

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Biofyzikální a biochemická meziorgánová komunikace  
v masožravé rostlině mucholapce podivné**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Martina Lušňáková</b>
Studijní program:	N0512A130009 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.</b>
Rok:	2022



## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

## **Poděkování**

Děkuji především vedoucímu mé práce doc. Mgr. Andreji Pavlovičovi, Ph.D. za vždy vstřícný přístup, odborné rady a velikou trpělivost během psaní mé diplomové práce. Dále také děkuji Mgr. Janě Jakšové (již brzy Ph.D.), že tu pro mě vždy byla, když bylo nejhůř a dále všem, kteří se jakkoliv snažili o získání RNA z mucholapky.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Martina Lušňáková
Název práce	Biofyzikální a biochemická meziorgánová komunikace v masožravé rostlině mucholapce podivné
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biofyziky
Vedoucí práce	doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

### Abstrakt

Mechanická stimulace mechanosenzitivních výběžků uvnitř pasti mucholapky podivné (*Dionaea muscipula* Ellis) vyvolává elektrické signály. Opakované mechanické podněty a tvorba akčních potenciálů vede k akumulaci fytohormonů ze skupiny jasmonátů, což způsobí expresi genů závislých na kyselině jasmonové, které hrají zásadní roli při obraně nemasožravých rostlin po napadení býložravcem. Následuje syntéza transportních proteinů a trávicích enzymů, které jsou sekretovány do uzavřené pasti mucholapky podivné. Cílem této diplomové práce je sledovat meziorgánovou komunikaci v masožravé rostlině mucholapce podivné, a to konkrétně šíření elektrických signálů a jejich vliv na akumulaci jasmonátů. Jakož i následnou expresi trávicích enzymů v různých typech pletiv (past vs. asimilační list) po poranění jehlou nebo mechanické stimulaci mechanosenzitivních výběžků. Pro tyto účely bylo provedeno povrchové měření elektrických signálů pomocí Ag/AgCl elektrod, kvantitativní analýza fytohormonů LC-MS/MS a plánována byla i qPCR pro analýzu exprese genů v jednotlivých částech masožravé rostliny mucholapky podivné. Výsledky naznačují, že se akční potenciál mezi pastí a asimilační částí listu nepřenáší a podle kvantitativní analýzy kyseliny jasmonové dochází k aktivaci její signální dráhy výhradně ve stimulované části rostliny. Jediným fytohormonem, který byl akumulován po poškození asimilační části listu i v pasti mucholapky podivné je kyselina abscisová. I přesto, že meziorgánová komunikace je k přežití nemasožravých rostlin esenciální, výsledky této diplomové práce naznačují, že pro mucholapku podivnou je meziorgánová komunikace postradatelná, i když ne zcela postradatelná.

Klíčová slova	Elektrické signály, kyselina jasmonová, meziorgánová komunikace, mucholapka podivná
Počet stran	56
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Martina Lušňáková
Title	Biophysical and biochemical interorgan communication in the carnivorous plant Venus flytrap
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biophysics
Supervisor	assoc. prof. MSc. Andrej Pavlovič, Ph.D.
The year of presentation	2022

### Abstract

The mechanical stimulation of mechanosensitive trigger hairs inside the trap of the Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis) elicits an electrical signal. If the mechanical stimulation and the creation of action potentials are repeated, it leads to the accumulation of phytohormones from the group of jasmonates, which leads to the expression of genes that play a crucial role in response to herbivory attack in non-carnivorous plants. This is followed by the synthesis of digestive enzymes and proteins for the transport of nutrients, which are secreted into the closed trap of the Venus flytrap. This diploma thesis aims to monitor the inter-organ communication in the carnivorous plant of the Venus flytrap, specifically the propagation of electrical signals and their effect on the accumulation of jasmonates. As well as the subsequent expression of digestive enzymes in various types of tissues (trap vs. assimilation leaf) after needle injury or mechanical stimulation of mechanosensitive trigger hair. For these purposes, surface measurement of electrical signals using Ag/AgCl electrodes, quantitative analysis of phytohormones by LC-MS / MS, and qPCR were planned for the analysis of gene expression in individual parts of the carnivorous plant Venus flytrap. The results indicate that the action potential between the trap and the assimilation part of the leaf is not transmitted and according to the analysis of the jasmonic acid, the signaling pathway is activated exclusively in the stimulated part of the plant. The only phytohormone that was accumulated in the nondamaged part of the Venus flytrap was abscisic acid. Although inter-organ communication is essential for the survival of non-carnivorous plants, the results of this thesis suggest that inter-organ communication is indispensable for the Venus flytrap, although not completely.

Keywords	Electrical signals, jasmonic acid, interorgan communication, Venus flytrap
Number of pages	56
Number of appendices	0
Language	Czech

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Elektrické signály v rostlinách</b>	<b>2</b>
2.1.1	Fyziologické změny v rostlinách vlivem elektrických signálů	6
<b>2.2</b>	<b>Signální dráha kyseliny jasmonové</b>	<b>7</b>
2.2.1	Biosyntéza kyseliny jasmonové	7
2.2.2	Průběh signální dráhy kyseliny jasmonové	9
<b>2.3</b>	<b>Masožravé rostliny</b>	<b>10</b>
<b>2.4</b>	<b>Mucholapka podivná (<i>Dionaea muscipula</i>)</b>	<b>11</b>
<b>2.5</b>	<b>Mechanismus lovu a trávení kořisti (lovící cyklus)</b>	<b>13</b>
2.5.1	Elektrické signály v mucholapce podivné	14
2.5.2	Signální dráha kyseliny jasmonové v mucholapce podivné	16
2.5.3	Trávicí enzymy	18
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Materiály</b>	<b>20</b>
3.1.1	Rostlinný materiál	20
3.1.2	Použité chemikálie	20
3.1.3	Použité přístroje	21
3.1.4	Použité software	22
<b>3.2</b>	<b>Metody</b>	<b>22</b>
3.2.1	Povrchové měření elektrických signálů Ag/AgCl elektrodou	22
3.2.2	LC-MS/MS pro stanovení koncentrace fytohormonů	24
3.2.3	qPCR pro stanovení hladiny mRNA	26
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>Povrchové měření elektrických signálů Ag/AgCl elektrodou</b>	<b>33</b>
4.1.1	Paralelní měření elektrické meziorgánové komunikace mezi pastí a asimilační částí listu mucholapky podivné	33
<b>4.2</b>	<b>LC-MS/MS</b>	<b>37</b>
<b>4.3</b>	<b>Ovlivnění amplitudy AP po poškození asimilační části listu, nebo ošetření pastí roztokem ABA</b>	<b>41</b>
<b>4.4</b>	<b>Optimalizace protokolu izolace RNA z mucholapky podivné pro qPCR</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSE</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b>	<b>56</b>

## **Cíle**

Cílem teoretické části této diplomové práce je zpracovat rešerši na téma elektrické signály, vyvolávající aktivaci signální dráhy kyseliny jasmonové a následnou expresi genů pro trávící enzymy v mucholapce podivné.

Cílem experimentální části této diplomové práce je sledovat biofyzikální a biochemickou meziorgánovou komunikaci mezi pastí a asimilační částí listu mucholapky podivné a to v podobě elektrické signalizace, aktivace signální dráhy kyseliny jasmonové a navazující exprese trávících enzymů.



