaliana*. The *Arabidopsis thaliana* ecotypes Col-0 and Col-3 and various *MED25* T-DNA mutants were used in this study on the role of *MED25* in stomatal regulation. In order to study the stomatal reactions gas exchange analyses were conducted. The results showed that *MED25* in fact has an effect on stomatal regulation in red light but also in high environmental carbon dioxide concentration. Through comparison of stomatal conductance of T-DNA mutants a novel discovery was also made hinting at a negative regulatory role of *MED25* in stomatal reaction to high environmental carbon dioxide concentration.

Kasutatud kirjandus

- Ache P., Becker D., Ivashikina N., Dietrich P., Roelfsema M. R. G., Hedrich R.** (2000). GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. *FEBS Lett* **486**: 93–98.
- Adie B. A. T., Pérez-Pérez J., Pérez-Pérez M. M., Godoy M., Sánchez-Serrano J.-J., Schmelz E. A., Solano R.** (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 1665–1681.
- Ahn E.- R., Cho H.-K., Pai H.-S.** (2013). The forkhead-associated domain 2 (FHA2) in *Arabidopsis* plays a role in plant fertility by regulating stamen development. *Planta* **237**: 1015–1023.
- Alonso J. M., Stepanova A. N., Leisse T. J., Kim C. J., Chen H., Shinn P., Stevenson D.K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., et al** (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–657.
- Ando E., Kinoshita T.** (2018). Red Light-Induced Phosphorylation of Plasma Membrane H⁺-ATPase in Stomatal Guard Cells. *Plant Physiol* **178**: 838–849.
- Assmann S., Shimazaki K.** (1999). The Multisensory Guard Cell. Stomatal Responses to Blue Light and Abscisic Acid1. *Plant Physiol* **119**: 809–16.
- Bäckström S., Elfving N., Nilsson R., Wingsle G., Björklund S.** (2007). Purification of a Plant Mediator from *Arabidopsis thaliana* Identifies PFT1 as the Med25 Subunit. *Mol Cell* **26**: 717–729.
- Björklund S., Gustafsson C. M.** (2005). The yeast Mediator complex and its regulation. *Trends Biochem Sci* **30**: 240–244.
- Blatt M. R.** (2000). Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 221–241.
- Boccalandro H. E., Giordano C. V., Ploschuk E. L., Piccoli P. N., Bottini R., Casal J. J.** (2012). Phototropins But Not Cryptochromes Mediate the Blue Light-Specific Promotion of Stomatal Conductance, While Both Enhance Photosynthesis and Transpiration under Full Sunlight. *Plant Physiol* **158**: 1475–1484.
- Bourbon H. M., Aguilera A., Ansari A. Z., Asturias F. J., Berk A. J., Björklund S., Blackwell T. K., Borggreffe T., Carey M., Carlson M., et al** (2004). A unified nomenclature for protein subunits of mediator complexes linking transcriptional regulators to RNA polymerase II. *Mol Cell* **14**: 553–557.
- Briggs W. R., Beck C.F., Cashmore A. R., Christie J. M., Hughes J., Jarillo J. A., Kagawa T., Kanegae H., Liscum E., Nagatani A., et al** (2001). The Phototropin Family of Photoreceptors. *Plant Cell* **13**: 993–997.
- Briggs W. R., Christie J. M.** (2002). Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* **7**: 204–210.

