

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

**Kinaasist OST1 sõltuv õhulõhede sulgumine kuivas õhus: jaht puudevatele
komponentidele signaalrajas**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Benelote Uusküla

Juhendajad PhD Ebe Merilo

PhD Hanna Hõrak

TARTU 2023

INFOLEHT

Kinaasist OST1 sõltuv õhulõhede sulgumine kuivas õhus: jaht puuduvatele komponentidele signaalrajas

Kliima soojenemisega kaasneb õhu niiskusdefitsiidi (VPD) tõus, mis tähendab, et õhk on kuivem, evaporatiivne surve seetõttu suurem ning see mõjutab taimede õhulõhede regulatsiooni. Kõrge VPD mõjul toimuvast õhulõhede sulgumisest on vähe teada, kuid selle protsessi üks oluline regulaator on kinaas OST1. Käesolevas töös on uuritud mutante, kus on defektne ühe eelistatult sulgrakkudes ekspresseeritud geeni funktsioon, eesmärgiga leida häiritud VPD-vastusega mutante. Õhulõhede juhtivust ning sulgumist mõõdeti kõrge VPD, eksogeense abstsiiishappe (ABA) ja pimeduse mõjul. Katsetest tuli välja, et mutandil *hookless1* oli juhtivus normaalolekus konstantselt metsiktüüpi taimede omast kõrgem. *Hookless1* mutandi kõrgem juhtivus viitab selle geeni olulisusele lehe veekao regulatsioonis. Ühegi uuritud geeni puudumine ei muutnud VPD mõjul toimuvat õhulõhede sulgumist ja seega peab jaht õhulõhede VPD-toimelise sulgumise signaalraja puuduvatele komponentidele jätkuma.

VPD, kinaas OST1, gaasivahetus, harilik müürlook, õhulõhede juhtivus

CERCS: B310 Soontaimede füsioloogia, B225 Taimegeneetika

Protein kinase OST1-dependent stomatal closure: the hunt for missing components in the VPD signalling pathway

Climate warming is accompanied with the rise of VPD (the difference between the saturation and actual air vapor pressure), which results in higher evaporative demand and affects plants stomatal regulation. Protein kinase OST1 plays a significant role in VPD-dependent stomatal closure. However, signalling components that lead to the activation of OST1 in the high-VPD response are unknown. This study examined mutants deficient in genes that have a higher expression level in guard cells compared to mesophyll cells, to find mutants with reduced stomatal VPD-response. Stomatal conductance was measured in response to high VPD, exogenous abscisic acid (ABA) and darkness in gas-exchange experiments. A mutant *hookless1* was discovered, which had higher steady-state stomatal conductance than wild-type plants. However, stomatal VPD-response was statistically wildtype-like in all studied mutants, and thus, the hunt for missing components in the VPD signalling pathway has to continue.

VPD, kinase OST1, gas exchange, *Arabidopsis thaliana*, stomatal conductance

CERCS: B310 Physiology of vascular plants, B225 Plant genetics

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Kliimamuutused ja sellega kaasnev VPD tõus	7
1.2. VPD tõusu mõju taimedele.....	7
1.3. Õhulõhed	7
1.3.1. Õhulõhede regulatsioon abiootilise keskkonna signaalide mõjul.....	8
1.3.2. Õhulõhede VPD-toimeline regulatsioon	8
1.3.3. Õhulõhede ABA-regulatsioon	9
1.4. OST1 valk.....	10
1.5. Puuduvad komponendid VPD-toimelises õhulõhede sulgumise rajas	10
2. EKSPERIMENTAALOSA	11
2.1. Töö eesmärgid	11
2.2. Materjal ja meetodika.....	11
2.2.1. Taimeliinide genotüüpide kontrollimine	11
2.2.2. Kasutatud taimeliinid.....	12
2.2.3. Taimede kasvatamine	14
2.2.4. Aparatuur	14
2.2.5. Katsete läbiviimine	15
2.2.6. Lehejäljendite tegemine.....	16
2.2.7. Andmeanalüüs	16
2.3. Tulemused	17
2.3.1. Õhulõhede sulgumine kõrge VPD mõjul.....	17
2.3.2. Õhulõhede sulgumine ABA-ga pritsides.....	19
2.3.3. Õhulõhede sulgumine pimedas.....	21
2.3.4. Õhulõhede tihedus valitud liinidel.....	22

2.4. Arutelu	22
KOKKUVÕTE	26
SUMMARY	28
TÄNUAVALDUSED.....	30
KASUTATUD KIRJANDUS	31
LISAD	37
Lisa 1	37
Lisa 2	37
LIHTLITSENTS.....	40

KASUTATUD LÜHENDID

ABA	<i>abscisic acid</i> ; abstsiihape, taimehormoon
G _s	õhulõhede juhtivus
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ; etüleendiamiintetraäädikhape
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; polümeraasi ahelreaktsioon
PP2C	PROTEIN PHOSPHATASE 2C; 2C tüüpi proteiinfosfataas, ABA signaalraja negatiivne regulaator
PYR/PYL/RCAR	PYRABACTIN RESISTANCE/PYR-LIKE/REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR; ABA retseptor
OST1	OPEN STOMATA 1; kinaas, õhulõhede sulgumise positiivne regulaator sugrakkudes
RH	<i>relative humidity</i> ; suhteline õhuniiskus
ROS	reaktiivsed hapnikuühendid
SLAC1	SLOW TYPE ANION CHANNEL 1; aeglast tüüpi sulgraku anioonkanal
SnRK2	SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2
SNF1	SUCROSE NON-FERMENTING 1
TRIS	<i>trisaminomethane</i> ; trisaminometaan
VPD	<i>vapour-pressure deficit</i> ; õhu niiskusdefitsiit

Valgu- ja geeninimede puhul tähistavad läbivad suurtähed tekstis valgunimesid, kaldkirjas läbivad suurtähed geeninimesid ja kaldkirjas läbivad väiketähed mutantide nimesid.

SISSEJUHATUS

Taimed reguleerivad oma veekaotust läbi õhulõhede. Õhulõhe koosneb õhupilust ning seda ümbritsevast sulgrakkudest, läbi mille toimub taime sisse ja sellest välja süsihappegaasi ja vee liikumine. Kliima soojenemisega kaasneb õhu niiskusedefitsiidi (VPD) tõus, mis mõjutab taimede õhulõhede regulatsiooni. VPD tõus tähendab lihtsalt kokku võttes seda, et ümbritsev õhk muutub taimede jaoks kuivemaks, mistõttu vee aurumine lehtedest – transpiratsioon – tõuseb. Suureneva veekao piiramiseks peab taim õhulõhed suletumaks reguleerima. Oluline on luua sorte, kes saavad tuleviku kõrge VPD-ga kliimatingimustega hakkama, aga esimese sammuna on vaja mõista, kuidas õhulõhede VPD-toimeline sulgumine taimedes toimub. VPD poolt indutseeritud õhulõhede sulgumine toimub mudelorganismis harilik müürlook (*Arabidopsis thaliana*) aktiivselt läbi OST1 valgu, mis aktiveerub abstsissiinist (ABA) sõltuvalt või ABA-sõltumatult. Võimalik on ka õhulõhede sulgumine kõrges VPD-s passiivselt, kui kuiva õhu tõttu langeb sulgrakkudes veesisaldus ja turgor. Mis toimub õhulõhede aktiivses VPD-vastuses enne OST1 valgu aktiveerumist, pole täpselt teada. Seega on vajalik uurida VPD tõusu mõjusid taimedele, et mõista, kuidas toimub õhulõhede aktiivne regulatsioon kõrges VPD-s, kuidas erinevad taimed kõrge VPD-ga toime tulevad jne.

Käesoleva töö eesmärgiks oli leida hariliku müürlooga õhulõhede regulatsiooni osas häirunud fenotüübiga mutante andmebaaside toel valitud ja tellitud mutantide seast. Valitud mutantides on puudu mingi konkreetne geen, mis on sulgrakus rohkem ekspresseerunud kui mesofüllis. Selline geeniekspressiooni muster võiks viidata vastava geeni/valgu funktsioonile õhulõhede regulatsioonis. Uuritavaks õhulõhede fenotüübiks olid häiritud või üldse puuduv sulgumine kõrge VPD või eksogeense ABA toimetel, aga ka kõrgem õhulõhede juhtivus normaalolekus Arvestades toimunud ja kestvat õhu VPD tõusu, selle olulist mõju taimedele, ning lünki meie teadmistes õhulõhede VPD-toimelise sulgumise rajast, on käesolev töö oluline ja hästi ajastatud.

Töö teostati Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Kliimamuutused ja sellega kaasnev VPD tõus

Õhu niiskusdefitsiit (VPD, *vapour pressure deficit*) on vahe õhu tegeliku veeauru sisalduse ja antud temperatuurile vastava küllastunud veeauru sisalduse vahel (Yuan *et al.*, 2019). VPD tõuseb kliima soojenemise tagajärjel eelkõige seetõttu, et kõrgemal temperatuuril on küllastunud veeauru sisaldus suurem. VPD tõus on suur probleem alates hilistest 1990-ndatest, jätkudes mudelennustuste põhjal ka 21. sajandil (Yuan *et al.*, 2019). Lisaks õhutemperatuuri tõusule mõjutab VPD-d ka suhteline õhuniiskus (RH), mille muutumises on globaalselt valdav negatiivne trend (Vicente-Serrano *et al.*, 2018). Näiteks 25-kraadise temperatuuri puhul 70% õhuniiskusega on VPD 0,9 kPa. USA näitel tõusis VPD aastatel 1979–2013 0,25 kPa võrra (Ficklin & Novick, 2017). Suveperioodi VPD tasemed USA-s tõusevad ennustuste kohaselt 51% aastaks 2099 (Ficklin & Novick, 2017). VPD arvutamiseks kasutatav valem:

$VPD = \text{küllastav õhuniiskus} * (1 - \text{õhuniiskus}) / 10.$

1.2. VPD tõusu mõju taimedele

Õhuniiskuse vähenemisel või temperatuuri tõustes VPD tõuseb, mis tähendab taimede jaoks suuremat evaporatiivset survet st transpiratsioon taimedest tõuseb (Kerstiens, 1997; López *et al.*, 2021). Suurema veekaotuse vältimiseks tuleb õhulõhed sulgeda. Õhulõhede juhtivus (G_s) langeb 9–51% ennustatud 51%-se VPD tõusu tõttu ning sellega seostub netoassimilatsiooni kiiruse ja primaarproduktiooni vähenemine (Ficklin & Novick, 2017). Kõrges VPD-s toimuvat transpiratsiooni tõusu pidurdab taim lisaks õhulõhede sulgumisele ka õhulõhede arengut ja suurust mõjutades: õhulõhede tihedus väheneb, õhulõhed adapteeruvad ja arenevad välja väiksemad õhulõhed, mis langetab õhulõhede juhtivust (Fanourakis *et al.*, 2013). Kõrge VPD taime kasvu ajal mõjutab terve taime ehitust: puuvõra kasv väheneb, lehed on väiksemad ning taim jääb madalaks. Lisaks on kõrge VPD tõttu taimedel väiksem saagikus, väiksed ja vähem arvukad õied ning taime maapealsel osal väiksem biomass (López *et al.*, 2021).

