

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Mariia Voloshina**

Rostlinná kutikula

Plant cuticle

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.

Praha, 2021

**Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat své školitelce RNDr. Kateřině Schwarzerové, Ph.D za ochotu, připomínky a trpělivost. Zejména proto, že jsem se rozhodla psát tuto práci v češtině, která za tři roky bakalářského studia nepřestala být pro mě cizí. Mohlo to být velkou komplikací, ale snad nebylo. Poděkování rovněž patří mé rodině a všem mým kamarádům, kteří mě na této cestě podporovali.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne, 6.5.2021

Podpis

## **Abstrakt**

Kutikula je lipidickou strukturou pokrývající nadzemní rostlinné orgány, která poskytuje rostlině mechanickou pevnost a slouží jako ochranná bariéra. Skládá se především z polyesteru kutinu a vosků, odvozených z velmi dlouhých mastných kyselin. Vznikají ve dvou na sobě nezávislých biosyntetických dráhách. Kutikulární biosyntetický aparát je velice složitý a využívá velké množství enzymů, které mohou mít redundantní funkce, mohou se vyskytovat ale v odlišných pletivech nebo mohou využívat substráty různých délek. Mechanismy transportu monomerů kutinů a vosku a organizace kutikuly závisí na aktivitě ABC přenašečů, lipidových přenašečových proteinech LTP, kutin syntázách a kutinzomech. Znalosti o těchto dynamických procesech jsou fragmentární a dosud nebyly integrovány do většího buněčného kontextu. Bylo rovněž naznačeno těsné spojení mezi kutikulou a polysacharidovou buněčnou stěnou, které byly dosud vnímané jako dvě nezávislé entity. Složitost těchto dějů odráží i přísná regulace na transkripční a posttranskripční úrovni. Klíčovými regulátory vzniku kutikuly během vývoje rostliny jsou transkripční faktory SHINE, MIXTA-like a protein CFL1 s WW-doménou, zatímco při odpovědi rostliny na abiotický stres jsou důležité ABA-dependentní MYB transkripční faktory. Recentní výzkum také ukazuje, že může syntéza kutikuly může oscilovat během dne. Tato práce má za cíl shrnout recentní poznatky o komplexních mechanismech vzniku kutikuly.

**Klíčová slova:** Rostlinná kutikula, epidermis, biosyntéza, kutin, vosky

## **Abstract**

The cuticle is a lipidic structure covering plant aerial organs, providing mechanical rigidity and acting as a protective barrier. It contains the cutin polyester and waxes, which are derived from very-long-chain fatty acids. These compounds are synthesised in two separate pathways. The cuticular biosynthetic machinery is incredibly complex and employs a multitude of enzymes, some of which are functionally redundant, are present in different tissues or catalyse reactions with substrates of various chain lengths. The mechanisms of how these compounds are transported and how the cuticle is assembled rely on ABC transporters, LTP lipid carrier proteins, cutin synthases, and cutinsomes. Knowledge of these highly dynamic processes is very fragmented and the integrated model of cutin synthesis is yet to be elucidated. A tight connection between the cuticle and the cell wall, conventionally seen as two separate entities, has also been implied. The complexity of these mechanisms is also reflected in their transcriptional and post-transcriptional regulation. While SHINE and MIXTA-like transcriptional factors and the WW-domain protein CFL1 regulate the cuticle's synthesis throughout a plant's development, ABA-dependent MYB transcriptional factors are important during abiotic stress. Recent research also shows that the cuticle's regulation might follow the diurnal cycle. This work aims to review the recent progress made in understanding of these complex mechanisms.

**Key words:** Plant cuticle, epidermis, biosynthesis, cutin, waxes

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Biosyntéza kutikuly</b> .....	<b>2</b>
2.1	Aktivace mastných kyselin.....	2
2.2	Syntéza monomerů kutinu.....	3
2.2.1	$\omega$ -hydroxylace .....	4
2.2.2	Hydroxylace uvnitř řetězce.....	4
2.2.3	Syntéza dikarboxylových kyselin.....	5
2.2.4	Esterifikace .....	6
2.3	Syntéza vosků.....	6
2.3.1	Elongace .....	7
2.3.2	Alkoholová dráha .....	10
2.3.3	Alkanová dráha.....	11
<b>3</b>	<b>Sekrece kutikuly</b> .....	<b>12</b>
3.1	Intracelulární transport .....	12
3.2	ABCG přenašeče .....	13
3.3	LTP.....	14
3.4	Polymerizace kutinu .....	16
3.5	Kutinomy .....	17
<b>4</b>	<b>Regulace vývoje kutikuly</b> .....	<b>19</b>
4.1	Transkripční regulace .....	19
4.1.1	SHINE transkripční faktory.....	20
4.1.2	MIXTA-like.....	21
4.1.3	CFL1 .....	22
4.1.4	ABA regulace .....	22
4.1.5	MYB30 .....	23
4.1.6	Cirkadiální rytmicita.....	23
4.1.7	Histonové modifikace.....	24
4.1.8	Posttranskripční regulace.....	24
<b>5</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>25</b>
	<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>26</b>

## Seznam zkratek

2-MAG	2- monoacylglycerol
ABA	abscisic acid, kyselina abscisová
ABCG	G podrodina ATP-binding cassette přenašečů
AP2/ERF	APETALA2/ethylene responsive factor
BDG	BODYGUARD
C16, C18	kyselina palmitová, kyselina stearová; číslo je počet uhlíků
CEPs	cuticle-embedded polysaccharides
CER	ECERIFERUM
CESA	cellulose synthase, celulózasyntáza
CFL1	CURLY FLAG LEAF1
CFLAP	CFL1 associated protein
CL	cuticular layer, kutinizovaná vrstva buněčné stěny
CP	cuticle proper, kutikula samotná
CUS	CUTIN SYNTHASE, kutinsyntáza
CYP	cytochrom P450
DCR	DEFECTIVE IN CUTICULAR RIDGES
DEWAX	DECREASE WAX BIOSYNTHESIS
ECH	ECHIDNA
AtEH1	EPOXIDE HYDROXYLASE1 u <i>Arabidopsis thaliana</i>
ER	endoplazmatické retikulum
FAE	fatty acid elongase, elongáza mastných kyselin, elongační komplex
FDH	FIDDLEHEAD
GCN	GENERAL CONTROL NON-REPRESSED PROTEIN
GFP, YFP	green/yellow fluorescent protein, fluorescentní protein
GNL1	GNOM-LIKE1
GPAT	glycerol-3-fosfát acyltransferáza
GPI	glykofosfatidylinositol
HDG1	homeodomain GLABRA 2-like protein 1
HTH	HOTHEAD
HUB	HISTONE MONOUBIQUITINATION
KCS	3-ketoacylsyntáza
KCR	β-ketoacylreduktáza
L1	layer 1, epidermální vrstva apikálního meristému
LACS	long-chain acyl-CoA synthetase, acyl-CoA-syntetáza
LCR	LACERATA
LTP, LTPG	lipid transfer protein; G znamená, že nese GPI-kotvu.
MAH1	midchain acyl hydroxylase1; acylhydroxyláza, působí uprostřed řetězce
MIEL1	MYB30-INTERACTING E3 LIGASE 1
ONI3	ONION3
PAS2	PASTICCINO2
PM	plazmatická membrána
RAP 2.4	RELATED TO APETALA 2.4
SDG	SET DOMAIN GROUP
SHN	SHINE
SKI	SUPERKILLER
SLC	split luciferase assay
SPL9	SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE
WSD1	syntáza voskových (wax) esterů/diacylglycerolacyltransferáza 1

## 1 Úvod

Při přechodu na souš se rostliny setkaly s rizikem desikace, větší intenzitou UV záření a potřebou mechanické podpory. Jedním z řešení těchto problémů je hydrofobní kutikula, deponovaná na povrch epidermis. Recentní práce nabízejí pohled do její rané evoluce. Homology mnoha genů, spojených se vznikem kutikuly, najdeme i u řas – je ale zřejmé, že zde plní jinou funkci (Kong et al., 2020). Rovněž se zjistilo, že genetické vybavení mechorostů, které kutikulu mají, je pestřejší, a je zase patrná homologie s cévnatými rostlinami. Proto se zdá, že kutikula je velice ancestrální struktura, kterou mohl mít společný předek všech terestrických rostlin (Kong et al., 2020).

Otázka, co kutikula je a z čeho se skládá, je však předmětem diskuze. V 19. století byla rostlinná kutikula definovaná jako struktura nezávislá na polysacharidech buněčné stěny a skládající se z viditelných vrstev (von Mohl 1847 dle Fernández et al., 2016). Později byly tyto jednotlivé vrstvy definované: vnější vrstva, obsahující epikutikulární vosky; kutikula samotná (CP, cuticle proper); kutinizovaná vrstva buněčné stěny (CL, cuticular layer), kterou také lze rozlišit na vnější a vnitřní (Wattendorff a Holloway, 1980). Kutikula samotná obsahuje polyester kutin, skládající se převážně z hydroxylovaných C16 a C18 mastných kyselin, což jedním z prvních popsal Matic, 1956. V malém počtu byly nalezeny fenolické látky (Riley a Kolattukudy, 1975) a glycerol (Graça et al., 2002). V posledních letech se objevují práce, zdůrazňující význam polysacharidové složky kutikuly a interpretující ji jako nehomogenní lipidickou složku buněčné stěny (Fernández et al., 2016). Následující text se však bude držet konvenční klasifikace a bude se věnovat jen nejznámějším složkám kutikuly: kutinu a vrstvě epikutikulárních vosků, jejichž biosyntetické dráhy jsou na sobě nezávislé.

Je zřejmé, že mechanismy vzniku kutikuly jsou velice složité. První studie ze druhé poloviny 20. století se zabývají biochemií kutikuly: jaké jsou monomery kutinu a složky vrstvy epikutikulárních vosků, a jaké reakce k jejich syntéze vedou. Tyto poznatky byly rozšířeny prací s mutanty. Byla popsána celá sada *eceriferum* (*cer*) mutantů *Arabidopsis thaliana* s narušenou vrstvou epikutikulárních vosků (Koornneef et al., 1989; McNevin et al., 1993). Na základě popisu jejich fenotypů byl sestaven první kompletní model biosyntézy epikutikulárních vosků, který platí i dodnes (Jenks et al., 1995). Během posledních dvaceti let byla identifikovaná většina *cer* genů, jejichž produkty plní biosyntetické, transportní nebo regulační role. Později došlo i k identifikaci genů, spojených s biosyntézou kutinu. Nejdéle známým biosyntetickým genem je *lacerata* (*lcr*) kódující cytochrom P450 CYP86A8 (Wellesen et al.,

2001). Genů spojených s biosyntézou kutinu bylo popsáno mnohem méně, ale jejich seznam se neustále zvětšuje. V posledních letech rovněž přibývají práce, které se zabývají nejen biosyntézou kutikuly, ale i transportem jejích složek do buněčné stěny a transkripční regulací, čímž zapojují její vývoj do většího buněčného a ontogenetického kontextu. Většina současných poznatků pochází z *Arabidopsis*, ale šíří se využití nových modelových organismů, u kterých lze mechanismy vzniku kutikuly studovat. Nejdůležitějším modelovým organismem je rajče, u kterého byl popsán mechanismus polymerizace kutinu (Yeats et al., 2014).

Cílem této práce je shrnout poznatky o molekulárních mechanismech vzniku kutikuly, převážně její biosyntézy, na příkladě modelového organismu *Arabidopsis thaliana*. Občas se bude tato práce obracet i k jiným modelovým organismům. Bude také pojednáno o hypotézách, jak mohou být složky kutikuly sekretované na povrch buněčné stěny; kde, kdy a jak dochází k polymeraci kutinu. Poslední kapitola se věnuje klíčovým regulačním modulům, zodpovědným za centrální transkripční regulaci vývoje kutikuly během ontogeneze a stresové odpovědi.

## 2 Biosyntéza kutikuly

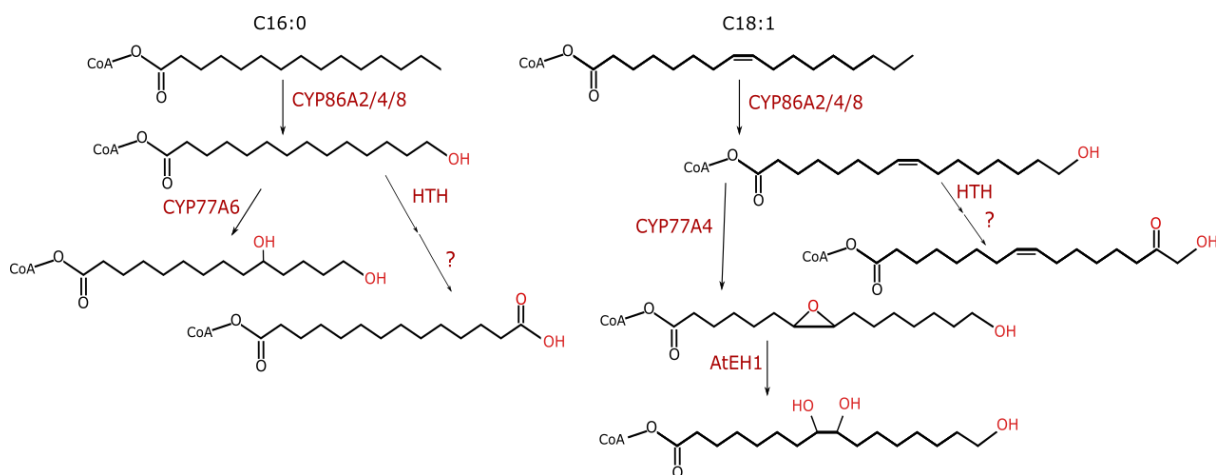
### 2.1 Aktivace mastných kyselin

Předpokládá se, že C16 a C18 mastné kyseliny, transportované z plastidu do endoplazmatického retikula (ER), jsou následně aktivované navázáním koenzymu A (CoA) za vzniku acyl-CoA (Schnurr et al., 2004). Aktivaci v biosyntetické dráze kutikuly katalyzují enzymy LACS1 (long-chain acyl-CoA synthetase 1) (Lü et al., 2009), LACS2 (Schnurr et al., 2004) a LACS4 (Zhao et al., 2019). Ví se, že tyto enzymy jsou lokalizovány v ER (Weng et al., 2010; Jessen et al., 2015). Společným znakem jejich mutantů je výrazně snížený obsah kutinu a vrstvy epikutikulárních vosků (Schnurr et al., 2004; Bessire et al., 2007; Lü et al., 2009; Zhao et al., 2019). LACS1 a LACS2 jsou funkčně redundantní: *lacs1* a *lacs2* jsou postižené méně než dvojitý mutant *lacs1 lacs2* (Lü et al., 2009). Nicméně u *lacs1* byla pozorovaná akumulace C18 monomerů, ke které u *lacs2* nedochází. Z toho plyne, že má LACS1 afinitu k C16 prekurzorům, zatímco substrátem LACS2 mohou být C16 i C18 mastné kyseliny (Lü et al., 2009). Vliv LACS4 na kutikulu je méně jasný, ale předpokládá se, že aktivuje mastné kyseliny podobně, jako LACS1 a LACS2. Trojitý mutant *lacs1 lacs2 lacs4* má nejnižší obsah kutinu a vosků ze všech *lacs* mutantů. Otázkou zůstává, proč je trojitý mutant tak ovlivněn, zatímco *lacs4* nebo dvojité mutanty nikoli (Zhao et al., 2019).

## 2.2 Syntéza monomerů kutinu

Prekurzory kutinu jsou C16 a C18 mastné kyseliny, syntetizované *de novo* v plastidech a aktivované navázáním CoA. Lokalizace následujících reakcí je diskutabilní: je velice rozšířená představa, že všechny tyto reakce probíhají v lumen ER. Ilustrativní je např. přehledový článek Pollard et al., 2008. Tato představa plyne ze starších prací, ve kterých biosyntetické reakce jsou asociované s mikrozomy (Soliday a Kolattukudy, 1977), což jsou artefakty derivované z ER (Palade a Siekevitz, 1956). Ve skutečnosti pouze jeden biosyntetický enzym byl nalezen v ER pomocí zeleného fluorescentního proteinu (green fluorescent protein, GFP) (Gidda et al., 2009). Existuje alternativní hypotéza o lokalizaci biosyntézy kutinu na cytosolické straně membrány ER (Pineau et al., 2017), o které bude pojednáno v kapitole 2.2.2, ale je poměrně nová. Nelze proto říct, že existuje jedinečný, empirickými daty podpořený názor na prostorové uspořádání biosyntézy kutinu.

Hydroxylace  $\omega$ -konce je první reakce, sdílená všemi prekurzory (Kolattukudy a Walton, 1972). Další kroky se liší pro nasycené a nenasycené mastné kyseliny. Nasycené C16 prekurzory jsou dále hydroxylovány za vzniku 10,16-dihydropalmitové kyseliny (Walton a Kolattukudy, 1972). U nenasycených C18 prekurzorů se na místě dvojnás vazby tvoří epoxidová skupina, která může být následně hydroxylována za vzniku kyseliny 9,10,18-trihydroxystearové (Croteau a Kolattukudy, 1974). Alternativou těchto dvou drah je syntéza karboxylové skupiny na hydroxylovaném  $\omega$ -konci za vzniku dikarboxylové kyseliny (Kurdyukov et al., 2006a). Průběh biosyntézy prekurzorů kutinu znázorňuje **obr. 1**. Společný pro tyto tři dráhy je tvorba 2-monoacylglycerolů (2-MAG), což je poslední krok syntézy.



