

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

**SLAC1 anioonkanali N- ja C-terminuse roll *Arabidopsis thaliana* õhulõhede
regulatsioonis**

Bakalaureusetöö

(12 EAP)

Toomas Ginter

Juhendajad Maris Nuhkat, MSc
Hannes Kollist, PhD

TARTU 2017

SLAC1 anioonkanali N- ja C-terminuse roll *Arabidopsis thaliana* õhulõhede regulatsioonis

Efektiivsema põllumajanduse jaoks on tarvis taimi, mis tulevad paremini toime erinevate keskkonnategurite ja nende muutustega. Üks tegur on taime gaasivahetus atmosfääriga, mis on reguleeritud õhulõhede poolt. Õhulõhede regulatsiooni detailsete mehhanismide uurimine aitab kaasa põuatolerantsete ja teiste kasulike sortide aretamisele. Käesolevas bakalaureusetöös uuriti hariliku müürlooga, *Arabidopsis thaliana*, SLAC1 valgu lühendatud amino- ja/või karboksü-terminusega mutantide õhulõhede reaktsioone õhuniiskuse vähendamisele, ABA, CO₂ ja osooni kontsentratsiooni tõusule ning pimedusele. Selgus, et SLAC1 anioonkanali vahendatud õhulõhede vastus õhuniiskuse vähendamisele, CO₂ kontsentratsiooni tõusule ning pimedusele sõltub SLAC1 valgu transmembraansest kanalist, kuid ei sõltu N- ja C-terminaalsetest otstest. Seevastu viitab uuring sellele, et N- ja C-terminustel võib mingi roll olla ABA vastuses ja kindlasti on oluline roll sulgraku reageerimisel osooni kontsentratsiooni kasvule.

Märksõnad: SLAC1, õhulõhed, osoon
CERCS kood: B225 – Taimogeneetika

On the Role of SLAC1 Anion Channel's N and C Termini' in *Arabidopsis thaliana* Guard Cell regulation

To improve our agricultural effectivity and ecological impact, we need plants which can better cope with the environment and its change. One important factor is gas exchange between the plant and atmosphere, which is regulated by stomata. Detailed research into stomatal regulatory mechanisms gives us insights to produce more drought-resistant and otherwise beneficial new crop breeds. Current Thesis researched *Arabidopsis thaliana* lines with SLAC1 constructs with truncated amino- and/or carboxy-terminus. Their changes in stomatal conductance were measured in response to rise in CO₂ and ozone concentration, abscisic acid, decrease in relative humidity and darkness. It was concluded that SLAC1 anion channel's mediated response to decrease in relative humidity, CO₂ increase and darkness primarily depends on its transmembrane region. Reaction to ABA may use C and N termini, but ozone response, however, definitely requires both the N and C termini.

Keywords: SLAC1, stomata, ozone
CERCS code: B225 – Plant genetics

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Taime õhulõhede uurimise põhjused	7
1.2. Õhulõhede roll ja tööpõhimõte	8
1.3. Ioonkanalite roll õhulõhede regulatsioonis	9
1.4. SLAC1 kanal ja selle tööpõhimõte	10
1.5. Õhulõhe tööd mõjutavad keskkonnafaktorid	12
1.5.1. Valguse ja pimedus	12
1.5.2. Abstsiihape	13
1.5.3. Osoon	14
1.5.4. Süsihappegaas	14
1.5.5. Madal õhuniiskus	14
EKSPERIMENTAALOSA	16
2.1. Töö eesmärgid.....	16
2.2. Materjal ja meetodika	16
2.2.1. Müürlook katseobjektina.....	16
2.2.2. Gaasivahetuskamber.....	16
2.2.3. Katsetaimede kasvatamine	17
2.3. Kasutatud taimed	18
2.3.1. Gaasivahetuse mõõtmine katsetaimedel.....	19
2.3.2. Rakendatavad stiimulid	20
2.3.2.1. Reaktsioon süsihappegaasile	20
2.3.2.2. Reaktsioon pimedusele.....	20
2.3.2.3. Reaktsioon madalale õhuniiskusele	20
2.3.2.4. Reaktsioon abstsiihappele.....	21
2.3.2.5. Reaktsioon osoonile	21
2.3.3. Andmeanalüüs	21
2.4. Tulemused.....	23
2.4.1. Õhulõhede juhtivus	23
2.4.2. Õhulõhede sulgumine madala suhtelise õhuniiskuse toimel.....	23
2.4.3. Õhulõhede sulgumine pimeduse toimel	26
2.4.4. Õhulõhede sulgumine süsihappegaasi toimel	26
2.4.5. Õhulõhede sulgumine ABA toimel	27

2.4.6. Õhulõhede sulgumine osooni toimel.....	29
2.5. Arutelu	31
KOKKUVÕTE	36
SUMMARY	37
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	39
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	46
LISAD	47
LIHTLITSENTS.....	48

KASUTATUD LÜHENDID

ABA – Abstsiihape

ALMT12 – Alumiinium-aktiveeritud malaadi transportvalk 12 (*Aluminum-activated malate transporter 12*)

ANOVA – Dispersioonanalüüs (*analysis of variance*)

ATP - Adenosiintrifosfaat

CAM – Paksuleheliste taimede fotosüntees (*Crassulacean acid metabolism*)

CPK – Kaltsiumsoõltuv proteiinkinaas (*Ca²⁺-dependent protein kinase*)

GFP – Roheline fluorestseeruv valk (*Green Fluorescent Protein*)

GHR1 – Sulgraku vesinikperoksiidi resistentne 1 (*Guard Cell Hydrogen Peroxide-Resistant1*)

HT1 – Kinaas *High Temperature 1*

MPK4/12 – Mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaas 4/12 (*Mitogen-activated protein kinase 4/12*)

OST1 – Kinaas *Open Stomata 1*

PAR – Fotosünteesiliselt aktiivne kiirgus

PHOT1/2 – Fototropiin1/2 (*Phototropin1/2*)

PP2C – *Type 2C protein phosphatase / Protein phosphatase 2C 56*

PPFD – Fotosünteesiliselt aktiivse kiirguse tihedus (*Photosynthetic photon flux density*)

PYL – *Pyr1-like*

PYR – Pürabaktiinresistentne (*Pyrabactin resistance*)

QUAC1 – ALMT12 sünonüüm

RCAR – ABA retseptori reguleeriv komponent (*Regulatory component of ABA receptor*)

RH – Suhteline õhuniiskus (*Relative Humidity*)

ROS – Reaktiivne hapnikuühend (*Reactive oxygen species*)

SLAC1 – Anioonkanal *Slow Anion Channel-Associated 1*

SLAH3 – SLAC1 homoloog 3

TehA – Telluriidi resistentne valk (*Tellurite resistance proteiin*)

T-DNA – *Transfer DNA*

SISSEJUHATUS

Maailma rahvaarv tõuseb, kuid magevee varud on vähenemas ning põud mõjutab olulisel määral taimede tootlikust (Gerland jt., 2014; Luo jt., 2015). Seetõttu on taimeteaduse üks peamisi eesmärke tõsta põllumajanduse produktiivsust, aretades taimi, mis on suurema vee kasutamise efektiivsusega ning vajavad vähem väetamist (Foley jt., 2011).

Hinnanguliselt 60% maismaale langevast vihmast on taimede õhulõhedest atmosfääri aurunud vesi (Katul jt., 2012). Transpiratsiooni ja muud gaasivahetust reguleerivad taime lehepinnal paiknevate õhulõhede sulgumine ja avamine. Pidevalt muutuv keskkonnas on optimaalne õhulõhede regulatsioon taimede ellujäämiseks hädavajalik (Field jt., 1995). Õhulõhede avanemine ja sulgumine toimub mikroskaalal, kuid sellele vaatamata on sel äärmiselt tähtis mõju ökosüsteemile. Õhulõhede regulatsiooni detailse mehhanismi selgitamine aitab kaasa uue põlvkonna põuatolerantsete sortide aretamisele (Marris, 2008; Yamamoto jt., 2016).

Sulgrakkude regulatsiooni alus on osmootselt aktiivsete ainete liikumine sulgrakkudesse ja sealt välja. Seega peamised sulgrakkude regulatsioonimehhanismid puudutavad sulgrakkude membraansete ioonkanalite ja pumpade regulatsiooni. SLAC1 on tsentraalne anioonkanal, mille puudumisel ei toimu normaalset õhulõhede sulgumist praktiliselt mitte ühegi õhulõhede sulgumist põhjustava stiimuli toimel (Negi jt., 2008; Vahisalu jt., 2008). Varasemad tööd on välja pakkunud, et SLAC1 regulatsioonil mängib olulist rolli N-terminuse fosforüleerimine erinevate proteiinkinaaside poolt. Samas, hiljuti näidati, et CO₂-toimelise reaktsiooni jaoks pole C- ega N-terminust vaja (Yamamoto jt., 2016).

Käesolevas bakalaureusetöös selgitati SLAC1 anioonkanali C- ja N-terminaalsete otste olulisust hariliku müürlooga, *Arabidopsis thaliana*, õhulõhede sulgumisel vastusena õhuniiskuse vähendamisele, ABA, CO₂ ja O₃ kontsentratsiooni tõusule ning pimedusele.

Töö koostati TÜ Tehnoloogiainstituudi taimesignaalide uurimisrühmas.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Taimede õhulõhede uurimise põhjused

Maailma rahvaarv on pidevas tõusutrendis, tõustes käesoleva sajandi lõpuks ennustatavalt 12 miljardini (Gerland jt., 2014). Aina suureneva rahvaarvu toitmiseks on vaja 2050. aastaks tõsta toiduproduktiooni praegusega võrreldes 70% (Brutnell ja Frommer, 2012). Seega on tulevikus oodata nii suurenevat põllukultuuride kui ka nende kasvatamiseks vajaliku vee tarbimist. Arvestades ennustusi, mis on seotud kliima soojenemise ja populatsiooni kasvuga, halveneb olukord tõenäoliselt veelgi (Bruinsma, 2009).

Eestis kui ka mujal maailmas on mageveevarud vähenemas ning muutuvad ilmastikuolud mõjutavad negatiivselt saaki (Turrall jt., 2011; Luo jt., 2015). Kuigi pidevalt tõusev globaalne atmosfääri CO₂ kontsentratsioon soodustab küll C₃-taimedes fotosünteesi ning vähendab nende veekadu, siis liigiti võib CO₂ vastus paljuski erineda, muutes potentsiaalselt kindlaid liike eelistatumaks kui teisi (Hetherington ja Woodward, 2003; Ellsworth jt., 2017). Lisaks on probleemiks O₃ kõrge tase troposfääris, mille mõju on lokaalne ja piirkonniti erinev. Arvestades neid taimekasvule mõjuvaid ohte, on taimeteaduse üks tähtsamaid eesmärke luua taimi, mis on suurema vee kasutamise efektiivsusega, mis vajavad vähem väetamist, mille gaasivahetus keskkonnaga on uutes tingimustes efektiivsem ning mis on paremini kaitstud saasteainete eest (Hetherington ja Woodward, 2003; Vahisalu jt., 2008; Foley jt., 2011).

Taimede gaasivahetus atmosfääriga toimub läbi õhulõhede. Õhulõhede liikumine toimub mikroskaalal, kuid sellele vaatamata on sellel mõju ökosüsteemile: hinnanguliselt 60% maismaale langevast vihmast on tingitud taimede õhulõhede kaudu toimuvast transpiratsioonist (Katul jt., 2012). Õhulõhede avanemise ja sulgumise regulatsiooni detailse mehhanismi selgumine aitab kaasa uue põlvkonna põuatolerantsete sortide aretamisele (Marris, 2008; Yamamoto jt., 2016).

Õhulõhede regulatsiooni uuringute tulemused võimaldaksid maksimeerida tootlikust nii avamaa- kui ka kasvuhoonekultuuridel. Samuti võimaldab erinevate mutantide uurimine valida kasvatamiseks just selline mutant, mis sobib kõige paremini konkreetsesse keskkonda. Selline

teaduspõhine aretamine võimaldaks maksimeerida tootlikust, reguleerides vastavalt keskkonna ööpäeva režiimi, CO₂, õhuniiskuse ja osooni sisaldust suletud kasvukeskkonnas (Jensen, 2002).

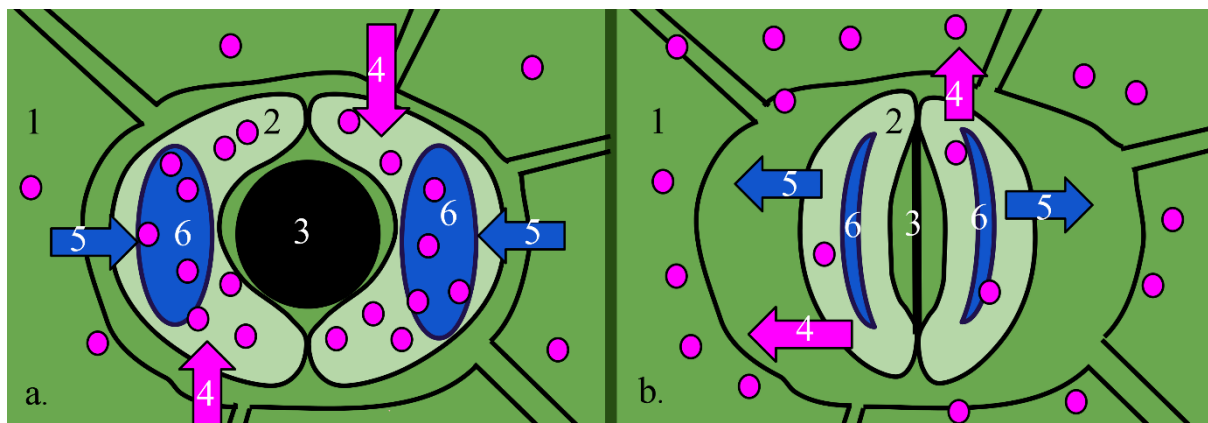
1.2. Õhulõhede roll ja tööpõhimõte

Enamik taime maapealsest osast on kaetud epidermisega, mille välispind on omakorda kaetud vett mitteläbilaskva vahaja kihi ehk kutiikulaga. Taime ja atmosfääri vahelise gaasivahetuse jaoks on epidermis mikroskoopilised poorid, mida kutsutakse õhulõhedeks (Boyer jt., 1997; Jones jt., 2013). Õhulõhede kaudu toimub fotosünteesi jaoks vajaliku CO₂ omastamine: taimelehe rakkudevahelises ruumis on CO₂ kontsentratsioon madalam kui väliskeskkonnas ja kui õhulõhed on avatud, siis CO₂ difundeerub taime. Samal ajal toimub transpiratsiooni käigus veeauru väljumine õhulõhede kaudu. Transpiratsioon juhib ka ksüleemi voogu, mis reguleerib taime toiteainete omastamist pinnasest (Boyer jt., 1997).

Õhulõhe moodustub kahest sulgrakust, mille vahel on õhulõhe poor. Sulgrakke ümbritseb omakorda kuni seitse kaasrakku. Sulgrakkude suhtelise liikumisvõime tuleneb nende asümmeetrilisest ehitusest: sulgrakupaari vahelised kokkupuutuvad kestad on paksud ning piisava hulga vee sisenemisel rakkude vakuooli ja sulgraku ruumala kasvamisest rakud kõverduvad ja kahe sulgraku vahele tekib ovaalne avaus (Willmer ja Fricker, 1996). Poori suuruse määrab sulgraku turgor. Kui osmootselt aktiivsete, madalmolekulaarsete ühendite kontsentratsioon kasvab, siis veepotentsiaal langeb, mistõttu vesi liigub rakku ja turgor tõuseb. Kõrge turgoriga sulgrakud paisuvad ja õhulõhe poor suureneb. Kui osmootselt aktiivsete ühendite kontsentratsioon rakus väheneb, siis veepotentsiaal tõuseb ning tekkiva vee väljavooluga rakust turgor langeb. Kui turgor on madal, siis õhulõhed sulguvad. Sulgrakud reageerivad erinevatele keskkonnatingimuste muutustele kui signaalidele, nagu näiteks temperatuuri, CO₂ kontsentratsiooni, valguse ja niiskuse hulga muutus, ja ka sisemistele signaalidele nagu hormoonid ja taime veesisaldus (Kwak jt., 2008).

Õhulõhede kaudu toimub taimele vajalik ainevahetus, kuid avatud õhulõhed teevad taime vastuvõtlikuks ka erinevatele biotilistele ja abiotilistele stressoritele. Õhulõhede kaudu eraldub näiteks vajalikku vett ning sisenevad kahjulikud mikroobid (Melotto jt., 2006). Muutlikes keskkonnatingimustes elavad taimed peavad suutma optimaalselt väikese veekao juures kätte saama piisava koguse süsihappegaasi. Seega on taime eksistentsi aluseks suuresti kompromiss – õhulõhed peavad olema piisavalt avatud vajaliku CO₂ omastamiseks ja piisavalt

suletud, et mitte kaotada liigselt vett. Samuti peab taim olema võimeline keskkonnastressi mõjul kahjustuste vältimiseks õhulõhed kiiresti sulgema (H. Kollist jt., 2014).



