

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

**Tundmatu geeni (*PUSA*) ja *CYP707A3* toime iseloomustamine hariliku müürlooga
(*Arabidopsis thaliana*) taimedes**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Madli Johanna Veigel

Juhendaja MSc Ingmar Tulva

TARTU 2025

INFOLEHT

Tundmatu geeni (*PUSA*) ja *CYP707A3* toime iseloomustamine hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) taimedes

Taimedel on gaasivahetuseks lehtede pinnal õhulõhed, mida on võimalik liigse veekaotuse kontrollimiseks sulgeda. Õhulõhede sulgumiseks on oluline taimehormoon abstsiiishape (ABA). Käesolevas töös uuriti abstsiiishappe lagundamiseks vajalikku *CYP707A3* geeni ja tundmatu, mutantsel fenotüübil põhineva esmase nimetusega *PUSA* geeni toimet hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) taimedes. Tundmatu *PUSA* geen avastati ja eraldati varasemalt ühest häirunud *CYP707A3* geeni sisaldavast taimeliinist (SALK_078173), millel oli silmapaistev fenotüüp, mistõttu sooviti teada saada, kumma geeni häirumisest on põhjustatud SALK_078173 fenotüüp. Saadi teada, et *CYP707A3* geeni toime oli uuritud taimeliinides madal ning tundmatu *PUSA* geen on oluline taimede kasvamiseks. Samuti selgus, et SALK_078173 fenotüüpi põhjustas tundmatu *PUSA* geeni häirumine.

ABA, *CYP707A3*, *Arabidopsis*, õhulõhe, areng

CERCS: B225, Taimeneetika

Functional characterization of an unidentified gene (*PUSA*) and *CYP707A3* in *Arabidopsis thaliana*

For the purpose of gas exchange, plants are equipped with stomata on the surface of leaves, that can be closed for minimizing water loss. A plant hormone called abscisic acid (ABA) is very important for stomatal closure. In this thesis, the function of *CYP707A3*, important for the breakdown of ABA, and an unknown gene, temporarily named *PUSA* based on the mutated phenotype, was researched in *Arabidopsis thaliana*. The unknown *PUSA* was previously discovered and isolated from a plant line with mutated *CYP707A3* (SALK_078173). Due to this, the last aim of this study was to find out which defected gene caused the phenotype of SALK_078173. The results showed that *CYP707A3* effect was low and *PUSA* gene is important for plant growth in the used plant lines. SALK_078173 phenotype was caused by a mutation in *PUSA* gene.

ABA, *CYP707A3*, *Arabidopsis*, stoma, development

CERCS: B225, Plant genetics

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Abstiishape taimedes.....	8
1.2. Veekaotuse kontroll	10
1.2.1. Õhulõhede sulgumine ja avanemine.....	12
1.3. Abstiishappe ja <i>CYP707A</i> geenide roll taime funktsioneerimises ja arengus	13
1.3.1. Abstiishappe vahendatud õhulõhede sulgumine	13
1.3.2. <i>CYP707A</i> geenid.....	13
1.3.3. Abstiishappe olulisus taime arengus	14
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	16
2.1. Töö eesmärgid.....	16
2.2. Materjal ja meetodika.....	17
2.2.1. Kasutatud taimeliinid.....	17
2.2.2. Taimede kasvatamine.....	18
2.2.3. Kutiikulakatsed.....	20
2.2.4. Õhulõhede juhtivuse mõõtmine.....	21
2.2.5. Lehejäljendite tegemine	21
2.2.6. Veekaotuskatse	22
2.2.7. Taimeroseettide kuivatamine	22
2.2.8. Õhulõhede tiheduse määramine	22
2.2.9. Statistiline analüüs.....	23
2.3. Tulemused.....	24
2.3.1. Kutiikula terviklikkuse hindamine	24
2.3.2. Taimede haabitus	25
2.3.3. Õhulõhede juhtivus ja juhtivuste suhe	25
2.3.4. Veekaotus	26
2.3.5. Õhulõhede tihedus ja tiheduste suhe	27
2.3.6. Roseti kuivmass ning seos õhulõhede summaarse tihedusega.....	29
2.3.7. Lehe mass pindala kohta.....	32
2.4. Arutelu	34
2.4.1. Järeldused.....	39
KOKKUVÕTE	40

RESÜMEE.....	41
TÄNUSÕNAD.....	42
KIRJANDUSE LOETELU	43
LISAD	51
LISA 1	51
LISA 2	52
LISA 3	53
LIHTLITSENTS	54

KASUTATUD LÜHENDID

AAO3 – ABSCISIC ALDEHYDE OXIDASE 3, abstsiihappe tootmiseks vajalik ensüüm

ABA – *abscisic acid*, abstsiihappe, oluline taimehormoon veekaotuse reguleerimiseks

ABA2 – ABSCISIC ACID DEFICIENT 2, abstsiihappe biosünteesis osalev ensüüm

ABA-GE – abstsiihappe glükosüülester, abstsiihappe inaktiivne, konjugeeritud vorm

BDG – BODYGUARD, kutiikula moodustumises osalev valk

BG1 – beeta-glükosidaas 1, muudab abstsiihappe glükosüülestri aktiivseks abstsiihappeks

BG2 – beeta-glükosidaas 2, muudab abstsiihappe glükosüülestri aktiivseks abstsiihappeks

Col-0 – mudelorganism hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) Columbia ökotüüp, metsiktüüp

CYP707A – CYTOCHROME P450, FAMILY 707, SUBFAMILY A; abstsiihappe lagundamises osalevad ensüümid

DPA – *dihydrophaseic acid*, dihidrofaseiinhape, abstsiihappe lagundamise lõpp-produkt

EPF1 – EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 1, õhulõhede arengut kontrolliv signaalpeptiid

EPF2 – EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2, õhulõhede arengut kontrolliv signaalpeptiid

GORK – GUARD CELL RECTIFYING K⁺ CHANNEL, kaaliumioonide väljavoolukanal

ICE1/SCREAM – INDUCER OF CBF EXPRESSION1/SCREAM, aluseline heeliks-ling-heeliks transkriptsioonifaktor

LMA – *leaf mass per area*, lehe kuivmassi ja pindala suhe

NCED – NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID-DIOXYGENASE, abstsiihappe biosünteesis osalev ensüüm

OST1/SnRK2.6 – OPEN STOMATA 1/SUCROSE NONFERMENTING1-RELATED PROTEIN KINASE 2.6, õhulõhede sulgumiseks vajalik valgukinaas

PA – *phaseic acid*, faseiinhape, ABA katabolismiprodukt

PP2C – TYPE 2C PROTEIN PHOSPHATASE, abstsiihappe signaaliraja negatiivsed regulaatorensüümid

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

QUAC1/ALMT12 – QUICK ACTIVATING ANION CHANNEL 1/ALUMINIUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 12, õhulõhede sulgumiseks vajalik anioonkanal

SCRM2 – SCREAM2, aluseline heeliks-ling-heeliks transkriptsioonifaktor

SLAC1 – SLOW ANION CHANNEL 1, õhulõhede sulgumiseks vajalik anioonkanal

SLAH3 – SLAC1 HOMOLOGUE 3, õhulõhede sulgumiseks vajalik anioonkanal

SPCH – SPEECHLESS, aluseline heeliks-ling-heeliks transkriptsioonifaktor, mis võimaldab õhulõhede arenemist

ZEP – zeaksantiin epoksidaas, abstsiihappe tootmises oluline ensüüm

TBO – *Toluidine Blue O*, toluidiinsinine, kutiikula terviklikkuse hindamiseks kasutatav värv

UGT – uridiin difosfaat glükosüültransferaas, abstsiihapet abstsiihappe glükosüülestriks konjugeeriv ensüüm

UTR – *untranslated region*, mittetransleeritav regioon

SISSEJUHATUS

Taimedele eluks vajalikku gaaside vahetumist võimaldavad lehtede pinnal paiknevad pisikesed suletavad avauseid ehk õhulõhed. Õhulõhede avatuse reguleerimine on eriliselt oluline ebasoodsates oludes, nt põuatingimustes, kui läbi avatud õhulõhede aurustuv vesi võib kujutada ohtu taime elutegevusele. Vastusena veepuudusele hakatakse taimedes tootma taimehormooni nimega abtsiishape (ABA), mis võimaldab õhulõhed sulgeda.

Käesoleva töö üheks eesmärgiks oli süvendada arusaama *CYP707A3* funktsioonist hariliku müürlooga taimedes, kuna geen kodeerib abtsiishapet lagundavat valku ning optimaalse ABA taseme säilitamine on vajalik taime normaalseks arenguks ja stressitingimustega toimetulekuks. Ühel häirunud *CYP707A3* geeni sisaldaval taimeliinil (SALK_078173) täheldati varasemalt fenotüüpi, mis ei olnud seletatav *cyp707a3* mutatsiooniga. Sellest tulenevalt eraldati eelnevalt SALK_078173 taimedest tagasiristamisel metsiktüübiga (Col-0) *cyp707a3* ja tundmatu häirunud geen, mille esmane nimetus *PUSA* põhineb mutantsel fenotüübil. Kuna *PUSA* on tundmatu geen, oli oluline kirjeldada selle geeni funktsiooni, sest *PUSA* geeni mõju võib potentsiaalselt muuta senist arusaama *CYP707A3* geeni toimest. Samuti sooviti SALK_078173 tagasiristamisest pärinevate *pusa* ja *cyp707a3* mutandiliinide abil välja selgitada, kas SALK_078173 taimede fenotüüpi põhjustas ikkagi *CYP707A3* või hoopis *PUSA* geeni häirumine.

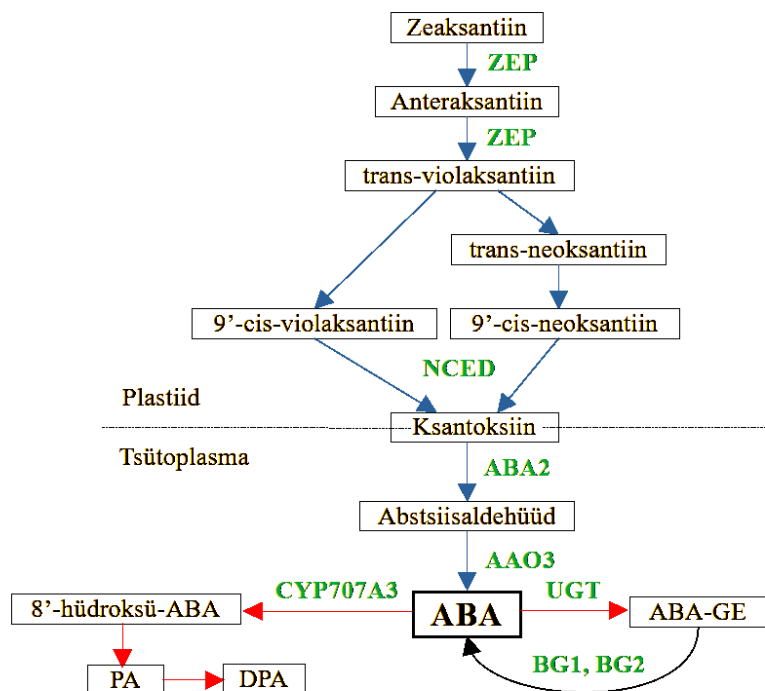
Bakalaureusetöö viidi läbi Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis, molekulaarse taimefüsioloogia laboris.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Abstsiiishape taimedes

Taimede elutegevus põhineb suuresti fotosünteesil, milleks vajalikku atmosfäärist pärinevat süsihappegaasi võimaldavad vastu võtta taime lehtede ja varte pinnal paiknevad avased ehk õhulõhed (Schroeder et al., 2001). Kuid süsihappegaasi taime difundeerumisega, mil õhulõhed on avatud, kaasneb paratamatult ka vee aurustumine taimest ehk transpiratsioon (Hetherington & Woodward, 2003). Seetõttu on taimedele eluliselt oluline, et õhulõhed oleksid suletavad. Õhulõhede sulgumisel on kesksel kohal taimehormoon abstsiiishape (ABA), mille tootmist on laialdaselt seostatud ümbritsevast keskkonnast pärinevatele stressoritele, nagu näiteks veepuudusele, reageerimisega (Finkelstein, 2013; Kim et al., 2010; Kuromori et al., 2018).

Abstsiiishapet toodetakse peamiselt lehtedes, kuid näiteks ka seemnetes ning juurtes (Chen et al., 2020; Ikegami et al., 2009; Kuromori et al., 2018). ABA biosüntees (Joonis 1) algab plastiidides, kus zeaksantiin muundatakse ensüümi zeaksantiin epoksidaasi (ZEP) osalusel anteraksantiiniks ning seejärel trans-violaksantiiniks (A. J. Cutler & Krochko, 1999; Nambara & Marion-Poll, 2005). Järgnevalt võib trans-violaksantiin läbida kaks erinevat isomeriseerumist, mille tulemusel moodustub kas 9'-cis-violaksantiin või läbi trans-neoksantiinist vaheühendi 9'-cis-neoksantiin (Mo et al., 2024). Seejärel lõikab ensüüm NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID-DIOXYGENASE (NCED) eelmises etapis tekkinud 9'-cis-ksantiine ning moodustub ksantoksiin (Schwartz et al., 2003). Edasisteks reaktsioonideks toimetatakse ksantoksiin tsütoplasmasse, kus leiavad aset kaks järjestikust oksüdatsioonireaktsiooni (Cheng et al., 2002; Nambara & Marion-Poll, 2005). Esimest reaktsiooni katalüüsib ensüüm ABSCISIC ACID DEFICIENT 2 (ABA2), mille toime moodustub abstsiiisaldehyüd (Cheng et al., 2002; González-Guzmán et al., 2002). Teist, abstsiiishapet moodustavat reaktsiooni katalüüsib ABSCISIC ALDEHYDE OXIDASE 3 (AAO3) (Seo et al., 2000).



Joonis 1. Abstiishappe biosünteesi ja katabolismi lihtsustatud skeem. Abstiishappe (ABA) plastiidides algavad biosünteesi reaktsioonid on kujutatud siniste nooltega. Punased nooled tähistavad ABA katabolismi, millest esimesel juhul lagundatakse ABA läbi 8'-hüdrosülatsiooniraja esmalt faseiinhappeks (PA) ning seejärel dihidrofaseiinhappeks (DPA); samuti on abstiishapet võimalik inaktiveerida konjugeerimisel, millest moodustub ABA glükosüülester (ABA-GE). ABA glükosüülestrist aktiivse ABA taastootmine on märgitud musta noolega. Rohelisega on tähistatud ensüümid: ZEP – zeaksantiin epoksidaas; NCED – NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID-DIOXYGENASE; ABA2 – ABA DEFICIENT 2; AAO3 – ABSCISIC ALDEHYDE OXIDASE; CYP707A3 – CYTOCHROME P450, FAMILY 707, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 3; UGT – uridiin difosfaat glükosüültransferaas; BG1 ja BG2 – beeta-glükosidaasid. Joonis põhineb (Leng et al., 2013; Mo et al., 2024; Nambara & Marion-Poll, 2005) joonistel.

Abstiishappe inaktiveerimine (Joonis 1) põhineb kas hüdroksüleerimisel või konjugeerimisel ning reaktsioonitüüpide peamiseks erinevuseks on see, et ABA hüdroksülatsiooni lõpp-produkt on täielikult mitteaktiivne, ent konjugeeritud ABA on võimalik uuesti toimivaks abstiishappeks muuta (A. J. Cutler & Krochko, 1999; Lee et al., 2006; Nambara & Marion-Poll, 2005). Hüdroksülatsiooniradu on kirjeldatud kolm, vastavalt sellele, mitmendele abstiishappe molekulis paiknevale metüülrühmale hüdroksüülrühm lisatakse (C-7', C-8' või C-9'), kusjuures neist põhiliseks peetakse 8'-hüdrosülatsiooni (A. J. Cutler & Krochko, 1999; Nambara & Marion-Poll, 2005). ABA 8'-hüdrosülatsioonil moodustuv ebastabiilne vaheühend, 8'-hüdrosü-ABA, muutub iseeneslikult edasi faseiinhappeks (PA) ning seejärel lõplikult inaktiveeritud dihidrofaseiinhappeks (DPA) (A. J. Cutler & Krochko, 1999; Saito et al., 2004). ABA 8'-hüdrosüleerimist katalüüsivad tsütokroom P450 monooksügenaaside hulka kuuluvad ABA 8'-hüdrosülaasid, mida kodeerivad *CYP707A* perekonna geenid (Kushiro et

al., 2004; Saito et al., 2004). Harilikus müürloogas on *CYP707A* geene kirjeldatud neli: *CYP707A1*, *CYP707A2*, *CYP707A3* ning *CYP707A4* (Kushiro et al., 2004; Saito et al., 2004). Kuna *CYP707A3* geen on käesoleva töö keskseks teemaks, käsitletakse *CYP707A* geenide olulisust edaspidi põhjalikumalt.

Teist tüüpi ABA inaktiveerimine põhineb ABA ühinemisel glükoosiga, mida viib läbi uridiin difosfaat glükosüültransferaas (UGT) ning moodustub ABA glükosüülester (ABA-GE) (Priest et al., 2006; Z.-J. Xu et al., 2002). ABA glükosüülestrit hüdrolyüsivad abstsiihappeks beeta-glükosidaasid (BG1 ja BG2) (Lee et al., 2006; Z.-Y. Xu et al., 2012). BG1 vahendatud hüdrolyüs toimub endoplasmaatilises retiikulumis (ER) ning BG2 hüdrolyüsib ABA-glükosüülestrit vakuoolis (Lee et al., 2006; Z.-Y. Xu et al., 2012).

1.2. Veekaotuse kontroll

Taimedel võimaldab end kuivamise eest kaitsta kutiikula – epidermirakkude poolt toodetud vett hülgav lipiidne struktuur, mis katab lehtede ja varte epidermi (Jakobson et al., 2016; Kurdyukov et al., 2006; Yeats & Rose, 2013). Samuti tõkestab kutiikula patogeenide sisenemist taime (Yeats & Rose, 2013). Kutiiikula moodustavad vahad ja nende all paiknev kutiin, kujutades endast rasvhapete polümeeri (Kurdyukov et al., 2006; Yeats & Rose, 2013). Kutiini monomeeride sünteesis ja sellele järgneval polüestrite moodustamisel omab olulist rolli BDG (BODYGUARD), mille puudumisega kaasneb katkine kutiikula ning sellest tulenevalt kõrgem vee aurustumise tase (Jakobson et al., 2016).

Kuigi kaitsva barjääri omamine on taimedele kahtlemata vajalik, pärsib vettpidav kutiikula ka gaasivahetust – CO₂ sisenemist taime ja seega fotosünteesi ning samuti transpiratsiooni, mis on iseenesest oluline vee ja mineraalide lehtedesse jõudmiseks (Boyer, 2015; von Caemmerer & Baker, 2007). Seepärast asetsevad lehtede ja varte epidermis gaaside vahetumist võimaldavad õhulõhed – kahest kõrvuti asetsevast sulgrakust ja nende vahele jäävast avausest ehk õhupilust koosnevad struktuurid, mida on liigse veekaotuse piiramiseks võimalik sulgeda (Schroeder et al., 2001). Õhulõhede avatust reguleerivad sulgrakud, mis vastavalt oma turgorrõhu muutustele kas paisuvad või kahanevad, kohandades seega õhupilu avatust ehk apertuuri (Schroeder et al., 2001).