1.3. Õhulõhed

Õhulõhe moodustab õhupilu lehe epidermis ning kaks sulgrakku, mis ümbritsevad õhupilu, sulgrakud on neerukujulised või hantlikujulised. Õhulõhed vahendavad süsihappegaasi (CO₂) ja vee liikumist taime ning sellest välja. Taimede G_s näitab, kui palju veeauru väljub lehe pindalaühiku kohta ajaühikus (mmol m⁻² s⁻¹). Taime gaasivahetuse kiirust reguleerivad nii õhupilu laius (avatus) kui õhulõhede tihedus lehel, mis koos määravad G_s (Hetherington & Woodward, 2003). Õhupilu avatus võib muutuda minutites, kuid õhulõhede tihedus määratakse lehe varases arengus ning võimaldab veekadu taimest reguleerida pikas ajaskaalas (Jalakas *et al.*, 2018). Kliima soojenemise valguses on oluline uurida keskkonnast tulevate signaalide muutuse mõju nii õhulõhede tihedusele kui õhulõhede sulgemisele (Driesen *et al.*, 2020).

1.3.1. Õhulõhede regulatsioon abiootilise keskkonna signaalide mõjul

Õhulõhed sulguvad ja avanevad sulgrakkude abil, turgori toimel – kui ioonid kogunevad rakku, liigub ka vesi sulgrakkudesse ning turgor tõuseb ja õhulõhe avaneb; vastupidine toimub, kui vesi ja ioonid liiguvad sulgrakust välja ja langenud turgori tõttu sulgub õhulõhe. Õhulõhede avatust mõjutavad mitmed abiootilised tegurid: valgus, ümbritseva õhu CO₂ kontsentratsioon, temperatuur ja RH. VPD kajastab RH ja temperatuuri koosmõju õhulõhedele. Õhulõhede avatus väheneb kõrge VPD mõjul (Driesen *et al.*, 2020). Pimeduses toimub õhulõhede sulgemine läbi kahe signalisatsiooniraja: ühelt poolt inaktiveeruvad fototropiinid ja H⁺-ATPaas, mis valguses õhulõhesid avatuna hoiavad (Shimazaki *et al.*, 2007), teisalt kasvab pimedas rakusisene CO₂ kontsentratsioon, sest fotosünteesi ei toimu, ning seetõttu aktiveeruvad anioonkanalid (Roelfsema *et al.*, 2002).

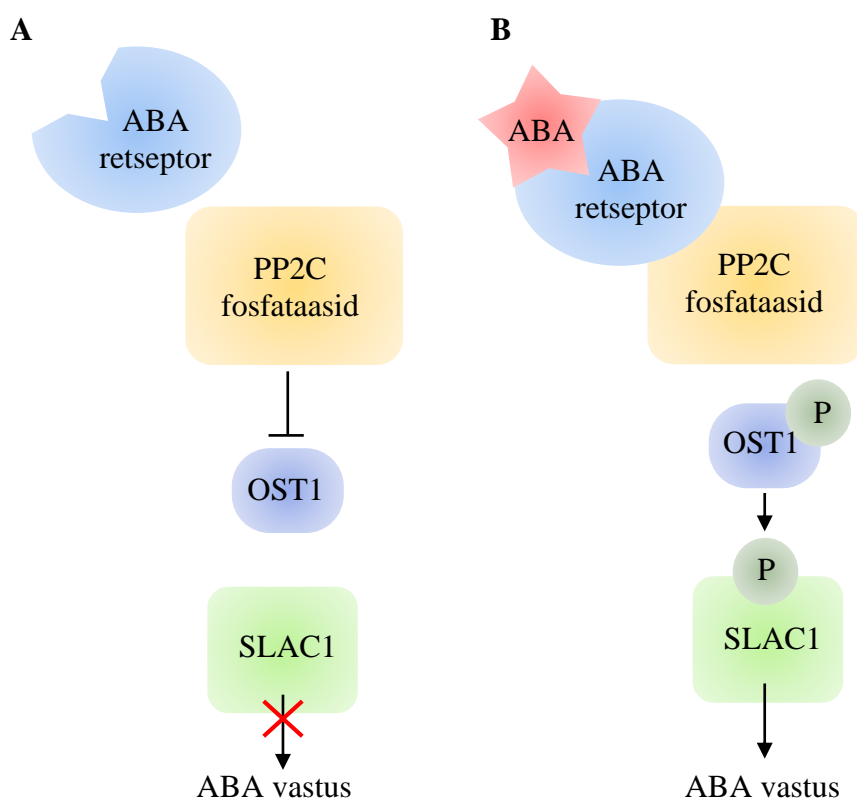
1.3.2. Õhulõhede VPD-toimeline regulatsioon

Õhulõhede sulgumine kõrges VPD-s võib toimuda kas aktiivselt või passiivselt (Merilo *et al.*, 2018). Passiivse vastuse korral suletakse õhulõhed keskkonnatingimuste mõjul langenud lehe veesisalduse ning turgori tulemusel (McAdam & Brodribb, 2015). Õhulõhede aktiivses sulgumises kõrges VPD-s osaleb võtmevalguna proteiinkinaas OPEN STOMATA 1 (OST1), mis omakorda aktiveerib sulgrakkude anioonkanalid, viies anioonide väljavoolu ja õhulõhe sulgumiseni (Merilo *et al.*, 2018). OST1 saab aktiveeruda ka ABA-sõltumatult (vaata allpool) ning VPD-toimelises õhulõhede regulatsioonis osalevad nii ABA-sõltuv kui ABA-sõltumatu OST1 aktivatsioon (Jalakas, Takahashi, *et al.*, 2021). Evolutsiooniliselt vanemate

maismaataimede õhulõhed avanevad ja sulguvad turgori tõusmise ja langemisega passiivselt (Brodribb & McAdam, 2011; McAdam & Brodribb, 2014), kuid katteseemnetaimedes tekkis ABA-toimeline aktiivne õhulõhede regulatsioon (McAdam & Brodribb, 2015).

1.3.3. Õhulõhede ABA-regulatsioon

Abstsiihape (ABA) initsieerib aktiivse õhulõhede sulgumise (Hetherington, 2001), milles osalevad PYRABACTIN RESISTANCE/PYR-LIKE/REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR (PYR1/PYL/RCAR) ABA retseptorid (Cutler *et al.*, 2010; Raghavendra *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009), PROTEIN PHOSPHATASE 2C (PP2C) fosfataasid, SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2 (SnRK2) -tüüpi kinaasid (sealhulgas OST1) ning sulgrakkude anioonkanalid (Jalakas, Nuhkat, *et al.*, 2021). Ilma ABA-ta on PP2C fosfataasid aktiivsed ning OST1 inaktiivne, ABA juuresolekul PP2C fosfataasid inaktiveeritakse, kui moodustavad kompleksi ABA ja PYR1/PYL/RCAR retseptoritega, selle tulemusel autofosforüleerub OST1 ja aktiveerib SLAC1 kanali, mille kaudu väljuvad anioonid sulgrakkudest (joonis 1; H. Kollist *et al.*, 2011).



Joonis 1. Lihtsustatud skeem ABA signaalrajast. (A) ABA puudumisel on PP2C aktiivne ja OST1 inaktiivne – SLAC1 on inaktiivne ja ABA vastust st õhulõhede sulgumist ei teki. (B) ABA juuresolekul moodustavad ABA

retseptor, PP2C ja ABA kompleksi, mis võimaldab OST1-l autofosforüleeruda ja aktiveerida SLAC1 kaudu ABA vastuse. Originaaljoonist (Hõrak, 2017) on muudetud.

1.4. OST1 valk

ABA signaalrajas on tähtsal kohal kinaas OST1, mis aktiveerib transkriptsioonifaktoreid ja ioonkanaleid ja seega tagab sulgrakkude turgori vähenemise ja õhulõhede sulgumise (Geiger *et al.*, 2009; Imes *et al.*, 2013). OST1 aktivatsioon toimub enne reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) tootmist (Mustilli *et al.*, 2002). OST1 valgu C-terminaalses osas on kaks reguloorset domeeni: domeen I ning domeen II. Kuigi domeen II (ABA-ga seonduv *box*) on ABA-sõltuvaks signalisatsioonirajaks vajalik, näitas Yoshida *et al.* (2006) läbiviidud katse, et ka puuduva ABA-*box*iga mutant suutis reageerida osmootsele stressile ning madalale niiskusele. See näitab, et OST1 aktiveerub ka ABA-st sõltumatult. Puuduva ABA-*box*iga mutantides aktiveerivad osmootne stress ning madal õhuniiskus OST1 valgu domeen I ehk SnRK2-*box*'i vahendusel (Yoshida *et al.*, 2006).

1.5. Puuduvad komponendid VPD-toimelises õhulõhede sulgumise rajas

OST1 on oluline valk VPD mõjul toimuva õhulõhede sulgumise läbiviimiseks, OST1 aktiveerib anioonkanalid ja õhulõhe sulgub (Jalakas, Nuhkat, *et al.*, 2021). Pole aga täpselt teada, mis toimub VPD signaalrajas enne OST1 valgu aktiveerimist.

Üks võimalus puuduvate signaalraja komponentide avastamiseks on otsida VPD- või ABA-vastuse osas fenotüübiga (st väiksema vastusega) mutante nende mutantide hulgast, kus on häirunud geenide funktsioon, mille kohta on andmebaaside põhjal teada, et nad on sulgrakus ekspresseerunud rohkem kui mesofüllis. Erinevate mutantide VPD vastust on mõõdetud (Merilo *et al.*, 2013), kuid teadaolevaid mutante, mille VPD-vastus oleks häiritud on vähe: *ost1-3* ning anioonkanalite kolmikmutant *qua1 slac1 slah3* (Jalakas, Nuhkat, *et al.*, 2021). Lisaks leidsid Hsu, Takahashi, *et al.* (2021), et Raf-kinaaside nelikmutandil *m3kδ1/δ5/δ6/δ7* on aeglasem vastus kõrgele VPD-le ning *GHR1* geen toob kõrge VPD vastusesse lisakomponente, mille puudumisel on kõrge VPD regulatsioon häiritud.

Harilikus müürloogas on *ost1-3* ja anioonkanalite kolmikmutandi fenotüüpi arvestades just nemad olulised VPD-vastuses, Raf-kinaaside olulisus seisneb selles, et nemad osalevad OST1 aktivatsioonis, kuid siiski pole leitud, mis toimub eelnevalt VPD signaalrajas.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Sissejuhatuses selgus, et õhulõhede kõrge VPD tingimustes toimuva sulgumisraja komponente pole veel kõiki teada, eriti puudutab see kinaasi OST1 aktiveerumisele eelnevaid etappe. Sellest tulenevalt on minu töö eesmärk leida hariliku müürlooga mutantide hulgast neid, mille kõrge VPD vastus on häiritud. Teisisõnu, leida puuduvaid komponente õhulõhede VPD-toimelises sulgumisrajas. Uurimisalused mutandid olid laborisse tellitud hariliku müürlooga seemnepangast (*Nottingham Arabidopsis Stock Centre*) ja saadud T-DNA insertioonmutageneesiga (Alonso *et al.*, 2003), mutantide tellimisel võeti aluseks antud geeni ekspressioonitase sulgrakkudes (vt tabel 1) eesmärgiga, et kõrgem ekspressioon sulgrakkudes võiks viidata funktsioonile õhulõhede toimimises.