# 1 ÚVOD

Rostliny se na rozdíl od zvířat nemohou pohybovat a musely si tak vyvinout sofistikované systémy vnímání změn okolí, aby mohly na působící faktory vnějšího prostředí rychle a efektivně reagovat aktivací obranných mechanismů, které mají za cíl zachovat homeostázu a zabránit poškození nebo smrti rostliny. Mezi tyto obranné mechanismy patří například změny v expresi genů, respiračních a fotosyntetických dějích nebo v produkci fytohormonů. Tyto obranné mechanismy si však některé rostliny přizpůsobily k obrazu svému, aby se vypořádaly s nedostatkem živin v půdě. Pasti masožravé rostliny mucholapky podivné (*Dionaea muscipula* Ellis) jsou v získávání živin z kořisti extrémně efektivní, čímž kompenzují nedostatek živin v půdě. Živiny získané z kořisti navíc stimulují fotosyntézu, ve které pasti příliš nevynikají, čímž kompenzují své nedostatky a tedy i růst celé rostliny a její plodnost.

Vzhledem k tomu, že se schopnost lapit kořist u mucholapky podivné vyvinula ze signální dráhy kyseliny jasmonové, využívané v nemasožravých rostlinách k obraně před býložravci, mají tyto dvě signální dráhy mnoho společného. Obě dráhy jsou aktivované elektrickými signály, které vyvolají akumulaci jasmonátů v poraněné části rostlin nebo v pasti, která lapila kořist. U běžné rostliny se však signály informující o poranění šíří nejen lokálně v místě poranění, ale i do vzdálených částí rostliny, Běžné rostlina tak mohou aktivovat signální dráhu obrany před býložravcem v podstatě v celém rostlinném těle, a připravit se tak na další útok. Jak je to ale u rostlin masožravých? Z výsledků dříve publikovaných výzkumných prací vyplývá, že pasti mucholapky podivné mezi sebou nekomunikují, protože v zájmu mucholapky je lapit co největší počet kořistí a tím získat co největší množství potřebných živin. Což by v případě, že by se všechny pasti zavřely najednou, když by se na jedné z nich nacházela kořist, nebylo možné. Znamená to tedy, že meziorgánová komunikace v mucholapce podivné zcela chybí nebo je jen omezena? A právě řešení této otázky je cílem předložené diplomové práce.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

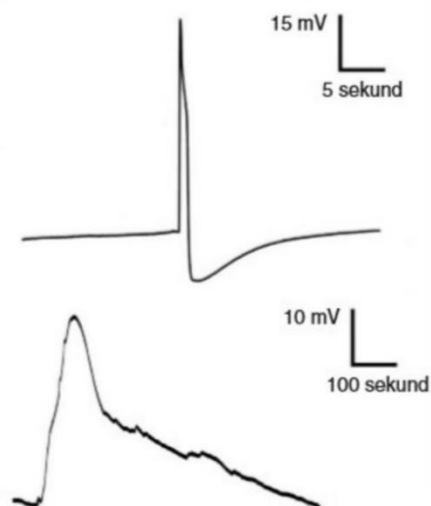
### 2.1 Elektrické signály v rostlinách

Elektrické signály popsal poprvé u rostlin před více než 230 lety Berthelon (1783) a zanedlouho poté i u živočichů Galvani (1791). Elektrické signály se tak staly novou studijní disciplínou, pro kterou byly využívány výhradně masožravé rostliny po více než století, díky jejich schopnosti rychlého pohybu. V té době byly elektrické signály jedinou známou intracelulární signalizací, než Darwin (1881) ve své práci vznesl domněnku o existenci chemických signálů v rostlinách. Je nutné si uvědomit, že výzkum elektrické signalizace v rostlinách stále probíhal převážně na rostlinách masožravých, u kterých bylo možné pozorovat rychlý pohyb. Není tedy divu, že ve 20. století došlo ke zpochybnění existence elektrických signálů v běžných rostlinách bez viditelné rychlé odezvy, protože běžné rostliny nejeví známky potřeby tak rychlé signalizace, jako je ta elektrická. K postupnému vyvrácení obav dochází na přelomu 20. a 21. století, kdy bylo prokázáno, že rostliny potřebují velmi rychlou signalizaci pro systémovou odpověď na podmínky vnějšího prostředí, jako je genová exprese (Davies a Schuster, 1981; Vodeneev *et al.*, 2015).

Elektrické signály jsou v rostlinách generovány v odpovědi na lokální působení abiotických i biotických stresorů a šíří se na dlouhé vzdálenosti pomocí floému a xylému. Jedná se o přechodnou změnu elektrického potenciálu na plasmatické membráně, přenášející informaci o přítomnosti stresoru. V rostlinách rozeznáváme tři druhy elektrických signálů: akční potenciál (AP), variační potenciál (VP) a systémový potenciál (SP). Některé elektrické signály jsou doprovázeny změnou v intracelulární koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS), jako je například  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Huber a Bauerle, 2016; Nguyen *et al.* 2018; Sukhov *et al.*, 2019).

Prvním zdokumentovaným a nejrychlejším elektrickým signálem v rostlinách je akční potenciál, objeven byl anglickým fyziologem Burdon-Sandersonem v roce 1873 v mucholapce podivné (*Dionaea muscipula*). Jedná se o velmi krátký elektrický signál trvající jen pár jednotek až desítek sekund, šířící se na krátkou vzdálenost v obou směrech od místa působení stresoru, rychlostí až  $20 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ . Průběh AP se řídí pravidlem „vše nebo nic“, což znamená, že pro jeho iniciaci je potřeba přesáhnout určitou prahovou hodnotu. Podnětem, který je schopný

překročit tuto prahovou hodnotu však může být i velmi slabý biotický či abiotický stimul. Například dotek nebo snížení teploty o pár °C (Pavlovič, 2012). Po dosažení prahové hodnoty je signál udržován prostřednictvím plazmodesmat sousedních parenchymatických buněk nebo pomocí floému a jeho amplituda je tak konstantní (Trebacz *et al.*, 2006; Pavlovič, 2012). Jelikož intenzita stimulu neovlivňuje jeho amplitudu, je informace o intenzitě podnětu kódovaná frekvencí AP (Böhm *et al.*, 2016). Průběh AP můžeme rozdělit do tří fází, které jsou způsobeny změnami koncentrace iontů v intercelulárním a extracelulárním prostoru. V první fázi dochází působením stresoru k depolarizaci plasmatické membrány. Pokud depolarizace plasmatické membrány přesáhne určitou kritickou hodnotu, jsou aktivovány  $\text{Ca}^{2+}$  iontové kanály a dochází k přílivu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů z vnitřních (mitochondrie, vakuoly, endoplasmatické retikulum) i vnějších (apoplast) zdrojů do cytoplasmy a přílivu  $\text{Cl}^-$  iontů do apoplastu (Böhm a Scherzer, 2021). Zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v cytoplasmě aktivuje  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentní iontové kanály, což způsobuje odliv  $\text{Cl}^-$  iontů z cytoplasmy a ještě výraznější depolarizaci. Zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů (až o několik  $\mu\text{M}$ ) v cytoplasmě způsobí snížení pH a dočasnou inaktivaci  $\text{H}^+$ -ATPas, což vede naopak ke zvýšení pH mimo buňku. (Reddy *et al.*, 2011; Huber a Bauerle, 2016; Sukhov *et al.*, 2019). Druhou fází je krátká repolarizace až hyperpolarizace plasmatické membrány, která je spuštěna depolarizací aktivovaných  $\text{K}^+$  kanálů, která řídí odtok  $\text{K}^+$  iontů ven z buňky. Po vyrovnání koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v cytoplasmě vlivem jejich odčerpání pomocí  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasových pump za spotřeby ATP, dochází k opětovné aktivaci  $\text{H}^+$ -ATPas a navození klidového napětí na plasmatické membráně (Pavlovič *et al.*, 2012; Huber a Bauerle, 2016; Sukhov *et al.*, 2019). Na obnovení klidového potenciálu se dále podílí vzájemné působení různých iontových kanálů (Böhm a Scherzer, 2021).