Joonis 1. Õhulõhe avanemine (a) ja sulgumine (b).

Avanemisel sisenevad sulgrakku (peamiselt) K^+ ioonid, mis langetavad veepotentsiaali. Seetõttu siseneb rakku ja vakuolidesse piisavalt vett, et turgor tekitab kahe sulgraku vahele avatud poori. Sulgumisel liiguvad K^+ ioonid sulgrakust välja, tõstes veepotentsiaali ja lastes üleliigselt veel väljuda rakust. Langenud turgori tõttu vajuvad sulgrakud kokku ja sulgevad õhulõhe. 1 – epidermi rakk, 2 – sulgrakk, 3 – õhulõhe, 4 – osmootselt aktiivsed ioonid, 5 – vesi, 6 – vakuool (Lmackay2013, 2013).

1.3. Ioonkanalite roll õhulõhede regulatsioonis

Ioonkanalid on transmembraansed valgud, mille membraani läbivatest osadest moodustub poor, mida saavad läbida vaid teatud kindlad ioonid. Ioonkanalid võimaldavad ionide passiivset transporti rakust sisse ja välja. On mitmeid ioonkanalite aktiveerimismehhanisme, mille kaudu muudetakse kanali valgu konformatsiooni, et seda kas avada või sulgeda. Pingsesõltuvaid ioonkanaleid reguleerib membraani potentsiaalide erinevusest tekkinud elektriväli. Ligandseoselised ioonkanalid avanevad spetsiifilise ligandmolekuli seondumisel retseptordomeenile, põhjustades kanalis konformatsioonilisi muutusi. Lisaks leidub Ca^{2+} -aktiveeritavaid, valgustundlikke, mehhaanilise pinge tundlikke, temperatuurist sõltuvaid ioonkanaleid ja mitmeid veel.

Õhulõhede avanemisel hüperpolariseerib H^+ -ATPaas (ATP energiat vajav H^+ pump) membraani, pumbates prootoneid tsütoplastmast apoplasti (Assmann jt., 1985; Shimazaki jt., 1986) Membraani hüperpolariseerimine omakorda aktiveerib membraanpotentsiaalst-sõltuvad K^+ sissevoolukanalid, mis lasevad K^+ ioonidel vabalt liikuda sulgrakkudesse (Schroeder jt., 1984). Lisaks K^+ ioonidele koguneb õhulõhede avanemisel rakku ka anioone ja madalmolekulaarseid orgaanilisi ühendeid nagu sahharoos ja malaat. See põhjustab veepotentsiaali langust ja vee osmootset liikumist rakku, mis viib sulgraku paisumise ja

õhulõhede avanemiseni. Õhulõhede sulgumisel on keskne roll anioonkanalitel (Kwak jt., 2008). Nende aktiveerimine signaaliülekandeahela tulemusena põhjustab anioonide väljavoolu ning see omakorda plasmamembraani depolarisatsiooni, mis aktiveerib K^+ väljavoolu kanalid. Selle tulemusena toimub vee väljavool ja õhulõhed sulguvad (Dzierżyńska, 2006; Kim jt., 2010).

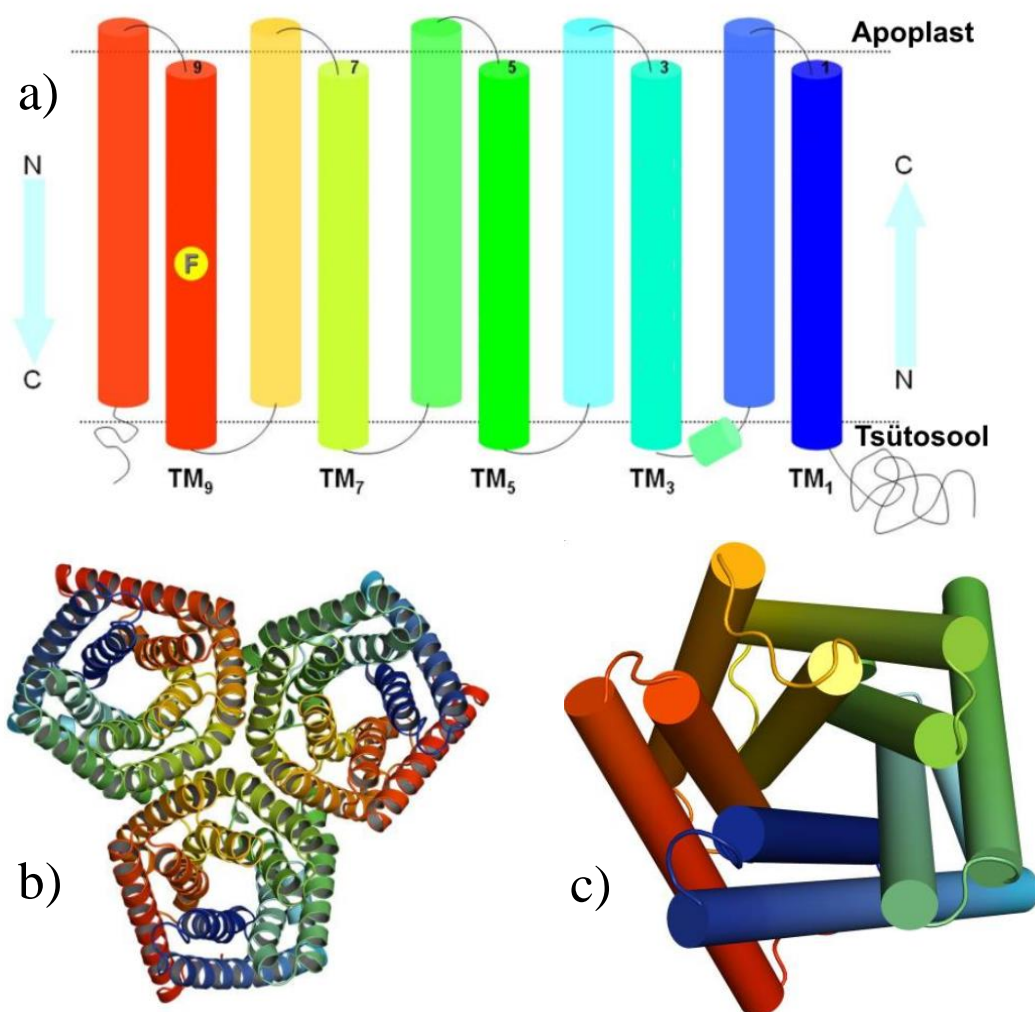
Õhulõhede plasmamembraani anioonkanaleid võib jagada aeglasteks (S-tüüp) ja kiireteks (R-tüüp) anioonkanaliteks. R-tüüpi kanalid on pingesõltuvad ning nende aktivatsioon/deaktivatsioon toimub millisekundite jooksul (Kolb jt., 1995). Põldoa (*Vicia faba*) sulgrakkude protoplastide puhul on näidatud, et R-tüüpi anioonkanali ajast sõltuv inaktivatsioon toimub kümnete sekundite jooksul (Roelfsema jt., 2004). S-tüüpi kanalite puhul kestab aktivatsioon/deaktivatsioon mitmeid sekundeid (Linder ja Raschke, 1992). S-tüüpi kanali aktiivsus on nõrgalt pingesõltuv ja nad inaktiveeruvad iseseisvalt teatud aja jooksul (Schroeder ja Keller, 1992). Anioonkanalite roll õhulõhede töös oli elektrofüsioloogia katsete kaudu teada juba pea 30 aastat varem kui leiti esimene anioonkanali valk, SLAC1. Juba 1989. aastal mõõdeti õhulõhede plasmamembraanil anioonide voolu (Schroeder ja Hagiwara, 1989). Nii S- kui R-tüüpi kanalite esmane iseloomustamine ja nimetamine toimus 90ndate alguses (Schroeder ja Keller, 1992). Peamised anioonkanalid, mis on praegu teada ja mis reguleerivad anioonide liikumist plasmamembraanil, on S-tüüpi kanalid SLAC1 ning selle homoloog SLAH3 ning R-tüüpi kanal ALMT12 ehk QUAC1 (Vahisalu jt., 2008; Meyer jt., 2010; Geiger jt., 2011).

1.4. SLAC1 kanal ja selle tööpõhimõte

SLAC1 ioonkanal avastati, uurides hariliku müürlooga CO_2 toimel õhulõhesid mitte sulguvaid ja osoonitundlikke mutante (Negi jt., 2008; Vahisalu jt., 2008). SLAC1 perekonna valgud aitavad hoida rakule vajalikku anioonhomöostaasi (Negi jt., 2008). SLAC1 valk paikneb sulgraku plasmamembraanis ning funktsioneerib aeglase, S-tüüpi anioonkanalina, ning mängib olulist rolli õhulõhede sulgemise reguleerimises (Vahisalu jt., 2008). Selle anioonkanali juhtivus on kõige suurem nitraadile, kuid ta juhib ka kloori ioone ning vähesel määral ka malaati (Schroeder jt., 1984; Schmidt ja Schroeder, 1994; Geiger jt., 2009; Chen jt., 2010). Muteerunud SLAC1 kanaliga sulgrakkudel ei pääse anioonid rakust välja ja akumulatsioonid (Negi jt., 2008). Seetõttu on defektse SLAC1 valguga taimedel õhulõhed oluliselt rohkem lahti ja õhulõhede sulgemine raskendatud ning erinevad keskkonnafaktorid nagu osoon ja madal õhuniiskus kahjustavad taimi veel enam (Vahisalu jt., 2008; Merilo jt., 2013).

SLAC1 (*Arabidopsis thaliana* geen nr. AT1G12480) kodeerib 556 aminohappe pikkust valku, mille massiks on 63 kDa. SLAC1-le on ennustatud tertsiaarstruktuur, mis põhineb selle

bakteriaalse homoloogi, *Haemophilus influenzae* leiduva TehA kristallstruktuuril (Chen jt., 2010). Struktuur näitab, et SLAC1 valk esineb membraanis homotrimeerina. Ühes valgus on 10 transmembraanset heeliksi, mis paiknevad membraanis paarikaupa ja ringikujuliselt nii, et moodustub keskne 5 heeliksiga poor (Joonis 2 c). Poori avanemisel-sulgumisel arvatakse olevat oluline konserveerunud fenüülalaniin positsioonis 450, mis on ainukene absoluutselt konserveerunud aminohape SLAC1 valguperekonnas. SLAC1 valgu N- ja C-terminaalsed otsad paiknevad tsütosoolis ning on vastavalt 188 ning 58 aminohappe pikkused (UniProt andmebaas).



Joonis 2. SLAC1 valgu struktuur.

(a) struktuur ristlõikes läbi membraani. Poori moodustavad heeliksid on märgitud $TM_{1..9}$. 9. transmembraansel heeliksil on toodud ära pooris paiknev konserveerunud Phe450. (b) SLAC1 homoloogi TehA trimeer (c) SLAC1 ennustatav struktuur pealtvaates. Värvid joonisel vastavad värvidele joonisel (a). Joonised mugandustega Chen Y-H jt., (2010) artiklist.

SLAC1 valgu aktiveerimiseks on vajalik selle fosforüleerimine: on leitud mitmeid kinaase, mis on võimelised SLAC1 aktiveerima. Tugevate fenotüüpidega OST1 valgu mutandid leiti uurimusest, kus otsiti rohkem avatud õhulõhedega taimi (Mustilli jt., 2002). On teada, et OST1

on võimeline otseselt interakteeruma ja aktiveerima nii SLAC1 kui QUAC1 anioonkanaleid (Geiger jt., 2009; Lee jt., 2009; Vahisalu jt., 2010; Imes jt., 2013). Lisaks on leitud, et kinaas GHR1 on võimeline aktiveerima SLAC1-te (Hua jt., 2012). On võimalik, et GHR1 ei fosforüleeri SLAC1, vaid on võimeline seda aktiveerima läbi muu interaktsiooni (Sierla jt., avaldamata). Mitmed Ca^{2+} -sõltuvate proteiinkinaaside rühma liikmed (CPK 3, 6, 21, 23) on samuti võimelised SLAC1 valku aktiveerima, lisaks reguleerivad nad ka SLAH3 anioonkanali aktiivsust (Geiger jt., 2011; Brandt jt., 2012; Scherzer jt., 2012). *In vitro* fosforülatsioonikatsed ning kannuskonna ootsüütides läbi viidud ko-ekspressioonikatsed on viidanud mitmetele võimalikele fosforülatsiooni sihtmärkidele SLAC1 valgus. On näidatud, et OST1 on võimeline fosforüleerima SLAC1 valgu nii N- kui C-terminust (Lee jt., 2009). Samuti on leitud võimalikud fosforüleerimise sihtpunktid S59, S120 ja T513 (Geiger jt., 2009; Vahisalu jt., 2010; Maierhofer jt., 2014). *In vivo* ehk terves taimes on kinnitust leidnud vaid S120 olulisus: S120F mutandi (*slac1-7*) sulgumine vastusena osoonile on inhibeeritud (Vahisalu jt., 2010). Yamamoto jt (2016) lähenesid SLAC1 regulatsiooni küsimusele teisiti, luues mitte punktmutante, vaid mutante, millel puudus kas SLAC1 N- või C-terminaalne ots või mõlemad. Need valgud ekspresseeriti puuduliku SLAC1 funktsiooniga mutandi *slac1-4* taustas. Nende tulemused näitasid, et õhulõhede reaktsioon vastusena kõrgele CO_2 kontsentratsioonile taastub ka SLAC1 N- ja C-terminaalsete otsteta valgu taime sisestamisel. Seega sõltub taime CO_2 vastus vaid SLAC1 valgu transmembraansest osast. See valgu osa polnud aga piisav, et nende läbiviidud katses epidermise lõikudega taastada õhulõhede sulgumist ABA töötlusel.

1.5. Õhulõhe tööd mõjutavad keskkonnafaktorid

Õhulõhede reaktsiooni keskkonnale on uuritud juba 1940. aastatest kui CO_2 mõju õhulõhedele selgitas Bünning (Bünning, 1953). Detailsem molekulaarne mehhanism vastusena erinevatele keskkonnafaktoritele on siiski suures osas ebaselge. Veel pole teada kus signaliseerimine täpselt toimub, kas vahetult sulgrakkudes, või on mesofüllil rakud signaalide vahendajad sulgrakkudele (Fujita jt., 2013).

Järgnevalt on kirjeldatud käesolevas uurimistöös käsitletud keskkonnatingimuste mõju õhulõhedele.

1.5.1. Valguse ja pimedus

Valgus on peamine õhulõhede avanemist põhjustav stiimul (Taiz jt., 2014). Valguse põhjustatud õhulõhede avanemine algab aeglaselt, kuid saavutab maksimaalse kiiruse ca 25 minutit enne küllastust (H. Kollist jt., 2011). Eristatakse kaht õhulõhesid stimuleerivat rada:

PAR (fotosünteesiliselt aktiivne kiirgus) tekitatud sulgraku kloroplastide fotosünteesist tekkinud rada ning spetsiifiline sinise valguse rada (H. Kollist jt., 2014). Sinise valguse intensiivsuse muutust vahendavad fototropiinid PHOT1 ja PHOT2 (Inoue jt., 2008). Sinine valgus põhjustab kiire muutuse ainult taime sulgrakkudes, aktiveerides sulgraku plasmamembraanis H⁺-ATPaasi, mis indutseerib plasmamembraani hüperpolarisatsiooni, avades K⁺ sissevoolukanalid (Hayashi ja Kinoshita, 2011). Lisaks sellele stimuleerib sinine valgus tähtselt degradeerimist ja malaadi biosünteesi, mille tõttu kogunevad sulgraku osmootselt aktiivsed suhkrud, mis põhjustavad õhulõhede avanemist (Taiz jt., 2014). Kuigi vigase SLAC1 anioonkanaliga taimeliin avaneb PAR-i toimel sarnaselt metsiktüübiga, siis pimeduse vastusel on *slac1* mutantide sulgumine oluliselt häiritud (Vahisalu jt., 2008). Valdav osa taimedest, sealhulgas tavalised C₃- ja C₄-fotosünteesiga taimed, sulgevad öösel õhulõhed, et vähendada taime veekadu, kuna pimeduses fotosünteesi ei toimu ja seega süsihappegaasi ei vajata (Snyder jt., 2003; Caird jt., 2007). Erandiks on kõrbetingimustes kohastunud CAM taimed, kus ööpäevane õhulõhede tsükkel toimib vastupidiselt, tänu millele nad kokkuvõttes säästavad vett (Hartsock ja Nobel, 1976; Taiz jt., 2014).