Lisaks õhulõhede kõrge VPD vastuse uurimisele lisati katseskeemi ka uuritavate mutantide õhulõhede sulgumise katse eksogeense ABA toimel. ABA katse lisamine aitab saada paremat pilti mutantide õhulõhede regulatsioonist ning on oluline ka VPD-vastuse kontekstis, sest OST1 aktivatsioon õhulõhede VPD-toimelises sulgumises on (vähemalt osaliselt) ABA poolt vahendatud.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Taimeliinide genotüüpide kontrollimine

Seemnepangast tellitud mutantsete taimeliinidega töötades on rutiinselt esimeseks etapiks genotüüpiseerimine, et kinnitada mutandiliinide õigsust st seda, et ostetud seemnetest kasvanud taimedes tõepoolest vastavas geenis seda katkestav T-DNA insertioon on. Genotüüpiseerimiseks pandi iga mutantse taimeliini taimi maha 10-sse potti ja genotüüpiseeriti neid standardmeetodikat kasutades. Praimerite tegemiseks kasutati veebitööriista [T-DNA Primer Design \(http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html\)](http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html), praimerid on toodud tabelis 1 töö lisas. Genotüüpiseerimist korrati gaasivahetuskatsete lõpus nende taimedega, mille gaasivahetust mõõdeti, et olla kindel genotüüpide õigsuses.

DNA eraldamiseks võeti igalt taimelt 2–3 väiksemat lehte, mis lisati koos DNA eraldamise puhvri ja klaaskuulidega 1,5 ml tuubi. DNA eraldamise puhver sisaldas 100 mM TRIS pH=8,0, 50 mM EDTA ja 500 mM NaCl. Lehed purustati (FastPrep -24, Zymo Research) ja tuubid tsentrifuugiti 15 000 rpm viis minutit. 500 µl supernatandile lisati 500 µl isopropanooli, segati ning tsentrifuugiti uuesti 15 000 rpm viis minutit. Supernatant eemaldati ning DNA-l lasti kuivada, enne kui see 100 µl vees lahustati. Järgnevate protseduurideni hoiti tuube DNA lahustega sügavkülmas -20°C juures.

PCR genotüüpide kontrollimiseks viidi läbi eelnevalt disainitud ja tellitud praimeritega (tabel 2). PCR reaktsioonisegu komponendid olid: vesi, 1x puhver B, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,5 µM praimer 1, 0,5 µM praimer 2, 2 µl eraldatud genoomset DNA-d, 0,05 U/µl DNA polümeraas.

Iga mutandi jaoks viidi genotüüpiseerimine läbi paralleelselt metsiktüüpi taimega. Antud töös kasutatud mutandid olid kõik SALK liinid st pärinesid SALK Instituudist (Alonso *et al.*, 2003), seega mutantsete liinide kindlakstegemiseks oli kasutusel SALK praimer LBb1.3.

Igal taimel viidi läbi reaktsioon nii for ja rev praimeritega kui ka LBb1.3 ja rev praimeritega.

PCR-s kasutati juhendajate poolt soovitatud standardit, mis koosnes järgneva pikkusega faasidest:

95°C kolm minutit,

95°C kümme sekundit,

53°C 20 sekundit,

72°C 90 sekundit,

72°C seitse minutit.

Teist, kolmandat ja neljandat faasi korrati 35 tsükli.

Lõpuks tehti geel-elektroforeesi DNA eraldamiseks fragmentide pikkuste järgi. Agarosgeel oli 1%, puhvriks oli 0,5x TAE ning geelelektroforees toimus pingel 100 V/cm Geelipildid töös uuritud mutantide kohta on esitatud lisas 2.

2.2.2. Kasutatud taimeliinid

Genotüüpiseerimise tulemusel valiti lõpuks edasiseks uurimiseks välja kaheksa õiget mutanti st sellist, milles leidis kinnitust T-DNA insertiooni olemasolu vastavas geenis. Uurimises olnud mutante kirjeldab tabel 1.

Tabel 1. Katses kasutatud mutantide loetelu. Toodud on mutantse geeni identifitseerimine ning tema ekspressioon sulgrakkudes võrreldes mesofüllirakkudega. Suhteline ekspressioon sulgrakkudes on saadud andmebaasi toel (<https://bar.utoronto.ca/>), esitatud number on jagatis: ekspressioon sulgrakkudes/ekspressioon mesofüllis. Toodud on nii tavaoleku kui ABA poolt indutseeritud suhteline ekspressioon sulgrakkudes. Kasutatud andmebaas toetub kahele tööle: Pandey *et al.* (2010) ning Yang *et al.* (2008), erinevused tulemustes tulenevad ilmselt sellest, et kumbki töö ei toetu väga suurele valimile, vastavalt n=3 ja n=2.

Geeni ID	Geen	Pandey <i>et al.</i> (2010)		Yang <i>et al.</i> (2008)	
		ABA-	ABA+	ABA-	ABA+
At1g22770 (N592757)	<i>GIGANTEA</i>	1,62	5,61	1,96	6,80
At2g22240 (N653621)	<i>MYO-INOSITOL-1-PHOSPHATE SYNTHASE 2</i>	14,06	33,00	47,45	16,52
At1g14730 (N674921)	<i>Cytochrome b561/ferric reductase transmembrane protein family</i>	2,97	3,16	17,85	68,97
At1g23710 (N540406)	<i>hypothetical protein (DUF1645)</i>	29,37	16,57	0,82	0,84
At1g77020 (N923478)	<i>DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein</i>	5,60	1,18	191,16	19,17
At4g24130 (N546482)	<i>DUF538 family protein</i>	24,61	5,93	24,16	4,33
At4g37580 (N659008)	<i>HOOKLESS1</i>	5,82	6,00	103,00	30,09
At5g01710 (N656526)	<i>METHYL-TRANSFERASE</i>	7,62	9,38	5,77	5,04

2.2.3. Taimede kasvatamine

Gaasivahetuskatsetes mõõdeti tabelis 1 toodud mutante, lisaks oli igas katses alati vähemalt üks kontroll: kas metsiktüüp Col-0 või negatiivse kontrollina OST1-defitsiitne taim (*ost1-3*), mille puhul on teada, et tema õhulõhed on suhteliselt ABA- ja VPD-tundetud ning reageerivad väheka teistele keskkonnafaktoritele (Merilo *et al.*, 2018, 2013; Mustilli *et al.*, 2002). Hariliku müürlooga seemnete paremaks idanemiseks hoiti neid vees 1,5 ml tuubides +4°C külmkapis vähemalt kaks päeva. Siis külvati 3–5 seemet spetsiaalsesse gaasivahetuspotti, mis oli kaetud klaasiga, mille keskel oli auk taime kasvamiseks. Klaasi mõte on selles, et eraldada gaasivahetuse mõõtmiseks taime maapealne ja -alune osa. Kasvustraat koosnes turbast, vermikuliidist ning veest, mahusuhtes 2 : 1 : 1,5, veele lisati 0,3–0,5 g/l bioloogilise tõrjena laboris rutiinselt kasutatavaid nematoode. Taimede tärkamise järel toimus harvendamine, nii et igasse potti jäi kasvama üks taim. Taimi kasvatati kasvukambrites (SE-41, Percival Scientific), neid kasteti regulaarselt. Kasvutingimused kasvukambrites olid järgmised: suhteline õhuniiskus (RH) päeval 70% ja öösel 75%, temperatuur päeval 23°C ja öösel 19°C (vastavad VPD väärtused on 0,8 kPa ja 0,5 kPa), valgusintensiivsus vastavalt 250 ja 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ päeval ja öösel, ööpäevane valgusrežiim 12 tundi valgust/12 tundi pimedust. Gaasivahetuskatsete ajaks olid taimed 23-27 päeva vanused.

2.2.4. Aparatuur

Gaasivahetuskatsed viidi läbi spetsiaalselt hariliku müürlooga roseti mõõtmiseks projekteeritud ja loodud 8-kambrilise gaasivahetussüsteemiga, mille tööprintsipi on kirjeldatud artiklis (T. Kollist *et al.*, 2007). VPD- ja pimeduskatses kasutati gaasivahetuse mõõtmiseks korraga nelja mõõtekambrit kaheksast, ABA katses mõõdeti paralleelselt kaheksa taime gaasivahetust (joonis 2. Kasutatavate kambrite arv määrab selle, kui tiheda ajasammuga igas üksikus kambris mõõtmisi tehakse: kuna sissemineva (nn referents) õhu mõõtmiseks kulub 30 sekundit ja kambrist väljuva õhu mõõtmiseks samuti 30 sekundit, siis nelja või kaheksat kambrist kasutades saab iga üksiku taime kohta mõõtetulemuse vastavalt iga nelja või kaheksa minuti järel.



Joonis 2. Kaheksa-kambriline aparatuur hariliku müürlooga roseti gaasivahetuse mõõtmiseks. Pildistanud Benelote Uusküla.

Enne mõõtmist täideti võimalikud avad gaasivahetuspotti katva klaasi keskel oleva augu ja taimevarre vahel spetsiaalse vahaga, et tagada hermeetilisus. Kambrite kohal asetsevad lambid reguleeriti sellisele kõrgusele, et valgusintensiivsus kambris oleks sama, mis kasvukambrites kasvu ajal ($250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Mõõtekambri pealmist osa katab kahekihiline klaas, mille vahel on termostaadi abil muudetava temperatuuriga veesein, see võimaldab määrata õhutemperatuuri mõõtekambrites. Antud katsetes oli õhutemperatuur mõõtekambris katse ajal $23,5\text{--}24^\circ\text{C}$. Õhuvoolu kiirus kambris oli katse ajal konstantselt $0,000813 \text{ mol s}^{-1}$.

Aparatuur mõõtis CO_2 ja veeauru kontsentratsioone nii kambrisse sisseminevas kui ka väljaminevas õhus ning mõõtekambri õhutemperatuuri. Transpiratsiooni arvutamiseks on vaja teada veeauru kontsentratsiooni muutust sissemineva ja väljuva õhu vahel, õhuvoolu kiirust ja taimeroseeti pindala. Õhulõhede juhtivus arvutati spetsiaalse programmi abil, kasutades transpiratsiooni ja arvutatud lehetemperatuuri väärtusi (T. Kollist *et al.*, 2007).

2.2.5. Katsete läbiviimine

Esmalt asetati taimed madala VPD tingimustes mõõtekambritesse. Taimed stabiliseerusid ühe tunni, et õhulõhede juhtivus enam ei kõiguks. Temperatuur kambris oli $23,5\text{--}24^\circ\text{C}$, õhuniiskus $62\text{--}80\%$ (vastavad VPD väärtused on $0,6\text{--}1,1$).

VPD katses muudeti peale stabiliseerumisperioodi järsult kõigis mõõtekambrites sissemineva õhu niiskust. Õhulõhede sulgumist vaadeldi 50 minuti jooksul õhuniiskusel 34–42% (vastavad VPD väärtused on 1,7–1,9). Peale katset tehti taimedest nende rosetipindala mõõtmiseks fotod, pindalade leidmiseks kasutati programmi ImageJ (Schneider *et al.*, 2012).

