

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

**Sõeluuring valitud AHL geenide rolli selgitamiseks hariliku müürlooga
(*Arabidopsis thaliana*) õhulõhede juhtivuse ja arengu regulatsioonis**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Ott Rünkla

Juhendaja PhD Hanna Hõrak

Tartu 2023

INFOLEHT

Sõeluuring valitud AHL geenide rolli selgitamiseks hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) õhulõhede juhtivuse ja arengu regulatsioonis

Gaasivahetus lehe ja atmosfääri vahel toimub läbi lehe pinnal asuvate pisikeste avauste, mida kutsutakse õhulõhedeks. Õhulõhed koosnevad kahest sulgrakust, mille vahele jääb tühimik, mida taim saab vastavalt vajadusele sulgeda ja avada. Õhulõhede avatus on oluline vahed kiireks transpiratsiooni reguleerimiseks, mis aitab taimedel ellu jääda veepuuduse tingimustes. Pikemas ajaskaalas mõjutavad transpiratsiooni ka muutused õhulõhede tiheduses. Õhulõhede funktsiooni ja arengut mõjutavad mitmed valgud, mille avaldumine on kontrollitud keerukate signaaliradadega. *AHL* geeniperekonna geenid määravad taime arengus ja stressivastuses olulist rolli mängivaid transkriptsioonifaktoreid, mille mõju õhulõhede arengule ja funktsioonile pole siiani uuritud. Sellest ajendatult uuriti õhulõhede eelaasrakkudes kõrge ekpressioonitasemega *AHL* geenide mutante, kasutades katseteks mudeltaime harilik müürlook (*Arabidopsis thaliana*). Töö tulemused viitavad, et *AHL8* transkriptsioonifaktor võib mõjutada taime õhulõhede avatuse regulatsiooni lehe ülemisel, kuid mitte alumisel küljel.

Õhulõhe, taim, gaasivahetus, õhulõhede tihedus, õhulõhede juhtivus, õhulõhede areng

CERCS: B310 Soontaimede füsioloogia, B225 Taimeneetika

Analysis of the role of selected AHL genes in the regulation of stomatal conductance and development in *Arabidopsis thaliana*

Gas exchange between the leaf and the atmosphere takes place through tiny openings on the surface of the leaf called stomata. Between two guard cells that form a stoma is a gap that can be opened and closed by the plant according to environmental conditions. Keeping the stomatal aperture optimal is a key for plant survival and growth. The genes of the *AHL* gene family encode transcription factors that play an important role in plant stress responses and regulation of development. The experiments carried out in this thesis aimed to find *AHL* mutants deficient in stomatal development or regulation. Experiments were carried out on *Arabidopsis thaliana*. Selected *ahl* mutants (picked for respective *AHL* high expression in stomatal lineage cells) were grown alongside wild type plants. The results show that the mutant *ahl8* had reduced upper leaf side stomatal conductance, suggesting that *AHL8* regulates the function of stomata on upper but not lower leaf side.

Stomata, plant, gas exchange, stomatal density, stomatal conductance, stomatal development

CERCS: B310 Physiology of vascular plants, B225 Plant genetics

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Harilik müürlook	7
1.2. Õhulõhed.....	7
1.3. Õhulõhede areng.....	9
1.4 Õhulõhede avanemine ja sulgumine	11
1.5 <i>AHL</i> geenid.....	12
2. PRAKTILINE OSA.....	15
2.1. Eesmärk	15
2.2. Metoodika.....	15
2.2.1 Kasutatud taimed	15
2.2.2. Taimede kasvatamine	16
2.2.3. Lehejäljendite võtmine	16
2.2.4. Õhulõhede juhtivuse ja veekaotuse mõõtmine	17
2.2.5. Õhulõhede tiheduse määramine.....	18
2.2.6. Statistiline analüüs	18
2.3. Tulemused.....	19
2.3.1. Õhulõhede juhtivus.....	19
2.3.2. Massikaotus	21
2.3.3. Õhulõhede tihedus	22
2.3.4. Lisakatse <i>ahl8</i> õhulõhede juhtivuse uurimiseks	25
2.4 Arutelu	26
2.4.1. <i>AHL8</i> roll ülemiste õhulõhede juhtivuse mõjutajana	26

2.4.2. Massikaotus ja tihedus.....	27
2.4.3. <i>ahl6-1</i> erinevus metsiktüübist.....	28
KOKKUVÕTE.....	29
RESÜMEE.....	30
TÄNUSÕNAD.....	31
KIRJANDUSE LOETELU.....	32
LIHTLITSENTS.....	35

KASUTATUD LÜHENDID

ABA - abstsiihape, taimehormoon

AHL – AT-hook motif nuclear-localized

EPF - EPIDERMAL PATTERNING FACTOR; epidermi mustri moodustumise faktor, signaalpeptiid

GMC – *guard mother cell*; sulgrakkude emarakk

H⁺-ATPaas – ATP energiat kasutav H⁺ kanal

MMC – *meristemoid mother cell*; meristemoidi emarakk

OST1 – OPEN STOMATA 1 õhulõhede avatust kontrolliv kinaas

PP2C – PROTEIN PHOSPHATASE BELONGING TO CLASS 2C ABA signaalrajas osalevad fosfotaasid

QUAC1 – QUICK-ACTIVATING ANION CHANNEL 1 kiiret tüüpi sulgraku anioonikanal

SLAC1 - SLOW TYPE ANION CHANNEL 1; aeglast tüüpi sulgraku anioonikanal

SLAH3 - SLAC1 HOMOLOGUE 3; aeglast tüüpi sulgraku anioonikanal, SLAC1 homolog

SLGC – *stomatal lineage ground cell*; õhulõhe eellasliini põhirakk

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

SISSEJUHATUS

Taimed on paiksed elusorganismid, kes asustasid maismaa mitusada miljonit aastat tagasi ja kelle elutegevuse kaasnähuna on võimalikuks saanud imetajate ja teiste maismaa elukate eksistents meile igapäevasena näival kujul. See imeline omadus, mis võimaldas ka liikuva eluviisiga olenditel maismaale kolida, oli taimede võime eraldada atmosfääri hapnikku. Lisaks hapnikule on taimed toiduks kõigi kõrgemate loomade jaoks, nii otseselt kui kaudselt. Taimedele on raske omistada liiga suurt tähendust, kuna moel või teisel võlgname inimestena kõik, mis meil on, neile. Aitäh, taimed!

Gaasivahetus lehe ja atmosfääri vahel toimub läbi lehe pinnal asuvate pisikeste avauste, mida kutsutakse õhulõhedeks. Nende kaudu pääseb taimedesse süsihappegaas (CO_2) ja taimedest välja vesi (H_2O). Õhulõhe on lehe pinna alsetsev kahe sülgrakust moodustuv kanal, mille avatuse üle on taimel kontroll. Ava suurendamiseks tõstetakse sulgrakkude turgorrühku. Ava sulgrakkude vahed suureneb turgorrühku suurenedes. Õhulõhede avatuna hoidmisel on ka oma hind: avatud õhulõhe kaudu lahkub taimest vesi, mis kuivades oludes on taimetele ohtlik. Seega sulevad taimed põua ajal õhulõhed, et vältida veekadu. Kui keskkonnas on vett piisavalt, siis taimed avavad oma õhulõhed, et süsihappegaas pääseks lehte ja saaks toimuda fotosüntees. Lisaks niiskusele reageerivad õhulõhed ka valgusele ja süsihappegaasi kontsentratsioonile.

Käesoleva töö eesmärk oli uurida *AHL* geeniperekonna valitud esindajate mõju õhulõhede arengule ja regulatsioonile. *AHL* geeniperekonna geenid kodeerivad taime stressivastuses ja arengu regulatsioonis olulist rolli mängivaid transkriptsioonifaktoreid. *AHL* geene on leitud kõigist siiani sekveneeritud maismaataimedest. *AHL* geeniperekonna kõrge konserveerumus maismaataimedes viitab nende rolli olulisusele taimede kasvus ja arengus. Töös uuriti *AHL* geenide valitud üksikmutante. Valiku aluseks oli vastavate geenide kõrge ekspressioonitase õhulõhede eellasliini rakkudes. Fenotüüpe seirati võrreldes metsiktüübiga, mõõtes lehtede veekaotust, õhulõhede juhtivust ja õhulõhede tihedust mõlemal lehe küljel.

Töö teostati Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis.

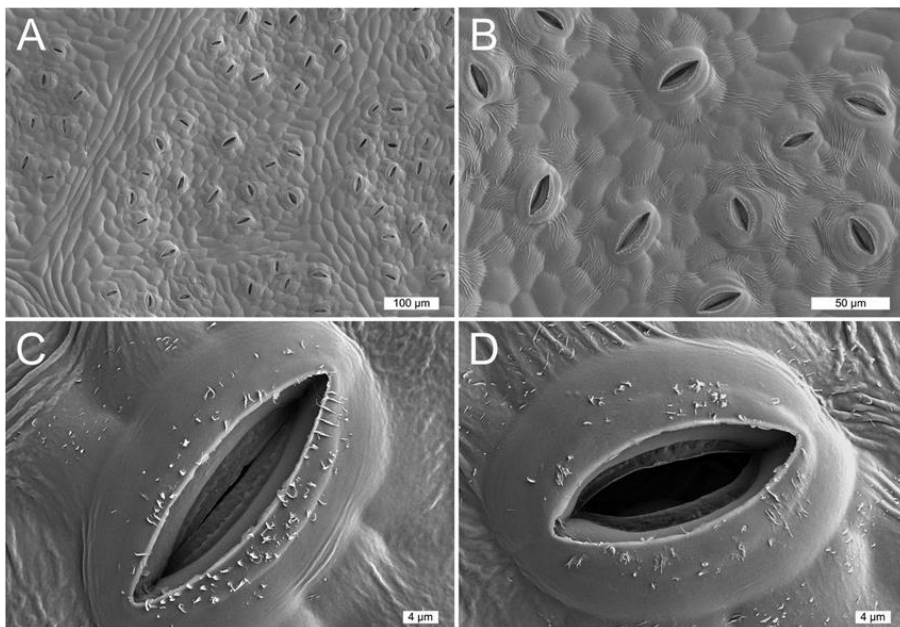
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Harilik müürlook

Käesolevas bakalaureusetöös on katsed läbi viidud taimeteaduses laialdaselt kasutatud mudeltaimel, harilikul müürloogal (*Arabidopsis thaliana*, edaspidi müürlook). See taim on valitud tema kiire kasvutsükli pärast (6-8 nädalat). Müürlooga eeliseks on veel pikaajalise teadusliku töö tulemuseks olev andmete hulk, millega on hea võrrelda oma katses saadud tulemusi (Koorneef & Meinke, 2010). Taimel on üsna väike genoom suurusega 125 mega-aluspaari, mis on ühtlasi esimeseks täielikult sekveneeritud taimegenoomiks (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

1.2. Õhulõhed

Õhulõhed (nähtavad joonisel 1) on enamiku maismaal elavate taimede pinnal asuvad väiksed avaused, mille kaudu toimub taimede ja atmosfääri vaheline gaasivahetus. Õhulõhede kaudu pääseb taimedesse süsihappegaas ja taimedest välja vesi. Gaasivahetus on lehe pinnal ilma õhulõhedeta praktiliselt olematu, sest lehe pinda katab kutiikula – vahajas kiht mis kaitseb pinda vigastuste ja liigse aurumise eest (Ogburn & Edwards, 2010). Seega on õhulõhed olulised, et taim saaks omandada õhust süsinikku ja muuta selle biomassiks ning kasvada, areneda ja elutegevust jätkata (Nadeau & Sack, 2002).



