

mgr inż. Kamila Laskoś✉,  
dr hab. inż. Ilona Mieczysław  
Czyczyło-Mysza

Instytut Fizjologii Roślin imienia Franciszka  
Górskiego Polskiej Akademii Nauk, Kraków

[https://doi.org/10.18388/pb.2021\\_483](https://doi.org/10.18388/pb.2021_483)

✉autor korespondujący: k.laskos@ifr-pan.edu.  
pl

**Słowa kluczowe:** wosk epikutylarny, susza,  
zboża

**Wykaz skrótów:** ABS/RC – przepływ strumienia fotonów zaabsorbowanych przed cząsteczkami chlorofilu anten fotosytemu II w przeliczeniu na centrum reakcji;  $F_v/F_m$  – maksymalna wydajność fotochemiczna fotosytemu II; MDA – zawartość dialdehydu malonowego; PI – ogólny wskaźnik funkcjonowania fotosytemu II;  $P_n$  – intensywność fotosyntezy; PSII – fotosystem II; VLCFAs – długołańcuchowe kwasy tłuszczowe

## STRESZCZENIE

Nalot woskowy jest elementem lipidowej warstwy, kutykuli, która pokrywa nadziemne organy roślin i stanowi główną barierę zapobiegającą pozaszparkowej utracie wody. Warstwa woskowa pomaga także chronić powierzchnie roślin przed patogenami i promieniowaniem ultrafioletowym oraz wpływa na interakcje między roślinami i owadami. Akumulacja wosku kutykularnego to jeden z mechanizmów przystosowawczych do stresu suszy, jednak szereg badań związku między woskami kutykularnymi a odpornością roślin na suszę dotyczy rośliny modelowej jaką jest rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*). W związku z ogromnym znaczeniem konsumpcyjnym zbóż, niniejsza praca traktuje o związku wosków kutykularnych i odporności na suszę u tej grupy roślin. Zaprezentowano dotychczasowe osiągnięcia z zakresu badania związku między biosyntezą wosku a reakcją roślin na stres suszy z wykorzystaniem linii bliskoizogenicznych o sinoszarej i transparentnej warstwie woskowej oraz badania roli genów biosyntezy i transportu wosków kutykularnych oraz regulujących je czynników transkrypcyjnych z wykorzystaniem mutantów o zaburzonym formowaniu pokrywy woskowej.

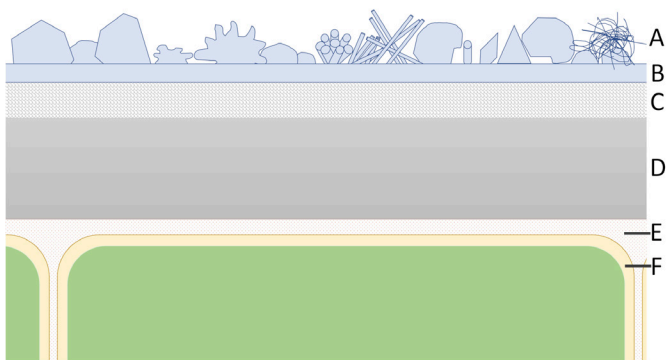
## WPROWADZENIE

Prognozy klimatyczne sugerują, że ekstremalne zjawiska cieplne będą w przyszłości coraz częstsze i poważniejsze, a częstotliwość występowania susz może ulec zwiększeniu [1,2]. Konieczne jest zatem dostosowanie globalnego systemu produkcji zbóż do pojawiających się ekstremów klimatycznych oraz zrozumienie kluczowych procesów prowadzących do strat w plonach [3]. Próby uzyskania odmian o zwiększonej odporności na stres suszy, na drodze tradycyjnych metod hodowlanych były utrudniane przez niską odziedziczalność cech związanych z plonowaniem, szczególnie w warunkach suszy glebowej, a także przez niekorzystny wpływ interakcji między genotypem a środowiskiem [4–6]. Interakcje środowiskowe opierają się na wzajemnych oddziaływaniach, w których kluczową rolę odgrywają warstwy wierzchnie roślin, co ma szczególne znaczenie dla organizmów o dużej powierzchni funkcjonalnej takich jak rośliny. W większości przypadków wierzchnią warstwę pierwotnych roślin wyższych stanowi hydrofobowa kutykula, która składa się z kutyny i wosków kutykularnych, które odgrywają kluczową rolę w ograniczaniu transpiracji kutykularnej [7,8]. Liczne doniesienia literaturowe [9–11] dowodzą, że geny oraz czynniki transkrypcyjne biosyntezy wosku pełnią ważną rolę w podnoszeniu odporności na suszę u roślin, między innymi poprzez akumulację wosków epikutylarnych oraz zmiany w ich składzie chemicznym. Zmieniona ekspresja genów biosyntezy i transportu komponentów kutikuli może prowadzić do zmiany odporności na suszę u roślin zbożowych takich jak ryż, kukurydza, jęczmień i pszenica [12]. Naturalne jest zatem zwiększające się zainteresowanie nalotem woskowym pokrywającym nadziemne organy roślinne w kontekście stresów abiotycznych i biotycznych [13–16].

## WOSKI EPIKUTYLARNE

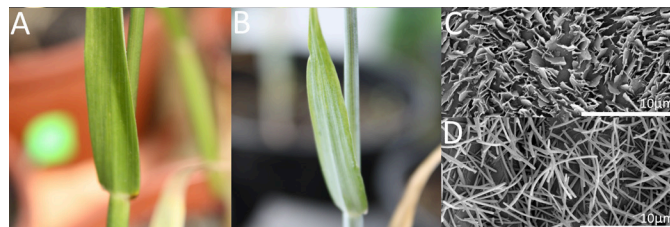
### UMIEJSCOWIENIE I STRUKTURA

W epidermie, tkance otaczającej organy roślinne wchodzące w skład pędu, zachodzi biosynteza wosku, który następnie jest deponowany na zewnętrznej ścianie komórkowej epidermy (tzw. ściana peryklinalna) (Ryc. 1). Wosk kutykularny jest jednym z dwóch głównych składników kutykuli, która stanowi lipidową warstwę o niejednorodnym składzie chemicznym pokrywającą organy roślin lądowych [17]. Rozróżniamy woski intra- i epi-kutykularne, które stanowią obszerną grupę związków chemicznych, a różnica między nimi wynika z ich umiejscowienia w obrębie kutykuli [12,18]. Oprócz lipofilowych wosków kutykularnych (intra- i epi-kutykularnych), podatnych na ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi, w skład kutykuli wchodzi także lipofilowa kutyna, która jednak nie może zostać wyekstrahowana rozpuszczalnikami ze względu



**Rycina 1.** Schemat budowy kutykuli liścia. A. Wosk epikutykularny krystaliczny; B. Wosk epikutykularny amorficzny; C. Kutykula właściwa (kutyna osadzona w wosku intrakutykularnym); D. Warstwa kutykularna będąca mieszaniną kutyny, wosku i polisacharydów (celuloza i pektyny); E. Lamella pektynowa; F. Celulozowa ściana komórek epidermy – ściana peryklinalna.