Taime ja ümbritseva keskkonna vahelise gaasivahetuse efektiivsust kirjeldab õhulõhede juhtivus (g_s , mõõtühik $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), sõltudes lisaks õhulõhede avatusele ka õhulõhede tihedusest (õhulõhede arv pinnaühiku kohta) (Hetherington & Woodward, 2003). Seega, mida avatumad on õhulõhed ja mida arvukamalt neid lehtedel paikneb, seda rohkem pääseb taime CO₂ ning aurustub ka vett välja. Nii õhulõhede avatust kui ka tihedust mõjutavad erinevad

keskkonnatingimused. Õhulõhed avanevad põhiliselt valguse toimel, kuid samuti ka vastusena suhtelise õhuniiskuse ja temperatuuri tõusule ning CO₂ kontsentratsiooni alanemisele (Driesen et al., 2020; Feller, 2007; Shimazaki et al., 2007). Õhulõhede tiheduse tõusu on täheldatud taimedel, mis on kasvanud valgusküllastes oludes (Casson et al., 2009). Seevastu põhjustavad kõrge CO₂ kontsentratsioon ja õhutemperatuur õhulõhede tiheduse langust (Crawford et al., 2012; Woodward et al., 2002). Suhtelise õhuniiskuse mõju õhulõhede tihedusele on varieeruv: kõrge suhteline õhuniiskus soodustas roosil õhulõhede arenemist, ent mudelorganism harilik müürlook saavutas kõrgema õhulõhede tiheduse hoopis madala suhtelise õhuniiskusega kasvukeskkonnas (Fanourakis et al., 2013; Tulva et al., 2024).

Õhulõhede arenemine algab protodermaalset päritolu meristemoidi emaraku (*meristemoid mother cell*) asümmeetrilise jagunemisega meristemoidiks, millel on tüvirakkudele sarnane aktiivsus, ning õhulõhe eellasliini põhirakuks (*stomatal lineage ground cell*) (Nadeau & Sack, 2002, 2003; Shpak et al., 2005; Zhao & Sack, 1999). Järgnevalt on meristemoidil võimalik areneda sulgraku emarakuks (*guard mother cell*) või läbida kuni kolm õhulõhe eellasliini põhirakkude arvu suurendavat asümmeetrilist jagunemist ning areneda seejärel edasi sulgraku emarakuks (Bergmann & Sack, 2007; Geisler et al., 2000). Õhulõhe eellasliini põhirakk võib areneda sillutisrakuks (*pavement cell*), enimlevinud epidermirakuks, või toota asümmeetriliselt jagunedes satelliitmeristemoidi (Geisler et al., 2000; Zhao & Sack, 1999). Selline jagunemine võib aset leida olukorras, kus õhulõhe eellasliini põhirakk paikneb õhulõhe või selle eellasraku kõrval ning uus meristemoid tekib teisele poole eellasliini põhiraku (Geisler et al., 2000; Zhao & Sack, 1999). Sulgraku emarakk läbib ühe sümmeetrilise jagunemise, millest tekkinud kaks sulgraku ja nende vahele jääv avaus moodustavadki õhulõhe (Nadeau & Sack, 2002).

Õhulõhede arengus omavad väga olulist rolli SPCH (SPEECHLESS), MUTE ja FAMA – aluseliste heeliks-ling-heeliks (*basic helix-loop-helix*) valkude hulka kuuluvad transkriptsioonifaktorid (Pillitteri et al., 2007). SPCH võimaldab meristemoidi emarakul asümmeetriliselt meristemoidiks jaguneda, tänu millele saavad toimuda edasised õhulõhede arenguetapid (MacAlister et al., 2007; Pillitteri et al., 2007). SPCH olulisust ilmestab, et *spch-1* mutandiliini taimedel ei arenenud meristemoide, mistõttu koosnes terve epiderm vaid sillutisrakkudest (MacAlister et al., 2007). Samuti on avaldatud, et SPCH on vajalik ka juba protodermaalse raku jagunemisel meristemoidi emarakuks (Pillitteri & Torii, 2012). MUTE'i ülesandeks on peatada meristemoidi asümmeetrilised jagunemised, et toimuks diferentseerumine sulgraku emarakuks (Pillitteri et al., 2007). Lisaks osaleb MUTE sulgraku emaraku sümmeetrilises jagunemises (Torii, 2021). MUTE transkriptsioonifaktorit kodeeriva MUTE geeni funktsiooni eemaldamine (*mute*) põhjustas meristemoidide liigset asümmeetrilist

jagunemist, peale mida sulgraku emarake ning sellest tulenevalt ka õhulõhesid ei tekkinudki (Pillitteri et al., 2007). FAMA tagab, et sulgraku emaraku sümmeetriline jagunemine toimuks vaid korra ning vastutab sulgrakkude diferentseerumise eest (Ohashi-Ito & Bergmann, 2006). Sarnaselt *spch* ja *mute* mutantidele ei arenenud ka *fama* taimedel õhulõhesid – sulgrakkude emarakud moodustasid korduva jagunemise tulemusel kogumikke (Ohashi-Ito & Bergmann, 2006). Samuti on õhulõhede arengus olulised veel kaks aluselist heeliks-ling-heeliks transkriptsioonifaktorit: INDUCER OF CBF EXPRESSION1/SCREAM (ICE1/SCRM) ja SCREAM2 (SCRM2), mis moodustavad transkriptsioonifaktoritega SPCH, MUTE ja FAMA heterodimeere ning edendavad seega nende toimimist (Kanaoka et al., 2008).

Õhulõhede arengu kontrollis on keskse tähtsusega signaalpeptiidid EPF1 (EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 1) ja EPF2 (EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2), mis tagavad epidermis õhulõhede korrektse paiknemise üksteise suhtes (õhulõhede mustri) (Hara et al., 2007, 2009; Hunt & Gray, 2009). Kui taime õhulõhed paiknevad liiga tihedalt või lausa kõrvuti, on tagajärjeks häirunud õhupilu apertuuri reguleerimine, mille tõttu ei suuda õhulõhed normaalselt gaasivahetust vahendada ega end liigse veekaotuse eest kaitsta, st taime elutegevus on häiritud. Meristemoidi emarakkudes toodetud EPF2 funktsiooniks on piirata naaberrakkude muutumist meristemoidi emarakkudeks (Hara et al., 2009). EPF1 kontrollib meristemoidi asümmeetrilisi jagunemisi ning tagab selle, et õhulõhed ei paikneks vahetult kõrvuti (ühe-raku-reegel, *one cell spacing rule*) (Hara et al., 2007; Sachs, 1991).

1.2.1. Õhulõhede sulgumine ja avanemine

Õhulõhede sulgumine kaasneb sulgrakkude turgorrõhu langusega, mida põhjustab ionide (erinevad anioonid, K^+) ning vee liikumine sulgrakust välja (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013). Anioonide väljumine toimub läbi anioonkanalite, millest võtmetähtsusega on SLAC1 (SLOW ANION CHANNEL 1), SLAH3 (SLAC1 HOMOLOGUE 3) ja QUAC1 (QUICK ACTIVATING ANION CHANNEL 1)/ALMT12 (ALUMINIUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 12) (Geiger et al., 2011; Meyer et al., 2010; Negi et al., 2008; Vahisalu et al., 2008). Anioonide väljumine põhjustab membraani depolariseerumist ehk positiivsemaks muutumist, mis omakorda aktiveerib K^+ ionide väljumist võimaldava K^+ väljavoolukanali GUARD CELL RECTIFYING K^+ CHANNEL (GORK) (Hosy et al., 2003; Roelfsema et al., 2012). Õhulõhede avanemisel hüperpolariseerub sulgraku membraan ensüüm H^+ -ATPaas'i vahendatud prootonite väljumisel, võimaldades K^+ ionide sisenemist (Kim et al., 2010). Järgnevalt liiguvad sulgrakku anioonid ja vesi, põhjustades turgorrõhu tõusu ning õhulõhede avanemist (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013).

1.3. Abstiishappe ja *CYP707A* geenide roll taime funktsioneerimises ja arengus

1.3.1. Abstiishappe vahendatud õhulõhede sulgumine

Põhiliselt toimuvad õhulõhede sulgumisega päädivad protsessid abstiishappes sõltuva mehhanismi läbi, olles vastuseks keskkonnatingimustele, nagu pimedus, põud ning õhutemperatuuri langemine (Bauer et al., 2013; Li et al., 2025; Merilo et al., 2013). Erandiks on CO₂ kontsentratsiooni tõusu põhjustatud õhulõhede sulgumine, mida ABA ei vahenda (Hsu et al., 2018). ABA-vahendatud õhulõhede sulgumist alustab ABA seundumine retseptoritega PYRABACTIN RESISTANCE (PYR)/PYR1-LIKE (PYL)/REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR (RCAR) (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Moodustunud kompleks on määrava tähtsusega, kuna võimaldab seundumisel ABA signaaliraja negatiivsete regulaatoritega PP2C (TYPE 2C PROTEIN PHOSPHATASE) need inaktiveerida, mis omakorda aktiveerib ABA signaaliraja positiivse regulaatori OST1/SnRK2.6 (OPEN STOMATA 1/SUCROSE NONFERMENTING1-RELATED PROTEIN KINASE 2.6) (G. J. Allen et al., 1999; Fujii et al., 2007; Mustilli et al., 2002; Park et al., 2009; Vlad et al., 2009). OST1 olulisus seisneb anioonkanalite käivitamises (Geiger et al., 2009; Imes et al., 2013).

1.3.2. *CYP707A* geenid

Kõigi nelja hariliku müürlooga *CYP707A* geeni avaldumist kutsub esile väline ABA töötlus ja põuastressile järgnev taimede rehüdreerumine, ent ka veepuudus ise (Kushiro et al., 2004; Saito et al., 2004). Vastuseks stressile tõuseb taimes ABA kontsentratsioon, mis põhjustab õhulõhede sulgumist ning võimaldab taimel säilitada olemasolevaid veevarusid pidurdades vee aurustumist. Kui mulla veesisaldus taastub, on gaasivahetuse toimumiseks vaja taimel õhulõhed uuesti avada. Seda võimaldab ABA kontsentratsiooni langus, milles osalevad *CYP707A* geenide kodeeritavad ABA 8'-hüdrosülaasid (Kushiro et al., 2004; Saito et al., 2004). Kuid miks on siis vaja, et stressitingimustes, kui taimel on eluliselt oluline saavutada kõrget ABA taset, suureneb ka ABA lagundamiseks vajalike *CYP707A* geenide avaldumine? Olukord on põhjendatav sellega, et stabiilse ABA taseme hoidmine sõltub nii ABA biosünteesist kui ka katabolismist (Kushiro et al., 2004). ABA tootmise ja lagundamise vahelise tasakaalu olulisust ABA kontsentratsiooni säilitamisel ilmestab, et põuastressi ajal tõusis nii taime seesmine ABA, kuid ka ABA inaktiveeritud vormide (PA ja DPA) tase (Kushiro et al., 2004). Samuti on võimalik, et põuaaegne *CYP707A* ekspressiooni suurenemine võimaldab kiiret stressijärgset ABA katabolismi (Umezawa et al., 2006).

Vastusena põuastressile ja sellele järgnevale taasteperioodile indutseeritakse *Arabidopsise* taimedes kõige kõrgemalt *CYP707A3* geeni avaldumist, viidates sellele, et võrreldes teiste

CYP707A geeniperekonna liikmetega omab just *CYP707A3*, peamiselt rosetilehtedes jm vegetatiivsetes taimekudedes avalduv geen, prominentset rolli ABA taseme reguleerimisel lehtedes (Saito et al., 2004; Umezawa et al., 2006). Kuivatuskatsed *cyp707a3* nokautmutantidega näitasid, et võrreldes metsiktüübiga (Col-0) olid *cyp707a3-1* ja *cyp707a3-2* taimed tänu vähenenud transpiratsioonile elujõulisemad, olles seletatav kõrgema ABA kontsentratsiooni ning seega suletumate õhulõhedega (Umezawa et al., 2006). Samuti viitavad *CYP707A3* geeni olulisusele vee aurustumise kontrollis *cyp707a3-1* ja *cyp707a3-2* nokautmutantide metsiktüübist madalamad õhulõhedede juhtivused ning *CYP707A3* geeni üleekspressiooniga kaasnev transpiratsiooni tõus (Okamoto et al., 2009; Umezawa et al., 2006).

Siiski ei piirdu vee aurustumise reguleerimine ainult *CYP707A3* geeni toimega, kuna avastati, et vastusena kõrgele õhuniiskusele katalüüsisid ABA lagundamist nii *CYP707A3* kui ka *CYP707A1* valgud, vastavalt lehe roodudes ehk juhtkudedes ning sulgrakkudes (Okamoto et al., 2009). Varasemalt seostati *CYP707A1* olulisust hoopis ABA taseme reguleerimisega kuivades seemnetes (Okamoto et al., 2006). Mõlema geeni osalus transpiratsiooni kontrollimisel võib seostatav olla *CYP707A* geeniperekonna liikmete sarnase toime ehk redundantantsusega, kuna *CYP707A* geenid avalduvad samades taimekudedes, lihtsalt erineval tasemel (Kushiro et al., 2004; Saito et al., 2004). Samuti tõestab *CYP707A* geenide redundantantsust *CYP707A* geenide korvav toime üksteise mõjule olukorras, kus mingi *CYP707A* geen on häirunud, sest *cyp707a3-1* mutandiliini taimedes täheldati, et vaatamata *CYP707A3* geeni häirumisele ei lakanud ABA lagundamine täielikult, jäädes siiski metsiktüübist madalamaks (Umezawa et al., 2006). Samas muudab *CYP707A3* ja *CYP707A1* ühise veekaotuse kontrollimise keerulisemaks tõsiasja, et sulgrakud toodavad iseseisvalt ABA (Bauer et al., 2013). Nimelt arvati varasemalt, et *CYP707A3* kontrollib suuresti selle ABA kogust, mis transporditakse lõpuks sulgrakkudesse (Okamoto et al., 2009). Sellest tulenevalt vajaks edasist uurimist *CYP707A3* konkreetne roll veekaotuse reguleerimisel.

1.3.3. Abstsiihappe olulisus taime arengus

ABA on oluline juba taime varajases arengus, edendades idanemiseks vajalike varuainete kogunemist seemnesse (Chen et al., 2020). Kuigi varuainete talletamine on tähtis, sest vastasel juhul katkeks taime arengutee seemnestadiumis, väheneb samaaegselt ka seemne veesisaldus, mis võib samuti seemnele saatuslikuks osutada (Angelovici et al., 2010). Sellest tulenevalt ilmneb järgmine ABA roll – seemnele kuivataluvuse tagamine (Chen et al., 2020).

Seemne arenemine täiskasvanud taimeks vajab aega ning on suuresti mõjutatud ümbritsevatest oludest, nagu nt niiskus, temperatuur ning valgus. Kuna keskkonnatingimused ei ole staatilised,

on taime edukaks arenguks määrava tähtsusega seda vajadusel pidurdada. ABA osaleb arengu ajutisel peatamisel seemne ning idandi faasides, võimaldades taimel arenemist jätkata, kui keskkonnaolud seda jälle soosivad (S. R. Cutler et al., 2010; Lopez-Molina et al., 2001). Idanemispuhkusest võimaldab seemnel väljuda CYP707A2 valk ning idandi kasvuaresti lõpetavad CYP707A3 ja CYP707A1 valgud (Kushiro et al., 2004; Okamoto et al., 2006). Samuti edendab ABA kutiikula teket (Cui et al., 2016).

ABA mõjust õhulõhede arengule annavad aimdust katsed hariliku müürlooga mutandiliinidega, millel on rikutud kas mingi ABA tootmises või lagundamises osalev geen ja seetõttu on ABA sisaldus vastavalt alanenud või tõusnud. ABA biosünteesi üksikmutandi *aba3-1* ja topeltmutandi *nced3nced5* õhulõhede tihedused olid võrreldes metsiktüübiga kõrgemad (Chater et al., 2015; Jalakas et al., 2018). Seevastu ABA katabolismi topeltmutandi *cyp707a1cyp707a3* taimede õhulõhede tihedus kujunes metsiktüübist madalamaks (Jalakas et al., 2018; Tanaka et al., 2013). Eelnimetatud mutandiliinide õhulõhede tiheduste võrdlused metsiktüübiga viitavad motiivile, et ABA pärsib õhulõhede arengut (Chater et al., 2015; Jalakas et al., 2018; Tanaka et al., 2013). Lisaks olid ka *bgl* taimede õhulõhede tihedused metsiktüübist kõrgemad, ilmestades ABA rolli õhulõhede arengu inhibeerimisel veelgi, kuna BG1 hüdrolyüsib inaktiivse ABA-GE aktiivseks ABA-ks, ning seega kaasneb antud geeni häirumisega madalam ABA kontsentratsioon (J. Allen et al., 2019). Samuti on näidatud, et ABA inhibeerib esmast meristemoidi teket (Tanaka et al., 2013). Kuigi eelnevalt mainitud katsed erinevate ABA mutandiliinidega viitavad ABA tõkestavale mõjule õhulõhede arengus, on täpsemad detailid veel ebaselged ning vajaksid edasist uurimist.

Vaatamata sellele, et ABA-t tuntakse põhiliselt stressihormoonina, on see oluline ka siis, kui stressi pole. Katsed stressivabades tingimustes kasvatatud hariliku müürlooga mutantidega, millel oli kas ABA vahendatud signaalirada või hormooni tootmine häiritud, näitasid, et mutantidel arenes võrreldes metsiktüübiga (Col-0) rohkem lehti (Yoshida et al., 2019).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

1. Iseloomustada tundmatu *PUSA* geeni funktsiooni.
2. Saada teada, mis on *CYP707A3* geeni olulisus hariliku müürlooga taimedes.
3. Saada teada, kas SALK_078173 genotüübiga taimede fenotüüp on põhjustatud *CYP707A3* või *PUSA* geeni häirumisest.

2.2. Materjal ja meetoodika

2.2.1. Kasutatud taimeliinid

Katsetes uuritud SALK taimeliinid (Tabel 1) pärinesid NASC'ist (*Nottingham Arabidopsis Stock Centre*) (Scholl et al., 2000). Tegemist on hariliku müürlooga Col-0 päritolu mutandiliinidega, mille *CYP707A3* geeni on sisestatud T-DNA ning seega on geeni funktsioon häirunud. SALK_040601 T-DNA insertioon paikneb *CYP707A3* geeni 5' UTR regioonis; SALK_101566 T-DNA insertioon asub *CYP707A3* geeni teises eksonis (*cyp707a3-2*); SALK_078173 T-DNA insertioon on *CYP707A3* geeni esimeses eksonis (*cyp707a3-1*). Häirunud *BDG* geeniga *bdg-6* (Tabel 1) on samuti Col-0 päritolu mutandiliin, mille T-DNA insertioon asub geeni esimeses eksonis ning liin pärineb Jakobson et al., (2016). Hariliku müürlooga metsiktüüp Col-0 oli varasemalt juba laboris olemas.