**Obr. 1:** Rozdíl mezi průběhem AP (nahore) a VP (dole) (Převzato z Pavlovič, 2014 – upraveno).

Variační potenciál je na rozdíl od AP (Obr. 1) velmi pomalý elektrický signál o délce trvání v řádech jednotek až desítek minut, šířící se na dlouhou vzdálenost. Neřídí se pravidlem „vše nebo nic“ a jeho rychlost i amplituda se vzdáleností slábnou o 2,5 % na každý jeden centimetr. Variační potenciál má dvě fáze, rychlou nebo pomalou depolarizaci a velmi pomalou repolarizaci plasmatické membrány. Objeven byl jako druhý v první polovině 20. století u rostlin v reakci na drcení, pálení nebo stříhání listů, tedy pro rostlinu velmi invazivními podněty (Vodeneev *et al.*, 2015). Variační potenciál však není indukován přímo abiotickými nebo biotickými stresory, ale až hydraulickým nebo chemickým signálem, který byl těmito stresory vyvolán. Rychlost, amplituda a povaha variačního potenciálu závisí na síle neelektrického signálu, který jej vyvolal a vypovídá tak mnohem více informací o rozsahu poranění oproti AP. Díky tomu může být fáze depolarizace pomalá, rychlá nebo s vrcholy podobnými průběhu AP a rychlost šíření VP se pohybuje mezi  $0,2\text{--}20\text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$  (Sukhov *et al.*, 2019). Hydraulický signál vyvolávající VP se šíří xylémem v podobě tlakové vlny a působí aktivaci mechanosenzitivních  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů napříč rostlinou (Farmer *et al.*, 2014). Dochází tedy ke zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v cytoplasmě buněk, produkci ROS, dlouhodobé inaktivace  $\text{H}^+$ -ATPas a aktivaci signálních drah vedoucích k obranné reakci. V případě chemického signálu se jedná o signální molekulu uvolněnou při poškození rostliny. Tato molekula byla

dlouhou dobu neznámá a podle svého objevitele se nazývala jako „Ricca faktor“ (Ricca, 1926). Na základě posledních výzkumů mohou být těmito molekulami  $\text{H}_2\text{O}_2$  nebo glutamát. Molekuly  $\text{H}_2\text{O}_2$ , spouští samopropagující se ROS vlnu, která působí aktivaci ligand-dependentních  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů, příliv  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do buňky a následnou propagaci variačního potenciálu. Elektrické signály šířící se od místa poranění v obou směrech vedou také ke zvýšení koncentrace glutamátu v apoplastu, který může být pomocí floému dále transportován jako chemický signál na vzdálené GLUTAMATE-RECEPTOR-LIKE iontové kanály (GLR) nacházející se na plasmatické membráně vodivých svazků cévních (Mousavi *et al.*, 2013). Zda glutamát hraje roli jen při iniciaci nebo i při propagaci elektrických signálů zatím není zcela jasné (Toyota *et al.*, 2018; Farmer *et al.*, 2020). Po navázání glutamátu na GLR dochází k indukci variačního potenciálu a uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do buňky i ve vzdálených částech rostliny (Farmer *et al.*, 2014; Tanaka a Heil, 2021). Po ukončení působení variačního potenciálu vyvolávajícího signálů dochází k inaktivaci  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů, reaktivaci  $\text{H}^+$ -ATPas a nastává pomalá repolarizace plasmatické membrány (Sukhov *et al.*, 2019).

Posledním ze tří elektrických signálů je systémový potenciál. Jedná se o elektrický signál působící přechodnou hyperpolarizaci plasmatické membrány rychlým odlivem  $\text{H}^+$  protonů, který může být indukován jak abiotickými, tak biotickými stresory. Systémový potenciál je spojován především s apoplastem, neboť jeho indukce je doprovázena změnou koncentrace iontů v apoplastu rostlin. Veškeré změny koncentrace iontů vedou v apoplastu ke zvýšení pH. Stejně jako u VP závisí rychlost a amplituda systémového potenciálu na stresovém podnětu, který SP vyvolal. Zde však podoba SP s ostatními elektrickými signály končí. Na rozdíl od AP a VP doprovází systémový potenciál aktivace  $\text{H}^+$ -ATPas v plasmatické membráně a jeho indukce je silně závislá na místě působení stresoru. Systémový potenciál je nejméně probádaným elektrickým signálem a jeho mechanismus stále není zcela známý (Zimmermann *et al.*, 2016; Sukhov *et al.*, 2019).

Elektrické signály v rostlinách se můžou šířit jako kompozitní signály složené z více složek (AP, VP, SP) (Zimmermann *et al.*, 2016; Farmer *et al.*, 2020). Elektrické signály v rostlinách hrají významnou roli v obraně před nejrůznějšími stresory. Především se však uplatňují v obraně rostliny při napadení herbivorem,

kdy je důležitá rychlost přenosu signálu. Vedou k aktivaci signální dráhy kyseliny jasmonové (JA) jak lokálně, v místě působení stresoru, tak ve vzdálených částech rostliny díky schopnosti se šířit na dlouhou vzdálenost.

### **2.1.1 Fyziologické změny v rostlinách vlivem elektrických signálů**

Elektrické signály v rostlinách působí, mimo aktivaci signální dráhy JA, na mnoho dalších fyziologických změn v rostlinách. Potenciály AP a VP vedou k inhibici fotosyntézy a stimulace respirace díky zvýšené koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v buňce, které jsou důležitými regulátory mnoha zúčastněných procesů (Koziolek *et al.*, 2004; Lautner *et al.*, 2005; Kaiser *et al.*, 2006; Grams *et al.*, 2009). V případě fotosyntézy dochází například k inhibici klíčových enzymů Calvinova cyklu (např. fruktóza-1,6-bisfosfát) (Hertig a Wolosiuk, 1983; Kreimer *et al.*, 1988) nebo funkce ATP-syntázy. Vlivem změn pH doprovázející změny koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v buňce jsou ovlivňovány i enzymatické reakce fotosyntézy. Stimulace respirace nastává úbytkem adenosintrifosfátu (ATP), který je spotřebováván při obnovení klidového napětí na plasmatické membráně po propagaci elektrického signálu (Pavlovič, 2012).