na posiadanie struktury biopolimerowej [18,19]. Czasem, poza kutyną w kutykuli stwierdza się także obecność innego biopolimeru, kutanu, jednakże zawiera on nieulegające hydrolizie wiązania, które znacznie ograniczają badania strukturalne [20]. Woski intrakutykularne odkładane są wewnątrz macierzy odpornego mechanicznie biopolimeru kutyny, tworząc wspólnie warstwę kutykuli właściwej, na powierzchni której następuje deponowanie wosków epikutykularnych, które łatwo ulegają uszkodzeniom mechanicznym. Pod warstwą kutykuli właściwej występuje warstwa kutykularna, która jest mieszaniną substancji lipidowych i polisacharydów (celuloza i pektyny) (Ryc. 1). Woski epikutykularne (powierzchniowe) często stanowią gładką i transparentną warstwę wierzchnią większości roślin (Ryc. 2A), jednak w przypadku wielu gatunków: liście, łodygi, czy owoce, a w przypadku zbóż także kłosa lub wiechy, pokryte są sinoszarą matową powłoką wosków epikutykularnych [21] (Ryc. 2B). Woski te stanowią najbardziej zewnętrzna, hydrofobową warstwę kutykuli i występują w postaci amorficznego filmu woskowego o grubości  $<1.0 \mu\text{m}$  pokrywającego kutykulę właściwą oraz w postaci struktur krystalicznych o różnorodnej formie odkładanych na filmie woskowym [13,22,23] (Ryc. 1, Ryc. 2C, D). Kryształy wosku są na tyle duże, że zmieniają właściwości optyczne powierzchni, powodując, że w niektórych przypadkach odbieramy tę strukturę rośliny jako sinoszarą, a nie transparentną [21]. Rozmiary kryształów mogą wahać się od  $0.2$  do  $100 \mu\text{m}$  [13, 21]. Uwagę zwraca również występowanie ogromnej różnorodności morfologii kryształów wosków epikutykularnych (Ryc. 1, Ryc. 2C, D), wśród których można zidentyfikować takie formy jak: płytki o regularnych lub nieregularnych brzegach, pręciki, nitki, rurki itp. [13,24]. Wzorce orientacji i agregacji kryształów także są różnorodne. Mogą dotyczyć ułożenia kilku pojedynczych kryształów względem siebie (np. rozety), jak i regularności ułożenia kryształów na większej powierzchni [13,21]. Warto zauważyć, że nie tylko obecność, ale przede wszystkim rodzaj struktury wosku będzie determinował właściwości optyczne powierzchni rośliny (sinoszarą lub transparentną warstwą) [24]. Morfologia struktury wosków epikutykularnych nie jest stała, zależy od gatunku rośliny, organu, tkanki, a także ulega ciągłym zmianom podczas rozwoju ontogenetycznego oraz może



**Rycina 2.** Linia żyta (*Secale cereale* L.) o transparentnej (A) i sinoszarzej (B) okrywie woskowej oraz mikrofotografie wosku epikutykularnego okrywającego odosiową powierzchnię liścia flagowego żyta, którego kryształy przyjmują formę płytek (C) lub tubul (D) (skala  $10 \mu\text{m}$ ).

podlegać modyfikacjom pod wpływem czynników środowiskowych [11,21,24–26].

## SKŁAD CHEMICZNY I BIOSYNTeza

W ujęciu chemicznym warstwa wosków epikutykularnych jest złożoną i zróżnicowaną strukturalnie (związki łańcuchowe i pierścieniowe) mieszaniną długocząsteczkowych kwasów tłuszczowych (VLCFAs, ang. *very long chain fatty acids*) oraz ich pochodnych z takich klas związków chemicznych jak wielkocząsteczkowe węglowodory, estry woskowe, pierwszo- i drugo-rzędowe alkohole, aldehydy, ketony, a także niealifatyczne komponenty takie jak triterpenoidy, flawonoidy i sterole, a długości łańcucha węglowego poszczególnych komponentów mogą sięgać od  $C_{20}$  do około  $C_{40}$ – $C_{46}$  w szeregu homologicznym [12,18,25]. Podobnie jak w przypadku morfologii kryształów wosku epikutykularnego, w zależności od badanego gatunku rośliny, organu, tkanki czy komórki, a także etapu rozwoju lub czynników środowiskowych skład tej warstwy będzie różny [11,24, 25,27–29]. Inicjacja biosyntezy *de novo* wosku następuje w chloroplastach komórek epidermalnych. Początkowo dochodzi do biosyntezy prekursorów woskowych szkieletów węglowych w postaci kwasów tłuszczowych  $C_{16}$  i  $C_{18}$ , które następnie są transportowane ze stromy plastydów do membran retikulum endoplazmatycznego, gdzie następuje ich wydłużanie poprzez szereg reakcji enzymatycznych do nasyconych VLCFAs  $C_{20}$ – $C_{34}$  [18,30]. Dalsze przekształcenia VLCFAs mogą zachodzić na drodze trzech szlaków biosyntezy (i-iii) [12,18]. Przez szlak formowania alkoholi (i) VLCFAs mogą być przekształcone do zbudowanych z parzystej liczby atomów węgla alkoholi I-rzędowych i dalej zestryfikowane z kwasami tłuszczowymi  $C_{16}$  do estrów woskowych. W wyniku przekształceń VLCFAs przez szlak formowania alkanów (ii) powstają alkanany, aldehydy, alkohole II-rzędowe i ketony. Dodatkowo, u gatunków *Triticum* odnotowano przekształcanie VLCFAs przez ścieżkę biosyntezy  $\beta$ -diketonów (iii) [18,31]. Zsyntetyzowane komponenty tworzą mieszaninę wosków kutykularnych, a następnie transportowane są drogą apoplastyczną i osadzone w obrębie kutykuli [32,33]. Formacja kryształów wosku jest związana z jego chemicznym składem [34]. Według niektórych doniesień literaturowych [18,35–37] tworzenie kryształów z klasy płatków na powierzchni tkanki roślinnej związane jest z występowaniem dużej ilości alkoholi pierwszorzędowych w wosku epikutykularnym i powstawaniem fenotypu o transparentnej powierzchni, natomiast obecność tubularnych kryształów  $\beta$ -diketonowych wiąże się z występowaniem sinoszarzej powierzchni organów roślinnych [34,38].

## FUNKCJE PEŁNIONE U ORGANIZMÓW ROŚLINNYCH

Woskom epikutylarnym przypisuje się kilka ważnych funkcji oprócz pełnienia roli jednostki strukturalnej [39]. Odgrywają one ważną rolę jako bariera ochronna przed stresami środowiskowymi [15]. Dotychczasowe doniesienia dotyczące ochronnej funkcji wosku przed nadmierną utratą wody sugerowały, że zwiększona akumulacja wosku powierzchniowego wiązała się z mniejszą pozasparkową utratą wody [30,40–42]. Inną istotną funkcją wosków epikutylarnych jest ochrona tkanek roślinnych przed uszkodzeniami spowodowanymi nadmiernym promieniowaniem UV, co jest możliwe dzięki dużej skuteczności warstwy wosku powierzchniowego w odbijaniu lub osłabianiu promieniowania UV. Dodatkowo, ilość i charakterystyka spektralna odbitego promieniowania zależy od kształtu, średnicy i rozmieszczenia kryształów wosku na powierzchni tkanki roślinnej [43]. Właściwości wosków powierzchniowych, ich grubość, struktura, skład chemiczny, a także zwilżalność i przepuszczalność powierzchni liścia, zapewniają ochronę przed patogenami, zapobiegają atakom wirusów, bakterii i grzybów chorobotwórczych, a także mogą warunkować interakcję roślin z owadami, poprzez ochronę przed żerowaniem owadów lub składaniem jaj [33,44–47]. Woski epikutylarne wchodzi także w interakcje z zewnętrznymi czynnikami chemicznymi, co ma szczególne znaczenie w przypadku oprysków środkami ochrony roślin, poprzez oddziaływanie na zatrzymanie oprysków na powierzchni rośliny, penetrację przez warstwę kutykuli oraz ich wiązanie [39,48]. Kryształy wosku epikutylarnego mogą także wpływać na rozmieszczenie zanieczyszczeń powietrza na powierzchni roślin. Gęste rozmieszczenie kryształów może zapobiegać osadzaniu się cząstek zanieczyszczeń w celu zachowania funkcji aparatów szparkowych [49]. Istnieją również doniesienia literaturowe wskazujące na degradację wosków epikutylarnych w przypadku oddziaływania zanieczyszczeń gazowych ( $\text{SO}_2$  lub  $\text{NO}_2$ ) oraz kwaśnego deszczu, co pośrednio może nieść za sobą takie skutki jak obniżenie odporności na suszę u roślin narażonych na zanieczyszczenia powietrza [39,50].

