

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

# **Rozhovory přes kutikulu**

Bakalářská práce

**Simona Koutková**

Školitelka: Ing. Marie Hronková, Ph.D.

České Budějovice 2020

Koutková., S., 2020: Rozhovory přes kutikulu. [Crosstalk across the cuticle. Bc. Thesis, in Czech.] – 52 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:** Leaves of the plants communicate with their environment on the interface formed by epidermis with stomata and cuticle. Cuticle layer, composed of cutin and waxes, represents a barrier, which protects a plant from excessive water loss, but not only this. The changes of these boundaries are dependent on the environmental conditions, especially light (PPFD) and ambient CO<sub>2</sub> concentration (C<sub>a</sub>). This work tries to answer these questions: How is the availability of CO<sub>2</sub> inside the leaf (C<sub>i</sub>) altered? How is the development of epidermis related to cuticle formation?

**Klíčová slova:** Cuticle, stomata, waxes, light, CO<sub>2</sub>, *Pisum sativum*, *Arabidopsis thaliana*

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, dne 23. 4. 2020

.....

Simona Koutková

## **Poděkování**

Ze srdce ráda bych poděkovala své paní školitelce doktorce Marii Hronkové za příjemnou spolupráci, ochotu kdykoli mi vysvětlit případné nejasnosti a za možnost vyzkoušet si široké spektrum pro mě do té doby neznámých laboratorních metod. Moje poděkování také patří lidem z oddělení fotosyntézy z Ústavu molekulární biologie rostlin AVČR a KEBR, obzvláště pak inženýrce Marii Šimkové a inženýrce Daně Wiesnerové, které mi poskytly cenné zkušenosti a pomohly mi s experimentální částí bakalářské práce. Ani bez magistry Jitky Neuwirthové, profesora Lukase Schreiber, doktorky Martiny Vráblové, magistra Ladislava Marka, doktora Jiřího Kubáska, inženýrky Jany Nebesářové a Jiřího Vaněčka bych si práci neuměla představit. Všem Vám navíc děkuji za vřelé přijetí do kolektivu a přátelskou atmosféru. Nakonec bych velmi ráda poděkovala rodině, která mě během studií podporovala.

Experimenty byly financovány z grantu GAČR 18-14704S a RVO: 60077344. Zařízení použité při aplikaci metody FESEM je součástí platformy *MEYS CR (LM2015062 Czech-BioImaging)* a *ERDF (No.CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_013/0001775)*.

# Obsah

Seznam použitých zkratk	1
1 Úvod	2
2 Kutikula jako bariéra mezi vnitřkem listu a okolním prostředím	3
2.1 Struktura, chemické složení a syntéza kutikuly	3
2.2 Propustnost kutikuly	5
3 Průduchy	6
3.1 Vývoj průduchů	7
3.2 Faktory ovlivňující vývoj průduchů a kutikuly	9
4 Transport CO <sub>2</sub> do listu a jeho vnitřní koncentrace, $\delta^{13}\text{C}$	11
5 Cíle práce	13
6 Materiál a metody	14
6.1 Použitý materiál a způsob pěstování	14
6.2 Průduchová hustota a průduchový index	15
6.3 Postup měření $\delta^{13}\text{C}$ a stanovení vnitřní koncentrace CO <sub>2</sub> v listu	16
6.4 Izolace kutikuly	17
6.5 Stanovení množství vosků v kutikule	17
6.6 Statistické vyhodnocení	18
6.7 Kryo-elektronová mikroskopie (FESEM – Field Emission Scanning Electron Microscopy)	18
7 Výsledky	19
7.1 Vliv světla na vývoj pokožky listu	19
7.1.1 Počet průduchů na listu hrachu ( <i>Pisum sativum</i> ) závisí na světle	19
7.1.2 Stanovení $\delta^{13}\text{C}$ a vnitřní koncentrace CO <sub>2</sub> v listu hrachu ( <i>Pisum sativum</i> )	21
7.2 Množství vosků v kutikule koresponduje s vývojem průduchů v pokožce listu huseníčku rolního ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	22
7.2.1 Počet průduchů na listech rostlin s mutací ve vývoji průduchů	22
7.2.1 Množství vosků se mění vlivem mutace ve vývoji průduchů	23
7.3 Povrch listu, struktura a tloušťka kutikuly pod elektronovým mikroskopem	24
7.4 Vliv vnějšího a vnitřního CO <sub>2</sub> na vývoj pokožky listu	25
7.4.1 Počet průduchů na listu huseníčku rolního ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) při změně koncentrace CO <sub>2</sub>	25
7.4.2 Měření $\delta^{13}\text{C}$ a vnitřní koncentrace CO <sub>2</sub> v listu huseníčku rolního ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	29
8 Diskuze	32
9 Závěr	37

10	Seznam citované literatury.....	38
11	Přílohy.....	47

## Seznam použitých zkratek

Zkratka	Význam	Jednotka
C <sub>a</sub>	Koncentrace CO <sub>2</sub> v atmosféře (atmospheric concentration)	μmol* <sup>-1</sup>
C <sub>i</sub>	Koncentrace CO <sub>2</sub> v listu (internal concentration)	μmol* <sup>-1</sup>
FESEM	Technika skenovací elektronové mikroskopie (Field Emission Scanning Electron Microscopy)	
GCs	Svěrací buňky (Guard Cells)	
GMC	Mateřská buňka průduchů (Guard Mother Cell)	
M	Meristemoid	
MMC	Mateřská buňka meristemoidu (Meristemoid Mother Cell)	
PPFD	Hustota toku fotosyntetických fotonů (Photosynthetic Photon Flux Density)	μmol*m <sup>-2</sup> *s <sup>-1</sup>
PvC	Dlaždicová buňka (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)	
SPR	Povrchová plasmonová rezonance (Surface Plasmon Resonance)	
TF	Transkripční faktor	
VPDB	Vienna Pee Dee Belemnite	
wt	Rostlina bez mutace (wild type, divoká forma)	
WUE	Efektivita využití vody (Water Use Efficiency), poměr asimilace CO <sub>2</sub> /transpirace	
δ <sup>13</sup> C	Izotopový poměr <sup>13</sup> C/ <sup>12</sup> C vzorku vzhledem ke standardu VPDB	‰

# 1 Úvod

Před více než 400 miliony let se objevily první rostliny na souši. Odlišné okolní podmínky, oproti těm ve vodě, je donutily se adaptovat. Vyvinul se u nich nejen kořen a systém vodivých pletiv, které přivádí vodu a živiny k fotosyntetickému pletivu, mezofylu v listech, ale také drobné, pouhým okem neviditelné pohyblivé póry – průduchy (zvané také stomata) v pokožce listu (epidermis) a převážně z přírodního polymeru kutinu a vosků složená kutikula, která pokrývá všechny okolnímu vzduchu vystavené povrchy rostlin. Tyto dva „vynálezy“ a jejich vzájemná interakce jsou předmětem zkoumání této bakalářské práce.

Kutikula je vnější vrstva nacházející se na nezdřevnatělých částech vyšších rostlin. Je téměř nepropustná pro polární molekuly (vodu –  $H_2O$ ) a plyny (oxid uhličitý –  $CO_2$ , kyslík –  $O_2$ ). Proto primárním místem, kudy tyto látky unikají/vstupují do listu, jsou průduchy, které se s jistou pravidelností tvoří v pokožce mezi ostatními pokožkovými buňkami (Pavement Cells, PvCs). Rostlina si jejich otevíráním a zavíráním reguluje transpiraci, respiraci a fotosyntézu, aby si zajistila optimální podmínky.

Vzájemná komunikace mezi pokožkovými buňkami a přilehlou kutikulou není dosud pořádně prozkoumána. První zmínky pochází z přelomu 19. a 20. století. V následujícím přehledu literatury jsem se snažila nastínit dosud zjištěné informace o vzájemné regulaci vývoje průduchů a kutikuly a také faktory ovlivňující jejich vývoj.

## 2 Kutikula jako bariéra mezi vnitřkem listu a okolním prostředím

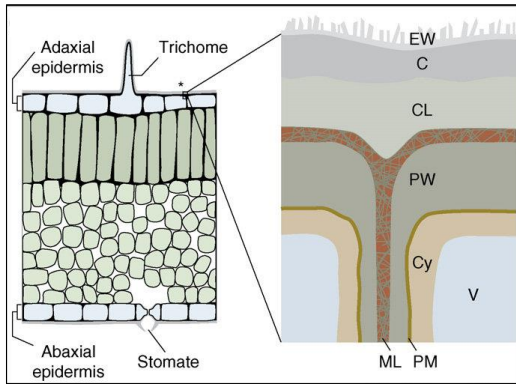
Rostlinná kutikula je tenká vrstva (od setin po desítky  $\mu\text{m}$ ) pokrývající pokožku na listech, stoncích či na květech a plodech (Riederer and Schreiber, 2001), např. u modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) je silná 0,03  $\mu\text{m}$  (Schnurr et al., 2004). Byla také nalezena na povrchu trichomů u dubu cesmínového (*Quercus ilex*), kde zvyšovala hydrofobicitu listu (Fernandez et al., 2014). Také může zasahovat až do podprůduchové dutiny (Pesacreta and Hasenstein, 1999).

Mez přední funkce kutikuly patří její schopnost vytvářet bariéru proti vyschnutí (Riederer and Schreiber, 2001). Dále její povrch omezuje přilnavost prachových částic (Barthlott and Neinhuis, 1997) a kapek deště (Neinhuis and Barthlott, 1997), chrání rostlinu před napadením různými patogeny (Serrano et al., 2014) či hmyzem (Eigenbrode and Jetter, 2002) a ochraňuje ji před nadměrným UV zářením (Krauss et al., 1997).

### 2.1 Struktura, chemické složení a syntéza kutikuly

Kutikula není od počátku vrstevnatá, mění se s vývojem a růstem listu. Mladé listy mají tzv. prokutikulu složenou převážně z amorfních (beztvarých) vosků, později se objevují i zpevňující lamely přidáním ostatních složek kutikuly (Jeffree, 1996). U zralých listů se struktura kutikuly dělí na kutikulární vrstvu (cuticle layer), která je bohatá na kutin a polysacharidy a na vlastní kutikulu (cuticle proper) s hojným počtem vosků (Yeats and Rose, 2013). Vosky mohou být zabudované v kutinovém polymeru (zvané intrakutikulární vosky) anebo tvoří na povrchu voskový film (epikutikulární vosky) zodpovědný za lesklý vzhled (Yeats and Rose, 2013; Zeisler-Diehl et al., 2018). Nad epikutikulárním voskovým filmem mohou být navíc epikutikulární voskové krystaly (**Obr. č. 1**), které dávají povrchu matný vzhled (Yeats and Rose, 2013). Vlastnost voskového filmu je dobře vidět na jablkách, kdy se při jejich leštění mechanicky odstraňují vnější krystaly a tak se pak plody krásně lesknou (Yang et al., 2017).





**Obr. č. 1:** Schématický řez listem s trichomem (trichome) a průduchem (stomate). Pokožka (epidermis) je na horní (adaxial) a dolní (abaxial) straně listu kryta kutikulou. Na detailu: epikutikulární vosky (EW), vlastní kutikula (C), kutikulární vrstva (CL), střední lamela (ML), primární stěna (PW), plazmatická membrána (PM), cytoplazma (CY), vakuola (V) (Pollard et al., 2008).

Epikutikulární vosky mohou nabývat rozmanitých tvarů – destičky, trubičky, rozety, vlákna či hranoly (Barthlott et al., 1998). Poměr mezi intra- a epikutikulárními vosky je druhově specifický – od 1:9 u hrachu setého (*Pisum sativum*) (Gniwotta et al., 2005) až po 4:1 u ptačího zobu (*Ligustrum vulgare*) (Buschhaus et al., 2007).

Z chemického hlediska obsahuje kutikula, jak již bylo zmíněno, kutin (Kolattukudy, 1970), vosky (Wen et al., 2006), polysacharidy (Philippe et al., 2020) a u některých druhů také kutan (Boom et al., 2005). Kutin je polyester složený z C<sub>16</sub> (kyselina palmitová) a C<sub>18</sub> (kyselina stearová) hydroxylovaných mastných kyselin (Kolattukudy, 1970) a alkoholů (např. glycerolu) (Graca et al., 2002). Vosky se skládají z dlouhých řetězců mastných kyselin (C<sub>20</sub>-C<sub>34</sub>) (Pulsifer et al., 2012), uhlovodíků, esterů, primárních alkoholů, mastných kyselin, aldehydů, v menší míře z ketonů a sekundárních alkoholů, triterpenoidů a flovonoidů (Barthlott et al., 1998). Složení epikutikulárních vosků je rozdílné i na stranách listů. Gniwotta et al. (2005) zjistili po extrakci vosků v chloroformu, že vrchní strana listu třech ekotypů hrachu setého je tvořená ze 71 % primárními alkoholy a spodní strana ze 73 % alkany. Celkové množství vosků se pohybovalo v rozmezí od  $14,7 \pm 0,9 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  do  $24,3 \pm 2,9 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Kutan je acyklický biopolymer, který byl primárně nalezen u agáve americké (*Agave americana*). Vědci později zjistili, že se tento polymer vyskytuje především u rostlin s CAM typem fotosyntézy – s adaptací na sucho ale také u C<sub>3</sub> rostlin – rostliny vyskytující se v našich podmínkách (Boom et al., 2005). Z buněčné stěny se do spodní vrstvy kutikuly prolínají polysacharidy (pektin, hemicelulóza,

celulóza) (Lopez-Casado et al., 2007), které se zabudovávají do kutinu a tvoří až 30 % kutikulární vrstvy. Na rozdíl od polysacharidů v buněčné stěně jsou metylované nebo acetylované (Philippe et al., 2020). Celulóza je ve větší míře krystalizovaná a přidává kutikule zpevňující vlastnosti (Agarwal et al., 2010; Philippe et al., 2020).

Prekurzory kutikulárního vosku a kutinu (mastné kyseliny) se tvoří v plastidech pokožkových buněk, které přes endoplazmatické retikulum, kde dochází k prodloužení uhlíkatých řetězců a po modifikaci v cytoplazmě, opouštějí buňku směrem k jejímu vnějšímu povrchu (Alkio et al., 2012). Známymi přenašeči přes plazmatickou membránu jsou ABC-transportéry závislé na ATP (adenosintrifosfát). Prvním popsáním typem přenašeče lipidové molekuly byl AtABCG12 (Pighin et al., 2004), dále byly identifikovány např. AtABCG13 nebo AtABCG32 přenašeče prekurzorů kutikuly v okvětních lístcích (Sanchez-Fernandez et al., 2001; Bessire et al., 2011). Nguyen et al. (2018) našli u rýže transportér OsABCG9, který je z 80 % podobný AtABCG11 nalezenému u modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Bez jeho přítomnosti se obsah vosků v kutikule snížil o 53 %. S jiným typem tohoto přenašeče se nevytvořily voskové krystaly. Dalším známým transportérem je lipidový transportér (LTP, lipid transfer protein) AtLTPI - 4, který přemísťuje mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (Deeken et al., 2016).

## 2.2 Propustnost kutikuly

Bylo zjištěno, že se zvyšující se teplotou propustnost kutikuly pro vodu a organické sloučeniny stoupá – změnou teploty z 15°C na 35°C byla propustnost 2x vyšší. Nejnížší propustnost kutikuly mají epifytní rostliny z tropů, větší xeromorfní rostliny ze Středomoří a největší rostliny z mírného pásu (Baur and Schonherr, 1995; Riederer and Schreiber, 2001), např. propustnost kutikuly jedle bělokoré (*Abies alba*) je  $140 \cdot 10^6 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (Lendzian et al., 1986). Také se zvyšující se relativní vlhkostí propustnost stoupá (Fernandez and Eichert, 2009). Schreiber et al. (2001) potvrdili tuto skutečnost gravimetrickou metodou na slivoni (*Prunus*). Becker et al. (1986) zkoumali elektrolytickou metodou propustnost vody v závislosti na tloušťce kutikuly, ale přímou úměru nepotvrdili. Schreiber a Riederer (1996; 2001) dospěli ke stejnému závěru a doplnili, že na propustnost nemá vliv množství vosků v kutikule ani obsah kutinu (Vogg et al., 2004). Propustnost kutikuly pro vodu je dána spíše chemickým složením vosků. Grncarevic a Radler (1967) uvedli, že hydrofóbní složkou vosků jsou uhlovodíky, alkoholy a aldehydy. Zejména dlouhé acyklické řetězce tvoří účinnou bariéru (Vogg et al., 2004). Cheng et al. (2019) srovnávali složení vosků korunních lístků a listů růží

a dospěli ke stejnému zjištění. Listy, které měly významně více delších acyklických uhlovodíků ( $C_{29}$  a  $C_{33}$  X v korunních lístcích  $C_{26}$  a  $C_{29}$ ), měly menší propustnost. Celkové množství vosků bylo od  $4,9 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  do  $13,2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  pro korunní lístky a od  $5,8 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  do  $6,7 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  pro listy. Studie Zeisler-Diehl et al. (2016; 2018) také potvrdila předchozí tvrzení – hlavní transpirační bariéru tvoří intrakutikulární vosky bohaté na dlouhé řetězce alifatických molekul a na triterpenoidy.

U rostlin preferujících vodní prostředí se výměna plynů zajišťuje především přes kutikulu, protože se u nich vyvíjí méně průduchů anebo zcela chybí či nefungují (Aulio, 1986; Mommer and Visser, 2005). Kutikulární vrstva je v tomto prostředí tenčí (Frost-Christensen et al., 2003). Boyer (2015) zjistil, že kutikula je pro oxid uhličitý daleko méně propustná než pro vodu. Přesto zajišťuje pro vodní rostliny dostatečnou difúzi oxidu uhličitého, substrátu limitujícího fotosyntézu (Sand-Jensen and Frost-Christensen, 1998). Její tloušťka například u mokřanky vzpřímené (*Hygrophila corymbosa*) je na listech rostoucích na vzduchu  $52 \pm 2$  nm ale ve vodě je o 22 nm menší. Vědci také změřili rezistenci kutikulární membrány vůči difúzi kyslíku na kyslíkové elektrodě a zjistili, že pro listy na vzduchu je větší než pro listy ponořené (Frost-Christensen et al., 2003).

### 3 Průduchy

Průduchy jsou malé regulovatelné otvory v pokožce rostlin. Listy mohou mít průduchy jen na dolní (abaxiální) straně (hypostomatické listy) – např. stromy (Lawson, 2009), či na obou stranách listu (amfistomatické listy), kde je počet průduchů na dolní straně listu – např. blahovičník (*Eucalyptus*) (Richardson et al., 2017) nebo jen na horní (adaxiální) straně listu (epistomatické listy) – např. leknín (*Nymphaea sp.*) (Lawson, 2009). Průduchová štěrбина, tvořená dvěma svěracími buňkami (Guard Cells, GCs), umožňuje výměnu plynů (zejména kyslíku a oxidu uhličitého) nutných pro fotosyntézu a dýchání a uvolňuje vodu, která ve formě vodní páry uniká do okolí (Serna, 2011; Nunes et al., 2019). Během dne (na světle) mají rostliny většinou své průduchy otevřené a rychleji transpirují (vypařují vodu) než v noci (Boyer, 2015). Rozlišují se dva základní tvary průduchů podle systémového zařazení rostlin. U dvouděložných (Eudicots) rostlin jsou GCs ledvinitého tvaru (Lee and Bergmann, 2019), u trav činkového tvaru a jsou obklopené pomocnými buňkami (Nunes et al., 2019). Buněčná stěna průduchů musí odolávat turgoru (tlaku), proto musí být pevná ale zároveň ohebná. Je složena z celulózy, pektinů, u trav navíc

z glukanu a u dvouděložných rostlin z xyloglukanů (Shtein et al., 2017). Rozmístění průduchů na listu také není jednotné. Pro trávy a další jednoděložné rostliny je typické uspořádání průduchů v podélných řadách po délce listu, podél vodivých drah, zatímco u dvouděložných jsou průduchy nepravidelně rozmístěné po celé listové čepeli (Rudall et al., 2017).

