

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Veronika Litkeiová

Kutikula, její tvorba a význam v rezistenci rostlin k abiotickému stresu
Cuticle, its formation and importance in resistance of plants to abiotic stress

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Michal Hála, Ph.D.

Praha, 2019

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli RNDr. Michalu Hálovi, Ph.D. za jeho trpělivost, ochotu, čas a odborné vedení během zpracování bakalářské práce.

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,

Podpis

Abstrakt

Rostliny jsou denně vystavovány stresu, ať už se jedná o ten biotický, či abiotický. Oba typy stresu můžeme dále rozdělit do několika podskupin. Tato práce je zaměřena na rostlinnou kutikulu, její tvorbu a funkci ve vztahu k rezistenci k abiotickému stresu, mezi jehož hlavní faktory patří sucho a teplo, ultrafialové záření, nadměrné zasolení a zaplavení, či působení ozonu a těžkých kovů na rostlinu. Jednotlivé kapitoly jsou zaměřeny na složení, biosyntézu a změny ve stavbě kutikuly zapříčiněné působením uvedených typů stresorů. Významná část práce je věnována kutinu a kutikulárním voskům, které hrají podstatnou roli v ochraně rostliny a jejichž struktura je ovlivňována abiotickým stresem. Nejsou opomenuty ani fytohormony, především kyselina abscisová, která zde má též své uplatnění. V závěrečné fázi práce jsou zmíněni kutikulární mutanti v souvislosti s druhy abiotických stresů, na kterých je ukázána důležitost kutikulární vrstvy.

Klíčová slova: rostliny, kutikula, osmotický stres, kyselina abscisová, kutin, vosky

Abstract

Plants are daily exposed to stress, biotic or abiotic. Both of these types can be divided into several subgroups. This work is focused on plant cuticle, its formation and function in respect to abiotic stress resistance. The main factors, mentioned in this work, are drought, heat, UV radiation, excessive salinity or ozone exposure. The individual chapters focus on the composition, biosynthesis and changes in the build-up construction caused by certain types of stressors. A significant part is also devoted to cutin and cuticular waxes, which play an important role in plant protection and whose structure is also affected by abiotic stress. Phytohormones, especially abscisic acid, which had its application here, are also not omitted. In the final phase of the thesis, cuticular mutants are mentioned in connection with abiotic stress types illustrating the role and the importance of the cuticle layer.

Key words: plants, cuticle, osmotic stress, abscisic acid, cutin, waxes

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Kutikula.....	2
2.1	Kutikulární komponenty.....	3
2.1.1	Kutikulární vosky.....	3
2.1.1.1	Efekt štírovníku (tzv. Lotus efekt).....	4
2.1.2	Kutin.....	5
2.1.3	Kutan.....	5
2.2	Biosyntéza kutikuly.....	6
2.3	Kutikulární transpirace.....	7
2.4	Kutikula vyskytující se u ovoce.....	8
3	Stres.....	9
3.1	Hlavní druhy abiotického stresu, v nichž je kutikula zapojena.....	10
3.1.1	Osmotický stres.....	10
3.1.1.1	Hlavní příčiny osmotického stresu.....	10
3.1.1.1.1	Zasolení.....	10
3.1.1.1.2	Sucho.....	10
3.1.1.1.3	Oxidační stres.....	11
3.1.1.1.4	UV záření.....	11
3.1.1.1.5	Ozon (O ₃).....	12
3.2	Faktory ovlivňující zapojení kutikuly do odpovědi rostlin na abiotické stresy.....	12
3.2.1	Kyselina abscisová (ABA).....	12
3.2.2	Sucho a nadměrná teplota.....	13
3.2.3	Chlad.....	13
3.2.4	Zasolení.....	13
3.2.4.1	Solné žlázy.....	14
3.2.5	UV záření.....	14
3.2.6	Ozon.....	15
4	Kutikulární mutanti.....	15
4.1	Mutace modifikující kutikulu v souvislosti s druhy abiotického stresu.....	15
4.1.1	Acyl-CoA-binding protein (ACBP).....	15
4.1.2	Mutanti široku dvoubarevného (<i>Sorghum bicolor</i>).....	16
4.1.3	Kukuřičný (<i>Zea mays</i>) mutant glossy6 (gl6).....	16
4.1.4	Homologní gen OsGlossy1-3 (OsGL1-3) v rýži (<i>Oryza sativa</i>).....	16
4.1.5	WRKY transkripční faktor.....	17
4.1.6	MYB transkripční faktor.....	17
4.1.6.1	AtMYB41 transkripční faktor.....	18

4.1.7	NFXL2 (NFX1-LIKE2) gen.....	18
4.1.8	Rodina proteinů SHINE (SHN).....	18
4.1.9	Mutace genu WAX2.....	19
4.1.10	Glycerol-3-fosfát-acyltransferáza 6 (GPAT6)	19
4.1.11	Eceriferum (CER)	20
4.1.12	MAX2 (More Axillary Growth2).....	20
4.1.13	Gen CBP80.....	20
4.1.14	Fatty acyl-coenzyme A reduktázy (FAR)	21
4.1.15	Mutant ječmene eibi1	21
4.1.16	Gen rýže Drought-Induced Wax Accumulation 1 (DWA1)	21
4.1.17	Acyl-CoA syntetázy s dlouhými řetězci (LACS).....	22
4.1.18	Sensitive to freezing 3 (sfr3) mutace.....	22
4.1.19	Wilted Dwarf and Lethal 1 (wdl1) mutace.....	22
5	Závěr	23
6	Literatura.....	25

Seznam použitých zkratk

ABA	kyselina abscisová
ABC transportér	ATP-binding cassette transporter
ABH	ABA citlivý protein (Abscisic Acid Hypersensitive)
ACP	Acyl carrier protein (transportní protein)
ACBP	Acyl-CoA-binding protein
BDG	Bodyguard protein
bm	bezkvětý (bloomless)
BS	buněčná stěna
CAM	metabolismus tučnolistých rostlin (Crassulacean acid metabolism)
CER	eceriferum
CoA	koenzym A
CBP	pozitivně vázající protein (cap-binding protein)
DWA	Drought-Induced Wax Accumulation
EBL	24-epibrasinolid
ECR	Trans-2-enoyl-CoA reductáza
ER	endoplazmatické retikulum
FA	mastné kyseliny (fatty acid)
FAE	elongáza mastných kyselin (fatty acid elongase)
FAR	fatty acyl-coenzyme A reductázy
FAS	syntáza mastných kyselin (fatty acid synthase)
GA	Golgiho aparát
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
gl	glossy mutant
GPAT	glycerol-3-phosphate acyltransferase
KCR	3-ketoacyl koenzym A reductáza
KCS	3-ketoacyl koenzym A syntáza
LACS	long-chain acyl-CoA syntetáza
LTP	lipid transfer protein
MAX2	more axillary growth2 (vice axilárního růstu)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MEP	plastidová dráha 2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfátu
MYB	transkripční faktor z rodiny myeloblastózy

NCED	9-cis-epoxykarotenoid dioxygenáza
NFXL2	NFX1-LIKE2 gen
PAR	fotosynteticky aktivní sluneční záření
PAS2	3-hydroxyacyl-CoA dehydratáza
PCD	programovaná buněčná smrt
PM	plazmatická membrána
ROS	reaktivní formy kyslíku
SHN	SHINE protein
SOS	Salt-Overly-Sensitive
srf	sensitive to freezing mutace
T-DNA	Transferová DNA
UV	ultrafialové záření
VLC	velmi dlouhý řetězec
VLCFA	velmi dlouhé řetězce mastných kyselin (very-long-chain fatty acid)
WDL	Wilted Dwarf and Lethal mutace
WUE	efektivita využití vody (water use efficiency)

1 Úvod

Stres je běžnou součástí života rostlin. V současné době jsou na ně však kladeny čím dál větší nároky. To se týká především kulturních plodin, jejichž spotřeba je stále vyšší, avšak životní podmínky ne úplně ideální. Dochází k nadměrnému hnojení, tudíž se do půdy dostává přílišné množství dusičnanů. Rostliny jsou též vysazovány ve velkém množství na malých plochách a za běžných okolností, nebýt genetických modifikací, by byly nuceny kompetovat o zdroj slunečního záření, s čímž by souvisely i jejich nižší výnosy. Aktuálním problémem jsou též globální změny podnebí a s nimi spojené vysoké teploty a sucho, na které není většina rostlin přizpůsobena. Všechny tyto působící stresory můžeme rozdělit do dvou skupin, na stresy biotické – interakce s živými organismy, a abiotické – fyzikální a chemické povahy.

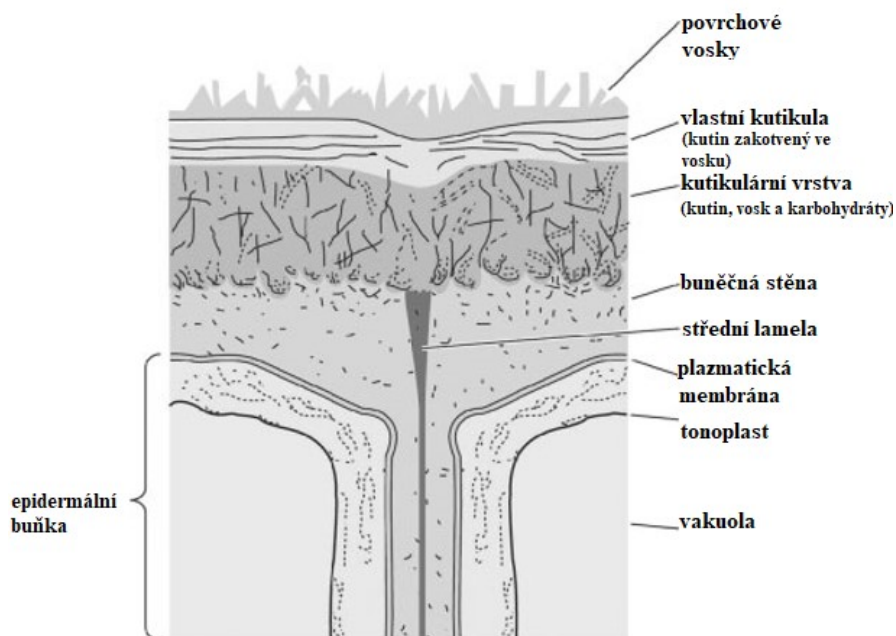
Všem těmto stresovým faktorům se snaží rostlina bránit. Jelikož nemůže z nevhodného místa odejít, musí si poradit jinak. Stejně jako stresy, můžeme i způsob obrany rozdělit do dvou skupin. Na náhlé či krátkodobé změny reaguje rostlina aklimací, nedědičnými změnami na úrovni fenotypu, které jí umožní přežít nepříznivé podmínky. Dalším způsobem ochrany je adaptace. Ta většinou zahrnuje modifikaci existujících genů, jejich ztráty či získání genů nových, je tedy příkladem evolučních úprav a následných změn (Procházka, 1998).

Rostlinám v jejich ochraně napomáhá, kromě jiného, svrchní vrstva jejich těla nacházející se nad epidermis. Jedná se o kutikulu a s ní spjaté kutikulární vosky. Obě tyto struktury zamezují unikání metabolitů z vnitřních částí rostlin, chrání před nadměrným výparem či vnikáním škodlivých látek z prostředí. Působením odlišných stresorů může docházet k expresím daných genů a tím i k modifikaci obou struktur. Ty mohou být ovlivňovány kladně, jejich resistance vůči danému stresovému faktoru se tedy zlepší, či mohou být naopak negativní povahy.

Cílem práce je proto poukázat na důležitost rostlinné kutikuly, jakožto nejsvrchnější vrstvy nadzemních částí rostlin, hrající významnou roli v jejich ochraně před všemi druhy stresů. Představíme si hlavní abiotické stresory, s jejichž působením souvisí specifické modifikace a vlastnosti kutikuly a jejích kompartmentů.

2 Kutikula

Kutikula je anatomická struktura, které náleží mnoho funkcí nezbytných pro život rostlin. Je složená z kutin a polymorfních lipidů neboli vosků, které se vyskytují na rozhraní mezi prostředím a rostlinou a tvoří hydrofobní bariéru.



Obr. 1: Schématické znázornění struktury rostlinné kutikuly.

Převzato a upraveno z (Taiz & Zeiger, 2003).

V literatuře byl její název poprvé použit roku 1834, a to Alexandrem Brongniartem, který takto označil svrchní vrstvu izolovanou z listu zelí. List otáčel ve vodě a následně separovanou kutikulu obarvil sudanovým barvivem, díky čemuž zjistil, že obsahuje mastné částice (Riederer & Muller, 2006).

Kutikula se nachází na vnějším povrchu epidermálních buněk nadzemních částí rostlin. Zde je založena *de novo* během vývoje embrya, následně roste souběžně s rostlinou a slouží jako bariéra mezi prostředím a vnitřními strukturami rostliny. Během vývoje se její vlastnosti a struktura mění vlivem environmentálních a vývojových faktorů a u sekundárně ztloustlých orgánů je nahrazena korkem. Chrání také před škůdci a patogeny, které nevstupují do rostliny rankami či průduchy. Bylo však prokázáno, že houbové patogeny jsou schopné narušit strukturu kutikuly pomocí kombinace enzymatických

degradací. Produkují totiž kutinázy, které hydrolyzují kutinový polyester a uvolňují volné monomery kutinu (Longhi & Cambillau, 1999; Yeats & Rose, 2013).