1.5.2. Abstiishape

Abstiishape ehk ABA on taimehormoon, mis reguleerib erinevaid taime stressireaktsioone ja kasvu. Sulgrakus toimib terve ABA biosünteesi rada, mille aktiivsust reguleeritakse läbi positiivse tagasiside mehhanismi. Hariliku müürlooga sulgrakus ekspresseeritud geenidest on 1550 ABA poolt reguleeritud (Bauer jt., 2013). On näidatud, et ABA mängib olulist rolli taimede reageerimisel soola, kuivus- ja temperatuuristressile, sealhulgas aktiveerides õhulõhede sulgumist. Lisaks reguleerib ABA juurte ja võrsete kasvu, õitsemist ja reaktsiooni patogeenidele (Taiz jt., 2014). ABA indutseerib nii S-tüüpi kui ka R-tüüpi anioonkanalite aktiivsust (Roelfsema jt., 2004; H. Kollist jt., 2011). See tagab stressiolukorras õhulõhede sulgumise ABA retseptorkompleksi vahendusel, mis reguleerib erinevate ionikanalite ja pumpade koordineeritud inaktiveerumist/aktiveerumist ning ionide ja vee väljumist sulgrakkudest (Geiger jt., 2009; Ma jt., 2009; Park jt., 2009). ABA retseptorkompleks mängib olulist rolli ka õhulõhede sulgumisel teiste stiimulite toimel, nagu muutused süsihappegaasi, osooni ja õhuniiskuse kontsentratsioonid ja vastusena pimedusele (Merilo jt., 2013). ABA juuresolekul seovad RCAR/PYR/PYL perekonna valgud PP2C fosfataasid, muutes need inaktiivseks. Olukorras, kus ABA sisaldus on madal, on PP2C fosfataasid aktiivsed ja inhibeerivad anioonkanaleid aktiveerivaid kinaase. ABA juuresolekul on anioonkanaleid

aktiveerivad kinaasid aktiivsed ja fosforüleerivad anioonkanaleid ja algab õhulõhede sulgumine (Geiger jt., 2009). ABA tagab ka õhulõhede sulgumise põuaperioodil (Bauer jt., 2013).

1.5.3. Osoon

Osoon (O_3) on hapniku allotroopne vorm, koosnedes kolmest hapniku aatomist. Kõrgel stratosfääris moodustuv osoonikiht on kasulik, neelates suurema osa Päikeselt tulevast UV-kiirgusest. Kuna elusorganismides moodustab osoon reaktiivseid hapnikuühendeid (ROS), siis maalähedases õhukihis, troposfääris, on tal kahjulik mõju (Kangasjärvi jt., 2005; Vahisalu jt., 2008). Kõrged O_3 kogused põhjustavad nähtavaid kahjustusi taimedel ning pärsivad nende kasvu (Alexander jt 1985). Lisaks sellele võib kõrgem osooni tase vähendada fotosünteesi ja transpiratsiooni (Hill ja Littlefield, 1969). Osoonitöötlus alates kontsentratsioonist 150 ppb põhjustab lühiajalise pöörduva õhulõhede sulgumise (T. Kollist jt., 2007). On näidatud, et osoon ja ROS mõjutavad ka ABA signalisatsioonirada õhulõhedes ning et osooni põhjustatud õhulõhede sulgumise toimumiseks on vajalikud OST1 ja SLAC1 valgud (Trouverie jt., 2008; Vahisalu jt., 2010; McAdam jt., 2017).

1.5.4. Süsihappegaas

Süsihappegaas (CO_2) on süsiniku stabiilseim oksiid. Taimed, vetikad ja tsüanobakterid seovad süsihappegaasi fotosünteesi käigus orgaaniliseks aineks. Juba 1930-ndatel aastatel veenduti, et [CO_2] (CO_2 kontsentratsiooni) vähendamine põhjustab kanna (*Canna*) õhulõhede avanemist ning [CO_2] tõstmine kutsub esile õhulõhede sulgumise (Freudenberger, 1940). CO_2 kontsentratsiooni suurenemine atmosfääris põhjustab paljude taimeliikide puhul lehtedesse siseneva CO_2 hulga suurenemist, samas vähendades õhulõhede avatust ning gaasivahetust (Field jt., 1995; Medlyn jt., 2011). SLAC1 on vajalik õhulõhede sulgumisel kõrge [CO_2] korral (Negi jt., 2008; Vahisalu jt., 2008). Kuigi täpseid molekulaarseid mehhanisme, kuidas CO_2 õhulõhedesse siseneb ning rakus ära tuntakse, pole teada, on näidatud, et kõrge CO_2 taseme varases signalisatsioonis on olulised süsihappe anhüdraasid (Hu jt., 2010). CO_2 signalisatsioonis on oluline roll kinaasil HT1 (Hashimoto jt., 2006; Hõrak jt., 2016) ning selle regulaatorvalkudel MPK4 ja MPK12 (Hõrak jt., 2016; Jakobson jt., 2016). Lisaks osalevad mitmed ABA signaaliraja valgud CO_2 vastuses (Merilo jt., 2013). Süsihappegaasi osarõhu tõus põhjustab järjekindlat ainult S-tüüpi kanali aktivatsiooni (Raschke jt., 2003).

1.5.5. Madal õhuniiskus

Madal suhteline õhuniiskus (RH) viitab põuaolukorrale ja põhjustab õhulõhede sulgumise (Schulze jt., 1987). Seetõttu reageerivad õhulõhed suhteliselt kiiresti õhuniiskuse alandamisele

(Kwak jt., 2008; Bauer jt., 2013). Samas, kiirel õhuniiskuse languse korral tekib alguses vastupidine efekt – Ivanovi efekt. See tähendab, et välise madala õhuniiskuse tõttu jõuab seni avatud õhulõhedest palju vett väljuda ja see põhjustab sulgrakku ümbritsevate rakkudes kiire veekao ja kokkutõmbumise, mis alandab nende rakkude survet õhulõhedele ja põhjustab õhulõhede avanemist esimeste minutite jooksul (Raschke, 1970). Õhulõhede sulgumine madala RH puhul on reguleeritud ABA vahendusel. Seevastu kõrge õhuniiskuse käes kasvades on taimede õhulõhed suurema avatusega ja häiritud talitlusega, mistõttu ei suuda madala õhuniiskuse korral piisavalt sulguda (Arve jt., 2011). Kõrges õhuniiskuses (92%) kasvanud hariliku müürlooga taimedel on madalam ABA sisaldus, võrreldes standardõhuniiskuses (60%) kasvanud taimedega (Arve jt., 2015). Sellele vaatamata ei ole seniajani teada, kuidas taimed tunnetavad õhuniiskuse langust ja lülitavad seejärel sisse signaalirajad.

EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

On teada, et SLAC1 anioonkanal on õhulõhede sulgumises keskse tähtsusega (Negi jt., 2008; Vahisalu jt., 2008). SLAC1 aktiveerivad erinevad kinaasid, sh. OST1, GHR1 ja mitmed CPK kinaasid (Geiger jt., 2009; Lee jt., 2009; Vahisalu jt., 2010; Brandt jt., 2012; Hua jt., 2012; Maierhofer jt., 2014). Erinevates piirkondades on leitud mitmeid aminohappeid, mida fosforüleerivad erinevad proteiin kinaasid, enamus neist katsetest on tehtud aga katsesüsteemides väljaspool taime. Samuti pole teada, millised SLAC1 valgu piirkonnad ja fosforülatsiooni märklauad on olulised erinevate keskkonnastiimulite poolt aktiveeritud signaaliradade puhul.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on välja selgitada, millised SLAC1 valgu piirkonnad on vajalikud erinevate keskkonnastiimulite poolt tekitatud õhulõhede sulgumises. Selleks uuritakse müürlooga, *Arabidopsis thaliana* mutante, milles *slac1-4* mutandi tausta on agrobakteri vahendusel transformeeritud erinevad versioonid SLAC1 valgust; neil versioonidel on puudu kas C- või N-terminaalne tsütoplasmas olev piirkond või mõlemad valgu tsütoplasmas olevad mittemembraansed otsad (Yamamoto jt., 2016). Antud töös uuriti nende mutantide õhulõhede reaktsiooni õhuniiskuse vähendamisele, abstsiihappega pritsimisele, pimedusele ning CO₂ ja osooni kontsentratsiooni tõusule.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Müürlook katseobjektina

Müürlook, *Arabidopsis thaliana*, on kaheiduleheline õistaim. Ta on kasvult väike ja iseviljastuv diploidne taim, mille viljudes valmib tuhandeid seemneid taime kohta. Taime elutsükkel on võrdlemisi lühike, ~8 nädalat. Ta on teadaolevalt üks vähima genoomi suurusega katteseemnetaim. Hariliku müürlooga genoom on sekveneeritud ning see on senini kõige paremini annoteeritud taimegenoomi järjestus (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; Rhee ja Mutwil, 2014). Seega on tegu väga hea mudelorganismiga, mis on teaduses laialdaselt kasutatud (Somerville ja Koornneef, 2002). Käesolevas töös uuritavad taimed olid hariliku müürlooga laboratoorse metsiktüübi Col-0 mutandid.

2.2.2. Gaasivahetuskamber

Vajalikud gaasivahetuse mõõtmised viidi läbi (T. Kollist jt., 2007) väljatöötatud meetodika alusel spetsiaalses gaasivahetussüsteemis. Süsteem sobib hästi 3-22 cm² lehepindalaga müürlooga taimede mõõtmiseks. Masinal on 8 kambrit 8 taime mõõtmiseks ja gaasivahetuse

andmeid saab koguda iga taime kohta 2 kuni 16 minuti tagant, sõltuvalt katses olevate taimede arvust. Gaasivahetussüsteem mõõdab esimese minuti jooksul läbivoolu põhimõttel CO₂, veeauru ja osooni kontsentratsioonid mõõdetavasse kambris sisenevas ning teise minuti jooksul sellest väljuvas õhus. Mõõtekambris saab reguleerida valgustatust ning sisenevas õhus süsihappegaasi ja osooni kontsentratsiooni, suhtelist õhuniiskust ja temperatuuri. Katsetes reguleeriti erinevaid keskkonnafaktoreid ning kambris siseneva ja väljuva õhu koostise erinevuse järgi arvatati õhulõhede juhtivused. Õhulõhede juhtivuse määramisel võeti arvesse ka taimede lehepindala.

Enne stiimulite rakendamist lasti taimedel mõõteküvettides stabiliseeruda ~60-70% suhtelise õhuniiskuse, 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ valgusintensiivsuse ja ~400 ppm CO₂. Kui õhulõhede juhtivus saavutas stabiilsuse, rakendati vastav stiimul ja jätkati taime mõõtmist järgneva 32-48 minuti jooksul.



Joonis 3. Fotod katsetest

(a) Spetsiaalne Jyrkki pott taimede kasvatamiseks gaasivahetuskambri jaoks, koos pindala mõõtmiseks millimeeterpaberiga (b) Gaasivahetuskambri pimeduse rakendamine

2.2.3. Katsetaimede kasvatamine

Seemneid hoiti ühtlasema idanemise eesmärgil destilleeritud vees 4°C juures pimedas, et üle saada puhkefaasist ja sünkroniseerida idanemist. Taimi kasvatati spetsiaalsetes (T. Kollist jt., 2007) gaasivahetuse mõõtmise katseaparatuurile mõeldud Jyrkki pottides (Joonis 3 a). Selleks täideti nelinurksed plastikust potid 250 grammi kasvusubstraadiga nii, et moodustus kungas keskele. Kasvusubstraadi koostis oli mahu järgi vahekorras 4:2:3 turvas:vermikuliit:vesi. Pott kaeti ruudukujulise klaasplaadiga (10 x 10 cm, 0,25 cm paks), mille keskpunktis oli 3 mm läbimõõduga koonusekujuline auk. Plaat asetati potile lõigatud sälkudesse poti suhtes 45° nurgaga, et tagada mulla gaasivahetus. Klaas oli õrnalt surutud vastu mullaküngast, nii et

kasvustraadiga kokkupuutepindala on umbes 10-15 cm². Seemned külvati automaatpipetiga läbi klaasi ava substraadile, kuni 5 seemet ühte potti.

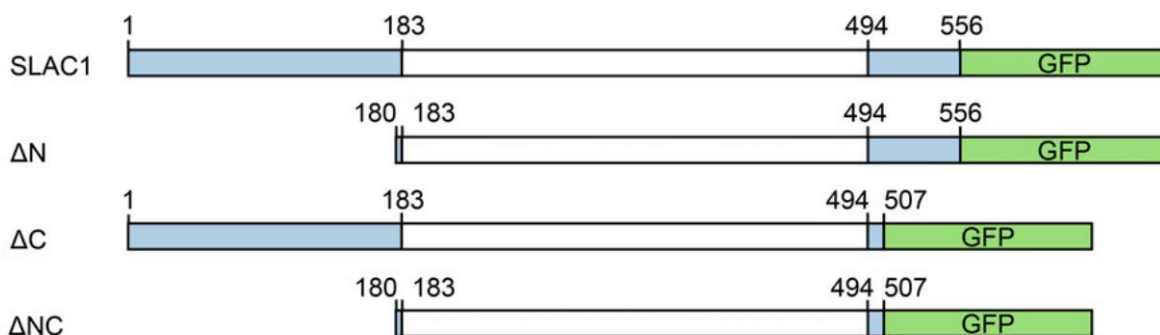
Seemnete idanemiseks piisava niiskuse tagamiseks kaeti külv Petri tassiga. Petri tass eemaldati umbes nädal pärast idulehtede tekkimist. Juhul, kui mõnes potis ei läinud ükski seeme idanema, tõsteti sinna võimaluse korral taim pintsettide abil teisest potist. Seejärel toimus taimede harvendamine nii, et igasse potti jäi kasvama ainult üks taim.

Esimese nädala kasvasid katsetaimed taimekasvuruumis, kus ööpäeva režiim oli 12:12 päev:öö. Päevasel ajal oli temperatuur ca 23°C, suhteline õhuniiskus 30-40%. Seejärel viidi taimed üle JUMO IMAGO 500 kontrolleri Snijders kasvukambrisse, kus suhteline õhuniiskus oli 70%. Kambris oli valgust 12 tundi alates kella kaheksast hommikul ja pimedust 12 tundi alates kella kaheksast õhtul. PPFD oli ~100-150 μmol m⁻² s⁻¹. Päeval oli temperatuur 23°C ja öösel 19°C. Taimi kasteti veega kord nädalas altpoolt, tõstes poti kaalu 330 grammini.

2.3. Kasutatud taimed

Kõik kasutatud liinid on Columbia ökotüübi taustas (Col-0). T-DNA mutandi *slac1-4* seemned saadi Salk T-DNA kollektsioonist ning *slac1-4/ΔN* #2, *slac1-4/ΔN* #3, *slac1-4/ΔC* #2, *slac1-4/ΔC* #3, *slac1-4/ΔNC* #5 ja *slac1-4/ΔNC* #7 Kyushu Ülikooli loodusteaduste teaduskonna bioloogia osakonnast prof. Koh Iba tööruhmalt. Eelnimetatud mutandid on töös tähistatud edaspidi vastavalt N2, N3, C2, C3, NC5 ja NC7. Joonisel 4 on võrdluseks täispikk SLAC1 valk ja selle lühendatud variandid. SLAC1 terminaalse otste rolli määramiseks mõõdeti metsiktüüpi Columbia, SLAC1 valgu nullmutanti *slac1-4* ning *slac1-4* taustas kolme erineva SLAC1 ioonkanali mutatsiooniga taimi (tabel 1).

Kokku mõõdeti uurimuses 99 *Arabidopsis thaliana* taime õhulõhede juhtivust (tabel 1): 21 Col-0, 12 *slac1-4*, 13 N2, 13 N3, 13 C2, 2 C3, 12 NC5 ja 13 NC7 taime.



Joonis 4. SLAC1 ΔN, ΔC ja ΔNC järjestused (Yamamoto jt., 2016).

Tabel 1. Uuringus kasutatud *Arabidopsis thaliana* mutandid.

Nimi	Mutatsioon	Liinid	Taimede arv
Col-0	-		21
<i>slac1-4</i>	T-DNA insertioon <i>SLAC1</i> geeni esimeses eksonis.		12
<i>slac1-4</i> ΔC	<i>slac1-4</i> mutant, milles on ekspresseeritud C-terminaalse otsata SLAC1 valk	2	13
<i>slac1-4</i> ΔN	<i>slac1-4</i> mutant, milles on ekspresseeritud N-terminaalse otsata SLAC1 valk.	2 ja 5	26 – 13 N2, 13 N3
<i>slac1-4</i> ΔNC	<i>slac1-4</i> mutant milles on ekspresseeritud N- ja C-terminaalse otsata SLAC1 valk.	5 ja 7	25 – 12 NC5, 13 NC7

2.3.1. Gaasivahetuse mõõtmine katsetaimedel

Mõõtmised toimusid 2017. aasta jaanuaris ja aprillis. Katsetes mõõdeti taimi lehepindaladega 4-28 cm². Jaanuaris ei idanenud *slac1-4* mutandid teistega samal ajal ning seetõttu lisati hiljem uuesti seemneid mulda, mistõttu selle liini taimed olid mõõtmise ajal väiksemad. Jaanuaris ei läinud teadmata põhjustel ükski taim C3 liinist idanema. Aprillis pandi C3 liinist ~30 seemet agarsöötmele kasvuplaadile, et pakkuda idanemiseks võimalikult soodsaid tingimusi. Neist seemnetest läks vaid 4 idanema, nädala möödudes istutati need mulda ümber. Ainult 2 taimet C3 liinist elasid ümberistutamise üle. Kuna neid jäi nii vähe, et mõõdetud andmed ei võimaldanud statistilist analüüsi, siis jäeti C3 tulemused lõplikust andmeanalüüsist välja.

