Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Dynamika obnovy epikutikulárních vosků na listech rostlin *Clusia rosea*

Diplomová práce

Bc. Tereza Kalistová

Školitel: prof. Ing. Jiří Šantrůček, CSc.

České Budějovice 2021

Kalistová, T., 2021: Dynamika obnovy epikutikulárních vosků na listech rostlin *Clusia rosea*. [Regeneration dynamic of epicuticular waxes on the *Clusia rosea* leaves. Mgr. Thesis, in Czech] – 91 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The cuticle, a thin extracellular layer on the aboveground surface of terrestrial plants, is the first physical barrier between the plant and the outer environment. It consists of a polyester cutin matrix and a mixture of cuticular waxes in two forms. Epicuticular waxes (EW) are placed on the outermost surface of plants and intracuticular waxes (IW) are embedded in the cutin matrix alongside the cell wall. The main aim of this study was to elucidate whether the epicuticular waxes of *Clusia rosea* are synthesized both in young and mature leaves, whether the rate of wax synthesis differ between these two types of leaves, and whether the rate of wax synthesis differ after the disruption of EW takes place.

Prohlašuji, že svoji magisterskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své magisterskou práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou Univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 Tcheses.cz, provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, dne 8.12. 2021 .....

Tereza Kalistová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli prof. Jiřímu Šantrůčkovi za vedení mé práce, trpělivost, inspirativní připomínky a podněty. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Jiřímu Kubáskovi za podnětné poznámky, zaškolení do různých metod i programů a ochotu pomoc, Mgr. Jitce Neuwirthové za předání důležitých poznatků, ochotu pomoc a podporu, Ing. Martinu Jandovi Ph. D. za konzultaci kapitoly o patogenech, Mgr. Ladislavu Markovi za provádění izotopových analýz, Ing. Petře Fialové za pomoc při pěstování a sázení rostlin a celému u kolektivu laboratoře katedry experimentální biologie rostlin. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK **1**

ÚVOD **3**

1. KUTIKULA **4**

1.1 VÝVOJ KUTIKULY BĚHEM EVOLUCE 5

1.2 STRUKTURA KUTIKULY 7

1.3 SLOŽENÍ KUTIKULY 8

1.3.1 Kutin *8*

1.3.2 Kutikulární vosky *9*

1.3.3 Kutan *11*

1.4 FUNKCE KUTIKULY 11

1.4.1 Ochrana před abiotickými stresovými faktory *12*

1.4.2 Bariéra proti cizorodým organismům *14*

1.4.3 Úloha kutikuly při mezibuněčných interakcích *19*

1.5 BIOSYNTÉZA KUTIKULY 21

1.5.1 De novo syntéza FA v plastidech *22*

1.5.2 Elongace lipidů v endoplazmatickém retikulu *24*

1.5.3 Doprava na povrch kutikulární membrány *28*

1.6 OBNOVA A OBMĚNA SLOŽEK KUTIKULÁRNÍ MEMBRÁNY 33

1.7 METODY EXTRAKCE EPIKUTIKULÁRNÍCH VOSKŮ 35

2 STABILNÍ IZOTOPY UHLÍKU A JEJICH ANALÝZY **35**

2.1 DISKRIMINACE IZOTOPU ^{13}C ROSTLINAMI 36

2.2 IZOTOPOVÉ ANALÝZY ZASTOUPENÍ ^{13}C 37

2.3 VÝPOČTY RYCHLOSTI OBRATU ^{13}C 39

2.4 VÝPOČTY RYCHLOSTI OBRATU ^{13}C V PLETIVECH A EW ZNAČENÝCH LISTŮ 40

2.5 VÝPOČTY FRAKCE ^{13}C V PLETIVECH LISTU A EW 41

CÍLE PRÁCE **43**

3 MATERIÁL A METODY **43**

3.1 ROSTLINNÝ MATERIÁL 43

3.2 ZNAČENÍ IZOTOPEM ^{13}C 45

3.2.1 Postupné odběry ^{13}C značených listů *46*

3.2.2 Izolace kutikul a zjištění hustoty průduchů *47*

3.2.3 Izolace epikutikulárních vosků a jejich příprava na izotopovou analýzu *48*

3.2.4 Listová pletiva *48*

3.2.5 Izotopové analýzy *49*

3.2.6 Gazometrická měření *49*

3.3 SROVNÁNÍ RELATIVNÍHO ZASTOUPENÍ UHLÍKU ($\Delta^{13}C$) V EPIKUTIKULÁRNÍCH VOSCÍCH *BRASSICA OLERACEA* VAR. *ITALICA* A *CLUSIA ROSEA* 50

3.3.1 Statistické vyhodnocení *50*

4 VÝSLEDKY **51**
4.1 OBNOVA EPIKUTIKULÁRNÍCH VOSKŮ NA LISTECH *CLUSIA ROSEA* 51
4.1.1 Stáří odebíraných listů a SD *51*
4.1.2 Hmotnost kutikulární matrix na plochu listu *52*
4.1.3 Relativní zastoupení uhlíku ^{13}C ($\delta^{13}C$) v pletivech listů *53*
4.1.4 Relativní zastoupení uhlíku ($\delta^{13}C$) v epikutikulárních voscích *54*
4.1.5 Rychlost obratu C v pletivech značených listů *56*
4.1.6 Rychlost obratu ^{13}C v EW *57*
4.1.7 Frakce ^{13}C v pletivech listu *58*
4.1.8 Frakce ^{13}C v epikutikulárních voscích *59*
4.1.9 Tok uhlíku do epikutikulárních vosků *61*
4.1.10 Poměr uhlíku asimilovaného fotosyntézou přeneseného do EW *61*
4.1.11 Světelná křivka fotosyntézy *62*
4.1.12 Porovnání vypočtené a změřené rychlosti fotosyntézy *64*
4.2 SROVNÁNÍ RELATIVNÍHO ZASTOUPENÍ UHLÍKU ($\Delta^{13}C$) V EPIKUTIKULÁRNÍCH VOSCÍCH *BRASSICA OLERACEA* VAR. *ITALICA* A *CLUSIA ROSEA* 65
5 DISKUSE **67**
ZÁVĚR **71**
LITERATURA **72**
PŘÍLOHY **88**

Seznam použitých zkratek

Zkratka	Název	Jednotka
VLC	very-long-chain – složky kutikuly s velmi dlouhým uhlíkovým řetězcem (více než 20 uhlíků)	-
VLCFA	very-long-chain fatty acid– mastné kyseliny s velmi dlouhým uhlíkovým řetězcem (více než 20 uhlíků)	-
ROS	reactive oxygen species – reaktivní formy kyslíku	-
ABA	abscisic acid – rostlinný fytohormon kyselina abscisová	-
EW	Epicuticular waxes – epikutikulární vosky	-
IW	Intracuticular waxes – intrakutikulární vosky	-
MX	Kutinová matrix	-
FA	Fatty acids – mastné kyseliny	-
SD	Stomatal density	mm^{-2}
^{12}C, ^{13}C	stabilní izotopy uhlíku lišící se obsahem 1 neutronu	-
δ	relativní zastoupení izotopu, vyjadřující množství izotopu vzhledem ke standardu	‰
at%	procentuální zastoupení minoritního stabilního izotopu ve vzorku	%
$t_{1/2}$	poločas obratu uhlíku, tedy čas potřebný na výměnu 50% uhlíkových atomů v zásobníku	h
τ	průměrná doba zdržení, tedy čas, který stráví průměrný atom uhlíku v zásobníku	h
k	rychlostní konstanta udávající ztrátu značky ^{13}C	-
F_{t_pl}	frakce ^{13}C v pletivech listu udává relativní obsahu uhlíku ^{13}C v pletivech, tedy podíl izotopu uhlíku ^{13}C na celkovém obsahu uhlíku v biomase listu získaného rostlinnými pletivy ze sta procent obohacené atmosféry (zdroje) o ^{13}C	-
F_{t_EW}	frakce ^{13}C v epikutikulárních voscích listu udává relativní obsahu uhlíku ^{13}C v epikutikulárních voscích, tedy tedy podíl izotopu uhlíku ^{13}C na celkovém obsahu uhlíku v EW listu získaného z rostlinných pletiv	-

A	fixace CO_2 odpovídající rychlosti čisté fotosyntézy	$\mu gC \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ $\mu mol\ (CO_2) \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$
D	tok uhlíku z listu do epikutikulárních vosků	$\mu gC \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$
D/A	poměr uhlíku asimilovaného fotosyntézou a přeneseného do epikutikulárních vosků	%
LMA	leaf mass per area - průměrná hmotnostní plocha listu, tedy hmotnost sušiny pletiv listu na plochu listu	$g/\ cm^2$
WaxMA	wax mass per area - průměrná hmotnost EW na plochu listu	$g/\ cm^2$

Úvod

Suchozemské rostliny (Embryophyta) se vyvinuly ze zelených řas (*Charophyceae*) (Waters, 2003; Niklas et al., 2010) a poprvé vystoupily na souš asi před 450 až 500 miliony lety (Niklas et al., 2017; Bhanot et al., 2021). Od té doby kolonizovaly většinu terestrických prostředí a významně pozměnily geochemické složení planety, atmosféry i ekologii na Zemi (Delwiche et al., 2015; Philippe et al., 2020). S výstupem na souš se rostliny musely vyrovnat s novými podmínkami okolního prostředí jako například vystavení UV záření, teplotním výkyvům, větru a zejména vysychání. Výstup na souš byl proto podmíněn vznikem několika evolučních novinek umožňujících kontrolovanou výměnu plynů a vody mezi rostlinou a okolním prostředím (Philippe et al., 2020) a fungování rostlin v homoiohydrickém stavu (Edwards, 1993). Tedy ve stavu, kdy rostliny udržují poměrně stabilní vodní prostředí uvnitř svého těla a nejsou tolik závislé na aktuálním množství vody v okolním prostředí. Mezi nová evoluční řešení umožňující výstup na souš patří především hydrofobní kutikula a regulovatelné průduchy usměrňující příjem a výdej vody. Dále také vodivá pletiva (xylém a floém) a mezibuněčné prostory zajišťující rozvod a dostupnost vody i v ní rozpuštěných látek a udržení stabilního vodního prostředí uvnitř těla rostlin (Edwards, 1993).

Hydrofobní kutikula se vytváří na vnějším povrchu především nadzemních částí rostlin a tvoří rozhraní rostliny a okolního prostředí. Tato práce se zabývá obnovou její nejzevnější části, tedy epikutikulárních vosků, během života listu. Ptá se na to, zda k obnově epikutikulárních vosků dochází nejen během mládí listu, ale také v pozdějších fázích vývoje listu. Byly formulovány tři základní hypotézy:

a) K obnově epikutikulárních vosků dochází po celou dobu života listu, tedy i u plně vyvinutých dospělých listů.

b) Obnova epikutikulárních vosků je u mladých listů rychlejší, protože u mladých listů stále ještě probíhá aktivně vývoj celého listu.

c) Odstranění vrstvy epikutikulárních vosků z listu rostlin urychlí obnovu epikutikulárních vosků.

1. Kutikula

Kutikula je extracelulární hydrofobní membrána vyskytující se na povrchu nadzemních částí rostlin. Přikrývá vnější buněčnou stěnu epidermálních, průduchových i trichomových buněk (Samuels et al., 2008) v tloušťce od stovek nm po jednotky μm. Její struktura a složení se liší jak mezi různými druhy rostlin, tak i v rámci jednoho druhu rostlin mezi orgány, různými vývojovými stádii, ročními obdobími, podmínkami okolí a stářím jedince (Hauke et al., 1998; Jetter et al., 2001; Karbulková et al., 2008; Macková et al., 2013; Ingram et al., 2017). Základní komponenty kutikuly jsou ale pro všechny rostliny stejné. Vždy se především skládá ze dvou lipofilních skupin látek, a to kutinu a kutikulárních vosků (Samuels et al., 2008; Bhanot et al., 2021). Konstrukce tvořená nerozpustným polyesterem kutinem tvoří kutinovou matrix, která je obklopená a prostoupená rozpustnými v nepolárních rozpouštědlech rozpustnými kutikulárními vosky. Kutikulární vosky byly na základě svého umístění a později i chemického složení rozděleny na intrakutikulární vosky (intracuticular waxes - IW), vnořené do kutinové matrix (MX), a epikutikulární vosky (epicuticular waxes - EW), rozložené na vnějším povrchu kutikulární membrány (Buschhaus et al., 2011). Toto rozdělení kutikulárních vosků bylo zaznamenáno u všech doposud zkoumaných cévnatých rostlin (Buschhaus et al., 2011; Jetter et al., 2016; Zeisler et al., 2016; Zeisler-Diehl et al., 2018).

Kutikula, typicky 1 – 10 μm široká, odděluje rostliny od okolního vzdušného prostředí, svojí strukturou reguluje výměnu vody a rozpuštěných látek s atmosférou, výrazně omezuje výpar vody z rostlin (Hauke et al., 1998; Šantrůček et al., 2004; Lewandowska et al., 2020). Současně tvoří komunikační rozhraní a zabraňuje fúzi orgánů během jejich vývoje (Sinha et al., 1998; Müller et al., 2013; Fich et al., 2016; Ingram et al., 2017; Mazurek et al., 2017; Philippe et al., 2020). V neposlední řadě kutikula brání vstupu patogenů, mikroorganismů či cizorodých sloučenin (Pfeilmeier et al., 2016; Aragón et al., 2017; Lewandowska et al., 2020; Wang et al., 2020). Zabraňuje poškození rostlin vysokými intenzitami UV záření, teplotou a mechanickým či chemickým poškozením (Lewandowska et al., 2020). Spolu s dalšími povrchovými strukturami jako jsou různé trichomy, trny, ostny či emergence tvoří fyzickou bariéru, která chrání rostlinu před vnějšími stresy, mimo jiné i před herbivorním hmyzem (Lewandowska et al., 2020; Wang et al., 2020).

Na povrchu epidermálních buněk se kutikula nově zakládá brzo po začátku vývoje embrya a poté je udržována po celý život rostliny (Ingram et al., 2017). První viditelná kutikula byla

u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) i dalších rostlin zaznamenána v globulární fázi embrya (Szczuka et al., 2003). V dřívějších fázích embrya vývoj kutikuly zaznamenán nebyl. Epidermální buňky se vyvíjejí dříve než kutikula a jako první od sebe oddělují jednotlivé orgány. Zdá se, že kutikula pokrývá celý povrch vyvíjejícího se embrya kromě suspenzoru (drží embryo během vývoje, vzniká z bazální buňky dvoubuněčného embrya, a později během vývoje zaniká) a povrchu hypofýzy (kořenového pólu embrya) (Szczuka et al., 2003; Ingram et al., 2017). Kutikula roste a vyvíjí se s rostlinou, mění své vlastnosti a strukturu v reakci na okolní prostředí a vývoj rostliny. Když rostlinné orgány dosáhnou plné velikosti a epidermální buňky se přestanou zvětšovat dochází k pozměnění struktury kutikuly a propojení vnitřních polymerů (Riederer et al., 1988; Heide-Jørgensen, 1991; Ingram et al., 2017).

Dle nové studie (Berhin et al., 2019) na rostlinách huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) se kutikulární membrána vyskytuje i v prvních fázích vývoje kořenových čepiček a ve vrcholech laterálních kořenů. Chrání vrchol kořene podobně jako kutikula na povrchu nadzemních orgánů. Při prorůstání laterálních kořenů ven z hlavního kořene zabraňuje fúzi orgánů a zajišťuje správný růst nového kořene.

1.1 Vývoj kutikuly během evoluce

Molekulární studie na Charophytech (*Klebsormidiophyceae, Charophyceae* a *Zygnematophyceae*), linii řas ze kterých se suchozemské rostliny vyvinuly, ukazují, že se kutikula či jí podobná hydrofobní vrstva na povrchu stélky vyvinula ještě před výstupem rostlin na souš (Hori et al., 2014; Kondo et al., 2016; Nishiyama et al., 2018; Cheng et al., 2019; Philippe et al., 2020; Bhanot et al., 2021). U *Klebsormidium flaccidum* (Hori et al., 2014) a *Chara braunii* (Nishiyama et al., 2018), které se z linie Charophyt oddělily evolučně dříve, nebyl zaznamenán žádný náznak biosyntetické dráhy polymerů podobných kutinu, suberinu nebo ligninu. Zatímco vývoj hydrofobní povrchové vrstvy složené z lipidů podobajících se voskům suchozemských rostlin u *Klebsormidium flaccidum* (dnes *Klebsormidium nitens;* Ohtaka et al., 2017) zaznamenán byl (Kondo et al., 2016). Zde jsou lipidy tvořící hydrofobní povrchovou membránu namísto na kutinové konstrukci uložené na konstrukci z glykoproteinů (Kondo et al., 2016). Oproti tomu u *Zygnematophyceae*, sesterské linie suchozemských rostlin, byly již zaznamenány i vyvinuté základy biosyntetické dráhy polymerů, vedoucí k syntéze kutinu, suberinu a později i ligninu vyšších rostlin (Cheng et al., 2019; Jiao, 2019; Philippe et al., 2020). Tyto řasy žijí na přechodu mezi suchozemským a

vodním prostředím. Pravděpodobně proto pro ně bylo důležité vyvinout obranu proti vysychání, kterou je právě hydrofobní membrána na povrchu stélky (Jiao, 2019; Philippe et al., 2020).

Přesný evoluční vývoj kutikulární membrány ještě není zcela znám a doložen. Původní hydrofobní membrána se pravděpodobně dále vyvíjela postupně během kolonizace suchozemského prostředí rostlinami (Kong et al., 2020; Philippe et al., 2020). Obecně se podle fylogenetických analýz zdá, že klíčové geny hlavních složek kutikuly, tedy kutinu a kutikulárních vosků, vznikaly nedlouho po sobě (Kong et al., 2020). Podle současných znalostí tvořila původní kutikulu nejprve kutinu podobná ochranná vrstva z hydrofobních polymerů obsahujících alifatické prekurzory s malým obsahem fenolů a sbírkou různých vosků. Později se vyvinula v hustší a pevnější ochranou vrstvu s vyšším obsahem fenolů, která byla lépe připojená k buněčné stěně a více se podobala struktuře dnešního suberinu. Postupem času vznikaly polymery více podobné dnešnímu ligninu a časem i samotný lignin, který už je složen převážně z fenolů (Renault et al., 2017; Philippe et al., 2020). Dnes je lignin součástí sekundárních buněčných stěn cévnatých rostlin. Tento scénář postupného vývoje kutinových a suberinových polymerů podporuje například studie prováděná na genech patřících do rodiny genů GPAT (glycerol-3-phosphát acyltransferáz) (Yang et al., 2012). Také u dnešních rostlin je doloženo, že evolučně mladší semenné rostliny mají oproti evolučně straším mechorostům účinnější kutikulární membrány se zvýšenou hydrofobicitou a schopností zadržovat vodu (Fich et al., 2016; Kong et al., 2020). Kutikuly semenných rostlin jsou silnější s vyšším obsahem di- a trihydroxykyselin, dikarboxylových kyselin, alkanů s velmi dlouhými uhlíkovými řetězci (víc než 20 uhlíků; very-long-chain alkane – VLC alkany) a dalších lipofilních sloučenin delších než 28 uhlíků (>28C) (Kong et al., 2020).

Vývoj složení a strukturní komplexity kutikuly po výstupu rostlin na souš dokládají i některé paleontologické studie (Guignard, 2019). Neboť kutikula, ačkoliv je to tenká a poměrně křehká struktura, zůstává často zachována i u fosilních rostlin. Podle studie Guignard (2019) odpovídá nejjednodušší strukturní komplexita kutikul nalezených ve fosilním záznamu araukáriím (*Araucariaceae*), což je jedna z evolučně nejstarší skupin semenných rostlin. Naproti tomu u jedné z evolučně nejmladších fosilních skupin rostlin *Miroviaceae* byli nalezené kutikuly výrazně složitější (Guignard, 2019). Při porovnání fosilních kutikul a kutikul dnešních rostlin je posun ke strukturněji komplexnějším kutikulám také dobře patrný (Guignard, 2019).

1.2 Struktura kutikuly

Ve struktuře kutikuly lze rozlišit nejméně dvě části (**Obr.1**). Nejvnitřnější část kutikuly bývá nazývána kutikulární vrstva (cuticular layer). Kutikulární vrstva přisedá shora na střední lamely buněčných stěn epidermis. Skládá se z kutinu, může obsahovat intrakutikulární vosky, a pravděpodobně obsahuje i některé polysacharidy, které jí propojují s buněčnou stěnou. Vrstva ležící nad kutikulární vrstvou se nazývá vlastní kutikula (cuticular proper) je složena z kutinu vyplněného intrakutikulárními vosky. Během vývoje kutikuly vzniká nejprve embryonální prokutikula, která pravděpodobně časem přechází ve vlastní kutikulu. Kutikulární vrstva se vytváří ve vývoji kutikuly o něco později pod vlastní kutikulou. Na povrchu vlastní kutikuly se vytváří vrstva epikutikulárních vosků, které mohou tvořit povrchové krystaly různých tvarů v závislosti na svém chemickém složení. Složky vytvářející EW musí patrně při vzniku a obnově EW projít oběma vrstvami kutikuly ležícími pod vrstvou epikutikulárních vosků (Yeats et al., 2013; Ohlrogge et al., 2015).

Dnes obecně uznávaný model, který mluví o kutikule jako o hydrofobní lipidické vrstvě tvořící samostatnou strukturou nad buněčnou stěnou, vznikl počátkem devatenáctého století. Objevují se ale i práce, které mluví o kutikule jako o kontinuální vrstvě navazující na buněčnou stěnu, a tvořící tak součást buněčných stěn epidermálních buněk (Fernández et al., 2016).

Obr. 1: Strukturní rozdělení kutikulární membrány (upraveno podle The American Oil Chemists' Society, 2020 - https://lipidlibrary.aocs.org/chemistry/physics/plant-lipid/biosynthesis-of-plant-lipid-polyesters)

1.3 Složení kutikuly

Kutikula se skládá především z (v běžných nepolárních rozpouštědlech) nerozpustného hydrofobního polymeru kutinu a kutikulárních vosků snadno rozpustných např. v chloroformu. Kutin tvoří konstrukci (matrix), která je prosycená kutikulárními vosky. Kromě kutinu a kutikulárních vosků je kutikula u některých druhů rostlin tvořena kutanem, obecně pak také polysacharidy jako je celulóza, hemicelulóza či různými pektiny, terpenoidy a fenolovými sloučeninami jako jsou deriváty kyseliny skořicové, ferulové a kávové (Bhanot et al., 2021)

Během vývoje rostliny je kutikula spolu s epidermálními buňkami vystavována značným tlakům vnitřních rostoucích tkání. Proto je třeba aby byla pevná a mechanicky odolná. Svojí pevností a mechanickou odolností kutikula reguluje a omezuje rychlost růstu a prodlužování vnitřních orgánů. Zároveň je také potřeba, aby kutikula byla elastická tak, aby při růstu vnitřních tkání nebo diurnálních změnách objemu buňky nedocházelo k jejímu praskání a narušení (Domínguez et al., 2011; Fich et al., 2016). Zdá se, že hustotu a elasticitu kutikuly ovlivňují hlavně polysacharidové, kutanové a voskové složky (Takahashi et al., 2012; Tsubaki et al., 2012). Zatímco viskoelasticita kutikuly je zajištěna v první řadě kutinem (Domínguez et al., 2011; Takahashi et al., 2012; Tsubaki et al., 2012; Fich et al., 2016). K pevnosti kutikuly přispívají především voskové složky kutikuly a kutin ji spíše snižuje. Mechanické vlastnosti kutikuly nereagují jen na vnitřní podněty rostoucích tkání, ale jsou ovlivňovány také vnějšími environmentálními podmínkami a stresory (Domínguez et al., 2011; Fich et al., 2016).

1.3.1 Kutin

Kutin je amorfní, viskoelastický polyester složený především z hydroxylovaných, epoxidovaných a případně karbonylovaných, alifatických C_{16} a C_{18} ω-mastných kyselin (fatty acid – FA) a glycerolu (Samuels et al., 2008; Fich et al., 2016; Ingram et al., 2017; Bhanot et al., 2021). Kutin může tvořit až 80%celkové hmotnosti kutikuly (Bhanot et al., 2021). Polyhydroxylované FA jsou propojeny esterovými vazbami a tvoří lineární řetězec (Domínguez et al., 2011; Bhanot et al., 2021). Jednotlivé monomery kutinu jsou nejčastěji tvořeny ω-hydroxykyselinami s jednou či dvěma přidanými epoxy, hydroxyl či karbonyl skupinami uprostřed řetězce uhlíků. Můžou také obsahovat malé množství nesubstituovaných mastných kyselin, mastných aldehydů, dikarboxylových kyselin, primárních alkoholů či fenylpropanoidů (Fich et al., 2016). I když je zjevná určitá variabilita kutinových monomerů

napříč druhy, orgány či vývojovými fázemi rostlin, zdá se, že určité vlastnosti kutinových monomerů jsou evolučně konzervované. U krytosemenných rostlin v kutinových monomerech často převažují mastné kyseliny s délkou řetězců C18, které u nahosemenných rostlin tvoří menšinu a u výtrusných rostlin jsou zastoupeny jen ve stopových množstvích (Holloway, 1982). Oproti tomu u výtrusných rostlin převažují kyseliny s délkou řetězců C14, které jsou u nahosemenných zastoupeny méně a u krytosemenných se nevyskytují vůbec. Obecně se zdá, že délka kutinových monomerů roste u evolučně odvozenějších skupin rostlin (Fich et al., 2016).

Kutin tvoří na povrchu rostlinných pletiv amorfní vrstvu, která ale má určité prostorové uspořádání, kupříkladu se liší její vrchní a spodní strana (Domínguez et al., 2011; Fich et al., 2016). Většina primárních hydroxylů obsažených v kutikule a tvořících polymer kutinu je propojena esterovými vazbami. Velká většina kutinových monomerů skládajících polymer kutinu se větví uprostřed řetězce, což ukazuje, že polymerovaný kutin tvoří nejspíš dosti větvenou 3D strukturu. Kutin utváří základní konstrukci kutikulární membrány, která ale není hustě propletená a spíše tvoří řidší síť s dutinami prostoupenými kutikulárními vosky a dalšími kutikulárními složkami. Detailnější strukturální uspořádání monomerů kutinu do polymerů v kutikulární membráně ale není známo (Pollard et al., 2008; Fich et al., 2016). Není jasné, zda jsou specificky uspořádány například na základě chemických vlastností (délka či substituce řetězce) v polymeru jako celku nebo uvnitř určitých specifických oblastí polymeru. Také je zde otázka, zda se polymerové molekuly kutinu, které se připojují na buněčnou stěnu, tvoří jednotlivě v několika místech či zda tvoří jedno propletené kontinuum.

1.3.2 Kutikulární vosky

Kutikulární vosky jsou složené především z mastných kyselin s velmi dlouhými uhlíkatými řetězci (více než 20 uhlíků; very-long-chain fatty acid – VLCFA) a jejich derivátů jako jsou aldehydy a ketony, alkany, primární a sekundární alkoholy a estery (Kunst et al., 2009; Aragón et al., 2017; Bhanot et al., 2021). U některých rostlin obsahují i sekundární metabolity: flavonoidy, fenylpropanoidy, pentacyklické terpenoidy či tokoferoly (Jetter et al., 2008; Wang et al., 2020; Bhanot et al., 2021).

Kutikulární vosky se podle umístění rozlišují na **epikutikulární** (EW), rozložené na vnějším povrchu kutikulární membrány, a **intrakutikulární vosky** (IW), vnořené do kutinové konstrukce kutikuly. Strukturně mohou být složky EW i IW rozděleny do dvou skupin,

na sloučeniny s cyklickými nebo lineárními řetězci. Buschhaus et al. (2011) porovnávali složení IW a EW z údajů devíti různých studií zkoumajících různé druhy rostlin (listy *Kalanchoë daigremontiana,* ptačího zobu (*Ligustrum vulgare*), *Macaranga tanarius,* hrachu setého (*Pisum sativum* cv Avanta), bobkovišně lékařské (*Prunus laurocerasus*), růže šípkové (*Rosa canina*), žita setého *Secale cereale,* jehlice tisu červeného (*Taxus baccata*), láčky různých druhů Láčkovek (*Nephenthes*) a plody rajčete (*Solanum lycopersicum*)). Jejich porovnání ukázalo, že v IW cyklické sloučeniny představují 0–75 % celkového množství vosků, kdežto lineární sloučeniny bývají zastoupeny 25–100 % v závislosti na druzích. V EW oproti tomu cyklické sloučeniny představují jen 0 - 35 % celkového množství vosků, kdežto lineární sloučeniny bývají zastoupeny 65 - 100 % (Buschhaus et al., 2011). Primární alkoholy a dioly se ve vyšších koncentracích spíše hromadí v IW. Kdežto alkany, volné FA a sekundární alkoholy mají tendenci hromadit se v EW. U aldehydů a esterů nebyl v rámci porovnávaných druhů zjištěn žádný jasný trend (Buschhaus et al., 2011). Mezi porovnávanými druhy nebylo zjištěno jednotné složení EW a IW jen preference určitých trendů. Porovnávané druhy se od sebe hodně lišily také morfologií, fylogeneticky či adaptací na podmínky prostředí, což může ovlivňovat složení kutikulárních vosků. Je možné, že by složení jednotlivých vrstev vosků mohlo být více podobné v rámci určitých fylogenetických skupin u evolučně blízkých druhů rostlin. Buschhaus et al. (2011) dále u porovnávaných druhů zjišťovali zda, se vrstva IW neliší od EW v zastoupení složek o určité délce uhlíkového řetězce. Odlišnost v délce uhlíkového řetězce se ukázala u FA a alkoholů u ptačího zobu (*Ligustrum vulgare*) a tisu červeného (*Taxus baccata*) a u FA žita setého (*Secale cereale*), které ve vrstvě IW obsahovalo větší procento složek s kratším řetězcem uhlíků (Wen et al., 2006; Buschhaus et al., 2007, 2011; Ji et al., 2008).

Složení kutikulární membrány, její tloušťka a struktura se přizpůsobuje vlivům podmínek prostředí a tím ovlivňuje výsledek působení stresových faktorů na rostliny. S chemickým složením EW se mění struktura voskových krystalů. Například EW s vyšším obsahem primárních alkoholů tvoří ploché deskovité krystaly, kdežto při vyšším obsahu sekundárních alkoholů či β-diketonů tvoří voskové krystaly v podobě trubiček (Lewandowska et al., 2020)

I mezi orgány v rámci jedné rostliny se kutikula může lišit ve složení, struktuře i vlastnostech (Ingram et al., 2017). Složení kutikulárních vosků se také liší podle umístění na rostlině a orgánu, který pokrývají. Kupříkladu pro listy různých poddruhů hrachu setého (*Pisum sativum*) platí, že kutikulární vosk horní (adaxiální) strany listů obsahuje především

primární alkoholy (71%), kdežto u vosku ze spodní (abaxiální) strany listů jsou hlavní složkou alkany (73%) (Gniwotta et al., 2005). S tím souvisí i rozdílný tvar krystalů na povrchu EW mezi stranami listů hrachu. Na horní (adaxiální) straně se nachází deskovité krystaly složené především z hexacosanolu (C26) doprovázeném octacosanolem (C28) a hentriacontanem (C31). Kdežto na abaxiální straně listů jsou krystaly spíše páskovité složené především z hentriakontanu doprovázeném menším množstvím hexacosanolu a octacosanolu (Gniwotta et al., 2005).

1.3.3 Kutan

Kutan je další poměrně významnou součástí kutikuly. Je to amorfní polymer, který u některých rostlin tvoří hmotnostně podobnou část kutikuly jako kutin (Bhanot et al., 2021). Kutan může být složen z polymetylovaných sloučenin a polysacharidů propojených nehydrolyzovatelnými vazbami nebo může být tvořen sítí převážně z polymethylovaných řetězců propojených dvojnými vazbami a z volných karboxylových skupin propojených etherovými vazbami (Villena et al., 1999; Guzmán-Delgado et al., 2016; Bhanot et al., 2021). Některé studie ukazují, že výskyt kutanu v kutikule rostlin silně koreluje s adaptací rostlin na sucho (Boom et al., 2005; Xin et al., 2021). To indikuje zapojení kutanu při adaptaci na stres suchem. Kutan je velice odolný proti degradaci, a proto se jeho složky stanovují obtížně. Ve známém chemickém složení kutanu je značná variabilita mezi druhy i různými studiemi. Podle některých studií obsahuje také volné primární hydroxylové skupiny, estericky propojené FA, trihydroxylované benzenové jednotky, karboxylové a dikarboxylové kyseliny s dlouhým uhlíkovými řetězci, alkany, alkeny či ethery propojené alifatické sloučeniny (Deshmukh et al., 2005; Bhanot et al., 2021; Xin et al., 2021).

1.4 Funkce kutikuly

Kutikula se nachází na kontaktu živých buněk s vnějším prostředím, zprostředkovává s ním výměnu informací a odděluje od něj vnitřek rostliny, který chrání před abiotickými i biotickými stresy. Oboustranně brání a reguluje tok vody, iontů, rozpuštěných látek i plynů (Samuels et al., 2008; Schreiber, 2010; Renault et al., 2017). Chrání povrch rostliny před mechanickým odíráním a zvětráváním (Takahashi et al., 2012). Kutikula může reagovat na podmínky prostředí tím, že mění svou tloušťku, složení, stavbu, tvar krystalů epikutikulárních vosků a rozmístění voskových struktur po povrchu (Baker, 1974; Lewandowska et al., 2020).

Působení jednotlivých podmínek prostředí nejde od sebe snadno oddělit, protože podmínky často působí simultánně a jejich vliv na reakce kutikuly se překrývá a násobí. Kutikula je důležitá také při kontaktu dvou různých buněk během organogeneze či opylení a oplození rostlin, kdy především zabraňuje fúzi buněk a odděluje odlišné tkáně (Samuels et al., 2008; Fich et al., 2016; Ingram et al., 2017).

