

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Rozhovory přes kutikulu: Molekulární aspekty interakce  
ve vývoji průduchů a syntéze vosků v kutikule**

Diplomová práce

**Bc. Simona Koutková**

Školitel: Ing. Marie Hronková, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Iva Mozgová, Ph.D.

České Budějovice 2023

Koutková, S., 2023: Rozhovory přes kutikulu: Molekulární aspekty interakce ve vývoji průduchů a syntéze vosků v kutikule. [Crosstalk across the cuticle: Molecular aspects of interaction in stomatal development and wax synthesis in the plant cuticle. Mgr. Thesis, in Czech.] – 68p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The main aim of the thesis was to find a connection between the cuticular and stomatal development on the molecular level. The *SHN* (*SHINE*) genes, which encode SHN transcription factors and belong to AP2/EREBP (APETALA2/ ethylene-responsive element binding protein) family, were investigated. Homozygous mutant lines of *Arabidopsis thaliana* with T-DNA insertion in *SHN1* (*WIN1*), *SHN2*, or *SHN3* gene were acquired from SALK lines. The hypothesis that *SHNs* are one of the crucial genes involved in stomatal and cuticular development was confirmed. The overexpression of the *SHN* genes gently stimulated epicuticular wax deposition and decreased stomatal density. The opposite effect of the *SHNs* downregulation on the cuticle and stomatal development was not supported. Cryo-electron microscopy; Real-Time RT-PCR of some genes involved in both cuticular or stomatal development; GC-MS (gas chromatography mass spectrometry) of some compounds of the plant cuticle were performed.

**Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.**

**V Českých Budějovicích, dne 12.4.2023**

.....

**Simona Koutková**



## **Poděkování**

Mile ráda bych poděkovala především mé školitelce, doktorce Marii Hronkové, která mi byla vždy ochotna vše vysvětlit, názorně ukázat a byla mi vždy velkou oporou. Zároveň bych chtěla velice poděkovat doktorce Ivě Mozgové za vstřícné jednání při debatách nad dalšími postupy a přátelský přístup. Dále mé poděkování patří paní inženýrce Daně Wiesnerové, bez které bych si práci v laboratoři neuměla představit. Mé poděkování také náleží celému rodinnému kolektivu na katedře Experimentální biologie rostlin JU, zejména doktoru Jiřímu Kubáskovi, který mi analyzoval vosky a radil při tvorbě grafů a doktoru Martinu Jandovi za přínosné rady ve vědeckém prostředí. Též nesmím opomenout zmínit kolektiv Laboratoře elektronové mikroskopie Biologického centra Akademie věd a Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity. V neposlední řadě vděčím své rodině a příteli za pevné nervy, finanční i psychickou podporu při studiu.

Projekt byl financová grantem GAČR (18-14704S) BC AV CR v.v.vi. a Studentskou grantovou agenturou PŘF JU (SGA) 2021.

# Obsah

Seznam použitých zkratk.....	1
1 Úvod .....	2
2 Kutikula rostlin .....	4
2.1 Syntéza kutikuly.....	6
2.2 Molekulární aspekty syntézy kutikuly .....	9
3 Transkripční faktory .....	10
3.1 Transkripční faktory SHN rodiny AP2/EREBP .....	11
3.2 SHINE (SHN) transkripční faktory ovlivňují geny zapojené do tvorby kutikuly .....	13
4 Regulace vývoje pokožkových buněk rostlin v souvislosti se SHN transkripčními faktory .....	15
5 Praktická část.....	19
5.1 Cíle práce.....	19
5.2 Materiál a metody.....	19
5.2.1 Rostlinný materiál a podmínky pěstování.....	19
5.2.2 Genotypování.....	22
5.2.3 Určení relativní exprese genů, Real-time RT-PCR .....	23
5.2.4 Kryo-elektronová mikroskopie (FESEM) listu <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	25
5.2.5 Analýza vosků v kutikule listu <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	25
5.2.6 Průduchová hustota (SD) a průduchový index (SI).....	26
5.2.7 Statistické vyhodnocení a tvorba grafů.....	26
5.3 Výsledky.....	27
5.3.8 Výběr homozygotních linií.....	27
5.3.9 Relativní exprese <i>SHN</i> genů u vybraných homozygotů.....	28
5.4 Kryo-elektronová mikroskopie (FESEM).....	32
5.5 Analýza epikutikulárních vosků listu <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	33
5.5.10 Relativní exprese vybraných genů účastnící se vývoje průduchů či kutikuly na listu <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	35
5.5.11 Průduchová hustota a průduchový index .....	40
6 Diskuze .....	44
7 Závěr.....	50
8 Přílohy .....	51
9 Přehled citované literatury.....	59

## Seznam použitých zkratk

Zkratka	Význam	Jednotka
FESEM	Technika skenovací elektronové mikroskopie (Field Emission Scanning Electron Microscopy)	
GCs	Svěrací buňky (Guard Cells)	
GMC	Mateřská buňka průduchů (Guard Mother Cell)	
GC-MS	Plynová chromtaografie s hmotnostní spektrometrií (Gas chromatography – mass spectroscopy)	
MMC	Mateřská buňka meristemoidu (Meristemoid Mother Cell)	
PvC	Dlaždicové buňky (Pavement Cell)	
PvCD	Hustota dlaždicových buněk (Pavement Cell Density)	mm <sup>-2</sup>
SD	Průduchová hustota (Stomatal Density)	mm <sup>-2</sup>
SI	Průduchový index (Stomatal Index)	%
SLGC	Sesterská buňka meristemoidu, typ PvC (Stomatal-lineage ground cell)	
WT	Rostlina bez mutace (wild type, divoká forma)	

# 1 Úvod

Vedlejším produktem fotosyntézy, bez kterého bychom nemohli existovat, je kyslík. Není třeba dodávat proč jsou rostliny v tomto ohledu pro nás na Zemi důležité. Kyslík je uvolňován malými otvory v pokožce zvanými průduchy, skrze které rostlina primárně přijímá oxid uhličitý pro fotosyntézu. Skrze otevřené průduchy ovšem z rostlin uniká i voda (Gao *et al.*, 2017). Rostlina tak musí řešit, zdali je pro ni na základě aktuálních podmínek výhodné průduchy kvůli příjmu oxidu uhličitého pro fotosyntézu otevřít či nikoli, aby se zamezilo vysoušení (Bueno *et al.*, 2020). I samotný počet průduchů ovlivňuje výpar. Vyvine-li se na listech méně průduchů, zvyšuje se tím tolerance k suchu (Caine *et al.*, 2019). Proti nadměrnému výparu vody také rostlinám pomáhá hydrofobní vrstva – kutikula – pokrývající pokožku nadzemních orgánů (Riederer and Schreiber, 2001). Jak průduchy, tak kutikula jsou významným evolučním přizpůsobením suchozemských rostlin (Arteaga-Vazquez, 2016) okolním podmínkám prostředí a jejich vývoj by mohl být vzájemně koordinován.

Na základě publikovaných dat se zdá, že vývoj průduchů a kutikuly má na molekulární úrovni společnou dráhu nebo alespoň bod, kdy se obě dráhy potkávají (Gray *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2011). V mé bakalářské práci (Koutková, 2020) byla zmíněna korelace mezi počtem průduchů a množstvím vosků v kutikule listu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*, L.). Tato diplomová práce se konkrétně zaměřuje na úlohu *SHN* (*SHINE*) rodiny 3 genů (*SHN1*, *SHN2*, *SHN3*) fungující v rostlině jako transkripční faktory. Nejvíce studovaným z nich je *SHN1* (*WIN1*, *WAX INDUCER 1*) gen, jež při zvýšené expresi snižuje počet průduchů, ale na druhé straně navyšuje obsah vosků v kutikule listu huseníčku (ekotyp Wasilevskija, WS). Současně *SHN1* jako transkripční faktor mění expresi řady genů podílejících se na vývoji kutikuly. Proto se *SHN* zdá být jedním z genů účastnících se obou vývojových drah (Aharoni *et al.*, 2004; Kannangara *et al.*, 2007). Rovněž z našich dosud nepublikovaných výsledků sekvenování mutantů se změněným počtem průduchů (dvojitý mutant *epf1,2* měl vyšší počet průduchů, *StRNAi* měl snížený počet průduchů) vychází *SHN* geny (nejvíce *SHN2*) jako klíčové. Následná analýza vosků v kutikule také ukázala změny v obsahu epikutikulárních vosků.

Pokud je exprese *SHN1* zvýšena, jsou rostliny odolnější vůči suchu, patrně díky změněnému složení kutikuly a počtu průduchů (Aharoni *et al.*, 2004). Větší význam budou mít zřejmě průduchy než kutikula, neboť její permeabilita byla u těchto mutantních rostlin větší než u kontrolních rostlin (Sadler *et al.*, 2016). Diplomová práce shrnuje výsledky ze studia rostlin

huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*, L.) s T-DNA inzercí (*Agrobacterium transferred DNA*) v jednotlivých *SHN* genech, získané ze SALK mutantní kolekce (Alonso *et al.*, 2003), a rozšiřuje tak poznatky o společném vývoji průduchů a kutikuly listu modelové rostliny.

## 2 Kutikula rostlin

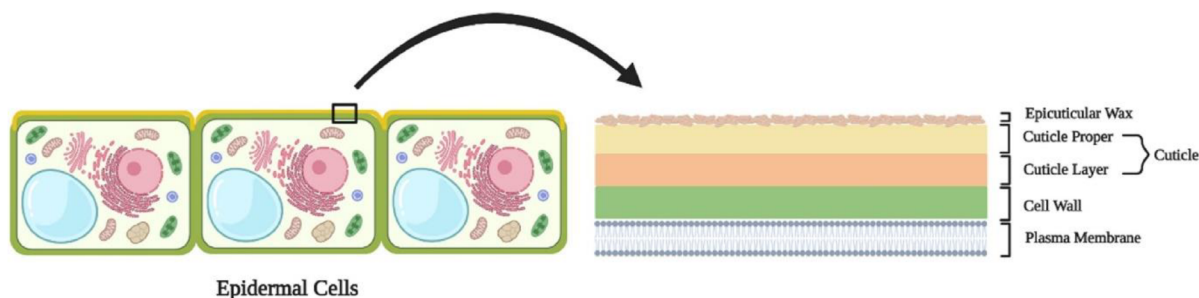
Kutikula je tenká (0,1-10  $\mu\text{m}$ ) heterogenní vrstva pokrývající pokožku (epidermis) nadzemních orgánů rostlin (Chen *et al.*, 2011; Riederer and Schreiber, 2001). Před pár lety bylo také zjištěno, že kutikula se nenachází jen v nadzemních částech rostlin, ale pokrývá i kořenovou čepičku (Berhin *et al.*, 2019).

Kutikulu lze rozdělit na vrstvu sousedící s buněčnou stěnou pokožkové buňky, kutikulární vrstvu (cuticle layer), složenou zejména z kutinu a polysacharidů, a vrstvu nad ní (vlastní kutikulu, cuticle proper) tvořenou kutinem a vosky (Yeats and Rose, 2013) (**Obr. č. 1**).

Chemické složení kutikuly není u všech rostlin ani orgánů, které chrání, jednotné. Závisí mimo jiné na vývojovém stádiu. Například listy mladé kukuřice mají vosky obohacené o primární alkoholy, kdežto zralé listy o estery (Bianchi *et al.*, 1985). Nicméně dvě složky (kutin a vosky), jak již bylo řečeno, jsou vždy přítomné (Jarvinen *et al.*, 2010; Fernandez *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2020). Dále se v kutikule nachází glycerol, polysacharidy (celulóza, hemicelulóza, pektin), kutan a fenolické sloučeniny (derivát kyseliny ferulové či kávové). Samotný kutin je tvořen zejména alifatickými C16-C18  $\omega$ -hydroxy/epoxi mastnými kyselinami, které se díky esterovým vazbám skládají do řetězců a tvoří síť (Nip *et al.*, 1986; Heredia, 2003; Heredia-Guerrero *et al.*, 2014; Bhanot *et al.*, 2021). Vosky jsou složeny zejména z mastných kyselin s dlouhým řetězcem (VLCFA, very long chain fatty acids) (C20 - C34) a jejich derivátů, jmenovitě z alkanů, aldehydů, alkoholů, esterů. Mohou se objevit v menší koncentraci i triterpenoidy, fenypropanoidy a flavonoidy (Bernard and Joubes, 2013; Petit *et al.*, 2017; Bhanot *et al.*, 2021; Jetter and Schaffer, 2001).

Vosky, které tvoří 20-60 % hmoty kutikuly (Heredia, 2003) lze, na rozdíl od kutinu, snadno vyextrahovat organickými rozpouštědly (chloroformem, acetonem, ethylacetátem, hexanem a methanolem) (Bhanot *et al.*, 2021). Nejsnadněji lze extrahovat zejména epikutikulární vosky (Koch and Ensikat, 2008; Buschhaus and Jetter, 2011), které se nacházejí nad „vlastní kutikulou“ (cuticle proper) (Yeats and Rose, 2013) (**Obr. č. 1**). Vosky na povrchu pokožky mohou tvořit buď film nebo i krystaly, které jsou pro každý rostlinný druh specifické (Barthlott *et al.*, 1998; Buschhaus and Jetter, 2011). Vosky se nacházejí i uvnitř kutikulární matrice (tzv. intrakutikulární vosky) (Koch and Ensikat, 2008). Vědci Farber *et al.* (2019) u vosků stonku čiroku (*Sorghum*) zjistili, že i epikutikulární vosky jsou heterogenní.

Jejich vnější povrch je složen z neuspořádaných alifatických uhlovodíků, zatímco vnitřní struktura je více uspořádaná a krystalizovaná.



**Obr. č. 1:** Vrstvy kutikuly nad pokožkovými buňkami (epidermal cells). Plazmatická membrána (plasma membrane) a buněčná stěna (cell wall) pokožkových buněk je pokryta kutikulou skládající se z kutikulární vrstvy (cuticle layer) a vlastní kutikuly (cuticle proper). Nejsvrchnější část kutikuly tvoří epikutikulární vosky (Bhanot *et al.*, 2021).

Díky voskům je povrch nadzemních orgánů hydrofobní, dochází zde k „lotosovému efektu“ kdy kapičky vody omílají plochu listu a tím ji zároveň i očišťují (Ensikat *et al.*, 2011; Bargel *et al.*, 2006; Bhanot *et al.*, 2021) a smyjí i potenciálních patogeny. Přesto však kutikula není 100% nepropustnou bariérou. Její propustnost pro vodu se zvyšuje v závislosti na zvyšující se teplotě. Rieder a Schreiber (2001) zkoumali tuto závislost u listů několika druhů rostlin při teplotě povrchu listu od 15°C do 55°C. Větší význam při transpiraci mají intrakutikulární vosky než ty povrchové - epikutikulární, což bylo dokázáno nezměněnou transpirací po odstranění epikutikulárních vosků (Zeisler-Diehl *et al.*, 2018; Bueno *et al.*, 2020). Kutikula má i další protektivní funkce. Jelikož jsou rostliny celý svůj život vystaveny slunečním paprskům, ukázala se kutikula jako dobrý pomocník při ochraně před UV zářením, které může poškodit DNA i chloroplast (Jansen *et al.*, 1998). Buď se UV-B záření absorbuje flavonoidy ve voskové vrstvě či je UV jednoduše odraženo (Bhanot *et al.*, 2021; Bornman *et al.*, 1997). Rovněž i tloušťka kutikuly koreluje do jisté míry s dobou vystavení rostlin UV záření. Metwally *et al.* (2019) zjistili, že po 40 minutách expozice áronovité rostliny *Spathiphyllum* na UV světle se tloušťka kutikuly téměř ztrojnásobila. Ovšem vystavení rostlin UV záření pouze na 30 min mělo za následek naměření menší tloušťky kutikuly oproti kontrolní variantě. Proto se zdá, že tloušťka kutikuly nemá takový význam jako její složení. To potvrzuje i fakt, že tloušťka kutikuly nemá s největší pravděpodobností vliv na výraznější omezení transpirace (Riederer and Schreiber, 2001; Kerstiens *et al.*, 2006).

## 2.1 Syntéza kutikuly

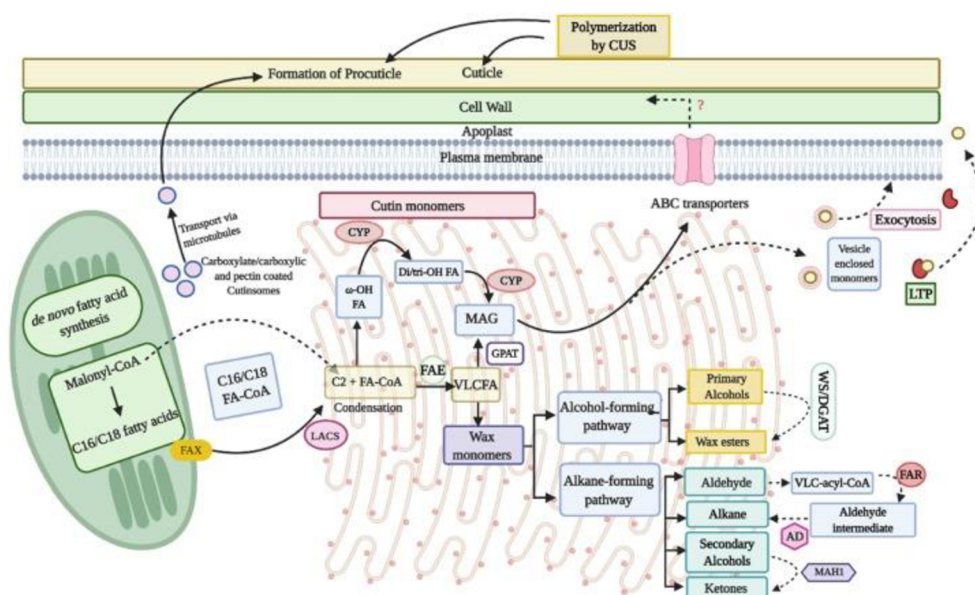
Kutikula, jako první obranná bariéra mezi vnitřním prostředím rostliny a okolním světem, je syntetizována v pokožkových buňkách, ať už listů, plodů, květů či stonků (Bhanot *et al.*, 2021; Niklas and Kutschera, 2010). Z časového hlediska není zcela jasné, kdy se kutikula zakládá, ale její první viditelná struktura byla pozorována už v globulární fázi vývoje embrya po barvení lipofilním barvivem auraminem u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) (Ingram and Nawrath, 2017; Szczuka and Szczuka, 2003). Složení kutikuly se liší mezi druhy rostlin i orgány. Některé sloučeniny, jako například sekundární alkoholy či ketony, se mohou tvořit pouze v řapících či stonku ale v menší míře i v listech, jak bylo zjištěno u huseníčku rolního (Greer *et al.*, 2007).

Obecně biosyntéza kutinu a vosků vychází ze stejných prekurzorů (Natarajan *et al.*, 2020; Hen-Avivi *et al.*, 2014), mastných kyselin (C16/C18), které se tvoří v plastidech (Yeats and Rose, 2013) v několika cyklech postupným prodlužováním dvouuhlíkatých Acetyl-CoA (acetyl-koenzym A) jednotek syntázou mastných kyselin (FAS, fatty acid synthase). Každý cyklus zahrnuje kondenzaci, redukci, dehydrataci a redukci, kde jako kofaktor slouží ACP (Acyl Carrier Protein). Následně Fatty Acyl-thioesteráza A či B (FATA, FATB) hydrolyzuje C16/C18-ACP (Borisjuk *et al.*, 2014). De-novo vytvářené mastné kyseliny jsou z plastidů přemístěny do cytoplasmy k endoplasmatickému retikulu pomocí komplexu exportu mastných kyselin (FAX, Fatty Acid Export), kde díky syntetáze LACS (Long Chain Acyl-Coenzyme A Synthases, acyl koenzym A syntetáza s dlouhým řetězcem) reagují s koenzymem A za tvorby FA-CoA (Fatty Acyl Coenzym A) (Pulsifer *et al.*, 2012; Yeats and Rose, 2013; Bhanot *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2019). Některé mastné kyseliny mohou být konjugované na acyl-CoA pomocí LACS už v membráně plastidů (Jessen *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). Přičemž u huseníčku rolního je nepostradatelná aktivita dvou z devíti LACS, a to LACS1 a LACS2 (Lu *et al.*, 2009; Schnurr *et al.*, 2004).

Poté se dráhy syntézy rozdělují a jsou zakončené syntézou vosků či kutinu. Syntéza vosků pokračuje na membráně endoplasmatického retikula aktivací komplexu elongázy mastných kyselin (FAE, Fatty Acid Elongase) prodlužující řetězec mastných kyselin, o 2 uhlíky za cyklus, na tzv. mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (VLCFA, very long chain fatty acid). Konkrétně vzniká VLCFA-acyl-CoAs, které mají délku C24-C36 (Yeats and Rose, 2013; Bhanot *et al.*, 2021). Membránově vázaný komplex elongáz se skládá z  $\beta$ -ketoacyl-CoA syntázy (KCS),  $\beta$ -ketoacyl-CoA reduktázy (KCR), 3-hydroxyacyl-CoA dehydratázy (HCD)



a enoyl-CoA reduktázy (ECR) (Han *et al.*, 2002; Beaudoin *et al.*, 2002; Kohlwein *et al.*, 2001; Hegebarth *et al.*, 2017; Paul *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2019). Dále se komponenty vosků tvoří dvěma metabolickými cestami. Za první cestou acylové redukce, jinak také zvanou alkoholovou, ze které vznikají primární alkoholy a estery. Druhá je dekarboxylační cesta, neboli tzv. alkanová, kdy vznikají alky, sekundární alkoholy, aldehydy a ketony (Li *et al.*, 2019; Joubes and Domergue, 2018; Broun *et al.*, 2004). Alkoholová dráha dává vznik sloučeninám se sudým počtem uhlíků, alkanová s lichým počtem uhlíků. Nejčastějším voskem u huseníčku rolního byl zaznamenán alkan C29-C33 (Samuels *et al.*, 2008). Všechny nasyntetizované komponenty kutikuly jsou poté, dosud plně neprozkoumaným mechanismem, transportovány k povrchu buňky. Skrz plazmatickou membránu jsou přenášeny nejspíše ABC transportéry – ATP binding cassettes (Do *et al.*, 2018), (známé jsou u huseníčku například ABCG11 a ABCG32 (McFarlane *et al.*, 2010; Bessire *et al.*, 2011)). Dalším možným způsobem transportu je exocytóza či přesun komponentů proteiny transportující lipidy – LTP (DeBono *et al.*, 2009; Yeats and Rose, 2013) (**Obr. č. 2**).



**Obr. č. 2:** Biosyntéza kutikuly. Předpokládané dráhy tvorby kutinu a vosků při syntéze kutikuly rostlin. Podrobnější popis v textu (Bhanot *et al.*, 2021).

U syntézy kutinu se předpokládají dva možné scénáře, které se s největší pravděpodobností doplňují. Enzymatický mechanismus zahrnuje aktivitu kutin syntázy (CUS, cutin synthase). Druhý, neenzymatický proces, využívá kutinzomy (Stepinski *et al.*, 2020).

Kutinové prekurzory (C16 a C18, či FA-CoA) jsou v endoplazmatickém retikulu modifikovány na monoacylglyceroly (MAG) a diacylglyceroly (DAG) (Stepinski *et al.*, 2020; Manan *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2016), což je provedeno v několika krocích, zahrnujících hydroxylaci konců ( $\omega$ - uhlík) a středů řetězců mastných kyselin (přesněji hydroxylázou cytochrom P450 kódovanou rodinou CYP 86A4 a následně CYP77A6) či syntézu acyl-CoA meziproduktů (Li-Beisson *et al.*, 2009). Přesné pořadí jednotlivých kroků však není známo. Pokračující oxidací koncového uhlíku vznikají dikarboxylové kyseliny, které u rostlin, kromě huseníčku, nejsou běžné (Fich *et al.*, 2016; Yeats and Rose, 2013; Kurdyukov *et al.*, 2006b). Nakonec dochází k esterifikaci a vznikají monoacylglyceroly (MAG) a diacylglyceroly (DAG), katalyzované glycerol-3-fosfát-CoA acyltransferázou (GPAT) a diacylglycerolacyltransferázou (DGAT2) (Stepinski *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2016; Manan *et al.*, 2017). GPAT4 byla popsána u huseníčku pro katalyzaci esterifikační reakce v květu (Li-Beisson *et al.*, 2009), zatímco GPAT6 a GPAT8 v listech a stonku (Li *et al.*, 2007). Lipidy jsou poté transportovány lipidovými tělísky od endoplazmatického retikula k buněčné stěně. Do tohoto transportu se zapojují i mikrotubuly. Následně dochází v místě ukládání kutinu k polymerizaci pomocí kutin syntázy (CUS, Cutin Synthase) (Stepinski *et al.*, 2020). Další či nověji popsán přístup transportu kutinových monomerů zahrnuje kutinzomy, což jsou částice o průměru 40 - 200 nm (Stepinski *et al.*, 2020) studované u *Ornithogalum umbellatum* (Kwiatkowska *et al.*, 2014) a *Arabidopsis thaliana* (Stepinski *et al.*, 2017). Tyto částice byly poprvé připraveny in vitro, na základě pozorování samovolného sestavování hydroxymastných kyselin do nanostruktur (Heredia-Guerrero *et al.*, 2008; Stepinski *et al.*, 2020). Povrch kutinzomů, oddělující lipidový obsah od vodného prostředí cytoplazmy, je složen s hydrofilních karboxylových sloučenin, zatímco vnitřek z hydroxykyselin. Vytvořené kutinzomy, které mohou přenášet i enzymy, jsou transportovány mikrotubuly k buněčné stěně. To, že obě syntetické dráhy kutinu spolupracují dosvědčuje fakt, že v raných fázích vývoje kutikuly byly identifikovány kutinzomy a v pozdější fázi aktivita enzymu CUS (Stepinski *et al.*, 2020; Yeats *et al.*, 2012).

## 2.2 Molekulární aspekty syntézy kutikuly

Dosud byla popsána řada genů podílející se na syntéze kutikuly (Philippe *et al.*, 2020). Následující text poskytuje přehled pouze několika málo genů, které jsou zapojeny do této dráhy.