**Obrázek 1:** Přehled jednotlivých modifikací C16 a C18 prekurzorů kutinu. CYP, cytochrom P450. HTH, HOTHHEAD. AtEH1, EPOXIDE HYDROXYLASE1. Vytvořeno pomocí Inkscape.

### 2.2.1 $\omega$ -hydroxylace

$\omega$ -hydroxylaci mastných kyselin v biosyntetické dráze kutinu katalyzují tři enzymy: CYP86A8 (Wellesen et al., 2001), CYP86A2 (Xiao et al., 2004) a CYP86A4 (Li-Beisson et al., 2009). Jsou to cytochromy P450 a patří k podrodině CYP86A, která u huseníčku zahrnuje 5 paralogů (Duan a Schuler, 2005). Většina známých eukaryotických CYP jsou proteiny s transmembránovou doménou, asociující s membránou ER, což je shrnuto např. Graham-Lorence a Peterson, 1996. O podrodině CYP86A se to přesně neví. Co se týče ostatních paralogů z podrodiny CYP86A, CYP86A1 se exprimuje pouze v kořeni a je klíčovým hráčem ve vzniku suberinu (Höfer et al., 2008). Význam CYP86A7, k jehož expresi většinou dochází v květu, stonku a šešulce (Duan a Schuler, 2005), nebyl doposud demonstrován. CYP86A7 má *in vitro* nejmenší afinitu k C18 prekurzorům kutinu, a jeho odhadovaná struktura usnadňuje navázání kratších mastných kyselin, které se v kutikule nevyskytují (Rupasinghe et al., 2007). Je regulován stejně jako CYP86A4 a některé geny biosyntézy vosků (Kannangara et al., 2007), což však ukazuje na roli v syntéze kutikuly jenom nepřímo.

CYP86A2, CYP86A4 a CYP86A8 jsou schopné vázat stejný substrát, i když *in vitro* k němu vykazují odlišnou afinitu (Rupasinghe et al., 2007). Výjimkou jsou kyseliny 9,10-epoxystearová a 9,10-dihydroxystearová, které dokážou vázat pouze CYP86A2 a CYP86A4, i když ke katalýze nedochází kvůli velké vzdálenosti  $\omega$ -konce od katalytického místa (Rupasinghe et al., 2007). Liší se exprese těchto enzymů: CYP86A2 a CYP86A8 jsou exprimovány ve všech pletivech, zatímco CYP86A4 není exprimován v listech a kořeni (Duan a Schuler, 2005). Konzervovaná primární sekvence a struktura aktivního místa a další již výše uvedené podobnosti naznačují funkční redundanci (Duan a Schuler, 2005; Rupasinghe et al., 2007), což však zatím nebylo detailně popsáno.

### 2.2.2 Hydroxylace uvnitř řetězce

Hydroxylaci nasycených C16 monomerů katalyzuje CYP77A6, což ukázala práce Li-Beisson et al., 2009. Kutikula mutanta *cyp77a6* neobsahuje žádnou 10,16-dihydropalmitovou kyselinu, ale má zvýšený obsah kyseliny 16-hydroxypalmitové a 1,16-dikarboxypalmitové. Biochemická funkce CYP77A6 byla zároveň demonstrována *in vitro*. Je proto zřejmé, že plní v biosyntéze nasycených monomerů kutinu roli hydroxylázy (Li-Beisson et al., 2009).

Mechanismus hydroxylace nenasycených C18 monomerů je odlišný. Dvojná vazba je epoxylována a poté hydroxylována. Produkty těchto dvou reakcí jsou kyseliny 18-hydroxy-9,10-epoxystearová a 9,10,18-trihydroxystearová (Croteau a Kolattukudy, 1974).

Předpokládalo se, že se na epoxylaci mastných kyselin podílí cytochrom P450 (Croteau a Kolattukudy, 1975), ale první konkrétní kandidát na tuto roli, CYP77A4, byl popsán mnohem později (Sauveplane et al., 2009). Nedávno se potvrdil význam CYP77A4 pro kutikulu, ale pouze v embryích (Kawade et al., 2018). Kutikula embrya *cyp77a4-3* je propustnější pro barvivo než kutikula normální rostliny, což ukazuje na změny jejího obsahu. Dospělá pletiva se nezbarvila (Kawade et al., 2018) Není zatím znám enzym, který katalyzuje epoxylaci C18 prekurzorů u dospělé rostliny.

Druhý krok je katalyzován epoxid hydroxylázou. Nedávno byl popsán enzym, který tuto funkci plní, rozpustný protein EPOXIDE HYDROXYLASE1 (AtEH1) (Pineau et al., 2017). Substrátem pro AtEH1 *in vitro* je produkt reakce, katalyzované enzymem CYP77A4 – kyselina 18-hydroxy-9,10-epoxystearová (Pineau et al., 2017). AtEH1 rovněž vykazuje koexpresi s CYP77A4 a CYP86A8, což je dalším důkazem, že jsou ve stejné biosyntetické dráze. Důkazy jsou i na úrovni fenotypu: mutantní *ateh1* rostliny mají zvýšený obsah epoxylovaných monomerů kutinu a snížený obsah trihydroxy mastných kyselin (Pineau et al., 2017).

Zajímavým poznatkem je cytosolická lokalizace AtEH1 (Pineau et al., 2017). Jak bylo zmíněno výše, rozšířená je představa, že biosyntéza kutinu probíhá v lumen ER. Autoři spekulují, že syntéza monomerů kutinu probíhá v metabolomu na cytosolické straně membrány ER, nikoliv v lumen ER. Zprostředkovat sestavení metabolomu by mohly do membrány zakotvené cytochromy P450 (Pineau et al., 2017). To bylo pozorováno u jiných zástupců této nadrodiny (Bassard et al., 2012). Nicméně důkazy existence podobného cytosolického metabolomu, syntetizujícího kutin, jsou nepřímé.

### 2.2.3 Syntéza dikarboxylových kyselin

Alternativní drahou pro  $\omega$ -hydroxykyseliny může být syntéza druhé karboxylové skupiny. Dikarboxylové kyseliny nejsou pro rostlinné kutikuly běžné, nicméně jsou podstatnou složkou kutikuly huseníčku (Bonaventure et al., 2004). Mechanismus jejich vzniku u rostlin byl popsán u lilku bramboru *Solanum tuberosum* ve spojení s metabolismem suberinu (Agrawal a Kolattukudy, 1977). Zahrnuje dva kroky: dehydrogenaci  $\omega$ -konce a dehydrogenaci vzniklé oxokyseliny. Kurdyukov et al., 2006a předpokládají, že mechanismus vzniku dikarboxylových kyselin v kutikule je podobný. Popsali  $\omega$ -alkoholdehydrogenázu HOTHEAD (HTH), která by mohla katalyzovat první krok. Kutikula mutantů *hth* obsahuje méně karboxylových kyselin než kutikula normálních rostlin (Kurdyukov et al., 2006a). *Arabidopsis* má 7 příbuzných HTH genů (Krolikowski et al., 2003), ale jejich funkce není známá. U rýže byl objeven ortolog HTH,

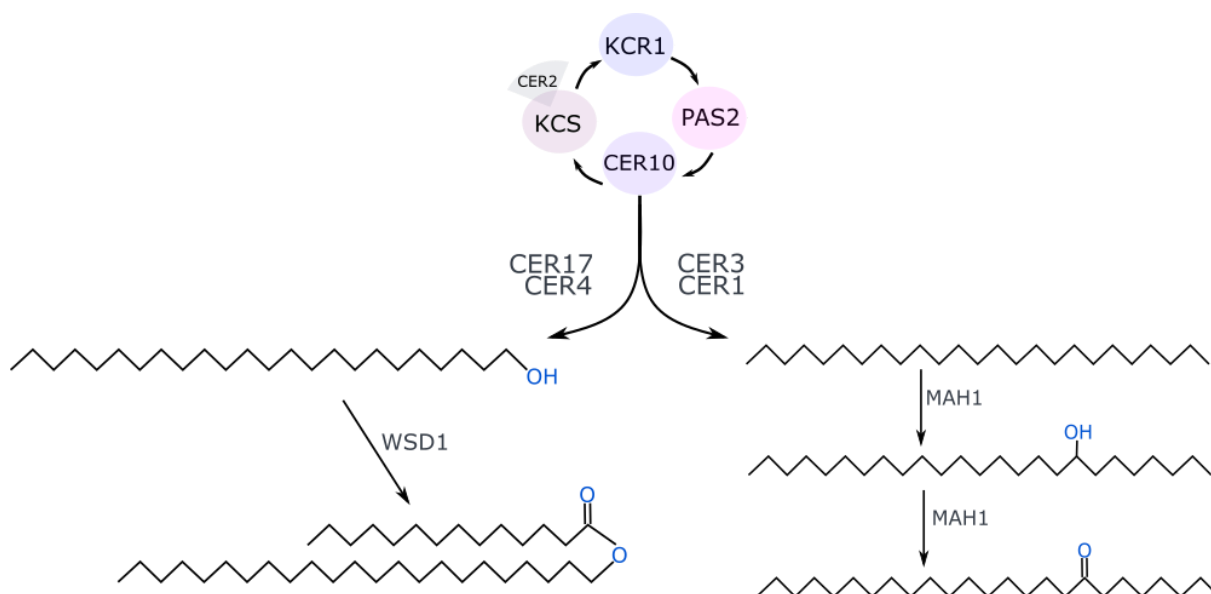
ONION3 (ONI3) (Akiba et al., 2013). HTH se exprimuje v protodermis a epidermis, ONI3 pouze v protodermis (Kurdyukov et al., 2006a; Akiba et al., 2013). Mutant *oni3* je letální, *hth* nikoli. ONI3 může hrát větší roli ve vývoji rýže než HTH u huseníčku (Akiba et al., 2013). Dalším homologem u rýže je oxidoreduktáza HTH1, k jejíž expresi dochází v epidermis prašníků (Xu et al., 2017). Enzym, katalyzující druhý krok syntézy dikarboxylových kyselin, dehydrogenaci, nebyl zatím popsán.

#### 2.2.4 Esterifikace

Přijímaný model je, že monomery kutinu jsou polymerizované v podobě 2-MAG (Yeats et al., 2012). Vznikají acylací glycerol-3-fosfátu, kterou katalyzují enzymy GPAT4 (glycerol-3-phosphate acyltransferase), GPAT6 a GPAT8 (Li et al., 2007; Li-Beisson et al., 2009; Yang et al., 2010). O těchto enzymech se rozhodně ví, že jsou to transmembránové proteiny, lokalizující na membráně ER (Zheng et al., 2003; Gidda et al., 2009; Waschburger et al., 2018). Dvojitý mutant *gpat4 gpat8* měl ovlivněnou kutikulu listů a stonků: byl u něj zaznamenán snížený obsah kutinu (Li et al., 2007). Samostatné *gpat4* a *gpat8* mutanty natolik postižené nebyly, takže se role těchto dvou enzymů v biosyntéze kutinu překrývají. U mutantu *gpat6* snížený obsah kutinu byl pozorován především v květech (Li-Beisson et al., 2009)

### 2.3 Syntéza vosků

C16 a C18 mastné kyseliny jsou prekurzory nejen kutinu, ale i epikutikulárních vosků. Ne všechny složky této vrstvy jsou vosky – nejsou estery. Společným znakem těchto sloučenin je přítomnost dlouhého řetězce, většinou 25 až 35 uhlíků (Jenks et al. 1995). Tento dlouhý řetězec vzniká činností elongačního komplexu FAE (fatty acid elongase). Enzymy, ze kterých se FAE skládá, byly lokalizovány na membránách ER pomocí fúze proteinů GFP (Joubès et al., 2008). Po elongaci se prekurzory účastní jedné ze dvou drah: alkanové a alkoholové (Jenks et al., 1995). V alkoholové dráze vznikají vosky *sensu stricto*. Produkty alkanové dráhy jsou alkany, sekundární alkoholy a ketony (Jenks et al., 1995). Tyto dvě dráhy se také odehrávají v ER, což je podpořeno lokalizací biosyntetických enzymů pomocí fluorescence, viz dále. Biosyntetickou dráhu epikutikulárních vosků znázorňuje **obr.2**.



**Obrázek 2:** Přehled biosyntézy složek vrstvy epikutikulárních vosků. CER, ECERIFERUM. KCS, 3-ketoacylsyntáza. KCR,  $\beta$ -ketoacylreduktáza. PAS2, PASTICCINO2. MAH1, midchain alkane hydroxylase 1. WSD1, wax ester synthase/diacylglycerol acyltransferase 1. Vytvořeno pomocí Inkscape.

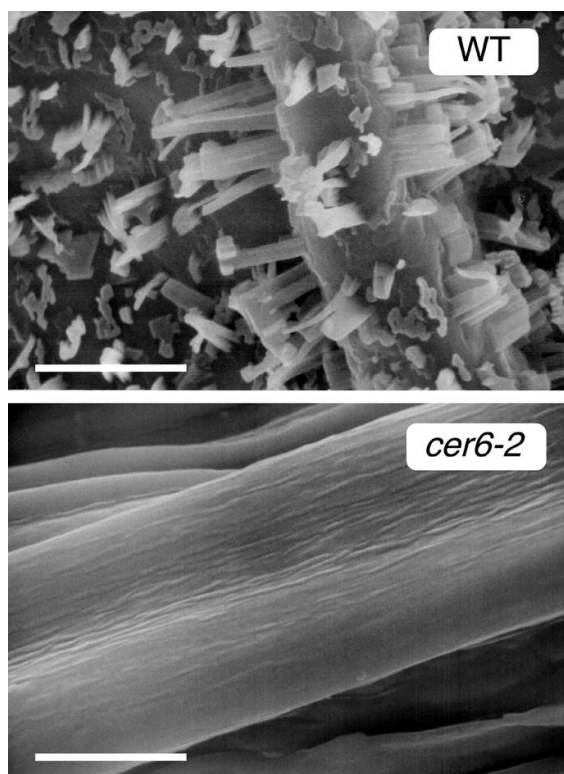
### 2.3.1 Elongace

Mechanismus elongačního cyklu vosků v ER byl poprvé nalezen u živočichů (Nugteren 1965), ale mnohem později byl v dokonalosti popsán i u rostlin (Fehling a Mukherjee, 1991). Cyklus zahrnuje čtyři reakce: **kondenzace** acyl-CoA a malonyl-CoA za vzniku  $\beta$ -ketoacyl-CoA, **redukce** na  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA, **dehydratace** za vzniku trans-2-enoyl-CoA a **redukce** (Fehling a Mukherjee, 1991). Produktem jednoho cyklu je mastná kyselina v podobě acyl-CoA, která má o dva uhlíky navíc (Nugteren, 1965).

#### 2.3.1.1 Kondenzace

Kondenzace, katalyzovaná 3-ketoacylsyntázami (KCS), je limitujícím krokem elongačního cyklu, ovlivňujícím délku výsledné mastné kyseliny a její množství (Millar a Kunst, 1997). Dochází ke kondenzaci acyl-CoA, kde acylovou skupinou je budoucí mastný řetězec určité délky, a malonyl-CoA, který je zdrojem dvou uhlíků. Proto je výsledný produkt elongačního cyklu delší o dva uhlíky. Tomu, jak je tento krok důležitý, odpovídá velký počet KCS – 21 paralogů u *Arabidopsis* – a velká variabilita jejich exprese v různých pletivech v odlišných vývojových stádiích (Joubès et al., 2008). Zatímco KCS jsou specifické pro různé biosyntetické dráhy a substráty, ostatní složky FAE jsou univerzální a jejich mutace mají pleiotropní efekty, zásadně ovlivňující morfogenezi rostliny.