Käesolevas töös uuritud *PUSA* geeni nimetus on mutantsel fenotüübil põhinev (Joonis 2) esmane nimetus tundmatule geenile, mis pärineb töö autori juhendajalt. SALK_078173 liini kuuluvate taimede fenotüüp eristus teistest häirunud *CYP707A3* geeni sisaldavate taimede (SALK_040601 ja SALK_101566) haabitusest niivõrd, et juhendajal tekkis varasemalt kahtlus, et SALK_078173 taimede fenotüüpi võib põhjustada mingi tundmatu geeni mutatsioon. Seetõttu eraldati eelnevalt häirunud *CYP707A3* ja *PUSA* geenid SALK_078173 taimede tagasiristamisel metsiktüübiga Col-0 (Lisa 1), millest pärinevad ülejäänud käesolevas töös uuritud liinid (Tabel 1).

Tabel 1. Katsetes kasutatud taimeliinid ja nende mutatsioonid.

Genotüüp	Mutatsioon	Allikas
Col-0	metsiktüüp	Laboris kasutusel
<i>bdg-6</i>	<i>bdg-6</i>	(Jakobson et al., 2016)
SALK_040601	<i>cyp707a3</i>	(Alonso et al., 2003)
SALK_101566	<i>cyp707a3-2</i>	(Alonso et al., 2003)
#7-4	<i>cyp707a3-1</i>	Tagasiristatud SALK_078173-st
#7-8	<i>cyp707a3-1</i>	Tagasiristatud SALK_078173-st
#14-6	<i>cyp707a3-1</i>	Tagasiristatud SALK_078173-st
SALK_078173	<i>cyp707a3-1 + pusa</i>	(Alonso et al., 2003)
<i>pusa DEF</i>	<i>pusa</i>	Tagasiristatud SALK_078173-st
<i>pusa GHI</i>	<i>pusa</i>	Tagasiristatud SALK_078173-st

Katsetele eelnevalt kasvatati kõigist Tabeli 1 taimeliinidest peale *bdg-6* samadel kasvutingimustel seemnepõlvkond. Kuni õievarre moodustumiseni kasvasid taimed lühipäevatoas (kasvutingimused: 10 h valgust ja 14 h pimedust, suhteline õhuniiskus 60%, temperatuur päeval 23 °C ja öösel 19 °C, valgustugevus 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), edaspidi kasvasid

taimed pikapäevatoas, kus oli valgust 16 h ja pimedust 8 h ning muud tingimused olid lühipäevatoaga samad.

2.2.2. Taimede kasvatamine

Kasvukatses uuritud taimede kasvatamiseks kasutati 50 x 29 cm kandikut, mis pandi teise sama suure kandiku sisse taimede kastmise hõlbustamiseks. Sisemise kandiku põhjas oli 40 x 3 mm läbimõõduga auku. Kandikuid oli kokku 12 tükki (Joonis 2). Kandikud kaaluti enne mullaseguga täitmist, et hiljem saada teada mulla enda mass. Mullasegu koosnes turbast (OPM 025W, Kekkilä) ja vermikuliidist (Vermikuliit Medium 0-4 mm, TopGreen) mahusuhtes 2 : 1. Kandikud täideti 1600 g mullaga ning igale kandikule mõeldud mullast võeti 60-70 g mullaproovid, mida kuivatati kuus päeva 70 °C juures ahjus ning kaaluti seejärel uuesti. Algse ja kuivatatud mulla massivahe võimaldas määrata, kui palju oli algse mulla veesisaldus ning sellest tulenevalt, mis oli algse mullas kuiva materjali osakaal. Selle põhjal sai arvutada mulla kuivmassi kandikus. Täitmise järel lisati kandikutele 3 liitrit kraanivett ning mullapind kaeti tekstiilmultšiga (Baltic Agro), milles olid seemnete külvamiseks augud (kokku 26 auku diameetriga 5 mm).

Enne külvamist hoiti seemneid idanemise edendamiseks 3 päeva deioniseeritud veega (milliQ) täidetud 1,5 ml tuubis 4°C külmkapis. Seemneid külvati 20 µl pipetiga, mille otsikult oli ots maha lõigatud, vältimaks seemnete otsikusse kinnijäämist. Ühte tekstiilmultši auku külvati ca 5 seemet. Külvati järgmisi liine: Col-0 (metsiktüüp), SALK_040601, SALK_101566, SALK_078173, #7-4, #14-6, *pusa DEF* ja *pusa GHI*. Kuigi *pusa DEF* ja *pusa GHI* pärinevad ühest F3 põlvkonna taimest (Lisa 1) ning kuuluvad seega tegelikult ühte *pusa* taimeliini, lisati kasvukatsesse kindluse mõttes kaks liini (eelnenud haabitusepõhine selektsioon võis väikese tõenäosusega anda heterosügootse liini). Samal põhjusel kasutati #7-4 ja #14-6 taimi, mis pärinevad küll erinevatest F2 põlvkonna taimedest (Lisa 1), kuid on sama genotüübiga.

Kõiki kaheksat uuritavat genotüüpi külvati igale kandikule kolmes korduses juhuslikustatud kohtadesse. Peale külvamist kaeti kandikud paariks päevaks kilega, et edendada idanemist ning, viidi Percivali kasvukappidesse (Percival Scientific). Kasvukappide tingimused olid samad, mis eelnevalt kirjeldatud lühipäevatoas, ainult suhteline õhuniiskus oli päeval 60% ja öösel 80%. Nädal peale külvamist harvendati taimi pintsettidega nii, et igasse positsiooni jääks ainult üks taim kasvama.

Viis päeva peale harvendamist alustati kandikute igapäevase kaalumise, mis andis kandiku brutomassi (g). Kandikus oleva mulla veesisalduse arvutamiseks antud hetkel kasutati valemit:

$$\text{Veesisaldus} = \left(1 - \frac{\text{mulla kuivmass}}{\text{brutomass} - \text{tühjade kandikute mass} - \text{multši mass}} \right) \times 100 \%$$

Taimi kasteti siis, kui kandiku veesisaldus langes alla 70%. Selleks lisati välimisse kandikusse nii palju vett (g), et kandiku veesisaldus oleks taas 75%. Kuna taimekandikud paiknesid erinevates kasvukappides ning ka erineva kõrgusega riiulitel (ühele riiulile mahub kolm kandikut), roteeriti kandikuid igapäevaselt kappide ja riiulite vahel ja keerati ka nende orientatsiooni, et ühtlustada asukohast tingitud kasvutingimusi. Kasvukatses uuritud taimede korjed toimusid kahes jaos: siis, kui taimed olid nelja nädala vanused (28-päevased, edaspidi neljanädalased taimed) ning siis, kui taimed olid umbes viie nädala vanused (37-päevased, edaspidi viienädalased taimed). Kasvukatsetaimedel uuriti õhulõhede juhtivust (poromeetria ja veekaotuskatse), roseti kuivmassi, lehe kuivmassi ja pindala suhet ning õhulõhede tihedust.



Joonis 2. Esinduslik näide kasvukatses taimedest. Taimi on pildistatud kaks päeva enne korjet (35-päevased taimed). Joonisel on märgitud taimeliinide nimed. Kandiku suurus on 50 x 29 cm.

Kutiikulakatsetes uuritud taimi kasvatati kahes jaos, toluidiinsinise värvimiseks ning etanooli leotuskatseks. Päev enne toluidiinsinise värvimiseks mõeldud katsetaimede külvamist täideti 36 8 x 8 x 6 cm suuruses potti mullaseguga, mille mahusuhted olid 4 osa turvast (OPM 025W, Kekkilä) : 2 osa vermikuliiti (Vermikuliit Medium 0-4 mm, TopGreen) : 3 osa kraanivett. Samuti lisati mullasegule nematoode (*S. feltiae*, Koppert) üks teelusikatäis 2-3 liitri mullasegu kohta. Seemnete leotamine ja külvamine toimus sama meetoodika alusel, mis kasvukatselgi, ent antud juhul külvati igat genotüüpi neljas korduses ehk neli potti genotüübi kohta. Seemneid külvati igasse potti kolmes jaotuses nii, et peale harvendamist jäi igasse potti alles kolm taime,

mis kasvasid poti eri nurkades. Rohkemate taimede kasvatamine võimaldas kasutada taimi mõlemaks toluidiinsinisega värvimise katseks (14-päevaste taimede värvimine ja täpikatse). Kasutatud genotüübid olid: Col-0, *bdg-6*, #7-4, #7-8, #14-6, SALK_040601, SALK_101566, SALK_078173, *pusa GHI*. Ühest F3 põlvkonna taimest (Lisa 1) pärinevate #7-4 ja #7-8 taimede eristamine ning lisaks ka #14-6 taimede kasutamine põhines samadel eelnevalt kirjeldatud põhjustel, nagu kasvukatseski. Leotuskatsetaimi kasvatati eraldi, ent meetoodika kattus toluidiinsinisega värvimiseks mõeldud katsetaimede kasvatamisega, välja arvatud, et igasse potti jäi peale harvendamist üks taim kasvama.

2.2.3. Kutiikulakatsed

Toluidiinsinisega värvimise tarbeks kasvatatud taimi värviti toluidiinsinisega (TBO, *Toluidine Blue O*) kahel viisil: seemikud kasteti värvilahusesse ning taimelehtedele kanti värvilahust täppidena. Värvilahusesse kastmise katset viidi läbi 14-päevaste taimedega, mida värviti neli minutit 0,05% TBO lahusega ning seejärel loputati kahel korral kraaniveega. TBO täpikatse tehti 38-päevaste taimedega. Igale uuritavale taimele tehti 0,5% TBO-lahusega kaks täppi ühe juhuslikult valitud lehe abaksiaalsele pinnale ja teise lehe adaksiaalsele pinnale. Värvil lasti toimida ca üks tund, peale mida pesti värv veega maha.

Kolme nädala vanused (21-päevased) leotuskatsetaimed paigutati 25 ml 80% etanooliga täidetud tuubidesse, mis paigutati kahte rotaatorisse (*end-over-end rotator*) (Mini Labroller, Labnet International, Inc. ja Multi Bio RS-24, Biosan). Kindlatel ajahetkedel (10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 90 min ja 120 min peale leotamise algust) võeti lahustest küvetti 1 ml proovid, mille neeldumist mõõdeti spektrofotomeetriga (UV-1900 i, Shimadzu) 647 nm ja 664 nm lainepikkustel. Peale mõõtmist tagastati proov leotuslahusesse. Katses kasutati igat uuritud genotüüpi neljas korduses. Kuna taimi oli kokku 36 ja rotaatoritesse mahtus korraga 16 tuubi, tehti katset mitmes korduses. Kindlal ajahetkel lahusesse eraldunud klorofüllü mikromoolide arvu määramiseks grammi taime märgkaalu kohta arvutati esmalt klorofüllü mikromolaarne kontsentratsioon ($\mu\text{mol/l}$). Selleks kasutati valemit:

$$\text{Chl } (\mu\text{M}) = 7,93 A_{664} + 19,53 A_{647},$$

kus Chl (μM) on klorofüllü mikromolaarne kontsentratsioon ($\mu\text{mol/l}$) lahuses, A_{664} ja A_{647} tähistavad neeldumisi vastavalt 664 nm ja 647 nm ning 7,93 ja 19,53 on ekstinktsioonikoefitsendid (Lolle et al., 1997).

Klorofüllisisalduse grammi taime märgmassi kohta arvutamiseks kasutati valemit:

$$Chl (\mu mol g^{-1} \text{ märgmass}) = \frac{\text{lahuse ruumala}}{\text{märgmass}}$$

Leidmaks kindlal ajahetkel lahustunud klorofüllsi osakaalu kogu taime klorofüllisisaldusest, standardiseeriti väljalahustunud klorofüllsi lõpp-punkti ehk 120nda katseminuti suhtes, eeldusel, et selleks hetkeks oli kogu klorofüll taimest väljunud:

$$\text{Standardiseeritud klorofüll} = \frac{Chl (\mu mol g^{-1} \text{ märgmass}) \text{ kindlal katseminutil}}{Chl (\mu mol g^{-1} \text{ märgmass}) 120ndal katseminutil}$$

2.2.4. Õhulõhede juhtivuse mõõtmine

Kasvukatsetaimede õhulõhede juhtivust mõõdeti päev enne korjet ainult viienädalastelt taimedelt, kuna neljänädalaste taimede lehed polnud poromeetriga (LI-600, Licor Bioscience) mõõtmiseks piisavalt suured. Mõõtmise ajal olid taimed kasvukapis, et vähendada keskkonnatingimuste muutumise mõju õhulõhede juhtivusele. Poromeetriga mõõdeti kordamööda erinevate kasvukappide juures, et liigne kasvukapi ukse lahti hoidmine omakorda taimi ei mõjutaks. Õhulõhede juhtivust üritati mõõta märgitud kümnendalt lehelt, ent kuna osade taimede kümnendad lehed olid liiga väikesed, valiti sellistel juhtudel suvaline piisava suurusega leht. Mõõdeti nii abaksiaalsete kui ka adaksiaalsete õhulõhede juhtivusi. Õhulõhede juhtivuse suhte leidmiseks jagati adaksiaalsete õhulõhede juhtivus abaksiaalsete õhulõhede juhtivusega.

2.2.5. Lehejäljendite tegemine

Jäljendeid võeti neljänädalaste kasvukatsetaimede vanuselt kuuendatelt lehtedelt ning viienädalaste kasvukatsetaimede vanuselt kümnendatelt lehtedelt. Neljänädalaste taimede kuuendad lehed loendati korje käigus, viienädalaste taimede kümnendad lehed märgistati niidiga 5 päeva enne korjet. Lehed lõigati pikuti pooleks ning ühest poolest võeti abaksiaalne ja teisest adaksiaalne jäljend. Jäljendite tegemiseks kasutati silikoonsegu, mida tavapärast kasutatakse stomatoloogias hambajäljendite tegemiseks. Silikoonsegule lisati ka vastavat aktivaatorit, millega segunemisel silikoon tahkus. Abaksiaalsed jäljendid tehti Zhermack Oranwash L ja adaksiaalsed Coltene Speedex light body silikoon-aktivaatori seguga. Seejärel lasti silikoonil tahkuda ning leht eemaldati. Allesjäänud jäljendile kanti õhukese kihina värvitut kiiresti kuivavat küünelakki, mis korjati peale kuivamist läbipaistva kleeplindi tükiga üles ning kanti preparaadi alusklaasile.

2.2.6. Veekaotuskatse

Nelja- ja viienädalaste kasvukatsetaimede vee- ehk massikaotust uuriti paralleelselt lehejäljendite tegemisega. Kõigepealt kaaluti taimerosesti märgmassi (ilma vastavalt kuuenda või kümnenda leheta) (g) kohe peale korjet ning rosett asetati adaksiaalne pind allapoole kaheks tunniks toatemperatuuril seisma. Peale kahe tunni möödumist kaaluti rosetti uuesti.

Veekaotusprotsendi arvutamiseks kasutati valemit:

$$\text{Veekaotusprotsent} = \frac{\text{märgmass} - \text{veekaotuskatse järgne mass}}{\text{märgmass}} \times 100 \%$$

2.2.7. Taimerosestide kuivatamine

Peale veekaotuskatset asetati kasvukatsetaimede rosetid paberist volditud ümbrikutesse ning kuivatati 70 °C kuivatuskapis konstantse massini. Kuna kuivatatud taimerosestidelt puudusid vastavalt vanusele kuuendad või kümnendad lehed, leiti terve roseti kuivmass arvutuslikult:

Terve roseti arvutuslik kuivmass

$$= \frac{\text{ülejäänud kuivmass (g)} \times (\text{jäljendilehe märgmass (g)} + \text{ülejäänud märgmass (g)})}{\text{ülejäänud märgmass (g)}}$$

Jäljendilehe kuivmassi arvutamiseks kasutati valemit:

Jäljendilehe kuivmass

$$= \text{terve roseti arvutuslik kuivmass (g)} - \text{kaalutud kuivmass (g)}$$

Kuuendaid ja kümnendaid (jäljendi)lehti pildistati korjete ajal, fotosid kasutati lehe pindala (cm²) arvutamiseks juhendaja loodud programmiga. Lehe massi ja pindala suhe (*leaf mass per area*, LMA, g m⁻²) arvutati valemiga:

$$LMA = \frac{\text{jäljendilehe kuivmass (g)}}{\text{jäljendilehe pindala (cm}^2\text{)}} \times 10\,000$$

2.2.8. Õhulõhede tiheduse määramine

Kasvukatsetaimede lehejäljendeid jäädvustati valgusmikroskoobiga (Kern OBF 133C832) 200-kordse suurendusega. Vaatevälja pindalaks oli 0,2547 mm². Sobivast vaateväljast tehti

fokusseerimiskruvi keerates lühike video, et kõik jäljendi tasapinnad oleksid hiljem nähtavad. Õhulõhede loendamiseks kasutati programmi ImageJ, versioon 1.53t (Schneider et al., 2012).

Õhulõhede tiheduse (õhulõhet mm^{-2}) arvutamiseks kasutati valemit:

$$\text{Õhulõhede tihedus} = \frac{\text{loendatud õhulõhede arv}}{\text{vaatevälja pindala (mm}^2\text{)}}$$

Õhulõhede tiheduste suhte arvutamine põhines valemil:

$$\text{Õhulõhede tiheduste suhe} = \frac{\text{adaksiaalsete õhulõhede tihedus (õhulõhet mm}^{-2}\text{)}}{\text{abaksiaalsete õhulõhede tihedus (õhulõhet mm}^{-2}\text{)}}$$

Õhulõhede summaarset tihedust leiti valemiga:

$$\text{Õhulõhede summaarne tihedus} = abax. \text{õhulõhet mm}^{-2} + adax. \text{õhulõhet mm}^{-2}$$

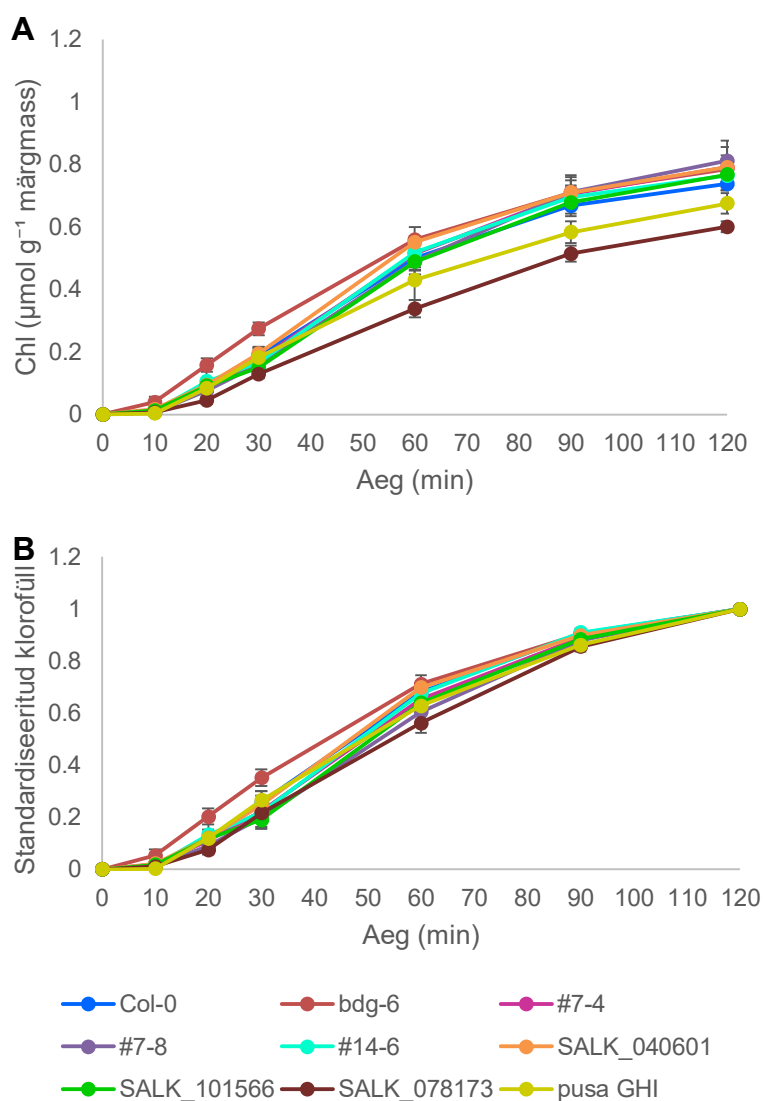
2.2.9. Statistiline analüüs

Kasvukatsetaimede õhulõhede juhtivuste, õhulõhede juhtivuste suhete, õhulõhede tiheduste, õhulõhede tiheduste suhete, veekaotuste, roseti kuivmassi ning lehe massi ja pindala suhete statistiliseks analüüsiks kasutati programmi Statistica (versioon 7.0). Andmete graafiliseks esitamiseks tehti tulpdiagrammid, mille loomisel keskmistas programm vastavad andmed iga uuritava genotüübi kohta ning arvutas ka joonistel veatulpadena näidatud \pm standardvead. Genotüüpide vaheliste statistiliselt oluliste erinevuste väljaselgitamiseks teostati ühefaktoriline ANOVA (kolmandat tüüpi ruutude summa). *Post-hoc* analüüsiks kasutati Tukey testi ebavõrdse valimi jaoks. Genotüüpide vahel esinesid statistiliselt olulised erinevused, kui p-väärtus oli $<0,05$. Roseti kuivmassi ja õhulõhede summaarse tiheduse seoseid esitati kategoriseeritud hajusdiagrammidena; võrdlemiseks, millised on erinevate genotüüpide seosed roseti kuivmassi ja õhulõhede summaarse tiheduse vahel, viidi läbi ka kovariatsioonanalüüs (*General Linear Models, Homogeneity-of-slopes model*).