- Casal J. J.** (2013). Photoreceptor Signaling Networks in Plant Responses to Shade. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 403–427.
- Cashmore A. R., Jarillo J. A., Wu Y. J., Liu D.** (1999). Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* **284**: 760–765.
- Cerdán P. D., Chory J.** (2003). Regulation of flowering time by light quality. *Nature* **423**: 881–885.
- Christie J. M.** (2007). Phototropin Blue-Light Receptors. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 21–45.
- Conaway R. C., Conaway J. W.** (1993). General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* **62**: 161–190.
- Daszkowska-Golec A., Szarejko I.** (2013). Open or close the gate - stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Front Plant Sci* **4**: 138.
- Edwards A., Bowling D. J. F.** (1985). Evidence for a CO₂ Inhibited Proton Extrusion Pump in the Stomatal Cells of *Tradescantia virginiana*. *J Exp Bot* **36**: 91–98.
- Elfving N., Davoine C., Benloch R., Blomberg J., Brännström K., Müller D., Nilsson A., Ulfstedt M., Ronne H., Wingsle G., et al** (2011). The *Arabidopsis thaliana* Med25 mediator subunit integrates environmental cues to control plant development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 8245–8250.
- Fitzsimons P. J., Weyers J. D. B.** (1983). Separation and Purification of Protoplast Types from *Commelina communis* L. Leaf Epidermis. *J Exp Bot* **34**: 55–66.
- Fornero C., Suo B., Zahde M., Juveland K., Kirik V.** (2017). Papillae formation on trichome cell walls requires the function of the mediator complex subunit Med25. *Plant Mol Biol* **95**: 389–398.
- Geiger D., Maierhofer T., Al-Rasheid K. A. S., Scherzer S., Mumm P., Liese A., Ache P., Wellmann C., Marten I., Grill E., et al** (2011). Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Sci Signal* **4**: ra32.
- Geiger D., Scherzer S., Mumm P., Stange A., Marten I., Bauer H., Ache P., Matschi S., Liese A., Al-Rasheid K. A. S., et al** (2009). Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 21425–21430.
- Gonzalez-Guzman M., Pizzio G.A., Antoni R., Vera-Sirera F., Merilo E., Bassel G. W., Fernández M. A., Holdsworth M. J., Perez-Amador M. A., Kollist H., et al** (2012). *Arabidopsis* PYR/PYL/RCAR Receptors Play a Major Role in Quantitative Regulation of Stomatal Aperture and Transcriptional Response to Abscisic Acid. *Plant Cell* **24**: 2483–2496.
- Goodman H. M., Ecker J. R., Dean C.** (1995). The genome of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 10831–10835.
- Hammer O., Harper D. A. T., Ryan P. D.** (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. 9.

- Hashimoto M., Negi J., Young J., Israelsson M., Schroeder J. I., Iba K.** (2006). Arabidopsis HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO₂. *Nat Cell Biol* **8**: 391–397.
- Hashimoto-Sugimoto M., Negi J., Monda K., Higaki T., Isogai Y., Nakano T., Hasezawa S., Iba K.** (2016). Dominant and recessive mutations in the Raf-like kinase HT1 gene completely disrupt stomatal responses to CO₂ in Arabidopsis. *J Exp Bot* **67**: 3251–3261.
- Hayashi M., Inoue S., Ueno Y., Kinoshita T.** (2017). A Raf-like protein kinase BHP mediates blue light-dependent stomatal opening. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep45586.
- Hirayama T., Shinozaki K.** (2007). Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Sci* **12**: 343–351.
- Hoffmann M. H.** (2002). Biogeography of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). *J Biogeogr* **29**: 125–134.
- Hõrak H., Sierla M., Tõldsepp K., Wang C., Wang Y.-S., Nuhkat M., Valk E., Pechter P., Merilo E., Salojärvi J., et al** (2016). A Dominant Mutation in the HT1 Kinase Uncovers Roles of MAP Kinases and GHR1 in CO₂-Induced Stomatal Closure. *Plant Cell* **28**: 2493–2509.
- Hu H., Boisson-Dernier A., Israelsson-Nordström M., Böhmer M., Xue S., Ries A., Godoski J., Kuhn J. M., Schroeder J.I.** (2010). Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO₂-controlled stomatal movements in guard cells. *Nat Cell Biol* **12**: 87–93; sup pp 1-18.
- Iñigo S., Alvarez M. J., Strasser B., Califano A., Cerdán P. D.** (2012). PFT1, the MED25 subunit of the plant Mediator complex, promotes flowering through CONSTANS dependent and independent mechanisms in Arabidopsis. *Plant J* **69**: 601–612.
- Jakobson L., Vaahtera L., Tõldsepp K., Nuhkat M., Wang C., Wang Y.-S., Hõrak H., Valk E., Pechter P., Sindarovska Y., et al** (2016). Natural Variation in Arabidopsis Cvi-0 Accession Reveals an Important Role of MPK12 in Guard Cell CO₂ Signaling. *PLoS Biol* **14**: e2000322.
- Kaiserli E., Chory J.** (2016). The Role of Phytochromes in Triggering Plant Developmental Transitions. eLS. American Cancer Society, pp 1–11.
- Kevei E., Schafer E., Nagy F.** (2007). Light-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning of phytochromes. *J Exp Bot* **58**: 3113–3124.
- Kinoshita T., Doi M., Suetsugu N., Kagawa T., Wada M., Shimazaki K.** (2001). phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**: 656–660.
- Kollist T., Moldau H., Rasulov B., Oja V., Rämme H., Hüve K., Jaspers P., Kangasjärvi J., Kollist H.** (2007). A novel device detects a rapid ozone-induced transient stomatal closure in intact Arabidopsis and its absence in *abi2* mutant. *Physiol Plant* **129**: 796–803.
- Koolmeister K.** (2019). MED25 roll hariliku müürlooga õhulõhede regulatsioonis ja arengus. Thesis. Tartu Ülikool.