Nejdéle známé KCS, podílející se na syntéze vosků, jsou KCS6/CER6 (Millar et al., 1999; Fiebig et al., 2000), KCS1 (Todd et al., 1999) a KCS10/FIDDLEHEAD (FDH) (Yephremov et al., 1999; Pruitt et al., 2000). Mutant *cer6* byl poprvé popsán spolu s dalšími *cer* mutanty, jejichž společným znakem je postižení vrstvy epikutikulárních vosků (Koornneef et al., 1989). Mutant *cer6* má charakteristický lesklý fenotyp, způsobený absencí krystalů epikutikulárních vosků na povrchu epidermis stonku, který je znázorněn na **obr. 3** (Koornneef et al., 1989; Millar et al., 1999). Listy, květy a plody *cer6* mutantů vrstvu epikutikulárních vosků zachovávají (Millar et al., 1999), i když v nich také dochází k expresi CER6 (Hooker et al., 2002). CER6 je totiž klíčový pro syntézu vosků ve stoncích, kdežto v jiných pletivech se jeho funkce překrývá



**Obrázek 3:** Skenovací elektronová mikrofotografie stonků rostlin divokého typu (horní) a *cer6-2* (dolní). Měřítko 5  $\mu\text{m}$ . Převzato z Fiebig et al., 2000.

s jinými KCS, hlavně s KCS1 (Todd et al., 1999) a FDH (Yephremov et al., 1999; Pruitt et al., 2000). Unikátním pro mutantní fenotyp *fdh* je to, že dochází k adhezi epidermálních buněk květů a listů (Lolle et al., 1992; Yephremov et al., 1999). Tyto enzymy KCS se liší nejen místem exprese, ale i afinitou k substrátu *in vitro*. Substrátem CER6 *in vitro* jsou mastné acyl-CoA délkou C16 až C24 (Millar et al., 1999), KCS1 C16 až C20 (Blacklock a Jaworski, 2006). Aktivita FDH *in vitro* zatím nebyla popsána. Z toho také plyne, že CER6 sama o sobě vytváří C26 prekurzory. Při tvorbě vosků s délkou C28 a víc dochází k interakci CER6 s CER2, CER2-LIKE1 nebo CER2-LIKE2 acyltransferázami (Haslam et al., 2012; Pascal et al., 2013; Haslam et al., 2015). O jejich spolupráci svědčí to, že u kvasinek, exprimujících CER6 ale neexprimujících CER2 a CER2-LIKE enzymy,

nedochází k syntéze delších mastných kyselin (Haslam et al., 2015), a že se delší vosky neakumulují na povrchu kutikuly mutantů s nefunkčními acyltransferázami (Pascal et al., 2013; Haslam et al., 2015). CER2 geny jsou odlišně exprimovány: CER2 je převažující v epidermis stonku, zatímco v listech se jeho aktivita překrývá s aktivitou CER2-LIKE1 (Haslam et al., 2012; Pascal et al., 2013). CER2-LIKE2 se může spolu s CER2 podílet na tvorbě sporopoleninu a kutikuly květních orgánů (Haslam et al., 2015). Mechanismus interakce CER6 a CER2

enzymů nebyl zatím dostatečně objasněn. Nadto se neví, jestli s těmito acyltransferázami interagují i jiné enzymy KCS, kromě CER6.

Dalšími enzymy KCS, ovlivňujícími stavbu kutikuly, jsou KCS20 a KCS2/DAISY (Lee et al., 2009a). Snížený obsah epikutikulárních vosků má dvojitý mutant *kcs20 kcs2/daisy-1*, což svědčí o jejich možné spolupráci. Na rozdíl od ostatních kutikulárních KCS se KCS20 a KCS2/DAISY uplatňují i v jiných biosyntetických drahách, např. suberinu. Kromě toho byla nedávno popsána role KCS16 v syntéze C36 a C38 vosků v trichomech (Hegebarth et al., 2017). *Z in vitro* pokusů rovněž bylo zřejmé, že substrátem pro KCS16 jsou C34 až C36 mastné kyseliny.

### 2.3.1.2 Redukce $\beta$ -ketoacyl-CoA

Druhým krokem elongace mastných kyselin je redukce výsledné  $\beta$ -ketoacyl-CoA. U kvasinek tuto reakci katalyzuje enzym YBR159w (Beaudoin et al., 2002), a *Arabidopsis* má dva homologní enzymy: KCR1 ( $\beta$ -ketoacyl reductase 1) a KCR2 (Beaudoin et al., 2009). Homozygotní mutace *kcr1* je letální ve stadiu embrya, takže je tento enzym pro jeho vývoj esenciální. Pomocí metod RNA interference byl popsán fenotyp dospělé rostliny, u které dochází k potlačení exprese KCR1. Transformované rostliny měly typický lesklý fenotyp a abnormální morfologii trichomů a epidermis listů, spojené s absencí vrstvy epikutikulárních vosků. Mutace KCR1 má pleiotropní efekty: kromě kutikulárních vosků, měly mutanty i jiný obsah sfingolipidů, triacylglycerolů v semenech a glycerolipidů v kořenech. Fenotyp *kcr2* se od rostliny divokého typu nelišil a doposud není známá funkce KCR2, ale je zřejmé, že není esenciální a redukčního kroku FAE se během biosyntézy kutikuly neúčastní (Beaudoin et al., 2009).

### 2.3.1.3 Dehydratace

V předchozím kroku vzniklý  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA je dehydratován acyl-CoA-dehydratázou PASTICCINO2 (PAS2) (Bach et al., 2008). Mutant s oslabenou expresí PAS2 má srostlé listy a květní orgány, podobně jako *fdh*, ale, na rozdíl od ostatních mutantů, má abnormální morfologii, způsobenou ektopickým buněčným dělením a proliferací (Faure et al., 1998; Bellec et al., 2002). Kromě narušené biosyntézy kutikuly byla u *pas2* popsána zvýšená exprese markerů buněčného dělení a genů cytokininové odpovědi (Harrar et al., 2003). Důvodem může být to, že funkce PAS2 proteinu prozatím neznámým způsobem ovlivňuje syntézu samotné buněčné stěny. Aktivita PAS2 je například spojena s expanzí buněčné desky (Bach et al., 2011). Pomocí metody dvouhybridového systému byla také zaznamenána interakce PAS2 se složkami

celulózasyntáz CESA3 a CESA6 (Zhu et al., 2020). PAS2 jako multifunkční protein lokalizuje na více místech a plní více funkcí v závislosti na kontextu: lokalizace v ER odpovídá jeho biosyntetické funkci (Morineau et al., 2016), zatímco lokalizace v Golgi souvisí s interakcí s CESA3/6 (Zhu et al., 2020)

#### 2.3.1.4 Redukce $\beta$ -ketoacyl-CoA

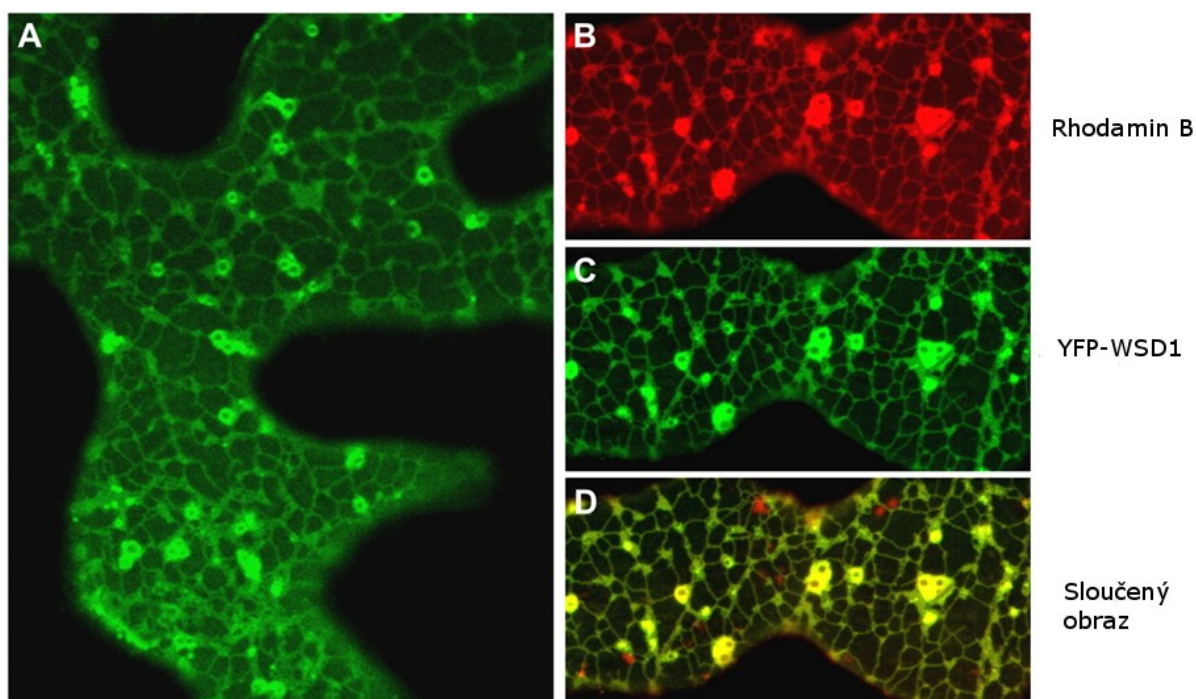
Poslední krok elongačního cyklu katalyzuje enzym CER10, jediný známý homolog kvasinkové enoyl-CoA-reduktázy Tsc13p u *Arabidopsis* (Kohlwein et al., 2001; Zheng et al., 2005). Pro *cer10* jsou typické snížený obsah kutikulárních vosků, zakrnělost a náchylnost k vadnutí v suchých podmínkách (Koornneef et al., 1989). Abnormální morfologie stonku, listů, epidermálních buněk a trichomů je způsobena narušením buněčné expanze (Zheng et al., 2005). Stejný tým také zjistil, že se CER10 podílí nejen na biosyntéze kutikuly, ale i sfingolipidů a triacylglycerolů, o čemž svědčí jejich snížená hladina u *cer10* mutantů.

### 2.3.2 Alkoholová dráha

Po elongaci jsou prekurzory redukovány mastnou acyl-CoA-reduktázou za vzniku primárního mastného alkoholu (Pollard et al., 1979). CER4 je jediný dosud známý enzym u huseníčku, který plní tuto roli (Rowland et al., 2006). Exprimuje se v listech, květech, plodech a stoncích. Obsah vosků byl však detailně kvantifikován jenom ve stoncích (Rowland et al., 2006). U mutantu *cer4* jsou detekovatelné primární C30 alkoholy, což svědčí o tom, že existuje nepopsaný izoenzym, který je s CER4 redundantní. Sledování *in vitro* aktivity CER4 také ukázalo, že jeho produktem jsou kratší C24 až C28 alkoholy (Rowland et al., 2006). V distálních částech stonku se můžou z produktů CER4 také tvořit nenasycené primární alkoholy, jejichž vznik katalyzuje desaturáza CER17 (Yang et al., 2017). Primární alkoholy, syntetizované v této dráze, a C16 mastné kyseliny jsou prekurzory esterů (Lai et al., 2007; Li et al., 2008). Li et al. 2008 rovněž zjistili, že tvorba esteru je katalyzovaná enzymem WSD1 (wax ester synthase/diacylglycerol acyltransferase 1). Mutant *wsd1* má snížený obsah esterů, a tvoří WSD1 estery a triacylglyceroly *in vitro*. Aktivita promotorů WSD1 byla popsána v místech syntézy epikutikulárních vosků: stoncích, listech a květech. Přestože WSD1 *in vitro* katalyzuje syntézu triacylglycerolů, mRNA WSD1 v semenech detekovaná nebyla. Proto se může *in vivo* podílet jen na biosyntéze kutikuly (Li et al. 2008).

Alkoholová dráha se odehrává v ER, což je v souladu s lokalizací souboru enzymů, podílejících se na elongaci mastných kyselin – komplexu FAE. Předpokládá se, že WSD1 je

transmembránový protein, zakotvený v membráně ER (Li et al. 2008). Lokalizace tohoto enzymu na membráně ER byla pozorovaná *in planta* pomocí fúzního proteinu YFP:WSD1 (**obr. 4**). Stejnou metodou byla stanovená asociace CER17 se membránami ER (Yang et al., 2017). Lokalizace rostlinného enzymu CER4 v ER byla popsána jen *in vitro* u kvasinek (Rowland et al. 2006). Autoři předpokládají, že je *in vivo* podobná a že se jedná o protein, ukotvený v membráně.



**Obrázek 4:** Buněčná lokalizace WSD1. A, lokalizace YFP-WSD1 v ER epidermální buňky. B, barvení ER pomocí hexylrhodaminu B. C, lokalizace YFP-WSD1. D, kombinace B a C. Upraveno dle Li et al., 2008.

### 2.3.3 Alkanová dráha

Alkany se tvoří přes aldehydový intermediát, který je následně dekarbonylován (Cheesbrough a Kolattukudy, 1984). Počet uhlíků v mastném řetězci, který je po elongaci sudý, se po odstranění karbonylové skupiny stává lichý. Na syntéze alkanů se podílí heterodimer dvou enzymů CER3 a CER1, což bylo zjištěno pomocí metody SLC (split luciferase assay) týmem Bernard et al., 2012. Heterodimer lokalizuje v ER, a předpokládá se jeho vazba na membránu. To, že tyto dva enzymy jsou pro vznik alkanu důležité, se vědělo už dřív: kutikula *cer1* (Hannoufa et al., 1993; Aarts et al., 1995; Jenks et al., 1995) a *cer3* (Chen et al., 2003; Kurata et al., 2003) má snížený obsah alkanů. Nadměrná exprese CER1 vede k akumulaci alkanů ve vrstvě epikutikulárních vosků (Bourdenx et al., 2011). Zásadní rozdíl mezi těmito dvěma mutanty je však v tom, že *cer1* akumuluje ve své kutikule aldehydy (Hannoufa et al., 1993; Aarts et al., 1995; Jenks et al., 1995), zatímco *cer3* nikoliv a dokonce má obsah aldehydů

snížený oproti rostlinám divokého typu (Chen et al., 2003). CER3 totiž katalyzuje syntézu aldehydů, zatímco CER1 jejich dekarboxylaci za vzniku alkanů (Kurata et al., 2003). S aktivitou CER1 se částečně překrývá aktivita CER1-LIKE1, zejména při syntéze C25 a C27 aldehydů v květech a plodech. Protein CER1-LIKE1 byl také nalezen na membráně ER, a byla popsána jeho interakce s CER3 (Pascal et al., 2019). Enzym MAH1 (midchain acyl hydroxylase 1) katalyzuje vznik ketonů a sekundárních alkoholů, dalších derivátů této dráhy (Greer et al., 2007). Je také znám jako CYP96A15, takže jde o další cytochrom P450. Je to transmembránový protein, asociující s membránou ER.

### 3 Sekrece kutikuly

#### 3.1 Intracelulární transport

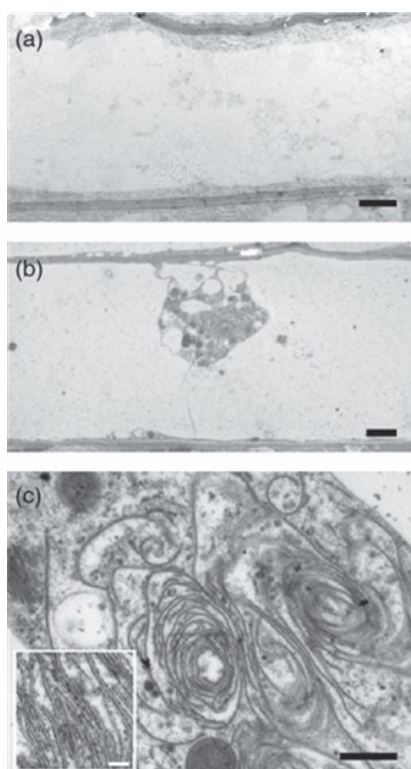
Existuje několik hypotéz, jak probíhá intracelulární transport epikutikulárních vosků. Hypotéza nevezikulárního transportu skrze kontaktní místa ER a plazmatické membrány (PM) se zakládá na pozorování fenotypu mutantů s nefunkčními ABC transportéry z G podrodiny (ATP-binding cassette transporter, ABCG). Předpokládá se, že přenášejí složky kutikuly skrze PM, čemuž se detailně věnuje kapitola 3.2. U mutantů s nefunkčními ABCG přenašeči dochází k akumulaci lipidů ve strukturách, odvozených z ER, což slouží jako nepřímý důkaz nevezikulárního transportu vosků skrze kontaktní místa ER a PM (McFarlane et al., 2010).

Recentní výzkum se však soustředil na hypotézu, že epikutikulární vosky jsou transportovány ve váčcích. Argumentem pro tuto hypotézu je fenotyp mutantů, spojených se sekreční dráhou: *ech* (*echidna*), *gnl1-1* (*gnom-like1*) a *cer11*. ECH je transmembránový protein, lokalizující v *trans*-Golgi, a podílí se na sekreci pektinů (Gendre et al., 2011; McFarlane et al., 2013). GNL1 je výměnný faktor guaninového nukleotidu lokalizující s markery *cis*-Golgi (Richter et al., 2007). Společným znakem *gnl1-1* a *ech* je abnormální morfologie ER (Nakano et al., 2007; McFarlane et al., 2013) a snížený obsah epikutikulárních vosků, sekretovaných na povrch buněčné stěny a celkově syntetizovaných v buňce (McFarlane et al., 2014). Vliv jejich mutace na depozici vosků by byl dvojitý: narušená syntéza vosku kvůli abnormálnímu tvaru ER a narušená sekrece, jak píše McFarlane et al., 2014. Třetí gen kóduje protein CER11, fosfatázu s dosud neznámou funkcí (Shi et al., 2019). Mutantní rostliny *cer11* jsou zakrnělé a křovinaté a mají snížený obsah epikutikulárních vosků. Zatím žádná další práce hypotézu vezikulárního transportu explicitně nepodpořila ani nevyvrátila. Kromě toho žádná

z popsaných hypotéz ve svém původním znění nezmiňuje monomery kutinu, o jejichž transportu skrze kontaktní místa ER a PM nebo ve vezikulech se nic neví.