2.3. Tulemused

2.3.1. Kutiikula terviklikkuse hindamine

21-päevaste taimede etanoolis leotamisest selgus, et grammi märgmassi kohta väljus kõige vähem klorofüllü häirunud *PUSA* geeni sisaldavatest taimedest (Joonis 3a). Teistest uuritud taimeliinidest eraldunud absoluutses klorofüllü koguses ei esinenud märgatavaid erinevusi (Joonis 3a). Standardiseerituna katse lõpp-punkti ehk 120nda katseminuti suhtes ilmnes, et kõige kiiremini lahustus klorofüllü negatiivse kontrollina kasutatud *bdg-6* taimedest (Joonis 3b). Häirunud ja toimivat *PUSA* geeni sisaldavate taimede klorofüllü eraldumise kiiruses ei olnud pigem erinevusi (Joonis 3b). Sarnased tulemused olid ka taimede toluidiinsinisega värvimisel (Lisa 2, lisa 3).



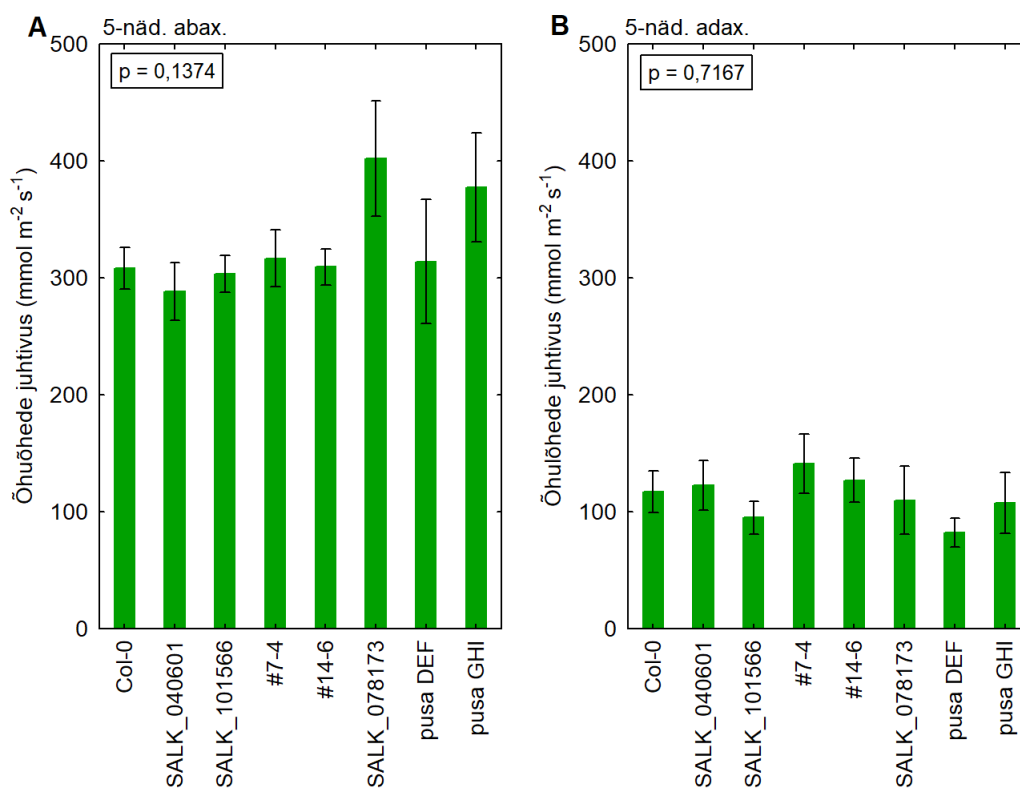
Joonis 3. (A) Taimest välja lahustunud klorofüllü kogus grammi märgmassi kohta ajas. (B) Taimest välja lahustunud klorofüllü kogus grammi märgmassi kohta ajas standardiseerituna 120 minuti punkti suhtes. A ja B telgede nullpunktid tähistavad katse null-ajahetke. Vearivad näitavad \pm standardviga. Valimi suuruseks oli neli taime igast genotüübist.

2.3.2. Taimede haabitus

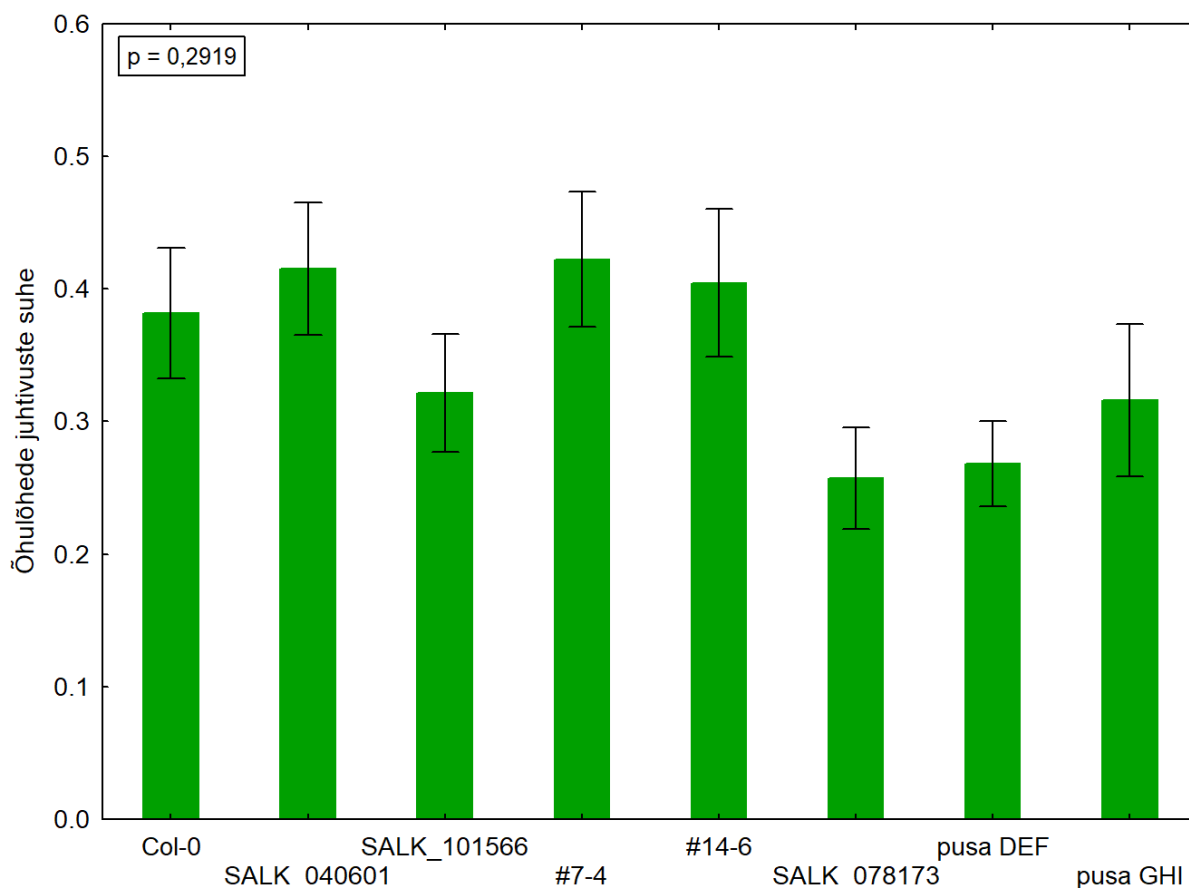
Uuritud taimeliinide välimuse erinevuse hindamine piirdus vaatlusega (Joonis 2). Täheldati, et häirunud *PUSA* geeni sisaldavate taimede lehed olid väiksemad, kui metsiktüüpi (Col-0) taimede lehed. Lisaks tundusid häirunud *PUSA* geeni sisaldavate taimede lehed väiksemad teistest toimivat *PUSA* geeni sisaldavate taimede lehtedest. Metsiktüüpi taimede lehed olid põhiliselt lapikud, kuid esines ka kumeramaid lehti. Häirunud *PUSA* geeni sisaldavate taimede lehed olid samuti lapikud või kumerad, kuid viimase korral oli kumerus metsiktüübist silmapaistvam. Toimivat *PUSA*, ent vigast *CYP707A3* geene sisaldavate taimede lehed sarnanesid metsiktüübiga. Metsiktüüpi taimede lehed olid suhteliselt sileda servaga, kohati esines ebataasusasi. Defektset *PUSA* geeni sisaldavate taimede leheservad olid metsiktüübist märgatavalt ebaühtlasemad, paistes sakilised. Funktsioneerivat *PUSA*, kuid häirunud *CYP707A3* geene sisaldavate taimede leheservad sarnanesid metsiktüübiga.

2.3.3. Õhulõhede juhtivus ja juhtivuste suhe

Statistilise analüüsi tulemusel selgus, et nii taimede abaksiaalsete ja adaksiaalsete õhulõhede juhtivustes (Joonis 4) kui ka juhtivuste suhetes (Joonis 5) ei esinenud statistiliselt olulisi erinevusi.



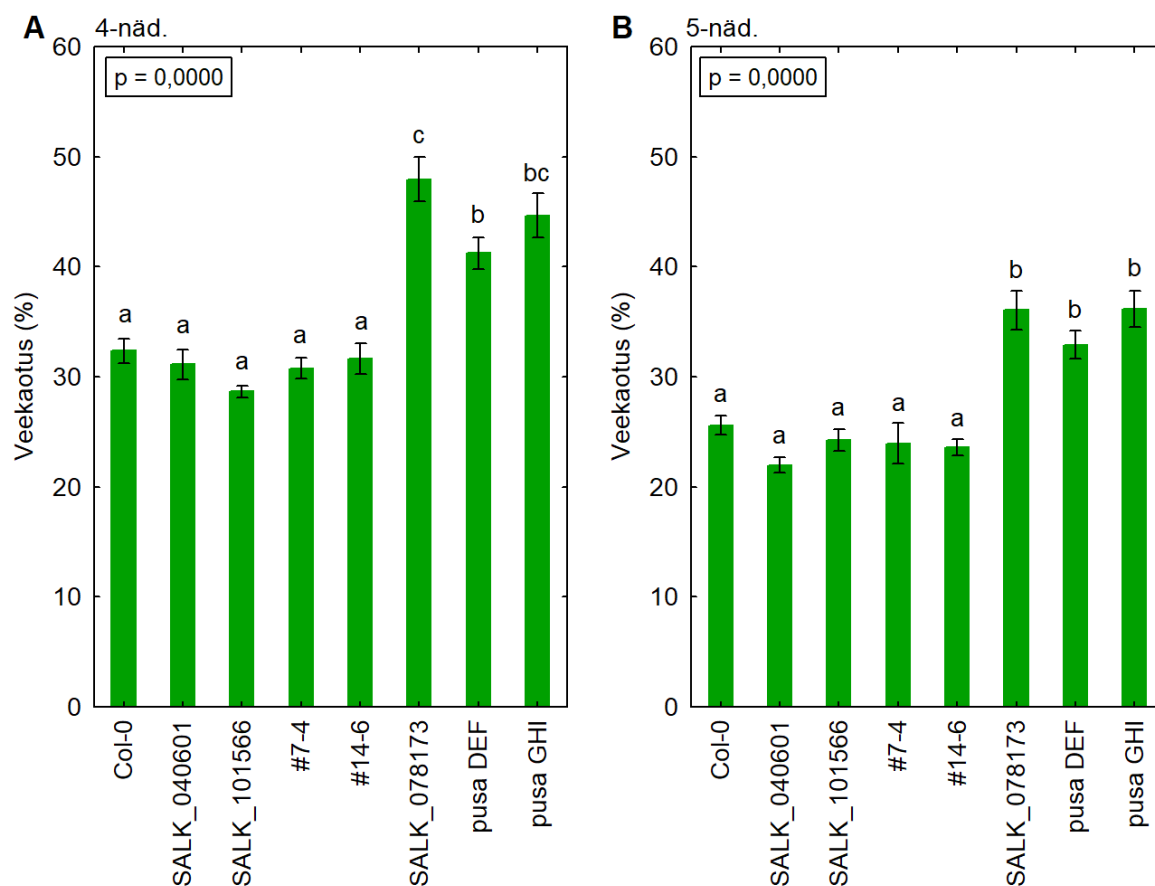
Joonis 4. Viienädalaste taimede õhulõhede keskmised juhtivused. Tulpadel asetsevad veatulpad näitavad keskmist \pm standardviga. (A) Abaksiaalsete õhulõhede juhtivused. (B) Adaksiaalsete õhulõhede juhtivused. Joonistel on näidatud ühefaktorilise ANOVA p-väärtused. A ja B valimite suurused olid 4-12 taime genotüübi kohta.



Joonis 5. Viienädalaste taimede õhulõhede juhtivuste suhe. Tulpadel asetsevad veatulbad näitavad näitavad keskmist \pm standardviga. Joonisel on näidatud ühefaktorilise ANOVA p-väärtus. Valimi suurused oli 4-12 taime genotüübi kohta.

2.3.4. Veekaotus

Neljanädalaste taimede mass vähenes enim, >40%, häirunud *PUSA* geeni sisaldavatel taimeliinidel (Joonis 6a). Funktsioneerivat *PUSA* geeni sisaldavate taimede massikaotus jäi 30% ümbrusesse (Joonis 6a). Viienädalaste taimede puhul oli massikaotuse trend analoogne: defektset *PUSA* geeni sisaldavate taimede mass vähenes >30% ning toimivat *PUSA* geeni sisaldavate taimede massi vähendas veekaotus >20% (Joonis 6b). Nii nelja- kui ka viienädalased toimivat *PUSA* geeni sisaldavad taimed ei erinenud üksteisest statistiliselt oluliselt (Joonis 6), kuid häirunud *PUSA* geeni sisaldavatest taimedest erinesid (Joonis 6). Neljanädalased SALK_078173 taimed erinesid statistiliselt oluliselt *pusa DEF*-ist (Joonis 6a). Viienädalased defektset *PUSA* geeni sisaldavad taimed üksteisest statistiliselt oluliselt ei erinenud (Joonis 6b).

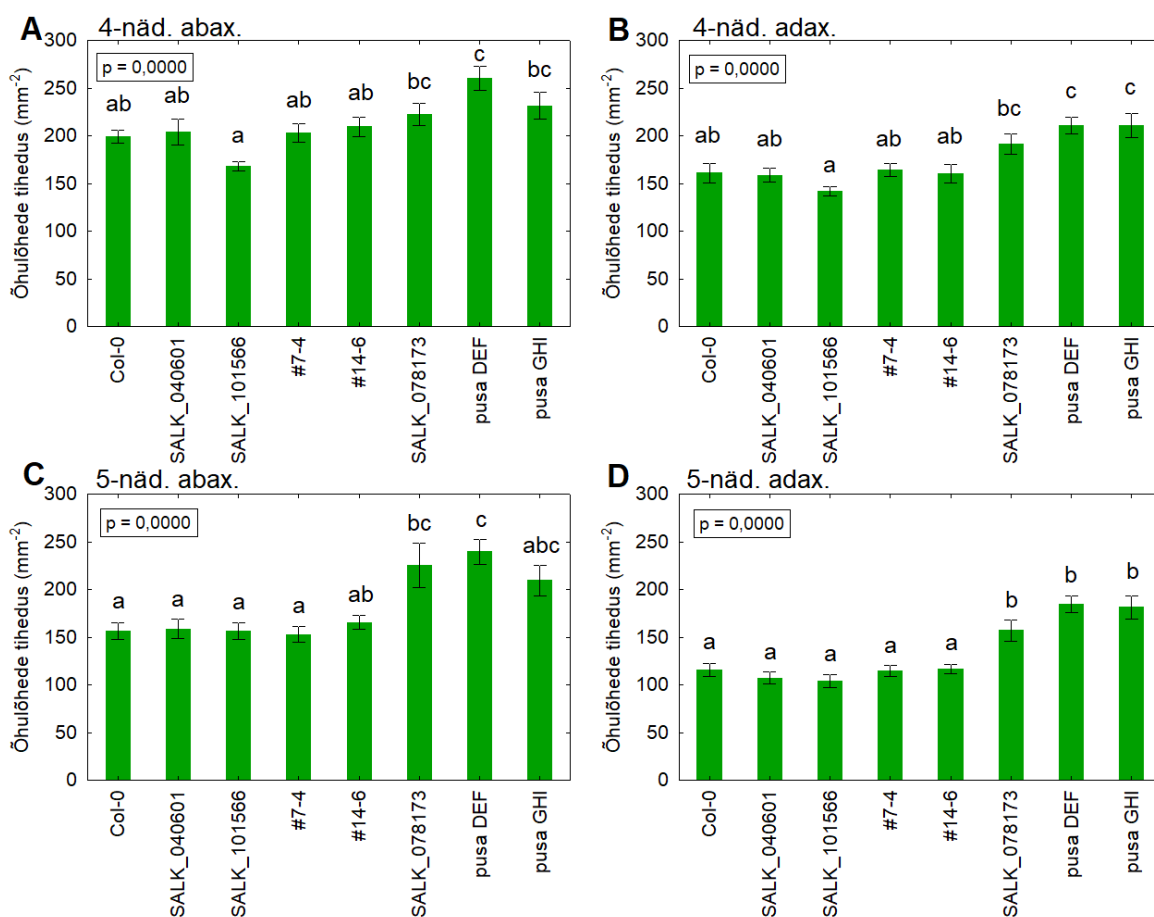


Joonis 6. Nelja- ja viienädalaste taimede veekaotused. Tulpadel asetsevad veatulbad näitavad keskmist \pm standardviga. (A) Nelja nädala vanuste taimede massi vähenemine veekaotuse tõttu. (B) Viie nädala vanuste taimede massi vähenemine veekaotuse tõttu. Liinid, mis ei jaga sama tähte, on paarikaupa erinevad (Tukey test erinevate valimisuurustega). Joonisel on näidatud ühefaktorilise ANOVA p-väärtused. A valimi suuruseks oli 22-24 ja B valimi suuruseks 10-12 taime genotüübi kohta.