Kutikula je charakterizována postranní a příčnou heterogenitou. Ta je podmíněna tím, že na vnějším povrchu jsou kutikulární vosky a na vnitřním polymery kutinu (Schreiber & Schönherr, 2009). U listu se nachází na adaxiální i abaxiální straně, dodává formu stomatálním otvorům a kryje epidermis buněk tvořících substomatální dutiny, byť ne všech rostlinných druhů (Riederer & Muller, 2006). Kutikula a epidermis přenášejí 20 - 40x více vody než CO₂ (Boyer, 2015). Kutikula pokrývající průduchy, antiklinální buněčné stěny a trichomy je více propustná vůči polárním sloučeninám, jako jsou ionty a barviva, ve srovnání s ostatními pokrytými částmi rostlinného těla (Schlegel et al., 2005; Schönherr, 2006).

U trichomů se často shromažďují sekrety, což mohou být sekundární metabolity typu silic, éterických olejů, terpenoidů a dalších, a uvolňují se až po narušení kutikuly. Tyto trichomy se nejčastěji vyskytují u čeledi hluchavkovitých. Mladé orgány jsou schopné svou kutikulu po sekreci regenerovat (Votrubová, 2010).

Kutikula kryje také povrch různých plodů. Zkoumá se hlavně u ovoce jako je například jablko či rajče.

2.1 Kutikulární komponenty

2.1.1 Kutikulární vosky

Nynější vědění o kutikulárních voscích je výsledkem více než 80 let výzkumů. První zmínka pochází z 20. let 19. století, kdy Edith Clenshaw a Ida Smedley-Maclean izolovali C₃₁ alkan *n*-hentriakontan ze špenátu (Riederer & Muller, 2006).

Vosková složka se skládá především z dlouhých řetězců mastných kyselin (VLCFA) (C₂₀ – C₃₄), jejichž syntéza probíhá v endoplazmatickém retikulu (ER). Dále zahrnuje také aldehydy, alkany, primární a sekundární alkoholy, estery a ketony (Shepherd & Griffiths, 2006; Bernard & Joubès, 2013). Složení vosků se může částečně lišit během ontogeneze, mezi druhy či vlivem odlišných životních podmínek. Příkladem odlišného složení během ontogeneze je list kukuřice, jehož kutikula ve fázi semenáčku obsahuje až 63 % volného C_{32:0} primárního alkoholu, zatímco u zralého listu tvoří větší část estery vosků mastných kyselin. (Bianchi et al., 1985). U některých druhů mohou být podstatnými komponenty kutikulárních vosků i různé sekundární metabolity, například pentacyklické triterpenoidy, flavonoidy a tokoferoly (Jetter et al., 2006, 2018; Yeats & Rose, 2013).

Vosky lze rozdělit do dvou skupin, které se od sebe kompozičně liší - epikutikulární a intrakutikulární. Epikutikulární vosky se ukládají na vnějším povrchu kutikuly a tvoří rozmanité struktury, kterými mohou být tyčinky, vlákna, šupiny či zrna (Votrubová, 2010). V epikutikulární vrstvě se nejčastěji hromadí alkany a volné mastné kyseliny, zatímco v té intrakutikulární mají tendenci hromadit se dlouhé řetězce alifatických voskových složek a primární alkoholy (Buschhaus & Jetter, 2011). Dále, pod epikutikulární vrstvou, se nachází vlastní kutikula, která je tvořena trojrozměrnou kutinovou a kutanovou matrix s vloženými intrakutikulárními vosky, ve kterých je kutan zakotvený (Jenks & Hasegawa, 2005). Nynější stav výzkumu ukazuje, že intrakutikulární vosky, spíše než ty extrakutikulární, jsou hlavními determinanty v propustnosti kutikuly. Tvoří se zde systém dutinek, kterými voda uniká do atmosféry.

Biosyntéza vosků začíná v plastidech epidermálních buněk *de novo* biosyntézou mastných kyselin C16 nebo C18, které jsou poté přenášeny do ER. Detailní mechanismus přenosu mastných kyselin z chloroplastu do ER zůstává neznámý, stejně jako jejich následný transport z ER na plazmatickou membránu (PM), u kterého ale existují dvě možné hypotézy. Jednou z nich je, že by mohly být voskové komponenty přenášeny prostřednictvím míst apozice ER domén s protoplazmatickou, tedy vnitřní (cytosolickou), plochou plazmatické membrány přímo do PM. Druhá hypotéza říká, že by mohly být tyto voskové komponenty přepravovány pomocí vezikulů z ER do Golgiho aparátu (GA) a následně na PM. Dále musejí projít skrz PM a přesunout se přes periklinální buněčnou stěnu (BS) do kutikuly. U druhé hypotézy je jisté částečné zapojení vezikulárního transportu kutikulárních lipidů z ER do GA (Kunst & Samuels, 2009; Yeats & Rose, 2013). Existují i takzvané lipidové transportní proteiny (LTP), které se nacházejí v buněčné stěně, což naznačuje, že mohou být zapojeny do sekrece vosku (Jenks & Hasegawa, 2005). Publikovaná data také ukazují, že LTP hrají roli nejen při syntéze vosků, ale i suberinu a sporopoleninu (Salminen et al., 2016).

2.1.1.1 Efekt štírovníku (tzv. Lotus efekt)

U mnoha rostlinných druhů se vyskytuje tzv. samočistící mechanismus. Nejlépe je pozorovatelný na listech štírovníku, díky čemuž získal tento efekt svůj název. Jedná se o epikutikulární mikrostruktury v podobě papil pokrytých voskovými krystaly a záhybů kutikuly, které napomáhají čištění povrchu rostlin. Tento nerovný povrch poskytuje jen malé kontaktní plochy, které redukují Van der Waalsovské interakce, jež jsou zodpovědné za přilnavost vody k plochému povrchu (Nun & Oles, 2002; Ensikat et al., 2011). Tímto rostliny předcházejí usazování prachu a nečistot, které by mohly bránit pronikání slunečního záření

k rostlině, a tím zpomalovat fotosyntézu. Možnou roli hraje také při zbavování se patogenů, než se stihnou namnožit. Tento efekt se dále vyskytuje například u lichořeřišnice (*Tropaeolum*), opuncie (*Opuntia*) či kontryhelu (*Alchemilla*) (Neinhuis & Barthlott, 1997; Yeats & Rose, 2013).

2.1.2 Kutin

Tato složka rostlinné kutikuly tvoří kostru zbylým kutikulárním součástí. Zaujímá 40-80 % hmotnosti kutikuly a je tvořen polyestery C16 a C18 mastných kyselin a glycerolu transportovaných do buněčné stěny. Jeho složení, a tím pádem i vlastnosti kutikuly, se liší podle konkrétních požadavků pletiva nebo rostlinných druhů (Domínguez et al., 2015). Směrem k vnitřní straně kutikuly je kutinový polymer pravděpodobně kovalentně vázán na sacharidy vnější stěny epidermálních buněk (Valeska Zeisler-Diehl et al., 2017).

Biosyntéza kutinu není příliš známá, například u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) se jí musí účastnit protein Bodyguard (BDG), jehož mutanti jsou přecitlivější vůči osmotickému stresu a při těchto podmínkách akumulují nižší hladiny kyseliny abscisové (ABA) (Wang et al., 2011; Jakobson et al., 2016).

Navzdory své všudypřítomnosti u suchozemských rostlin není kutin snadno využitelný jako průmyslový materiál. Může za to jeho špatná rozpustnost a chybějící teplota tání. Jedná se tedy o termosetický polymer. Tento polymer tvoří trojrozměrnou síť, kterou již není možné dále přetvářet. V posledních letech však bylo vyvinuto několik technologií pro získávání kutinových monomerů ze zemědělských odpadů, z kterých by bylo nejlepší tvořit obalové materiály. (Heredia-Guerrero et al., 2017).

2.1.3 Kutan

Alifatický nedegradovatelný biopolymer, dříve známý jen z řemenatky červené a agáve americké, byl izolován z listové kutikuly několika na sucho adaptovaných rostlin. U všech těchto rostlin se vyskytují sukulentní listy se silnou kutikulou a specifický způsob prefixace atmosférického oxidu uhličitého pro fotosyntézu (CAM). Identifikace složení kutanu byla umožněna využitím chemické extrakce, následované pyrolýzní plynovou chromatografií (GC) a hmotnostní spektrometrií (MS). U některých rostlin obsahoval například aromatické sloučeniny a větší množství C31 a C33 *n*-alkanů. Tyto dlouhé řetězce alkanů a alkenů (až do C33) se ukázaly být podstatnou částí struktury kutanu (Boom et al., 2005).

Pyrolýza fosilních listů často ukazuje podobné distribuční vzorce *n*-alkanů a *n*-alkenů jako kutanová pyrolýza. Toto zjištění naznačuje, že kutan je důležitou součástí listů fosilních rostlin. Tento důkaz dává také najevo to, že nejde o vzácný biopolymer, ale že se jedná o fyziologickou adaptaci na přežívání sucha. Neměl by tedy být zaměňován s kutinem, který je polyester, zatímco kutan je uhlovodíkový polymer (Nip et al., 1986; Boom et al., 2005).

2.2 Biosyntéza kutikuly

Kutikula se tvoří jak na vegetativních částech rostlin, tak na semenech, květech a ovoci (Jessen et al., 2011). Její syntéza začíná v raných stádiích vývoje rostlin. Konstantní voskový povrch se začíná tvořit v pozdním globulárním stádiu vývoje embrya huseníčku, stejně jako depozice kutinu (Tanaka et al., 2002; Szczuka & Szczuka, 2003; Suh et al., 2005).

Biosyntéza a akumulace kutikuly mohou být rozděleny do 4 fází.

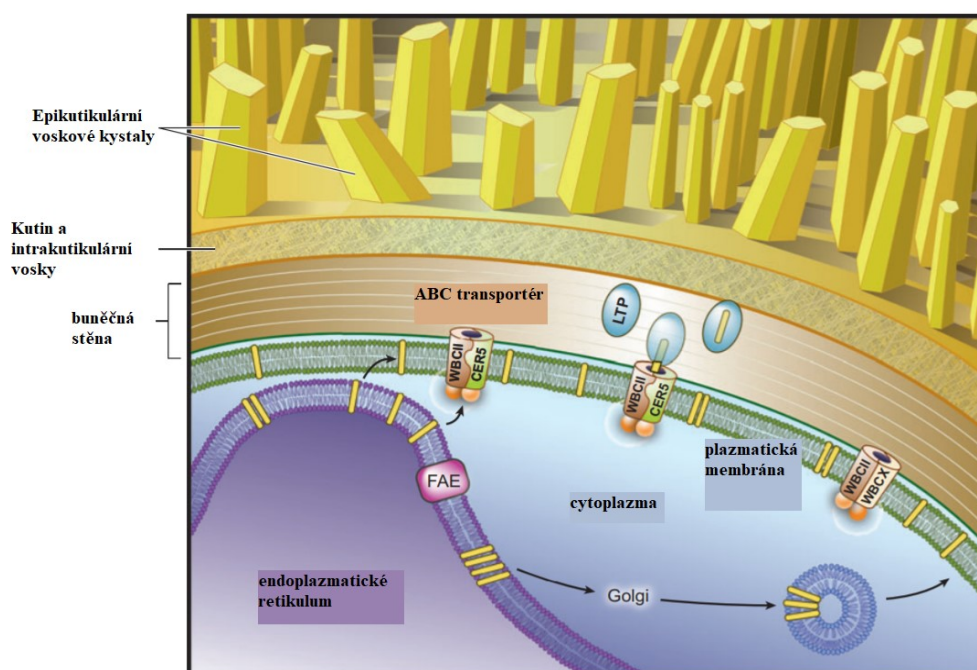
Během první fáze jsou hlavní prekurzory všech kutikulárních alifatických složek C16 a C18 mastných kyselin (FA) generovány *de novo* syntézou v plastidech. Vznik těchto FA vychází z dvouuhlíkatých jednotek acyl-koenzym A (CoA) a pokračuje sekvenčními cykly prodloužení, které jsou prováděny komplexem syntáz mastných kyselin (FAS). Každý cyklus zahrnuje 4 reakce: kondenzaci, redukci, dehydrataci a opět redukci. Ve všech těchto reakcích je využíván tzv. Acyl Carrier Protein (ACP) jako kofaktor (Borisjuk et al., 2014).

Druhá fáze biosyntetické dráhy vosku zahrnuje prodloužení C16 a C18 mastných kyselin do VLCFA, které jsou složené z 20 až 34 uhlíků. Tyto dlouhé řetězce jsou syntetizovány v ER komplexem elongáz mastných kyselin (FAE), jenž katalyzuje cyklické přidání dvojuhlíkových skupin, získaných z malonyl-CoA. Elongace FA probíhá, podobně jako syntéza mastných kyselin, ve 4 po sobě jdoucích reakcích. První z nich je kondenzace C2 uhlíkové části na acyl-CoA pomocí 3-ketoacyl-CoA syntázy (KCS), následuje redukce KCS meziprojektu pomocí 3-ketoacyl-CoA reduktázy (KCR), třetím krokem je dehydratace 3-hydroxyacyl-CoA pomocí 3-hydroxyacyl-CoA dehydratázy (PAS2), a nakonec redukce trans-2,3-enoyl-CoA pomocí trans-2-enoyl reduktázy (ECR) (Bernard & Joubès, 2013; Haslam & Kunst, 2013; Borisjuk et al., 2014).