ABA katses võeti stabiliseerimisperioodi lõpus taimed ükshaaval kambri välja vahetult pärast vastava kambri mõõtmist, pritsiti 5 µM ABA lahusega (see protseduur kestis alla 30 sekundi) ja asetati 50 minutiks tagasi mõõtekambrisse. ABA lahuse koostis: 10 ml mQ vett, 5 µl 10 mM ABA, 1,6 µl Silwet L-77 (0,012%). Katse lõpus taimi pildistati.

Pimeduskatse stabiliseerimisperioodi lõpus asetati valguse takistamiseks mõõtekambritele raamatud. Katseperiood oli 40 minutit, peale mida taimedest pildid tehti.

2.2.6. Lehejäljendite tegemine

Lehejäljendite tegemiseks eemaldati peale katsete läbiviimist iga taime kaheksas leht (Farmer *et al.*, 2013). Leht lõigati pooleks, et võtta jäljend nii alumisest kui ka ülemisest poolest. Lehed kaeti hambajäljendi pasta ja kõvendi (Coltene, Zhermack) seguga. Segu kuivamisel eemaldati leht ning jäljend kaeti läbipaistva küünelakiga. Kuivanud küünelakk eemaldati jäljendilt läbipaistva teibiga ning asetati preparaadi alusklaasile. Õhulõhede tiheduse määramiseks filmiti preparaate mikroskoobi (Kern valgusmikroskoop OBF 133C832 koos Kern kaameraga ODC 832) abil 200x suurendusega, filmitava ala suurus oli 0,26 mm². Õhulõhede tiheduse määramiseks kasutati programmi ImageJ, kus erinevate fookustasapindade vahel liikuda sai.

2.2.7. Andmeanalüüs

Esmaseks andmeanalüüsiks kasutati spetsiaalset Exceli programmi, mis mõõdetud veeauru kontsentratsioonidest, õhuvoolu kiirusest, lehe ja mõõtekambri temperatuurist ning taime pindalast lähtuvalt arvutas transpiratsiooni ja G_s väärtused (T. Kollist *et al.*, 2007).

Töötlemiseelsete stabiiloleku õhulõhede juhtivuste väärtuste statistiliste erinevuste hindamiseks genotüüpide vahel kasutati ühefaktorilist ANOVAt ja Tukey HSD testi (Statistica, version 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA)). Korduvmõõtmistega ANOVAt kasutati ühe genotüübi õhulõhede juhtivuse muutuse olulisuse analüüsiks enne ja pärast töötlust. Lisaks arvutati õhulõhede sulgumise iseloomustamiseks esmane ja summaarne sulgumine, vastavalt

Sulgumine 1 ja Sulgumine 2, nende genotüüpidevaheliste erinevuste leidmiseks kasutati ühefaktorilist ANOVAt ja Tukey HSD testi, olulisuse nivooga 0,05.

Esialgse ja summaarse sulgumise arvutamine VPD katses:

$$\text{Sulgumine 1} = G_{s0} - G_{s16},$$

$$\text{Sulgumine 2} = G_{s0} - G_{s48};$$

ABA katses:

$$\text{Sulgumine 1} = G_{s0} - G_{s16},$$

$$\text{Sulgumine 2} = G_{s0} - G_{s40};$$

pimeduskatses:

$$\text{Sulgumine 1} = G_{s0} - G_{s8},$$

$$\text{Sulgumine 2} = G_{s0} - G_{s32}.$$

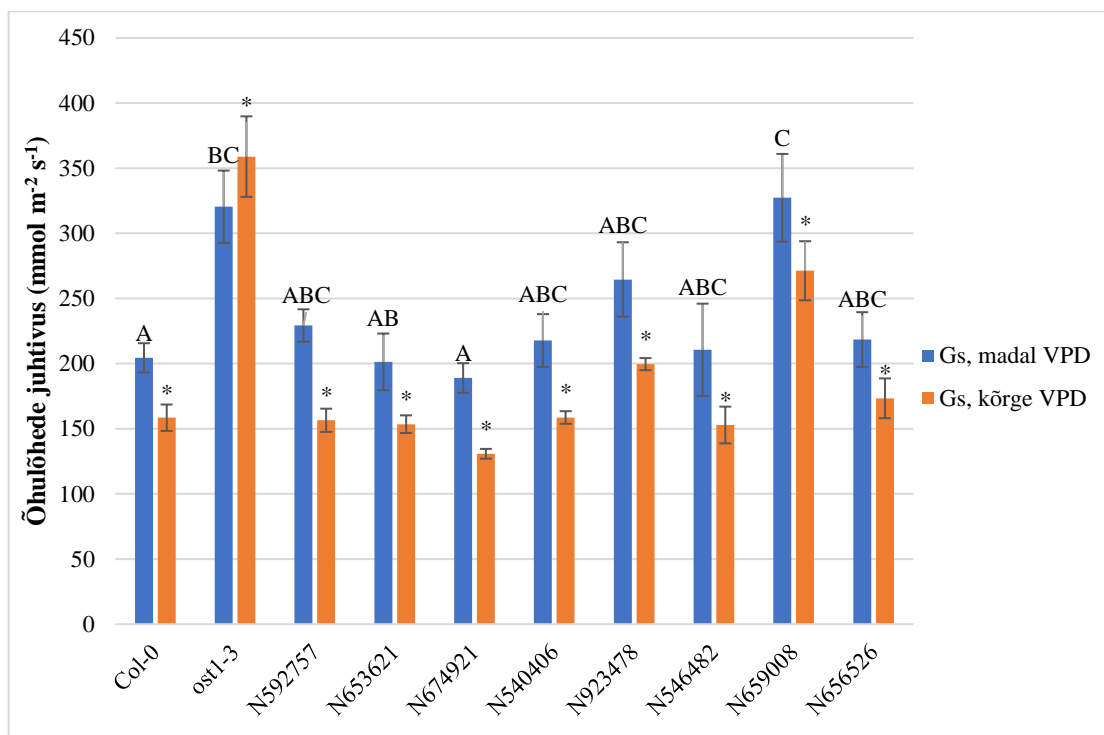
Toodud valemistes tähistab G_{s0} õhulõhede juhtivust vahetult enne vastava mõjufaktori (kõrge VPD, ABA, pimedus) rakendamist ning G_{s8} , G_{s16} , G_{s32} , G_{s40} ja G_{s48} vastavalt õhulõhede juhtivuste väärtusi pärast 8, 16, 32, 40 või 48 minutit rakendatud faktori mõju all olemist. VPD ja ABA katses on Sulgumine 1 arvutamisel rakendatud pikemat ajavahemikku, see tuleneb sellest, et neis katsetes on esimene töötlusjärgne andmepunkt ebausaldusväärne.

2.3. Tulemused

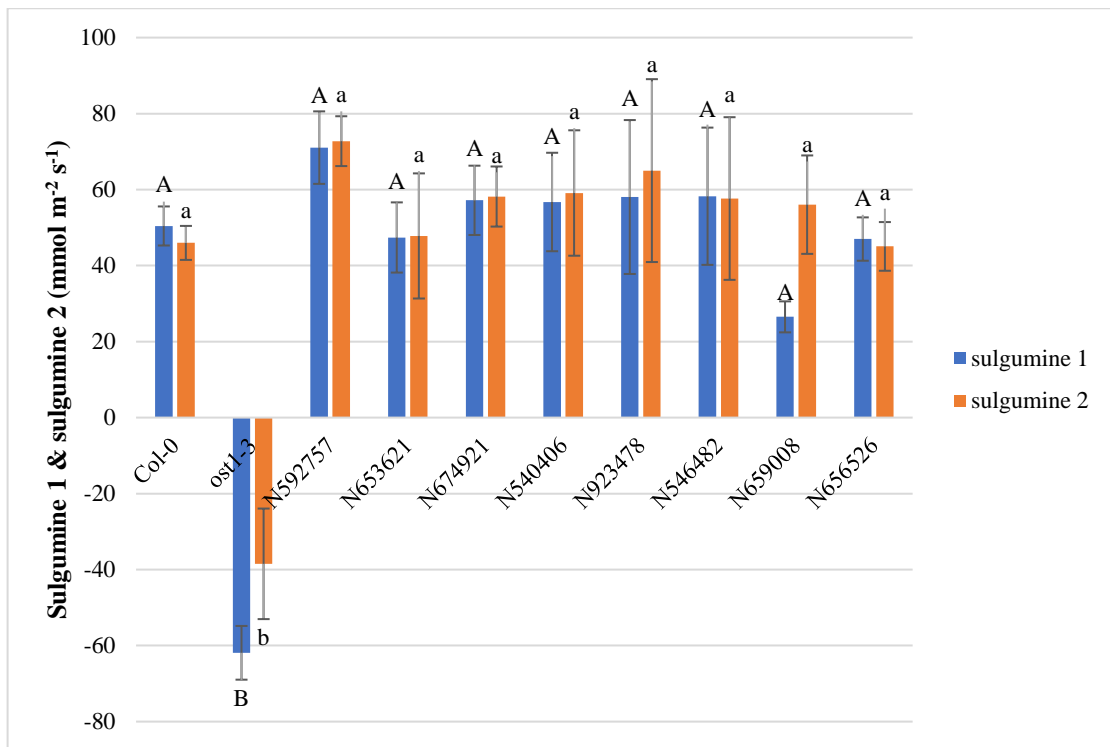
2.3.1. Õhulõhede sulgumine kõrge VPD mõjul

Õhulõhede juhtivused stabiliseerimisperioodi lõpus madala VPD tingimustes varieerusid uuritud taimeliinidel 1,7 korda. Taimeliinide *ost1-3* ja N659008 G_s väärtused olid teistega võrreldes statistiliselt oluliselt kõrgemad, ülejäänute omavahelised erinevused polnud statistiliselt olulised (joonis 3). Kõrge VPD mõjul langes statistiliselt oluliselt kõigi uuritud taimeliinide õhulõhede juhtivus, seda ühe erandiga: *ost1-3* (joonis 3). Viimasel ilmnes hoopis vastupidine: *ost1-3* õhulõhede juhtivus oli kõrge VPD tingimustes statistiliselt oluliselt suurem kui madala VPD tingimustes. Uuritud taimeliinide VPD vastuste võrdlemiseks arvutati õhulõhede esialgne sulgumine ja summaarne sulgumine kõrge VPD tingimustes (Sulgumine 1 ja Sulgumine 2, nagu meetodikaosas kirjeldatud; joonis 4). Ehkki genotüübi N659008 esialgne

sulgumine oli teistega võrreldes väiksem, polnud see erinevus statistiliselt oluline. Taimeliini *ost1-3* puhul ei toimunud kõrges VPD-s mitte õhulõhede sulgumine, vaid avanemine, see erinevus oli teistega võrreldes statistiliselt oluline (joonis 4).