Joonis 1. Krüo-skaneeriva elektronmikroskoobi pildid kalju viinapuu *Vitis rupestris* lehe alumise külje õhulõhedest. (A) ja (B) näitavad erineva suurendusastmega vaateid õhulõhede paigutumisest. Pildil (C) on suletud õhulõhe ja pildil D avatud õhulõhe. Joonis pärineb Gambetta *et al.*, 2020.

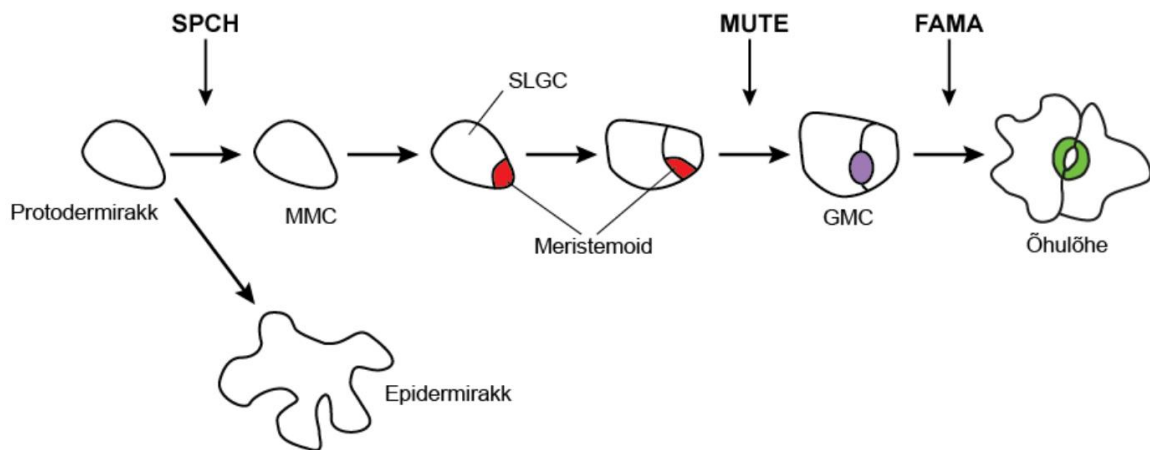
Õhulõhe moodustub kahest sulgrakust, mille vahele jääb tühimik, mida taim saab vastavalt vajadusele sulgeda ja avada. Õhulõhe avamiseks suurendatakse sulgrakkude turgorrõhku. Selleks pumbatakse rakku ioone, mis suurendab sulgrakkude osmootset rõhku. Vesi liigub osmoosi teel rakku, sest seal on ionide kontsentratsioon ümbritsevate rakkude omast kõrgem. Sulgrakud paisuvad ja kahe sulgraku vahel avaneb pilu, millest gaasid pääsevad liikuma sisse ja välja (Nadeau & Sack, 2002).

Õhulõhede ava suurus on mõjutatud mitmest keskkonna tegurist. Esiteks taime pinnale langeva valguse hulk: suurema intensiivsusega valguse käes (eestkätt punase ja sinise valguse) (Assmann *et al.*, 1985) õhulõhe avaneb rohkem ja väiksema intensiivsusega valguse käes õhulõhe ava suurus väheneb (Mott *et al.*, 2008). Teiseks, mida suurem on ümbritseva keskkonna CO₂ sisaldus, seda vähem avaneb õhulõhe ja mida väiksem, seda rohkem õhulõhe avaneb (Leakey *et al.*, 2009). Üldiselt on enamikul taimedel õhulõhed avatud vaid päeval ja öösel suletud. Õhulõhede öösel lahti hoidmine on tarbetu, kui fotosüntees on vähese valguse tõttu kas täielikult või osaliselt mitteaktiivne (Caird *et al.*, 2007). Keskkonna kõrge CO₂ kontsentratsiooni juures pole vaja õhulõhesid väga avatuna hoida, kuna siis suureneks veekadu ja vajaliku süsiniku saab kätte ka väheavatud õhulõhede kaudu. Samuti allub õhulõhede avatus erinevatele taimehormoonidele nt stressivastuse reguleerija abstsissihape (ABA), mis mõjutab õhulõhede ava suurust negatiivselt (Azoulay-Shemer *et al.*, 2015). Muidugi on oluline ka üldine vee hulk, mis taimele on kättesaadav, sest kuivades tingimustes ei pruugi taimel olla üldse piisavalt vett, et hoida turgorit lehe rakkudes piisavalt kõrgel, mis paratamatult tähendab õhulõhede suletust. See kaitseb niigi kuivatingimusi trotsivat taime veelgi suurema veekao eest (Mott *et al.*, 2008).

Õhulõhede areng sõltub samuti keskkonnatingimustest. Õige õhulõhede tiheduse, paigutuse ja arengu tagamine on taime ellujäämise seisukohalt ülioluline. Mutandid, kellel ei formuleeru õhulõhesid, näiteks *spch-3* taimed, kus õhulõhede diferentseerumist ei toimu, pole elujõulised ja surevad ära seemikutena (MacAlister *et al.*, 2007). Kõrgema keskkonna CO₂ kontsentratsiooni juures on täheldatud õhulõhede tiheduse (õhulõhede arv lehe pinnaühiku kohta) ja indeksi (õhulõhede osakaal kõigist epidermirakkudest) langust (Woodward, 1987). Areneva lehe õhulõhede paigutus ja indeks sõltuvad täiskasvanud lehti mõjutavast CO₂ tasemest (Lake *et al.*, 2001). Taimele langeva valguse hulk mõjutab samuti õhulõhede arengut. Üldjuhul tõuseb valguse intensiivsuse kasvuga õhulõhede tihedus ja indeks, uute lehtede puhul on mõjutajaks jällegi täiskasvanud lehtedele langeva valguse intensiivsus (Lake *et al.*, 2001).

1.3. Õhulõhede areng

Protoderm on taimekude, millest moodustub epiderm ehk taime välispinda kattev kiht. Kaheidulehelise taime müürlooga puhul algab õhulõhede areng protodermi raku diferentseerumisega meristemoidi emarakuks (*meristemoid mother cell*, MMC). Meristemoidi emarakk jaguneb asümmeetriliselt üheks väikeseks kolmnurkseks meristemoidrakuks (*meristemoid*, M) ning üheks õhulõhe eellasliini põhirakuks (*stomatal lineage ground cell*, SLGC) (Nadeau & Sack, 2002). Meristemoididele on omane võime korduvalt asümmeetriliselt jaguneda, tekitades veel meristemoide ja õhulõhede eellasliini põhirakke. Hilises jagunemistasmes kaob meristemoidil võime jaguneda ja ta diferentseerub sulgraku emarakuks (*guard mother cell*, GMC). Viimase etapina jaguneb sulgraku emarakk sümmeetriliselt kaheks sulgrakuks (*guard cell*, GC) (Pillitteri & Torii, 2012). Jagunemise erinevad faasid koos neid mõjutavate transkriptsioonifaktoritega (TF) on näha joonisel 2.



Joonis 2. Hariliku müürlooga õhulõhede areng protodermirakust õhulõheni. Transkriptsiooni faktorid SPCH (SPEECHLESS), MUTE ja FAMA kontrollivad põhilisi staadiumite üleminekuid õhulõhede arenguliinis. Õhulõhede areng algab protodermi raku diferentseerumisega meristemoidi emarakuks (*meristemoid mother cell*, MMC). MMC jaguneb asümmeetriliselt üheks väikeseks kolmnurkseks meristemoidiks ning üheks õhulõhe eellasliini põhirakuks (SLGC). Meristemoid jaguneb korduvalt asümmeetriliselt. Lõpuks kaob meristemoidil võime jaguneda ja ta diferentseerub sulgraku emarakuks (*guard mother cell*, GMC). Viimase etapina jaguneb GMC sümmeetriliselt kaheks sulgrakuks (*guard cell*, GC). Joonis pärineb Jalakas, 2019 tööst, seda modifitseeris Vask, 2021.

Optimeerimaks õhulõhede jaotust ja paigutust areneval lehel toimuvad rakujagunemised olemasolevatest õhulõhedest eemale. Kahe õhulõhe vahele jääb normaalses epidermis alati vähemalt üks rakk. Noored meristemoidid ja SLGC-d on võimelised uuesti asümmeetriliselt jagunema, moodustades taas meristemoide, millest arenevad samuti õhulõhed. Rakud, mis õhulõhesid ei moodusta, diferentseeruvad sillutisrakkudeks (*pavment cells*), mis moodustavad enamuse epidermi (Nadeau & Sack, 2002).

Õhulõhede arengu geneetiline kontroll toimub peamiselt läbi kolme aluseline heeliks-ling-heeliks (*basic helix-loop-helix*, bHLH) tüüpi transkriptsioonifaktori: SPEECHLESS (SPCH), MUTE ja FAMA. Neile lisaks osalevad õhulõhede arengu koordineerimises veel kaks transkriptsioonifaktorit: ICE1/SCREAM (SCRM) ja SCRM2 (Ohashi-Ito & Bergmann, 2006; MacAlister *et al.*, 2007; Pillitteri *et al.*, 2007; Kanaoka *et al.*, 2008).

SPCH on õhulõhede diferentseerumises ja arengus esimene oluline bHLH-tüüpi transkriptsiooni faktorit kodeeriv geen, mis on laialdaselt ekspresseerunud epidermi rakkudes. Ekspressioon piirdub meristemoidi emarakkude ja meristemoidi rakkudega. Mutantliinis *spch-1* epidermi rakud ei jagune asümmeetriliselt, et initsieerida õhulõhede moodustamist. Sellisel juhul õhulõhesid ei teki ja taimed surevad noorelt (MacAlister *et al.*, 2007).

MUTE on teine oluline bHLH transkriptsioonifaktorit määrav geen, mis on oluline meristemoidi rakujagunemise lõpetamiseks. *MUTE* geeni promootor on aktiivne meristemoidi hilises jagunemisastmes. Mittefunktsionaalse *MUTE* geeniga *mute* mutandis ei lõpeta meristemoidi rakud jagunemist ning ei diferentseeru sulgraku emarakuks ja õhulõhesid ei teki. *MUTE* üleekspressiooni korral arenevad kõik epidermi rakud õhulõhedeks (Pillitteri *et al.*, 2007).

FAMA soodustab sulgraku emaraku jagunemist, aga takistab tekkinud sulgrakkude edasist jagunemist ning soodustab nende diferentseerumist. Kui FAMA funktsioon on häiritud, siis tekivad õhulõhed, kus sulgrakud on korduvalt jagunenud ja ei funktsioneerid ootuspäraselt (Ohashi-Ito & Bergmann, 2006).

Õhulõhede arenguliini rakkude poolt toodetud peptiidsed signaalmolekulid EPF1 (EPIDERMAL PATTERNING FACTOR), EPF2 omavad olulist rolli õhulõhede arengus: näiteks vastutavad nad ühe-raku-reegli kehtimise eest. See reegel näeb ette, et kaks õhulõhet ei oleks kunagi kõrvuti. Reegli kehtima panekuks sekreteerivad õhulõhe arenguliini rakud EPF-e, mis suruvad alla naaberrakkudes õhulõhedeks diferentseerumise raja (Hara *et al.*, 2007). EPF1 ja EPF2

reguleerivad õhulõhede arengut negatiivselt, arenguetapiliselt üksteisele järgnevalt (Lin *et al.*, 2017). EPF-ide mõju on uuritud ka majanduslikus kontekstis. Mutantsed riisitaimed, kus EPF-id olid üleekspressioneeritud, olid põuakindlamad kui kontrollitaimed (Caine *et al.*, 2019).