## ZWIĄZEK MIĘDZY WOSKAMI EPIKUTYLARNYMI A ODPORNOŚCIĄ NA SUSZĘ U ZBÓŻ

### BADANIA Z WYKORZYSTANIEM LINII BLISKOIZOGENICZNYCH O SINOSZAREJ I TRANSPARENTNEJ WARSTWIE WOSKOWEJ

Stres suszy postrzegany jest jako jeden z głównych czynników abiotycznych, który dotyka różne regiony świata, oraz wpływa na biosyntezę i modyfikację składu wosku epikutylarnego u roślin zbożowych [12,30]. Dotychczasowe opracowania na temat roli wosku epikutylarnego w adaptacji zbóż do stresu suszy przede wszystkim odnosiły się do badań na poziomie molekularnym [12,15,30]. Natomiast, analizy fizjologiczne i biochemiczne obejmowały głównie ilościową i jakościową analizę wosków kutykularnych, badanie przepuszczalności kutykuli oraz określenie składowych plonu, a rzadko poszerzano doświadczenia o pomiary wymiany gazowej, fluorescencji chlorofilu *a* oraz analizę zawartości barwników fototsyntetycznych, osmoprotektantów, antyoksydantów czy poziomu dialdehydu

malonowego (MDA) jako markera uszkodzenia błon komórkowych [12,15].

Niewiele jest badań dotyczących kompleksowych analiz cech morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych powiązanych z odpornością na stres suszy, u roślin zbożowych fenotypowo różniących się rodzajem pokrywy woskowej. Do tej pory badania tego typu były możliwe dzięki uzyskaniu linii bliskoizogenicznych pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) [11,51], czy żyta zwyczajnego (*Secale cereale* L.) [24,52].

Analizowane linie bliskoizogeniczne charakteryzowały się różnym typem pokrywy woskowej (sinoszarym lub transparentnym). Według wielu autorów [24,51,52] różnice te wynikają z odmiennej morfologii kryształów wosku, a tym samym składu nalotu woskowego. Linie bliskoizogeniczne zostały opracowane dla wielu gatunków roślin uprawnych metodą krzyżowania wstecznego i stanowią parę/grupę roślin o prawie identycznym podłożu genetycznym, z wyjątkiem pojedynczego fragmentu/*locus* na jednym chromosomie [53]. Ich wykorzystanie pozwala na zbadanie czy geny warunkujące tworzenie powłoki woskowej wykazują zaangażowanie wspomnianych czynników w inne reakcje fizjologiczne ważne dla zwiększenia odporności na suszę. Badania z wykorzystaniem linii bliskoizogenicznych pozwalało na analizę odmienności między liniami różniącymi się typem pokrywy woskowej w wykształceniu różnych cech morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych w odpowiedzi na stres suszy glebowej. Wyniki Guo i wsp. (2016) [11] pokazują, że wosk epikutylarny u sinoszarych linii pszenicy wpłynął na utrzymanie stosunkowo wysokiego potencjału wodnego w liściu flagowym, niską utratę wody i wysoką względną zawartość wody. Według Guo i wsp. (2016) [11] skutkowało to względnie wysoką aktywnością fotosystemu II (PSII) w porównaniu do linii o transparentnej pokrywie woskowej. Linie sinoszare odznaczały się mniejszym spadkiem maksymalnej wydajności fotochemicznej PSII ( $F_v/F_m$ ) oraz ogólnego wskaźnika funkcjonowania PSII (PI), natomiast charakteryzował je większy wzrost przepływu strumienia fotonów zaabsorbowanych przed cząsteczki chlorofilu anten PSII w przeliczeniu na centrum reakcji (ABS/RC) oraz wydajności fotosyntezy ( $P_n$ ) i masy ziarna w warunkach stresu suszy glebowej. Dodatkowo, Guo i wsp., (2016) [11] zasugerowali, że odpowiednio zaprojektowany protokół przesiewowy w oparciu o zawartość wosku w liściach flagowych byłyby w stanie odzwierciedlić wpływ stresu suszy na plon ziarna pszenicy i wskazywać bardziej lub mniej odporne na suszę jej odmiany. Z kolei badania Su i wsp. (2020) [51] dotyczące linii bliskoizogenicznych pszenicy dowiodły, że linie sinoszare odporne na suszę utrzymywały wzrost i fotosyntezę podczas trwania stresu suszy przez zwiększenie zawartości  $\beta$ -diketonów i całkowitej ilości wosku oraz utrzymanie przewodnictwa mezofilu i aparatów szparkowych, natomiast u odpornych na suszę linii o transparentnym nalocie woskowym nastąpiło to przez zmiany w proporcji alkanów, zmniejszenie przewodnictwa mezofilu i zwiększenie zamknięcia aparatów szparkowych [24,52] Su i wsp. (2020) [51] wykazali, że cecha sinoszarej pokrywy woskowej u pszenicy nie zawsze wskazywała odporność na stres suszy. Su i wsp. (2020) [51] przeanalizowali również korelację między składnikami po-

Tabela 1. Geny zaangażowane w biosyntezę i transport wosków kutykularnych u zbóż, dla których wykazano powiązanie z odpornością na stres suszy.

Gen	Gatunek	Funkcja	Pozycja literatury
<i>TaCER1-1A</i>	Pszenica zwyczajna ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	Biosynteza i transport wosków kutykularnych/ Dekarbonylaza aldehydowa	Li i wsp., 2019 [59]
<i>OsGL1-1</i>	Ryż siewny ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Biosynteza i transport wosków kutykularnych /Dekarbonylaza aldehydowa	Qin i wsp., 2011 [40]
<i>OsGL1-2</i>	Ryż siewny ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Biosynteza i transport wosków kutykularnych/ Hydroksylaza kwasów tłuszczowych	Islam i wsp., 2009[55]
<i>OsGL1-3</i>	Ryż siewny ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Biosynteza i transport wosków kutykularnych/ Dekarbonylaza aldehydowa	Zhou i wsp., 2015 [57]
<i>OsGL1-6</i>	Ryż siewny ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Biosynteza i transport wosków kutykularnych /Dekarbonylaza aldehydowa	Zhou i wsp., 2013 [56]
<i>gl6</i>	Kukurydza zwyczajna ( <i>Zea mays</i> L.)	Wewnątrzkomórkowy transport i akumulacja wosków kutykularnych /Białko transportowe	Li i wsp., 2019 [61]
<i>OsABCG9</i>	Ryż siewny ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Biosynteza i transport wosków kutykularnych /Białko transportowe wiążące ATP	Nguyen i wsp., 2018 [62]
<i>DWA1</i>	Ryż siewny ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Biosynteza i transport wosków kutykularnych/ Kompleks wieloenzymatyczny	Zhu i Xiong, 2013 [63]
<i>LOC_Os05g48260/WSD1</i>	Ryż siewny ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Syntaza estrów woskowych/ Diacyloglicerolowa O-acyltransferaza	Choi i wsp., 2022 [64]
<i>TaSHN1</i>	Pszenica zwyczajna ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	Czynnik transkrypcyjny z rodziny AP2/ERF	Bi i wsp., 2018 [58]
<i>HvSHN1</i>	Jęczmień zwyczajny ( <i>Hordeum vulgare</i> L.)	Czynnik transkrypcyjny z rodziny AP2/ERF	Djemał i wsp., 2018 [67], Djemał i Khoudi, 2021 [68]
<i>OsWR1</i>	Ryż siewny ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Czynnik transkrypcyjny z rodziny AP2/ERF	Wang i wsp., 2012 [9]
<i>OsWR2</i>	Ryż siewny ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Czynnik transkrypcyjny z rodziny AP2/ERF	Zhou i wsp., 2014 [10]
<i>ZmFDL1/MYB94</i>	Kukurydza zwyczajna ( <i>Zea mays</i> L.)	Czynnik transkrypcyjny z rodziny MYB	Castorina i wsp., 2022 [69]
<i>DHS</i>	Ryż siewny ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Czynnik transkrypcyjny/Ligaza E3 typu RING	Wang i wsp., 2018 [70]