Elektrické signály indukované v rostlinách v reakci na poranění vedou v iniciační fázi ke změně koncentrace iontů, protonů a ROS. Jak bylo výše popsáno, propagace AP, VP i SP je spojena s výkyvy koncentrace  $\text{K}^+$  a  $\text{Cl}^-$  iontů v cytoplasmě a apoplastu, stejně jako s šířením  $\text{Ca}^{2+}$  vlny. Spolu s elektrickými signály se šíří i ROS vlna schopná sebepropagace napříč buňkami. Elektrické signály,  $\text{Ca}^{2+}$  vlna a ROS vlna jsou natolik propojené děje, že je nelze od sebe jednoznačně oddělit. Společně jsou zodpovědné za akumulaci fytohormonů v rostlinách. Především se jedná o JA, kyselinu abscisovou (ABA) a ethylen. Zvýšená koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplasmě způsobuje fosforylaci a následnou proteolytickou degradaci represoru JAV1 v represorovém komplexu JAV1-JAZ8-WRKY51, což vede k dezintegraci celého komplexu a uvolnění genů kódujících enzymy biosyntézy JA z represe (Fisahn *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2018). Následná zvýšená koncentrace JA indukuje aktivaci signální dráhy, která vede k expresi genů pro látky zodpovědné za systémovou odpověď rostliny na působení stresoru (Sukhov *et al.*, 2019). Dráha JA může vést například k expresi genů pro inhibitory proteináz (*pin1*, *pin2*), které se podílejí u rajčat na obraně při napadení hmyzem nebo nikotinu u tabáku (Shoji *et al.*, 2008).

## 2.2 Signální dráha kyseliny jasmonové

Spolu s jejími deriváty a prekurzory patří JA do rodiny jasmonátů, klíčových signálních molekul v rostlinách, regulující stresové odpovědi a vývoj. Jasmonáty hrají roli zejména při mechanickém poškození rostliny (např. napadení herbivorem) a přítomnosti fytopatogenů. Mezi deriváty JA řadíme například její konjugát s izoleucinem, jasmonyl-L-isoleucin (JA-Ile), prekurzor kyselinu *cis*-(+)-12-oxofytodienovou (*cis*-OPDA) či kyselinu 12-hydroxyjasmonovou (12-OH-JA). Po chemické stránce se jedná o krátké řetězce alkylycyklopentenových a alkylycyklopentanových karboxylátů biosyntetizovaných z kyseliny  $\alpha$ -linolenové (Creelman a Mullet, 1997). Prekurzory JA vznikají v chloroplastech, samotná JA je ze svých prekurzorů syntetizována v peroxizomech a ke konečné metabolizaci JA na její deriváty dochází následně v cytoplasmě (Ruan *et al.*, 2019).

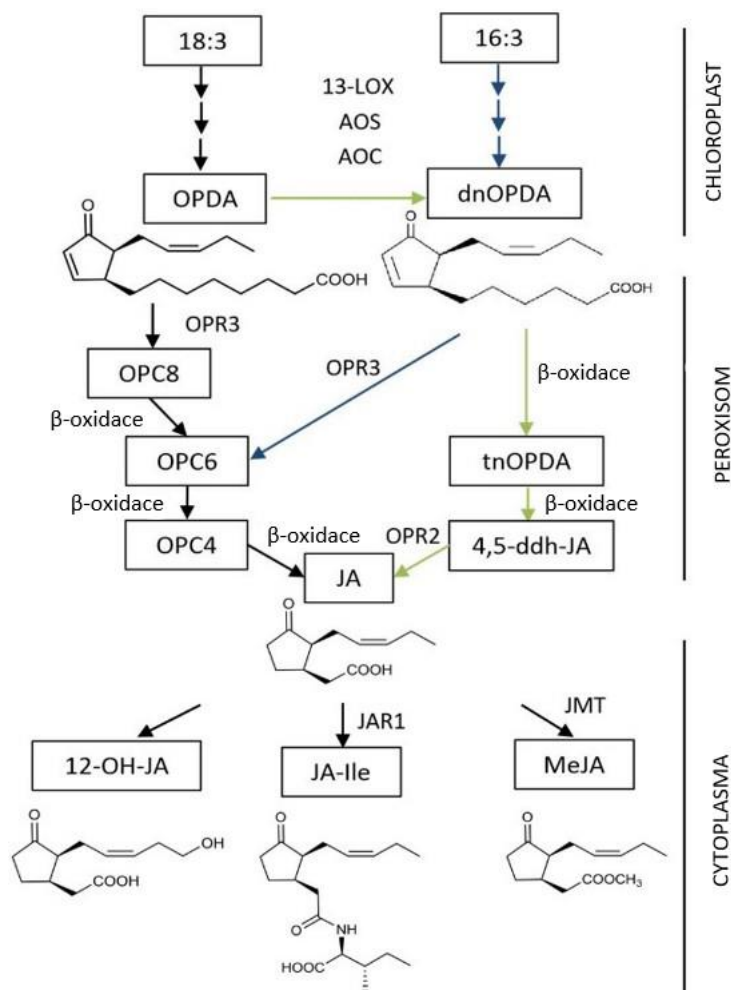
### 2.2.1 Biosyntéza kyseliny jasmonové

Biosyntéza JA byla studována zejména na modelové rostlině huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) a rajčeti (*Lycopersicon esculentum*). U *A. thaliana* jsou identifikovány tři dráhy pro syntézu JA (Obr. 2): oktadekanová dráha, hexadekanová dráha a OPR3-nezávislá dráha. Všechny tři dráhy se odehrávají částečně v chloroplastu, peroxizomu a cytoplasmě (Chini *et al.*, 2018; Ruan *et al.*, 2019).

Oktadekanová dráha začíná uvolněním kyseliny  $\alpha$ -linolenové (LA) z membrány chloroplastu fosfolipázou a její oxidace 13-lipoxygenázou (LOX). Následující sdružená dehydratačně-cyklizační reakce zprostředkovaná allenoxidsyntázou (AOS) a allenoxidcyklázou (AOC) vede k tvorbě cyklopentenoxolipidu, *cis*-OPDA v chloroplastu. Vzniklá *cis*-OPDA je transportována do peroxizomu, kde je redukována pomocí OPDA reduktázy 3 (OPR3) na kyselinu 8-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl)oktanovou (OPC8). V peroxizomu OPC8 prochází třemi koly  $\beta$ -oxidace, kdy postupně vzniká kyselina 6-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl)hexanová (OPC6), kyselina 4-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl)butanová (OPC4) a výsledným produktem je JA, která může být v cytoplasmě metabolizována na různé deriváty řadou chemických reakcí. Nejčastěji je v cytoplasmě JA přeměněna na metyljasmonát

(MeJA) pomocí jasmonát-O-metyltransferázy (JMT), JA-Ile pomocí JA-amidosyntetázy (JAR1) a 12-OH-JA (Chini *et al.*, 2018; Ruan *et al.*, 2019).

Paralelní hexadekanovou dráhou (Obr. 2) je syntetizován dinor kyseliny 12-oxo-fytodienové (dn-OPDA). Pomocí OPR3 je dn-OPDA převeden na OPC6 a dále prochází stejnou dráhou jako *cis*-OPDA až na konečný produkt, JA a její deriváty (Ruan *et al.*, 2019).