1.4 Õhulõhede avanemine ja sulgumine

Õhulõhed katavad tüüpiliselt taime lehepinnast alla 3%, kuid nende kaudu toimub 98% lehe ja atmosfääri vahelisest gaasivahetusest (Willmer & Fricker, 1996). Toimiv gaasivahetus ja seda võimaldav bioloogiline aparatuur on taimede ja seega ka kõigi maismaa loomade elutegevuseks vajalik. See teebki õhulõhede mõistmise ülimalt oluliseks, sest kogu meie maine eksistents sõltub fotosünteesist, mis omakorda sõltub õhulõhede kaudu toimuvast gaasivahetusest (Keenan *et al.*, 2013). Õhulõhede avatust näitab õhulõhede juhtivus: avatud õhulõhed tähendavad kõrget juhtivust, suletud õhulõhed madalat.

Õhulõhede avanemine toimub läbi ATP energia toimel funktsioneeriva H⁺ATPaasi töö, mis pumpab H⁺ ioone sulgrakkudest välja, põhjustades membraani hüperpolarisatsiooni. Järgneb K⁺ ionide liikumine sulgrakku läbi KAT1/2 K⁺ kanalite, mis on aktiveeritud hüperpolarisatsiooni poolt (Assmann *et al.*, 1985). K⁺ ionidega koos liiguvad rakku Cl⁻ ioonid, malaat ja suhkrud (Horrer *et al.*, 2016). Protsessi käigus plasmamembraan polariseerub, tõuseb osmootne rõhk sulgrakus, tõuseb turgor, sulgrakud paisuvad ja õhulõhe avaneb (Lazar, 2003).

Õhulõhede sulgumine on suuresti vahendatud taimehormoon abtsiishappe (ABA) signaalraja kaudu. ABA signaalraja häiretega mutandid on oluliselt põuatundlikumad kui metsiktüüpi taimed (Ma *et al.*, 2009). ABA signaalraja peamiseks lõppväljundiks on ionide väljutamine sulgrakust läbi anioonkanalite, millega kaasneb plasmamembraani depolarisatsioon (Keller *et al.*, 1989). Signaalraja esimese sammuna seondub ABA tsütoplasmas paikneva retseptorvalguga perekonnast PYR1 (PYRABACTIN RESISTANCE 1)/PYL (PYR1-LIKE)/RCAR (REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTORS). PYR/PYL/RCAR valgud kannavad signaali edasi, inhibeerides 2C tüüpi proteiinfosfataase (PP2C) nendega seondumise teel. PP2C inhibitsioon aktiveerib proteiinkinaasi OST1 (OPEN STOMATA 1) (Park *et al.*, 2009). OST1 aktiveerib muu hulgas ka aeglase, S-tüüpi (*slow type*) anioonikanali SLAC1 (SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1) ja kiire, R-tüüpi (*rapid type*) anioonikanali QUAC1 (QUICK-ACTIVATING ANION CHANNEL 1)/ALMT12 (ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 12), algatades sellega õhulõhe sulgumise (Negi *et al.*, 2008; Sasaki *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2010).

SLAC1 valgud on vajalikud anioonide homöostaasi tagamiseks sulgrakkudes. SLAC1 puuduva funktsiooniga mutantidel (nt. *slac1*) on suurem õhulõhede juhtivus, mis tuleneb anioonide kuhjumisest sulgrakkudesse; *slac1* mutandil on probleeme õhulõhede sulgemisega ja sellest tulenevalt halvem võime reageerida keskkonnast saabuvatele signaalidele: taimed on põutundlikumad ja lisaks on neil ka tavatingimuse juures suurem veekadu kui metsiktüüpi taimedel (Negi *et al.*, 2008).

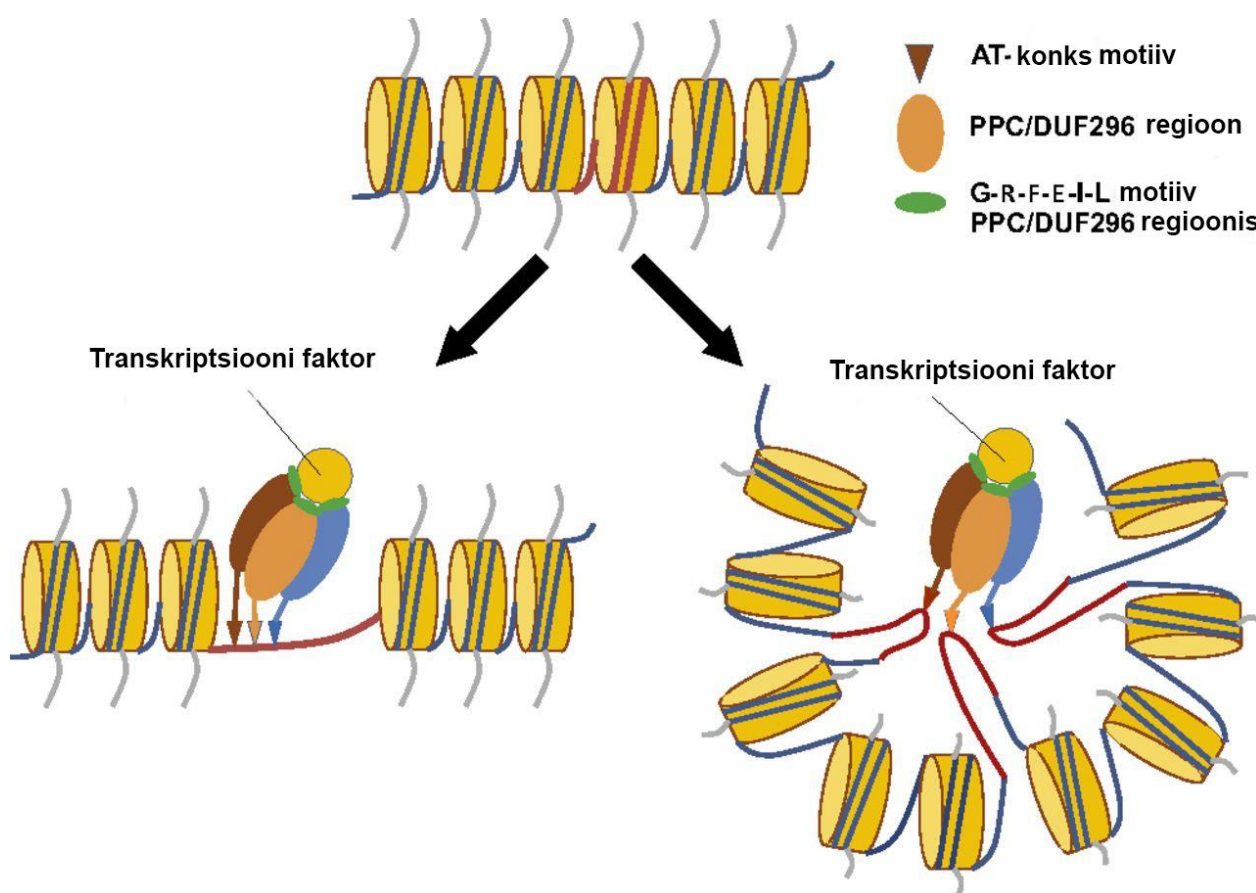
1.5 AHL geenid

AHL (*AT-hook motif nuclear-localized*) geeniperekonna geenid kodeerivad taime stressivastuses ja arengu regulatsioonis olulist rolli mängivaid transkriptsioonifaktoreid. *AHL* gene on leitud kõigist siiani sekveneeritud maismaataimedest. *AHL* geeniperekonna kõrge konserveerumus maismaataimedes viitab nende rolli olulisusele taimede kasvus ja arengus. (Zhao, 2013)

AHL valgud koosnevad kahest regioonist, ~120st aminohappest koosnev taime ja prokaryoodi konserveerunud (*plant and prokaryote conserved*, PPC) regioon ja ühte või kahte AT-konksu (*AT-hook*) sisaldav regioon. AT-konksu motiiv sisaldab keskset Arg-Gly-Arg (arginiin-glütsiin-arginiin) aminohappe järjestust, mis on võimeline seostuma AT-rikka regiooniga B-vormis DNA ahelas. AT-konksu motiivid jagatakse kahte rühma keskse Arg-Gly-Arg järjestuse C-terminaalse osa varieerumise alusel: I tüübil on konsensusjärjestus Gly-Ser-Lys-Asn-Lys (glütsiin-seriin-lüsiin-asparagiin-lüsiin), II tüübil Arg-Lys-Tyr (arginiin-lüsiin-türosiin) (Zhao *et al.*, 2013). PPC regioon vastutab valk-valk interaktsioonide eest, mis võimaldab AHL valkudel moodustada homotrimeere (Joonis 3). AHL valgud moodustavad ka hetero-komplekse, seondudes teiste tuumavalkudega, näiteks histoonide ja teiste transkriptsioonifaktoritega (Machaj & Grzebelus, 2021). *AHL* geenid klassifitseeritakse Bayes'i analüüsi abil kahte fülogeneetilisse klaadi. Klaad A-sse kuuluvatel *AHL* geenidel pole introneid ja selle klaadi valkudel on ainult üks AT-konksu motiiv ning üks PPC regioon. Klaad B-sse kuuluvad intronitega *AHL*-id, millel on üks või kaks AT-konksu motiivi (Zhao *et al.*, 2013).

Müürlooga genoom kodeerib kokku 29 AHL valku (Fujimoto *et al.*, 2004), mille mõju taime kasvule ja arengule on väga mitmekülgne. Näiteks mõjutavad *AHL* geenid hüpokotüüli kasvu (Zhao *et al.*, 2013). On näidatud, et *AHL* geenide üheks funktsiooniks on hüpokotüüli kasvu pidurdada, kuna geenide inaktiveerimisel hüpokotüüli kasv valge valgusega kasvukeskkonnas suureneb. Kui kas AHL29 või AHL27 on üleekspressioneeritud, siis on hüpokotüüli kasv pidurdunud

valguse käes kasvanud seemikutel, pimedas kasvanud seemikud aga pole nende geenide üleekspressioonist mõjutatud (Street *et al.*, 2008). Täiskasvanuna on neil mutantidel suurenenud lehed, õied ja seemned ja nende kasvukiirus on aeglane. *AHL29* ja *AHL27* defektsete geenidega mutandil on hüpokotüüli kasv tavalisest suurem (Zhao, 2013). Geenide funktsioonid on sarnased, sest kui ainult üks neist geenidest on välja lülitatud, ühtib taimede fenotüüp metsiktüüpi taimedega (Street *et al.*, 2008). Kolmikmutantidega tehtud katsed näitavad, et valitud geenide hulgast (*AHL5*, *AHL6*, *AHL15* või *AHL22*) ei *AHL5*, *AHL15* ega *AHL22* hüpokotüüli kasvu ei mõjuta, *AHL6* seevastu surub hüpokotüüli kasvu tugevasti alla (Zhao *et al.*, 2013).



Joonis 3. *AHL* geeniperekond reguleerib taime kasvu ja arengut AHL komplekside kaudu. Komplekse moodustavad nii samad valgud, kui erinevad perekonna esindajad. PPC regiooni vahendusel moodustuvad homo-/hetero-trimeersed kompleksid. Kompleksid haakuvad DNA AT-rikaste aladega (joonisel punane). AHL valkude töö on reguleeritud ja vahendatud teiste transkriptsioonifaktorite poolt. Zhao *et al.* pakutud mudeli järgi on kompleksiga ühinenud transkriptsioonifaktorid peale kompleksiga ühinemist kasutuks tehtud ja nende funktsioon rakus ei avaldu. Zhao *et al.*, 2013 modifitseeritud joonis.