Mõõtmisüsteemi hermeetilisuse tagamiseks kaeti auk, millest taim läbi plaadi kasvas, vahaga hiljemalt üks päev enne gaasivahetuskatseid. Vaha saamiseks segati 100 g vaseliini, 5 g mesilasvaha, 5 g parafiini ning kuumutati mikrolaineahjus segu ühtlustumiseni ja lasti jahtuda. Hermeetilisust testiti alarõhu pumbaga. Vahetult enne gaasivahetussüsteemi asetamist tehti fotoaparaadiga Sony Cyber-Shot DSC-RX100 igast taimest foto koos millimeeterpaberiga

(10 x 30 mm). Tehtud fotodelt mõõdeti arvutis taimede lehepindalad ImageJ versiooni 1.51j8 polügon tööriistaga (*polygon*).

Gaasivahetuskambris kohanesid taimed keskkonnaga vähemalt 1 tund, et õhulõhede juhtivus stabiliseeruks. Kui õhulõhede juhtivus oli kõigil taimedel neljal või kolmel järjestikusel mõõtmisel suhteliselt muutumatu, rakendati üks keskkonnatingimuse muutus.

2.3.2. Rakendatavad stiimulid

2.3.2.1. Reaktsioon süsihappegaasile

Antud katses oli gaasivahetussüsteemis korraga 4 taime, mida mõõdeti üksteise järel. Tavapärastes tingimustes mõõdeti taimi kuni kõigi juhtivus oli stabiilne 30 minuti vältel. Seejärel tõsteti igal taimel referentsi mõõtmise alguses CO₂ kontsentratsioon 800 ppm-ni. Väljast võetavas õhus oli CO₂ kontsentratsioon ca 400 ppm. Seejärel mõõdeti õhulõhede juhtivust kõrgel CO₂ kontsentratsioonil 42 minutit. Katset korrati igast liinist 4-6 taimega.

2.3.2.2. Reaktsioon pimedusele

Antud katses oli gaasivahetussüsteemis korraga 4 taime, mida järjest mõõdeti. Tavapärastes tingimustes mõõdeti taimi kuni kõigi juhtivus oli stabiilne 24 minuti vältel. Seejärel, vahetult pärast iga taime mõõtmist kaeti kamber, takistamaks valguse jõudmist taimeni ning mõõdeti pimedas õhulõhede juhtivust veel 48 minutit. Katset korrati igast liinist 8-11 taimega.

2.3.2.3. Reaktsioon madalale õhuniiskusele

Antud katses oli gaasivahetussüsteemis mõõtmises korraga 3 taime, mida järjest mõõdeti. Madala suhtelise õhuniiskuse saamiseks kasutati lihtsat termostaati, milles õhuvool juhiti läbi jääkambril läbiva spiraalse toru. Tavapärastes tingimustes mõõdeti taimi, kuni kõigi juhtivus oli stabiilne, 16 minuti vältel. Seejärel suunati ühe kambri referentsi mõõtmise ajal sissevõetav õhk läbi eelmainitud termostaadi, langetades nii suhtelise õhuniiskuse 25-40%-ni. Kuna õhuniiskus langes kõikides kambrites korraga, siis iga kambri mõõtmisel saadi stiimuli algusest erinevad ajad. Näiteks kambri, mille referentsi ajal lülitati madal õhuniiskus sisse, mõõdeti esimene katsepunkt 2 minutit, järgneval kambri 4 minutit ja viimasel kambri 6 minutit pärast stiimuli rakendamist. Keskmise tulemuse arvestamiseks loeti iga taime esimeseks

katsepunktiks 4 minuti ajapunkt. Madala õhuniiskuse käes mõõdeti õhulõhede juhtivust 32 minutit. Katset korrati igast liinist 6-9 taimega.

2.3.2.4. Reaktsioon abstsiihappele

Antud katses oli gaasivahetussüsteemis mõõtmises korraga 4 taime, mida järjest mõõdeti. Taimi mõõdeti tavapärastes tingimustes, kuni kõigi juhtivus oli stabiilne 24 minuti vältel. Seejärel võeti taim kambrist välja ning pihustati neli korda, kord iga külje alt ABA lahusega, kuivatati klaaspind taime ümber ning asetati tagasi kambrisse. Vesilahuses sisaldus 5 µM ABA (Sigma-Aldrich, A1049), 0.012% Silwet L-77 (Duchefa) ja 0.05% etanool (kasutati ABA lahustamiseks). Edasi mõõdeti 48 minuti jooksul pärast stiimuli rakendamist taime õhulõhede juhtivust. Katset korrati igast liinist 7-8 taimega.

2.3.2.5. Reaktsioon osoonile

Antud katses oli gaasivahetussüsteemis mõõtmises korraga 3 taime, mida järjest mõõdeti. Tavapärastes tingimustes mõõdeti taimi kuni kõigi juhtivus oli stabiilne 15 minuti vältel. Seejärel üks minut enne taime järgmise katsepunkti referentsi mõõtmise algust osoneeriti antud taime 3 minuti jooksul 400-450 ppb osooniga. Osooni tekitamiseks kasutati balloonihapnikku, mis juhiti läbi kaarlahendusega osoonigeneraatorist. Väljast võetavas õhus oli O₃ kontsentratsioon ca 20 ppb. Seejärel mõõdeti tunni jooksul taime õhulõhede reaktsiooni osoneerimisele ja sellest taastumist. Katset korrati igast liinist 7-9 taimega.

2.3.3. Andmeanalüüs

Käesoleva töö katsete tulemusi analüüsiti eesmärgiga vastata küsimusele, kas uuritavate mutandiliinide reaktsioonid erinevad statistiliselt metsiktüübist või *slac1-4* nullmutandist. Gaasivahetuskambri mõõtmistelt saadud katseandmete esmane analüüs ning graafikute koostamine toimus programmiga Microsoft Excel (16.0.4366.1000). Statistiline analüüs viidi läbi STATISTICA (7.1) programmiga.

Esmalt keskmistati sama stiimuli sama mutandi liinide tulemused ning võrreldi neid teiste liinidega samal stiimulil. Lisaks leiti katsetulemuste standardviga, hindamaks, kui sarnane on katsetes kasutatud taime keskmine liinide keskmistele. Graafikutelt oli võimalik hinnata erinevate liinide juhtivuse langemise määra.

Õhulõhede juhtivuse tavaoleku väärtuse leidmiseks arvutati kõigi liinide kõigi mõõtmiste keskmine õhulõhede juhtivus enne stiimulit. Kui ühte taime oli mõõdetud mitmel korral, siis võeti kõigepealt selle taime keskmine läbi kõigi temaga tehtud mõõtmiste. Seejärel leiti kõigi

taimede keskmiste juhtivuse keskmine ja selle standardviga. Seejärel kasutati ühefaktorilist ANOVA testi erinevate liinide õhulõhede juhtivuste grupeerimiseks. See näitas, kas õhulõhede avatus on metsiktüübil ja mutantidel statistiliselt erinev.

Korduvmõõtmiste (*repeated-measures*) ANOVA analüüsiga uuriti, kas õhulõhede juhtivuse erinevus enne ja pärast stiimulit oli statistiliselt oluline. Selleks kõrnutati õhulõhede keskmine juhtivus enne ja x minutil pärast stiimuli rakendamist, kus x sõltub mõõdetavast stiimulist.

Veel viidi läbi ühefaktoriline ANOVA test, kus muutujaks oli õhulõhede juhtivuse suhteline muut reaktsiooni alguses. Selle leidmiseks jagati reaktsiooni ulatus õhulõhede juhtivusega tavaolekus. Reaktsiooni ulatuse leidmiseks valiti esimene ajapunkt, mil Col-0 juhtivus jõudis stabiilsete väärtusteni ning lahutati see õhulõhede juhtivusest tavaolekus. Lisaks analüüsiti õhulõhede juhtivuse suhtelist muutu ka kogu katses mõõdetud aja jooksul. Reaktsiooni ulatuse leidmiseks valiti selle jaoks enamasti katse viimase ajapunkti õhulõhede juhtivus, mis lahutati algsest juhtivusest; tulemus jagati õhulõhede algse juhtivusega. Erandiks olid osooni katsed, kus stiimulit rakendati lühiajaliselt ning esialgsele sulgumisreaktsioonile järgneb avanemine. Seetõttu valiti ajapunkt, kus Col-0 taimedel esineb selge juhtivuse miinimum, milleks oli 9. minut pärast osooni manustamist. Analüüs jagab juhtivuse suhtelise muudu järgi liinid rühmadesse, mis näitab, milliste liinide reaktsioon oli statistiliselt sarnane ja millistel erinev.

Kõigis statistilistes analüüsides loeti olulisuse määraks $p=0,05$.

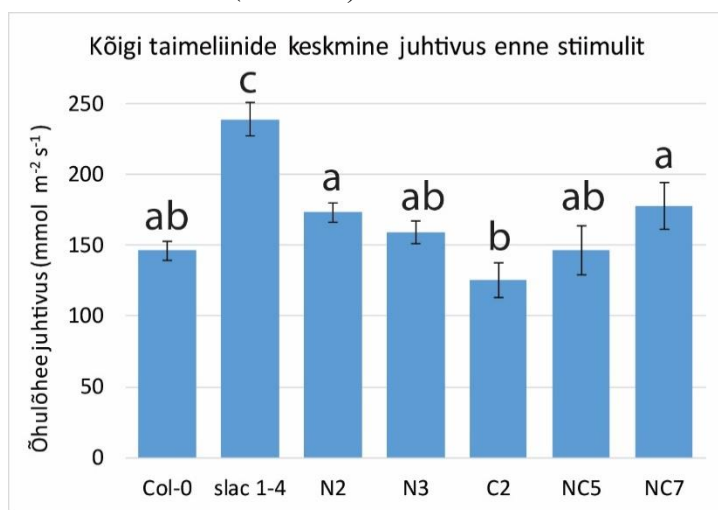
2.4. Tulemused

Katsetes mõõdeti taimede õhulõhede juhtivust enne ja pärast erinevate stiimulite rakendamist. Stiimuliteks valiti pimedus, CO₂, madal õhuniiskus, O₃ ja ABA. Katsetes kasutati hariliku müürlooga metsiktüüpi Col-0 ning erinevaid mutante: SLAC1 valgu nullmutanti (*slac1-4*) ja kolme erineva SLAC1 mutatsiooniga mutantide liine. Saadud tulemused võimaldavad hinnata mutatsioonide ja stiimulite omavahelist mõju õhulõhede avatusele, reaktsioonivõimele ja -kiirusele.

Kui mutant reageeris stiimulile nagu kontrolltaim, siis õhulõhede reguleerimisel vastusena sellele stiimulile mängib olulist rolli ainult transmembranne, mitte aga eemaldatud SLAC1 tsütosoolsed osad. Kui uuritav mutant käitus nagu nullmutant, siis on õhulõhede regulatsioon SLAC1 valgu poolt halvatud ehk ärälõigatud terminused on vajalikud antud stiimuli tekitatud õhulõhede regulatsioonil.

2.4.1. Õhulõhede juhtivus

Uurimaks reaktsioone stiimulitele peab võrdlusele arvestama õhulõhede juhtivust enne stiimulit. Ainult stabiilseid juhtivusi analüüsides selgus, et nullmutandi õhulõhed on kõigist teistest oluliselt avatumad (Joonis 5). Teised liinid olid kõik üksteisega sarnase juhtivusega.

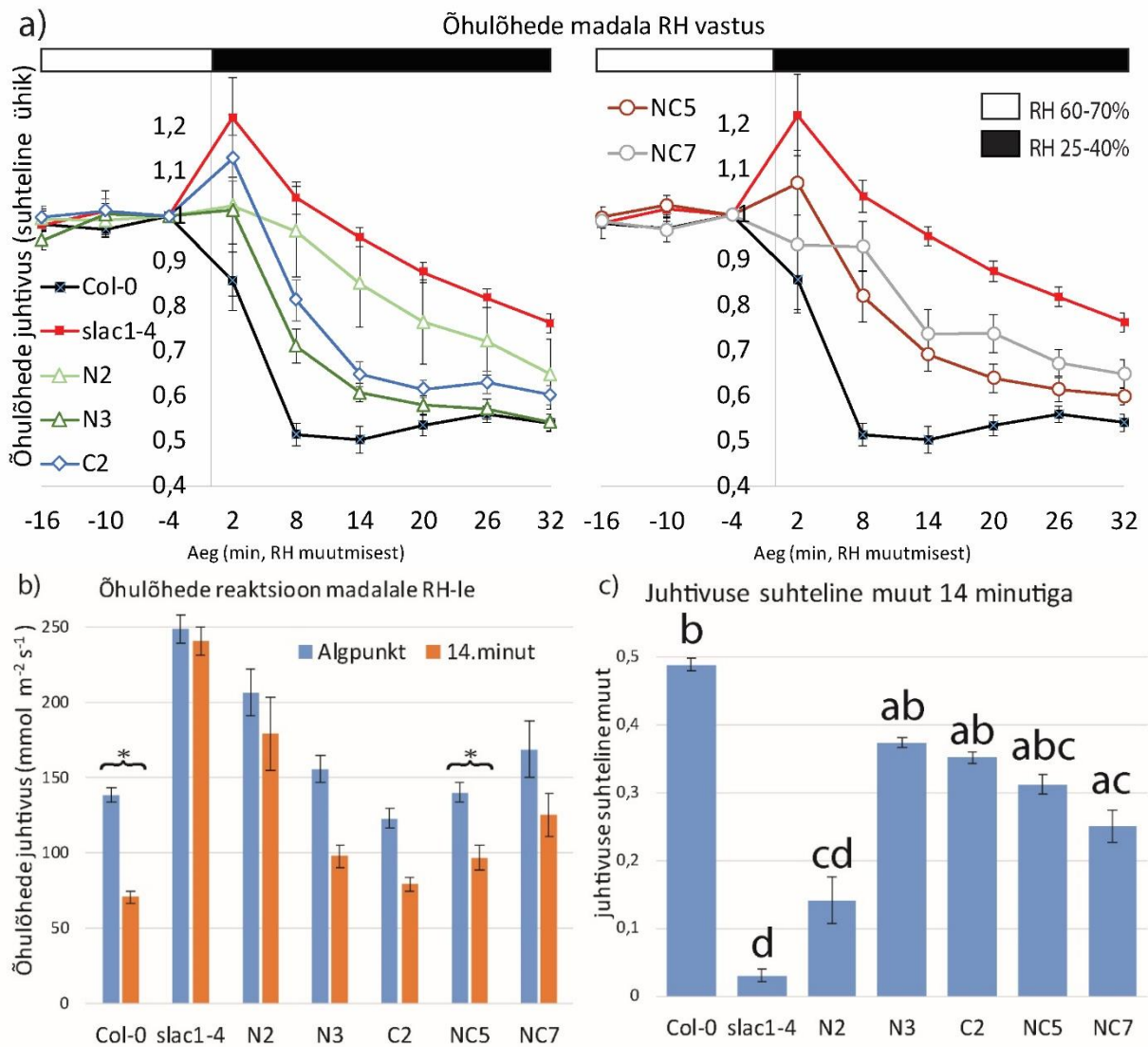


Joonis 5. Õhulõhede juhtivus tavaolekus, enne stiimulit.

Keskliste juhtivuste arvutamisel võeti kõigi taimede kõigi katsete stiimulieelse keskmiste juhtivuste keskmine. Ühefaktoriline ANOVA jagas taimed kolme statistiliselt oluliselt erinevase rühma, mis on joonisel tulba kohale märgitud.