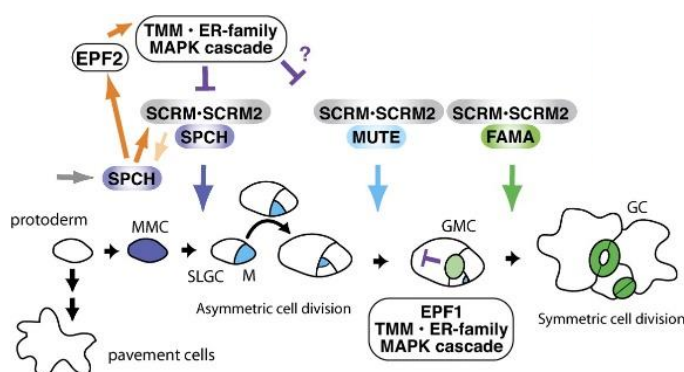
### 3.1 Vývoj průduchů

Podobně jako u zvířat, je tvorba nových buněk řízena prostřednictvím peptidových signálů (Fukuda and Higashiyama, 2011). Ve vývoji průduchů je dodržováno pravidlo “one cell spacing rule“, které znamená, že dva průduchy se nevytvoří těsně vedle sebe, ale je mezi nimi alespoň jedna dlaždicová buňka (Pavement Cell, PvC) (Akita et al., 2013). Tento princip vývoje je občas porušen mutací, např. u mutantu TMM (TOO MANY MOUTHS), který na dolní (abaxiální) straně listů tvoří průduchy v klastrech (Yang and Sack, 1995; Hronková et al., 2015) a na horní straně (adaxiální) omezí jejich počet v porovnání s kontrolními (wt, wild type, divoká forma) rostlinami (Hronková et al., 2015).

Na počátku vývoje dvouděložných rostlin je protodermální buňka pokožky, která se může diferencovat buď v PvC anebo ve specializovanou buňku – průduch (Holroyd et al., 2002). U rostlin jsou známé tři hlavní transkripční faktory (TF) – bHLH (basic helix – loop - helix), které se pozitivně podílejí na vývoji průduchů – SPEECHLESS (SPCH), MUTE a FAMA. SPCH diferencuje protodermální buňku v mateřskou buňku meristemoidu (Meristemoid Mother Cell, MMC) a dále iniciuje první asymetrické dělení MMC – vzniká meristemoid (M) a sesterská buňka meristemoidu (stomatal-lineage ground cell, SLGC) (Peterson et al., 2010; Serna, 2011), typ PvC. V okamžiku, kdy TF MUTE dá signál k expresi genů zahajujících diferenciaci M v mateřskou buňku průduchů (Guard Mother Cell, GMC), ztrácí M charakter kmenové buňky a přestává se neustále dělit (Serna, 2011). Aktivací TF FAMA se GMC symetricky dělí ve dvě svěrací buňky a vzniká průduch (Ohashi-Ito and Bergmann, 2006). FAMA zároveň funguje jako represor genů buněčného cyklu, takže se průduch dále nedělí (Han and Torii, 2016). K celému procesu jsou potřeba další bHLH proteiny – SCREAM (SCRM), které iniciují přepis již uvedených TFs (Kanaoka et al., 2008) (**Obr. č. 2**).

Aktivita některých uvedených TFs je řízena tzv. epidermálními faktory EPIDERMAL PATTERNING FAKTORs (EPFs), které negativně (EPF1 a/nebo EPF2) nebo pozitivně (EPFL9) ovlivňují vývoj průduchů (Hunt et al., 2010; Jewaria et al., 2013). U huseníčku

rolního byla popsána celá rodina těchto EPFs (Doheny-Adams et al., 2012). EPFs se jako ligandy váží na receptor na membráně pokožkových buněk, složený z několika proteinů – ERECTA (ER) a ERECTA-LIKE (ERL) a spouští kinázovou proteinovou kaskádu (MAPK cascade). MAPK fosforylací SPCH negativně ovlivní počet průduchů (Jewaria et al., 2013). Součástí komplexu je i TMM, který kóduje leucin bohatý protein bez kinázové aktivity (Yang and Sack, 1995; Serna and Fenoll, 2002; Jewaria et al., 2013). EPF2 se exprimuje v MMC a stimuluje tvorbu PvC (Hara et al., 2009). EPF1 je exprimován v M a GMC a jeho úkolem je rozmístřování průduchů na listu a také tvorba PvC (Hara et al., 2007). SPCH, EPF2 a TMM tvoří zpětnovazebnou smyčku (Obr. č. 2). SPCH vazbou na promotor EPF2 a TMM podporuje přepis jejich genetické informace a tím omezuje akumulaci SPCH, který by dal vzniknout přílišnému množství průduchů (Han and Torii, 2016).



**Obr. č. 2:** Schéma vývoje průduchů. Transkripční faktory SPCH, MUTE, FAMA se aktivují proteiny také z rodiny bHLH – SCRM a SCRM2 a určují následný vývoj buněk pokožky. SPCH diferencuje protodermální buňku (protoderm) v mateřskou buňku meristemoidu (MMC), která se asymetricky dělí v meristemoid (M) a sesterskou buňku meristemoidu (SLGC), své dělení několikrát opakuje. Protodermální buňka, které se nemění v MMC, se stává buňkou dlaždicovou (pavement cell). Diferenciaci M v mateřskou buňku průduchů (GMC) řídí MUTE a následné symetrické dělení ve dvě svěrací buňky (GCs) transkripční faktor FAMA. Vývoj průduchů potlačují proteiny EPF (EPF1 je exprimován v MMC, EPF2 v GMC), které se váží na TMM a kinázovou rodinu ER a spouští MAPK kinázovou kaskádu. Upraveno podle Peterson et al. (2010).

O vazebné místo na receptoru si s EPF1 a 2 konkuruje STOMAGEN (Jewaria et al., 2013), známý také pod názvem EPFL9 (Hunt et al., 2010). Na rozdíl od negativních EPF faktorů, exprimovaných v pokožce, jak již bylo zmíněno, pozitivně ovlivňuje počet vyvinutých průduchů, exprimuje se v mezofylu listu a také se účastní lokalizace průduchů (Sugano et al., 2010; Jewaria et al., 2013).

Jednoděložné rostliny mají vývoj průduchů o něco jednodušší. Na bázi listů jsou vždy nejstarší buňky, směrem k apexu (špičce listu) se tvoří nové buňky. Na počátku se protodermální buňka asymetricky dělí. Menší buňka (GMC) se znovu asymetricky dělí a vytváří si po okrajích dvě pomocné buňky. Větší buňka zůstane pak mezi dvěma průduchy, aby bylo zachováno pravidlo “one cell spacing rule“. GMC podstoupí symetrické dělení, aby dala vznik průduchu (Hepworth et al., 2018).

## 3.2 Faktory ovlivňující vývoj průduchů a kutikuly

Aby rostliny mohly tvořit biomasu, růst a nakonec se rozmnožit, musí reagovat na podmínky prostředí. Mezi známé vnější faktory, které ovlivňují rostliny, patří dostupnost vody (Casson and Hetherington, 2010), ozáření (jeho intenzita – PPF<sub>D</sub> (hustota toku fotosyntetických fotonů, Photosynthetic Photon Flux Density) a kvalita světla) (Lake et al., 2001), složení vzduchu (především koncentrace oxidu uhličitého – C<sub>a</sub>) (Woodward and Kelly, 1995). Za zmínku stojí také regulace vývoje fytohormony. Dosavadní přehled literatury uvádí jak pozitivní, tak negativní vliv jednotlivých fytohormonů, záleží, na jaké proteiny regulující vývoj průduchů působí. Například hormon ABA (kyselina abscisová) inhibuje SPCH a MUTE, ale aktivuje rodinu ER (Qi and Torii, 2018).

Rostliny se snaží za sucha eliminovat ztrátu vody uzavřením průduchů, ale zároveň tím omezují příjem uhlíku (oxidu uhličitého) pro fotosyntézu (Peters et al., 2018). Z dlouhodobého hlediska vede snaha omezit ztrátu vody ke snižování průduchové hustoty (SD, počet průduchů\*mm<sup>-2</sup> listu) (Hughes et al., 2017), průduchy jsou menších rozměrů (Xu and Zhou, 2008) a listy v kutikule mají až o 9-15 % více vosků (Jenks et al., 2001). Krátkodobý nebo mírný vodní deficit však takovou odezvu v SD nevyvolává, například u trav se v těchto podmínkách SD zvyšuje (Xu and Zhou, 2008).

Při zvýšené PPF<sub>D</sub> je SD vyšší (Gay and Hurd, 1975). Světlo zvyšuje expresi STOMAGENu a současně se tak vytváří více průduchů (Hronková et al., 2015). Vysoké PPF<sub>D</sub> se projeví i na průduchovém indexu (SI, procentuální podíl průduchů k celkovému počtu pokožkových buněk), který se také zvyšuje (Casson et al., 2009) společně s množstvím vosků a silou kutikuly (Reed and Tukey, 1982). Bylo zjištěno, že vývoj průduchů ovlivňuje hlavně červené světlo, které je vnímáno fytochromem B. Ten, indukován světlem, putuje z cytoplazmy do jádra buňky a zde interaguje s TFs PIF (PHYTOCHROME - INTERACTING FACTORS). PIF je skupina proteinů rodiny bHLH.

Například mutace v PIF4 při vyšším PPFD snižuje SI (Casson et al., 2009). Světlo má také vliv na rychlost fotosyntézy – ve stínu se zpomaluje (Terashima et al., 2006). Je prokázáno, že signál o aktuálních podmínkách je předáván ze zralých (vyvinutých) listů do nově se vyvíjejících (Lake et al., 2001). Pokud se starší listy zastíní, mladé listy na vysoké PPFD mají snížené SI (Casson and Hetherington, 2010).

Že je signál o vnějších podmínkách vnímán plně vyvinutými listy a předáván do nově se tvořících, se také zjistilo při reakci na rozdílnou koncentraci oxidu uhličitého ve vzduchu ( $C_a$ ) (Lake et al., 2001). Oxid uhličitý je na molekulární úrovni vnímán CRSP (CO<sub>2</sub> RESPONSE SECRETED PROTEASE), která je sprostředkovatelem mezi plynem a EPF2 (Engineer et al., 2014), který dále ovlivňuje vývoj průduchů (Peterson et al., 2010). Jestliže byly mladé listy vystaveny přirozeně se vyskytující  $C_a$  ( $\pm 400 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), ale starší listy skoro dvojnásobné koncentraci, hodnoty SD a SI na nových listech byly nižší. Naopak, byly-li listy vystaveny obráceným  $C_a$ , hodnoty SD a SI byly u mladých listů vyšší (Lake et al., 2001). Na zvýšené  $C_a$  se obecně u většiny druhů rostlin vyvine méně průduchů (snížená SD). Výjimkou je například pryskyřník ledovcový (*Ranunculus glacialis*) (Woodward and Kelly, 1995). Paoletti et al. (1998) vystavili dub cesmínový (*Quercus ilex*)  $C_a$  od 360-2600  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  a zjistili, že se SD stromu snižovala jen do 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  a dále už se počet průduchů na podmínky prostředí neměnil. Podobný účinek zaznamenali také v množství vosků (intrakutikulární a epikutikulární) – množství sice lineárně stoupalo se zvyšující se  $C_a$ , ale do 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  bylo množství vosků více variabilní. Podle Berryman et al. (1994) se za vyšší  $C_a$  (700  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) u blahovičnicku (*Eucalyptus*) SD také snižuje a průduchová vodivost je za těchto podmínek obecně nižší ( $\pm 300 \text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) než v podmínkách přirozené  $C_a$ , kdy naměřili průduchovou vodivost  $\pm 600 \text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Anatomicky se listům za zvýšené  $C_a$  zvětší buňky mezofylu (Radoglou and Jarvis, 1990), stejně jako za vyšší PPFD (Terashima et al., 2006) a tloušťka listu se tím zvětší. Roste také velikost průduchů, a to nejenom v reakci na zvýšenou  $C_a$ , ale také na PPFD (Lomax et al., 2009).

Gray et al. (2000) zjistili souvislost mezi  $C_a$  a vývojem průduchů a potvrdili tak koordinaci vývoje pokožky s tvorbou kutikuly. Objevili gen *HIC* (HIGH CARBON DIOXIDE), který je exprimován ve svěracích buňkách průduchů a kóduje 3-ketoacyl koenzym A syntázu (KCS13). KCS je enzym, který je součástí syntézy dlouhých řetězců mastných kyselin, které se transportují do kutikuly. Mutace v tomto genu způsobí za zvýšené  $C_a$  navýšení SD až o 41,8 % a SI až o 27,6 %. Dalším genem z rodiny genů *KCS*,

zodpovědným za syntézu vosků je *CER* (ECERIFERUM), který se exprimuje v pokožkových buňkách (Jenks et al., 1995; Millar et al., 1999; Joubes et al., 2008). Mutace v genu *CER6* (někdy nazývaný *CUTI* či *KCS6*) vede k tvorbě menšího množství vosků na povrchu listů a stonků (s menším množstvím alkanů a primárních alkoholů) (Jenks et al., 1995; Fiebig et al., 2000; Sampangi-Ramaiah et al., 2019). Protože *CER6* kóduje enzym (*KCS6*) (Lokesh et al., 2013), zodpovědný za prodloužení složek vosků (mastných kyselin), dochází k redukci dlouhých řetězců (od C<sub>28</sub>) (Sampangi-Ramaiah et al., 2019). Na zvýšenou C<sub>a</sub> reagují rostliny s touto mutací zvýšením SI (o 30,5 %) (Gray et al., 2000). Dalším genem, který spojuje vývoj pokožkových buněk a kutikuly, je *FDH* (FIDDLEHEAD). Též patří do rodiny *KCS* a jeho mutací se iniciuje menší množství trichomů (Yephremov et al., 1999).

## 4 Transport CO<sub>2</sub> do listu a jeho vnitřní koncentrace, δ<sup>13</sup>C

Rostliny během fotosyntézy zabudovávají do své biomasy uhlík z oxidu uhličitého. Oxid uhličitý se do listu dostává přes řadu difúzních odporů – putuje přes tzv. hraniční vrstvu (nachází se těsně nad listem), průduch, do podprůduchové dutiny, dále přes mezibuněčný prostor, buněčnou stěnu mezofylové buňky, její cytoplazmatickou membránu a cytosol, přes dvě membrány chloroplastu až k enzymu RUBISCO (ribulóza 1,5bisfosfát karboxyláza/oxygenáza) do stromatu chloroplastu (Evans and Von Caemmerer, 1996; Terashima et al., 2006; Evans et al., 2009), kde probíhá fotosyntéza. Koncentrace oxidu uhličitého se tedy směrem do vnitřku listu (do stromatu chloroplastu) postupně snižuje (Terashima and Ono, 2002). Uvádí se, že pro oxid uhličitý je hlavní překážkou vrstva mezofylových buněk listu. Rozlišuje se transport skrz plynnou fázi (mezibuněčnými prostory) a kapalnou fázi (od buněčné stěny naplněné vodou do chloroplastu) (Evans et al., 2009). Aby se transport urychlil, putuje oxid uhličitý skrz plazmatickou membránu aquaporiny (membránové kanály) (Terashima and Ono, 2002).

Enzym RUBISCO má také afinitu ke kyslíku. V důsledku toho dochází v buňce k fotorespiraci, tedy k „prodýchání“ produktů fotosyntézy. Reakce probíhají částečně také mimo chloroplast – v peroxizomu a mitochondrii (Terashima et al., 2006; von Caemmerer, 2013). Oxid uhličitý se pak uvolňuje z mitochondrie, stejně jako při dýchání a putuje do cytosolu (Evans et al., 2009).



Ve vzduchu je 98,9 % uhlíku  $^{12}\text{C}$  a 1,1 %  $^{13}\text{C}$  (Farquhar et al., 1989). Během fotosyntézy se k enzymu RUBISCO přednostně váže lehčí izotop uhlíku  $^{12}\text{C}$ . Říká se, že enzym těžší uhlík diskriminuje – závisí na pH a teplotě. Díky tomuto jevu je možné vypočítat izotopovou frakcionaci (izotopový signál,  $\delta^{13}\text{C}$ ), který uvádí poměr  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ke standardu (viz **Rovnice 4**, Materiál a metody). Hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  pro rostliny s C3 typem fotosyntézy se pohybují v rozmezí -30 až -22‰ (Farquhar et al., 1982).

Častěji se ve vědeckých člancích uvádí tzv. velká delta ( $\Delta$ ), tedy diskriminace  $^{13}\text{C}$ , která představuje relativní rozdíl  $^{13}\text{C}$  v rostlině oproti okolnímu vzduchu (Šantrůček et al., 2014a):

$$\Delta = a + (b - a) * \frac{C_i}{C_a} \quad [\text{‰}] \quad \text{Rovnice 1}$$

kde  $a$  je tzv. difúzní koeficient zahrnující limitaci průchodu  $^{13}\text{CO}_2$  plynnou fází skrz hraniční vrstvu a průduchy (4,4 ‰),  $b$  je tzv. karboxylační koeficient, tedy diskriminace při karboxylaci enzymem RUBISCO (27 ‰),  $C_i$  je koncentrace oxidu uhličitého uvnitř listu a  $C_a$  koncentrace ve vnější atmosféře (Farquhar et al., 1982).

Hodnota  $\Delta$  je kladná veličina a u C3 rostlin vychází v rozmezí 17-25. Lze ji také trochu nepřesně vypočítat jako rozdíl obsahu  $\delta^{13}\text{C}$  v okolním vzduchu ( $\delta_a$ ) a uvnitř rostliny ( $\delta_p$ ) (Šantrůček et al., 2014a). Tím se dá **Rovnice 1** vyjádřit jako:

$$\delta_p = \delta_a - a - (b - a) * \frac{C_i}{C_a} \quad [\text{‰}] \quad \text{Rovnice 2}$$

Z **Rovnice 2** pak lze vypočítat  $C_i$  (viz **Rovnice 5**, Materiál a metody) (Farquhar et al., 1982).

## 5 Cíle práce

### 1. Ověřit následující hypotézy:

- 1.1. Změna intenzity záření (PPFD) vede ke změně počtu průduchů na listu (SD).  
Vnitřní koncentrace oxidu uhličitého ( $C_i$ ) v listu se snižuje se zvyšující se PPFD.
- 1.2. Četnost průduchů koresponduje s množstvím vosků v přilehlé kutikule.
- 1.3. Zvýšená koncentrace oxidu uhličitého ( $CO_2$ ) v okolním vzduchu ( $C_a$ ) (provázená zvýšenou  $C_i$ ) snižuje počet průduchů na listu (SD) ve srovnání s listy pěstovanými v běžné atmosférické  $C_a$ , naopak snížená  $C_a$  a  $C_i$  vede ke zvýšení SD.
- 1.4. Mutace v genu *HIC* (*KCS13*) naopak vede ke zvýšení SD při vyšší  $C_a$ .

### 2. Zvládnout následující laboratorní metody:

- 2.1. Světelná mikroskopie, mikroreliefová metoda – zhotovit otisky listů, pořídit fotografie a pomocí programu pro analýzu obrazu ImageJ zjistit průduchovou hustotu (SD) a určit průduchový index (SI).
- 2.2. Zjistit vnitřní koncentraci oxidu uhličitého ( $C_i$ ) pomocí měření poměru izotopů  $^{13}C/^{12}C$  v biomase listů.
- 2.3. Pokusit se izolovat kutikulu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a vyzkoušet si měření propustnosti kutikuly metodou SPR (Povrchová plasmonová rezonance). Pořídit snímky povrchu listu a izolované kutikuly rostlin pomocí skenovací elektronové mikroskopie za nízkých teplot (FESEM).

## 6 Materiál a metody

### 6.1 Použitý materiál a způsob pěstování

V prvním pokusu byl použit hrách setý/cukrový (*Pisum sativum* var. *saccharatum*) a tři úrovně ozáření (PPFD, hustota toku fotosyntetických fotonů, Photosynthetic Photon Flux Density) – zvýšená  $450 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  a snižená  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , jako kontrolní byla použita PPFD  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Pro každou světelnou variantu jsme měly šest květináčů o velikosti  $5\cdot 5\cdot 6$  cm. Hrách byl nejprve vyset do perlitu. Po vyklíčení byl přesazen do univerzálního zahradnického substrátu (Forestina) a pěstován tři týdny v kultivačním boxu Sanyo (UK) při vlhkosti cca 50 %, teplotě  $25^\circ\text{C}$  ve dne a  $18^\circ\text{C}$  v noci. Fotoperioda (délka dne/noci) byla stanovena na 16/8 hodin. Listy byly otisknuty do bezbarvého laku na nehty, spočtena SD (průduchová hustota) a SI (průduchový index) (**Rovnice 3**) a připraveny vzorky pro analýzu izotopového poměru  $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ ) (**Rovnice 4**).