Pärmi kaksikhübridisüsteemi sõeluuring (*yeast two-hybrid screen*) ja bimolekulaarne fluorestsents-komplementatsioon (*bimolecular fluorescence complementation*) on näidanud nii omavahelisi B klaadi valk-valk interaktsioone AHL5 ja AHL12 vahel, kui ka nimetatud valkude interaktsiooni A klaadist AHL27 ja AHL29-ga. Nende interaktsioonide roll geeniekspressiooni regulatsioonis ei ole selge (Zhao *et al.*, 2013).

Mutantsed taimed *ahl13* on nõrgenenud muster-ärgitatud immuunvastusega (*PAMP-triggered immunity*), mida kutsuvad esile patogeenidele iseloomulikud molekulid. Neil taimedel on vähenenud reaktiivsete hapnikuühendite toodang, kaitsegeenide ekspressioon ja muster-ärgitatud immuunvastus. Transkriptoomi analüüs on näidanud, et AHL13 reguleerib jasmoonhappe biosünteesi ning immuunsust *Pseudomonas syringae* ja *Botrytis cinerea* patogeenide vastu. Fosforüleerimine on oluline AHL13 valgu stabiilsuses ning immuunfunktsioonis, seda näitas fosforüleeritavate järjestuste muteerimise katse (Rayapuram *et al.*, 2021).

Mitmed *AHL* geenid on olulised taime kasvu, arengu ja stressivastuse regulatsioonis. Oluline on ka roll kaitsereaktsioonis patogeenide vastu. Seni pole aga teada, kas *AHL* geenidel on ka oluline mõju õhulõhede arengu ja/või avatuse regulatsioonile.

2. PRAKTILINE OSA

2.1. Eesmärk

Töö eesmärgiks oli testida, kas sulgrakkudes või õhulõhede eellasliini rakkudes ekspresseeritud AHL geenid on olulised õhulõhede funktsiooni või arengu mõjutajad. Selleks teostati sõeluuring isoleeritud homosügootsetele T-DNA liinidele, kus on häiritud valitud *AHL* geenide funktsioon. Igas mutandis peaks olema häiritud vaid ühe *AHL* geeni töö. Sõeluuringu eesmärgiks oli kaardistada valitud geenide üksikmutantide fenotüüpilisi iseärasusi ja uurida, kas mõne valitud geeni inaktiivsus mõjutab taimede õhulõhede arengut ja /või funktsiooni.

Taimeliinide valik oli varasemalt tehtud molekulaarse taimefüsioloogia laboris, valiku aluseks oli antud geenide kõrge ekspressioonitase sulgrakkudes või nende eellasrakkudes.

2.2. Metoodika

2.2.1 Kasutatud taimed

Kasutusel olid seemnepangast NASC (*The Nottingham Arabidopsis Stock Centre*) saadud hariliku müürlooga mutantsed seemned, mille *ahl* geenides on T-DNA insertioon, mis muudab need geenid mittefunktsionaalseks. Katse viidi läbi nendest seemnetest kasvatatud taimedele järgnevast põlvkonna taimedel. Üks generatsioon kasvatati lihtsalt tavatingmustes, et epigeneetilised mõjutused eelmisest põlvkonnast oleks liinide vahel ühtlased. *AHL* geenide suhtes defektsetest taimeliinidest olid esindatud: *ahl5*, *ahl6*, *ahl8*, *ahl12* ja *ahl13*. Uuritud liinid on näha tabelis 1. Võrdluseks *ahl* liinidega kasvati metsiktüüpi Col-0 taimi.

Tabel 1. Kasutatud AHL liinid.

Geeni identifikaator	Mutantliini nimi	Mutantliini identifikaator
AT1G63470	<i>ahl5</i>	SALK_123590C
AT5G62260	<i>ahl6-1</i>	SALK_061044C
AT5G62260	<i>ahl6-2</i>	SALK_037803C
AT5G46640	<i>ahl8</i>	SALK_002786C
AT1G63480	<i>ahl12</i>	SALK_111395C
AT4G17950	<i>ahl13</i>	SALK_014014C

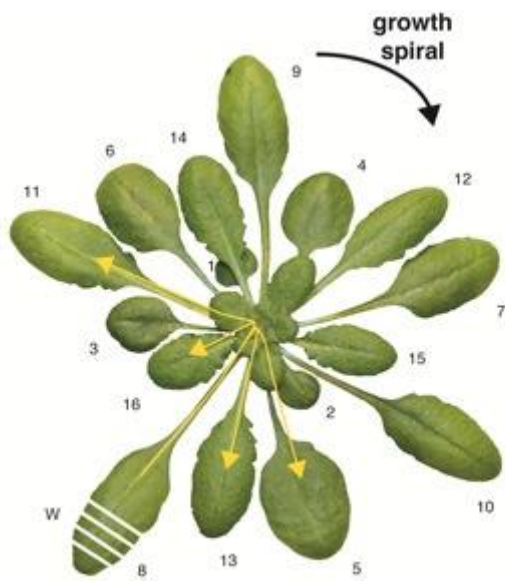
2.2.2. Taimede kasvatamine

Enne külvamist hoiti seemeneid idandamise ühtlustamise eesmärgil vähemalt kaks päeva 1,5 ml tuubides, vee sees, 4°C temperatuuriga külmkapis. Seemned külvati automaatpipeti abiga 2-8 kaupa pottidesse. Potid täideti kasvusubstraadiga, mis koosnes 2:1 turba (KEKKILÄ, turbasubstraat) ja vermikuliidi (TopGreen, Medium) segust (mahu järgi). Kasvusegusse lisati umbes 1g nematoode (*S.feltiae*, Koppert Entonem) 10 liitri substraadi kohta. Kuiva substraati niisutati veega vahekorras 2:1 substraati ja vett (mahu järgi).

Potid asetati 18-kaupa kandikutele, eri liinid omavahel läbisegi, et äärealadele omapäraseid kasvutingimused ei mõjutaks katsetulemusi. Esimesed 10 päeva olid kandikud kaetud katetega, et soodustada seemikute idanemist ja kasvu ja hoida niiskustaset kõrgel. Peale 10. päeva eemaldati kandikutelt katted ja taimi harvendati, jättes igasse potti alles üks taim. Taimi kasteti keskmiselt kord nädalas, altniisutuse meetodil. Taimed kasvasid kasvukapis Percival 3 (Percival Scientific, US, Iowa) järgnevatel kasvutingimustel: fotoperiood 10 tundi päeva, 14 tundi ööd; temperatuur 23°C päeval, 19°C öösel; õhuniiskus 60% päeval 80% öösel, valgusintensiivsus 250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

2.2.3. Lehejäljendite võtmine

Harilikul müürloogal kasvavad lehed spiraalis, üksteise järel (Joonis 4). Kahe esimese lehe vaheline nurk on $\sim 180^\circ$, hilisemate lehtede vahelised nurgad on $\sim 120^\circ$ (Farmer *et al.*, 2013). Kolm ja pool nädalat peale külvamist märgistati kõigil taimedel 10. leht kahe hambaorgiga, et sellel hiljem läbi viia gaasivahetuse mõõtmine ja jäljendi võtmine.



Joonis 4. Lehtede nummerdamise skeem müürloogal. Joonis pärineb Farmer *et al.*, 2013.

Viis nädalat peale taimede külvamist võeti 10. lehest jäljend. Jäljendi võtmiseks eraldati leht taime küljest ja lõigati pikkupidi pooleks. Ühest poolest võeti alumise poole jäljend, teisest ülemise poole jäljend. Jäljendi võtmiseks määriti lehte tüüpiliselt hambajäljendite võtmiseks kasutatava pastaga (*Zhermack Orangwash L* ja *Coltene Speedex light body*). Pastal lasti kuivada vähemalt 20 min ja see eemaldati lehe küljest. Saadud jäljend lakiti küünelakiga, millel lasti kuivada. Küünelakk eemaldati jäljendilt, kasutades läbipaistvat kleeplinti. Kleeplint koos sinna külge kleepunud küünelakiga kleebiti preparaadi alusklaasile, ühe liini lehe ülemise ja alumise külje jäljendid koos ühele alusklaasile.

2.2.4. Õhulõhede juhtivuse ja veekaotuse mõõtmine

Õhulõhede juhtivust mõõdeti LI-600 (Licor Bioscience, Nebraska, US) poromeetriga. Mõõtmised viidi läbi kasvutoas, kus keskkonnatingimused püsisid mõõtmise ajal samad, mis kasvamise ajal. Juhtivus mõõdeti samuti taime 10. lehelt, enne lehe eemaldamist jäljendi võtmiseks. Mõõtmiseks suleti leht aparadi mõõtekambrisse, LI-600 poromeeter teostas *in situ* juhtivuse mõõtmise (ühikutes $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), lähtudes transpiratsioonist ja lehe temperatuurist. Kõigi taimede puhul teostati mõõtmised lehe ülemiselt ja alumiselt küljelt.

Taimede veekaotuse mõõtmiseks lõigati kõigilt taimedelt ära kolm täiskasvanud lehte. Lehed kaaluti ja jäeti kaheks tunniks toatemperatuurile kuivama, alumine külg ülespoole. Peale

kuivamist kaaluti lehed uuesti. Arvutati massikaotuse osakaal. Samuti arvutati lehe kogujuhtivus, ehk mõlema lehepoole juhtivuste summa.

$$\text{massikaotuse osakaal} = \frac{\text{algmass} - \text{lõppmass}}{\text{algmass}}$$

2.2.5. Õhulõhede tiheduse määramine

Täiskasvanud 10. lehe õhulõhede tiheduse määramiseks tehti preparaatidest (vt. 2.2.3) mikroskoobiga (Kern valgusmikroskoop OBF 133C832 koos Kern kaameraga ODC 832) 200-kordse suurendusega video, mis näitaks kaadrissejäävat pilti kõigil fookustasanditel, et ka ebaühtlase paksusega preparaadilt oleks võimalik identifitseerida õhulõhed. Pildistatava ala suurus oli 0,26 mm². Tiheduse määramiseks kasutati pildianalüüsi programmi ImageJ (Rasband, W.S., 1997). Arvutati fotol oleva ala pindala, loeti kokku seal nähtavad õhulõhed ja nende kahe jagatisena leiti õhulõhede tihedus.

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

Õhulõhede tihedus arvutati eraldi lehe alumise ja ülemise külje jaoks. See võimaldas arvutada ka tiheduste suhte ja summa. Samuti arvutati lehe tiheduste summa.

$$\text{õhulõhede tiheduste suhe} = \frac{\text{lehe ülemise külje õhulõhede tihedus}}{\text{lehe alumise külje õhulõhede tihedus}}$$

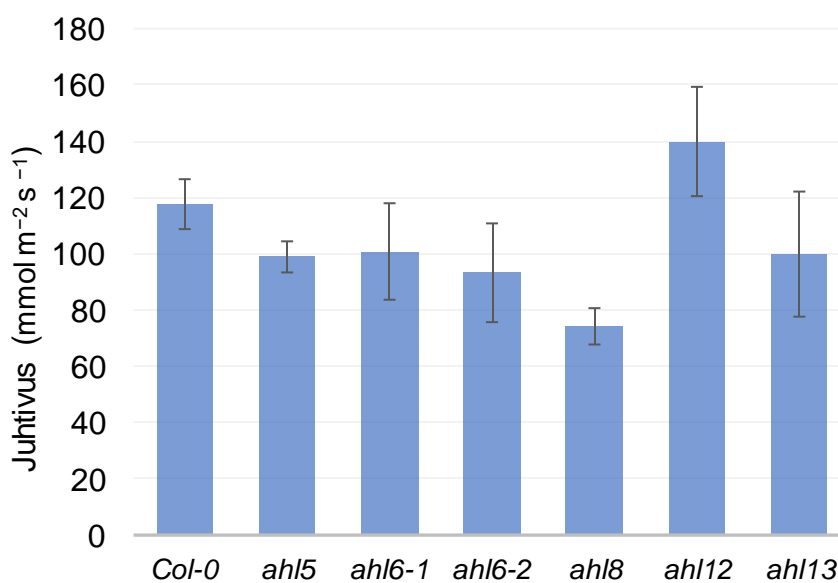
2.2.6. Statistiline analüüs

Katsetes mõõdetud õhulõhede juhtivused, tihedused ja massikaotuse osakaalud keskmistati iga katses kasutatud müürlooga liini kohta. Arvutati standardviga, mida kasutati vearibade kujutamisel graafiliselt. Statistilise andmeanalüüsi teostamiseks kasutati programmi Statistica, kus kõigepealt kasutati Levene testi, et selgitada, kas rühmadesisene varieeruvus on homogeenne; kui oli, siis kasutati analüüsiks ühefaktorilist ANOVA-t, kui ei, siis Welch-i ANOVA-t. Kui ANOVA näitas statistiliselt olulist erinevust rühmade vahel, siis tehti *post-hoc* testina Dunneti test. Lisakatses kasutati kahe grupi võrdlemiseks t-testi. Erinevused loeti oluliseks kui p oli väiksem kui 0,05.