2.4.2. Õhulõhede sulgumine madala suhtelise õhuniiskuse toimel

Katse käigus uuriti, kuidas kiire suhteline õhuniiskuse langemine mõjutab mutantide õhulõhede juhtivust. Õhuniiskus langetati ajahetkel 0 katses kaks korda madalamaks, ehk umbes 60-70



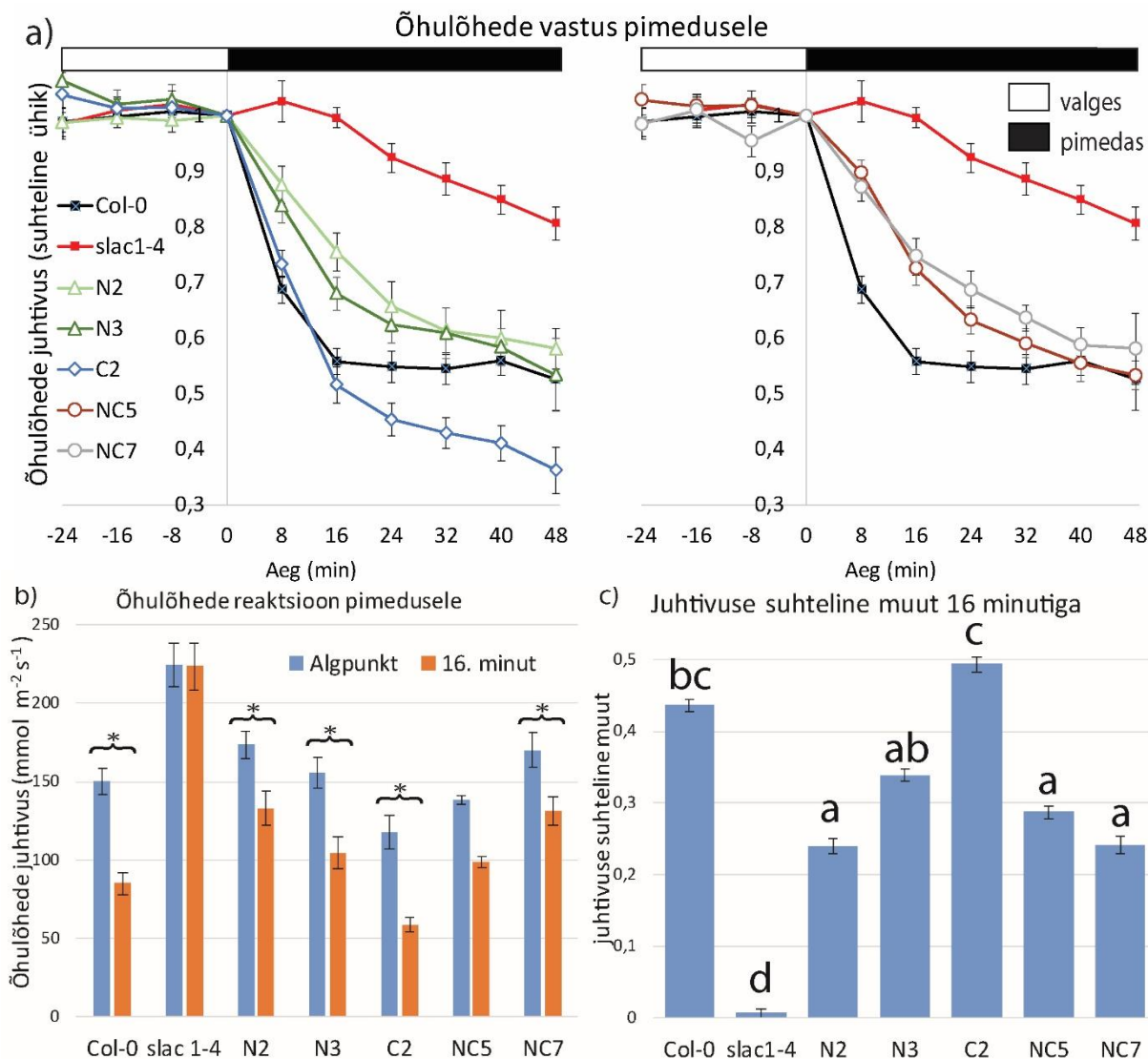
Joonis 6. Õhulõhede reaktsioon madala suhtelise õhuniiskuse toimel.

(a) Madala õhuniiskuse katse õhulõhede suhtelise juhtivuse muut. Selgema ülevaate saamiseks on N ja C liinid koos kontrollidega eraldi graafikul NC liinidest. (b) Õhulõhede juhtivused enne stiimulit ja pärast 14 minutit. Ära on märgitud kordumõõtmiste ANOVA tulemusel saadud statistiliselt olulised erinevused. (c) Õhulõhede juhtivuse suhteline muut ajahetkeks 14. Eri liinidele on märgitud ühefaktorilise ANOVA järgi grupeerumised.

protsendilt 25-40 protsendini. Õhuniiskuse vähenedes kõigepealt õhulõhede juhtivus suurenes Ivanovi efekti tõttu, seejärel õhulõhede juhtivusus hakkas õhulõhede juhtivus vähenema.

Edasi võrreldi liinide õhulõhede juhtivust enne ja pärast stiimulit ning metsiktüüpi taime ning erinevate mutantide reaktsiooni määra. Katse tulemused näitasid, et metsiktüüpi taimel toimub õhuniiskuse alandamisel õhulõhede sulgumine kiiremini kui mutantidel (Joonis 6 a). Kordumõõtmistega ANOVA näitas vaid Col-0 ja NC5 liinidel statistiliselt olulist muutust õhulõhede juhtivuses enne ja 14 minutit pärast stiimuli rakendamist (Joonis 6 b). Õhulõhede sulgumine oli kõige aeglasem *slac1-4* mutandil. Metsiktüüp saavutas maksimaalse suletuse

plato (~55% esialgsest juhtivusest) 14. katseminutil, seevastu kõigil mutantidel toimus sulgumine ka veel 32. katseminutil. Lisaks sellele täheldati, et maksimaalne sulgumise määr oli suurim metsiktüübil ning vähim nullmutandil (Joonis 6 a). Õhulõhede juhtivuse suhtelise muudu ühefaktorilise ANOVA analüüsi abil moodustus 4 gruppi: {Col-0, N3, C2, NC5, NC7}, {N3, C2, NC5, NC7}, {N2, NC5, NC7} ja {*slac1-4*, N2}.



Joonis 7. Õhulõhede reaktsioon pimeduse toimel

(a) Pimeduse katses õhulõhede suhtelise juhtivuse muut ajas. Selgema ülevaate saamiseks on N ja C liinid koos kontrollidega eraldi graafikul NC liinidest. (b) Õhulõhede juhtivused enne valguse katmist ja 16 minutit hiljem. Ära on märgitud kordumõõtmistega ANOVA tulemusel saadud statistiliselt olulised erinevused. (c) Õhulõhede juhtivuse suhteline muut ajahetkeks 14 min. Eri liinidele on märgitud ühefaktorilise ANOVA-ga leitud statistiliselt oluliselt erinevad grupid.

2.4.3. Õhulõhede sulgumine pimeduse toimel

Katses uuriti pimeduse mõju taimede õhulõhede reaktsioonile. Mõõtekamber kaeti (Joonis 3 b) ajahetkel 0 ning pimedus põhjustas õhulõhede osalise sulgumise.

Liinide võrdlus korduvmõõtmistega ANOVA abil kinnitas, et 40 minuti jooksul toimus kõigil liinidel statistiliselt oluline muutus õhulõhede juhtivuses (lisa Joonis 11). Õhulõhede juhtivuse suhtelise muudu järgi oli *slac1-4* ainus liin, millel ei täheldatud õhulõhede sulgumist 16 minuti jooksul (Joonis 7 b). Katse tulemused näitasid, et metsiktüüpi taimel toimub õhulõhede sulgemine pimeduse toimel kõige kiiremini ning liin saavutas madalaima juhtivuse platoo (50% esialgsest) esimese 16 minutiga. Kõige aeglasem oli reageering niiskuse muutusele *slac1-4* mutandis: liin saavutas juhtivuse muudu miinimumi (20%) 48 minutil. Lisaks sellele täheldati, et metsiktüübi õhulõhede sulgumise suhteline muutus oli mõnevõrra suurem kui enamikel mutantidel (Joonis 7 c). Mutant C2 sulgumise kiirus oli enam-vähem võrdne metsiktüübi õhulõhede sulgumise kiirusega, kuid ta õhulõhede sulgumine jätkus ka pärast 16. minutit. Seega katse lõpuks olid C2 taimed reageerinud rohkem kui metsiktüüp. 16 minutiga saavutatud õhulõhede juhtivuse suhtelise muudu analüüs ühefaktorilise ANOVA-ga näitas, et mutandid jagunesid nelja gruppi – {Col-0, C2}, {N2, N3, NC5 ja NC7}, {Col-0, N3} ning neljandaks {*slac1-4*}.

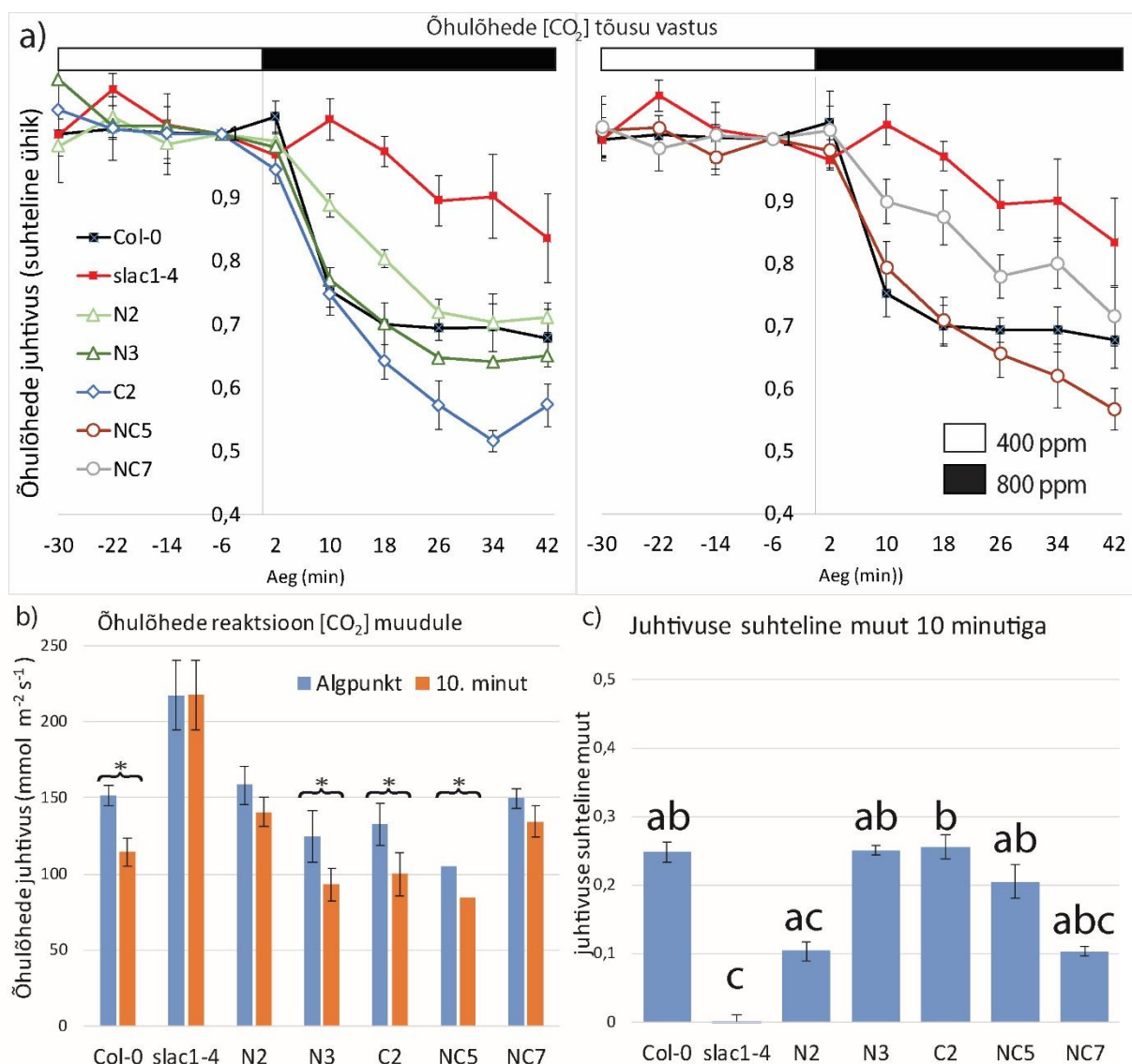
2.4.4. Õhulõhede sulgumine süsihappegaasi toimel

Katses uuriti CO₂ kontsentratsiooni mõju taimede õhulõhede juhtivusele. Katse käigus viidi läbi CO₂ kontsentratsiooni kahekordistamine (400 ppm → 800 ppm) ajapunktis 0. Süsihappegaasi toimel peaksid õhulõhed sulguma, mida katsetega ka täheldati.

Seejärel võrreldi metsiku taime ning mutantide reageeringute erisusi. Kuigi algpunkti ja viimase katsepunkti võrdlemiseks tehtud korduvmõõtmiste ANOVA tulemused näitasid, et kõigi liini juhtivus vähenes süsihappegaasi toimel (lisa joonis 12 a), siis oli näha, et Col-0 juhtivuse ja teise, 10 minuti ajapunkti võrdluseks läbi viidud korduvmõõtmiste ANOVA näitas, et *slac1-4*, N2 ja NC5 ei sulgunud olulisel määral. Sellal kui Col-0 saavutas madalaima platoo 18-ndal minutil, jätkus veel kõigi mutantide sulgumisreaktsioon.

Ühefaktorilise ANOVA testiga 10 katseminutil toimunud õhulõhede suhtelise muudu kohta tekkis kolm statistiliselt oluliselt erinevat gruppi: {Col-0, N2, N3, NC5, NC7}, {Col-0, N3, C2, NC5, NC7} ja {*slac1-4*, N2, NC7}(Joonis 8 c). Ühefaktorilise ANOVA testiga kogu

reaktsiooni suhtelise muudu kohta (42 katseminutil) tekkis kaks gruppi: {Col-0, N2, N3, C2, NC5, NC7} ja {Col-0, *slac1-4*, N2,N3, NC7}(lisa joonis 12 b).



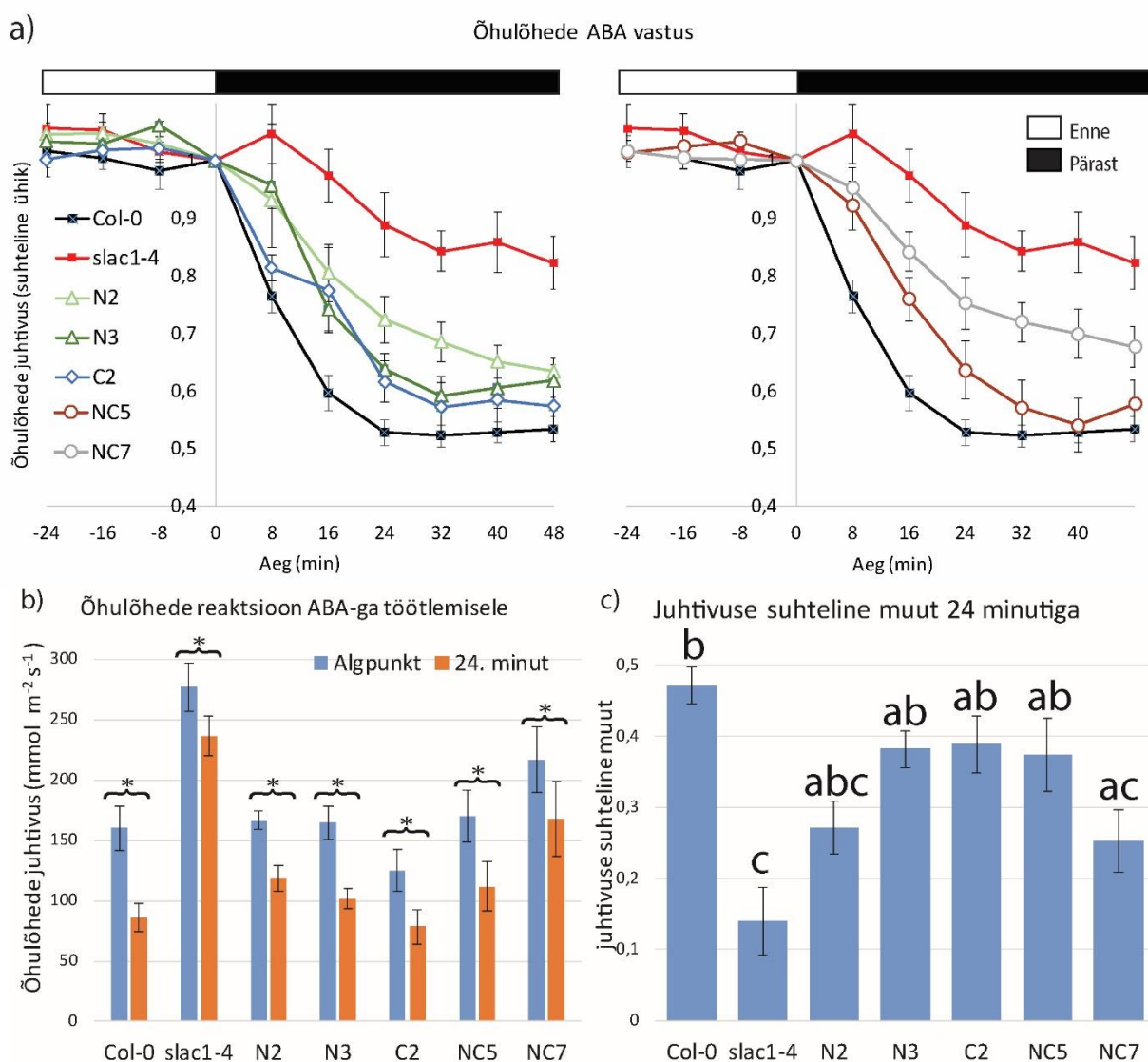
Joonis 8. Õhulõhede reaktsioon süsihappegaasile

(a) Süsihappegaasi katses õhulõhede suhtelise juhtivuse muut ajas. Selgema ülevaate saamiseks on N ja C liinid koos kontrollidega eraldi graafikul NC liinidest. (b) Õhulõhede juhtivused enne süsihappegaasi kontsentratsiooni tõstmist ja 10 minutit hiljem. Ära on märgitud korduvmõõtmistega ANOVA tulemusel saadud statistiliselt olulised erinevused. (c) Õhulõhede juhtivuse suhteline muut 10 minuti jooksul. Eri liinidele on märgitud ühefaktorilise ANOVA järgi grupeerumised.