Ve všech dalších pokusech byla použita modelová rostlina – huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), který je často používán pro svůj rychlý růst a malý genom.

Společně s divokou formou (wild type, wt) Col-0 byly v hydroponii (1/4 koncentrace plného Hoaglandova roztoku) pěstovány i mutantní rostliny (*tmm-1* a *epf1,2*; *StRNAi* (Stomagen RNA interference) – tedy tzv. „průduchoví“ mutanti). Rostliny byly pěstovány v kontrolovaných podmínkách v klimaboxu Snijders (Holandsko) jeden měsíc. Byla zvolena PPFD  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , pro huseníček optimální ozáření, teplota přes den/noc  $22^\circ\text{C}/18^\circ\text{C}$ , délka dne/noci 14/10 hodin, relativní vlhkost vzduchu nebyla regulována a činila asi 50 %. Byly připraveny trvalé preparáty (otisky) povrchu listů (mikroreliefovou metodou) a zjištěn počet průduchů v programu ImageJ pro výpočet SD a SI, dále byly odebrány vzorky vosků, které analyzovala Mgr. Jitka Neuwirthová v laboratoři prof. Lukase Schreiberera v Bonnu. Povrch a struktura celých listů na lomu, rovněž také vzorky izolované kutikuly, byly pozorovány pod kryo-elektronovým mikroskopem metodou FESEM.

Pro zjištění vlivu zvýšené koncentrace oxidu uhličitého ( $\text{CO}_2$ ) ve vzduchu ( $C_a$ ) na frekvenci vývoje průduchů a na vnitřní koncentraci oxidu uhličitého v listech ( $C_i$ ) byl opět vybrán modelový huseníček rolní – ekotyp Columbia (Col-0) a také mutanti v genu *HIC* (*hic* – SM linie (semena poskytli Casson S. a Gray J., UK) a SAIL2055E06 (z databáze NASC – homozygotní v genu *HIC* – Hroníček (2019)). Rostliny byly vystaveny jeden měsíc třem různým  $C_a$  ( $200$ ,  $400$  a  $800 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), ve vzduchotěsném růstovém boxu se třemi

oddíly, kde v každém byla příslušná  $C_a$ . Rostliny pěstované při  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  představovaly kontrolní variantu. Ostatní podmínky (viz níže) byly stejné, protože box byl umístěn do fytotronu Percival. Vzduch byl nejdříve zbaven oxidu uhličitého, poté obohacen o oxid uhličitý z tlakové lahve (Messer, ČR, izotopový signál  $-28,4 \text{ ‰}$ ) v požadované koncentraci ( $200, 400, 800 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) a systémem ventilů přiveden do pěstebních boxů. Oxid uhličitý z tlakové lahve byl dodáván do jednotlivých komůrek pěstebního boxu pomocí zařízení vyrobeného svépomocí. Dodávaná  $C_a$  byla pravidelně kontrolována pomocí otevřeného gazometrického systému Li-6400 XT (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA). Teplota byla přes den nastavena na  $20^\circ\text{C}$  a v noci na  $18^\circ\text{C}$ , PPFD byla  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  a relativní vlhkost byla asi 50 %. Podmínky pěstování (teplota, vlhkost) byly kontrolovány pomocí Datalogerů Minikin (EMS Brno, ČR). V každém květináči (rozměry totožné s předchozími pokusy) byly vždy ponechány tři rostliny rozmístěné tak, aby si nekonkurovaly, z nich se pak odebraly vzorky na spočtení SD a SI a také na analýzu izotopového signálu  $\delta^{13}\text{C}$ . K pěstování byl použit univerzální zahradnický substrát Forestina. Pokus se opakoval celkem dvakrát (duben, září). Během prvního pěstování byly použity kromě wt rostlin (Col-0) již uvedené linie *hlc* (SM\_3\_19849) a SAIL205E06 (Hroníček, 2019). Délka dne/noci byla 12/12 hodin. Ve druhém opakování bylo cílem ověřit výsledky prvního pokusu na rostlinách wt – (Col-0), délka světelné periody byla o čtyři hodiny delší, 16/8 hodin (den/noc).

## 6.2 Průduchová hustota a průduchový index

Pomocí zmíněné mikroreliefové metody byly vytvořeny otisky listů (postup viz níže). Dále byla na uvedených plochách listů počítána průduchová hustota (SD) a i hustota ostatních pokožkových buněk (PvCD), jejichž hodnoty byly dosazeny do vzorce pro průduchový index (SI):

$$SI = \frac{SD}{SD+PvCD} * 100 \quad [\%] \quad \text{Rovnice 3}$$

kde SD značí počet průduchů přepočtených na  $1 \text{ mm}^2$  a PvCD počet dlaždicových buněk na  $1 \text{ mm}^2$ . SI byl vyjádřen jako podíl průduchů na celkovém počtu buněk v procentech.

Z každé varianty bylo odebráno ve všech pokusech po jednom měsíci pěstování 5-7 plně vyvinutých listů z různých rostlin. Polovina střední části každého listu byla použita pro vytvoření kopie horní (adaxiální) a dolní (abaxiální) strany listu. Poté byl list otisknut

do bezbarvého laku na nehty (Rimmel London 60 Seconds) a průhlednou lepicí páskou nalepen na podložní sklíčko – byl vytvořen mikrorelief. Otisky byly pozorovány pod optickým mikroskopem (Olympus BX61) s objektivem 50x (ilustrační obrázek viz **příloha obr. P1**). Digitálním fotoaparátem (750D Cannon) byly pořízeny fotografie listových plošek o velikosti 0,130 mm<sup>2</sup> listu – u hrachu bylo z každé varianty pořízeno 42 fotografií, v pokusu s vosky 15-26 fotografií a v prvním pokusu, jež sledoval vliv s oxidu uhličitého na vývoj průduchů 20-25 fotografií a ve druhém pokusu 42 fotografií. Plošky byly analyzovány v programu ImageJ, kde byly stanoveny počty průduchů a PvCs. Získané hodnoty byly přeočteny na mm<sup>2</sup> (SD a PvCD) a pak byl vypočítán průduchový index (SI) podle **Rovnice 3**.

### **6.3 Postup měření $\delta^{13}\text{C}$ a stanovení vnitřní koncentrace $\text{CO}_2$ v listu**

Byla stanovena izotopová frakcionace uhlíku  $^{13}\text{C}$  k uhlíku  $^{12}\text{C}$  v sušině listu ( $\delta^{13}\text{C}$ ), díky diskriminaci izotopu uhlíku  $^{13}\text{C}$  před  $^{12}\text{C}$  během fotosyntézy:

$$\delta^{13}\text{C} = \left( \frac{R_{\text{vzorek}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right) * 1000 \quad [\text{‰}] \quad \text{Rovnice 4}$$

kde R znamená poměr  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ve vzorku rostlinného materiálu a ve standardu. Jako standard byl použit VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite).

Vzorky pro stanovení  $\delta^{13}\text{C}$ , plně vyvinuté listy, byly vždy odebrány ze třech odlišných rostlin v každé studované variantě (různá PPF<sub>D</sub> či C<sub>a</sub>, genotyp) pro jednotlivý směsný vzorek. V uvedených pokusech byly z každé varianty analyzovány celkem tři biologické vzorky. Za teploty 80°C byly listy během 24 hodin vysušeny do konstantní hmotnosti a pak byly rozemlety na jemný prášek – 1 minutu v mikrozkuřkách Eppendorf za pomoci dvou nerezových kuliček na kulovém mlýnku (Retch, MM200, Haan, Německo) při frekvenci 30 kmitů/s. Na analytických vahách Sartorius bylo naváženo 0,083-0,117 mg vzorku do cínové kapsle, která byla poté pečlivě zabalena. Za samotné analýzy izotopového poměru v sušině rostlinné biomasy vděčím Mgr. Ladislavu Markovi. Vzorky byly spáleny při 950°C v proudu kyslíku za vzniku plynného oxidu uhličitého. Jeho izotopové složení bylo analyzováno na izotopovém hmotnostním spektrometru IRMS (Delta plus XL, ThermoFinnigan, Brehmen, DE) připojeném k prvkovému analyzátoru (NC2100, ThermoQuest CE Instruments, Rodano, Itálie).

Z hodnot  $\delta^{13}\text{C}$  je možno spočítat vnitřní koncentraci oxidu uhličitého v listu ( $C_i$ ), jestliže známe  $C_a$  (koncentraci oxidu uhličitého ve vzduchu) a izotopový signál vstupujícího oxidu uhličitého, který rostlina využívala pro tvorbu biomasy.  $C_i$  u huseníčku rolního, vystaveného ve třech boxech odlišným  $C_a$ , a hrachu, na třech rozdílných PPF (intenzitách světla), bylo spočteno podle vzorce, který uvádí **Rovnice 5**:

$$C_i = C_a * \frac{\delta_a - \delta_p - a}{b - a} \quad [\mu\text{mol} * \text{mol}^{-1}] \quad \text{Rovnice 5}$$

kde se za  $C_a$  dosazovaly tři zkoumané koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře (200, 400 nebo 800  $\mu\text{mol} * \text{mol}^{-1}$ ), za  $\delta_a$  změřený izotopový poměr pro vzduch -28,4 ‰ u pokusu s huseníčkem a -11 ‰ u pokusu s hráškem,  $\delta_p$  představovala ke každému vzorku rostlinné biomasy hodnotu  $\delta^{13}\text{C}$  podle výše uvedené **Rovnice 4**. Konstanty  $a$  (difúzní koeficient, 4,4 ‰) a  $b$  (karboxylační koeficient, 27 ‰) zohledňují pomalejší difúzi těžšího izotopu uhlíku  $^{13}\text{C}$  do listu a také jeho menší afinitu k enzymu RUBISCO (ribuloza - 1,5 - bisfosfát karboxyláza oxygenáza) (Farquhar et al., 1982; Šantrůček et al., 2014a).

## 6.4 Izolace kutikuly

Byla použita modifikovaná metoda Schönherra a Riederra (1986). Ve 300 ml vody ( $\text{H}_2\text{O}$ ) bylo rozpuštěno 0,645g kyseliny citronové ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ), bylo přidáno 6 ml 2% celulózy a 6 ml 2% pektinázy (Fruikozyne Combi), pH bylo upraveno na 3,0 a roztok byl konzervován 3 ml 1M azidu sodného (NaN). Roztok byl před použitím naředěn 10x. Terčíky nebo kousky listů, jejichž kutikula byla velmi opatrně na jedné straně porušena pomocí jemného smirkového papíru, byly poškozenou stranou položeny na hladinu izolačního roztoku, takže došlo k izolaci neporušené kutikuly z příslušné strany listu. Roztok se měnil velmi opatrně cca po týdnu, dokud nedošlo k izolaci kutikuly, kdy zbytek pletiva klesl ke dnu. Izolační roztok byl vyměněn za superčistou vodu. Krátce byly kutikuly skladovány v ledničce. Ty, které klesly ke dnu, nešlo použít.

## 6.5 Stanovení množství vosků v kutikule

Pro analýzu vosků z jednotlivých stran listu (adaxiální a abaxiální) byly vosky smyty pomocí chloroformu ( $\text{CHCl}_3$ ) do vialek opakovaným kontaktem s příslušnými stranami listů v trvání souhrnně 10 s, z celkové plochy listů vždy 7,5  $\text{cm}^2$ . Vosky analyzovala Mgr. Jitka

Neuwirthová v laboratoři prof. Lukase Schreiberera v Bonnu. Vosky rozpuštěné v chloroformu doplnila adekvátním množstvím vnitřního standardu tetrakosanu ( $C_{24}H_{50}$ ) (5  $\mu\text{g}$  tetrakosanu v 25  $\mu\text{l}$  chloroformu, Fluka) pro kvantifikaci vosků. Obsah chloroformu byl redukován na konečný objem 200  $\mu\text{l}$  jemným proudem dusíku při zahřívání na 60°C v termobloku. Polární hydroxylové a karboxylové skupiny alkoholů a kyselin byly převedeny na odpovídající trimethylsilyletery a estery derivatizací pomocí N, O- Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu (BSTFA; Macherey-Nagel, Duren, Germany) a Pyridinu (Sigma Aldrich) 45 min při 70 °C. Množství vosků bylo stanoveno z nástřiku 1  $\mu\text{l}$  vzorku do GC-FID (CG-Hewlett Packard 5890 series H, kolona: 30 m DB-1 i.d. 0,32 mm, film 0,2  $\mu\text{m}$ ; J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Množství vosků bylo vyjádřeno v absolutních hodnotách ( $\mu\text{g}$ ) na plochu ( $\text{cm}^2$ ).

## 6.6 Statistické vyhodnocení

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny v programu RStudio jednocestnou analýzou variance (one-way ANOVA). Pokus s vosky byl testován dvoucestnou analýzou variance (two-way ANOVA). Tyto metody byly aplikovány za předpokladu normálního rozložení dat a homogenity variancí a tak byla čísla při použití Bartlettova testu a ANOVY upravena zlogaritmováním. Statistická průkaznost rozdílů hodnot byly stanoveny na 5% hladině významnosti. Při mnohonásobném porovnání byl použit post-hoc Tukeyho HSD test. Grafy byly vytvořeny v programu Microsoft Office Excel.

## 6.7 Kryo-elektronová mikroskopie (FESEM – Field Emission Scanning Electron Microscopy)

FESEM je vysoce účinná rozlišovací technika skenovací elektronové mikroskopie (SEM) spojená s kryo technikou pro přípravu vzorku a umožňující lámání preparátu za nízkých teplot (odpovídající teplotě tekutého dusíku). Výhodou metody je pozorování vzorků téměř v přírodním stavu.

Malé kousky živých listů huseníčku byly speciálním lepidlem Tissue-Tek O.C.T. Compound (EMS) nalepeny na hliníkový terčik. Vzorky izolované kutikuly, plovoucí na hladině vody, byly umístěny na silikonový “wafer“ (plátek). Dále se postupovalo během přípravy preparátů stejně. Vzorek byl rychle zmrazen ponořením do tekutého dusíku a pak ihned umístěn do vakua v zařízení CryoALTO 2500 (Gatan, UK), kde byly

zmražené vzorky sublimovány (1-2 minuty) za nízké teploty (-90°C), což vedlo k odstranění krystalů vody z povrchu preparátu. Nakonec byl vzorek pokoven částicemi slitiny platiny a palladia při 140°C cca 2 minuty. Preparát byl pozorován mikroskopem FESEM JEOL JSM 7401F při napětí v rozmezí 1-4 kV v pracovní vzdálenosti 8 mm při teplotě -135°C.

Snímky lomů a povrchu listů a také izolované kutikuly byly pořízeny v Laboratoři elektronové mikroskopie Biologického centra Akademie věd a Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity.

## 7 Výsledky

### 7.1 Vliv světla na vývoj pokožky listu

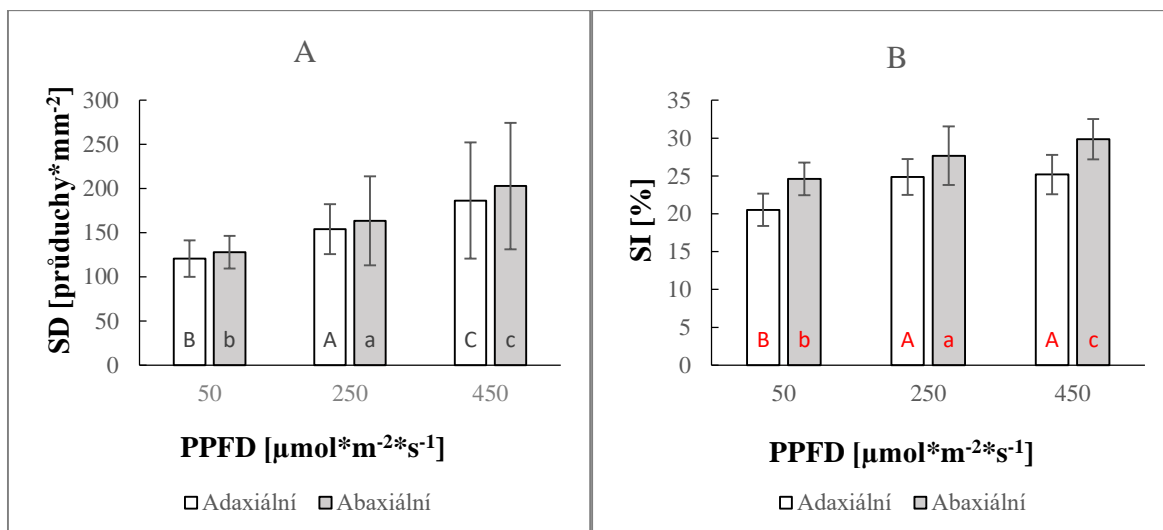
#### 7.1.1 Počet průduchů na listu hrachu (*Pisum sativum*) závisí na světle

Vývoj kutikuly a průduchů je ovlivněn řadou faktorů – světlo je jedním z nich. Čím jsou rostliny huseníčku (*Arabidopsis thaliana* Heynh) vystaveny intenzivnějším světlu, tím více průduchů se na listech tvoří (Hronková et al., 2015). Platí to i pro jiný druh rostlin? Pro ověření této hypotézy byla použita modelová rostlina J. G. Mendela – hrách (*Pisum*). V našem případě šlo o hrách setý/cukrový (*Pisum sativum* var. *saccharatum*).

Vzhled pokusných rostlin se v závislosti na intenzitě světla (PPFD, Photosynthetic Photon Flux Density) lišil – na vysoké PPFD (hodnota níže) byl vývoj rychlejší, rostliny rychleji dozrávaly a stárly, spodní listy zežloutly, viz **příloha Obr. P2**.

V pokusu byl zjišťován vliv třech různých PPFD na hustotu průduchů na mm<sup>2</sup> (SD) a průduchový index (SI) (**viz Rovnice 3**) na obou stranách listu hrachu. Jako kontrolní byla zvolena střední hodnota (250 μmol\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup>). Na základě jednocestné analýzy variance, která hodnotila vliv světla na SD a SI odděleně pro horní (adaxiální) a dolní (abaxiální) stranu listů, bylo zjištěno, že SD stoupala statisticky významně na obou stranách listu se zvyšující se PPFD (**Obr. č. 3, A**), až na jednu výjimku (nižší PPFD na adaxiální straně), byly rozdíly statisticky významné i v případě SI (**Obr. č. 3, B**).



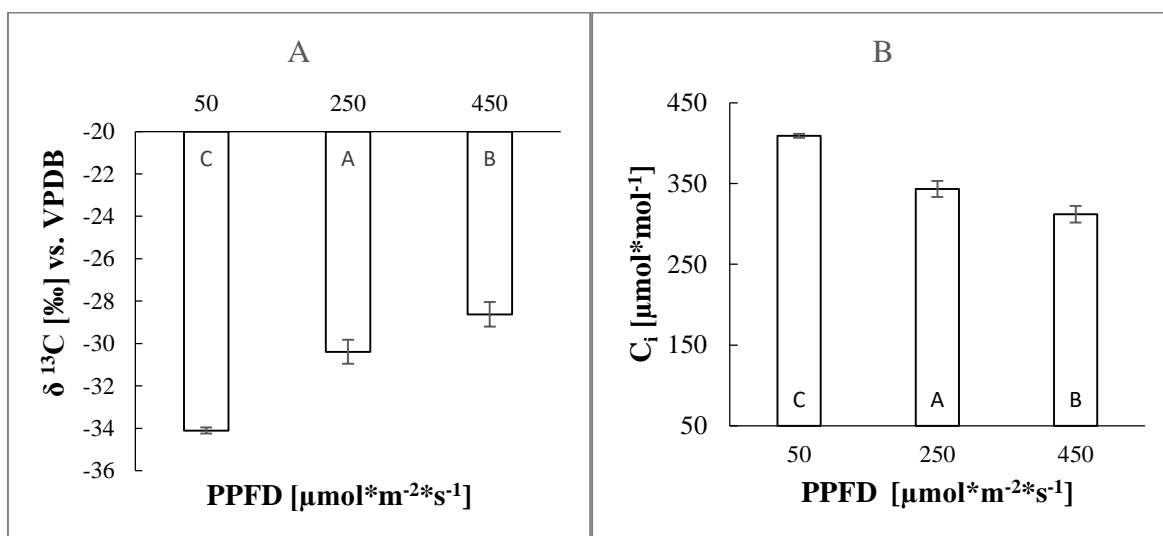


**Obr. č. 3:** Hustota průduchů – SD (A) a průduchový index – SI (B) na horní (adaxiální) straně listu (označeno velkými písmeny) a dolní (abaxiální) straně listu (označeno malými písmeny) hrachu (*Pisum*) v závislosti na intenzitě světla – (PPFD, Photosynthetic Photon Flux Density). Statisticky významné rozdíly od kontroly (250 μmol\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup>, označena písmeny A či a) jsou označeny odlišnými písmeny. Červená barva znamená statisticky významný rozdíl mezi adaxiální a abaxiální stranou listu. Sloupce jsou průměrné hodnoty (n = 42, kde n je počet analyzovaných ploch). Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku od průměru (s. d.), p < 0,05.  $SI = (SD)/(SD+PvCD) \times 100$ .