### 3.2 ABCG přenašeče

Je velice rozšířená hypotéza, že monomery kutinu a epikutikulální vosky jsou sekretovány na povrch buněčné stěny pomocí ABCG přenašečů, lokalizujících na PM: ABCG12/CER5 (Pighin, 2004), ABCG11 (Bird et al., 2007; Panikashvili et al., 2007), ABCG32 (Bessire et al., 2011; Fabre et al., 2016), ABCG13 (Panikashvili et al., 2011) a ABCG5 (Lee et al., 2021). Pro ABCG transportéry je charakteristické to, že mnohé z nich fungují jako dimery, což bylo



**Obrázek 5:** Transmisní elektronová mikrofotografie příčného řezu epidermální buňkou A, divokého typu a B, *abcg11* s membránovou inkluzí. C, zvětšený obraz inkluze. Měřítka: 2  $\mu\text{m}$  – A, B; 500 nm – C. Převzato z Bird et al., 2007.

definováno v práci Verrier et al., 2009. ABCG12 a ABCG11 tvoří heterodimer, ale byla pozorovaná schopnost ABCG11 tvořit homodimer (McFarlane et al., 2010). Neví se, jaké dimery vytvářejí ostatní ABCG transportéry.

U mutantů *abcg12*, *abcg11* a *abcg32* byla popsána přítomnost cytoplazmatických inkluzí, odvozených z ER, ve kterých se hromadí složky kutikuly (**obr. 5**), a snížený obsah lipidů na povrchu buněčné stěny (Pighin, 2004; Bird et al., 2007; Bessire et al., 2011). Kutikula *abcg12* postrádá jenom epikutikulální vosky (Pighin, 2004), kdežto *abcg11* má snížený obsah jak vosků, tak i kutinu (Bird et al., 2007). Proto se předpokládá, že ABCG12 je specifický pro transport vosků, zatímco ABCG11 je přenašečem všech prekurzorů kutikuly (Bird et al., 2007; McFarlane et al., 2010). Činnost ABCG13 je spojená s transportem kutinu v květních orgánech (Panikashvili et al., 2011). Úloha ABCG32 je méně jasná. Nejvíce se exprimuje rostoucích, nikoliv plně vyvinutých, pletivech (Bessire et al., 2011; Fabre et al., 2016). Jeho mutant má snížený obsah nasycených C16 monomerů kutinu. Zajímavý je objev Fabre et al., 2016, že funguje částečně nezávisle na GPAT4, 6 a 8. Jak bylo zmíněno v předchozích kapitolách, posledním krokem biosyntézy monomerů kutinu je tvorba 2-MAG, katalyzovaná enzymy GPAT4, 6 a 8. Cílem pokusů bylo

zjistit, zda jsou GPAT epistatické k ABCG32, který by měl být přenašečem 2-MAG. Porovnání fenotypu dvojitého *abcg32 gpat6* a trojitého *abcg32 gpat4 gpat6* mutantu s rodičovskými rostlinami ukázalo, že nejsou úplně epistatické. U takových mutantů je obsah kutinu mnohem menší než u *abcg32*, *gpat6* nebo *gpat4 gpat8* (Fabre et al., 2016). Není jasné, jestli nezávisle na těchto enzymech GPAT fungují i ostatní ABCG přenašeče. Může to také znamenat, že existují další GPAT enzymy, které nebyly popsány, nikoliv to, že nejsou ABCG na 2-MAG závislé.

Recentní práce Lee et al., 2021 také zvažuje význam ABCG5 pro vývoj kutikuly zavodněných semenáčků. Zavodněné *abcg5* semenáčky nedokážou vyvinout dospělé listy. Jejich kutikula je propustná pro etanol a toluidinovou modř a ovlivněné jsou jak kutin, tak i vosky. Mutace se projevuje i u semenáčků, pěstovaných v normální půdě nebo agaru, ale nemá stejně dramatický vliv na jejich vývoj. Za normálních podmínek aktivita ABCG5 je částečně kompenzovaná činností jiných přenašečů; o tom svědčí i zvýšená exprese ABCG11 a ABCG12. Proto se zdá, že, i když je ABCG5 v něčem s jinými přenašeči redundantní, může plnit nějakou zvláštní funkci, zejména při hypoxickém stresu během zavodnění (Lee et al., 2021).

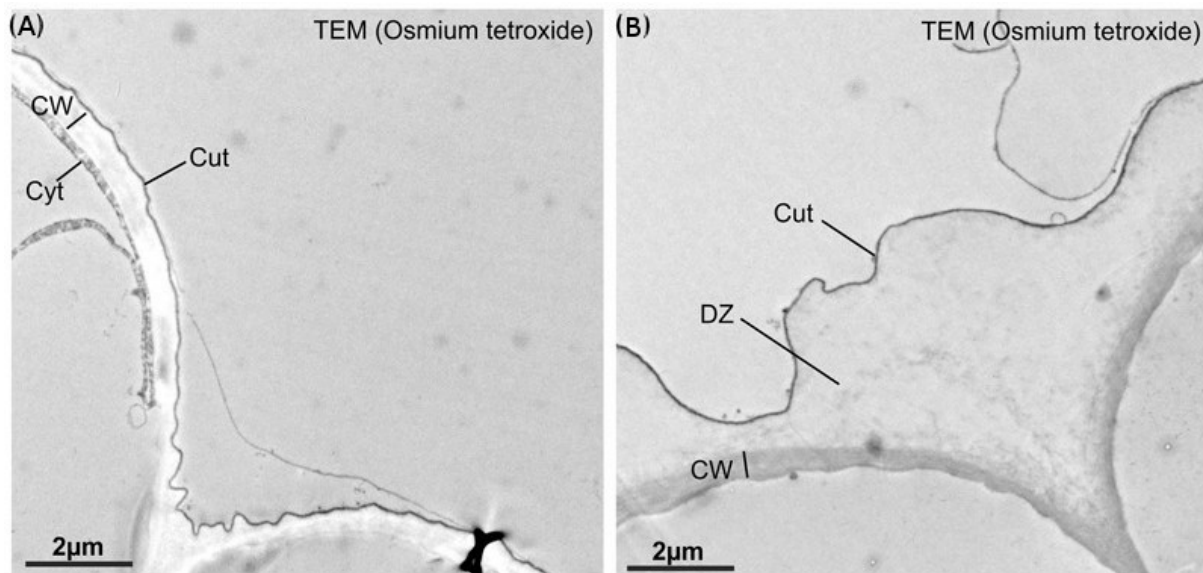
### 3.3 LTP

Nejasným zůstává mechanismus, jak jsou složky kutikuly transportované na povrch buněčné stěny. Jednou z hypotéz je transport pomocí lipidových přenašečových proteinů (LTP, lipid transfer protein), které by lokalizovaly extracelulárně a přenášely by hydrofobní vosky a monomery kutinu přes buněčnou stěnu (Sterk et al., 1991). Tyto proteiny obsahují hydrofobní kapsu, kam se vážou lipidické látky, což umožňuje jejich přenos (Shin et al., 1995). V posledních letech se hypotéza transportu pomocí LTP rozšířila. Někteří autoři navrhují klasifikaci LTP podle jejich možné role v kutikule: LTPG s glykofosfatidylinositolovou (GPI) kotvou, transportní LTP a adhezní LTP (Edqvist et al., 2018), ale přesný mechanismus jejich spolupráce není dosud znám. Podle jednoho modelu by LTPG mohly vázat prekurzory kutikuly a předávat je transportním LTP (DeBono et al., 2009). Druhý model, nabízený stejným týmem, předpokládá, že LTPG jsou odštěpené specifickou fosfolipázou a přenášejí kutikulární lipidy samy. Adhezní LTP nejsou spojené přímo s transportem, ale zatím neznámým způsobem se podílejí na propojení hydrofobní vrstvy kutikuly s polysacharidy buněčné stěny (Jacq et al., 2017; Edqvist et al., 2018).

Byly popsány dva LTP s GPI-kotvou: LTPG1 a jeho homolog LTPG2. Mutace *ltpg1* je spojená zejména se sníženou hladinou voskových alkanů v kutikule stonků a plodů (Lee et al.,

2009b; DeBono et al., 2009). Podobně se projevuje mutace *ltpg2*, která ovlivňuje převážně epikutikulární vosky plodů (Kim et al., 2012). Nicméně jedna z mutantních alel, *ltpg2-1*, se fenotypově projevuje sníženým obsahem monomerů kutinu v listech. Fenotyp dvojitého mutantu svědčí o tom, že dochází k určitému překryvu funkce LTPG1 a LTPG2 při transportu alkanů v plodech a stoncích, zatímco jejich vliv na epikutikulární vosky listů je minimální (Kim et al., 2012). Vzhledem k tomu, že byla v epidermis *Arabidopsis* popsána exprese ještě několika dalších LTP (Suh et al., 2005), a že mutantní rostliny zachovávají svoji kutikulu, můžou se na transportu podílet i jiné LTP. Na základě koexprese s LTPG1 a LTPG2 byl navržen LTPG6 jako další GPI-ukotvený LTPG, důležitý pro vývoj kutikuly (Edstam et al., 2013).

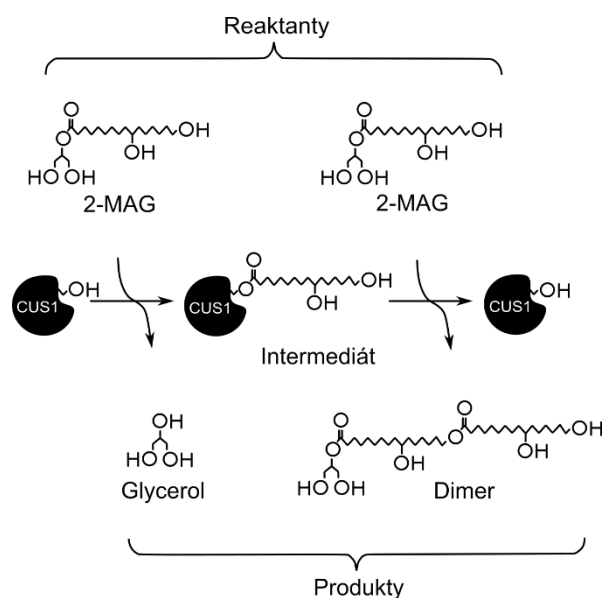
Z adhezních LTP je znám pouze AtLTP2 (Jacq et al., 2017). Kutikula etiolovaných semenáčků *atltp2* se svým chemickým složením neliší od divokého typu, avšak je mnohem propustnější pro barvivo a hůř brání ztrátám vody. Nejpozoruhodnějším znakem tohoto fenotypu je narušené propojení buněčné stěny a kutikuly (**obr. 6**), což vedlo k závěru, že se AtLTP2 podílí na jejich adhezi.



**Obrázek 6:** Transmisní elektronová mikrofotografie kutikuly etiolovaného hypokotylu divokého typu (A) a hypokotylu *atltp2* (B). CW, buněčná stěna. Cut, kutikula. Cyt, cytoplazma. DZ, zóna, kde dochází k odpojení buněčné stěny a kutikuly (cuticle-cell wall detachment zone). Měřítko 2 µm. Upraveno podle Jacq et al., 2017.

### 3.4 Polymerizace kutinu

Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole, předpokládá se, že kutin je polymerizován v podobě 2-MAG, vznikajících činnostmi enzymů GPAT (kapitola 2.2.4). Role glycerolu v tvorbě polymeru kutinu se zvažovala i dřív (Graça et al., 2002), ale jeho přesný význam nebyl jasný. Výrazným posunem se stal objev lipázy CUTIN SYNTHASE 1 (CUS1) u rajčete, který spojil poznatky o glycerolu v kutikule, enzymů GPAT a jejich roli v polymerizaci kutinu (Girard et al., 2012; Yeats et al., 2012). *In vitro* tento enzym dokázal vytvořit z 2-MAG krátký řetězec oligomeru



**Obrázek 7:** Mechanismus polymerizace, navržený na základě studií CUS1 *in vitro*. Upraveno dle Yeats et al., 2014.

kutinu. Na základě těchto pozorování byl navržen mechanismus polymerizace kutinu: CUS1 přenáší acylovou skupinu z 2-MAG na lineární polymer kutinu (**obr. 7**) (Yeats et al., 2012, 2014). Později bylo zjištěno, že nefunkční CUS1 ovlivňuje nejen esterifikaci acylových skupin mezi sebou, ale i esterifikaci glycerolu mezi sebou (Philippe et al., 2016), což původně zaznamenáno nebylo. V další práci Philippe et al., 2020 demonstrovali, že mutací CUS1 jsou ovlivněny i polysacharidy, nacházející se v přímém kontaktu s alifatickými složkami kutikuly. Jsou známé jako CEPs (cutin-embedded polysaccharides).

Např. ve vrstvě CEPs u *cus1* mutantů dochází ke zvýšení celkového obsahu polysacharidů, nicméně proporčně je tam mnohem méně pektinu než u rostlin divokého typu. Tyto poznatky naznačují těsné spojení CUS1, kutinu a polysacharidů buněčné stěny, ale jeho podstata není zatím jasná.

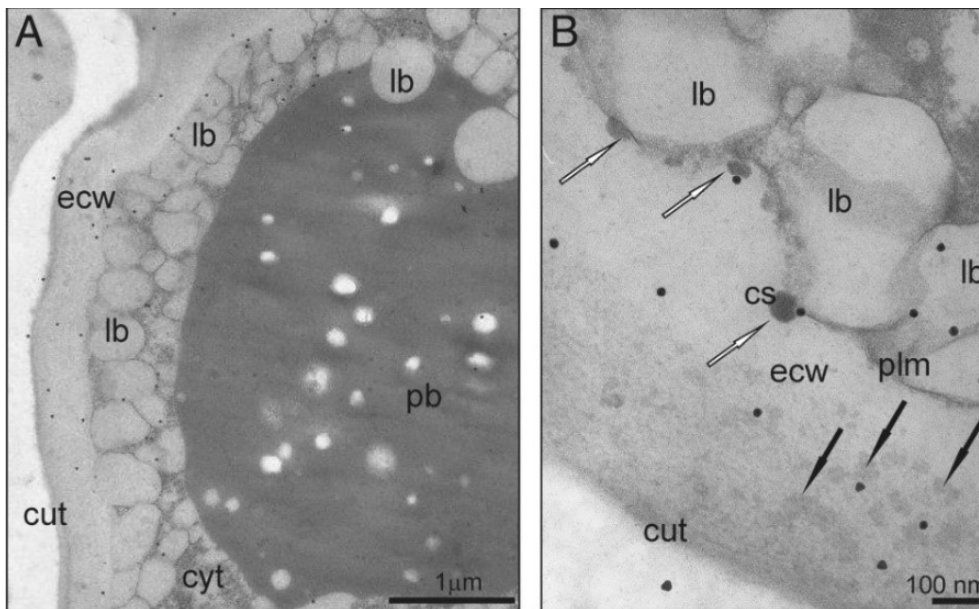
S ohledem na to, že se u mutantu *cus1* zachovávají kratší řetězce polyesteru kutinu, je možné, že jsou další enzymy, které polymerizaci pomáhají (Philippe et al., 2016). CUS1 patří k velice konzervované rostlinné rodině kutinsyntáz CUS, která zahrnuje 5 homologů u rajčete a 4 u huseníčku (Yeats et al., 2014). Většina z nich ale zatím nebyla popsána. Je jenom známo, že CUS2 *Arabidopsis* není přímo spojená s polymerizací kutinu, ale podílí se na tvorbě hřebenu na povrchu kutikuly květu (Hong et al., 2017). Kromě toho jsou BODYGUARD (BDG) (Kurdyukov et al., 2006b) a DEFECTIVE IN CUTICULAR RIDGES (DCR) (Panikashvili et al., 2009) dva další enzymy, které se můžou na polymerizaci kutinu podílet. BDG je

extracelulární hydroláza. Pro *bdg* je charakteristická narušená morfologie listů a trichomů, akumulace vosků a monomerů kutinu. Při pěstování *in vitro* *bdg* rostliny tvoří struktury připomínající kalus. BDG může plnit nějakou funkci buď přímo v sekreci kutikuly nebo regulaci buněčné proliferace (Kurdyukov et al., 2006b). Jakobson et al., 2016 předpokládají, že se BDG podílí na polymerizaci kutinu, zejména C18 prekurzorů: C18 mastných kyselin je víc v kutikule rostlin se zvýšenou expresí BDG. Kvůli tomu, že jsou ovlivněné jenom specifické C18 monomery kutinu, odmítají autoři jeho regulační roli (Jakobson et al., 2016). Jako alternativní možnost nabízejí biosyntetickou funkci – deacylací CoA, ale v takovém případě zůstává nejasná jeho extracelulární lokalizace. O druhém enzymu, DCR, je známo stejně málo. Je to cytosolická acyltransferáza (Panikashvili et al., 2009). Její nefunkčnost je spojená s řadou znaků typických pro mutanty spojené s kutinem nebo kutikulou: srostlé orgány, snížená hladina kutinů a náchylnost k vyschnutí. Avšak DCR se exprimuje nejen v epidermis nadzemních orgánu, ale i v jinde, což ukazuje na mnohofunkčnost tohoto enzymu. Jedna z jeho rolí by byla v polymerizaci kutinu, zejména kyseliny 10,16-dihydropalmitové, kterou mutant *dcr* ve své kutikule nemá. Existuje i jiný opačný názor: DCR je diacyltransferáza, která katalyzuje vznik triacylglycerolů (Rani et al., 2010). To implikuje, že triacylglyceroly jsou prekurzorem kutinu. Roli triacylglycerolů ve vzniku kutikuly však žádná jiná práce nepodporuje. Je vidět, že význam BDG a DCR není dosud jasný: neví se ani jejich biochemická funkce, ani jejich přesné zařazení do biosyntetické dráhy kutinu.