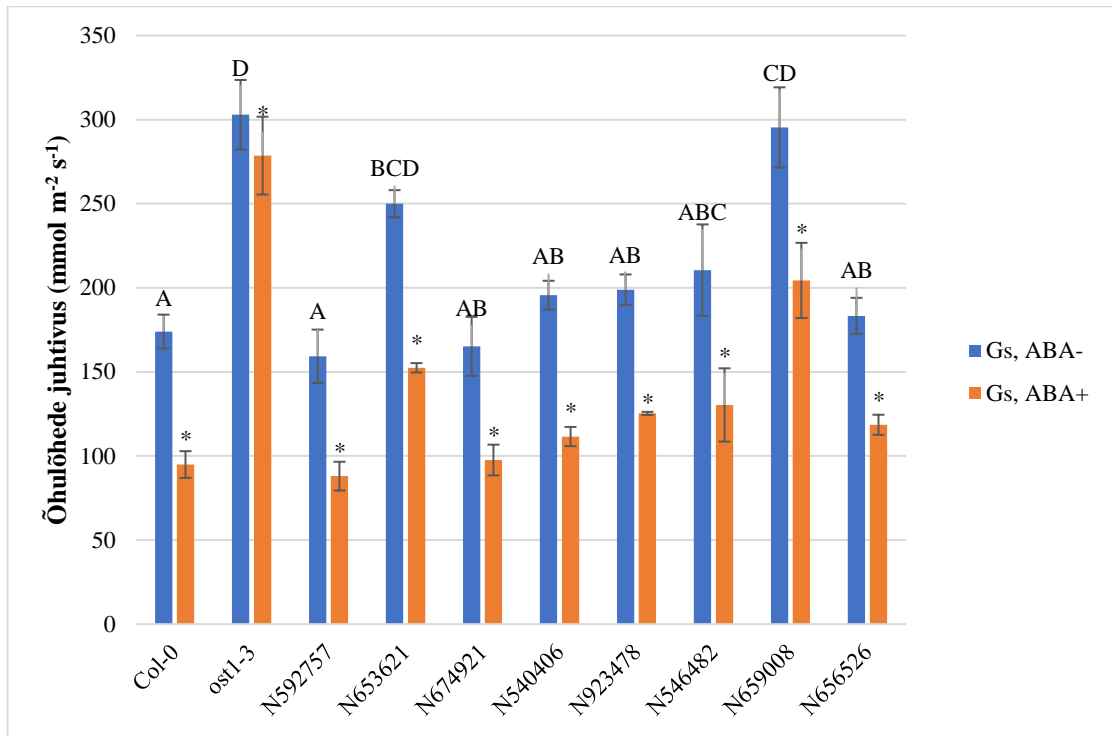
Joonis 3. Hariliku müürlooga metsiktüübi ja mutantide õhulõhede juhtivused stabilisatsiooniperioodi lõpus madala VPD tingimustes ja kõrge VPD töötuse lõpus (keskmine ± standardviga, n=3–7). Erinevad tähed madala VPD G_s väärtuste kohal tähistavad statistiliselt olulisi erinevusi juhtivuste väärtustes taimeliinide vahel (ühefaktoriline ANOVA ja Tukey HSD test), tärnid kõrge VPD juhtivuste väärtuste kohal märgivad olulisi erinevusi sama genotüübi madala ja kõrge VPD tingimustes mõõdetud G_s väärtuste vahel (korduvmõõtmistega ANOVA).



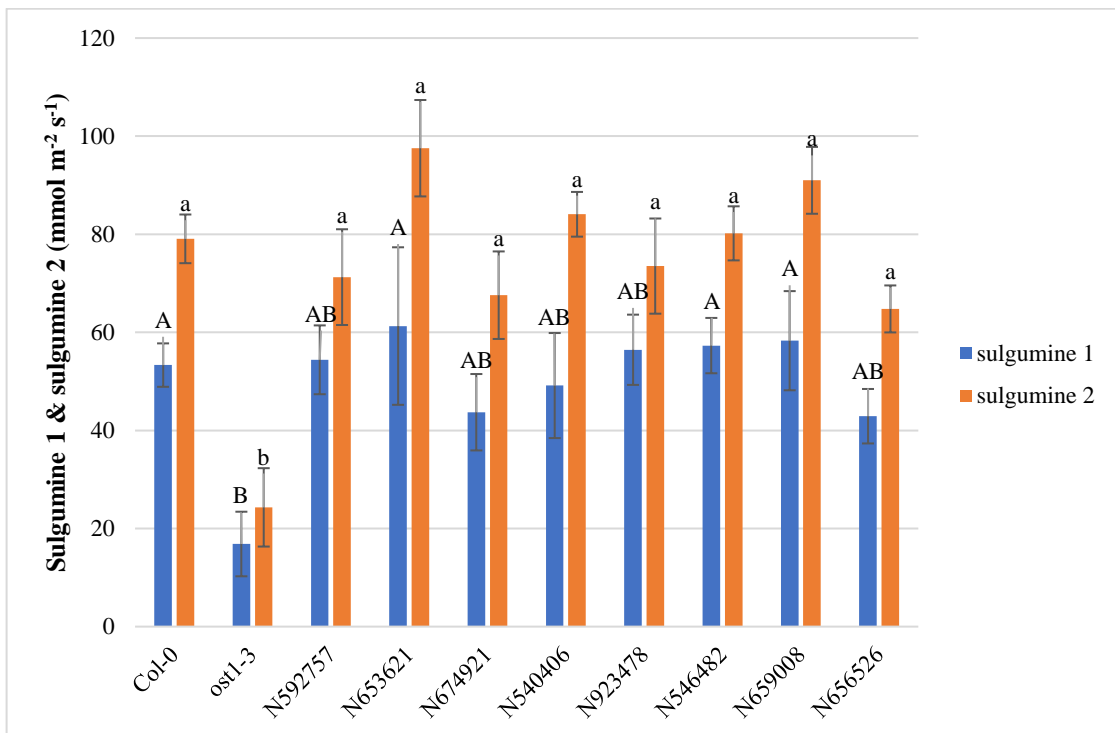
Joonis 4. Hariliku müürlooga metsiktüübi ja mutantide esialgne ja summaarne õhulõhede sulgumine kõrge VPD mõjul (keskmine ± standardviga, n=3–7). Suurtähed esialgse sulgumise (Sulgumine 1) ning väiketähed summaarse sulgumise (Sulgumine 2) kohal näitavad statistiliselt olulisi taimeliinidevahelisi erinevusi antud sulgumises (ühefaktoriline ANOVA ja Tukey HSD test).

2.3.2. Õhulõhede sulgumine ABA-ga pritsides

ABA katses leidsid kinnitust erinevused pritsimiselsetes õhulõhede juhtivuste väärtustes, mis olid teistega võrreldes oluliselt suuremad taimeliinidel *ost1-3* ja N659008. Lisaks neile kahele mõõdeti teistest suurem G_s väärtus ka taimeliinil N653621 (joonis 5). Peale ABA-ga pritsimist langesid statistiliselt oluliselt kõigi uuritud genotüüpide õhulõhede juhtivused (joonis 4). Sarnaselt VPD katsega arvatati ka ABA katses õhulõhede esmased ja summaarsed sulgumised. Õhulõhede esmaste sulgumiste väärtuste võrdlemisel eristus ainult *ost1-3*, mille esmane sulgumine oli teistega võrreldes oluliselt väiksem. Sama tulemus kehtis ka summaarse sulgumise puhul: ABA toimel mõõdeti madalaim summaarne sulgumine genotüübil *ost1-3* (joonis 6).



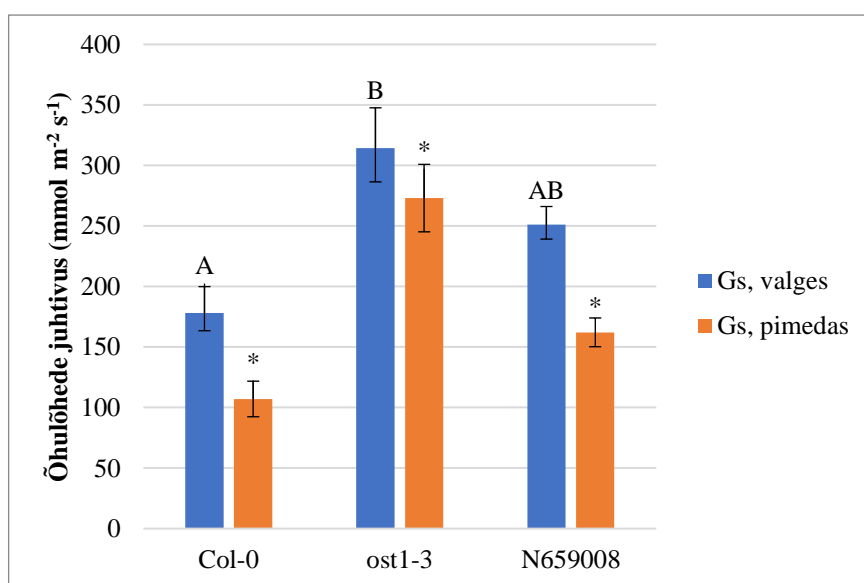
Joonis 5. Hariliku müürlooga metsiktüübi ja mutantide õhulõhede juhtivused stabilisatsiooniperioodi lõpus enne ABA-ga pritsimist ja ABA katse lõpus (keskmine \pm standardviga, $n=3-7$). Erinevad tähed pritsimiseelsete G_s väärtuste kohal tähistavad statistiliselt olulisi erinevusi juhtivuste väärtustes taimeliinide vahel (ühefaktoriline ANOVA ja Tukey HSD test), tärnid ABA-ga pritsitud taimede juhtivuste väärtuste kohal märgivad olulisi erinevusi sama taimeliini ABA-eelse ja ABA-ga töödeldud taimede G_s väärtuste vahel (korduvmõõtmistega ANOVA).



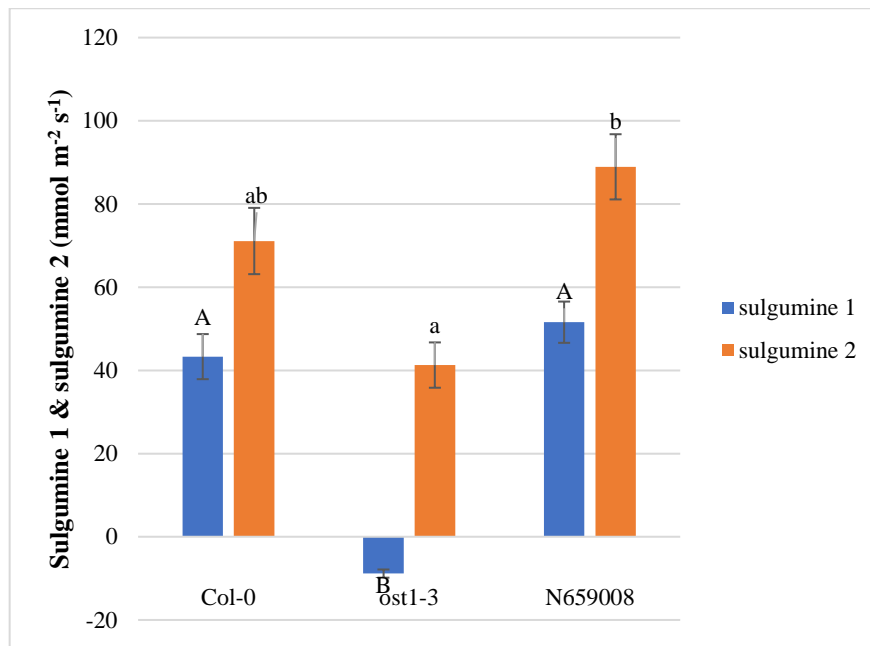
Joonis 6. Hariliku müürlooga metsiktüübi ja mutantide esialgne ja summaarne õhulõhede sulgumine ABA mõjul (keskmine ± standardviga, n=3–7). Suurtähed esialgse sulgumise ning väiketähed summaarse sulgumise kohal näitavad statistiliselt olulisi erinevusi taimeliinide vahel antud sulgumises (ühefaktoriline ANOVA ja Tukey HSD test).