krywy woskowej a cechami fizjologicznymi. Analiza ta wykazała, że stosunek zawartości  $\beta$ -diketonów w wosku był pozytywnie związany z międzykomórkowym stężeniem CO<sub>2</sub>. Badania dotyczące okrywy woskowej i stresu suszy u żyta, również nie wskazują na jednostronną przewagę roślin o sinoszarym lub transparentnym fenotypie pokrywy woskowej w warunkach niedoboru wody [24,52]. Porównanie reakcji na suszę u trzech różnych par linii bliskoizogenicznych żyta wskazało, że odporność na suszę jest specyficzna dla danej linii i genotypu i może być związana ze ścieżkami biosyntezy wosku zaangażowanymi w reakcje fizjologiczne i biochemiczne ważne dla zwiększenia odporności na suszę [52]. We własnych badaniach wykazaliśmy [24] korelację między składnikami wosku epikutykularnego (zawartość estrów i kwasów tłuszczowych) liścia flagowego żyta a jego parametrami fizjologicznymi (parametry fluorescencji chlorofilu *a*) i biochemicznymi (zawartość pigmentów fotosyntetycznych i drobnocząsteczkowych przeciwutleniaczy takich jak tokoferole). Również nasze badania dotyczące linii bliskoizogenicznych żyta [52] potwierdziły zróżnicowane reakcje linii o odmiennym typie warstwy woskowej, wskazując na fakt stabilnej liczby ziaren i masy tysiąca ziaren obserwowanych w warunkach suszy glebowej u linii o transparentnej pokrywie woskowej. Badania te [52] zwróciły także uwagę na reakcje biochemiczne obserwowane u tej linii, takie jak około 60% wzrost MDA, czy

około dwukrotny wzrost ilości wosku, które były wyraźnie wyższe w porównaniu do jej sinoszarego odpowiednika i innych linii z pozostałych badanych par. Biorąc pod uwagę istotne różnice między badanymi liniami o odmiennym typie powłoki woskowej pod względem parametrów fizjologicznych i biochemicznych, powyższe wyniki potwierdziły interakcję między genotypem, typem warstwy woskowej oraz czynnikami środowiskowymi. Powyższe badania sugerują istnienie związku między biosyntezą wosku a reakcją roślin na stres suszy. Ponadto, dokładne badania w zakresie fizjologicznych, biochemicznych i agronomicznych reakcji na suszę i ich związek ze strukturą i składem chemicznym wosku kutykularnego będą istotnym uzupełnieniem badań molekularnych [15].

## ZWIĄZEK MIĘDZY WOSKAMI EPIKUTYKULARNYMI A ODPORNOŚCIĄ NA SUSZĘ U ZBÓŻ

### BADANIA MOLEKULARNE U MUTANTÓW WYKAZUJĄCYCH ZABURZENIA W FORMOWANIU WŁAŚCIWEJ POKRYWY WOSKOWEJ

Związek między morfologią struktury, zawartością i składem chemicznym wosku kutykularnego a odpornością na stres suszy jest tematem wielu badań i opracowań naukowych, a jego zrozumienie jest coraz większe, jednak na-

dal wymaga dogłębnych badań. Dotychczas metodami genetyki molekularnej zidentyfikowano wiele genów zaangażowanych w biosyntezę wosku kutykularnego lub jej regulację u roślin i wykazano ich ściśle powiązanie ze stresem suszy [12,15,54]. Indukcja biosyntezy wosku kutykularnego, w tym aktywacja genów biosyntezy przez stres suszy została zaobserwowana w szerokim zakresie gatunków roślin, a z pośród roślin zbożowych przede wszystkim skupiano się na takich gatunkach jak: ryż siewny (*Oryza sativa* L.), pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum* L.), jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.), sorgo zwyczajne (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) oraz kukurydza zwyczajna (*Zea mays* L.) [29,30,55–61] (Tabela 1). Według danych literaturowych [12,15] geny kodujące enzym dekarbonylazę aldehydową (kodowaną przez gen *CER1*), białko transportowe wiążące ATP (ang. *ATP-binding cassette transporter*, ABCG9), kompleks wieloenzymatyczny genu *DWA1* (ang. *Drought-Induced Wax Accumulation 1*, *DWA1*), czy gen *WSD1* (ang. *Wax Ester Synthase/Acyl-Coenzyme A:Diacylglycerol Acyltransferase*, *WSD1*) należą do grupy genów kontrolujących syntezę wosku i kodują enzymy związane z syntezą wosku kutykularnego lub białka zaangażowane w transport związków woskowych [12,15]. Zbadano, że stres suszy aktywował ekspresję *TaCER1-1A* u pszenicy zwiększając znacząco biosyntezę długołańcuchowych alkanów [59]. Substytucyjna linia nullisomiczno-tetrasomiczna pszenicy, pozbawiona genu *TaCER1-1A*, miała znacząco obniżoną ilość alkanów  $C_{33}$ , podczas gdy rośliny ryżu z nadekspresją *TaCER1-1A* wykazywały znaczny wzrost ilości alkanów  $C_{25}$ - $C_{33}$  w stosunku do kontrolnych roślin typu dzikiego [59]. Li i wsp. (2019) [59] stwierdzili, że gen *TaCER1-1A* odgrywa ważną rolę w biosyntezie alkanów wosku u pszenicy i bierze udział w reakcji na suszę i inne stresy środowiskowe. Wiele doniesień literaturowych [12,15,57] skupiało się na badaniu genów *GL1* u ryżu, będących homologami genu *CER1* wykazując jego powiązanie z odpornością na suszę [57]. U ryżu nadekspresja genu *OsGL1-1* i *OsGL1-2* wiązała się ze wzrostem grubości warstwy wosku epikutylarnego i jego silniejszą krystalizacją, podczas gdy u mutantów *osgl1-1* i *osgl1-2* o obniżonej masie wosku kutykularnego stwierdzono większą wrażliwość na suszę w porównaniu z roślinami wykazującymi nadekspresję *OsGL1-1* i *OsGL1-2* oraz roślinami typu dzikiego [40, 55]. Mutant *knockdown osgl1-3* charakteryzował się zmniejszoną krystalizacją i masą wosku kutykularnego na powierzchni liści, a nadekspresja *OsGL1-3* skutkowała zwiększeniem krystalizacji wosku kutykularnego na powierzchni liści i znaczny wzrost jego akumulacji [57]. Według Zhou i wsp. (2015) [57] do powyższych obserwacji u roślin wykazujących nadekspresję *OsGL1-3* przyczyniła się bardzo wyraźna zmiana zawartości aldehydów  $C_{30}$ - $C_{32}$  i alkoholi pierwszorzędowych  $C_{30}$ . U roślin tych odnotowano zmniejszenie szybkości utraty wody i zwiększenie odporności na deficyt wody na różnych etapach rozwojowych, co sugeruje istotną rolę *OsGL1-3* w odporności na suszę u ryżu. Natomiast utrata funkcji genu *OsGL1-6* u mutantu ryżu *osgl1-6* spowodowała znaczne obniżenie biosyntezy alkanów w wosku kutykularnym i nadwrażliwość na suszę [56]. Z kolei Li i wsp. (2019) [61] w badaniach nad genem *gl6* u kukurydzy wykazali, że białko *GL6* może być zaangażowane w wewnątrzkomórkowy transport wosków kutykularnych. Badacze zaobserwowali, że mutant *gl6* o