**Obr. 2:** Schéma tří JA biosyntetických drah v huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*). (18:3) α-linolenová kyselina, (16:3) hexadecatrienová kyselina, (OPDA) *cis*-(+)-12-oxofytodienová, (dn-OPDA) dinor kyseliny 12-oxo-fytodienové, (13-LOX) 13-lipoxygenáza, (AOS) allenoxidsyntáza, (AOC) allenoxidcykláza, (tn-OPDA) tetranor-kyselina 12-oxo-fytodienové, (4,5-ddh-JA) 4,5-didehydrojasmonát, (OPR2) 12-oxofytodienoátreduktáza, (OPR3) OPDA reduktáza 3, (OPC8) 8-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl)oktaná kyselina, (OPC6) 6-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl) hexanová kyselina, (OPC4) 4-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl)butanová kyselina, (JA) kyselina jasmonová, (12-OH-JA) 12-hydroxyjasmonová kyselina, (JAR1) JA-amidosyntetáza, (JA-Ile) jasmonyl-L-isoleucin, (JMT) jasmonát-O-metyltransferáza, (MeJA) metyljasmonát (Převzato z Ruan *et al.*, 2019 – upraveno).



Předchozí dvě dráhy biosyntézy JA využívaly OPR3. Poslední, nově objevená dráha je OPR3-nezávislá a využívá přímý vstup OPDA do beta-oxidace za vzniku dn-OPDA, tetranor-kyselina 12-oxo-fytodienové (tn-OPDA) a 4,5-didehydrojasmonátu (4,5-ddh-JA), který je následně redukován v peroxizomu na JA pomocí 12-oxofytodienoátoreduktázy (OPR2). Dále je JA stejně jako v předchozích případech přeměněna na její deriváty v cytoplasmě (Chini *et al.*, 2018).

### 2.2.2 Průběh signální dráhy kyseliny jasmonové

V posledních letech bylo na aktivaci biosyntézy JA v rostlinách provedeno hned několik studií. Pearce *et al.* (1991) identifikoval u rajčete (*Lycopersicon esculentum*) polypeptidovou signální molekulu, která je syntetizována v odpovědi na mechanické poškození rostliny, jako je krmení herbivora. Touto signální molekulou je systemin, polypeptid skládající se z 18 aminokyselin, odvozený od prekurzorového proteinu protosystemin. Protosystemin je v odpovědi na působení biotického stresoru hydrolyzován na systemin, který je následně uvolněn do apoplastu, kde se váže na povrchový receptor, čímž je aktivována JA signální dráha (Li, *et al.*, 2003; Ruan *et al.*, 2019). Dlouho se předpokládalo, že JA signalizace prostřednictvím systeminu je typická jen pro rostliny z čeledi *Solanaceae*. Později byl u huseníčku rolního (*A. thaliana*) identifikován peptid AtPEP1 plnící stejnou funkci jako systemin u rajčete. Po mechanickém poškození rostliny nebo působení patogenů dochází k hydrolýze prekurzorového proteinu PROPEP1 na aktivní AtPEP1, který se následně váže na receptor nacházející se na plasmatické membráně, čímž dochází k aktivaci signální dráhy kyseliny jasmonové (Yamaguchi *et al.*, 2010). Jak JA signalizace prostřednictvím systeminu, tak prostřednictvím AtPEP1, vedou po navázání peptidu na receptor k aktivaci fosfolipázy A2, která následně štěpí fosfolipidy plasmatické membrány za uvolnění kyseliny LA, sloužící jako prekurzor biosyntézy JA. Mechanismus aktivace fosfolipázy A2 pomocí systeminu však stále není zcela objasněn (Ruan *et al.*, 2019). Paralelní Ca<sup>2+</sup> signalizace vede ke zvýšení exprese genů kódujících enzymy JA biosyntetické dráhy, čímž může být současně zabezpečena tvorba substrátu i enzymů pro syntézu JA (Yan *et al.*, 2018).

Aktivací signální dráhy JA dochází k hromadění JA v cytoplasmě buněk v místě poranění a aktivaci ABC transportéru JAT. Transportér JAT zajišťuje při vysoké koncentraci JA v cytoplasmě její přenos přes plasmatickou membránu do apoplastu, díky čemuž je aktivována signální JA dráha i v odlehlých buňkách (Li *et al.*, 2017). Působením JAR1 vzniká z JA v cytoplasmě její aktivovaná forma JA-Ile. Transportér JAT je zodpovědný za rychlou regulaci koncentrace JA a JA-Ile v cytoplasmě, aby nedošlo k inhibici růstu a vývoje rostliny. Jasmonát JA-Ile je transportován pomocí ABC transportéru JAT přes jadernou membránu do jádra, kde se váže na signální receptor CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1), který zprostředkuje degradaci JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) represorů, zabraňujících přepisu JA-responzivních genů, ubiquitinací. Odstranění represorů JAZ vede k aktivaci genové exprese původně blokových obranných genů. V nepřítomnosti JA-Ile je JAZ asociováno s transkripčním represorem Topless (TPL), což působí modifikaci chromatinu pomocí enzymů modifikujících histony a exprese genů závislých na JA je potlačena (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Sheard *et al.*, 2010; Shigenaga a Argueso, 2016). Pro *cis*-OPDA a 12-OH-JA je nezávislá signální aktivita z velké části stále prostředkem debaty (Pavlovič a Mithöfer, 2019).

Speciální kategorií rostlin, které využily existující JA signalizaci ne k odpuzení svého protivníka, ale k jeho ulovení a strávení, jsou rostliny masožravé. Tyto rostliny žijí většinou v půdách chudých na živiny, a využívají tak těla hmyzu ve svůj prospěch.

### **2.3 Masožravé rostliny**

Rostliny jsou organismy bez možnosti útěku před nepřítelem a byly tak nuceny si vyvinout strategie pro svou ochranu. Během vývoje můžeme pozorovat různorodé taktiky obrany. Příkladem může být konstitutivní obrana, jako jsou trny u růže šípkové (*Rosa canina*) nebo žahavé trichomy obsahující chemickou látku moroidin u kopřiváku morušovitého (*Dendrocnide moroides*). Indukovanou obranu reprezentuje například výše zmíněná JA signální dráha. Některé masožravé rostliny v procesu exaptace využily existující JA signalizaci pro indukci svých trávicích procesů (Pavlovič a Mithöfer, 2019).

Masožravost se u rostlin vyvinula na mnoha místech nezávisle na sobě, většinou se však jednalo o vlhká, otevřená stanoviště s půdou chudou na živiny,

především dusík a fosfor. Následkem vzniku masožravosti u rostlin je skrovný kořenový systém. Většina těchto rostlin má velmi plytké nebo dokonce chybějící kořeny, což je činní velmi náchylné na nedostatek vody. Výjimku tvoří hlíznaté rosnatky původem z jihozápadní Austrálie, které přežívají dlouhá suchá období a vegetují krátce v období dešťů nebo brazilské rosnatky osidlující suché půdy, přežívající díky vysoké vzdušné vlhkosti. (Studnička, 1984; Brewer *et al.*, 2011).