2.3.3. Õhulõhede sulgumine pimedas

Pimeduskatses uuriti, kas mutandil N659008 toimub õhulõhede sulgumine pimedas normaalselt nagu metsiktüübil Col-0 või on tema sulgumine häiritud nagu *ost1-3* oma. N659008 oli ainuke mutant VPD katses, mille õhulõhede juhtivus normaalolekus oli statistiliselt oluliselt kõrgem võrreldes metsiktüübiga – sellest tingitult valiti pimeduskatsesse just tema. Stabiliseerumisperioodi lõpus mõõdeti statistiliselt oluliselt kõrgem G_s genotüübil *ost1-3*. Mutandi N659008 juhtivus polnud metsiktüübist oluliselt erinev. Pimedas langes kõigi taimeliinide juhtivus statistiliselt oluliselt (joonis 7). Esialgse pimedas toimuva sulgumise osas eristus *ost1-3*, mille õhulõhed hoopis avanesid esimestel minutitel pimedas. Summaarne sulgumine varieerus kaks korda, taimeliinide *ost1-3* ja N659008 summaarsed sulgumised pimeduses olid üksteisest statistiliselt oluliselt erinevad (joonis 8).



Joonis 7. Pimeduskatsesse valitud kolme taimeliini õhulõhede juhtivuste väärtused valges ja pimeduskatse lõpus (keskmine ± standardviga, n=3–4). Erinevad tähed stabilisatsiooniperioodi lõpu G_s väärtuste kohal tähistavad statistiliselt olulisi erinevusi juhtivuste väärtustes taimeliinide vahel (ühefaktoriline ANOVA ja Tukey HSD test), tärnid pimeduses hoitud taimede juhtivuste kohal märgivad olulisi erinevusi sama taimeliini valges ja pimedas mõõdetud G_s väärtuste vahel (korduvmõõtmistega ANOVA).



Joonis 8. Hariliku müürlooga valitud taimeliinide õhulõhede sulgumine pimedas (keskmine ± standardviga, n=3–4). Suurtähed esialgse sulgumise ning väiketähed summaarse sulgumise kohal näitavad statistiliselt olulisi taimeliinide vahelisi erinevusi antud sulgumises (ühefaktoriline ANOVA ja Tukey HSD test).

2.3.4. Õhulõhede tihedus valitud liinidel

Mutandil N659008 leiti enamikus katsetes kõrgem õhulõhede juhtivus normaaltingimustel st enne vastava mõjufaktori rakendamist (joonised 3 ja 5). Sellest tulenevalt määrasin õhulõhede tiheduse selle mutandi ja mõlema kontroll-taimeliini jaoks.

Tabel 2. Kolme valitud hariliku müürlooga genotüüpide õhulõhede tihedus (õhulõhet mm⁻²). Leiti lehe keskmine õhulõhede tihedus, keskmistati taimeliinide kaupa ning arvutati standardviga (n=4–5).

Genotüüp	Õhulõhede tihedus
Col-0	172 ± 10
<i>ost1-3</i>	143 ± 10
N659008	135 ± 23

Erinevused keskmises õhulõhede tiheduses taimeliinide vahel ei olnud statistiliselt olulised (tabel 2).

2.4. Arutelu

Antud töö eesmärk oli leida hariliku müürlooga mutantide hulgast neid, mille kõrge VPD vastus on häiritud. Võib eeldada, et õhulõhede sulgumiseks vajalikud geenid on eelistatult ekspresseeritud sulgrakkudes, sellepärast uuriti töös mõnede selliste geenide mutantide vastuseid VPD-le. Katsete käigus leiti, et geen *At4g37580 (HOOKLESS1)* mõjutab G_s-i väärtust normaalolekus. Katsest paistis, et *hookless1* mutandi sulgumine kõrge VPD mõjul on aeglasem, kuid statistiliselt olulist erinevust siin katses ei leitud. Siiski tasuks teha täiendavaid katseid, võrreldes Col-0 ja *hookless1* mutandi sulgumise kineetikat parema lahutusvõimega paariviisilises katses, kus ajapunktide vahed on lühemad. ABA katses ei eristunud *hookless1* sulgumised teistest mutantidest, pimeduskatses sulgusid *hookless1* õhulõhed kaks korda rohkem kui *ost1-3* taimedes, kuid metsiktüüpi taimest *hookless1* õhulõhede sulgumise ulatus ei erinenud. Seega võib väita, et taimedel, millel puudub *HOOKLESS1* geen, on kõrgem õhulõhede juhtivus. Kas selle geeni puudumine tähendab ka häireid abiootiliste tegurite mõjul toimivas õhulõhede regulatsioonis, vajab täiendavaid katseid suurema valimiga.

Õhulõhede juhtivust mõjutavad kaks õhulõhedega seotud tunnust: õhupilu laius ning õhulõhede tihedus. Õhupilu laius mõjutab õhulõhede juhtivust kiiresti, kuid õhulõhede tihedus pikemas ajaskaalas (Jalakas *et al.*, 2018). Kuna töös ei leitud, et *hookless1* õhulõhede tihedus oleks statistiliselt oluliselt suurem metsiktüübi omast, võib arvata, et *hookless1* kõrgem juhtivus on tingitud suuremast õhupilu laiusest. 2014. aastal läbi viidud uurimuses leiti, et *hookless1* õhupilu laius on suurem nii pimedas kui ka valges ning seda ei mõjuta ABA (Grob, 2014). Mainitud töö erineb käesolevas töös ehtud katsest, kus *hookless1* õhulõhed sulgusid ABA toimel metsiktüübi sarnaselt. Erinevused võivad olla tingitud sellest, et Grob (2014) töös mõõdeti õhupilu avatust epidermiribade peal, mitte tervelt lehelt. Õhulõhede sulgumist kõrge CO₂ ja pimeduse tõttu mõjutavad ka lehe mesofüllist saabuvald signaalid (Mott *et al.*, 2008) ja seepärast on võimalik, et eraldatud epidermis ei saa usaldusväärselt õhulõhede sulgumise protsesse uurida.

Mutandi *hookless1* kõrgemat juhtivust võib põhjustada ka suurem kutikulaartranspiratsioon ehk veekaotus lehest olukorras, mil õhulõhed on kinni. Enamasti toimub taimede transpiratsioon läbi õhulõhede ning kutiikula takistab vee aurumist mujalt lehe pinnalt. Küll aga võib kutikulaartranspiratsioon mõnel juhul moodustada kuni 30% summaarsest transpiratsioonist (Boyer *et al.*, 1997). Kutikulaartranspiratsiooni käesolevas töös ei mõõdetud, kuid viidi läbi preliminaarne test lehe toluidiinsinisega värvimisega, mis näitas, et *hookless1* kutiikula võib olla mõnevõrra läbilaskev. Toluidiinsinisega värvimine on rutiinne meetod kutikulaarsete lekete kindlakstegemisel (Tanaka *et al.*, 2004). Seega tuleks *hookless1* võimalikku suuremat

kutikulaartranspiratsiooni kindlasti põhjalikumalt uurida, kasutades ka muid meetodeid lisaks toluiidiinsinisega värvimisele (Jakobson *et al.*, 2016).

Varasemates uuringutes pole *hookless1* õhulõhede regulatsiooni uuritud, välja arvatud eelmainitud doktoritöö, milles mõõdeti õhupilude avatust epidermiribades (Grob, 2014). Küll aga osaleb HOOKLESS1 idanemisel toimuva apikaalse konksu tekke regulatsioonis (Xiong *et al.*, 2023). Kuna HOOKLESS1 on aktiivne oligomeerina, on see vaja sumoüleerida. Sumoüleerimist vahendavad SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) ja SIZ1, mis HOOKLESS1-ga interakteerudes aitavad HOOKLESS1-l oligomeriseeruda. Apikaalse konksu avanemist initseeritakse, kui idanev taim jõuab valguse kätte, HY5 surub maha SIZ1 transkriptsiooni ning selle tõttu väheneb HOOKLESS1 sumoüleerimine (Xiong *et al.*, 2023).

Kuna HOOKLESS1 on seotud valguse ja termomorfogeneesi signaalradadega, siis võib ka õhulõhede suurem juhtivus *hookless1* mutandis nende radadega seotud olla, sest nii valgus kui temperatuur mõjutavad õhulõhede avatust (Kostaki *et al.*, 2020).

Ülejäänud seitsme uurimisse kaasatud mutandi puhul ei leitud õhulõhede juhtivuse ega VPD-ning ABA-toimelise sulgumise osas statistiliselt olulisi muutusi võrreldes metsiktüübiga. Ainuke erinevus oli genotüübil N653621, millel oli enne ABA katset kõrgem juhtivus. See võis olla väikesest valimist tingitud juhuslik muutus, sest VPD katses ei leidnud kõrgem normaaloleku juhtivus kinnitust. Seega võib öelda, et andmebaasidest leitud kõrgem sulgrakuspetsiifiline ekspressioon (tabel 1) ei tähenda veel, et antud geen/valk on olulise funktsiooniga õhulõhede regulatsioonis. Sellel võib olla mitu põhjust: 1) Pandey *et al.* (2010) ja Yang *et al.* (2008) artiklites, kust saadi ekspressiooni tasemed, ei olnud väga suur valim, mistõttu esines ka neis kahes artiklis lahknevusi; 2) oluliste funktsioonide puhul esinevad kompensatsioonimehhanismid ja sarnase funktsiooniga valgud, mistõttu üksikmutantide uurimine ei pruugi õhulõhede regulatsiooni fenotüüpi paljastada. Näiteks arvestades ABA väga olulist rolli taimes, on tema retseptoreid harilikus müürloogas kokku 14 ja fenotüüpide nägemiseks on vaja mitmikmutante (Cutler *et al.*, 2010; Gonzalez-Guzman *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). Teise näitena oli B3 perekonna Raf-kinaaside rolli kinnitamiseks õhulõhede VPD-vastuses vaja Raf-kinaaside nelikmutanti (Hsu, Dubeaux, *et al.*, 2021).

Töös selgus, et OST1 puudumine taimes põhjustab tugevat häiritust õhulõhede sulgumises abiootiliste signaalide mõjul ning kaasneb kõrgem õhulõhede juhtivus, nagu ka varasemates töödes leitud. VPD katses leidis kinnitust see, et OST1 tagab õhulõhede aktiivse sulgumise kõrges VPD-s - selle valgu puudumisel õhulõhed kõrges VPD-s ei sulgunud. Lisaks osaleb

OST1 õhulõhede sulgumises ABA mõjul ning pimedas, nagu leitud varasemates töödes (Mustilli *et al.*, 2002; Merilo *et al.*, 2018; Jalakas, Takahashi, *et al.*, 2021).