Ve třetí fázi se VLCFA modifikují na hlavní složky vosku, což zahrnuje alkoholy, estery, alkany, ketony a aldehydy. Produkty komplexů elongáz, VLCFA-CoA, mohou být přeměněny na volné VLCFA nebo zpracovány dvěma odlišnými způsoby. Jednou možnou cestou je tvorba alkoholu a další možností je tvorba alkanů, což vede ke vzniku řady

sloučenin kutikulárních vosků (Rowland et al., 2006; Greer et al., 2007; Li et al., 2008; Rowland & Domergue, 2012; Borisjuk et al., 2014). Další dělení dráhy tvořící alkohol má za následek produkci alkoholu či syntézu alkanů, sekundárních alkoholů a ketonů s délkou řetězce mezi 27 a 33 uhlíky. Ty jsou hlavní složkou vosků u huseníčku a některých dalších druhů (Bernard & Joubès, 2013; Borisjuk et al., 2014).

Nakonec jsou kutinové a voskové komponenty vedeny z ER skrz plazmatickou membránu až na vnější stranu buněk. Tento mechanismus není doposud dobře známý, je zde však hned několik hypotéz. Jednou z nich je účast LTP na transportu kutikulárních lipidů, export pomocí heterodimeru ATP-binding cassette transportéru (ABC transportér), vezikulární transport zprostředkovaný pomocí GA, oleofilní kapky nebo ER kotvící doména plazmatické membrány (Pollard et al., 2008; Kunst & Samuels, 2009; Borisjuk et al., 2014). Transport viz obrázek č. 3.

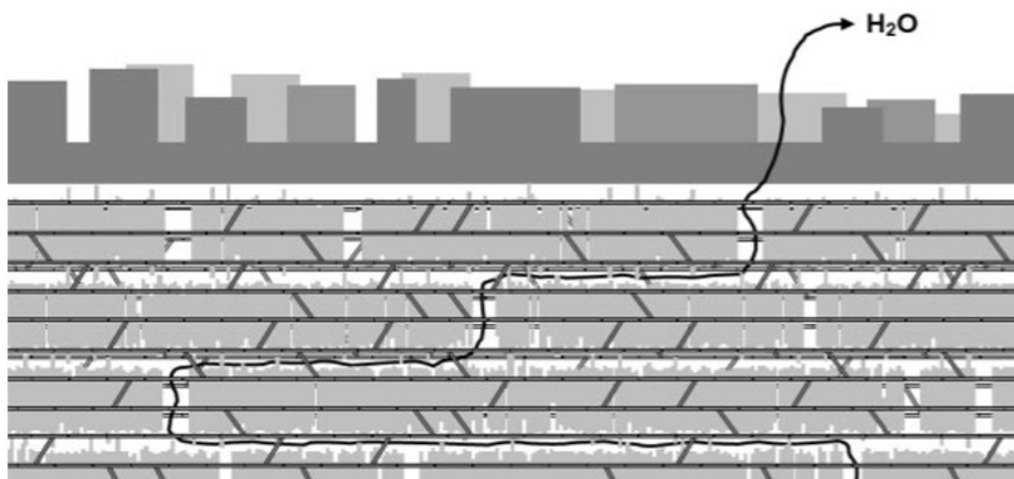


Obr. 3: Transport částí kutikuly (Samuels et al., 2008).

2.3 Kutikulární transpirace

Primární funkcí kutikuly byla již zmiňovaná bariéra mezi rostlinou a prostředím, další roli má jakožto kontrolní mechanismus transpirace společně s průduchy. Obě tyto struktury vznikly zřejmě po přechodu rostlin na souš, byly totiž nalezeny již u nejstarších dochovaných fosilií cévnatých rostlin rodu *Cooksonia* a *Rhynia* (Votrubová, 2010). Transpirace probíhá nejlépe, pokud tyto dva kompartmenty optimálně spolupracují. V případě, že jsou stomata

zavřená, zůstává regulační funkce na kutikule. Tento vztah byl testován na listech desítek rostlinných druhů. Příkladem může být transpirace listu vinné révy, která byla měřena při různých vodních potenciálech. Když byl list dehydrovaný, kutikulární transpirace klesla. Dehydratační účinek, tedy pokles kutikulární vodivosti vodních par a snížení transpirace společně s asimilací, byl úměrný poklesu turgoru, což naznačuje, že výměna plynů skrz kutikulu mohla být ovlivněna epidermálním roztahováním (Boyer et al., 1997). Kutikulární transpirace může být dále ovlivněna přítomností křemíku (Si), jenž je ukládán nad epidermálními buňkami. Dojde k vytvoření vrstvy Si pod kutikulární vrstvou listu a následnému snížení kutikulární transpirace (Ahmed et al., 2014). Tato dvojitá vrstva se chová jako by byla skleněná a snižuje další přenos ultrafialového (UV) záření. Neplatí to však obecně. U kukuřice Si neovlivňuje kutikulární transpiraci listů, nýbrž snižuje tu stomatální. Ta je regulována otevíráním průduchů, jejich morfologií a hustotou. Avšak ani díky změnám v morfologii či hustotě nejsme schopni vysvětlit, jak Si ovlivňuje jejich otevírání a s tím spojenou transpiraci (Gao et al., 2006; Etesami & Jeong, 2018).



Obr. 2: Model vnější části kutikuly rostlin a transportu vody skrz ni. Úplně svrchní část tvoří epikutikulární vosky. Monomery kutinu jsou zde zesíťované dibazickými kyselinami (Riederer & Schreiber, 1995).

Listy tedy nemohou zcela zamezit ztrátám vody, bez ohledu na to, jak těsně jsou stomata uzavřena, jelikož kutikula dovoluje procházet vodní páře skrz pomocí difúze, viz obrázek č. 2 (Keller, 2015).

2.4 Kutikula vyskytující se u ovoce

Jednou z nejzřetelnějších struktur perikarpu plodu rajčete je kutikula s vosky, která leží vně epidermálních buněk, stejně jako je tomu u zbylých částí rostliny. Kutikula ovoce je

velmi podobná té na vegetativních orgánech, avšak má i své odlišnosti. Patří mezi ně například absence průduchů či větší tloušťka, díky které je snadněji izolovatelná (Martin & Rose, 2014). U zralého plodu často prorůstá až do apoplastu buněk ležících pod ní. Mnoho pokusů souvisejících s rostlinnou kutikulou se provádí právě na plodech rajčat, a to i z toho důvodu, že rajče je ekonomicky významné (Matas et al., 2011; Yeats et al., 2012; Vallarino et al., 2017). Dalším zkoumaným plodem jsou jablka. Výzkum jejich genomu naznačuje, že gen MdSHN3, který je transkripčním faktorem pro doménu APETALA2, je pozitivním regulátorem tvorby kutikuly u jablek a také je inhibítorem červenohnědého růstu (tzv. russet), který se projeví červenohnědým povlakem na jablku. Toto tzv. russet zbarvení je výhradně výsledkem potrhání kutikuly a vytvoření nepropustné vrstvy peridermu. (Lashbrooke et al., 2015).

3 Stres

Jedná se o jakýkoli environmentální faktor potenciálně nepříznivý pro živé organismy (Kershaw & Levitt, 1973).

Růst a vývoj rostlin je velice dynamický. Co se morfologie a fenotypu týče, jsou schopné nesmírné rozmanitosti. Během života se přizpůsobují podmínkám prostředí, samozřejmě do určité míry. Působení stresu může vést k absenci růstu rostliny, předčasnému dozrávání semen a plodů, trvalému poškození či smrti, pokud je překročena hranice tolerance. Většina rostlin navíc žije v podmínkách, které nejsou optimální, což jim brání dosáhnout plného genetického potenciálu pro reprodukci a růst (Mosa et al., 2017).

Stres rozdělujeme do dvou hlavních kategorií: abiotický a biotický. Biotický může být způsoben stresorem v podobě patogenu či zásahu člověka atd. Abiotickým stresem je například nedostatek vody, světla, minerálů, kyslíku, či naopak přebytek již zmíněného, a mnoho dalších. Rostlina se může bránit změnou velikosti a polohy listu (jeho natočením), růstem do hloubky, tvorbou trichomů či změnou kutikuly (její tloušťkou a složením) a jejích vosků.

Odhaduje se, že právě kvůli nepříznivým podmínkám je každoročně ztraceno až 15 % celosvětových výnosů. Tyto ztráty nejvíce pociťují lidé v rozvojových zemích (Molnár, 2011; Ashraf et al., 2018).

3.1 Hlavní druhy abiotického stresu, v nichž je kutikula zapojena

3.1.1 Osmotický stres

Mezi hlavní faktory osmotického stresu se řadí extrémní teplota, sucho, zasolení či nedostatek vody. Během přesunu na souš si rostliny musely vůči nim vybudovat jistou toleranci (Chaves & Oliveira, 2004). Růstová odpověď rostliny na osmotický stres je charakterizována náhlou inhibicí růstu, následovanou zotavením a aklimatizací na nové podmínky (Skirycz & Inzé, 2010). Vodní deficit způsobí to, že rostlina omezí příjem vody, kvůli čemuž mohou membrány ztratit své uspořádání, proteiny mohou denaturovat, chloroplasty ztratí svou fotosyntetickou funkci a často jsou také produkovány reaktivní formy kyslíku (ROS). Ty vedou k oxidativnímu poškození, které končí narušeným růstem rostliny. S osmotickým stresem souvisí především rostlinný hormon ABA (Zhu, 2002).

3.1.1.1 Hlavní příčiny osmotického stresu

3.1.1.1.1 Zasolení

Tento typ stresu způsobuje nadměrné množství určitých iontů v půdě, nejčastěji Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} . Nejhůře však působí právě Na^+ . Rostlina reaguje na zasolení ve dvou fázích. První je rychlá osmotická fáze, ta zabraňuje růstu mladých listů, a druhá fáze je pomalejší, iontová, která urychluje senescenci zralých listů. V souvislosti se zasolením se u rostlin mimo jiné vyvinula adaptační signální dráha SOS (Salt-Overly-Sensitive) pro regulaci iontové homeostázy a tolerance k soli (Yokoi et al., 2002; Zhu, 2002; Munns & Tester, 2008).

3.1.1.1.2 Sucho

Jedná se o období bez deště dostatečně dlouhé na to, aby způsobilo významné snížení obsahu půdní vlhkosti a redukovalo růst rostlin (Kalefetoğlu et al., 2005). Sucho je ovlivněno klimatickými, agronomickými a edafickými faktory a je problémem mnoha rostlin. Trvalý nebo přechodný deficit vody, více než jakýkoli jiný environmentální faktor, výrazně zhoršuje růst a rozvoj rostlin. Kombinace sucha a tepelného šoku vede k potlačení fotosyntézy, uzavření průduchů, zlepšení dýchání a zvýšení teploty listu (Rizhsky et al., 2002; Anjum et al., 2011).

Příkladem suchých oblastí může být oblast Caatinga, která leží ve vnitrozemí severovýchodní Brazílie a má charakter buše. Je tvořena řídkým porostem suchomilných keřů a nízkých stromů, avšak v závislosti na srážkách se zde nachází opadavé lesy a polopouštní krajina, na níž jsou jedinou vegetací kaktusy. Na tomto území rostlinám

nestačí jen epikutikulární vosky, využívají také stínění svých listů, nebo se naopak listů úplně zbavují, aby zamezily ztrátám vody. Dalším příkladem jsou rostliny rostoucí v oblasti Cerrado, jež je největším biotem Jižní Ameriky, hned po brazilské Amazonii. Jedná se o jeden z největších komplexů savan a lesů s obrovskou druhovou rozmanitostí. Avšak zdejší dřeviny nevykazují žádné známky nedostatku vody, neboť jejich kořeny dosahují hloubky až 18 metrů a zde už se voda nachází. Silná kutikula, sklerofyty a další rysy dřevin z této oblasti se přisuzují nedostatku živin v půdě v kombinaci s periodickými požáry (Coutinho, 1983; Salatino, 1993; Oliveira et al., 2003).

3.1.1.1.3 Oxidační stres

Různé typy abiotických stresorů vedou k nadprodukci ROS v rostlinách, které pro ni jsou toxickými produkty aerobního metabolismu. Tím mohou poškodit bílkoviny, lipidy, sacharidy a dokonce DNA, což nakonec vede k oxidativnímu stresu. Expresí genů, regulovaná ROS, řídí několik procesů, jako je například růst, buněčný cyklus, programovaná buněčná smrt (PCD), ochrana před patogeny a signalizace. Je dobře známo, že orgány s vysoce oxidační metabolickou aktivitou nebo s intenzivním elektronovým proudem, například chloroplasty, mitochondrie či peroxizomy, jsou hlavním zdrojem ROS. Mezi hlavní členy ROS rodiny patří volné radikály a neutrální látky, příkladem je H_2O_2 (Mittler, 2002; Gill & Tuteja, 2010; Demidchik, 2015). Oxidační stres může být vyvolán také těžkými kovy, které pochází z průmyslových odpadů a z nadměrného užívání pesticidů. Jistý potenciál pro zmírnění tohoto typu stresu vykazuje rostlinný hormon 24-epibrassinolid (EBL). Patří mezi brassinosteroidy a jedná se o polyhydroxylovanou steroidní sloučeninu hrající roli při regulaci fyziologických a vývojových procesů jako je klíčivost semen, reprodukce a senescence (Shahzad et al., 2018).

Dalším příkladem je arzen. Do rostlin vstupuje pomocí fosfátových transportérů. Jeho toxicita se může projevit poklesem či úplnou ztrátou kořenových chloupků, poškozením epidermálních buněk a kůry, rozpadem thylakoidních membrán, a nakonec buněčnou smrtí (Sharma, 2012).