zmniejszonej akumulacji wosku epikutylarnego, w stosunku do typu dzikiego, wykazywał zwiększoną przepuszczalność kutykuli, a w efekcie osłabioną odporność siewek kukurydzy na suszę [61]. Nguyen i wsp. (2018) [62] stwierdzili, że białko transportowe *OsABCG9* przyczynia się do prawidłowego rozwoju roślin ryżu w fazie wegetatywnej oraz spełnia kluczową funkcję podczas transportu wosku epikutylarnego oraz pełni ważną rolę w utrzymaniu stabilności warstwy woskowej u ryżu. Autorzy Ci wykazali, że mutant *osabcg9-1*, o obniżonej krystalizacji i masie wosku oraz zawartości aldehydów  $C_{30}$  i  $C_{32}$ , a także kwasów tłuszczowych w szeregu homologicznym  $C_{26}$ - $C_{32}$ , charakteryzował się zwiększoną wrażliwością na suszę w porównaniu do roślin typu dzikiego [62]. Innym przykładem genu zaangażowanego w biosyntezę wosku, który ma związek z odpornością roślin na suszę jest gen ryżu *DWA1* kodujący białko zawierające wiele struktur enzymatycznych i wykazujące preferencyjną ekspresję w tkankach naczyniowych i warstwach epidermalnych [63]. Gen *DWA1* podlegał silnej indukcji w wyniku stres suszy, a doniesienia literaturowe sugerują, że może on kontrolować odporność na suszę u ryżu poprzez regulację wywołanego suszą odkładania się wosku epikutylarnego [63]. Mutant *knockout dwa1* odznaczał się znacznie większą wrażliwością na stres suszy w porównaniu z roślinami typu dzikiego, w warunkach suszy charakteryzował się zmniejszoną akumulacją wosku kutykularnego oraz silnie zmodyfikowanym składem chemicznym głównie w wyniku obniżenia poziomu długołańcuchowych kwasów tłuszczowych [63]. Wyselekcjonowany podczas badań przesiewowych w kierunku odporności na suszę niewrażliwy na suszę mutant ryżu (*ditl1*), posiadający mutację w genie *LOC\_Os05g48260* będącym przypuszczalnie ortologiem genu *WSD1* u rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis*), w warunkach stresu suszy wykazywał znacząco zmniejszoną utratę wody, przepuszczalność kutykuli, zwijanie się liści, akumulację  $H_2O_2$  oraz akumulował więcej wosku kutykularnego, alkanów i alkoholi niż rośliny typu dzikiego [64]. Na podstawie badań dotyczących odporności na suszę u sorga dwubarwnego [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] stwierdzono, że genotypy odporne na nią wykazywały przyrost alkanów, które stanowiły skuteczną barierę, pozwalającą na kontrolowanie strat wody, a geny *SbWINL1*, *FATB* i *CER1* odgrywają ważną rolę w wywoływaniu biosyntezy wosku będącej efektem suszy [65]. Jedną ze strategii stosowanych w badaniach nad poprawą odporności na stresy abiotyczne u roślin jest nadekspresja czynników transkrypcyjnych [66]. W badaniach nad rolą wosku kutykularnego w odporności na suszę u zbóż analizowano także rolę czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w biosyntezę wosku [12,15]. Wiadomo, że przedstawiciele typu *SHN1* z rodziny czynników transkrypcyjnych *AP2/ERF* odgrywają kluczową rolę w odporności roślin na stresy abiotyczne i coraz większa ich liczba jest identyfikowana i charakteryzowana u różnych gatunków [12]. Wykazano, że nadekspresja m. in. genów *SHN1* (*TaSHN1* i *HvSHN1*) oraz *MYB94* (*ZmFDL1/MYB94*) będących czynnikami transkrypcyjnymi biosyntezy wosku, powodowała zwiększoną akumulację wosku kutykularnego lub kutyny, co przyczyniało się do zwiększonej odporności na stres suszy [12]. Bi i wsp. (2018) [58] zaobserwowali u pszenicy, że nadekspresja czynnika transkrypcyjnego *TaSHN1* spowodowała zwiększoną odporność na suszę u ro-

ślin transgenicznych, na co mogła mieć wpływ zwiększona akumulacja alkanów w wosku liści flagowych i obniżona gęstość aparatów szparkowych. Te zmiany prawdopodobnie przyczyniły się do zmniejszenia odwodnienia liści i lepszych wskaźników przeżywalności transgenicznych sadzonek pszenicy w trudnych warunkach suszy [58]. Bi i wsp. (2018) [58] poprzez molekularną charakterystykę TaSHN1 wykazali, że działa on jako aktywator transkrypcji i jest homologiczny do OsWR1 z ryżu. Czynniki transkrypcyjny typu SHN1, HvSHN1 badano również u roślin jęczmienia i stwierdzono, że był silnie indukowany przez różne stresy abiotyczne, w tym suszę, co wskazuje na jego możliwe zaangażowanie w tolerancję na stresy abiotyczne [67]. Ponadto nadekspresja *HvSHN1* w transgenicznych roślinach tytoniu była związana z ich zwiększoną odpornością na suszę w porównaniu do roślin typu dzikiego [68]. Z kolei w badaniach Castorina i wsp. (2020) [69] utrata funkcji czynnika transkrypcyjnego ZmFDL1/MYB94 u mutantu kukurydzy *fall1-1* w stadium siewek doprowadziła do zmniejszenia biosyntezy zarówno wosku kutykularnego jak i kutyny, redukcji poziomu długocząsteczkowych pierwszorzędowych alkoholi (stanowią główne składniki wosków siewek kukurydzy) i estrów woskowych, oraz spowodowała nadwrażliwość na wysychanie. Stwierdzili oni, że czynnik ten jest kluczowym regulatorem odkładania się kutykuli i pośredniczy w aktywnej odpowiedzi na warunki niedoboru wody, aczkolwiek prawdopodobnie jego aktywność zależy od fazy rozwoju [69]. Gen *OsWR1*, homolog *SHN1*, okazał się być pozytywnym regulatorem genów związanych z biosyntezą wosku u ryżu poprzez zmiany jakościowe i ilościowe długocząsteczkowych kwasów tłuszczowych i alkanów, a jego nadekspresja u roślin transgenicznych przyczyniła się do zmniejszonej utraty wody, zmniejszonej przepuszczalności kutykuli i zwiększonej odporności na suszę w porównaniu do typu dzikiego [9]. Ponadto, *OsWR1* aktywował ekspresję genów związanych z odpowiedzią na stres oksydacyjny i stabilnością błony komórkowej [9]. Homolog genu *OsWR1*, gen *OsWR2*, który również przyczynia się do transkrypcyjnej regulacji biosyntezy wosku kutykularnego i kutyny, głównie kontroluje przepuszczalność epidermy [10]. W badaniach Zhou i wsp. (2014) [10] nadekspresja *OsWR2* powodowała wzrost masy wosku kutykularnego oraz zawartości związków z grupy aldehydów. Liście charakteryzowały się obniżoną szybkością utraty wody i zwiększoną odpornością na suszę [10]. Autorzy Ci stwierdzili, że *OsWR2* działa jako transkrypcyjny regulator zarówno wosku kutykularnego, jak i biosyntetycznych ścieżek kutyny, a jego mechanizm(-y) wyraźnie różni się od jego homologów *Arabidopsis* WIN1/SHN1 i *OsWR1* [10]. Z kolei w doświadczeniach Wang i wsp. (2018) [70] stwierdzono, że nadekspresja *DHS* kodującego czynnika transkrypcyjny u ryżu hamowała akumulację wosku kutykularnego i obniżała odporność na suszę u roślin transgenicznych. W Tabeli 1 przedstawiono omówione w niniejszej pracy geny zaangażowane w biosyntezę i transport wosków kutykularnych u zbóż.