2.4.5. Õhulõhede sulgumine ABA toimel

Katses uuriti ABA mõju taimede õhulõhede reaktsioonile. Katses pihustati taimedele ABA lahust ning registreeriti, kuidas õhulõhed sellele reageerivad. ABA toimel peaksid õhulõhed sulguma. Katsete käigust just sellist protsessi täheldati.

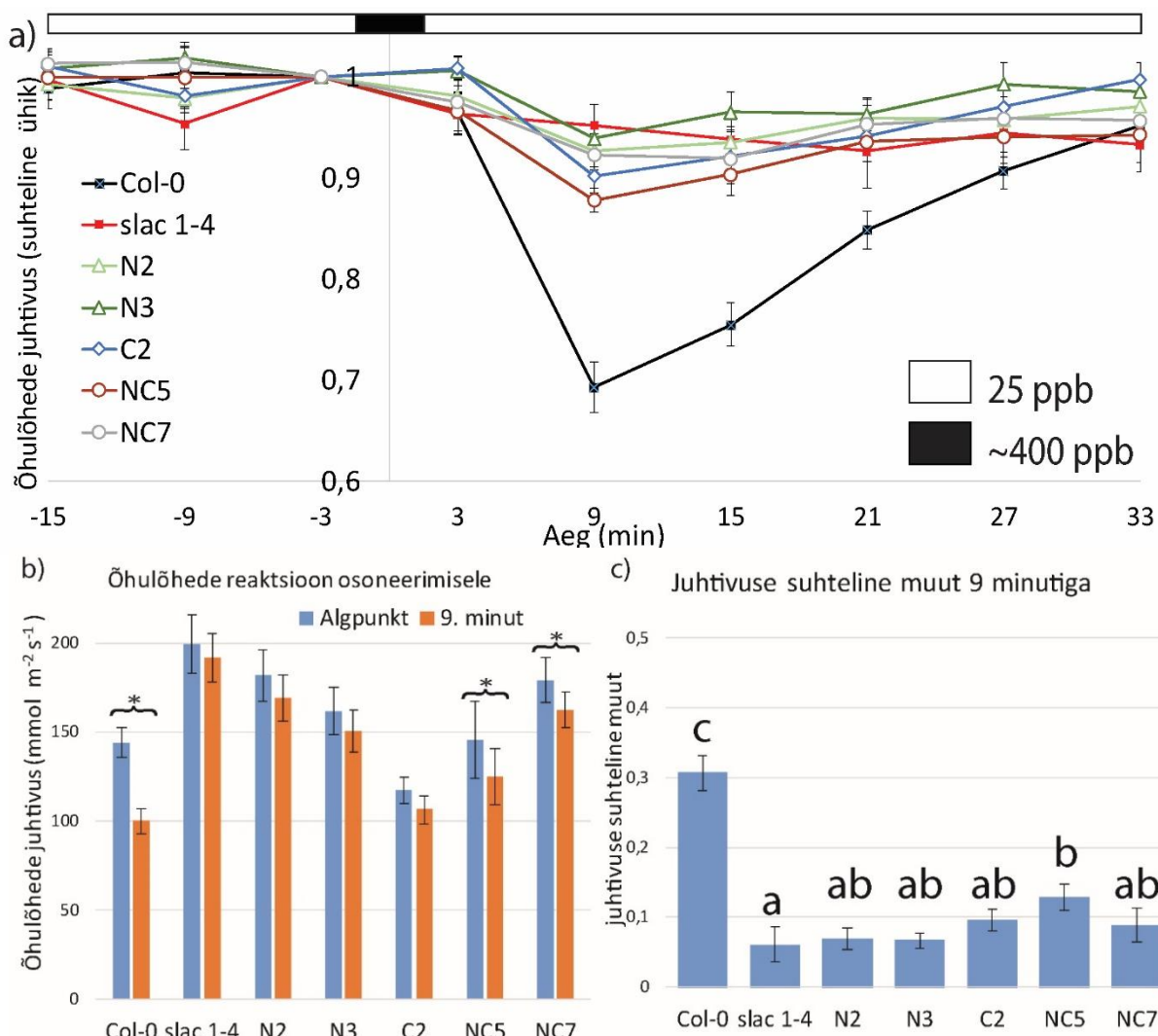
Seejärel võrreldi metsiktüübi ning mutantliinide reageeringute erisusi. Katse tulemused näitasid, et metsiktüübil toimus õhulõhede sulgumine kiiremini ja sulgumise määr oli suurem kui mutantidel (Joonis 9 a). Col-0 saavutas vähima juhtivuse (45% esialgsest) 24 minutiga, jäädes platoole. Kõige aeglasemalt sulgusid *slac1-4* mutandi õhulõhed, sulgumise määr oli minimaalne (20%). Algujuhtivuse ja 24-nda minuti punkti vahel toimunud õhulõhede juhtivuse langusele tehtud korduvmõõtmise ANOVA analüüsi järgi toimus kõigi liinide puhul statistiliselt oluline õhulõhede sulgumine (Joonis 9 b). 48 minuti jooksul toimunud suhtelise õhulõhede juhtivuse muudu ühefaktorilise ANOVA testi järgi tekkis kaks gruppi: {*slac1-4* ja



Joonis 9. Õhulõhede reaktsioon ABA toimel

(a) Õhulõhede suhtelise juhtivuse muut ajas vastusena ABA-ga töötlemisele. Selgema ülevaate saamiseks on N ja C liinid koos kontrollidega eraldi graafikul NC liinidest. (b) Õhulõhede juhtivused enne ABA-ga töötlemist ja 24 minutit hiljem. Ära on märgitud korduvmõõtmiste ANOVA tulemusel saadud statistiliselt olulised erinevused. (c) Õhulõhede juhtivuse suhteline muut 24 minuti jooksul. Eri liinidele on märgitud ühefaktorilise ANOVA järgi grupeerumised.

NC7} ja kõik peale *slac1-4* (Joonis). 24 minuti jooksul ühefaktorilise ANOVA testi järgi tekkis kolm gruppi: {N2, *slac1-4*, NC7}, kõik peale Col-0 ja *slac1-4*, kõik peale *slac1-4* ja NC7 (Joonis 9 c).



Joonis 10. Õhulõhede reaktsioon osooni toimel

- (a) Õhulõhede suhtelise juhtivuse muut ajas 3-minutilise osoneerimise tulemusena.
 (b) Õhulõhede juhtivused enne ja 9 minutit pärast osoneerimist. Ära on märgitud korduvmõõtmistega ANOVA tulemusel saadud statistiliselt olulised erinevused.
 (c) Õhulõhede juhtivuse suhteline muut 9 minuti jooksul. Eri liinidele on märgitud ühefaktorilise ANOVA järgi grupeerumised.

2.4.6. Õhulõhede sulgumine osooni toimel

Antud katse eesmärk oli uurida, kuidas eri mutantide õhulõhede reageerivad osooni kontsentratsiooni tõusule võrreldes metsiktüübiga. Katses tõsteti ajahetkel 0 O₃ kontsentratsiooni kolmeks minutiks vähemalt 400 ppb-ni ning mõõdeti, kuidas õhulõhede sellele reageerivad. O₃ toimel peaks õhulõhede juhtivus vähenema ning mingi aja pärast taastuma. Katsete käigust täheldati sellist protsessi selgelt ainult metsiktüübil (Joonis 10 a). Seejärel võrreldi metsiku taime ning erinevate mutatsioonidega taimede reageeringu erisusi. Katse

tulemused näitasid, et metsikul taimel toimus kiire ja tugev reaktsioon osooni kontsentratsiooni tõusule esimese 9 minuti jooksul, mille järel hakkasid õhulõhed taas avanema (Joonis 10 a). Metsiktüübi maksimaalse sulgumise määr oli 30% esialgsest juhtivusest. Korduvmõõtmiste ANOVA näitas, et enamikel juhtudel oli osooniga stimuleerides õhulõhede avatuse muutus väike, kuid NC5 ja NC7 liinidel väike statistiliselt oluline juhtivuse muutus (Joonis 10 c). O₃ toimel käituvad kõikide mutantide õhulõhed sarnaselt *slac1-4* õhulõhedega (Joonis 10 a). Mutantide õhulõhede sulgumise määr oli oluliselt madalam kui metsiktüübil.

2.5. Arutelu

Taimeteaduse üks peamisi eesmärke on tõsta põllumajanduse produktiivsust, sealhulgas aretades taimi, mis on resistentsed kahjurite vastu, vajavad vähem väetamist ning on suurema vee kasutamise efektiivsusega (Foley jt., 2011). Üheks keskseks objektiks taimede veekasutuse reguleerimisel on lehtede ja varte pinnal asuvad õhulõhed. Õhulõhed reguleerivad taimede gaasivahetust: pidevalt muutuv keskkonnas on kohanemiseks vaja täpset õhulõhede sulgumise ja avanemise regulatsiooni. Õhulõhede avanemise ja sulgumise regulatsiooni detailse mehhanismi selgitamine aitaks kaasa uue põlvkonna põuatolerantsete sortide aretamisele. Seniste õhulõhede regulatsiooni uuringute tulemusena on sealhulgas leitud õhulõhede plasmamembraani anioonkanal SLAC1 ning seda reguleerivad kinaasid (Negi jt., 2008; Vahisalu jt., 2008; Geiger jt., 2009; Brandt jt., 2012; Hua jt., 2012). On ka pakutud, millist SLAC1 piirkonda ja läbi milliste aminohapete modifitseerimise SLAC1 reguleeritakse, ent senised tööd on peamiselt läbi viidud kas *in vitro* või heteroloogilistes süsteemides (Geiger jt., 2009; Maierhofer jt., 2014). Et need katsed on toimunud väljaspool taimeraku ja -kudede konteksti, kus puuduvad teised võimalikud taimsele keskkonnale omased mõjutegureid, siis ei saa nende põhjal teha lõplikke järeldusi taimetes toimuva kohta.

Yamamoto ja teised löid T-DNA liinid, milles *slac1-4* mutandi taustas ekspresseeritakse mittetäielikke SLAC1 valke, millel on puudu kas N- või C-terminaalne ots või mõlemad (Yamamoto jt., 2016). Tegemist on väärtuslike liinidega, mille abil on võimalik terves taimetes välja selgitada, millised SLAC1 valgu piirkonnad on vajalikud erinevate keskkonnatingimuste toimel õhulõhede vastuste reguleerimiseks. Yamamoto jt. uurisid SLAC1 valgu N- ja C-terminaalsete otste mõju õhulõhede sulgumisele kõrgenenud süsihappegaasi ja ABA toimel. Nende tulemused näitasid, et õhulõhede reaktsioon CO₂-le sõltub SLAC1 valgu transmembraansest osast, kuid ei sõltu N- ja C-terminaalsetest otstest. Samas ABA-toimelise õhulõhede sulgumise regulatsioonil mängisid olulist rolli ka C- ja N-terminaalsed SLAC1 otsad, sest taimeliinide õhulõhed, mis ekspresseerisid vaid SLAC1 transmembraanset osa, ei reageerinud normaalselt ABA-le (Yamamoto jt., 2016).

Käesolevas uuringus kasutati Yamamoto jt (2016) kirjeldatud mutante. Selle töö esmane eesmärk oli selgitada, kas Tartus kasutatavas gaasivahetussüsteemides läbi viidavad katsed kinnitavad Yamamoto jt (2016) tulemusi. On teada, et SLAC1 valk on oluline õhulõhede sulgumisel ja arvatakse, et erinevad keskkonnasignaalid toimivad läbi mõnevõrra erinevate signaaliradade (Negi jt., 2008; Vahisalu jt., 2008; Merilo jt., 2013). Pole aga teada, kas need signaalirajad, mille lõplik märklaud on SLAC1 aktivatsiooni, reguleerivad selle valgu samu

piirkondi. Seetõttu uuriti, millist rolli mängivad SLAC1 valgu terminaalsed otsad õhulõhede regulatsioonis vastusena teistele stiimulitele: õhuniiskuse vähendamisele, osooni kontsentratsiooni tõusule ning pimedusele.

Enne stiimuli rakendamist oli kõigi uuritavate mutantide õhulõhede juhtivus metsiktüüpi taimega samas suurusjärgus. Ainult *slac1-4* juhtivus erines oluliselt, olles umbes poole kõrgem. Nullmutandi kõrge õhulõhede juhtivus tuleneb anioonkanali puudumisest tingitud osmootselt aktiivsete ainete kogunemisest sulgrakku. Kuna kõik teised mutandid sarnanesid kontrollile, siis tavapäraste tingimuste juures ei mängi terminaalsed otsad olulist rolli õhulõhede juhtivuses.

Samade mutatsioonidega eri liinide puhul ei olnud tulemused alati sarnased. See erinevus N2 ja N3 ning NC5 ja NC7 reaktsioonides võib tulla T-DNA liinide loomisel tekkivast variatsioonist. See võib tähendada sisestatud T-DNA paiknemist mõnes regulatsiooni jaoks olulises geenis või sisseviidud geeni väiksemat või suuremat ekspressiooni sõltuvalt insertiooni ümbritsevast geneetilisest kontekstist. Veendumaks liinide SLAC1 valgu ühtlases ekspressioonis, tuleks edaspidiste katsete jooksul mõõta ka SLAC1 valgule kinnitatud GFP fluorestsentsi. Samuti oli katse lõpus näha enamasti kõigil liinidel reaktsiooni (korduvmõõtmistega ANOVA analüüsil võrreldes algset juhtivust katse viimase minutiga). See võib tuleneda väikesest valimimahust *slac1-4* mutantides (nt 6 taime ABA katses), selleks ajapunktiks võis esineda ka ööpäevastest rütmidest tulenevaid õhulõhede juhtivuse muutused. Võib ka-olla, et SLAC1 puudumine põhjustabki vaid kiire kineetika kadu ning pikemaajalisel vastusel korvavad selle teised ionikanalid, sh. SLAC1 homoloog SLAH3.

Antud töös leiti, et süsihappegaasi tõusule reageerivad esimese 10 minuti jooksul metsiktüübiga sarnaselt N3, C2 ja NC5 mutandid (Joonis 8 b). Kahel mutandil, N2 ja NC7 statistiliselt olulist reaktsiooni selle aja jooksul ei esinenud. Erinevate N ja NC liinide vaheline varieeruvus võib tuleneda varem nimetatud T-DNA insertioonikoha põhjustatud varieeruvusest. Kuna ühefaktorilise ANOVA puhul (Joonis 8 c) eristusid juhtivuse suhtelise muudu poolest uuritud mutandid *slac1-4* mutandist selgemini ja kuulusid metsiktüübiga samasse statistilisse jaotusse, siis võib järeldada, et kiire CO₂ reaktsiooni puhul pole N- ja C-terminuste olemasolu tähtis. Seega leidis selles töös kinnitust Yamamoto jt (2016) tulemus, et õhulõhede CO₂ reaktsiooni puhul on oluline vaid SLAC1 valgu transmembraanne osa.

Erinevalt Yamamoto jt andmetest oli gaasivahetuskatsetes näha õhulõhede sulgumine vastusena ABA-le kõigis taimeliinides. Väikene sulgumine, mis toimus *slac1-4* mutandis, võib olla seletatav valimi väikese suurusega. Alternatiivselt võib olla erinevus *slac1-4* ja teiste *slac1*

mutantide erinevuses ABA vastuses. Varasemalt on ABA vastust mõõdetud teistes SLAC1 defektsetes liinides (Negi jt., 2008; Vahisalu jt., 2008; Geiger jt., 2009). Ühefaktorilise ANOVA analüüsis eristus selgelt *slac1-4* reaktsioon, teiste mutantide reaktsioonid olid pigem sarnasemad metsiktüübi reaktsioonile. Sellegipoolest sarnanesid nad rohkem teineteisele, paiknedes metsiktüübi ja *slac1-4* vahepeal. Neist tulemustest saab järeldada, et SLAC1 valgu N- ja C-terminustel võib olla ABA regulatsioonis mõningane roll ja et ABA reaktsiooniks võivad olla vajalikud lisaks SLAC1 valgu transmembraansele osale ka tsütosoolsed osad. Küsimuse selgitamiseks oleks vaja läbi viia lisa katseid ja võimalusel analüüsida veel sõltumatuid ainult SLAC1 transmembraanset osa ekspresseerivaid liine.

Erinevus Yamamoto jt tulemustest võib johtuda sellest, et kasutatud süsteemid olid erinevad: antud töös pritsiti ABA terve taime lehtedele, samas kui Yamamoto jt artiklis lisati ABA epidermiselõiku sisaldavale lahusele. Epidermiselõikudes on õhulõhed eraldatud ülejäänud taimest, mistõttu ei pruugi õhulõhede avatust muuta kõik terves taimes toimivad tegurid. Näiteks on läbi viidud katseid, kus terved lehed või mesofüllil rakkudele asetatud epidermise lõigud käituvad teistmoodi kui üksikud epidermiselõigud (Hashimoto jt., 2006; Mott jt., 2008; Fujita jt., 2013).