V dnešní době můžeme najít 12 čeledí s celkem 15 rody masožravých rostlin, které spojují společné vlastnosti – schopnost lovu, konzumace kořisti a využití produktů trávení lapaných živočichů (Adamec *et al.*, 2021). Všechny orgány sloužící k lapaní kořisti se vyvinuly z listů, jen některé rody využívají dodatečný orgán sloužící k lapaní a trávení např. z květní stopky (Kocáb *et al.*, 2020). Hlavní strategií lovu masožravých rostlin je napodobování vzhledem, barvou nebo vůní květy (špirlice), plodnice hub (tučnice), kvasící ovoce (láčkovky), apod. Žádná masožravá rostlina však nepoužívá k lovu a vábení kořisti květ. Mezi hlavní organické látky vstřebávané těmito rostlinami jsou fosfor a dusík, ale také síra, draslík, vápník a další jiné prvky v různém množství v závislosti na konkrétní rostlině (Studnička, 1984, 2006).

Masožravé rostliny byly dříve označovány jako rostliny „hmyzožravé“ (insektivorní) (Darwin, 1875), ale vzhledem k různorodé povaze kořisti některých druhů masožravých rostlin, mezi které se řadí i myši, ještěrky, žáby, červi nebo prvoci, se dnes užívá výstižnějšího termínu „masožravé“ rostliny nebo také rostliny „karnivorní“. Trávicí šťávy u všech rodů masožravých rostlin navíc obsahují enzymy proteázy, štěpící bílkoviny, základní složku svaloviny živočichů, což vyvrací zaměření rostlin výhradně na hmyz, jako zdroj živin (Studnička, 1984).

#### **2.4 Mucholapka podivná (*Dionaea muscipula*)**

V roce 1759 měl guvernér Arthur Dobbs možnost být svědkem do té doby nevídaného jevu, polapení hmyzu rostlinou a čirou náhodou se jednalo právě o mucholapku podivnou, čímž se stal jejím objevitelem. O deset let později tuto pozoruhodnou rostlinu poprvé popsal anglický obchodník John Ellis a vyslovil přitom úvahu, že lapání hmyzu souvisí s výživou mucholapky podivné (Studnička, 1984) a v roce 1875 popsal Charles Darwin mucholapku ve své knize

„Insectivorous plants“ jako nejpodivuhodnější rostlinu na světě. Od té doby uplynulo již téměř 150 let a mucholapka podivná nepřestává vědce fascinovat.

Mucholapka podivná (*Dionaea muscipula*) je nejznámější masožravá rostlina čeledi *Droseraceae*, endemicky se vyskytující v mokřadech států Severní a Jižní Karoliny na východním pobřeží USA. Listy mucholapky podivné tvoří kruhovou přízemní růžici s velmi skrovným kořenovým systémem, vyrůstajícím z cibulové hlízy. Protože se mucholapka vyskytuje v regionu, kde se střídají chladné zimy o teplotách pod bodem mrazu a velmi horká vlhká léta, vyskytuje se u nich sezónní růstový vzorec. V chladném období je jejich vývoj utlumen, nový růst začíná typicky brzy na jaře a první květy je možné vidět začátkem léta. V polovině léta se po opylení objevují semena, ze kterých po projití chladem (stratifikace) a trpělivém dvou až pětiletém čekání vyroste dospělá rostlina, schopná lapit kořist. Navzdory svému jménu, mouchy tvoří pouze malý podíl úlovku a její hlavní kořistí je především lezoucí hmyz (Studnička, 1984; Ellison a Adamec, 2018).

Listy mucholapky podivné se skládají z asimilační části, která je na konci modifikována do dvou laloků nazývaných čepele, spojených podél hlavní žíly. Na okrajích čepelí se nachází tuhé výrůstky a také žlázy vylučující v případě potřeby vábivý nektar. Povrch pasti je vystlaný žlázami s funkcí produkovat trávicí šťávy a absorbovat živiny z kořisti. Takto tvořená past je schopna se velmi rychle zavřít, za optimálních podmínek během 0,1 s a polapit drobný hmyz. Citlivé výčnělky umístěné na vnitřní straně pasti slouží jako mechanoreceptory, jejichž podráždění spouští uzavření pasti a následně i řadu dějů potřebných ke vstřebání živin z kořisti. Po uzavření pasti se mechanosenzitivní výčnělky díky své ohebné bazální části přitisknou na stěnu čepele a nedochází tak k jejich poškození. (Burdon-Sanderson *et al.*, 1873; Studnička, 1984).

Uzavření pasti v rostlinném světě tak nevídanou rychlostí umožňuje robustní, dobře organizovaná žilnatina, ústící do hlavní žíly mezi oběma laloky. Takto uspořádaná žilnatina slouží jako „zelené kabely“ zajišťující rychlý přenos akčního potenciálu indukovaného stimulací mechanosenzitivních výčnělků, a tím aktivaci lovicího cyklu mucholapky podivné. Rychlost sevření pasti závisí na stáří listu i na teplotních podmínkách. Nejrychleji se zavírají mladé listy při teplotě kolem 35 °C, starší listy pomaleji. Při trávení se prohnutí čepelí postupně mění z konvexního na konkávní, past se hermeticky uzavírá a opět se

otevře až po několika dnech. Pokud došlo k uzavření prázdné pasti, mucholapka to rozpozná a pomalu past otevře během dvou dnů (Studnička 1984; Hedrich a Neher, 2018).

Hladovějící mucholapka má sytě červeno-fialové pasti a ze žláz na okraji pastí vylučuje vábivý nektar, obsahující více než 60 různých těkavých organických látek s vůní květů a ovoce. Jak bylo již dříve prokázáno, tento vábivý nektar silně přitahuje hmyz a drobné živočichy sloužící mucholapce podivné jako potrava (Kreuzwieser *et al.*, 2014; Hedrich a Neher, 2018). Druhý typ žláz s dvojitou funkcí produkce trávicích enzymů a vstřebávání živin z kořisti, který se nachází na vnitřním povrchu pasti, se skládá z bazálních, endodermálních a sekrečních buněk ve dvou řadách. Každá ze zmíněných buněk má specifickou funkci a stavbu. Sekreční buňky slouží k produkci trávicích enzymů, které jsou následně vypouštěny do uzavřené pasti tvořící „zelený žaludek“ s polapenou kořistí. Právě tyto buňky jsou aktivovány stimulací mechanosenzitivních výběžků. Druhou funkci trávicích žláz zajišťují endodermální buňky, které se v běžných rostlinách nacházejí v kořenech (Caspariho proužek) a slouží k čerpání živin z půdy. Vzhledem k tomu, že mucholapka podivná potřebuje čerpat živiny z rozkládající se kořisti uvnitř uzavřené pasti, našly tyto buňky využití právě v trávicích žlázách na povrchu pastí (Lloyd, 1942; Robins *et al.*, 1980; Płachno *et al.*, 2022).