Již výše byla zmíněná glycerol-3-fosfát-acyltransferáza (GPAT) měnící monomery mastných kyselin na 2-monoacylglyceridy (Stepinski *et al.*, 2020; Manan *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2016). Podtypy GPAT4, GPAT6 a GPAT8 se podílejí na defosforylační reakci v syntéze kutinu (Philippe *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2012). Oproti tomu na spojení monomenů kutinu byl identifikován enzym DCR (DEFECT IN CUTICULAR RIDGES), který patří do stejné rodiny acyltransferáz (BAHD) jako BODYGUARD (BDG) a CUTIN SYNTÁZA (CUS) (Stepinski *et al.*, 2020). DCR se podílí na začlenění nejhojnější kyseliny kutikulární matrice – 9(10),16- dihydroxy-hexadekanové kyseliny. Tato kyselina tvoří v kutikule asi polovinu množství kutinu. Přitom bylo zjištěno, že DCR může být aktivní jak v cytosolu nebo i v plazmatické membráně a má vliv primárně na syntézu kutinu, jelikož u mutantních rostlin s defektem DCR bylo množství epikutikulárních vosků nezměněno. Navíc se DCR účastní jak oligomerizace, tak polymerizace. Aktivita DCR je také nezbytná při diferenciaci epidermálních buněk, vývoji trichomů a zabránění fúze nadzemních orgánů (Panikashvili *et al.*, 2009). Další zmíněný gen BDG kóduje  $\alpha/\beta$ -hydrolázu, je exprimován v epidermálních buňkách, ale hromadí se v buněčné stěně. Mutace v BDG genu (*bdg*) způsobuje zvýšené množství vosků až o trojnásobek, a to zejména alkanů (C29, C31, C33) (Kurdyukov *et al.*, 2006a). Navýšení množství alkanů je zřejmě způsobeno aktivací dekarboxylační cesty, která znamená změnu mastných kyselin o sudém počtu uhlíků (C<sub>2n</sub>) na aldehydy a následně na alkany o lichém počtu uhlíků (C<sub>2n-1</sub>) (Cheesbrough and Kolattukudy, 1984; Kurdyukov *et al.*, 2006a). U rostlin byla také pozorována defektní kutikula (slabší i silnější, místy chybějící) pod mikroskopem, ale následná plynová chromatografie odhalila dvojnásobné až trojnásobné zvýšení množství lipidů. Výsledky studie naznačují, že BDG se spíše účastní zesíťování kutikuly než její syntézy (Kurdyukov *et al.*, 2006a). Další studie ovšem uvádí jiné výsledky. Defektní rostliny *bdg-6* a *bdg-7* mají rovněž více kutinu v kutikule listu, ale při zkoumání listů mladších než 36 dní, bylo množství kutinu oproti kontrole o 60 % sníženo. Jestliže byl *BDG* gen exprimován pod konstitutivním promotorem, bylo množství kutinu navýšeno až čtyřikrát. BDG se nejspíš účastní biosyntézy polyesterů, a to zejména polynenasycených monomerů C18 (Jakobson *et al.*, 2016).

Enzym HOTHEAD (HTH) s největší pravděpodobností katalyzuje další oxidaci již hydroxylovaného koncového uhlíku mastných kyselin a tvoří tak aldehydovou a druhou karboxylovou skupinu (Kurdyukov *et al.*, 2006b; Fich *et al.*, 2016). Gen *KCSI* (3 - ketoacyl - koenzym A syntáza 1) je součástí rodiny dalších 20 genů (jako je např. *FDD*, *FIDDLEAHEAD* neboli *KCSI0*), které kódují  $\beta$ -ketoacyl-CoA syntázu prodlužující řetězec mastných kyselin v průběhu biosyntézy kutikuly (Joubes *et al.*, 2008; Pruitt *et al.*, 2000). Dalším genem zapojeným do tvorby kutikuly je *CER*. U huseníčku rolního bylo popsáno několik *CER* genů účastnících se tvorby vosků (Kunst and Samuels, 2003). Gen *CER5* například kóduje ABC-transportér, potřebný k přenosu vosků přes plazmatickou membránu (Pighin *et al.*, 2004). *CER2* a *CER26* se podílí, stejně jako FAE komplex enzymů, na prodlužování řetězců VLC acyl-CoA na řetězce delší než C28 (Kong *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020; Haslam *et al.*, 2012; Pascal *et al.*, 2013), přitom *CER6* (*CUT1*, *KCS6*) se zdá být v biosyntéze vosků jako hlavní (Fiebig *et al.*, 2000). Mutace v *CER2* způsobuje hromadění voskových esterů, primárních alkoholů a C26 a C28 acylových skupin (Kunst and Samuels, 2003). Geny *CER1* a *CER3/WAX2* jsou nejprobádanější. Mutace *cer1* způsobuje lesklé stonky a sníženou syntézu alkanů. *CER1* nejspíše kóduje aldehyddekarboxylázu měnící aldehydy a alkyly, jelikož mutant *cer1* měl zvýšený obsah aldehydů (Bourdenx *et al.*, 2011; Aarts *et al.*, 1995; Smirnova *et al.*, 2013). Mutant *cer3* měl rovněž snížený obsah alkanů, ale navíc i ketonů a aldehydů (Chen *et al.*, 2003; Kurata *et al.*, 2003; Rowland *et al.*, 2007). Oba geny (*CER1* a *CER3*) přitom při přeměně VLC acyl-Co-A na alkyly spolupracují (Bernard *et al.*, 2012). Kannangara *et al.* (2007) ve své práci uvádějí, že transkripce *CER1* (i *CER2* a již zmíněného *KCSI*) je kontrolována transkripčním faktorem WIN1/SHN1 (WAX INDUCER1/SHINE1) (dále jen SHN1).

### 3 Transkripční faktory

Transkripční faktory jsou důležitými regulátory genové exprese (Lu *et al.*, 2012) obsahující 4 domény (DNA-vazebné místo – DBD, doména regulující transkripci – TRD, oligomerizační místo a nukleární lokalizační místo – NLS) (Lu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2020). Transkripční faktory se váží na promotor cílových genů a jejich přepis z DNA do RNA, na základě signálů v buňce, buď stimulují anebo potlačují (Lu *et al.*, 2012).

Zmíněný transkripční faktor SHN1 je jeden z více jak 2000 transkripčních faktorů, které u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) najdeme (Lu *et al.*, 2012). Transkripční

faktory jsou u huseníčku klasifikovány do několika rodin, jako je bHLH (Basic/helix-loop-helix) (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003), MYB (Myeloblastosis) (Riechmann and Ratcliffe, 2000), či AP2/EREBP (APETALA 2/ethylene-responsive element binding protein) (Riechmann and Meyerowitz, 1998). A právě do poslední jmenované rodiny patří i SHN1 (Broun *et al.*, 2004; Aharoni *et al.*, 2004).

AP2/EREBP se vyznačuje typickou 41-73 aminokyselin dlouhou AP2-DNA vazebnou doménou (Feng *et al.*, 2005). Na základě počtu této domény se AP2/EREBP rodina člení na čtyři podrodiny – AP2 (APETALA 2), DREB (Dehydration-Responsive Element Binding proteins), ERF (Ethylene-Responsive Factor) a RAV (Related to ABI3/VP1) (Sakuma *et al.*, 2002). U huseníčku rolního tvoří rodinu AP2/EREBP 147 genů (Feng *et al.*, 2005) zapojených do růstu a vývoje rostliny (zejména reprodukčních orgánů) (Riechmann and Meyerowitz, 1998), geny reagující na stres (jako je sucho, UV, chlad, zasolení či patogeny) a hormonální ošetření (etylén, kyselina abscisová, kyselina jasmonová) (Gutterson and Reuber, 2004; Feng *et al.*, 2005).

### 3.1 Transkripční faktory SHN rodiny AP2/EREBP

SHN1 (SHINE1, WAX INDUCER1 – WIN1) byl prvním zjištěným transkripčním faktorem podílejícím se na tvorbě a ukládání vosků do kutikuly (Broun *et al.*, 2004; Aharoni *et al.*, 2004). Svůj název dostal podle fenotypu, který tento gen vykazoval při nadměrné expresi – zvýšený obsah epikutikulárních vosků a lesklost listů (Broun *et al.*, 2004). SHN1 má dva homology – SHN2 a SHN3. Proteinová sekvence SHN1 (199 aminokyselin dlouhý protein) a SHN2 (189 aminokyselin) je identická z 55 %, sekvence SHN2 se SHN3 (186 aminokyselin) vykazuje vyšší homologii (71 %) (Aharoni *et al.*, 2004; Broun *et al.*, 2004). Huseníček rolní má v diploidním stavu 10 chromozomů ( $2n = 10$ ) (Chen *et al.*, 2004). Geny pro SHN transkripční faktory se nacházejí na prvním (*SHN1* – At1g15360) či pátém (*SHN2* – At5g11190, *SHN3* – At5g25390) chromozomu (TAIR; Broun *et al.*, 2004) a ze sekvenčního hlediska obsahují pouze jeden intron, nacházející se 80 bp od start kodonu (Aharoni *et al.*, 2004).

Všechny SHN proteiny mají na N konci AP2 doménu, blízko C konce se nachází jedna konzervovaná doména a uprostřed proteinové sekvence další (Nakano *et al.*, 2006; Aharoni *et al.*, 2004). Exprese jednotlivých genů se také liší podle jejich druhu. *SHN1* je nejvíce exprimován v květu a v kořeni (Aharoni *et al.*, 2004; Klepikova *et al.*, 2016). Ortolog

k *AtSHN1* (popsaný u huseníčku rolního) nalezený u eukalyptu (*EgrSHN1*) měl také nejvyšší expresi *SHN1* genu v květu (Marques *et al.*, 2013). Exprese *SHN1* genu u huseníčku nebyla detekovatelná ve stonku, listech rostoucích na stonku či zralých listech růžice (Aharoni *et al.*, 2004; Klepikova *et al.*, 2016). Oproti tomu Broun *et al.* (2004) nedetekovali expresi *SHN1* v kořeni. Méně výrazné GUS barvení bylo pozorováno i u mladých listů růžice a v okolí trichomů (Aharoni *et al.*, 2004). *SHN2* gen je hojně exprimován v mladých listech (Klepikova *et al.*, 2016), rovněž byla jeho exprese detekovatelná v šešulích při dozrávání semen a v prašníku (Aharoni *et al.*, 2004). Gen *SHN3* vykazuje nejvyšší expresi v šešulích (Klepikova *et al.*, 2016). Podle Aharoni *et al.* je ale jeho exprese detekovatelná víceméně ve všech rostlinných orgánech. Jeho exprese v květu a v mladých listech se nelišila od oblastí exprese *SHN1* genu. Výzkumníci také zjistili, že *SHN3* gen je exprimován v místě poranění na listech stonku, v samotném stonku a v šešuli.

*SHN* geny byly dosud studovány zejména v souvislosti s reakcí na stresové podmínky (jako je sucho nebo napadení patogenem) (Hrmova and Hussain, 2021; Buxdorf *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019). To, že se *SHN* geny skutečně účastní těchto i dalších reakcí v rostlině bylo potvrzeno změnou expresí genů, na které se SHN jako transkripční faktor váže. Studie Shi *et al.* (2011) identifikovala geny u trojitého mutantu s potlačenou expresí v *SHN1*, *SHN2* a *SHN3* genech. U mutantních rostlin vědci pozorovali sfúzované květní orgány a deformaci buněčné stěny pokožkové buňky. Celkově bylo detekováno 38 diferenciólně exprimovaných genů. Vědci rozdělili ovlivněné geny do několika podkategorií. 30 transkriptů mělo sníženou expresi, 8 zvýšenou. U 13 transkriptů bylo zjištěno, že jsou kontrolovány alespoň jedním SHN transkripčním faktorem. Ve studii byly popsány geny spojené s metabolismem methioninu jako je *BSMT1* (SAM:karboxyl methyl transferáza) a *ARD3* (Acidoredukton dioxygenáza), geny spojené s redoxními reakcemi, například *GRXC11* (Glutaredoxin-C) a *PRX02* (peroxidáza), *Atg43620* (chitináza) zapojená do reakcí při stresové odpovědi. V neposlední řadě byly detekovány i geny kódující enzymy vytvářející či degradující pektin v buněčné stěně jako je polygalakturonáza *ADPG1*, geny kódující strukturální proteiny buněčné stěny (například *GRP* – glycin-rich-protein) (Shi *et al.*, 2011). To, že SHN transkripční faktory mění buněčnou stěnu, bylo pozorováno i u plodů rajčete (*Solanum lycopersicum*) s potlačenou expresí *SHN3* genu. Tyto plody měly pokožkové buňky se silnější a jasně odlišitelnou primární buněčnou stěnou (Shi *et al.*, 2013).

Dále byl u huseníčku s RNA interferencí ve všech třech *SHN* genech detekován HPRP (hydroxyproline-bohatý glykoprotein) také zapojený do syntézy buněčné stěny. U všech

těchto příkladných genů bylo potvrzeno, že se na ně váže alespoň jeden transkripční faktor SHN. U rostlin se také detekovala snížená exprese genu kódující ABC transportér či transportér draslíku. U mutantních rostlin se změnila i exprese genů podílející se na biosyntéze lipidů (Shi *et al.*, 2011).

### **3.2 SHINE (SHN) transkripční faktory ovlivňují geny zapojené do tvorby kutikuly**

Funkce *SHN* genů byla nejvíce studována na huseníčku rolním (Broun *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2011). Dále byly např. na rajčeti (*Solanum lycopersicum*) (Buxdorf *et al.*, 2014; Al-Abdallat *et al.*, 2014), pšenici (*Triticum turgidum*) (Djemal and Khoudi, 2015) či balhovičnicku (*Eucalyptus*) (Marques *et al.*, 2013) nalezeny jejich ortology (Li *et al.*, 2019; Buxdorf *et al.*, 2014). Na základě změněné exprese několika genů podílející se na biosyntéze kutinu a vosků v kutikule u mutantních rostlin se předpokládá, že by SHN mohly být transkripčními faktory této dráhy. To, že se přinejmenším SHN1 podílí na biosyntéze kutikuly, nasvědčuje i fakt, že na základě microarray analýzy jsou předpokládáné geny společně se *SHN1* exprimovány v pokožkových buňkách, kde probíhá i syntéza kutinu (Kannangara *et al.*, 2007; Suh *et al.*, 2005). Zvláště silná exprese byla v korunních lístcích (Kannangara *et al.*, 2007).

Zatím pouze u několika genů byla zjištěna přímá vazba alespoň jednoho ze SHN transkripčních faktorů na promotorovou oblast cíleného genu. Prvním, na základě chromatinové imunoprecipitace potvrzeným genem, který je součástí dráhy kutinu i vosků, je *LACS2* (*LONG CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 2*), na který se váže SHN1 (Kannangara *et al.*, 2007; Schnurr *et al.*, 2004). Dalšími cílenými geny, zapojenými do biosyntézy lipidů, jsou podle Shi *et al.* (2011) *RXF26* (GDSL motiv lipáza/hydroláza), *CYP86A7* a *CYP86A4* (cytochrom P450), *BDG3* (hydroláza podobná *BDG1*) a *FAR1* (reduktáza mastných kyselin). Zajímavé je, že Shi *et al.* (2011) nepotvrdili vazbu SHN1 na *LACS2*.

Práce Kannangara *et al.* (2007) na huseníčku rolním, jež měl zvýšenou expresi *SHN1* genu, uvádí, že SHN1 indukuje nejdříve geny spojené s kutinem, kdežto geny spojené s dráhou syntézy vosků (jako je *CER1*, *CER2*, *KCS1*) se aktivují se zpožděním čili je možné, že mají i další regulátory transkripce. V květu identifikovali navýšení voskových složek, zejména alkanů C31 a alkoholů C28. Rovněž i v listu došlo k navýšení obsahu vosků. Také zvýšená exprese *SHN3* genu z rajčete (ortolog *SISHN3*) v huseníčku vedla k navýšení vosků (alkanů,

aldehydů, mastných kyselin) a kutinu (mastných kyselin, dikarboxylových mastných kyselin,  $\omega$ -hydroxylových mastných kyselin) v listech růžice. Tyto transgenní rostliny 35S:*SISHN3* měly listy rovněž lesklejší a po okrajích zvlněné tak, jak bylo popsáno u rostlin se zvýšenou expresí *SHN1* genu (Shi *et al.*, 2013; Aharoni *et al.*, 2004). Aharoni *et al.* (2004) se také zabývali fenotypem u huseníčku rolního (ekotyp WS, Wasilevskija) se zvýšenou expresí *SHN1* genu. Výsledky také ukázaly, že tyto rostliny měly v kutikule listu více vosků. Broun *et al.* (2004) také uvádí, že při konstitutivně exprimovaném *SHN1* genu je u rostlin huseníčku až 4,5 krát navýšena akumulace vosků v kutikule listů, zvýšení je také na stoncích. Pod mikroskopem byly na povrchu kutikuly k vidění také voskové krystaly. S navýšením vosků při zvýšené expresi *SHN1* genu, stejně jako v předešlé práci Kannangaran *et al.* (2007), koreluje i navýšení exprese genů zapojených do tvorby vosku – *CER1*, *CER2*, *KCSI*.

U kutinových genů studie Kannangara *et al.* (2007) uvádí navýšení exprese u *LACS2* genu, zároveň u genu podobného *HTH* (*HOTHEAD*), u genů kódující enzym cytochrom P450 monooxygenázu (*CYP86A4* a *CYP86A7*) a *GPAT4* podobnému glycerol-3-fosfát acyltransferáze, stimulující biosyntézu lipidů. Enzym *HTH* s největší pravděpodobností katalyzuje oxidaci již hydroxylovaného koncového uhlíku mastných kyselin a vytváří tak na mastných kyselinách aldehydovou a druhou karboxylovou skupinu (Kurdyukov *et al.*, 2006b; Fich *et al.*, 2016). To, že by se všechny tyto geny popsané v článku Kannangara *et al.* (2007) mohly podílet na katalyzaci složek kutinu, bylo navrženo díky detekci dvojnásobného navýšení obsahu nejběžnějších složek kutinu –  $\omega$ -hydroxy mastných kyselin a mono/polynenasycené dioických kyselin v listech a květu huseníčku.

Naproti tomu bylo navrženo, že snížení exprese *SHN1* genu v květu má na obsah kutinu opačný účinek, tedy snížení, v porovnání se zvýšenou expresí *SHN1*, přestože celkové množství kutinu (i vosků) práce neuvádí, pouze obsah jednotlivých složek. Ve voscích byl obsah alkanu C31 a mastné kyseliny C38 mírně navýšen, stejně jako u rostlin se zvýšenou expresí *SHN1*, ale na druhou stranu obsah mastných kyselin C24 se snížil. Významnější snížení kutinových sloučenin (kyseliny dioové a  $\omega$ -hydroxymastných kyselin) byl detekován v korunních lístcích (oproti zkoumání celého květu), kde s největší pravděpodobností nedochází k redundanci se *SHN3* genem (Kannangara *et al.*, 2007). To, že geny působí redundantně uvádí i Shi *et al.* (2011) rovněž při studiu huseníčku rolního, ale na rostlině, která měla potlačenou expresi ve všech třech genech *SHN* (*SHN1*, *SHN2*, *SHN3*). Zjistili, že *SHN3* transkripční faktor je univerzální, neboť nasedá na promotor všech tří *SHN* genů. Expresi *SHN1* genu také řídí *SHN2* transkripční faktor a *SHN2* genu *SHN1* transkripční faktor. Vědci



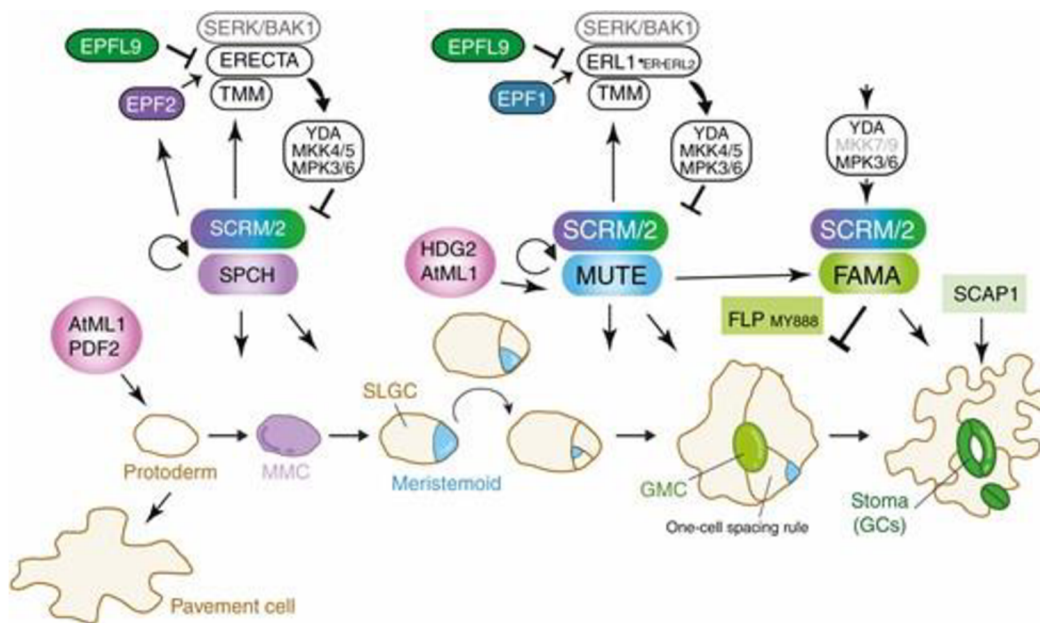
u tohoto rostlinného mutanta zjistili také méně kutinu v kutikule. V kutikule korunních lístků byl stejně jako v předchozí práci Kannangara *et al.* (2007) zaznamenán snížený obsah kutinu (zde o 48 % celkového obsahu) zejména díky menšímu množství kyseliny diové a  $\omega$  - hydroxymastné kyseliny. Změnu obsahu vosků v květu či v listech, stejně jako množství kutinu v kutikule listu, nedetekovali. Všechny geny podílející se na metabolismu lipidů (*CYP86A7* a *CYP86A4*, *BDG3*, *FAR1*, *RXF26* a další 2 geny kódující GDSL-motiv lipázu/hydrolázu) měly v mutantních rostlinách sníženou expresi. Kromě posledních zmíněných hydroláz byly všechny geny aktivovány všemi třemi transkripčními faktory SHN – SHN1, SHN2, SHN3 (Shi *et al.*, 2011). V kutikule plodu rajčete s potlačením transkripčního faktoru SHN3 (*SISHN3*), jež byla daleko slabší, bylo naměřeno menší množství kutinových monomerů (o 60 %), a také vosků, na rozdíl od předešlých jmenovaných prací na huseníčku rolním. Potvrzeno to bylo detekovanou inhibicí dvou cytochromů P450 (*CYP86A68*, *CYP86A69*), na něž se přímo vázal *SISHN3* transkripční faktor a také geny *SIHTH*, *SILACS2* (Shi *et al.*, 2013).

## **4 Regulace vývoje pokožkových buněk rostlin v souvislosti se SHN transkripčními faktory**

Vědecká práce z roku 2004 uvádí, že transkripční faktor SHN1 má vliv na pokožkové buňky. U mutantů huseníčku rolního (ekotyp WS) s navýšenou exprese *SHN1* genu zjistili méně vyvinutých průduchů na spodní straně listu v kontrastu s divokým typem rostliny. Byla u nich rapidně snížena jak průduchová hustota (SD), tak i průduchový index (SI), který byl nižší o 41 % (Aharoni *et al.*, 2004). Snížení SD hodnoty pozorovali i v další práci na listech huseníčku po indukci exprese genu *SHN1* (Yang *et al.*, 2011).

Dráha vývoje průduchů v pokožce rostlin, skrze které rostlina vyměňuje plyny s okolním prostředím, je geneticky daná a řízená podmínkami vnějšího prostředí. Je známo, že vyšší procento oxidu uhličitého ve vzduchu vede k vývoji menšího počtu průduchů (Woodward, 1987; Engineer *et al.*, 2016) či že světlo naopak stimuluje jejich vývoj (Wang *et al.*, 2021). Následující text popisuje vývoj průduchů pro huseníček rolní, zástupce dvouděložných rostlin (**Obr. č. 3**). Vývoj průduchů začíná v době, kdy se protodermální buňka diferencuje buď na dlaždicovou buňku (PvC) anebo na meristemoidní mateřskou buňku (MMC) (Lau and

Bergmann, 2012; Torii, 2021). Osud protodermální buňky je řízen dvěma transkripčními faktory AtML1 a PDF2 (Lu *et al.*, 1996; Abe *et al.*, 2003; Takada *et al.*, 2013). V případě, že vznikne MMC, začne se asymetricky dělit na meristemoid a sesterskou buňku meristemoidu (SLGC). Meristemoid se dále několikrát dělí tak, aby ho obklopovaly jen SLGC a sousední buňkou nebyl meristemoid, ze kterého by mohl vzniknout průduch (Torii, 2021; Pillitteri and Torii, 2012; Lau and Bergmann, 2012). Nebylo by v tomto případě dodrženo pravidlo “one cell spacing rule“ (Hara *et al.*, 2007). Meristemoid se poté může diferencovat na mateřskou buňku průduchů (GMC), která se symetricky rozdělí a dá vznik průduchu (GC) (Wang *et al.*, 2021; Torii, 2021; Zhao and Sack, 1999).



**Obr. č. 3:** Dráha vývoje průduchů z protodermální buňky je řízena na několika místech, zahrnující jak pozitivní (označeno šipkou), tak negativní (označeno obráceným písmenem T) regulátory. Bližší popis v textu (Torii, 2021).

K regulaci vývoje průduchů je potřeba několik transkripčních faktorů. Hlavními z nich, které pozitivně ovlivňují jejich vývoj, jsou bHLH (basic helix-loop-helix) transkripční faktory SPEECHLES (SPCH), MUTE a FAMA (Ohashi-Ito and Bergmann, 2006; Wakeel *et al.*, 2021).

SPCH, který dimerizuje s ICE1 (INDUCER OF CBF EXPRESSION 1) nebo se SCREAM (SCRM), alternativně s homology ICE2 či SCRM2 (Kanaoka *et al.*, 2008) určuje, zdali se

z protodermální buňky stane MMC a posléze meristemoid. SPCH tedy podporuje první asymetrické dělení MMC a také proliferaci meristemoidu (Wakeel *et al.*, 2021; Torii, 2021). Aktivita SPCH je potlačena kaskádou receptorových komplexů ER (ERECTA) a TMM (TOO MANY MOUTH) (Lau and Bergmann, 2012), tyto receptory navíc spolupracují s koreceptorem SERK/BAK1 (SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES) (Meng *et al.*, 2015), a jako ligand váží EPF2 (EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2) (Hunt and Gray, 2009). EPF2, který je indukován SPCH, zodpovídá za to, aby se v pokožce nevytvořily dva průduchy vedle sebe (Lau and Bergmann, 2012). Následuje aktivace MAPK (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE), která fosforylací znemožní diferenciaci buněk a vývoj průduchu (Lampard *et al.*, 2008; Putarjunan *et al.*, 2019). MAPK kaskáda se skládá z YODA–MKK4/5–MPK3/6 (Bergmann *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007).