Õhulõhede reaktsiooni madalale õhuniiskusele mõõtes oli näha, et metsiktüüp reageerib oluliselt kiiremini ja ka rohkem suhtelise õhuniiskuse langemisele. Selgesti eristus ka nullmutandi reaktsioon uuritavate mutantide juhtivusest, olles oluliselt väiksem ja ka aeglasem. Seega kõik uuritavad mutandid olid kontrolli ja nullmutandi vahepealse juhtivusega. Sellest võib järeldada, et SLAC1 valgu N- ja C-terminustel võib olla mingi roll madalale suhtelisele õhuniiskusele reaktsioonis. Uuritavatest mutantidest vähima õhulõhede sulgumisega 14. minutil oli N2 liin, olles peaaegu 3 korda väiksema juhtivusega kui N3 liin. Tuleb ka mainida, et sarnane olukord oli ka süsihappegaasiga stimuleerimisel, kus N2 liini suhteline juhtivuse muutus oli enam kui kaks korda väiksem N3 liini omast esimese 10 minuti jooksul. See võib taas viidata eelmainitud T-DNA insertiooni koha erinevusele ja selle tulemitele. Võib-olla on N2 liini insertioon kohas, mis reguleerib nii süsihappegaasi kui ka õhuniiskuse muudu korral õhulõhede avatust.

Müürlooga metsiktüübil toimub õhulõhede sulgemine pimeduse toimetel esimesel 16 minutil kõige kiiremini, *slac1-4* mutandil kõige aeglasemalt. Lisaks sellele täheldati, et metsiktüübi õhulõhede sulgumise määr oli suurem kui enamikel mutantidel. Seega võime öelda, et valgu terminaalse otste äralõikamine muutis taime reageerimise pimedusele mõnevõrra väiksemaks. Kuid siiski: kõik N- ja C- terminuste mutandid reageerisid pimedusele nullmutandist

tugevamalt. Lisaks sellele oli C2 liinil sulgumine enamvähem võrdne metsiktüübi õhulõhede sulgumisega, kuid ta õhulõhede sulgumine jätkus ka pärast 16 minutit, seega tema õhulõhed sulgusid rohkem kui metsiktüübil. Kui tegemist on tõepoolest taimega, mis reageerib pimedusele tugevamalt, siis on see taim suuteline valguse kadumisel vett paremini säästma. Lisauuringud antud mutandiga annaksid seletust, kas antud mutant oleks potentsiaalselt oluline tootlikkuse tõstmise aspektist.

Käesoleva uuringu märkimisväärsimaks tulemuseks võib pidada seda, et N- ja C-terminaalsetel otstel on oluline roll taime õhulõhede reageerimisel osoonile. Kõigi uuritud SLAC1 mutantide õhulõhed reageerisid oluliselt aeglasemalt kui metsiktüübi õhulõhed ja nende sulgumise määr oli madalam kui metsiktüübil. Kõikide mutantide sarnane käitumine viitab sellele, et SLAC1 valgu C- ja N-terminaalsetel otstel on oluline regulatoorne roll antud anioonkanali aktiveerimisel osooni toimel.

Vahisalu jt (2010) uuringud näitasid, et osoon vallandab sulgrakkudes reaktiivsete hapniku ühendite tootmise, mis arvatavasti toimivad kui signaalmolekulid, aktiveerides erinevaid protsesse, sealhulgas õhulõhede sulgumise (Bright ja Mochly-Rosen, 2005). On teada, et SLAC1 valgu funktsioneerimine on vajalik osooni tekitatud kiires õhulõhede sulgumises (Vahisalu jt., 2008, 2010). Täiendavalt on näidatud, et SLAC1 võimalike fosforülatsiooni sihtmärkide S146F ja S120F mutantidel O₃-reaktsioon puudub ehk neil on O₃ fenotüüp (Vahisalu jt., 2010; Merilo jt., 2013). Lisaks on leitud, et ka OST1 ja ABA-signalisatsiooniga seotud mutantidel on O₃ fenotüüp (Vahisalu jt., 2010; Merilo jt., 2013). Seega võib eeldada, et osooni ja ABA-toimelisel signaliseerimisel on ühisosa ehk eksisteerivad valgud, mis kuuluvad mõlemasse signalisatsiooniratta. Seega on tõenäoline, et nende signalisatsiooniradade tulemusena reguleeritakse vähemalt osaliselt kattuvaid SLAC1 valgu piirkondi. See ühtib Yamamoto jt ja ka antud töös esitatud tulemustega, et N- ja C-terminus mängivad õhulõhedes rolli nii ABA- kui osoonireaktsioonide reguleerimisel.

Antud töös leiti, et SLAC1 N- ja C-terminused pole olulised süsihappegaasi kontsentratsiooni kasvust põhjustatud õhulõhede sulgumisel ning C-terminus pole vajalik pimedusest põhjustatud õhulõhede sulgumiseks. Süsihappegaasi kontsentratsiooni kasv arvatakse mõjuvat taimele läbi ABA signalisatsioonil osalevate valkude ja ka neist sõltumatult (Hõrak jt., 2016). Hiljuti on välja selgitatud mõned ABA-sõltumatus CO₂ signalisatsioonirajas toimivad valgud ning näidatud nende seoseid ABA-sõltuva CO₂ signalisatsioonirajaga (Hashimoto jt., 2006; Jakobson jt., 2016). Nimelt osalevad valgud MPK4, MPK12 ja HT1 ABA-st sõltumatu CO₂

raja reguleerimisel. Antud teadmiste ning Yamamoto jt ja käesoleva töö tulemuste põhjal võib arvata, et nimetatud valgud mõjutavad SLAC1 transmembraanset piirkonda.

Samas on HT1 võimeline inhibeerima nii GHR1 kui OST1 kinaaside poolset SLAC1 aktivatsiooni (Hõrak jt., 2016). Lisaks on teada, et nii defektse OST1 kui GHR1 valguga mutantidel on puudulikud nii CO₂, ABA kui osoonitoimeline sulgumine (Sierla jt., avaldamata; Vahisalu jt., 2010; Xue jt., 2011; Merilo jt., 2013). Need andmed viitavad sellele, et OST1 ja GHR1 võivad olla signaliseerimise sõlmpunktideks, läbi mille peab SLAC1 aktiveeriv signaalsatsioon toimuma. Sellest lähtuvalt võib järeldada, et erinevate stiimulite puhul on kinaasid võimelised mõjutama SLAC1 valguga erinevaid piirkondi. Seega oleks kasulik uurida OST1 ja GHR1 valgude mõju SLAC1-le erinevate stiimulite korral.

Antud töös läbiviidud katsed ei andnud selgeid vastuseid N- ja C-terminaalsete otste olulisusest õhulõhede õhuniiskuse ja ABA reaktsioonis. Seega on tarvis nende stiimulite puhul läbi viia lisakatsed. Huvitavaid tulemusi annaks katsed, kus mõõdetakse vaid ühte taime sagedasemate mõõtmispunktidega. Sellised mõõtmised võimaldaksid täpsemalt jälgida õhulõhedes toimuvaid muutusi just katse algul ning paremini hinnata reaktsiooni kiirust ja ulatust. Kuigi USA-s ja Euroopas osooni tase langeb, siis maailmas tervikuna, kui saastepoliitika oluliselt ei parane, võib osooni tase tõusta (Tai jt., 2014). Kui läbi avatud õhulõhede pääseb see kahju tekitav molekul taime, on optimaalne, ümbritsevatele tingimustele vastav õhulõhede regulatsioon taime arenguks ja kasvuks äärmiselt oluline. Edasised uuringud SLAC1 punktmutantidega aitaksid oluliselt täpsustada SLAC1 valguga rolli osooni pääsemisel taime.

Käesolev uuring viitab, et erinevatest keskkonnatingimuste muutustest lähtuvad signaalsatsioonirajad mõjutavad SLAC1 valgu erinevalt. Töö tulemused näitavad, et uuritavatel terminustel on eelkõige oluline roll raku gaasivahetuse reguleerimisel osooni ja osaliselt ka ABA vastuses, kuid mitte CO₂ ja pimeduse reaktsioonis. Viimaste puhul, kui terminalid mängivad rolli, siis just kiire kineetika puhul. Antud andmed on aluseks edasistele uuringutele ning võimaldavad seeläbi tõsta taimede saagikust ebasobivates tingimustes.

KOKKUVÕTE

Taimeteaduse üks peamisi eesmärke tänapäeval on tõsta põllumajanduse produktiivsust – õhulõhede avanemise ja sulgumise regulatsiooni detailse mehhanismi selgumine aitab kaasa uue põlvkonna põuatolerantsete sortide aretamisele. Pimeduse, kõrge CO₂ taseme, vähesel õhuniiskusel, taimehormooni abstsissiinil ja osooni toimel õhulõhed sulguvad ning taimest eralduva veeauru hulk väheneb.

Käesolevas bakalaureusetöös uuriti hariliku müürlooga, *Arabidopsis thaliana* SLAC1 mutantide õhulõhede reaktsiooni õhuniiskuse vähendamisele, ABA, CO₂ ja osooni kontsentratsiooni tõusule ning pimedusele.

Käesolev uuring näitas, et SLAC1 anioonkanali reaktsioon õhuniiskuse vähendamisele, CO₂ kontsentratsiooni tõusule ning pimedusele sõltub SLAC1 valgu transmembraansesest kanalist, kuid ei sõltu N- ja C-terminaalsetest otstest. Küll aga võib olla N- ja C-terminustel ABA regulatsioonis. Kindlasti viitab uuring sellele, et N- ja C-terminustel on oluline roll sulgraku reageerimisel osooni kontsentratsiooni kasvule. Mutantide õhulõhed reageerivad aeglasemalt kui metsiktüüp ja nende sulgumise määr on valdavalt madalam kui metsiktüübil. Seega on uuringus kasutatud mutandid vastuvõtlikumad osoonile ning seega ka osoonist tingitud kahjustustele altimad kui metsiktüüp.

Siiski on vajalikud lisakatsed, et täpsemalt välja selgitada, miks osoonile reageerimine oli mutantidel häiritud. Vajalikud on katsed, kus mõõdetakse vaid ühte taime, kuid sagedastemate mõõtmispunktidega, saades parema vaate kuidas õhulõhede avatus muutub osooni käes. Kasulikud oleksid ka SLAC1 N- ja C-terminaalsete otste osooni reguleerivat piirkonda täpsustavad katsed, näiteks katsed SLAC1 punktmutantidega.

On the Role of SLAC1 Anion Channel's N and C Termini' in *Arabidopsis thaliana* Guard Cell regulation

Toomas Ginter

Summary

An important part in botanical science is to improve the productivity of agriculture and lessen its burden on the ecosystem. One way to cope with the trending worldwide fresh water deficit is to better control our crop's gas exchange with the atmosphere, which is regulated by guard cells' stomatal conductance. Different factors like higher CO₂ and ozone concentration, darkness and low relative humidity induce stomatal closing which reduces transpiration, but also CO₂ intake, which is vital for plants photosynthesis.

This thesis concentrates on guard cells' regulation by SLAC1 anion channel's N and C cytosolic terminus in *Arabidopsis thaliana*. Mutants with defective SLAC1 protein are shown to have higher overall stomatal conductance and have a smaller closing response to ABA, CO₂, ozone, RH and light changes. Thus, stomatal response to aforementioned stimuli was measured in wild-type Col-0, SLAC1 null mutant *slac1-4* in control group, and mutant lines. The lines were created with SLAC1 constructs truncated in N or C terminus or with both N and C termini truncated. These constructs were introduced to *slac1-4*, with all of them having a green fluorescent protein at the C terminal end. Whilst these lines have been created and measured by Yamamoto et al, in contrast to them, this study measured conductance in living, whole plants and to more stimuli.

The current study found that almost all of the mutants' stomatal conductance in response to ABA, CO₂ increase, RH decrease and darkness were somewhere between the wild-type and *slac1-4* for all of the mutant lines in view. In response to ozone, all of the mutant lines reacted similarly to *slac1-4*.

The current study concluded that N and C terminus' are not vital for stomatal regulation in response to ABA, CO₂, RH and light changes, though the termini might play a role in the reactions' fast kinetics to low RH, ABA, and N terminus for fast response to darkness. The most important role of SLAC1 termini, however, was in the reaction to ozone. All of the lines

with truncated C or N termini reacted as if they had no SLAC1 channel at all – like the *slac1-4* mutant.

Still, more research is needed to better show the exact mechanism of the termini's response signal to changes in CO₂ and ozone concentration, changes in relative humidity and light, and ABA.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 796–815. <https://doi.org/10.1038/35048692>
- Arve, L. E., Kruse, O. M. O., Tanino, K. K., Olsen, J. E., Futsæther, C., ja Torre, S. (2015). Growth in continuous high air humidity increases the expression of CYP707A-genes and inhibits stomatal closure. *Environmental and Experimental Botany*, 115, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.02.004>
- Arve, L. E., Torre, S., Olsen, J., ja Tanino, K. (2011). Stomatal Responses to Drought Stress and Air Humidity. <https://doi.org/10.5772/24661>
- Assmann, S. M., Simoncini, L., ja Schroeder, J. I. (1985). Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature*, 318(6043), 285–287. <https://doi.org/10.1038/318285a0>
- Bauer, H., Ache, P., Lautner, S., ... Hedrich, R. (2013). The Stomatal Response to Reduced Relative Humidity Requires Guard Cell-Autonomous ABA Synthesis. *Current Biology*, 23(1), 53–57. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.022>
- Boyer, J. S., Wong, S. C., ja Farquhar, G. D. (1997). CO₂ and Water Vapor Exchange across Leaf Cuticle (Epidermis) at Various Water Potentials. *Plant Physiology*, 114(1), 185–191. <https://doi.org/10.1104/pp.114.1.185>
- Brandt, B., Brodsky, D. E., Xue, S., Negi, J., Iba, K., Kangasjärvi, J., Ghassemian, M., Stephan, A. B., Hu, H., ja Schroeder, J. I. (2012). Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), 10593–10598. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116590109>
- Bright, R., ja Mochly-Rosen, D. (2005). The Role of Protein Kinase C in Cerebral Ischemic and Reperfusion Injury. *Stroke*, 36(12), 2781–2790. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000189996.71237.f7>
- Bruinsma, J. (2009). The Resource Outlook To 2050. Salvestatud ftp://193.43.36.92/agl/AGLW/docs/ResourceOutlookto2050_fra.pdf
- Brutnell, T., ja Frommer, W. B. (2012). Food for Thought. *The Scientist Magazine*®, (2012). Salvestatud <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/32151/title/Food-for-Thought/>
- Bünning, E. (1953). *Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze*. Springer-Verlag.
- Caird, M. A., Richards, J. H., ja Donovan, L. A. (2007). Nighttime Stomatal Conductance and Transpiration in C₃ and C₄ Plants. *Plant Physiology*, 143(1), 4–10. <https://doi.org/10.1104/pp.106.092940>
- Chen, Y.-H., Hu, L., Punta, M., Bruni, R., Hillerich, B., Kloss, B., Rost, B., Love, J., Siegelbaum, S. A., ja Hendrickson, W. A. (2010). Homologue structure of the SLAC1 anion channel for closing stomata in leaves. *Nature*, 467(7319), 1074–1080. <https://doi.org/10.1038/nature09487>

- Dzierżyńska, A. (2006). The role of cytoskeleton in stomata functioning. *Acta Physiologiae Plantarum*, 28(1), 59–79. <https://doi.org/10.1007/s11738-006-0069-z>
- Ellsworth, D. S., Anderson, I. C., Crous, K. Y., ... Reich, P. B. (2017). Elevated CO₂ does not increase eucalypt forest productivity on a low-phosphorus soil. *Nature Climate Change*, 7(4), 279–282. <https://doi.org/10.1038/nclimate3235>
- Field, C. B., Jackson, R. B., ja Mooney, H. A. (1995). Stomatal responses to increased CO₂: implications from the plant to the global scale. *Plant, Cell & Environment*, 18(10), 1214–1225. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1995.tb00630.x>
- Foley, J. A., Ramankutty, N., Brauman, K. A., ... Zaks, D. P. M. (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature*, 478(7369), 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature10452>
- Freudenberger, H. (1940). Die Reaktion der Schliesszellen auf Kohlensäure und Sauerstoffentzug. *documentslide.com*. Salvestatud <http://documentslide.com/documents/die-reaktion-der-schliesszellen-auf-kohlensaere-und-sauerstoffentzug.html>
- Fujita, T., Noguchi, K., ja Terashima, I. (2013). Apoplastic mesophyll signals induce rapid stomatal responses to CO₂ in *Commelina communis*. *The New Phytologist*, 199(2), 395–406. <https://doi.org/10.1111/nph.12261>
- Geiger, D., Maierhofer, T., AL-Rasheid, K. A. S., ... 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(173), ra32-ra32. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001346>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(50), 21425–21430. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912021106>
- Gerland, P., Raftery, A. E., Ševčíková, H., ... Wilmoth, J. (2014). World population stabilization unlikely this century. *Science*, 346(6206), 234–237. <https://doi.org/10.1126/science.1257469>
- Hartsock, T. L., ja Nobel, P. S. (1976). Watering converts a CAM plant to daytime CO₂ uptake. *Nature*, 262(5569), 574–576. <https://doi.org/10.1038/262574b0>
- Hashimoto, M., Negi, J., Young, J., Israelsson, M., Schroeder, J. I., ja Iba, K. (2006). Arabidopsis HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO₂. *Nature Cell Biology*, 8(4), 391–397. <https://doi.org/10.1038/ncb1387>
- Hayashi, M., ja Kinoshita, T. (2011). Crosstalk between blue-light- and aba-signaling pathways in stomatal guard cells. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), 1662–1664. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17800>
- Hetherington, A. M., ja Woodward, F. I. (2003). The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, 424(6951), 901–908.
- Hill, A. C., ja Littlefield, N. (1969). Ozone. Effect on apparent photosynthesis, rate of transpiration, and stomatal closure in plants. *Environmental Science & Technology*, 3(1), 52–56. <https://doi.org/10.1021/es60024a002>
- Hu, H., Boisson-Dernier, A., Israelsson-Nordström, M., Böhmer, M., Xue, S., Ries, A., Godoski, J., Kuhn, J. M., ja Schroeder, J. I. (2010). Carbonic anhydrases are upstream