- Koornneef M., Meinke D.** (2010). The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant J* **61**: 909–921.
- Kornberg R. D.** (2005). Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem Sci* **30**: 235–239.
- Krämer U.** (2015). Planting molecular functions in an ecological context with Arabidopsis thaliana. *eLife*. doi: 10.7554/eLife.06100.
- Lee S.C., Lan W., Buchanan B. B., 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* **106**: 21419–21424.
- Li D., Wei J., Peng Z., Ma W., Yang Q., Song Z., Sun W., Yang W., Yuan L., Xu X., et al** (2020). Daily rhythms of phyto melatonin signaling modulate diurnal stomatal closure via regulating reactive oxygen species dynamics in Arabidopsis. *J Pineal Res* **68**: e12640.
- Liu Z., Chen G., Gao F., Xu R., Li N., Zhang Y., Li Y.** (2019). Transcriptional Repression of the APC/C Activator Genes CCS52A1/A2 by the Mediator Complex Subunit MED16 Controls Endoreduplication and Cell Growth in Arabidopsis. *Plant Cell* **31**: 1899–1912.
- Ma Y., Szostkiewicz I., Korte A., Moes D., Yang Y., Christmann A., Grill E.** (2009). Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science* **324**: 1064–1068.
- Malik S., Roeder R.G.** (2005). Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem Sci* **30**: 256–263.
- Mancinelli A.L.** (1994). The physiology of phytochrome action. *In* RE Kendrick, GHM Kronenberg, eds, *Photomorphogenesis Plants*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 211–269.
- Matrosova A., Bogireddi H., Mateo-Peñas A., Hashimoto-Sugimoto M., Iba K., Schroeder J.I., Israelsson-Nordström M.** (2015). The HT1 protein kinase is essential for red light-induced stomatal opening and genetically interacts with OST1 in red light and CO₂-induced stomatal movement responses. *New Phytol* **208**: 1126–1137.
- Meinke D. W., Cherry J. M., Dean C., Rounsley S. D., Koornneef M.** (1998). Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis. *Science* **282**: 662, 679–682.
- Melotto M., Underwood W., Koczan J., Nomura K., He S. Y.** (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**: 969–980.
- Messinger S. M., Buckley T. N., Mott K. A.** (2006). Evidence for Involvement of Photosynthetic Processes in the Stomatal Response to CO₂. *Plant Physiol* **140**: 771–778.
- Mott K. A.** (1988). Do Stomata Respond to CO₂ Concentrations Other than Intercellular? 1. *Plant Physiol* **86**: 200–203.
- Park S.-Y., Fung P., Nishimura N., Jensen D.R., Fujii H., Zhao Y., Lumba S., Santiago J., Rodrigues A., Chow T. F., et al** (2009). Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science* **324**: 1068–1071.