Pro adaxiální stranu listu byla hodnota testového kritéria pro SD  $F_{(2; 123)} = 25,34$  a pro abaxiální  $F_{(2; 123)} = 21,89$ . Následný Tukeyho post-hoc test pro prokázal rozdíl SD všech studovaných úrovní PPFD od kontrolní PPFD (250 μmol\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup>). Lišily se jak adaxiální strany (p < 0,026), tak abaxiální strany (p < 0,0058) listů, zároveň se lišila SD u listů pěstovaných při nízké a vysoké PPFD (p < 0,0001). Na 5% hladině významnosti nebyl ovšem zjištěn rozdíl SD mezi adaxiální a abaxiální stranou listu (**Obr. č. 3, A**). To ovšem neplatilo u SI. Na všech intenzitách světla byla průkazná odlišnost od kontroly – (p < 0,0003). V případě SI na adaxiální straně, došlo ke změně oproti kontrole pouze na nízké PPFD (p = 0). PPFD měla větší vliv na SI u abaxiálních stran listů – zde SI stoupalo se zvyšující se PPFD stejně jako u SD (p < 0,003).

### 7.1.2 Stanovení $\delta^{13}\text{C}$ a vnitřní koncentrace $\text{CO}_2$ v listu hrachu (*Pisum sativum*)

Bylo zjištěno, že PPFĐ má vliv na  $\delta^{13}\text{C}$  a ovlivňuje také koncentraci oxidu uhličitého ( $\text{CO}_2$ ) uvnitř listu ( $C_i$ ) (**Obr. č. 4**). Data byla získána podle **Rovnice 4 a 5** (viz Materiál a metody).



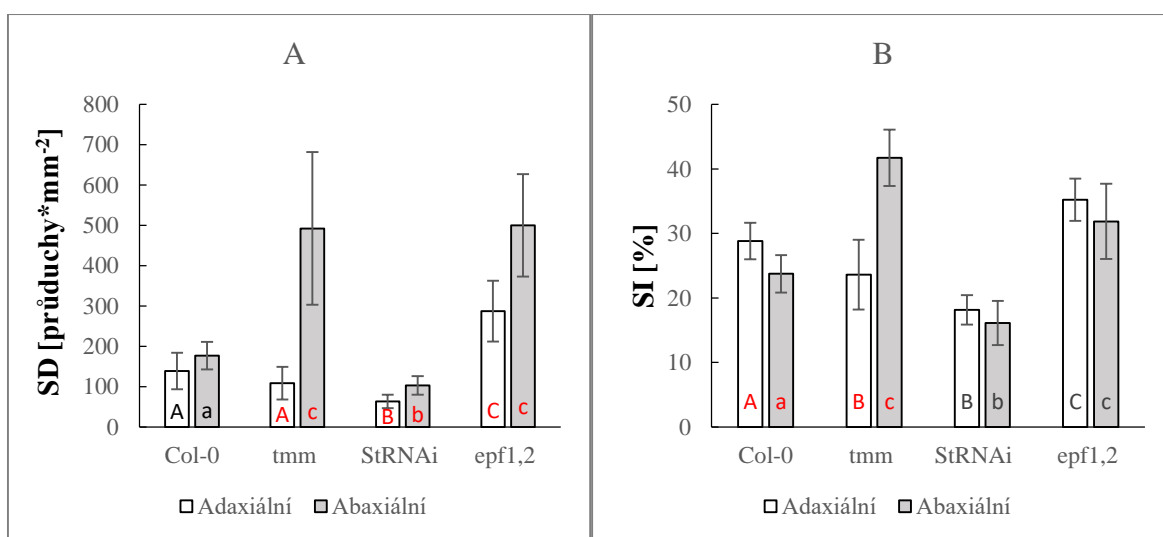
**Obr. č. 4:** Izotopový poměr  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  vzhledem ke standardu VPDB ( $\delta^{13}\text{C}$ ) (A) a vnitřní koncentrace  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) (B) v listu hrachu (*Pisum*) v závislosti na třech úrovních ozáření (PPFD). Statisticky významné rozdíly od kontrolní PPFD (250  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , označena písmenem A) jsou označeny odlišnými písmeny,  $p < 0,05$ . Sloupce představují průměrné hodnoty ( $n = 3$ , kde  $n$  je počet směšných biologických vzorků). Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku od průměru (s. d.).

Podle Tukeyho testu se izotopový signál ( $\delta^{13}\text{C}$ ) vzájemně lišil mezi všemi testovanými PPFD ( $p < 0,01$ ). S klesající PPFD se do biomasy listu hrachu zabudovalo více lehčího izotopu uhlíku  $^{12}\text{C}$  (**Obr. č. 4, A**),  $\delta^{13}\text{C}$  byl více diskriminován. Celkem ale měly listy hrachu, pěstovaného při nízké PPFD, nejvyšší  $C_i$  a naopak při vysoké PPFD bylo  $C_i$  nejnižší (**Obr. č. 4, B**). Mnohonásobné porovnání prokázalo rozdíl na 5% hladině významnosti opět mezi všemi testovanými úrovněmi světla ( $p < 0,01$ ).

## 7.2 Množství vosků v kutikule koresponduje s vývojem průduchů v pokožce listu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*)

### 7.2.1 Počet průduchů na listech rostlin s mutací ve vývoji průduchů

Na listech různých rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), pěstovaných za optimální PPFD  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , byly zjištěny hodnoty SD a SI (Obr. č. 5). Col-0 jsou kontrolní rostliny bez mutace; *tmm*, *StRNAi* a *epf1,2* jsou mutantní rostliny v genech pro vývoj průduchů („průduchoví“ mutanti), které se liší počtem průduchů alespoň na jedné straně listu.



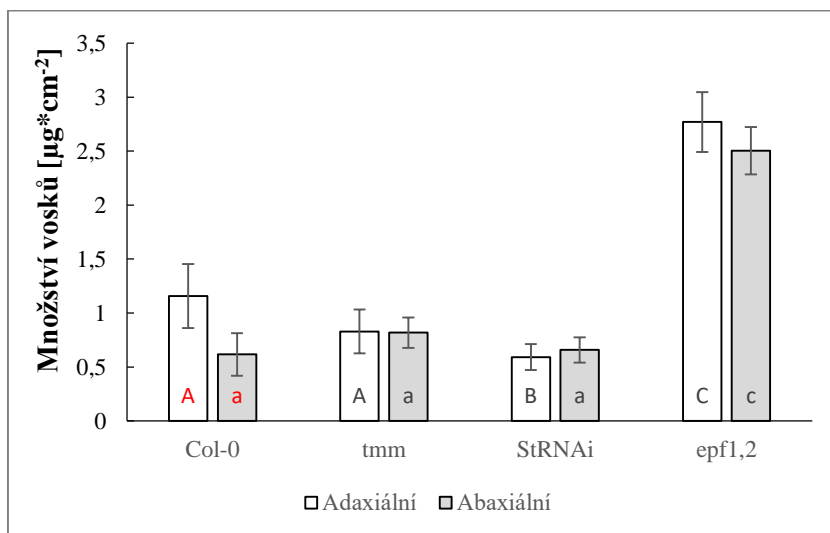
**Obr. č. 5:** Průduchová hustota – SD (A) a průduchový index – SI (B) na horní (adaxiální) straně listu (označeno velkými písmeny) a dolní (abaxiální) straně listu (označeno malými písmeny) u divoké formy (Col-0) a třech mutantů (s mutací ve vývoji průduchů – *tmm*, *StRNAi*, *epf1,2*) huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Statisticky odlišné hodnoty od kontrolního genotypu (Col-0, označený písmeny A či a) jsou označeny odlišným písmenem. Červená barva znamená statisticky významný rozdíl mezi adaxiální a abaxiální stranou listu. Sloupce jsou průměrné hodnoty ( $n = 15-26$ , kde  $n$  je počet analyzovaných ploch). Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku od průměru (s. d.),  $p < 0,05$ .  $SI = (SD)/(SD+PvCD) \times 100$ .

Od přirozeně se vyskytujícího huseníčku rolního (Col-0) se podle očekávání odlišovala SD a SI na obou stranách listu jak u dvojnásobného mutantu *epf1,2* (mutace ve faktorech EPF1 a EPF2, které v těsném sousedství negativně ovlivňují vývoj průduchů, porucha jejich exprese vedla ke zvýšení SD a SI), tak u mutantu *StRNAi* (mutace v pozitivním EPF faktoru

STOMAGENU/EPFL9 vedla naopak ke snížení SD a SI). Jen SD na adaxiální straně *tmm* mutanta (s výrazným rozdílem SD na obou stranách listu) se od Col-0 statisticky nelišila (Obr. č. 5). SD se mezi adaxiální a abaxiální stranou lišila u všech mutantů kromě kontrolních rostlin (Obr. č. 5, A), naopak v SI se rozdíl mezi oběma stranami listu projevil u kontrolních rostlin a *tmm* mutantů (Obr. č. 5, B). Testová statistika pro SD vyšla:  $F_{(3; 127)} = 29,44$ ;  $p < 0,0002$  a pro SI:  $F_{(3; 127)} = 47,619$ ;  $p < 0,01$ .

### 7.2.1 Množství vosků se mění vlivem mutace ve vývoji průduchů

Celkové množství vosků bylo stanoveno odděleně z adaxiální a abaxiální strany listu rostlin s mutací ve vývoji průduchů (*tmm*, *StRNAi*, *epfl,2*) a v porovnání s kontrolními rostlinami huseníčku rolního (Col-0) (Obr. č. 6).

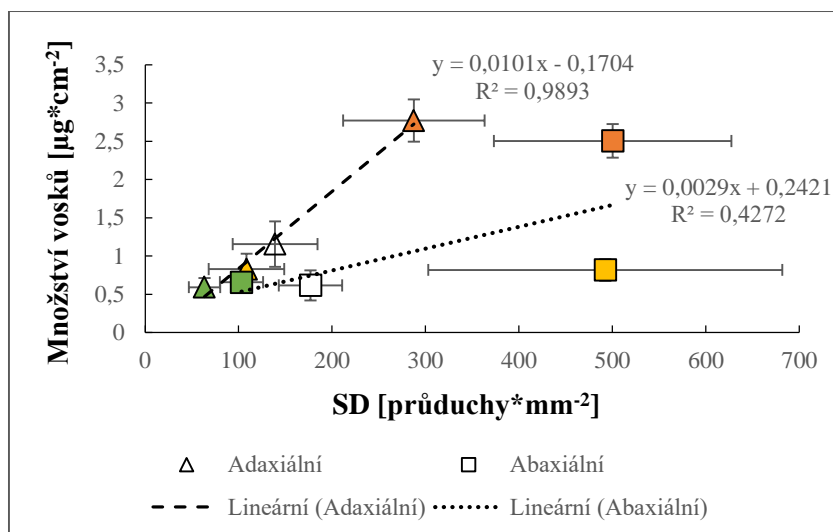


**Obr. č. 6:** Celkové množství vosků v kutikule na horní (adaxiální) (označeno velkými písmeny) a dolní (abaxiální) straně (značeno malými písmeny) listu u divoké formy (Col-0) a třech mutantů huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) s mutací ve vývoji průduchů (*tmm*, *StRNAi*, *epfl,2*). Statisticky významné rozdíly od kontroly (Col-0) jsou označeny odlišným písmenem. Červená barva znamená statisticky významný rozdíl mezi adaxiální a abaxiální stranou listu. Sloupce jsou průměrné hodnoty ( $n = 3$ , kde  $n$  je počet směsných biologických vzorků). Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku od průměru (s. d.),  $p < 0,05$ .

Nejvíce vosků bylo zaznamenáno u dvojnásobného mutantu *epfl,2*, který měl zhruba dvojnásobnou SD oproti wt (Col-0), naopak nejméně u mutantu v pozitivním EPF faktoru Stomagenu *StRNAi*, jehož SD byla přibližně poloviční ve srovnání s wt. Obsah vosků na adaxiální straně (u *epfl,2* také na abaxiální straně) listů se statisticky významně lišil

od kontrolních rostlin. Mezi adaxiální a abaxiální stranou listů se množství vosků nelišilo, až na kontrolní Col-0. Tukeyho test prokázal rozdíly s  $p < 0,031$ .

Průduchová hustota (SD) či průduchový index (SI) pozitivně korelovala s množstvím vosků v přilehlé kutikule (**Obr. č. 7 a příloha Obr. P3**).



**Obr. č. 7:** Závislost množství vosků v příslušné kutikule na počtu průduchů (SD) na horní (adaxiální) a dolní (abaxiální) straně listu u mutantů v genech řídících vývoj průduchů (*tmm* – žlutě, *StRNAi* – zeleně, *epf1,2* – oranžově) a divoké formy (Col-0 – bíle) huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Značky představují průměrné hodnoty ( $n=3$ , kde  $n$  je počet směsných biologických vzorků pro analýzu vosků,  $n = 15-26$ , kde  $n$  je počet analyzovaných ploch u SD). Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku od průměru (s. d.).  $R^2$  je koeficient determinace.

Těsnější korelace byla vždy prokázána na adaxiální straně listu, tedy s SD či s SI rostlo i celkové množství vosků v kutikule (**Obr. č. 7 a příloha Obr. P3**).

### 7.3 Povrch listu, struktura a tloušťka kutikuly pod elektronovým mikroskopem

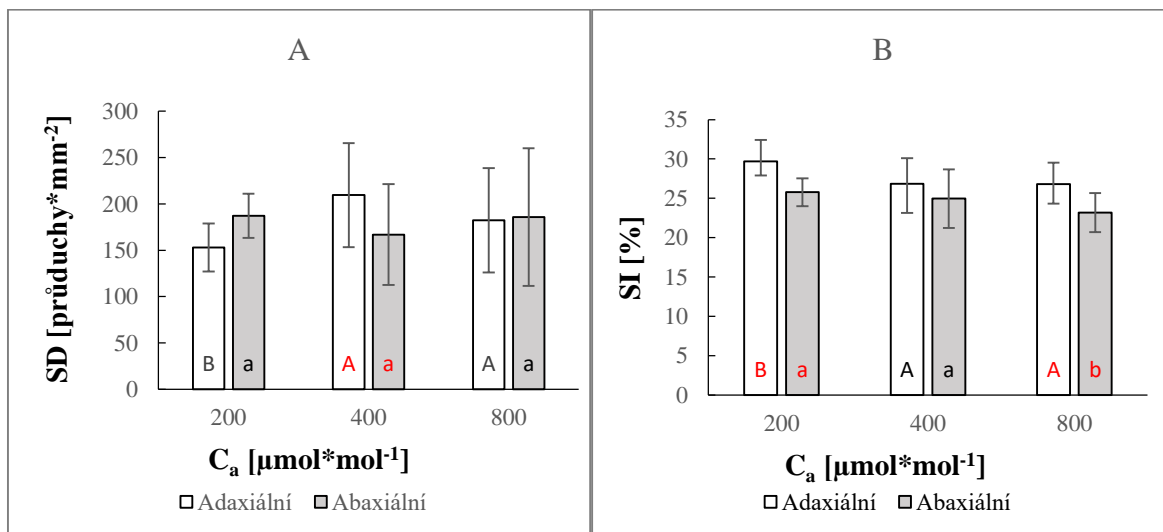
Metodou FESEM pod kryo-elektronovým mikroskopem byly pozorovány průduchy na povrchu listu, lom a tloušťka kutikuly huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) jak u Col-0, tak u výše zmíněných „průduchových“ mutantů. **Příloha Obr. P4** ukazuje nepravidelné rozmístění průduchů u divoké formy huseníčku rolního (Col-0) a průduchy na abaxiální straně listu *tmm* mutantu po čtyřech v klastru. V **příloze Obr. P5** je zobrazen

lom listem kontrolní Col-0 a listem mutanta *epfl,2*, který má významně více vosků. Bohužel nešlo odlišit vrstvu kutikuly od buněčné stěny a určit tak tloušťku kutikuly. Byl také pořízen snímek izolované kutikuly huseníčku (příloha Obr. P6). Lom izolované kutikuly, který by umožnil změřit její tloušťku, se zatím nezdařil.

## 7.4 Vliv vnějšího a vnitřního CO<sub>2</sub> na vývoj pokožky listu

### 7.4.1 Počet průduchů na listu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) při změně koncentrace CO<sub>2</sub>

Dalším důležitým faktorem, který může ovlivnit stavbu kutikuly a pokožky, je koncentrace oxidu uhličitého ve vzduchu ( $C_a$ ). Jak se mění SD a SI v závislosti na okolní  $C_a$ ? Výsledky v literatuře jsou značně rozdílné. Zde byla zkoumána SD a SI v závislosti na třech  $C_a$  u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) ve dvou pokusech s odlišnou fotoperiodou. V prvním pokusu (Obr. č. 8) byla stejná délka dne a noci (12/12 hodin) a kromě rostlin Col-0, tj. wt rostlin, byly použity také dva genotypy s mutací v genu *HIC* (*hic* – SM linie a SAIL2055E06). U nich se předpokládala opačná reakce na  $C_a$  oproti Col-0 podle článku Gray et al. (2000). Fotografie pokusných rostlin viz příloha Obr. P7 - P9.

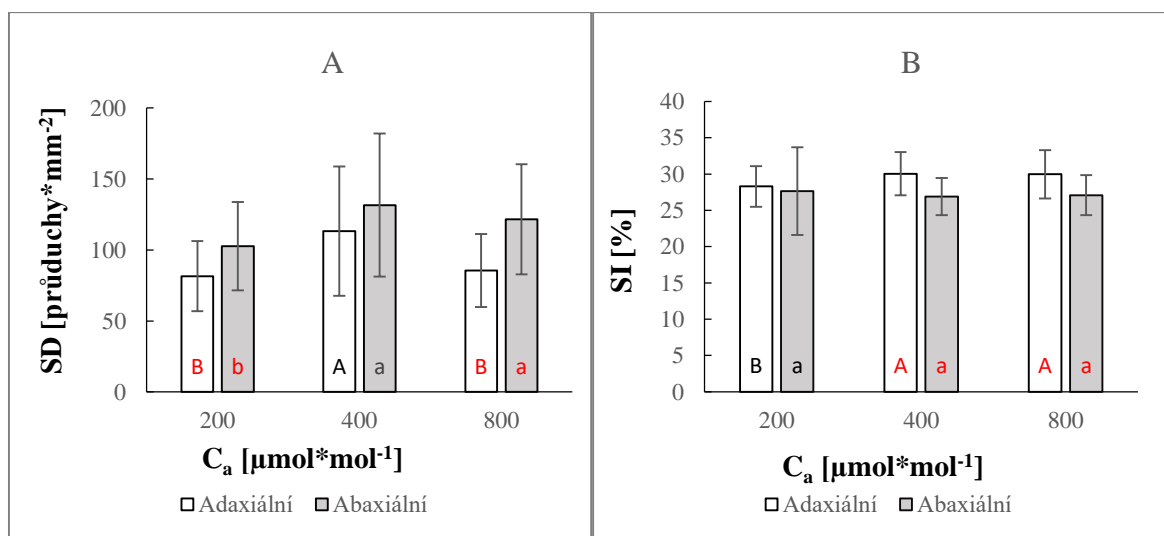


**Obr. č. 8:** Průduchová hustota – SD (A) a průduchový index – SI (B) na horní (adaxiální) straně listu (označeno velkými písmeny) a dolní (abaxiální) straně listu (označeno malými písmeny) huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*, Col-0) ve třech různých koncentracích CO<sub>2</sub> v atmosféře –  $C_a$ . Odlišné hodnoty od kontroly (400 μmol\*mol<sup>-1</sup>, označena písmeny A či a) jsou označeny odlišnými písmeny. Červená barva znamená statisticky významný rozdíl mezi adaxiální a abaxiální stranou listu.