### 3.5 Kutinzomy

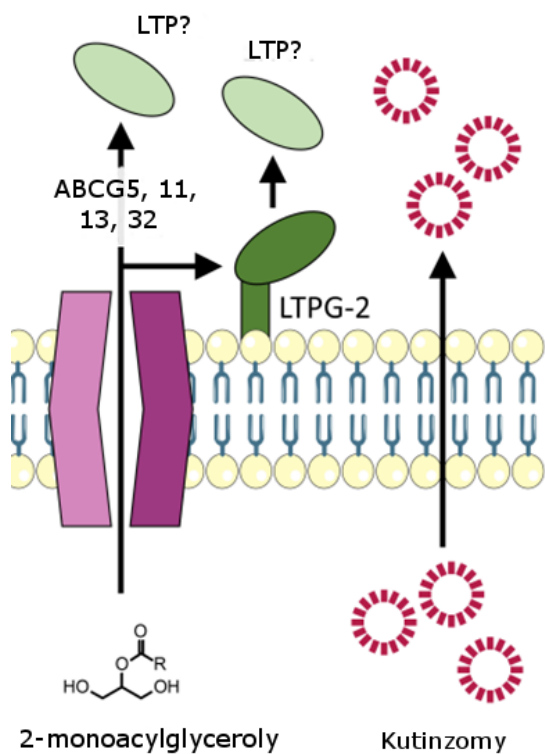
Alternativní hypotézou, jak probíhá transport a polymerizace monomerů kutinu je, že probíhají činností kutinzomů. Kutinzomy byly poprvé popsány jako váčky, vznikající *in vitro* samouspořádáním z alifatických monomerů kutinu (Heredia-Guerrero et al., 2008; Domínguez et al., 2010). Místem vzniku kutinzomů v buňce by měla být lipidová tělíska. U některých rostlin tato lipidová tělíska jsou součástí lipotubulodního metabolonu (Kwiatkowska et al., 2014). Je to struktura, obsahující mikrotubuly, aktin, ribozomy, mitochondrie, Golgi a ER, která byla poprvé popsána u snědku chocholičnatého *Ornithogalum umbellatum* (Kwiatkowska, 1971; Kwiatkowska et al., 2013, 2015). U rostlin, které tuto strukturu nemají, jsou předpokládaným místem vzniku volná lipidová tělíska (Stępiński et al., 2017). Platí to i pro *Arabidopsis*. Další *in vitro* pokusy předpokládají podíl pektinů na tvorbě kutinzomů. Vytvářejí kolem hydrofobního jádra hydrofilní obal (Guzman-Puyol et al., 2015). To však zatím nebylo pozorováno *in vivo*, takže se neví, jak tento proces vypadá v rostlinné buňce.

Poznatků o skutečném výskytu těchto struktur u rostlin je málo. Poprvé byly popsány u vyvíjejícího se plodu rajčete pomocí mikroskopie atomárních sil (Heredia-Guerrero et al., 2008) a imunolokalizace (Domínguez et al., 2010). Nejvíce prozkoumané jsou kutinzomy, které byly pozorované v pokožkových buňkách semeníku snědku chocholičnatého pomocí metod transmisní elektronové mikroskopie (Kwiatkowska et al., 2014). Jsou ve velkém počtu na povrchu buněčné stěny a ve vznikající kutikule. S kutinzomy rovněž asociují enzymy, homologické s WSD1 a GPAT6 (Stępiński et al., 2016). Proto autoři předpokládají, že kutinzomy přenášejí tyto enzymy na povrch kutikuly. Nedávno kutinzomy byly popsány i v embryu huseníčku při tvorbě prokutikuly (**obr. 8**).



**Obrázek 8:** Transmisní elektronová mikrofotografie kutinzomů v embryu *Arabidopsis*. Tmavé struktury v buněčné stěně (černé šipky) a cytoplasmě (bílé šipky) jsou kutinzomy. cs, kutinzom; lb, lipidové tělísko; pb, proteinové tělísko; cyt, cytoplazma; ecw, buněčná stěna; plm, plazmatická membrána; cut, kutikula. Měřítka: A–1 μm, B–100 nm. Převzato z Stępiński et al., 2017.

Podle zastánců hypotézy kutinzomů se jejich existence nevyklučuje s transportem pomocí ABC přenašečů a polymerizace činností CUS1, který je popsán v předchozích kapitolách, nýbrž je to komplementární mechanismus (Stępiński et al., 2017; Segado et al., 2020). Zjistilo se, že se v různých stádiích vývoje uplatňují odlišné mechanismy tvorby kutikuly (Segado et al., 2020). Když se tvoří prokutikula plodu rajčete, jsou detekovatelné kutinzomy. Při buněčné expanzi se naopak zvyšuje exprese CUS1. V tom stadiu se zároveň začíná lišit kutikula *cus1* od kutikuly divokého typu (Segado et al., 2020). Souhrn mechanismů, které se na transportu kutinu podílejí, je znázorněn na **obr. 9**.



**Obrázek 9:** Model spolupráce různých mechanismů, které se podílejí na transportu monomerů kutinu: ABCG přenašeče, LTP, kutinzojmy. Upraveno dle Xin a Herbuger, 2021.

## 4 Regulace vývoje kutikuly

### 4.1 Transkripční regulace

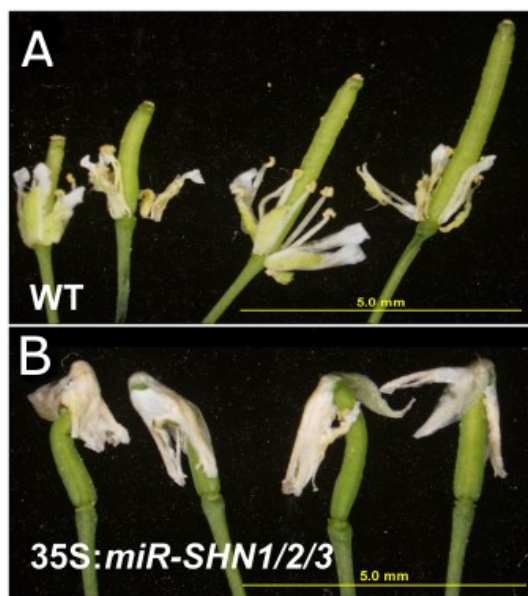
První popsanou rodinou transkripčních faktorů, spojených s regulací kutikuly, je rodina SHN (SHINE). Aktivitu SHN regulují protein s WW doménou CFL1 (CURLY FLAG LEAF1) a MIXTA-like transkripční faktory, považované za centrální regulátory vývoje kutikuly. Jejich aktivita je spojená s celkovou ontogenezí rostliny (Wu et al., 2011; Oshima et al., 2013). Transkripční regulaci kutikuly lze však studovat i v kontextu stresové odpovědi rostliny. Pro odpověď na abiotický stres je důležitá exprese genů, řízená ABA-dependentními transkripčními faktory (kapitola 4.1.4). S reakcí na biotický stres je spojen pouze jeden transkripční faktor, MYB30 (Raffaele et al., 2008). Kromě toho se v posledních letech objevují práce o cirkadiální rytmicitě syntézy kutikuly a jsou známé histonové modifikace, spojené s regulací biosyntetických genů. Nejdůležitější transkripční regulátory vývoje kutikuly u *Arabidopsis thaliana* jsou shrnuté v **tab. 1**

<b>Protein</b>	<b>Funkce</b>	<b>Zdroje</b>
SHN1/2/3	Pozitivní transkripční regulace biosyntézy vosků (LACS2, CER1, KCS1, FDH) a kutinu (LACS2, CYP86A4/7, CYP77A6, GPAT4)	Broun et al., 2004, Kannangara et al., 2007, Shi et al., 2011, Oshima et al., 2013
MYB106	Pozitivní transkripční regulace SHN1, biosyntézy vosků (FDH, CER1, LACS2) a kutinu (CYP86A8, CYP77A6)	Oshima et al., 2013
MYB16	Pozitivní transkripční regulace syntézy kutinu (LACS2, CYP86A4, CYP77A6)	Oshima et al., 2013
CFL1	Negativní regulace SHN1 a HDG1, pozitivní regulace CFLAP1/2	Wu et al., 2011, Li et al., 2016
HDG1	Pozitivní transkripční regulace FDH a BDG	Wu et al., 2011
CFLAP1/2	Negativní transkripční regulace syntézy a transportu vosků (KCS1, CER4, ABCG12...) a kutinu (CYP86A4, CYP77A6)	Li et al., 2016
MYB30	Pozitivní transkripční regulace syntézy vosků (CER10, KCS2, CER3...)	Raffaele et al., 2008
MIEL1	Řízená degradace MYB96 a MYB30	Marino et al., 2013, Lee et al., 2017
DEWAX	Negativní transkripční regulace syntézy vosků (LACS2, CER1), inhibice SPL9.	Go et al., 2014, Li et al., 2019
SPL9	Pozitivní transkripční regulace syntézy vosků (CER1, CER4).	Li et al., 2019
miR156	Negativní regulace SPL9.	Li et al., 2019
RAP2.4	Pozitivní transkripční regulace syntézy vosků (CER1, KCS2/DAISY)	Yang et al., 2020a
HUB1/2	Monoubikvitinace histonu H2B, pozitivní regulace syntézy kutinu (LACS2, HTH, CYP86A2) a vosků (CER1)	Ménard et al. 2014
GCN5	Acetylace histonu H3, pozitivní regulace syntézy vosků (CER3, CER2-LIKE1, CER1-LIKE1)	Wang et al., 2019
SDG8/25	Metylace histonu H3, pozitivní regulace syntézy vosků (CER3)	Lee et al., 2016

**Tabulka 1:** Shrnutí transkripčních regulátorů vývoje kutikuly a genů, na které působí.

#### 4.1.1 SHINE transkripční faktory

SHN (SHINE) je podrodinou APETALA2/ethylene-response factor (AP2/ERF) transkripčních faktorů, obsahujících konzervovanou AP2 doménu. U huseníčku čítá tři homology: SHN1, SHN2 a SHN3 (Aharoni et al., 2004). Nejdřív byly tyto transkripční faktory popsány jako regulátory biosyntézy epikutikulárních vosků (Aharoni et al., 2004; Broun et al., 2004), ale další práce zvažují i jejich podíl na regulaci vzniku kutiny (Kannangara et al., 2007) a expresi genů, spojených s buněčnou stěnou (Shi et al., 2011). Umlčení všech tří SHN genů zásadně ovlivňuje morfologii květu (**obr.10**). Naopak při umlčení pouze SHN1 ke vzniku podobného fenotypu nedochází (Shi et al., 2011). Tyto výsledky naznačují jejich spolupráci při vývoji květu. Přesto, že ve starších studiích, jako Aharoni et al., 2004, aktivita SHN1 byla pozorovaná pouze v květních orgánech, jeho ektopická exprese zřejmě ovlivňuje obsah kutiny a vosků v listech (Broun et al., 2004; Kannangara et al., 2007). Exprese SHN3 se částečně kryje se SHN1 v květech, je významná v listech a stoncích (Aharoni et al., 2004). SHN2 se exprimuje v oblastech dehiscence plodů (Aharoni et al., 2004) a trichomech (Kumar et al., 2017) a je popsán nejméně.



**Obrázek 10:** Dehiscence květů rostliny divokého typu (A) a květů linie s umlčením transkripčních faktorů SHN (B). Je vidět, že dochází k adhezi korunních lístků k sobě. Měřítko 5 mm. Upraveno dle Shi et al., 2011.

#### 4.1.2 MIXTA-like

První centrální regulační modul vývoje kutikuly je zastoupen dvěma paralogy, MYB16 a MYB106, které patří do podrodiny MIXTA-like transkripčních faktorů (Oshima et al., 2013). MYB106 reguluje biosyntézu kutiny a epikutikulárních vosků jak přes SHN1, tak i nezávisle na něm. Interakce jeho paralogu MYB16 s SHN1 nebyla popsána. Aktivita těchto transkripčních faktorů je také spojovaná s regulací větvení trichomů (Jakoby et al., 2008; Gilding a Marks, 2010). Proto se předpokládá, že se MYB106 a MYB16 jsou klíčovými regulátory vývoje kutikuly, které mají podíl i na obecnějších procesy morfogeneze epidermální

buněk a trichomů (Oshima et al., 2013). To naznačuje celkový význam tohoto regulačního modulu pro vývoj rostliny a dává vznik kutikuly do ontogenetického kontextu.

### 4.1.3 CFL1

Předpokládá se, že CFL1 je dalším centrálním regulátorem vývoje kutikuly a funguje v několika na sobě nezávislých signalizačních drahách (Li et al., 2016). Negativně reguluje aktivitu transkripčního faktoru HDG 1 (homeodomain GLABRA 2-like protein 1) (Wu et al., 2011). HDG1 naopak pozitivně reguluje expresi genů, obsahujících L1-box. L1-box je sekvence, specifická pro geny, exprimované v L1-vrstvě stonkového apikálního meristému (Abe et al., 2001). Tuto sekvenci obsahují FDH a BDG (Abe et al., 2001; Wu et al., 2011), jejichž role ve vzniku kutikuly byla diskutována v předchozích kapitolách. CFL1 rovněž interaguje transkripčními faktory CFLAP1 (AtCFL associated protein 1) a CFLAP2 (Li et al., 2016). Jsou negativními regulátory biosyntézy vosků. Předpokládá se, že mezi CFL1 a transkripčními faktory, které reguluje, dochází k fyzické interakci (Li et al., 2016).

Wu et al., 2011 rovněž popsali, že CFL1 pozitivně reguluje expresi SHN1. Působí nejspíš nezávisle na HDG1 ale přes nějaký jiný transkripční faktor. Prvním argumentem je to, že u rostlin, vykazujících ektopickou expresi HDG1, exprese SHN1 zůstává stejná. Promotor SHN neobsahuje L1-box, na který by se HDG1 mohl navázat (Wu et al., 2011).

### 4.1.4 ABA regulace

Některé transkripční faktory, regulující expresi biosyntetických genů kutikuly, jsou regulované kyselinou abscisovou (ABA): MYB96 (Seo et al., 2009, 2011), MYB94 (Lee a Suh, 2015), MYB49 (Zhang et al., 2020) a RELATED TO APETALA 2.4 (RAP 2.4) (Yang et al., 2020a). Tyto transkripční faktory jsou součástí odpovědi rostliny na abiotický stres. Pro část z nich je také společné to, že pozitivně regulují syntézu epikutikulárních vosků. Je tomu tak v případě RAP 2.4, MYB96 a jeho paralogů, MYB94. Předpokládá se, že se vážou přímo na sekvenci regulovaných genů (Seo et al., 2011; Lee a Suh, 2015; Yang et al., 2020a). MYB49 působí podobně, ale má podíl nejen na biosyntéze kutikuly, ale i suberinu (Zhang et al., 2020).

Podle Lee et al., 2017 je aktivita MYB96 za normálních podmínek regulovaná řízenou degradací, na které se podílí E3 ubikvitin ligáza MYB30-INTERACTING E3 LIGASE 1 (MIEL1). Tento regulační modul je klíčový pro vývoj kutikuly stonku: *miell* mutanty mají mnohem větší obsah epikutikulárních vosků než rostliny divokého typu. Vzhledem k tomu, že

exprese MYB96 je konstitutivní, autoři zvažují jeho roli nejen pro odpověď na abiotický stres, ale i během ontogeneze rostliny (Lee et al., 2017).

#### 4.1.5 MYB30

Tento transkripční faktor byl nejdříve popsán ve spojení s hypersenzitivní reakcí – odpovědí na patogeny (Daniel et al., 1999). Linie s nadměrnou expresí *MYB30ox* má zvýšený obsah velmi dlouhých mastných kyselin a nadměrnou expresi biosyntetických genů (Raffaele et al., 2008). Dochází nejen ke zvýšení exprese univerzálních genů, jakými jsou složky elongačního komplexu, ale i genů, spojených s alkanovou dráhou. Nelze proto říci, že se jedná pouze o obecný regulátor syntézy velmi dlouhých mastných kyselin. Předpokládá se, že produkty elongačního cyklu, které nejsou inkorporované do kutikuly, se účastní signalizace, vedoucí k buněčné smrti (Raffaele et al., 2008). MYB30 je regulován MIEL1 podobně jako zmíněný v předchozí kapitole MYB96 (Marino et al., 2013). Nicméně jeho exprese za normálních podmínek je mnohem nižší než exprese MYB96 (Lee et al., 2017). Lze proto předpokládat, že modul MIEL1-MYB30 je významnější pro odpověď na biotický stres než celkový vývoj rostliny.

#### 4.1.6 Cirkadiální rytmicita

AP2/ERF transkripční faktor DEWAX (decrease wax biosynthesis) byl nejdříve popsán jako negativní regulátor biosyntézy vosků, který ovlivňuje expresi biosyntetických genů, LACS a jednoho z přenašečů, ABCG11, ve stoncích a listech (Go et al., 2014). Zajímavé však je to, že exprese DEWAX a genů, které jsou jím regulované, osciluje během dne (Go et al., 2014; Li et al., 2019). Recentní výzkum se věnuje jednomu z těchto genů, CER1, a regulaci jeho exprese v závislosti na světle (Li et al., 2019). Spolu s DEWAX se na tom podílí transkripční faktor SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 9 (SPL9) a microRNA miR156. SPL9 je pozitivním transkripčním regulátorem exprese CER1, zatímco DEWAX negativně reguluje SPL9. Li et al., 2019 předpokládají, že DEWAX tvoří se SPL9 heterodimer, čímž ovlivňuje schopnost SPL9 se vázat na promotory regulovaných genů. Exprese SPL9 je větší na světle, zatímco ve tmě dochází k jeho inhibici činností DEWAX a degradaci jeho transkriptu pomocí miR156 (Li et al., 2019). Přesný molekulární mechanismus světelné regulace těchto jevů není dosud znám.