- Pilot G., Lacombe B., Gaymard F., Cherel I., Boucherez J., Thibaud J. B., Sentenac H.** (2001). Guard cell inward K⁺ channel activity in arabidopsis involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2. *J Biol Chem* **276**: 3215–3221.
- Quail P. H.** (2002). Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr Opin Cell Biol* **14**: 180–188.
- Raschke K.** (1975). Stomatal Action. *Annu Rev Plant Physiol* **26**: 309–340.
- Roelfsema M. R. G., Hanstein S., Felle H. H., Hedrich R.** (2002). CO₂ provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *Plant J* **32**: 65–75.
- Roelfsema M. R. G., Hedrich R.** (2005). In the light of stomatal opening: new insights into “the Watergate.” *New Phytol* **167**: 665–691.
- Roelfsema M. R. G., Levchenko V., Hedrich R.** (2004). ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *Plant J Cell Mol Biol* **37**: 578–588.
- Roelfsema M. R. G., Steinmeyer R., Staal M., Hedrich R.** (2001). Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane. *Plant J* **26**: 1–13.
- Sancar A.** (1994). Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* **33**: 2–9.
- Schachtman D. P., Schroeder J. I., Lucas W. J., Anderson J. A., Gaber R. F.** (1992). Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA. *Science* **258**: 1654–1658.
- Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W.** (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**: 671–675.
- Schroeder J. I., 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**: 5025–5029.
- Schwartz A., Zeiger E.** (1984). Metabolic energy for stomatal opening. Roles of photophosphorylation and oxidative phosphorylation. *Planta* **161**: 129–136.
- Sessions A., Burke E., Presting G., Aux G., McElver J., Patton D., Dietrich B., Ho P., Bacwaden J., Ko C., *et al*** (2002). A High-Throughput Arabidopsis Reverse Genetics System. *Plant Cell* **14**: 2985–2994.
- Sharkey T. D., Raschke K.** (1981). Effect of Light Quality on Stomatal Opening in Leaves of *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiol* **68**: 1170–1174.
- Sharrock R. A., Quail P. H.** (1989). Novel phytochrome sequences in Arabidopsis thaliana: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev* **3**: 1745–1757.
- Shimazaki K., Doi M., Assmann S. M., Kinoshita T.** (2007). Light regulation of stomatal movement. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 219–247.

- Sierla M., Hõrak H., Overmyer K., Waszczak C., Yarmolinsky D., Maierhofer T., Vainonen J. P., Salojärvi J., Denessiouk K., Laanemets K., et al** (2018). The Receptor-like Pseudokinase GHR1 Is Required for Stomatal Closure. *Plant Cell* **30**: 2813–2837.
- Szyroki A., Ivashikina N., Dietrich P., Roelfsema M. R. G., Ache P., Reintanz B., Deeken R., Godde M., Felle H., Steinmeyer R., et al** (2001). KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 2917–2921.
- Takemiya A., Kinoshita T., Asanuma M., Shimazaki K.-I.** (2006). Protein phosphatase 1 positively regulates stomatal opening in response to blue light in *Vicia faba*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 13549–13554.
- Takemiya A., Shimazaki K.** (2016). Arabidopsis phot1 and phot2 phosphorylate BLUS1 kinase with different efficiencies in stomatal opening. *J Plant Res* **129**: 167–174.
- Takemiya A., Sugiyama N., Fujimoto H., Tsutsumi T., Yamauchi S., Hiyama A., Tada Y., Christie J. M., Shimazaki K.** (2013a). Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening. *Nat Commun* **4**: 2094.
- Takemiya A., Yamauchi S., Yano T., Ariyoshi C., Shimazaki K.** (2013b). Identification of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 which mediates blue light signaling for stomatal opening. *Plant Cell Physiol* **54**: 24–35.
- Talbott L. D., Shmayevich I. J., Chung Y., Hammad J. W., Zeiger E.** (2003). Blue Light and Phytochrome-Mediated Stomatal Opening in the npq1 and phot1 phot2 Mutants of Arabidopsis. *Plant Physiol* **133**: 1522–1529.
- Talbott L. D., Zhu J., Han S.W., Zeiger E.** (2002). Phytochrome and Blue Light-Mediated Stomatal Opening in the Orchid, *Paphiopedilum*. *Plant Cell Physiol* **43**: 639–646.
- Tian W., Hou C., Ren Z., Pan Y., Jia J., Zhang H., Bai F., Zhang P., Zhu H., He Y., et al** (2015) A molecular pathway for CO₂ response in Arabidopsis guard cells. *Nat Commun* **6**: 6057.
- Tischer S. V., Wunschel C., Papacek M., Kleigrew K., Hofmann T., Christmann A., Grill E.** (2017). Combinatorial interaction network of abscisic acid receptors and coreceptors from Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci* **114**: 10280–10285.
- Töldsepp K., Zhang J., Takahashi Y., Sindarovska Y., Hõrak H., Ceciliato P. H. O., Koolmeister K., Wang Y.-S., Vaahtera L., Jakobson L., et al** (2018). Mitogen-activated protein kinases MPK4 and MPK12 are key components mediating CO₂-induced stomatal movements. *Plant J* **96**: 1018–1035.
- Vahisalu T., Kollist H., Wang Y.-F., Nishimura N., Chan W.-Y., Valerio G., Lamminmäki A., Brosché M., Moldau H., Desikan R., et al** (2008). SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* **452**: 487–491.
- Vahisalu T., Puzõrjova I., Brosché M., Valk E., Lepiku M., Moldau H., Pechter P., Wang Y.-S., Lindgren O., Salojärvi J., et al** (2010). Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *Plant J* **62**: 442–453.