Naproti tomu je SPCH pozitivně regulován STOMAGENEM (neboli EPFL9), který se jako ligand váže na receptor místo EPF2, čímž se deaktivuje MAPK reprimující kaskáda (Wang *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2015). Také bylo zjištěno, že aktivita peptidu STOMAGENU je závislá na světle. Za světla se totiž deaktivuje COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1) ubiquitin E3 ligáza, která by ve tmě v mezofylu reprimovala transkripční faktor ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5) stimulující expresi STOMAGENU. STOMAGEN se poté v extracelulárním prostoru jako ligand váže na již známý receptorový komplex ER-TMM (Wang *et al.*, 2021).

Poté, co je vytvořeno už dost SLGC buněk, podpoří transkripční faktory HD - ZIP IV (HDG2 a AtML1) aktivaci MUTE, který společně s SCRM zastaví proliferaci meristemoidu a dojde k diferenciaci na GMC (Pillitteri *et al.*, 2007; Kanaoka *et al.*, 2008; Torii, 2021). Rovněž i aktivita MUTE může být pozastavena MAPK kaskádou, ale zde hraje roli komplex ligand-receptor EPF1-ERL1–TMM, kde rovněž jako u EPF2 dochází k zpětnovazebné smyčce (Qi *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2018). Nakonec FAMA-SCRM započne symetrické dělení GMC a dojde k vytvoření póru průduchu, GC. Omezení přílišného symetrického dělení GMC, je kontrolováno MYB proteinem FLP (FOUR LIPS) a jeho paralogem MYB88 (Ohashi-Ito and Bergmann, 2006; Kanaoka *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2005). Transkripční faktor SCAP1 (STOMATA CARPENTER 1), exprimovaný až ve vytvořených průduších, zase kontroluje morfogenezi průduchů a podílí se na kódování genů potřebných k jejich správnému fungování jako je např. proteinový kanál pro draslík K<sup>+</sup> (Negi *et al.*, 2013).

Kromě průduchů jsou v pokožce rostlin také trichomy. Ty se rovněž tvoří z protodermálních buněk (Bernal-Gallardo *et al.*, 2023), ale přestože jejich vývojová dráha se liší od průduchové, mají i tak některé společné hráče. Je jím např. TMM, jež při nadměrné expresi snižuje počet trichomů i jejich větvení (Torii, 2021; Yan *et al.*, 2014). Také SPCH by mohl hrát ve vývoji trichomů určitou roli, jelikož při jeho zvýšené expresi se navýšila i exprese genů zapojených do tvorby trichomů (*MYC1* a *ETC3*) (Torii, 2021; Adrian *et al.*, 2015). Autoři Kumar *et al.* (2017) ve své publikaci též zveřejňují, že upstream oblast genu *SHN2* hraje při vytváření trichomů u rostlin roli.

Dalším fenotypem u mutanta s potlačenou expresí v *SHN1* genu, jsou téměř nedetekovatelné trichomy na prvních pravých listech růžice. Tyto trichomy nebyly navíc typicky pro huseníček rolní trojvětvené ale jen jednovětvené a jejich lokace byla primárně po okrajích listů (Aharoni *et al.*, 2004). Že by SHN transkripční faktory mohly cílit i na geny účastnící se diferenciaci pokožkových buněk, bylo zjištěno v kutikule plodu rajčete, kde transkripční faktor *SlSHN3* (ortolog *ATSHN3*) ovlivnil expresi genu *SIMIXTA*, podílející se na specifikaci a regulaci buněčné diferenciaci (Shi *et al.*, 2013; Brockington *et al.*, 2013). Shi *et al.* (2011) také pozorovali změněný povrch korunních lístků u trojitého mutanta huseníčku s potlačenou expresí v *SHN1*, *SHN2*, *SHN3* genech. Buňky byly oproti kontrolní rostlině méně protáhlé ale spíše kompaktní, neměly tak členitý povrch a měly mezi sebou větší mezery. Oproti tomu předchozí zmíněná studie pozorovala u rostliny se zvýšenou expresí *SHN1* genu na korunních lístcích buňky jak protáhlejšího tvaru, tak typicky kuželovité (Aharoni *et al.*, 2004).

## 5 Praktická část

### 5.1 Cíle práce

#### 1. Potvrdit následující hypotézy:

1.1 Vývoj průduchů a kutikuly listu (u *Arabidopsis thaliana*) má na molekulární úrovni propojené dráhy. *SHN* (*SHINE*) je jedním z genů, který je do tohoto společného vývoje zapojen.

2.2 Zvýšená exprese *SHN* genu vede k vývoji menšího počtu průduchů v epidermis a zvýšenému obsahu vosků v kutikule listu. Snížená exprese *SHN* genu má opačný efekt.

#### 2. Záměry práce:

2.1 Identifikovat homozygotní mutantní rostliny v *SHN* genech (*SHN 1*; *SHN2*; *SHN3*) z vytipovaných SALK linií.

2.2 Analyzovat u vybraných linií expresi genů *SHN* pomocí qPCR a charakterizovat jejich fenotyp z hlediska obsahu vosků v kutikule a počtu průduchů na listu.

2.3 Zjistit relativní expresi určitých genů zapojených do vývoje průduchů a kutikuly listu.

### 5.2 Materiál a metody

#### 5.2.1 Rostlinný materiál a podmínky pěstování

Výše uvedené hypotézy byly zkoumány na listech modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* (*L. Heynh*)). Huseníček rolní je planě rostoucí rostlina z čeledi brukvovité (*Brassicaceae*) (Kole *et al.*, 2011), která měla poprvé osekvenovaný genom v roce 2000 (Kaul *et al.*, 2000). Podle nejnovějšího sekvenování (2016) bylo v genomu identifikováno 27 655 protein-kódujících genů, které se díky alternativnímu splicingu přepisují do 48 359 transkriptů (Cheng, 2016). Rostlina se vyznačuje malým genomem, rychlým reprodukčním cyklem, dostupností celých kolekcí mutantů (např. SALK), a proto byla zvolena jako vhodný kandidát.

Homozygotní linie v *SHN* (*SHINE*) genu – *SHN1*, *SHN2* nebo *SHN3* – byly vybrány z heterozygotních linií, na bázi ekotypu Columbia, s T-DNA inzercí (*Agrobacterium transferred DNA*) z kolekce Salk Institute Genomic Analysis Laboratory. Semena byla objednána z databáze NASC institut (Alonso *et al.*, 2003). Jako kontrolní varianta (WT, wild type) sloužil ekotyp Columbia (Col-0). Následující tabulka (**Tab. č. 1**) uvádí seznam testovaných T-DNA transformovaných linií i lokaci jednotlivých *SHN* genů na chromozomech.

**Tab. č. 1:** Seznam testovaných SALK mutantních linií s T-DNA inzercí, lokace *SHN1*, *SHN2* či *SHN3* genu na chromozomu a komerční název objednaných semen.

Lokace	Gen	SALK název/ NASC ID
At1g15360	<i>SHN1</i>	SALK_030905/N530905
At1g15360	<i>SHN1</i>	SALK_051701/N551701
At5g11190	<i>SHN2</i>	SALK_135005/N635005
At5g11190	<i>SHN2</i>	SALK_050853/N550853
At5g11190	<i>SHN2</i>	SALK_043868C/N665887
At5g25390	<i>SHN3</i>	SALK_040198/N540198

Před výsevem byla semínka ošetřena proti výskytu škůdců (inkubována 2 dny při 37 °C a na další 2 dny při -20 °C) a povrchově sterilizována v 1,5ml roztoku (Savo: destilovaná voda (1:9), detergent) 15 minut, poté 3x promyta sterilní destilovanou vodou. Následně byla semena vyseta ve Flowboxu (FlowFAST H) do Petriho misek s agarem (1/2 Murashige-Skoog (MS) médium s vitamíny (Duchefa), 1,5% sacharóza (Duchefa), 0,8% agar (Sigma)). Semena klíčila ve Fytotronu (Snijders Scientific) na světle o intenzitě 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , při fotoperiodě 16/8h, teplotě 22 °C ve dne a 18°C v noci, vlhkosti 90-100%. Klíčící rostlinky byly po jedné přesazeny do květináčků. Rostliny rostly ve skleníku na světle o intenzitě 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , délce dne 16 hodin, teplotě 19°C den/ 18°C noc a 70 % vlhkosti.

Další generace (T1) homozygotních rostlin vybraných pomocí genotypování (**Tab. č. 2**) byla pěstována v hydroponii (světlo zářivky 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 10h den/14h noc, teplota 22 °C den/18 °C noc, vlhkost 55 %) ve Fytotronu (Snijders Scientific) (**Příloha č. 1 A**). Do nádob byl nalit ¼ Hoaglandův roztok (Hoagland and Arnon, 1950), který se měnil po 14 dnech. Složení Hoaglandova roztoku je k dispozici v **Příloze č. 2**. Linie SALK\_135005/N635005 byla vynechána, kvůli malému počtu získaných semen s homozygotními alelami.

**Tab. č. 2:** T1 generace homozygotních rostlin v T-DNA inserci, u nichž byl dále zjišťován fenotyp a exprese genů. Tabulka uvádí i lokaci T-DNA inserce na chromozomu.

Lokace	Gen	SALK název/ NASC ID	Lokace T-DNA inserce
At1g15360	<i>SHN1</i>	SALK_030905/N530905	Mezigenová
At1g15360	<i>SHN1</i>	SALK_051701/N551701	Mezigenová
At5g11190	<i>SHN2</i>	SALK_043868C/N665887	Mezigenová
At5g11190	<i>SHN2</i>	SALK_050853/N550853	Kódující sekvence
At5g25390	<i>SHN3</i>	SALK_040198/N540198	Mezigenová

V dalším opakování jsme se soustředili pouze na mutanty v genech *SHN2* (SALK\_043868C/N665887, SALK\_050853/N550853) a *SHN3* (SALK\_040198/N540198) rostliny. Mutanty v genu *SHN1* byly vynechány kvůli velmi mírné změně relativní exprese v *SHN1* genu a fenotypu. Rostliny byly rovněž pěstovány v hydroponii v ¼ Hoaglandově roztoku (10h den/14h noc, teplota 22 °C den/18 °C noc, vlhkost 55 %, světlo 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (**Příloha č. 1 B**).

U výše uvedených genotypů byla na listech zjišťována průduchová hustota (SD, stomatal density) a průduchový index (SI, stomatal index), množství alkanů a aldehydů v kutikule, relativní exprese *SHN1*, *SHN2* a *SHN3* genů a několika vybraných genů podílejících se na vývoji průduchů a kutikuly (*SPCH* – *SPEECHLESS*, *MUTE*, *FAMA*, *STOMAGEN* – *EPFL9*, *EPF1* – *EPIDERM PATTERNING FACTOR 1*, *EPF2*, *CER1* – *ECERIFERUM 1*, *CER2*, *KCSI* – *3-ketoacyl-CoA synthase 1*, *BDG3* – *BODYGUARD 3*). Struktura kutikulární vrstvy (lom a povrch listů) byla pozorována pomocí Kryo-elektronového mikroskopu (FESEM).

Pro porovnání množství alkanů v kutikule listu a povrchu či lomu listu pod Kryo - elektronovým mikroskopem, byl pěstován i huseníček rolní na bázi ekotypu Wasilevskija (WS), jež měl zvýšenou expresi v *SHN1* genu. Složení vosků a počet průduchů na listech tohoto mutantu již zkoumal Aharoni *et al.* (2004), od něhož byla semínka získána. V této diplomové práci byly tyto mutantní rostliny pojmenovány *SHN1 Ox*. Výsledky byly vztahovány ke kontrolní rostlině bez mutace (označeno jako WS).

## 5.2.2 Genotypování

### 5.2.2.1 Izolace a amplifikace genomové DNA

Před samotným určením genotypu (homozygot či heterozygot v T-DNA inzerci, divoká alela), bylo potřeba vyextrahovat DNA z plně vyvinutých listů jednotlivých rostlin. K extrakci 1 plně vyvinutého listu bylo použito 400  $\mu$ l extrakčního pufru (200 mM tris HCl pH 7,5; 250mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) podle Edwards et al. (1991). Protokol byl dále mírně upraven. Než byl vysušený pelet rozpuštěn ve 100  $\mu$ l DEPC vody (bez nukleáz), byl obsah každé mikrokumavky se vzorkem promyt v 300  $\mu$ l 70% ethanolu.

Vyizolovaná genomová DNA byla amplifikována v 25  $\mu$ l PCR reakci (polymerázová řetězová reakce, polymerase chain reaction) s Dream Taq Green DNA polymerázou (Thermo Fisher Scientific) v přístroji Biometra Trio Analytic (Jena). V reakci byly použity specifické primery, které uvádí tabulka v **Příloze č. 2** a univerzální levý primer LBB1.3 (ATTTTGCCGATTTTCGGAAC) pro T-DNA inzerci. Na cycleru byly nastaveny hodnoty uvedené v **Tabulce č. 3**.

**Tab. č. 3:** Protokol PCR.

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet cyklů
Iniciace denaturace	95	3	1
Denaturace	95	1/2	35
Nasedání primerů (annealing)	55	1/2	
Prolongace vláken (extension)	72	1	
Finální prolongace	72	5	1
Uchování před vyjmutím z cycleru	6	$\infty$	1

### 5.2.2.2 Agarová elektroforéza

K vizualizaci DNA fragmentů byla použita 1,5% agarová elektroforéza s 1x TAE pufrem (Tris acetát-EDTA pufr, Sigma; Amresco agarósa), kde TAE pufr byl připraven z 40mM Tris acetátu, pH 8,3; 1mM EDTA.



Do jednotlivých jamek bylo nanášeno 20 µl PCR produktu se 4 µl 6x loading pufru (jedna jamka se specifickým levým a pravým primerem, druhá jamka s univerzálním LBb1.3 a specifickým pravým primerem). Jako měřítko testovaných fragmentů DNA bylo použito 5 µl PCR Markeru, 50-2000 bp (Sigma, katalogové číslo P9577). Elektroforéza běžela při 70 V na přístroji Cleaver. Gel byl poté barven 30 min v roztoku interkalačního barviva GelRed (Nucleic acid Gel Stain, 10 000X, Biotium) a následná vizualizace gelu byla udělána pod UV světlem pomocí systému Vilber Lourmat.

Jako homozygot v *SHN* genu byla určena rostlina, která měla na elektroforéze jen 1 kratší produkt. Větší produkt značil kontrolní (wild type, divokou) nemutantní alelu bez T-DNA inserce. Produkty v obou reakcích označoval heterozygota. Pomocná legenda, vysvětlující čtení produktů na gelu, je k dispozici v **Obr. č. 4**.



**Obr. č. 4:** Legenda k určení typu alel. WT = wild type, divoká nemutantní alela, HZ = heterozygot mající jak mutovanou, tak divokou alelu, HM = homozygot mající v obou alelách T-DNA inserci. N = vzdálenost mezi inzertním místem a flanking sekvencí (SIGNAL, 2005).

### 5.2.3 Určení relativní exprese genů, Real-time RT-PCR

U identifikovaných homozygotních linií byla pomocí Real-time RT-PCR stanovena relativní míra exprese *SHN1*, *SHN2* a *SHN3* genů, aby se zjistilo, zdali je exprese zvýšena či snížena (seznam použitých primerů uvádí **Příloha. č. 3**). Ke stanovení bylo potřeba nejdříve vyextrahovat total RNA. Biologický vzorek byl získán ze 3 nejmladších listů 3 rostlin, které byly pro zachování nativních podmínek rychle zmrazeny v tekutém dusíku. Dohromady byly z asi 4týdenních rostlin analyzovány 3 biologické vzorky z každého genotypu (linie) v průběhu 1. pěstování, 4 biologické vzorky z 5týdenních rostlin ve 2. pěstování.

Při izolaci total RNA byl dodržován protokol Total RNA Purification from Plant, Macher Nagel. Koncentrace RNA byla ověřena pomocí Qubit RNA BR (Broad Range) a kvalita díky Qubit RNA IQ (Integrity and Quality) od ThermoFisher Scientific. RNA byla dále přečištěna pomocí TURBO DNA-free KIT (Ambion) a pak přepsána do cDNA (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol nebo High-Caacity RNA to cDNA Kit, ThermoFisher Scientific). Při samotné RT-PCR (REAL TIME PCR, qPCR) bylo postupováno podle návodu 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX), Solis BioDyne. Pracovalo se na přístroji BIO-RAD (CFX Connect, Real Time Sytem), kde byly oproti originálnímu návodu optimalizovány cykly (**Tab. č. 4**) a přidána melting analýza. Jako referenční („house - keeping“) gen byl použit *Actin2*. Relativní míra exprese mutantních rostlin byla vztažena k hodnotě kontrolního vzorku Col-0 (WT), přičemž jemu byla přiřazena hodnota 1.

**Tab. č. 4:** Protokol průběhu Real-time RT-PCR reakce.

<b>Krok</b>	<b>Teplota (°C)</b>	<b>Čas (min)</b>	<b>Počet cyklů</b>
Iniciace denaturace	95	12	1
Denaturace	95	0:15	39
Nasedání primerů (annealing)	60	0:20	
Prodlužování vláken (elongace)	72	0:20	

Na základě stanovené míry exprese genů *SHN1*, *SHN2* či *SHN3* genu byly jednotlivé genotypy pro lepší přehlednost přejmenovány (**Tab. č. 5, Výsledky**).

U rostlin byla zjišťována i exprese genů, které jsou zapojeny do regulace vývoje průduchů. Geny podporující vývoj průduchů (*STOMAGEN – EPFL9*, *SPCH – SPEECHLESS*, *MUTE*, *FAMA*) a geny snižující počet vyvíjejících se průduchů – negativní epidermální faktory (*EPF1 – EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 1*, *EPF2*). Rovněž byla stanovena relativní míra exprese některých genů, které jsou zapojeny do tvorby kutikuly a jejichž exprese by mohla být regulována transkripčním faktorem SHN (*BDG3 – BODYGUARD3*, *CER1 – ECERIFERUM 1*, *CER2*, *KCSI - 3-ketoacyl-CoA synthase 1*). Výčet primerů je k dispozici v **příloze v tabulce č. 3**.

#### **5.2.4 Kryo-elektronová mikroskopie (FESEM) listu *Arabidopsis thaliana***

Snímky lomu a povrchu listů 10týdenních rostlin byly pořízeny pod Kryo - elektronovým FESEM JEOL JSM 7401F (napětí 1-4 kV, pracovní vzdálenost 8 mm, teplota -135°C) v Laboratoři elektronové mikroskopie Biologického centra Akademie věd a Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity. Tato metoda umožňuje vzorek zmrazit tak rychle, že se preparát zachová relativně v nativním stavu.

Vzorek střední části listu byl pomocí lepidla Tissue Tek připevněn na terčík, rychle zmrazen v tekutém dusíku (-196 °C). Zmrazený list byl poté zlomen, aby bylo možné pozorovat na lomu tloušťku a vnitřní strukturu listu. Vzorek byl pak přemístěn do vakua v CryoALTO 2500 (Gatan, UK), kde došlo k sublimaci krystalků vody z povrchu vzorku (1 až 2 minuty) za nízké teploty (-90 °C). Nakonec byl list cca na 1 až 2 min pokoven směsí platiny a palladia při teplotě 140 °C.

#### **5.2.5 Analýza vosků v kutikule listu *Arabidopsis thaliana***

Epikutikulární vosky z povrchu listu huseníčku rolního byly extrahovány u 8týdenních rostlin z 2. pěstování (tj. u Col, *SHN2* – SALK\_043868C/N665887, SALK\_050853/N550853 a *SHN3* - SALK\_040198/N540198). Před extrakcí vosků byly listy oskenovány a v programu ImageJ byla spočítána jejich plocha. Na přípravu jednoho biologického vzorku byly vosky smyty z obou stran 9 mladých listů (vždy 3 listy ze 3 různých rostlin) o celkové ploše cca 35 cm<sup>2</sup>. Listy byly po dobu 10 s vymáhány ve vialce v 1 ml chloroformu. Pro každý genotyp bylo analyzováno 5 biologických vzorků.

Obsah alkanů a aldehydů o různých délkách řetězce byl stanoven pomocí plynového chromatografu (Trace 1310, Thermo, Brémy, Německo) ve spojení s hmotnostním spektrometrem (Delta V Advantage, Thermo, Brémy, Německo) na koloně Restek Rxi - 5MS - Sil (30m x 0,25 mm x 0,25 μm) s průtokem 1,5 ml/1 min helia. Jako interní standard byl použit alkan C24 (n-tetrakosan). Ve vzorcích byly analyzovány alkany o délce 27-33 uhlíků a suma aldehydů byla počítána z C26-C34. Hodnoty byly vyjádřeny v μg/cm<sup>2</sup>.

## 5.2.6 Průduchová hustota (SD) a průduchový index (SI)

Hustota průduchů (SD) i průduchový index (SI) byly určeny u 4 týdnů/6 týdnů (1. pěstování/2.pěstování) starých identifikovaných homozygotních rostlin, a to vždy na plně vyvinutých nesenescentních listech. V 1. pěstování byly použity 3 listy z rozdílných rostlin stejné varianty, oproti tomu v opakovaném pěstování bylo odebíráno 6 listů pro každý genotyp. Polovina listu byla vždy použita pro zjištění SD a SI z horní (adaxiální) a dolní (abaxiální) strany každého listu. Otisky listu byly pořízeny pomocí bezbarvého laku na nehty (Rimmel London 60 Seconds) a po uschnutí byly průhlednou lepící páskou nalepeny na podložní sklíčko. Snímky otisků byly pořízeny pod optickým mikroskopem Olympus BX61 s 50x zvětšením objektivu a fotoaparátem 750D Cannon. Z každé poloviny listu se pořizovalo 5 či 6 snímků (1. pěstování či 2. pěstování) o velikosti plochy 0,130 mm<sup>2</sup>. Pořízené snímky byly analyzovány v programu ImageJ a počty průduchů a dlaždicových buněk (PvCD) byly dosazeny pro výpočet průduchového indexu (**Rovnice č. 1**). SD byla vyjádřena jako počet průduchů na 1 mm<sup>2</sup>.

$$SI = SD / (SD + PvCD) * 100 [\%]$$

**Rovnice č. 1**

kde SD znamená průduchovou hustotu (počet průduchů na 1mm<sup>2</sup>), PvCD počet dlaždicových buněk.

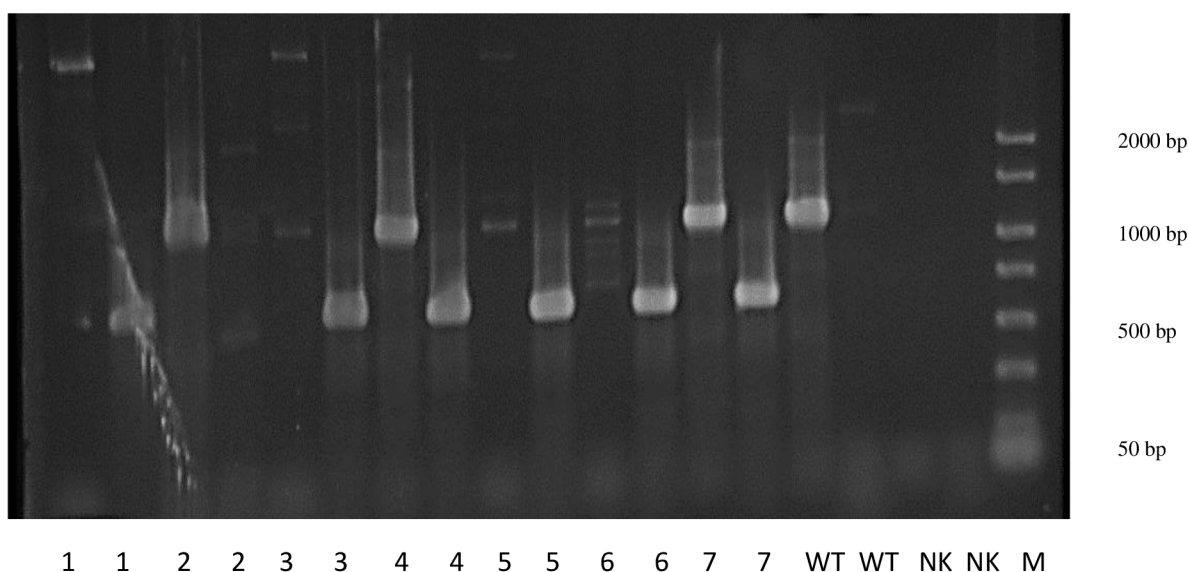
## 5.2.7 Statistické vyhodnocení a tvorba grafů

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny v R-studiu dvouvýběrovým t-testem na 5% hladině významnosti. Vždy se porovnávala mutantní linie s kontrolní variantou. Byl také proveden test shody variancí. Grafy (box-ploty) byly vytvořeny v programu Statistika.