1.4.1 Ochrana před abiotickými stresovými faktory

Hlavní funkcí kutikulární membrány je především zamezit **vysychání** rostlin a omezit neregulovatelnou transpiraci a ztráty vody mimo průduchy. Na to poukázal například Kerstiens (1996), který ve své práci shrnul výsledky řady studií a porovnal tak transpiraci u 200 druhů vyšších rostlin (jehličnatých i listnatých stromů a bylin). Maximální vodivost průduchů se pohybovala mezi 4–12 · $l0^{-3}$ m · s^{-1} v rámci jedné strany listu. Kdežto kutikulární transpirace přispívala vodivostí nižší než 2 · $l0^{-4}$m · s^{-1} v rámci celého listu (součet obou stran) (Kerstiens, 1996). To po převodu do běžněji užívaných jednotek (Kerstiens, 1996) odpovídá vodivosti průduchů přibližně 400 mmol m^{-2} · s^{-1} a vodivosti kutikuly zhruba 10 mmol m^{-2} · s^{-1}. Tato měření jsou ale nejspíš zkreslena tím, že pro měření kutikulární transpirace předpokládají úplné zavření průduchů, které svým nedokonalým zavřením mohou přispívat docela podstatnou částí k naměřené vodivosti. Průduchy nezkreslenou kutikulární vodivost na kutikule obsahující průduchové póry nebylo možné změřit až do nedávna, kdy Šantrůček et al. (2004) navrhli novou metodu měření. I přes určité nedokonalosti měření porovnání transpirace ukázalo, že kutikulární transpirace je velmi nízká oproti transpiraci skrz průduchy u všech porovnávaných druhů rostlin (Kerstiens, 1996). To souvisí s reakcí rostlin na aktuální vodní stres, kdy rostliny zavíráním průduchů omezují ztráty vody pouze na množství unikající převážně skrz kutikulární membránu. Na dlouhodobější sucho proto reagují rostliny neextrémních biotopů, jako huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) (Kosma et al., 2009; Seo et al., 2011), ječmen setý (*Hordeum vulgare*) (Nødskov Giese, 1975), bavlník chlupatý (*Gossypium hirsutum*) (Bondad et al., 1996), hrách setý (*Pisum sativum*) (Sánchez et al., 2001), tolice vojtěška (*Medicago sativa*) (Jefferson et al., 1989), tabák sivý (*Nicotiana glauca* L. Graham)(Cameron et al., 2006), různé kultivary růže (Jenks et al., 2001) či různé druhy brukve (*Brassica* sp.) (Baker, 1974; Ashraf et al., 1976; Shepherd et al., 1997), zvyšováním množství vosků v kutikulární membráně či změnou stavby kutikulárních vosků, čímž zřejmě dále snižují propustnost kutikulární membrány pro vodu (Lewandowska et al., 2020). Například u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) se působením sucha zvyšuje celkové

množství vosků, především VLC alkanů, ale i monomerů kutinu na listech až čtyřikrát oproti nestresovaným rostlinám (Kosma et al., 2009; Seo et al., 2011). Některé studie ale ukazují, že propustnost izolované kutikuly s množstvím vosků nekoreluje (Schreiber et al., 1996; Sánchez et al., 2001; Vogg et al., 2004) či, že rostliny nereagují zvyšováním množství kutikulárních vosků, ale jen prodlužováním FA řetězců a změnou velikosti a množství průduchů (Macková et al., 2013). Nekonzistence výsledků může být spojena s tím, že propustnost kutikuly nelze snadno a spolehlivě změřit. Důležitým aspektem také je, že část studií pracuje se změnami množství a uspořádání jen EW, nikoliv všech kutikulárních vosků. Podle několika studií na různých druzích rostlin, ale k utváření transpirační bariery přispívají EW jen minimálně a transpirační bariéra je utvářena především IW (Vogg et al., 2004; Zeisler et al., 2016; Zeisler-Diehl et al., 2018). Zvyšování množství či prodlužování FA kutikulárních vosků, ale ne monomerů kutinu, bylo zjištěno i při aplikaci chloridu sodného (NaCl) či kyseliny abscisové (ABA) na povrch listů huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana)* (Kosma et al., 2009) či řeřichy seté (*Lepidium sativum)*(Macková et al., 2013). Sucho i aplikace ABA totiž spouští u různých zkoumaných druhů cévnatých rostlin expresi genů související se syntézou vosků a transkripčních faktorů ze skupiny myeloblastózových transkripčních faktorů (MYB), které podporují akumulaci kutikulárních vosků na povrchu (Seo et al., 2009, 2011; Yeats et al., 2013; Zhu et al., 2014; Xue et al., 2017; Lewandowska et al., 2020). Například Seo et al. (2011) ukázali, že huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) v reakci na sucho transkripčně aktivuje biosyntézu kutikulárních vosků pomocí transkripčního faktoru MYB96 citlivého na ABA. Protein MYB96 se přímo váže na promotory genů účastnících se biosyntézy vosků, konkrétně na geny kódujících enzymy kondenzující VLCFA (Seo et al., 2011). Vývoj kutikuly, její strukturu a její permeabilitu ovlivňuje nejen dostupnost vody v půdě, ale i relativní vlhkost vzduchu během vývoje rostliny (Karbulková et al., 2008).

Spolu se sníženou dostupností vody často na rostliny působí i vyšší **teploty**. Zpravidla je proto ovlivněno nejen množství vosků v kutikulární membráně, ale i konkrétní chemické složení kutikulární membrány. Například u růžičkové kapusty (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) působení vyšších teplot a snížení relativní vlhkosti vyvolává vyšší syntézu aldehydů a primárních alkoholů na úkor alkanů a ketonů (Baker, 1974). Oproti tomu u ječmene setého (*Hordeum vulgare*) nemá působení vyšších teplot a snížené relativní vlhkosti takový vliv na relativní množství složek vosků, a spíše ovlivňuje délku řetězců složek kutikulární membrány (Nødskov Giese, 1975). Vystavení rostlin různým teplotám má vliv také na EW a jejich krystalické struktury. Kupříkladu u růžičkové kapusty (*Brassica oleracea* var.

gemmifera) se při změně teplot z 15°C na 35°C mění struktura krystalů z tvaru trubiček na více rozvětvené krystaly podobné dendritům (Baker, 1974; Lewandowska et al., 2020).

Kutikula má spolu s trichomy a dalšími povrchovými emergencemi také fotoprotektivní funkci, chrání rostliny před nadměrným světelným a **UV zářením**. Zejména před UV-B zářením (218 – 315 nm), které dopadá na povrch země a může být pro rostliny, stejně jako pro jiné živé organismy, nebezpečné, neboť poškozuje DNA, membránové lipidy a také fotosyntetický aparát. Z porovnání 45 rostlinných druhů ukázali Holmes et al. (2002), že chlupaté listy dobře odrážejí záření delších vlnových délek než má UV záření. Oproti tomu ojíněné listy s tlustou vrstvou epikutikulárních vosků (EW) odráží velice efektivně UV záření i záření vyšších vlnových délek (Holmes et al., 2002). Proti UV záření chrání rostliny především lineární a aromatické sloučeniny s konjugovanými dvojnými vazbami, jako jsou fenoly či flavonoidy. Ty se hromadí ve vrstvě kutikulárních vosků, vázané na monomery kutinu, a také ve vakuolách epidermálních buněk a v buněčných stěnách (Pfündel et al., 2006; Lewandowska et al., 2020). Na množství kutikulárních vosků má vliv rovněž intenzita **fotosynteticky aktivního záření** (záření využitelné zelenými rostlinami při fotosyntéze, 400 – 750 nm), tedy zda rostlina roste na slunci nebo ve stínu. Podle studie na jilmu sibiřském (*Ulmus pumila*) a jilmu habrolistém (*Ulmus minor*) se na osluněných listech v porovnání se stinnými hromadí více EW (Lykholat et al., 2020). Také chemické složení EW se u těchto jilmů mění v závislosti na oslunění listů. Osluněné listy mají zvýšený obsah alkoholů a dlouhořetězcových n-alkanů v epikutikulárních voscích (Lykholat et al., 2020). To může být způsobené nejen vlivem zvýšené intenzity dopadajícího fotosynteticky aktivního záření, ale i zvýšenou teplotou.

1.4.2 Bariéra proti cizorodým organismům

Jelikož kutikula leží na vnějším povrchu prýtu rostlin, je její další funkcí účast na interakci rostlin s organismy z vnějšího prostředí. Ovlivňuje interakce s herbivory a pomáhá zabraňovat vstupu bakteriálních, hmyzích i houbových patogenů do těla rostlin (Samuels et al., 2008; Lewandowska et al., 2020; Wang et al., 2020). Hydrofobní charakter kutikuly rostlinám pomáhá zbavovat se nečistot, cizích spor, prachu a vody z povrchu (tzv. lotosový efekt kutikuly (W. Barthlott, 1997; Watson et al., 2014)), čímž stěžuje kolonizaci bakteriím, houbám či oomycetám.

Pro napadení **patogenními bakteriemi** potřebují bakterie vstoupit do vnitřních pletiv rostlin. Některé bakterie obchází tento problém například tím, že jsou přenášeny hmyzem sajícím mízu rostlin, který je rovnou vpraví do pletiva rostliny (Sugio et al., 2012; Pfeilmeier et al., 2016). Většina bakterií ale potřebuje nějakou dobu přežít na povrchu rostlin (epifitický způsob života), dokud nenastanou vhodné podmínky, jejich populace se nezvětší k určité hranici a nepřekonají bariéru rostliny zabraňující jejich vstupu (Pfeilmeier et al., 2016). K přežití na povrchu rostlin dopomáhá bakteriím tvorba agregátů a produkce polymerů EPS (exopolysaccharid), které jsou spojeny s epifytickým způsobem života bakterií, přispívají k toleranci osmotického stresu, vysychání a k odolnosti při zamrzání a rozmrzání (Pfeilmeier et al., 2016; Wang et al., 2020).

Podobně i **houbové či houbám podobné patogeny(oomycety)** potřebují přežít na povrchu rostlin, dokud nepřekonají vnější hydrofobní bariéru rostliny zabraňující jejich vstupu, a dokud jejich spory nevyklíčí nebo se jejich klíční hyfy nediferencují v apresoria. Apresoria jsou ploché útvary, kterými se houba více přitiskne na povrch hostitelské rostliny, vstupuje jimi do vnitřku rostliny a tím spouští vlastní infekci (Zabka et al., 2008; Hansjakob et al., 2011; Lewandowska et al., 2020; Wang et al., 2020).

Rostlinná kutikula proto hraje důležitou roli v odolnosti proti usazování, pronikání a nákaze potenciálními patogeny. Nejvíce rozšířenou a přijímanou rolí kutikuly v boji proti patogenům je pasivní typ obrany, kdy je využita hydrofobnost kutikuly. Díky tomu se na povrchu rostlin nedrží vlhkost a nečistoty, které by patogenům poskytovaly výhodné podmínky pro život (Bessire et al., 2007; Fich et al., 2016; Wang et al., 2020). Kutikula je v tomto velmi efektivní, patogeni ji ale často obchází a překonávají vstupem do vnitřních pletiv skrze průduchy či poraněná místa vnějším narušením kutikuly. Ovšem kutikula je, pro někoho možná překvapivě, součástí i aktivní obrany proti patogenům, a tedy samotné imunitní odpovědi na napadení patogenem. Ta začíná rozpoznáním přítomnosti patogena po průchodu do vnitřních pletiv. Rostlina přítomnost patogenu zaznamenává PRR receptory („pattern recognition receptors“) nacházejícími se vně plasmatické membrány a to rozpoznáním typických molekulárních vzorů (chemických molekul) spojených s přítomností patogenů (pathogen-associated molecular patterns – PAMPS) či jimi způsobeného poškození, kdy jsou produkovány molekulární vzory spojené s poškozením (damage-associated molecular patterns – DAMPS) a spouští imunitní reakci (Boutrot et al., 2017). Ukazuje se, že v reakci na přítomnost patogena mohou rostliny modifikovat strukturu, integritu a permeabilitu

(propustnost) kutikuly. Současně někteří patogeni se snaží kutikulu překonat vlastními silami, produkcí kutináz, které vedou k vyšší permeabilitě kutikuly (Kolattukudy et al., 1995; Skamnioti et al., 2007; Serrano et al., 2014; Pfeilmeier et al., 2016; Wang et al., 2020). Změna permeability kutikulární membrány bývá měřena několika různými metodami, a to měřením kutikulární transpirace (propustnost pro vosu), citlivosti k herbicidů či pronikání toluidinové modři (propustnost pro organické látky, resp. toluidinovou modř) do rostlinných pletiv (Bessire et al., 2007; Ju et al., 2017; Zhang et al., 2019). Podle dosavadních výsledků se zdá, že zvýšení či snížení permeability kutikuly může mít na odolnost a obranu vůči patogenům protichůdné účinky. U některých rostlin byla se zvýšenou permeabilitou kutikulární membrány zaznamenána vyšší citlivost k nákaze určitým patogenem, kdežto u jiných rostlin či v reakci na jiné patogeny se naopak zvýšením permeability citlivost k nákaze snižovala (Bessire et al., 2007; Zabka et al., 2008; Serrano et al., 2014; Fich et al., 2016; Aragón et al., 2017; Ju et al., 2017; Ziv et al., 2018; Wang et al., 2020). Tyto protichůdné výsledky se dají vysvětlit několika způsoby, jejich mechanismus ale doposud nebyl plně popsán.

Snížení permeability pro chemické látky vede k menší neprostupnosti kutikuly i pro patogeny, což logicky může zvyšovat odolnost rostliny vůči nákaze tím, že zvýšená hradba více brání vstupu patogena. Například u jabloně (*Malus truncata*) bylo ukázáno, že působení biotrofní patogenní houby *Botryosphaeria dothidea* (bílá hniloba či „bot rot“ způsobující rakovinu stromů) zvyšuje produkci specifického transkripčního faktoru (MdMYB30) z rodiny MYB (myeloblastózových) transkripčních faktorů (Zhang et al., 2019). Tím byla indukována biosyntéza vosků, snížila se permeabilita kutikulární membrány, což bránilo vstupu houby do pletiv a tak zvýšilo odolnost jabloní proti nákaze bílou hnilobou (Zhang et al., 2019, 2020). Podobně zvýšená produkce transkripčního faktoru MdMYB30 u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) vedoucí ke zvýšené biosyntéze a změně uspořádání kutikulárních vosků, zvýšila odolnost k nákaze bakteriálním patogenem *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) (Zhang et al., 2019; Wang et al., 2020).

Zajímavé je, že ne každá akumulace voskových složek kutikuly vede ke zvýšení odolnosti rostliny vůči patogenu. Třeba u linií huseníčku se zvýšenou expresí CER1 dochází k akumulaci VLC alkanů čímž se zvyšuje citlivost na *Pst* DC3000 (Wang et al., 2020). Někteří patogeni, jak se zdá, se přizpůsobily kutikule vhodného hostitele a pro své klíčení vyhledávají zastoupení určitých kutikulárních složek. Určité složky kutikulární membrány, zvláště epikutikulární vosky, či produkty rozpadu kutikuly tak ovlivňují přilnavost houbových spor či

bakterií a jejich vývoj, klíčení i průběh infekce (Kolattukudy et al., 1995; Zabka et al., 2008; Hansjakob et al., 2011; Uppalapati et al., 2012; Lewandowska et al., 2020; Wang et al., 2020). Například se ukazuje, že klíčení houbových spor či diferenciace klíčních hyf v apresoria u houbových patogenů rodu *Blumeria* a *Colletotrichum* reaguje na specifický obsah VLC aldehydů a terpenoidů v kutikule (Kolattukudy et al., 1995; Hansjakob et al., 2011; Serrano et al., 2014; Lewandowska et al., 2020). Úspěšnost a rychlost klíčení houbových spor a tvorby apresorií se u některých rostlin liší i v závislosti na části interagujícího orgánu rostlin. Kupříkladu u hrachu setého (*Pisum sativum*) klíčí spory padlí hrachového (*Erysiphe pisi*) lépe na horních stranách listů než na dolních. Což je také nejspíš ovlivněno rozdílným chemickým složením kutikuly a rozdílnou strukturou krystalů epikutikulárních vosků na listech (Gniwotta et al., 2005).

Jak bylo zmíněno výše, ke zvýšení permeability kutikuly během infekce může docházet vlivem patogenních organismů, které syntetizují a vylučují hydrolytické enzymy, jako jsou kutinázy a lipázy, kterými degradují vosky kutikulární membrány (Kolattukudy et al., 1995; Skamnioti et al., 2007; Serrano et al., 2014; Pfeilmeier et al., 2016; Wang et al., 2020). Uvolnění určitých kutinových monomerů a voskových složek může sloužit jako DAMP, signál aktivující obrannou imunitní reakci rostlin (Aragón et al., 2017; Ziv et al., 2018). Ke zvýšení permeability kutikuly může dále docházet i vlivem rostlin, které tak můžou zvyšovat efektivitu dopravy antimikrobiálních látek k patogenu. Jako antimikrobiální látky fungují například reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species – ROS), které po dosažení toxické koncentrace zabraňují růstu patogenů. Nebo se při nižších koncentracích účastní aktivace dalších obranných mechanismů (Serrano et al., 2014; Aragón et al., 2017; Ju et al., 2017). Zvýšení permeability kutikuly dále může působit jako zesilující smyčka, kdy se se zvýšenou permeabilitou zvyšuje množství DAMPs, což indukuje vyšší imunitní reakci (Aragón et al., 2017; Ziv et al., 2018). Například u rostlin huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) při napadení nekrotrofní houbou plísní šedou (*Botrytis cinerea*) bylo prokázáno, že rostliny záměrně shromažďují kutinázy produkované plísní, čímž se zvyšují permeabilita kutikulární membrány (Ju et al., 2017). Navíc ještě rostliny huseníčku produkují transkripční faktor DECREASE WAX BIOSYNTHESIS (DEWAX), který blokuje biosyntézu vosků. Tím rostlina zajistí, aby permeabilita membrány nebyla snižována vlastní výrobou dalších vosků (Go et al., 2014; Ju et al., 2017). V takových případech tedy vede vyšší permeabilita kutikuly k efektivnější obraně proti patogenovi. Tento mechanismus je, pravděpodobně, zvláště výhodný ve chvíli, kdy už

patogen kutikulu nějakým způsobem překoná a není tedy na místě vylepšovat „brnění“, které již bylo překonané.

Mechanismus, kterým složení, permeabilita a struktura kutikulární membrány ovlivňuje průběh infekce není stále úplně vyjasněn. Serrano et al. (2014) ve svém přehledném článku navrhují zobecnění, kdy se při nákaze nekrotrofními patogeny rostliny brání snižováním množství vosků na svém povrchu, tedy větší permeabilitou kutikulární membrány, a zvýšenou produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS). Kdežto při nákaze biotrofními patogeny spíše zvyšují syntézu vosků a jejich množství v kutikulární membráně čímž snižují její propustnost a prostupnost. Další možností by mohlo být, že obrana snižováním permeability kutikulární membrány nastává poté, co patogen pronikne dovnitř rostlinných pletiv. Další zvyšování obranné bariéry by jeho vstup už neovlivnilo, naopak je potřeba aktivace obrany v místě vzniku nákazy. Současně je možné, že místní snižování permeability kutikulární membrány může fungovat i jako signál pro aktivaci systémové rezistence, díky kterému se ve vzdálenějších částech rostliny modifikuje kutikula a zvyšuje se syntéza jejích složek. Tím je rostlina lépe připravena na obranu, kdyby patogen přišel i do těchto míst (Xia et al., 2009; Aragón et al., 2017; Lewandowska et al., 2020; Wang et al., 2020).

Interakce rostlin s **hmyzem** je regulována několika způsoby (Barbero, 2016; Wang et al., 2020). Rostliny dokážou složením a povrchem svých EW omezit možnosti pohybu nežádoucího hmyzu po vlastním povrchu, například tím, že tvoří povrch ze kterého se uvolňují částečky vosků, které se lepí hmyzu na nohy a znemožňují tím jeho pohyb či tvoří kluzký povrch (Lewandowska et al., 2020; Wang et al., 2020). Kupříkladu druhy rostlin z rodu Makaraga (*Macaraga – Euphorbiaceae*) tvoří kluzký povrch, který je způsoben vysokým obsahem triterpenoidů v kutikulárních voscích. Po jejich povrchu se dokážou pohybovat jen jejich symbiotičtí mravenci. Rostlina tím chrání své symbiotické mravence před konkurencí jiných mravenců a jiného hmyzu. Mravenci na oplátku chrání rostlinu před býložravci (Federle et al., 1997; Wang et al., 2020). Další způsob, kterým je ovlivněna interakce rostlin s hmyzem, závisí také na složení a množství kutikulárních vosků. Pro některý hmyz závisí atraktivnost hostitelských rostlin pro kladení vajíček na určitém složení kutikulárních vosků (Spencer, 1996). A naopak některé rostliny mění složení svých kutikulárních vosků v reakci na nakladená vajíčka svých parazitů čímž mohou lákat parazitoidy těchto vajíček (Fatouros et al., 2008; Blenn et al., 2012).

1.4.3 Úloha kutikuly při mezibuněčných interakcích

Kutikula je také podstatná pro správnou **organogenezi** a při kontaktu dvou různých buněk či dvou orgánových struktur. Během vývoje rostlinných pletiv a orgánů vše vzniká z meristémů ve velice malých prostorech omezených pupeny či semeny. Adhezi, a tedy i srůstu mezi orgány, zabraňují vlastnosti epidermálních buněk. Pro správné fungování epidermálních buněk je ale třeba kutikuly, která udržuje turgor, stálou transpiraci a správnou výměnu vody a CO_2 (Voisin et al., 2009; Ingram et al., 2017). U různých mutantů v genech souvisejících se syntézou kutinu a kutikulárních vosků dochází k fúzi ovlivněných orgánů (Lolle et al., 1992; Wellesen et al., 2001; Krolikowski et al., 2003; Fich et al., 2016), poruchám vývoje orgánů či ke zpomalení jejich vývoje (Li et al., 2007). Obecně se zdá, že poruchy v organogenezi a nevhodná fúze orgánů jsou spojené s porušenou permeabilitou kutikuly během vývoje daného orgánu (Ingram et al., 2017). Přesný molekulární mechanismus fúze orgánů není ale zcela znám. Přilnavost buněk stejného pletiva je pravděpodobně výsledkem obsahu homogalakturonanu ve střední lamele epidermálních buněk a pektin-dependentní signalizace (Daher et al., 2015; Verger et al., 2016). Jeden z možných mechanismů, kterými rostlina zabraňuje postgenitální fúzi orgánů v nemutovaných orgánech, může být kutikula sloužící jako „pokrývka“, která „maskuje“ homogalakturonan během vývoje orgánu a tím brání spojení sousedních pletiv (Sinha et al., 1998; Müller et al., 2013). Další možný mechanismus je založený na vlastnostech kutikuly jako bariéry bránící volné difúzi mobilních signálů, bránící přímé komunikaci mezi oddělenými orgány a tím udržující orgány samostatně (Lolle et al., 1999; Ingram et al., 2017). Pro přilnavost a nepřilnavost orgánů jsou také důležité povrchové struktury kutikuly jako jsou krystaly epikutikulárních vosků či kutikulární brázdy, které oddalují povrchy orgánů a zabraňují tak jejich fúzi. Což bylo ukázáno například při vývoji okvětních lístků huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) (Takeda et al., 2014; Mazurek et al., 2017). Během vývoje rostliny některé orgány a pletiva splývají v jeden celek. Jde například o srůstání vnitřního a vnějšího integumentu vajíčka či plodolistů v semeníku. I těchto procesů se účastní kutikula, která fúzi umožňuje a reguluje (Ingram et al., 2017).

Rostlinná pylová zrna klíčí jen na kompatibilních bliznách. U rostlin, které mají suchou bliznu se interakcí blizny s pylovým zrnem při **oplození** účastní i kutikula (Sieber et al., 2000; Takahashi et al., 2010; Fich et al., 2016). Suché blizny se nacházejí například u čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) jako brukev řepák (*Brassica rapa*), huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) (Sieber et al., 2000; Fich et al., 2016) či hvozdíkovitých (*Caryophyllaceae*). Jsou

chráněné kutikulou před vyschnutím a ostatními nepříznivými podmínkami (Ingram et al., 2017). Při dopadu pylového zrna na bliznu je třeba rychlé zavodnění pylových zrn pro jejich hydrataci a následné klíčení. Voda by přes neporušenou kutikulu neprocházela, proto kompatibilní pylová zrna obsahují vlastní esterázy a kutinázy, kterými lokálně degradují kutikulu. Oslabená kutikula umožňuje průchod vody a následné prorůstání pylové láčky skrz kutikulu (Sieber et al., 2000; Takahashi et al., 2010; Ingram et al., 2017).

U mnoha rostlin se ukázalo, že jejich **semena** obsahují vrstvu z kutinu či kutinu podobných látek a mastných kyselin, tedy kutikulu (Beresniewicz et al., 1995; Molina et al., 2008; Ranathunge et al., 2010; De Giorgi et al., 2015; Ingram et al., 2017). U huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana)* je kutikula semen dokonce 10 krát tlustší než kutikula listů a 3-4 krát tlustší než kutikula stonků (De Giorgi et al., 2015; Ingram et al., 2017). Tvoří vnitřní vrstvu osemení a pokrývá endosperm. Vzniká chvíli po fertilizace mezi endospermem a endotheliem, spodní vrstvou vnitřního integumentu (Molina et al., 2008; De Giorgi et al., 2015). Pokrývá a uzavírá všechna živá pletiva semena kromě chalázového pólu, kde je vajíčko připojené k poutku a odkud vyrůstají obaly vajíčka (Beeckman et al., 2000; Molina et al., 2008; Ingram et al., 2017). Kutikula reguluje příjem vody, aby tlak na osemení nebyl příliš veliký a neprasklo dřív, než budou správné podmínky. Účastní se regulace výměny plynů s okolím, především kyslíku a oxidu uhličitého (Wager, 1974; Rolletschek et al., 2007). Klíčení semen je řízeno fytohormony giberelinem (GA) a kyselinou abscisovou (ABA), které reagují na světelné a teplotní podmínky a osmotický potenciál. Jedním z mechanismů, který blokuje klíčení při nevhodných podmínkách prostředí a při nízkém obsahu GA je právě regulace propustnosti kutikuly pro plyny (De Giorgi et al., 2015). Kutikula chrání embryo před suchem, poškozením oxidací po vstupu kyslíku a jeho radikálů, které snižují životaschopnost embrya, a před předčasným klíčením. Je potřebná pro životaschopnost a dormanci semen (Rolletschek et al., 2007; De Giorgi et al., 2015; Ingram et al., 2017; Née et al., 2017). Účastní se udržování rostlinného embrya v suchém, metabolicky inertním a osmoticky stabilním prostředí (Lopez-Molina et al., 2002; De Giorgi et al., 2015). Rostliny mutované v genech pro syntézu kutinu nemají blokovanou expanzi buněk endospermu při nízkém obsahu GA a nezabraňují předčasnému prasknutí osemení. Jsou také citlivější na oxidaci, která snižuje životnost semen (De Giorgi et al., 2015).

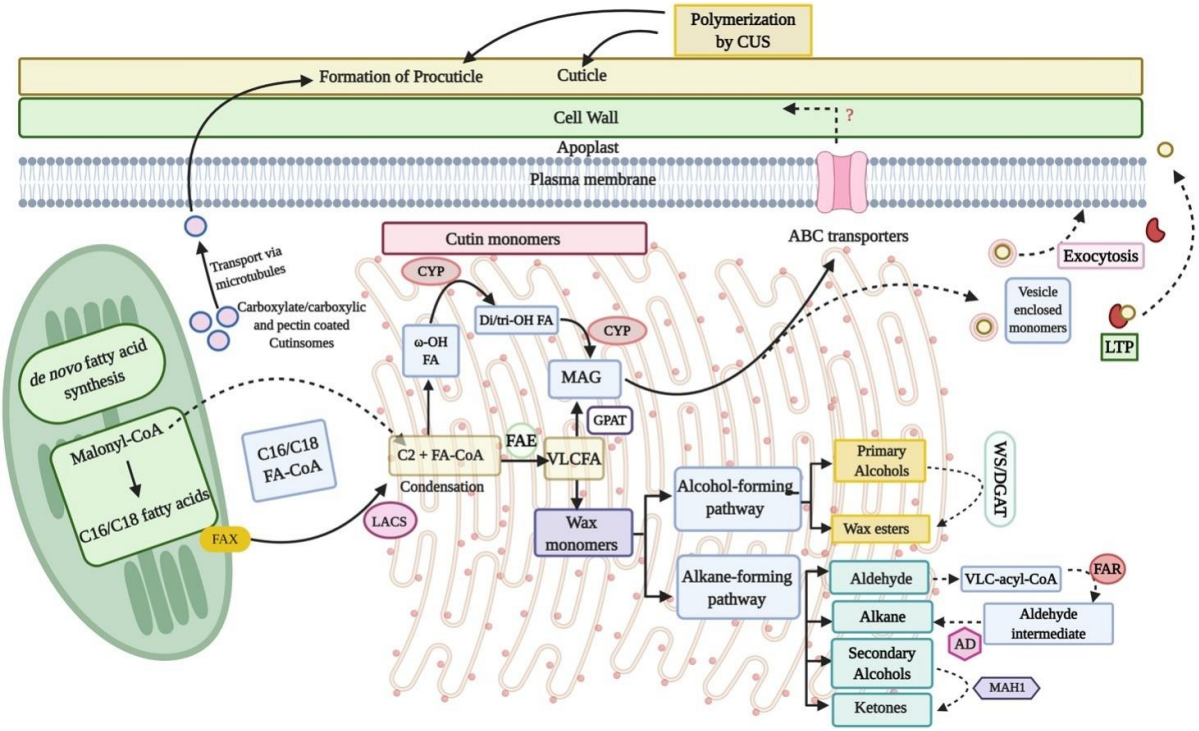
Kutikula je velice důležitá během **klíčení**, a to především u epigeických druhů mezi které patří kupříkladu huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), fazol obecný (*Phaseolus vulgaris*)

nebo lípa srdčitá (*Tilia cordata*). Epigeické rostliny mají často malá semena s malou zásobou energetických látek, a proto energii pro klíčení získávají fotosyntézou děložních lístků. U těchto druhů je kutikula pokrývající dělohy a hypokotyl podstatná pro jejich správnou funkci (Moussu et al., 2013; San-Bento et al., 2014; Ingram et al., 2017). Oproti tomu u hypogeických druhů se na povrchu děloh ani hypokotylu kutikula nejspíš nenachází (Borisjuk et al., 2003; Ingram et al., 2017). Dělohy hypogeických druhů zůstávají uzavřeny pod zemí v semeni a předávají rostlině energii ze zásobních látek, které obsahují. Hypokotyl je brzděn v růstu a nevyrůstá nad zem. Semena hypogeických druhů, mezi které patří například hrách setý (*Pisum sativum*), dub letní (*Quercus robur*) či lilie zlatohlavá (*Lilium martagon*), bývají větší než semena epigeických rostlin a často obsahují vyšší zásobou energetických látek.

1.5 Biosyntéza kutikuly

První fáze biosyntézy kutikuly, kutinu i kutikulárních vosků, je sdílena se syntézou mastných kyselin (fatty acid – FA). Biosyntéza FA probíhá v chloroplastech mezofylových a v plastidech epidermálních buněk, v případě FA jako prekurzorů kutinu a kutikulárních vosků pak výhradně v plastidech epidermálních buněk. Biosyntéza začíná de novo syntézou C16 a C18 FA ve stromatu plastidů epidermálních buněk (**Obr. 2**). Nově syntetizované C16 a C18 FA jsou poté transportovány do endoplazmatického retikula (ER), kde se syntéza rozchází a pokračuje zvlášť pro kutikulární vosky a zvlášť pro kutin. Nasyntetizované prekurzory vosků (VLCFA) i kutinu (C16 nebo C18 FA) jsou následně z ER transportovány přes plazmatickou membránu a buněčnou stěnu do kutikulární membrány. Mechanismus transportu zatím není zcela znám, ale je navrženo několik variant, které se nejspíš navzájem doplňují a fungují dohromady. Po transportu z ER jsou vosky i kutin zabudovány do kutikulární membrány. Monomery kutinu musí být navíc před zabudováním do kutikulární membrány polymerovány, zatím ne úplně objasněným mechanismem (Yeats et al., 2013; Lewandowska et al., 2020; Philippe et al., 2020; Bhanot et al., 2021).

Většina toho, co je známo o biosyntetických drahách vedoucích ke vzniku a formování kutikuly bylo zjišťováno na omezeném množství modelových rostlin, zejména na huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*), ale také na lilku rajčeti (*Solanum lycopersicum*) či rýži seté (*Oryza sativa*). Proto určitě ne vše platí univerzálně, a ne vše je známo. Některé dráhy biosyntézy se liší taxonomicky i mezi různými orgány jedné rostliny. Výběr biosyntetických drah, které mohou v daném rostlinném orgánu probíhat je orgánově specifický. Odpovídá odlišnosti kutikul mezi různými orgány rostlin (Hauke et al., 1998; Jetter et al., 2001; Ingram et al., 2017). Například syntéza sekundárních alkoholů a ketonů se u huseníčku téměř nevyskytuje v listech, ale probíhá v řapících, vyvíjejícím se stonku a šešulích (Greer et al., 2007).



Obr. 2: Souhrn biosyntézy a exportu kutinových a voskových monomerů v epidermálních buňkách rostlin (Bhanot et al., 2021)

1.5.1 De novo syntéza FA v plastidech

De novo biosyntéza C16 a C18 mastných kyseliny probíhá ve stromatu plastidů epidermálních buněk. Počátečním substrátem syntézy uhlíkové kostry všech FA je acetyl-CoA, který slouží jako centrální meziprodukt na různých místech buňky. Slouží mimo jiné jako prekurzor syntézy nukleových kyselin, fytosterolů či prodlužováním některých FA přináší uhlík do citrátového cyklu. I přesto se ale zdá, že acetyl-CoA neprochází membránou a musí být nově syntetizován na každém z míst použití (Ohlrogge et al., 2015). V plastidech

vzniká pomocí pyruvát dehydrogenázy přímo z pyruvátu vznikajícího během glykolýzy. Z acetyl-CoA a CO_2 dále ATP dependentní reakcí vzniká pomocí acetyl-CoA karboxylázy malonyl-CoA. Malonyl-CoA je následně malonyl-CoA:ACP transacylázou připojen na acyl přenášející protein (acyl carrier protein-ACP), kofaktor, na který bývá rostoucí acylový řetězec připojen během celé biosyntézy FA v plastidech. ACP bývá považován za součást komplexu syntázy mastných kyselin (fatty acid synthase – FAS), který je u rostlin složen z několika oddělených enzymů (Kunst et al., 2003; Ohlrogge et al., 2015). Komplexem FAS jsou souhrnně nazývány enzymy katalyzující sérii enzymatických reakcí samotné biosyntézy FA. (Post-Beittenmiller, 1996; Kunst et al., 2003; Samuels et al., 2008; Ohlrogge et al., 2015). Samotná biosyntéza FA začíná za pomoci ketoacyl-ACP syntázy (KAS) kondenzací acetyl-CoA a malonyl-CoA za uvolnění CO_2. Poté následuje sestava tří postupných reakcí, a to redukce β-ketoacyl-ACP, dehydratace 3-hydroxyacyl-ACP a redukce *trans*-Δ^2-enoyl-ACP, kde každá z redukcí vyžaduje dodání jednoho NADPH. Z těchto tří postupných reakcí vzniká nasycený acyl prodloužený o dva uhlíky, který slouží jako primer pro další kondenzaci s malonylem-CoA pomocí KAS. Poté opět následuje sestava tří postupných reakcí: redukce, dehydratace a redukce. Protože každý cyklus dodá ke vznikajícímu acetylu dva uhlíky musí pro vznik C16 a C18 FA proběhnout 7 – 8 cyklů, které spotřebují 14 – 16 molekul NADPH. Během syntézy se vystřídají tři typy FAS komplexů lišících se v KAS, které jsou specifické pro určitou délku acylového řetězce: KASIII (C2-C4), KASI (C4-C16) a KASII (C16-C18). Reduktázy a dehydratáza oproti KAS nejsou nikterak specifické na délku vznikajícího řetězce a jsou u všech komplexů FAS stejné (Post-Beittenmiller, 1996; Kunst et al., 2003; Samuels et al., 2008; Ohlrogge et al., 2015).