#### DALSZE PERSPEKTYWY W BADANIACH NAD BIOSYNTEZĄ WOSKU U ZBÓŻ

Niewiele wiadomo na temat molekularnych podstaw biosyntezy wosku u pozostałych zbóż takich jak: żyto, pro-

so, pszenżyto czy owies oraz związku genów biosyntezy wosku z odpornością na suszę. W przypadku żyta, wykazano, że gen *wal1* jest związany z kutikulą charakteryzującą się brakiem wosku i został on zmapowany do chromosomu 7R [71]. W kolejnych latach dalszy postęp w identyfikacji genów zaangażowanych w biosyntezę kutikuli u żyta osiągnięto przez zmapowanie *locus wax* (gen *WAX1*) w środkowej części chromosomu 2R, co było pierwszym doniesieniem o tej lokalizacji [72]. Marker DArT-Silico 3585843, ściśle powiązany z segregacją nalotu woskowego, został wskazany jako jeden z kandydatów kontrolujących formację wosku epikutylarnego [72]. Złożenie genomu żyta „Lo7” [73] pozwoli na dalsze kroki w kierunku identyfikacji genu *WAX1* i poprawę zrozumienia biosyntezy kutikuli na poziomie molekularnym [74]. Varshney i wsp. (2017) [75] przedstawili sekwencję genomową genotypu referencyjnego Tift 23D2B1-P1-P5 prosa perłowego [*Cenchrus americanus* (L.) Morrone], w której pokazano poszerzoną o nowe pozycje grupę genów biosyntezy wosku oraz genów odpowiedzialnych za syntezę lipidów i eksport makrocząsteczek prosa perłowego. Według autorów opracowanie to może stanowić zasób do poprawy cech agronomicznych prosa w środowiskach suchych. W literaturze brakuje również bardziej złożonych badań dotyczących związku wosku epikutylarnego z adaptacją owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.) do warunków deficytu wodnego [76,77].

Temat roli wosków kutykularnych w adaptacji roślin do stresów środowiskowych jest coraz częściej omawiany u różnych roślin [12, 15], jednak szereg badań do tej pory przeprowadzono przede wszystkim na roślinie modelowej jaką jest rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis*) [32]. Wosk kutykularny może w sposób bezpośredni pełnić funkcję ochronną przed skutkami stresu suszy u roślin zbożowych przez ograniczenie utraty wody i transpiracji kutykularnej, ale jak dowodzą powyżej omówione badania również geny i czynniki transkrypcyjne biosyntezy wosku (Tabela 1) mogą mieć związek z reakcjami fizjologicznymi i biochemicznymi roślin zbożowych na stres wodny. Fakt silnej zależności między profilem woskowym nadziemnych organów roślinnych a fazą rozwojową rośliny oraz istotnego wpływu czynników abiotycznych stwarza duże pole do popisu w kontekście planowanych kolejnych badań, szczególnie w przypadku roślin zbożowych odznaczających się długim okresem wegetacyjnym. Ważne jest także zbadanie nalotu woskowego i jego związku z suszą w przypadku innych niż liść flagowy organów roślinnych takich jak kłos czy łodyga. W obecnych czasach, gdy rolnictwo mierzy się z bardzo skrajnymi przykładami skutków ocieplenia klimatycznego, szczególnie istotną i wartą podejmowania tematyką badawczą staje się rola wosku w adaptacji do stresu suszy na różnych etapach rozwoju rośliny.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Cook BI, Mankin JS, Marvel K, Williams AP, Smerdon JE, Anchukaitis KJ (2020) Twenty-First Century Drought Projections in the CMIP6 Forcing Scenarios. *Earth's Future* 8: 1-20
2. van Ginkel M, Biradar C (2021) Drought early warning in agri-food systems. *Climate* 9: 134
3. Lesk C, Rowhani P, Ramankutty N (2016) Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature* 529: 84-87
4. Blum A (1988) Plant breeding and yield stability, W: Plant breeding for stress environments. CRC Press, Boca Raton, str. 15-42

5. Passioura JB (2012) Phenotyping for drought tolerance in grain crops: when is it useful to breeders? *Funct Plant Biol* 39: 851-859
6. Langridge P, Reynolds MP (2015) Genomic tools to assist breeding for drought tolerance. *Curr Opin Biotechnol* 32: 130-135
7. Lewandowska M, Keyl A, Feussner I (2020) Wax biosynthesis in response to danger: its regulation upon abiotic and biotic stress. *New Phytol* 227: 698-713
8. Sheperd T, Griffiths DW (2006) The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytol* 171: 469-499
9. Wang Y, Wan L, Zhang L, Zhang Z, Zhang H, Quan R, Zhou S, Huang R (2012) An ethylene response factor OsWR1 responsive to drought stress transcriptionally activates wax synthesis related genes and increases wax production in rice. *Plant Mol Biol* 78: 275-288
10. Zhou X, Jenks MA, Liu J, Liu A, Zhang X, Xiang J, Zou J, Peng Y, Chen X (2014) Overexpression of Transcription Factor OsWR2 Regulates Wax and Cutin Biosynthesis in Rice and Enhances its Tolerance to Water Deficit. *Plant Mol Biol Report* 32: 719-731
11. Guo J, Xu W, Yu X, Shen H, Li H, Cheng D, Liu A, Liu J, Liu C, Zhao S, Song J (2016) Cuticular Wax Accumulation Is Associated with Drought Tolerance in Wheat Near-Isogenic Lines. *Front Plant Sci* 7: 1809
12. Liu L, Wang X, Chang C (2022) Toward a smart skin: Harnessing cuticle biosynthesis for crop adaptation to drought, salinity, temperature, and ultraviolet stress. *Front Plant Sci* 13: 961829
13. Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D, Ditsch F, Meusel I, Theisen I, Hiltrud W (1998) Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Bot J Linn Soc* 126: 237-260
14. Barthlott W, Mail M, Bhushan B, Koch K (2017) Plant surfaces: Structures and functions for biomimetic innovations. *Nano-Micro Lett* 9: 1-40
15. Xue D, Zhang X, Lu X, Chen G, Chen Z-H (2017) Molecular and Evolutionary Mechanisms of Cuticular Wax for Plant Drought Tolerance. *Front Plant Sci* 8: 621
16. 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 Physiol* 184: 1998-2010
17. Suh MC, Uk Kim H, Nakamura Y (2022) Plant lipids: trends and beyond. *J Exp Bot* 73: 2715-2720
18. von Wettstein-Knowles P (2016) *Plant Waxes*, W: eLS. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, str. 1-13
19. Buschhaus C, Jetter R (2011) Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: How do plants seal their epidermal surfaces? *J Exp Bot* 62: 841-853
20. Reynoud N, Petit J, Bres C, Lahaye M, Rothan C, Marion D, Bakan B (2021) The Complex Architecture of Plant Cuticles and Its Relation to Multiple Biological Functions. *Front Plant Sci* 12: 782773
21. Tomaszewski D, Zieliński J (2014) Epicuticular wax structures on stems and comparison between stems and leaves – A survey. *Flora Morphol Distrib Funct Ecol Plants* 209: 215-232
22. Ensikat HJ, Boese M, Mader W, Barthlott W, Koch K (2006) Crystallinity of plant epicuticular waxes: Electron and X-ray diffraction studies. *Chem Phys Lipids* 144: 45-59
23. Koch K, Dommissa A, Niemietz A, Barthlott W, Wandelt K (2009) Nanostructure of epicuticular plant waxes: Self-assembly of wax tubules. *Surf Sci* 603: 1961-1968
24. Laskoś K, Czaczyło-Mysza IM, Dziurka M, Noga A, Góralaska M, Bartyzel J, Myśków B (2021) Correlation between leaf epicuticular wax composition and structure, physio-biochemical traits and drought resistance in glaucous and non-glaucous near-isogenic lines of rye. *Plant J* 108: 93-119
25. Wang Y, Wang J, Chai G, Li C, Hu Y, Chen X, Wang Z (2015) Developmental changes in composition and morphology of cuticular waxes on leaves and spikes of glossy and glaucous wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS One* 10: e0141239
26. Lavergne F, Broeckling C, Cockrell D, Haley S, Peairs F, Jahn C, Heuberger A (2018) GC-MS Metabolomics to Evaluate the Composition of Plant Cuticular Waxes for Four *Triticum aestivum* Cultivars. *Int J Mol Sci* 19: 249
27. Guo Y, Busta L, Jetter R (2017) Cuticular wax coverage and composition differ among organs of *Taraxacum officinale*. *Plant Physiol Biochem* 115: 372-379
28. Sun Y, Yao R, Ji X, Wu H, Luna A, Wang Z, Jetter R (2020) Characterization of an alkylresorcinol synthase that forms phenolics accumulating in the cuticular wax on various organs of rye (*Secale cereale*). *Plant J* 102: 1294-1312
29. Busta L, Schmitz E, Kosma DK, Schnable JC, Cahoon EB (2021) A co-opted steroid synthesis gene, maintained in sorghum but not maize, is associated with a divergence in leaf wax chemistry. *Proc Natl Acad Sci* 118: e2022982118
30. Lee SB, Suh MC (2015) Advances in the understanding of cuticular waxes in *Arabidopsis thaliana* and crop species. *Plant Cell Rep* 34: 557-572
31. Tulloch AP (1973) Composition of leaf surface waxes of *Triticum* species: Variation with age and tissue. *Phytochemistry* 12: 2225-2232
32. Lee SB, Suh MC (2015) Cuticular wax biosynthesis is up-regulated by the MYB94 transcription factor in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 56: 48-60
33. Dhanyalakshmi KH, Soolanayakanahally RY, Rahman T, Tanino KK, Nataraja KN (2019) Leaf Cuticular Wax, a Trait for Multiple Stress Resistance in Crop Plants, W: de Oliveira AB (red) *Abiotic Biot Stress Plants*. IntechOpen, str. 1-29
34. Bi H, Luang S, Li Y, Bazanova N, Morran S, Song Z, Perera MA, Hrmova M, Borisjuk N, Lopato S (2016) Identification and characterization of wheat drought-responsive MYB transcription factors involved in the regulation of cuticle biosynthesis. *J Exp Bot* 67: 5363-5380
35. Johnson DA, Richards RA, Turner NC (1983) Yield, Water Relations, Gas Exchange, and Surface Reflectances of Near-Isogenic Wheat Lines Differing in Glaucousness. *Crop Sci* 23: 318-325
36. Cervantes DE, Eigenbrode SD, Ding HJ, Bosque-Pérez NA (2002) Oviposition responses by Hessian fly, *Mayetiola destructor*, to wheats varying in surface waxes. *J Chem Ecol* 28: 193-210
37. Gorb E (2005) Composite structure of the crystalline epicuticular wax layer of the slippery zone in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* and its effect on insect attachment. *J Exp Biol* 208: 4651-4662
38. Zhang Z, Wei W, Zhu H, Challa GS, Bi C, Trick HN, Li W (2015) *W3* Is a new wax locus that is essential for biosynthesis of  $\beta$ -diketone, development of glaucousness, and reduction of cuticle permeability in common wheat. *PLoS One* 10: e0140524
39. Jenks MA, Ashworth EN (2010) *Plant Epicuticular Waxes: Function, Production, and Genetics*, W: Janick J (red) *Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., Oxford str. 1-68
40. Qin B-X, Tang D, Huang J, Li M, Wu X-R, Lu L-L, Wang K-J, Yu H-X, Chen J-M, Gu M-H, Cheng Z-K (2011) Rice *OsGLI-1* is involved in leaf cuticular wax and cuticle membrane. *Mol Plant* 6: 985-995
41. Sajeevan RS, Parvathi MS, Nataraja KN (2017) Leaf wax trait in crops for drought and biotic stress tolerance: regulators of epicuticular wax synthesis and role of small RNAs. *Indian J Plant Physiol* 22: 434-447
42. Seo PJ, Lee SB, Suh MC, Park M-J, Go YS, Park C-M (2011) The MYB96 Transcription Factor Regulates Cuticular Wax Biosynthesis under Drought Conditions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 1138-1152
43. Karabourniotis G, Liakopoulos G, Bresta P, Nikolopoulos D (2021) The Optical Properties of Leaf Structural Elements and Their Contribution to Photosynthetic Performance and Photoprotection. *Plants* 10:1445
44. Serrano M, Coluccia F, Torres M, L'Haridon F, Métraux J-P (2014) The cuticle and plant defense to pathogens. *Front Plant Sci* 5: 274
45. Wang W, Liu X, Gai X, Ren J, Liu X, Cai Y, Wang Q, Ren H (2015) *Cucumis sativus* L. *WAX2* plays a pivotal role in wax biosynthesis, influencing pollen fertility and plant biotic and abiotic stress responses. *Plant Cell Physiol* 56: 1339-1354
46. Gorb E V, Gorb SN (2017) Anti-adhesive effects of plant wax coverage on insect attachment. *J Exp Bot* 68: 5323-5337
47. Gorb E V, Hofmann P, Filippov AE, Gorb SN (2017) Oil adsorption ability of three-dimensional epicuticular wax coverages in plants. *Sci Rep* 7:4548348. Yao C, Myung K, Wang N, Johnson A (2014) Spray