3.1.1.1.4 UV záření

Na rostliny denně působí ultrafialové záření. To můžeme rozdělit na tři typy. Prvním z nich je UV-A s vlnovou délkou 315-400 nm, následně UV-B záření o vlnové délce 280-320 nm, které je nejběžnější, a nakonec UV-C, to má vlnovou délku méně než 280 nm a podílí se na vzniku ozonu v troposféře. Fotony UV B/C záření mají dostatek energie k narušení chemických vazeb a mohou tak iniciovat fotochemické reakce. Jejich působením

může dojít k poškození DNA a inhibici genové exprese. Proto má v sobě rostlina několik ochranných mechanismů, které UV-B záření absorbují. Příkladem jsou antokyany, flavonoidy či vosky na povrchu listů. Tento typ záření může za jistých podmínek ionizovat pouze určité typy molekul, obecně se tedy za ionizující záření neoznačuje (Taylor et al., 1996; Jordan, 2002; Kovács & Keresztes, 2002).

3.1.1.1.5 Ozon (O₃)

Ozon vyskytující se v dolní troposféře je problémem kvality ovzduší na většině severní polokoule, působí negativně na lidské zdraví a ekosystém. Je považován za skleníkový plyn, a tedy i za součást globální změny klimatu. Existuje však i prospěšná vrstva O₃ ve vyšších vrstvách atmosféry (okolo 15-50 km od povrchu Země), která absorbuje škodlivé ultrafialové záření (Krupa et al., 2001; Karlsson et al., 2017). Jeho nadměrným působením na rostlinu může docházet k řadě biochemických změn. Expozice ozonu má za následek nárůst rostlinného hormonu etylenu, polyaminů a flavonoidů. Bylo však prokázáno, že ozon sám o sobě pro plazmatickou membránu škodlivý není. Degraduje však na superoxid, peroxid vodíku a hydroxylové radikály a vytváří singletový kyslík během reakce s biologickými molekulami (Kangasjarvi et al., 1994; Sandermann et al., 1998; Luštinec, 2003).

3.2 Faktory ovlivňující zapojení kutikuly do odpovědi rostlin na abiotické stresy

3.2.1 Kyselina abscisová (ABA)

Jedná se o fytohormon patřící do velké skupiny isoprenoidů, který je syntetizován v plastidové dráze 2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfátu (MEP) (Nambara & Marion-Poll, 2005). V jeho biosyntéze je jedním z hlavních kroků karotenoidní štěpení katalyzované 9-cis-epoxykarotenoiddioxygenázou (NCED).

Tento rostlinný hormon hraje klíčovou roli v různých vývojových procesech, např. v rozvoji semen, kontrole velikosti orgánů, uzavírání průduchů a stresových adaptivních odezvách na environmentální podněty. Dehydratace buněk během zrání semen a vegetativních růstových stádií indukuje zvýšení hladiny ABA (Fujita et al., 2011). Kutikula zprostředkovává regulaci biosyntézy ABA a její signalizaci během osmotického stresu. Přesný mechanismus však není doposud znám (Wang et al., 2011).

Osmotická exprese genů odpovídajících na stres je regulována ABA-dependentními a ABA-independentními cestami (Yoshida et al., 2014). Existuje mnoho kutikulárních mutantů, u nichž je snížena biosyntéza této kyseliny během odpovědi na

osmotický stres. Takovými příklady jsou *bdg*, *lacs2*, *gpat4* a *gpat8* mutanti (viz. dále), jež mohou působit na výkonost růstu během působení stresu (Wang et al., 2011).

3.2.2 Sucho a nadměrná teplota

Tolerance vůči suchu obecně je složitý jev spojený s tloušťkou kutikuly, její voskovou vrstvou, stomatální regulací, kořenovým systémem, hormonální rovnováhou, antioxidačním obranným systémem, osmotickým přizpůsobením a udržováním obsahu vody v tkáních. Sucho má za následek narušení homeostázy a distribuce iontů v buňce. Rostliny využívají řadu mechanismů, kterými tomuto stresu odolávají. Svou roli zde hrají kutikulární vosky. Mutanti v genech vosků vykazovali zvýšené ztráty vody, a tudíž i větší citlivost na sucho. Naopak nadměrná exprese těchto genů způsobila hojnější množství vosků a účinnější toleranci na sucho (Wang et al., 2003; Pavlová, 2005). Mnoho xerofytních rostlin, například CAM rostliny, zavírá průduchy přes den, čímž zamezují odpařování vody. Během této doby se u nich tedy očekává větší kutikulární transpirace a silnější kutikulární vrstva. U ostatních rostlin hraje kutikula, společně s trichomy, důležitou roli při odražení radiace a také při zvyšující se teplotě v listech, během které dochází k poškození fotosyntetických aparátů (Jenks & Hasegawa, 2005).

3.2.3 Chlad

Kutikula mnoha stálezelených listnatých stromů v alpinském a jiném chladném klimatu je méně propustná pro vodu. Tyto modifikace poskytují ochranu během zimních mrazů, aby nedocházelo k nadměrné tvorbě krystalků ledu uvnitř rostlin. Led se nejprve vytvoří na povrchu listů, následně proniká skrz průduchy, rány nebo praskliny v kutikule, aby inicioval tvorbu ledových krystalků v apoplastu (Jenks & Hasegawa, 2005; Wisniewski et al., 2014).

3.2.4 Zasolení

Jak již bylo zmíněno výše, tloušťka kutikuly při zasolení souvisí s rostlinnou transpirací. V půdách s velkým množstvím solí měly rostliny kutikulu výrazně silnější, stejně jako i voskovou vrstvu. Ukázalo se, že hlavní bariéru tvoří intrakutikulární vosky, a nikoli ty epikutikulární. Například u rajčete je tato vnitřní vrstva vosků tvořena nejen alifatickými látkami, ale i velkým množstvím triterpenoidů. Kutikulární transpirace u rostlin vystavených NaCl byla nižší (o 35 %) než u těch chloridu sodnému nevystavených. Kromě toho se tento stres projevuje jako oxidační stres zprostředkovaný ROS (Acosta-Motos et al., 2017).

Některé rostliny jsou schopné žít za neustálého působení tohoto stresoru. Svůj růst udržují zvýšením množství rozpuštěných látek v buňkách, které je následované regulací turgoru. Zatímco u většiny rostlin působí kutikula jako bariéra pro vstup soli do buněk epidermis, u solničky přímořské (*Suaeda maritima*) zabraňuje dešťové vodě ve vyluhování soli z buněčných stěn (Hajibagheri et al., 1983; Kosma & Jenks, 2007).

3.2.4.1 Solné žlázy

Mnoho halofytů má charakteristické solné žlázy v listech. Jejich rolí je odstraňovat z nich sůl, kdy dojde k jejímu oddělení od živých buněk pomocí voskové složky (Tester, 2003). Vylučování těmito žlázami je jedním z hlavních mechanismů pro odstranění přebytečných minerálních iontů z listů. Vnější stěny těchto sekrečních buněk jsou pokryty kutikulou. Mezi ní a stěnou sekrečních buněk se tvoří malé póry pro vylučování roztoku (Gorham et al., 1985; Jacoby, 1999).

3.2.5 UV záření

Další funkcí kutikuly je ochrana rostlin před UV zářením. To buď odrážejí, nebo absorbují fenolickými sloučeninami v kutikulární matrix (Khanal & Knoche, 2017). Tento typ stresu může u rostlin vyvolat morfologické změny, příkladem je větší tloušťka kutikuly, jiné stočení listů či potlačení růstu. Během působení tohoto stresoru na rostlinu mají svou roli i flavonoidy. Ty se vyskytují v epidermální buněčné vrstvě listů a v tkáních, které jsou citlivé na UV záření (Rozema et al., 1997; Jordan, 2002; Hideg et al., 2013). Prvním příkladem je pokus provedený na dřevinách (stálezelených, opadavých a jedné ovocné dřevině). Jejich kutikula aktivně zmírňovala působení UV-B záření, ale zároveň umožňovala pronikání fotosynteticky aktivního slunečního záření (PAR) do fotosyntetických tkání. Propustnost se lišila co do druhů. Tropicke druhy vykazovaly nižší propustnost a listnaté naopak vyšší míru propustnosti (Krauss et al., 1997). Další experiment byl proveden na kutikule jablek a rajčat. Zde se opět projevila významná role flavonoidů při zachycování UV záření, především UV-A a UV-B. Flavonoidy se vyskytují ve vakuolách epidermálních buněk, těsně pod kutikulární vrstvou, a během dozrávání plodů jsou transportovány z epidermální vrstvy do kutikuly, kde jsou začleňovány do kutinu (Laguna et al., 1999; Solovchenko & Merzlyak, 2003). Na odrazu UV záření se podílejí i kutikulární vosky, jejichž uspořádání může zesílit odraz a rozptýlit světla. Tento výsledek se dal dobře pozorovat na rostlinách okurky (*Cucumis sativus*). UV-B záření ovlivnilo distribuci alkanů, aldehydů a primárních alkoholů kutikulárních vosků, kdy došlo ke zkrácení acylových řetězců (Steinmüller & Tevini, 1985).

3.2.6 Ozon

Největší množství ozonu je zachyceno rostlinnými průduchy, vůči kterým je jeho kutikulární příjem zanedbatelný. Nejsvrchnější část kutikulární vrstvy (neboli její vosky) není sama o sobě příliš reaktivní vůči O₃. Avšak na jejím povrchu mohou být například soli, iontové částice a kondenzované páry, kvůli kterým může docházet k reakcím s ozonem (Altimir et al., 2008; Tuzet et al., 2011).

4 Kutikulární mutanti

Rostlinná kutikula je denně vystavována různým druhům stresu, viz výše. Působení těchto stresorů zabraňuje správné tvorbě kutikuly, jejímu ukládání či ji modifikuje. Exprese rostlinných genů související s tvorbou kutikuly a jejími kompartmenty může být ovlivněna i přítomností ABA. Byla provedena řada experimentů, které se zabývaly reakcí rostlin s kutikulárními změnami během působení abiotického stresu, jemuž byly rostliny uměle vystavovány. Těmito modifikacemi se budeme zabývat v dalších kapitolách, které jsou rozděleny podle specifických kutikulárních mutantů.

4.1 Mutace modifikující kutikulu v souvislosti s druhy abiotického stresu

4.1.1 Acyl-CoA-binding protein (ACBP)

Jedná se o proteiny hrající důležitou roli při embryogenezi a odpovědi na abiotický stres u huseníčku rolního. AtACBP proteiny jsou spojovány hned s několika druhy stresů jako je sucho, chlad, oxidační stres a stres vyvolaný působením těžkých kovů. V této modelové rostlině se nachází proteiny AtACBP1-AtACBP6, jejichž lokalizace se liší. AtACBP1 a AtACBP2 se nachází v PM a ER, ale AtACBP3 se vyskytuje v extracelulárním prostoru, AtACBP4 a AtACBP5 jsou cytosolické proteiny.

Acbp1 mutanti mají nižší hustotu voskových krystalů a je u nich pozorována nepravidelnost kutikulární membrány na stoncích, což naznačuje, že narušená kutikula je výsledkem funkční ztráty AtACBP1. Tito mutanti byli citlivější na přítomnost olova v živném médiu. Naopak k chladu, byly tyto rostliny tolerantnější (Xiao & Chye, 2011). Druhy, jejichž hustota vosků byla nižší, obsahovaly nejen alkany, ale také primární alkoholy, sekundární alkohol C29 a ketony.

Dále se ukázalo, že v listech mutantů acbp3 a acbp4 bylo výrazně nižší množství kutinových monomerů s též výrazným snížením dikarboxylových mastných kyselin C16:0,

C18:1, C18:2. Naopak u mutantu *acbp6* nebyla pozorována žádná změna kutinových monomerů (Xue et al., 2014).

4.1.2 Mutanti čiroku dvoubarevného (*Sorghum bicolor*)

Byla provedena analýza mutantů bezkvětého (*bm*) druhu čiroku dvoubarevného se změněnou strukturou epikutikulárních vosků. Ta odhalila mutaci, která postihla jak ukládání kutikuly, tak těchto vosků. Rostlinná kutikula mutantního *bm22* byla asi o 60 % tenčí a vážila přibližně jednu pětinu hmotnosti kutikuly divokého rodičovského typu. Nižší množství uložené kutikuly bylo spojeno se zvýšenou epidermální vodivostí pro vodní páru, a tudíž s větší náchylností na sucho. Ukázalo se tedy, že rostliny bezkvěté, stejně jako ty s redukováným množstvím květu, jsou více náchylné ke ztrátám vody v důsledku změn epikutikulární voskové vrstvy (Premachandra et al., 1994; Jenks et al., 1994). Dále jsou zde nezávisle se vyskytující genové mutace *bm2*, *bm6* a *bm33*, včetně *bm22*, které byly shledány jako alelické (Jenks et al., 1994).