Typický cyklus syntézy FA v plastidech končí na C16 a C18, po proběhnutí několika cyklů syntézy. Poté je potřeba vzniklý řetězec FA upravit, popřípadě přenést do míst využití či míst pokračování jejich biosyntézy. Část FA je integrována do lipidů v rámci takzvané prokaryotické cesty syntézy lipidů uvnitř plastidů (Jessen et al., 2015; Li et al., 2016). Kdežto většina prochází takzvanou eukaryotickou cestou syntézy lipidů, kdy jsou řetězce FA transportovány do ER. V ER probíhá další prodlužování řetězců, úpravy acylů a syntéza lipidů, tedy i kutikulárních vosků či kutinu. Mechanismus určení osudu daného FA řetězce a mechanismus přenosu do ER není ještě zcela znám. Například u housenky je více než 50% FA syntetizovaných v epidermálních buňkách přeneseno přes plazmatickou membránu do jiných buněk, do buněčné stěny či kutikulární membrány (Suh et al., 2005; Li et al., 2016). Zdá se, že nejprve je z ACP hydrolyzovaná acylová část pomocí acyl-ACP thioesterázy za

vzniku volných FA. Odstřihnutí acylové části od ACP brání dalšímu prodlužování řetězce FA a dosud neznámým mechanismem směruje vzniklý řetězec pro přenos ven z plastidu do místa dalšího využití (Samuels et al., 2008; Ohlrogge et al., 2015; Li et al., 2020; Wang et al., 2020). Samotný mechanismus přenosu FA z plastidů do ER je nejasný a nejspíš specifický pro typ FA a orgán rostliny. Existuje proto několik možností přenosu FA ven z plastidů. Některé důkazy podporují přenos FA pomocí usnadněné difuze (von Berlepsch et al., 2012). Další možností je přenos pomocí aktivních ATP-vázajících kazetových transportérů (ATP-binding cassette transporters – ABC) vázaných v membráně (Kunz et al., 2009). Přenos některých řetězců FA je v květech a listech *Arabidopsis* zprostředkováván pomocí membránového proteinu FA PŘENAŠEČE1 (FATTY ACID EXPORT1 – FAX1), který se nachází ve vnější membráně plastidů, a je prvním takovým popsaným proteinem (Li et al., 2015, 2020). Takto přenesené FA řetězce jsou následně aktivovány na acyl koenzymu A (CoA) a to nejspíš pomocí syntáz LACS (long chain acyl-coenzyme A synthases) připojených ve vnější membráně plastidů (Jetter et al., 2008; Samuels et al., 2008; Yeats et al., 2013; Jessen et al., 2015; Li et al., 2015, 2020; Lewandowska et al., 2020). Podle některých studií může být u *Arabidopsis thaliana* přenašečem FA z plastidů LACS9, který je připojený ve vnější membráně plastidů (Jetter et al., 2008; Li et al., 2015, 2020). To ale vyvrací Jessen et al. (2015), který studoval jednoduché i dvojité mutanty *lacs9* a *lacs4*, u kterých byl export FA z plastidů jen mírně pozměněn. Jeho studie naopak uvádí, že LACS9 a LACS4 slouží spíše pro opačný přenos FA, tedy z ER do plastidů v rámci syntézy lipidů tylakoidní membrány. Pro přenos FA ven z plastidů zůstává proto správná isoforma LACS zatím neznámá (Jessen et al., 2015). Když jsou FA esterifikované na acyl-CoA jsou přeneseny acyl-CoA vazebnými proteiny z plastidu či cytosolu do míst kontaktu s ER membránou. (Samuels et al., 2008; Yeats et al., 2013; Li et al., 2015, 2020; Wang et al., 2020). Dovnitř ER pravděpodobně importují řetězce acyl-CoA ATP-vázající kazetové transportéry9 (ATP-binding cassette transporters – ABCA9) (Li et al., 2015, 2020).

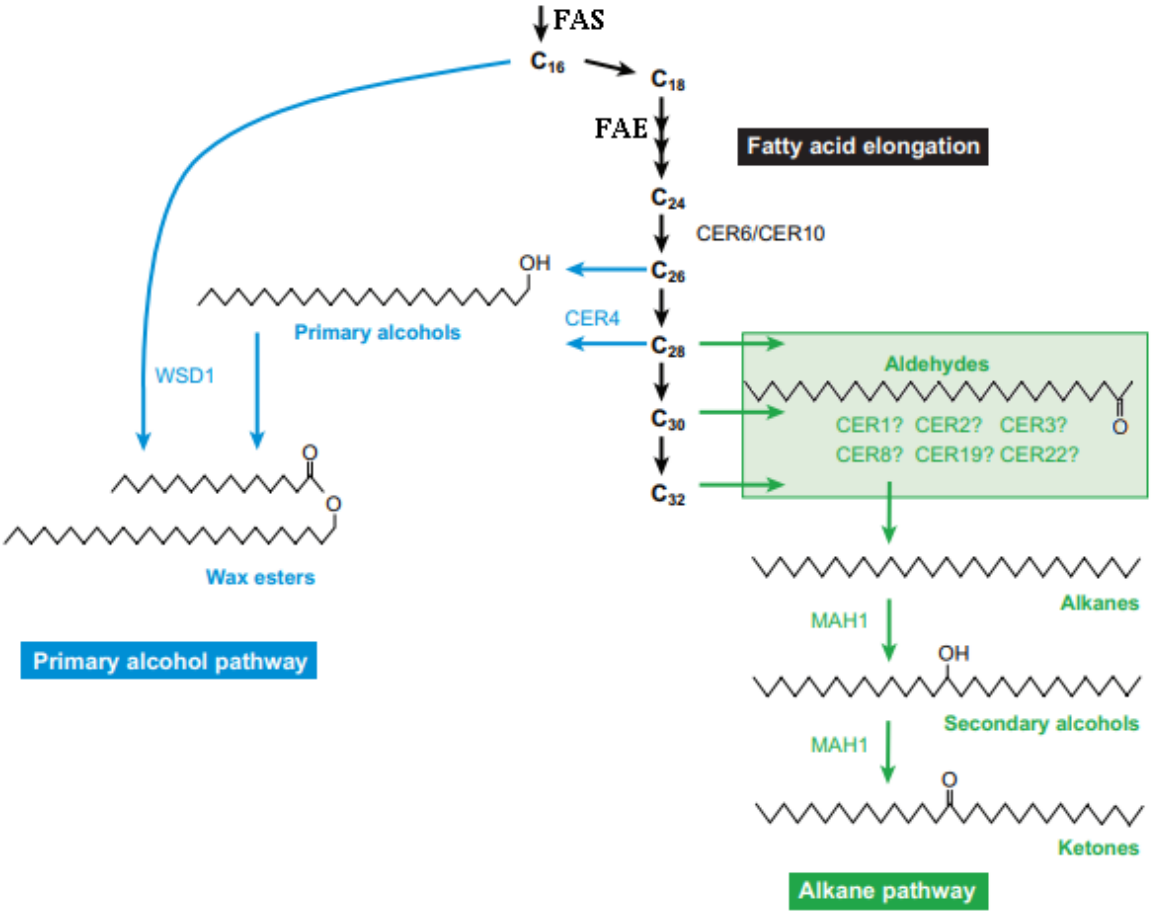
1.5.2 Elongace lipidů v endoplazmatickém retikulu

V ER se syntéza kutinu a kutikulárních vosků rozchází. Při biosyntéze **kutikulárních vosků** slouží C16 a C18 FA či C16 a C18 acyl-CoA přenesené do ER jako prekurzory pro vznik velmi dlouhých řetězců (very-long-chain – VLC) acyl-CoA. Některé FA jsou konjugované na acyl-CoA pomocí LACS v membráně plastidů či pomocí LACS přímo v ER, u *Arabidopsis thaliana* pomocí LACS1 za přispění LACS2 (Samuels et al., 2008; Yeats et al.,

2013; Zhao et al., 2019). Vznik VLC acyl-CoA je katalyzován enzymy skládajícími FA elongázový (fatty acid elongase – FAE) komplex. Komplex FAE je složen z β-ketoacyl-CoA synázy (KCS), β-ketoacyl-CoA reduktázy (KCR), 3-hydroxyacyl-CoA dehydratázy (HCD) a enoyl-CoA reduktázy (KCR), které katalyzují postupnou kondenzaci, redukci, dehydrataci a redukci. Tyto čtyři reakce se postupně střídají a několikrát za sebou cyklicky opakují. FAE v ER analogicky k biosyntéze pomocí FAS v plastidech prodlužuje acylový řetězec v každém cyklu o dva uhlíky za spotřeby NADPH (Cassagne et al., 1994; Samuels et al., 2008). Jen s tím rozdílem, že pro FAE není donorem uhlíků malonyl-ACP, jako u FAS v plastidech, ale malonyl-CoA, který vzniká mimo plastidy pomocí acyl-CoA karboxylázy (Cassagne et al., 1994; Kunst et al., 2003; Yeats et al., 2013; Wang et al., 2020). Prodlužování VLC acyl-CoA do požadované délky se účastní několik různých typů elongáz specifických pro určitou délku acylového řetězce. Specificita různých typů komplexů FAE elongáz je určena typem podjednotky KCS (Kunst et al., 2003; Samuels et al., 2008; Pascal et al., 2019). Kromě enzymů FAE se elongace účastní i ECERIFERUM2 (CER2) a jeho homology, které dále prodlužují VLC acyl-CoA na řetězce delší než C28 (Kong et al., 2020; Wang et al., 2020). Prodlužování VLCFA může být ukončeno thioesterázou za vzniku volných VLCFA nebo můžou být VLC acyl-CoA dále modifikovány na primární alkoholy a voskové estery takzvanou alkoholotvornou cestou (alcohol-forming pathway) či na alkany, aldehydy, sekundární alkoholy a ketony pomocí alkanotvorné cesty (alkane-forming pathway) (**Obr. 2**, **Obr. 3**) (Kunst et al., 2003; Samuels et al., 2008; Yeats et al., 2013; Wang et al., 2020).

Alkoholotvornou cestou vznikají převážně sloučeniny se sudým počtem uhlíků v řetězci, z kterých jsou nejčastější primární alkoholy (C26až C36) (Samuels et al., 2008). . VLC acyl-CoA jsou přeměněny acyl desaturázou ECERIFERUM17 (CER17) na n-6 mononenasycené FA, které jsou následně redukovány na primární alkoholy pomocí mastné acyl-CoA reduktázy (fatty acyl-CoA reductase – FAR), kterou může být ECERIFERUM 4 (CER4) (Rowland et al., 2006; Yang et al., 2017; Wang et al., 2020). Jsou zde rozlišovány i další FAR, o kterých je známo jen málo, pravděpodobně mají specificitu pro jinou délku řetězce (Rowland et al., 2006; Pascal et al., 2019). Primární alkoholy a VLC acyl-CoA můžou být dále použity jako prekurzory WSD1 (wax synthase/acyl-coa:diacylglycerol acyltransferase1) pro vznik voskových esterů (**Obr. 2**, **Obr. 3**) (Kunst et al., 2003; Samuels et al., 2008; Yeats et al., 2013; Wang et al., 2020).

Alkanotvornou cestou vznikají především sloučeniny s lichým počtem uhlíků, z kterých jsou (i u *Clusia rosea* (Medina et al., 2006; zde uváděná data) nejčastější alkany C29, C31 a C33, které například u listů huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) tvoří 70 – 80% vosků (Pascal et al., 2019). Alkanotvorná cesta začíná modifikací VLC acyl-CoA na alkany pomocí komplexu ECERIFERUM1(CER1)/ECERIFERUM3 (CER3)/CYTOCHROM B5 (CYTB5) (Bernard et al., 2012; Yeats et al., 2013; Pascal et al., 2019; Wang et al., 2020). Pascal et al. (2019) ukázali, že CER3 katalyzuje redukci VLC acyl-CoA na aldehydy, které nejspíše zůstávají vázané na komplexu CER1/CER3/CYTB5 a jsou pomocí CER1 dekarbonylovány na n-alkany. Během dekarbonylace je štěpena uhlíková vazba a je odštěpena jedna CO molekula (Samuels et al., 2008). CER1 se účastní dekarbonylace na alkany delší než C29. Místo CER1 může být součástí komplexu také CER1-LIKE1, který nejspíše katalyzuje syntézu alkanů od C25 až do C35 jen je u syntézy delších řetězců méně efektivní než CER1 (Pascal et al., 2019). Biosyntézu alkanů zesilují CYTB5, které pravděpodobně slouží jako kofaktory CER1 a zprostředkovávají přenos elektronů na katalytickou stranu CER1 (Bernard et al., 2012; Pascal et al., 2019). Tyto VLC alkany mohou být dále hydroxylovány na sekundární alkoholy a sekundárně oxidovány na ketony pomocí enzymu cytochrom P450 nazývaného jako MAH1 (midchain alkane hydroxylase1), která pravděpodobně katalyzuje obě reakce (**Obr. 2**, **Obr. 3**) (Greer et al., 2007; Samuels et al., 2008; Wang et al., 2020). Zdá se, že obě reakce probíhají jako postupná hydroxylace jednoho stejného atomu C uvnitř alkanového řetězce. První hydroxylací alkanového řetězce pomocí MAH1 vznikne sekundární alkohol (-CHOH-), který může být další hydroxylací přeměněn na geminální diol (-$C(OH)_2$-) mající dvě hydroxylové skupiny na jednom atomu C. Vzniklý geminální diol poté spontánně prochází dehydratací za vzniku ketonu (-CO-) (Greer et al., 2007; Samuels et al., 2008; Wang et al., 2020).



Obr. 3: Zjednodušená cesta syntézy vosků v *Arabidopsis thaliana.* FAS – fatty acid synthase, FAE – fatty acid elongase, WSD – wax synthase/acyl-coa:diacylglycerol acyltransferase, CER – ECERIFERUM, MAH – midchain alkane hydroxylase (Samuels, 2008, upraveno).

Při biosyntéze **kutinu** jsou C16 a C18 FA či C16 a C18 acyl-CoA přenesené do ER modifikovány na oxygenované mastné kyselino-glycerolové estery nazývané monoacylglyceroly. Není jisté, zda jsou FA používané pro biosyntézu kutinu aktivovány konjugací na acyl-CoA pomocí LACS už v membráně plastidů (Li et al., 2015, 2020) či pomocí LACS přímo v ER (Pollard et al., 2008; Yeats et al., 2013; Fich et al., 2016; Zhao et al., 2019). Zhao et al. (2019) představili pomocí studia mutantů u *Arabidopsis thaliana* možnost, že tuto funkci by mohli v ER zastávat LACS2 s přispěním LACS1 a LACS4. Mastné kyseliny aktivované LACS konjugací s acyl-CoA jsou následně ω-hydroxylovány často za účasti cytochrom P450 enzymů (cytochrome P450 – CYP). Přesněji ω-hydroxylaci na konečných uhlících katalyzují členy CYP86A rodiny, kdežto hydroxylaci na středořetězcových uhlících katalyzují členy CYP77A rodiny (Fich et al., 2016). Přesné pořadí reakcí není známo, ale zdá se, že ω-hydroxylace předchází hydroxylaci a syntéze acyl-CoA meziproduktů (Li-Beisson et al., 2009; Yeats et al., 2013; Fich et al., 2016). Další oxidací

hydroxylovaného koncového ω uhlíku může následně vznikat aldehydová a poté druhá karboxylová skupina. Čímž vznikají dikarboxylové kyseliny, které ale nejsou v kutinu rostlin moc časté (mimo huseníček rolní - *Arabidopsis thaliana* Kurdyukov et al., 2006 a). Enzymy katalyzující tuto reakci nejsou plně potvrzeny, výzkumy mutantní rostlin ukazují na účast CYP86A2 a HOTHEAD (Kurdyukov et al., 2006 a; Pollard et al., 2008; Fich et al., 2016). Nakonec dochází k esterifikaci, kdy jsou acylové skupiny přenesené z acyl-CoA na glycerol-3-fosfát pomocí glycerol-3-fosfát acyltransferázy (glycerol-3-phosphate acyltransferase – GPAT) čímž vznikají kutinové monomery (Pollard et al., 2008; Yeats et al., 2013; Fich et al., 2016). Konkrétně vznikají 2-monoacylglyceroly (2MHG), neboť účastnící se GPAT, nejspíše GPAT4 a GPAT6 či GPAT8 (Li et al., 2007; Yang et al., 2010), přenáší acylovou skupinu specificky na *sn*-2 pozici glycerolu. Aby následně mohly být kutinové monomery včleněny do kutinové vrstvy kutikuly musí být přeneseny přes polysacharidovou buněčnou stěnu do míst, kde jsou polymerovány.

Uvnitř jednotlivých buněk jsou FA hojně přenášeny mezi ER a plastidy oběma směry, ale každá z buněk syntetizuje lipidy, glycerolipidy i FA vlastní biosyntézou a téměř je nepřenáší mezi buňkami (Ohlrogge et al., 2015). Jen epidermální buňky se vymykají tomuto pravidla a přenášejí prekurzory kutikuly, tedy vosky a monomery kutinu, z ER ven z buněk a ukládají je do kutikulární membrány.

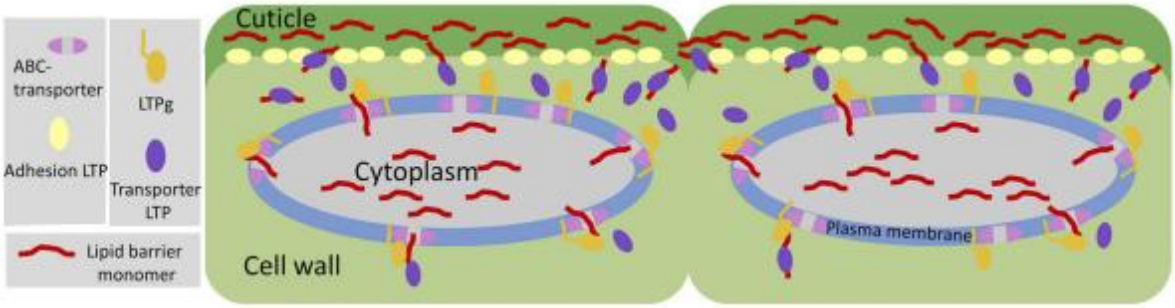
1.5.3 Doprava na povrch kutikulární membrány

Po dokončení syntézy voskových a kutinových prekurzorů v ER musí být přeneseny přes plazmatickou membránu a polysacharidovou buněčnou stěnu do vznikající kutikulární membrány. Zde jsou kutinové monomery polymerizovány a kompletovány s voskovými složkami. Většina transportních mechanismů zatím není příliš známa.

Část přenosu voskových i kutinových prekurzorů **přes plazmatickou membránu probíhá pomocí ABC** (ATP-binding cassette) transportérů z G podrodiny (**Obr. 4**, **Obr. 5**) (Yeats et al., 2013; Fich et al., 2016; Li et al., 2016; Philippe et al., 2020; Stępiński et al., 2020; Wang et al., 2020; Bhanot et al., 2021; Xin et al., 2021). Takzvané kompletní (full-size) ABC transportéry obsahují dvě ABC a dvě transmembránové podjednotky v jednom polypeptidu. Kdežto poloviční (half-size) transportéry dosahují své funkce dimerizací, mohou tvořit homo i heterodimery (Panikashvili et al., 2007; McFarlane et al., 2010). Na základě studia mutantů *Arabidopsis thaliana* v různých ABCG transportérech se zdá, že pro transport kutinových

prekurzorů slouží především half-size transportéry ABCG11 v listech i stoncích, ABCG13 v květech a pravděpodobně i full-size transportér ABCG32, jehož fungování ale není úplně vyjasněné. Pro transport voskových prekurzorů, takto fungují nejspíše half-size transportéry ABCG11 v listech i stoncích, ABCG12 ve stoncích a možná i full-size transportér ABCG32 (Panikashvili et al., 2007, 2011; McFarlane et al., 2010; Yeats et al., 2013; Li et al., 2016; Xin et al., 2021). Pro kutinové monomery byla kromě přenosu přes ABC transportéry také navržená hypotetická cesta průchodu z ER přímo přes plazmatickou membránu v místech dotyku obou membrán (Samuels et al., 2012; Fich et al., 2016).

Dalším krokem transportu do kutikuly je málo známý přenos hydrofobních prekurzorů kutikuly **přes** hydrofilní polysacharidovou **buněčnou stěnu**. Tento přenos mohou zajišťovat **LTP** (lipid transfer protein), které se vyvinuli až u suchozemských rostlin (Edstam et al., 2011). Zatím bylo klasifikováno 5 hlavních (LTP1, LTP2, LTPc, LTPd, a LTPg) a 5 vedlejších typů LTP lišících se vzdálenosti cysteinových reziduí a posttranslačními modifikacemi.



Obr. 4: Role ABC a LTP transportérů v přenosu lipidových monomerů při tvorbě kutikuly. Barevně jsou odlišeny tři typy LTP: LTPg (oranžově) přebírají lidové monomery od ABC transportérů (růžově) ležících uvnitř plazmatické membrány, transportní LTP (modře) a adhezní LTP (světle žlutě) (Edqvist et al., 2018, upraveno).

Přičemž LTPd, a LTPg byli nalezeny u všech zkoumaných suchozemských rostlin (Edstam et al., 2011; Edqvist et al., 2018). LTPg mají GPI (glykosilfosfatidylinositolovu) kotvu, kterou jsou kotveny z vnější strany plazmatické membrány. Podle některých modelů (**Obr. 4**, **Obr. 5**) LTPg vážou prekurzory kutikuly po tom, co projdou ABC transportéry a předávají je transportním LTP. Transportní LTP přenáší prekurzory kutikuly od LTPg do míst ukládání kutikulární membrány. Transportu přes buněčnou stěnu se nejspíš, zatím ne zcel známým způsobem, účastná i adhezní LTP, jejichž rolí by mohlo být připojování kutikulární hydrofobní bariéry k buněčné stěně (Edstam et al., 2011; Yeats et al., 2013; Fich et al., 2016; Li et al., 2016; Edqvist et al., 2018). LTP přenáší vosky a pravděpodobně i některé kutinové monomery

vazbou těchto hydrofobních látek do hydrofobní dutiny LTP (Edstam et al., 2011; Edqvist et al., 2018; Philippe et al., 2020). Ačkoliv byly LTP objeveny ve spektru druhů, pořád chybí klíčové znalosti mechanismům. Například bez možnosti recyklace LTP po uvolnění přenášeného nákladu, by tento proces byl velice energeticky náročný. Proto vznikají i různé alternativní hypotézy mechanismu přenosu, které by byly jednodušší a méně energeticky náročné. Jedna z hypotéz mluví například o pasivním fázovém rozdělení, kdy kutikulární prekurzory difundují skrz hydrofilní prostředí apoplastu, hromadí se vně a díky svým biofyzikálním vlastnostem se sami spojují a tvoří hydrofobní kutikulu (Fich et al., 2016).

Po přenosu prekurzorů kutikuly vně buněčné stěny je potřeba **sestavit, uspořádat a modifikovat složky** tak, aby vznikla funkční kutikulární membrána. Mechanismus těchto procesů není úplně objasněn. Bylo ukázáno, že vosky tvořící vrstvu epikutikulárních vosků se po jejím mechanickém odstranění dokáží regenerovat a znovu složit do správných krystalických struktur (Koch et al., 2004). Vzniklo několik hypotéz tvorby EW krystalů. Jedna z teorií navrhuje možnost vytlačování krystalů přidáváním voskových složek zespodu kutikulární membrány a vytlačováním intrakutikulárních vosků. Tomu ale nenasvědčuje rozdílné chemické složení vosků IW a EW (Wen et al., 2006; Buschhaus et al., 2007, 2011; Ji et al., 2008). Další možností je přenos specifických vosků přes vrstvy kutikuly do míst určení. U sněženky podsněžník (*Galanthus nivalis*) a ifejonu jednokvětého (*Ipheion uniflorum*) byla analýzou pomocí AFM (Atomic Force Microscopy) pozorována tvorba nových epikutikulárních voskových krystalů po jejich mechanickém odstranění. Nové voskové krystaly se tvořili na povrchu celistvé vrstvy vosků, z čehož lze usoudit, že nové voskové molekuly prochází touto vrstvou a tvoří krystaly nad ní (Koch et al., 2004). Po dosažení cílového místa se nejspíš EW krystaly samo-organizují (self-assembly) díky svým fyzikálním a chemickým vlastnostem bez přispění jakýchkoliv enzymů (Koch et al., 2004), což ukazují i studie krystalizace EW *in vitro* (Jeffree et al., 1975; Jetter et al., 2016). Mechanismus skládání a uspořádávání intrakutikulárních vosků mezi kutin polymerové kostry je neznámý, což může být způsobeno jeho složitostí a obtížností jeho zkoumání.

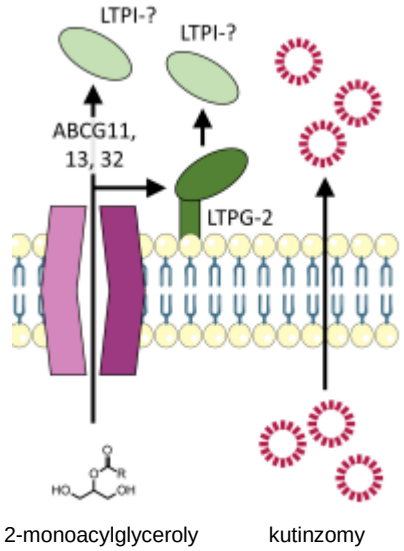
Kutinové monomery je pro utvoření kutikulární membrány potřeba **polymerizovat**. Molekulární mechanismus tohoto procesu byl dlouho neznámý. Dnešní poznatky pochází především ze studia mutantních rostlin a pořád nejsou kompletní. Polymerizace může probíhat **enzymatickou cestou** pomocí několika enzymů acyltransferázového typu, které zprostředkovávají sestavování polymerů tvorbou esterových vazeb. Nejprozkoumanější

z těchto enzymů je CUTIN SYNTHASE1 (CUS1). CUS1 a BDG (BODYGUARD), další z enzymů účastnící se polymerizace kutinu, jsou extracelulární enzymy patřící do α/β superrodiny hydroláz, jež se vyznačují přítomností dvou domén (hlavní a víčkové) mezi nimiž se nachází aktivní místo. Cesta CUS1 i BDG z místa vzniku do místa působení ve vznikající kutikuly je nejasná. CUS1 je protein z rodiny lipáz/hydroxyláz obsahujících GDSL motiv (konzervované zbytky okolo katalytického Serinu: Gly-Asp-Ser-Leu) (Yeats et al., 2013; Fich et al., 2016; Bakan et al., 2017; Philippe et al., 2020; Segado et al., 2020; Stępiński et al., 2020). Zapojení proteinu s GDSL motivem do polymerizace kutinu u listů Agáve americké (*Agave americana*) odhalil imunolokalizací už výzkum Reina et al. (2007). CUS1 protein byl ale poprvé objeven u rajčete (*Solanum lycopersicum*) v mutantech *cutin deficient1* (*cd1*) (Isaacson et al., 2009). CUS1 působí extracelulárně a funguje jako acyltransferázový enzym, který propojuje 2-MHG kutinové monomery esterifikací. Přesný mechanismus fungovaní enzymu CUS1 není úplně jasné a je možné, že se polymerace kutinových monomerů účastní i další typy CUS enzymů. Esterifikovány jsou konečné nebo středořetězcové hydroxylové skupiny. Pokud esterifikace proběhne pouze na hydroxylové skupině ve středu řetězce vznikají lineární polymery, kdežto esterifikací obou hydroxylových skupin vznikají větvené polymerové struktury. (Yeats et al., 2013; Fich et al., 2016; Bakan et al., 2017; Philippe et al., 2020; Segado et al., 2020). BDG je podle studií na různých mutantech *bdg* u huseníčku velice důležitý pro správný obsah kutinu v kutikule mladých listů a květů. Především ovlivňuje polymerizaci C_{18} monomerů kutinu vně buněčné stěny (Kurdyukov et al., 2006 b; Jakobson et al., 2016; Segado et al., 2020). Posledním známým enzymem účastním se polymerizace kutinových monomerů je cytoplazmatický enzym DCR (DEFECTIVE IN CUTICULAR RIDGES). DCR je členem BAHD acyltransferáz (Yeats et al., 2013; Fich et al., 2016; Segado et al., 2020; Stępiński et al., 2020), u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a bobu obecného (*Vicia faba*) bylo ukázáno, že se účastní oligomerizace určitých součástí kutinu již v cytoplasmatické membráně (Panikashvili et al., 2009; Segado et al., 2020).

Další, nově objevený, způsob, kterým probíhá **transport a polymerizace kutinu** souvisí s funkcí **kutinzomů** (cutinsomes) (**Obr. 5**). Kutinzomy jsou kulovité nanostruktury (40 – 200 nm), které se pravděpodobně samo-organizují (self-assembly) fyzikálně-chemickými procesy bez přispění enzymů (Heredia-Guerrero et al., 2008; Fich et al., 2016; Segado et al., 2020; Stępiński et al., 2020; Bhanot et al., 2021; Xin et al., 2021). Polymerizace kutinových monomerů pomocí kutinzomů se proto někdy nazývá **neenzymatickou cestou** polymerizace. Kulovité struktury podobné kutinzomům byly v brzkých fázích vývoje

zaznamenány na vnitřní straně rostoucí kutikuly již dříve (Riederer et al., 1988; Heide-Jørgensen, 1991; Cook et al., 1998; Stępiński et al., 2020). Kutinzomy se formují v cytoplazmě nebo v druhově specifických cytoplazmatických doménách nazývaných lipotubuloidní metabolony (lipotubuloid metabolons – LMs). Lipotubuloidní metabulony obsahují lipidová tělíska propletená s mikrotubuly, polysomy, drsným ER a aktinovými filamenty. Mohou obsahovat také pár mitochondrií, Golgiho struktur a mikrotělísek, později také autolytické vakuoly (Kwiatkowska et al., 2015). Kutinzomy k sestavení využívají schopnosti hydroxy FA se samo-organizovat a esterifikovat fyzikálně-chemickými procesy. Kutinzomy jsou složeny ze dvou jasně strukturovaných segmentů. Vnitřní část tvoří rozvětvené a propojené hydroxykyseliny, které vznikají esterifikací skupin obsahujících uprostřed řetězce kyslík (epoxo, hydroxo, oxo skupiny). Vnitřní část je obalena hydrofilní karboxylátovou/karboxylovou a pektinovou vrstvou, která odděluje lipidický obsah od vnějšího vodního prostředí (Stępiński et al., 2020; Bhanot et al., 2021). Kutinzomy podle všeho vnáší do kutikuly větvené a propojené esterifikované polyhydroxy FA (Stępiński et al., 2020). Pomocí imunolokalizace a TEM se ukazuje, že kutinzomy jsou do kutikuly patrně přenášeny pomocí mikrotubulů skrz cytoplazmatickou membránu a buněčnou stěnu (Stępiński et al., 2020; Bhanot et al., 2021).

Kutinzomy doplňují fungování předchozích způsobů transportu do kutikulární membrány (**Obr. 5**). Segado et al. (2020) ukázali, že kutinzomy se účastní ukládání a polymerizace kutinových monomerů během buněčného dělení do začátku zvětšování buněk (ABCG, LTP a ustavují primární ochrannou prokutikulu. CUS1, které přijímá prekurzory z jiných cest transportu, polymerizuje kutinové monomery v pozdějších fázích vývoje od začátku zvětšování buněk. Zatímco kutinzomy vnáší do kutikuly větvené polymery, CUS1 vytváří jak lineární tak větvené polymery (Stępiński et al., 2020). CUS1 přetváří prokutikulu na kutikulu, která je méně uspořádaná. Kutinové polymerové domény jsou reorganizovány, vkládány jsou další složky kutikuly a kutinové vazby jsou modifikovány (Segado et al., 2020). S funkcí kutinzomů souvisí také funkce některých enzymů jako například GPAT6 či DGAT2. Pro ně můžou kutinzomy sloužit jako transportní váčky nesoucí je do kutikuly (Segado et al., 2020).



Obr. 5: Model spolupráce mechanismů podílejících se na transportu monomerů kutinu přes plazmatickou membránu a dál přes buněčnou stěnu rostlin (Xin et. al., 2021).

1.6 Obnova a obměna složek kutikulární membrány

Kutikula se nachází na vnějším povrchu rostlinných pletiv, leží na rozhraní mezi vnějším a vnitřním prostředím rostliny. Její obnovu a obměnu proto ovlivňují jak vnitřní, tak vnější podmínky (viz. kapitola **1.4 Funkce kutikuly**). Různé součásti kutikulární membrány se vyměňují a obnovují různě v závislosti na vnitřním načasování a vnějších podmínkách. Obnova kutikulární membrány byla zkoumána především z pohledu obměny kutikulárních vosků, s vyšším důrazem na obnovu epikutikulárních vosků. U různých druhů rostlin bylo ukázáno prodlužování průměrné délky řetězců kutikulárních vosků během vegetativní sezóny, a to u popínavého keře břečťanu popínavého (*Hedera helix*) (Hauke et al., 1998), u keře bobkovišně lékařské (*Prunus laurocerasus*) (Jetter et al., 2001) a stromů javoru klenu (*Acer pseudoplatanus*) (Sachse et al., 2009), jasanu ztepilého (*Fraxinus excelsior*), jasanu zimnáře (*Fraxinus ornus*), lísky obecné (*Corylus avellana*), jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia*) a buku lesního (*Fagus sylvatica*) (Piasentier et al., 2000), i u trávy bojínku lučního (*Phleum pratense*) (Gao et al., 2012). Což může být vysvětleno tím, že při biosyntéze vosků jsou nejprve syntetizovány sloučeniny s kratšími uhlíkovými řetězci a teprve následně jsou syntetizovány vosky s delšími uhlíkovými řetězci (Gao et al., 2012). Není známé, jak tyto vosky s delšími uhlíkovými řetězci vznikají. Jednou z možností je elongace již existujících vosků, které by ale bylo nutné přenést z kutikuly do epidermálních buněk a po elongaci zpět do kutikuly. Druhou možností je syntéza nových vosků s delšími uhlíkovými řetězci v buňkách a nahrazení vosků s kratšími uhlíkovými řetězci v kutikule. Dřívější studie také měřili množství a sledovali změny chemického složení izolované kutikuly během vývoje listu či během vegetativní sezóny. U některých studovaných rostlin se ukázalo, že kutikula, její složení a množství, se

mění jen u mladých vyvíjejících se listů a po dosažení dospělosti listu se dále nemění (Stammitti et al., 1996; Jetter et al., 2000). Naopak jiné studie uvádějí, že se může měnit během celého života listu (Hauke et al., 1998; Jetter et al., 2001; Richardson et al., 2005). U bobkovišně lékařské (*Prunus laurocerasus*) Jetter et al. (2001) odhalili, že čisté množství epikutikulárních vosků se zvyšuje nejen u mladých (což ukázali ve své dřívější studii (Jetter et al., 2000)), ale také u plně vyvinutých, rok starých listů. Stejný výsledek pro ječmen setý (*Hordeum vulgare*) uvádí Richardson et al. (2005). Oproti tomu Hauke et al. (1998) při sledování kutikuly břečťanu popínavého (*Hedera helix*) ukázali dvě skupiny voskových složek chovajících se u plně vyvinutých listů odlišným způsobem. Množství voskových složek první skupiny apolárních a méně polárních molekul, které není třeba před analýzou upravovat, se po dosažení maximálního množství pomalu snižovalo. Kdežto množství voskových složek ze skupiny polárních molekul (primární alkoholy a esterifikované FA), které museli být před analýzou transesterifikovány, se po dosažení plně vyvinutého stádia listu dále neměnilo. Výsledkem těchto sledování je znalost čistých změn celkového množství kutikulárních složek (nárůst syntézou mínus úbytek erozí) jako skupin (alkany, alkoholy, aldehydy, mastné kyseliny, …), ale neříká nic o rychlosti výměny určité jedné složky kutikuly. Nověji lze rychlost obnovy určité kutikulární složky zkoumat pomocí izotopového značení stabilními izotopy vodíku či uhlíku, což jsou nejčastěji se vyskytující prvky skládající kutikulu i celou rostlinu. Izotop vodíku ^{2}H (deuterium) je používán pro značení zálivkové vody, izotopem uhlíku ^{13}C bývá značena atmosféra, z které rostlina C fixuje. Oba způsoby odhalují vysokou dynamiku výměn, ztrát a syntézy složek vosků. Pořád ale zůstává otázkou, zda se kutikulární vosky obnovují během celého života listu a jak k tomu dochází. U buku lesního (*Fagus sylvatica*) a javoru klenu (*Acer pseudoplatanus*) bylo pomocí značení $^{2}H_2O$ ukázáno, že n-alkany se u mladých listů obměňují za dobu kratší než dva týdny, což pro javor platí nejen pro mladé listy ale i po celou dobu života listu (Sachse et al., 2009). Oproti tomu Kahmen et al. (2011) u topolu chlupatoplodého (*Populus trichocarpa*), značeného také $^{2}H_2O$, ukázali, že se v kontrolovaných podmínkách nové kutikulární n-aklany syntetizují jen na začátku ontogeneze listu a později už ne. Na tuto studii ale navázali Gao et al. (2012), kteří u trávy bojínku lučního (*Phleum pratense*) odhadli na základě zalévání $^{2}H_2O$, že obrat vosků trvá v řádu týdnů. Nejrychleji v řádu několika dnů se vyměňují složky s kratšími řetězci (C16 a C18 kyseliny a C23 alkany), delší doby zaznamenali pro delší řetězce (například C27 alkan se vyměňuje 25x pomaleji než C23 alkan). Gao et al. (2012) navrhují, že obnova vosků je stimulována jejich přirozeným mechanickým obrušováním proudem vzduchu, a proto, na rozdíl od studie na topolu (*Populus trichocarpa*) (Kahmen et al., 2011), simulují proud

vzduchu použitím větráku. V přirozených podmínkách může dále kromě obrušování proudem vzduchu působit i mechanické odírání různými organismy a deštěm, jehož vliv není vůbec znám. Množství obroušených a přirozeně „odpadnutých“ složek vosků není známo, a proto je nemožné odhadnout reálnou rychlost obnovy vosků. Některé studie proto pozorují obnovu vosků až po jejich umělém mechanickém odstranění (Koch et al., 2004)

1.7 Metody extrakce epikutikulárních vosků

Existuje několik přístupů k vzorkování vrstvy epikutikulárních vosků z povrchu rostlinné kutikuly. Je to 1) přímý sběr pomocí stěru EW skelnou vatou namočenou v chloroformu. Další techniky zahrnují tzv. adhezivní techniky. Jde o použití 2) arabské gumy, 3) celulóza acetátu či 4) kolodia, které jsou na povrch listů naneseny v roztoku. Po zaschnutí/polymeraci jsou EW sundány s vrstvou zaschlého filmu a uvolněny do příslušného rozpouštědla. Dále se experimentuje s použitím kryo-lepidel, která ale poškozují živá rostlinná pletiva nutností vysokých změn teplot. Metody se liší selektivitou mezi IW a EW, složitostí aplikace a následné extrakce EW (Buschhaus et al., 2011; Jetter et al., 2016; Zeisler et al., 2016).