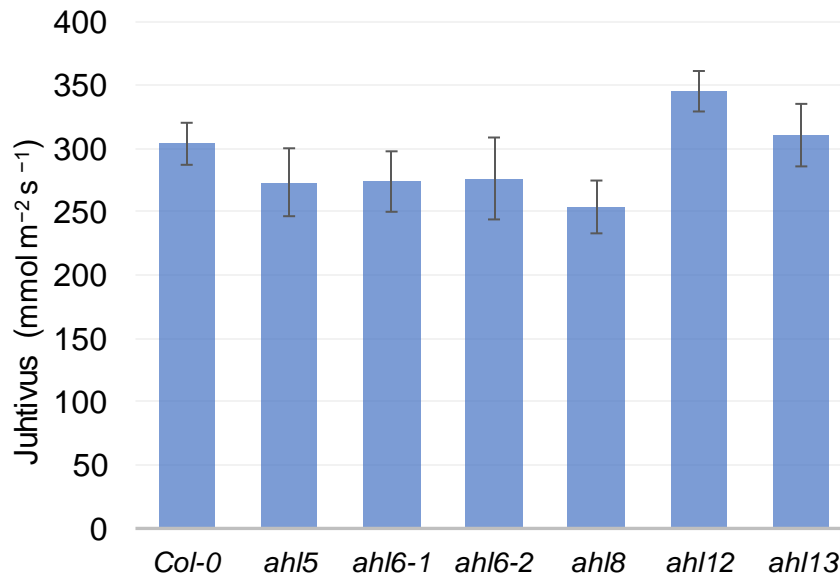
2.3. Tulemused

2.3.1. Õhulõhede juhtivus

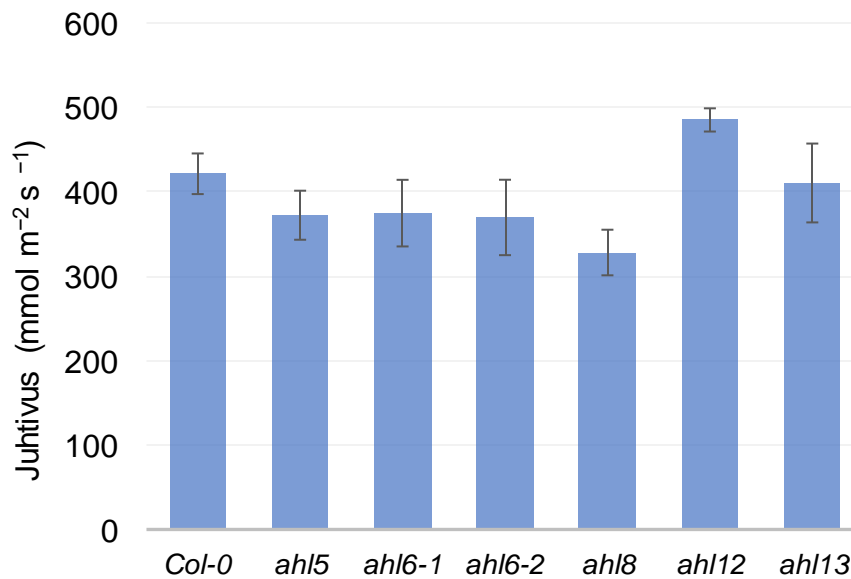
Katses mõõdeti *ahl* mutantide ja metsiktüüpi taimede õhulõhede juhtivust, eesmärgiga leida ja selekteerida järgnevateks uuringuteks metsiktüüpi taimest erineva juhtivusega mutante. Joonised 5 ja 6 näitavad õhulõhede juhtivust lehe eri külgedel, joonis 7 näitab lehe kogujuhtivust, ehk lehepoolte juhtivuste summat. Joonis 8 näitab lehepoolte juhtivuste suhet, mille saamiseks on lehe ülemise poole juhtivus jagatud lehe alumise poole juhtivusega. Mainitud joonistel 5.-8. ühtegi statistiliselt olulist rühmadevahelist erinevust ei leidunud, kuid joonisel 6 tundus *ahl8* lehe ülemise külje juhtivus siiski märkimisväärselt madal. Seetõttu tehti lisakatse võrdlemaks *ahl8* õhulõhede juhtivust Col-0 õhulõhede juhtivusega (joonis 14).



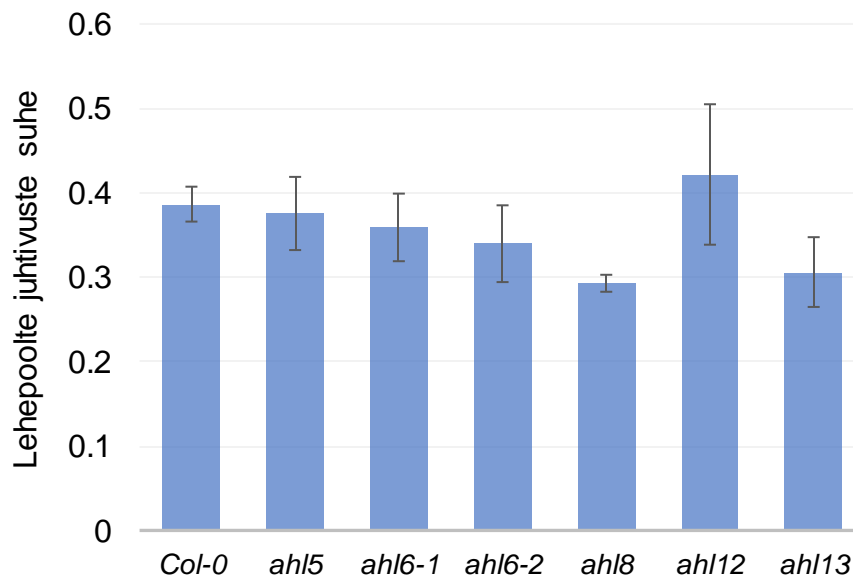
Joonis 5. Hariliku müürlooga metsiktüübija erinevate *ahl* mutantide lehe ülemise külje õhulõhede juhtivus (mmol m⁻² s⁻¹). Diagrammil on katse käigus saadud tulemuste keskmised väärtused. Tulpadel olevad vearistid näitavad ± standarddviiga. Ühefaktorilise ANOVA alusel puudub statistiliselt oluline erinevus rühmade vahel. Valimi suurus varieerus *ahl* liinide puhul 5-6, Col-0 puhul oli 16.



Joonis 6. Hariliku müürlooga metsiktüübi ja erinevate *ahl* mutantide lehe alumise külje õhulõhede juhtivus (mmol m⁻² s⁻¹). Diagrammil on katse käigus saadud tulemuste keskmised väärtused. Tulpadel olevad vearistid näitavad ± standardviga. Valimi suurus varieerus *ahl* liinide puhul 5-6, Col-0 puhul oli 16.



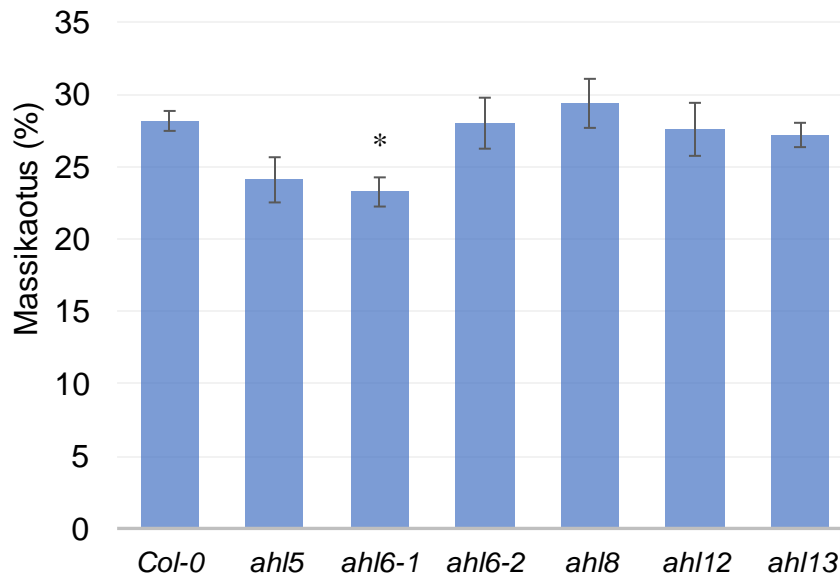
Joonis 7. Hariliku müürlooga metsiktüübi ja erinevate *ahl* mutantide lehe kogujuhtivus (mmol m⁻² s⁻¹). Diagrammil on katse käigus saadud tulemuste keskmised väärtused. Tulpadel olevad vearistid näitavad ± standardviga. Valimi suurus varieerus *ahl* liinide puhul 5-6, Col-0 puhul oli 16.



Joonis 8. Hariliku müürlooga metsiktüübi ja erinevate *ahl* mutantide lehepoolte juhtivuste suhe (ülemine jagatud alumisega). Diagrammil on katse käigus saadud tulemuste keskmised väärtused. Tulpadel olevad vearistid näitavad \pm standardviga. Valimi suurus varieerus *ahl* liinide puhul 5-6, Col-0 puhul oli 16.

2.3.2. Massikaotus

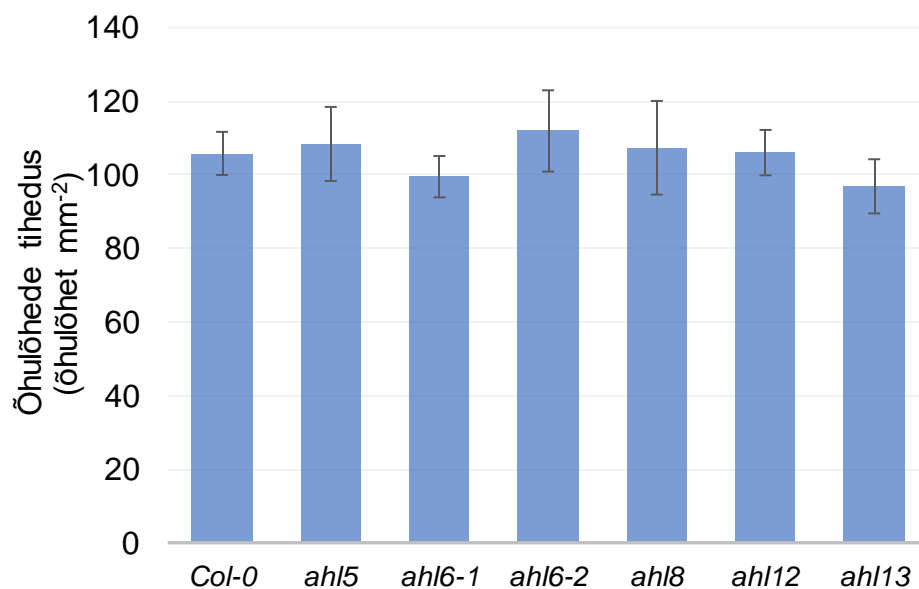
Massikaotus ehk veekaotus näitab, kui palju muutus kahetunnise kuivamisperioodi vältel taime küljest ära lõigatud lehtede mass. Katse näitab veekaotust, kuna katse käigus leitav massierinevus sõltub eelkõige veest, mis aurab läbi õhulõhede keskkonda. Õhulõhede sulgumise regulatsiooni probleemidega mutandid sulgevad õhulõhed aeglasemalt ja vett eraldub rohkem. Joonisel 9 on näha *ahl* mutantide massikaotuse protsente võrdluses metsiktüüpi taimedega. Statistiliselt metsiktüüpi taimedest oluliselt erinev oli *ahl6-1* liin, mis on huvitav, kuna sama geeni mutatsiooniga liin *ahl6-2* ei olnud statistiliselt oluliselt erinev metsiktüübist.