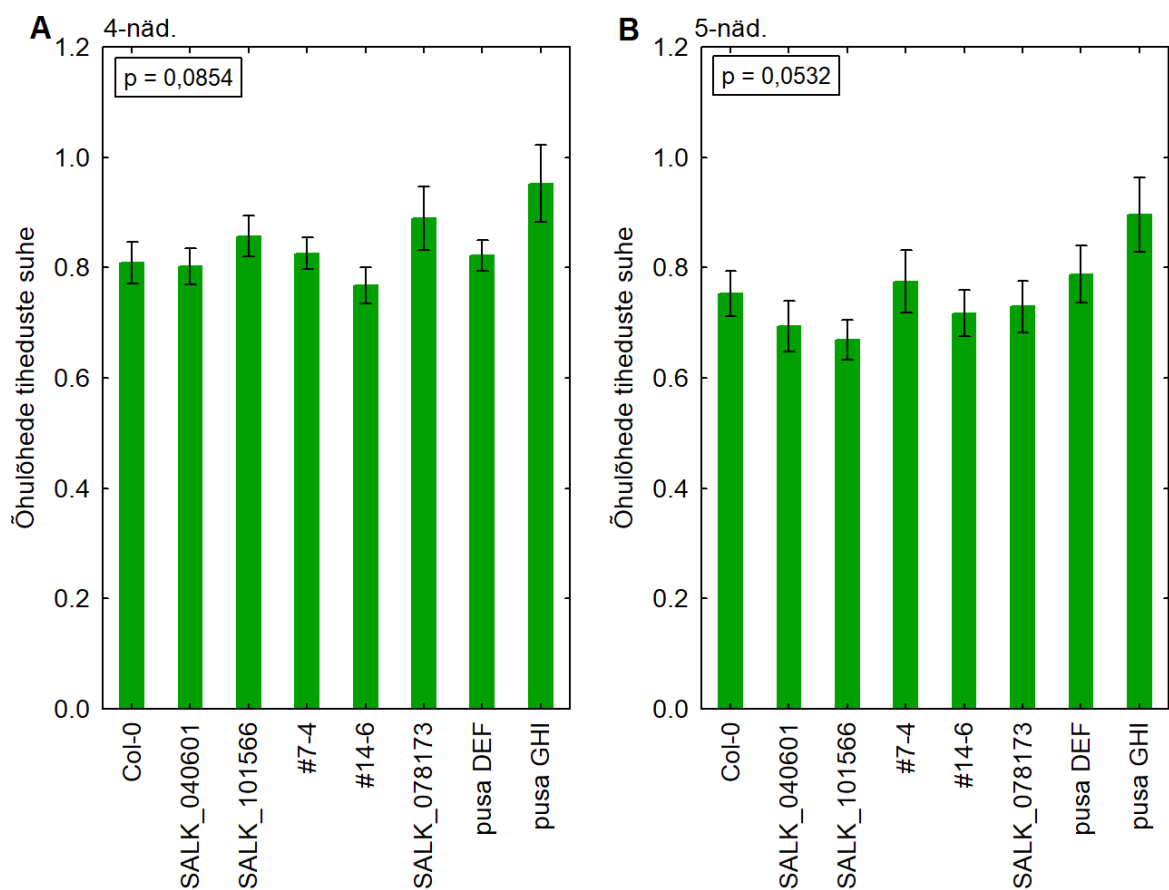
2.3.5. Õhulõhede tihedus ja tiheduste suhe

Häirunud *PUSA* geeni sisaldavatel taimedel oli pigem kõrgem õhulõhede tihedus kui funktsioneerivat *PUSA* geeni sisaldavatel taimedel (Joonis 7), ent selge erinevus häirunud ja toimivat *PUSA* geeni sisaldavate taimede vahel puudus, sest kõik häirunud *PUSA* sisaldavad taimed erinesid kõigist terve *PUSA* geeniga taimedest ainult kümnenda lehe adaksiaalsete õhulõhede tihedustes (Joonis 7d). Läbivalt erines statistiliselt oluliselt nii kuuenda kui ka kümnenda lehe mõlema külje õhulõhede tihedustes kõigist toimivat *PUSA* geeni sisaldavatest taimedest vaid *pusa DEF* (Joonis 7). Kuuenda lehe õhulõhede tihedused olid häirunud *PUSA* ja funktsioneerivat *PUSA* sisaldavate taimede vahel ilmselt sarnasemad kui kümnenda lehe õhulõhede tihedused, kuna SALK_078173 kuuenda lehe õhulõhede tihedused sarnanesid kõigi uuritud taimeliinidega peale SALK_101566, tähendades omakorda, et SALK_078173 sarnanes metsiktüübiga Col-0 (Joonis 7a,b). Seevastu kümnenda lehe õhulõhede tihedustes erines

SALK_078173 metsiktüübist statistiliselt oluliselt (Joonis 7c,d). Veel ei erinenud metsiktüübist ka *pusa GHI* kuuenda, ent ka kümnenda lehe abaksiaalsete õhulõhede tihedused (Joonis 7a,c). Samas võis *pusa GHI* kümnenda lehe abaksiaalne õhulõhede tihedus olla lihtsalt statistiline varieeruvus, kuna *pusa GHI* ei erinenud ühestki uuritud taimeliinist statistiliselt oluliselt, kuid SALK_078173 erines statistiliselt oluliselt kõigist funktsioneerivat *PUSA* sisaldavatest taimeliinidest peale #14-6 ning *pusa DEF* erines kõigist toimiva *PUSA* geeniga taimeliinidest (Joonis 7c). Siiski ei erinenud häirunud *PUSA* geeni sisaldavad taimed kunagi omavahel statistiliselt oluliselt (Joonis 7). Samuti ei erinenud ka toimivat *PUSA* geeni sisaldavad taimed omavahel ehk tervet *PUSA*, kuid vigast *CYP707A3* geeni sisaldavad taimed sarnanesid metsiktüübiga Col-0 (Joonis 7). Õhulõhede tiheduste suhetes puudusid selged erinevused (Joonis 8).



Joonis 7. Õhulõhede tihedused nelja- ja viienädalastel taimedel. Tulpadel asetsevad veatuld näitavad keskmist \pm standardviga. (A) Kuuenda lehe abaksiaalsete õhulõhede tihedused neljanädalastel taimedel. (B) Kuuenda lehe adaksiaalsete õhulõhede tihedused neljanädalastel taimedel. (C) Kümnenda lehe abaksiaalsete õhulõhede tihedused viienädalastel taimedel. (D) Kümnenda lehe adaksiaalsete õhulõhede tihedused viienädalastel taimedel. Liinid, mis ei jaga sama tähte, on paarikaupa erinevad (Tukey test erinevate valimisuurustega). Joonisel on näidatud ühefaktorilise ANOVA p-väärtused. A ja B valimi suuruseks oli 22-24 taime, C ja D valimi suuruseks 10-12 taime genotüübi kohta.



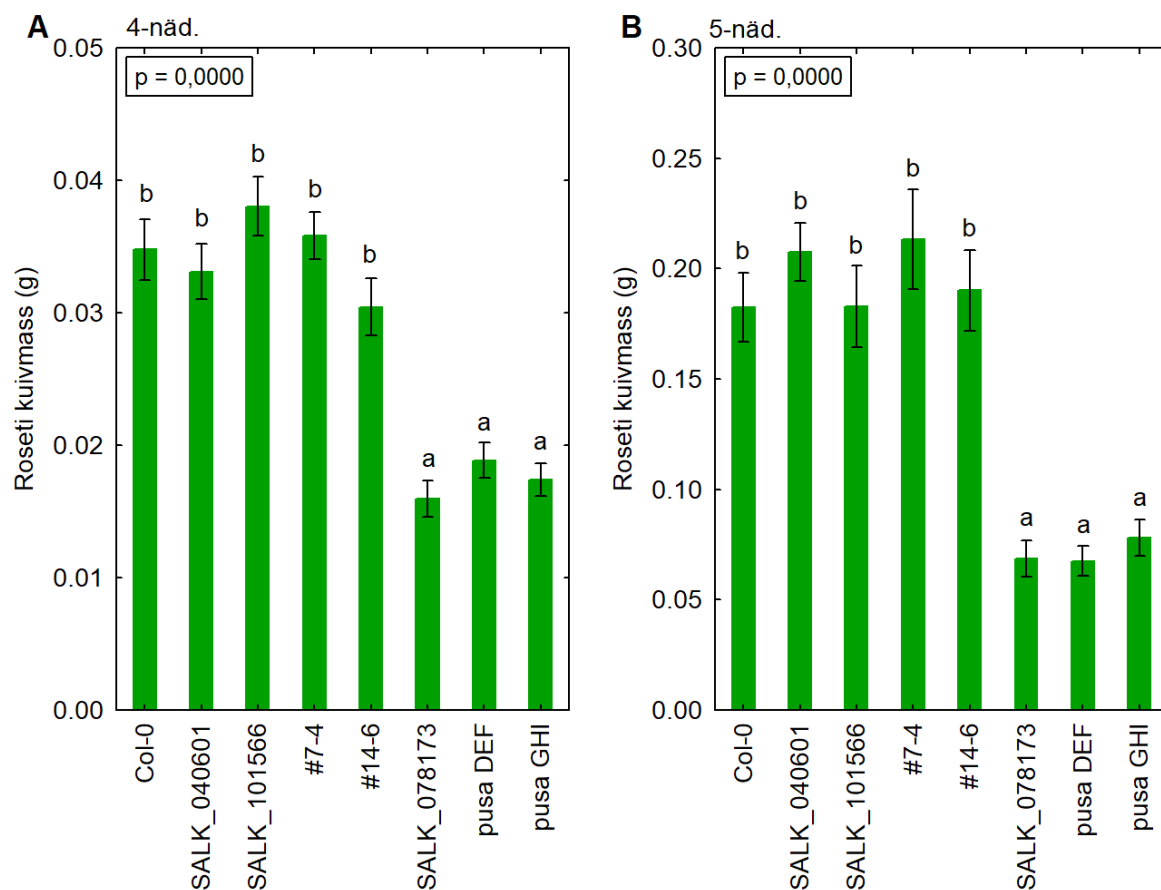
Joonis 8. Öhulõhede tiheduste suhted nelja- ja viienädalastel taimedel. Tulpadel asetsevad veatulpad näitavad keskmist \pm standarddviiga. (A) Kuuenda lehe öhulõhede suhted neljanädalastel taimedel. (B) Kümnenenda lehe öhulõhede suhted viienädalastel taimedel. Joonisel on näidatud ühefaktorilise ANOVA p-väärtused. A valimi suuruseks oli 22-24 ja B valimi suuruseks 10-12 taime genotüübi kohta.

2.3.6. Roseti kuivmass ning seos õhulõhede summaarse tihedusega

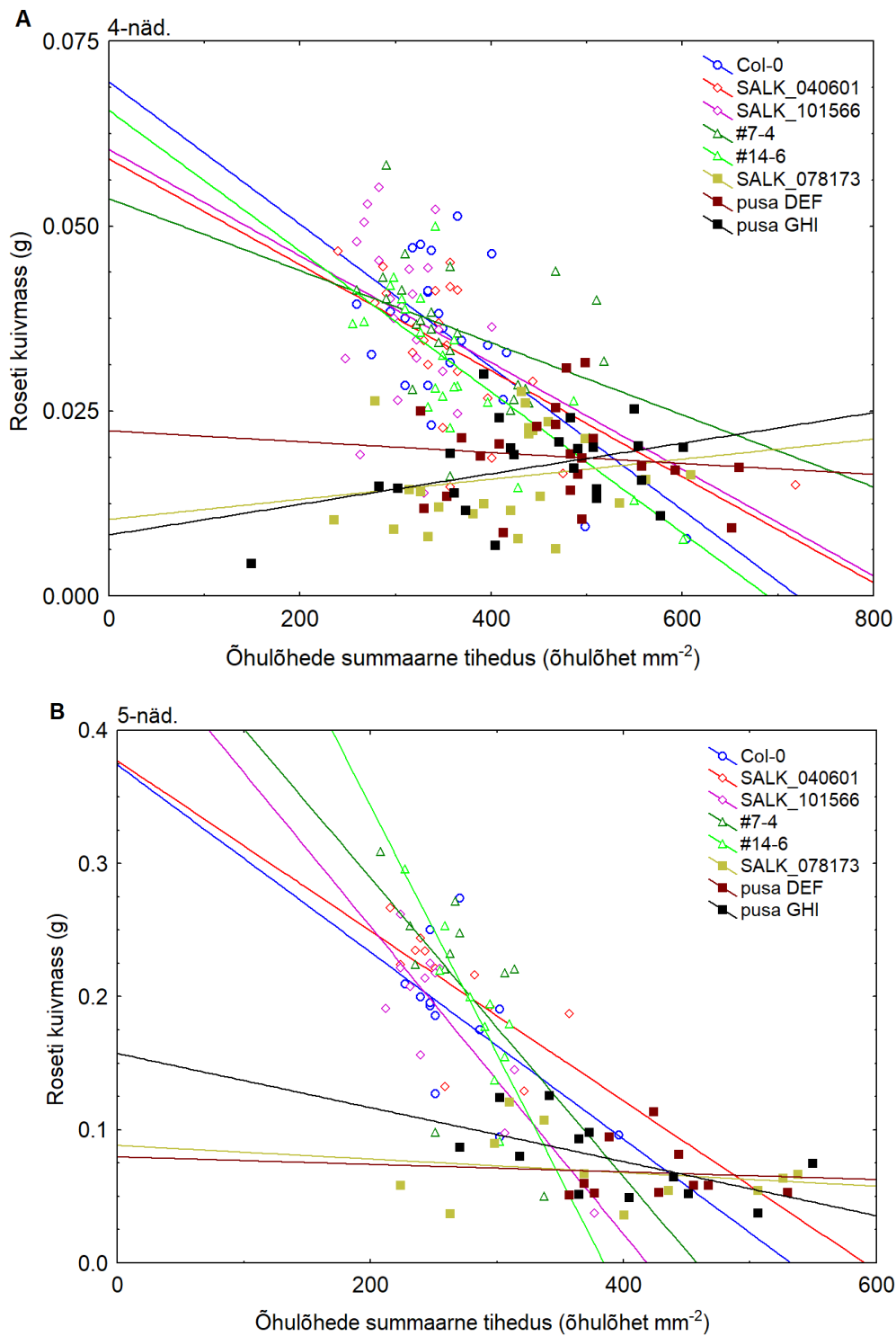
Nelja- ja viienädalastest taimedest olid kõige väiksemad roseti kuivmassid häirunud *PUSA* geeni sisaldavatel taimedel (Joonis 9). Häirunud *PUSA* geeniga taimed erinesid toimivat *PUSA* sisaldavatest taimedest mõlemal juhul statistiliselt oluliselt, omavahel defektset *PUSA* sisaldavad taimed ei erinenud (Joonis 9). Samuti ei erinenud funktsioneerivat *PUSA* sisaldavad taimed üksteisest ehk häirunud *CYP707A3*, kuid toimivat *PUSA* geeni sisaldavate taimede kuivmassid sarnanesid metsiktüübiga (Joonis 9).

Nelja- ja viienädalaste taimede roseti kuivmassi ja õhulõhede summaarse tiheduse seose uurimiseks tehtud kategoriseeritud hajusdiagrammidelt ilmnes, et kõigil toimivat *PUSA* geeni sisaldavate taimedel oli õhulõhede summaarne tihedus negatiivses korrelatsioonis roseti kuivmassiga (Joonis 10). Seevastu häirunud *PUSA* geeni sisaldavatel taimedel kindlat seost ei esinenud (Joonis 10), mistõttu tehti mõlema nädala vanustele taimedele kovariatsiooni

analüüsid (GLM, *Homogeneity-of-slopes model*) (Tabel 2). Analüüside tulemustest selgus, et nelja- ja viienädalased defektset *PUSA* geeni sisaldavad taimed erinesid statistiliselt oluliselt toimivat *PUSA* geeni sisaldavatest taimedest, kuid häirunud *PUSA* geeni sisaldavad taimed üksteisest statistiliselt ei erinenud (Tabel 2). Samuti ei erinenud omavahel terve *PUSA* geeniga taimed (Tabel 2).



Joonis 9. Nelja- ja viienädalaste taimede roseti kuivmassid. Tulpadel asetsevad veatuld näitavad keskmist \pm standardviga. (A) Neljanädalaste taimerosettide kuivmassid. (B) Viienädalaste taimerosettide kuivmassid. Liinid, mis ei jaga sama tähte, on paarikaupa erinevad (Tukey test erinevate valimisuurustega). Joonisel on näidatud ühefaktorilise ANOVA p-väärtused. A valimi suuruseks oli 22-24 ja B valimi suuruseks 10-12 taime genotüübi kohta.