2 Stabilní izotopy uhlíku a jejich analýzy

Vše živé i neživé kolem nás je tvořeno atomy různých chemických prvků. Jednotlivé atomy se skládají z jádra a elektronového obalu. Uvnitř jádra atomu se nachází kladné protony a neutrální neutrony. Elektronový obal okolo jádra je tvořen záporně nabitými elektrony. Prvky se zapisují jako ${}^{A}_{Z}X$, kde Z označuje počet protonů (protonové číslo) a A (nukleonové číslo) označuje součet počtu protonů Z s počtem neutronů (neutronové číslo – N). Protonové číslo (Z) udává také základní počet elektronů atomu daného prvku. Při odtrhnutí či navázání elektronu se atom prvku mění v kladně nebo záporně nabitý iont. Určitý prvek je určen protonovým číslem Z. Oproti tomu neutronové číslo N (tedy i nukleonové A) se může mezi atomy prvku lišit. Atomy prvku lišící se v N se nazývají izotopy daného prvku. Izotopy jsou stabilní či nestabilní s různým poločasem rozpadu v závislosti na daném N.

Uhlík (C) je chemický prvek, který přirozeně tvoří několik izotopů. Nejhojněji (přibližně 98,8 %) se vyskytuje jako stabilní izotop ${}^{12}_{6}C$. Druhým méně hojným (přibližně 1,108 % atmosférického uhlíku) izotopem je ${}^{13}_{6}C$, který je těžší o jeden neutron. Posledním přirozeně vyskytujícím se izotopem uhlíku je ${}^{14}_{6}C$, který je nestabilní a velmi málo zastoupený (méně

než 0,000 000 000 1 %). Uměle byly připraveny i další izotopy uhlíku, které jsou ale velice nestabilní (například $^{11}_{6}C$s poločasem rozpadu 20 minut).

2.1 Diskriminace izotopu ^{13}C rostlinami

Rostliny ve svých pletivech obsahují relativně více ^{12}C, než je v atmosféře a v procesech asimilace CO_2 preferují ^{12}C v porovnáním s přirozeným poměrem zastoupení $^{13}C/^{12}C$ v atmosféře. Tento jev se nazývá diskriminace izotopu ^{13}C. K této diskriminaci dochází během několika procesů fixace CO_2 z atmosféry a jeho následného využití. Molekuly CO_2 vstupují do pletiva listu difuzí skrz hraniční vrstvu a průduchy, kde dochází k prvnímu zvýšení poměru izotopů uhlíku ve prospěch ^{12}C, neboť $^{13}CO_2$ difunduje pomaleji než $^{12}CO_2$. Výsledkem tohoto procesu je ochuzení vnitřní koncentrace CO_2 o $^{13}CO_2$, které lze vyjádřit frakcionačním faktorem 4,4‰. Frakcionační faktor je teoretická hodnota v ideálních podmínkách v klidném a nemíchaném vzduchu, je odvozen od izotopového efektu α, který udává poměr difuze $^{12}CO_2/^{13}CO_2$ při teplotě 20°C. Od tohoto poměru je odečtena 1 a výsledná hodnota je násobena 1000 (Farquhar et al., 1982; Bowling et al., 2008; Květoň, 2018). Druhým důležitým procesem, který přispívá k diskriminaci ^{13}C je karboxylace CO_2 pomocí enzymu RuBisCO (ribulóza-1,5-bisfosfát karboxyláza oxygenáza). Enzym RuBisCO preferuje při karboxylaci lehčí molekulu $^{12}CO_2$, která je reaktivnější. Výsledkem tohoto procesu je další ochuzení relativního obsahu ^{13}C, které lze vyjádřit frakcionačním faktorem 29‰ (Farquhar et al., 1982; Bowling et al., 2008; Květoň, 2018). K další diskriminaci ^{13}C může docházet post-fotosynteticky během metabolických procesů v závislosti na probíhajícím procesu. Například pro vznik C16 a C18 FA v plastidech je potřeba Acetyl-CoA vznikající pyruvát dehydrogenázou přímo z pyruvátu, který je produktem glykolýzy. Během tohoto procesu dochází k diskriminaci ^{13}C, takže výsledné lipidy jsou o ^{13}C ochuzeny oproti primárním asimilátům či suché hmotě listu, kterou představuje například celulóza (Melzer et al., 1987). Diskriminace ^{13}C se liší mezi různými skupinami rostlin, které se liší především fyziologicko-biochemických mechanismy fixace uhlíku a podle toho se dělí do třech základních skupin C3, C4 a CAM rostliny. Diskriminace dále závisí na dostupnosti CO_2 pro fixaci (přesněji jeho koncentraci v chloroplastech listu) a následných procesech. Při nižší dostupnosti molekul CO_2 diskriminují rostliny těžší $^{13}CO_2$ méně, jsou tedy relativně bohatší na ^{13}C v biomase. Vyjádřeno mechanisticky, při nedostatku substrátu není naplněna karboxylační kapacita RuBisCO, což zvyšuje pravděpodobnost navázání molekuly $^{13}CO_2$ (Květoň, 2018). Diskriminaci dále ovlivňují vnější podmínky jako je intenzita fotosynteticky aktivního záření, která ovlivňuje

rychlost fotosyntézy, vlhkost vzduchu a dostupnost půdní vody, teplota či období vegetativní sezóny, což vše ovlivňuje otevřenost průduchů, a tedy koncentraci CO_2 uvnitř listu. Například Lockheart et al. (1997) odhalili u břízy Ermanovy (*Betula ermanii*), dubu kaštanolistého (*Quercus castaneifolia*) a buku japonského (*Fagus japonica*), že na jaře jsou kutikulární n-alkany více obohacené o ^{13}C než na podzim, kdy je ^{13}C více diskriminováno.

2.2 Izotopové analýzy zastoupení ^{13}C

Relativní zastoupení izotopu ^{13}C ($\delta^{13}C$) u vzorků je zjišťováno izotopovou poměrovou hmotnostní spektrometrií (Isotope Ratio Mass Spectrometry, IRMS). V tzv. „bulk" režimu, je vzorek (např. homogenizovaná suchá hmota listu) uzavřený v cínové kapsli spálen v proudu čistého kyslíku při 950°C v reaktoru prvkového analyzátoru za vzniku CO_2. Izotopový poměr *R*, udávající poměr minoritního izotopu k četnosti majoritního izotopu, zde $^{13}C/^{12}C$ je poté zaznamenán IRMS propojeným s prvkovým analyzátorem. Relativní zastoupení izotopu ^{13}C může být také měřeno v jednotlivých chemicky čistých látkách v režimu látkově specifické analýzy poté, co je vzorek rozdělen plynovou (GC) nebo kapalinovou (LC) chromatografií. Vzhledem k tomu, že přirozené zastoupení minoritních izotopů biogenních prvků je opravdu velice nízké bylo pro izotopové složení látek zvoleno vyjádření relativního izotopového zastoupení (Urey, 1948). Relativní zastoupení izotopu ^{13}C ($\delta^{13}C$) ve vzorku je vypočteno jako rozdíl mezi izotopovým poměrem vzorku (R_{vz}) a standardu (R_s), který je vztažený k izotopovému poměru standardu R_s (McKinney et al., 1950): (Rovnice 1).

$$\delta^{13}C = [(R_{vz} - R_s)/R_s] \cdot 1000, [\delta^{13}C\ ] = ‰ \qquad \text{Rovnice 1}$$

Jako mezinárodně uznávaný standard se používá třetihorní vápenec označovaný jako VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite).

Jelikož jsou minoritní izotopy biogenních prvků přirozeně zastoupeny velice málo, bývají používány pro značení organických sloučenin a pozorování jejich osudu v chemických a fyzikálních procese uvnitř živých systémů. U rostlin, jak již bylo naznačeno, se používá kromě izotopu uhlíku ^{13}C ve formě $^{13}CO_2$, také izotop vodíku ^{2}H (deuterium) ve formě $^{2}H_2O$, izotop kyslíku ^{18}O či ^{15}N. Při použití těžkých izotopů jako značky už nejsou tyto izotopy minoritní, ale jsou v nadbytku (těžkého izotopu je ve vzorku více než lehkého) a k jejich pozorování se proto lépe, než δ můžou hodit tzv. „atomprocenta" (Dawson et al., 2002; Květoň, 2018). Atomprocenta se značí at% a popisují procentuální zastoupení minoritního stabilního izotopu ve vzorcích, takže jednotkou jsou [%] (Rovnice 2).

Rovnice 2

$$at\% = \frac{četnost\ těžkého\ izotopu}{(četnost\ lehkého\ izotopu) + (četnost\ těžkého\ izotopu)} \cdot 100$$

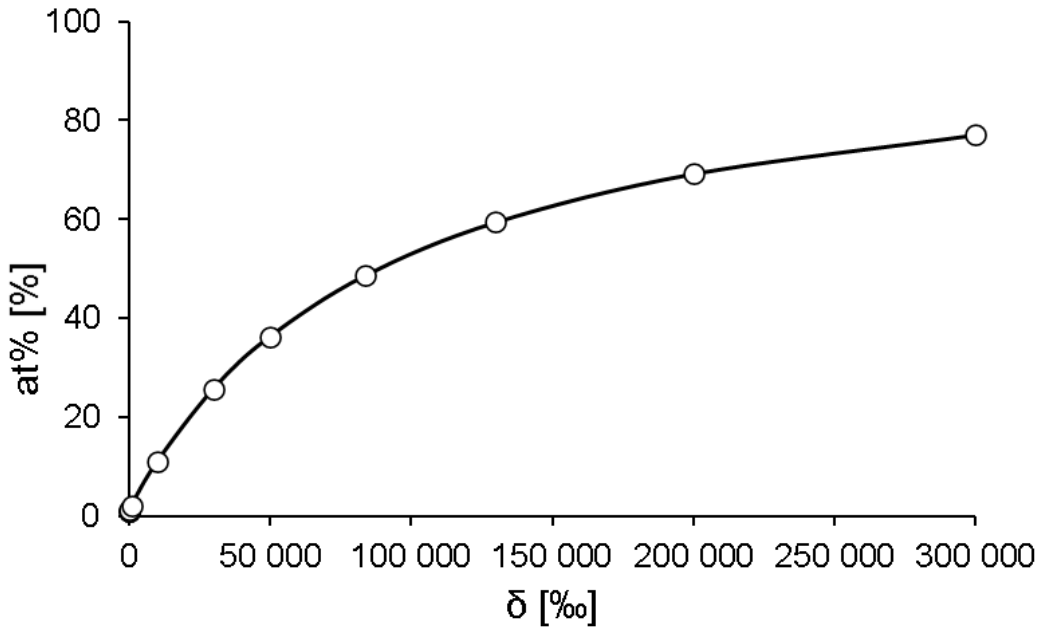
Pro izotop ^{13}C tedy vypadá rovnice následovně (Rovnice 3):

$$at\% = \frac{[^{13}C]}{[^{12}C] + [^{13}C]} \cdot 100$$ Rovnice 3

Z této rovnice vyplývá vztah pro δ a *at%* (Rovnice 4).

$$at\% = 100 \cdot R_s\,(\delta + 1000)/[R_s\,(\delta + 1000) + 1000]$$ Rovnice 4

Kde R_s je opět izotopový poměr standardu. Tento vztah je nelineární, což se projevuje především při vysokých hodnotách δ (**Obr. 6**). Proto je vyjádření obsahu ^{13}C v *at%* vhodnější než pomocí δ v případech, kdy vzorky obsahují velké množství „značky“ tj. těžkého izotopu (např. ^{13}C).



Obr. 6: Převod relativního zastoupení izotopů δ na atomprocenta at%.

2.3 Výpočty rychlosti obratu ^{13}C

Využití těžkých, v přirozeném zastoupení minoritních, stabilních izotopů prvků je výhodné pro sledování chemických a fyzikálních procesů v živých systémech bez radiačního nebezpečí a bez ochrany, která je nutná při práci s radioaktivními izotopy. Umožňuje kvantifikovat zdržení (dobu obratů) prvků v zásobnících a sledovat co se syntetizuje ze zásobních zdrojů a co z nově asimilovaných. Stanovení rychlosti obratu je ale přesto obtížné, protože vždy je zde možnost míchání s neznačeným, neznámým množstvím z dalších zdrojů.

Pro výpočet rychlosti poklesu množství či podílu značeného C v dané části bývá používána exponenciální funkce stejná, jaká se používá pro vyjádření rozpadu radioaktivních izotopů a pro radiokarbonové datování (Epron et al., 2012) (Rovnice 5).

$$C_{(t)}=C_0 \cdot e^{(-kt)} \qquad \text{Rovnice 5}$$

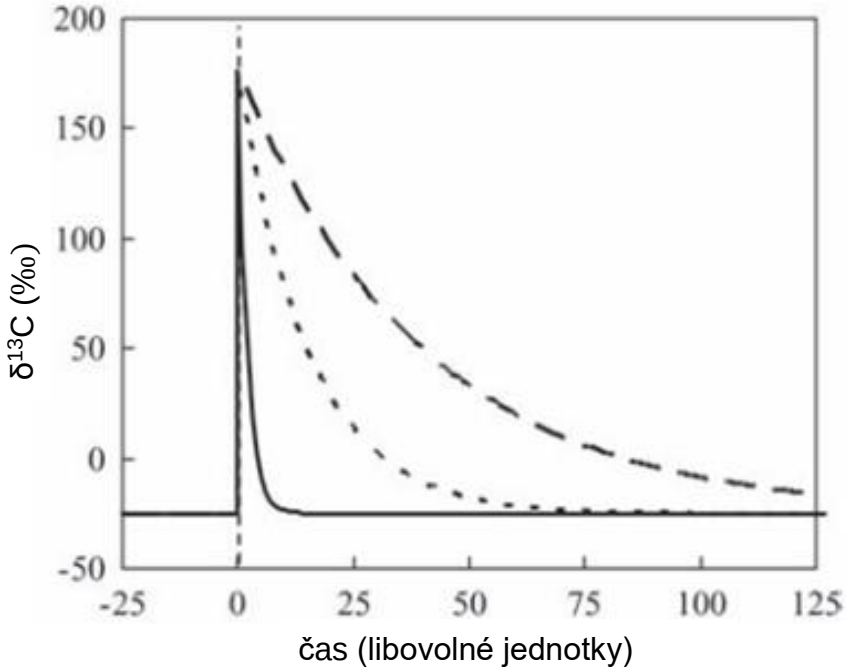
Kde *t* je čas, který uběhl od zaznamenaného maxima obsahu ^{13}C (např. po značícím pulzu v čase 0 v **Obr. 7**), $C_{(t)}$ je množství – (frakce) značeného C v daném čase *t*, C_0 je množství – (frakce) značeného C v čase maxima obsahu ^{13}C a k je rychlostní konstanta udávající ztrátu ^{13}C značky.

Při předpokladu systému v ustáleném stavu, kde jsou toky přímo úměrné velikosti zásobníku (kinetika prvního řádu), který je jen jeden, a kdy se značka těžkého izotopu ztrácí jen odtokem (k) (**Obr. 7**) můžeme počítat průměrnou dobu zdržení (τ, čas, který stráví průměrný atom C v zásobníku) (Rovnice 6) a poločas obratu uhlíku ($t_{1/2}$, čas potřebný na výměnu 50% C atomů v zásobníku) (Rovnice 7) (Derrien et al., 2011; Epron et al., 2012).

$$\tau = \frac{1}{k} \qquad \text{Rovnice 6}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \qquad \text{Rovnice 7}$$

Pro odhad těchto dvou veličin je potřeba předpokladu o systému v ustáleném stavu s kinetikou prvního řádu, což u většiny studovaných systémů bývá opravdu jen předpoklad. Proto je důležitý co nejkompletnější záznam obsahu značky od doby maxima jejího obsahu ve sledovaném zásobníku (zde ve voscích) až do doby, kdy je značky málo (např. 10 % maxima), aby bylo možné odhalit případné součásti zásobníku, ve kterých se sledovaný prvek vyměňuje pomaleji.



Obr. 7: Schématický diagram exponenciální kinetiky prvního řádu značky ^{13}C v jakékoliv značené části rostliny s průměrnou dobou zdržení τ=2 a tedy $t_{1/2}$=1,4 pro plnou čáru, τ=15 a tedy $t_{1/2}$=10,4 pro tečkovanou čáru aτ=40 a tedy $t_{1/2}$=27,6 pro čárkovanou čáru. Časová škála na ose x by se lišila podle studované části rostliny. Značící CO_2 obohacený o značku ^{13}C zde byl aplikován v čase 0 (vertikální čárkovaná čára). Graf nepočítá s žádným zpožděním mezi značením a nahrazování značky neznačeným CO_2 (upraveno podle Epron et al., 2012).

2.4 Výpočty rychlosti obratu ^{13}C v pletivech a EW značených listů

Pro možnost výpočtu průměrné doby zdržení τ a poločasu obratu uhlíku $t_{1/2}$ uvnitř pletiv a EW značených listů je potřeba vypočíst průměrnou rychlost (k) exponenciálního poklesu značky ^{13}C. Pro tento výpočet byl použit následující vztah (Rovnice 8) odvozený z Rovnice 5 kde t_{max} je čas od začátku značení, ve kterém naměřená hodnota v at% byla maximální ($at\%_{max}$) a od kterého dál naměřené hodnoty v at% už jen klesaly, t je doba odběru vzorku měřená od začátku značení a $at\%_t$ je hodnota at% v čase t.

$$k = \frac{\ln\left(\frac{at\%_t}{at\%_{max}}\right)}{t_{max} - t}$$ Rovnice 8

Pro výpočet k tímto vztahem (Rovnice 8) lze tedy použít pouze tu část křivky vyjadřující změnu $\delta^{13}C$ (či at% ^{13}C) v čase, kdy je značka ^{13}C nahrazována neznačeným izotopem uhlíku ^{12}C, a křivka $\delta^{13}C$ (či at% ^{13}C) klesá (**Obr. 7**). Ze získaného k byla vypočtena průměrná doba zdržení (τ) (Rovnice 6) a poločasu obratu uhlíku ($t_{1/2}$) (Rovnice7) zvlášť pro pletiva a EW značených listů.

2.5 Výpočty frakce ^{13}C v pletivech listu a EW

Pro výpočet frakce ^{13}C uhlíku v pletivech listu (F_{t_pl}) získané za čas t z naznačeného zdroje, kterým je zde atmosféra, byl použit následující vztah (Rovnice 9). Kde $at\%_t$ je hodnota at% daného pletiva v čase t, $at\%_{kon_pl}$ je hodnota at% pletiva kontroly pro danou rostlinu, měřené před začátkem značení tedy v čase 0, $at\%_{atm}$ je průměrné at% naznačené atmosféry a 1,11 je hodnota přirozeného výskytu ^{13}C v atmosféře Země v at%.

Rovnice 9

$$F_{t_pl} = \frac{at\%_{t_pl} - at\%_{kon_pl}}{at\%_{atm} - 1{,}11}$$

Frakce F_{t_pl} udává relativní obsahu uhlíku ^{13}C v naznačené rostlině ($at\%_{t_pl}$) vztažený k relativnímu obsahu uhlíku ^{13}C v atmosféře ($at\%_{atm}$), která je značená ze 100%, tedy pokud by atmosféra obsahovala pouze ^{13}C a žádný ^{12}C. F_{t_pl} klesá exponenciálně po ukončení značení (zde po 4 h), protože ^{13}C je nahrazováno ^{12}C.

Stejně lze vypočíst frakci izotopu uhlíku ^{13}C v EW v daném čase t (F_{t_EW}) oproti zásobníku rostlinného uhlíku v pletivech listů ($at\%_{t_pl}$), ze kterého EW značku přejímají. Proměnná $at\%_{kon_EW}$ odpovídá hodnotě at% epikutikulárních vosků kontroly pro danou rostlinu (Rovnice10). Frakce se po značení kumulativně zvyšuje s časem.

$$F_{t_EW} = \frac{at\%_{t_EW} - at\%_{kon_EW}}{at\%_{t_pl} - at\%_{kon_pl}}$$ Rovnice 10

Pomocí vypočtené frakce EW F_{t_pl} je možné odhadnout fixaci CO_2 odpovídající rychlosti čisté fotosyntézy (A) [$\mu gC \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$] (Rovnice 11).

$$A = \frac{F_{t_pl} \cdot C_l \cdot LMA}{t} = \frac{\frac{at\%_{t_pl} - at\%_{kon_pl}}{at\%_{atm} - 1{,}11} \cdot \frac{m_c}{m_l} \cdot \frac{m_l}{S_l}}{t}$$ Rovnice 11

Kde C_l je průměrná hmotnost uhlíku (m_c [µg]) na hmotnost sušiny listu (m_l [g]), *LMA* (leaf mass per area) je průměrná hmotnostní plocha listu udávající hmotnost sušiny pletiv listu (m_l [g]) na plochu listu (S_l [cm^2]) a F_{t_pl} je frakce ^{13}C po značení v atmosféře obohacené o $^{13}CO_2$. Rychlost čisté fotosyntézy v jednotkách [µg (^{13}C) · cm^{-2} · h^{-1}] lze převést na v dnešní době používanější jednotky [µmol(CO_2) · m^{-2} · s^{-1}] a to vynásobením 10000/3600 kvůli převodu [cm^{-2} · h^{-1}] na [m^{-2} · s^{-1}] a následným vydělením 13, které odpovídá převodu [µg] ^{13}C na [µmol] $^{13}CO_2$ (1µmol ^{13}C váží 13g a z jednoho 1µmol ^{13}C vznikne 1µmol $^{13}CO_2$). U *Clusia rosea* bylo na základě pokusů určeno průměrné C_l = 500 000 µg/g, *LMA* = 0,00628 g/cm^2.

Podobně byl pro EW odhadnut tok C do EW (depozice – *D*) [µgC · cm^{-2} · h^{-1}] (Rovnice 12).

Rovnice 12

$$D = \frac{F_{t_EW} \cdot C_{EW} \cdot WaxMA}{t}$$

Kde *WaxMA* (wax mass per area) je hodnota udávající průměrnou hmotnost EW (m_{EW} [g]) na plochu listu (S_l [cm^2]. U *Clusia rosea* bylo na základě pokusů určeno průměrné C_{EW} = 700 000 µg/g, *WaxMA = 0,000 0075* g/cm^2.

Využitím vypočtené frakce izotopu uhlíku ^{13}C v EW F_{t_EW} a rychlosti čisté fotosyntézy *A* lze vypočítat poměr uhlíku, který byl asimilován fotosyntézou a zabudován do EW (*D/A* [%]) (Rovnice 13).

Rovnice 13

$$D/A = \frac{F_{t_EW} \cdot 100}{A}$$

Cíle práce

I. Pomocí značení stabilním izotopem uhlíku ^{13}C zjistit, zda dochází k přirozené obnově epikutikulárních vosků na listech vybrané modelové rostliny *Clusia rosea*. Při zahrnutí:
   a. vlivu stáří listu
   b. efektu mechanického poškození epikutikulární vrstvy

II. Odhadnout rychlost přirozené obměny kutikulárních vosků na listech *Clusia rosea*.

III. Určit základní fotosyntetické parametry listů a sledovat efekt mechanického poškození epikutikulární vrstvy.

IV. Porovnat obnovu epikutikulárních vosků mezi jednoletou rostlinou *Brassica oleracea* var. *italica* a víceletou *Clusia rosea*.

3 Materiál a metody

3.1 Rostlinný materiál

Pro studii byly použity 4 rostliny *Clusia rosea* patřící do čeledi *Clusiaceae* v řádu Malphigiales. Jsou to tropické a subtropické víceleté rostliny původem ze Střední a Jižní Ameriky, kde tvoří spodní patro horských lesů. Nesnáší proto přílišné výkyvy teplot, ale mají rády mírné proudění vzduchu. V přirozeném prostředí můžou dosahovat až rozměrů stromů (výška až 10 metrů). Rostliny *Clusia rosea* byly vybrány, protože mají listy s poměrně velkou listovou plochou a relativně širokou vrstvou kutikulárních vosků. Díky silné vrstvě kutikulárních vosků, do které lze vyrývat obrázky a nápisy viditelné po celý život listu, bývá v angličtině označována jako *autograph tree* („podpisový strom“). Její epikutikulární vosky obsahují vysoký podíl alkanů, podle Medina et al. (2006) je 73 až 85% epikutikulárních vosků *Clusia rosea* tvořeno alkany. Alkany při analýze nevyžadují derivatizaci, chemický proces, který zvyšuje těkavost a termostabilitu látek čímž umožňuje a usnadňuje jejich detekci při plynové chromatografii, a proto jdou snadněji analyzovat na obsah látkově specifického ^{13}C. Rostliny *Clusia rosea* jsou pro tuto práci také výhodné tím, že mají listy bez trichomů, které by mohly dělat problém při odběrech kutikul. Navíc jsou to komerčně dostupné rostliny, které dobře rostou ve skleníku v našich klimatických podmínkách. Jednou z výhod je také možnost

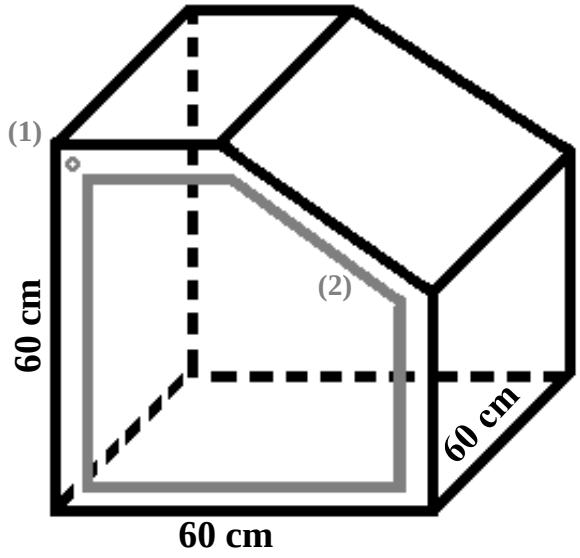
doplnění informací z jiných probíhajících výzkumů na této rostlině (Boom et al., 2005; Medina et al., 2006; Takahashi et al., 2012; Jetter et al., 2016; Zeisler-Diehl et al., 2018).

V druhé části studie byla použita rostlina brukev zelená – brokolice (*Brassica oleracea* var. *italica*), která patří do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Brukev zelená je původem mediterránní bylina. Pro své využití jako zelenina byla vyšlechtěna do mnoha kultivarů, z nichž jeden je známý jako brokolice. Brokolice je běžně pěstovaná rostlina, která dobře roste v našich klimatických podmínkách. Její listy mají velkou listovou plochu a kutikulu obsahující vysoké množství vosků.

Před začátkem experimentu byly všechny rostliny aklimatizované na stejné podmínky ve skleníku, kde byla udržována zvýšená intenzita světelného záření kombinací venkovního světla a dvou přídatných světelných zdrojů. Před samotným značením izotopem uhlíku ^{13}C bylo na každé rostlině náhodně vybráno 18 mladých listů (young - Y) a 18 plně vyvinutých dospělých listů (mature - M). Polovina listů z každé kategorie, tedy 9 mladých a 9 plně vyvinutých listů, byla ponechána v původním stavu a označena jako kontrola (control – C). U druhé poloviny listů, tedy také u 9 mladých a 9 plně vyvinutých listů, byla pomocí kolodia (4–8% roztok nitrocelulózy ve směsi etanolu a diethyletheru, Sigma-Aldrich) odstraněna vrstva epikutikulárních vosků (treated – T) (přesný mechanismus viz níže). Všechny vybrané listy byly označeny štítky pro správné pozdější rozlišení.

3.2 Značení izotopem ^{13}C

Rostliny byly značeny po dvou v uzavřené kultivační komoře s obsahem 190 litrů (60 x 60 x 60 cm s horní zkosenou hranou) (**Obr. 8**) izotopem uhlíku ^{13}C. Rostliny fotosyntetizovaly čtyři hodiny v atmosféře silně obohacené o $^{13}CO_2$ při fotosynteticky aktivním záření 460 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Do uzavřené komory bylo čtyřikrát za sebou vždy po hodině značení vstříknuto 80 ml $^{13}CO_2$, což zvýšilo koncentraci CO_2 v komoře přibližně na 800 ppm. Aby byla koncentrace uvnitř komory homogenní a snížil se vliv hraniční vrstvy listu byl v komoře umístěn ventilátor, který vnitřní atmosféru promíchával. Před dalším vstřikem 80 ml $^{13}CO_2$ byla komora vždy otevřena, aby se vnitřní atmosféra promíchala s čerstvým okolním vzduchem, koncentrace CO_2 klesla (ca na 400 ppm) a vlhkost vzduchu se vyrovnala s okolní atmosférou. Tím bylo zajištěno menší kolísání vnitřní koncentrace CO_2 a obsahu ^{13}C. Každá dvojice rostlin byla v komoře celkem čtyři hodiny a poté byla umístěna zpět do skleníku. Ve skleníku bylo zajištěno proudění vzduchu ventilátory, aby se vnitřní podmínky lépe podobaly přirozeným venkovním podmínkám.



Obr. 8: Schéma vzduchotěsné komory s vnitřními rozměry 60 x 60 x 60 cm a obsahem 190 l. Součástí je septem uzavřený otvor pro vstřikování látek (zde $^{13}CO_2$) do vnitřku komory (1) a vzduchotěsně uzavíratelná dvířka pro vkládání rostlin do komory (2).

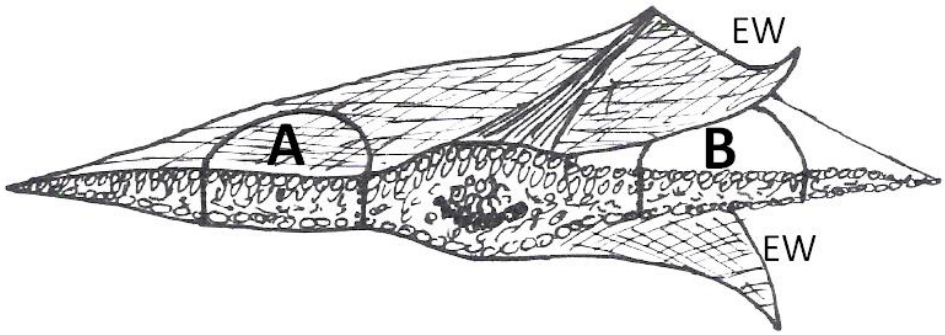
3.2.1 Postupné odběry ^{13}C značených listů

Postupně byly odebírány předem označené listy v prodlužujících se intervalech. První listy byly odebrány v čase 0 (t=0) těsně před umístěním rostlin do kultivační komory. Druhý odběr proběhl po dvou hodinách značení $^{13}CO_2$ v kultivační komoře (t=2), tedy po dvou vstřicích 80 ml $^{13}CO_2$ do komory. Další odběr proběhl 8 hodin po ukončení značení $^{13}CO_2$ v kultivační komoře, tedy 12 hodin po začátku experimentu (t=12). Následné odběry byly 24, 48, 72, 168 (1 týden), 336 (2 týdny) a 504 (3 týdny) hodin od začátku experimentu. Při každém odběru bylo odebráno 16 listů, čtyři listy z každé rostliny (mladý kontrolní (young control) – YC, mladý s porušenou vrstvou epikutikulárních vosků (young treated) – YT, vyvinutý kontrolní (mature control) – MC a vyvinutý s porušenou vrstvou epikutikulárních vosků (mature treated) – MT) (viz **Tab. 1**).

Tab. 1: Přehled listů odebíraných při každém odběru.

Mladé (**Y**oung)	Kontrolní (**C**ontrol)	YC
	narušená vrstva vosků (**T**reated)	YT
Vyvinuté (**M**ature)	Kontrolní (**C**ontrol)	MC
	narušená vrstva vosků (**T**reated)	MT

Každý odebraný list byl naskenován pro následné změření plochy listu v programu ImageJ. Z každého listu byl poté mimo hlavní žilku korkovrtem vyříznut terčík A (**Obr. 9**) o průměru 22 mm (3,8 cm^2, několik mladých listů nemělo dostatečnou velikost pro vyříznutí tak velikých terčíků, a proto byl použit korkovrt s menším průměrem 16 mm – 2 cm^2). Ten byl poté použit na enzymatickou izolaci kutikuly. Ze zbytku listu byly pomocí kolodia odebrány epikutikulární vosky (EW). Poté byl korkovrtem vyříznut terčík B o stejném průměru jako terčík A. Tento druhý terčík byl poté použit na zjištění obsahu ^{13}C v pletivech listu (**Obr. 9**).



Obr. 9: Rozmístění odebraných terčíků A a B a vrstvy epikutikulárních vosků na příčném řezu listem. Terčík A byl dále použit pro izolaci kutikuly, terčík B byl usušen pro následnou analýzu $\delta^{13}C$ listových pletiv. Vrstva epikutikulárních vosků byla odebrána kolodiem před odběrem terčíku B.