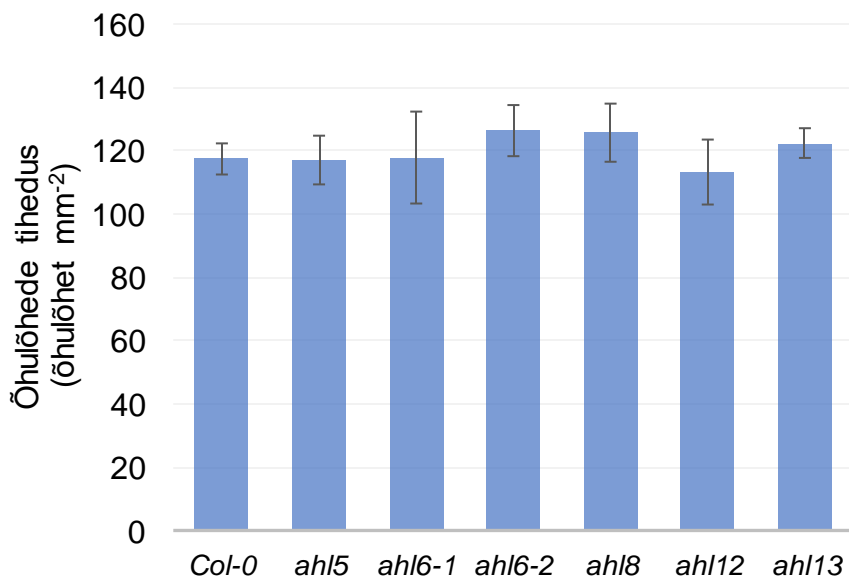
Joonis 9. Hariliku müürlooga metsiktüübi ja erinevate *ahl* mutantide massikaotus (%). Diagrammil on katse käigus saadud tulemuste keskmised väärtused. Tulpadel olevad vearistid näitavad \pm standardviga. Statistiliselt metsiktüübist oluliselt erinev rühm on *ahl6-1* ($p=0,02$), mis on tähistatud tärmiga (*). Valimi suurus varieerus *ahl* liinide puhul 5-6, Col-0 puhul oli 16.

2.3.3. Õhulõhede tihedus

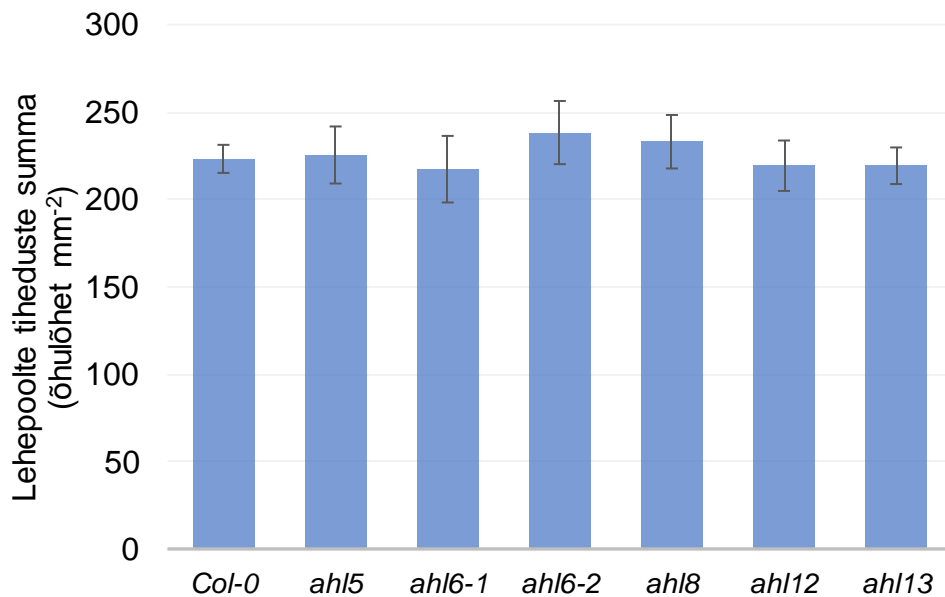
Katses mõõdeti *ahl* mutantide ja metsiktüüpi taimede õhulõhede tihedust, eesmärgiga leida ja selekteerida järgnevateks uuringuteks metsiktüüpi taimest erineva õhulõhede tihedusega mutante. Joonised 10 ja 11 näitavad õhulõhede tihedust lehe eri külgedel, joonis 12 näitab lehe külgede tiheduste summat. Joonis 13 näitab lehepoolte tiheduste suhet, mille saamiseks on lehe ülemise poole õhulõhede tihedus jagatud lehe alumise poole õhulõhede tihedusega. Mainitud tulemusetes ühtegi statistiliselt oluliselt erinevust ei leidunud.



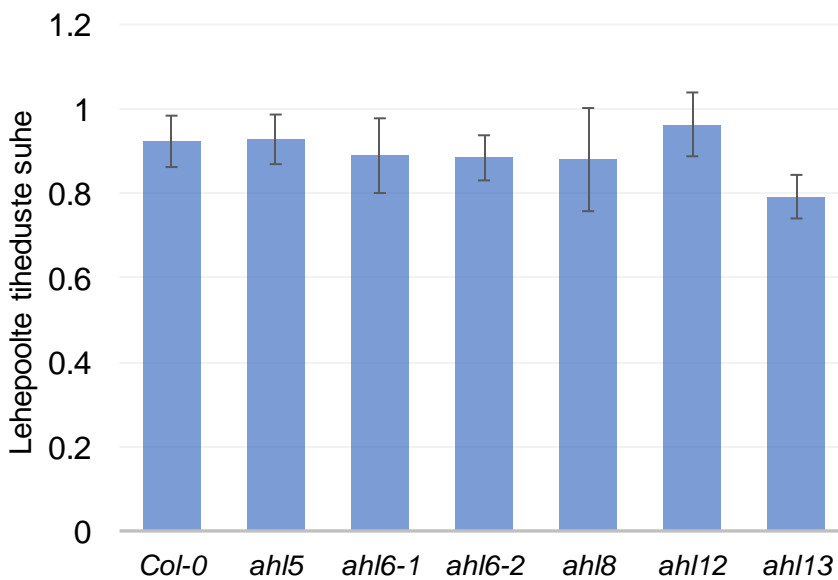
Joonis 10. Hariliku müürlooga metsiktüübi ja erinevate *ahl* mutantide lehe ülemise külje õhulõhede tihedus (õhulõhet mm⁻²). Diagrammil on katse käigus saadud tulemuste keskmised väärtused. Tulpadel olevad vearistid näitavad ± standardviga. Valimi suurus varieerus *ahl* liinide puhul 5-6, Col-0 puhul oli 16.



Joonis 11. Hariliku müürlooga metsiktüübi ja erinevate *ahl* mutantide lehe alumise külje õhulõhede tihedus (õhulõhet mm⁻²). Diagrammil on katse käigus saadud tulemuste keskmised väärtused. Tulpadel olevad vearistid näitavad ± standardviga. Valimi suurus varieerus *ahl* liinide puhul 5-6, Col-0 puhul oli 16.



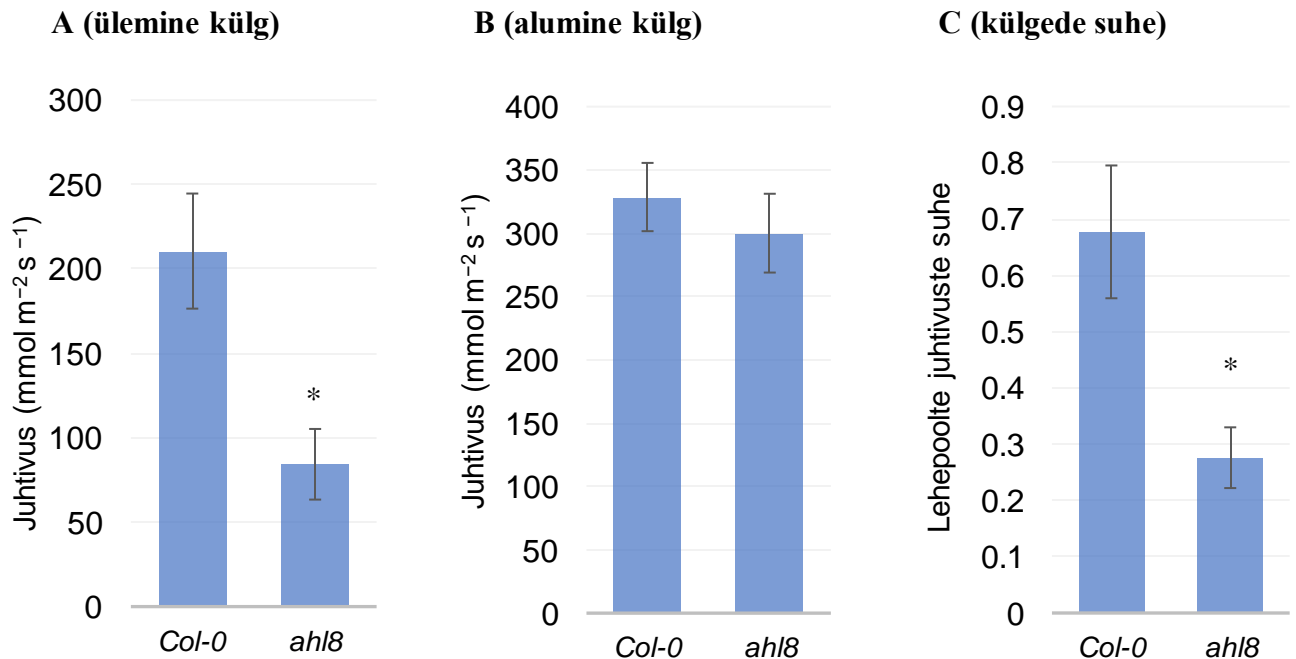
Joonis 12. Hariliku müürlooga metsiktüübi ja erinevate *ahl* mutantide lehe külgede õhulõhede tiheduste summa (õhulõhet mm⁻²). Diagrammil on katse käigus saadud tulemuste keskmised väärtused. Tulpadel olevad vearistid näitavad ± standarddviaga. Valimi suurus varieerus *ahl* liinide puhul 5-6, Col-0 puhul oli 16.



Joonis 13. Hariliku müürlooga metsiktüübi ja erinevate *ahl* mutantide lehe külgede õhulõhede tiheduste suhe (ülemine jagatud alumisega). Diagrammil on katse käigus saadud tulemuste keskmised väärtused. Tulpadel olevad vearistid näitavad ± standarddviaga. Valimi suurus varieerus *ahl* liinide puhul 5-6, Col-0 puhul oli 16.