## **2.5 Mechanismus lovu a trávení kořisti (lovící cyklus)**

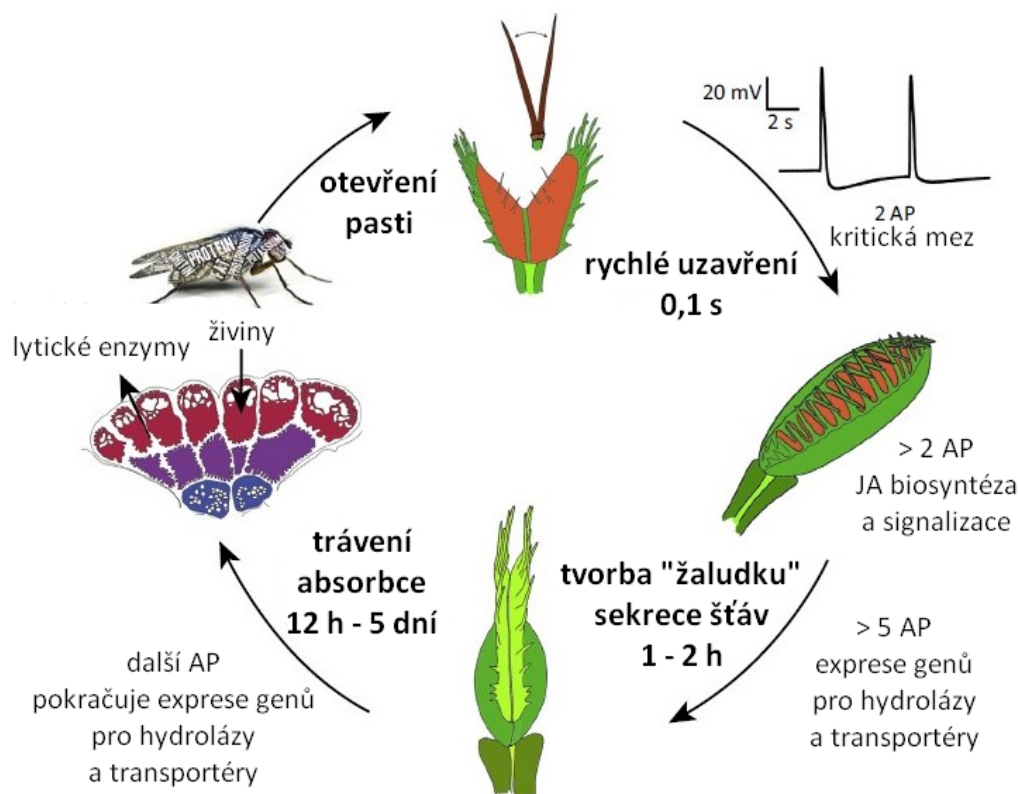
Mucholapka podivná vylučuje z pastí ovocně vonící těkavé šťávy, pomocí nichž vábí svou kořist (Kreuzwieser *et al.*, 2014). Hmyz hledajíc potravu usedne na rozevřenou past mucholapky a dotkne se jednoho ze šesti mechanosenzitivních výčnělků, jejichž podráždění vede k deformaci sensorických buněk v bazální části výčnělku a následné tvorbě elektrického signálu, o síle napětí desítek milivoltů, čímž je aktivován lovící cyklus (Obr. 3) mucholapky podivné (Burdon-Sanderson *et al.*, 1873; Haberlandt *et al.*, 1906; Studnička, 1984; Böhm *et al.*, 2016). V nedávné době byly na základě transkriptomické analýzy identifikovány možné mechanosenzitivní iontové kanály FLYCATCHER1 (FLYC1), patřící do rodiny MscS-Like (MSL) kanálů a OSCA kanál, které se podílejí na transformaci mechanického vjemu na elektrický signál (Procko *et al.*, 2021). Dva elektrické signály vyvolané za sebou způsobí uzavření pasti. Zároveň

dochází k převedení elektrického signálu na chemický aktivací JA signální dráhy, pravděpodobně prostřednictvím  $\text{Ca}^{2+}$  signalizace, jako u běžných rostlin (Suda *et al.*, 2020). Hmyz se instinktivně snaží z pasti uniknout, čímž opakovaně stimuluje tvorbu dalších elektrických signálů neustálými doteky mechanosenzitivních výčnělků, a nevědomky tak zpečetí svou smrt (Brown *et al.*, 1916; Bemm *et al.*, 2016).

Další a další pohyby kořisti uvnitř pasti vedou k hermetickému uzavření pasti a tvorbě tzv. zeleného žaludku. Oba laloky se prohnou směrem ven, čímž obepnou kořist a znemožní její další pohyb. Finální hermetické uzavření pasti závisí na rostlinném hormonu, JA, který aktivuje endokrinní systém mucholapky podivné, expresí genů pro produkci trávicích šťáv a transportérů živin v sekrečních žlázách, vystylajících vnitřní povrch pasti. Hydrolytické enzymy jsou sekretovány do dutiny zeleného žaludku a rozkládají kořist na stavební jednotky živin. Transportéry současně pomáhají vstřebávat produkty rozkladu stejnými žlázami pro další využití. Nestrávené zbytky hmyzu jsou po opětovném otevření pasti odváty větrem nebo odplaveny deštěm. Past se tedy znova otevře, kruh se uzavírá a celý lovicí cyklus může začít od znova (Hedrich a Neher, 2018). A na začátku stojí opět kořist, mechanosenzitivní výběžky a akční potenciál.

### **2.5.1 Elektrické signály v mucholapce podivné**

Ohybem mechanosenzitivních výběžků generovaný AP v mucholapce podivné se řídí pravidlem „vše nebo nic“. Nedávná úspěšná transformace mucholapky podivné GCaMP6f senzorem pro intracelulární  $\text{Ca}^{2+}$  odhalil, že s každým AP dochází ke zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v cytoplasmě, která časem klesá, až do dalšího AP (Suda *et al.*, 2020). Ionty  $\text{Ca}^{2+}$  tak hrají roli časovače, čímž umožňují mucholapce podivné počítat a pamatovat si AP po dobu 30 s. První AP uvede past do „pohotovostního režimu“, ale hladina  $\text{Ca}^{2+}$  iontů nestačí k jejímu sklapnutí. Pokud by do 30 s od prvního AP nedošlo k indukci druhého, zvýšená koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů není dostatečná pro překročení prahové hodnoty, mucholapka vyhodnotí signál jako falešný a past nesklapne. Pokud jsou iniciovány dva AP v rámci 2 – 30 s,  $\text{Ca}^{2+}$  ionty se nasčítají, dochází k překročení prahové hodnoty jejich koncentrace v cytoplasmě a past se uzavře během 0,1 s (Suda *et al.*, 2020). Rychlé sklapnutí pasti je kritické pro lapení kořisti. Rychlost



**Obr. 3:** Lovící cyklus mucholapky podivné. (AP) akční potenciál (Převzato ze Hedrich a Neher 2018 – upraveno).

sevržení pasti závisí na stáří listu i na teplotních podmínkách. (Studnička 1984; Böhm *et al.*, 2016; Hedrich a Neher, 2018; Sukhov *et. al.*, 2019).

Mucholapka má lovicí cyklus (Obr. 3) pevně pod kontrolou a aby nedošlo k narušení rovnováhy mezi benefity a vynaloženým úsilím, je potřeba další tři AP k hermetickému uzavření pasti. Tak se mucholapka ujistí, že skutečně lapila kořist. Pokud by po uzavření pasti nedošlo k indukci dalších AP, past se otevře po 12 h. Pět AP vyvolaných za sebou vede k tvorbě „zeleného žaludku“ zhruba 1-2 h od uzavření pasti. Konečné zapečetění pasti je závislé na JA, aktivující endokrinní systém mucholapky podivné a expresi genů pro hydrolytické enzymy a transportéry získaných živin. Čím více AP je generováno, tím silnější je produkce trávicích enzymů. (Böhm *et al.*, 2016; Hedrich a Neher, 2018; Sukhov *et. al.*, 2019).