3.2.2 Izolace kutikul a zjištění hustoty průduchů

Kutikuly byly z terčíků A (**Obr. 9**) izolovány enzymaticky pomocí 2% vodního roztoku celulázy (Celluclast, Novo Nordisk, Bagsvared, Dánsko) a pektinázy (Trenolin Super DF, Erbslöh, Geisenheim, Německo) v 0,01 M citrátovém pufru (Merck, Německo) s pH=3, do kterého byl jako konzervant přidán 0,1 mM azid sodný (NaN_3, Fluka, Neu-Ulm, Německo). V tomto roztoku byly terčíky ponechány do doby, kdy se z terčíku zcela odloučila horní (adaxiální) i spodní (abaxiální) kutikula (obvykle do dvou týdnů). Poté byly kutikulární membrány omyty od enzymatického roztoku několikrát v destilované vodě. V izolované kutikule jsou otisknuté pokožkové i průduchové buňky, protože kutikula pokrývá celý povrch epidermis. Pomocí přítomnosti průduchů jen na spodní straně listů (*Clusia rosea* je hypostomatická rostlina) byly pod světelným mikroskopem (LABO COMFORT 1502, Arsenal, Česká republika) kutikulární membrány roztříděny na spodní a svrchní, přeneseny z vody na 1 mm silné teflonové destičky a následně na vzduchu v laboratoři usušeny.

Pro potvrzení předpokladu věkové homogenity uvnitř sbíraných skupin mladých a vyvinutých listů byla na izolovaných kutikulách počítána hustota průduchů (SD – stomatal density) udávající počet průduchů na jednotku plochy (1 mm^2). Neboť během vývoje a stárnutí listu se po určitou dobu zvětšuje jeho plocha, tvoří se nové buňky a zvětšují se již vytvořené buňky, dokud se list plně nevyvine a nedosáhne plné velikosti. Tento proces lze dobře pozorovat právě na vývoji průduchových buněk pokožky. U mladých listů se vytváří nové meristemoidy a z nich se vyvíjí průduchové buňky. Po čase už se počet průduchů nenavyšuje, list dospívá a jeho pokožkové buňky mezi průduchy se zvětšují čímž od sebe oddalují průduchy a snižují SD. V předchozí práci bylo ukázáno, že SD je charakteristické pro stejně staré listy, takže jeho použitím lze odlišit mladé listy od vyvinutých (Kalistová, 2019). Z každé abaxiální kutikuly (16 kutikul v každém čase odběru, z toho 8 abaxiálních) bylo pomocí optického mikroskopu (Olympus BX61, Japonsko) digitálním fotoaparátem (Canon EOS, Taiwan) při zvětšení 500x pořízeno pět fotografií s plochou 0,130 mm^2 zachycujících nepřekrývající se místa na kutikule. Na každé z těchto fotografií byl spočten počet průduchů pomocí programu ImageJ. Počty byly poté zprůměrovány pro každý list a byla vypočtena střední hodnota hustoty průduchů na plochu listu [mm^{-2}].

Proto, aby bylo možné zjistit, jaký podíl hmotnosti kutikuly tvoří kutikulární matrix (MX), byly zčásti roztřízených izolovaných kutikul vymyty vosky. Kutikuly byly přeneseny do skleněných uzavíratelných nádobek s inertním teflonovým septem („vialek“ o objemu 2 ml)

obsahujících 1 ml chloroform a nechány na válcové třepačce (Ingenieurbüro CAT M. Zipperer Roller GmbH, Německo) při pokojové teplotě přes noc. Poté byly MX vyjmuty, promyty čistým chloroformem, usušeny a zváženy (mikrováhy Mettler Toledo MT5, Columbus, OH, USA). Následně byla hmotnost MX přepočtena na plochu celého listu.

V další části pokusu byla na 8 terčících kutikuly o průměru 3 cm (s plochou 7,07 cm^2) ze čtyř listů čtyř různých rostlin porovnávaná hmotnost EW a IW a jejich poměr na celkové hmotnosti kutikuly. Polovina kutikul byla před enzymatickou izolací zbavená EW (z každého listu byla jedna z kutikul ponechána bez narušení a u druhé byly odstraněny EW). Po izolaci tak bylo možné porovnat hmotnost neporušené kutikuly s EW a kutikuly s odstraněnými EW. Oba typy kutikul byly následně chloroformem zbaveny všech vosků (IW i EW) a zbylé MX bez vosků byly zváženy. Po odečtení hmotnosti MX od předchozích kategorií šlo snadno porovnat získanou průměrnou hmotnost EW a IW a vypočítat jejich procentuální zastoupení na celkové hmotnosti kutikuly a všech vosků.

3.2.3 Izolace epikutikulárních vosků a jejich příprava na izotopovou analýzu

Epikutikulární vosky (EW) byly z povrchu listu získány pomocí kolodia (4–8% roztok nitrocelulózy ve směsi etanolu a diethyletheru, Sigma-Aldrich). Na každý list byla štětcem nanesena stejně tlustá vrstva kolodia z obou stran. Po zaschnutí (1-2 minuty) byla kolodiová blána i s navázanými EW opatrně pinzetou sloupnuta z povrchu listu a ponořena do vymytých skleněných nádobek o objemu 12 ml (scintilačních „vialek“, VWR Chemicals) s 3 ml chloroformu, které byly uzavřeny plastovým víčkem s hliníkovým septem tak, aby chloroform nepřišel do styku s organickým materiálem a nedošlo ke kontaminaci. Kolodiové blány s voskem byly v chloroformu ponechány přes noc a pro lepší rozpuštění EW v chloroformu míchány na třepačce (Ingenieurbüro CAT M. Zipperer Roller GmbH, Německo). V chloroformu rozpuštěné EW byly zakoncentrovány částečným odpařením chloroformu v digestoři, pipetovány do cínových kapslí, až bylo po odpaření dosaženo čisté navážky EW v rozmezí 78-116 μg. Do každé cínové kapsle bylo přidáno velmi malé množství vyžíhaného křemitého písku (prostého uhlíku), který zabraňoval vzlínání chloroformu ven.

3.2.4 Listová pletiva

Terčíky B (**Obr. 9**) byly vysušeny do konstantní hmotnosti (24 hodin, při 60°C). Následně homogenizovány v polypropylenových mikrozkumavkách (Eppendorf) na kulovém mlýnu

(Retsch MM200, Haan, Německo) každý po dobu 30 s při frekvenci 30 kmitů/s. Do každé mikrozkumavky byly dány dvě kuličky z nerezové oceli o průměru 3 mm. Namletá sušina byla v rozmezí navážek 690 – 950 µg navážena do cínových kapslí. Kontaminace polypropylenem z mikrozkumavek byla pravděpodobně zanedbatelná, což bylo zkoumáno v předchozí práci (Kalistová, 2019).

3.2.5 Izotopové analýzy

Relativní zastoupení ^{13}C ($\delta^{13}C$) bylo analyzováno poměrovou hmotnostní spektrometrií, kdy vzorky zabalené v cínových kapslích byly spáleny v reaktoru elementárního prvkového analyzátoru (NC 2100Soil, ThermoQuest CE Instruments, Rodano, Italy) a poměr $^{13}C/^{12}C$ byl zaznamenán poměrovým hmotnostním spektrometrem (IRMS) (Delta plus XL, ThermoFinnigan, Bremen, Německo). Měření standardu probíhalo se standardní odchylkou menší než 0,1 ‰.

V druhé části bylo relativní zastoupení ^{13}C ($\delta^{13}C$) analyzováno specificky podle jednotlivých složek oddělených plynovou chromatografií (GC) (Trace 1310, Thermo, Bremen, Německo) na koloně (Restek Rxi-5MS- Syl s velikostí 30m x 0,25 mm x 0,25 µm), následně byly složky oxidovány na CO_2 Isolink II interfází (Thermo, Bremen, Německo) při 1000 °C a poměr $^{13}C/^{12}C$ byl zaznamenán hmotnostním spektrometrem (MS) (Delta V Advantage, Thermo, Bremen, Německo). $\delta^{13}C$ složek byl vyhodnoceno na základě (10 µg/ml) vnitřního standardu n-tetracosanu (C24 alkan) kalibrovaného na $\delta^{13}C$ proti VPDB.

3.2.6 Gazometrická měření

Pomocí gazometrického měření bylo sledováno, zda a jaký vliv má narušení vrstvy EW na průduchy a fotosyntézu, a tedy schopnost listru regenerovat narušenou vrstvu vosků. Fotosyntetické parametry byly měřeny na jednom mladém a jednom plně vyvinutém listu u každé ze tří vybraných rostlin. Měření probíhala nejprve na listu s neporušenou vrstvou EW, poté byla vrstva EW odstraněna a následující den byl stejný list změřen opět stejným způsobem. Hodnoty fotosyntetických parametrů byly měřeny v systému dvou gazometrických přístrojů Li-6400 a Li-6400 XT (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA) následujícím způsobem. Rostlina *Clusia rosea* byla hodinu před měřením aklimatizována ve tmě. Poté byla změřena rychlost respirace ve tmě pro následnou kalibraci (3 minuty), a rychlost fotosyntetické asimilace CO_2 (1 hodinu při stálém fotosynteticky aktivním záření 1000 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Pro

následné vyhodnocení byly použity ustálené hodnoty rychlosti fotosyntézy naměřené v posledních 30 minutách měření a světelná křivka fotosyntézy. Světelná křivka (tj. závislost rychlosti asimilace CO_2 na hustotě dopadajících fotonů fotosynteticky aktivního záření) byla měřena při následujících ozářenostech: 50, 100, 200, 400, 600, 1000 a 1600 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Každá intenzita záření působila na list rostliny 2 minuty. Koncentrace CO_2 v atmosféře okolo listu byla udržována na 400 $\mu mol \cdot mol^{-1}$.

3.3 Srovnání relativního zastoupení uhlíku ($\delta^{13}C$) v epikutikulárních voscích *Brassica oleracea* var. *italica* a *Clusia rosea*

Pro porovnání pozorované změny relativního zastoupení ^{13}C v epikutikulárních voscích rostlin *Clusia rosea* s jinou rostlinou byla použita brukev zelená – brokolice (*Brassica oleracea* var. *italica*). Od každého druhu byly použity dva mladé a dva vyvinuté listy z jedné ^{13}C izotopově značené rostliny. Stejně jako v předchozím pokusu byly rostliny značeny v atmosféře se zvýšeným obsahem $^{13}CO_2$. Relativní zastoupení uhlíku ^{13}C ($\delta^{13}C$) bylo analyzováno specificky podle jednotlivých složek oddělených plynovou chromatografií (GC). Pro porovnání s předchozí prací bylo váženým aritmetickým průměrem vypočteno celkové relativní zastoupení uhlíku ^{13}C (jako váha pro výpočet průměru byla použita plocha píku naměřená v GS-IRMS analýze, odrážející množství dané složky v měřeném vzorku).

3.3.1 Statistické vyhodnocení

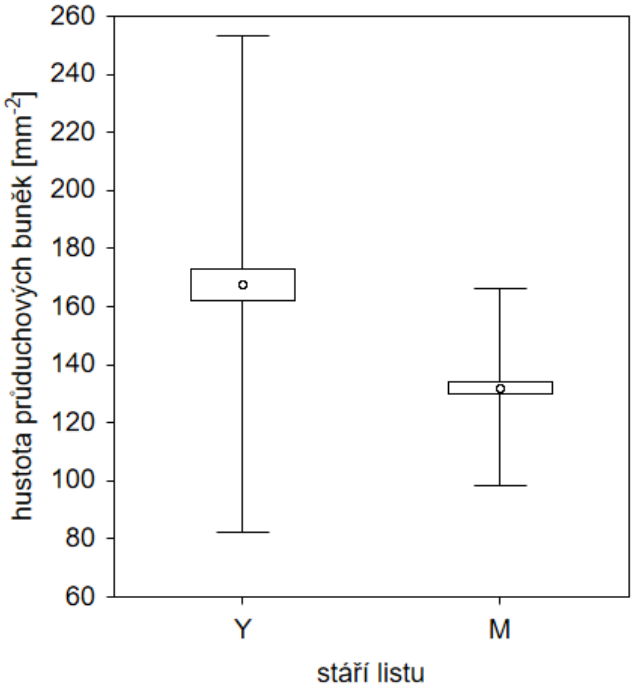
Získaná data byla statisticky zpracována pomocí programu Statistica (StatSoft CR). Pro zhodnocení homogenity stáří listů na základě hustoty průduchů (SD) byly nejprve hodnoty SD logaritmicky transformovány pro dosažení více symetrické distribuce a přiblížení normální distribuci. Poté byla spočtena dvoucestná hierarchická analýza variance (náhodný efekt odběrového času vložen do pevného efektu věkové skupiny listu). Pro zhodnocení homogenity hmotnosti kutikulární matrix na plochu byla spočtena dvouvýběrová analýza variance. Pro porovnání gazometricky naměřené a vypočtené fotosyntézy byla použita dvoucestná hierarchická analýza variance (náhodný efekt typu měření fotosyntézy změřen/spočten byl vložen do pevného efektu kategorie listu). Za statisticky významný rozdíl byly považovány pravděpodobnosti $p < 0,05$.

4 Výsledky

4.1 Obnova epikutikulárních vosků na listech *Clusia rosea*

4.1.1 Stáří odebíraných listů a SD

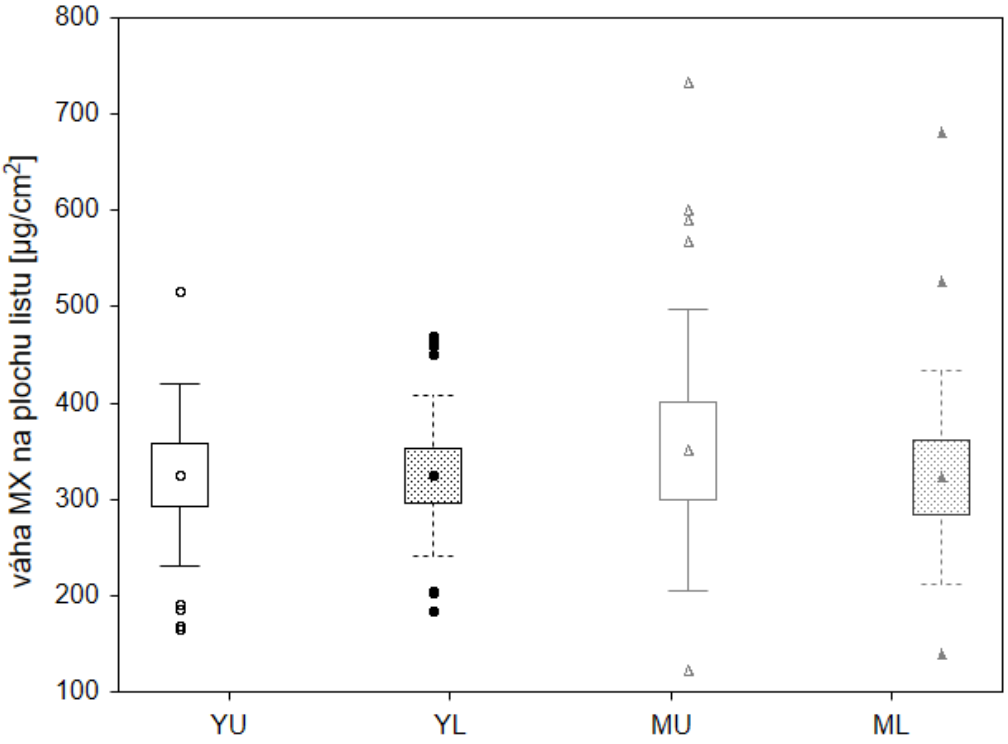
Pro ověření věkové heterogenity mezi dvěma odebíranými skupinami mladých (Y) a vyvinutých (M) listů jsem spočítala SD (hustotu průduchů na plochu listů [mm^{-2}]) (**Obr. 10**). Do grafu byla vynesena směrodatná chyba průměru ukazující přesnost odhadnutých průměrů SD a 1,96 násobek směrodatné odchylky shrnující variabilitu SD (v tomto rozpětí by mělo ležet 95% pozorování). Výsledek dvoucestné hierarchické analýzy variance ukázal průkaznou odlišnost logaritmované hodnoty SD mezi skupinou mladých (Y) a vyvinutých (M) listů ($F(1,16) = 30,90$; $p = 0,00005$) a neprůkaznou odlišnost mezi jednotlivými odběrovými časy ($p = 0,33$). Vyšší variabilita SD, která byla zaznamenána mezi mladými listy, odpovídá částečně tomu, že listy během analýzy stárly (**Obr. P1**). Ty, které byly na začátku experimentu označeny jako mladé mohly být sebrány pro měření $\delta^{13}C$ až v čase, kdy už fyziologicky patřili mezi vyvinuté (3 týdny mezi označením a sebráním ve vývoji mladého listu hrají podstatnou roli ve vývoji i změně SD). U listů plně vyvinutých už na začátku experimentu 3 týdny vývoje nehrají roli a SD už se nemění.



Obr. 10: Hustota průduchových buněk v závislosti na věkové skupině odebíraných listů *Clusia rosea* (mladé listy – Y, vyvinuté listy – M). Bod uprostřed boxu značí průměr, okraj boxu udává směrodatnou chybu a chybové úsečky udávají 1,96 násobek směrodatné odchylky. n=68

4.1.2 Hmotnost kutikulární matrix na plochu listu

Z enzymaticky izolovaných kutikul byly chloroformem vymyty všechny kutikulární vosky (IW i EW). Hmotnost zbylých kutikulárních matrix (MX) porovnaná ve dvoucestné analýze variancí se průkazně nelišila mezi různě starými listy ($F(1)=0{,}388$; $p=0{,}534$) ani mezi horní a dolní kutikulární MX ($F(1)=0{,}54$; $p=0{,}463$). Toto graficky znázorňuje následující graf na **Obr. 11**.



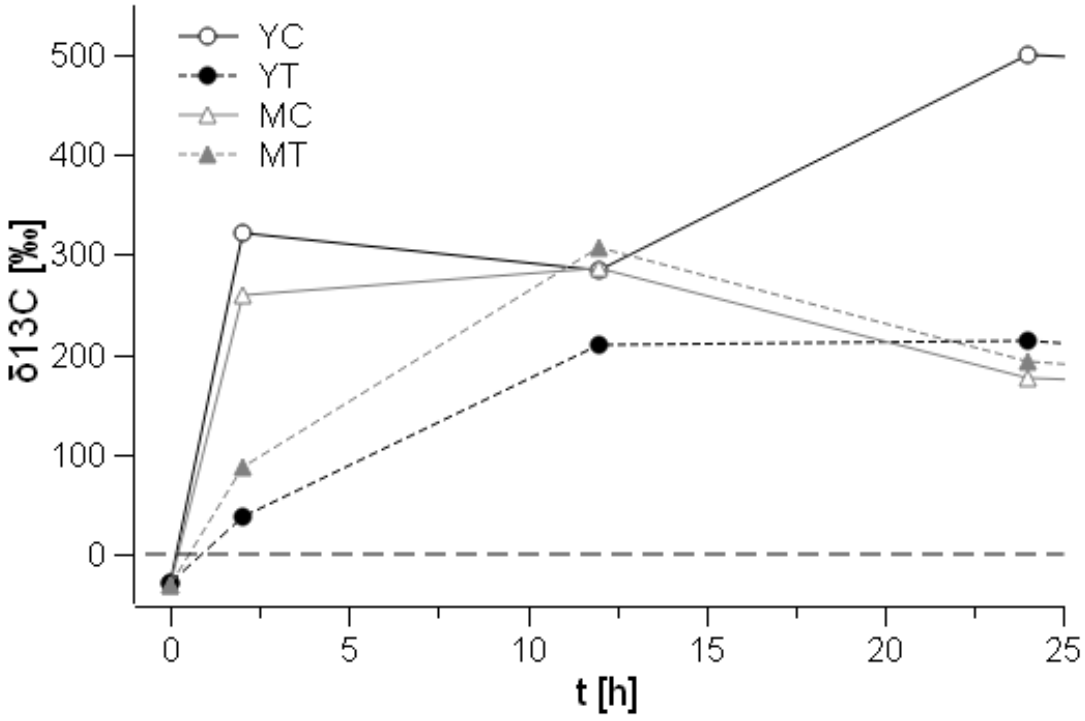
Obr. 11: Porovnání hmotnosti kutikulární matrix mezi horní (upper – U) a dolní (lower – L) stranou mladých (Y) a vyvinutých (M) listů. Bod vprostřed boxu značí průměr, okraj boxu udává směrodatnou chybu a chybové úsečky udávají 1,96 násobek směrodatné odchylky a vnější body ukazují odlehlé hodnoty (n=34).

V následující části byla odečtením hmotnosti MX od hmotnosti neporušených terčíků kutikul a terčíků kutikul s odstraněnými EW získána průměrná hmotnost EW a IW a vypočteno procentuální zastoupení EW a IW na celkové hmotnosti kutikuly a všech vosků. Průměrná hmotnost EW byla u horní strany listu 0,055 µg/cm^2 a tvořila 59,8% hmotnosti všech kutikulárních vosků. U dolní strany byla průměrná hmotnost EW 0,023 µg/cm^2 a tvořila pouze 38,5% hmotnosti všech vosků. Na rozdíl od EW se průměrná hmotnost IW mezi stranami listů příliš nelišila, u horní strany vážily IW průměrně 0,037 µg/cm^2 a u spodní 0,036 µg/cm^2. To představuje pro horní stranu listu 40,2% hmotnosti všech kutikulárních vosků a pro spodní stranu 62,5%. Porovnání hmotnosti kutikulárních vosků s hmotností

kutikuly naznačuje, že na horní straně listů tvoří kutikulární vosky 27,8% celkové hmotnosti kutikuly, ale na spodní straně pouze 17,7% celkové hmotnosti kutikuly.

4.1.3 Relativní zastoupení uhlíku ^{13}C ($\delta^{13}C$) v pletivech listů

Hodnoty $\delta^{13}C$ v listových pletivech rostly už 2 hodiny po začátku značení u všech listů (**Obr. 13, A**). U listů s odstraněnou vrstvičkou EW před začátkem značení (YT a MT) dosahovalo $\delta^{13}C$ nižších hodnot (**Obr. 12**). Maximálních hodnot $\delta^{13}C$ dosáhla pletiva vyvinutých listů 12 hodin po začátku značení, kdežto pletiva mladých listů až 24 hodin po začátku značení. Poté docházelo k poklesu $\delta^{13}C$ v pletivech všech typů listů nahrazením těžkého uhlíku nově fixovaným uhlíkem z neznačené atmosféry. Nejvyšších hodnot přibližně 500 ‰ dosáhlo $\delta^{13}C$ pletiv mladých kontrolních listů 24 hodin po začátku značení. U pletiv mladých listů byla zjištěna vyšší směrodatná odchylka průměrů $\delta^{13}C$, a tedy větší variabilita hodnot mezi listy různých rostlin v rámci jednoho času měření než u vyvinutých listů (**Obr. P2, A**). Nejvyšší variabilita $\delta^{13}C$ byla zaznamenána u mladých listů s porušenými EW (YT).

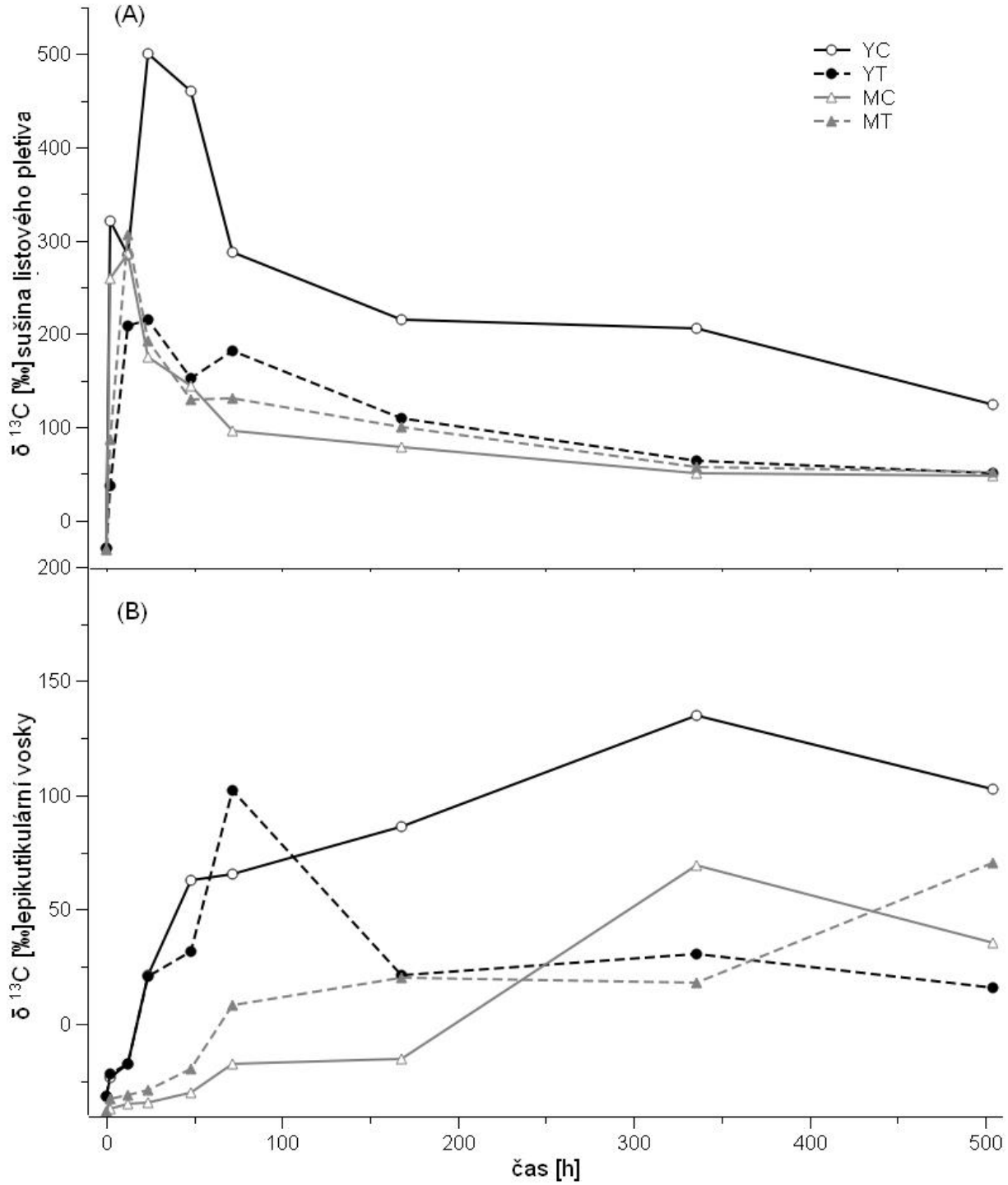


Obr. 12: Relativní zastoupení uhlíku ^{13}C (‰) u listových pletiv prvních 25h po značení. Kontrolní mladé listy (YC, prázdná kolečka), mladé listy s porušenou vrstvou EW (YT, plná kolečka), kontrolní vyvinuté listy (MC, prázdné trojúhelníčky) a vyvinuté listy s porušenou vrstvou EW (MT, plné trojúhelníčky). n=4

Hodnoty relativního zastoupení uhlíku ^{13}C (‰) začínají v záporných hodnotách, protože rostlina preferuje v procesech fixace a následných procesech izotop uhlíku ^{12}C a těžký uhlík ^{13}C diskriminuje (viz kapitola 2.1), proto je o ^{13}C „ochuzena“ oproti atmosféře a její $\delta^{13}C$ je záporné.

4.1.4 Relativní zastoupení uhlíku ($\delta^{13}C$) v epikutikulárních voscích

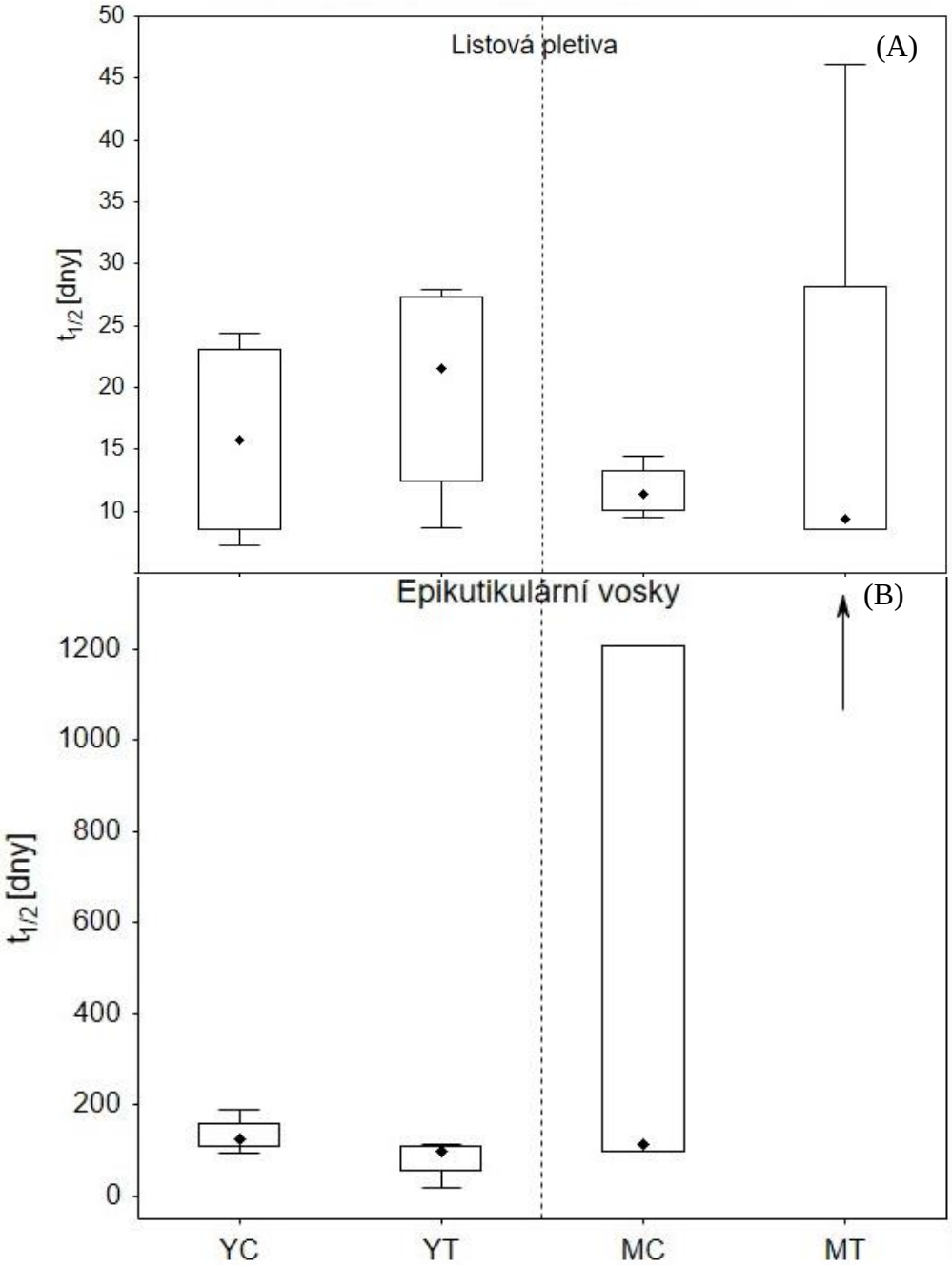
Oproti $\delta^{13}C$ listových pletiv narůstalo $\delta^{13}C$ epikutikulárních vosků pomaleji (**Obr. 13, B**). Hodnoty $\delta^{13}C$ EW kontrolních mladých i vyvinutých listů (YC, MC) dosáhly maxima 2 týdny (336 hodin) po začátku značení. Relativní zastoupení těžkého uhlíku u EW mladých listů s porušenými EW před značením (YT) prvních 24h dosahovalo stejných hodnot jako EW kontrolních mladých listů, nejvyšší hodnoty ale dosáhlo až 72 hodin po značení. EW vyvinutých listů s porušenou vrstvičkou EW před značením (MT) dosahovaly zpočátku sledování vyšších hodnot $\delta^{13}C$ než odpovídající kontrolní listy (MC). Relativní zastoupení těžkého uhlíku u EW vyvinutých listů s porušenými EW (MT) pravděpodobně do konce měření nedosáhlo maximálních hodnot $\delta^{13}C$, jejich rostlo $\delta^{13}C$ po celou dobu měření až do konce měření po třech týdnech (504 hodin). U mladých listů byla zaznamenána vyšší variabilita hodnot $\delta^{13}C$ v EW oproti vyvinutým listům (**Obr. P2, B**). Nejvyšší variabilita hodnot se ukázala mezi mladými listy bez EW 3 dny (72 hodin) po začátku značení.



Obr. 13: **A**: Relativní zastoupení uhlíku ^{13}C (‰) u listových pletiv v závislosti na čase od začátku značení (h). Kontrolní mladé listy (YC, prázdná kolečka), mladé listy s porušenou vrstvou EW (YT, plná kolečka), kontrolní vyvinuté listy (MC, prázdné trojúhelníčky) a vyvinuté listy s porušenou vrstvou EW (MT, plné trojúhelníčky). **B**: Relativní zastoupení uhlíku ^{13}C (‰) u epikutikulárních vosků v závislosti na čase od začátku značení (h). n = 4

4.1.5 Rychlost obratu C v pletivech značených listů

Pro odhad rychlosti obratu uhlíku v listových pletivech byl vypočten poločas obratu ($t_{1/2}$) udávající čas potřebný pro výměnu poloviny všech uhlíkových atomů v pletivech listů. Byl odhadnut na základě sledování obsahu izotopu těžkého uhlíku, který sloužil jako „značka“ zobrazující rychlost obratu celkového uhlíku v listech. (**Obr. 14, A)**.



Obr. 14: Poločas obratu uhlíku **A**: v listových pletivech a **B**: v EW (dny) mladých kontrolních listů (YC), mladých listů s porušenými EW (YT), vyvinutých kontrolních listů (MC) a vyvinutých listů s porušenými EW. Bod znázorňuje medián, značí průměr, okraj boxu udává horní a dolní kvantily a chybové úsečky udávají rozsah od maxima do minima, n=4.

Poločas obratu C v pletivech listů se mezi kategoriemi mladých listů (YC a YT) průkazně nelišil ($t(6) = -0,65$; $p = 0,91$), ale mezi vyvinutými ano ($t(6) = -0,71$; $p = 0,005$). U MT listů byla zaznamenána nejvyšší variabilita v poločase obratu.