4.1.3 Kukuřičný (*Zea mays*) mutant *glossy6* (*gl6*)

Gen *gl6* se nachází na třetím chromozomu. Jeho mutant vykazoval nižší epikutikulární voskovou vrstvu, zvýšenou permeabilitu a sníženou toleranci semenáčků k suchu, na rozdíl od divokého typu. Fenotyp a fyziologická charakterizace tohoto mutantu ukázaly, že se jedná o typického *glossy* (lesklého) mutantu kukuřice se sníženou akumulací epikutikulárních vosků na povrchu listu, což vede právě k tomuto lesklému povrchu. Funkční charakteristika naznačuje, že *GL6* protein by mohl být zapojen do intracelulárního transportu epikutikulárních vosků, což by mohlo vést k objasnění procesu, kterým se tyto vosky dopravují z místa syntézy od PM. Pokus byl proveden vyluhováním chlorofylu z listů semenáčků mutantních rostlin a též z divokého typu rostlin kukuřice, a výsledky ukázaly již výše zmíněnou vyšší propustnost kutikuly mutantních semenáčků ve srovnání s listy těch divokých (Li et al., 2018).

4.1.4 Homologní gen *OsGlossy1-3* (*OsGL1-3*) v rýži (*Oryza sativa*)

Gen pro *OsGL1-3* se nachází na chromozomu 6. Protein se v buňkách vyskytuje především na plazmatické membráně. Pokus byl proveden na výhoncích rýže v pozdní fázi kultivace. Pro analýzu ztráty vody byly rostliny dány do naprosté tmy po dobu 10 hodin, tím se stabilizovala jejich transpirace. Z experimentu vyplynulo, že nadměrná exprese tohoto proteinu snižuje propustnost kutikuly pro extrakci chlorofylu a zabraňuje ztrátám vody. To poukazuje na důležitou roli *OsGL1-3* při toleranci k suchu. Jeho exprese byla znatelná

u klíčících semen a pochev listů, naopak nízká v listech a nedetekovatelná v kořenech. Ve srovnání s divokým typem vykazovaly rostliny rýže s nadměrnou expresí OsGL1-3 zakrnělý růst, více krystalizace vosků na povrchu listů a celkově více vosků na povrchu v důsledku změn C30-C32 aldehydů a C30 primárních alkoholů. To naznačuje jistou roli v biosyntéze kutikulárních vosků (Zhou et al., 2015).

Dalším příkladem je glossy 1-2 mutant rýže. U něj dochází ke snížené akumulaci alkanů, aldehydů a mastných kyselin. Mutantní rostliny vykazovaly v reprodukční fázi vyšší citlivost na suchu a kutikulární propustnost (Bi et al., 2017).

4.1.5 WRKY transkripční faktor

Transkripční faktory typu WRKY jsou jedny z nejhojnějších u rostlin a jsou zapojeny do jejich vývoje a odpovědi na stres. GsWRKY20 patřící mezi jaderné proteiny byl původně identifikován jako gen pro stresovou odezvu u sóji luštinaté (*Glycine max*). Nakonec se ukázalo, že exprese tohoto genu je indukována díky ABA, chladu, zasolení a suchu. Nadměrná exprese GsWRKY20 vedla ke snížené citlivosti na ABA během klíčení semen a růstu semenáčků. Dále bylo u této linie, která vykazovala větší toleranci k suchu a nižší ztráty vody, pozorováno více epikutikulárních voskových krystalů a mnohem silnější kutikula (Luo et al., 2013; Tang et al., 2014). Byl proveden experiment, při kterém byly rostliny vystaveny několikadennímu suchu, během kterého se projevilo vadnutí jak divokého typu, tak transgenních rostlin. Po opětovném zavlažování se transgenní linie vrátila rychleji do původní kondice. Naopak většina listů rostlin divokého typu se nezotavila vůbec a odumřely. Míra přežití byla tedy značně vyšší u transgenní linie (Ning et al., 2017).

4.1.6 MYB transkripční faktor

Jedná se o transkripční faktor z rodiny myeloblastózy (MYB). Zkoumána byla epikutikulární struktura, složení a transkripční síť, založená na tomto transkripčním faktoru, u dvou australských kultivarů pšenice, RAC875 a Kukri, které měly kontrastní vzhled kutikuly a odolnost vůči suchu. Analýzy epikutikulárních vosků odhalily, že obsah β -diketonů je jedním z hlavních kompozičních a strukturálních rozdílů mezi těmito kultivary. U RAC875 rostlin tvoří β -diketony cca 18 % celkových vosků, u Kukri je toto množství zanedbatelné. Během sucha zůstal obsah β -diketonů stejně rozdílný, zatímco obsah alkanů a primárních alkoholů se zvýšil u obou odrůd. Z toho vyplývá, že souhra těchto složek, spíše než složky samotné, určuje rozdíl v toleranci k suchu mezi kultivary. Během růstu limitovaného vodou se množství voskových krystalů mírně zvýšilo u Kukri, zatím co u RAC875 zůstalo stejné. Nicméně nebyly pozorovány žádné změny těchto krystalů. Podobný jev byl pozorovaný i

během mírného sucha, to však vzrostlo množství vosků u obou kultivarů, krystaly opět zůstaly beze změny tvaru (Bi et al., 2016).

4.1.6.1 AtMYB41 transkripční faktor

R2R3-MYB transkripční faktor AtMYB41, jehož podrodina je v rostlinách zastoupena nejvíce, je indukován suchem a zasolením. Charakteristiky této rodiny byly studovány u transgenních linií huseničku, které v nadměrné míře exprimují AtMYB41. Tato nadměrná exprese AtMYB41, která způsobila přecitlivělost k suchu, je spojována s metabolismem lipidů, expanzí buněčné stěny a depozicí kutikuly. Nadměrná exprese je doprovázena změnou exprese genů podílejících se na biosyntéze kutikuly (Cominelli et al., 2008). To tudíž ukazuje klíčovou funkci AtMYB41 při ochraně rostlin před suchem a jejich přežití prostřednictvím primárního metabolismu lipidů a tvorby kutikuly.

Tomuto transkripčnímu faktoru je také přiřazována funkce spojená s primárním metabolismem uhlíku, což naznačuje vztah mezi ukládáním kutikuly, tolerancí rostlin k vysoušení, jakož i metabolismem uhlíku a buněčných lipidů. V neposlední řadě hraje tento transkripční faktor důležitou roli při biosyntéze suberinu. Experimentem bylo prokázáno, že nadměrná exprese AtMYB41 zvýšila množství alifatických monomerů suberinu 4.5x, a tudíž se snížil počet těch kutinových (Golldack et al., 2014; Kosma et al., 2014).

4.1.7 NFXL2 (NFX1-LIKE2) gen

U zvířat a vyšších rostlin se nachází dva NFX1-like geny. U modelové rostliny huseničku jsou to NFXL1 a NFXL2. Mutanti *nfx2-1* genu mají změněnou permeabilitu kutikuly. Jeho ztráta u rostlin huseničku má za následek zvýšení hladiny ABA, peroxidu vodíku, sníženou stomatální aperturu a zvýšenou toleranci ke stresu. Dále se protein NFXL2-78 váže na promotory BDG1 a SHINE1 (SHN1), SHN2, SHN3, a zprostředkovává slabší expresi těchto genů. Silnější exprese BDG1 znamená u mutantních rostlin *nfxl2-1* zvýšenou akumulaci ABA během sucha. Silnější exprese v genech SHN1, SHN2 a SHN3 může také způsobit kutikulární změny, včetně nižší hustoty průduchů, větší kutikulární propustnosti a tím částečně zvýšit toleranci vůči suchu (Lisso et al., 2012).

4.1.8 Rodina proteinů SHINE (SHN)

U suchozemských rostlin se vykytují pouze tři geny SHN spadající do rodiny transkripčních faktorů AP2/EREBP. Mutanti těchto genů vykazovali u rostlin huseničku zajímavé vlastnosti. Listy byly mnohem lesklejší, zelenější a šestinásobně se u nich zvýšilo množství kutikulárních vosků. Dalším rozdílem, oproti divokému typu, byly zkroucené listy.

To se stalo zejména díky násobnému zmnožení alkanů, které tvořily přibližně polovinu celkového objemu vosků.

Analýzy prováděné pomocí chlorofylu a ztrát hmotnosti rostliny ukázaly, že nadměrná exprese těchto genů má vliv na povrch rostliny. Zvyšuje permeabilitu kutikuly, ovlivnila také množství trichomů, průduchů a strukturu epidermálních buněk. S menším množstvím průduchů nejspíš souvisí právě snížená transpirace v období sucha a zotavování rostlin po působení tohoto stresoru (Aharoni et al., 2004).

4.1.9 Mutace genu WAX2

Tato mutace byla pozorována opět u modelové rostliny huseníčku a vykazovala zde změny v kutikulární vrstvě a jejích voscích. Ve srovnání s divokým typem vážila tato kutikula ze stonku o 20 % méně, byla o 36 % silnější, méně průhledná a strukturálně dezorganizovaná. Snížilo se též množství kutikulárních vosků na listech a stonku, a to o 78 %. Tyto vosky vykazovaly deficienci aldehydů, alkanů, sekundárních alkoholů a ketonů, ale naopak větší množství esterů, primárních alkoholů a kyselin. Vedle kutikulárních změn se zde objevilo menší množství stomat na adaxiální i abaxiální straně listů, nižší plodnost při nedostatku vlhkosti a zvýšená epidermální permeabilita, která je způsobena zvýšenou propustností kutikuly. Přestože wax2 mutant má průduchů znatelně méně, během pokusu u něj probíhala stomatální transpirace normálně, ve srovnání s divokým typem. Rozdíl se projevil během extrahování chlorofylu z listů a stonků, které u mutantních rostlin probíhalo rychleji. Geny WAX2 jsou homologní s CER1 (eceriferum – aldehyd dekarboxyláza), nicméně mutace v CER1 působí na vosky, nikoli na kutikulární membránu. Všechny tyto strukturální změny jednotlivých částí mutantních rostlin hrají svou roli při toleranci k suchu. Zapříčiňují mnohem větší výpar vody a tím rostlinám ubírají na odolnosti (Chen et al., 2003).

Dalším byl pokus na okurce seté, u které abnormální exprese ovlivňovala tvorbu a ukládání VLC (velmi dlouhých řetězců) alkanů a biosyntézu kutinu. Též jí byla ovlivněna fertilita pylu (Wang et al., 2015).

4.1.10 Glycerol-3-fosfát-acyltransferáza 6 (GPAT6)

Tato transferáza hraje hlavní roli v biosyntéze vosku u ovoce. Jedná se o mutanta, který způsobuje nedostatek kutinu, kutikula má menší hustotu C16 kutinových monomerů. U mutantního ovoce byla pozorována změna tloušťky kutikuly a jejího složení, tudíž se předpokládá, že tyto rostliny mají sníženou odolnost vůči suchu. Pokus byl proveden na plodech rajčat, jejichž fenotyp se projevil lesklými plody. Dalším experimentům byly

podrobeny rostliny huseníčku, u nichž výsledky ukázaly, že GPAT6 se podílí na vývoji prašníku a na fertilitě pyly (Li et al., 2012; Petit et al., 2016).

4.1.11 Eceriferum (CER)

U rostlin huseníčku bylo objeveno 11 cer mutantů s dramatickými změnami ve složení vosků. Jedním z příkladů je mutace eceriferum9 (cer9), která zvyšuje množství 18-uhlíků dlouhých řetězců monomerů kutinu. Zvýšené množství vykazovaly také VLCFA kyseliny lignocerové (C24) a kyseliny hexakosanové (C26), jejichž množství je u divokých typů huseníčku zanedbatelné. Kromě toho větší tloušťka kutikuly u tohoto mutantu korelovala s vyšší efektivitou využití vody (WUE) a nižší transpirační hodnotou, tudíž je tento mutant popisován jako hlavní regulátor efektivity využití vody v rostlinách a slouží k odezvě na stres (Goodwin et al., 2005; Lu et al., 2012; Bi et al., 2017).

Dalším příkladem je cer1, jehož exprese probíhá v epidermis nadzemních orgánů a nadmíra podporuje biosyntézu dlouhých řetězců alkanů, a tudíž ovlivňuje reakci rostlin na abiotické a biotické stresy. Nadměrná exprese má však i své negativum, jímž je zvýšená náchylnost k bakteriálním a houbovým patogenům (Bourdenx et al., 2011).

4.1.12 MAX2 (More Axillary Growth2)

Protein obsahující tzv. F-box doménu, který reguluje různé biologické procesy jako je fotomorfogeneze, signalizace karrikinu (regulátoru růstu), stavba rostlin a jejich senescence. Max mutantů je hned několik (max1, max2...) a všichni ovlivňují fenotyp větvení výhonků. Avšak pouze MAX2, podílející se na biosyntéze strigolaktonu, může ovlivnit fotomorfogenezi. Kutikula je u tohoto mutantu výrazně tenčí než u divokého typu huseníčku. To koreluje se zvýšenou ztrátou vody a fenotypem citlivým na sucho. Důkaz byl proveden pomocí vyluhování chlorofylu, jež bylo u max2 mnohem rychlejší. (Nelson et al., 2011; Bu et al., 2014).

4.1.13 Gen CBP80

Jde o rodinu proteinů, které se podílejí na zpracování RNA ovlivňující transdukcí signálu ABA. Jedním z nich je tzv. cap-binding protein 80 (CBP80), též známý jako Abscisic Acid Hypersensitive 1 (ABH1) protein. Jeho inaktivace vede k uzavření průduchů hypersenzitivnímu k ABA a snížení vadnutí během sucha (Hugouvieux et al., 2001; Kowalkowska et al., 2015). Pro studii byla použita rostlina bramboru (*Solanum tuberosum*), ve které byl umlčen gen CBP80 v tetraploidním kultivaru. U těchto rostlin se projevíly morfologické a fyziologické změny, které zlepšují odolnost vůči suchu. Na kutikule

transgenních rostlin se pokus projevil snížením počtu mikrokanálek, jimiž prochází voda i složky extrakutikulárních vosků, a lineární hranicí mezi kutikulou a buněčnou stěnou. Z tohoto experimentu vyplývá, že kutikulární transpirace závisí především na struktuře kutikuly (Pieczynski et al., 2013).