Sloupce jsou průměrné hodnoty ( $n = 25$ , kde  $n$  je počet analyzovaných ploch). Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku od průměru (s. d.),  $p < 0,05$ .  $SI = (SD)/(SD+PvCD) \times 100$ .

Abaxiální strany listů rostlin na odlišné podmínky pěstování vůbec nereagovaly. Snížená SD na rozdíl od kontrolních rostlin pěstovaných za  $C_a$  ( $400 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) byla zaznamenána pouze na adaxiální straně listu u rostlin pěstovaných při poloviční koncentraci  $C_a$  ( $p < 0,002$ ) (**Obr. č. 8, A**). Dané listy však měly na adaxiální straně zvýšený SI. Průkazně jiný SI (snížený) byl také na abaxiální straně za vysoké  $C_a$  ( $p < 0,0026$ ) (**Obr. č. 8, B**). SD se mezi stranami listu odlišovala pouze za kontrolní  $C_a$  ( $p = 0,00748$ ) (**Obr. č. 8, A**), ovšem SI se lišil na opačných stranách jak za vysoké, tak nízké  $C_a$  ( $p < 0,0001$ ) (**Obr. č. 8, B**).

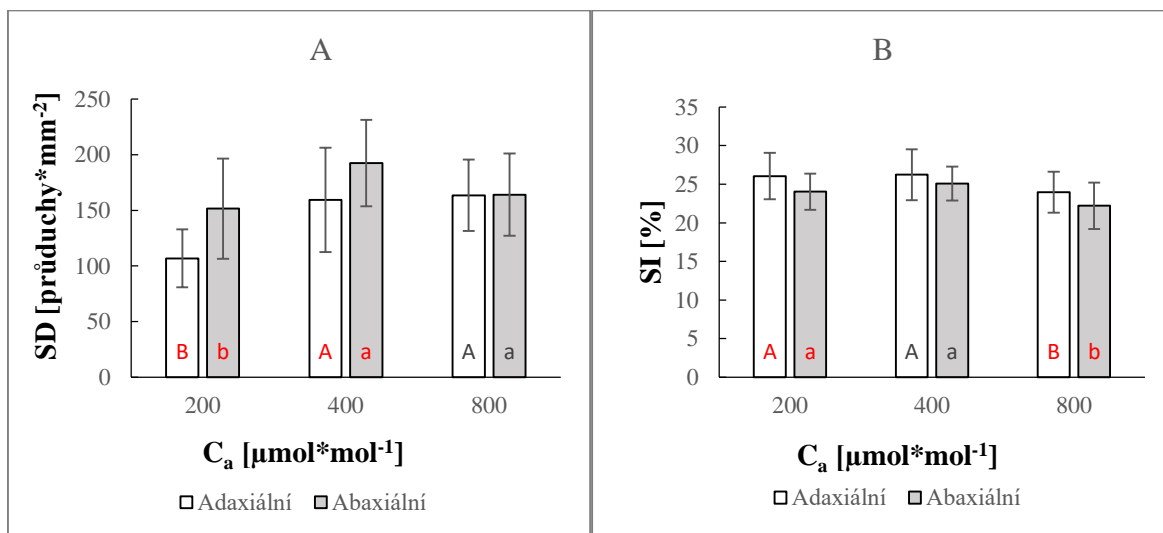
U druhého pokusu s huseníčkem rolním (Col-0) s delší světelnou periodou o čtyři hodiny (16h den/8h noc) vyšla SD a SI následovně (**Obr. č. 9**):



**Obr. 9:** Průduchová hustota – SD (A) a průduchový index – SI (B) na horní (adaxiální) straně listu (označeno velkými písmeny) a dolní (abaxiální) straně listu (označeno malými písmeny) huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*, Col-0) ve třech různých koncentracích  $\text{CO}_2$  v atmosféře –  $C_a$ . Odlišné hodnoty od kontroly ( $400 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ , označena písmeny A či a) jsou označeny odlišnými písmeny. Červená barva znamená statisticky významný rozdíl mezi adaxiální a abaxiální stranou listu. Sloupce jsou průměrné hodnoty ( $n = 42$ , kde  $n$  je počet analyzovaných ploch). Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku od průměru (s. d.),  $p < 0,05$ .  $SI = (SD)/(SD+PvCD) \times 100$ .

Zde se SD oproti předchozímu pokusu snížila na adaxiálních stranách listů nejen za nízké ale i za vysoké  $C_a$  ( $p < 0,0005$ ) (**Obr. č. 9, A**). Pokles byl u obou zmíněných koncentrací navíc o přibližně stejnou hodnotu. Na abaxiální straně listu došlo ke změně SD pouze při pěstování za snížené  $C_a$  ( $p < 0,0108$ ). Strany listů se v SD nelišily pouze u kontrolních rostlin. Graf SI byl obdobný jako v předchozím pokusu, zde ovšem nedošlo na adaxiálních stranách listů ke zvýšení za nízké  $C_a$ , ale ke snížení ( $p < 0,0435$ ). Strany listů se v SI nelišily jen za nízké  $C_a$  ( $p > 0,05$ ).

U *hic* mutanta (SM linie) huseníčku rolního šlo o ověření odlišné reakce na zvýšenou  $C_a$  na SD a SI v porovnání s hodnotami za kontrolní  $C_a$  ( $400 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) (**Obr. č. 10**).



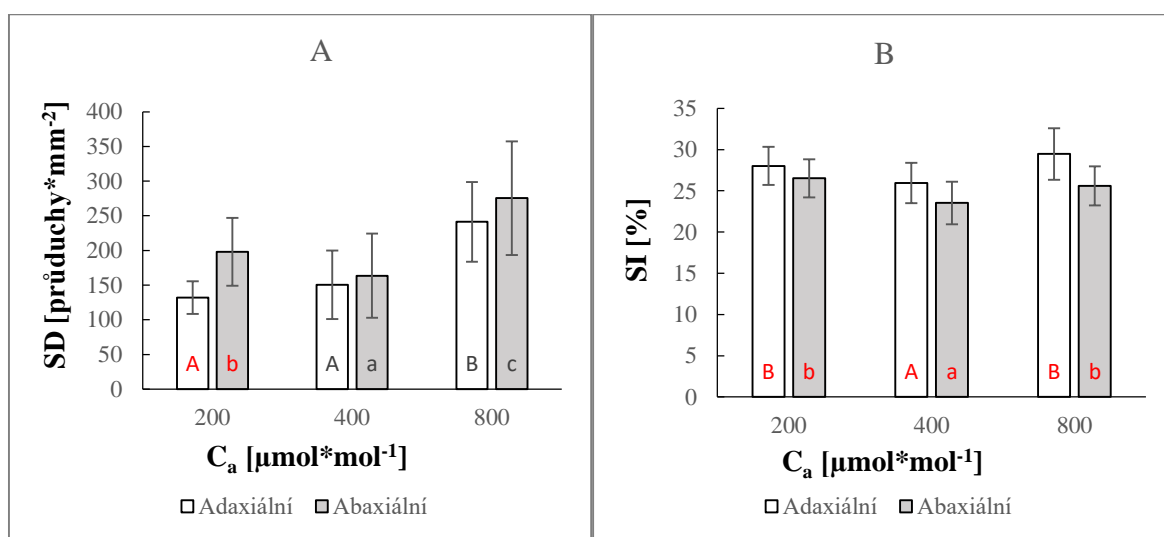
**Obr. č. 10:** Průduchová hustota – SD (A) a průduchový index – SI (B) na horní (adaxiální) straně listu (označeno velkými písmeny) a dolní (abaxiální) straně listu (označeno malými písmeny) huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*, *hic* mutant) ve třech různých koncentracích  $\text{CO}_2$  v atmosféře –  $C_a$ . Odlišné hodnoty od kontroly ( $400 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ , označena písmeny A či a) jsou označeny odlišnými písmeny. Červená barva znamená statisticky významný rozdíl mezi adaxiální a abaxiální stranou listu. Sloupce jsou průměrné hodnoty ( $n = 25$ , kde  $n$  je počet analyzovaných ploch). Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku od průměru (s. d.),  $p < 0,05$ .  $\text{SI} = (\text{SD})/(\text{SD} + \text{PvCD}) \times 100$ .

Došlo však jen ke snížení SD za nízké  $C_a$ . Lišila se jak adaxiální, tak abaxiální strana listu. Ve všech testech bylo  $p < 0,002$ . SD v závislosti na straně listu byla průkazně jiná pouze



za nízké a kontrolní  $C_a$  ( $p < 0,0084$ ), při vysoké  $C_a$  byla SD totožná (**Obr. č. 10, A**). SI se od kontrolních rostlin snížil (oproti SD) za vysoké  $C_a$  a to na obou stranách listu (**Obr. č. 10, B**) – pro adaxiální stranu bylo  $p < 0,0262$  a pro abaxiální stranu  $p < 0,001$ . Jednocestná ANOVA prokázala různý SI mezi adaxiální a abaxiální stranou listu jen za nízké ( $p = 0,001$ ) a vysoké ( $p = 0,032$ )  $C_a$ .

Nakonec se stejný pokus opakoval i pro mutantní rostliny huseníčku rolního (SAIL - SAIL2055E06) (**Obr. č. 11**), které měly mutaci ve stejném genu jako mutant *hic*. Očekával se proto stejný efekt.



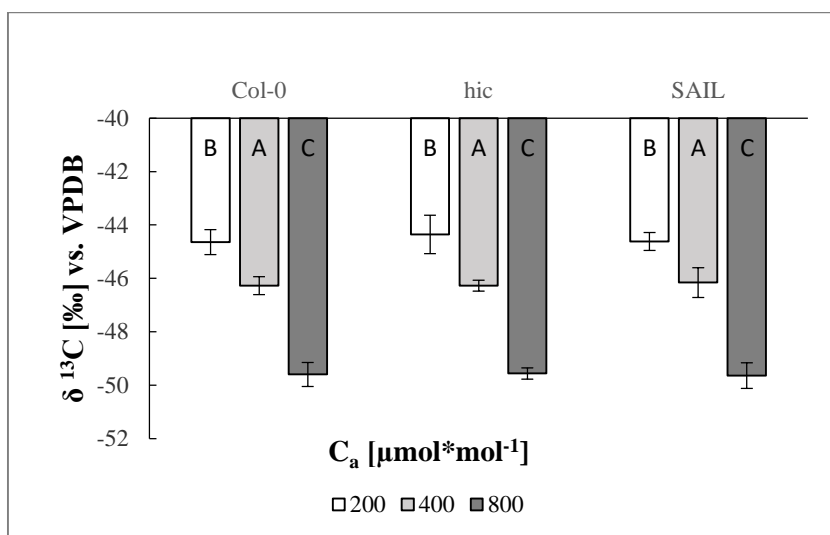
**Obr. č. 11:** Průduchová hustota – SD (A) a průduchový index – SI (B) na horní (adaxiální) straně listu (označeno velkými písmeny) a dolní (abaxiální) straně listu (označeno malými písmeny) huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*, SAIL mutant) v závislosti na třech různých koncentracích  $\text{CO}_2$  v atmosféře –  $C_a$ . Odlišné hodnoty od kontroly ( $400 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ , označena písmeny A či a) jsou označeny odlišnými písmeny. Červená barva znamená statisticky významný rozdíl mezi adaxiální a abaxiální stranou listu. Sloupce jsou průměrné hodnoty ( $n = 20-25$ , kde  $n$  je počet analyzovaných ploch). Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku od průměru (s. d.),  $p < 0,05$ .  $\text{SI} = (\text{SD})/(\text{SD} + \text{PvCD}) \times 100$ .

U SD byla hodnota testové statistiky pro adaxiální strany listů  $F_{(2; 67)} = 36,25$ ;  $p < 0,00001$  a následný Tukeyho test prokázal rozdíl SD mezi nízkou a kontrolní  $C_a$  ( $p = 0$ ). Na abaxiální straně se navíc lišila SD při vysoké  $C_a$  a zároveň při nízké a vysoké  $C_a$  ( $p < 0,0413$ ). Jednofaktorová analýza variance prokázala vliv strany listu pouze za nízké  $C_a$  ( $p < 0,00001$ ) (**Obr. č. 11, A**). Vliv snížené a zvýšené  $C_a$  na SI u mutantu SAIL (**Obr. č. 11, B**)

ukazuje zvýšení hodnot oproti kontrole jak na adaxiální ( $p < 0,0218$ ), tak abaxiální ( $p < 0,0080$ ) straně listu. SI se průkazně lišil mezi adaxiální a abaxiální stranou listu ve všech třech studovaných  $C_a$  ( $p < 0,0345$ ).

#### 7.4.2 Měření $\delta^{13}\text{C}$ a vnitřní koncentrace $\text{CO}_2$ v listu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*)

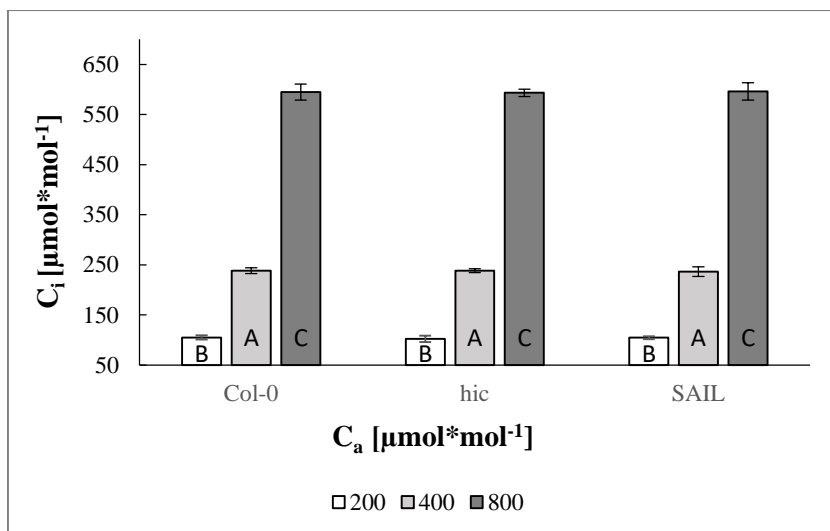
Na následujícím grafu (**Obr. č. 12**) je zobrazeno, jaký je u jednotlivých genotypů huseníčku rolního pěstovaných při třech  $C_a$  izotopový poměr  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  vzhledem ke standardu VPDB. Hodnoty byly získány dosazením do **Rovnice 4** (viz Materiál a metody).



**Obr. č. 12:** Izotopový poměr  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  vzhledem ke standardu VPDB ( $\delta^{13}\text{C}$ ) u divoké formy huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*, Col-0) a dvou jeho mutantů (*hic*, SAIL) v závislosti na rozdílné atmosférické koncentraci  $\text{CO}_2$  ( $C_a$ ).  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  znamená kontrolní  $C_a$  (písmeno A) a odlišná písmena znamenají statisticky významný rozdíl,  $p < 0,05$ . Sloupce jsou průměrné hodnoty ( $n = 3$ , kde  $n$  je počet biologických vzorků). Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku od průměru (s. d.).

Jak je vidět, v biomase bylo  $^{13}\text{C}$  tím méně (hodnota je tím zápornější), čím se zvyšovala atmosférická  $C_a$  a to bez ohledu na genotyp. Čím měl enzym RUBISCO (enzym v chloroplastu vážící k sobě oxid uhličitý) k dispozici více oxidu uhličitého, tím více diskriminoval těžší uhlík  $^{13}\text{C}$ . Statistické vyhodnocení pro všechny testy bylo s  $p < 0,0014$ .

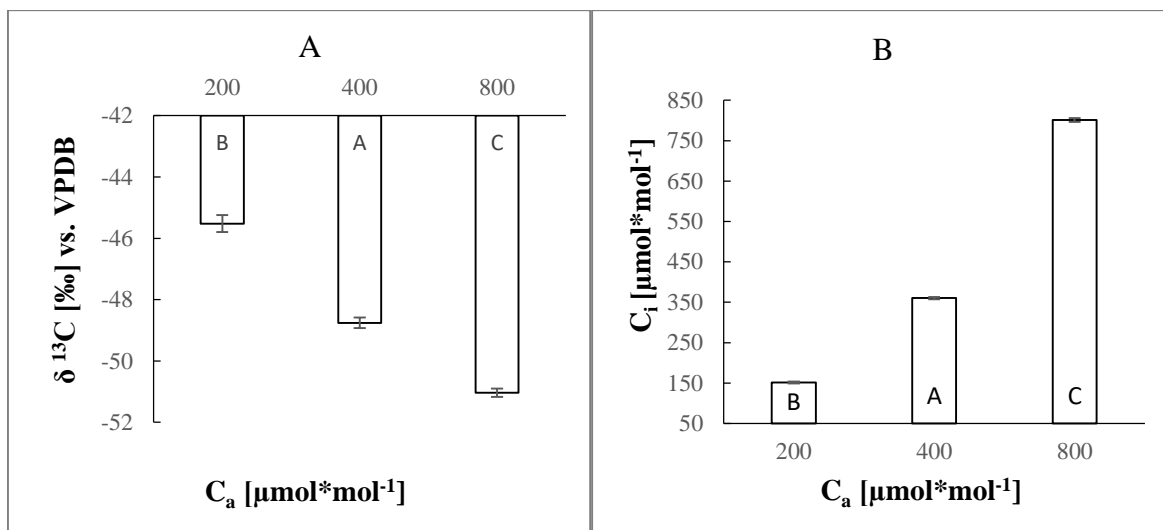
Vnitřní koncentrace oxidu uhličitého v listu ( $C_i$ ) (**Obr. 13**) byla vypočítána podle **Rovnice 5**, (uvedená v Materiálech a metodách). Tukeyho test vždy prokázal významný rozdíl mezi rostlinami pěstovanými v poloviční či dvojnásobné  $C_a$  vůči kontrolním rostlinám.



**Obr. č. 13:** Vnitřní koncentrace  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) v listu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) pro Col-0 (kontrolní rostlina) a mutanty *hic* a SAIL při třech vnějších koncentracích  $\text{CO}_2$  ( $C_a$ ). Písmeno A představuje přirozenou kontrolní  $C_a$  ( $400 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), odlišná písmena znamenají statisticky významný rozdíl,  $p < 0,05$ . Sloupce jsou průměrné hodnoty ( $n = 3$ , kde  $n$  je počet biologických vzorků). Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku od průměru (s. d.).

Změny v SD či SI v závislosti na  $C_i$ , jehož změna je důsledkem změny  $C_a$ , jsou ukázány v **příloze (Obr. P10 a P11)**. Se stoupající  $C_i$  se SD nepatrně zvyšovalo na obou stranách listu, SI naopak nepatrně klesalo, korelace ovšem nebyla prokázána.

V opakovaném pokusu s kontrolními rostlinami huseníčku rolního (Col-0), které byly pěstovány s jinou fotoperiodou (16h den/8h noc), měl izotopový signál ( $\delta^{13}\text{C}$ ) a  $C_i$  stejný trend jako v předchozím pokusu (**Obr. č. 14**).



**Obr. č. 14:** Izotopový poměr  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  vzhledem ke standardu VPDB ( $\delta^{13}\text{C}$ ) (A) a vnitřní koncentrace  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) (B) v listu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*, Col-0) v závislosti na třech koncentracích  $\text{CO}_2$  ve vzduchu ( $C_a$ ). Statisticky významné rozdíly od kontrolní  $C_a$  ( $400 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ , označena písmenem A) jsou označeny odlišnými písmeny,  $p < 0,05$ . Sloupce představují průměrné hodnoty ( $n = 3$ , kde  $n$  je počet směsných biologických vzorků). Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku od průměru (s. d.).