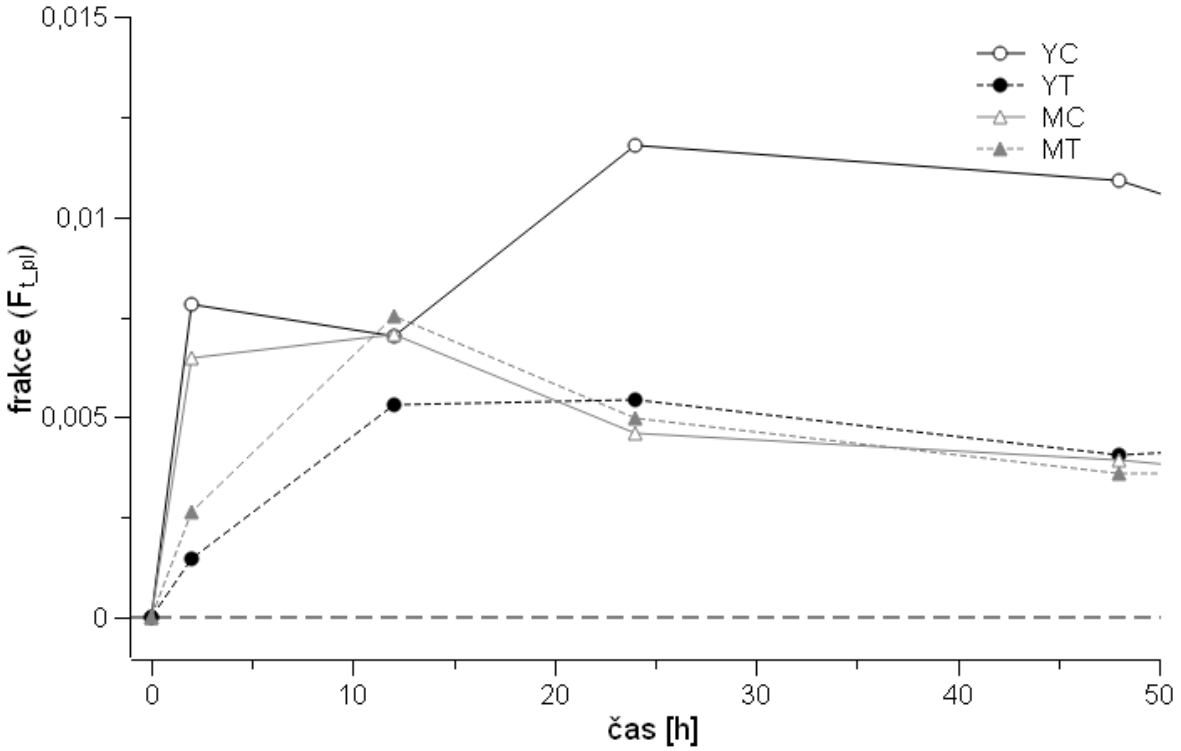
4.1.6 Rychlost obratu ^{13}C v EW

Stejně jako pro listová pletiva byl pro EW vypočten poločas obratu C, tedy čas potřebný pro výměnu poloviny uhlíkových atomů v EW značených listů (**Obr. 14, B**). Sestupná část křivky vyjadřující změny obsahu ^{13}C ve vosku s časem byla zachycena až v posledním intervalu odběrů (mezi 360 a 500 hodinami). To ukazuje na velmi pomalý obrat uhlíku a částečně to znemožnilo přesné a spolehlivé výpočty. Poločas obratu ^{13}C byl u mladých listů výrazně kratší než u vyvinutých listů. U vyvinutých kontrolních listů (MC) byla zjištěna velká variabilita mezi poločasy obratu ^{13}C, neboť, kromě výše uvedeného, naměřená fáze poklesu ^{13}C značky v EW potřebné pro výpočet poločasu obratu ^{13}C byla velice pozvolná. U vyvinutých listů s odstraněnými EW nebylo možné poločas obratu ^{13}C spočítat z důvodu chybějící fáze poklesu ^{13}C značky v EW.

Obrat uhlíku v pletivech listu jako celku byl několikanásobně rychlejší ($t_{1/2}$ ca 15 dnů, **Obr. 14, A**) než obrat uhlíku ve voscích kutikuly ($t_{1/2}$ ca 100 dnů pro mladý rostoucí list a ca 500 dnů pro dospělý list, **Obr. 14, B**).

4.1.7 Frakce ^{13}C v pletivech listu

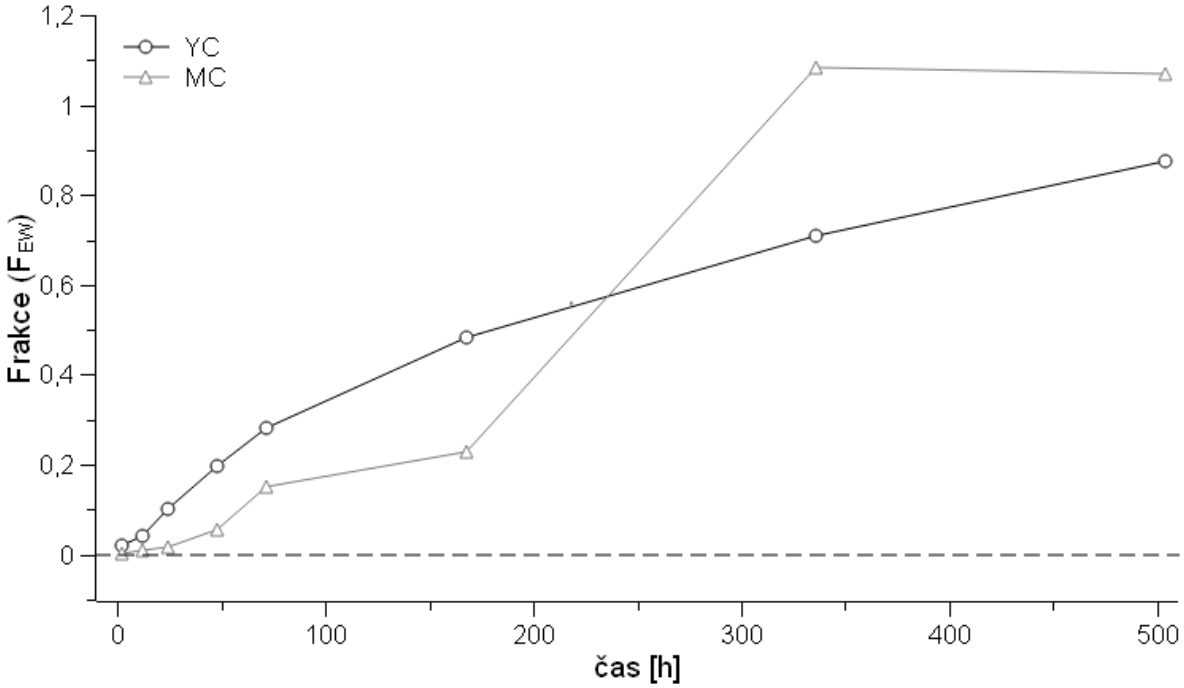
Frakce ^{13}C v pletivech listu udává podíl izotopu uhlíku ^{13}C, který by rostlina získala z atmosféry (zdroje) ze sta procent obohacené o ^{13}C při pulzním značení, na celkovém obsahu uhlíku v biomase listu. Pokud by pletiva rostliny přijala všechen ^{13}C obsažený v obohacené atmosféře, její frakce by byla rovna 1. Dynamika průběhu F_{t_pl} je, až na malou korekci přirozeného zastoupení ^{13}C v atmosféře, totožná s průběhem $\delta^{13}C$ v sušině listových pletiv (**Obr. 15**). Frakce ^{13}C v pletivech listu byla dále použita pro výpočet rychlosti fotosyntézy.



Obr. 15: Frakce ^{13}C listových pletivech v závislosti na čase od začátku značení do 50 hodin. Kontrolní mladé listy (YC, prázdná kolečka), mladé listy s porušenou vrstvou EW (YT, plná kolečka), kontrolní vyvinuté listy (MC, prázdné trojúhelníčky) a vyvinuté listy s porušenou vrstvou EW (MT, plné trojúhelníčky). n=4

4.1.8 Frakce ^{13}C v epikutikulárních voscích

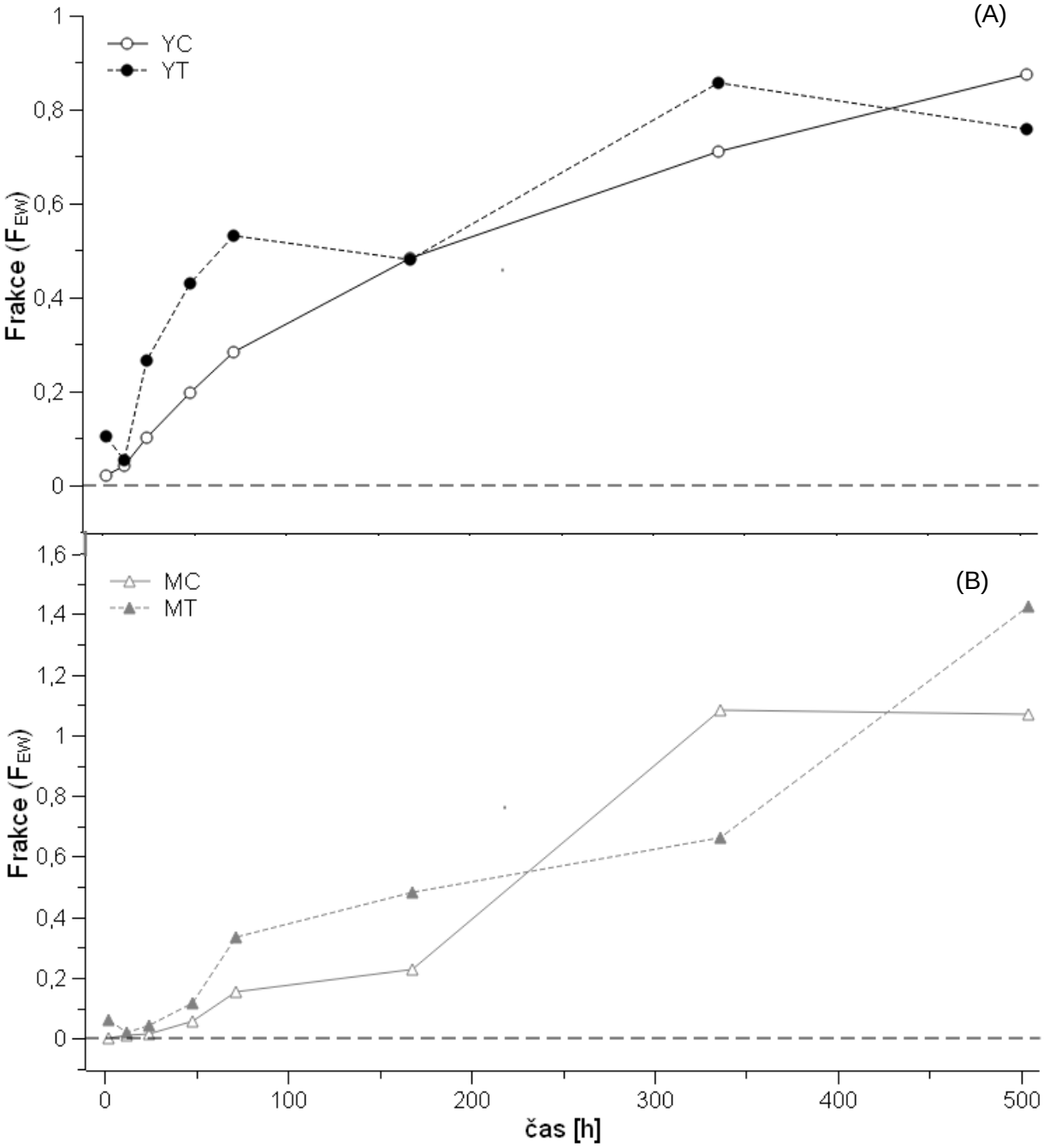
Frakci ^{13}C epikutikulárních vosků kontrolních mladých (YC) a kontrolních vyvinutých (MC) listů ukazuje následující **Obr. 16**. Analogicky s předchozí frakcí ^{13}C v listu jako celku, zde jde o relativní množství ^{13}C ve vosku získané ze zdroje (pletiv listu) za situace, že tento zdroj je plně „nasycen“ uhlíkem ^{13}C. Pokud by epikutikulární vosky rostliny přijaly všechen ^{13}C obsažený v pletivech daného listu, jejich frakce by byla rovna 1. U obou skupin listů frakce mírně narůstala už od 12 hodin po značení. Mladé listy prokazovaly plynulejší nárůst oproti vyvinutým listům. Při konečném odběru se frakce v epikutikulárních voscích mladých i



Obr. 16: Frakce obnovy epikutikulárních vosků v kontrolních mladých listech (YC, prázdná kolečka) a kontrolních vyvinutých listech (MC, prázdné trojúhelníčky). n=4

vyvinutých listů téměř rovnala a byla blízká 1.

Porovnání frakce ^{13}C v epikutikulárních voscích u mladých kontrolních listů (YC) a mladých listů s odstraněnými EW (YT) ukazuje zpočátku rychleji rostoucí frakci u YT oproti YC, která roste pomaleji a téměř lineárně (**Obr. 17, A**). Při konečném měření byla frakce obou typů mladých listů téměř vyrovnaná. Podobně jako u mladých listů narůstá frakce prudčeji nejdříve u vyvinutých listů s odstraněnými EW (MT) oproti neporušeným vyvinutým listům (MC) (**Obr. 17, B**).



Obr. 17: Frakce ^{13}C v epikutikulárních voscích v závislosti na čase obnovy u **A**: kontrolních mladých listů (YC, prázdná kolečka) a mladých listů s porušenou vrstvou EW (YT, plná kolečka), **B**: kontrolních vyvinutých listů (MC, prázdné trojúhelníčky) a vyvinutých listů s porušenou vrstvou EW (MT, plné trojúhelníčky). n=4

4.1.9 Tok uhlíku do epikutikulárních vosků

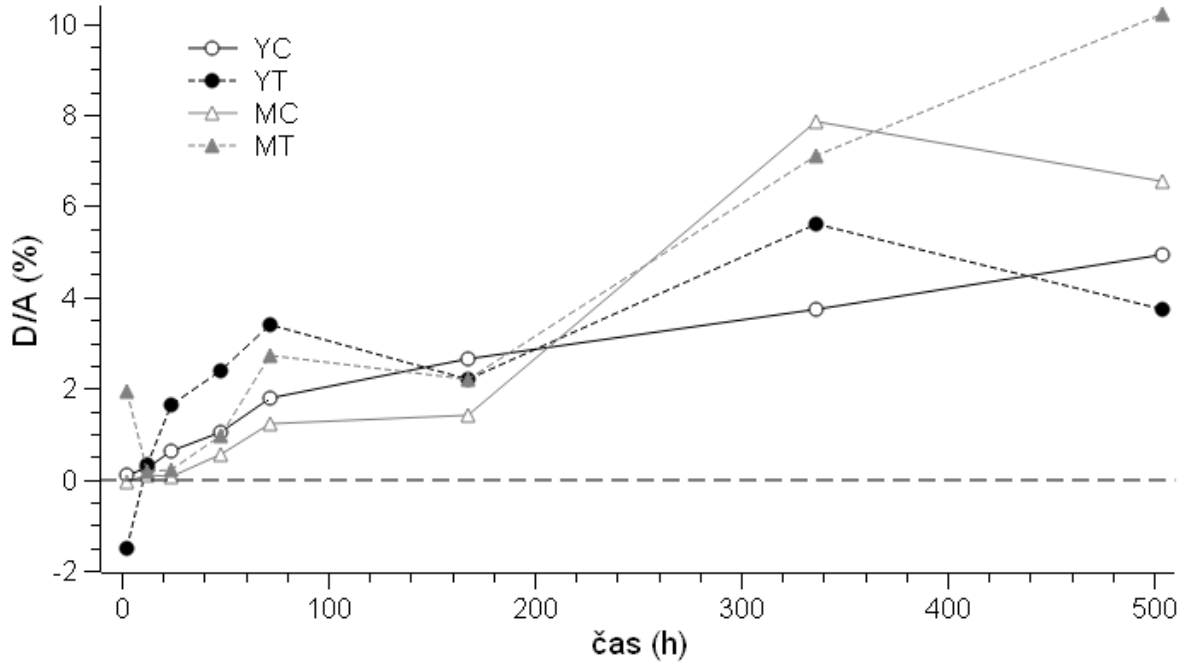
Na základě naměřených hodnot $\delta^{13}C$ byl vypočten tok C do EW (depozice – *D*) [$\mu gC \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$]. Tok uhlíku do EW byl po celou sledování rostlin téměř stejný, s vyšší variabilitou na začátku značení, rovnal se přibližně 0,01 $\mu gC \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$. Vypočtené hodnoty ukazuje **Tab. 3**.

Tab. 2: Tok uhlíku do EW (D [$\mu gC \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$] pro kontrolní mladé listy (YC), mladé listy s porušenou vrstvou EW (YT), kontrolní vyvinuté listy (MC) a vyvinuté listy

čas odběru (h)	YC		YT		MC		MT	
	D	StD	*D*	StD	*D*	StD	*D*	StD
2	0,0399	0,0623	0,2311	0,5714	0,0018	0,0188	0,0902	0,0970
12	0,0161	0,0230	0,0196	0,0274	0,0033	0,0027	0,0066	0,0055
24	0,0183	0,0113	0,0423	0,0312	0,0022	0,0038	0,0060	0,0057
48	0,0144	0,0088	0,0317	0,0220	0,0040	0,0037	0,0094	0,0064
72	0,0172	0,0105	0,0331	0,0219	0,0089	0,0095	0,0212	0,0233
168	0,0101	0,0068	0,0080	0,0067	0,0039	0,0028	0,0068	0,0047
336	0,0075	0,0045	0,0110	0,0101	0,0113	0,0112	0,0091	0,0055
504	0,0066	0,0038	0,0049	0,0045	0,0072	0,0074	0,0099	0,0066

4.1.10 Poměr uhlíku asimilovaného fotosyntézou přeneseného do EW

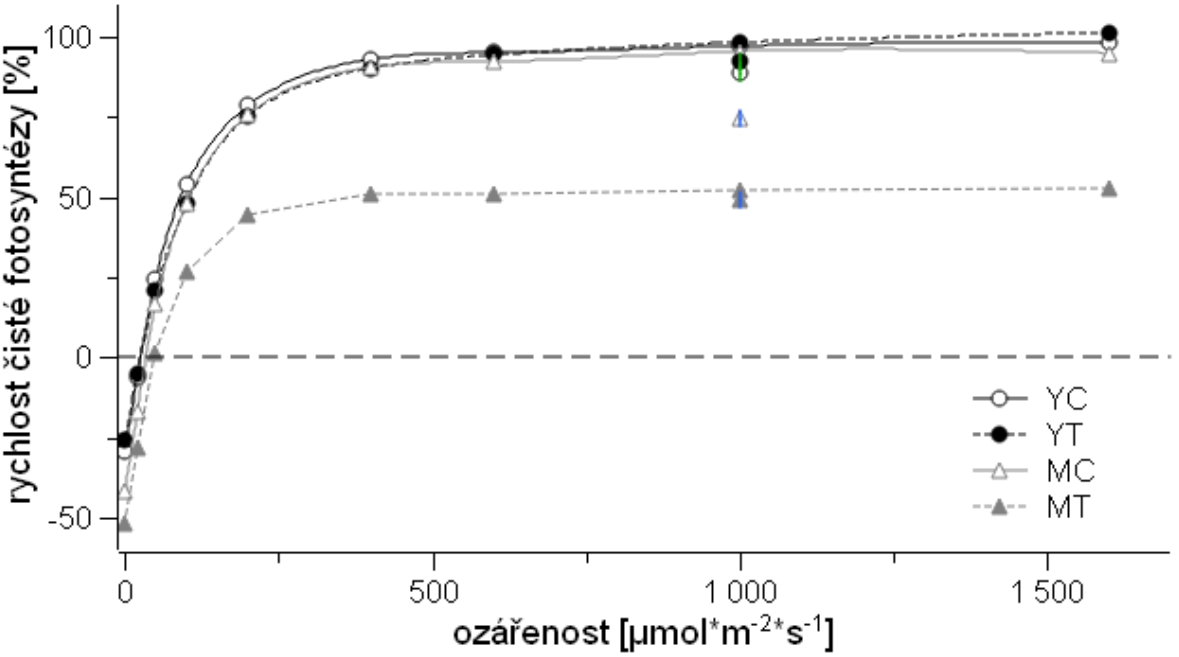
Na základě výpočtu čisté fixace CO_2 do pletiva listů (asimilace *A*) a toku uhlíku do EW (depozice do vosku *D*) byl vypočten jejich poměr (*D*/*A* [%]), který ukazuje, jaký podíl (v %) uhlíku získaného fotosyntézou za dobu značení (4 hodiny) se dostal do epikutikulárních vosků během následujících tří týdnů (504 hodin). Graf zobrazuje, že pro některé listy (YC, MT) ani doba tří týdnů (504 h) po značení nestačila na ukončení přenos uhlíku asimilovaného fotosyntézou během 4 hodin značení. Nejvíce fotosynteticky asimilovaného uhlíku (10 %) bylo přeneseno do EW vyvinutých listů s poškozenou vrstvičkou EW (MT) (**Obr. 18**).



Obr. 18: Poměr uhlíku asimilovaného fotosyntézou a přeneseného do EW v závislosti na čase. Kontrolní mladé listy (YC, prázdná kolečka), mladé listy s porušenou vrstvou EW (YT, plná kolečka), kontrolní vyvinuté listy (MC, prázdné trojúhelníčky) a vyvinuté listy s porušenou vrstvou EW (MT, plné trojúhelníčky). n=4

4.1.11 Světelná křivka fotosyntézy

Světelná křivka fotosyntézy ukazuje závislost rychlosti asimilace CO_2 na měnící se intenzitě fotosynteticky aktivního záření. Pro srovnání charakteru světelné závislosti fotosyntézy byla do grafu vynesena procenta fotosyntézy, neboť listy se v rámci věkových kategorií lišily v naměřených hodnotách fotosyntézy. Jako 100 % fotosyntézy byla brána nejvyšší naměřená hodnota fotosyntézy pro obě měření na daném listu (před i po odstranění EW). Charakter závislosti a rychlost fotosyntézy nebyla ovlivněna odstraněním epikutikulárních vosků u mladých listů (**Obr. 19**). U vyvinutých listů se odstraněním EW mírně pozměnil charakter světelné závislosti fotosyntézy a celkově se snížila rychlost fotosyntézy.



Obr. 19: Relativní rychlost fotosyntézy v závislosti na intenzitě ozářenosti daného listu. Kontrolní mladé listy s neporušenými EW (YC, prázdná kolečka), mladé listy druhý den po porušení vrstvy EW (YT, plná kolečka), kontrolní vyvinuté listy s neporušenými EW (MC, prázdné trojúhelníčky) a vyvinuté listy druhý den po porušení vrstvy EW (MT, plné trojúhelníčky). Body ležící mimo křivky znázorňují průměr z 3 minut měření ustálené fotosyntézy při stálé intenzitě fotosynteticky aktivního záření 1000 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, směrodatná odchylka průměrů je pro mladé listy vykreslena zeleně a pro vyvinuté listy modře. n=3

Kromě světelné křivky byla pro příslušné kategorie listů vynesena do grafu i průměrná ustálená rychlost fotosyntézy při stálé intenzitě fotosynteticky aktivního záření 1000 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ a k ní příslušející směrodatné odchylky. Zatímco ustálená rychlost fotosyntézy u obou kategorií mladých listů a u vyvinutých listů s odstraněnými EW dosahovala stejných hodnot jako při měření světelné křivky při odpovídající intenzitě záření, ustálená rychlost fotosyntézy vyvinutých kontrolních listů byla o něco nižší (**Obr. 19** symboly mimo křivky při ozářenosti 1000 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$).

4.1.12 Porovnání vypočtené a změřené rychlosti fotosyntézy

Porovnání vypočtené fotosyntézy podle Rovnice 11 a gazometricky naměřené rychlosti fotosyntézy dvoucestnou hierarchickou analýzou variance ukázalo statisticky významný rozdíl mezi způsoby získání hodnot rychlosti fotosyntézy ($F(1,3) = 19,22$; $p=0,00022$) (**Obr. P3**). Také hodnoty rychlosti fotosyntézy byly významně odlišné mezi kategoriemi listu ($F(3) = 3,36$; $p=0,036$). Hodnoty vypočtené rychlosti fotosyntézy byly na rozdíl od gazometricky naměřených hodnot více variabilní. Pro kontrolní listy vyšly vypočtené hodnoty rychlosti fotosyntézy vyšší (YC i MC) než u listů s odstraněnými EW (YT a MT), a to jak pro mladé listy, tak pro vyvinuté (**Tab. 2**). Toto porovnání bylo provedeno pouze na čtyřech listech pro každou kategorii listů u spočtené rychlosti fotosyntézy a třech listech od každé kategorie u gazometricky změřené rychlosti fotosyntézy, což mohlo ovlivnit správnost hodnot.

Tab. 3: Porovnání spočtených a naměřených hodnot rychlosti fotosyntézy pro kontrolní mladé listy (YC), mladé listy s porušenou vrstvou EW (YT), kontrolní vyvinuté listy (MC) a vyvinuté listy s porušenou vrstvou EW (MT).

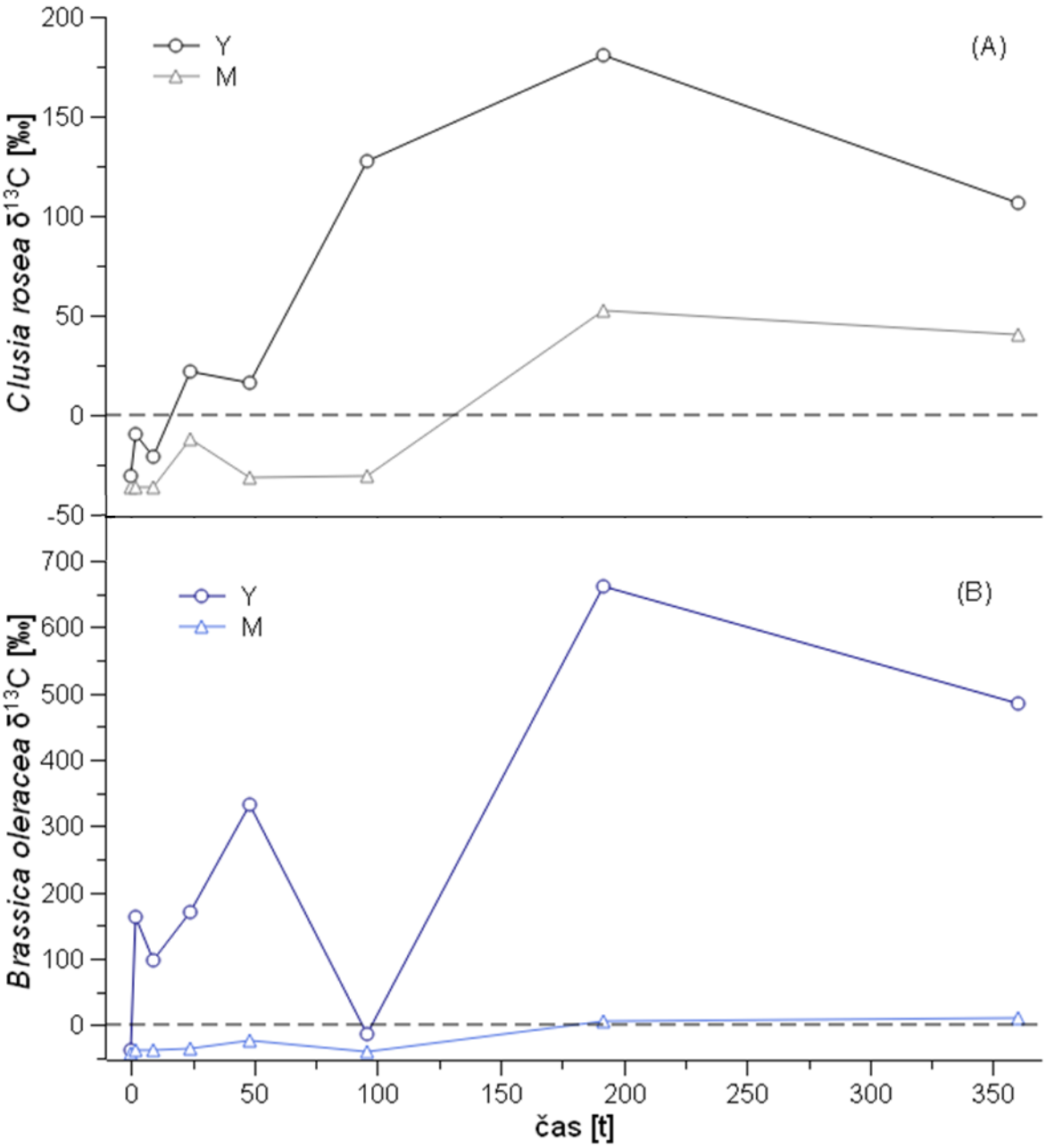
kategorie	list	A [µmol (CO_2) m^{-2} s^{-1}]	
		spočtená	změřená
YC	1	2,92	4,36
YC	2	1,93	5,04
YC	3	3,41	3,15
YC	4	2,20	-
YT	1	0,12	6,09
YT	2	0,67	3,95
YT	3	0,51	2,28
YT	4	0,68	-
MC	1	2,44	2,40
MC	2	2,09	6,45
MC	3	1,12	3,07
MC	4	3,02	-
MT	1	1,65	1,28
MT	2	0,71	4,39
MT	3	0,87	1,46
MT	4	0,29	-

4.2 Srovnání relativního zastoupení uhlíku ($\delta^{13}C$) v epikutikulárních voscích *Brassica oleracea* var. *italica* a *Clusia rosea*

Relativní zastoupení $\delta^{13}C$ u brukve zelené – brokolice (*Brassica oleracea* var. *italica*) a *Clusia rosea* bylo analyzováno specificky podle jednotlivých látek obsažených ve voscích oddělených plynovou chromatografií (GC). Relativní zastoupení $\delta^{13}C$ je znázorněno pro hlavní složky epikutikulárních vosků listů na **Obr. P4**. Pro možnost porovnání s předchozí prací bylo váženým aritmetickým průměrem vypočteno celkové relativní zastoupení uhlíku ^{13}C v EW (jako váha byla použita plocha píku naměřeného v GC-IRMS představující množství dané složky ve vzorku) (**Obr. 19**).

Relativní zastoupení uhlíku ^{13}C u *Clusia rosea* bylo podobné mezi rostlinami z první a druhé části práce. Mladé listy měly po celou dobu mírně vyšší obsah ^{13}Coproti vyvinutým listům. Těžší izotop uhlíku začínaly mladé listy zabudovávat do EW o přibližně 20 hodin dříve než vyvinuté listy. Oproti tomu relativní zastoupení ^{13}C u *Brassica oleracea* var. *italica* se ukázalo být více odlišné mezi mladými a vyvinutými listy. Mladé listy hojně zabudovávaly značku ^{13}C už 2 hodiny po začátku značení, kdežto vyvinuté listy ji zabudovávaly výrazně pomaleji a v nižších množstvích. Obohacení o ^{13}C u vyvinutých listů brokolice rostlo po celou dobu experimentu téměř lineárně, kdežto u mladých listů se $\delta^{13}C$ měnilo v čase velice dynamicky a dosahovalo vysokých hodnot $\delta^{13}C$ (až 700 ‰).

Látkově specifickou analýzou GC-IRMS naměřená dynamika relativního zastoupení ^{13}C u nejhojnějších alkanů EW ukazuje variabilitu obohacování různých složek EW (**Obr. P4**). Nejhojnějšími složkami EW jsou pro *Clusia rosea* a *Brassica oleracea* var. *italica* alkany, konkrétně*:* nonakosan (C29), hentriakontan (C31) a tritriakontan (C33) v EW *Clusia rosea* a nonakosan (C29) a nonakosan-15-on (C29-15on) v EW *Brassica oleracea* var. *italica.* Zajímavé je, že zatímco u brokolice se relativní zastoupení ^{13}C mezi složkami EW téměř neliší, u *Clusia rosea* bylo relativní zastoupení ^{13}C mezi složkami EW více odlišné.



Obr. 20: Relativní zastoupení uhlíku ^{13}C ($\delta^{13}C$) u mladých (Y) a vyvinutých (M) listů **A**: *Clusia rosea* a **B:** *Brassica oleracea* var. *italica* v závislosti na čase po značení v atmosféře obohacené $^{13}CO_2$. n=2

5 Diskuse

Ačkoliv by se mohlo zdát, že listy v pozdějších fázích vývoje nepotřebují již obměňovat a nově vytvářet vrstvu epikutikulárních vosků, alespoň u některých druhů rostlin bylo ukázáno, že tomu tak není. Měření v této práci navazují na dřívější studie obnovy kutikulárních vosků u různých druhů rostlin (Hauke et al., 1998; Jetter et al., 2001; Richardson et al., 2005; Sachse et al., 2009; Gao et al., 2012). Tato práce přináší na další rostlině potvrzení toho, že k obnově EW dochází po celý život listu od mládí až do dospělosti listu (během senescence obnova EW nebyla zkoumána).

V této práci jsem převážně pracovala s rostlinou *Clusia rosea*, jejíž listy mají poměrně velkou plochou, nemají trichomy a mají relativně silnou vrstvou kutikulárních vosků. Její kutikulární vosky jsou tvořeny převážně alkany, které není potřeba před plynovou chromatografií derivatizovat, což by mohlo vnášet určitou chybu do měření. Rostliny jsou navíc komerčně dostupné a dobře rostou ve skleníku v našich klimatických podmínkách. Jejich nevýhodou je pomalejší růst a nižší počet stejně starých listů, což mohlo být jednou z příčin vyšší variability hustoty průduchů u mladých listů (**Obr. 10**, **Obr. P1**). Druhým neodstranitelným vlivem, který překrývá tuto nechtěnou variabilitu mladých listů, je přirozené stárnutí mladých listů během analýzy. Hustota průduchů (SD) byla u listů zjišťováno až při odběru pro izotopové analýzy, tedy pro každý list různě dlouho po začátku značení. Zjištěné SD proto neodráží přesně věk listů při začátku značení, ale různě dlouho po začátku. To se odráží zejména ve variabilitě SD mladých listů, u kterých je rozdíl tří týdnů (504 hodin) vývoje důležitý.

Po fotosyntetické asimilaci CO_2 z atmosféry fotosyntézou je uhlík rostlinou využit v dalších procesech, zabudován do pletiv či následně vyloučen respirací. Jedním z procesů využívající asimilovaný uhlík je samozřejmě také biosyntéza vosků. Značený uhlík se nejprve zabudovává a využívá v procesech navazujících na fixaci uhlíku v pletivech listů, a poté může být využit pro syntézu vosků a přenesen vně epidermálních buněk do kutikuly. Tomuto schématu pěkně odpovídají naměřená data, kdy obsah těžkého uhlíku ($\delta^{13}C$) v EW začíná růst později než obsah těžkého uhlíku v sušině listových pletiv (**Obr. 13**). Zpoždění nárůstu obsahu těžkého uhlíku v EW trvá u mladých listů přibližně 10 – 20 hodin po nárůstu obsahu těžkého uhlíku v pletivech listu a 50-70 hodin u vyvinutých listů. Toto zpoždění pravděpodobně odpovídá době potřebné pro syntézu a transport EW vně buňky. Rozdíl zpoždění nárůstu

obsahu ^{13}C v EW mezi mladými a vyvinutými listy je pravděpodobně dán rozdílnou rychlostí metabolismu a také tím, že vývoj a růst mladých listů ještě není dokončen, a proto potřebují, využívají a zabudovávají více ^{13}C z asimilovaného CO_2 (**Obr. 13**, **B**). Po dosažení maxima začínaly hodnoty $\delta^{13}C$ v listových pletivech i EW pozvolna klesat, což odpovídá schématu ztráty „značky“, neboť pulzní značení rostliny skončilo po 4 hodinách a nadále rostlina přijímala už jen izotop ^{12}C (pokud nepočítáme s velmi malým přirozeným výskytem ^{13}C). Uhlík ^{13}C v biomase listu i ve voscích byl zřeďován nově asimilovaným neznačeným uhlíkem ^{12}C a částečně „odcházel“ z těla rostliny v podobě respiračního $^{13}CO_2$ (z biomasy jako celku) případně jako pevné depozity (zde např. erozí vosků).