- regulators of CO₂-controlled stomatal movements in guard cells. *Nature Cell Biology*, 12(1), 87–93. <https://doi.org/10.1038/ncb2009>
- Hua, D., Wang, C., He, J., Liao, H., Duan, Y., Zhu, Z., Guo, Y., Chen, Z., ja Gong, Z. (2012). A Plasma Membrane Receptor Kinase, GHR1, Mediates Abscisic Acid- and Hydrogen Peroxide-Regulated Stomatal Movement in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(6), 2546–2561. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.100107>
- Hõrak, H., Sierla, M., Tõldsepp, K., ... Kollist, H. (2016). A Dominant Mutation in the HT1 Kinase Uncovers Roles of MAP Kinases and GHR1 in CO₂-induced Stomatal Closure. *The Plant Cell*, tpc.00131.2016. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00131>
- Imes, D., Mumm, P., Böhm, J., Al-Rasheid, K. A. S., Marten, I., Geiger, D., ja Hedrich, R. (2013). Open stomata 1 (OST1) kinase controls R-type anion channel QUAC1 in Arabidopsis guard cells. *The Plant Journal*, 74(3), 372–382. <https://doi.org/10.1111/tpj.12133>
- Inoue, S., Kinoshita, T., Takemiya, A., Doi, M., ja Shimazaki, K. (2008). Leaf Positioning of Arabidopsis in Response to Blue Light. *Molecular Plant*, 1(1), 15–26. <https://doi.org/10.1093/mp/ssm001>
- Jakobson, L., Vaahtera, L., Tõldsepp, K., ... Brosché, M. (2016). Natural Variation in Arabidopsis Cvi-0 Accession Reveals an Important Role of MPK12 in Guard Cell CO₂ Signaling. *PLOS Biology*, 14(12), e2000322. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000322>
- Jensen, M. H. (2002). Controlled Environment Agriculture In Deserts, Tropics And Temperate Regions - A World Review. *Acta Horticulturae*, (578), 19–25. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.578.1>
- Jones, R., Ougham, H., Thomas, H., ja Waaland, S. (2013). *The molecular life of plants*. Chichester, West Sussex; Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell. Salvestatud http://www.123library.org/book_details/?id=20087
- Kangasjärvi, J., Jaspers, P., ja Kollist, H. (2005). Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant, Cell & Environment*, 28(8), 1021–1036. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01325.x>
- Katul, G. G., Oren, R., Manzoni, S., Higgins, C., ja Parlange, M. B. (2012). Evapotranspiration: A process driving mass transport and energy exchange in the soil-plant-atmosphere-climate system: EVAPOTRANSPIRATION AND CLIMATE. *Reviews of Geophysics*, 50(3). <https://doi.org/10.1029/2011RG000366>
- Kim, T.-H., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N., ja Schroeder, J. I. (2010). Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO₂, and Ca²⁺ Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 561–591. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112226>
- Kolb, H. A., Marten, I., ja Hedrich, R. (1995). Hodgkin-Huxley analysis of a GCAC1 anion channel in the plasma membrane of guard cells. *The Journal of Membrane Biology*, 146(3), 273–282.
- Kollist, H., Jossier, M., Laanemets, K., ja Thomine, S. (2011). Anion channels in plant cells. *The FEBS Journal*, 278(22), 4277–4292. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08370.x>

- Kollist, H., Nuhkat, M., ja Roelfsema, M. R. G. (2014). Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. *The New Phytologist*, 203(1), 44–62. <https://doi.org/10.1111/nph.12832>
- Kollist, T., Moldau, H., Rasulov, B., Oja, V., Rämme, H., Hüve, K., Jaspers, P., Kangasjärvi, J., ja Kollist, H. (2007). A novel device detects a rapid ozone-induced transient stomatal closure in intact *Arabidopsis* and its absence in *abi2* mutant. *Physiologia Plantarum*, 129(4), 796–803. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00851.x>
- 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*, e0114. <https://doi.org/10.1199/tab.0114>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(50), 21419–21424. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910601106>
- Linder, B., ja Raschke, K. (1992). A slow anion channel in guard cells, activating at large hyperpolarization, may be principal for stomatal closing. *FEBS Letters*, 313(1), 27–30. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)81176-M](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)81176-M)
- Lmackay2013. (2013). *Stoma Opening Closing.svg*. Salvestatud https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Stoma_Opening_Closing.svg
- Luo, T., Young, R., ja Reig, P. (2015). Aqueduct projected water stress country rankings. *Technical Note*. Salvestatud <https://www.medbox.org/aqueduct-projected-water-stress-country-rankings/download.pdf>
- 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(5930), 1064–1068. <https://doi.org/10.1126/science.1172408>
- Maierhofer, T., Diekmann, M., Offenborn, J. N., ... Hedrich, R. (2014). Site- and kinase-specific phosphorylation-mediated activation of SLAC1, a guard cell anion channel stimulated by abscisic acid. *Sci. Signal.*, 7(342), ra86-ra86. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005703>
- Marris, E. (2008). Water: More crop per drop. *Nature News*, 452(7185), 273–277. <https://doi.org/10.1038/452273a>
- McAdam, E. L., Brodribb, T. J., ja McAdam, S. A. M. (2017). Does ozone increase ABA levels by non-enzymatic synthesis causing stomata to close? *Plant, Cell & Environment*, 40(5), 741–747. <https://doi.org/10.1111/pce.12893>
- Medlyn, B. E., Duursma, R. A., Eamus, D., Ellsworth, D. S., Prentice, I. C., Barton, C. V. M., Crous, K. Y., De Angelis, P., Freeman, M., ja Wingate, L. (2011). Reconciling the optimal and empirical approaches to modelling stomatal conductance. *Global Change Biology*, 17(6), 2134–2144. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02375.x>
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., ja He, S. Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, 126(5), 969–980. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.054>

- Merilo, E., Laanemets, K., Hu, H., ... Kollist, H. (2013). PYR/RCAR Receptors Contribute to Ozone-, Reduced Air Humidity-, Darkness-, and CO₂-Induced Stomatal Regulation. *Plant Physiology*, 162(3), 1652–1668. <https://doi.org/10.1104/pp.113.220608>
- Meyer, S., Mumm, P., Imes, D., Endler, A., Weder, B., Al-Rasheid, K. A. S., 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. *The Plant Journal*, 63(6), 1054–1062. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04302.x>
- Mott, K. A., Sibbersen, E. D., ja Shope, J. C. (2008). The role of the mesophyll in stomatal responses to light and CO₂. *Plant, Cell & Environment*, 31(9), 1299–1306. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01845.x>
- 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. *The Plant Cell*, 14(12), 3089–3099. <https://doi.org/10.1105/tpc.007906>
- Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Hashimoto, M., ja Iba, K. (2008). CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature*, 452(7186), 483–486. <https://doi.org/10.1038/nature06720>
- 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(5930), 1068–1071. <https://doi.org/10.1126/science.1173041>
- Raschke, K. (1970). Leaf Hydraulic System: Rapid Epidermal and Stomatal Responses to Changes in Water Supply. *Science*, 167(3915), 189–191. <https://doi.org/10.1126/science.167.3915.189>
- Raschke, K., Shabahang, M., ja Wolf, R. (2003). The slow and the quick anion conductance in whole guard cells: their voltage-dependent alternation, and the modulation of their activities by abscisic acid and CO₂. *Planta*, 217(4), 639–650. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1033-4>
- Rhee, S. Y., ja Mutwil, M. (2014). Towards revealing the functions of all genes in plants. *Trends in Plant Science*, 19(4), 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.10.006>
- Roelfsema, M. R. G., Levchenko, V., ja Hedrich, R. (2004). ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *The Plant Journal*, 37(4), 578–588. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2003.01985.x>
- Scherzer, S., Maierhofer, T., Al-Rasheid, K. A. S., Geiger, D., ja Hedrich, R. (2012). Multiple Calcium-Dependent Kinases Modulate ABA-Activated Guard Cell Anion Channels. *Molecular Plant*, 6(5), 1409–1412. <https://doi.org/10.1093/mp/sss084>
- Schmidt, C., ja Schroeder, J. I. (1994). Anion Selectivity of Slow Anion Channels in the Plasma Membrane of Guard Cells (Large Nitrate Permeability). *Plant Physiology*, 106(1), 383–391. <https://doi.org/10.1104/pp.106.1.383>
- Schroeder, J. I., Hedrich, R., ja Fernandez, J. M. (1984). Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature*, 312(5992), 361–362. <https://doi.org/10.1038/312361a0>

- Schroeder, J. I., ja Keller, B. U. (1992). Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(11), 5025–5029.
- Schulze, E.-D., Turner, N. C., Gollan, T., ja Shackel, K. A. (1987). Stomatal responses to air humidity and to soil drought. Salvestatud <https://publications.csiro.au/rpr/pub?list=BRO&pid=procite:02a1ceb2-da81-4dc6-8b91-6092ad49de7b>
- Shimazaki, K., Iino, M., ja Zeiger, E. (1986). Blue light-dependent proton extrusion by guard-cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature*, 319(6051), 324–326. <https://doi.org/10.1038/319324a0>
- Sierla, M., Hörak, H., Overmyer, K., ... Kangasjärvi, J. (avaldamata). *An atypical LRR-receptor kinase regulates stomatal closure*. Manuscript.
- Snyder, K. A., Richards, J. H., ja Donovan, L. A. (2003). Night-time conductance in C3 and C4 species: do plants lose water at night? *Journal of Experimental Botany*, 54(383), 861–865. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg082>
- Somerville, C., ja Koornneef, M. (2002). A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nature Reviews Genetics*, 3(11), 883–889. <https://doi.org/10.1038/nrg927>
- Tai, A. P. K., Martin, M. V., ja Heald, C. L. (2014). Threat to future global food security from climate change and ozone air pollution. *Nature Climate Change*, 4(9), 817–821. <https://doi.org/10.1038/nclimate2317>
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., ja Murphy, A. (2014). *Plant Physiology and Development*. Sinauer Associates, Incorporated.
- Trouverie, J., Vidal, G., Zhang, Z., Sirichandra, C., Madiona, K., Amiar, Z., Prioul, J.-L., Jeannette, E., Rona, J.-P., ja Brault, M. (2008). Anion Channel Activation and Proton Pumping Inhibition Involved in the Plasma Membrane Depolarization Induced by ABA in *Arabidopsis thaliana* Suspension Cells are Both ROS Dependent. *Plant and Cell Physiology*, 49(10), 1495–1507. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn126>
- Turrall, H., Burke, J., ja Faurès, J.-M. (2011). *Climate change, water and food security*. Rooma. Salvestatud <http://www.fao.org/docrep/014/i2096e/i2096e00.htm>
- 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(7186), 487–491. <https://doi.org/10.1038/nature06608>
- 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. *The Plant Journal*, 62(3), 442–453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04159.x>
- Willmer, C., ja Fricker, M. (1996). *Stomata*. Springer Science & Business Media.
- 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 CO₂ signal transduction in guard cell. *The EMBO Journal*, 30(8), 1645–1658. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.68>
- Yamamoto, Y., Negi, J., Wang, C., Isogai, Y., Schroeder, J. I., ja Iba, K. (2016). The Transmembrane Region of Guard Cell SLAC1 Channels Perceives CO₂ Signals via an ABA-

Independent Pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 28(2), 557–567.
<https://doi.org/10.1105/tpc.15.00583>

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

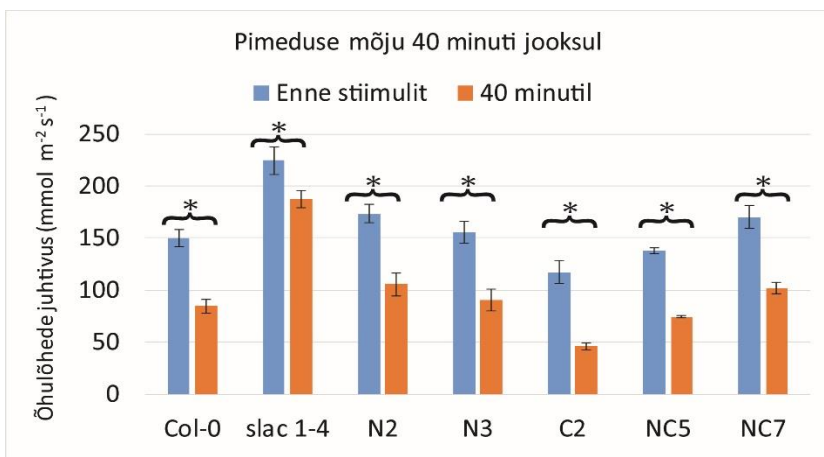
Uniprot andmebaas, SLAC1 valk

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9LD83> (26.05.2017)

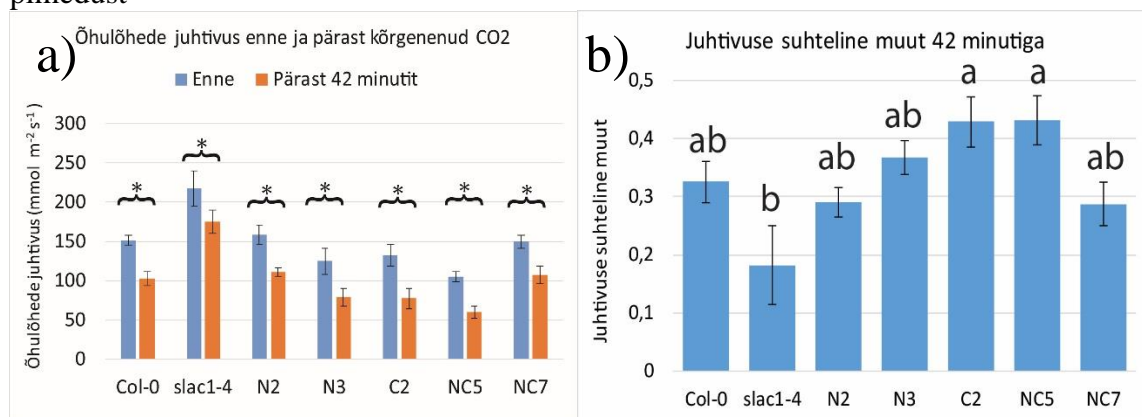
SALK T-DNA kolleksioon

<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress> (21.05.2017)

LISAD

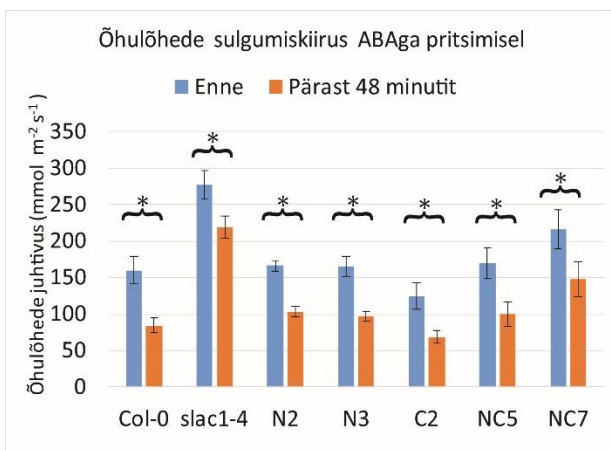


Joonis 11. Pimeduse korduvmõõtmistega ANOVA tulemused enne ja pärast 40 minutit pimedust



Joonis 12. CO₂ reaktsioonid 42 minutiga

(a) korduvmõõtmistega ANOVA tulemused enne ja pärast 42 minutit stiimulit. (b) ühefaktorilise ANOVA grupid eri liinide juhtivuse suhtelised muudused 42. minutil



Joonis 13. Korduvmõõtmistega ANOVA tulemused enne ja 48 minutit pärast ABA-ga töötlemise juhtivuste vahel

LIHTLITSENTS

Mina,

Toomas Ginter,

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

„SLAC1 anioonkanali N- ja C-terminuse roll Arabidopsis thaliana õhulõhede regulatsioonis“,

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, 29.05.2017