S rostoucí  $C_a$  rostla opět vnitřní koncentrace oxidu uhličitého ( $C_i$ ) v biomase listu huseníčku, ( $p = 0$ ) (**Obr. č. 14, B**) a do biomasy rostlin se zabudovalo méně těžšího izotopu uhlíku  $^{13}\text{C}$  ( $p < 0,0001$ ) (**Obr. č. 14, A**).

## 8 Diskuze

Rostliny se během svého života přizpůsobují okolnímu prostředí, ve kterém žijí – aby si zajistily vhodné podmínky pro svůj růst a reprodukci. Změnou turgoru ve svěřacích buňkách průduchů se snaží udržet optimální poměr mezi příjmem oxidu uhličitého ( $\text{CO}_2$ ) a výdejem vody ( $\text{H}_2\text{O}$ ) pro zachování biochemických procesů. Z dlouhodobého hlediska reagují rostliny na okolní prostředí mimo jiné změnou ve vývoji počtu a velikosti průduchů. Tento vývoj ovlivňují vnější biotické i abiotické faktory – z nich nejvýznamnější je intenzita světla (PPFD) a jeho kvalita, dostupnost oxidu uhličitého, ale také například vlhkost půdy i vzduchu (Bakker, 1991; Lee et al., 2007; Casson and Hetherington, 2010). Vnímání těchto signálů z vnějšího prostředí je zprostředkováno rostlinnými peptidy (jako jsou EPF faktory), jejichž informace jsou pak zpracovány na molekulární úrovni (Peterson et al., 2010; Takata et al., 2013). Na pokusných rostlinách hrachu (*Pisum sativum var saccharatum*) a huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) byly na listech zkoumány změny v průduchové hustotě (SD, počet průduchů\* $\text{mm}^{-2}$ ) a v průduchovém indexu (SI, podíl průduchů na celkovém počtu pokožkových buněk) a změny ve vnitřní koncentraci oxidu uhličitého v listu ( $C_i$ ) s využitím měření poměru stabilních izotopů uhlíku. Také se zjišťovalo celkové množství vosků v kutikule huseníčku, která tvoří spolu s pokožkou bariéru pro komunikaci s okolním prostředím.

Prvním faktorem vnějšího prostředí, který utváří rostlinu, je světlo. Vysoká PPFD ( $450 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) u hrachu stimulovala vývoj průduchů (vyšší SD) a naopak nízká PPFD ( $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) vedla ke snížení SD (**Obr. č. 3, A**). Stejný trend byl popsán i u modelové rostliny huseníčku rolního (Hronková et al., 2015), ale také například na listech tropických rostlin jako je vernonie (*Vernonia amygdalina*) (Idris et al., 2018) nebo *Tridax procumbens* (Idris et al., 2019), ačkoliv se lišily absolutní hodnoty PPFD (huseníček na 50 a  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , ostatní rostliny na 100 a  $1800 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Baroli et al. (2008) provedli pokus s tabákem (*Nicotiana*) a zjistili, že zastínění (nízké PPFD) má vliv také na SI, který byl snížen na obou stranách listu, stejně jako SD. Vliv světla na SI byl u hrachu potvrzen na dolní (adaxiální) straně listu, horní (adaxiální) strana listu reagovala na zastínění snížením SI, ale zvýšená PPFD SI dále nezvyšovala (**Obr. č. 3, B**). Odezva SI na světlo u huseníčku ale také nebyla naprosto jednotná, v jednom pokusu reagovaly pouze adaxiální strany a ve druhém pokusu obě strany listu (Hronková et al., 2015). Zdá se, že SD je na světlo citlivější než SI a že různé rostliny reagují odlišně.

S vyšší SD stoupá také průduchová vodivost (Baroli et al., 2008), což může být pro rostliny nepříznivé, protože klesá jejich efektivita využití vody (WUE, poměr asimilace oxidu uhličitého k transpiraci) (Franks et al., 2015), jež si rostliny regulují krátkodobě otevíráním a zavíráním průduchů. Kdyby ovšem neměly na svém povrchu vrstvu kutikuly, složenou z kutinu a vosků, která chrání povrch listu nejen proti nadměrným ztrátám vody, byla by WUE ještě nižší (Boyer, 2015).

Vztahem mezi pokožkou a kutikulou a jejich vzájemnou komunikací se mnoho prací dosud nezabývalo. Naše další pokusy byly inspirovány výsledky získanými Gray et al. (2000), kteří popsali produkt genu *HIC* (*KCS13*), jež kóduje enzym 3-keto acyl koenzym A syntázu jako klíčový enzym v komunikaci mezi kutikulou a pokožkou. Listy rostlin huseníčku, s mutací v tomto genu, v jejich pokusu reagovaly na zvýšenou  $C_a$  (koncentrace oxidu uhličitého ve vzduchu), na rozdíl od kontrolních rostlin, zvýšením SD i SI.

Oxid uhličitý je považován za jeden z důležitých signálů vnějšího prostředí, který ovlivňuje otevírání a zavírání průduchů i jejich počet na listu (Casson and Hetherington, 2010; Engineer et al., 2016). Uvádí se, že průduchová vodivost se za zvýšené  $C_a$  snižuje (Tomimatsu et al., 2014) a očekává se, že ve srovnání se současným stavem ( $400 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) se při zvyšování  $C_a$  vytvoří na listu méně průduchů (nižší SD) (Lake and Wade, 2009). Woodward a Kelly (1995) ve své práci shrnují výsledky pokusů s několika rostlinnými druhy a vliv zvýšené  $C_a$  na SD uvádí jako nejednotný, přestože se většinou SD snižovala. Paoletti et al. (1998) zjistili, že se SD na listech dubu cesmínového (*Quercus ilex*) při zvyšování  $C_a$  nad  $750 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$  již dále nesnižuje a je konstantní. V našich dvou pokusech s huseníčkem rolním, byl studován vliv jak snížené ( $200 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), tak zvýšené ( $800 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ )  $C_a$  (**Obr. č. 8 a 9**). Nebyl nalezen opakovatelný statisticky průkazný rozdíl v SD ani v SI při zvýšené  $C_a$ . Snížením SD reagovala pouze adaxiální strana u druhého opakování a snížením SI abaxiální strana u prvního pokusu. Caldera et al. (2017) také vystavili huseníček rolní přirozené a zvýšené ( $800 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ )  $C_a$  a i ostatní podmínky byly podobné podmínkám jako v našem druhém opakování. Hodnoty SD i SI se v jejich případě za zvýšené  $C_a$  průkazně zvýšily a to na obou stranách listů.

Snížením  $C_a$  na polovinu současné atmosférické  $C_a$ , došlo v našich dvou pokusech s huseníčkem vždy alespoň na adaxiální straně listu ke snížení SD (**Obr. č. 8, A a 9, A**), což je ale opačný efekt, než byl očekáván a který ukazuje např. Yuanyuan et al. (2014). Autoři ovšem huseníček vystavili  $C_a$   $100 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ , tedy poloviční, než jsme použily my. Ale velikost

listové plochy byla na nízké  $C_a$ , oproti přirozené (atmosferické)  $C_a$ , menší. To jsme v našem pokusu pozorovaly i my (**příloha Obr. P7**). Hodnota SI se při nižší  $C_a$  v našem prvním pokusu podle očekávání naopak zvýšila. Zdá se, že reakce rostlin na změnu  $C_a$  není tak jednoznačná jako v případě PPF. D.

Dalším cílem bylo ověřit roli genu *HIC*, který zřejmě představuje spojení mezi vývojem pokožky a kutikuly a podle dostupné literatury souvisí i se změnou  $C_a$ . Mutace v tomto genu způsobí, že se na listech při zvýšené  $C_a$  vytváří více průduchů (vyšší SD) a zvyšuje se i SI, jak uvádí (Gray et al., 2000). V našich pokusech byly použity dvě mutantní linie v tomto genu – první (*hic-SM* – **Obr. č. 10**) na změnu  $C_a$  prakticky nereagovala, SI při zvýšené  $C_a$  ( $800 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) se dokonce snížil, druhá linie (*SAIL*, **Obr. č. 11**) reagovala jak při zvýšené  $C_a$  ale také na snížené  $C_a$  zvýšením SD i SI. Bude tedy potřeba pokus ještě zopakovat.

Engineer et al. (2014) zjistili zvýšení SI se zvyšující se  $C_a$  (ze 150 na  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) na listech u mutantu v  $\beta$ -carbonic anhydráze (dvojitý mutant *ca1ca4*). Popsali tak novou specifickou proteázu CRSP, která je spolu s negativním epidermálním faktorem EPF2 zapojena do mechanismu vnímání oxidu uhličitého a za zvýšené  $C_a$  vede u kontrolních rostlin ke snížení SI. Šantrůček et al. (2014b) navrhli, že by vývoj průduchů v pravých listech mohl být zprostředkován vnímáním vnitřní koncentrace oxidu uhličitého uvnitř listu ( $C_i$ ). Na vysoké PPF ( $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a v přirozené  $C_a$ , kdy se zvýšil počet průduchů (SD i SI) byla v listu huseníčku zjištěna pomocí izotopového poměru  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  menší  $C_i$  ( $240 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) než na nízké PPF  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $320 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). I v našem pokusu s hrachem, byly hodnoty SD a SI na vysoké PPF vyšší a doprovázené snížením  $C_i$  (**Obr. č. 3 a 4, B**). Baroli et al. (2008) vysvětlují snížení  $C_i$  při vyšší PPF vyšší asimilací oxidu uhličitého. Autoři ovšem uvádějí, že pokles  $C_i$  nastává jen do určité intenzity PPF – např. u tabáku od cca  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  k dalšímu snižování nedochází.

$C_i$  je obecně vyšší se stoupající  $C_a$  (Tomimatsu et al., 2014). Závislost mezi SD (i SI),  $C_i$  a  $C_a$  uvádí Šantrůček et al. (2014b). U řeřichy seté (*Lepidium sativum*) bylo při vysoké  $C_a$  v listech zjištěno vyšší  $C_i$  a nižší SD ale SI bylo opačné. Stejný trend byl prokázán i v našem pokusu s huseníčkem (**příloha Obr. P10 a P11**). Šantrůček et al. (2014b) však také uvádí, že k ověření mechanismu zapojení  $C_i$  do biochemických drah ve vývoji průduchů, je potřeba ještě provést více pokusů.

Byla také testována hypotéza, že existuje spolupráce ve vývoji průduchů a tvorbě kutikuly. Příkladem vzájemného propojení by mohl být již několikrát zmíněný gen *HIC* (*KCS13*), který kóduje enzym zapojený do syntézy dlouhých řetězců mastných kyselin, jež se využívají v syntéze kutikuly (Jenks et al., 1995; Millar et al., 1999; Gray et al., 2000) a který by současně mohl představovat spojení s mechanismem vnímání koncentrace oxidu uhličitého listem ať už na úrovni  $C_a$  nebo  $C_i$ . Souvislost mezi vývojem průduchů a množstvím vosků v kutikule jsme hledaly pomocí našeho pokusu s „průduchovými“ mutanty huseníčku (*tmm*, *StRNAi* a *epfl,2*).

Bylo zjištěno, že s vyšším počtem průduchů na listu (SD i SI) se v přilehlé kutikule vytvoří větší množství vosků (**Obr. č. 5, 6 a 7, příloha Obr. P3**), viz dvojitý mutant v negativních EPF faktorech 1 a 2 (*epfl,2*) a že na adaxiální straně množství vosků koreluje s počtem průduchů (**Obr. č. 7, příloha Obr. P3**). Jediná práce na toto téma je disertační práce Petruschke (2019). Stanovila SD a SI a také množství a složení vosků na obou stranách listů huseníčku u dvou ekotypů (Col-0 a Wassilewskija) a několika mutantů s fenotypovým projevem ve změně počtu průduchů (*StRNAi*, *StOx*, *tmm* a *flp*) nebo v obsahu vosků (*wax2* a *shn3*) či kutinu (*att1*), ale korelaci množství vosků s SD ani s SI ze všech těchto genotypů nepotvrdila. S cílem ukázat, že s vyššími hodnotami SD (či SI) stoupá i množství vosků v přilehlé kutikule, byl zařazen mutant *tmm*, jež má na abaxiální straně daleko více průduchů než na adaxiální (**Obr. č. 5**), to bylo potvrzeno ve více pracích (Hronková et al., 2015; Vráblová et al., 2017; Petruschke, 2019). Množství vosků bylo však na obou stranách víceméně stejné a srovnatelné s Col-0 (**Obr. č. 6**) stejně jako u (Petruschke, 2019). Oproti tomu mutant ve STOMAGENU (*StRNAi*) měl na rozdíl od Col-0 asi poloviční SD a to na obou stranách listu (**Obr. č. 5, A**). Výsledky byly v souladu s publikovanými daty (Sugano et al., 2010; Tanaka et al., 2013). Menší množství vosků bylo naměřeno na adaxiální straně (**Obr. č. 6**). Petruschke (2019) však uvádí snížení SD ale i množství vosků na obou stranách listů u *StRNAi* mutantů. U Col-0 (wt) spočítala menší SD na adaxiální straně listu, ale nezjistila rozdíl v množství vosků mezi adaxiální a abaxiální kutikulou. Z našich dat vyplývá, že SD bylo na obou stranách listů stejné, ale množství vosků bylo na adaxiální straně vyšší (**Obr. č. 5, A a 6**). Rozdíly ve výsledcích by mohly být způsobeny odlišnými kultivačními podmínkami, protože zvláště světlo, jeho kvantita a kvalita, hraje důležitou roli. Závislost SD (či SI) a množství vosků tedy bude také potřeba ještě podrobněji ověřit, a hlavně hledat podstatu molekulárního mechanismu tohoto vztahu.



Také nás zajímalo, zda by bylo možné změřit pomocí kryo-elektronové mikroskopie (FESEM) tloušťku kutikuly a zda se tloušťka změní, když se změní množství vosků. Tato metoda umožňuje pozorovat listy v podmínkách, které se jen velmi málo liší od přirozených (rychlé zmražení živého listu při teplotě tekutého dusíku). Na celých listech však nešlo odlišit vrstvu kutikuly od buněčné stěny (**příloha Obr. P5**) a udělat řez izolované kutikuly (povrch viz **příloha Obr. P6**) se nám zatím nepodařilo.

Chtěla jsem se rovněž pokusit změřit propustnost kutikuly huseníčku pro vodu metodou SPR (Povrchová plasmonová rezonance, Surface Plasmon Resonance), ale jelikož byly listy izolované kutikuly příliš tenké a křehké a navíc jsou listy huseníčku amfistomatické, nebylo to možné.

## 9 Závěr

Podařilo se potvrdit hypotézu, že zvýšená intenzita záření (PPFD) ( $450 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) vede ke zvýšení počtu průduchů na listu hrachu (*Pisum*) (SD) a vnitřní koncentrace oxidu uhličitého v listu ( $C_i$ ) se snižuje a zároveň, že nízká PPFD ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) má opačný účinek. Znamená to tedy, že zvyšující se PPFD obecně zvyšuje SD i podíl SD na celkovém počtu pokožkových buněk (SI), podíl izotopu uhlíku  $^{13}\text{C}$  v biomase listu se také zvyšuje s PPFD, což svědčí o snižující se  $C_i$ .

Nebyla však potvrzena hypotéza, že zvýšená koncentrace oxidu uhličitého v okolním vzduchu ( $C_a$ ) ( $800 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) snižuje SD huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) (Col-0) a že nízká  $C_a$  ( $200 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) naopak vede ke zvýšení SD. Se stoupající/klesající  $C_a$  se zvyšovala/snižovala i koncentrace  $\text{CO}_2$  uvnitř listu ( $C_i$ ), změřená pomocí poměru izotopů  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ . Snížení  $C_i$  v listu však nevedlo ke zvýšení SD a nebude tedy asi hlavním signálem pro růst počtu průduchů a její zvýšení také samo o sobě nezpůsobilo významné omezení jejich vývoje.

U mutantních rostlin v genu *HIC/KCS13* (*hic*, SAIL) jsme na základě publikovaných dat předpokládaly, že budou na zvýšenou  $C_a$  reagovat opačným způsobem než kontrolní Col-0. To bylo ovšem potvrzeno jen částečně u SAIL mutantů.

U kontrolních wt (Col-0) i tzv. „průduchových“ mutantů huseníčku rolního (*tmm*, *StRNAi*, *epf1,2*) byla potvrzena hypotéza, že množství vosků v přilehlé kutikule koresponduje s počtem vyvinutých průduchů v přilehlé pokožce. Korelace byla prokázána na adaxiální straně listu.

## 10 Seznam citované literatury

- AGARWAL, U. P., REINER, R. S. and RALPH, S. A.** (2010). *Cellulose I crystallinity determination using FT-Raman spectroscopy: univariate and multivariate methods*. Cellulose, 17 (4): 721-733.
- AKITA, K., HASEZAWA, S. and HIGAKI, T.** (2013). *Breaking of Plant Stomatal One-Cell-Spacing Rule by Sugar Solution Immersion*. Plos One, 8 (9): 1-5.
- ALKIO, M., JONAS, U., SPRINK, T., VAN NOCKER, S. and KNOCHE, M.** (2012). *Identification of putative candidate genes involved in cuticle formation in Prunus avium (sweet cherry) fruit*. Annals of Botany, 110 (1): 101-112.
- AULIO, K.** (1986). *Cam-Like Photosynthesis in Littorella-Uniflora (L) Aschers - the Role of Humidity*. Annals of Botany, 58 (2): 273-275.
- BAKKER, J. C.** (1991). *Effects of humidity on stomatal density and its relation to leaf conductance*. Scientia Horticulturae, 48 (3-4): 205-212.
- BAROLI, I., PRICE, G. D., BADGER, M. R. and VON CAEMMERER, S.** (2008). *The contribution of photosynthesis to the red light response of stomatal conductance*. Plant Physiology, 146 (2): 737-747.
- BARTHLOTT, W. and NEINHUIS, C.** (1997). *Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces*. Planta, 202 (1): 1-8.
- BARTHLOTT, W., NEINHUIS, C., CUTLER, D., DITSCH, F., MEUSEL, I., THEISEN, I. and WILHELMI, H.** (1998). *Classification and terminology of plant epicuticular waxes*. Botanical Journal of the Linnean Society, 126 (3): 237-260.
- BAUR, P. and SCHONHERR, J.** (1995). *Temperature-Dependence of the Diffusion of Organic-Compounds across Plant Cuticles*. Chemosphere, 30 (7): 1331-1340.
- BECKER, M., KERSTIENS, G. and SCHONHERR, J.** (1986). *Water permeability of plant cuticles: permeance, diffusion and partition coefficients*. Trees-Structure and Function, 1 (1): 54-60.
- BERRYMAN, C. A., EAMUS, D. and DUFF, G. A.** (1994). *Stomatal Responses to a Range of Variables in 2 Tropical Tree Species Grown with CO<sub>2</sub> Enrichment*. Journal of Experimental Botany, 45 (274): 539-546.
- BESSIRE, M., BOREL, S., FABRE, G., CARRACA, L., EFREMOVA, N., YEPHREMOV, A., CAO, Y., JETTER, R., JACQUAT, A. C., METRAUX, J. P. and 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.
- BOOM, A., DAMSTE, J. S. S. and DE LEEUW, J. W.** (2005). *Cutan, a common aliphatic biopolymer in cuticles of drought-adapted plants*. Organic Geochemistry, 36 (4): 595-601.
- BOYER, J. S.** (2015). *Turgor and the transport of CO<sub>2</sub> and water across the cuticle (epidermis) of leaves*. Journal of Experimental Botany, 66 (9): 2625-2633.
- BUSCHHAUS, C., HERZ, H. and JETTER, R.** (2007). *Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on the adaxial side of Ligustrum vulgare leaves*. New Phytologist, 176 (2): 311-316.