- Wang F.-F., Lian H.-L., Kang C.-Y., Yang H.-Q.** (2010). Phytochrome B Is Involved in Mediating Red Light-Induced Stomatal Opening in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **3**: 246–259.
- Werner T., Köllmer I., Bartrina I., Holst K., Schmölling T.** (2006). New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biol Stuttg Ger* **8**: 371–381.
- Willmer C., Fricker M.** (1996). Ionic relations of stomatal movement and signal transduction in guard cells. *In* C Willmer, M Fricker, eds, *Stomata*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 228–309.
- Xu R., Li Y.** (2011). Control of final organ size by Mediator complex subunit 25 in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **138**: 4545–4554.
- Zeiger E., Farquhar G.D., Cowan I.R.** (1987). *Stomatal Function*. Stanford University Press.

Kasutatud veebiaadressid

SALK T-DNA Primer Design. Kasutatud 9.10.19, <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>

SALK T-DNA Express: Arabidopsis Gene Mapping Tool. Kasutatud 5.06.20, <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>

TAIR andmebaas. Kasutatud 5.06.20, <https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=30064&type=locus>

Lisad

Lisa 1

Tabel 1 PCR reaktsioonide jaoks disainitud praimerid

Praimer	Järjestus	GC%	T _m (°C)	Pikkus (bp)
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	42	53	19
<i>med25-3</i> LP	AGGTGTTGGCAATATGTGAGG	48	56	21
<i>med25-3</i> RP	CAACGCATTCATAAAGCAATG	38	52	21
<i>med25-4</i> LP	TGGAAGTGGTCCAACAGAAAC	48	56	21
<i>med25-4</i> RP	TGCATTGGCTTTCTTCCATAC	43	55	21
<i>med25-5</i> LP	AGGTGATGGATTGAGTTGTGG	48	56	21
<i>med25-5</i> RP	CCGACGACATAGTCTCTGAGC	57	58	21

Lisa 2

Tabel 2 PCR reaktsioonide programmid

Taimeliin	<i>med25-4, med25-5</i>	<i>med25-3</i>
Algne denatureerimine	95°C 5 min	95°C 5 min
Denatureerimine (35x)	95°C 30 s	95°C 30 s
Elongatsioon (35x)	51°C 30 s	50°C 30 s
Süntees (35x)	72°C 1 min 30 s	72°C 1 min 30 s
Lõpusüntees	72°C 10 min	72°C 10 min

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Erki Eelmets,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose Defektse *MED25* mõju hariliku müürlooga õhulõhede regulatsioonile,

mille juhendaja on Kaspar Koolmeister ja Hanna Hõrak,

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

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

Erki Eelmets

07.06.2020