4.1.14 Fatty acyl-coenzyme A reduktázy (FAR)

Tentokrát byla pozorovaným objektem pšenice setá (*Triticum aestivum*), konkrétně její mutant INVSur4#, v jejíž biosyntéze primárních alkoholů a odpovědi na abiotický stres hrají roli tři geny TaFAR (TaFAR2, TaFAR3, TaFAR4). Jejich heterologní exprese ukázala, že jsou odpovědné za akumulaci primárních alkoholů C18:0 (TaFAR2), C28:0 (TaFAR3), C24:0 (TaFAR4). Konkrétně primární alkohol C28, jež je produkován díky TaFAR3, je nejvíce zastoupen ve voskové vrstvě listů pšenice. Tyto exprese byly indukovány chladem, zasolením, suchem a ABA, společně se zvýšenou akumulací vosku v listech pšenice. Jejich množství se zvýšilo o 28 %, včetně nárůstu primárních alkoholů o 26 %, a tudíž se vytvořila silná vosková vrstva. Tím se rostlina snaží bránit dehydrataci. Hlavní složkou kutikulárních vosků těchto transgenních rostlin jsou primární alkoholy s délkou uhlíkového řetězce od C20 do C32 (M. Wang et al., 2016).

4.1.15 Mutant ječmene eibi1

Jedná se o spontánní mutaci nacházející se v genu HvABCG31 (úplný ABC transportér podrodiny G), jež je lokalizován v okolí centromery třetího chromozomu. Jejím hlavním projevem je menší množství ukládaného kutinu a tudíž tenčí kutikula, což je spjato se sníženou schopností k udržení vody. Listy mutantních rostlin vystavené dehydrataci ztratily 50 % své počáteční hmotnosti, zatímco u rostlin divokého typu pouze 5 %. Bylo zjištěno, že účinky mutace eibi1 byly primárně aktivovány CYP450 regulovanými geny, metabolismem mastných kyselin a eventuálně epigenetickými drahami. Dalšími projevy této mutace mohou být zkroucené listy, trpasličí rostliny, nižší plodnost a opožděné klíčení. Problém nastává, a je patrný, v elongační zóně, ve které ve stejný čas dochází též k tvorbě kutinu (Yang et al., 2013; Zhou et al., 2017).

4.1.16 Gen rýže Drought-Induced Wax Accumulation 1 (DWA1)

Jedná se o gen kódující velmi velký protein obsahující více enzymatických struktur. Dwa1 mutant je defektní v akumulaci kutikulárních vosků během sucha. Jejich množství se snížilo o necelých 8 %. Mutantní rostliny vykazovaly nižší hodnoty VLCFA a rychlejší ztráty vody, naopak nadměrná exprese DWA1 množství VLCFA zvýšila. Toto bylo porovnáno

s množstvím VLCFA u divokého typu. Nižší zastoupení VLCFA pozměnilo voskovou kompozici a vedlo ke zvýšení citlivosti vůči suchu (Zhu et al., 2013).

4.1.17 Acyl-CoA syntetázy s dlouhými řetězci (LACS)

Genom huseníčku rolního obsahuje rodinu devíti genů, které tyto enzymy LACS kódují. Byli zkoumány mutanti *lacs2*, kde je LACS2 vyžadován pro biosyntézu kutinu, a také *lacs1*, u kterých byla odhalena úloha v biosyntéze složek kutikulárních vosků. V obou případech se jedná o ER proteiny. Výzkum byl též prováděn na dvojitých mutantech *lacs1 lacs2*, kteří nedosahují svého plného reprodukčního vývoje. V tomto případě byla permeabilita kutikuly listů vyšší než u jednotlivých mutantů. K tomuto zjištění pomohla extrakce chlorofylu z listů (pět týdnů starých rostlin) ponořených do 80% etanolu, barvení toluidinovou modří a nakonec přímé měření ztrát vody. Z toho vyplývá, že jsou tyto dvojití mutanti více náchylní na sucho (Weng et al., 2010).

4.1.18 Sensitive to freezing 3 (*sfr3*) mutace

Sekvenování, mapování a transgenní komplementace ukázaly, že *srf3* je missense (měnící pořadí aminokyselin) mutace v *ACC1*, esenciálním genu kódujícím homomerní (multifunkční) acyl-CoA-karboxylázu. Tato mutace způsobuje citlivost na mraz a byla pozorována u modelové rostliny huseníčku rolního. Zvýšenou citlivostí se projevila rovněž mutace genu *srf2*, jež byla zkoumána opět na této modelové rostlině. U těchto mutantů, vystavených chladu, byla ovlivněna propustnost kutikuly. Ta propouštěla mnohem více vody, což se projevilo rychlejším vadnutím rostlin v chladu. Na květenstvích *sfr3* rostlin rostoucích v chladu byla také inhibována depozice vosku a složky dlouhých řetězců mastných kyselin a primárních alkoholů kutikul listů byly redukovány ve srovnání s divokým typem. Stejně tomu bylo u množství alkanů, kterých bylo znatelně méně než u rostlin divokého typu. To vše ukazuje, že citlivost k mrazu se objevuje kvůli nedostatkům kutikuly, která se vyvíjí během aklimatizace na chlad (Fourrier et al., 2008; Amid et al., 2012).

4.1.19 Wilted Dwarf and Lethal 1 (*wdl1*) mutace

Jedná se o mutanty kutikulární membrány u T-DNA (transferové DNA) značených linií populace rýže. Byla použita metoda T-DNA aktivačního značení, během kterého jsou generovány dominantní mutace vložením T-DNA nesoucí zesilující elementy (Memelink, 2003). Mohou ovlivňovat i epidermis. Na kutikule se mutace projevují dezorganizovanou vrstvou epikutikulárních voskových krystalů, u epidermis uspořádáním buněk. Během experimentu bylo zjištěno více monomerů primárních alkoholů u mutantů, což bylo způsobeno především nárůstem C30 alkoholu (Park et al., 2010).

5 Závěr

Stres je nedílnou součástí života rostlin, a právě on omezuje jejich růst a produkci plodin po celém světě. Abiotické faktory nutí vědce a zemědělce modifikovat rostlinné struktury, zlepšit jejich životní podmínky a tím posílit jejich odolnost a výnosy.

Rostliny se působícímu stresu snaží samy bránit mnoha způsoby. Jelikož nemohou opustit nevyhovující stanoviště, využívají totipotence svých buněk a ochranných schopností svých vnějších struktur. Mohou změnit polohu a natočení listů, měnit tloušťku kutikuly a hustotu kutikulárních vosků, tvořit trichomy či indukovat svůj růst do hloubky.

Se všemi působícími stresovými faktory souvisí rostlinná kutikula, které byla práce věnována. Přináší nám přehled o dosavadních znalostech a též její roli během působení abiotického stresu. Byla zde ukázána její důležitost a schopnost přizpůsobit se daným podmínkám. Ať už se jednalo o nadměrné množství daných látek v prostředí, či naopak nedostatečné. Rozebrána zde byla její struktura a komponenty, mezi které patří kutikulární vosky a kutin, biosyntéza, výskyt, a především významná funkce v ochraně rostlin. Uvedeno zde bylo několik typů abiotických stresových faktorů, které byly představeny obecně a rovněž ve spojitosti s kutikulární vrstvou.

V závěrečné části práce byli představeni kutikulární mutanti, jež se projevují odlišnou odolností rostlin vůči abiotickým stresorům. Zmíněny byly mutace ovlivňující biosyntézu kutikuly samotné, či jejích komponentů. Takovým příkladem může být mutant *gpat6* a dvojitý mutant *lacs1 lacs2*, kteří jsou více náchylní na sucho. Naopak mutanti *far* a *cer* brání dehydrataci rostlin, a tudíž vykazují vyšší odolnost vůči tomuto typu stresu. Dále byly představeny transkripční faktory zapojující se do vývoje rostlin a jejich odpovědi na stres. Jedním z nich byl *WRKY* transkripční faktor, jehož exprese měla pozitivní vliv na toleranci k suchu. Dalším zmíněným byl *MYB* transkripční faktor, jež byl pozorován v souvislosti s dvěma rostlinnými kultivary. Tento experiment ukázal, že odolnost na sucho závisí na souhře jednotlivých kutikulárních složek (alkanů, ketonů a primárních alkoholů), než na složkách samotných. Mutace se mohou také nacházet v genech pro ABC transportéry, které jsou s největší pravděpodobností zapojeny do transportu kutikulárních komponentů. Tyto mutace se projeví nižší schopností rostliny udržet vodu.

Dosavadní vědění o kutikule však není dostatečné a stále se musí rozvíjet. Neboť klimatické podmínky se stále mění a též i vhodná prostředí pro růst rostlin. Jelikož kutikula tvoří nedílnou součást ochrany rostlin, mělo by se rozvíjet i vědění o ní, a s ním související

množství experimentů a kutikulárních modifikací, které nakonec přinesou užitek. Tato problematika by mohla být námětem pro navazující diplomovou práci, která by pomohla přinést nové informace a rozšířit naše vědění.

6 Literatura

- Acosta-Motos, J., Ortuño, M., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M., & Hernandez, J. (2017). Plant Responses to Salt Stress: Adaptive Mechanisms. *Agronomy*, 7(1), 18. <https://doi.org/10.3390/agronomy7010018>
- Aharoni, A., Dixit, S., Jetter, R., Thoenes, E., van Arkel, G., & 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. *The Plant Cell*, 16(9), 2463 LP-2480. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.022897>
- Ahmed, M., Asif, M., & Hassan, F. (2014). Augmenting drought tolerance in sorghum by silicon nutrition. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(2), 473–483. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1427-2>
- Altimir, N., Vesala, T., Aalto, T., Bäck, J., & Hari, P. (2008). Stomatal-scale modelling of the competition between ozone sinks at the air-leaf interface. *Tellus B: Chemical and Physical Meteorology*, 60(3), 381–391. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0889.2008.00344.x>
- Amid, A., Lytovchenko, A., Fernie, A. R., Warren, G., & Thorlby, G. J. (2012). The sensitive to freezing3 mutation of Arabidopsis thaliana is a cold-sensitive allele of homomeric acetyl-CoA carboxylase that results in cold-induced cuticle deficiencies. *Journal of Experimental Botany*, 63(14), 5289–5299. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers191>
- Anjum, S. A., Xie, X.-Y., Wang, L.-C., Saleem, M. F., Man, C., & Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6(9). <https://doi.org/10.5897/AJAR10.027>
- Ashraf, M. A., Akbar, A., Askari, S. H., Iqbal, M., Rasheed, R., & Hussain, I. (2018). Recent Advances in Abiotic Stress Tolerance of Plants Through Chemical Priming: An Overview. In *Advances in Seed Priming* (pp. 51–79). Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0032-5_4
- Bernard, A., & Joubès, J. (2013). Arabidopsis cuticular waxes: Advances in synthesis, export and regulation. *Progress in Lipid Research*, 52(1), 110–129. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.10.002>
- Bi, H., Kovalchuk, N., Langridge, P., Tricker, P. J., Lopato, S., & Borisjuk, N. (2017). The impact of drought on wheat leaf cuticle properties. *BMC Plant Biology*, 17(1), 85. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1033-3>
- Bi, H., Luang, S., Li, Y., Bazanova, N., Morran, S., Song, Z., ... Lopato, S. (2016). Identification and characterization of wheat drought-responsive MYB transcription factors involved in the regulation of cuticle biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 67(18), 5363–5380. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw298>
- Bianchi A., Bianchi G, Salamini F., A. P. (1985). Biosynthetic pathways of epicuticular wax of maize as assessed by mutation, light, plant age and inhibitor studies. *Maydica (Italy)*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IT876013188>
- Boom, A., Sinnige Damsté, J. S., & de Leeuw, J. W. (2005). Cutan, a common aliphatic biopolymer in cuticles of drought-adapted plants. *Organic Geochemistry*, 36(4), 595–

601. Retrieved from
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0146638004002906>
- Borisjuk, N., Hrmova, M., & Lopato, S. (2014). Transcriptional regulation of cuticle biosynthesis. *Biotechnology Advances*, 32(2), 526–540.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.01.005>
- Bourdenx, B., Bernard, A., Domergue, F., Pascal, S., Léger, A., Roby, D., ... Joubès, J. (2011). Overexpression of Arabidopsis ECERIFERUM1 promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology*, 156(1), 29–45. <https://doi.org/10.1104/pp.111.172320>
- Boyer, J. S. (2015). Impact of cuticle on calculations of the CO₂ concentration inside leaves. *Planta*, 242(6), 1405–1412. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2378-1>
- Boyer, J. S., Wong, S. C., & Farquhar, G. D. (1997). CO₂ and Water Vapor Exchange across Leaf Cuticle (Epidermis) at Various Water Potentials. *Plant Physiology*, 114(1), 185–191. <https://doi.org/10.1104/pp.114.1.185>
- Buschhaus, C., & Jetter, R. (2011). Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: How do plants seal their epidermal surfaces? *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 841–853. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq366>
- Chaves, M. M., & Oliveira, M. M. (2004). Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh269>
- Chen, X., Goodwin, S. M., Boroff, V. L., Liu, X., & Jenks, M. A. (2003). Cloning and Characterization of the WAX2 Gene of Arabidopsis Involved in Cuticle Membrane and Wax Production, 15(5), 1170–1185. <https://doi.org/10.1105/tpc.010926>
- Cominelli, E., Sala, T., Calvi, D., Gusmaroli, G., & Tonelli, C. (2008). Over-expression of the Arabidopsis *AtMYB41* gene alters cell expansion and leaf surface permeability. *The Plant Journal*, 53(1), 53–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03310.x>
- Coutinho, L. M. (1983). ASPECTOS ECOLÓGICOS DA SAÚVA NO CERRADO - A SAÚVA, AS QUEIMADAS E SUA POSSÍVEL RELAÇÃO NA CICLAGEM DE NUTRIENTES MINERAIS. Retrieved from
<http://www.revistas.usp.br/bolzoo/article/view/122116/118871>
- Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 212–228.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>
- Domínguez, E., Heredia-Guerrero, J. A., & Heredia, A. (2015). Plant cutin genesis: unanswered questions. *Trends in Plant Science*, 20(9), 551–558.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.05.009>
- Ensikat, H. J., Ditsche-Kuru, P., Neinhuis, C., & Barthlott, W. (2011). Superhydrophobicity in perfection: the outstanding properties of the lotus leaf. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2, 152–161. <https://doi.org/10.3762/bjnano.2.19>
- Etesami, H., & Jeong, B. R. (2018). Silicon (Si): Review and future prospects on the action mechanisms in alleviating biotic and abiotic stresses in plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 881–896. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.063>
- Fourrier, N., Bédard, J., Lopez-Juez, E., Barbrook, A., Bowyer, J., Jarvis, P., ... Thorlby, G.