## 5.3 Výsledky

### 5.3.8 Výběr homozygotních linií

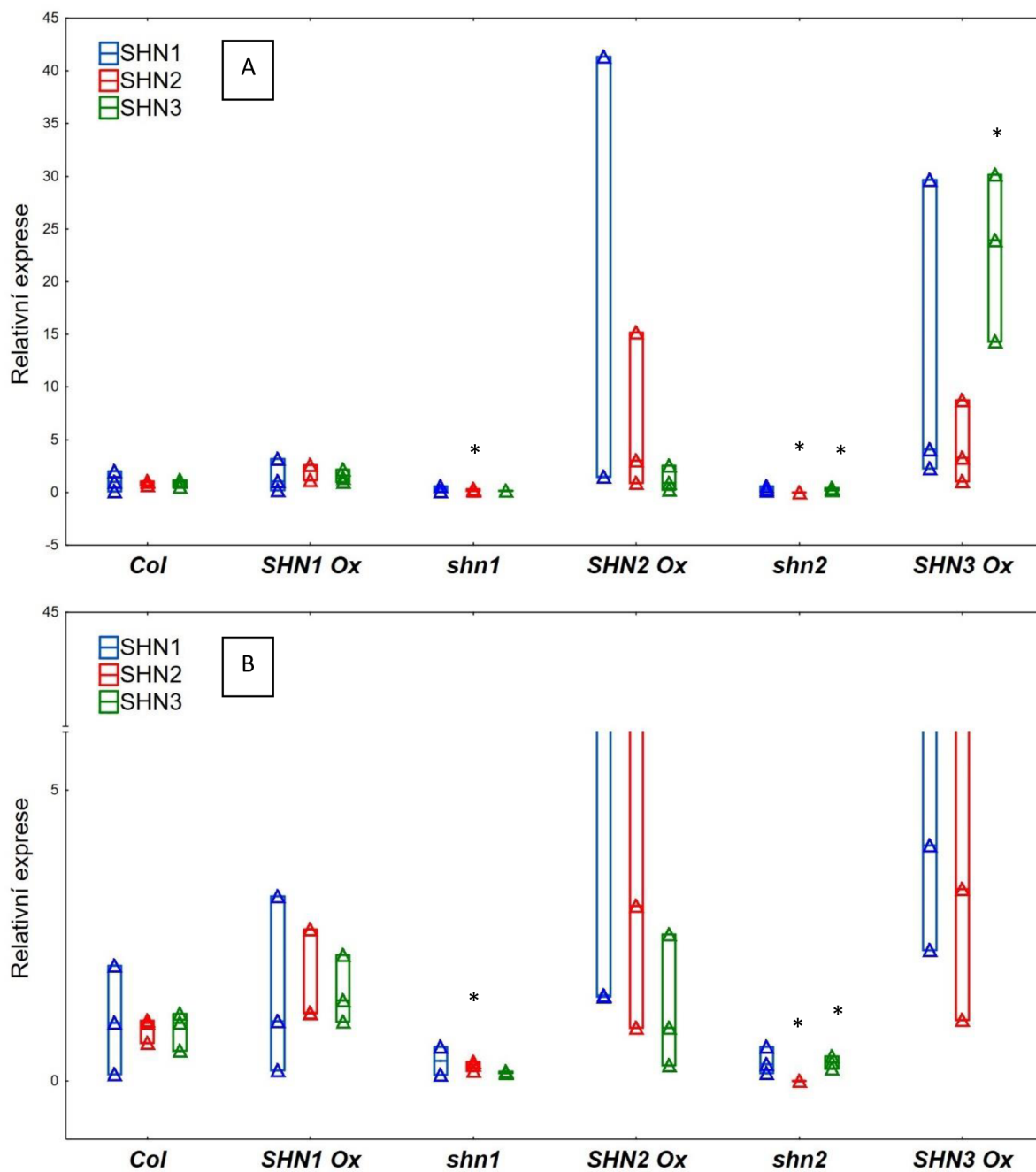
Z pěstovaných rostlin byly vybrány homozygotní rostliny v T-DNA inzerci na základě výsledků velikosti produktů v elektroforéze podle legendy **Obr. č. 4**. Jestliže se u rostliny objevil pouze 1 delší produkt (cca 900 bp), jednalo se o divokou alelu (WT, wild type), 2 produkty, byl to heterozygot. Přítomnost jen 1 kratšího produktu (cca 500 bp) svědčila o přítomnosti T-DNA inzerce na obou chromatidách. Tato rostlina byla pak vybrána jako homozygotní základ nové linie (T1). **Obr. č. 5** ukazuje ilustrativní elektroforézu rostlin *Arabidopsis thaliana* s T-DNA inzercí ovlivňující gen *SHN2* (SALK 050853). V konkrétním obrázku byla jako homozygotní identifikována rostlina č. 1.



**Obr. č. 5:** Ilustrativní elektroforéza pro výběr homozygotních rostlin s T-DNA inzercí u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Zde se jedná o T-DNA inzerci v oblasti genu *SHN2* (linie SALK 050853). Čísla představují konkrétní rostliny, kde v levé jamce je vždy produkt PCR reakce z amplifikace pomocí specifického levého a pravého primeru a v pravé jamce produkt PCR reakce s univerzálním LBb1.3 primerem a specifickým pravým primerem v tomto případě pro *SHN2*. WT je kontrolní rostlina (Col-0) bez inzerce, NK negativní kontrola (s vodou na místo DNA v PCR reakci), M značí DNA marker (směs DNA fragmentů o velikosti 50-2000bp).

### 5.3.9 Relativní exprese *SHN* genů u vybraných homozygotů

Dále byla u všech 5 linií, vytvořených ze semen homozygotních rostlin vyšetých v hydroponické kultuře ve standardních kontrolovaných podmínkách, zjišťována relativní míra exprese SHN transkripčních faktorů (genů *SHN1*, *SHN2*, *SHN3*). Na základě odlišné exprese od kontrolní varianty (Col-0) byly pro lepší přehlednost jednotlivé linie přejmenovány – linie se zvýšenou expresí mají v názvu Ox, linie se sníženou expresí jsou napsány malými písmeny (**Tab. č. 5**). **Obr. č. 6** uvádí data z 1. pěstování, **Obr. č. 7** z opakovaného pokusu, kdy byly vysety pouze Col-0, SALK\_043868C (*SHN2 Ox*), SALK\_050853 (*shn2*) a SALK\_040198 (*SHN3 Ox*). SHN1 linie byly v opakovaném pěstování vynechány kvůli neprůkaznému rozdílu v relativní expresi genu *SHN1* oproti kontrole (**Obr. č. 6 B**).



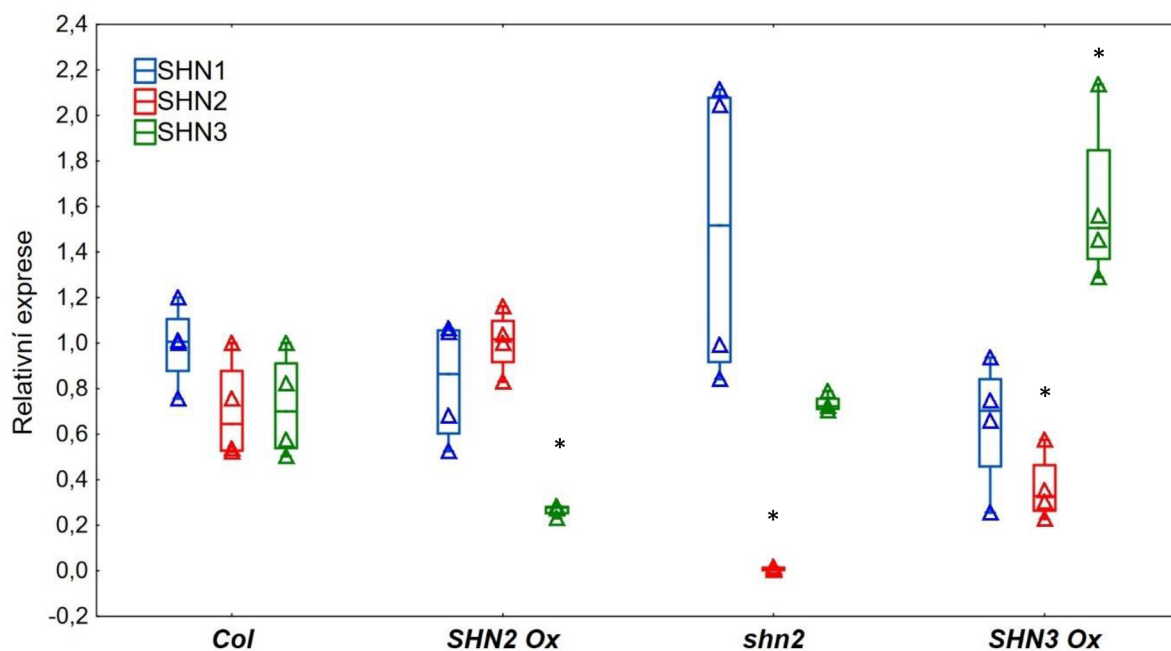
**Obr. č. 6:** Relativní exprese *SHN1*, *SHN2* a *SHN3* genů u vybraných homozygotních rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) s T-DNA inzercí (*SHN1 Ox* SALK\_051701, *shn1* SALK\_030905, *SHN2 Ox* SALK\_043868C, *shn2* SALK\_050853 a *SHN3 Ox* SALK\_040198) (A); zvětšené měřítko stejného grafu (B). Trojúhelníky zobrazují zdrojová data (n = 3, kde n jsou biologické vzorky), linka v boxplotu znamená medián. Hvězdička představuje statisticky významný rozdíl mutantní rostliny od kontroly (Col), p < 0,05.

Jak je vidět z **Obr. č. 6** průkazné rozdíly v expresi měly pouze rostliny *shn1* (SALK\_030905), *shn2* (SALK\_050853) a *SHN3* (SALK\_040198). Přestože u rostlin s T-DNA inzercí v *SHN1* genu nevyšla exprese *SHN1* genu t-testem odlišně, i tak byly tyto linie pro zjednodušení přejmenovány na variantu se zvýšenou a sníženou expresí (na základě rozptylu zdrojových dat). Stejný postup byl proveden i u rostlin s T-DNA inzercí v *SHN2* genu, kde byla průkazně snížená exprese v *SHN2* genu jen u SALK\_050853 (*shn2* rostliny), které měly navíc sníženou expresi i v *SHN3* genu. Linie SALK\_043868C byla nazvána jako *SHN2Ox*. U *SHN3 Ox* rostlin vyšla míra relativní exprese *SHN3* genu nadměru zvýšena.

**Tab. č. 5:** Přejmenování pěstovaných linií podle relativní exprese *SHN1*, *SHN2* či *SHN3* genu, pro lepší přehlednost ve výsledných grafech.

T-DNA inzerce v daném genu/linie	Relativní míra exprese	Přejmenování v grafech na základě relativní exprese
Columbia (Col-0)	Kontrolní exprese, ke které se vztahuje	<i>Col</i>
<i>SHN1</i> / SALK_051701	Zvýšená	<i>SHN1 Ox</i>
<i>SHN1</i> / SALK_030905	Snížená	<i>shn1</i>
<i>SHN2</i> / SALK_043868C	Zvýšená	<i>SHN2 Ox</i>
<i>SHN2</i> / SALK_050853	Snížená	<i>shn2</i>
<i>SHN3</i> / SALK_040198	Zvýšená	<i>SHN3 Ox</i>



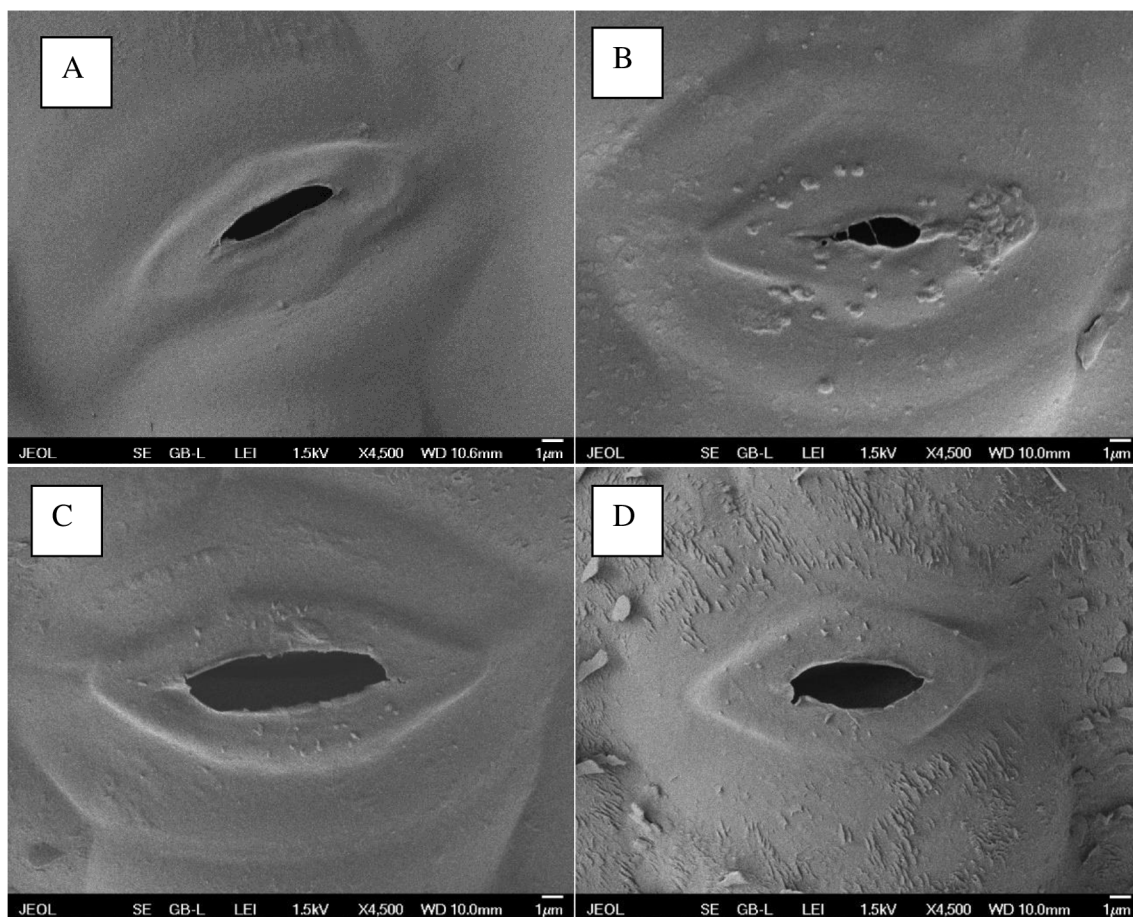


**Obr. č. 7:** Relativní exprese *SHN1*, *SHN2* a *SHN3* genů u vybraných homozygotních rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) s T-DNA inzercí (*SHN2 Ox* SALK\_043868C, *shn2* SALK\_050853 a *SHN3 Ox* SALK\_040198). Trojúhelníky zobrazují zdrojová data (n = 4, kde n jsou biologické vzorky), linka v boxplotu znamená medián, odchytky značí 5%- 95% kvantil. Hvězdička představuje statisticky významný rozdíl mutantní rostliny od kontroly (Col) p <0,05.

V opakovaném pokusu (**Obr. č. 7**) se potvrdila snížená exprese *SHN2* genu u *shn2* rostlin (SALK\_050853) a zvýšená exprese u *SHN3 Ox* linie (SALK\_040198). Navíc měly *SHN3 Ox* rostliny sníženou expresi i v *SHN2* genu. Oproti prvnímu pěstování nebyla míra relativní exprese *shn2* linie průkazně vyšší v *SHN3* genu oproti kontrolní variantě (Col) a *SHN2 Ox* (SALK\_043868C) rostliny měly sníženou expresi v *SHN3* genu.

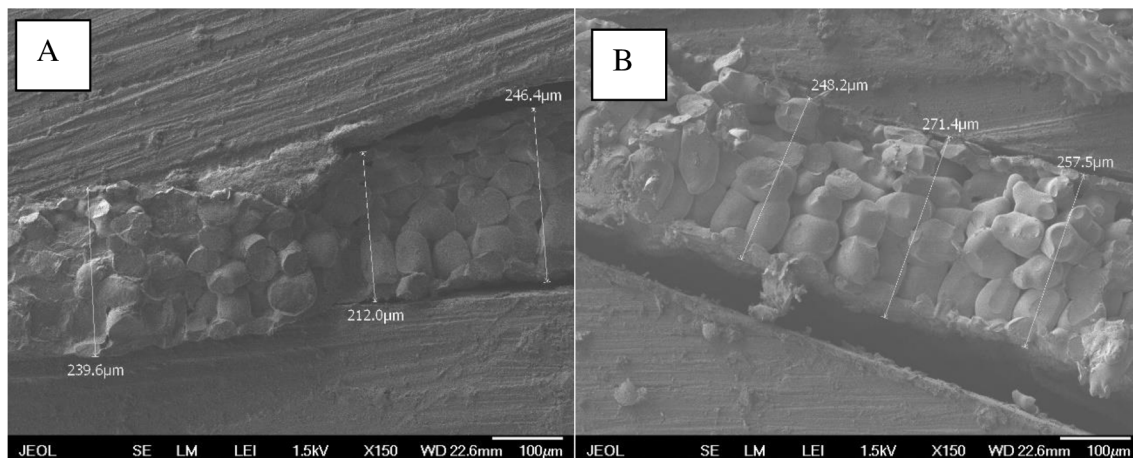
## 5.4 Kryo-elektronová mikroskopie (FESEM)

Povrch listů huseníčku rolního u vybraných rostlin s potvrzenou změnou v expresi v *SHN* genech (*SHN2 Ox* SALK\_043868C, *shn2* SALK\_050853, *SHN3 Ox* SALK\_040198) byl pozorován pod Kryo-elektronovým mikroskopem (**Obr. č. 8**). Fotografie s průduchem naznačují, že genotyp se zvýšenou expresí v *SHN* genu (*SHN2*, *SHN3*), tvoří na povrchu více struktur (**Obr. č. 8 B a D**), které by mohly představovat krystalky epikutikulárních vosků. Oproti tomu povrch listu *shn2* (**Obr. č. 8 C**) rostliny, se sníženou expresí *SHN2* genu, se více podobá kontrolní rostlině Col (**Obr. č. 8 A**).



**Obr. č.8:** Kryo-elektronová mikroskopie povrchu listu v okolí průduchu u rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) homozygotních v *SHN* genu (A – Col-0, B – *SHN2 Ox* (SALK\_043868C), C – *shn2* (SALK\_050853), D – *SHN3 Ox* (SALK\_040198)). Zvětšení 4500x.

Stejnou metodou byl pozorován i lom listu kontrolní rostliny (Col) a *SHN3 Ox* (SALK\_040198) (**Obr. č. 9**).

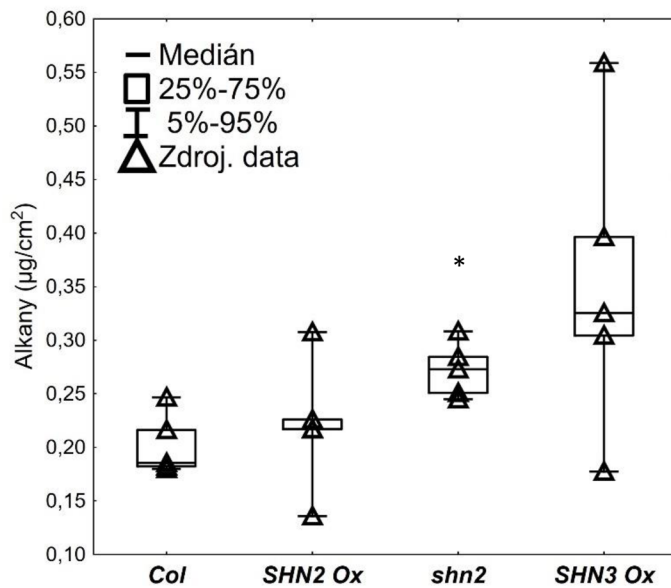


**Obr. č. 9:** Lom listu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) u Col (A) a (B) *SHN3 Ox* (SALK\_040198) rostlin. Zvětšení 150x.

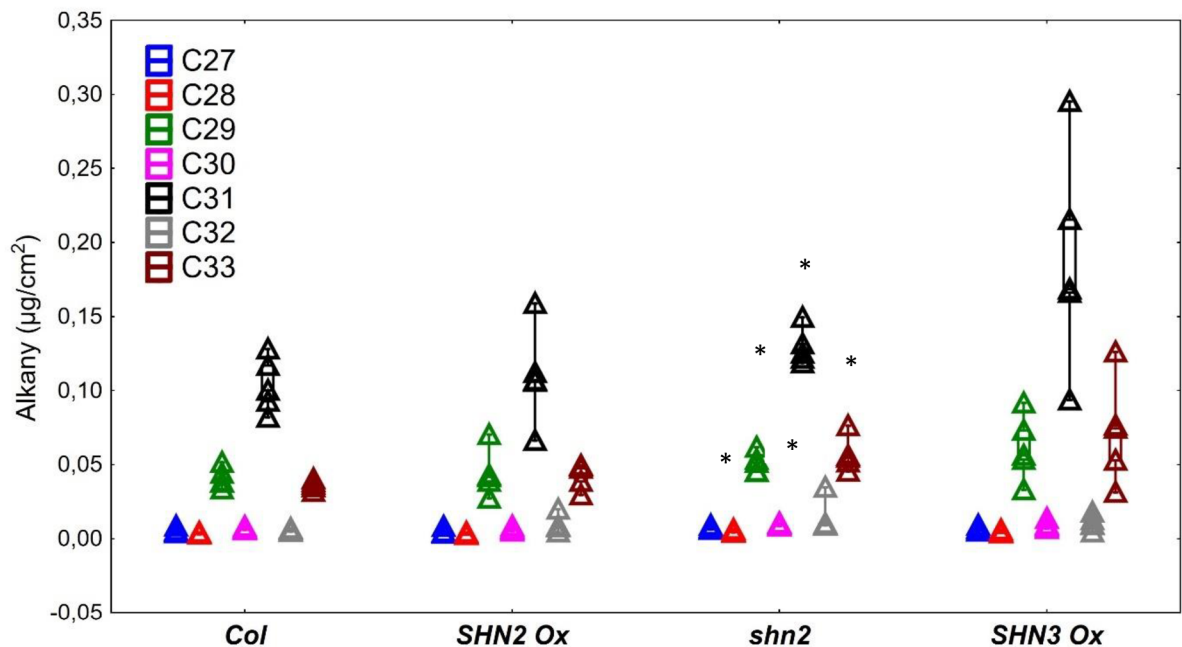
Podle spočteného průměru šířky listu ze 3 měření se list se zvýšenou expresí v *SHN3* genu (**Obr. č. 9 B**) zdál silnější (259,03μm X 232,6μm), indikující silnější kutikulu.

## 5.5 Analýza epikutikulárních vosků listu *Arabidopsis thaliana*

Následně byla provedena analýza smytých epikutikulárních vosků u rostlin z 2. pěstování (Col, *SHN2 Ox*, *shn2*, *SHN3 Ox*) v GC-MS (Gas chromatography–mass spectrometry, plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií), kde se zaměřilo na množství alkanů (**Obr. č. 10 a 11**) a aldehydů (**Příloha č. 4**).



**Obr. č. 10:** Suma alkanů smytých chloroformem z epikutikulárních vosků listu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) u mutantních rostlin s T-DNA inzercí (*SHN2 Ox* – SALK\_043868C, *shn2* – SALK\_050853, *SHN3 Ox* – SALK\_040198). Kontrolní varianta Col (Col-0). N = 5, kde n znamená počet biologických vzorků; hvězdička znamená statisticky významný rozdíl od kontroly Col,  $p < 0,05$ .



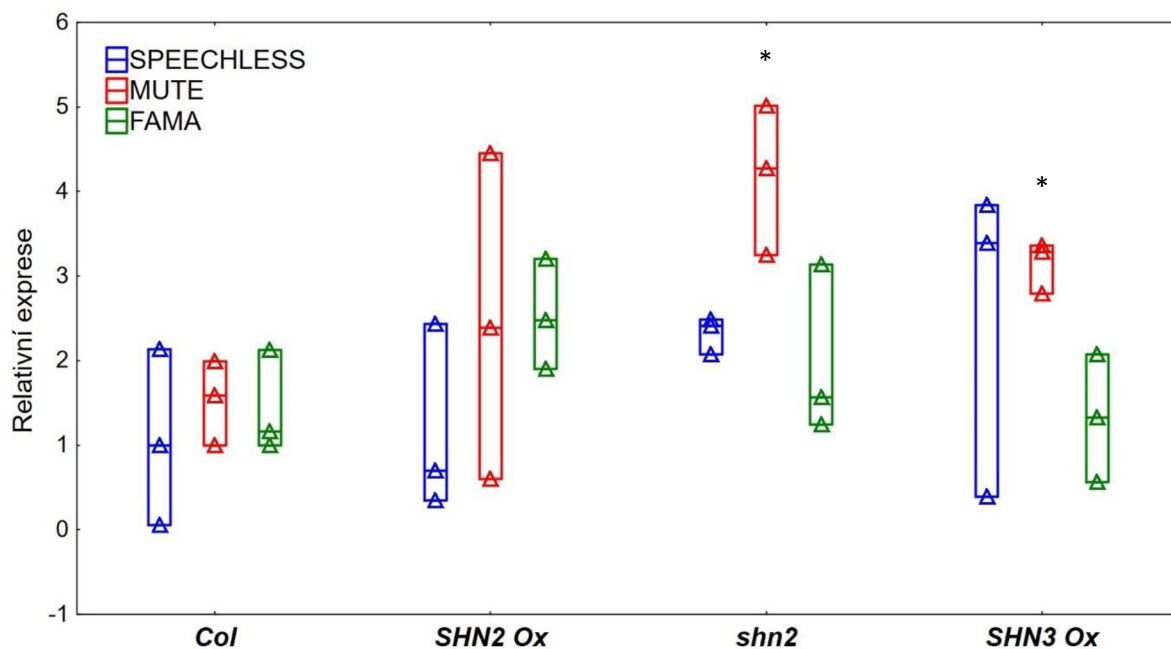
**Obr. č. 11:** Detekce alkanů o délce řetězce 27-33 uhlíků smytých chloroformem z epikutikulárních vosků listu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) u mutantních rostlin s T-DNA inzercí (*SHN2 Ox* – SALK\_043868C, *shn2* – SALK\_050853, *SHN3 Ox* – SALK\_040198). Kontrolní varianta Col (Col-0). Trojúhelníky v boxplotu

znamenaají zdrojová data ( $n = 5$ , kde  $n$  je počet biologických vzorků), odchylky v boxplotu značí 5%-95% kvantil, hvězdička označuje statisticky významný rozdíl od kontroly Col,  $p < 0,05$ .

Jediná linie *shn2* měla v epikutikulárních voscích prokazatelně více alkanů než kontrolní varianta Col (**Obr. č. 10**). Z podrobnějšího hlediska k tomu přispěly alkany o délce uhlíkatého řetězce 28, 29, 30, 31 a 33 (**Obr. č. 11**). V celkovém množství aldehydů byly výsledky obdobné jako u alkanů. Pouze u linie *SHN3 Ox* bylo detekováno více aldehydů oproti kontrole (**Příloha č. 4**).