Doba, za kterou se značený uhlík v epikutikulárních voscích (EW) vyměnil se lišila vlivem stáří listů i efektem odstranění EW. Jednou z mých hypotéz bylo to, že se u listů s odstraněnými EW zrychlí obnova EW. Efekt odstranění EW se ale lišil v závislosti na stáří sledovaného listu. U mladých listů bylo zaznamenáno zrychlení (**Obr. 14**, **B**) obnovy EW u listů s odstraněnou vrstvičkou EW (YT). Což naznačuje, že mechanické odstranění vosků patrně spouští kaskádu dějů, která vede k syntéze a obnově EW. Ve srovnání s mladými listy, u kterých byl efekt odstranění EW výrazný, byl efekt u vyvinutých listů nejednoznačný. U plně vyvinutých listů bylo zpočátku množství obnovených EW vyšší v listech s odstraněnými EW (MT), ale později (14 dní po značení) obnova u kontrolních listů (MC) převýšila obnovu u MT (**Obr. 17**, **B**). U MT pokračovala obnova EW z asimilovaného ^{13}C, a zvyšování obsahu těžkého uhlíku po celou dobu měření (21 dní). V obsahu těžkého uhlíku u MT rostlin nebylo do konce měření dosaženo fáze poklesu obsahu značeného uhlíku po maximu $\delta^{13}C$, která je potřebná pro výpočet poločasu obratu uhlíku (**Obr. 14**, **B**). Lze ale vyvodit, že rychlost obnovy EW byla u MT výrazně nižší než u MC i mladých listů (YC, YT), což odpovídá velmi pomalému transportu uhlíku do EW u MT. Další možností způsobující zpoždění syntézy nových EW u MT by mohlo být způsobeno vnímáním odstranění EW jako stresu. Například pokud by rostlina vnímala mechanické odstranění EW jako napadení patogenem, asimilovaný C by mohl být zpočátku využit k „akutnějším“ procesům obrany při napadení patogenem, než je obnova kutikuly (Fich et al., 2016; Wang et al., 2020). Při vnímání odstranění EW jako stresu může také docházet k přerozdělování využitelné energie pro „akutnější“ procesy. Také u vyvinutých kontrolních listů (MC) byla obnova EW pomalejší oproti mladým listům což naznačuje pomalejší metabolickou výměnu uhlíku v EW vyvinutých listů

Celkové měření a sledování obsahu těžkého uhlíku ($\delta^{13}C$) u listů *Clusia rosea* probíhalo tři týdny (504 hodin), což ale, jak se zpětně ukázalo, nebyla u některých listů dostatečně dlouhá doba na to, aby „přišel na řadu“ v syntéze a transportu vosků lehký izotop uhlíku, který začala rostlina majoritně přijímat po ukončení značení těžkým uhlíkem tři týdny před tím. Pro výpočet rychlosti obnovy EW u všech sledovaných kategorií listů by bylo potřeba delšího měření i s fází poklesu $\delta^{13}C$ a nahrazením značených EW za EW syntetizované z neznačeného CO_2. Delší sledování ale bohužel nebylo možné z důvodu nedostatku vhodných listů na rostlině a z důvodu určitého zpoždění mezi odběrem listů, přípravou vzorků pro izotopové analýzy a získáním výsledků ukazujících potřebu dalších odběrů. Je fascinující, že $^{13}CO_2$ asimilované fotosyntézou během 4 hodiny je využíváno pro syntézu EW ještě tři týdny poté.

Vysoká variabilita ve vypočtené rychlosti obnovy EW může být dána nejen nedostatečnou délkou měření, ale také možnou chybou či kontaminací při odběrech a následných analýzách. Značka ^{13}C je ve vysoké koncentraci a špatnou manipulace se může snadno přenést mezi vzorky pomocí používaných nástrojů a přístrojů. Dalším problémem ve výpočtu rychlosti obnovy EW může být nedodržení předpokladů pro takovýto výpočet (Epron et al., 2012). Pro vypočtení poločasu obratu uhlíku je potřeba dodržet předpoklad systému a) v ustáleném stavu, kde jsou b) toky přímo úměrné velikosti zásobníku (kinetika prvního řádu), který je c) jen jeden, a kdy se d) značka sledovaného izotopu ztrácí jen odtokem. Přesné dodržení těchto předpokladů je ale pro živý systém téměř nemožné. a) Rostliny byly pěstovány ve skleníku v kontrolovaných podmínkách což by mohlo odpovídat dodržení předpokladu o systému v ustáleném stavu. b) Předpoklad toku přímo úměrného velikosti zásobníku mluví o velkém toku uhlíku do velkého zásobníku, čemuž odpovídá například tok uhlíku asimilovaného fotosyntézou do celého listu. Analogicky předpokládá menší tok uhlíku do menšího zásobníku, kterými jsou například EW. Tento předpoklad potvrzuje graf poměru uhlíku asimilovaného fotosyntézou a přeneseného do EW (*D/A* [%]) (**Obr. 18**), který ukazuje, že do epikutikulárních vosků šlo maximálně 10 % fotosynteticky asimilovaného uhlíku. d) Zda je ztráta značky minoritního izotopu z EW způsobena pouze „odtokem“ uhlíku, nelze plně potvrdit ani vyvrátit, neboť o syntéze a následných procesech ve vrstvě epikutikulárních vosků není známo dostatečné množství informací. Některé studie se například zabývají hypotézou, že EW mohou zpětně přecházet dovnitř buňky a mohou být „recyklovány“ a využity pro tvorbu nových EW například s delšími uhlíkovými řetězci (Gao et al., 2012). A tedy, že uhlík nemusí z EW odcházet pouze odtokem, ale může být znovu přeměněn či využit v metabolismu. c) Posledním a velice důležitým předpokladem výpočtu poločasu obratu

uhlíku je zapojení pouze jednoho zásobníku uhlíku do syntézy EW. Tento předpoklad patrně dodržený není, protože syntéza vosků může využívat prekurzory z vícero různých zdrojů v buňce. Tato mnohočetnost, rozdvojování a spojování metabolických toků z různých zdrojů může být problémem pro správný odhad poločasu obratu uhlíku v epikutikulárních voscích.

Porovnání vypočtené rychlosti fotosyntézy podle Rovnice 11 a gazometricky naměřené rychlosti fotosyntézy ukazuje významnou odlišnost mezi těmito dvěma způsoby získání hodnot rychlosti fotosyntézy (**Obr. P3**). To může ukazovat rozdíl mezi rychlostí hrubé a čisté fotosyntézy způsobený respirací. Zatímco spočtená fotosyntéza je ovlivněna i respirací, a tedy její hodnota odpovídají rychlosti hrubé fotosyntéze, hodnoty fotosyntézy naměřené gazometricky měřili respiraci a rychlost čisté fotosyntézy nezahrnující respiraci zvlášť. Porovnání respirace gazometricky naměřené před měřením fotosyntézy naznačuje významnou rozdílnost mezi respirací listů s nenarušenými a s narušenými EW. Dalším možným vysvětlením by mohlo být zapojení vlivu cirkanuálních cyklů na hodnoty rychlosti fotosyntézy, neboť rostliny používány pro výpočet rychlosti fotosyntézy na základě hodnot $\delta^{13}C$ byly značeny a měřeny na jaře, oproti tomu gazometrická měření rychlosti fotosyntézy probíhala na podzim. Toto porovnání bylo provedeno pouze na čtyřech listech pro každou kategorii listů u spočtené rychlosti fotosyntézy a třech listech od každé kategorie u gazometricky změřené rychlosti fotosyntézy, což není mnoho. Nedostatek naměřených hodnot mohl ovlivnit správnost porovnání a zviditelnit vliv náhodné variability.

Porovnání dvou druhů rostlin: *Brassica oleracea* var. *italica* (brukev zelená – brokolice) a *Clusia rosea* dále potvrzuje hypotézu této práce, že k obnově epikutikulárních vosků dochází i u plně vyvinutých listů (**Obr. 20**). Porovnávané druhy rostlin se liší rozdílem rychlosti obnovy epikutikulárních vosků mezi mladými a vyvinutými listy. Zatímco u listů *Clusia rose* je obnova EW jak mladých, tak vyvinutých listů téměř stejně rychlá, obnova vyvinutých listů u *Brassica oleracea* var. *italica* je výrazně pomalejší oproti mladým listům. To ukazuje na velice pomalý metabolismus a syntézu EW u vyvinutých listů brokolice. Strategie obnovy EW by mohla být ovlivněna délkou života daného listu potažmo celé rostliny. Brokolice je jednoletá rostlina, která roste poměrně rychle a vytvořené listy používá pouze část jedné vegetativní sezóny. Oproti tomu *Clusia* je vytrvalá rostlina, která může dorůstat až do stromových rozměrů a jelikož přirozeně roste v tropickém a subtropickém podnebí neshazuje na podzim listy, jako naše listnaté stromy. Rostlinám *Clusia rosea* se proto vyplatí více investovat do listů, které déle vydrží, a proto rychleji obnovovat EW i u vyvinutých listů.

Může se zdát, že mladé listy nabírají více uhlíku ^{13}C než vyvinuté (**Obr. 13 B; Obr. 20**), ale jelikož úplně neznáme základní množství epikutikulárních vosků, do kterých je ^{13}C doplňováno. Je otázka, zda a jak se liší množství nově syntetizovaných EW mezi mladými a vyvinutými listy. Nebylo by možné, že vyvinuté listy nabírají a syntetizují stejné množství epikutikulárních vosků jako mladé listy, ale ve větším množství již vytvořených EW tvoří nově syntetizované EW menší procentuální zastoupení?

Závěr

a) Hypotézu, že k obnově epikutikulárních vosků dochází po celou dobu života listu, tedy i u plně vyvinutých dospělých listů jsem potvrdila na listech *Clusia rosea* i *Brassica oleracea* var. *italica*. Kutikulární vosky mají pro rostliny životně důležitou roli v ochraně před ztrátou vody a před působením vnějších biotických i abiotických stresů. Pravděpodobně proto je potřeba udržovat kutikulu v plně funkčním stavu a obnovovat ji po celou dobu vývoje listu.

b) Potvrdila jsem, že obnova epikutikulárních vosků neprobíhá po celý život listu stejně rychle. U vyvinutých listů je obnova epikutikulárních vosků výrazně pomalejší, neboť dochází ke zpomalení metabolismu a transportu potřebných látek do epikutikulárních vosků. Rozdíl rychlosti obnovy epikutikulárních vosků mezi mladými a vyvinutými listy se liší v závislosti na zkoumaném druhu. U *Clusia rosea* byl rozdíl mezi obnovou epikutikulárních vosků mladých a vyvinutých listů nižší než u *Brassica oleracea* var. *italica*.

c) Ukázala jsem, že mechanické odstranění vrstvy epikutikulárních vosků má vliv na dynamiku obnovy epikutikulárních vosků. Avšak tento vliv se liší mezi různě starými listy rostlin *Clusia rosea*. U plně vyvinutých listů došlo po odstranění epikutikulárních vosků ke zpomalení obratu uhlíku a obnovy epikutikulárních vosků. U mladých listů byl vliv odstranění epikutikulárních vosků opačný, docházelo k mírnému zrychlení obnovy epikutikulárních vosků.

Pro obnovu epikutikulárních vosků je potřeba dostatek dostupného uhlíku a energie. Porovnávala jsem, proto vliv odstranění epikutikulárních vosků na dynamiku otevírání a zavírání průduchů. Z naměřených hodnot vyplívá, že odstranění epikutikulárních vosků nemá vliv na dynamiku otvírání a zavírání průduchů a zřejmě ani na rychlost fotosyntézy.

Literatura

Aragón, W.; Reina-Pinto, J. J.; Serrano, M., 2017: The intimate talk between plants and microorganisms at the leaf surface. *Journal of experimental botany*., **68**, 5339–5350.

Ashraf, M.; Mehmood, S., 1976: Response of four Brassica species to drought stress. *Environmental and Experimental Botany*., **30**, 93–100.

Bakan, B.; Marion, D., 2017: Assembly of the cutin polyester: From cells to extracellular cell walls. *Plants*., **6**.

Baker, E. A., 1974: the Influence of Environment on Leaf Wax Development in Brassica Oleracea Var. Gemmifera. *New Phytologist*., **73**, 955–966.

Barbero, F., 2016: Cuticular Lipids as a Cross-Talk among Ants, Plants and Butterflies. *International journal of molecular sciences*., **17**.

Beeckman, T.; De Rycke, R.; Viane, R.; Inzé, D., 2000: Histological study of seed coat development in Arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Research*., **113**, 139–148.

Beresniewicz, M.; Taylor, A.; Goffinet, M.; Koeller, W., 1995: Chemical nature of a semipermeable layer in seed coats of leek, onion (Liliaceae), tomato and pepper (Solanaceae). *Seed Science and Technology*., **23**, 135–145.

Berhin, A.; de Bellis, D.; Franke, R. B.; Buono, R. A.; Nowack, M. K.; Nawrath, C., 2019: The Root Cap Cuticle: A Cell Wall Structure for Seedling Establishment and Lateral Root Formation. *Cell*., **176**, 1367-1378.e8.

Bernard, A.; Domergue, F.; Pascal, S.; Jetter, R.; Renne, C.; Faure, J. D.; Haslam, R. P.; Napier, J. A.; Lessire, R.; Joubès, J., 2012: Reconstitution of plant alkane biosynthesis in yeast demonstrates that Arabidopsis ECERIFERUM1 and ECERIFERUM3 are core components of a very-long-chain alkane synthesis complex. *Plant Cell*., **24**, 3106–3118.

Bessire, M.; Chassot, C.; Jacquat, A. C.; Humphry, M.; Borel, S.; Petétot, J. M. D. C.; Métraux, J. P.; Nawrath, C., 2007: A permeable cuticle in Arabidopsis leads to a strong resistance to Botrytis cinerea. *EMBO Journal*., **26**, 2158–2168.

Bhanot, V.; Fadanavis, S. V.; Panwar, J., 2021: Revisiting the architecture, biosynthesis and functional aspects of the plant cuticle: There is more scope. *Environmental and Experimental Botany*., **183**, 104364.

Blenn, B.; Bandoly, M.; Küffner, A.; Otte, T.; Geiselhardt, S.; Fatouros, N. E.; Hilker, M., 2012: Insect Egg Deposition Induces Indirect Defense and Epicuticular Wax Changes in Arabidopsis thaliana. *Journal of Chemical Ecology*., **38**, 882–892.

Bondad, B.; Oosterhuis, D.; Murphy, J.; Kim, K., 1996: . Effect of water stress on the

epicuticular wax composition and ultrastructure of cotton (Gossypium hirsutum L.) leaf, bract, and boll. *Environmental and Experimental Botany*., **36**, 61–69.

Boom, A.; Sinninge Damsté, J. S.; De Leeuw, J. W., 2005: Cutan, a common aliphatic biopolymer in cuticles of drought-adapted plants. *Organic Geochemistry*., **36**, 595–601.

Borisjuk, L.; Rolletschek, H.; Wobus, U.; Weber, H., 2003: Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. *Journal of Experimental Botany*., **54**, 503–512.

Boutrot, F.; Zipfel, C., 2017: Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology*., **55**, 257–286.

Bowling, D. R.; Pataki, D. E.; Randerson, J. T., 2008: Carbon isotopes in terrestrial ecosystem pools and CO2 fluxes. *New Phytologist*., **178**, 24–40.

Buschhaus, C.; Herz, H.; Jetter, R., 2007: Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on adaxial sides of Rosa canina leaves. *Annals of Botany*., **100**, 1557–1564.

Buschhaus, C.; Jetter, R., 2011: Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: How do plants seal their epidermal surfaces? *Journal of Experimental Botany*., **62**, 841–853.

Cameron, K. D.; Teece, M. A.; Smart, L. B., 2006: Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. *Plant physiology*., **140**, 176–183.

Cassagne, C.; Lessire, R.; Bessoule, J. J.; Moreau, P.; Creach, A.; Schneider, F.; Sturbois, B., 1994: Biosynthesis of very long chain fatty acids in higher plants. *Progress in Lipid Research*., **33**, 55–69.

Cheng, S.; Xian, W.; Fu, Y.; Marin, B.; Keller, J.; Wu, T.; Sun, W.; Li, X.; Xu, Y.; Zhang, Y.; Wittek, S.; Reder, T.; Günther, G.; Gontcharov, A.; Wang, S.; Li, L.; Liu, X.; Wang, J.; Yang, H. et al., 2019: Genomes of Subaerial Zygnematophyceae Provide Insights into Land Plant Evolution. *Cell*., **179**, 1057-1067.e14.

Cook, M. E.; Graham, L. E., 1998: Structural Similarities between Surface Layers of Selected Charophycean Algae and Bryophytes and the Cuticles of Vascular Plants. *International Journal of Plant Sciences*., **159**, 780–787.

Daher, F. B.; Braybrook, S. A., 2015: How to let go: Pectin and plant cell adhesion. *Frontiers in Plant Science*., **6**, 1–8.

Dawson, T. E.; Mambelli, S.; Plamboeck, A. H.; Templer, P. H.; Tu, K. P., 2002: Stable

isotopes in plant ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*., **33**, 507–559.

De Giorgi, J.; Piskurewicz, U.; Loubery, S.; Utz-Pugin, A.; Bailly, C.; Mène-Saffrané, L.; Lopez-Molina, L., 2015: An Endosperm-Associated Cuticle Is Required for Arabidopsis Seed Viability, Dormancy and Early Control of Germination. *PLoS Genetics*., **11**, 1–32.

Delwiche, C. F.; Cooper, E. D., 2015: The evolutionary origin of a terrestrial flora. *Current Biology*., **25**, R899–R910.

Derrien, D.; Amelung, W., 2011: Computing the mean residence time of soil carbon fractions using stable isotopes: impacts of the model framework. *European Journal of Soil Science*., **62**, 237–252.

Deshmukh, A. P.; Simpson, A. J.; Hadad, C. M.; Hatcher, P. G., 2005: Insights into the structure of cutin and cutan from Agave americana leaf cuticle using HRMAS NMR spectroscopy. *Organic Geochemistry*., **36**, 1072–1085.

Domínguez, E.; Cuartero, J.; Heredia, A., 2011: An overview on plant cuticle biomechanics. *Plant Science*., **181**, 77–84.

Edqvist, J.; Blomqvist, K.; Nieuwland, J.; Salminen, T. A., 2018: Plant lipid transfer proteins: Are we finally closing in on the roles of these enigmatic proteins? *Journal of Lipid Research*., **59**, 1374–1382.

Edstam, M. M.; Viitanen, L.; Salminen, T. A.; Edqvist, J., 2011: Evolutionary history of the non-specific lipid transfer proteins. *Molecular Plant*., **4**, 947–964.

Edwards, D., 1993: Tansley Review: Cells and tissues in the vegetative land plants sporophytes. *New Phytologist*., **125**, 225–247.

Epron, D.; Bahn, M.; Derrien, D.; Lattanzi, F. A.; Pumpanen, J.; Gessler, A.; Högberg, P.; Maillard, P.; Dannoura, M.; Gérant, D.; Buchmann, N., 2012: Pulse-labelling trees to study carbon allocation dynamics: A review of methods, current knowledge and future prospects. *Tree Physiology*., **32**, 776–798.

Farquhar, G. D.; O'Leary, M. H.; Berry, J. A., 1982: On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*., **9**, 121–137.

Fatouros, N. E.; Broekgaarden, C.; Bukovinszkine'Kiss, G.; Van Loon, J. J. A.; Mumm, R.; Huigens, M. E.; Dicke, M.; Hilker, M., 2008: Male-derived butterfly anti-aphrodisiac mediates induced indirect plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*., **105**, 10033–10038.

Federle, W.; Maschwitz, U.; Fiala, B.; Riederer, M.; Holldobler, B., 1997: Slippery Ant-Plants and Skilful Climbers : Selection and Protection of Specific Ant Partners by

Epicuticular Wax Blooms in Macaranga (Euphorbiaceae). *International Association for Ecology*., **112**, 217–224.

Fernández, V.; Guzmán-Delgado, P.; Graça, J.; Santos, S.; Gil, L., 2016: Cuticle structure in relation to chemical composition: Re-assessing the prevailing model. *Frontiers in Plant Science*., **7**, 1–14.

Fich, E. A.; Segerson, N. A.; Rose, J. K. C., 2016: The Plant Polyester Cutin: Biosynthesis, Structure, and Biological Roles. *Annual Review of Plant Biology*., **67**, 207–233.

Gao, L.; Burnier, A.; Huang, Y., 2012: Quantifying instantaneous regeneration rates of plant leaf waxes using stable hydrogen isotope labeling. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*., **26**, 115–122.

Gniwotta, F.; Vogg, G.; Gartmann, V.; Carver, T. L. W.; Riederer, M.; Jetter, R., 2005: What do microbes encounter at the plant surface? Chemical composition of pea leaf cuticular waxes. *Plant Physiology*., **139**, 519–530.

Go, Y. S.; Kim, H.; Kim, H. J.; Suh, M. C., 2014: Arabidopsis cuticular wax biosynthesis is negatively regulated by the DEWAX gene encoding an AP2/ERF-type transcription factor. *Plant Cell*., **26**, 1666–1680.

Greer, S.; Wen, M.; Bird, D.; Wu, X.; Samuels, L.; Kunst, L.; Jetter, R., 2007: The cytochrome P450 enzyme CYP96A15 is the midchain alkane hydroxylase responsible for formation of secondary alcohols and ketones in stem cuticular wax of arabidopsis. *Plant Physiology*., **145**, 653–667.

Guignard, G., 2019: Thirty-three years (1986–2019) of fossil plant cuticle studies using transmission electron microscopy: A review. *Review of Palaeobotany and Palynology*., **271**.

Guzmán-Delgado, P.; Graça, J.; Cabral, V.; Gil, L.; Fernández, V., 2016: The presence of cutan limits the interpretation of cuticular chemistry and structure: Ficus elastica leaf as an example. *Physiologia Plantarum*., **157**, 205–220.

Hansjakob, A.; Riederer, M.; Hildebrandt, U., 2011: Wax matters: Absence of very-long-chain aldehydes from the leaf cuticular wax of the glossy11 mutant of maize compromises the prepenetration processes of Blumeria graminis. *Plant Pathology*., **60**, 1151–1161.

Hauke, V.; Schreiber, L., 1998: Ontogenetic and seasonal development of wax composition and cuticular transpiration of ivy (Hedera helix L.) sun and shade leaves. *Planta*., **207**, 67–75.

Heide-Jørgensen, H. S., 1991: Cuticle development and ultrastructure: evidence for a

procuticle of high osmium affinity. *Planta*., **183**, 511–519.

Heredia-Guerrero, J. A.; Benítez, J. J.; Heredia, A., 2008: Self-assembled polyhydroxy fatty acids vesicles: A mechanism for plant cutin synthesis. *BioEssays*., **30**, 273–277.

Holloway, P. J., 1982: The chemical constitutionof plant cutins. In: Cutler, D., K. Alvin & C. Price (eds.), *The Plant Cuticle*. London: Academic, pp. 45–85.

Holmes, M. G.; Keiller, D. R., 2002: Effects of pubescence and waxes on the reflectance of leaves in the ultraviolet and photosynthetic wavebands: A comparison of a range of species. *Plant, Cell and Environment*., **25**, 85–93.

Hori, K.; Maruyama, F.; Fujisawa, T.; Togashi, T.; Yamamoto, N.; Seo, M.; Sato, S.; Yamada, T.; Mori, H.; Tajima, N.; Moriyama, T.; Ikeuchi, M.; Watanabe, M.; Wada, H.; Kobayashi, K.; Saito, M.; Masuda, T.; Sasaki-Sekimoto, Y.; Mashiguchi, K. et al., 2014: Klebsormidium flaccidum genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nature Communications*., **5**, 2–6.

Ingram, G.; Nawrath, C., 2017: The roles of the cuticle in plant development: organ adhesions and beyond. *Journal of experimental botany*., **68**, 5307–5321.

Isaacson, T.; Kosma, D. K.; Matas, A. J.; Buda, G. J.; He, Y.; Yu, B.; Pravitasari, A.; Batteas, J. D.; Stark, R. E.; Jenks, M. A.; Rose, J. K. C., 2009: Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. *Plant Journal*., **60**, 363–377.

Jakobson, L.; Lindgren, L. O.; Verdier, G.; Laanemets, K.; Brosché, M.; Beisson, F.; Kollist, H., 2016: BODYGUARD is required for the biosynthesis of cutin in Arabidopsis. *The New phytologist*., **211**, 614–626.

Jefferson, P.; Johnson, D.; Rumbaugh, M.; Asay, K., 1989: Water stress and genotypic effects on epicuticular wax production of alfalfa and crested wheatgrass in relation to yield and excised leaf water loss rate. *Canadian Journal of Plant Science*., **69**, 481–490.

Jeffree, C. E.; Baker, E. A.; Holloway, P. J., 1975: Ultrastructure and recrystallization of plant epicuticular waxes. *New Phytologist*.

Jenks, M. A.; Andersen, L.; Teusink, R. S.; Williams, M. H., 2001: Leaf cuticular waxes of potted rose cultivars as affected by plant development, drought and paclobutrazol treatments. *Physiologia plantarum*., **112**, 62–70.

Jessen, D.; Roth, C.; Wiermer, M.; Fulda, M., 2015: Two activities of long-chain acyl-coenzyme a synthetase are involved in lipid trafficking between the endoplasmic reticulum and the plastid in arabidopsis. *Plant Physiology*., **167**, 351–366.

Jetter, R.; Schäffer, S.; Riederer, M., 2000: Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from Prunus laurocerasus L. *Plant, Cell & Environment*., **23**, 619–628.

Jetter, R.; Schäffer, S., 2001: Chemical composition of the Prunus laurocerasus leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. *Plant Physiology*., **126**, 1725–1737.

Jetter, R.; Kunst, L., 2008: Plant surface lipid biosynthetic pathways and their utility for metabolic engineering of waxes and hydrocarbon biofuels. *Plant Journal*., **54**, 670–683.

Jetter, R.; Riederer, M., 2016: Localization of the transpiration barrier in the epi- and intracuticular waxes of eight plant species: Water transport resistances are associated with fatty acyl rather than alicyclic components. *Plant Physiology*., **170**, 921–934.

Ji, X.; Jetter, R., 2008: Very long chain alkylresorcinols accumulate in the intracuticular wax of rye (Secale cereale L.) leaves near the tissue surface. *Phytochemistry*., **69**, 1197–1207.

Jiao, C., 2019: The Genome of the Charophyte Alga.

Ju, S.; Go, Y. S.; Choi, H. J.; Park, J. M.; Suh, M. C., 2017: DEWAX transcription factor is involved in resistance to botrytis cinerea in arabidopsis thaliana and camelina sativa. *Frontiers in Plant Science*., **8**, 1–13.

Kahmen, A.; Dawson, T. E.; Vieth, A.; Sachse, D., 2011: Leaf wax n-alkane δD values are determined early in the ontogeny of Populus trichocarpa leaves when grown under controlled environmental conditions. *Plant, Cell and Environment*., **34**, 1639–1651.

Kalistová, T., 2019: Vývoj průduchů u dvouděložných rostlin: vliv faktorů prostředí. [Stomatal development in dicotyledons: the effect of environmental factors. Bc. Thesis, in Czech]. *Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic*., 43.

Karbulková, J.; Schreiber, L.; Macek, P.; Šantrůček, J., 2008: Differences between water permeability of astomatous and stomatous cuticular membranes: Effects of air humidity in two species of contrasting drought-resistance strategy. *Journal of Experimental Botany*., **59**, 3987–3995.

Kerstiens, G., 1996: Cuticular water permeability and its physiological significance. *Journal of Experimental Botany*., **47**, 1813–1832.

Koch, K.; Neinhuis, C.; Ensikat, H. J.; Barthlott, W., 2004: Self assembly of epicuticular waxes on living plant surfaces imaged by atomic force microscopy (AFM). *Journal of Experimental Botany*., **55**, 711–718.

Kolattukudy, E. P.; Rogers, M. L.; Li, D.; Hwang, C. S.; Flaischman, A. M., 1995: Active stereo vision based system for estimation of mobile robot orientation using affine moment invariants. *Proc. NatL Acad Sci. USA 92 (1995).*, **92**, 4080–4087.

Kondo, S.; Hori, K.; Sasaki-Sekimoto, Y.; Kobayashi, A.; Kato, T.; Yuno-Ohta, N.; Nobusawa, T.; Ohtaka, K.; Shimojima, M.; Ohta, H., 2016: Primitive extracellular lipid components on the surface of the charophytic alga Klebsormidium flaccidum and their possible biosynthetic pathways as deduced from the genome sequence. *Frontiers in Plant Science*., **7**, 1–15.

Kong, L.; Liu, Y.; Zhi, P.; Wang, X.; Xu, B.; Gong, Z.; Chang, C., 2020: Origins and evolution of cuticle biosynthetic machinery in land plants. *Plant Physiology*., **184**, 1998–2010.

Kosma, D. K.; Bourdenx, B.; Bernard, A.; Parsons, E. P.; Lü, S.; Joubès, J.; Jenks, M. A., 2009: The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of Arabidopsis. *Plant Physiology*., **151**, 1918–1929.

Krolikowski, K. A.; Victor, J. L.; Wagler, T. N.; Lolle, S. J.; Pruitt, R. E., 2003: Isolation and characterization of the Arabidopsis organ fusion gene HOTHEAD. *Plant Journal*., **35**, 501–511.

Kunst, L.; Samuels, A. L., 2003: Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research*., **42**, 51–80.

Kunst, L.; Samuels, L., 2009: Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. *Current Opinion in Plant Biology*., **12**, 721–727.

Kunz, H. H.; Scharnewski, M.; Feussner, K.; Feussner, I.; Flügge, U. I.; Fulda, M.; Gierth, M., 2009: The ABC transporter PXA1 and peroxisomal β-oxidation are vital for metabolism in mature leaves of Arabidopsis during extended darkness. *Plant Cell*., **21**, 2733–2749.

Kurdyukov, S.; Faust, A.; Trenkamp, S.; Bär, S.; Franke, R.; Efremova, N.; Tietjen, K.; Schreiber, L.; Saedler, H.; Yephremov, A., 2006a: Genetic and biochemical evidence for involvement of HOTHEAD in the biosynthesis of long-chain alpha-,omega-dicarboxylic fatty acids and formation of extracellular matrix. *Planta*., **224**, 315–329.

Kurdyukov, S.; Faust, A.; Nawrath, C.; Bär, S.; Voisin, D.; Efremova, N.; Franke, R.; Schreiber, L.; Saedler, H.; Métraux, J. P.; Yephremov, A., 2006b: The epidermis-specific extracellular BODYGUARD controls cuticle development and morphogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell*., **18**, 321–339.

Květoň, J., 2018: Stabilní izotopy - terminologie, analýzy, přírodní výskyt. In: Šantrůček, J.

& H. Šantrůčková (eds.), *Stabilní izotopy biogenních prvků. Použití v biologiia ekologii*. Akademia, Praha, pp. 43–60.

Kwiatkowska, M.; Polit, J. T.; Stępiński, D.; Popłońska, K.; Wojtczak, A.; Domínguez, E.; Heredia, A., 2015: Lipotubuloids in ovary epidermis of Ornithogalum umbellatum act as metabolons: suggestion of the name 'lipotubuloid metabolon'. *Journal of Experimental Botany*., **66**, 1157–1163.

Lewandowska, M.; Keyl, A.; Feussner, I., 2020: Wax biosynthesis in response to danger: its regulation upon abiotic and biotic stress. *New Phytologist*., **227**, 698–713.

Li-Beisson, Y.; Pollard, M.; Sauveplane, V.; Pinot, F.; Ohlrogge, J.; Beisson, F., 2009: Nanoridges that characterize the surface morphology of flowers require the synthesis of cutin polyester. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*., **106**, 22008–22013.

Li, N.; Gügel, I. L.; Giavalisco, P.; Zeisler, V.; Schreiber, L.; Soll, J.; Philippar, K., 2015: FAX1, a Novel Membrane Protein Mediating Plastid Fatty Acid Export. *PLoS Biology*., **13**, 1–37.

Li, N.; Xu, C.; Li-Beisson, Y.; Philippar, K., 2016: Fatty Acid and Lipid Transport in Plant Cells. *Trends in Plant Science*., **21**, 145–158.

Li, N.; Meng, H.; Li, S.; Zhang, Z.; Zhao, X.; Wang, S.; Liu, A.; Li, Q.; Song, Q.; Li, X.; Guo, L.; Li, H.; Zuo, J.; Luo, K., 2020: Two plastid fatty acid exporters contribute to seed oil accumulation in Arabidopsis. *Plant Physiology*., **182**, 1910–1919.

Li, Y.; Beisson, F.; Koo, A. J. K.; Molina, I.; Pollard, M.; Ohlrogge, J., 2007: Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*., **104**, 18339–18344.

Lockheart, M. J.; Van Bergen, P. F.; Evershed, R. P., 1997: Variations in the stable carbon isotope compositions of individual lipids from the leaves of modern angiosperms: Implications for the study of higher land plant-derived sedimentary organic matter. *Organic Geochemistry*., **26**, 137–153.

Lolle, S. J.; Cheung, A. Y.; Sussex, I. M., 1992: Fiddlehead: An Arabidopsis mutant constitutively expressing an organ fusion program that involves interactions between epidermal cells. *Developmental Biology*., **152**, 383–392.

Lolle, S. J.; Pruitt, R. E., 1999: Epidermal cell interactions: A case for local talk. *Trends in Plant Science*., **4**, 14–20.

Lopez-Molina, L.; Mongrand, S.; McLachlin, D. T.; Chait, B. T.; Chua, N. H., 2002: ABI5

acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant Journal*., **32**, 317–328.

Lykholat, Y. V.; Khromykh, N. A.; Didur, O. O.; Alexeyeva, A. A.; Lykholat, T. Y., 2020: Modification of the epicuticular waxes of plant leaves due to increased sunlight intensity. *Biosystems Diversity*., **28**, 29–33.

Macková, J.; VaŠková, M.; Macek, P.; Hronková, M.; Schreiber, L.; Šantrůček, J., 2013: Plant response to drought stress simulated by ABA application: Changes in chemical composition of cuticular waxes. *Environmental and Experimental Botany*., **86**, 70–75.

Mazurek, S.; Garroum, I.; Daraspe, J.; De Bellis, D.; Olsson, V.; Mucciolo, A.; Butenko, M. A.; Humbel, B. M.; Nawrath, C., 2017: Connecting the molecular structure of cutin to ultrastructure and physical properties of the cuticle in petals of arabidopsis. *Plant Physiology*., **173**, 1146–1163.

McFarlane, H. E.; Shin, J. J. H.; Bird, D. A.; Samuels, L. A., 2010: Arabidopsis ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations. *Plant Cell*., **22**, 3066–3075.

McKinney, C. R.; McCrea, J. M.; Epstein, S.; Allen, H. A.; Urey, H. C., 1950: Improvements in mass spectrometers for the measurement of small differences in isotope abundance ratios. *Review of Scientific Instruments*., **21**, 724–730.

Medina, E.; Aguiar, G.; Gómez, M.; Aranda, J.; Medina, J. D.; Winter, K., 2006: Taxonomic significance of the epicuticular wax composition in species of the genus Clusia from Panama. *Biochemical Systematics and Ecology*., **34**, 319–326.

Melzer, E.; Schmidt, H. L., 1987: Carbon isotope effects on the pyruvate dehydrogenase reaction and their importance for relative carbon-13 depletion in lipids. *The Journal of biological chemistry*., **262**, 8159–8164.

Molina, I.; Ohlrogge, J. B.; Pollard, M., 2008: Deposition and localization of lipid polyester in developing seeds of Brassica napus and Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*., **53**, 437–449.

Moussu, S.; San-Bento, R.; Galletti, R.; Creff, A.; Farcot, E.; Ingram, G., 2013: Embryonic cuticle establishment, the great (apoplastic) divide. *Plant Signaling and Behavior*., **8**.