- (2008). A role for *SENSITIVE TO FREEZING2* in protecting chloroplasts against freeze-induced damage in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 55(5), 734–745.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03549.x>
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research*, 124(4), 509–525. <https://doi.org/10.1007/s10265-011-0412-3>
- Gao, X., Zou, C., Wang, L., & Zhang, F. (2006). Silicon Decreases Transpiration Rate and Conductance from Stomata of Maize Plants. *Journal of Plant Nutrition*, 29(9), 1637–1647. <https://doi.org/10.1080/01904160600851494>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Golldack, D., Li, C., Mohan, H., & Probst, N. (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Frontiers in Plant Science*, 5, 151. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00151>
- Goodwin, S. M., Rashotte, A. M., Rahman, M., Feldmann, K. A., & Jenks, M. A. (2005). Wax constituents on the inflorescence stems of double eceriferum mutants in Arabidopsis reveal complex gene interactions. *Phytochemistry*, 66(7), 771–780. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.02.001>
- Gorham, J., Jones, R. G. W., & McDonnell, E. (1985). Some mechanisms of salt tolerance in crop plants. *Plant and Soil*, 89(1–3), 15–40. <https://doi.org/10.1007/BF02182231>
- Greer, S., Wen, M., Bird, D., Wu, X., Samuels, L., Kunst, L., & 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 PHYSIOLOGY*, 145(3), 653–667. <https://doi.org/10.1104/pp.107.107300>
- Hajibagheri, M. A., Hall, J. L., & Flowers, T. J. (1983). THE STRUCTURE OF THE CUTICLE IN RELATION TO CUTICULAR TRANSPIRATION IN LEAVES OF THE HALOPHYTE *SUAEDA MARITIMA* (L.) DUM. *New Phytologist*, 94(1), 125–131. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1983.tb02728.x>
- Haslam, T. M., & Kunst, L. (2013). Extending the story of very-long-chain fatty acid elongation. *Plant Science*, 210, 93–107. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2013.05.008>
- Heredia-Guerrero, J. A., Heredia, A., Domínguez, E., Cingolani, R., Bayer, I. S., Athanassiou, A., & Benítez, J. J. (2017). Cutin from agro-waste as a raw material for the production of bioplastics. *Journal of Experimental Botany*, 68(19), 5401–5410. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx272>
- Hideg, É., Jansen, M. A. K., & Strid, Å. (2013). UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends in Plant Science*, 18(2), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.09.003>

- Hugouvieux, V., Kwak, J. M., & Schroeder, J. I. (2001). An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Cell*, *106*(4), 477–487. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00460-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00460-3)
- Jacoby, B. (1999). Mechanisms Involved in Salt Tolerance of Plants (pp. 97–123). <https://doi.org/10.1201/9780824746728.pt2>
- Jakobson, L., Lindgren, L. O., Verdier, G., Laanemets, K., Brosché, M., Beisson, F., & Kollist, H. (2016). BODYGUARD is required for the biosynthesis of cutin in Arabidopsis. *New Phytologist*, *211*(2), 614–626. <https://doi.org/10.1111/nph.13924>
- Jenks, M. A., & Hasegawa, P. M. (2005). *Plant abiotic stress*. Blackwell Pub.
- Jenks, M. A., Joly, R. J., Peters, P. J., Rich, P. J., Axtell, J. D., & Ashworth, E. N. (1994). Chemically Induced Cuticle Mutation Affecting Epidermal Conductance to Water Vapor and Disease Susceptibility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plant Physiology*, *105*(4), 1239 LP-1245. <https://doi.org/10.1104/pp.105.4.1239>
- Jessen, D., Olbrich, A., Knüfer, J., Krüger, A., Hoppert, M., Polle, A., & Fulda, M. (2011). Combined activity of LACS1 and LACS4 is required for proper pollen coat formation in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *68*(4), 715–726. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04722.x>
- Jetter, R., Kunst, L., & Samuels, A. L. (2006). Composition of Plant Cuticular Waxes. In *Biology of the Plant Cuticle* (pp. 145–181). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470988718.ch4>
- Jetter, R., Kunst, L., & Samuels, A. L. (2018). Composition of Plant Cuticular Waxes. In *Annual Plant Reviews online* (pp. 145–181). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0232>
- Jordan, B. R. (2002). Review: Molecular response of plant cells to UV-B stress. *Functional Plant Biology*, *29*(8), 909. <https://doi.org/10.1071/FP02062>
- Kalefetoğlu, T., Ekmekçi, Y., Üniversitesi, H., Fakültesi, F., & Bölümü, B. (2005). THE EFFECTS OF DROUGHT ON PLANTS AND TOLERANCE MECHANISMS (Review). *Fen Bilimleri Dergisi*, *18*(4), 723–740. Retrieved from <http://dergipark.gov.tr/download/article-file/83268>
- Kangasjarvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M., & Karjalainen, R. (1994). Plant defence systems induced by ozone. *Plant, Cell and Environment*, *17*(7), 783–794. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1994.tb00173.x>
- Karlsson, P. E., Klingberg, J., Engardt, M., Andersson, C., Langner, J., Karlsson, G. P., & Pleijel, H. (2017). Past, present and future concentrations of ground-level ozone and potential impacts on ecosystems and human health in northern Europe. *Science of The Total Environment*, *576*, 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.061>
- Keller, M. (2015). Environmental Constraints and Stress Physiology. In *The Science of Grapevines* (pp. 267–341). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-419987-3.00007-8>
- Kershaw, K. A., & Levitt, J. (1973). Responses of Plants to Environmental Stresses. *The Bryologist*, *76*(2), 328. <https://doi.org/10.2307/3241344>
- Khanal, B. P., & Knoche, M. (2017). Mechanical properties of cuticles and their primary

- determinants. *Journal of Experimental Botany*, 68(19), 5351–5367.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erx265>
- Kosma, D. K., & Jenks, M. A. (2007). Eco-Physiological and Molecular-Genetic Determinants of Plant Cuticle Function in Drought and Salt Stress Tolerance. In *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops* (pp. 91–120). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5578-2_5
- Kosma, D. K., Murmu, J., Razeq, F. M., Santos, P., Bourgault, R., Molina, I., & Rowland, O. (2014). AtMYB41 activates ectopic suberin synthesis and assembly in multiple plant species and cell types. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 80(2), 216–229. <https://doi.org/10.1111/tpj.12624>
- Kovács, E., & Keresztes, Á. (2002). Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. *Micron*, 33(2), 199–210. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(01\)00012-9](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(01)00012-9)
- Kowalkowska, A. K., Kozieradzka-Kiszkurno, M., & Turzyński, S. (2015). Morphological, histological and ultrastructural features of osmophores and nectary of *Bulbophyllum wendlandianum* (Kraenzl.) Dammer (B. section *Cirrhopetalum* Lindl., *Bulbophyllinae* Schltr., *Orchidaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 301(2), 609–622. <https://doi.org/10.1007/s00606-014-1100-2>
- Krauss, P., Markstadter, C., & Riederer, M. (1997). Attenuation of UV radiation by plant cuticles from woody species. *Plant, Cell and Environment*, 20(8), 1079–1085. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1997.tb00684.x>
- Krupa, S., McGrath, M. T., Andersen, C. P., Booker, F. L., Burkey, K. O., Chappelka, A. H., ... Zilinskas, B. A. (2001). Ambient Ozone and Plant Health. *Plant Disease*, 85(1), 4–12. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.1.4>
- Kunst, L., & Samuels, L. (2009). Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(6), 721–727. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.09.009>
- Laguna, L., Casado, C. G., & Heredia, A. (1999). Flavonoid biosynthesis in tomato fruit cuticles after in vivo incorporation of 3 H-phenylalanine precursor. *Physiologia Plantarum*, 105(3), 491–498. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.105314.x>
- Lashbrooke, J., Aharoni, A., & Costa, F. (2015). Genome investigation suggests *MdSHN3*, an APETALA2-domain transcription factor gene, to be a positive regulator of apple fruit cuticle formation and an inhibitor of russet development. *Journal of Experimental Botany*, 66(21), 6579–6589. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv366>
- Li, F., Wu, X., Lam, P., Bird, D., Zheng, H., Samuels, L., ... Kunst, L. (2008). Identification of the Wax Ester Synthase/Acyl-Coenzyme A:Diacylglycerol Acyltransferase WSD1 Required for Stem Wax Ester Biosynthesis in Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY*, 148(1), 97–107. <https://doi.org/10.1104/pp.108.123471>
- Li, L., Du, Y., He, C., Dietrich, C. R., Li, J., Ma, X., ... Zheng, J. (2018). A novel maize gene, *glossy6* involved in epicuticular wax deposition and drought tolerance. <https://doi.org/10.1101/378687>
- Li, X.-C., Zhu, J., Yang, J., Zhang, G.-R., Xing, W.-F., Zhang, S., & Yang, Z.-N. (2012). Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase 6 (GPAT6) Is Important for Tapetum Development in Arabidopsis and Plays Multiple Roles in Plant Fertility. *Molecular*

- Plant*, 5(1), 131–142. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr057>
- Lisso, J., Schröder, F., Schippers, J. H. M., & Müssig, C. (2012). NFXL2 modifies cuticle properties in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, 7(5), 551–555. <https://doi.org/10.4161/psb.19838>
- Longhi, S., & Cambillau, C. (1999). Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1441(2–3), 185–196. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00159-6](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00159-6)
- Lu, S., Zhao, H., Des Marais, D. L., Parsons, E. P., Wen, X., Xu, X., ... Jenks, M. A. (2012). *Arabidopsis* ECERIFERUM9 Involvement in Cuticle Formation and Maintenance of Plant Water Status. *PLANT PHYSIOLOGY*, 159(3), 930–944. <https://doi.org/10.1104/pp.112.198697>
- Luo, X., Bai, X., Sun, X., Zhu, D., Liu, B., Ji, W., ... Zhu, Y. (2013). Expression of wild soybean WRKY20 in *Arabidopsis* enhances drought tolerance and regulates ABA signalling. *Journal of Experimental Botany*, 64(8), 2155–2169. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert073>
- Luštinac, J. (2003). *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*. (1. vyd.). Karolinum. Retrieved from <https://search.ebscohost.com/login.aspx?authtype=shib&custid=s1240919&profile=eds>
- Martin, L. B. B., & Rose, J. K. C. (2014). There's more than one way to skin a fruit: formation and functions of fruit cuticles. *Journal of Experimental Botany*, 65(16), 4639–4651. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru301>
- Matas, A. J., Yeats, T. H., Buda, G. J., Zheng, Y., Chatterjee, S., Tohge, T., ... Rose, J. K. C. (2011). Tissue- and Cell-Type Specific Transcriptome Profiling of Expanding Tomato Fruit Provides Insights into Metabolic and Regulatory Specialization and Cuticle Formation. *The Plant Cell*, 23(11), 3893–3910. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.091173>
- Memelink, J. (2003). T-DNA activation tagging. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 236, 345–362. <https://doi.org/10.1385/1-59259-413-1:345>
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405–410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- Molnár, V. Ö. and Z. (2011). Plant physiology. *Plant Physiology*, 1–12.
- Mosa, K. A., Ismail, A., & Helmy, M. (2017). Introduction to Plant Stresses (pp. 1–19). https://doi.org/10.1007/978-3-319-59379-1_1
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Nambara, E., & Marion-Poll, A. (2005). ABSCISIC ACID BIOSYNTHESIS AND CATABOLISM. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 165–185. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046>
- Neinhuis, C., & Barthlott, W. (1997). Characterization and Distribution of Water-repellent, Self-cleaning Plant Surfaces. *Annals of Botany* 79: 667–677, 1997, 11.
- Ning, W., Zhai, H., Yu, J., Liang, S., Yang, X., Xing, X., ... Bai, X. (2017). Overexpression of Glycine soja WRKY20 enhances drought tolerance and improves plant yields under