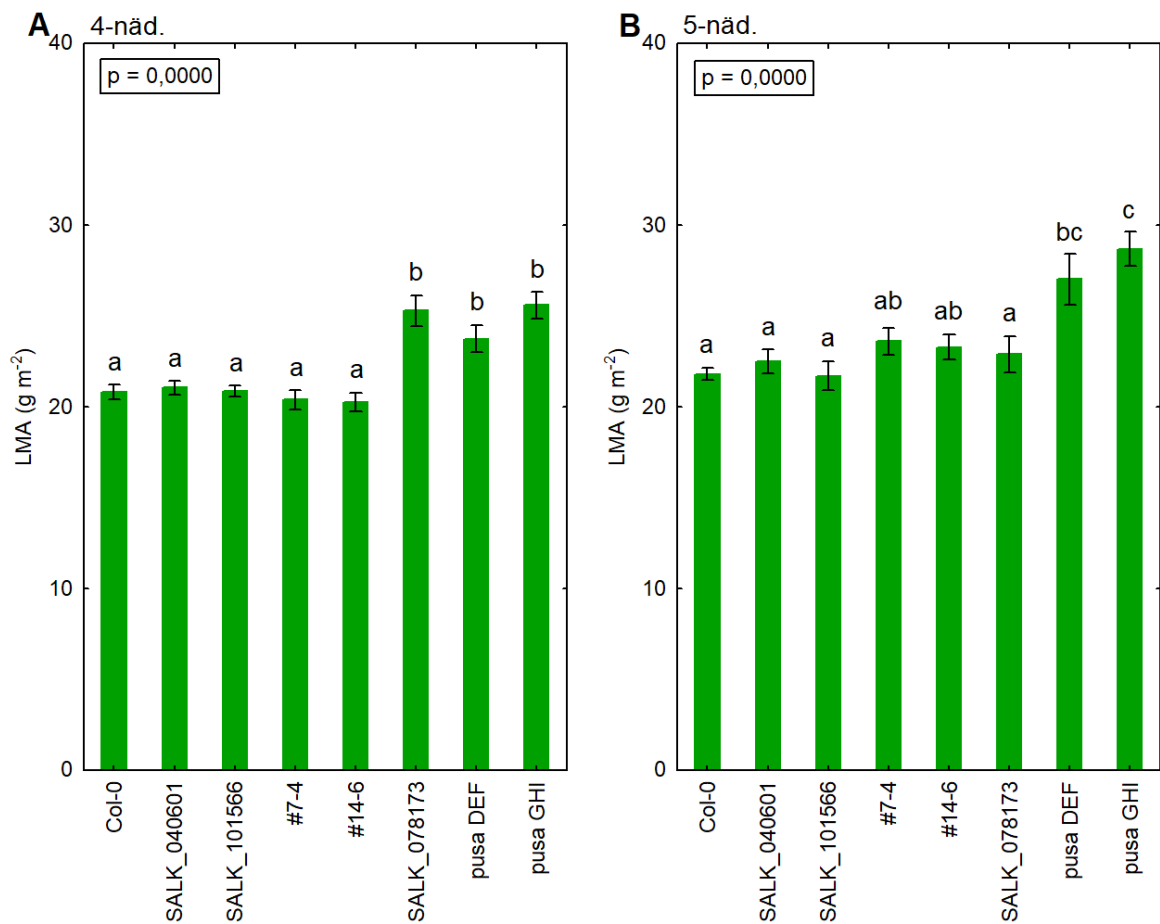
Joonis 10. Roseti kuivmassi sõltuvus summaarsest õhulõhede tihedusest nelja- ja viienädalastel taimedel. (A) Nelja nädala vanuste taimede seosed roseti kuivmassi (g) ja õhulõhede summaarse tiheduse (õhulõhet mm⁻²) vahel. (B) Viie nädala vanuste taimede seosed roseti kuivmassi (g) ja õhulõhede summaarse tiheduse (õhulõhet mm⁻²) vahel. A valimi suuruseks oli 22-24 ja B valimi suuruseks 10-12 taime igast genotüübist.

Tabel 2. Nelja- ja viienädalaste taimedele õhulõhede summaarse tiheduse ja roseti kuivmassi vaheliste seoste uurimiseks *Homogeneity-of-slopes* mudeliga tehtud kovariatsiooni analüüs. Tabelis on näidatud analüüside genotüüp*õhulõhede summaarse tiheduse interaktsioonide p-väärtused.

Vanus	Kõik genotüübid	<i>pusa</i> mutandid	Terve <i>PUSA</i>-ga taimed
4-näd. (leht nr 6)	0,000	0,344	0,581
5-näd. (leht nr 10)	0,000	0,394	0,275

2.3.7. Lehe mass pindala kohta

Neljänädalaste taimede lehe kuivmass pindala kohta (LMA) oli kõige kõrgem häirunud *PUSA* geeni sisaldavatel taimedel ning defektset *PUSA* sisaldavad taimed erinesid toimivat *PUSA* sisaldavatest taimedest statistiliselt oluliselt, kujuures gruppide siseselt erinevused puudusid (Joonis 11a). Seevastu viienädalaste häirunud *PUSA* geeniga taimede lehe massi ja pindala suhete erinemine funktsioneerivat *PUSA* sisaldavatest taimedest oli ebaselgem: SALK_078173 sarnanes kõigi toimivat *PUSA* geeni sisaldavate taimedega (Joonis 11b), mis tähendab, et SALK_078173 LMA ei erinenud metsiktüübist Col-0 statistiliselt oluliselt; *pusa DEF* erines kõigist terve *PUSA* geeniga taimedest peale #7-4 ja #14-6 statistiliselt oluliselt (Joonis 11b); *pusa GHI* erines kõigist terve *PUSA* geeniga taimedest statistiliselt oluliselt (Joonis 11b). Viienädalased toimivat *PUSA* sisaldavad taimed ei erinenud omavahel (Joonis 11b), kuid häirunud *PUSA* geeniga taimed erinesid: SALK_078173 erines nii *pusa DEF*-ist kui ka *pusa GHI*-st, *pusa DEF* ja *pusa GHI* omavahel ei erinenud (Joonis 11b). Tuginedes statistilisele analüüsile, olid viienädalaste häirunud *PUSA*, kuid toimiva *CYP707A3* geeniga taimede lehe massi ja pindala suhted pigem kõrgemad kui ülejäänud uuritud taimeliinidel (Joonis 11b).



Joonis 11. Lehe kuivmass pindala kohta (LMA) nelja- ja viienädalastel taimedel. Tulpadel asetsevad veatulbad näitavad keskmist \pm standardviga. (A) Neljanädalaste taimede LMA. (B) Viienädalaste taimede LMA. Liinid, mis ei jaga sama tähte, on paarikaupa erinevad (Tukey test erinevate valimisuurustega). Joonisel on näidatud ühefaktorilise ANOVA p-väärtused. A valimi suuruseks oli 22-24 taime, B valimi suuruseks 10-12 taime genotüübi kohta.

2.4. Arutelu

Häirunud *PUSA* geeni sisaldavad taimed olid funktsioneeriva *PUSA* geeniga taimedest tunduvalt väiksemad, mida tõestab taimede kuivmass (Joonis 9). Defektseid *PUSA* ja *CYP707A3* geene sisaldavate taimede (SALK_078173) metsiktüübist (Col-0) madalam kuivmass võiks olla seostatav *cyp707a3-1* mutatsiooni põhjustatud häirunud ABA taseme reguleerimisega, kuna varasemalt on näidatud, et ka *cyp707a3-3* mutatsiooni sisaldavad taimed olid samuti metsiktüübist väiksemad (Bhaskara et al., 2022). Antud teooriaga on vastuolus defektset *CYP707A3*, kuid toimivat *PUSA* geeni sisaldavate taimede metsiktüübiga sarnane kuivmass, viidates *PUSA* geeni häirumise võimalikule kasvu pärssivale mõjule. Seda toetab omakorda defektse *PUSA*, ent terve *CYP707A3* geeniga taimede metsiktüübist madalam kuivmass.

Samuti võib häirunud *PUSA* geeni sisaldavate taimede väiksem suurus olla seotud sellega, et kõigil neljanädalastel häirunud *PUSA* geeniga taimedel oli lehe massi ja pindala suhe (LMA) toimiva *PUSA* geeniga taimedest kõrgem (Joonis 11a). Varasemalt on avaldatud, et kõrgem LMA viitab lehtede aeglasemale arengule, kuna nende väljakujunemine on taimetele energiakulukam (Westoby et al., 2002). Samuti olid viie nädala vanuste defektset *PUSA*, kuid toimivat *CYP707A3* geeni sisaldavate taimede LMA-d teistest uuritud taimeliinidest pigem kõrgemad (Joonis 11b). Viienädalaste häirunud *PUSA* ja *CYP707A3* geeniga taimede (SALK_078173) LMA sarnanemine toimiva *PUSA*, kuid häirunud *CYP707A3* geeniga taimedega ning erinemine teistest häirunud *PUSA* geeni sisaldavatest taimedest võib olla tingitud sellest, et vigase *PUSA*, kuid funktsioneeriva *CYP707A3* geeniga taimede genotüüp ei sisalda defektset *CYP707A3* geeni, mis häirib ABA homöostaasi (Kushiro et al., 2004). Siiski sarnanesid viienädalaste SALK_078173 taimede, nagu ka nelja- ja viienädalaste toimiva *PUSA* ja häirunud *CYP707A3* geeniga taimede LMA-d metsiktüübiga (Joonis 11), viidates sellele, et *CYP707A3* häirumine ei mõjuta LMA-d. Defektse *CYP707A3* häirumise mitteeristuvat toimet lehe massi ja pindala suhtele on varasemalt näidatud seoses *cyp707a1cyp707a3* topeltmutandiga, mille LMA ei erinenud samuti metsiktüübist statistiliselt oluliselt (Tulva et al., 2024). Sellest tulenevalt jääb tegelikult ebaselgeks, miks erinesid viienädalased häirunud *PUSA* ja *CYP707A3* geeniga taimed teistest häirunud *PUSA* geeniga taimedest ja sarnanesid toimivat *PUSA* geeni sisaldavate taimedega, kui *CYP707A3* häirumine ei mõjuta tõenäoliselt LMA-d ning neljanädalased häirunud *PUSA* geeniga taimed sarnanesid omavahel ning erinesid terve *PUSA* geeniga taimedest. Ilmselt on viienädalaste SALK_078173 taimede puhul tegemist statistilise varieeruvusega, kuna viienädalased häirunud *PUSA* ning toimiva *CYP707A3* geeniga taimede üldiselt kõrgemad LMA-d olid kooskõlas neljanädalaste samade taimeliinide lehe ja

kuivmassi pindala suhetega, ning seetõttu oleks olnud oodatav, et ka viienädalaste SALK_078173 LMA-d on toimivat *PUSA* sisaldavatest taimedest kõrgemad.

Häirunud *PUSA* geeni sisaldavate taimede haabitus (Joonis 2) eristus metsiktüübist ning teistest toimivat *PUSA* geeni sisaldavatest taimedest märgatavalt, väljendudes väiksemates ja ebataavalise kujuga lehtedes. Kuna omapärane välimus esines nii funktsioneeriva kui ka defektse *CYP707A3* geeniga *pusa* mutatsiooni sisaldavatel taimedel, viitab see sellele, et *PUSA* geeni häirumine võib põhjustada fenotüübilisi iseärasusi. Käesolevas töös uuritud defektset *CYP707A3* ja toimivat *PUSA* geene sisaldavatel taimedel ei täheldatud metsiktüübist eristuvat haabitust (Joonis 2). Varasem informatsioon häirunud *CYP707A3* geeni mõjust fenotüübile on ebaselge, kuna on avaldatud, et *cyp707a3* mutatsiooniga ei kaasnenud metsiktüübist eristuvat fenotüüpi, kuid ka, et *cyp707a3* mutatsiooni sisaldavatel taimedel siiski oli õrn fenotüüp (Kushiro et al., 2004; Saito et al., 2004).

Häirunud *PUSA* geeni sisaldavatel taimedel oli pigem kõrgem õhulõhede tihedus, kui toimivat *PUSA* geeni sisaldavatel taimedel (Joonis 7), viidates sellele, et *PUSA* geeni häirumisega võib kaasneda rohkem õhulõhesid lehe pinnaühiku kohta, ent selge statistilise erinevuse puudumise tõttu tasuks tulevikus katsed korrata. Kuuenda lehe õhulõhede tihedused (Joonis 7a,b) võisid häirunud ja toimivat *PUSA* geeni sisaldavate taimede vahel olla sarnasemad kui kümnendatel lehtedel (Joonis 7c,d) seetõttu, et kuuendad lehed pärinesid neljanädalastelt taimedelt. Nimelt on varasemalt avaldatud, et lehe kasvamisega väheneb õhulõhede tihedus (Gay & Hurd, 1975). Sellest tulenevalt võis defektset *PUSA* sisaldavate taimede õhulõhede tiheduste võimalik erinemine funktsioneerivat *PUSA* sisaldavatest taimedest vähem eristatav olla.

Funktsioneerivat *PUSA* geeni sisaldavate taimede sarnased õhulõhede tihedused (Joonis 7) viitavad sellele, et antud katses ei põhjustanud *CYP707A3* häirumine metsiktüübist erinevat õhulõhede tihedust. Eelnevalt on avaldatud, et *cyp707a3* mutatsiooniga kaasnes ABA katabolismi alanemine, põhjustades omakorda õhulõhede arengut tõenäoliselt inhibeeriva ABA kontsentratsiooni eeldatavat tõusu (Tanaka et al., 2013; Umezawa et al., 2006). Seetõttu oleks olnud oodatav, et vigast *CYP707A3* ja toimivat *PUSA* sisaldavate taimede õhulõhede tihedused jäävad metsiktüübist madalamaks. Samuti ei olnud nii häirunud *PUSA* kui ka *CYP707A3* geeniga SALK_078173 taimede õhulõhede tihedused metsiktüübist madalamad (Joonis 7). Olukord võib olla seletatav *CYP707A* geenide reduntantsusega: erinevad *CYP707A* geenid avalduvad varieeruva tasemel samades taimekudedes, mistõttu võis *CYP707A3* geeni funktsiooni puudumist kompenseerida mingi muu *CYP707A* geen (Kushiro et al., 2004; Saito et al., 2004). Lisaks on *CYP707A* geenide reduntantsusega kooskõlas eelnevad uuringud

cyp707a1cyp707a3 topelmutantidega, millel esinesid hõredamalt paiknevad õhulõhed (Jalakas et al., 2018; Tanaka et al., 2013).

Samuti võib uuritud taimeliinides ilmnenud madal *CYP707A3* toime toetada teooriat, et häirunud *PUSA* sisaldavate taimede potentsiaalselt kõrgem õhulõhede tihedus oli seotud ikkagi *PUSA* geeni defektiga. Kuigi häirunud *PUSA* ja *CYP707A3* geene sisaldavate SALK_078173 taimede õhulõhede tiheduste erinevused toimivat *PUSA* geeni sisaldavatest taimedest jäi ebaselgeks, piirdudes statistiliselt olulise erinevusega kümnenda lehe abaksiaalsete ning üldiselt ka sama lehe abaksiaalsete õhulõhede tihedustes (Joonis 7d,c), sarnanesid häirunud *PUSA* geeni sisaldavate taimede õhulõhede tihedused alati üksteisega (Joonis 7). Sellest tulenevalt viitab SALK_078173-st pärineva defektse *PUSA* ja toimiva *CYP707A3* geeniga *pusa DEF* taimeliini statistiliselt oluline erinevus kõigist toimivat *PUSA* geeni sisaldavatest taimedest mõlema lehe abaksiaalsete ja adaksiaalsete õhulõhede tihedustes, et *pusa DEF* kõrgem õhulõhede tihedus kaasnes *PUSA* geeni häirumisega.

Õhulõhede summaarse tiheduse mõju uurimisest taimede kuivmassile selgus, et funktsioneerivat *PUSA* geeni sisaldavate taimede õhulõhede tihedus mõjutab kuivmassi negatiivselt, ehk mida madalam oli õhulõhede tihedus, seda kõrgem oli taime kuivmass (Joonis 10). Õhulõhede tiheduse pärssiv mõju taimede kasvule võib seletatav olla sellega, et rohkemad õhulõhed põhjustavad suuremat vee aurustumist ning taimede kasv on seetõttu häiritud (Doheny-Adams et al., 2012). Seevastu häirunud *PUSA* sisaldavate taimede kuivmassil polnud õhulõhede tihedusega seost (Joonis 10). Kuna häirunud *PUSA* sisaldavate taimede õhulõhede tihedused olid pigem kõrgemad (Joonis 7) ja kuivmassid (Joonis 9) märgatavalt madalamad, kui funktsioneerivat *PUSA* geeni sisaldavate taimede vastavad tulemused, kuid teada on, et toimivat *PUSA* sisaldavate taimede kõrgema õhulõhede summaarse tihedusega kaasnes madalam kuivmass, võib häirunud *PUSA* geeni sisaldavate taimede kuivmassi ja õhulõhede tiheduse vahelise seose puudumine viidata sellele, et *PUSA* geeni häirumine võib põhjustada väiksemaid taimi. Seetõttu võis häirunud *PUSA* geeni sisaldavate taimede võimalik kõrgem õhulõhede tihedus olla põhjustatud väiksest kasvust, kuna õhulõhede arv määratakse taime varajases arengus ning lehe kasvamisel õhulõhede tihedus väheneb (Gay & Hurd, 1975; Haworth et al., 2021).

Nii nelja- kui ka viienädalaste häirunud *PUSA* geeni sisaldavate taimede õhulõhede tiheduste suhetes (Joonis 8) ei ilmnenud selgeid erinevusi. Samas võisid tegelikud erinevused siiski eksisteerida, kuid neid ei suudetud lihtsalt tõestada. Õhulõhede tiheduste suhete üldine sarnanemine viitab sellele, et *PUSA* geeni häirumisega võib kaasneda eeldatav õhulõhede arvu suurenemine mõlemal lehe küljel. See on oluline, kuna harilik müürlook on amfistomaatiline

taim ning õhulõhede mõlemal lehe küljel paiknemine hõlbustab gaasivahetust (Drake et al., 2019; Muir, 2015). Seetõttu võib mingi geeni mutatsiooni, mis mõjutab abaksiaalsete ja adaksiaalsete õhulõhede arvu erinevalt, esinemine häirida taime elutegevust. Samuti viitavad katse tulemused sellele, et *CYP707A3* geeni häirumine ei mõjuta õhulõhede tiheduste suhet. Seda toetab varasem uuring, kus näidati, et häirunud *CYP707A1* ja *CYP707A3* gene sisaldavate topelmutantide õhulõhede tiheduste suhe oli samuti metsiktüübile lähedane (Jalakas et al., 2024). Kõigi kasvukatses uuritud taimeliinide keskmised õhulõhede tiheduste suhted jäid alla ühe nii nelja- kui ka viienädalastel taimedel. See tähendab, et taimedel oli abaksiaalseid õhulõhesid rohkem kui adaksiaalseid õhulõhesid, olles kooskõlas varasemalt avaldatuga (Martin & Glover, 2007).

Taim võib liigselt vett kaotada nii läbi avatud õhulõhede kui ka katkise kutiikula. Uuritud liinide taimed peale negatiivse kontrollina kasutatud *bdg-6* toluidiinsinisega ei värvunud (Lisa 2, lisa 3). Häirunud *PUSA* geeni sisaldavatest kolmenädalastest taimedest lahustus klorofüllil grammi märgmassi kohta kõige vähem välja (Joonis 3a), mis võib seotud olla sellega, et ilmselt oli nendes taimedes lihtsalt massi kohta vähem klorofüllil, mis on kooskõlas ka neljanädalaste vigast *PUSA* geeni sisaldavate taimede kõrgema LMA-ga (Joonis 11a). Nimelt on varasemalt avaldatud, et kõrgema LMA-ga taimed sisaldasid massi kohta vähem klorofüllil (Poorter & Evans, 1998). Siinesitatud katse tulemused viitavad sellele, et defektne *PUSA* geen ei mõjuta kutiikula terviklikkust. Samuti ei olnud häirunud *CYP707A3* sisaldavate taimede kutiikulast selgelt näha ABA eeldatavat positiivset mõju kutiikulale (Cui et al., 2016).

Uuritud taimede õhulõhede juhtivustes (Joonis 4) ning ka õhulõhede juhtivuste suhetes (Joonis 5) ei olnud erinevusi, mis võib olla tingitud andmete suurest varieeruvusest. See võib omakorda olla põhjustatud sellest, et kui taim on millestki häiritud ja sulgeb vastusena stressile õhulõhed, toimub see mõne minutiga ning on seetõttu ettearvamatu (Lake & Woodward, 2008). Näiteks võis taimedes stressi tekitada õhulõhede juhtivuste mõõtmine kasvukappides, mistõttu oli kasvukapi uks mitme minuti vältel lahti. Samuti olid osad, eeskätt häirunud *PUSA* geeni sisaldavad taimed, väiksemad ning seega ei õnnestunud poromeetriga mõõtmine esimesel katsel vaid tuli mingi muu lehega uuesti proovida. Varasemalt on näidatud, et nii *cyp707a3-1* kui ka *cyp707a3-2* õhulõhede juhtivused on metsiktüübist madalamad, mida seostatakse *CYP707A3* geeni häirumisest tuleneva ABA kontsentratsiooni eeldatava tõusuga (Okamoto et al., 2009; Umezawa et al., 2006).