2.3.4. Lisakatse *ahl8* õhulõhede juhtivuse uurimiseks

Lisakatse tehti võrdlemaks *ahl8* õhulõhede juhtivust Col-0 õhulõhede juhtivusega (Joonis 14). Katse viidi läbi kuna *ahl8* taimede ülemise lehepoole õhulõhede juhtivus tundus eriliselt väike, kuigi varasem katse ei näidanud selle erinevuse statistilist olulisust. Lisakatsest tuli välja, et t-testi alusel on *ahl8* ülemiste õhulõhede juhtivus statistiliselt oluliselt väiksem kui metsiktüübil ja sellest tulenevalt on oluliselt erinev ka lehepoolete juhtivuste suhe.



Joonis 14. Hariliku müürlooga Col-0 ja *ahl8* mutandi (A) lehe ülemise külje juhtivus ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (B) lehe alumise külje juhtivus ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ja (C) lehe külgede juhtivuste suhe. Diagrammil on katse käigus saadud tulemuste keskmised väärtused. Tulpadel olevad vearistid näitavad \pm standardviga. Statistiliselt erineb metsiktüübist (*) *ahl8* lehe ülemise külje juhtivus ($p=0,006$) ja *ahl8* lehe külgede juhtivuste suhe ($p=0,007$) (t-test). Valimi suurus oli mõlemal rühmal 9 taime.

2.4 Arutelu

2.4.1. AHL8 roll ülemiste õhulõhede juhtivuse mõjutajana

Tehtud lisakatse näitas, et *ahl8* lehe ülemiste õhulõhede juhtivus oli statistiliselt oluliselt väiksem metsiktüübist (joonis 14). Kuna *ahl8* õhulõhede tihedus ei olnud kummalgi lehe küljel oluliselt erinev metsiktüübist (joonised 10 ja 11), peab erinevus juhtivuses tulenema erinevast lehe ülemise külje õhulõhede avatuse regulatsioonist *ahl8* taimedes. Lehe alumise külje juhtivus oli *ahl8* puhul sarnane metsiktüübiga. Enne, kui saaks kindlalt järeldada, et antud erinevus on põhjustatud just *AHL8* geeni mutatsioonist, tuleks tõestada, et fenotüüp pole põhjustatud muudest muutustest mõnes teises genoomi osas, mis võivad kaasneda nende seemnete saamiseks kasutatud muteerimisprotsessiga (T-DNA juhulik instertsioon). Selleks võib uurida mõnda muud *ahl8* mutanti või viia funktsionaalne *AHL8* geen *AHL8* promootori kontrolli all katses kasutatud *ahl8* mutandi genoomi. Viimasel juhul peaks muutuma peale funktsionaalse *AHL8* geeni insertiooni *ahl8* taime fenotüüp metsiktüübist eristamatuks juhul, kui fenotüübi põhjuseks on *AHL8* geeni defekt. Juhul, kui muutus on tingitud muu genoomi muutuse poolt, fenotüüp püsib.

Erinevate lehe külgede juhtivused erinevad taimeti ja isegi sama taime kõrvuti asetsevatel täiskasvanud lehtede puhul, näitab päevalilledel tehtud katse (Mott & O'Leary, 1984). Hästikastetud taimede puhul ületas tavaliselt ülemise lehepoole juhtivus alumise lehepoole oma, lehepoolte juhtivuste suhted (ülemine jagatud alumisega) jäid 1,0 ja 2,0 piiridesse (Mott & O'Leary, 1984). Selle töö raames läbi viidud katse näitab aga, et müürloogal on suhe teistpidi: ülemise külje juhtivus on alati madalam alumise külje juhtivusest. Juhtivuste suhe selle katse raames kasvatatud müürlookadel 0,3-0,4 ringis. Müürlooga suhteliselt madalam ülemine juhtivus võib viidata tema lehe ülakülje õhulõhede suuremale tundlikkusele keskkonnatingimuste muutuste suhtes. On näidatud, et erinevatel lehe pooltel asuvad õhulõhed käituvad erinevalt ja neil on erinev funktsioon (Mott & O'Leary, 1984; Wang *et al.*, 2008). Kui valgustati mõlemat lehepoolt ühtlaselt, oli kõrgem juhtivus lehe alumisel küljel. See reegel kehtis erinevate valgusintensiivsuste juures. Kui valgustati mõlemat lehepoolt eraldi, siis olid nii ülemise, kui ka alumise lehepoole õhulõhed sensitiivsed valgusele, mis jõudis nendeni läbi lehe. Veel on leitud, et mõlema lehepoole õhulõhede toimimine on omavahel koordinatsioonis, kuigi muutused lehepoolte juhtivuses reaktsioonina valgusele on erinevad (Wall *et al.*, 2022). Õhulõhede avanemise ajendiks pole mitte ainult valgus, vaid selles on oma osa ka süsihappegaasi kontsentratsioonil ja mesofüllist pärinevatel signaalidel (Yera *et al.*, 1986; Wall *et al.*, 2022). Leitud on tugev seos õhulõhede avatuse ja mesofüllil

fotosünteesi aktiivsuse vahel, kusjuures alumise lehepoole õhulõhed reageerisid mesofüllil fotosünteesile tugevamalt (avanesid rohkem) kui ülemise lehepoole õhulõhed (Wang *et al.*, 2008). Lehte läbivale valgusele reageerisid lehe alakülje õhulõhed tugevamalt, kui lehe ülakülje õhulõhed. Roheline monokromaatiline valgus algatas alumiste, aga mitte ülemiste, õhulõhede avanemise (Wang *et al.*, 2008). Õhulõhed olid lehte läbivate lainepikkuste suhtes tundlikumad kui ülemised. Vajab veel täiendavat uurimist, kas *ahl8* madalam ülemise külje õhulõhede juhtivus on seotud nende õhulõhede erineva avanemisega valguse ja madala CO₂ mõjul või on sellel muud põhjused. Tasuks teha täiendavaid katseid ülemiste ja alumiste õhulõhede reaktsiooni kineetika mõõtmiseks.

Kui katses leitud *ahl8* fenotüüp on põhjustatud *AHL8* geeni funktsiooni häirumisest, siis on tegemist väga huvitava mutandiga, kuna metsiktüübiga sarnase õhulõhede tiheduse juures on sel taimel ülemistel õhulõhedel juhtivus hulga väiksem, mis viitab avatuse regulatsiooni puudulikkusele ainult ülemise lehe poole õhulõhedes. Selliseid mutante pole seni leitud ega uuritud. Edasi võiks uurida, kas *ahl8* ülemise ja alumise külje õhulõhed reageerivad erineva kiirusega keskkonnatingimuste muutustele või stressihormoonile ABA. Huvitav oleks näha, kas *ahl8* taimede veekasutus on efektiivsem kui metsiktüübil ja kas nad on sellest tulenevalt ka põuale vähem tundlikud. Veel tasuks uurida, kas ja kuidas *ahl8* mutantide süsiniku sidumise kiirus ja efektiivsus metsiktüübist erineb. Kuna *ahl8* mõjutab ainult lehe ülemise külje õhulõhede juhtivust, võib järeldada, et lehe erinevate poolte õhulõhede avatus on reguleeritud erinevate signaalradade kaudu. Nendest signaalradadest mõjutab *ahl8* just lehe ülemise külje õhulõhede regulatsiooniga seotud signaalrada. Kuna *AHL8* on transkriptsioonifaktor, siis võib tema mõju signaalrajale avalduda teiste geenide ekspressiooni reguleerimise kaudu. On võimalik, et *AHL8* mõjutab õhulõhede juhtivust näiteks ABA kaudu, kuna see hormoon on keskne õhulõhede sulgumise regulaator. Seda hüpoteesi saaks testida RNA sekveneerimise eksperimendiga, võrreldes omavahel *ahl8* ja metsiktüüpi taime transkriptoomi. Kui *ahl8* tõesti mõjutab vaid ülemise õhulõhede avatuse regulatsiooniga seotud rada, siis on tegemist äärmiselt huvitava uurimisobjektiga, kuna lehe eri külgede õhulõhede funktsioonist on seni teada võrdlemisi vähe.

2.4.2. Massikaotus ja tihedus

Nii massikaotuses kui ka õhulõhede tiheduse osas ei olnud uuritud *ahl* mutantide hulgas ühtegi silmapaistvat ega statistiliselt oluliselt metsiktüübist erinevat fenotüüpi. See võib tähendada, et need geenid ei mõjuta vastavaid õhulõhede tunnuseid. Kuna *AHL* geeniperekonna gene on

müürloogas 29 ja nende funktsioonid on osaliselt kattuvad, siis on võimalik, et isegi kui neil on suurem mõju õhulõhede arengule, kui katsetulemustest nähtav, ei ole see üksikmutantide puhul eristatav, kuna ühe geeni funktsiooni puudumise asendab mõni teine *AHL* geeniperekonna liige (Street *et al.*, 2008). Seega oleks oluline teha katseid ka mitmikmutantidega, leidmaks ühise funktsiooniga üksteist asendavaid gene.

2.4.3. *ahl6-1* erinevus metsiktüübist

Joonisel 9 on näha *ahl* mutantide massikaotuse protsente võrdluses metsiktüüpi taimega. Statistiliselt metsiktüübist eristuv on *ahl6-1* liin, mis on huvitav, kuna sama geeni mutatsiooniga liin *ahl6-2* ei ole statistiliselt oluliselt erinev metsiktüübist. Fenomen võib olla seletatav seemnepangast saadud liinide muteerimisprotsessi iseärasuste kaudu: mutantliinide saamisel pole välistatud, et lisaks soovitud geeni väljalülitusele muutub mittefunktsionaalseks ka mõni muu genoomi osa. Antud juhul paistab, et *ahl6-1* fenotüüpi ei põhjustanud *AHL6* geeni funktsiooni häirumine, kuna sama geeni mutant *ahl6-2* pole fenotüüpiliselt oluliselt erinev metsiktüübist. Seega on muutus suure tõenäosusega põhjustatud muust genoomi osast.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli selgitada välja, kas õhulõhe sulgrakkudes ja eellasrakkudes kõrgelt ekspresseeritud *AHL* geenid mõjutavad õhulõhede juhtivust või arengut. Uuriti valitud *AHL* geenide üksikmutante, kaardistades nende fenotüüpilisi erinevusi metsiktüübist.

Selles töös tehtud katsed näitasid statistiliselt olulist erinevust *ahl8* mutandi lehe ülemise külje õhulõhede juhtivuses võrreldes metsiktüübiga. Mutandi *ahl8* lehe ülemiste õhulõhede juhtivus oli oluliselt väiksem metsiktüüpi taime õhulõhede juhtivusest. Kuna *ahl8* õhulõhede tihedus ei olnud kummalgi lehepoolel oluliselt erinev metsiktüübist, peab erinevus juhtivuses tulenema erinevusest lehe ülemise külje õhulõhede avatuse regulatsioonis *ahl8* taimedes. Järgmise etapina tuleks kindlasti tõestada, et fenotüüp on põhjustatud *ahl8* mutatsioonist, mitte teistest genomsetest muteerimisprotsessiga kaasnevatest iseärasustest antud mutandis.

Nii massikaotuses kui ka õhulõhede tiheduse osas ei olnud uuritud *ahl* mutantide hulgas ühtegi silmapaistvat ega statistiliselt oluliselt metsiktüübist erinevat fenotüüpi. Kuna *AHL* geeniperekonna gene on müürloogas 29 ja nende funktsioonid on osaliselt kattuvad, siis on võimalik, et nende mõju õhulõhede arengule ei ole üksikmutantide puhul eristatav, kuna ühe geeni funktsiooni puudumist võib asendada mõni teine geeniperekonna liige. Sel põhjusel oleks huvitav teha katseid ka *AHL* geeniperekonna geenide mitmikmutantidega.