#### **5.5.10 Relativní exprese vybraných genů účastnících se vývoje průduchů či kutikuly na listu *Arabidopsis thaliana***

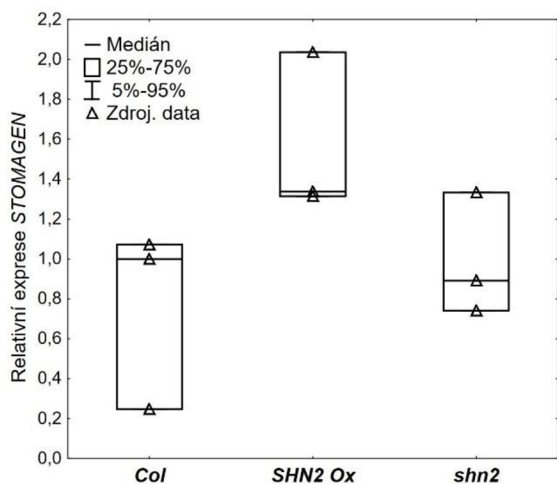
Rovněž byla zjišťována relativní exprese genů zapojených do dráhy vývoje průduchů či kutikuly. Míra relativní exprese genů stimulujících vývoj průduchů *SPEECHLESS*, *MUTE* a *FAMA* se nelišila u prvního pěstování u žádné linie (*SHN1 Ox*, *shn1*, *SHN2 Ox*, *shn2*, *SHN3 Ox*) (**Příloha č. 5**). U druhého pěstování vyšly výsledky následovně (**Obr. č. 12**).



**Obr. č. 12:** Relativní míra exprese u mutantních rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) s T-DNA inzercí (*SHN2 Ox* – SALK\_043868C, *shn2* – SALK\_050853, *SHN3 Ox* – SALK\_040198). Trojúhelníky zobrazují zdrojová data (n=3, kde n jsou biologické vzorky), linka v boxplotu značí medián. Hvězdička představuje statisticky významný rozdíl mutantní rostliny od kontroly (Col), p < 0,05.

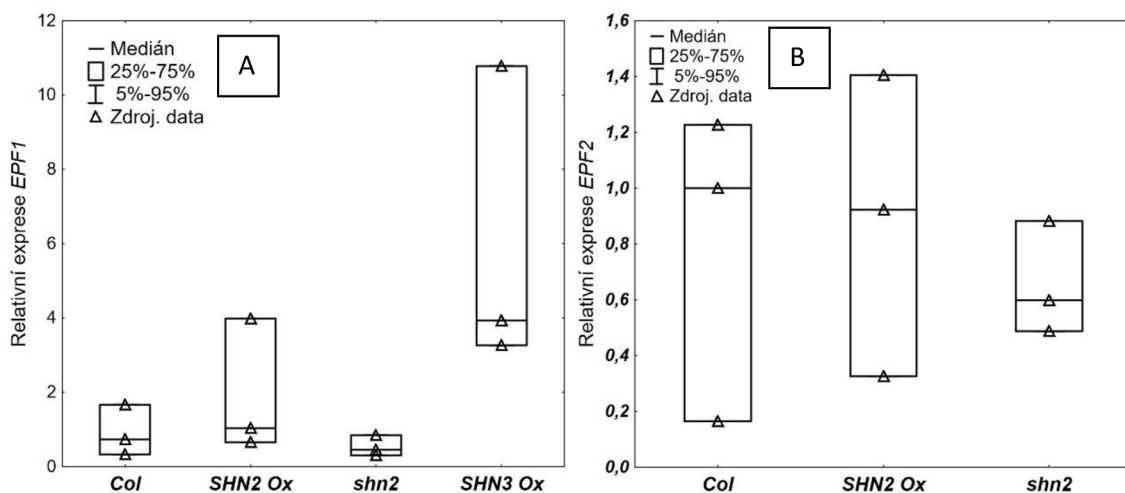
U rostlin s průkazně sníženou expresí v *SHN2* genu (*shn2*) byla pouze zvýšená exprese v *MUTE*. Stejný výsledek byl u *SHN3 Ox* rostlin. Ostatní geny podporující vývoj průduchů (*SPEECHLESS* a *FAMA*) měly stejnou míru relativní exprese jako Col.

Relativní míra exprese dalšího genu podporující vývoj průduchů, *STOMAGENU*, zkoumaného u rostlin z prvního pěstování, byla u linií *SHN2 Ox* a *shn2* rostlin stejná jako u kontroly (Col) (**Obr. č. 13**).



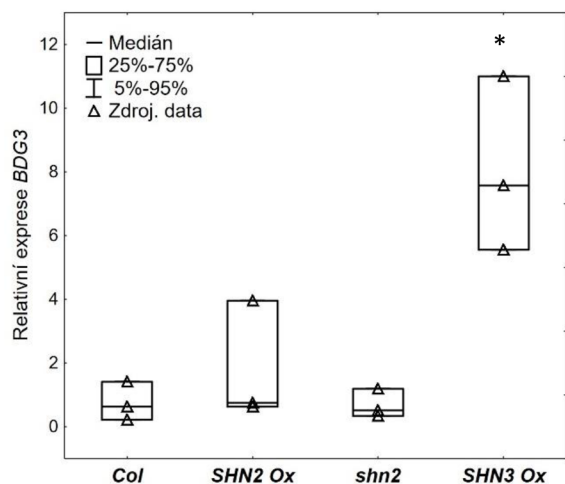
**Obr. č. 13:** Relativní exprese *STOMAGENU* podporujícího vývoj průduchů u Col, *SHN2 Ox* (SALK\_043868C) a *shn2* (SALK\_050853). N=3, kde n značí počet biologických vzorků.

Ani exprese genu *EPF1* (*EPPIDERMAL PATTERNING FACTOR 1*), který potlačuje vývoj průduchů, se u T-DNA mutantních rostlin (*SHN2 Ox*, *shn2* a *SHN3 Ox*) nelišila od kontrolní varianty Col. Totožný závěr byl i u 2. pěstování, kde se zjišťovala exprese u *shn2* a *SHN3 Ox* (**Příloha č. 6**). Také exprese genu *EPF2* (*EPPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2*) u rostlin *SHN2 Ox* a *shn2* nebyla statisticky odlišná od exprese kontrolní varianty Col (**Obr. č. 14**).



**Obr. č. 14:** Relativní exprese genů potlačující vývoj průduchů (*EPF1* – A, *EPF2* – B) u T-DNA mutantních rostlin *SHN2 Ox* (SALK\_043868C), *shn2* (SALK\_050853), popř. *SHN3 Ox* (SALK\_040198). Kontrolní varianta Col. N=3, kde znamená počet biologických vzorků.

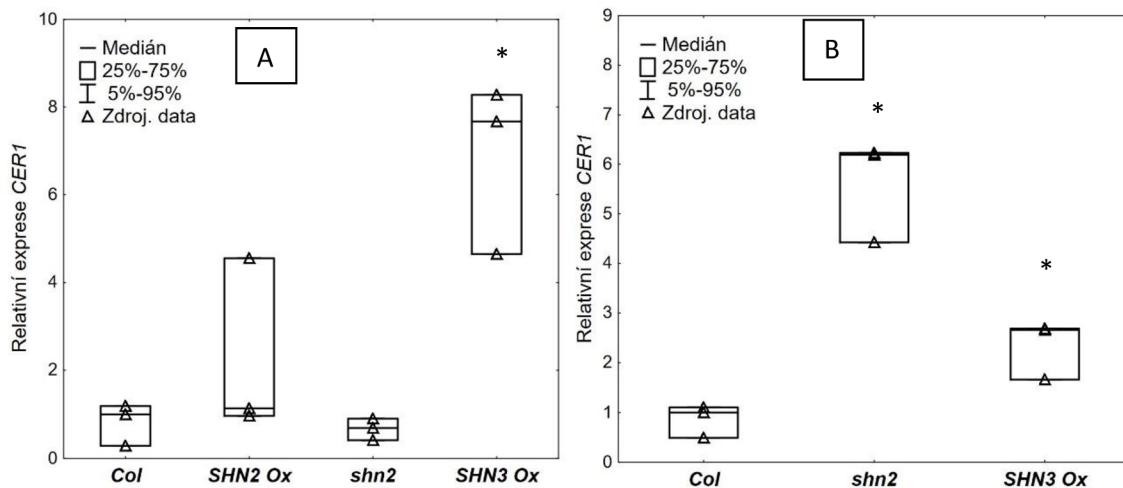
Relativní míra exprese genu *BDG3* (*BODYGURD 3*) účastnícího se syntézy kutikuly byla zvýšená pouze v *SHN3 Ox* rostlinách v porovnání s kontrolou (**Obr. č. 15**). Ovšem v opakovaném pěstování byla exprese *BDG3* u linií stejná jako v kontrole (**Příloha č. 7**).



**Obr. č. 15:** Relativní exprese *BDG3* v listech huseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*) u linií s T-DNA inzercí – *SHN2 Ox* (SALK\_043868C), *shn2* (SALK\_050853) a *SHN3 Ox* (SALK\_040198). Hvězdička značí statisticky významný rozdíl od kontroly Col.  $p < 0,05$ ;  $n=3$ , kde  $n$  značí počet biologických vzorků.

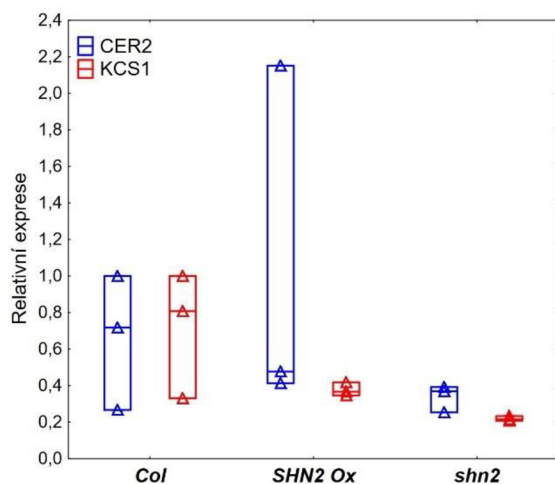
Expresa dalšího genu *CERI*, který je součástí dráhy vytvářející kutikulu, byla zvýšena v obou pěstováních v listech rostlin *SHN3 Ox* (**Obr. č. 16**). V opakovaném pokusu se exprese navýšila i u *shn2* rostlin (**Obr. č. 16 B**).





**Obr. č. 16:** Relativní míra exprese *CER1* v listech huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) u prvního (A) a opakovaného (B) pěstování. Hvězdička představuje statisticky významný rozdíl linie (*SHN2 Ox* – SALK\_043868C nebo *shn2* – SALK\_050853 nebo *SHN3 Ox* – SALK\_040198) od kontroly (Col).  $p < 0,05$ ;  $n=3$ , kde  $n$  značí počet biologických vzorků.

Posledními sledovanými geny zapojenými do tvorby kutikuly byly *CER2* (*ECCERIFERUM 1*) a *KCS1* (*3-KETOACYL KOENZYM A SYNTHASE 1*). Jejich exprese se od divokého typu rostliny (Col) statisticky nelišila (**Obr. č. 17**).

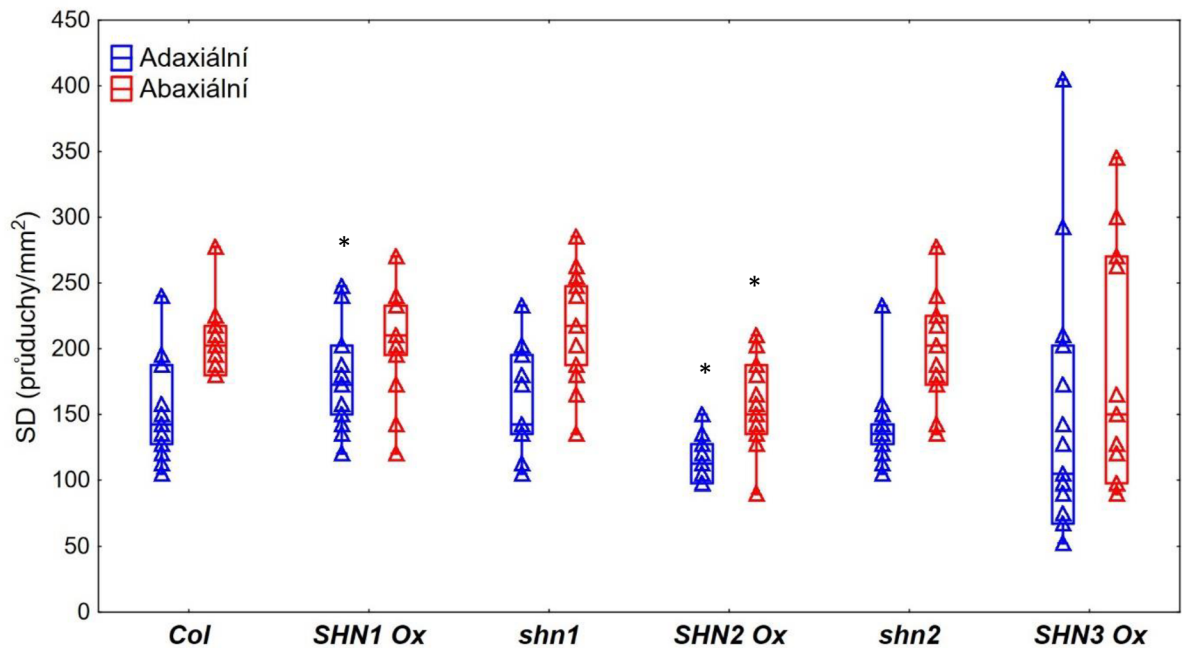


**Obr. č. 17:** Relativní míra exprese *CER2* a *KCS1* genů v listech huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) u rostlin s T-DNA inzercí (*SHN2 Ox* – SALK\_043868C, *shn2* – SALK\_050853) a kontrolní varianty (Col, Col-0). Linka v boxplotu značí medián, trojúhelníky zdrojová data;  $n=3$ , kde  $n$  je počet biologických vzorků.

### 5.5.11 Průduchová hustota a průduchový index

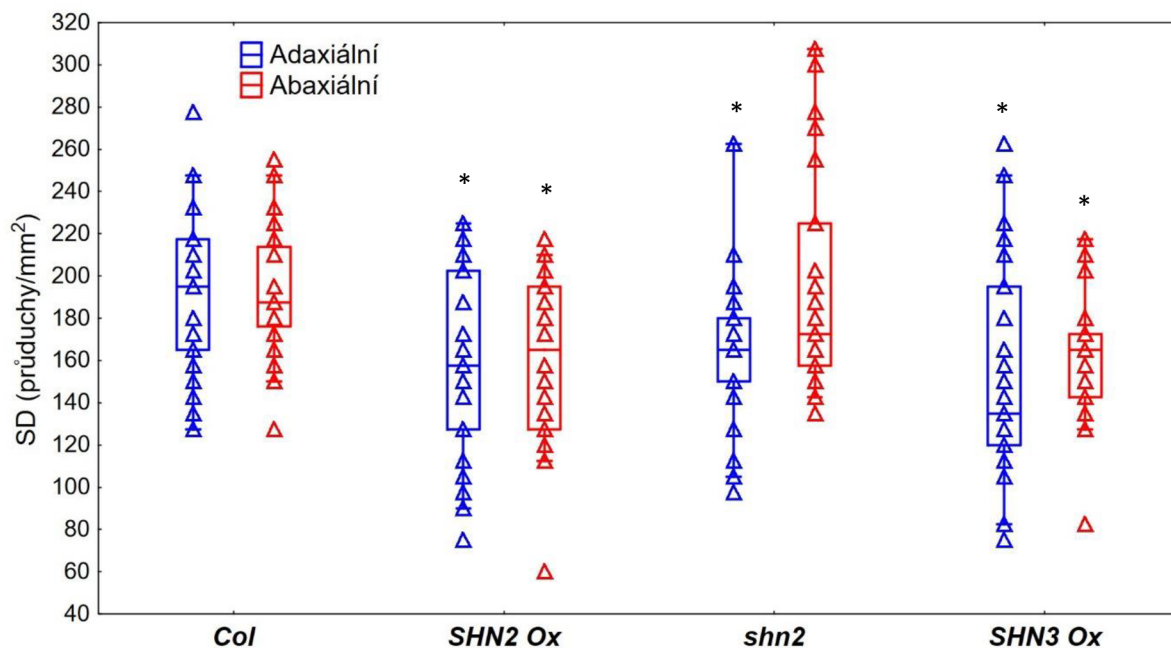
Přestože byla u většiny linií zaznamenána jen mírná změna v expresi genů *SHN* a ta nezpůsobila statisticky významnou změnu v obsahu vosků kutikuly (alkanů a aldehydů) u většiny těchto homozygotních rostlin, zajímalo nás, zda se projeví nějaká změna v počtu průduchů. Podle předpokladu se očekávalo, že zvýšená exprese *SHN* genu vede ke snížení hustoty průduchů (SD) a snížená exprese, že má opačný účinek. Na listech huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) byla zjišťována průduchová hustota (SD) i průduchový index (SI).

V prvním pokusném pěstování byly nalezeny statisticky významné rozdíly v SD jen ve třech případech ve vztahu ke kontrole Col-O. Překvapivě byla u *SHN1 Ox* SD zvýšena – na horní (adaxiální) straně listu, u *SHN2 Ox* byla SD podle očekávání snížena na obou stranách listu. U ostatních linií se SD statisticky významně nelišila od kontrolní varianty rostlin (**Obr. č. 18**).



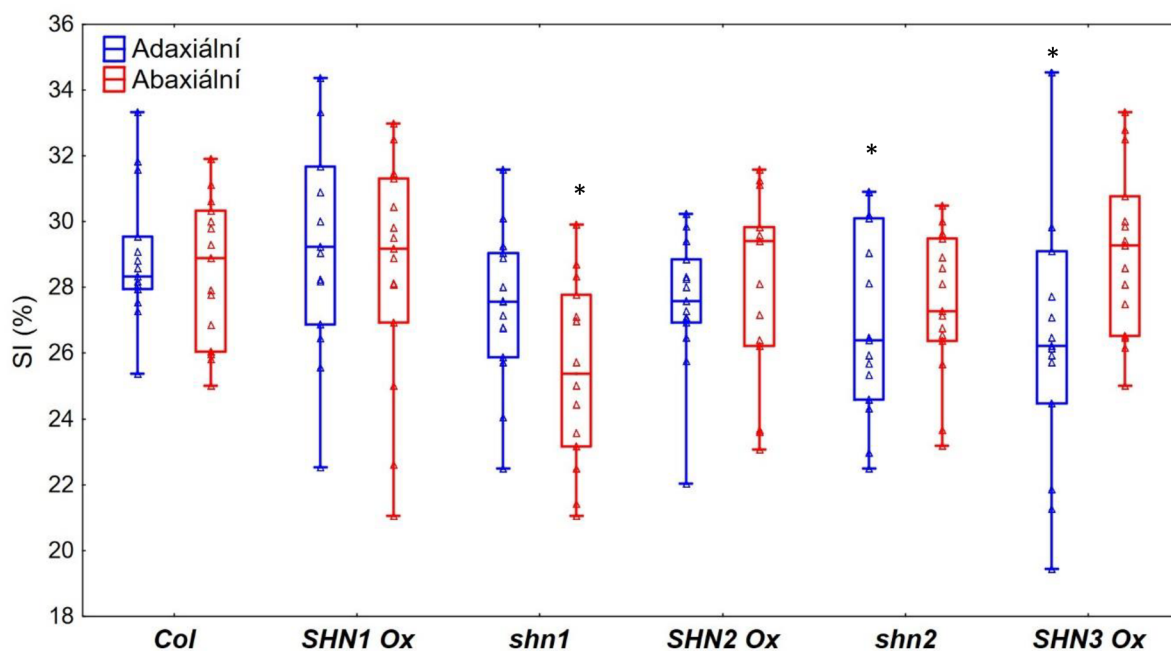
**Obr. č. 18:** Průduchová hustota (SD) horní (adaxiální) a dolní (abaxiální) strany listu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) u pěti linií (*SHN1 Ox* – SALK\_051701, *shn1* – SALK\_030905, *SHN2 Ox* – SALK\_043868C, *shn2* – SALK\_050853 a *SHN3 Ox* – SALK\_040198) vztažených ke kontrolní rostlině Col. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl adaxiální/abaxiální strany listu od kontroly. Linie v boxplotu značí medián, trojúhelníky zdrojová data (n= 15 analyzovaných ploch), odchylky od mediánu značí 5% -95% kvantil,  $p < 0,05$ .

V opakovaném pěstování byl opět průkazný rozdíl v průduchové hustotě vzhledem ke kontrolní Col u *SHN2 Ox* na obou stranách listu – menší SD. Nově byla snížena, nikoli podle předpokladu zvýšena, průduchová hustota u *shn2* na horní (adaxiální) straně listu. Podle očekávání byla SD a na obou stranách listu *SHN3 Ox* rostlin snížena (**Obr. č. 19**).



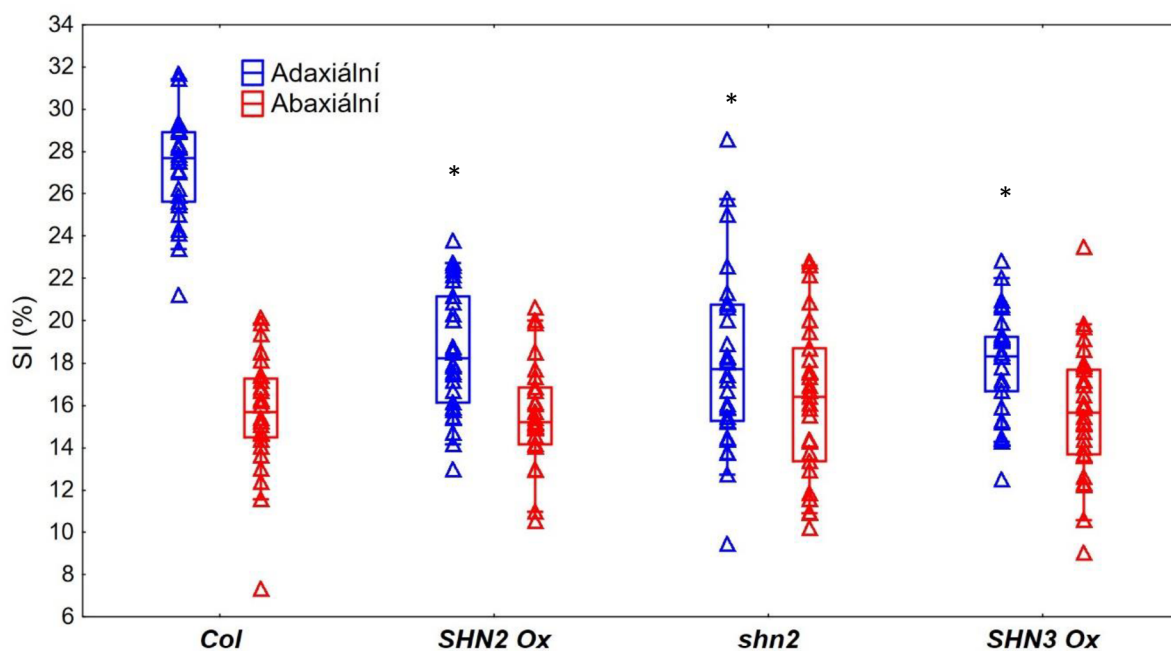
**Obr. č. 19:** Průduchová hustota (SD) horní (adaxiální) a dolní (abaxiální) strany listu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) u třech linií (*SHN2 Ox* – SALK\_043868C, *shn2* – SALK\_050853 a *SHN3 Ox* – SALK\_040198) vztažených ke kontrolní rostlině Col. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl adaxiální/abaxiální strany listu od kontroly. Linie v boxplotu značí medián, trojúhelníky zdrojová data (n= 25-30 analyzovaných ploch), odchylky od mediánu značí 5%- 95% kvantil, p <0,05.

Jediný průkazný rozdíl v průduchovém indexu (SI) vyšel u prvního pěstování na horních (adaxiálních) stranách listů u *shn2* a *SHN3 Ox* rostlin, kde byl nižší než u Col. Rovněž u *shn1* rostlin, se sníženou expresí *SHN1* genu, vyšel průduchový index nižší na dolní (abaxiální) straně listu (**Obr. č. 20**).



**Obr. č. 20:** Průduchový index (SI) horní (adaxiální) a dolní (abaxiální) strany listu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) u pěti linií (*SHN1 Ox* – SALK\_051701, *shn1* – SALK\_030905, *SHN2 Ox* – SALK\_043868C, *shn2* – SALK\_050853 a *SHN3 Ox* – SALK\_040198) vztažených ke kontrolní rostlině Col. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl adaxiální/abaxiální strany listu od kontroly. Linie v boxplotu značí medián, trojúhelníky zdrojová data (n= 15 analyzovaných ploch), odchylky od mediánu značí 5%-95% kvantil,  $p < 0,05$ .  $SI = SD/(SI+PvCD)*100$ .

V opakovaném pokusu byl průduchový index opět nižší na horních (adaxiálních) stranách *shn2* a *SHN3 Ox* rostlin jako v prvním pokusném pěstování. Nově byl průduchový index nižší i u *SHN2 Ox* linie (**Obr. č. 21**).



**Obr. č. 21:** Průduchový index (SI) horní (adaxiální) a dolní (abaxiální) strany listu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) u třech linií (*SHN2 Ox* – SALK\_043868C, *shn2* – SALK\_050853 a *SHN3 Ox* – SALK\_040198) vztažených ke kontrolní rostlině Col. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl adaxiální/abaxiální strany listu od kontroly. Linie v boxplotu značí medián, trojúhelníky zdrojová data (n= 25-30 analyzovaných ploch), odchylky od mediánu značí 5% -95% kvantil,  $p < 0,05$ .  $SI = SD/(SI+PvCD)*100$ .

## 6 Diskuze

Rostliny se při přechodu z vody na souš přizpůsobily novému okolnímu prostředí nejednou změnou vnitřní stavby či povrchu svého těla. Mezi těmito adaptacemi je i přítomnost průduchů v pokožce, která je v nadzemních částech rostlin pokryta vrstvou kutikuly (Arteaga-Vazquez, 2016; Yeats and Rose, 2013). Průduchy rostlinám slouží k regulaci výparu, příjmu oxidu uhličitého a výdeji kyslíku v průběhu fotosyntézy (Peterson *et al.*, 2010; Chater *et al.*, 2017; Nunes *et al.*, 2020; Yeats and Rose, 2013). Kutikula má více funkcí – ochraňuje rostlinu před nadměrnou ztrátou vody, před poškozením a možným napadením škůdcem, má protektivní efekt vůči UV záření při dlouhých slunečních dnech (Serrano *et al.*, 2014).