- drought stress in transgenic soybean. *Molecular Breeding*, 37(2), 19. <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0614-4>
- Nip, M., Tegelaar, E. W., de Leeuw, J. W., Schenck, P. A., & Holloway, P. J. (1986). A new non-saponifiable highly aliphatic and resistant biopolymer in plant cuticles. *Naturwissenschaften*, 73(10), 579–585. <https://doi.org/10.1007/BF00368768>
- Nun, E., & Oles, M. (2002). Self-cleaning lotus effect surfaces having antimicrobial properties. Retrieved from <https://patents.google.com/patent/US20030147932A1/en>
- Oliveira, A. F. M., Meirelles, S. T., Salatino, A., & Dietrich, S. M. C. (2003). Epicuticular waxes from caatinga and cerrado species and their efficiency against water loss. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 75(4), 431–439. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652003000400003>
- Park, J.-J., Jin, P., Yoon, J., Yang, J.-I., Jeong, H. J., Ranathunge, K., ... An, G. (2010). Mutation in Wilted Dwarf and Lethal 1 (WDL1) causes abnormal cuticle formation and rapid water loss in rice. *Plant Molecular Biology*, 74(1–2), 91. Retrieved from <https://search.ebscohost.com/login.aspx?authtype=shib&custid=s1240919&profile=eds>
- Pavlová, L. (2005). *Fyziologie rostlin*. (1. vyd.). Karolinum. Retrieved from <https://search.ebscohost.com/login.aspx?authtype=shib&custid=s1240919&profile=eds>
- Petit, J., Bres, C., Mauxion, J.-P., Wong, F., Tai, J., Martin, L. B. B., ... Rothan, C. (2016). The Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase GPAT6 from Tomato Plays a Central Role in Fruit Cutin Biosynthesis 1. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00409>
- Pieczynski, M., Marczewski, W., Hennig, J., Dolata, J., Bielewicz, D., Piontek, P., ... Szweykowska-Kulinska, Z. (2013). Down-regulation of *CBP80* gene expression as a strategy to engineer a drought-tolerant potato. *Plant Biotechnology Journal*, 11(4), 459–469. <https://doi.org/10.1111/pbi.12032>
- Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., & Ohlrogge, J. B. (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science*, 13(5), 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.03.003>
- Premachandra, G. S., Hahn, D. T., Axtell, J. D., & Joly, R. J. (1994). Epicuticular wax load and water-use efficiency in bloomless and sparse-bloom mutants of *Sorghum bicolor* L. *Environmental and Experimental Botany*, 34(3), 293–301. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(94\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0098-8472(94)90050-7)
- Procházka, S. (1998). *Fyziologie rostlin*. Academia. Retrieved from <https://books.google.cz/books?id=QD5FAQAIAAJ>
- Riederer, M., & Muller, C. (2006). *Biology of the plant cuticle*. (M. Riederer & C. Müller, Eds.). Oxford, UK: Blackwell Pub. <https://doi.org/10.1002/9780470988718>
- Riederer, M., & Schreiber, L. (1995). Waxes : the transport barriers of plant cuticles. *Waxes : Chemistry, Molecular Biology and Functions*. Retrieved from <https://ci.nii.ac.jp/naid/10024970124/>
- Rizhsky, L., Liang, H., & Mittler, R. (2002). The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco 1. <https://doi.org/10.1104/pp.006858>
- Rowland, O., & Domergue, F. (2012). Plant fatty acyl reductases: Enzymes generating fatty alcohols for protective layers with potential for industrial applications. *Plant Science*,

193–194, 28–38. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2012.05.002>

- Rowland, O., Zheng, H., Hepworth, S. R., Lam, P., Jetter, R., & Kunst, L. (2006). CER4 Encodes an Alcohol-Forming Fatty Acyl-Coenzyme A Reductase Involved in Cuticular Wax Production in Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY*, *142*(3), 866–877. <https://doi.org/10.1104/pp.106.086785>
- Rozema, J., van de Staaij, J., Björn, L. O., & Caldwell, M. (1997). UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends in Ecology & Evolution*, *12*(1), 22–28. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(96\)10062-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(96)10062-8)
- Salatino, A. (1993). *Chemical ecology and the theory of oligotrophic scleromorphism*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (Vol. 65). Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/308378974_Chemical_ecology_and_the_theory_of_oligotrophic_scleromorphism
- Salminen, T. A., Blomqvist, K., & Edqvist, J. (2016). Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure, and function. *Planta*, *244*(5), 971–997. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2585-4>
- Samuels, L., Kunst, L., & Jetter, R. (2008). Sealing Plant Surfaces: Cuticular Wax Formation by Epidermal Cells. *Annual Review of Plant Biology*, *59*(1), 683–707. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.103006.093219>
- Sandermann, H., Ernst, D., Heller, W., & Langebartels, C. (1998). Ozone: An abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends in Plant Science*, *3*(2), 47–50. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01162-X](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01162-X)
- Schlegel, T. K., Schönherr, J., & Schreiber, L. (2005). Size selectivity of aqueous pores in stomatous cuticles of *Vicia faba* leaves. *Planta*, *221*(5), 648–655. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1480-1>
- Schönherr, J. (2006). Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *Journal of Experimental Botany*, *57*(11), 2471–2491. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj217>
- Schreiber, L., & Schönherr, J. (2009). *Water and solute permeability of plant cuticles : measurement and data analysis*. Springer.
- Shahzad, B., Tanveer, M., Che, Z., Rehman, A., Cheema, S. A., Sharma, A., ... Zhaorong, D. (2018). Role of 24-epibrassinolide (EBL) in mediating heavy metal and pesticide induced oxidative stress in plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *147*, 935–944. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.066>
- Sharma, I. (2012). Arsenic induced oxidative stress in plants. *Biologia*, *67*(3). <https://doi.org/10.2478/s11756-012-0024-y>
- Shepherd, T., & Wynne Griffiths, D. (2006). The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist*, *171*(3), 469–499. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01826.x>
- Skirycz, A., & Inzé, D. (2010). More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology*, *21*(2), 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.002>
- Solovchenko, A., & Merzlyak, M. (2003). Optical properties and contribution of cuticle to UV protection in plants: experiments with apple fruit. *Photochemical & Photobiological*

- Sciences*, 2(8), 861. <https://doi.org/10.1039/b302478d>
- Steinmüller, D., & Tevini, M. (1985). Action of ultraviolet radiation (UV-B) upon cuticular waxes in some crop plants. *Planta*, 164(4), 557–564. <https://doi.org/10.1007/BF00395975>
- Suh, M. C., Samuels, A. L., Jetter, R., Kunst, L., Pollard, M., Ohlrogge, J., & Beisson, F. (2005). Cuticular Lipid Composition, Surface Structure, and Gene Expression in Arabidopsis Stem Epidermis. *PLANT PHYSIOLOGY*, 139(4), 1649–1665. <https://doi.org/10.1104/pp.105.070805>
- Szczuka, E., & Szczuka, A. (2003). *CUTICLE FLUORESCENCE DURING EMBRYOGENESIS OF ARABIDOPSIS THALIANA (L.) HEYNH. ACTA BIOLOGICA CRACOVIENSIA Series Botanica* (Vol. 45). Retrieved from http://www2.ib.uj.edu.pl/abc/pdf/45_1/Szczuka.pdf
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2003). *Plant Physiology*, 3rd ed. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg079>
- Tanaka, H., Watanabe, M., Watanabe, D., Tanaka, T., Machida, C., & Machida, Y. (2002). ACR4, a Putative Receptor Kinase Gene of Arabidopsis thaliana, that is Expressed in the Outer Cell Layers of Embryos and Plants, is Involved in Proper Embryogenesis. *Plant and Cell Physiology*, 43(4), 419–428. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf052>
- Tang, L., Cai, H., Zhai, H., Luo, X., Wang, Z., Cui, L., & Bai, X. (2014). Overexpression of Glycine soja WRKY20 enhances both drought and salt tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118(1), 77–86. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0463-y>
- Taylor, R. M., Nikaido, O., Jordan, B. R., Rrosamond, J., Bray, C. M., & Tobin, A. K. (1996). Ultraviolet-B-induced DNA lesions and their removal in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant, Cell and Environment*, 19(2), 171–181. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1996.tb00238.x>
- Tester, M. (2003). Na⁺ Tolerance and Na⁺ Transport in Higher Plants. *Annals of Botany*, 91(5), 503–527. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg058>
- Tuzet, A., Perrier, A., Loubet, B., & Cellier, P. (2011). Modelling ozone deposition fluxes: The relative roles of deposition and detoxification processes. *Agricultural and Forest Meteorology*, 151(4), 480–492. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2010.12.004>
- Valeska Zeisler-Diehl, V., Migdal, B., & Schreiber, L. (2017). Quantitative characterization of cuticular barrier properties: methods, requirements, and problems. *Journal of Experimental Botany*, 68(19), 5281–5291. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx282>
- Vallarino, J. G., Yeats, T. H., Maximova, E., Rose, J. K., Fernie, A. R., & Osorio, S. (2017). Postharvest changes in LIN5-down-regulated plants suggest a role for sugar deficiency in cuticle metabolism during ripening. *Phytochemistry*, 142, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.06.007>
- Votrubová, O. (2010). *Anatomie rostlin: Univerzity Karlovy - Přírodovědecká fakulta*. Praha: Karolinum 2010.
- Wang, M., Wang, Y., Wu, H., Xu, J., Li, T., Hegebarth, D., ... Wang, Z. (2016). Three TaFAR genes function in the biosynthesis of primary alcohols and the response to abiotic

- stresses in *Triticum aestivum*. *Scientific Reports*, 6, 25008.
<https://doi.org/10.1038/srep25008>
- Wang, W., Liu, X., Gai, X., Ren, J., Liu, X., Cai, Y., ... Ren, H. (2015). *Cucumis sativus* L. WAX2 plays a pivotal role in wax biosynthesis, influencing pollen fertility and plant biotic and abiotic stress responses. *Plant and Cell Physiology*, 56(7), 1339–1354.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcv052>
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5>
- Wang, Z.-Y., Xiong, L., Li, W., Zhu, J.-K. J., & Zhu, J.-K. J. (2011). The Plant Cuticle Is Required for Osmotic Stress Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis and Osmotic Stress Tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*.
<https://doi.org/10.1105/tpc.110.081943>
- Weng, H., Molina, I., Shockey, J., & Browse, J. (2010). Organ fusion and defective cuticle function in a *lacs1 lacs2* double mutant of *Arabidopsis*. *Planta*, 231(5), 1089–1100.
<https://doi.org/10.1007/s00425-010-1110-4>
- Wisniewski, M., Gusta, L., & Neuner, G. (2014). Adaptive mechanisms of freeze avoidance in plants: A brief update. *Environmental and Experimental Botany*, 99, 133–140.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.11.011>
- Xiao, S., & Chye, M.-L. (2011). New roles for acyl-CoA-binding proteins (ACBPs) in plant development, stress responses and lipid metabolism. *Progress in Lipid Research*, 50(2), 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.11.002>
- Xue, Y., Xiao, S., Kim, J., Lung, S.-C., Chen, L., Tanner, J. A., ... Chye, M.-L. (2014). *Arabidopsis* membrane-associated acyl-CoA-binding protein ACBP1 is involved in stem cuticle formation. *Journal of Experimental Botany*, 65(18), 5473–5483.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru304>
- Yang, Z., Zhang, T., Lang, T., Li, G., Chen, G., & Nevo, E. (2013). Transcriptome comparative profiling of barley *eib1* mutant reveals pleiotropic effects of *HvABCG31* gene on cuticle biogenesis and stress responsive pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 20478–20491. <https://doi.org/10.3390/ijms141020478>
- Yeats, T. H., Martin, L. B. B., Viart, H. M.-F., Isaacson, T., He, Y., Zhao, L., ... Rose, J. K. C. (2012). The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nature Chemical Biology*, 8(7), 609–611. <https://doi.org/10.1038/nchembio.960>
- Yeats, T. H., & Rose, J. K. C. (2013). The Formation and Function of Plant Cuticles. *PLANT PHYSIOLOGY*, 163(1), 5–20. <https://doi.org/10.1104/pp.113.222737>
- Yokoi, S., Bressan, R. A., & Hasegawa, P. M. (2002). *Salt Stress Tolerance of Plants*. *JIRCAS Working Report*. Retrieved from http://www.plantstress.com/Articles/salinity_m/salinity_m_files/JIRCAS.pdf
- Yoshida, T., Mogami, J., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014). ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 21, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.07.009>
- Zhou, Q., Wang, A., Duan, R., Yan, J., Zhao, G., Nevo, E., ... Chen, G. (2017). Comparative transcriptome profile of the leaf elongation zone of wild barley (*Hordeum spontaneum*)

eibi1 mutant and its isogenic wild type. *Genetics and Molecular Biology*, 40(4), 834–843. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0321>

Zhou, X., Li, L., Xiang, J., Gao, G., Xu, F., Liu, A., ... Wan, X. (2015). OsGL1-3 is Involved in Cuticular Wax Biosynthesis and Tolerance to Water Deficit in Rice. *PLoS ONE*, 10(1), e116676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116676>

Zhu, J.-K. (2002). SALT AND DROUGHT STRESS SIGNAL TRANSDUCTION IN PLANTS. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 247–273. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329>

Zhu, X., Xiong, L., & Zhang, Q. (2013). Putative megaenzyme DWA1 plays essential roles in drought resistance by regulating stress-induced wax deposition in rice. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316412110>