#### 4.1.7 Histonové modifikace

Kromě jednotlivých transkripčních faktorů a jejich interakcí bylo popsáno několik kutikulárních mutantů, spojených s narušenou modifikací histonů: ubikvitinací, acetylací a metylací. Jako první byly popsány mutanty s narušenou funkcí ubikvitin ligázy HISTONE MONOUBIQUITINATION1 (HUB1) a jejího homologu HUB2 (Ménard et al., 2014). Aktivita těchto enzymů ovlivňuje expresi genů, kódujících enzymy biosyntézy kutinu a alkanové dráhy. Jsou pozitivními regulátory exprese LACS2, CYP86A2, HTH a CER1. Předpokládá se, že HUB1 a HUB2 tvoří heterotetramer a pro aktivaci příslušných genů je tedy nutná jejich spolupráce (Cao et al., 2008; Ménard et al., 2014). O tom svědčí fenotyp dvojitého mutantu: mutace obou těchto genů nemá, ve srovnání s *hub1* a *hub2*, žádný aditivní účinek (Ménard et al., 2014).

Druhá modifikace, popsaná Wang et al., 2018, je acetylace histonu H3 činností acetyltransferázy GENERAL CONTROL NON-REPRESSED PROTEIN5 (GCN5). Pomocí metody chromatinové imunoprecipitace bylo zjištěno, že GCN5 pozitivně reguluje expresi CER3, CER2-LIKE1 a CER1-LIKE1 – enzymů biosyntetické dráhy vosků. To se projevuje i na fenotypu: pro *gcn5-2* je charakteristický lesklý fenotyp, spojený s *cer* mutanty. Kvantifikace složek epikutikulárních vosků rovněž ukázala, že taková rostlina postrádá deriváty alkanové dráhy (Wang et al., 2018). GCN5 se podílí na více procesech, např. na regulaci exprese homeotických genů WUSCHEL a AGAMOUS v květním meristému (Bertrand et al., 2003).

Třetí modifikace, metylace, je spojená s regulací syntézy epikutikulárních vosků a imunitní odpovědí rostliny na patogeny (Lee et al., 2016). Dvě metyltransferázy, SET DOMAIN GROUP8 (SDG8) a SDG25, pozitivně regulují transkripci CER3. To naznačuje nejen význam metylace histonů pro regulaci syntézy vosků, ale i význam CER3 a alkanů pro imunitní odpověď.

#### 4.1.8 Posttranskripční regulace

Je známo, že se při posttranskripční regulaci vývoje kutikuly uplatňuje mechanismus cílené degradace mRNA exozómem. Exozóm je proteinový komplex z 10 podjednotek, obsahující 3'–5' exonukleázy, a je velice konzervován u eukaryotů (Mitchell et al., 1997). Byl popsán i u *Arabidopsis* (Chekanova et al., 2000). Exonukleáza CER7 je součástí tohoto komplexu u huseníčku a jeho činností dochází k degradaci mRNA transkriptu genu CER3, aktivního v biosyntetické dráze alkanů (Hooker et al., 2007; Zhao a Kunst, 2016). Pro tento proces jsou také nezbytné proteiny ze SUPERKILLER (SKI) komplexu a CER16 (Zhao a Kunst, 2016;

Yang et al., 2020b). Degradace transkriptu udržuje optimální hladinu CER3 (Zhao a Kunst, 2016). Předpokládá se, že za podmínek, když nějaká ze složek, nezbytných pro fungování exozómů, není funkční, dochází ke tvorbě siRNA a posttranskripčnímu umlčení CER3. V takovém případě je hladina CER3 mnohem nižší než u rostlin divokého typu. Když však mutant *cer7* neexprimuje geny, spojené s RNA interferencí, má fenotyp, podobný s rostlinami divokého typu (Lam et al., 2012, 2015).

## 5 Závěr

Je vidět, že znalosti o dynamických procesech vzniku kutikuly jsou velice fragmentární. Většina současných znalostí o těchto procesech se zakládá převážně na *in vitro* studiích nebo izolaci mutantních linií. Otázkou však je, jak se tyto izolované pokusy a poznatky spojují do celku: například, co se přesně děje mezi biosyntézou epikutikulárních vosků v ER a jejich sekrecí ABCG přenašeči na povrch buněčné stěny. Mnohem složitější je však cesta ke koherentnímu modelu biosyntézy kutinu. Neví se, kde se koná a jaká je její prostorová organizace. Běžným předpokladem je lokalizace v ER, ale velkou překážkou pro tento model je nedávný nález jednoho z biosyntetických enzymů v cytosolu a hypotéza cytosolické lokalizace biosyntézy monomerů kutinu. Musí na to navazovat i model intracelulárního transportu monomerů kutinu, kterým se relevantní literatura nezabývá. Zcela alternativní pohled na transport a polymerizaci kutinu nabízí hypotéza kutinzomů, ale jejím hlavním problémem v případě modelového organismu *Arabidopsis thaliana* je vazba na ontogenetické stadium rostliny – kutinzomy byly popsány jenom u embryí.

Dalším významným a málo prostudovaným aspektem je závislost syntézy na ontogenetickém stadiu a kontextu, což naznačuje několik prací: exprese biosyntetického enzymu CYP77A4 pouze v embryích, role ABCG32 v rostoucích pletivech či význam přenašeče ABCG5 pro odpověď na hypoxický stres. V závislosti na různých situacích mohou být aktivní jiné enzymy a přenašeče. Závislosti syntézy kutikuly na kontextu odpovídá i její složitá transkripční regulace.

Třetí důležitá otázka, která byla naznačená na začátku, se týká spojení kutikuly a buněčné stěny. Postupně začíná být kutikula interpretovaná jako lipidická složka polysacharidové buněčné stěny, nikoliv jako od ní izolovaná entita. Tato interpretace nabízí jiný pohled nejen na strukturální, ale i vývojové aspekty kutikuly, která je zřejmě těsně propojená s buněčnou stěnou.

Lze říct, že kutikula je velice složitá struktura, o které se ví mnohem méně, než se zdá na první pohled: čím dále pokračuje její výzkum, tím víc otázek pokládá. Procesy jejího vzniku jsou velice dynamické a proto složité, a pořád zbývá velké množství nevyřešených otázek, ke kterým je třeba se při zkoumání kutikuly obracet.

## Seznam použité literatury

Aarts, M.G.M., Keijer, C.J., Stiekema, W.J., a Pereira, A. (1995). Molecular Characterization of the CER1 Gene of *Arabidopsis* Involved in Epicuticular Wax Biosynthesis and Pollen Fertility. *Plant Cell* 7, 2115–2127.

Abe, M., Takahashi, T., a Komeda, Y. (2001). Identification of a cis-regulatory element for L1 layer-specific gene expression, which is targeted by an L1-specific homeodomain protein. *Plant J.* 26, 487–494.

Agrawal, V.P., a Kolattukudy, P.E. (1977). Biochemistry of suberization:  $\omega$ -hydroxyacid oxidation in enzyme preparations from suberizing potato tuber disks. *Plant Physiol.* 59, 667–672.

Aharoni, A., Dixit, S., Jetter, R., Thoenes, E., van Arkel, G., a Pereira, A. (2004). The SHINE Clade of AP2 Domain Transcription Factors Activates Wax Biosynthesis, Alters Cuticle Properties, and Confers Drought Tolerance when Overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 2463–2480.

Akiba, T., Hibara, K., Kimura, F., Tsuda, K., Shibata, K., Ishibashi, M., Moriya, C., Nakagawa, K., Kurata, N., Itoh, J., et al. (2013). Organ fusion and defective shoot development in *oni3* mutants of rice. *Plant Cell Physiol.* 55, 42–51.

Bach, L., Michaelson, L.V., Haslam, R., Bellec, Y., Gissot, L., Marion, J., Da Costa, M., Boutin, J.-P., Miquel, M., Tellier, F., et al. (2008). The very-long-chain hydroxy fatty acyl-CoA dehydratase PASTICCINO2 is essential and limiting for plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 14727–14731.

Bach, L., Gissot, L., Marion, J., Tellier, F., Moreau, P., Satiat-Jeunemaitre, B., Palauqui, J.-C., Napier, J.A., a Faure, J.-D. (2011). Very-long-chain fatty acids are required for cell plate formation during cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Cell Sci.* 124, 3223–3234.

Beaudoin, F., Gable, K., Sayanova, O., Dunn, T., a Napier, J.A. (2002). A *Saccharomyces cerevisiae* Gene Required for Heterologous Fatty Acid Elongase Activity Encodes a Microsomal  $\beta$ -Keto-reductase. *J. Biol. Chem.* 277, 11481–11488.

Beaudoin, F., Wu, X., Li, F., Haslam, R.P., Markham, J.E., Zheng, H., Napier, J.A., a Kunst, L. (2009). Functional Characterization of the *Arabidopsis*  $\beta$ -Ketoacyl-Coenzyme A Reductase Candidates of the Fatty Acid Elongase. *Plant Physiol.* 150, 1174–1191.

Bellec, Y., Harrar, Y., Butaeye, C., Darnet, S., Bellini, C., a Faure, J.-D. (2002). *Pasticcino2* is a protein tyrosine phosphatase-like involved in cell proliferation and differentiation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 32, 713–722.

Bernard, A., Domergue, F., Pascal, S., Jetter, R., Renne, C., Faure, J.-D., Haslam, R.P., Napier, J.A., Lessire, R., a Joubès, J. (2012). Reconstitution of Plant Alkane Biosynthesis in Yeast Demonstrates That *Arabidopsis* ECERIFERUM1 and ECERIFERUM3 Are Core Components of a Very-Long-Chain Alkane Synthesis Complex. *Plant Cell* 24, 3106–3118.

- Bertrand, C., Bergounioux, C., Domenichini, S., Delarue, M., a Zhou, D.-X. (2003). *Arabidopsis* Histone Acetyltransferase AtGCN5 Regulates the Floral Meristem Activity through the WUSCHEL/AGAMOUS Pathway. *J. Biol. Chem.* *278*, 28246–28251.
- Bessire, M., Chassot, C., Jacquat, A.-C., Humphry, M., Borel, S., Petétot, J.M.-C., Métraux, J.-P., a Nawrath, C. (2007). A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. *EMBO J.* *26*, 2158–2168.
- Bessire, M., Borel, S., Fabre, G., Cao, Y., Jetter, R., a Jacquat, A.-C. (2011). A Member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE Family of ATP Binding Cassette Transporters Is Required for the Formation of a Functional Cuticle in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *23*, 1958–1970.
- Bird, D., Beisson, F., Brigham, A., Shin, J., Greer, S., Jetter, R., Kunst, L., Wu, X., Yephremov, A., a Samuels, L. (2007). Characterization of *Arabidopsis* ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *Plant J.* *52*, 485–498.
- Blacklock, B.J., a Jaworski, J.G. (2006). Substrate specificity of *Arabidopsis* 3-ketoacyl-CoA synthases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *346*, 583–590.
- Bonaventure, G., Beisson, F., Ohlrogge, J., a Pollard, M. (2004). Analysis of the aliphatic monomer composition of polyesters associated with *Arabidopsis* epidermis: occurrence of octadeca-cis-6, cis-9-diene-1,18-dioate as the major component. *Plant J.* *40*, 920–930.
- Bourdenx, B., Bernard, A., Domergue, F., Pascal, S., Léger, A., Roby, D., Pervent, M., Vile, D., Haslam, R.P., Napier, J.A., et al. (2011). Overexpression of *Arabidopsis* *ECERIFERUM1* Promotes Wax Very-Long-Chain Alkane Biosynthesis and Influences Plant Response to Biotic and Abiotic Stresses. *Plant Physiol.* *156*, 29–45.
- Broun, P., Poindexter, P., Osborne, E., Jiang, C.-Z., a Riechmann, J.L. (2004). WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 4706–4711.
- Cao, Y., Dai, Y., Cui, S., a Ma, L. (2008). Histone H2B Monoubiquitination in the Chromatin of *FLOWERING LOCUS C* Regulates Flowering Time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *20*, 2586–2602.
- Cheesbrough, T.M., a Kolattukudy, P.E. (1984). Alkane biosynthesis by decarbonylation of aldehydes catalyzed by a particulate preparation from *Pisum sativum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *81*, 6613–6617.
- Chekanova, J.A., Shaw, R.J., Wills, M.A., a Belostotsky, D.A. (2000). Poly(A) Tail-dependent Exonuclease AtRrp41p from *Arabidopsis thaliana* Rescues 5.8 S rRNA Processing and mRNA Decay Defects of the Yeast *ski6* Mutant and Is Found in an Exosome-sized Complex in Plant and Yeast Cells. *J. Biol. Chem.* *275*, 33158–33166.
- Chen, X., Goodwin, S.M., Boroff, V.L., Liu, X., a Jenks, M.A. (2003). Cloning and Characterization of the *WAX2* Gene of *Arabidopsis* Involved in Cuticle Membrane and Wax Production. *Plant Cell* *15*, 1170–1185.
- Croteau, R., a Kolattukudy, P.E. (1974). Direct evidence for the involvement of epoxide intermediates in the biosynthesis of the C18 family of cutin acids. *Arch. Biochem. Biophys.* *162*, 471–480.
- Croteau, R., a Kolattukudy, P.E. (1975). Biosynthesis of hydroxyfatty acid polymers: Enzymatic epoxidation of 18-hydroxyoleic acid to 18-hydroxy-cis-9,10-epoxystearic acid by a particulate preparation from spinach (*Spinacia oleracea*). *Arch. Biochem. Biophys.* *170*, 61–72.
- Daniel, X., Lacomme, C., Morel, J.-B., a Roby, D. (1999). A novel *myb* oncogene homologue in *Arabidopsis thaliana* related to hypersensitive cell death. *Plant J.* *20*, 57–66.

- DeBono, A., Yeats, T.H., Rose, J.K.C., Bird, D., Jetter, R., Kunst, L., a Samuels, L. (2009). *Arabidopsis* LTPG Is a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer Protein Required for Export of Lipids to the Plant Surface. *Plant Cell* 21, 1230–1238.
- Domínguez, E., Heredia-Guerrero, J.A., Benítez, J.J., a Heredia, A. (2010). Self-assembly of supramolecular lipid nanoparticles in the formation of plant biopolyester cutin. *Mol. Biosyst.* 6, 948–950.
- Duan, H., a Schuler, M.A. (2005). Differential Expression and Evolution of the *Arabidopsis* CYP86A Subfamily. *Plant Physiol.* 137, 1067–1081.
- Edqvist, J., Blomqvist, K., Nieuwland, J., a Salminen, T.A. (2018). Plant lipid transfer proteins: are we finally closing in on the roles of these enigmatic proteins? *J. Lipid Res.* 59, 1374–1382.
- Edstam, M.M., Blomqvist, K., Eklöf, A., Wennergren, U., a Edqvist, J. (2013). Coexpression patterns indicate that GPI-anchored non-specific lipid transfer proteins are involved in accumulation of cuticular wax, suberin and sporopollenin. *Plant Mol. Biol.* 83, 625–649.
- Fabre, G., Humbel, B.M., a Nawrath, C. (2016). The ABCG transporter PEC1/ABCG32 is required for the formation of the developing leaf cuticle in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 209, 192–201.
- Faure, J.-D., Vittorioso, P., Santoni, V., Fraissier, V., Prinsen, E., Barlier, I., Onckelen, H.V., Caboche, M., a Bellini, C. (1998). The PASTICCINO genes of *Arabidopsis thaliana* are involved in the control of cell division and differentiation. *Development* 125, 909–918.
- Fehling, E., a Mukherjee, K.D. (1991). Acyl-CoA elongase from a higher plant (*Lunaria annua*): metabolic intermediates of very-long-chain acyl-CoA products and substrate specificity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1082, 239–246.
- Fernández, V., Guzmán-Delgado, P., Graça, J., Santos, S., a Gil, L. (2016). Cuticle Structure in Relation to Chemical Composition: Re-assessing the Prevailing Model. *Front. Plant Sci.* 7, 427
- Fiebig, A., Mayfield, J.A., Miley, N.L., Chau, S., Fischer, R.L., a Preuss, D. (2000). Alterations in CER6, a Gene Identical to CUT1, Differentially Affect Long-Chain Lipid Content on the Surface of Pollen and Stems. *Plant Cell* 12, 2001–2008.
- Gendre, D., Oh, J., Boutte, Y., Best, J.G., Samuels, L., Nilsson, R., Uemura, T., Marchant, A., Bennett, M.J., Grebe, M., et al. (2011). Conserved *Arabidopsis* ECHIDNA protein mediates trans-Golgi-network trafficking and cell elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 8048–8053.
- Gidda, S.K., Shockey, J.M., Rothstein, S.J., Dyer, J.M., a Mullen, R.T. (2009). *Arabidopsis thaliana* GPAT8 and GPAT9 are localized to the ER and possess distinct ER retrieval signals: Functional divergence of the dilysine ER retrieval motif in plant cells. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 867–879.
- Lee, H.G., Kim, J., Chung, M.S., a Joon, P.S. (2017). The MIEL1 E3 Ubiquitin Ligase Negatively Regulates Cuticular Wax Biosynthesis in *Arabidopsis* Stems. *Plant Cell Physiol.* 58, 1249–1259.
- Gilding, E.K., a Marks, M.D. (2010). Analysis of purified glabra3-shapeshifter trichomes reveals a role for NOECK in regulating early trichome morphogenic events: Unexpected role for NOK in promoting cell outgrowth. *Plant J.* 64, 304–317.
- Girard, A.-L., Mounet, F., Lemaire-Chamley, M., Gaillard, C., Elmorjani, K., Vivancos, J., Runavot, J.-L., Quemener, B., Petit, J., Germain, V., et al. (2012). Tomato GDSL1 Is Required for Cutin Deposition in the Fruit Cuticle. *Plant Cell* 24, 3119–3134.