Vytváření kutikuly na povrchu nadzemních orgánů a průduchů v pokožce rostlin by mohlo být vzájemně koordinováno a případně kontrolováno společnými geny. Některé z nich, jejichž změněná exprese se projevila současně jak změnou v počtu průduchů na listu, tak strukturou či kvalitou kutikuly, zmiňuje literatura. Uváděnými geny jsou například *HIC* neboli *KCS13*, který kóduje 3-ketoacyl koenzym A syntázu, známou svým zapojením do syntézy dlouhých řetězců mastných kyselin. Rostliny s mutací v *HIC* za zvýšené koncentrace oxidu uhličitého ve vzduchu mají v pokožce rostlin až o 41 % více průduchů (doloženo vyšším SD, průduchovou hustotou) (Gray *et al.*, 2000). Dále například mutace v *CER6* (*CUT1/KCS6*) vede k vyšší SD ale k omezení množství vosků v kutikule (Sadler *et al.*, 2016; Millar *et al.*, 1999). Také rostlina *StRNAi* má jak méně průduchů v pokožce, tak snížený obsah epikutikulárních vosků v kutikule listu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) (Petruschke, 2019). Dalšími důležitými hráči jsou členové *SHN* (*SHINE*) rodiny genů – *SHN1*, *SHN2* a *SHN3* – kódující transkripční faktory. Nejvíce studovaným transkripčním faktorem z této trojice je *SHN1* (*WIN1*, *WAX INDUCER 1*). Navýšená exprese *SHN1* genu vede v listech huseníčku rolního na bázi ekotypu Wasilevskija ke snížení počtu průduchů v pokožce ale navýšení obsahu vosků (6x) v kutikule (Aharoni *et al.*, 2004). Sadler *et al.* (2016) detekovali v kutikule nejen zvýšený obsahu vosků (2,7x) ale i kutinu (4,2x). Zatím není kompletně jasné, jak je celý vývoj listu a jeho jednotlivých struktur propojen a která struktura ovlivňuje kterou.

Cílem této diplomové práce bylo posoudit vliv *SHN* (*SHINE*) genů na vývoj kutikuly a průduchů na listech huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Geny *SHN*, kódující transkripční faktory, patří do rodiny AP2/EREBP (APETALA 2/ethylene-responsive element binding protein). Výběr *SHN* genů vychází z našich předchozích dosud

nepublikovaných výsledků sekvenování dvou mutantních linií lišících se primárně v počtu průduchů. Linie *StRNAi* má zhruba poloviční SD na listu a méně vosků oproti kontrole (WT) a dvojitý mutant v negativních epidermálních faktorech *epf1,2* má dvojnásobně vyšší SD než WT a také významně vyšší obsah epikutikulárních vosků. Zejména *SHN2* vykázal zvýšenou expresi u *epf1,2* a sníženou u *StRNAi*. Proto bylo jedním z cílů nalézt mutanty se sníženou a zvýšenou expresí genů *SHN* na bázi ekotypu Columbia.

Dalším cílem bylo analýzou fenotypu těchto *SHN* mutantů potvrdit hypotézu, že vývoj průduchů a kutikuly listu huseníčku rolního (ekotyp Columbia) je vzájemně propojen a *SHN* gen v tom hraje klíčovou roli. Zvýšená exprese *SHN* genu u huseníčku rolního stimuluje tvorbu epikutikulárních vosků, ale omezuje počet průduchů na listu (Aharoni *et al.*, 2004). Má snížená exprese *SHN* opačný účinek?

Byly použity linie s T-DNA inzercí v jednotlivých *SHN* genech ze SALK institutu (Alonso *et al.*, 2003). Genotypováním a kvantitativní PCR analýzou *SHN* genů byly nalezeny homozygotní linie se zvýšenou (nazvány Ox) či sníženou (pojmenovány malým písmenem) expresí *SHN1* a *SHN2* genu a linie se zvýšenou expresí *SHN3* genu. Celkem tedy bylo získáno 5 linií – *SHN1 Ox*, *shn1*, *SHN2 Ox*, *shn2* a *SHN3 Ox* (**Obr. č. 6, Tab. č. 5**).

Na základě analýzy fenotypu získaných linií se zdá, že *SHN* transkripční faktory mají vliv na expresi genů ovlivňující syntézu vosků. Relativní exprese *CER1* genu, který je zodpovědný za zvýšení obsahu alkanů ve voscích (Bourdenx *et al.*, 2011; Aarts *et al.*, 1995; Smirnova *et al.*, 2013), byla jak u rostlin se sníženou expresí *SHN2* genu (*shn2*), tak u rostlin se zvýšenou expresí v *SHN3* genu (*SHN3Ox*) statisticky zvýšena (**Obr. č. 16**). Zároveň i exprese genu *BDG3*, jež také ovlivňuje množství alkanů ale i kutinu v kutikule listu (Kurdyukov *et al.*, 2006a), byla alespoň v prvním opakování zvýšena u *SHN3 Ox* linie (**Obr. č. 15**).

Zvýšená exprese *CER1* genu podporuje hypotézu, že by i množství vosku v kutikule mohlo být více. Listy linií *SHN2Ox* a *SHN3Ox* měly pod Kryo-elektronovým mikroskopem více epikutikulárních vosků (**Obr. č. 8**) a zároveň i tloušťka listu *SHN3Ox* byla větší než u Col (WT) (**Obr. č. 9**). Stejný fenotyp vykazovaly i listy mutantních rostlin se zvýšenou expresí genu *SHN1* v práci Broun *et al.* (2004), Aharoni *et al.* (2004) a také u transgenních rostlin huseníčku se zvýšenou expresí *SHN1* genu z rýže (*TaSHN1*) (Jager *et al.*, 2015). Jejich rostliny měly také typicky lesklejší povrch listů, který u našich rostlin ovšem nebyl pozorován. Zřejmě nedošlo k tak výraznému ovlivnění biosyntézy vosků, aby byl efekt viditelný pouhým okem. Expresí dalších vybraných genů podílejících se na biosyntéze vosků (*CER2*, *KCSI*)

zůstala nezměněna (**Obr. č. 17**), přestože určité statisticky neprůkazné snížení exprese zejména u *KCSI* bylo u *SHN2 Ox* a *shn2* linií zaznamenáno. Oproti tomu v práci Broun et al. (2004) zaznamenali expresi *KCSI* a *CER2*, u rostlin se zvýšenou expresí *SHN1* genu, navýšenou. Stejný trend v expresi *CER1*, *CER2*, *KCSI*, u rostlin se zvýšenou expresí *SHN1*, uvádí i Kannangara et al. (2007), u nichž se také celkové množství vosků v listech navýšilo. Jelikož se v publikacích (Broun et al., 2004) uvádí, že nejvyšší podíl vosků na listu tvoří alkanly C29 - C31 (z 65 %), měřili jsme množství zejména těchto alkanů (**Obr. č. 10, 11**). U rostlin se zvýšenou expresí v *SHN* genu se očekávalo navýšení obsahu alkanů, jako tomu bylo u *SHN1Ox* rostlin huseničku v práci Broun et al. (2004) a Aharoni et. al. (2004). K této změně ovšem v *SHN2Ox* a *SHN3Ox* liniích nedošlo. U *SHN3 Ox* bylo ovšem detekováno více aldehydů oproti kontrolní variantě Col (**Příloha č. 4**). Ani v disertační práci Petruschke (2019) se u listů rostlin *SHN3Ox* (ekotyp Wasilvskija) neuvádí navýšení celkového množství vosků. Analýza jednotlivých složek v její práci bohužel nebyla provedena. Oproti tomu v transgenních rostlinách huseničku rolního, kde byla navýšena exprese *SISHN3* genu z rajčete, došlo k navýšení obsahu vosků, a to jak alkanů, tak aldehydů (Shi et al., 2013). Očekávané navýšení obsahu alkanů bylo ovšem detekovatelné u huseničku rolního, ekotyp Wasilevskija, v *SHN1Ox* rostlinách (**Příloha č. 8**), jejichž analýza byla provedena pro porovnání s huseničkem ekotypu Columbia. Tato analýza potvrzuje závěry publikované v práci Aharoni et. al. (2004) a Sadler et al. (2016). Zároveň i tloušťka listu a i kutikuly *SHN1 Ox* linie ekotypu WS byla silnější v porovnání s kontrolou (**Příloha č. 9, 10**).

Oproti tomu u linií se sníženou expresí *SHN2* genu (*shn2*) se očekávalo snížené množství alkanů, ale byl detekován opačný efekt (**Obr. č. 10**). I zvýšená exprese *CER1* napovídala tomuto opačnému trendu (**Obr. č. 16 B**). Množství aldehydů nebylo u linií se sníženou expresí *SHN* genu ovlivněno (**Příloha č. 4**). Kannangara et. al. (2007) také nepozorovali v květu u *shn1* mutantů snížení obsahu alkanů, ale naopak mírné zvýšení alkanu C31, stejně jako my (**Obr. č. 11**), a mastné kyseliny C28, přestože exprese *SHN1* genu byla u jejich rostlin snížena na třetinu hodnoty kontrolní rostliny. Celkový výtěžek vosků práce bohužel neuvádí. Rovněž další studie, kde byla vědci potlačena exprese všech tří *SHN* genů, neuvádí v listech změnu v celkovém obsahu vosků, ale dokonce došlo k navýšení alkanů C29 a C31 (Shi et al., 2011).

*SHN* transkripční faktory přitom nemusí přímo ovlivňovat geny biosyntézy vosku, ale změna v množství vosku může být vedlejším efektem či se na biosyntéze vosku mohou podílet i další hráči. Kannangara et. al. (2007) navíc předpokládají, že množství vosku v kutikule *SHN* geny mění buď cíleně skrz změnu exprese genů zapojených do biosyntézy



vosků (*CER1*, *CER2*, *KCSI*) anebo skrz ovlivnění dráhy kutinu, neboť složení či akumulace kutinu má vliv na vosky. Je známo, že jsou obě dráhy kutinu a vosků propojeny. Syntéza vosku a kutinu vychází ze stejných prekurzorů a sdílí i část dráhy (Natarajan *et al.*, 2020; Hen-Avivi *et al.*, 2014). Zároveň bylo potvrzeno, že SHN transkripční faktory (konkrétně SHN1) přímo ovlivňují expresi genu *LACS2*, který kóduje acyl-CoA syntetázu, enzym, který je zapojen jak do biosyntézy kutinu, tak vosků. (Jager *et al.*, 2015).

Kromě toho obsah vosků v kutikule nekoreluje většinou s její propustností pro vodu. Mutanty v práci Sadler *et al.* (2026), *SHN1 Ox* a *SHN3 Ox* (ekotyp WS), s vyšším podílem epikutikulárních vosků mají propustnější kutikulu. Aharoni *et al.* (2004) zjistili, že navýšená exprese *SHN1* genu v huseníčku rolním (ekotyp WS) vede k větší suchovzdornosti rostlin. K vyšší suchovzdornosti budou ale pravděpodobně přispívat spíše průduchy než kutikula, kterých bylo u zmíněných *SHN1 Ox* rostlin vyvinuto méně. SD byla snížena na třetinu a SI (průduchový index) skoro na polovinu (Aharoni *et al.*, 2004). Tento předpoklad podporuje i fakt, že menší počet průduchů na listu zvyšuje WUE (water-use efficiency), což bylo zjištěno u rostlin s navýšením exprese dvou negativních epidermálních faktorů *EPF1* a *EPF2* (Franks *et al.*, 2015). Rovněž při vystavení rostlin vodnímu deficitu, kdy se snížila průduchová vodivost, zvýšila se WUE (Songsri *et al.*, 2013).

Tato diplomová práce se nezabývá odolností rostlin vůči suchu, ale jen vlivem SHN transkripčních faktorů na vývoj průduchů. Efekt se vyjadřoval pomocí průduchové hustoty (SD) a průduchového indexu (SI) a relativní mírou exprese vybraných genů zapojených do tvorby průduchů. Předpokládali jsme, že hodnoty se SD a SI budou u linií se zvýšenou expresí *SHN* genu snižovat, jak bylo uvedeno ve zmíněné práci Aharoni *et al.* (2004). Oproti tomu jsme byli zvědaví, zdali u linií se sníženou expresí v *SHN* genu se bude SD a SI zvyšovat. Tato hypotéza byla potvrzena jen částečně. U linie *SHN2 Ox* a *SHN3 Ox* skutečně došlo ke snížení SD na obou stranách listu a i SI bylo sníženo (alespoň na adaxiální straně listu) (**Obr. č. 19, 21**). Petruschke *et al.* (2019) také u rostlin *SHN3 Ox* (ekotyp WS) zjistila menší hodnotu SD, ale jen na adaxiální straně listu, hodnoty SI byly totožné s kontrolními hodnotami. U *SHN1 Ox* linie bylo SD dokonce navýšeno na adaxiální straně listu (**Obr. č. 18**). U linií se sníženou expresí v *SHN2* genu (*shn2* linie) došlo ke snížení jak SD, tak SI na adaxiální straně listu. Očekával se však opačný trend (**Obr. č. 19, 21**). U *shn1* linie se změna v počtu pokožkových buněk projevila pouze sníženou hodnotou SI na abaxiální straně listu (**Obr. č. 20**).

Relativní exprese negativních epidermálních faktorů (*EPF1*, *EPF2*), které potlačují vývoj průduchů, ovšem nebyla statisticky významně změněna u žádné linie (**Obr. č. 14, Příloha č. 6**). Přestože exprese *EPF1* genu u *SHN3 Ox* linie v prvním pěstování, která měla nižší SI (**Obr. č. 20**), byla navýšena. Oproti tomu exprese genu, který podporuje vývoj průduchů, *MUTE*, byla navýšena u *shn2* a *SHN3 Ox* linií (**Obr. č. 12**), které měly snížené SD (**Obr. č. 19**). Exprese *MUTE* však nebyla změněna u *SHN1 Ox* linie, kde bylo na adaxiální straně listu zjištěno vyšší SD (**Příloha č. 5, Obr. č. 18**). Ani exprese dalších genů stimulující vývoj průduchů, *SPEECHLESS*, *FAMA*, *STOMAGEN (EPFL-9)*, nebyla statisticky významně změněna na 5% hladině významnosti (**Obr. č. 12, 13, Příloha č. 5**). Míra relativní exprese genu *FAMA* u *SHN2 Ox* a *shn2* linie byla oproti kontrole zvýšena na hladinách významnosti  $p = 0,09$  a  $p = 0,07$  (**Obr. č. 12, Příloha č. 5**). Také exprese *SPEECHLESS* u *SHN3 Ox* linie a *STOMAGENU* u *SHN2 Ox* vykazovala statisticky nevýznamné zvýšení (na hladinách významnosti  $p = 0,067$  a  $p = 0,089$ ). Oproti tomu Yang *et al.* (2011) u rostlin se zvýšenou expresí *SHN1* genu u huseníčku rolního zjistili opravdu snížení počtu průduchů (SD i SI), ovšem snížení bylo detekovatelné jen po indukci exprese *SHN1* genu u mladých a nově se vyvíjejících listů. Indukce exprese *SHN1* na plně vyvinutých listech neměla na počet průduchů vliv. V této práci zároveň měřili relativní expresi genů *SPEECHLESS*, *MUTE* a *FAMA*, ale snížení bylo statisticky významné až po uplynutí tří dnů po indukci. Autoři navrhuje, že *SHN1* transkripční faktor ovlivňuje geny zapojené do vývoje průduchů jen nepřímo. Ovšem to, že *SHN* transkripční faktor může mít vliv na vývoj pokožkových buněk, zjistili u mutantních rostlin v *SHN1* genu nebo v potlačení funkce všech tří *SHN* genů (RNA interferencí) u huseníčku rolního vědci Aharoni *et al.* (2004) a Shi *et al.* (2011). Vědci našli defektní tvar pokožkových buněk korunních lístků (protáhlejší či kompaktní, s méně členitým povrchem). Aharoni *et al.* (2004) u *SHN1 Ox* rostlin (ekotyp WS) pozorovali na listech růžice menší počet trichomů a navíc jednovětvených nikoli typicky pro huseníček trojvětvených. Shi *et al.* (2011) ve své práci s huseníčkem rolním s RNA interferencí ve všech třech genech *SHN* také zjistili změněnou expresi několika genů. V seznamu uvádějí i geny účastníci se tvorby buněčné stěny, proto se zdá, že *SHN* transkripční faktory ovlivňují vývoj pokožkových buněk jako vedlejší efekt.

Zapojení transkripčních faktorů *SHN* v regulaci vývoje kutikuly a průduchů v pokožce rostlin a detailní propojení metabolických drah je nutné ještě důkladněji prozkoumat. Ke studiu by bylo vhodnější použít mutantní rostliny se změněnou mírou exprese v jednotlivých *SHN* genech, případně i double či triple mutanty vytvořené např. CRISPR-Cas9

systemem, neboť SHN transkripční faktory působí redundantně (Shi *et al.*, 2011). Použité mutantní rostliny v této práci mají T-DNA inzerci nejen v oblasti studovaných *SHN* genů, ale v některých případech i v další lokaci genomu. Navíc nevíme, zdali detekovaná změna v relativní míře exprese genu *SHN* je dostatečná k indukci očekávané fenotypové změny. Zároveň detekce změny v expresi genů pomocí RT-PCR (Real Time PCR) nic nevypovídá o tom, zdali se exprese přepíše do syntézy funkčního proteinu. Možná i měření exprese genů jen ze třech biologických vzorků mohlo být v některých případech nedostatečné. Z těchto důvodů nelze z výsledků učinit jednoznačný závěr.

## 7 Závěr

Vývoj kutikuly a průduchů by mohl být koordinován na molekulární úrovni společnými geny. Mezi ně patří i trojice genů kódující transkripční faktory SHINE (*SHN1*, *SHN2*, *SHN3*). Zde bylo identifikováno celkem 5 homozygotních linií huseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*) s T - DNA inzercí v jednotlivých *SHN* genech, které měly sníženou i zvýšenou expresi v *SHN1* nebo v *SHN2* genu a linie se zvýšenou expresí v *SHN3* genu. U rostlin byl analyzován celkový obsah alkanů a aldehydů, a také průduchová hustota (SD) i průduchový index (SI) na listech růžice. Zvýšená exprese jednotlivého *SHN* genu vedla v některých případech podle očekávání ke snížení počtu průduchů. Oproti tomu snížená exprese buď neměla na vývoj počtu průduchů vliv nebo měla stejný efekt jako ta zvýšená. U mutantních linií nebylo celkové množství alkanů ani aldehydů v kutikule významně ovlivněno, přestože mikroskopická pozorování ukázala na povrchu linií se zvýšenou expresí v *SHN2* či v *SHN3* genu více epikutikulárních vosků. Dokonce u linie se sníženou expresí v *SHN2* genu (*shn2*) došlo k navýšení obsahu alkanů, tedy k opačnému efektu, než který se předpokládal. Také změny v expresi vybraných genů účastnících se vývoje průduchů (*MUTE*) a syntézy vosků v kutikule listu (*CER1*, *BDG3*) podle našeho názoru podporují hypotézu, že se SHN transkripční faktory pravděpodobně účastní obou vývojových drah. Nicméně k důkladnější analýze, a možná i k jasnějšímu výsledku, by bylo vhodné použít podrobnější analýzu jednotlivých složek vosků a také kutinu. A zároveň použít rostliny s umlčením nebo zvýšenou expresí *SHN* genů pomocí sofistikovanější metody jako je např. CRISPR - Cas 9.

## 8 Přílohy

**Příloha č. 1:** Zvolené homozygotní rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) s T-DNA inzercí v *SHN1* genu (SALK\_051701, SALK\_030905), v *SHN2* genu (SALK\_043868C, SALK\_050853) a v *SHN3* genu (SALK\_040198) pěstované při prvním pěstování (A); a ve 2. pěstování (B), kdy byly pěstovány rostliny s T-DNA inzercí v *SHN2* genu (SALK\_043868C, SALK\_050853) a v *SHN3* genu (SALK\_040198). Kontrolní rostlinou byla vyseta Columbia-0.



**Příloha č. 2:** Sekvence levého a pravého primeru u *SHN* rostlin použité při PCR reakci během genotypování.

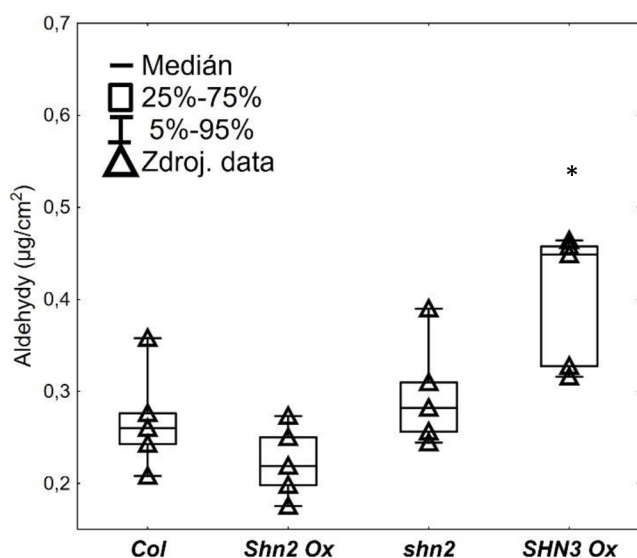
Lokace	Gen	(SALK název/ NASC ID)	Levý primer	Pravý primer
At1g15360	<i>SHN1</i>	SALK_030905/N530905	ATCATAGGG TCCCCACTTC C	ACATTTTCGCA GTGATTCACG
At1g15360	<i>SHN1</i>	SALK_051701/N551701	ATTCGACCTA TTGGAGACG G	TCGTACCCAT AGCCTAAGC C
At5g11190	<i>SHN2</i>	SALK_135005/N635005	GTGGTTCGTC CCCAACTAA C	CTATCCATCC CATAGCGTC G
At5g11190	<i>SHN2</i>	SALK_043868C/N66588 7	GATAAACAA AGCTGCACC AGG	GCATGCATG GTTGGTTTTA AC
At5g11190	<i>SHN2</i>	SALK_050853/N550853	ACCAACAAA ATTGTAGGCC C	CCATTGTTTA CTGTTTTCTT GC
At5g25390	<i>SHN3</i>	SALK_040198/N540198	GCCAACCTTT TCCTGTCTTG	ACAGTGACG TGAAAACGT CG

**Příloha č. 3:** Sekvence primerů (levého – forward, F; pravého – reverse, R) použitých při RT - PCR.

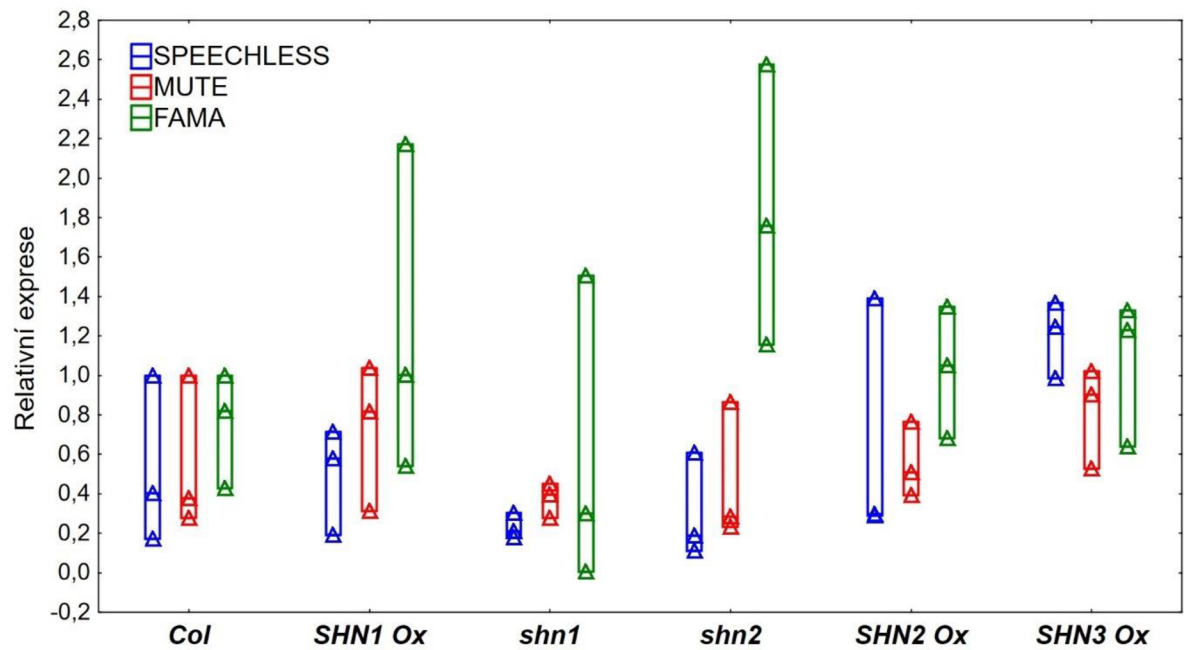
Název genu a typ primeru (forward – F, reverse – R)	Sekvence primeru
<i>ACTIN 2</i> F	CAAGGCCGAGTATGATGAGG
<i>ACTIN 2</i> R	GAAACGCAGACGTAAGTAAAAAC
<i>SHN1</i> F	CGCTGAGATTCGTCATCCTC
<i>SHN1</i> R	CCTCGTCGTATGCTCTTGCT
<i>SHN2</i> F	CCGCCAGCGACAATGG
<i>SHN2</i> R	TCGAAAGTTCCAAGCCACT
<i>SHN3</i> F	GTTCCGAGGTGTCCGCCAGCGTCA
<i>SHN3</i> R	GTCGTAGGCTCTAGCCGCTG
<i>SPCH</i> F	TCCAATCTTTGGAAGCCAAG
<i>SPCH</i> R	GCTTAGAACAGGCGGTGAAG
<i>MUTE</i> F	ATCGCTGTTGAAAGGAATCG

<i>MUTE R</i>	AAGGGAAAGATGGTCGGTTT
<i>FAMA F</i>	GGAACAAACCGTCCTCTACTC
<i>FAMA R</i>	CAAATGCTTGGAGAATAAAAACC
<i>EPF1 F</i>	CGTCGAAGAGGCTGAGACTT
<i>EPF1 R</i>	GCTGATCAAGGGACAGGGTA
<i>EPF2 F</i>	CTCAGTCGCCGAATCATGTA
<i>EPF2 R</i>	CGCCAGCCAAAACCTGATATT
<i>CER1 F</i>	GGTGGGAGAAGGAACAACAA
<i>CER1 R</i>	TCAATGCTGGTGTGGTATGA
<i>CER2 F</i>	TACGTCCGAGCCGTCTACTT
<i>CER2 R</i>	GAAGTGTCGTTGTCGTTGTC
<i>KCSI F</i>	TCTAACCAGGCGGTTCAACT
<i>KCSI R</i>	CCGGTTTGTAGCAGGAGAAA
<i>BDG3 F</i>	CAATAGCTCTCGGAGCGTCG
<i>BDG3 R</i>	GGCGATGAATTGCCAAACAC

**Příloha č. 4:** Suma aldehydů z epikutikulárních vosků listu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) smytých chloroformem u mutantních rostlin s T-DNA inzercí (*SHN2 Ox* SALK\_043868C, *shn2* SALK\_050853, *SHN3 Ox* SALK\_040198). Kontrolní varianta Col (Columbia). N = 5, kde n znamená počet biologických vzorků.