Gaasivahetuskatsete käigus ei leitud valitud mutantide seast ühtki sellist, millel oleks õhulõhede VPD-toimeline vastus statistiliselt oluliselt häiritud, kuid tuvastati üks taimeliin, *hookless1*, millel mõõdeti kõrgem õhulõhede juhtivus normaalolekus. Kas *hookless1* kõrgemat juhtivust põhjustab kõrgem kutikulaarjuhtivus või metsiktüübist erinev õhupilu avatuse regulatsioon, vajab veel uurimist. Edaspidi võiks sulgrakkudes rikastatud ekspressiooniga mutantide skriinimisel läbi viia kutikulaarjuhtivuse mõõtmise või hindamise testid (toluidiinsinisega värvimine, gaasivahetuskatsed kutikulaarjuhtivuse mõõtmiseks).

KOKKUVÕTE

Kliima soojenemisega kaasneb õhu niiskusevajaku (VPD) tõus. Kõrges VPD-s on õhk kuiv, evaporaatiivne surve kasvab ning taimed peavad liigset veekaotust reguleerima õhulõhedega. Õhulõhede sulgumine kõrges VPD-s toimub harilikus müürloogas pigem aktiivselt, ehkki õistaimedes võib toimuda ka passiivne protsess. Aktiivses VPD-vastuses on tähtsal kohal kinaas OST1, mis aktiveerub ABA-sõltuvalt või ABA-sõltumatult. Mis toimub VPD signaalrajas õhulõhede sulgemisel enne OST1 valgu aktiveerumist, pole veel täpselt teada. Selle välja selgitamiseks uuriti mudeltaime hariliku müürlooga mutante, milles oli puudu mõne sulgrakkudes kõrge ekspressioonitasemega geeni funktsioon, et näha, kas antud geen/valk mõjutab õhulõhede juhtivust või õhulõhede kõrge VPD-toimelist vastust. Gaasivahetuskatsetes mõõdeti õhulõhede juhtivust kõrge VPD, ABA-ga pritsimise ning pimeduse mõjul. Igas katses oli lisaks uuritavatele mutantidele metsiktüüp Col-0 või negatiivne kontroll *ost1-3*.

VPD katsetest leiti üks mutant, *hookless1*, mille juhtivus oli normaaltingimustel statistiliselt oluliselt kõrgem kui teistel mutantidel. Esialgne sulgumine kõrge VPD mõjul *hookless1* mutandis tundus väiksem, kuid polnud siiski statistiliselt oluliselt metsiktüübist erinev.

ABA katses oli enne töötlust lisaks *hookless1*-le kõrgem juhtivus ka teisel mutandil (taimeliin N653621), kuid tegu võis olla väiksest valimist tingitud erisusega. ABA-ga pritsimisel langes statistiliselt oluliselt kõigi genotüüpide juhtivus, õhulõhede sulgumise ulatuse osas eristus teistest vaid negatiivne kontroll *ost1-3*.

Peale kahte eelnimetatud katset viidi edasised uuringud läbi vaid Col-0, *ost1-3* ja *hookless1*-ga. Kõige rohkem sulgusid pimeduse mõjul õhulõhed *hookless1*-l. Valitud kolmel taimeliinil määrati ka õhulõhede tihedus, kuid taimeliinide vahelised erinevused ei olnud statistiliselt olulised.

Katsete käigus leiti, et geeni *HOOKLESS1* puudumine põhjustab kõrgemat õhulõhede juhtivust normaalolekus. Kuna *hookless1* õhulõhede tihedus polnud teistest statistiliselt oluliselt erinev, võib kõrgemat juhtivust põhjustada hoopis suurem õhulõhe avatus. Teine võimalus on *hookless1* suurenenud kutikulaartranspiratsioon, millele viitab ka preliminaarne lehtede toluidiinsinisega värvimise tulemus. Mutandi *hookless1* edasisel uurimisel tuleks läbi viia suurema valimiga gaasivahetuskatsed, et kontrollida erinevate abiootiliste mõjufaktorite toimelist õhulõhede sulgumist, mikroskoobikatse õhupilu laiuse välja selgitamiseks ning kutikulaartranspiratsiooni mõõtmiseks gaasivahetuskatsed.

Kuna ühelgi uuritud mutandil ei leitud häireid kõrge VPD toimelises õhulõhede sulgumises, siis tuleb jätkata otsinguid õhulõhede VPD regulatsioonis osalevate geenide leidmiseks ja nende rolli iseloomustamiseks, et paremini mõista, kuidas taimed tuleviku kliimatingimustele reageerivad. Nimetatud teadmisel on ka praktiline rakendus sordiaretuse jaoks.

SUMMARY

Climate change is associated with rising VPD (the difference between the saturation and actual air vapor pressure) levels. Since evaporative demand is higher in high VPD conditions, plants need to close their stomata to avoid excessive water loss under high VPD. Stomatal closure under high VPD occurs actively in *Arabidopsis*, but angiosperms can also show passive VPD-induced stomatal closure. OST1 is important in active VPD signalling, activating either ABA-dependently or ABA-independently. The components that lead to OST1 activation in the stomatal VPD signalling pathway are unknown. *Arabidopsis thaliana* mutants deficient in genes that have a higher expression level in guard cells compared to mesophyll cells were studied to see if the respective genes affect stomatal conductance or stomatal VPD-response. Gas-exchange experiments were conducted and stomatal response measured due to high VPD, exogenous ABA and darkness. Every experiment included wild-type Col-0 or *ost1-3* as a negative control.

The mutant *hookless1* was found in the VPD experiments, it had high steady-state stomatal conductance. Stomatal VPD-induced closure of *hookless1* also seemed to be reduced compared with Col-0, however, this difference was not statistically significant.

In addition to *hookless1*, another mutant (line N653621) also had a higher pre-treatment conductance in ABA experiment, but this difference might be due to a small sample size and was not confirmed in VPD experiment. The reduction of stomatal conductance of all plants lines was statistically significant after treatment with ABA, only *ost1-3* stomatal closure was less than in others.

Following the two aforementioned experiments, additional tests were done with Col-0, *ost1-3* and *hookless1*. The *hookless1* stomata closed the most in the darkness experiment. Stomatal density was determined, no statistically significant differences between plant lines were found. Preliminary tests with toluidine blue staining of leaves showed that *hookless1* cuticle might be slightly more permeable compared to Col-0. This can cause a higher water loss in *hookless1* mutant.

This study shows that the absence of the *HOOKLESS1* gene causes a higher steady-state stomatal conductance and possibly slows down VPD-mediated stomatal closure, although this needs further analysis. Since the stomatal density of *hookless1* was not higher than that of Col-0 or *ost1-3*, it is possible that the higher stomatal conductance of *hookless1* might be caused by

a larger stomatal aperture width. Second option is that *hookless1* has a higher cuticular transpiration. Further experiments with *hookless1* must be conducted with a larger sample size to measure the effects of abiotic factors on stomatal conductance, microscopic measurements of stomatal aperture width have to be carried out, and additional gas-exchange experiments are needed to measure cuticular transpiration.

Since none of the studied mutants showed statistically significant impairments in stomatal high VPD response, the hunt for missing components in the stomatal VPD-induced closure pathway needs to continue. These studies serve to understand how plants will adapt in the future climatic conditions and assist in plant breeding.

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin tänada oma juhendajat Ebe Merilod, kes oli väga toetav ning aitas töö igas etapis. Samuti tänan juhendajat Hanna Hõrakut, kes erinevate katsete puhul õpetussõnu jagas. Suured tänud ka teistele laboris meeldiva õhkkonna eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- 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., & others.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, *301*(5633), 653–657.
- Boyer, J. S., Wong, S. C., & Farquhar, G. D.** (1997). CO₂ and water vapor exchange across leaf cuticle (epidermis) at various water potentials. *Plant Physiology*, *114*(1), 185–191.
- Brodribb, T. J., & McAdam, S. A.** (2011). Passive origins of stomatal control in vascular plants. *Science*, *331*(6017), 582–585.
- Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., & Abrams, S. R.** (2010). Abscisic acid: Emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology*, *61*, 651–679.
- Driesen, E., Van den Ende, W., De Proft, M., & Saeys, W.** (2020). Influence of environmental factors light, CO₂, temperature, and relative humidity on stomatal opening and development: A review. *Agronomy*, *10*(12), 1975.
- Fanourakis, D., Heuvelink, E., & Carvalho, S. M.** (2013). A comprehensive analysis of the physiological and anatomical components involved in higher water loss rates after leaf development at high humidity. *Journal of Plant Physiology*, *170*(10), 890–898.
- Farmer, E., Mousavi, S., & Lenglet, A.** (2013). *Leaf numbering for experiments on long distance signalling in Arabidopsis*.
- Ficklin, D. L., & Novick, K. A.** (2017). Historic and projected changes in vapor pressure deficit suggest a continental-scale drying of the United States atmosphere. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, *122*(4), 2061–2079.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K. A., & others.** (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.

- 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., & others.** (2012). Arabidopsis PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. *The Plant Cell*, 24(6), 2483–2496.
- Grob, H.** (2014). *AtMRP5/AtABCC5-An Inositolhexakisphosphate Transporter Interacts with Hookless 1, a Protein Involved in Ethylene Signaling* [PhD Thesis]. University of Zurich.
- Hetherington, A. M.** (2001). Guard cell signaling. *Cell*, 107(6), 711–714.
- Hetherington, A. M., & Woodward, F. I.** (2003). The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, 424(6951), 901–908.
- Hõrak, H.** (2017). *Identification of key regulators of stomatal CO₂ signalling via O₃-sensitivity* [PhD Thesis]. Tartu University.
- Hsu, P.-K., Dubeaux, G., Takahashi, Y., & Schroeder, J. I.** (2021). Signaling mechanisms in abscisic acid-mediated stomatal closure. *The Plant Journal*, 105(2), 307–321.
- Hsu, P.-K., Takahashi, Y., Merilo, E., Costa, A., Zhang, L., Kernig, K., Lee, K. H., & Schroeder, J. I.** (2021). Raf-like kinases and receptor-like (pseudo) kinase GHR1 are required for stomatal vapor pressure difference response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(47), e2107280118.
- Imes, D., Mumm, P., Böhm, J., Al-Rasheid, K. A., Marten, I., Geiger, D., & Hedrich, R.** (2013). Open stomata 1 (OST 1) kinase controls R-type anion channel QUAC 1 in Arabidopsis guard cells. *The Plant Journal*, 74(3), 372–382.
- Jakobson, L., Lindgren, L. O., Verdier, G., Laanemets, K., Brosché, M., Beisson, F., & Kollist, H.** (2016). BODYGUARD is required for the biosynthesis of cutin in Arabidopsis. *New Phytologist*, 211(2), 614–626.