- Go, Y.S., Kim, H., Kim, H.J., a Suh, M.C. (2014). *Arabidopsis* Cuticular Wax Biosynthesis Is Negatively Regulated by the *DEWAX* Gene Encoding an AP2/ERF-Type Transcription Factor. *Plant Cell* *26*, 1666–1680.
- Graça, J., Schreiber, L., Rodrigues, J., a Pereira, H. (2002). Glycerol and glyceryl esters of  $\omega$ -hydroxyacids in cutins. *Phytochemistry* *61*, 205–215.
- Graham-Lorence, S., a Peterson, J.A. (1996). P450s: Structural similarities and functional differences. *FASEB J.* *10*, 206–214.
- Greer, S., Wen, M., Bird, D., Wu, X., Samuels, L., Kunst, L., a Jetter, R. (2007). The Cytochrome P450 Enzyme CYP96A15 Is the Midchain Alkane Hydroxylase Responsible for Formation of Secondary Alcohols and Ketones in Stem Cuticular Wax of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *145*, 653–667.
- Guzman-Puyol, S., Benítez, J.J., Domínguez, E., Bayer, I.S., Cingolani, R., Athanassiou, A., Heredia, A., a Heredia-Guerrero, J.A. (2015). Pectin-Lipid Self-Assembly: Influence on the Formation of Polyhydroxy Fatty Acids Nanoparticles. *PLOS ONE* *10*, e0124639.
- Hannoufa, A., McNevin, J., a Lemieux, B. (1993). Epicuticular waxes of *eceriferum* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* *33*, 851–855.
- Harrar, Y., Bellec, Y., Bellini, C., a Faure, J.-D. (2003). Hormonal Control of Cell Proliferation Requires *PASTICCINO* Genes. *Plant Physiol.* *132*, 1217–1227.
- Haslam, T.M., Mañas-Fernández, A., Zhao, L., a Kunst, L. (2012). *Arabidopsis* ECERIFERUM2 Is a Component of the Fatty Acid Elongation Machinery Required for Fatty Acid Extension to Exceptional Lengths. *Plant Physiol.* *160*, 1164–1174.
- Haslam, T.M., Haslam, R., Thoraval, D., Pascal, S., Delude, C., Domergue, F., Fernández, A.M., Beaudoin, F., Napier, J.A., Kunst, L., et al. (2015). ECERIFERUM2-LIKE Proteins Have Unique Biochemical and Physiological Functions in Very-Long-Chain Fatty Acid Elongation. *Plant Physiol.* *167*, 682–692.
- Hegebarth, D., Buschhaus, C., Joubès, J., Thoraval, D., Bird, D., a Jetter, R. (2017). *Arabidopsis* ketoacyl-CoA synthase 16 (KCS16) forms C<sub>36</sub>/C<sub>38</sub> acyl precursors for leaf trichome and pavement surface wax. *Plant Cell Environ.* *40*, 1761–1776.
- Heredia-Guerrero, J.A., Benítez, J.J., a Heredia, A. (2008). Self-assembled polyhydroxy fatty acids vesicles: a mechanism for plant cutin synthesis. *BioEssays* *30*, 273–277.
- Höfer, R., Briesen, I., Beck, M., Pinot, F., Schreiber, L., a Franke, R. (2008). The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP86A1 encodes a fatty acid  $\omega$ -hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis. *J. Exp. Bot.* *59*, 2347–2360.
- Hong, L., Brown, J., Segerson, N.A., Rose, J.K.C., a Roeder, A.H.K. (2017). CUTIN SYNTHASE 2 Maintains Progressively Developing Cuticular Ridges in *Arabidopsis* Sepals. *Mol. Plant* *10*, 560–574.
- Hooker, T.S., Millar, A.A., a Kunst, L. (2002). Significance of the Expression of the CER6 Condensing Enzyme for Cuticular Wax Production in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *129*, 1568–1580.
- Hooker, T.S., Lam, P., Zheng, H., a Kunst, L. (2007). A Core Subunit of the RNA-Processing/Degrading Exosome Specifically Influences Cuticular Wax Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *19*, 904–913.

- Jacq, A., Pernot, C., Martinez, Y., Domergue, F., Payré, B., Jamet, E., Burlat, V., a Pacquit, V.B. (2017). The *Arabidopsis* Lipid Transfer Protein 2 (AtLTP2) Is Involved in Cuticle-Cell Wall Interface Integrity and in Etiolated Hypocotyl Permeability. *Front. Plant Sci.* 8, 263.
- Jakobson, L., Lindgren, L.O., Verdier, G., Laanemets, K., Brosché, M., Beisson, F., a Kollist, H. (2016). BODYGUARD is required for the biosynthesis of cutin in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 211, 614–626.
- Jakoby, M.J., Falkenhan, D., Mader, M.T., Brininstool, G., Wischnitzki, E., Platz, N., Hudson, A., Hülskamp, M., Larkin, J., a Schnittger, A. (2008). Transcriptional Profiling of Mature *Arabidopsis* Trichomes Reveals That *NOECK* Encodes the MIXTA-Like Transcriptional Regulator MYB106. *Plant Physiol.* 148, 1583–1602.
- Jenks, M.A., Tuttle, H.A., Eigenbrode, S.D., a Feldmann, K.A. (1995). Leaf Epicuticular Waxes of the *Eceriferum* Mutants in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 108, 369–377.
- Jessen, D., Roth, C., Wiermer, M., a Fulda, M. (2015). Two Activities of Long-Chain Acyl-Coenzyme A Synthetase Are Involved in Lipid Trafficking between the Endoplasmic Reticulum and the Plastid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 167, 351–366.
- Joubès, J., Raffaele, S., Bordeaux, B., Garcia, C., Laroche-Traineau, J., Moreau, P., Domergue, F., a Lessire, R. (2008). The VLCFA elongase gene family in *Arabidopsis thaliana*: phylogenetic analysis, 3D modelling and expression profiling. *Plant Mol. Biol.* 547–566.
- Kannangara, R., Branigan, C., Liu, Y., Penfield, T., Rao, V., Mouille, G., Höfte, H., Pauly, M., Riechmann, J.L., a Broun, P. (2007). The Transcription Factor WIN1/SHN1 Regulates Cutin Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19, 1278–1294.
- Kawade, K., Li, Y., Koga, H., Sawada, Y., Okamoto, M., Kuwahara, A., Tsukaya, H., a Hirai, M.Y. (2018). The cytochrome P450 CYP77A4 is involved in auxin-mediated patterning of the *Arabidopsis thaliana* embryo. *Development* 145, dev168369.
- Kim, H., Lee, S.B., Kim, H.J., Min, M.K., Hwang, I., a Suh, M.C. (2012). Characterization of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer Protein 2 (LTPG2) and Overlapping Function between LTPG/LTPG1 and LTPG2 in Cuticular Wax Export or Accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 53, 1391–1403.
- Kohlwein, S., Eder, S., Oh, C., Martin, C., Gable, K., Bacikova, D., a Dunn, T. (2001). Tsc13p is required for fatty acid elongation and localizes to a novel structure at the nuclear-vacuolar interface in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 21, 109–125.
- Kolattukudy, P.E., a Walton, T.J. (1972). Structure and biosynthesis of the hydroxy fatty acids of cutin in *Vicia faba* leaves. *Biochemistry* 11, 1897–1907.
- Kong, L., Liu, Y., Zhi, P., Wang, X., Xu, B., Gong, Z., a Chang, C. (2020). Origins and Evolution of Cuticle Biosynthetic Machinery in Land Plants. *Plant Physiol.* 184, 1998–2010.
- Koornneef, M., Hanhart, C.J., a Thiel, F. (1989). A Genetic and Phenotypic Description of *Eceriferum* (*cer*) Mutants in *Arabidopsis thaliana*. *J. Hered.* 80, 118–122.
- Krolikowski, K.A., Victor, J.L., Wagler, T.N., Lolle, S.J., a Pruitt, R.E. (2003). Isolation and characterization of the *Arabidopsis* organ fusion gene HOTHEAD. *Plant J.* 35, 501–511.
- Kumar, V., Saha, D., Thakare, D.R., Jajoo, A., Jain, P.K., Bhat, S.R., a Srinivasan, R. (2017). A part of the upstream promoter region of SHN2 gene directs trichome specific expression in *Arabidopsis thaliana* and heterologous plants. *Plant Sci.* 264, 138–148.

- Kurata, T., Kawabata-Awai, C., Sakuradani, E., Shimizu, S., Okada, K., a Wada, T. (2003). The YORE-YORE gene regulates multiple aspects of epidermal cell differentiation in *Arabidopsis*. *Plant J.* *36*, 55–66.
- Kurdyukov, S., Faust, A., Trenkamp, S., Bär, S., Franke, R., Efremova, N., Tietjen, K., Schreiber, L., Saedler, H., a Yephremov, A. (2006a). Genetic and biochemical evidence for involvement of HOTHEAD in the biosynthesis of long-chain  $\alpha,\omega$ -dicarboxylic fatty acids and formation of extracellular matrix. *Planta* *224*, 315–329.
- Kurdyukov, S., Faust, A., Nawrath, C., Bär, S., Voisin, D., Efremova, N., Franke, R., Schreiber, L., Saedler, H., Métraux, J.-P., et al. (2006b). The Epidermis-Specific Extracellular BODYGUARD Controls Cuticle Development and Morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *18*, 321–339.
- Kwiatkowska, M. (1971). Fine structure of lipotubuloids (elaioplasts) in *Ornithogalum umbellatum*. *Acta Soc. Bot. Pol.* *40*, 451–465.
- Kwiatkowska, M., Polit, J.T., Popłońska, K., Stępiński, D., a Wojtczak, A. (2013). Immunogold method evidences that kinesin and myosin bind to and couple microtubules and actin filaments in lipotubuloids of *Ornithogalum umbellatum* ovary epidermis. *Acta Physiol. Plant.* *35*, 1967–1977.
- Kwiatkowska, M., Wojtczak, A., Popłońska, K., Polit, J.T., Stępiński, D., Domínguez, E., a Heredia, A. (2014). Cutinsomes and lipotubuloids appear to participate in cuticle formation in *Ornithogalum umbellatum* ovary epidermis: EM-immunogold research. *Protoplasma* *251*, 1151–1161.
- Kwiatkowska, M., Polit, J.T., Stępiński, D., Popłońska, K., Wojtczak, A., Domínguez, E., a Heredia, A. (2015). Lipotubuloids in ovary epidermis of *Ornithogalum umbellatum* act as metabolons: suggestion of the name ‘lipotubuloid metabolon.’ *J. Exp. Bot.* *66*, 1157–1163.
- Lai, C., Kunst, L., a Jetter, R. (2007). Composition of alkyl esters in the cuticular wax on inflorescence stems of *Arabidopsis thaliana cer* mutants. *Plant J.* *50*, 189–196.
- Lam, P., Zhao, L., McFarlane, H.E., Aiga, M., Lam, V., Hooker, T.S., a Kunst, L. (2012). RDR1 and SGS3, Components of RNA-Mediated Gene Silencing, Are Required for the Regulation of Cuticular Wax Biosynthesis in Developing Inflorescence Stems of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *159*, 1385–1395.
- Lam, P., Zhao, L., Eveleigh, N., Yu, Y., Chen, X., a Kunst, L. (2015). The Exosome and Trans-Acting Small Interfering RNAs Regulate Cuticular Wax Biosynthesis during *Arabidopsis* Inflorescence Stem Development. *Plant Physiol.* *167*, 323–336.
- Lee, S.B., a Suh, M.C. (2015). Cuticular Wax Biosynthesis is Up-Regulated by the MYB94 Transcription Factor in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* *56*, 48–60.
- Lee, E., Kim, K.Y., Zhang, J., Yamaoka, Y., Gao, P., Kim, H., Hwang, J., Suh, M.C., Kang, B., a Lee, Y. (2021). *Arabidopsis* seedling establishment under waterlogging requires ABCG5-mediated formation of a dense cuticle layer. *New Phytol.* *229*, 156–172.
- Lee, S., Fu, F., Xu, S., Lee, S.Y., Yun, D.-J., a Mengiste, T. (2016). Global regulation of plant immunity by histone lysine methyl transferases. *Plant Cell* *28*, 1640–1661.
- Lee, S.B., Jung, S.-J., Go, Y.-S., Kim, H.-U., Kim, J.-K., Cho, H.J., Park, O.K., a Suh, M.C. (2009a). Two *Arabidopsis* 3-ketoacyl CoA synthase genes, *KCS20* and *KCS2 / DAISY*, are functionally redundant in cuticular wax and root suberin biosynthesis, but differentially controlled by osmotic stress. *Plant J.* *60*, 462–475.

- Lee, S.B., Go, Y.S., Bae, H.-J., Park, J.H., Cho, S.H., Cho, H.J., Lee, D.S., Park, O.K., Hwang, I., a Suh, M.C. (2009b). Disruption of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer Protein Gene Altered Cuticular Lipid Composition, Increased Plastoglobules, and Enhanced Susceptibility to Infection by the Fungal Pathogen *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiol.* *150*, 42–54.
- Li, F., Wu, X., Lam, P., Bird, D., Zheng, H., Samuels, L., Jetter, R., a Kunst, L. (2008). Identification of the Wax Ester Synthase/Acyl-Coenzyme A:Diacylglycerol Acyltransferase WSD1 Required for Stem Wax Ester Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *148*, 97–107.
- Li, R.-J., Li, L.M., Liu, X.L., Kim, J.C., Jenks, M.A., a Lu, S. (2019). Diurnal Regulation of Plant Epidermal Wax Synthesis through Antagonistic Roles of the Transcription Factors SPL9 and DEWAX. *Plant Cell* *31*, 2711–2733.
- Li, S., Wang, X., He, S., Li, J., Huang, Q., Imaizumi, T., Qu, L., Qin, G., Qu, L.-J., a Gu, H. (2016). CFLAP1 and CFLAP2 Are Two bHLH Transcription Factors Participating in Synergistic Regulation of AtCFL1-Mediated Cuticle Development in *Arabidopsis*. *PLOS Genet.* *12*, e1005744.
- Li, Y., Beisson, F., Koo, A.J.K., Molina, I., Pollard, M., and Ohlrogge, J. (2007). Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 18339–18344.
- Li-Beisson, Y., Pollard, M., Sauveplane, V., Pinot, F., Ohlrogge, J., a Beisson, F. (2009). Nanoridges that characterize the surface morphology of flowers require the synthesis of cutin polyester. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 22008–22013.
- Lolle, S.J., Cheung, A.Y., a Sussex, I.M. (1992). *Fiddlehead*: An *Arabidopsis* mutant constitutively expressing an organ fusion program that involves interactions between epidermal cells. *Dev. Biol.* *152*, 383–392.
- Lü, S., Song, T., Kosma, D.K., Parsons, E.P., Rowland, O., a Jenks, M.A. (2009). *Arabidopsis* CER8 encodes LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. *Plant J.* *59*, 553–564.
- Marino, D., Froidure, S., Canonne, J., Ben Khaled, S., Khafif, M., Pouzet, C., Jauneau, A., Roby, D., a Rivas, S. (2013). *Arabidopsis* ubiquitin ligase MIEL1 mediates degradation of the transcription factor MYB30 weakening plant defence. *Nat. Commun.* *4*, 1476.
- Matic, M. (1956). The chemistry of plant cuticles: a study of cutin from *Agave americana* L. *Biochem. J.* *63*, 168–176.
- McFarlane, H.E., Shin, J.J.H., Bird, D.A., a Samuels, A.L. (2010). *Arabidopsis* ABCG Transporters, Which Are Required for Export of Diverse Cuticular Lipids, Dimerize in Different Combinations. *Plant Cell* *22*, 3066–3075.
- McFarlane, H.E., Watanabe, Y., Gendre, D., Carruthers, K., Levesque-Tremblay, G., Haughn, G.W., Bhalarao, R.P., a Samuels, L. (2013). Cell Wall Polysaccharides are Mislocalized to the Vacuole in *echidna* Mutants. *Plant Cell Physiol.* *54*, 1867–1880.
- McFarlane, H.E., Watanabe, Y., Yang, W., Huang, Y., Ohlrogge, J., a Samuels, A.L. (2014). Golgi- and Trans-Golgi Network-Mediated Vesicle Trafficking Is Required for Wax Secretion from Epidermal Cells. *Plant Physiol.* *164*, 1250–1260.
- McNevin, J.P., Woodward, W., Hannoufa, A., Feldmann, K.A., a Lemieux, B. (1993). Isolation and characterization of *eceriferum* (*cer*) mutants induced by T-DNA insertions in *Arabidopsis thaliana*. *Genome* *36*, 610–618.