Põhiline vee aurustumine toimub läbi õhulõhede ning transpiratsiooni taset kirjeldavaks parameetriks on õhulõhede juhtivus, mis sõltub nii õhupilu apertuurist kui ka õhulõhede tihedusest (Hetherington & Woodward, 2003). Seetõttu on veekaotus seda suurem, mida

rohkem paikneb taime lehel avatud õhulõhesid. Lühiajalist ehk mõõtmishetkele vastavat õhulõhede juhtivust saab mõõta poromeetriga, ent õhulõhede juhtivust on võimalik hinnata ka pikemaajaliselt – veekaotuskatsega, mis põhineb taimerosesti massi vähenemises vee aurustumise tõttu. Veekaotuskatse tulemustest selgus, et häirunud *PUSA* geeni sisaldavatest taimedest aurustus kahe tunni jooksul rohkem vett kui funktsioneerivat *PUSA* geeni sisaldavatest taimedest (Joonis 6), viidates *PUSA* geeni häirumise võimalikule transpiratsiooni edendavale mõjule. Häirunud *PUSA* geeni sisaldavate taimede jõudsam massikaotus on kooskõlas ka samade taimede võimaliku kõrgema õhulõhede tihedusega (Joonis 7), mis võib omakorda põhjustatud olla taimede väiksemast kasvust (Joonis 9). Samuti viitab häirunud *PUSA* geeni sisaldavate taimede suurenenud veekaotus avatumatele õhulõhedele, kuna kõnealuste taimede kutiikula on terviklik (Joonis 3, lisa 2, lisa 3), mistõttu väheneb kutikulaarse aurustumise tõenäosus. Seetõttu oleks ootuspärane, et ka häirunud *PUSA* geeni sisaldavate taimede poromeetriga mõõdetud õhulõhede juhtivused oleksid olnud toimivat *PUSA* sisaldavatest taimedest kõrgemad (Joonis 4). Samas viitab häirunud *PUSA* geeni sisaldavate taimede suurenenud veekaotus (Joonis 6) siiski kõrgemale õhulõhede juhtivusele, mis avaldus lihtsalt pikema aja vältel. Antud katses on ebamäärane häirunud *CYP707A3* geeni mõju transpiratsioonile, kuna funktsioneerivat *PUSA* geeni sisaldavate taimede veekaotused ei erinenud üksteisest statistiliselt oluliselt (Joonis 6). Samuti ei erinenud häirunud *PUSA* geeni sisaldavate taimede veekaotused (Joonis 6), kuid see võib olla osaliselt põhjendatav defektse *PUSA* geeni esinemisega, mis samas ei tähenda, et *CYP707A3* geeni häirumisel puudus vigast *PUSA* geeni sisaldavates taimedes igasugune mõju. Tuginedes varasemalt avaldatule peaks *CYP707A3* geeni häirumisega kaasnema madalam veekaotus, sest eeldatava ABA kontsentratsiooni tõusuga kaasnevad suletunud õhulõhed (Okamoto et al., 2009; Umezawa et al., 2006). Jättes kõrvale *PUSA* geeni häirumise põhjustatud potentsiaalse efekti, oleks olnud oodatav, et funktsioneerivat *PUSA*, kuid häirunud *CYP707A3* geeni sisaldavate taimede veekaotused jäävad metsiktüübist madalamaks. Olukord võib olla jällegi seostatav *CYP707A* geenide reduntantsusega (Kushiro et al., 2004; Saito et al., 2004). Ühiselt viitavad veekaotuskatse tulemused sellele, et häirunud *PUSA* geeni esinemine vähendab taimede kontrolli õhulõhede reguleerimise üle ning *CYP707A3* geeni häirumisest tulenev oodatav toime on madal ka nendes taimedes, mis defektset *PUSA* geeni ei sisalda.

2.4.1. Järeldused

Läbiviidud katsetest järeldus, et *PUSA* geeni häirumine pärssis taimede kasvu. Samuti selgus, et kummagi uuritud geeni häirumine ei mõjutanud kutiikula terviklikkust. Kuigi häirunud *PUSA* sisaldavate taimede õhulõhede tiheduste erinevus toimivat *PUSA* sisaldavatest taimedest jäi ebaselgeks, vajades edasist uurimist, viitasid defektset *PUSA* sisaldavate taimede kõrgemad veekaotused siiski sellele, et häirunud *PUSA* sisaldavate taimede õhulõhetunnused erinesid funktsioneerivat *PUSA* sisaldavatest taimedest. Sellest tulenevalt järeldus, et häirunud *PUSA* sisaldavate taimede eeldatavalt kõrgem õhulõhede tihedus on põhjustatud nende taimede väiksemast kasvust, kuna defektset *PUSA* sisaldavate taimede kuivmassi ja õhulõhede summaarse tiheduse vahel ei olnud seost. Uuritud taimeliinide haabituse vaatlemisest ilmselgus, et häirunud *PUSA* sisaldavatel taimeliinidel oli metsiktüübist erinev välimus, mille täpsemad tekkepõhjused vajavad edasist uurimist.

Katsetest häirunud *CYP707A3* ja tervet *PUSA* sisaldavate taimedega järeldus, et *CYP707A3* geeni mõju oli madal, kuna need taimeliinid ei erinevad mitte kunagi metsiktüübist Col-0 statistiliselt oluliselt.

Osade katsete tulemustes (õhulõhede juhtivus, juhtivuste suhe, tiheduste suhe) ei esinenud uuritud taimeliinide vahel statistiliselt olulisi erinevusi, mis ei välista tegelike erinevuste olemasolu ning seega peaks tulemustes veendumiseks neid katseid kordama. Sellele vaatamata järeldus katsetest, et SALK_078173 taimede metsiktüübist eristuvat fenotüüpi põhjustas *PUSA* geeni häirumine, sest katsetes, kus statistiliselt olulised erinevused olid olemas, erinesid SALK_078173 taimed üldiselt toimivat *PUSA* geeni sisaldavatest taimedest ning häirunud *PUSA* sisaldavad taimeliinid ei erinevad üksteisest kunagi, välja arvatud viienädalaste taimede lehe kuivmassi ja pindala suhetes, mis oli ilmselt juhuslik statistiline varieeruvus. Lisaks näitasid katsed toimivat *PUSA* ja häirunud *CYP707A3* sisaldavate taimedega, et *cyp707a3* toime oli madal, toetades omakorda SALK_078173 fenotüübi seostumist *pusa* mutatsiooniga.

KOKKUVÕTE

Käesolevas bakalaureusetöös keskenduti kahele hariliku müürlooga taimedes avalduvale geenile, millest esimene – mutantsel fenotüübil põhinevat esmast nimetust kandev *PUSA* on tundmatu geen, mille funktsiooni pole varasemalt kirjeldatud. Samuti sooviti rohkem teada saada juba varasemalt uuritud *CYP707A3* geeni toimest taimedele, kuna kõnealune geen kodeerib valku, mis osaleb taimehormoon abstsiiishappe taseme reguleerimisel ning on seega oluline taime elutegevuseks. Mõlema geeni uurimine tulenes sellest, et ühel häirunud *CYP707A3* geeni sisaldaval taimeliinil (SALK_078173) ilmnes silmapaistev fenotüüp, mis ei seostunud kuidagi *CYP707A3* geeni võimaliku häirumisest tuleneva mõjuga. Sellest liinist eelnevalt eraldatud *pusa* ja *cyp707a3* mutantsete taimeliinide uurimisega sooviti kindlaks teha, kas SALK_078173 genotüübiga taimede fenotüüp on põhjustatud tundmatu *PUSA* või siiski *CYP707A3* geeni häirumisest.

Saadi teada, et *PUSA* geen on oluline taimede kasvamiseks, sest häirunud *PUSA* geeni sisaldavate taimede madalamad kuivmassid erinesid statistiliselt oluliselt toimivat *PUSA* sisaldavate taimede kuivmassidest. Selgus, et häirunud *PUSA* geeni sisaldavatel taimedel oli pigem lehe pinnaühiku kohta rohkem õhulõhesid, kui terve *PUSA* geeniga taimedel, ent selgete erinevuste puudumise tõttu tuleks katset korrata. Lisaks saadi teada, et õhulõhede summaarne tihedus ei mõjutanud häirunud *PUSA* geeni sisaldavate taimede kuivmassi, mistõttu on võimalik, et nende taimede eeldatavalt kõrgem õhulõhede tihedus võis olla põhjustatud pisematest lehtedest, kuid õhulõhede tiheduse ebaselgete tulemuste tõttu oleks vaja edasisi uuringuid. Samuti tasuks lähemalt uurida *PUSA* geeni häirumise mõju õhupilu apertuuri reguleerimisele, kuna poromeetriga mõõdetud mõõtmishetkele vastavates õhulõhede juhtivustes uuritud taimeliinide vahel erinevusi ei esinenud, ent veekaotuskatses ilmnenud häirunud *PUSA* geeniga taimede kõrgem pikemaajaline õhulõhede juhtivus, mis võib küll seotud olla kõnealuste taimede eeldatavalt kõrgema õhulõhede tihedusega, viitab ka avatumatele õhulõhedele ning seega defektset *PUSA* sisaldavate taimede vähenenud kontrollile õhulõhede reguleerimise üle. Huvitaval kombel ei erinenud ükski häirunud *CYP707A3*, kuid toimivat *PUSA* geeni sisaldav taimeliin metsiktüübist (Col-0) üheski mõõdetud aspektis statistiliselt oluliselt, tähendades, et *CYP707A3* geeni toime oli uuritud taimeliinides madal. SALK_078173 silmapaistvat *pusa* fenotüüpi põhjustas *PUSA* geeni häirumine.

Teadustöö tundmatu *PUSA* geeniga jätkub ning edasiste uuringute lõpp-eesmärgiks on *PUSA* geeni tuvastamine.

RESÜMEE

Functional characterization of an unidentified gene (*PUSA*) and *CYP707A3* in *Arabidopsis thaliana*

Madli Johanna Veigel

Summary

The ability of gases (*i.e.* CO₂ and water vapour) to move between plant and the surrounding environment is crucial for plants, because the uptake of CO₂ is required for photosynthesis and transpiration is important for providing plant leaves with new water from the soil. Stomata, minuscule pores located in the aerial epidermis of plant leaves and stems, are structures that make gas exchange possible. Abscisic acid (ABA) is a plant hormone that is important for stomatal closure. Since transpiration occurs with open stomata, regulation of stomatal aperture is necessary for plant survival in conditions where water is scarce. This bachelor's thesis focused on two genes expressed in *Arabidopsis thaliana* – the first being an unknown gene, that was given a temporary name *PUSA*, based on the occurrence of an unusual phenotype in plants that had a mutation in the gene. The second gene – *CYP707A3*, is vital for plant development and stress responses, due to encoding a protein that helps to regulate the endogenous concentration of ABA. Researching both genes came about because of a plant line (SALK_078173) that contains a *cyp707a3* mutation in its genotype but exhibited also a strange phenotype that was uncharacteristic for the effects usually associated with *cyp707a3* mutation. Two mutant lines – *pusa* and *cyp707a3* had previously been separated by crossing SALK_078173 plants back with Col-0, allowing us to study, whether the phenotype of plants with SALK_078173 genotype is caused by *pusa* or *cyp707a3* mutation. The experiments showed that *PUSA* is important for plant growth, proved by the stunted growth (lower dry mass) of plants that had a mutation in *PUSA* gene. Plants with a mutation in *PUSA* had possibly increased stomatal density (stomata mm⁻²) compared to Col-0 or other plant lines that were used in the growth experiment, although the statistical differences were unclear and further experiments are needed. Plants containing *pusa* mutation also had higher water loss. Potentially more stomata per unit of leaf area could be caused by the smaller size of the plants containing *pusa*, due to lessened leaf expansion. The conducted experiments also showed that *CYP707A3* gene had an indistinguishable role in the used plants lines, as evidenced by the absence of statistically significant differences throughout the conducted experiments between plants with functioning *PUSA*, but mutated *CYP707A3* gene and Col-0. SALK_078173 phenotype was caused by *pusa* mutation.

TÄNUSÕNAD

Soovin kõigepealt tänada oma suurepärast juhendajat, Ingmar Tulvat. Suur aitäh Sulle abivalmiduse, kannatlikkuse ja julgustavate sõnade eest hetkedel, mil neid väga vaja oli! Samuti olen ülimalt tänulik kaasprofessor Hanna Hõrakule, Pirko Jalakule, Mikk Välbele, Egon Meigasele, Elena Ivandile, Triinu Arjusele, Jaanika Undile, Helen Parikule ning kaasprofessor Ebe Merilole väärtuslike nõuannete eest.

KIRJANDUSE LOETELU

Allen, G. J., Kuchitsu, K., Chu, S. P., Murata, Y., & Schroeder, J. I. (1999). Arabidopsis *abi-1* and *abi2-1* phosphatase mutations reduce abscisic acid-induced cytoplasmic calcium rises in guard cells. *The Plant Cell*, *11*(9), 1785–1798.

Allen, J., Guo, K., Zhang, D., Ince, M., & Jammes, F. (2019). ABA-glucose ester hydrolyzing enzyme ATBG1 and PHYB antagonistically regulate stomatal development. *PLOS ONE*, *14*(6), e0218605, doi: 10.1371/journal.pone.0218605

Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., ... Ecker, J. R. (2003). Genome-Wide Insertional Mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science*, *301*(5633), 653–657. doi: 10.1126/science.1086391

Angelovici, R., Galili, G., Fernie, A. R., & Fait, A. (2010). Seed desiccation: A bridge between maturation and germination. *Trends in Plant Science*, *15*(4), 211–218, doi: 10.1016/j.tplants.2010.01.003

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, doi: 10.1016/j.cub.2012.11.022

Bergmann, D. C., & Sack, F. D. (2007). Stomatal Development. *Annual Review of Plant Biology*, *58*(1), 163–181, doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.104023

Bhaskara, G. B., Lasky, J. R., Razzaque, S., Zhang, L., Haque, T., Bonnette, J. E., Civelek, G. Z., Verslues, P. E., & Juenger, T. E. (2022). Natural variation identifies new effectors of water-use efficiency in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(33), e2205305119, doi: 10.1073/pnas.2205305119

Boyer, J. S. (2015). Turgor and the transport of CO₂ and water across the cuticle (epidermis) of leaves. *Journal of Experimental Botany*, *66*(9), 2625–2633, doi: 10.1093/jxb/erv065

Casson, S. A., Franklin, K. A., Gray, J. E., Grierson, C. S., Whitlam, G. C., & Hetherington, A. M. (2009). Phytochrome B and PIF4 Regulate Stomatal Development in Response to Light Quantity. *Current Biology*, *19*(3), 229–234, doi: 10.1016/j.cub.2008.12.046

Chater, C., Peng, K., Movahedi, M., ... Hetherington, A. M. (2015). Elevated CO₂-Induced Responses in Stomata Require ABA and ABA Signaling. *Current Biology*, *25*(20), 2709–2716, doi: 10.1016/j.cub.2015.09.013

Chen, K., Li, G.-J., Bressan, R. A., Song, C.-P., Zhu, J.-K., & Zhao, Y. (2020). Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, *62*(1), 25–54, doi: 10.1111/jipb.12899

Cheng, W.-H., Endo, A., Zhou, L., ... Sheen, J. (2002). A Unique Short-Chain Dehydrogenase/Reductase in Arabidopsis Glucose Signaling and Abscisic Acid Biosynthesis and Functions. *The Plant Cell*, *14*(11), 2723–2743, doi: 10.1105/tpc.006494

- Crawford, A. J., McLachlan, D. H., Hetherington, A. M., & Franklin, K. A. (2012). High temperature exposure increases plant cooling capacity. *Current Biology*, 22(10), R396–R397, doi: 10.1016/j.cub.2012.03.044
- Cui, F., Brosché, M., Lehtonen, M. T., Amiryousefi, A., Xu, E., Punkkinen, M., Valkonen, J. P. T., Fujii, H., & Overmyer, K. (2016). Dissecting Abscisic Acid Signaling Pathways Involved in Cuticle Formation. *Molecular Plant*, 9(6), 926–938, doi: 10.1016/j.molp.2016.04.001
- Cutler, A. J., & Krochko, J. E. (1999). Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science*, 4(12), 472–478, doi: 10.1016/S1360-1385(99)01497-1
- 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(1), 651–679, doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112122
- Daszkowska-Golec, A., & Szarejko, I. (2013). Open or Close the Gate – Stomata Action Under the Control of Phytohormones in Drought Stress Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 4, 138, doi: 10.3389/fpls.2013.00138
- Doheny-Adams, T., Hunt, L., Franks, P. J., Beerling, D. J., & Gray, J. E. (2012). Genetic manipulation of stomatal density influences stomatal size, plant growth and tolerance to restricted water supply across a growth carbon dioxide gradient. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1588), 547–555, doi: 10.1098/rstb.2011.0272
- Drake, P. L., de Boer, H. J., Schymanski, S. J., & Veneklaas, E. J. (2019). Two sides to every leaf: Water and CO₂ transport in hypostomatous and amphistomatous leaves. *New Phytologist*, 222(3), 1179–1187, doi: 10.1111/nph.15652
- 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), Article 12, doi: 10.3390/agronomy10121975
- Fanourakis, D., Heuvelink, E., & Carvalho, S. M. P. (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, doi: 10.1016/j.jplph.2013.01.013
- Feller, U. (2007). Stomatal opening at elevated temperature: An underestimated regulatory mechanism? *General and Applied Plant Physiology*, 32(1), Article 1.
- Finkelstein, R. (2013). Abscisic Acid Synthesis and Response. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 11, e0166, doi: 10.1199/tab.0166
- Fujii, H., Verslues, P. E., & Zhu, J.-K. (2007). Identification of Two Protein Kinases Required for Abscisic Acid Regulation of Seed Germination, Root Growth, and Gene Expression in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(2), 485–494, doi: 10.1105/tpc.106.048538
- Gay, A. P., & Hurd, R. G. (1975). The Influence of Light on Stomatal Density in the Tomato. *New Phytologist*, 75(1), 37–46, doi: 10.1111/j.1469-8137.1975.tb01368.x