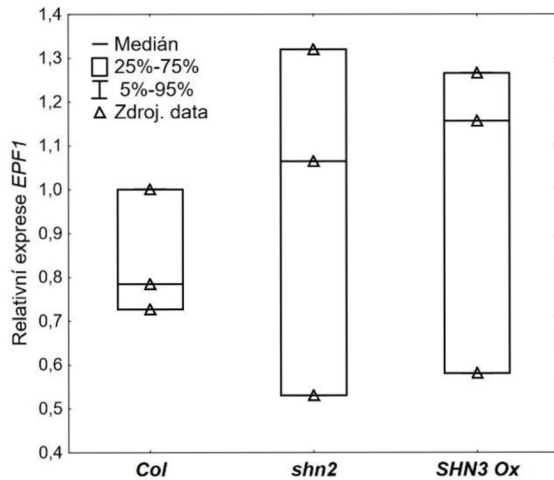


**Příloha č. 5:** Relativní exprese genů podporující vývoj průduchů u rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) s T-DNA inzercí (*SHN1 Ox* SALK\_051701, *shn1* SALK\_030905, *SHN2 Ox* SALK\_043868C, *shn2* SALK\_050853, *SHN3 Ox* SALK\_040198), kontrolní varianta Columbia (Col). Trojúhelníky zobrazují zdrojová data (n=3, kde n jsou biologické vzorky), linka v boxplotu znamená medián, hvězdička statisticky významný rozdíl od kontroly, p<0,05.

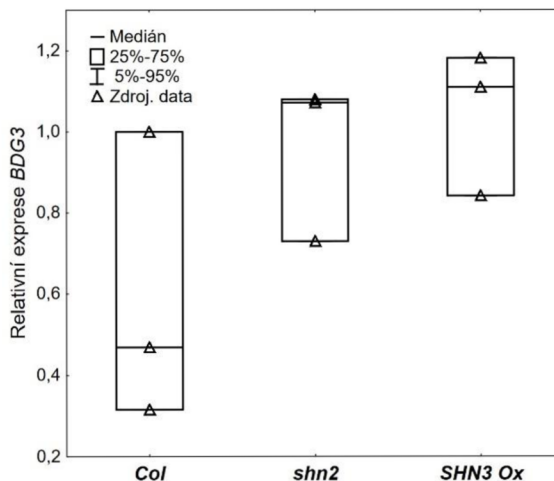




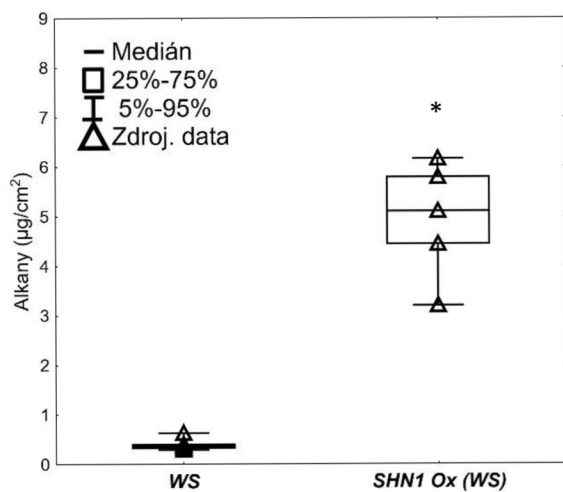
**Příloha č. 6:** Relativní exprese genu potlačující vývoj průduchů (*EPF1* – *EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 1*) u T-DNA mutantních rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) *shn2* (SALK\_050853), *SHN3 Ox* (SALK\_040198). N=3, kde n znamená počet biologických vzorků.



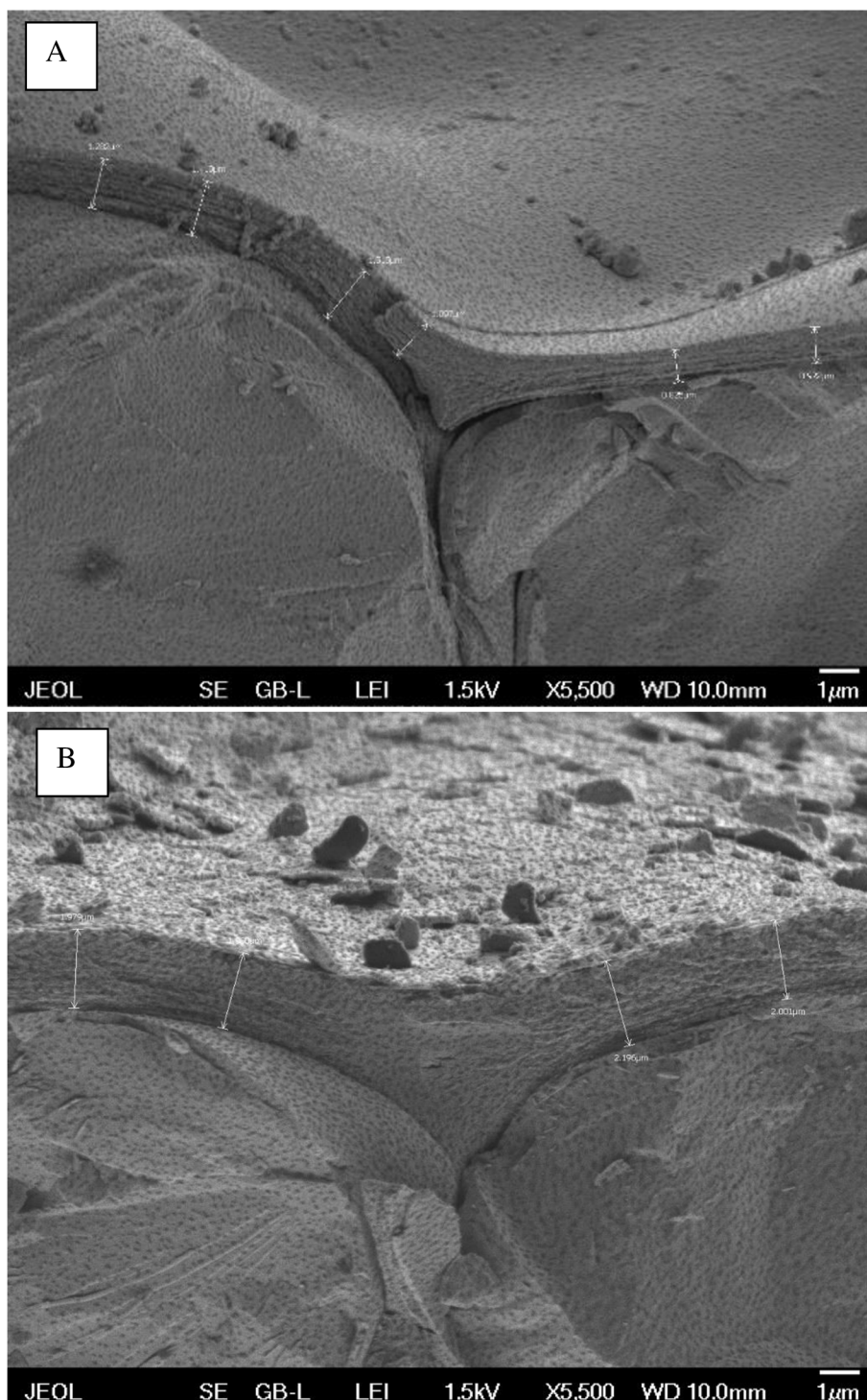
**Příloha č. 7:** Relativní exprese *BDG3* v listech huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) u linií s T-DNA inzercí – *shn2* (SALK\_050853) a *SHN3 Ox* (SALK\_040198), kontrolní variant Columbia (Col), n=3, kde n znamená počet biologických vzorků.



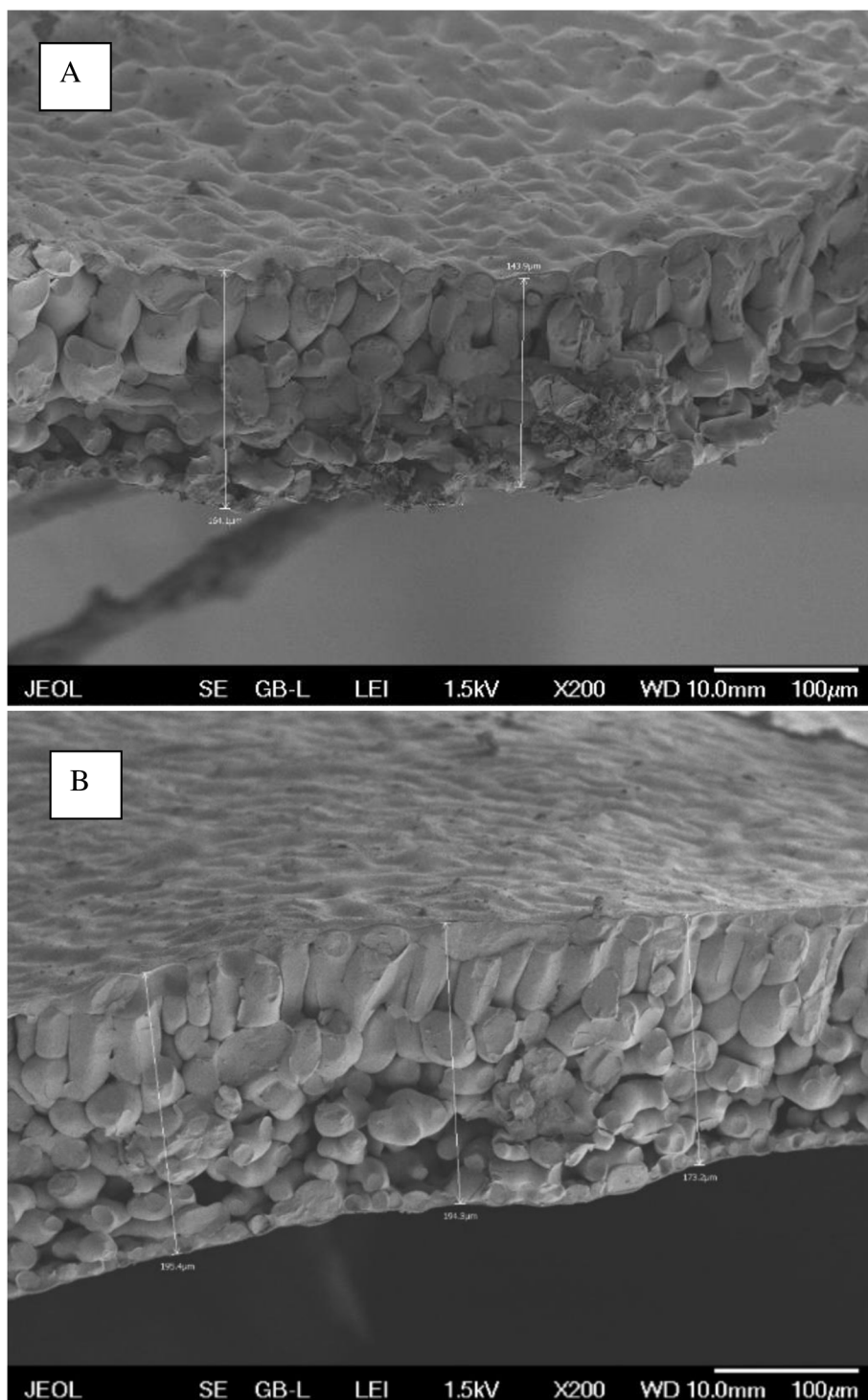
**Příloha č. 8:** Celkové množství alkanů u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) ekotyp Wassilewskija (WS) u *SHN1 Ox* rostliny, která má zvýšenou expresi *SHN1* genu. Hvězdička znamená statisticky významný rozdíl od kontroly (WS),  $p < 0,05$ .



**Příloha č. 9:** Lom listem huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) ekotyp Wassilewskija (WS) u kontrolní rostliny (A), *SHNI Ox* rostliny s epikutikulárními vosky na povrchu (B) pod Kryo-elektronovým mikroskopem se změřenou tloušťkou kutikuly.



**Příloha č. 10:** Lom listem huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) ekotyp Wasilevskija (WS) s jeho změřenou šířkou u kontrolní rostliny (A) a *SHN1 Ox* rostliny (B) pod Kryo - elektronovým mikroskopem.



## 9 Přehled citované literatury

- Aarts, M. G. M., Keijzer, C. J., Stiekema, W. J. &Pereira, A. (1995). Molecular characterization of the CER1 gene of arabidopsis involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *Plant Cell* 7(12): 2115-2127.
- Abe, M., Katsumata, H., Komeda, Y. &Takahashi, T. (2003). Regulation of shoot epidermal cell differentiation by a pair of homeodomain proteins in Arabidopsis. *Development* 130(4): 635-643.
- Adrian, J., Chang, J., Ballenger, C. E., Bargmann, B. O. R., Alassimone, J., Davies, K. A., Lau, O. S., Matos, J. L., Hachez, C., Lanctot, A., Vaten, A., Birnbaum, K. D. &Bergmann, D. C. (2015). Transcriptome Dynamics of the Stomatal Lineage: Birth, Amplification, and Termination of a Self-Renewing Population. *Developmental Cell* 33(1): 107-118.
- 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. *Plant Cell* 16(9): 2463-2480.
- Al-Abdallat, A. M., Al-Debei, H. S., Ayad, J. Y. &Hasan, S. (2014). Over-Expression of SISHN1 Gene Improves Drought Tolerance by Increasing Cuticular Wax Accumulation in Tomato. *International Journal of Molecular Sciences* 15(11): 19499-19515.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C. &Ecker, J. R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science* 301(5633): 653-657.
- Arteaga-Vazquez, M. A. (2016). Land Plant Evolution: Listen to Your Elders. *Current Biology* 26(1): R26-R29.
- Bargel, H., Koch, K., Cerman, Z. &Neinhuis, C. (2006). Structure-function relationships of the plant cuticle and cuticular waxes - a smart material? *Functional Plant Biology* 33(10): 893-910.
- Barthlott, W., Neinhuis, C., Cutler, D., Ditsch, F., Meusel, I., Theisen, I. &Wilhelmi, H. (1998). Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 126(3): 237-260.
- Beaudoin, F., Gable, K., Sayanova, O., Dunn, T. &Napier, J. A. (2002). A *Saccharomyces cerevisiae* gene required for heterologous fatty acid elongase activity encodes a microsomal beta-keto-reductase. *Journal of Biological Chemistry* 277(13): 11481-11488.
- Bergmann, D. C., Lukowitz, W. &Somerville, C. R. (2004). Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science* 304(5676): 1494-1497.
- Berhin, A., de Bellis, D., Franke, R. B., Buono, R. A., Nowack, M. K. &Nawrath, C. (2019). The Root Cap Cuticle: A Cell Wall Structure for Seedling Establishment and Lateral Root Formation. *Cell* 176(6): 1367-+.
- Bernal-Gallardo, J. J., Zuniga-Mayo, V. M., Marsch-Martinez, N. &de Folter, S. (2023). Novel Roles of SPATULA in the Control of Stomata and Trichome Number, and Anthocyanin Biosynthesis. *Plants (Basel)* 12(3).
- Bernard, A., Domergue, F., Pascal, S., Jetter, R., Renne, C., Faure, J. D., Haslam, R. P., Napier, J. A., Lessire, R. &Joubes, J. (2012). Reconstitution of Plant Alkane Biosynthesis in Yeast Demonstrates That Arabidopsis ECERIFERUM1 and ECERIFERUM3 Are Core Components of a Very-Long-Chain Alkane Synthesis Complex. *Plant Cell* 24(7): 3106-3118.
- Bernard, A. &Joubes, J. (2013). Arabidopsis cuticular waxes: Advances in synthesis, export and regulation. *Progress in Lipid Research* 52(1): 110-129.

- Bessire, M., Borel, S., Fabre, G., Carraca, L., Efremova, N., Yephremov, A., Cao, Y., Jetter, R., Jacquat, A. C., Metraux, J. P. & Nawrath, C. (2011). A Member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE Family of ATP Binding Cassette Transporters Is Required for the Formation of a Functional Cuticle in Arabidopsis. *Plant Cell* 23(5): 1958-1970.
- Bhanot, V., Fadanavis, S. V. & Panwar, J. (2021). Revisiting the architecture, biosynthesis and functional aspects of the plant cuticle: There is more scope. *Environmental and Experimental Botany* 183.
- Bianchi, A., Bianchi, G., Avato, P. & Salamini, F. (1985). Biosynthetic Pathways of Epicuticular Wax of Maize as Assessed by Mutation, Light, Plant-Age and Inhibitor Studies. *Maydica* 30(2): 179-198.
- Borisjuk, N., Hrmova, M. & Lopato, S. (2014). Transcriptional regulation of cuticle biosynthesis. *Biotechnology Advances* 32(2): 526-540.
- Bornman, J. F., Reuber, S., Cen, Y. P., & Weissenböck, G. (1997). Ultraviolet radiation as a stress factor and the role of protective pigments. In *Plants and UV-B: Responses to Environmental Change*, pp. 157-168, (Ed J. L. (Ed.)). Cambridge University press, Cambridge/New York.
- Bourdenx, B., Bernard, A., Domergue, F., Pascal, S., Leger, A., Roby, D., Pervent, M., Vile, D., Haslam, R. P., Napier, J. A., Lessire, R. & Joubes, 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.
- Brockington, S. F., Alvarez-Fernandez, R., Landis, J. B., Alcorn, K., Walker, R. H., Thomas, M. M., Hileman, L. C. & Glover, B. J. (2013). Evolutionary Analysis of the MIXTA Gene Family Highlights Potential Targets for the Study of Cellular Differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 30(3): 526-540.
- Broun, P., Poindexter, P., Osborne, E., Jiang, C. Z. & Riechmann, J. L. (2004). WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(13): 4706-4711.
- Bueno, A., Sancho-Knapik, D., Gil-Pelegrin, E., Leide, J., Peguero-Pina, J. J., Burghardt, M. & Riederer, M. (2020). Cuticular wax coverage and its transpiration barrier properties in *Quercus coccifera* L. leaves: does the environment matter? *Tree Physiology* 40(7): 827-840.
- 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.
- Buxdorf, K., Rubinsky, G., Barda, O., Burdman, S., Aharoni, A. & Levy, M. (2014). The transcription factor SISHINE3 modulates defense responses in tomato plants. *Plant Molecular Biology* 84(1-2): 37-47.
- Caine, R. S., Yin, X. J., Sloan, J., Harrison, E. L., Mohammed, U., Fulton, T., Biswal, A. K., Dionora, J., Chater, C. C., Coe, R. A., Bandyopadhyay, A., Murchie, E. H., Swarup, R., Quick, W. P. & Gray, J. E. (2019). Rice with reduced stomatal density conserves water and has improved drought tolerance under future climate conditions. *New Phytologist* 221(1): 371-384.
- DeBono, A., Yeats, T. H., Rose, J. K. C., Bird, D., Jetter, R., Kunst, L. & Samuelsen, L. (2009). Arabidopsis LTPG Is a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer Protein Required for Export of Lipids to the Plant Surface. *Plant Cell* 21(4): 1230-1238.
- Djemaal, R. & Khoudi, H. (2015). Isolation and molecular characterization of a novel WIN1/SHN1 ethylene-responsive transcription factor TdSHN1 from durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp durum). *Protoplasma* 252(6): 1461-1473.
- Do, T. H. T., Martinoia, E. & Lee, Y. (2018). Functions of ABC transporters in plant growth and development. *Current Opinion in Plant Biology* 41: 32-38.
- Edwards, K., Johnstone, C. & Thompson, C. (1991). A Simple and Rapid Method for the Preparation of Plant Genomic DNA for Pcr Analysis. *Nucleic Acids Research* 19(6): 1349-1349.

- Engineer, C. B., Hashimoto-Sugimoto, M., Negi, J., Israelsson-Nordstrom, M., Azoulay-Shemer, T., Rappel, W. J., Iba, K. & Schroeder, J. I. (2016). CO<sub>2</sub> Sensing and CO<sub>2</sub> Regulation of Stomatal Conductance: Advances and Open Questions. *Trends in Plant Science* 21(1): 16-30.
- 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.
- Farber, C., Wang, R., Chemelewski, R., Mullet, J. & Kurouski, D. (2019). Nanoscale Structural Organization of Plant Epicuticular Wax Probed by Atomic Force Microscope Infrared Spectroscopy. *Analytical Chemistry* 91(3): 2472-2479.
- Feng, J. X., Liu, D., Pan, Y., Gong, W., Ma, L. G., Luo, J. C., Deng, X. W. & Zhu, Y. X. (2005). An annotation update via cDNA sequence analysis and comprehensive profiling of developmental, hormonal or environmental responsiveness of the Arabidopsis AP2/EREBP transcription factor gene family. *Plant Molecular Biology* 59(6): 853-868.
- Fernandez, V., Bahamonde, H. A., Peguero-Pina, J. J., Gil-Pelegrin, E., Sancho-Knapik, D., Gil, L., Goldbach, H. E. & Eichert, T. (2017). Physico-chemical properties of plant cuticles and their functional and ecological significance. *Journal of Experimental Botany* 68(19): 5293-5306.
- Fiebig, A., Mayfield, J. A., Miley, N. L., Chau, S., Fischer, R. L. & Preuss, D. (2000). Alterations in CER6, a gene identical to CUT1, differentially affect long-chain lipid content on the surface of pollen and stems. *Plant Cell* 12(10): 2001-2008.
- Fich, E. A., Segerson, N. A. & Rose, J. K. C. (2016). The Plant Polyester Cutin: Biosynthesis, Structure, and Biological Roles. *Annual Review of Plant Biology, Vol 67* 67: 207-233.
- Franks, P. J., Doheny-Adams, T. W., Britton-Harper, Z. J. & Gray, J. E. (2015). Increasing water-use efficiency directly through genetic manipulation of stomatal density. *New Phytologist* 207(1): 188-195.
- Gao, Y., Xia, J. B., Chen, Y. P., Zhao, Y. Y., Kong, Q. X. & Lang, Y. (2017). Effects of extreme soil water stress on photosynthetic efficiency and water consumption characteristics of *Tamarix chinensis* in China's Yellow River Delta. *Journal of Forestry Research* 28(3): 491-501.
- Gray, J. E., Holroyd, G. H., van der Lee, F. M., Bahrami, A. R., Sijmons, P. C., Woodward, F. I., Schuch, W. & Heterington, A. M. (2000). The HIC signalling pathway links CO<sub>2</sub> perception to stomatal development. *Nature* 408(6813): 713-716.
- Greer, S., Wen, M., Bird, D., Wu, X. M., 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.
- Gutterson, N. & Reuber, T. L. (2004). Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* 7(4): 465-471.
- Han, G. S., Gable, K., Kohlwein, S. D., Beaudoin, F., Napier, J. A. & Dunn, T. M. (2002). The *Saccharomyces cerevisiae* YBR159w gene encodes the 3-ketoreductase of the microsomal fatty acid elongase. *Journal of Biological Chemistry* 277(38): 35440-35449.
- Han, S. K., Qi, X. Y., Sugihara, K., Dang, J. H., Endo, T. A., Miller, K. L., Kim, E. D., Miura, T. & Torii, K. U. (2018). MUTE Directly Orchestrates Cell-State Switch and the Single Symmetric Division to Create Stomata. *Developmental Cell* 45(3): 303-+.
- Hara, K., Kajita, R., Torii, K. U., Bergmann, D. C. & Kakimoto, T. (2007). The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes & Development* 21(14): 1720-1725.
- Haslam, T. M., Manas-Fernandez, A., Zhao, L. F. & Kunst, L. (2012). Arabidopsis ECERIFERUM2 Is a Component of the Fatty Acid Elongation Machinery Required for Fatty Acid Extension to Exceptional Lengths. *Plant Physiology* 160(3): 1164-1174.
- Hegebarth, D., Buschhaus, C., Joubes, J., Thoraval, D., Bird, D. & Jetter, R. (2017). Arabidopsis ketoacyl-CoA synthase 16 (KCS16) forms C-36/C-38 acyl precursors for leaf trichome and pavement surface wax. *Plant Cell and Environment* 40(9): 1761-1776.
- Hen-Avivi, S., Lashbrooke, J., Costa, F. & Aharoni, A. (2014). Scratching the surface: genetic regulation of cuticle assembly in fleshy fruit. *Journal of Experimental Botany* 65(16): 4653-4664.