- CALDERA, H. I., DE COSTA, W. A., WOODWARD, F. I., LAKE, J. A. and RANWALA, S. M.** (2017). *Effects of elevated carbon dioxide on stomatal characteristics and carbon isotope ratio of Arabidopsis thaliana ecotypes originating from an altitudinal gradient*. *Physiologia Plantarum*, 159 (1): 74-92.
- CASSON, S. A., FRANKLIN, K. A., GRAY, J. E., GRIERSON, C. S., WHITELAM, G. C. and HETHERINGTON, A. M.** (2009). *Phytochrome B and PIF4 regulate stomatal development in response to light quantity*. *Current Biology*, 19 (3): 229-234.
- CASSON, S. A. and HETHERINGTON, A. M.** (2010). *Environmental regulation of stomatal development*. *Current Opinion of Plant Biology*, 13 (1): 90-95.
- DEEKEN, R., SAUPE, S., KLINKENBERG, J., RIEDEL, M., LEIDE, J., HEDRICH, R. and MUELLER, T. D.** (2016). *The Nonspecific Lipid Transfer Protein AtLtpI-4 Is Involved in Suberin Formation of Arabidopsis thaliana Crown Galls*. *Plant Physiology*, 172 (3): 1911-1927.
- DOHENY-ADAMS, T., HUNT, L., FRANKS, P. J., BEERLING, D. J. and GRAY, J. E.** (2012). *Genetic manipulation of stomatal density influences stomatal size, plant growth and tolerance to restricted water supply across a growth carbon dioxide gradient*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 367 (1588): 547-555.
- EIGENBRODE, S. D. and JETTER, R.** (2002). *Attachment to plant surface waxes by an insect predator*. *Integrative and Comparative Biology*, 42 (6): 1091-1099.
- ENGINEER, C. B., GHASSEMIAN, M., ANDERSON, J. C., PECK, S. C., HU, H. and SCHROEDER, J. I.** (2014). *Carbonic anhydrases, EPF2 and a novel protease mediate CO<sub>2</sub> control of stomatal development*. *Nature*, 513 (7517): 246-250.
- ENGINEER, C. B., HASHIMOTO-SUGIMOTO, M., NEGI, J., ISRAELSSON-NORDSTROM, M., AZOULAY-SHEMER, T., RAPPEL, W. J., IBA, K. and 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.
- EVANS, J. R., KALDENHOFF, R., GENTY, B. and TERASHIMA, I.** (2009). *Resistances along the CO<sub>2</sub> diffusion pathway inside leaves*. *Journal of Experimental Botany*, 60 (8): 2235-2248.
- EVANS, J. R. and VON CAEMMERER, S.** (1996). *Carbon Dioxide Diffusion inside Leaves*. *Plant Physiology*, 110 (2): 339-346.
- FARQUHAR, G. D., EHLERINGER, J. R. and HUBIC, K. T.** (1989). *Carbon isotope discrimination and photosynthesis*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 503-537.
- FARQUHAR, G. D., OLEARY, M. H. and BERRY, J. A.** (1982). *On the Relationship between Carbon Isotope Discrimination and the Inter-Cellular Carbon-Dioxide Concentration in Leaves*. *Australian Journal of Plant Physiology*, 9 (2): 121-137.
- FERNANDEZ, V. and EICHERT, T.** (2009). *Uptake of Hydrophilic Solutes Through Plant Leaves: Current State of Knowledge and Perspectives of Foliar Fertilization*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 28 (1-2): 36-68.
- FERNANDEZ, V., SANCHO-KNAPIK, D., GUZMAN, P., PEGUERO-PINA, J. J., GIL, L., KARABOURNIOTIS, G., KHAYET, M., FASSEAS, C., HEREDIA-GUERRERO, J. A., HEREDIA, A. and GIL-PELEGRIN, E.** (2014). *Wettability,*

- Polarity, and Water Absorption of Holm Oak Leaves: Effect of Leaf Side and Age.* Plant Physiology, 166 (1): 168-180.
- FIEBIG, A., MAYFIELD, J. A., MILEY, N. L., CHAU, S., FISCHER, R. L. and 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.
- FRANKS, P. J., DOHENY-ADAMS, T. W., BRITTON-HARPER, Z. J. and GRAY, J. E.** (2015). *Increasing water-use efficiency directly through genetic manipulation of stomatal density.* New Phytologist, 207 (1): 188-195.
- FROST-CHRISTENSEN, H., JOGENSEN, L. B. and FLOTO, F.** (2003). *Species specificity of resistance to oxygen diffusion in thin cuticular membranes from amphibious plants.* Plant Cell and Environment, 26 (4): 561-569.
- FUKUDA, H. and HIGASHIYAMA, T.** (2011). *Diverse Functions of Plant Peptides: Entering a New Phase.* Plant and Cell Physiology, 52 (1): 1-4.
- GAY, A. P. and HURD, R. G.** (1975). *The influence of light on stomatal density in the tomato.* New Phytologist, 75 (1): 37-46.
- GNIWOTTA, F., VOGG, G., GARTMANN, V., CARVER, T. L. W., RIEDERER, M. and JETTER, R.** (2005). *What do microbes encounter at the plant surface? Chemical composition of pea leaf cuticular waxes.* Plant Physiology, 139 (1): 519-530.
- GRACA, J., SCHREIBER, L., RODRIGUES, J. and PEREIRA, H.** (2002). *Glycerol and glyceryl esters of omega-hydroxyacids in cutins.* Phytochemistry, 61 (2): 205-215.
- GRAY, J. E., HOLROYD, G. H., VAN DER LEE, F. M., BAHRAMI, A. R., SIJMONS, P. C., WOODWARD, F. I., SCHUCH, W. and HETHERINGTON, A. M.** (2000). *The HIC signalling pathway links CO<sub>2</sub> perception to stomatal development.* Nature, 408 (6813): 713-716.
- GRNCAREVIC, M. and RADLER, F.** (1967). *The effect of wax components on cuticular transpiration-model experiments.* Planta, 75 (1): 23-27.
- HAN, S. K. and TORII, K. U.** (2016). *Lineage-specific stem cells, signals and asymmetries during stomatal development.* Development, 143 (8): 1259-1270.
- HARA, K., KAJITA, R., TORII, K. U., BERGMANN, D. C. and KAKIMOTO, T.** (2007). *The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule.* Genes & Development, 21 (14): 1720-1725.
- HARA, K., YOKOO, T., KAJITA, R., ONISHI, T., YAHATA, S., PETERSON, K. M., TORII, K. U. and KAKIMOTO, T.** (2009). *Epidermal Cell Density is Autoregulated via a Secretory Peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 in Arabidopsis Leaves.* Plant and Cell Physiology, 50 (6): 1019–1031.
- HEPWORTH, C., CAINE, R. S., HARRISON, E. L., SLOANT, J. and GRAY, J. E.** (2018). *Stomatal development: focusing on the grasses.* Current Opinion in Plant Biology, 41: 1-7.
- HOLROYD, G. H., HETHERINGTON, A. M. and GRAY, J. E.** (2002). *A role for the cuticular waxes in the environmental control of stomatal development.* New Phytologist, 153 (3): 433-439.
- HRONÍČEK, O.** (2019). *Je vývoj průduchů na listech huseníčku výsledkem komunikace epidermis s mezofylem nebo s kutikulou? Bakalářská práce: 44.*

- HONKOVÁ, M., WIESNEROVÁ, D., ŠIMKOVÁ, M., SKUPA, P., DEWITTE, W., VRÁBLOVÁ, M., ZAŽÍMALOVÁ, E. and ŠANTRŮČEK, J.** (2015). *Light-induced STOMAGEN-mediated stomatal development in Arabidopsis leaves*. *Journal of Experimental Botany*, 66 (15): 4621-4630.
- HUGHES, J., HEPWORTH, C., DUTTON, C., DUNN, J. A., HUNT, L., STEPHENS, J., WAUGH, R., CAMERON, D. D. and GRAY, J. E.** (2017). *Reducing Stomatal Density in Barley Improves Drought Tolerance without Impacting on Yield*. *Plant Physiology*, 174 (2): 776-787.
- HUNT, L., BAILEY, K. J. and GRAY, J. E.** (2010). *The signalling peptide EPFL9 is a positive regulator of stomatal development*. *New Phytologist*, 186 (3): 609-614.
- CHENG, G. P., HUANG, H., ZHOU, L. Y., HE, S. G., ZHANG, Y. J. and CHEN, X. A.** (2019). *Chemical composition and water permeability of the cuticular wax barrier in rose leaf and petal: A comparative investigation*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 135: 404-410.
- IDRIS, A., LINATOC, A. C., ALIYU, A. M., MUHAMMAD, S. M., BAKAR, M. F. B. A. and** (2018). *Effect of Light on the Photosynthesis, Pigment Content and Stomatal Density of Sun and Shade Leaves of Vernonia Amygdalina*. *International Journal of Engineering & Technology*, 7 (4.30): 209-212
- IDRIS, A., LINATOC, A. C. and BAKKAR, M. F. B. A.** (2019). *Effect of light intensity on the photosynthesis and stomatal density of selected plant species of Gunung Ledang, Johor*. *Malaysian Applied Biology*, 48 (3): 133–140.
- JEFFREE, C. E.** (1996). *Structure and ontogeny of plant cuticles*. In: *BIRD, S. M. and GRAY, J. E. ed. Signal from the cuticle affect epidermal cell differentiation*. *New Phytologist*, 157 (1): 9-23.
- JENKS, M. A., ANDERSEN, L., TEUSINK, R. S. and WILLIAMS, M. H.** (2001). *Leaf cuticular waxes of potted rose cultivars as affected by plant development, drought and paclobutrazol treatments*. *Physiologia Plantarum*, 112 (1): 62-70.
- JENKS, M. A., TUTTLE, H. A., EIGENBRODE, S. D. and FELDMANN, K. A.** (1995). *Leaf Epicuticular Waxes of the Eceriferum Mutants in Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 108 (1): 369-377.
- JEWARIA, P. K., HARA, T., TANAKA, H., KONDO, T., BETSUYAKU, S., SAWA, S., SAKAGAMI, Y., AIMOTO, S. and KAKIMOTO, T.** (2013). *Differential effects of the peptides Stomagen, EPF1 and EPF2 on activation of MAP kinase MPK6 and the SPCH protein level*. *Plant and Cell Physiology*, 54 (8): 1253-1262.
- JOUBES, J., RAFFAELE, S., BOURDENX, B., GARCIA, C., LAROCHE-TRAINEAU, J., MOREAU, P., DOMERGUE, F. and 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. and 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.

- KOLATTUKUDY, P. E.** (1970). *Biosynthesis of a lipid polymer, cutin: the structural component of plant cuticle*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 41 (2): 299-305.
- KRAUSS, P., MARKSTADTER, C. and RIEDERER, M.** (1997). *Attenuation of UV radiation by plant cuticles from woody species*. Plant, Cell and Environment, 20 (8): 1079-1085.
- LAKE, J. A., QUICK, W. P., BEERLING, D. J. and WOODWARD, F. I.** (2001). *Plant development - Signals from mature to new leaves*. Nature, 411 (6834): 154-154.
- LAKE, J. A. and WADE, R. N.** (2009). *Plant-pathogen interactions and elevated CO<sub>2</sub>: morphological changes in favour of pathogens*. Journal of Experimental Botany, 60 (11): 3123-3131.
- LAWSON, T.** (2009). *Guard cell photosynthesis and stomatal function*. New Phytologist, 181 (1): 13-34.
- LEE, L. R. and BERGMANN, D. C.** (2019). *The plant stomatal lineage a glance*. Journal of Cell Science, 132 (8): 1-6.
- LEE, S. H., TEWARI, R. K., HAHN, E. J. and PAEK, K. Y.** (2007). *Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of Withania Somnifera (L.) Dunal. plantlets*. Plant cell tissue and organ culture, 90 (2): 141-151
- LENDZIAN, K. J., NAKAJIMA, A. and ZIEGLER, H.** (1986). *Isolation of cuticular membranes from various conifer needles*. Trees-Structure and Function, 1 (1): 47-53.
- LOKESH, U., KIRANMAI, K., PANDURANGAIAH, M., SUDHAKARBABU, O., NARESHKUMAR, A. and SUDHAKAR, C.** (2013). *Role of Plant Fatty acid Elongase (3 keto acyl-CoA Synthase) gene in Cuticular Wax Biosynthesis*. Research and Reviews: Journal of Agriculture and Allied sciences, 2 (4): 35-42.
- LOMAX, B. H., WOODWARD, F. I., LEITCH, I. J., KNIGHT, C. A. and LAKE, J. A.** (2009). *Genome size as a predictor of guard cell length in Arabidopsis thaliana is independent of environmental conditions*. New Phytologist, 183 (2): 496-496.
- LOPEZ-CASADO, G., MATAS, A. J., DOMINGUEZ, E., CUARTERO, J. and HEREDIA, A.** (2007). *Biomechanics of isolated tomato (Solanum lycopersicum L.) fruit cuticles: the role of the cutin matrix and polysaccharides*. Journal of Experimental Botany, 58 (14): 3875-3883.
- MILLAR, A. A., CLEMENS, S., ZACHGO, S., GIBLIN, E. M., TAYLOR, D. C. and 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.
- MOMMER, L. and VISSER, E. J. W.** (2005). *Underwater photosynthesis in flooded terrestrial plants: A matter of leaf plasticity*. Annals of Botany, 96 (4): 581-589.
- NEINHUIS, C. and BARTHLOTT, W.** (1997). *Characterization and distribution of water-repellent, self-cleaning plant surfaces*. Annals of Botany, 79 (6): 667-677.
- NGUYEN, V. N. T., LEE, S. B., SUH, M. C., AN, G. and JUNG, K. H.** (2018). *OsABCG9 Is an Important ABC Transporter of Cuticular Wax Deposition in Rice*. Frontiers in Plant Science, 9: 1-11.

- NUNES, T. D. G., ZHANG, D. and RAISSIG, M. T.** (2019). *Form, development and function of grass stomata*. *Plant Journal*, 101 (4): 780-799.
- OHASHI-ITO, K. and BERGMANN, D. C.** (2006). *Arabidopsis FAMA controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development*. *Plant Cell*, 18 (10): 2493-2505.
- PAOLETTI, E., NOURRISSON, G., GARREC, J. P. and RASCHI, A.** (1998). *Modifications of the leaf surface structures of Quercus ilex L. in open, naturally CO<sub>2</sub>-enriched environments*. *Plant, Cell and Environment*, 21 (10): 1071–1075.
- PESACRETA, T. C. and HASENSTEIN, K. H.** (1999). *The internal cuticle of Cirsium horridulum (Asteraceae) leaves*. *American Journal of Botany*, 86 (7): 923-928.
- PETERS, W., VAN DER VELDE, I. R., VAN SCHAIK, E., MILLER, J. B., CIAIS, P., DUARTE, H. F., VAN DER LAAN-LUIJKX, I. T., VAN DER MOLEN, M. K., SCHOLZE, M., SCHAEFER, K., VIDALE, P. L., VERHOEF, A., WARLIND, D., ZHU, D., TANS, P. P., VAUGHN, B. and WHITE, J. W. C.** (2018). *Increased water-use efficiency and reduced CO<sub>2</sub> uptake by plants during droughts at a continental scale*. *Nature Geoscience*, 11 (10): 744-748.
- PETERSON, K. M., RYCHEL, A. L. and 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.
- PETRUSCHKE, C.** (2019). *Cutin, wax and stomatal mutants of Arabidopsis thaliana: chemical and physiological analysis of the leaf barrier properties*. Dissertation thesis: 99.
- PHILIPPE, G., GENEIX, N., PETIT, J., GUILLON, F., SANDT, C., ROTHAN, C., LAHAYE, M., MARION, D. and BAKAN, B.** (2020). *Assembly of tomato fruit cuticles: a cross-talk between the cutin polyester and cell wall polysaccharides*. *New Phytologist*, 226 (3): 809-822.
- PIGHIN, J. A., ZHENG, H. Q., BALAKSHIN, L. J., GOODMAN, I. P., WESTERN, T. L., JETTER, R., KUNST, L. and SAMUELS, A. L.** (2004). *Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter*. *Science*, 306 (5696): 702-704.
- POLLARD, M., BEISSON, F., LI, Y. H. and OHLROGGE, J. B.** (2008). *Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin*. *Trends in Plant Science*, 13 (5): 236-246.
- PULSIFER, I. P., KLUGE, S. and 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.
- QI, X. and TORII, K. U.** (2018). *Hormonal and environmental signals guiding stomatal development*. *BMC Biology*, 16 (1): 21.
- RADOGLOU, K. M. and JARVIS, P. G.** (1990). *Effects of CO<sub>2</sub> Enrichment on Four Poplar Clones. 1. Growth and Leaf Anatomy*. *Annals of Botany*, 65 (6): 617-626.
- REED, D., W. and TUKEY, H., B.** (1982). *Light intensity and temperature effects on epicuticular wax morphology and internal cuticle ultrastructure of carnation dianthus caryophyllus and brussels sprouts brassica oleracea leaf cuticles*. *Journal of the American society for horticultural science*, 107 (3): 417-420.

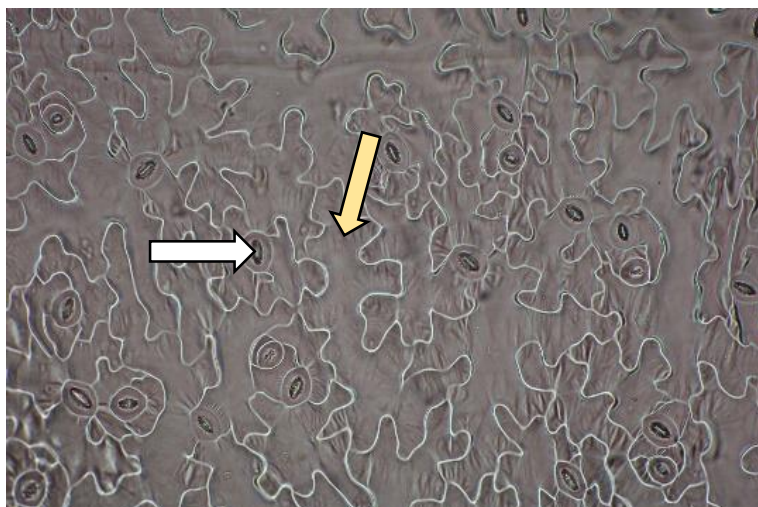


- RIEDERER, M. and SCHREIBER, L.** (2001). *Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles*. *Journal of Experimental Botany*, 52 (363): 2023-2032.
- RICHARDSON, F., BRODRIBB, T. J. and JORDAN, G. J.** (2017). *Amphistomatic leaf surfaces independently regulate gas exchange in response to variations in evaporative demand*. *Tree Physiology*, 37 (7): 869-878.
- RUDALL, P. J., CHEN, E. D. and CULLEN, E.** (2017). *Evolution and development of monocot stomata*. *American Journal of Botany*, 104 (8): 1122-1141.
- SAMPANGI-RAMAIAH, M. H., RAVISHANKAR, K. V., SHIVASHANKAR, K. S., ROY, T. K., REKHA, A. and HUNASHIKATTI, L. R.** (2019). *Developmental changes in the composition of leaf cuticular wax of banana influenced by wax biosynthesis gene expression: a case study in *Musa acuminata* and *Musa balbisiana**. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41 (8): 141.
- SAND-JENSEN, K. and FROST-CHRISTENSEN, H.** (1998). *Photosynthesis of amphibious and obligately submerged plants in CO<sub>2</sub>-rich lowland streams*. *Oecologia*, 117 (1-2): 31-39.
- SANCHEZ-FERNANDEZ, R., DAVIES, T. G. E., COLEMAN, J. O. D. and REA, P. A.** (2001). *The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory*. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (32): 30231-30244.
- SERNA, L.** (2011). *Stomatal development in *Arabidopsis* and grasses: differences and commonalities*. *International Journal of Developmental Biology*, 55 (1): 5-10.
- SERNA, L. and FENOLL, C.** (2002). *Reinforcing the idea of signalling in the stomatal pathway*. *Trends in Genetics*, 18 (12): 597-600.
- SERRANO, M., COLUCCIA, F., TORRES, M., L'HARIDON, F. and METRAUX, J. P.** (2014). *The cuticle and plant defense to pathogens*. *Frontiers in Plant Science*, 5: 274.
- SHTAIN, I., SHELEF, Y., MAROM, Z., ZELINGER, E., SCHWARTZ, A., POPPER, Z. A., BAR-ON, B. and HARPAZ-SAAD, S.** (2017). *Stomatal cell wall composition: distinctive structural patterns associated with different phylogenetic groups*. *Annals of Botany*, 119 (6): 1021-1033.
- SCHNURR, J., SHOCKEY, J. and BROWSE, J.** (2004). *The acyl-CoA synthetase encoded by *LACS2* is essential for normal cuticle development in *Arabidopsis**. *Plant Cell*, 16 (3): 629-642.
- SCHÖNHERR, J. and RIEDERER, M.** (1986). *Plant cuticles sorb lipophilic compounds during enzymatic isolation*. *Plant, Cell and Environment*, 9 (6): 459-466.
- SCHREIBER, L. and RIEDERER, M.** (1996). *Ecophysiology of cuticular transpiration: Comparative investigation of cuticular water permeability of plant species from different habitats*. *Oecologia*, 107 (4): 426-432.
- SCHREIBER, L., SKRABS, M., HARTMANN, K. D., DIAMANTOPOULOS, P., ŠIMÁŇOVÁ, E. and ŠANTRŮČEK, J.** (2001). *Effect of humidity on cuticular water permeability of isolated cuticular membranes and leaf disks*. *Planta*, 214 (2): 274-282.
- SUGANO, S. S., SHIMADA, T., IMAI, Y., OKAWA, K., TAMAI, A., MORI, M. and HARA-NISHIMURA, I.** (2010). *Stomagen positively regulates stomatal density in *Arabidopsis**. *Nature*, 463 (7278): 241-244.