- Ménard, R., Verdier, G., Ors, M., Erhardt, M., Beisson, F., a Shen, W.-H. (2014). Histone H2B Monoubiquitination is Involved in the Regulation of Cutin and Wax Composition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* *55*, 455–466.
- Millar, A.A., a Kunst, L. (1997). Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. *Plant J.* *12*, 121–131.
- Millar, A.A., Clemens, S., Zachgo, S., Giblin, E.M., Taylor, D.C., a Kunst, L. (1999). CUT1, an *Arabidopsis* Gene Required for Cuticular Wax Biosynthesis and Pollen Fertility, Encodes a Very-Long-Chain Fatty Acid Condensing Enzyme. *Plant Cell* 825–838.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., a Tollervey, D. (1997). The Exosome: A Conserved Eukaryotic RNA Processing Complex Containing Multiple 3'→5' Exoribonucleases. *Cell* *91*, 457–466.
- Morineau, C., Gissot, L., Bellec, Y., Hematy, K., Tellier, F., Renne, C., Haslam, R., Beaudoin, F., Napier, J., a Faure, J.-D. (2016). Dual Fatty Acid Elongase Complex Interactions in *Arabidopsis*. *PLOS ONE* *11*, e0160631.
- Nakano, R.T., Matsushima, R., Ueda, H., Tamura, K., Shimada, T., Li, L., Hayashi, Y., Kondo, M., Nishimura, M., a Hara-Nishimura, I. (2007). GNOM-LIKE1/ERMO1 and SEC24a/ERMO2 Are Required for Maintenance of Endoplasmic Reticulum Morphology in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* *21*, 3672–3685.
- Nugteren, D.H. (1965). The enzymatic chain elongation of fatty acids by rat-liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* *106*, 280–290.
- Oshima, Y., Shikata, M., Koyama, T., Ohtsubo, N., Mitsuda, N., a Ohme-Takagi, M. (2013). MIXTA-Like Transcription Factors and WAX INDUCER1/SHINE1 Coordinately Regulate Cuticle Development in *Arabidopsis* and *Torenia fournieri*. *Plant Cell* *25*, 1609–1624.
- Palade, G.E., a Siekevitz, P. (1956). Liver Microsomes. An Integrated Morphological and Biochemical Study. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *2*, 171–200.
- Panikashvili, D., Savaldi-Goldstein, S., Mandel, T., Yifhar, T., Franke, R.B., Höfer, R., Schreiber, L., Chory, J., a Aharoni, A. (2007). The *Arabidopsis* *DESPERADO/AtWBC11* Transporter Is Required for Cutin and Wax Secretion. *Plant Physiol.* *145*, 1345–1360.
- Panikashvili, D., Shi, J.X., Schreiber, L., a Aharoni, A. (2009). The *Arabidopsis* DCR Encoding a Soluble BAHD Acyltransferase Is Required for Cutin Polyester Formation and Seed Hydration Properties. *Plant Physiol.* *151*, 1773–1789.
- Panikashvili, D., Shi, J.X., Schreiber, L., a Aharoni, A. (2011). The *Arabidopsis* ABCG13 transporter is required for flower cuticle secretion and patterning of the petal epidermis. *New Phytol.* *190*, 113–124.
- Pascal, S., Bernard, A., Sorel, M., Pervent, M., Vile, D., Haslam, R.P., Napier, J.A., Lessire, R., Domergue, F., a Joubès, J. (2013). The *Arabidopsis* *cer26* mutant, like the *cer2* mutant, is specifically affected in the very long chain fatty acid elongation process. *Plant J.* *73*, 733–746.
- Pascal, S., Bernard, A., Deslous, P., Gronnier, J., Fournier-Goss, A., Domergue, F., Rowland, O., a Joubès, J. (2019). *Arabidopsis* CER1-LIKE1 Functions in a Cuticular Very-Long-Chain Alkane-Forming Complex. *Plant Physiol.* *179*, 415–432.
- Philippe, G., Gaillard, C., Petit, J., Geneix, N., Dalgalarrodo, M., Bres, C., Mauxion, J.-P., Franke, R., Rothan, C., Schreiber, L., et al. (2016). Ester Cross-Link Profiling of the Cutin Polymer of Wild-Type

and Cutin Synthase Tomato Mutants Highlights Different Mechanisms of Polymerization. *170*, 807–820.

Philippe, G., Geneix, N., Petit, J., Guillon, F., Sandt, C., Rothan, C., Lahaye, M., Marion, D., a Bakan, B. (2020). Assembly of tomato fruit cuticles: a cross-talk between the cutin polyester and cell wall polysaccharides. *New Phytol.* *226*, 809–822.

Pighin, J.A. (2004). Plant Cuticular Lipid Export Requires an ABC Transporter. *Science* *306*, 702–704.

Pineau, E., Xu, L., Renault, H., Trolet, A., Navrot, N., Ullmann, P., Légeret, B., Verdier, G., Beisson, F., a Pinot, F. (2017). *Arabidopsis thaliana* EPOXIDE HYDROLASE1 (AtEH1) is a cytosolic epoxide hydrolase involved in the synthesis of poly-hydroxylated cutin monomers. *New Phytol.* *215*, 173–186.

Pollard, M.R., McKeon, T., Gupta, L.M., a Stumpf, P.K. (1979). Studies on Biosynthesis of Waxes by Developing Jojoba Seed. II. The Demonstration of Wax Biosynthesis by Cell-Free Homogenates. *Lipids* *14*, 651–662.

Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., a Ohlrogge, J.B. (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci* *13*, 236–246.

Pruitt, R.E., Vielle-Calzada, J.-P., Ploense, S.E., Grossniklaus, U., a Lolle, S.J. (2000). FIDDLEHEAD, a gene required to suppress epidermal cell interactions in *Arabidopsis*, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 1311–1316.

Raffaele, S., Vaillieu, F., Léger, A., Joubès, J., Miersch, O., Huard, C., Blée, E., Mongrand, S., Domergue, F., a Roby, D. (2008). A MYB Transcription Factor Regulates Very-Long-Chain Fatty Acid Biosynthesis for Activation of the Hypersensitive Cell Death Response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *20*, 752–767.

Rani, S.H., Krishna, T.H.A., Saha, S., Negi, A.S., a Rajasekharan, R. (2010). Defective in Cuticular Ridges (DCR) of *Arabidopsis thaliana*, a Gene Associated with Surface Cutin Formation, Encodes a Soluble Diacylglycerol Acyltransferase. *J. Biol. Chem.* *285*, 38337–38347.

Richter, S., Geldner, N., Schrader, J., Wolters, H., Stierhof, Y.-D., Rios, G., Koncz, C., Robinson, D.G., a Jürgens, G. (2007). Functional diversification of closely related ARF-GEFs in protein secretion and recycling. *Nature* *448*, 488–492.

Riley, R.G., a Kolattukudy, P.E. (1975). Evidence for Covalently Attached *p*-Coumaric Acid and Ferulic Acid in Cutins and Suberins. *Plant Physiol.* *56*, 650–654.

Rowland, O., Zheng, H., Hepworth, S.R., Lam, P., Jetter, R., a Kunst, L. (2006). CER4 Encodes an Alcohol-Forming Fatty Acyl-Coenzyme A Reductase Involved in Cuticular Wax Production in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *142*, 866–877.

Rupasinghe, S.G., Duan, H., and Schuler, M.A. (2007). Molecular definitions of fatty acid hydroxylases in *Arabidopsis thaliana*. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* *68*, 279–293.

Sauveplane, V., Kandel, S., Kastner, P.-E., Ehltig, J., Compagnon, V., Werck-Reichhart, D., a Pinot, F. (2009). *Arabidopsis thaliana* CYP77A4 is the first cytochrome P450 able to catalyze the epoxidation of free fatty acids in plants. *FEBS J.* *276*, 719–735.

Schnurr, J., Shockey, J., a Browse, J. (2004). The Acyl-CoA Synthetase Encoded by *LACS2* Is Essential for Normal Cuticle Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *16*, 629–642.

- Segado, P., Heredia-Guerrero, J.A., Heredia, A., a Domínguez, E. (2020). Cutinsomes and CUTIN SYNTHASE1 Function Sequentially in Tomato Fruit Cutin Deposition. *Plant Physiol.* *183*, 1622–1637.
- Seo, P.J., Xiang, F., Qiao, M., Park, J.-Y., Lee, Y.N., Kim, S.-G., Lee, Y.-H., Park, W.J., a Park, C.-M. (2009). The MYB96 Transcription Factor Mediates Abscisic Acid Signaling during Drought Stress Response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *151*, 275–289.
- Seo, P.J., Lee, S.B., Suh, M.C., Park, M.-J., Go, Y.S., a Park, C.-M. (2011). The MYB96 Transcription Factor Regulates Cuticular Wax Biosynthesis under Drought Conditions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *23*, 1138–1152.
- Shi, J.X., Malitsky, S., De Oliveira, S., Branigan, C., Franke, R.B., Schreiber, L., a Aharoni, A. (2011). SHINE Transcription Factors Act Redundantly to Pattern the Archetypal Surface of *Arabidopsis* Flower Organs. *PLoS Genet.* *7*, e1001388.
- Shi, L., Dean, G.H., Zheng, H., Meents, M.J., Haslam, T.M., Haughn, G.W., a Kunst, L. (2019). ECERIFERUM11/C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE2 Affects Secretory Trafficking. *Plant Physiol.* *181*, 901–915.
- Shin, D.H., Lee, J.Y., Hwang, K.Y., Kyu Kim, K., a Suh, S.W. (1995). High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings. *Structure* *3*, 189–199.
- Soliday, C.L., a Kolattukudy, P.E. (1977). Biosynthesis of Cutin.  $\omega$ -Hydroxylation of Fatty Acids by a Microsomal Preparation from Germinating *Vicia faba*. *Plant Physiol.* *59*, 1116–1121.
- Stępiński, D., Kwiatkowska, M., Popłońska, K., Polit, J.T., Wojtczak, A., Domínguez, E., a Heredia, A. (2016). Cutinsomes and cuticle enzymes GPAT6 and DGAT2 seem to travel together from a lipotubuloid metabolon (LM) to extracellular matrix of *O. umbellatum* ovary epidermis. *Micron* *85*, 51–57.
- Stępiński, D., Kwiatkowska, M., Wojtczak, A., Domínguez, E., Heredia, A., a Popłońska, K. (2017). Cutinsomes as building-blocks of *Arabidopsis thaliana* embryo cuticle. *Physiol. Plant.* *161*, 560–567.
- Sterk, P., Booji, H., Schellekens, G.A., Van Kammen, A., a De Vries, S.C. (1991). Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* *3*, 907–921.
- Todd, J., Post-Beittenmiller, D., a Jaworski, J.G. (1999). KCS1 encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* *17*, 119–130.
- Verrier, P.J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, Ü., Lee, Y., Martinoia, E., et al. (2008). Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci* *13*, 151–159.
- Walton, T., a Kolattukudy, P. (1972). Enzymatic conversion of 16-hydroxypalmitic acid into 10,16-dihydroxypalmitic acid in *Vicia faba* epidermal extracts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *46*, 16–21.
- Wang, T., Xing, J., Liu, X., Yao, Y., Hu, Z., Peng, H., Xin, M., Zhou, D.-X., Zhang, Y., a Ni, Z. (2018). GCN5 contributes to stem cuticular wax biosynthesis by histone acetylation of CER3 in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* *69*, 2911–2922.
- Wattendorff, J., a Holloway, P.J. (1980). Studies on the Ultrastructure and Histochemistry of Plant Cuticles: The Cuticular Membrane of *Agave americana* L. *in situ*. *Ann. Bot.* *46*, 13–28.

- Wellesen, K., Durst, F., Pinot, F., Benveniste, I., Nettesheim, K., Wisman, E., Steiner-Lange, S., Saedler, H., a Yephremov, A. (2001). Functional analysis of the LACERATA gene of *Arabidopsis* provides evidence for different roles of fatty acid  $\omega$ -hydroxylation in development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 9694–9699.
- Weng, H., Molina, I., Shockey, J., a Browse, J. (2010). Organ fusion and defective cuticle function in a *lacs1 lacs2* double mutant of *Arabidopsis*. *Planta* *231*, 1089–1100.
- Wu, R., Li, S., He, S., Waßmann, F., Yu, C., Qin, G., Schreiber, L., Qu, L.-J., a Gu, H. (2011). CFL1, a WW Domain Protein, Regulates Cuticle Development by Modulating the Function of HDG1, a Class IV Homeodomain Transcription Factor, in Rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell* *23*, 3392–3411.
- Xiao, F., Goodwin, S.M., Xiao, Y., Sun, Z., Baker, D., Tang, X., Jenks, M.A., a Zhou, J.-M. (2004). *Arabidopsis* CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. *EMBO J.* *23*, 2903–2913.
- Xin, A., a Herburger, K. (2021). Mini Review: Transport of Hydrophobic Polymers Into the Plant Apoplast. *Front. Plant Sci.* *11*, 590990.
- Xu, Y., Liu, S., Liu, Y., Ling, S., Chen, C., a Yao, J. (2017). HOTHEAD-Like HTH1 is Involved in Anther Cutin Biosynthesis and is Required for Pollen Fertility in Rice. *Plant Cell Physiol.* *58*, 1238–1248.
- Yang, S.U., Kim, H., Kim, R.J., Kim, J., a Suh, M.C. (2020a). AP2/DREB Transcription Factor RAP2.4 Activates Cuticular Wax Biosynthesis in *Arabidopsis* Leaves Under Drought. *Front. Plant Sci.* *11*, 895.
- Yang, W., Pollard, M., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Feig, M., a Ohlrogge, J. (2010). A distinct type of glycerol-3-phosphate acyltransferase with sn-2 preference and phosphatase activity producing 2-monoacylglycerol. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 12040–12045.
- Yang, X., Zhao, H., Kosma, D.K., Tomasi, P., Dyer, J.M., Li, R., Liu, X., Wang, Z., Parsons, E.P., Jenks, M.A., et al. (2017). The Acyl Desaturase CER17 Is Involved in Producing Wax Unsaturated Primary Alcohols and Cutin Monomers. *Plant Physiol.* *173*, 1109–1124.
- Yang, X., Feng, T., Li, S., Zhao, H., Zhao, S., Ma, C., Jenks, M.A., a Lü, S. (2020b). CER16 Inhibits Post-Transcriptional Gene Silencing of *CER3* to Regulate Alkane Biosynthesis. *Plant Physiol.* *182*, 1211–1221.
- Yeats, T.H., Martin, L.B.B., Viart, H.M.-F., Isaacson, T., He, Y., Zhao, L., Matas, A.J., Buda, G.J., Domozych, D.S., Clausen, M.H., et al. (2012). The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nat. Chem. Biol.* *8*, 609–611.
- Yeats, T.H., Huang, W., Chatterjee, S., Viart, H.M.-F., Clausen, M.H., Stark, R.E., a Rose, J.K.C. (2014). Tomato Cutin Deficient 1 (CD1) and putative orthologs comprise an ancient family of cutin synthase-like (CUS) proteins that are conserved among land plants. *Plant J.* *77*, 667–675.
- Yephremov, A., Wisman, E., Huijser, P., Huijser, C., Wellesen, K., a Saedler, H. (1999). Characterization of the FIDDLEHEAD Gene of *Arabidopsis* Reveals a Link between Adhesion Response and Cell Differentiation in the Epidermis. *Plant Cell* *11*, 2187–2201.
- Zhang, P., Wang, R., Yang, X., Ju, Q., Li, W., Lü, S., Tran, L.P., a Xu, J. (2020). The R2R3-MYB transcription factor AtMYB49 modulates salt tolerance in *Arabidopsis* by modulating the cuticle formation and antioxidant defence. *Plant Cell Environ.* *43*, 1925–1943.

Zhao, L., a Kunst, L. (2016). SUPERKILLER complex components are required for the RNA exosome-mediated control of cuticular wax biosynthesis in Arabidopsis inflorescence stems. *Plant Physiol.* *171*, 960–973.

Zhao, L., Haslam, T.M., Sonntag, A., Molina, I., a Kunst, L. (2019). Functional Overlap of Long-Chain Acyl-CoA Synthetases in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* *60*, 1041–1054.

Zheng, H., Rowland, O., a Kunst, L. (2005). Disruptions of the Arabidopsis Enoyl-CoA Reductase Gene Reveal an Essential Role for Very-Long-Chain Fatty Acid Synthesis in Cell Expansion during Plant Morphogenesis. *Plant Cell* *17*, 1467–1481.

Zhu, X., Tellier, F., Gu, Y., a Li, S. (2020). Disruption of Very-Long-Chain-Fatty Acid Synthesis Has an Impact on the Dynamics of Cellulose Synthase in Arabidopsis thaliana. *Plants* *9*.

**Sekundární citace:**

von Mohl, H. (1847). Untersuchungen der Frage: bildet die cellulose die grundlage sammtlicher vegetabilischen membranen. *Bot. Zeit.* *5*, 497–505, citováno dle Fernández, V., Guzmán-Delgado, P., Graça, J., Santos, S., a Gil, L. (2016). Cuticle Structure in Relation to Chemical Composition: Re-assessing the Prevailing Model. *Front. Plant Sci.* *7*, 427