- retention of crop protection agrochemicals on the plant surface. ACS Symp Ser 1171: 1-22
49. Nakaba S, Yamane K, Fukahori M, Nugroho WD, Yamaguchi M, Kuroda K, Sano Y, Wuled Lenggoro I, Izuta T, Funada R (2016) Effect of epicuticular wax crystals on the localization of artificially deposited sub-micron carbon-based aerosols on needles of *Cryptomeria japonica*. J Plant Res 129: 873-881
  50. Burkhardt J, Pariyar S (2014) Particulate pollutants are capable to “degrade” epicuticular waxes and to decrease the drought tolerance of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). Environ Pollut 184: 659-667
  51. Su R, Chen L, Wang Z, Hu Y (2020) Differential response of cuticular wax and photosynthetic capacity by glaucous and non-glaucous wheat cultivars under mild and severe droughts. Plant Physiol Biochem 147: 303-312
  52. Laskoś K, Myśków B, Dziurka M, Warchoń M, Dziurka K, Juzoń K, Czyżyło-Mysza IM (2022) Variation between glaucous and non-glaucous near-isogenic lines of rye (*Secale cereale* L.) under drought stress. Sci Rep 12: 22486
  53. Muehlbauer GJ, Specht JE, Thomas-Compton MA, Staswick PE, Bernard RL (1988) Near-Isogenic Lines – A Potential Resource in the Integration of Conventional and Molecular Marker Linkage Maps. Crop Sci 28: 729-735
  54. Lee SB, Suh MC (2015) Advances in the understanding of cuticular waxes in *Arabidopsis thaliana* and crop species. Plant Cell Rep 34: 557-572
  55. Islam MA, Du H, Ning J, Ye H, Xiong L (2009) Characterization of *Glossy1*-homologous genes in rice involved in leaf wax accumulation and drought resistance. Plant Mol Biol 70: 443-456
  56. Zhou L, Ni E, Yang J, Zhou H, Liang H, Li J, Jiang D, Wang Z, Liu Z, Zhuang C (2013) Rice *OsGL1-6* Is Involved in Leaf Cuticular Wax Accumulation and Drought Resistance. PLoS One 8: e65139
  57. Zhou X, Li L, Xiang J, Gao G, Xu F, Liu A, Zhang X, Peng Y, Chen X, Wan X (2015) *OsGL1-3* is involved in cuticular wax biosynthesis and tolerance to water deficit in rice. PLoS One 10: e116676
  58. Bi H, Shi J, Kovalchuk N, Luang S, Bazanova N, Chirkova L, Zhang D, Shavrukov Y, Stepanenko A, Tricker P, Langridge P, Hrmova M, Lopato S, Borisjuk N (2018) Overexpression of the *TaSHN1* transcription factor in bread wheat leads to leaf surface modifications, improved drought tolerance, and no yield penalty under controlled growth conditions. Plant Cell Environ 41: 2549-2566
  59. Li T, Sun Y, Liu T, Wu H, An P, Shui Z, Wang J, Zhu Y, Li C, Wang Y, Jetter R, Wang Z (2019) *TaCER1-1A* is involved in cuticular wax alkane biosynthesis in hexaploid wheat and responds to plant abiotic stresses. Plant Cell Environ 42: 3077-3091
  60. Li C, Haslam TM, Krüger A, Schneider LM, Mishina K, Samuels L, Yang H, Kunst L, Schaffrath U, Nawrath C, Chen G, Komatsuda T, von Wettstein-Knowles P (2018) The  $\beta$ -Ketoacyl-CoA Synthase *HvKCS1*, Encoded by *Cer-zh*, Plays a Key Role in Synthesis of Barley Leaf Wax and Germination of Barley Powdery Mildew. Plant Cell Physiol 59: 806-822
  61. Li L, Du Y, He C, Dietrich CR, Li J, Ma X, Wang R, Liu Q, Liu S, Wang G, Schnable PS, Zheng J (2019) Maize *glossy6* is involved in cuticular wax deposition and drought tolerance. J Exp Bot 70: 3089-3099
  62. Nguyen VNT, Lee SB, Suh MC, An G, Jung KH (2018) *OsABCG9* is an important ABC transporter of cuticular wax deposition in rice. Front Plant Sci 9: 960
  63. Zhu X, Xiong L (2013) Putative megaenzyme DWA1 plays essential roles in drought resistance by regulating stress-induced wax deposition in rice. Proc Natl Acad Sci 110: 17790-17795
  64. Choi SY, Lee YJ, Seo HU, Kim JH, Jang CS (2022) Physio-biochemical and molecular characterization of a rice drought-insensitive TILLING line 1 (*dill1*) mutant. Physiol Plant 174: e13718
  65. Sanjari S, Shobbar ZS, Ghanati F, Afshari-Behbahanzadeh S, Farajpour M, Jokar M, Khazaei A, Shahbazi M (2021) Molecular, chemical, and physiological analyses of sorghum leaf wax under post-flowering drought stress. Plant Physiol Biochem 159: 383-391
  66. Agarwal PK, Jha B (2010) Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. Biol Plant 54: 201-212
  67. Djemal R, Mila I, Bouzayen M, Pirrello J, Khoudi H (2018) Molecular cloning and characterization of novel WIN1/SHN1 ethylene responsive transcription factor *HvSHN1* in barley (*Hordeum vulgare* L.). J Plant Physiol 228: 39-46
  68. Djemal R, Khoudi H (2021) The barley SHN1-type transcription factor *HvSHN1* imparts heat, drought and salt tolerances in transgenic tobacco. Plant Physiol Biochem 164: 44-53
  69. Castorina G, Domergue F, Chiara M, Zilio M, Persico M, Ricciardi V, Horner DS, Consonni G (2020) Drought-Responsive *ZmFDDL1/MYB94* regulates cuticle biosynthesis and cuticle-dependent leaf permeability. Plant Physiol 184: 266-282
  70. Wang Z, Tian X, Zhao Q, Liu Z, Li X, Ren Y, Tang J, Fang J, Xu Q, Bua Q (2018) The E3 ligase drought hypersensitive negatively regulates cuticular wax biosynthesis by promoting the degradation of transcription factor ROC4 in rice. Plant Cell 30: 228-244
  71. Korzun V, Malyshev S, Voylokov A, Börner A (1997) RFLP-based mapping of three mutant loci in rye (*Secale cereale* L.) and their relation to homoeologous loci within the *Gramineae*. Theor Appl Genet 95: 468-473
  72. Góralaska M, Bińkowski J, Lenarczyk N, Bienias A, Grądzielewska A, Czyżyło-Mysza I, Kapłoniak K, Stojalowski S, Myśków B (2020) How machine learning methods helped find putative rye wax genes among gbs data. Int J Mol Sci 21: 7501
  73. Rabanus-Wallace MT, Hackauf B, Mascher M, Lux T, Wicker T, Gundlach H, Baez M, Houben A, Mayer KFX, Guo L, Poland J, Pozniak CJ, Walkowiak S, Melonek J, Praz CR, Schreiber M, Budak H, Heuberger M, Steuernagel B, Wulff B, Börner A, Byrns B, Čížková J, Fowler DB, Fritz A, Himmelbach A, Kaithakottil G, Keilwagen J, Keller B, Konkin D, Larsen J, Li Q, Myśków B, Padmarasu S, Rawat N, Sesiz U, Biyikliglu-Kaya S, Sharpe A, Šimková H, Small I, Swarbreck D, Toegelová H, Tsvetkova N, Voylokov AV, Vrána J, Bauer E, Bolibok-Bragoszewska H, Doležel J, Hall A, Jia J, Korzun V, Laroche A, Ma X-F, Ordon F, Özkan H, Rakoczy-Trojanowska M, Scholz U, Schulman, Siekmann D, Stojalowski S, Tiwari VK, Spannagl M, Stein N (2021) Chromosome-scale genome assembly provides insights into rye biology, evolution and agronomic potential. Nat Genet 53: 564-573
  74. Hackauf B, Rabanus-Wallace MT, Korzun V (2021) Bridging the Genotype-Phenotype Gap for Precision Breeding in Rye. W: Rabanus-Wallace MT, Stein N (red) Rye Genome. Springer, Cham, str. 135-180
  75. Varshney RK, Shi C, Thudi M, Mariac C, Wallace J, Qi P, Zhang H, Zhao Y, Wang X, Rathore A, Srivastava RK, Chitkineni A, Fan G, Bajaj P, Punnuri S, Gupta AK, Wang H, Jiang Y, Couderc M, Katta MAVSK, Paudel DR, Mungra KD, Chen W, Harris-Shultz KR, Garg V, Desai N, Doddamani D, Kane NA, Conner JA, Ghatak A, Chaturverdi P, Subramaniam S, Yadav OP, Barthouly-Salazar C, Hamidou F, Wang J, Liang X, Clotault J, Upadhyaya HD, Cubry P, Rhone B, Gueye MC, Sunkar R, Dupuy C, Sparvoli F, Cheng S, Mahala RS, Singh B, Yadav RS, Lyons E, Datta SK, Hash CT, Devos KM, Buckler E, Bennetzen JL, Paterson AH, ozias-Akins P, Grando S, Wang J, Mohapatra T, Weckwerth W, Reif JC, Liu X, Vigouroux, Xu X (2017) Pearl millet genome sequence provides a resource to improve agronomic traits in arid environments. Nat Biotechnol 35: 969-976
  76. Bengtson C, Larsson S, Liljenberg C (1978) Effects of Water Stress on Cuticular Transpiration Rate and Amount and Composition of Epicuticular Wax in Seedlings of Six Oat Varieties. Physiol Plant 44: 319-324
  77. Svenningsson M, Liljenberg C (1986) Changes in cuticular transpiration rate and cuticular lipids of oat (*Avena sativa*) seedling induced by water stress. Physiol Plant 66: 9-14