Müller, K.; Levesque-Tremblay, G.; Fernandes, A.; Wormit, A.; Bartels, S.; Usadel, B.; Kermode, A., 2013: Overexpression of a pectin methylesterase inhibitor in Arabidopsis thaliana leads to altered growth morphology of the stem and defective organ separation. *Plant Signaling and Behavior*., **8**, 9–13.

Née, G.; Xiang, Y.; Soppe, W. J., 2017: The release of dormancy, a wake-up call for seeds to

germinate. *Current Opinion in Plant Biology*., **35**, 8–14.

Niklas, K. J.; Kutschera, U., 2010: The evolution of the land plant life cycle. *New Phytologist*., **185**, 27–41.

Niklas, K. J.; Cobb, E. D.; Matas, A. J., 2017: The evolution of hydrophobic cell wall biopolymers: from algae to angiosperms. *Journal of experimental botany*., **68**, 5261–5269.

Nishiyama, T.; Sakayama, H.; de Vries, J.; Buschmann, H.; Saint-Marcoux, D.; Ullrich, K. K.; Haas, F. B.; Vanderstraeten, L.; Becker, D.; Lang, D.; Vosolsobě, S.; Rombauts, S.; Wilhelmsson, P. K. I.; Janitza, P.; Kern, R.; Heyl, A.; Rümpler, F.; Villalobos, L. I. A. C.; Clay, J. M. et al., 2018: The Chara Genome: Secondary Complexity and Implications for Plant Terrestrialization. *Cell*., **174**, 448-464.e24.

Nødskov Giese, B., 1975: Effects of light and temperature on the composition of epicuticular wax of barley leaves. *Phytochemistry*., **14**, 921–929.

Ohlrogge, J.; Browse, J.; Jaworski, J.; Somerville, C., 2015: Lipids. In: Buchanan, B. B., W. Gruissem & R. L. Jones (eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. second edi. American Society of Plant Biologists, Hoboken, USA, pp. 337–400.

Ohtaka, K.; Hori, K.; Kanno, Y.; Seo, M.; Ohta, H., 2017: Primitive Auxin Response without TIR1 and Aux/IAA in the Charophyte Alga Klebsormidium nitens *Plant Physiology*., **174**, 1621 LP – 1632.

Panikashvili, D.; Savaldi-Goldstein, S.; Mandel, T.; Yifhar, T.; Franke, R. B.; Höfer, R.; Schreiber, L.; Chory, J.; Aharoni, A., 2007: The arabidopsis DESPERADO/AtWBC11 transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant Physiology*., **145**, 1345–1360.

Panikashvili, D.; Shi, J. X.; Schreiber, L.; Aharoni, A., 2009: The arabidopsis DCR encoding a soluble BAHD acyltransferase is required for cutin polyester formation and seed hydration properties. *Plant Physiology*., **151**, 1773–1789.

Panikashvili, D.; Shi, J. X.; Schreiber, L.; Aharoni, A., 2011: The Arabidopsis ABCG13 transporter is required for flower cuticle secretion and patterning of the petal epidermis. *New Phytologist*., **190**, 113–124.

Pascal, S.; Bernard, A.; Deslous, P.; Gronnier, J.; Fournier-Goss, A.; Domergue, F.; Rowland, O.; Joubès, J., 2019: Arabidopsis CER1-LIKE1 functions in a cuticular very-long-chain alkane-forming complex. *Plant Physiology*., **179**, 415–432.

Pfeilmeier, S.; Caly, D. L.; Malone, J. G., 2016: Bacterial pathogenesis of plants: future challenges from a microbial perspective: Challenges in Bacterial Molecular Plant Pathology. *Molecular plant pathology*., **17**, 1298–1313.

Pfündel, E. E.; Agati, G.; Cerovic, Z. G., 2006: Optical Properties of Plant Surfaces. *Biology of the Plant Cuticle. Annual Plant Reviews (eds M. Riederer and C. Müller)*., **23**, 216–249.

Philippe, G.; Sørensen, I.; Jiao, C.; Sun, X.; Fei, Z.; Domozych, D. S.; Rose, J. K., 2020: Cutin and suberin: assembly and origins of specialized lipidic cell wall scaffolds. *Current Opinion in Plant Biology*., **55**, 11–20.

Piasentier, E.; Bovolenta, S.; Malossini, F., 2000: The n-alkane concentrations in buds and leaves of browsed broadleaf trees. *Journal of Agricultural Science*., **135**, 311–320.

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

Post-Beittenmiller, D., 1996: Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*., **47**, 405–430.

Ranathunge, K.; Shao, S.; Qutob, D.; Gijzen, M.; Peterson, C. A.; Bernards, M. A., 2010: Properties of the soybean seed coat cuticle change during development. *Planta*., **231**, 1171–1188.

Reina, J. J.; Guerrero, C.; Heredia, A., 2007: Isolation, characterization, and localization of AgaSGNH cDNA: a new SGNH-motif plant hydrolase specific to Agave americana L. leaf epidermis. *Journal of experimental botany*., **58**, 2717–2731.

Renault, H.; Alber, A.; Horst, N. A.; Basilio Lopes, A.; Fich, E. A.; Kriegshauser, L.; Wiedemann, G.; Ullmann, P.; Herrgott, L.; Erhardt, M.; Pineau, E.; Ehlting, J.; Schmitt, M.; Rose, J. K. C.; Reski, R.; Werck-Reichhart, D., 2017: A phenol-enriched cuticle is ancestral to lignin evolution in land plants. *Nature Communications*., **8**.

Richardson, A.; Franke, R.; Kerstiens, G.; Jarvis, M.; Schreiber, L.; Fricke, W., 2005: Cuticular wax deposition in growing barley (Hordeum vulgare) leaves commences in relation to the point of emergence of epidermal cells from the sheaths of older leaves. *Planta*., **222**, 472–483.

Riederer, M.; Schönherr, J., 1988: Development of plant cuticles: fine structure and cutin composition of Clivia miniata Reg. leaves. *Planta*., **174**, 127–138.

Rolletschek, H.; Borisjuk, L.; Sánchez-García, A.; Gotor, C.; Romero, L. C.; Martínez-Rivas, J. M.; Mancha, M., 2007: Temperature-dependent endogenous oxygen concentration regulates microsomal oleate desaturase in developing sunflower seeds. *Journal of Experimental Botany*., **58**, 3171–3181.

Rowland, O.; Zheng, H.; Hepworth, S. R.; Lam, P.; Jetter, R.; Kunst, L., 2006: CER4 encodes an alcohol-forming fatty acyl-coenzyme A reductase involved in cuticular wax

production in Arabidopsis. *Plant Physiology*., **142**, 866–877.

Sachse, D.; Kahmen, A.; Gleixner, G., 2009: Significant seasonal variation in the hydrogen isotopic composition of leaf-wax lipids for two deciduous tree ecosystems (Fagus sylvativa and Acer pseudoplatanus). *Organic Geochemistry*., **40**, 732–742.

Samuels, L.; Kunst, L.; Jetter, R., 2008: Sealing plant surfaces: Cuticular wax formation by epidermal cells. *Annual Review of Plant Biology*., **59**, 683–707.

Samuels, L.; McFarlane, H. E., 2012: Plant cell wall secretion and lipid traffic at membrane contact sites of the cell cortex. *Protoplasma*., **249 Suppl**, S19-23.

San-Bento, R.; Farcot, E.; Galletti, R.; Creff, A.; Ingram, G., 2014: Epidermal identity is maintained by cell-cell communication via a universally active feedback loop in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*., **77**, 46–58.

Sánchez, F. J.; Manzanares, M.; De Andrés, E. F.; Tenorio, J. L.; Ayerbe, L., 2001: Residual transpiration rate, epicuticular wax load and leaf colour of pea plants in drought conditions. Influence on harvest index and canopy temperature. *European Journal of Agronomy*., **15**, 57–70.

Šantrůček, J.; Šimánová, E.; Karbulková, J.; Šimková, M.; Schreiber, L., 2004: A new technique for measurement of water permeability of stomatous cuticular membranes isolated from Hedera helix leaves. *Journal of Experimental Botany*., **55**, 1411–1422.

Schreiber, L.; Riederer, M., 1996: Ecophysiology of cuticular transpiration: Comparative investigation of cuticular water permeability of plant species from different habitats. *Oecologia*., **107**, 426–432.

Schreiber, L., 2010: Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends in Plant Science*., **15**, 546–553.

Segado, P.; Heredia-Guerrero, J. A.; Heredia, A.; Domínguez, E., 2020: Cutinsomes and CUTIN SYNTHASE1 function sequentially in tomato fruit cutin deposition1[OPEN]. *Plant Physiology*., **183**, 1622–1637.

Seo, P. J.; Xiang, F.; Qiao, M.; Park, J. Y.; Lee, Y. N.; Kim, S. G.; Lee, Y. H.; Park, W. J.; Park, C. M., 2009: The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in Arabidopsis. *Plant Physiology*., **151**, 275–289.

Seo, P. J.; Lee, S. B.; Suh, M. C.; Park, M. J.; Park, C. M., 2011: The MYB96 transcription factor regulates cuticular wax biosynthesis under drought conditions in arabidopsis. *Plant Cell*., **23**, 1138–1152.

Serrano, M.; Coluccia, F.; Torres, M.; L'Haridon, F.; Métraux, J. P., 2014: The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science*., **5**, 1–8.

Shepherd, T.; Robertson, G.; Griffiths, D.; Bircht, A., 1997: Effects of environment on the composition of epicuticular wax esters from kale and swede. *Phytochemistry*., **46**, 83–96.

Sieber, P.; Schorderet, M.; Ryser, U.; Buchala, A.; Kolattukudy, P.; Métraux, J. P.; Nawrath, C., 2000: Transgenic Arabidopsis plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and postgenital organ fusions. *Plant Cell*., **12**, 721–737.

Sinha, N.; Lynch, M., 1998: Fused organs in the adherent1 mutation in maize show altered epidermal walls with no perturbations in tissue identities. *Planta*., **206**, 184–195.

Skamnioti, P.; Gurr, S. J., 2007: Magnaporthe grisea cutinase2 mediates appressorium differentiation and host penetration and is required for full virulence. *Plant Cell*., **19**, 2674–2689.

Spencer, J. L., 1996: Waxes enhance Plutella xylostella oviposition in response to sinigrin and cabbage homogenates. *Entomologia Experimentalis et Applicata*., **81**, 165–173.

Stammitti, L.; Derridj, S.; Garrec, J. P., 1996: Leaf epicuticular lipids of Prunus laurocerasus: Importance of extraction methods. *Phytochemistry*., **43**, 45–48.

Stępiński, D.; Kwiatkowska, M.; Wojtczak, A.; Polit, J. T.; Domínguez, E.; Heredia, A.; Popłońska, K., 2020: The Role of Cutinsomes in Plant Cuticle Formation. *Cells*., **9**.

Sugio, A.; Hogenhout, S. A., 2012: The genome biology of phytoplasma: modulators of plants and insects. *Current opinion in microbiology*., **15**, 247–254.

Suh, M. C.; Samuels, A. L.; Jetter, R.; Kunst, L.; Pollard, M.; Ohlrogge, J.; Beisson, F., 2005: Cuticular lipid composition, surface structure, and gene expression in Arabidopsis stem epidermis. *Plant physiology*. 2005/11/18., **139**, 1649–1665.

Szczuka, E.; Szczuka, A., 2003: Cuticle fluorescence during embryogenesis of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*., **45**, 63–67.

Takahashi, K.; Shimada, T.; Kondo, M.; Tamai, A.; Mori, M.; Nishimura, M.; Hara-Nishimura, I., 2010: Ectopic expression of an esterase, which is a candidate for the unidentified plant cutinase, causes cuticular defects in arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*., **51**, 123–131.

Takahashi, Y.; Tsubaki, S.; Sakamoto, M.; Watanabe, S.; Azuma, J. I., 2012: Growth-dependent chemical and mechanical properties of cuticular membranes from leaves of Sonneratia alba. *Plant, Cell and Environment*., **35**, 1201–1210.

Takeda, S.; Iwasaki, A.; Tatematsu, K.; Okada, K., 2014: The half-size ABC transporter FOLDED PETALS 2/ABCG13 is involved in petal elongation through narrow spaces in

Arabidopsis thaliana floral buds. *Plants*., **3**, 348–358.

Tsubaki, S.; Ozaki, Y.; Yonemori, K.; Azuma, J. I., 2012: Mechanical properties of fruit-cuticular membranes isolated from 27 cultivars of Diospyros kaki Thunb. *Food Chemistry*., **132**, 2135–2139.

Uppalapati, S. R.; Ishiga, Y.; Doraiswamy, V.; Bedair, M.; Mittal, S.; Chen, J.; Nakashima, J.; Tang, Y.; Tadege, M.; Ratet, P.; Chen, R.; Schultheiss, H.; Mysore, K. S., 2012: Loss of abaxial leaf epicuticular wax in Medicago truncatula irg1/palm Mutants results in reduced spore differentiation of anthracnose and nonhost rust pathogens. *Plant Cell*., **24**, 353–370.

Urey, H. C., 1948: Oxygen Isotopes in Nature and in the Laboratory. *Science*., **108**, 489–496.

Verger, S.; Chabout, S.; Gineau, E.; Mouille, G., 2016: Cell adhesion in plants is under the control of putative O-fucosyltransferases. *Development (Cambridge)*., **143**, 2536–2540.

Villena, J. F.; Domínguez, E.; Stewart, D.; Heredia, A., 1999: Linked references are available on JSTOR for this article : Planta Characterization and biosynthesis of non-degradable polymers in plant cuticles. *Planta*., **208**, 181–187.

Vogg, G.; Fischer, S.; Leide, J.; Emmanuel, E.; Jetter, R.; Levy, A. A.; 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 β-ketoacyl-CoA synthase. *Journal of Experimental Botany*., **55**, 1401–1410.

Voisin, D.; Nawrath, C.; Kurdyukov, S.; Franke, R. B.; Reina-Pinto, J. J.; Efremova, N.; Will, I.; Schreiber, L.; Yephremov, A., 2009: Dissection of the complex phenotype in cuticular mutants of Arabidopsis reveals a role of SERRATE as a mediator. *PLoS Genetics*., **5**.

von Berlepsch, S.; Kunz, H. H.; Brodesser, S.; Fink, P.; Marin, K.; Flügge, U. I.; Gierth, M., 2012: The acyl-acyl carrier protein synthetase from Synechocystis sp. PCC 6803 mediates fatty acid import. *Plant Physiology*., **159**, 606–617.

W. Barthlott, C. C. N., 1997: Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta*., **202**, 1–8.

Wager, H. G., 1974: The effect of subjecting peas to air enriched with carbon dioxide: II. Respiration and the metabolism of the major acids. *Journal of Experimental Botany*., **25**, 338–351.

Wang, X.; Kong, L.; Zhi, P.; Chang, C., 2020: Update on cuticular wax biosynthesis and its roles in plant disease resistance. *International Journal of Molecular Sciences*., **21**, 1–15.

Waters, E. R., 2003: Molecular adaptation and the origin of land plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*., **29**, 456–463.

Watson, G. S.; Gellender, M.; Watson, J. A., 2014: Self-propulsion of dew drops on lotus leaves: A potential mechanism for self cleaning. *Biofouling*., **30**, 427–434.

Wellesen, K.; Durst, F.; Pinot, F.; Benveniste, I.; Nettesheim, K.; Wisman, E.; Steiner-Lange, S.; Saedler, H.; Yephremov, A., 2001: Functional analysis of the LACERATA gene of Arabidopsis provides evidence for different roles of fatty acid ω-hydroxylation in development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*., **98**, 9694–9699.

Wen, M.; Buschhaus, C.; Jetter, R., 2006: Nanotubules on plant surfaces: Chemical composition of epicuticular wax crystals on needles of Taxus baccata L. *Phytochemistry*., **67**, 1808–1817.

Xia, Y.; Gao, Q. M.; Yu, K.; Lapchyk, L.; Navarre, D. R.; Hildebrand, D.; Kachroo, A.; Kachroo, P., 2009: An Intact Cuticle in Distal Tissues Is Essential for the Induction of Systemic Acquired Resistance in Plants. *Cell Host and Microbe*., **5**, 151–165.

Xin, A.; Herburger, K., 2021: Mini Review: Transport of Hydrophobic Polymers Into the Plant Apoplast. *Frontiers in Plant Science*., **11**, 1–8.

Xue, D.; Zhang, X.; Lu, X.; Chen, G.; Chen, Z. H., 2017: Molecular and evolutionary mechanisms of cuticular wax for plant drought tolerance. *Frontiers in Plant Science*., **8**, 1–12.

Yang, W.; Pollard, M.; Li-Beisson, Y.; Beisson, F.; Feig, M.; Ohlrogge, J., 2010: A distinct type of glycerol-3-phosphate acyltransferase with sn-2 preference and phosphatase activity producing 2-monoacylglycerol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*., **107**, 12040–12045.

Yang, W.; Simpson, J. P.; Li-Beisson, Y.; Beisson, F.; Pollard, M.; Ohlrogge, J. B., 2012: A land-plant-specific glycerol-3-phosphate acyltransferase family in arabidopsis: Substrate specificity, sn-2 preference, and evolution. *Plant Physiology*., **160**, 638–652.

Yang, X.; Zhao, H.; Kosma, D. K.; Tomasi, P.; Dyer, J. M.; Li, R.; Liu, X.; Wang, Z.; Parsons, E. P.; Jenks, M. A.; Lü, S., 2017: The Acyl desaturase CER17 is involved in producing Wax unsaturated primary Alcohols and cutin monomers. *Plant Physiology*., **173**, 1109–1124.

Yeats, T. H.; Rose, J. K. C., 2013: The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiology*., **163**, 5–20.

Zabka, V.; Stangl, M.; Bringmann, G.; Vogg, G.; Riederer, M.; Hildebrandt, U., 2008: Host

surface properties affect prepenetration processes in the barley powdery mildew fungus. *New Phytologist*., **177**, 251–263.

Zeisler-Diehl, V.; Müller, Y.; Schreiber, L., 2018: Epicuticular wax on leaf cuticles does not establish the transpiration barrier, which is essentially formed by intracuticular wax. *Journal of Plant Physiology*., **227**, 66–74.

Zeisler, V.; Schreiber, L., 2016: Epicuticular wax on cherry laurel (Prunus laurocerasus) leaves does not constitute the cuticular transpiration barrier. *Planta*., **243**, 65–81.

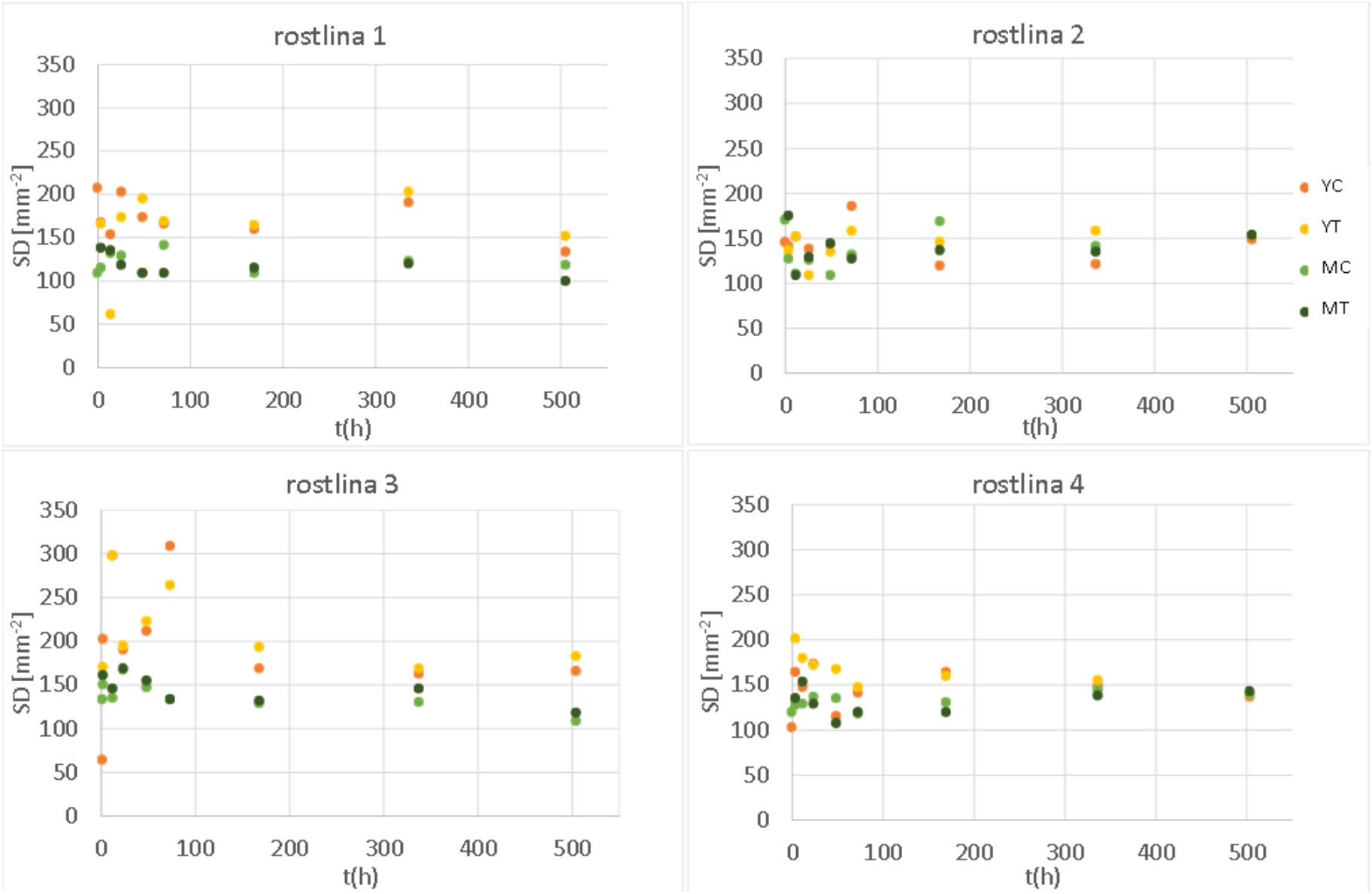
Zhang, Y. L.; Zhang, C. L.; Wang, G. L.; Wang, Y. X.; Qi, C. H.; Zhao, Q.; You, C. X.; Li, Y. Y.; Hao, Y. J., 2019: The R2R3 MYB transcription factor MdMYB30 modulates plant resistance against pathogens by regulating cuticular wax biosynthesis. *BMC Plant Biology*., **19**, 1–14.

Zhang, Y. L.; You, C. X.; Li, Y. Y.; Hao, Y. J., 2020: Advances in Biosynthesis, Regulation, and Function of Apple Cuticular Wax. *Frontiers in Plant Science*., **11**, 1–7.

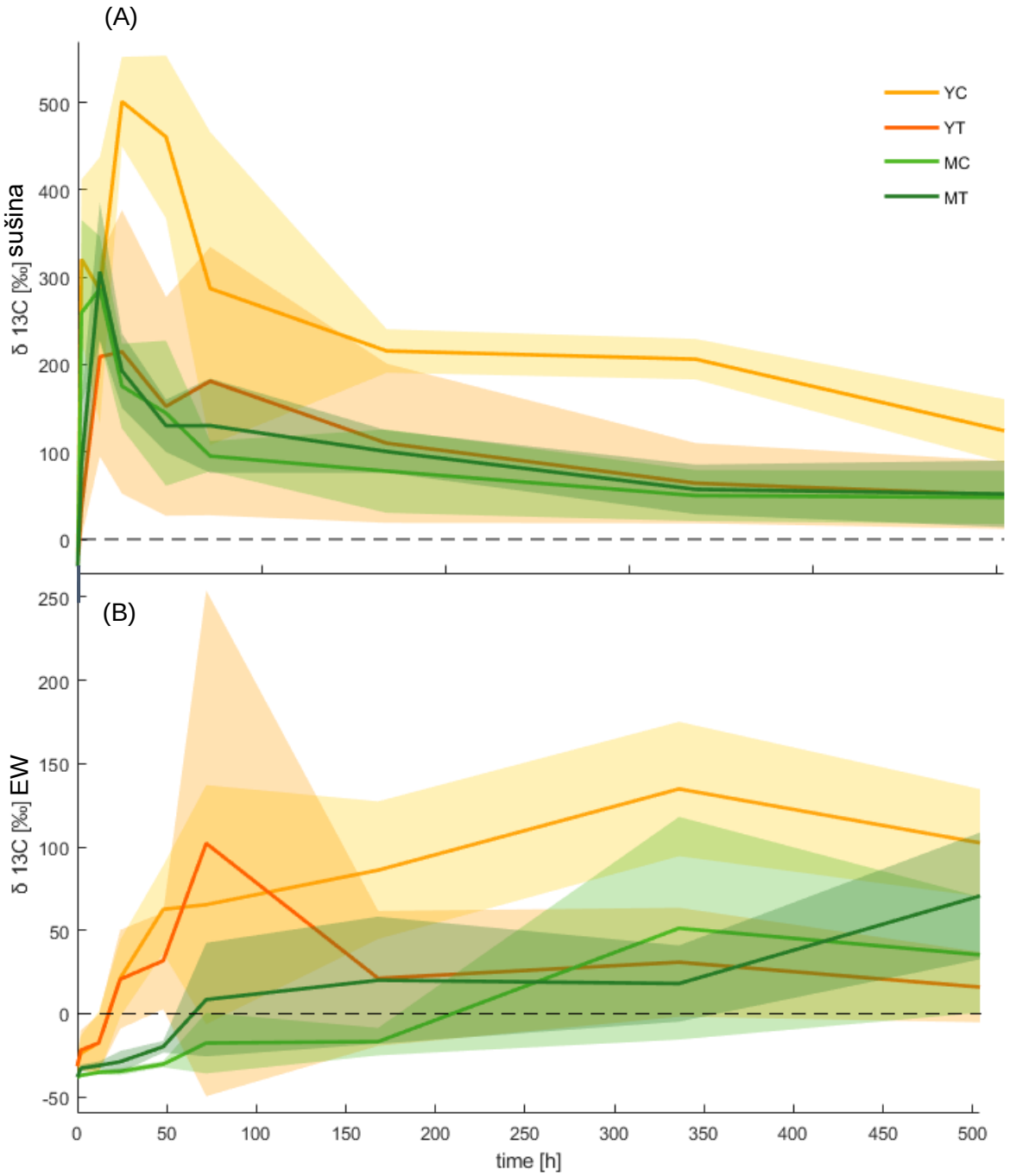
Zhao, L.; Haslam, T. M.; Sonntag, A.; Molina, I.; Kunst, L., 2019: Functional overlap of long-chain acyl-CoA synthetases in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*., **60**, 1041–1054.

Zhu, L.; Guo, J.; Zhu, J.; Zhou, C., 2014: Enhanced expression of EsWAX1 improves drought tolerance with increased accumulation of cuticular wax and ascorbic acid in transgenic Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*., **75**, 24–35.

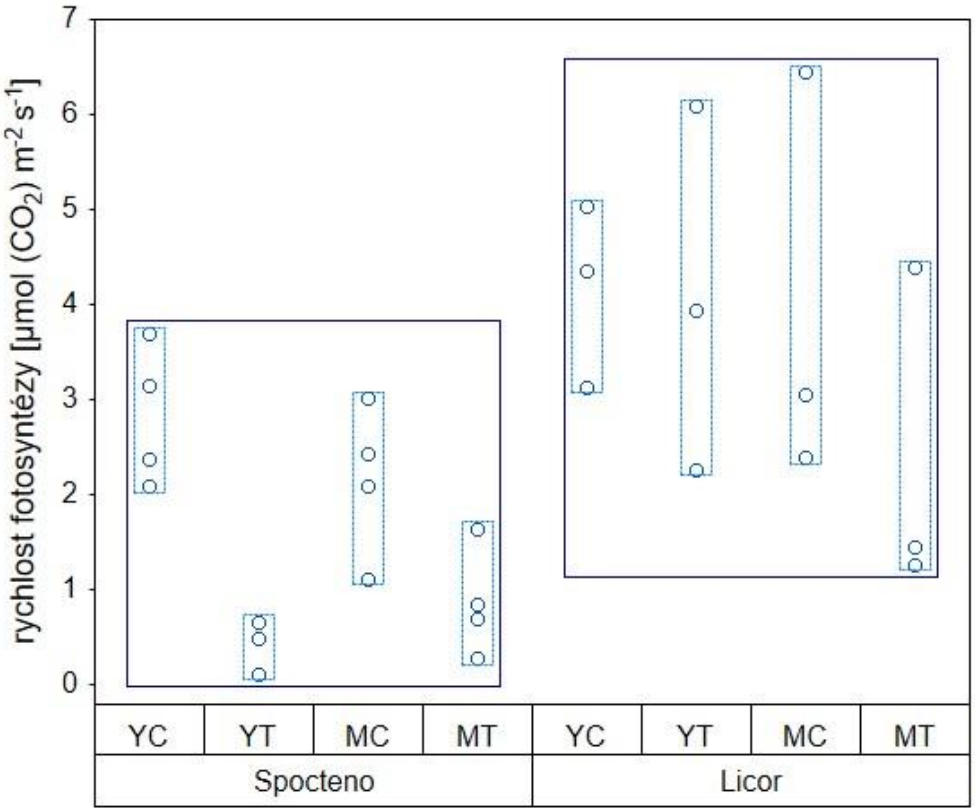
Ziv, C.; Zhao, Z.; Gao, Y. G.; Xia, Y., 2018: Multifunctional roles of plant cuticle during plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*., **9**, 1–8.



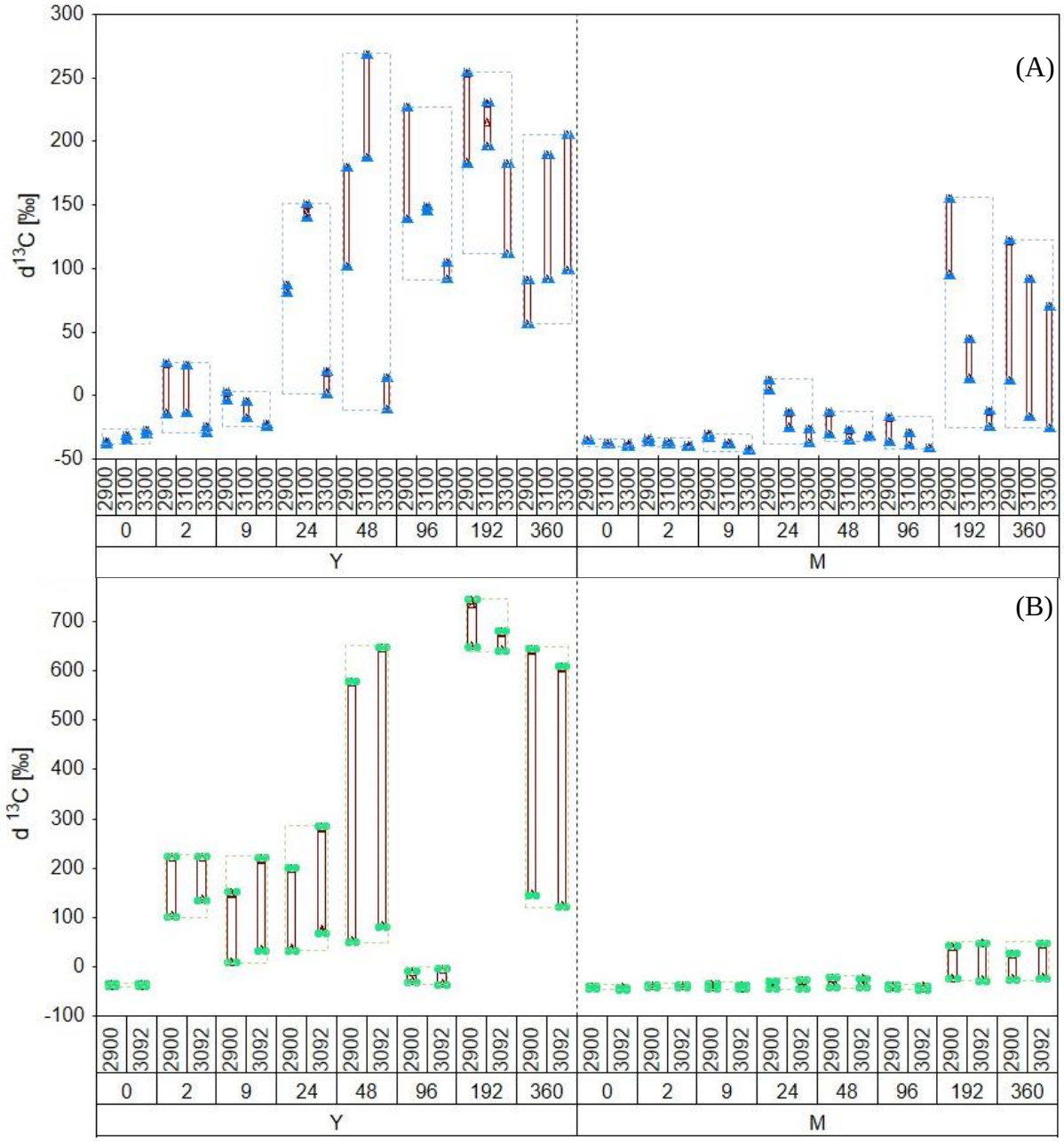
Obr. P1: Porovnání SD listů rostlin s ohledem na to, kdy byl daný list sebrán a použit pro analýzu $\delta^{13}C$. Kontrolní mladé listy (YC, žlutooranžová), mladé listy s porušenou vrstvou EW (YT, oranžovočervená), kontrolní vyvinuté listy (MC, světlezelená) a vyvinuté listy s porušenou vrstvou EW (MT, tmavězelená)



Obr. P2: **A**: Relativní zastoupení uhlíku ^{13}C (‰) sušiny listových pletiv v závislosti na čase odběru od začátku značení (h). Linie spojuje průměry $\delta^{13}C$ a plocha okolo zobrazuje směrodatnou odchylku průměru. Kontrolní mladé listy (YC, žlutooranžová), mladé listy s porušenou vrstvou EW (YT, oranžovočervená), kontrolní vyvinuté listy (MC, světlezelená) a vyvinuté listy s porušenou vrstvou EW (MT, tmavězelená). n= 4 **B**: Relativní zastoupení uhlíku ^{13}C (‰) epikutikulárních vosků v závislosti na čase od začátku značení (h). n = 4



Obr. P3: Porovnání rychlosti fotosyntézy spočtené (Spocteno) pro přibližně 460 µmol·m^{-2}·s^{-1} na základě relativního zastoupení uhlíku ^{13}C (n = 4) a gazometricky změřené pomocí Licoru (Licor) při 400 µmol·m^{-2}·s^{-1} (n = 3) pro mladé kontrolní listy (YC), mladé s odstraněnou vrstvou EW (YT), vyvinuté kontrolní (MC) a vyvinuté s odstraněnými EW (MT).



Obr. P4: Relativní zastoupení uhlíku ^{13}C ($\delta^{13}C$) hlavních složek EW u listů **A**: *Clusia rosea* a **B**: *Brassica oleracea* var. *italica*. V horním řádku osy x jsou jednotlivé složky EW, kdy 2900 odpovídá alkanu s 29C, 3100 alkanu s 31C, 3300 alkanu s33C a 3092 odpovídá alkanu C29 – nonakosan-15-on. Druhý řádek osy x odpovídá časům odběrů po začátku měření (h), třetí řádek osy x je určení stáří odebíraného listu: mladý (Y) a vyvinutý (M). n=2