Statistiliselt metsiktüübist eristuv oli ka *ahl6-1* liini massikaotus, mis on huvitav, kuna sama geeni mutatsiooniga liin *ahl6-2* ei olnud statistiliselt oluliselt erinev metsiktüübist. Fenomen võib olla seletatav seemnepangast saadud liinide muteerimisprotsessi iseärasuste kaudu. Antud juhu paistab, et *ahl6-1* fenotüüpi ei põhjusta *AHL6* geeni funktsiooni häirumine, kuna sama geeni mutant *ahl6-2* pole fenotüüpiliselt oluliselt erinev metsiktüübist.

Kokkuvõttes oli sõeluuring edukas, sest leiti vähemalt üks häirunud õhulõhede funktsiooniga liin ja selle täiendav uurimine aitab mõista *AHL8* rolli taime ülemiste õhulõhede avatuse regulatsioonis ja ülemiste õhulõhede juhtivuse tähtsust taime veekaotuse ja süsihappegaasi omastamise mõjutajatena.

RESÜMEE

Analysis of the role of selected AHL genes in the regulation of stomatal conductance and development in *Arabidopsis thaliana*

Ott Rünkla

Summary

Gas exchange between the leaf and the atmosphere takes place through tiny openings on the surface of the leaf called stomata. Through stomata, carbon dioxide enters and water leaves the plant. Stomata are made of two paired guard cells. Between these two guard cells is a gap that can be opened and closed by the plant according to the conditions of the environment. To open the stomata, the turgor of two guard cells is raised by pumping ions into the cells. Keeping the stomatal aperture optimal is a key for plant survival and growth. If the stomata do not respond to the environment signals appropriately, it could easily mean death by dehydration for the plant. While stomatal signalling is rather well understood, gaps remain in understanding stomatal development and function.

The genes of the *AHL* gene family encode transcription factors that play an important role in plant stress response and regulation of development. In all land plant genomes that have been sequenced to date *AHL* genes have been found. The high conservation of the *AHL* genes suggests that their role in plant growth and development is important.

The experiments carried out in this paper aimed to test if *AHL* genes affect stomatal development or regulation. Experiments were carried out on *Arabidopsis thaliana*. Selected *ahl* mutants (picked for their high expression in guard cells and stomatal lineage cells) were grown alongside wild-type plants. Stomatal conductance, density, and leaf fresh weight loss were measured to address stomatal function and development in these mutants.

The results showed little statistical differences between the selected *ahl* mutants and wild-type Col-0. The most important difference was discovered in the comparison of *ahl8* and Col-0 upper leaf side stomatal conductance. The result showed that the mutant *ahl8* had reduced upper leaf side stomatal conductance. If confirmed to be caused by the deficient *AHL8* gene, this opens up very interesting research topics to be studied further, as differences between upper and lower leaf side stomatal regulation and their role in overall plant physiology are poorly understood.

TÄNUSÕNAD

Ma tahan tänada oma juhendajat. Aitäh Hanna, et sa tegid mu bakalaureusetöö nii meeldivaks, kui vähegi võimalik. Üheski ilmas ei vahetaks sind ühegi teise juhendaja vastu!

Ma tahan tänada Ludwig van Beethoven-it, sest ta kirjutas muu hulgas ka oma viienda sümfoonia, mis oma teise liikumisega taastas raskeil hetkeil minu usu maailma illu. Aitäh!

Ma tahan tänada oma vanemaid, sest nad on mulle siiani kinkinud minu näilise vabaduse. Nad tegid seda parimas usus ja see tegelikult pole nende süü, et ma vahel õnnetu olen. Aitäh!

Ma tahan tänada oma Kõige Kallimat Looma Miiat, sest tema aitas mind küll kõigist kõige rohkem oma lõputu hoole ja armastusega. Aitäh!

KIRJANDUSE LOETELU

Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796–815.

Assmann SM, Simoncini L, Schroeder JI. 1985. Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* **318**: 285–287.

Azoulay-Shemer T, Palomares A, Bagheri A, Israelsson-Nordstrom M, Engineer CB, Bargmann BOR, Stephan AB, Schroeder JI. 2015. Guard cell photosynthesis is critical for stomatal turgor production, yet does not directly mediate CO₂ - and ABA-induced stomatal closing. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **83**: 567–581.

Caine RS, Yin X, Sloan J, Harrison EL, Mohammed U, Fulton T, Biswal AK, Dionora J, Chater CC, Coe RA, et al. 2019. Rice with reduced stomatal density conserves water and has improved drought tolerance under future climate conditions. *New Phytologist* **221**: 371–384.

Caird MA, Richards JH, Donovan LA. 2007. Nighttime Stomatal Conductance and Transpiration in C₃ and C₄ Plants. *Plant Physiology* **143**: 4–10.

Farmer E, Farmer E, Mousavi S, Lenglet A. 2013. Leaf numbering for experiments on long distance signalling in *Arabidopsis*. *Protocol Exchange*.

Gambetta G, Herrera J, Dayer S, Feng Q, Hochberg U, Castellarin SD. 2020. The physiology of drought stress in grapevine: Towards an integrative definition of drought tolerance. *Journal of Experimental Botany* **71**.

Hara K, Kajita R, Torii KU, Bergmann DC, Kakimoto T. 2007. The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes & Development* **21**: 1720–1725.

Horrer D, Flütsch S, Pazmino D, Matthews JSA, Thalmann M, Nigro A, Leonhardt N, Lawson T, Santelia D. 2016. Blue Light Induces a Distinct Starch Degradation Pathway in Guard Cells for Stomatal Opening. *Current Biology* **26**: 362–370.

Jalakas, P. 2019. Unravelling signalling pathways contributing to stomatal conductance and responsiveness. Tartu.

Kanaoka MM, Pillitteri LJ, Fujii H, Yoshida Y, Bogenschutz NL, Takabayashi J, Zhu J-K, Torii KU. 2008. SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to *Arabidopsis* stomatal differentiation. *The Plant Cell* **20**: 1775–1785.

Keenan TF, Hollinger DY, Bohrer G, Dragoni D, Munger JW, Schmid HP, Richardson AD. 2013. Increase in forest water-use efficiency as atmospheric carbon dioxide concentrations rise. *Nature* **499**: 324–327.

Keller BU, Hedrich R, Raschke K. 1989. Voltage-dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *Nature* **341**: 450–453.

- Koornneef M, Meinke D. 2010.** The development of Arabidopsis as a model plant. *The Plant Journal* **61**: 909–921.
- Lake JA, Quick WP, Beerling DJ, Woodward FI. 2001.** Signals from mature to new leaves. *Nature* **411**: 154–154.
- LAZAR T. 2003.** Taiz, L. and Zeiger, E. Plant physiology. 3rd edn. *Annals of Botany* **91**: 750–751.
- Leakey ADB, Ainsworth EA, Bernacchi CJ, Rogers A, Long SP, Ort DR. 2009.** Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *Journal of Experimental Botany* **60**: 2859–2876.
- Lin G, Zhang L, Han Z, Yang X, Liu W, Li E, Chang J, Qi Y, Shpak ED, Chai J. 2017.** A receptor-like protein acts as a specificity switch for the regulation of stomatal development. *Genes & Development* **31**: 927–938.
- 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 (New York, N.Y.)* **324**: 1064–1068.
- MacAlister CA, Ohashi-Ito K, Bergmann DC. 2007.** Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature* **445**: 537–540.
- Machaj G, Grzebelus D. 2021.** Characteristics of the AT-Hook Motif Containing Nuclear Localized (AHL) Genes in Carrot Provides Insight into Their Role in Plant Growth and Storage Root Development. *Genes* **12**: 764.
- Meyer S, Mumm P, Imes D, Endler A, Weder B, Al-Rasheid KAS, 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: For Cell and Molecular Biology* **63**: 1054–1062.
- Mott KA, O’Leary JW. 1984.** Stomatal Behavior and CO₂ Exchange Characteristics in Amphistomatous Leaves 1. *Plant Physiology* **74**: 47–51.
- Mott KA, Sibbersen ED, Shope JC. 2008.** The role of the mesophyll in stomatal responses to light and CO₂. *Plant, Cell & Environment* **31**: 1299–1306.
- Nadeau JA, Sack FD. 2002.** Stomatal Development in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* **1**: e0066.
- 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**: 483–486.
- Ogburn RM, Edwards EJ. 2010.** Chapter 4 - The Ecological Water-Use Strategies of Succulent Plants. In: Kader J-C, Delseny M, eds. *Advances in Botanical Research*. Academic Press, 179–225.

- Ohashi-Ito K, Bergmann DC. 2006.** Arabidopsis FAMA controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development. *The Plant Cell* **18**: 2493–2505.
- Park S-Y, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow T-FF, et al. 2009.** Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science (New York, N.Y.)* **324**: 1068–1071.
- Pillitteri LJ, Sloan DB, Bogenschutz NL, Torii KU. 2007.** Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. *Nature* **445**: 501–505.
- Pillitteri LJ, Torii KU. 2012.** Mechanisms of stomatal development. *Annual Review of Plant Biology* **63**: 591–614.
- Rasband, W.S. 1997.** ImageJ.
- Rayapuram N, Jarad M, Alhoraibi HM, Bigeard J, Abulfaraj AA, Völz R, Mariappan KG, Almeida-Trapp M, Schlöffel M, Lastrucci E, et al. 2021.** Chromatin phosphoproteomics unravels a function for AT-hook motif nuclear localized protein AHL13 in PAMP-triggered immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118**: e2004670118.
- Sasaki T, Mori IC, Furuichi T, Munemasa S, Toyooka K, Matsuoka K, Murata Y, Yamamoto Y. 2010.** Closing plant stomata requires a homolog of an aluminum-activated malate transporter. *Plant & Cell Physiology* **51**: 354–365.
- Street IH, Shah PK, Smith AM, Avery N, Neff MM. 2008.** The AT-hook-containing proteins SOB3/AHL29 and ESC/AHL27 are negative modulators of hypocotyl growth in Arabidopsis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **54**: 1–14.
- Vask, H. 2021.** Õhulõhede tihedus, indeks ja juhtivus ABA signaalraja ja õhulõhede arengu mutantidel. Tartu.
- Wall S, Violet-Chabrand S, Davey P, Van Rie J, Galle A, Cockram J, Lawson T. 2022.** Stomata on the abaxial and adaxial leaf surfaces contribute differently to leaf gas exchange and photosynthesis in wheat. *New Phytologist* **235**: 1743–1756.
- Wang Y, Noguchi K, Terashima I. 2008.** Distinct light responses of the adaxial and abaxial stomata in intact leaves of *Helianthus annuus* L. *Plant, Cell & Environment* **31**: 1307–1316.
- Willmer C, Fricker M. 1996.** *Stomata Chapman and Hall London. UK.*
- Woodward FI. 1987.** Stomatal numbers are sensitive to increases in CO₂ from pre-industrial levels. *Nature* **327**: 617–618.
- Yera R, Davis S, Frazer J, Tallman G. 1986.** Responses of Adaxial and Abaxial Stomata of Normally Oriented and Inverted Leaves of *Vicia faba* L. to Light. *Plant Physiology* **82**: 384–389.
- Zhao J, Favero DS, Peng H, Neff MM. 2013.** Arabidopsis thaliana AHL family modulates hypocotyl growth redundantly by interacting with each other via the PPC/DUF296 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: E4688–4697.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Ott Rünkla,

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

Sõeluuring valitud AHL geenide rolli selgitamiseks hariliku müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) õhulõhede juhtivuse ja arengu regulatsioonis,

mille juhendaja on Hanna Hõrak,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Ott Rünkla

29.05.2023