- 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. *Science Signaling*, 4(173), ra32–ra32, doi: 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 of the United States of America*, 106(50), 21425–21430, doi: 10.1073/pnas.0912021106
- Geisler, M., Nadeau, J., & Sack, F. D. (2000). Oriented Asymmetric Divisions That Generate the Stomatal Spacing Pattern in Arabidopsis Are Disrupted by the too many mouths Mutation. *The Plant Cell*, 12(11), 2075–2086.
- González-Guzmán, M., Apostolova, N., Bellés, J. M., Barrero, J. M., Piqueras, P., Ponce, M. R., Micol, J. L., Serrano, R., & Rodríguez, P. L. (2002). The Short-Chain Alcohol Dehydrogenase ABA2 Catalyzes the Conversion of Xanthoxin to Abscisic Aldehyde. *The Plant Cell*, 14(8), 1833–1846, doi: 10.1105/tpc.002477
- Hara, K., Kajita, R., Torii, K. U., Bergmann, D. C., & Kakimoto, T. (2007). The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes & Development*, 21(14), 1720–1725, doi: 10.1101/gad.1550707
- Hara, K., Yokoo, T., Kajita, R., Onishi, T., Yahata, S., Peterson, K. M., Torii, K. U., & Kakimoto, T. (2009). Epidermal Cell Density is Autoregulated via a Secretory Peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 in Arabidopsis Leaves. *Plant and Cell Physiology*, 50(6), 1019–1031, doi: 10.1093/pcp/pcp068
- Haworth, M., Marino, G., Loreto, F., & Centritto, M. (2021). Integrating stomatal physiology and morphology: Evolution of stomatal control and development of future crops. *Oecologia*, 197(4), 867–883, doi: 10.1007/s00442-021-04857-3
- Hetherington, A. M., & Woodward, F. I. (2003). The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, 424(6951), 901–908, doi: 10.1038/nature01843
- Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., ... Sentenac, H. (2003). The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5549–5554, doi: 10.1073/pnas.0733970100
- Hsu, P.-K., Takahashi, Y., Munemasa, S., Merilo, E., Laanemets, K., Waadt, R., Pater, D., Kollist, H., & Schroeder, J. I. (2018). Abscisic acid-independent stomatal CO₂ signal transduction pathway and convergence of CO₂ and ABA signaling downstream of OST1 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(42), E9971–E9980, doi: 10.1073/pnas.1809204115
- Hunt, L., & Gray, J. E. (2009). The Signaling Peptide EPF2 Controls Asymmetric Cell Divisions during Stomatal Development. *Current Biology*, 19(10), 864–869, doi: 10.1016/j.cub.2009.03.069

- Ikegami, K., Okamoto, M., Seo, M., & Koshiba, T. (2009). Activation of abscisic acid biosynthesis in the leaves of *Arabidopsis thaliana* in response to water deficit. *Journal of Plant Research*, *122*(2), 235–243, doi: 10.1007/s10265-008-0201-9
- Imes, D., Mumm, P., Böhm, J., Al-Rasheid, K. A. S., Marten, I., Geiger, D., & 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, doi: 10.1111/tpj.12133
- 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, doi: 10.1111/nph.13924
- Jalakas, P., Merilo, E., Kollist, H., & Brosché, M. (2018). ABA-mediated regulation of stomatal density is OST1-independent. *Plant Direct*, *2*(9), e00082, doi: 10.1002/pld3.82
- Jalakas, P., Tulva, I., Bērziņa, N. M., & Hõrak, H. (2024). Stomatal patterning is differently regulated in adaxial and abaxial epidermis in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, *75*(20), 6476–6488, doi: 10.1093/jxb/erae354
- Kanaoka, M. M., Pillitteri, L. J., Fujii, H., Yoshida, Y., Bogenschutz, N. L., Takabayashi, J., Zhu, J.-K., & Torii, K. U. (2008). SCREAM/ICE1 and SCREAM2 Specify Three Cell-State Transitional Steps Leading to *Arabidopsis* Stomatal Differentiation. *The Plant Cell*, *20*(7), 1775–1785, doi: 10.1105/tpc.108.060848
- Kim, T.-H., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N., & Schroeder, J. I. (2010). Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO₂, and Ca²⁺ Signaling. *Annual review of plant biology*, *61*, 561–591, doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112226
- Kurdyukov, S., Faust, A., Nawrath, C., ... Yephremov, A. (2006). The Epidermis-Specific Extracellular BODYGUARD Controls Cuticle Development and Morphogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *18*(2), 321–339, doi: 10.1105/tpc.105.036079
- Kuromori, T., Seo, M., & Shinozaki, K. (2018). ABA Transport and Plant Water Stress Responses. *Trends in Plant Science*, *23*(6), 513–522, doi: 10.1016/j.tplants.2018.04.001
- Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., Hirai, N., Koshiba, T., Kamiya, Y., & Nambara, E. (2004). The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: Key enzymes in ABA catabolism. *The EMBO Journal*, *23*(7), 1647, doi: 10.1038/sj.emboj.7600121
- Lake, J. A., & Woodward, F. I. (2008). Response of stomatal numbers to CO₂ and humidity: Control by transpiration rate and abscisic acid. *New Phytologist*, *179*(2), 397–404, doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02485.x
- Lee, K. H., Piao, H. L., Kim, H.-Y., Choi, S. M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, I., Kwak, J. M., Lee, I.-J., & Hwang, I. (2006). Activation of Glucosidase via Stress-Induced Polymerization Rapidly Increases Active Pools of Abscisic Acid. *Cell*, *126*(6), 1109–1120, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.034
- Leng, P., Yuan, B., & Guo, Y. (2013). The role of abscisic acid in fruit ripening and responses to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, *65*(16), 4577–4588, doi: 10.1093/jxb/eru204

- Li, C., Pan, Y., Cui, J., Lu, X., & Yu, W. (2025). Mechanism of ABA in Plants Exposed to Cold Stress. *Agronomy*, *15*(2), Article 2, doi: 10.3390/agronomy15020403
- Lolle, S. J., Berlyn, G. P., Engstrom, E. M., Krolkowski, K. A., Reiter, W.-D., & Pruitt, R. E. (1997). Developmental Regulation of Cell Interactions in the Arabidopsis fiddlehead-1 Mutant: A Role for the Epidermal Cell Wall and Cuticle. *Developmental Biology*, *189*(2), 311–321, doi: 10.1006/dbio.1997.8671
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., & Chua, N.-H. (2001). A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(8), 4782–4787, doi: 10.1073/pnas.081594298
- 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, doi: 10.1126/science.1172408
- MacAlister, C. A., Ohashi-Ito, K., & Bergmann, D. C. (2007). Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature*, *445*(7127), 537–540, doi: 10.1038/nature05491
- Martin, C., & Glover, B. (2007). Functional aspects of cell patterning in aerial epidermis. *Current Opinion in Plant Biology*, *10*(1), 70–82, doi: 10.1016/j.pbi.2006.11.004
- 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, doi: 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., & 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, doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04302.x
- Mo, W., Zheng, X., Shi, Q., Zhao, X., Chen, X., Yang, Z., & Zuo, Z. (2024). Unveiling the crucial roles of abscisic acid in plant physiology: Implications for enhancing stress tolerance and productivity. *Frontiers in Plant Science*, *15*, 1437184, doi: 10.3389/fpls.2024.1437184
- Muir, C. D. (2015). Making pore choices: Repeated regime shifts in stomatal ratio. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *282*(1813), 20151498, doi: 10.1098/rspb.2015.1498
- 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, doi: 10.1105/tpc.007906
- Nadeau, J. A., & Sack, F. D. (2002). Stomatal Development in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, *1*, e0066, doi: 10.1199/tab.0066
- Nadeau, J. A., & Sack, F. D. (2003). Stomatal development: Cross talk puts mouths in place. *Trends in Plant Science*, *8*(6), 294–299, doi: 10.1016/S1360-1385(03)00102-X

- Nambara, E., & Marion-Poll, A. (2005). ABSCISIC ACID BIOSYNTHESIS AND CATABOLISM. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 165–185, doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046
- Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Hashimoto, M., & Iba, K. (2008). CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature*, 452(7186), 483–486, doi: 10.1038/nature06720
- Ohashi-Ito, K., & Bergmann, D. C. (2006). Arabidopsis FAMA Controls the Final Proliferation/Differentiation Switch during Stomatal Development. *The Plant Cell*, 18(10), 2493–2505, doi: 10.1105/tpc.106.046136
- Okamoto, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kushiro, T., Asami, T., Hirai, N., Kamiya, Y., Koshiha, T., & Nambara, E. (2006). CYP707A1 and CYP707A2, Which Encode Abscisic Acid 8'-Hydroxylases, Are Indispensable for Proper Control of Seed Dormancy and Germination in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 141(1), 97–107, doi: 10.1104/pp.106.079475
- Okamoto, M., Tanaka, Y., Abrams, S. R., Kamiya, Y., Seki, M., & Nambara, E. (2009). High Humidity Induces Abscisic Acid 8'-Hydroxylase in Stomata and Vasculature to Regulate Local and Systemic Abscisic Acid Responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 149(2), 825–834, doi: 10.1104/pp.108.130823
- Park, S.-Y., Fung, P., Nishimura, N., ... Cutler, S. R. (2009). Abscisic acid inhibits PP2Cs via the PYR/PYL family of ABA-binding START proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1068–1071, doi: 10.1126/science.1173041
- Pillitteri, L. J., Sloan, D. B., Bogenschutz, N. L., & Torii, K. U. (2007). Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. *Nature*, 445(7127), 501–505, doi: 10.1038/nature05467
- Pillitteri, L. J., & Torii, K. U. (2012). Mechanisms of Stomatal Development. *Annual Review of Plant Biology*, 63(Volume 63, 2012), 591–614, doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105451
- Poorter, H., & Evans, J. R. (1998). Photosynthetic nitrogen-use efficiency of species that differ inherently in specific leaf area. *Oecologia*, 116(1), 26–37, doi: 10.1007/s004420050560
- Priest, D. M., Ambrose, S. J., Vaistij, F. E., Elias, L., Higgins, G. S., Ross, A. R. S., Abrams, S. R., & Bowles, D. J. (2006). Use of the glucosyltransferase UGT71B6 to disturb abscisic acid homeostasis in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 46(3), 492–502, doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02701.x
- Roelfsema, M. R. G., Hedrich, R., & Geiger, D. (2012). Anion channels: Master switches of stress responses. *Trends in Plant Science*, 17(4), 221–229, doi: 10.1016/j.tplants.2012.01.009
- Sachs, T. (1991). *Pattern Formation in Plant Tissues*. Cambridge University Press, doi: 10.1017/CBO9780511574535
- Saito, S., Hirai, N., Matsumoto, C., Ohigashi, H., Ohta, D., Sakata, K., & Mizutani, M. (2004). Arabidopsis CYP707As Encode (+)-Abscisic Acid 8'-Hydroxylase, a Key Enzyme in the

- Oxidative Catabolism of Abscisic Acid. *Plant Physiology*, 134(4), 1439, doi: 10.1104/pp.103.037614
- 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, doi: 10.1038/nmeth.2089
- Scholl, R. L., May, S. T., & Ware, D. H. (2000). Seed and Molecular Resources for Arabidopsis. *Plant Physiology*, 124(4), 1477–1480, doi: 10.1104/pp.124.4.1477
- Schroeder, J. I., Allen, G. J., Hugouvieux, V., Kwak, J. M., & Waner, D. (2001). GUARD CELL SIGNAL TRANSDUCTION. *Annual Review of Plant Biology*, 52(Volume 52, 2001), 627–658, doi: 10.1146/annurev.arplant.52.1.627
- Schwartz, S. H., Qin, X., & Zeevaart, J. A. (2003). Elucidation of the Indirect Pathway of Abscisic Acid Biosynthesis by Mutants, Genes, and Enzymes. *Plant Physiology*, 131(4), 1591–1601.
- Seo, M., Peeters, A. J. M., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J. A. D., Koornneef, M., Kamiya, Y., & Koshiba, T. (2000). The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), 12908–12913.
- Shimazaki, K., Doi, M., Assmann, S. M., & Kinoshita, T. (2007). Light Regulation of Stomatal Movement. *Annual Review of Plant Biology*, 58(1), 219–247, doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105434
- Shpak, E. D., McAbee, J. M., Pillitteri, L. J., & Torii, K. U. (2005). Stomatal Patterning and Differentiation by Synergistic Interactions of Receptor Kinases. *Science*, 309(5732), 290–293, doi: 10.1126/science.1109710
- Zhao, L., & Sack, F. D. (1999). Ultrastructure of stomatal development in Arabidopsis (Brassicaceae) leaves. *American Journal of Botany*, 86(7), 929–939, doi: 10.2307/2656609
- Tanaka, Y., Nose, T., Jikumaru, Y., & Kamiya, Y. (2013). ABA inhibits entry into stomatal-lineage development in Arabidopsis leaves. *The Plant Journal*, 74(3), 448–457, doi: 10.1111/tpj.12136
- Torii, K. U. (2021). Stomatal development in the context of epidermal tissues. *Annals of Botany*, 128(2), 137–148, doi: 10.1093/aob/mcab052
- Tulva, I., Koolmeister, K., & Hörak, H. (2024). Low relative air humidity and increased stomatal density independently hamper growth in young Arabidopsis. *The Plant Journal*, 119(6), 2718–2736, doi: 10.1111/tpj.16944
- Umezawa, T., Okamoto, M., Kushiro, T., Nambara, E., Oono, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Koshiba, T., Kamiya, Y., & Shinozaki, K. (2006). CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 46(2), 171–182, doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02683.x

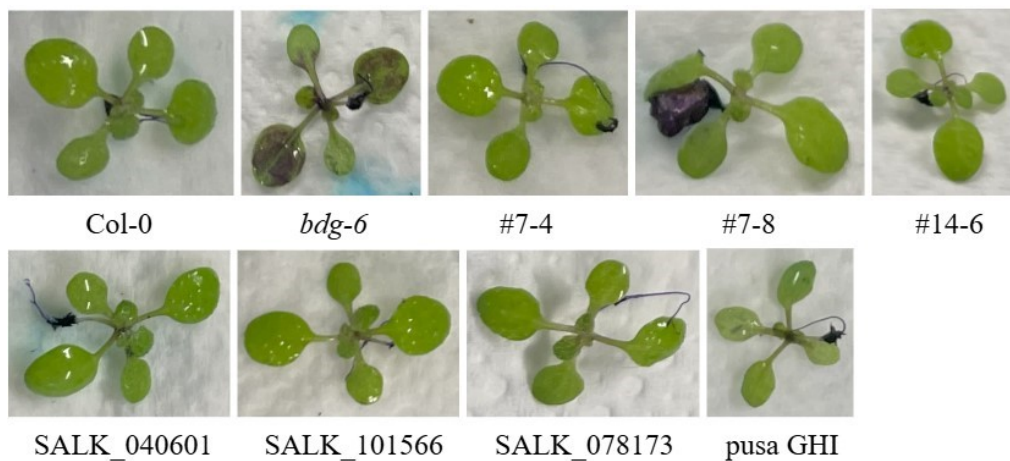
- Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y.-F., ... Kangasjärvi, J. (2008). SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature*, *452*(7186), 487–491, doi: 10.1038/nature06608
- Vlad, F., Rubio, S., Rodrigues, A., Sirichandra, C., Belin, C., Robert, N., Leung, J., Rodriguez, P. L., Laurière, C., & Merlot, S. (2009). Protein Phosphatases 2C Regulate the Activation of the Snfl-Related Kinase OST1 by Abscisic Acid in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *21*(10), 3170–3184, doi: 10.1105/tpc.109.069179
- von Caemmerer, S., & Baker, N. (2007). The Biology of Transpiration. From Guard Cells to Globe. *Plant Physiology*, *143*(1), 3, doi: 10.1104/pp.104.900213
- Westoby, M., Falster, D. S., Moles, A. T., Vesk, P. A., & Wright, I. J. (2002). Plant Ecological Strategies: Some Leading Dimensions of Variation Between Species. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *33*(Volume 33, 2002), 125–159, doi: 10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150452
- Woodward, F. I., Lake, J. A., & Quick, W. P. (2002). Stomatal development and CO₂: Ecological consequences. *New Phytologist*, *153*(3), 477–484, doi: 10.1046/j.0028-646X.2001.00338.x
- Xu, Z.-J., Nakajima, M., Suzuki, Y., & Yamaguchi, I. (2002). Cloning and Characterization of the Abscisic Acid-Specific Glucosyltransferase Gene from Adzuki Bean Seedlings. *Plant Physiology*, *129*(3), 1285–1295, doi: 10.1104/pp.001784
- Xu, Z.-Y., Lee, K. H., Dong, T., ... Hwang, I. (2012). A Vacuolar β -Glucosidase Homolog That Possesses Glucose-Conjugated Abscisic Acid Hydrolyzing Activity Plays an Important Role in Osmotic Stress Responses in Arabidopsis[W]. *The Plant Cell*, *24*(5), 2184–2199, doi: 10.1105/tpc.112.095935
- Yeats, T. H., & Rose, J. K. C. (2013). The Formation and Function of Plant Cuticles. *Plant Physiology*, *163*(1), 5–20, doi: 10.1104/pp.113.222737
- Yoshida, T., Obata, T., Feil, R., Lunn, J. E., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Fernie, A. R. (2019). The Role of Abscisic Acid Signaling in Maintaining the Metabolic Balance Required for Arabidopsis Growth under Nonstress Conditions. *The Plant Cell*, *31*(1), 84–105, doi: 10.1105/tpc.18.00766

LISAD

LISA 1

Häirunud *PUSA* ja *CYP707A3* geenide eraldamiseks ristati SALK_078173 taimi tagasi Col-0 taimedega, kus SALK_078173 oli emastaim ning Col-0 isastaim. F1 põlvkonna seemned korjati ja külvati. Seejärel lasti taimedel isetolmelda, mille tulemuseks koguti F2 põlvkonna seemned. F2 põlvkonna taimi genotüpiseeriti *CYP707A3* geeni suhtes ja *pusa* fenotüübi (Joonis 2) suhtes vaadeldi taimede välimust, mis oli oma esinemissageduse põhjal retsessiivne. Esiteks otsiti metsiktüüpi ehk funktsioneeriva *CYP707A3* geeniga ja *pusa* fenotüübiga taimi ning teiseks homosügootselt häirunud *CYP707A3* geeniga, kuid ilma *pusa* fenotüübita taimi. F2 põlvkonnast valiti välja üks taim, millel esines *pusa* fenotüüp ning toimiv *CYP707A3* geen. Samuti valiti välja kaks ilma *pusa* fenotüübita taime, mis sisaldasid homosügootselt mutantset *CYP707A3* geeni. Eelnimetatud F2 põlvkonna taimed kasvatati F3 põlvkonnani ning taimed genotüpiseeriti uuesti *CYP707A3* suhtes. Samuti vaadeldi taimede välimust *pusa* fenotüübi suhtes. Välja valiti üks *pusa* fenotüüpi ja funktsioneerivat *CYP707A3* geeni sisaldav taim, millest pärinevad käesolevas töös uuritud liinid *pusa DEF* ja *pusa GHI*. Samuti valiti välja kolm ilma *pusa* fenotüübita ja homosügootselt häirunud *CYP707A3* geeniga taime, olles aluseks käesolevas töös uuritud #7-4, #7-8 ja #14-6 taimeliinidele. Kirjeldatud – alates SALK_078173 taime metsiktüübiga tagasiristamisest kuni F3 põlvkonna taimede selekteerimiseni – teostas täielikult juhendaja Ingmar Tulva ning töö autor protsessist osa ei võtnud.

LISA 2



Joonis 1. 14-päevaste seemikute toluidiinsinisega värvimisel põhinev kutiikulakatse. Kõik taimed olid läbimõõdus 2-3 cm. Valimi suurus oli 1-4 taime igast genotüübist.

LISA 3



Joonis 2. Iseloomustavad näited 38-päevaste taimede kutiikula terviklikkuse hindamisest toluidiinsinise täpimeetodil. Ülemine pilt näitlikustab taimelehtedele tehtud TBO täppe. Poti külg oli 8 cm. Valimi suurus oli 3-4 taime iga genotüübi kohta.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Madli Johanna Veigel,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Tundmatu geeni (*PUSA*) ja *CYP707A3* toime iseloomustamine hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) taimedes“, mille juhendaja on Ingmar Tulva, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Madli Johanna Veigel

26.05.2025