- Heredia-Guerrero, J. A., Benitez, J. J., Dominguez, E., Bayer, I. S., Cingolani, R., Athanassiou, A. & Heredia, A. (2014). Infrared and Raman spectroscopic features of plant cuticles: a review. *Frontiers in Plant Science* 5.
- Heredia-Guerrero, J. A., Benitez, J. J. & Heredia, A. (2008). Self-assembled polyhydroxy fatty acids vesicles: a mechanism for plant cutin synthesis. *Bioessays* 30(3): 273-277.
- Heredia, A. (2003). Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1620(1-3): 1-7.
- Hoagland, D. R. & Arnon, D. I. (1950). *The water-culture method for growing plants without soil*. Berkely,: The College of Agriculture.
- Hrmova, M. & Hussain, S. S. (2021). Plant Transcription Factors Involved in Drought and Associated Stresses. *International Journal of Molecular Sciences* 22(11).
- Hunt, L. & Gray, J. E. (2009). The Signaling Peptide EPF2 Controls Asymmetric Cell Divisions during Stomatal Development. *Current Biology* 19(10): 864-869.
- Chater, C. C. C., Caine, R. S., Fleming, A. J. & Gray, J. E. (2017). Origins and Evolution of Stomatal Development. *Plant Physiology* 174(2): 624-638.
- Cheesbrough, T. M. & Kolattukudy, P. E. (1984). Alkane Biosynthesis by Decarbonylation of Aldehydes Catalyzed by a Particulate Preparation from Pisum-Sativum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 81(21): 6613-6617.
- Chen, G. X., Komatsuda, T., Ma, J. F., Li, C., Yamaji, N. & Nevo, E. (2011). A functional cutin matrix is required for plant protection against water loss. *Plant Signaling & Behavior* 6(9): 1297-1299.
- Chen, X. B., Goodwin, S. M., Boroff, V. L., Liu, X. L. & Jenks, M. A. (2003). Cloning and characterization of the WAX2 gene of Arabidopsis involved in cuticle membrane and wax production. *Plant Cell* 15(5): 1170-1185.
- Chen, Z. J., Wang, J. L., Tian, L., Lee, H. S., Wang, J. Y. J., Chen, M., Lee, J. S. J., Josefsson, C., Madlung, A., Watson, B., Lippman, Z., Vaughn, M., Pires, J. C., Colot, V., Doerge, R. W., Martienssen, R. A., Comai, L. & Osborn, T. C. (2004). The development of an Arabidopsis model system for genome-wide analysis of polyploidy effects. *Biological Journal of the Linnean Society* 82(4): 689-700.
- Cheng, C., Y., Krishnakumar, V., Chan, A., P., Thibaud-Nissen, F., Schobel, S., Town, C., D. (2016). Araport11: a complete reannotation of the Arabidopsis thaliana reference genome. *The plant journal* 89(4): 789-804.
- Ingram, G. & Nawrath, C. (2017). The roles of the cuticle in plant development: organ adhesions and beyond. *Journal of Experimental Botany* 68(19): 5307-5321.
- Jager, K., Misko, A., Fabian, A., Deak, C., Kiss-Baba, E., Polgari, D., Barnabas, B. & Papp, I. (2015). Expression of a WIN/SHN-type regulator from wheat triggers disorganized proliferation in the Arabidopsis leaf cuticle. *Biologia Plantarum* 59(1): 29-36.
- Jakobson, L., Lindgren, L. O., Verdier, G., Laanemets, K., Brosche, M., Beisson, F. & Kollist, H. (2016). BODYGUARD is required for the biosynthesis of cutin in Arabidopsis. *New Phytologist* 211(2): 614-626.
- Jansen, M. A. K., Gaba, V. & Greenberg, B. M. (1998). Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation (vol 3, pg 131, 1998). *Trends in Plant Science* 3(6): 243-243.
- Jarvinen, R., Kaimainen, M. & Kallio, H. (2010). Cutin composition of selected northern berries and seeds. *Food Chemistry* 122(1): 137-144.
- Jessen, D., Roth, C., Wiermer, M. & Fulda, M. (2015). Two Activities of Long-Chain Acyl-Coenzyme A Synthetase Are Involved in Lipid Trafficking between the Endoplasmic Reticulum and the Plastid in Arabidopsis. *Plant Physiology* 167(2): 351-U575.
- Jetter, R. & Schaffer, S. (2001). Chemical composition of the Prunus laurocerasus leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. *Plant Physiology* 126(4): 1725-1737.
- Joubes, J. & Domergue, F. (2018). Biosynthesis of the Plant Cuticle. In: Wilkes, H. (eds) *Hydrocarbons, Oils and Lipids: Diversity, Origin, Chemistry and Fate. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*.



- Joubes, J., Raffaele, S., Bourdenx, B., Garcia, C., Laroche-Traineau, J., Moreau, P., Domergue, F. & Lessire, R. (2008). The VLCFA elongase gene family in *Arabidopsis thaliana*: phylogenetic analysis, 3D modelling and expression profiling. *Plant Molecular Biology* 67(5): 547-566.
- Kanaoka, M. M., Pillitteri, L. J., Fujii, H., Yoshida, Y., Bogenschutz, N. L., Takabayashi, J., Zhu, J. K. & Torii, K. U. (2008). SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to *Arabidopsis* stomatal differentiation. *Plant Cell* 20(7): 1775-1785.
- Kannangara, R., Branigan, C., Liu, Y., Penfield, T., Rao, V., Mouille, G., Hofte, H., Pauly, M., Riechmann, J. L. & Broun, P. (2007). The transcription factor WIN1/SHN1 regulates cutin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19(4): 1278-1294.
- Kaul, S., Koo, H. L., Jenkins, J., Rizzo, M., Rooney, T., Tallon, L. J., Feldblyum, T., Nierman, W., Benito, M. I., Lin, X. Y., Town, C. D., Venter, J. C., Fraser, C. M., Tabata, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Kotani, H., Sasamoto, S., Ecker, J. R., Theologis, A., Federspiel, N. A., Palm, C. J., Osborne, B. I., Shinn, P., Conway, A. B., Vysotskaia, V. S., Dewar, K., Conn, L., Lenz, C. A., Kim, C. J., Hansen, N. F., Liu, S. X., Buehler, E., Altafi, H., Sakano, H., Dunn, P., Lam, B., Pham, P. K., Chao, Q., Nguyen, M., Yu, G. X., Chen, H. M., Southwick, A., Lee, J. M., Miranda, M., Toriumi, M. J., Davis, R. W., Wambutt, R., Murphy, G., Dusterhoft, A., Stiekema, W., Pohl, T., Entian, K. D., Terry, N., Volckaert, G., Salanoubat, M., Choise, N., Rieger, M., Ansoerge, W., Unseld, M., Fartmann, B., Valle, G., Artiguenave, F., Weissenbach, J., Quetier, F., Wilson, R. K., de la Bastide, M., Sekhon, M., Huang, E., Spiegel, L., Gnoj, L., Pepin, K., Murray, J., Johnson, D., Habermann, K., Dedhia, N., Parnell, L., Preston, R., Hillier, L., Chen, E., Marra, M., Martienssen, R., McCombie, W. R., Mayer, K., White, O., Bevan, M., Lemcke, K., Creasy, T. H., Bielke, C., Haas, B., Haase, D., Maiti, R., Rudd, S., Peterson, J., Schoof, H., Frishman, D., Morgenstern, B., Zaccaria, P., Ermolaeva, M., Perte, M., Quackenbush, J., Volfovsky, N., Wu, D. Y., Lowe, T. M., Salzberg, S. L., Mewes, H. W., Rounsley, S., Bush, D., Subramaniam, S., Levin, I., Norris, S., Schmidt, R., Acarkan, A., Bancroft, I., Quetier, F., Brennicke, A., Eisen, J. A., Bureau, T., Legault, B. A., Le, Q. H., Agrawal, N., Yu, Z., Martienssen, R., Copenhaver, G. P., Luo, S., Pikaard, C. S., Preuss, D., Paulsen, I. T., Sussman, M., Britt, A. B., Selinger, D. A., Pandey, R., Mount, D. W., Chandler, V. L., Jorgensen, R. A., Pikaard, C., Juergens, G., Meyerowitz, E. M., Theologis, A., Dangl, J., Jones, J. D. G., Chen, M., Chory, J., Somerville, M. C. & In, A. G. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408(6814): 796-815.
- Kerstiens, G., Schreiber, L. & Lenzian, K. J. (2006). Quantification of cuticular permeability in genetically modified plants. *Journal of Experimental Botany* 57(11): 2547-2552.
- Klepikova, A. V., Kasianov, A. S., Gerasimov, E. S., Logacheva, M. D. & Penin, A. A. (2016). A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *Plant Journal* 88(6): 1058-1070.
- Kohlwein, S. D., Eder, S., Oh, C. S., Martin, C. E., Gable, K., Bacikova, D. & Dunn, T. (2001). Tsc13p is required for fatty acid elongation and localizes to a novel structure at the nuclear-vacuolar interface in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 21(1): 109-125.
- Koch, K. & Ensikat, H. J. (2008). The hydrophobic coatings of plant surfaces: Epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular self-assembly. *Micron* 39(7): 759-772.
- Kole, C., Katam, R., Panthee, D., R., , Bhattacharya, A. & Basha, S., M. (2011). *Arabidopsis*. In *Kole, C. : Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*, 1-16: Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kong, L. Y., Liu, Y. N., Zhi, P. F., Wang, X. Y., Xu, B., Gong, Z. Z. & Chang, C. (2020). Origins and Evolution of Cuticle Biosynthetic Machinery in Land Plants. *Plant Physiology* 184(4): 1998-2010.
- Koutková, S. (2020). *Rozhovory přes kutikulu*. České Budějovice: Jihočeská univerzita. Bakalářská práce, 52 pg.
- Kumar, V., Saha, D., Thakare, D. R., Jajoo, A., Jain, P. K., Bhat, S. R. & Srinivasan, R. (2017). A part of the upstream promoter region of SHN2 gene directs trichome specific expression in *Arabidopsis thaliana* and heterologous plants. *Plant Science* 264: 138-148.

- Kunst, L. & Samuels, A. L. (2003). Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research* 42(1): 51-80.
- Kurata, T., Kawabata-Awai, C., Sakuradani, E., Shimizu, S., Okada, K. & Wada, T. (2003). The YORE-YORE gene regulates multiple aspects of epidermal cell differentiation in Arabidopsis. *Plant Journal* 36(1): 55-66.
- Kurdyukov, S., Faust, A., Nawrath, C., Bar, S., Voisin, D., Efremova, N., Franke, R., Schreiber, L., Saedler, H., Metraux, J. P. & Yephremov, A. (2006a). The epidermis-specific extracellular BODYGUARD controls cuticle development and morphogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 18(2): 321-339.
- Kurdyukov, S., Faust, A., Trenkamp, S., Bar, S., Franke, R., Efremova, N., Tietjen, K., Schreiber, L., Saedler, H. & Yephremov, A. (2006b). Genetic and biochemical evidence for involvement of HOTHEAD in the biosynthesis of long-chain alpha-,omega-dicarboxylic fatty acids and formation of extracellular matrix. *Planta* 224(2): 315-329.
- Kwiatkowska, M., Wojtczak, A., Poplonska, K., Polit, J. T., Stepinski, D., Dominguez, E. & Heredia, A. (2014). Cutinsomes and lipotubuloids appear to participate in cuticle formation in *Ornithogalum umbellatum* ovary epidermis: EM-immunogold research. *Protoplasma* 251(5): 1151-1161.
- Lai, L. B., Nadeau, J. A., Lucas, J., Lee, E. K., Nakagawa, T., Zhao, L. M., Geisler, M. & Sack, F. D. (2005). The Arabidopsis R2R3 MYB proteins FOUR LIPS and MYB88 restrict divisions late in the stomatal cell lineage. *Plant Cell* 17(10): 2754-2767.
- Lampard, G. R., MacAlister, C. A. & Bergmann, D. C. (2008). Arabidopsis Stomatal Initiation Is Controlled by MAPK-Mediated Regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science* 322(5904): 1113-1116.
- Lau, O. S. & Bergmann, D. C. (2012). Stomatal development: a plant's perspective on cell polarity, cell fate transitions and intercellular communication. *Development* 139(20): 3683-3692.
- Lee, J. S., Hnilova, M., Maes, M., Lin, Y. C. L., Putarjunan, A., Han, S. K., Avila, J. & Torii, K. U. (2015). Competitive binding of antagonistic peptides fine-tunes stomatal patterning. *Nature* 522(7557): 435-+.
- Li-Beisson, Y., Pollard, M., Sauveplane, V., Pinot, F., Ohlrogge, J. & Beisson, F. (2009). Nanoridges that characterize the surface morphology of flowers require the synthesis of cutin polyester. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(51): 22008-22013.
- Li, N. N., Xu, C. C., Li-Beisson, Y. H. & Philippar, K. (2016). Fatty Acid and Lipid Transport in Plant Cells. *Trends in Plant Science* 21(2): 145-158.
- Li, X. C., Liu, N. N., Sun, Y., Wang, P., Ge, X. Y., Pei, Y. K., Liu, D., Ma, X. W., Li, F. G. & Hou, Y. X. (2019). The cotton GhWIN2 gene activates the cuticle biosynthesis pathway and influences the salicylic and jasmonic acid biosynthesis pathways. *Bmc Plant Biology* 19(1).
- Li, Y. H., Beisson, F., Koo, A. J. K., Molina, I., Pollard, M. & Ohlrogge, J. (2007). Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(46): 18339-18344.
- Lu, P. Z., Porat, R., Nadeau, J. A. & O'Neill, S. D. (1996). Identification of a meristem L1 layer-specific gene in Arabidopsis that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes. *Plant Cell* 8(12): 2155-2168.
- Lu, S. Y., Song, T., Kosma, D. K., Parsons, E. P., Rowland, O. & Jenks, M. A. (2009). Arabidopsis CER8 encodes LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. *Plant Journal* 59(4): 553-564.
- Lu, T., Yang, Y. D., Yao, B., Liu, S., Zhou, Y. Q. & Zhang, C. (2012). Template-based structure prediction and classification of transcription factors in Arabidopsis thaliana. *Protein Science* 21(6): 828-838.
- Manan, S., Chen, B. B., She, G. B., Wan, X. C. & Zhao, J. (2017). Transport and transcriptional regulation of oil production in plants. *Critical Reviews in Biotechnology* 37(5): 641-655.

- Marques, W. L., Salazar, M. M., Camargo, E. L. O., Lepikson-Neto, J., Tiburcio, R. A., do Nascimento, L. C. & Pereira, G. A. G. (2013). Identification of four Eucalyptus genes potentially involved in cell wall biosynthesis and evolutionarily related to SHINE transcription factors. *Plant Growth Regulation* 69(2): 203-208.
- McFarlane, H. E., Shin, J. J. H., Bird, D. A. & Samuels, A. L. (2010). Arabidopsis ABCG Transporters, Which Are Required for Export of Diverse Cuticular Lipids, Dimerize in Different Combinations. *Plant Cell* 22(9): 3066-3075.
- Meng, X., Chen, X., Mang, H., Liu, C., Yu, X., Gao, X., Torii, K. U., He, P. & Shan, L. (2015). Differential Function of Arabidopsis SERK Family Receptor-like Kinases in Stomatal Patterning. *Current Biology* 25(18): 2361-2372.
- Metwally, S., A.,, Shoaib, R., M., , Hashish, K., I., & El-Tayeb, T., A. (2019). In vitro ultraviolet radiation effects on growth, chemical constituents and molecular aspects of Spathiphyllum plant. *Bulletin of the National Research Centre* 43(94).
- Millar, A. A., Clemens, S., Zachgo, S., Giblin, E. M., Taylor, D. C. & Kunst, L. (1999). CUT1, an arabidopsis gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *Plant Cell* 11(5): 825-838.
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T. & Shinshi, H. (2006). Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiology* 140(2): 411-432.
- Natarajan, P., Akinmoju, T. A., Nimmakayala, P., Lopez-Ortiz, C., Garcia-Lozano, M., Thompson, B. J., Stommel, J. & Reddy, U. K. (2020). Integrated Metabolomic and Transcriptomic Analysis to Characterize Cutin Biosynthesis between Low- and High-Cutin Genotypes of Capsicum chinense Jacq. *International Journal of Molecular Sciences* 21(4).
- Negi, J., Moriwaki, K., Konishi, M., Yokoyama, R., Nakano, T., Kusumi, K., Hashimoto-Sugimoto, M., Schroeder, J. I., Nishitani, K., Yanagisawa, S. & Iba, K. (2013). A Dof Transcription Factor, SCAP1, Is Essential for the Development of Functional Stomata in Arabidopsis. *Current Biology* 23(6): 479-484.
- Niklas, K. J. & Kutschera, U. (2010). The evolution of the land plant life cycle. *New Phytologist* 185(1): 27-41.
- Nip, M., Tegelaar, E. W., Brinkhuis, H., Deleeuw, J. W., Schenck, P. A. & Holloway, P. J. (1986). Analysis of Modern and Fossil Plant Cuticles by Curie-Point Py-Gc and Curie-Point Py-Gc-MS - Recognition of a New, Highly Aliphatic and Resistant Bio-Polymer. *Organic Geochemistry* 10(4-6): 769-778.
- Nunes, T. D. G., Zhang, D. & Raissig, M. T. (2020). Form, development and function of grass stomata. *Plant Journal* 101(4): 780-799.
- Ohashi-Ito, K. & Bergmann, D. C. (2006). Arabidopsis FAMA controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development. *Plant Cell* 18(10): 2493-2505.
- Panikashvili, D., Shi, J. X., Schreiber, L. & Aharoni, A. (2009). The Arabidopsis DCR Encoding a Soluble BAHD Acyltransferase Is Required for Cutin Polyester Formation and Seed Hydration Properties. *Plant Physiology* 151(4): 1773-1789.
- Pascal, S., Bernard, A., Sorel, M., Pervent, M., Vile, D., Haslam, R. P., Napier, J. A., Lessire, R., Domergue, F. & Joubes, J. (2013). The Arabidopsis cer26 mutant, like the cer2 mutant, is specifically affected in the very long chain fatty acid elongation process. *Plant Journal* 73(5): 733-746.
- Paul, S., Gable, K., Beaudoin, F., Cahoon, E., Jaworski, J., Napier, J. A. & Dunn, T. M. (2006). Members of the Arabidopsis FAE1-like3-ketoacyl-CoA synthase gene family substitute for the Elop proteins of Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry* 281(14): 9018-9029.
- Peterson, K. M., Rychel, A. L. & Torii, K. U. (2010). Out of the Mouths of Plants: The Molecular Basis of the Evolution and Diversity of Stomatal Development. *Plant Cell* 22(2): 296-306.
- Petit, J., Bres, C., Mauxion, J. P., Bakan, B. & Rothan, C. (2017). Breeding for cuticle-associated traits in crop species: traits, targets, and strategies. *Journal of Experimental Botany* 68(19): 5369-5387.

- Petruschke, C. (2019). *Cutin, wax and stomatal mutants of Arabidopsis thaliana: chemical and physiological analysis of the leaf barrier properties*. Bonn. Dissertation thesis, 99 pg.
- Philippe, G., Sorensen, I., Jiao, C., Sun, X. P., Fei, Z. J., Domozych, D. S. & Rose, J. K. C. (2020). Cutin and suberin: assembly and origins of specialized lipidic cell wall scaffolds. *Current Opinion in Plant Biology* 55: 11-20.
- Pighin, J. A., Zheng, H. Q., Balakshin, L. J., Goodman, I. P., Western, T. L., Jetter, R., Kunst, L. & Samuels, A. L. (2004). Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science* 306(5696): 702-704.
- Pillitteri, L. J., Sloan, D. B., Bogenschutz, N. L. & Torii, K. U. (2007). Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. *Nature* 445(7127): 501-505.
- Pillitteri, L. J. & Torii, K. U. (2012). Mechanisms of Stomatal Development. *Annual Review of Plant Biology, Vol 63* 63: 591-614.
- Pruitt, R. E., Vielle-Calzada, J. P., Ploense, S. E., Grossniklaus, U. & Lolle, S. J. (2000). FIDDLEHEAD, a gene required to suppress epidermal cell interactions in Arabidopsis, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(3): 1311-1316.
- Pulsifer, I. P., Kluge, S. & Rowland, O. (2012). Arabidopsis LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1), LACS2, and LACS3 facilitate fatty acid uptake in yeast. *Plant Physiology and Biochemistry* 51: 31-39.
- Putarjunan, A., Ruble, J., Srivastava, A., Zhao, C. Z., Rychel, A. L., Hofstetter, A. K., Tang, X. B., Zhu, J. K., Tama, F., Zheng, N. & Torii, K. U. (2019). Bipartite anchoring of SCREAM enforces stomatal initiation by coupling MAP kinases to SPEECHLESS. *Nature Plants* 5(7): 742-754.
- Qi, X. Y., Han, S. K., Dang, J. H., Garrick, J. M., Ito, M., Hofstetter, A. K. & Torii, K. U. (2017). Autocrine regulation of stomatal differentiation potential by EPF1 and ERECTA-LIKE1 ligand-receptor signaling. *Elife* 6.
- Riederer, M. & Schreiber, L. (2001). Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of Experimental Botany* 52(363): 2023-2032.
- Riechmann, J. L. & Meyerowitz, E. M. (1998). The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biological Chemistry* 379(6): 633-646.
- Rowland, O., Lee, R., Franke, R., Schreiber, L. & Kunst, L. (2007). The CER3 wax biosynthetic gene from Arabidopsis thaliana is allelic to WAX2/YRE/FLP1. *Febs Letters* 581(18): 3538-3544.
- Sadler, C., Schroll, B., Zeisler, V., Wassmann, F., Franke, R. & Schreiber, L. (2016). Wax and cutin mutants of Arabidopsis: Quantitative characterization of the cuticular transport barrier in relation to chemical composition. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861(9): 1336-1344.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290(3): 998-1009.
- Samuels, L., Kunst, L. & Jetter, R. (2008). Sealing plant surfaces: Cuticular wax formation by epidermal cells. *Annual Review of Plant Biology* 59: 683-707.
- Serrano, M., Coluccia, F., Torres, M., L'Haridon, F. & Metraux, J. P. (2014). The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science* 5.
- Sharma, P., Prasad, J., Kothari, S. L. & Gour, V. S. (2020). Evaluation of Variation in Cuticular Wax Yield with Season, Solvent, and Species in Calotropis. *National Academy Science Letters-India* 43(1): 99-101.
- Shi, J. X., Adato, A., Alkan, N., He, Y. H., Lashbrooke, J., Matas, A. J., Meir, S., Malitsky, S., Isaacson, T., Prusky, D., Leshkowitz, D., Schreiber, L., Granell, A. R., Widemann, E., Grausem, B., Pinot, F., Rose, J. K. C., Rogachev, I., Rothan, C. & Aharoni, A. (2013). The tomato SISHINE3 transcription factor regulates fruit cuticle formation and epidermal patterning. *New Phytologist* 197(2): 468-480.

- Shi, J. X., Malitsky, S., De Oliveira, S., Branigan, C., Franke, R. B., Schreiber, L. & Aharoni, A. (2011). SHINE Transcription Factors Act Redundantly to Pattern the Archetypal Surface of Arabidopsis Flower Organs. *Plos Genetics* 7(5).
- Schnurr, J., Shockey, J. & Browse, J. (2004). The acyl-CoA synthetase encoded by LACS2 is essential for normal cuticle development in Arabidopsis. *Plant Cell* 16(3): 629-642.
- SIGNAL, S. I. G. n A. L. (2005). T-DNA primer design. Webpage: <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html> (cited 18.3.2023).
- Smirnova, A., Leide, J. & Riederer, M. (2013). Deficiency in a Very-Long-Chain Fatty Acid beta-Ketoacyl-Coenzyme A Synthase of Tomato Impairs Microgametogenesis and Causes Floral Organ Fusion. *Plant Physiology* 161(1): 196-209.
- Songsri, P., Jogloy, S., Junjittakarn, J., Kesmla, T., Vorasoot, N., Holbrook, C., C., & Patanothai, A. (2013). Association of stomatal conductance and root distribution with water use efficiency of peanut under different soil water regimes. *Australian Journal of Crop Science* 7(7): 948-955.
- Stepinski, D., Kwiatkowska, M., Wojtczak, A., Dominguez, E., Heredia, A. & Poplonska, K. (2017). Cutinsomes as building-blocks of Arabidopsis thaliana embryo cuticle. *Physiologia Plantarum* 161(4): 560-567.
- Stepinski, D., Kwiatkowska, M., Wojtczak, A., Polit, J. T., Dominguez, E., Heredia, A. & Poplonska, K. (2020). The Role of Cutinsomes in Plant Cuticle Formation. *Cells* 9(8).
- 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.
- Szczuka, E. & Szczuka, A. (2003). Cuticle fluorescence during embryogenesis of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 45(1): 63-67.
- TAIR. Webpage: <https://www.arabidopsis.org/> (cited 12.3.2023).
- Takada, S., Takada, N. & Yoshida, A. (2013). ATML1 promotes epidermal cell differentiation in Arabidopsis shoots. *Development* 140(9): 1919-1923.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E. & Quail, P. H. (2003). The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* 15(8): 1749-1770.
- Torii, K. U. (2021). Stomatal development in the context of epidermal tissues. *Annals of Botany* 128(2): 137-148.
- Wakeel, A., Wang, L. & Xu, M. (2021). SPEECHLESS and MUTE Mediate Feedback Regulation of Signal Transduction during Stomatal Development. *Plants-Basel* 10(3).
- Wang, H. C., Ngwenyama, N., Liu, Y. D., Walker, J. C. & Zhang, S. Q. (2007). Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in Arabidopsis. *Plant Cell* 19(1): 63-73.
- Wang, S. Q., Zhou, Z. M., Rahiman, R., Lee, G. S. Y., Yeo, Y. K., Yang, X. & Lau, O. S. (2021). Light regulates stomatal development by modulating paracrine signaling from inner tissues. *Nature Communications* 12(1).
- Wang, X. Y., Kong, L. Y., Zhi, P. F. & Chang, C. (2020). Update on Cuticular Wax Biosynthesis and Its Roles in Plant Disease Resistance. *International Journal of Molecular Sciences* 21(15).
- Woodward, F. I. (1987). Stomatal Numbers Are Sensitive to Increases in CO<sub>2</sub> from Preindustrial Levels. *Nature* 327(6123): 617-618.
- Yan, L. F., Cheng, X., Jia, R. L., Qin, Q. Q., Guan, L. P., Du, H. & Hou, S. W. (2014). New phenotypic characteristics of three tmm alleles in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Reports* 33(5): 719-731.
- Yang, J., Ordiz, M. I., Jaworski, J. G. & Beachy, R. N. (2011). Induced accumulation of cuticular waxes enhances drought tolerance in Arabidopsis by changes in development of stomata. *Plant Physiology and Biochemistry* 49(12): 1448-1455.
- Yang, W. L., Simpson, J. P., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Pollard, M. & Ohlrogge, J. B. (2012). A Land-Plant-Specific Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Family in Arabidopsis: Substrate Specificity, sn-2 Preference, and Evolution. *Plant Physiology* 160(2): 638-652.

- Yeats, T. H., Martin, L. B. B., Viart, H. M. F., Isaacson, T., He, Y. H., Zhao, L. X., Matas, A. J., Buda, G. J., Domozych, D. S., Clausen, M. H. & Rose, J. K. C. (2012). The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nature Chemical Biology* 8(7): 609-611.
- Yeats, T. H. & Rose, J. K. C. (2013). The Formation and Function of Plant Cuticles. *Plant Physiology* 163(1): 5-20.
- Zeisler-Diehl, V., Muller, Y. & Schreiber, L. (2018). Epicuticular wax on leaf cuticles does not establish the transpiration barrier, which is essentially formed by intracuticular wax. *Journal of Plant Physiology* 227: 66-74.
- Zhang, C. L., Wang, Y. X., Hu, X., Zhang, Y. L., Wang, G. L., You, C. X., Li, Y. Y. & Hao, Y. J. (2020). An apple AP2/EREBP-type transcription factor, MdWRI4, enhances plant resistance to abiotic stress by increasing cuticular wax load. *Environmental and Experimental Botany* 180.
- Zhao, L. F., Haslam, T. M., Sonntag, A., Molina, I. & Kunst, L. (2019). Functional Overlap of Long-Chain Acyl-CoA Synthetases in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* 60(5): 1041-1054.
- Zhao, L. M. & Sack, F. D. (1999). Ultrastructure of stomatal development in Arabidopsis (Brassicaceae) leaves. *American Journal of Botany* 86(7): 929-939.