- ŠANTRŮČEK, J., ŠANTRŮČKOVÁ, H., KAŠTOVSKÁ, E., KVĚTOŇ, J. and TAHOVSKÁ, K.** (2014a). *Stabilní izotopy a jejich použití v biologii a ekologii*. In: *UHLÍK - Frakcionace izotopů uhlíku při fotosyntéze aneb proč jsme ochuzeni o těžký izotop uhlíku?*, 19-31 České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- ŠANTRŮČEK, J., VRÁBLOVÁ, M., ŠIMKOVÁ, M., HRONKOVÁ, M., DRTINOVÁ, M., KVĚTOŇ, J., VRÁBL, D., KUBÁSEK, J., MACKOVÁ, J., WIESNEROVÁ, D., NEUWITHOVÁ, J. and SCHREIBER, L.** (2014b). *Stomatal and pavement cell density linked to leaf internal CO<sub>2</sub> concentration*. *Annals of Botany*, 114 (2): 191-202.
- TAKATA, N., YOKOTA, K., OHKI, S., MORI, M., TANIGUCHI, T. and KURITA, M.** (2013). *Evolutionary Relationship and Structural Characterization of the EPF/EPFL Gene Family*. *Plos One*, 8 (6).
- TANAKA, Y., SUGANO, S. S., SHIMADA, T. and HARA-NISHIMURA, I.** (2013). *Enhancement of leaf photosynthetic capacity through increased stomatal density in Arabidopsis*. *New Phytologist*, 198 (3): 757-764.
- TERASHIMA, I., HANBA, Y. T., TAZOE, Y., VYAS, P. and YANO, S.** (2006). *Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO<sub>2</sub> diffusion*. *Journal of Experimental Botany*, 57 (2): 343-354.
- TERASHIMA, I. and ONO, K.** (2002). *Effects of HgCl<sub>2</sub> on CO<sub>2</sub> Dependence of Leaf Photosynthesis: Evidence Indicating Involvement of Aquaporins in CO<sub>2</sub> Diffusion across the Plasma Membrane*. *Plant and Cell Physiology*, 43 (1): 70-78.
- TOMIMATSU, H., IIO, A., ADACHI, M., SAW, L. G., FLETCHER, C. and TANG, Y.** (2014). *High CO<sub>2</sub> concentration increases relative leaf carbon gain under dynamic light in Dipterocarpus sublamellatus seedlings in a tropical rain forest, Malaysia*. *Tree Physiology*, 34 (9): 944-954.
- VOGG, G., FISCHER, S., LEIDE, J., EMMANUEL, E., JETTER, R., LEVY, A. A. and RIEDERER, M.** (2004). *Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid beta-ketoacyl-CoA synthase*. *Journal of Experimental Botany*, 55 (401): 1401-1410.
- VON CAEMMERER, S.** (2013). *Steady-state models of photosynthesis*. *Plant, Cell and Environment*, 36 (9): 1617-1630.
- VRÁBLOVÁ, M., VRÁBL, D., HRONKOVÁ, M., KUBÁSEK, J. and ŠANTRŮČEK, J.** (2017). *Stomatal function, density and pattern, and CO<sub>2</sub> assimilation in Arabidopsis thaliana tmm1 and sdd1-1 mutants*. *Plant Biology*, 19 (5): 689-701.
- WEN, M., BUSCHHAUS, C. and JETTER, R.** (2006). *Nanotubules on plant surfaces: Chemical composition of epicuticular wax crystals on needles of Taxus baccata L.* *Phytochemistry*, 67 (16): 1808-1817.
- WOODWARD, F. I. and KELLY, C. K.** (1995). *The Influence of CO<sub>2</sub> concentration on stomatal density*. *New Phytologist*, 131 (3): 311-327.
- XU, Z. and ZHOU, G.** (2008). *Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass*. *Journal of Experimental Botany*, 59 (12): 3317-3325.

- YANG, M. and SACK, F. D.** (1995). *The too many mouths and four lips mutations affect stomatal production in Arabidopsis*. Plant Cell, 7 (12): 2227-2239.
- YANG, Y. Q., ZHOU, B., ZHANG, J., WANG, C., LIU, C. H., LIU, Y. L., ZHU, X. B. and REN, X. L.** (2017). *Relationships between cuticular waxes and skin greasiness of apples during storage*. Postharvest Biology and Technology, 131: 55-67.
- YEATS, T. H. and ROSE, J. K. C.** (2013). *The Formation and Function of Plant Cuticles*. Plant Physiology, 163 (1): 5-20.
- YEPHREMOV, A., WISMAN, E., HUIJSER, P., HUIJSER, C., WELLESEN, K. and SAEDLER, H.** (1999). *Characterization of the FIDDLEHEAD gene of Arabidopsis reveals a link between adhesion response and cell differentiation in the epidermis*. Plant Cell, 11 (11): 2187-2201.
- YUANYUAN, L., JIAJIA, X., NOOR, U. H., HUI, Z. and XIN-GUANG, Z.** (2014). *Was low CO<sub>2</sub> a driving force of C4 evolution: Arabidopsis responses to long-term low CO<sub>2</sub> stress*. Journal of Experimental Botany, 65 (3): 3657–3667.
- ZEISLER-DIEHL, V., MULLER, Y. and 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.
- ZEISLER, V. and SCHREIBER, L.** (2016). *Epicuticular wax on cherry laurel (Prunus laurocerasus) leaves does not constitute the cuticular transpiration barrier*. Planta, 243 (1): 65-81.

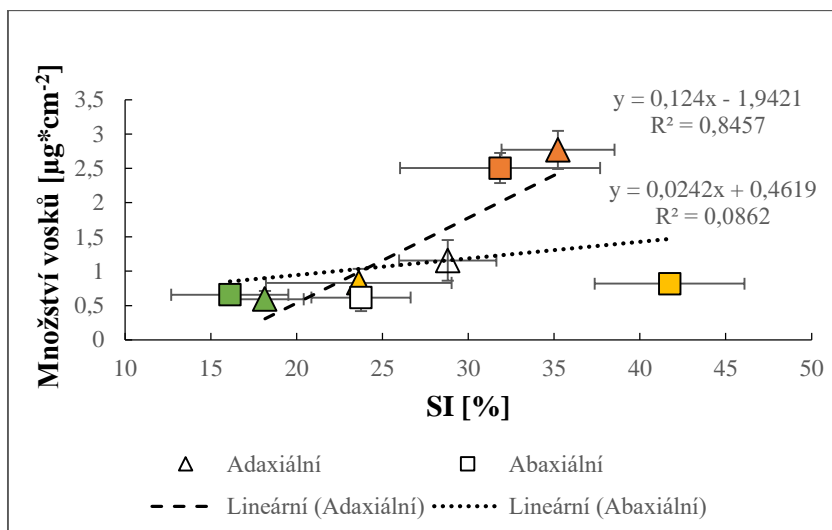
## 11 Přílohy



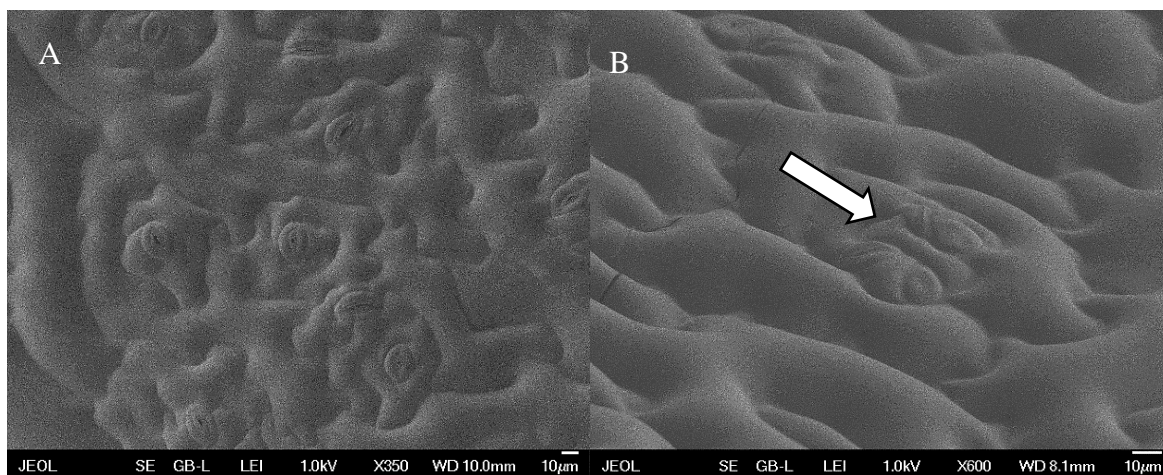
**Obr. P1:** 500x zvětšený otisk spodní strany listu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Bílá šipka ukazuje na průduch, žlutá na dlaždicovou buňku (PvC) v pokožce listu.



**Obr. P2:** Hrách (*Pisum*) vystavený (zleva) vysoké ( $450 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), kontrolní ( $250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) a nízké ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) ozáření.

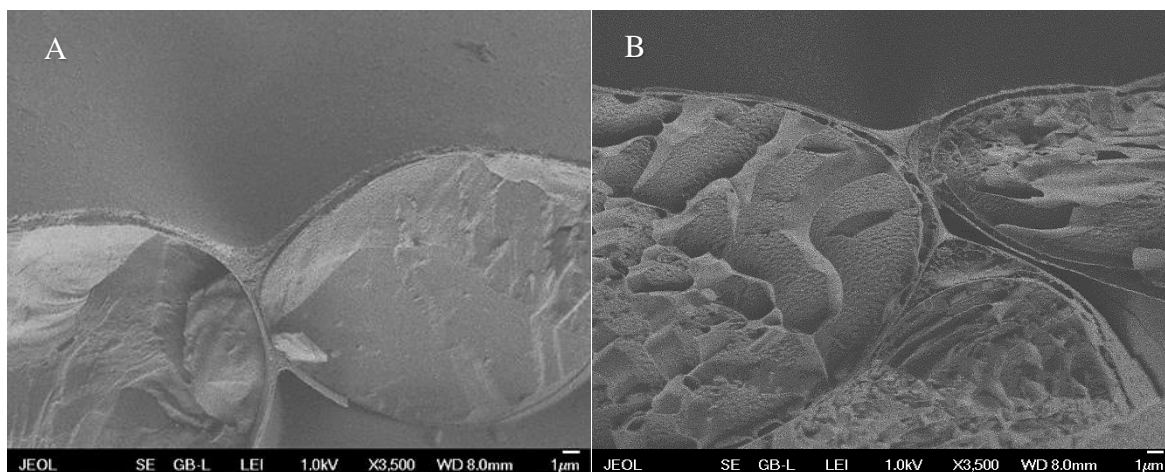


**Obr. P3:** Závislost množství vosků v příslušné kutikule na průduchovém indexu (SI) na horní (adaxiální) a dolní (abaxiální) straně listu u mutantů s různým podílem průduchů díky mutaci v genech řídících vývoj průduchů (*tmm* – žlutě, *epf1,2* – oranžově; *StRNAi* – zeleně) a divoké formy (Col-0 – bíle) huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Značky představují průměrné hodnoty (n=3, kde n je počet směsných biologických vzorků pro analýzu vosků, n = 15-26, kde n je počet analyzovaných ploch u SI). Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku od průměru (s. d.). Výpočet hodnot  $SI = SD/(SD+PvCD) \times 100$ .  $R^2$  je koeficient determinace.

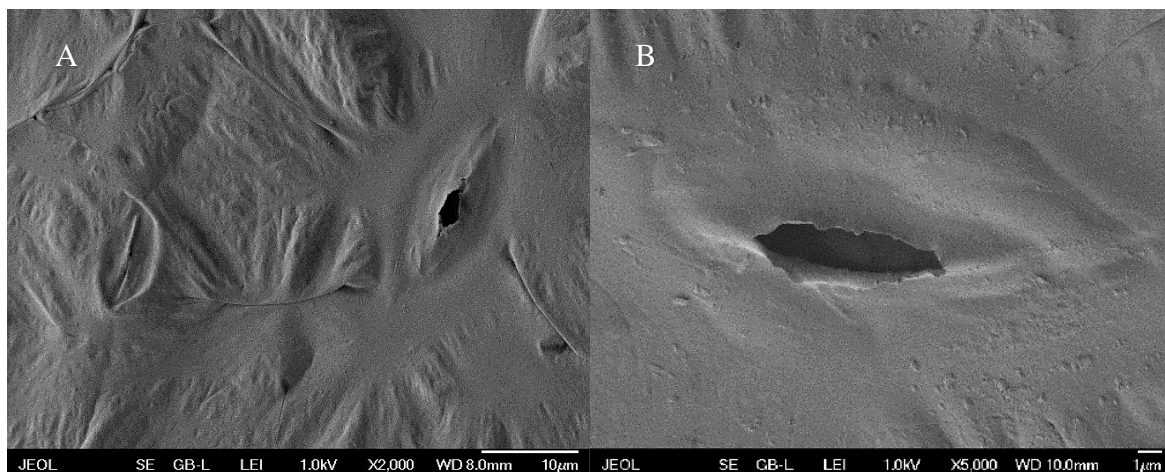


**Obr. P4:** Snímky z Kryo-elektronové mikroskopie (FESEM) po sublimaci ukazují povrch listu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Nepravidelné rozmístění průduchů u divoké formy huseníčku (Col-0) (A) (350x zvětšeno), šipka ukazuje průduchový klastř na dolní (abaxiální) straně listu „průduchového“ mutantu *tmm* huseníčku (B) (600x zvětšeno).





**Obr. P5:** Snímky z Kryo-elektronové mikroskopie (FESEM) po sublimaci. Lom listem huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Na obrázku A je zobrazen lom listu huseníčku Col-0. Další obrázek B znázorňuje lom listem u „průduchového“ mutanta *epf1,2*. Zvětšeno 3500x.



**Obr. P6:** Snímky izolované kutikuly z Kryo-elektronové mikroskopie (FESEM) po sublimaci a pokovení u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*, Col-0). Na obrázku A je zobrazena izolovaná kutikula huseníčku (zvětšeno 2000x) a na obrázku B detail průduchu (zvětšeno 5000x).



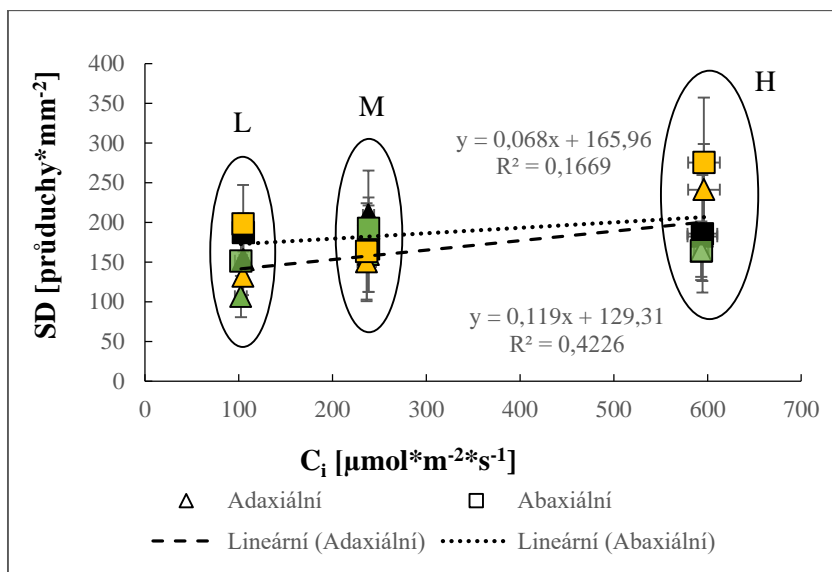
**Obr. P7:** Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) pěstovaný na (zleva) nízké ( $200 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), kontrolní ( $400 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) a vysoké ( $800 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) koncentraci  $\text{CO}_2$  ve vzduchu.



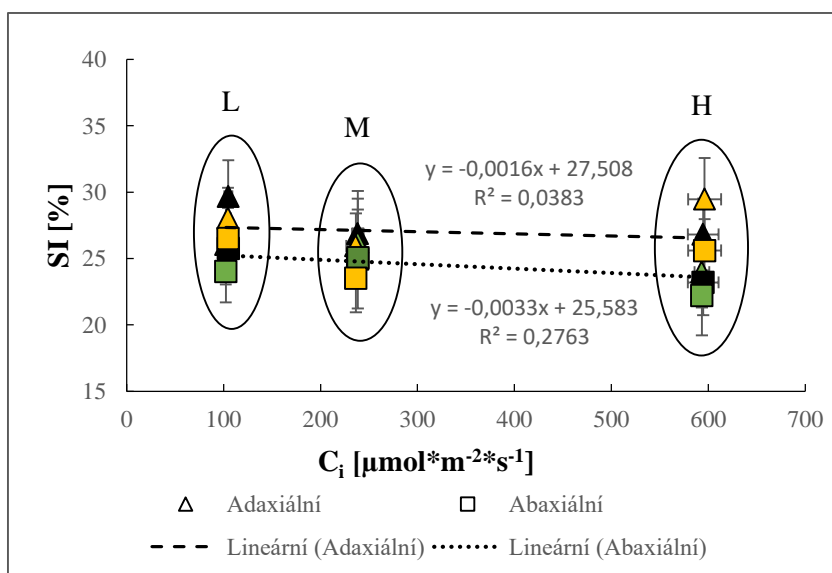
**Obr. P8:** *hic* mutant huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) vystavený (zleva) nízké ( $200 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), kontrolní ( $400 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) a vysoké ( $800 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) koncentraci  $\text{CO}_2$  ve vzduchu.



**Obr. P9:** Květináče se SAIL mutanty huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) pěstované na třech různých koncentracích  $\text{CO}_2$  ve vzduchu – (zleva) na nízké ( $200 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), kontrolní ( $400 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) a vysoké ( $800 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).



**Obr. P10:** Závislost hustoty průduchů (SD) na vnitřní koncentraci CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) pěstovaného při třech rozdílných atmosférických koncentracích CO<sub>2</sub> (L – 200 μmol\**mol*<sup>-1</sup>, M – 400 μmol\**mol*<sup>-1</sup>, H – 800 μmol\**mol*<sup>-1</sup>) a fotoperiodě 12 hodin den a 12 hodin noc (Col-0 černá barva, *hic* zelená, SAIL žlutá barva). Značky představují průměrné hodnoty (n = 3, kde n je počet směsných biologických vzorků pro analýzu vosků, n = 20-25, kde n je počet analyzovaných ploch u SD). Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku od průměru (s. d.). R<sup>2</sup> je koeficient determinace.



**Obr. P11:** Závislost průduchového indexu (SI) na vnitřní koncentraci CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) pěstovaného při třech rozdílných atmosférických koncentracích CO<sub>2</sub> (L – 200 μmol\**mol*<sup>-1</sup>, M – 400 μmol\**mol*<sup>-1</sup>, H – 800 μmol\**mol*<sup>-1</sup>) a fotoperiodě 12 hodin den a 12 hodin noc (Col-0 černá barva, *hic* zelená, SAIL žlutá barva). Značky představují průměrné hodnoty (n = 3, kde n je počet směsných biologických vzorků pro analýzu vosků, n = 20-25, kde n je



počet analyzovaných ploch u SI). Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku od průměru (s. d.).  
Výpočet hodnot  $SI = SD/(SD+PvCD) \times 100$ .  $R^2$  je koeficient determinace.