- Jalakas, P., Merilo, E., Kollist, H., & Brosché, M.** (2018). ABA-mediated regulation of stomatal density is OST 1-independent. *Plant Direct*, 2(9), e00082.
- Jalakas, P., Nuhkat, M., Vahisalu, T., Merilo, E., Brosché, M., & Kollist, H.** (2021). Combined action of guard cell plasma membrane rapid-and slow-type anion channels in stomatal regulation. *Plant Physiology*, 187(4), 2126–2133.
- Jalakas, P., Takahashi, Y., Waadt, R., Schroeder, J. I., & Merilo, E.** (2021). Molecular mechanisms of stomatal closure in response to rising vapour pressure deficit. *New Phytologist*, 232(2), 468–475.
- Kerstiens, G.** (1997). In vivo manipulation of cuticular water permeance and its effect on stomatal response to air humidity. *The New Phytologist*, 137(3), 473–480.
- Kollist, H., Jossier, M., Laanemets, K., & Thomine, S.** (2011). Anion channels in plant cells. *The FEBS Journal*, 278(22), 4277–4292.
- Kollist, T., Moldau, H., Rasulov, B., Oja, V., Rämna, 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. *Physiologia Plantarum*, 129(4), 796–803.
- Kostaki, K.-I., Coupel-Ledru, A., Bonnell, V. C., Gustavsson, M., Sun, P., McLaughlin, F. J., Fraser, D. P., McLachlan, D. H., Hetherington, A. M., Dodd, A. N., & others.** (2020). Guard cells integrate light and temperature signals to control stomatal aperture. *Plant Physiology*, 182(3), 1404–1419.
- López, J., Way, D. A., & Sadok, W.** (2021). Systemic effects of rising atmospheric vapor pressure deficit on plant physiology and productivity. *Global Change Biology*, 27(9), 1704–1720.
- 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(5930), 1064–1068.

- McAdam, S. A., & Brodribb, T. J.** (2014). Separating active and passive influences on stomatal control of transpiration. *Plant Physiology*, *164*(4), 1578–1586.
- McAdam, S. A., & Brodribb, T. J.** (2015). The evolution of mechanisms driving the stomatal response to vapor pressure deficit. *Plant Physiology*, *167*(3), 833–843.
- Merilo, E., Laanemets, K., Hu, H., Xue, S., Jakobson, L., Tulva, I., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, P. L., Schroeder, J. I., Broschè, M., & others.** (2013). PYR/RCAR receptors contribute to ozone-, reduced air humidity-, darkness-, and CO₂-induced stomatal regulation. *Plant Physiology*, *162*(3), 1652–1668.
- Merilo, E., Yarmolinsky, D., Jalakas, P., Parik, H., Tulva, I., Rasulov, B., Kilk, K., & Kollist, H.** (2018). Stomatal VPD response: There is more to the story than ABA. *Plant Physiology*, *176*(1), 851–864.
- Mott, K. A., Sibbernsen, E. D., & Shope, J. C.** (2008). The role of the mesophyll in stomatal responses to light and CO₂. *Plant, Cell & Environment*, *31*(9), 1299–1306.
- Mustilli, A.-C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F., & 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.
- Pandey, S., Wang, R.-S., Wilson, L., Li, S., Zhao, Z., Gookin, T. E., Assmann, S. M., & Albert, R.** (2010). Boolean modeling of transcriptome data reveals novel modes of heterotrimeric G-protein action. *Molecular Systems Biology*, *6*(1), 372.
- Park, S.-Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T. F., & others.** (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, *324*(5930), 1068–1071.
- Raghavendra, A. S., Gonugunta, V. K., Christmann, A., & Grill, E.** (2010). ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science*, *15*(7), 395–401.

- 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. *The Plant Journal*, 32(1), 65–75.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W.** (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.
- Shimazaki, K., Doi, M., Assmann, S. M., & Kinoshita, T.** (2007). Light regulation of stomatal movement. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 219–247.
- Tanaka, T., Tanaka, H., Machida, C., Watanabe, M., & Machida, Y.** (2004). A new method for rapid visualization of defects in leaf cuticle reveals five intrinsic patterns of surface defects in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 37(1), 139–146.
- Vicente-Serrano, S. M., Nieto, R., Gimeno, L., Azorin-Molina, C., Drumond, A., El Kenawy, A., Dominguez-Castro, F., Tomas-Burguera, M., & Peña-Gallardo, M.** (2018). Recent changes of relative humidity: Regional connections with land and ocean processes. *Earth System Dynamics*, 9(2), 915–937.
- Xiong, J., Yang, F., Wei, F., Yang, F., Lin, H., & Zhang, D.** (2023). Inhibition of SIZ1-mediated SUMOylation of HOOKLESS1 promotes light-induced apical hook opening in Arabidopsis. *The Plant Cell*, koad072.
- Yang, Y., Costa, A., Leonhardt, N., Siegel, R. S., & Schroeder, J. I.** (2008). Isolation of a strong Arabidopsis guard cell promoter and its potential as a research tool. *Plant Methods*, 4(1), 1–15.
- Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F., & Shinozaki, K.** (2006). The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(8), 5310–5318.

Yuan, W., Zheng, Y., Piao, S., Ciais, P., Lombardozzi, D., Wang, Y., Ryu, Y., Chen, G., Dong, W., Hu, Z., & others. (2019). Increased atmospheric vapor pressure deficit reduces global vegetation growth. *Science Advances*, 5(8), eaax1396.

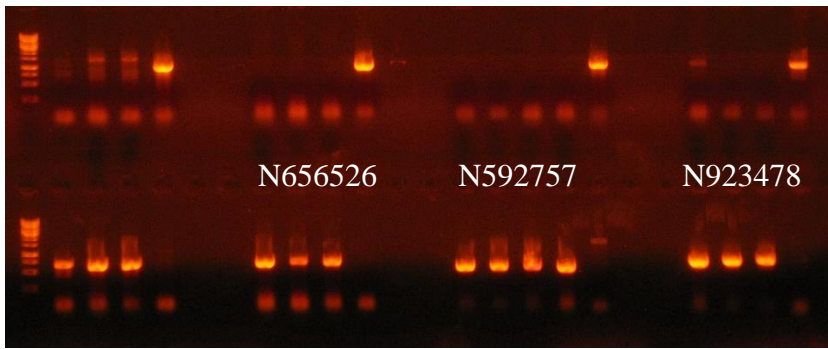
LISAD

Lisa 1

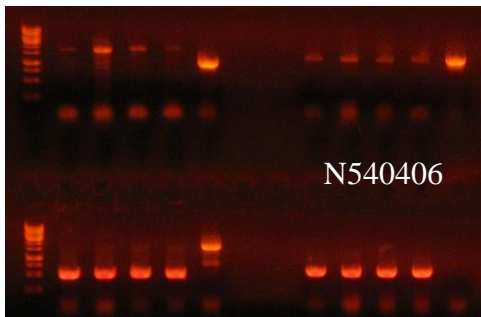
Tabel 1. Kasutatud praimerite järjestused, praimerite disainiks kasutati [T-DNA Primer Design](http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html) (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) andmebaasi.

Praimeri nimi	Järjestus
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
N592757-for	TTTTTCCCGAATCATTGATG
N592757-rev	ATCCAGCCTTAGGCTCTGAAG
N653621-for	ATGGATCAACACTAACCGCTG
N653621-rev	CTCACAATCGAAGTAGGCTGC
N674921-for	GAATCTCTCAGGGGATCGAAC
N674921-rev	GTAGCTCTCTGCATGAGTCCG
N540406-for	CCACTATTTCCCTCAGCCCATC
N540406-rev	GTGAAGAACCCGACTTGTTTG
N923478-for	CGGTTACTCTCTTCTTGCAGC
N923478-rev	GTGTCACTCCCTCTGCTTCTG
N546482-for	TGTTTGGGAGAAGATGAATCG
N546482-rev	TTGCTTCATCCAAACGTAACC
N659008-for	GGTTTGGCCACAAAGAAAAG
N659008-rev	TATTCGGAGTTTCGTACACCG
N656526-for	TTCAACAATCATAGCCTCGC
N656526-rev	CTGACAAAGCCTTTCACGAAG

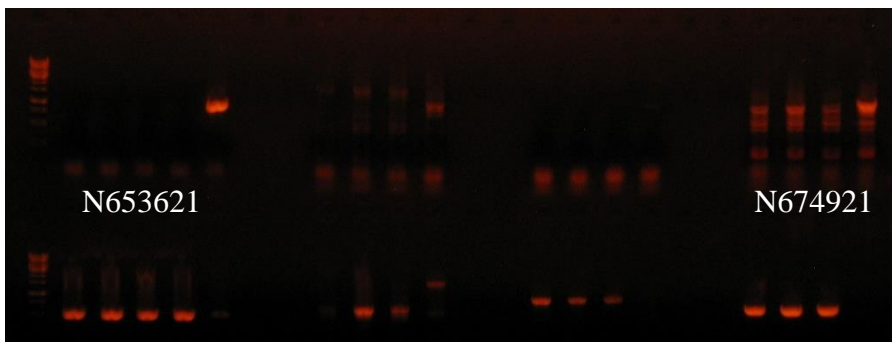
Lisa 2



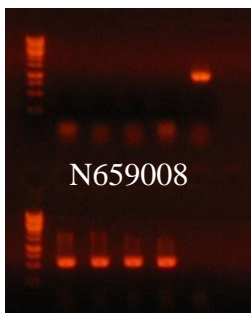
Joonis 1. Taimeliinide N656526, N592757, N923478 geelipilt. Ülemises reas kasutati vastavaid for ja rev praimereid, alumises reas LBb1.3 ja rev praimereid. Iga taimeliini kohta lisati viimasesse kaevu kontrollina metsiktüüpi taime DNA-d. Pildistas Benelote Uusküla.



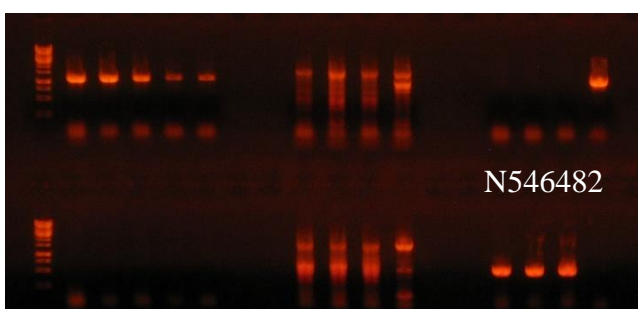
Joonis 2. Taimeliini N540406 geelipilt. Ülemises reas kasutati vastavaid for ja rev praimereid, alumises reas LBb1.3 ja rev praimereid. Iga taimeliini kohta lisati viimasesse kaevu kontrollina metsiktüüpi taime DNA-d. Pildistas Benelote Uusküla.



Joonis 3. Taimeliinide N653621, N674921 geelipilt. Ülemises reas kasutati vastavaid for ja rev praimereid, alumises reas LBb1.3 ja rev praimereid. Iga taimeliini kohta lisati viimasesse kaevu kontrollina metsiktüüpi taime DNA-d. Pildistas Benelote Uusküla.



Joonis 4. Taimeliini N659008 geelipilt. Ülemises reas kasutati vastavaid for ja rev praimereid, alumises reas LBb1.3 ja rev praimereid. Iga taimeliini kohta lisati viimasesse kaevu kontrollina metsiktüüpi taime DNA-d. Pildistas Benelote Uusküla.



Joonis 5. Taimeliini N546482 geelipilt. Ülemises reas kasutati vastavaid for ja rev praimereid, alumises reas LBb1.3 ja rev praimereid. Iga taimeliini kohta lisati viimasesse kaevu kontrollina metsiktüüpi taime DNA-d. Pildistas Benelote Uusküla.

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Benelote Uusküla,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) minu loodud teose

Kinaasist OST1 sõltuv õhulõhede sulgumine kuivas õhus: jaht puudevatele komponentidele signaalrajas,

mille juhendajad on Ebe Merilo 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 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Benelote Uusküla

29.05.2023