# Leaf epicuticular wax as a determinant trait for drought resistance in cereals

mgr inż. Kamila Laskoś✉, dr hab. inż. Ilona Mieczysława Czyczyło-Mysza

The Franciszek Górski Institute of Plant Physiology Polish Academy of Sciences, Kraków

✉Corresponding author: k.laskos@ifr-pan.edu.pl

**Key words:** epicuticular wax, drought, cereals

## ABSTRACT

The wax coating is an element of the lipid protective layer, the cuticle, which covers the above-ground organs of plants and is the main barrier that prevents non-stomatal water loss. Wax layer protects plant surfaces from pathogens and ultraviolet radiation and influences interactions between plants and insects. Accumulation of cuticular wax is one of the adaptive mechanisms of plants to drought stress. As a result, there are more and more reports on the relationship between cuticular wax and plant resistance to drought. This article deals with the relationship between cuticular waxes and drought resistance in cereals. The paper presents the achievements to date on (i) the relationship between wax biosynthesis and plant response to drought stress using glaucous and non-glaucous near-isogenic lines and (ii) investigating the role of genes for cuticular wax biosynthesis and transport and the transcription factors that regulate



WOSK EPIKUTYKULARNY  
LIŚCIA FLAGOWEGO

Stres  
suszy

### Aspekty fizjologiczne i biochemiczne:

Badanie związku między biosyntezą wosku a reakcją roślin na stres suszy (badania z wykorzystaniem linii bliskoizogenicznych o sinoszarej i transparentnej pokrywie woskowej)

**Aspekty molekularne:** Badanie roli genów biosyntezy i transportu wosków kutykularnych oraz regulujących je czynników transkrypcyjnych (badanie ekspresji genów u mutantów wykazujących zaburzenia w formowaniu właściwej pokrywy woskowej)