Veškeré následující AP indukované panikařící kořistí po aktivaci JA signální dráhy informují mucholapku podivnou o velikosti kořisti a tedy o množství potřebných trávicích enzymů k jejímu rozložení. Čím častěji jsou stimulovány

mechanosenzitivní výběžky, AP jsou indukovány a trávicí enzymy jsou syntetizovány, tím déle je aktivní endokrinní systém mucholapky podivné (Hedrich a Neher, 2018). Zajímavostí je, že elektrický signál se v mucholapce podivné na rozdíl od běžných rostlin nešíří systémově do okolních částí rostlin, ale působí pouze lokálně v rámci jedné pasti. Přičemž mucholapka nerozeznává mezi polapením kořisti a poraněním pasti, oba tyto stimuly vyvolávají AP, akumulaci JA a expresi trávicích enzymů (Pavlovič *et al.*, 2017). Také se u mucholapky podivné nevyskytuje elektrická ani chemická signalizace na dlouhou vzdálenost, která by byla pro mucholapku velmi nevýhodná vzhledem k tomu, že by pravděpodobně vedla k uzavření všech pastí najednou. Po úhynu kořisti ustane stimulace mechanosenzitivních výběžků a tím i tvorba AP. Dále je enzymatická aktivita regulována chemickými látkami získanými z potravy, především proteiny a chitinem (Pavlovič a Mithöfer, 2019).

### **2.5.2 Signální dráha kyseliny jasmonové v mucholapce podivné**

Aktivační stimuly signální dráhy JA lze dělit na mechanické (po doteku se vytváří akční potenciál) či chemické (proteiny, chitin,  $\text{NH}_4^+$ ), přičemž v případě pasti mucholapky podivné spouští signální dráhu JA stimuly mechanické (Pavlovič a Mithöfer, 2019). Oba typy stimulů vedou k tvorbě aktivované formy kyseliny jasmonové, JA-Ile, která následně aktivuje expresi genů pro řadu trávicích enzymů: peroxidázy, nukleázy, fosfatázy, fosfolipázy, glukonázy, chitinázy a pteázy (Pavlovič *et al.*, 2017; Jakšová *et al.*, 2020). Chemické signály v podobě proteinů a chitinu z rozkládající se kořisti ještě zesílí expresi genů pro cystein proteázu a chitinázu typu I v mucholapce podivné (Libiaková *et al.* 2014; Bemm *et al.*, 2016; Jakšová *et al.*, 2020). U modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* se v případě napadení parazitickou houbou, jejíž stěna je bohatá na chitin, uplatňuje LysM receptorová kináza CERK1, která chitin vycítí a aktivuje obranu rostliny před patogenem. Homolog CERK1 byl nalezen i v mucholapce podivné a to silně up-regulován po stimulaci hmyzem. Zároveň byla i silně up-regulována exprese genu pro chitinázu I, což značí, že CERK1 hraje roli v detekci chitinu a trávení kořisti i u této masožravé rostliny (Bemm *et al.*, 2016). Na druhou stranu, v mucholapce podivné není zatím známý žádný senzor pro vycítění proteinů. Předpokládá se však, že jejich přítomnost je zachycena prostřednictvím depolarizace plasmatické membrány příjmem  $\text{NH}_4^+$



iontů (Libiaková *et al.*, 2014; Pavlovič a Mithöfer, 2019). Nedávno byla navíc identifikována enzymatická deaminace proteinů pomocí trávicí tekutiny mucholapky podivné, neznámým enzymem a příjmem  $\text{NH}_4^+$  iontovým kanálem DmAMT1 (Scherzer *et al.*, 2013).

Subcelulární distribuce JA je pravděpodobně stejně jako u běžných rostlin regulována ABC transportérem JAT, konkrétně JAT1 (jasmonic acid transporter protein 1), který je lokalizovaný v jádře a plasmatické membráně rostlinných buněk (Ruan *et al.*, 2019). Do jádra je transportován JA-Ile, kde se váže na signální receptor COI1, který zprostředkuje degradaci represorů JAZ ubiquitinací. Odstranění represorů JAZ vede k aktivaci genové exprese původně blokových genů pro trávicí enzymy a transportéry živin spolu s geny pro růst a vývoj rostliny. V nepřítomnosti JA-Ile je JAZ asociováno s transkripčním represorem TPL, což působí modifikaci chromatinu pomocí enzymů modifikujících histony a exprese genů závislých na JA je potlačena (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Sheard *et al.*, 2010; Shigenaga a Argueso, 2016). Důkazem JA signalizace závislé na COI1 a JAZ v mucholapce podivné je aplikace antagonisty COI1, coronatin-O-methyloximu (COR-MO), který brání interakci mezi COI1 a JAZ, a tím i aktivaci trávicích procesů mucholapky (Böhm *et al.*, 2016).

Veškerý doposud provedený výzkum napovídá, že JA-Ile je sám o sobě zodpovědný za iniciaci trávení kořisti. Koncentrace proteinů, chitinu tvořícího exoskelet a  $\text{NH}_4^+$  jsou hlavní složky kořisti regulující enzymatickou aktivitu (Libiaková *et al.*, 2014; Bemm *et al.*, 2016; Jakšová *et al.*, 2020; Pavlovič *et al.*, 2016). Jakmile začnou trávicí šťávy kořist rozkládat, stavební prvky jsou pomocí transportérů přenášeny do pletiva a využity pro další růst. Po vstřebání využitelných látek se past opět otevře. Znovuotevření pasti může trvat 12 h - 5 dní v závislosti na velikosti kořisti a obsahu živin. Každá past zopakuje trávicí cyklus několikrát, až do jejího vyčerpání a odumření. Při poranění past reaguje obdobně jako při lapaní kořisti aktivací JA signální dráhy, což je považováno za důkaz odvození masožravosti ze signální dráhy obrany rostlin před herbivorem (Pavlovič *et al.*, 2017; Pavlovič a Mithöfer, 2019).

### 2.5.3 Trávicí enzymy

Každá ze žláz vystýlajících povrch pasti s funkcí produkovat trávicí šťávy a absorbovat živiny z kořisti, je složena z 46 buněk uspořádaných ve 3 vrstvách. Dvě bazální buňky jsou převrstveny čtyřmi endodermálními (stonkovými) buňkami, sloužícími jako uložště substrátu ke tvorbě ATP pro zbylé dvě horní vrstvy. Následuje vnitřní vrstva 8 buněk, které obsahují velkou centrální vakuolu a ohromné množství mitochondrií. Konečnou vnější vrstvu zralé žlázy tvoří 32 buněk sekrečních, charakteristických velkým množstvím vakuol a rozšířené drsné endoplasmatické retikulum. Tyto dvě vrstvy buněk slouží k produkci a sekreci trávicích enzymů mucholapky podivné, které rozkládají kořist uvnitř „zeleného žaludku“, stejně jako ke vstřebání živin z rozkládající se kořisti. Všechny žlázové buňky jsou propojeny plasmodesmaty, čímž vzniká metabolické a iontové kontinuum (Schulze *et al.*, 2012; Bemm *et al.*, 2016).

Po aktivaci sekrece pomocí jasmonátů jsou v buňkách sekrečních žláz exprimovány geny kódující trávicí enzymy. Tyto geny kódují enzymy potřebné pro rozložení kořisti na základní stavební jednotky živin, zejména se jedná o enzymy: proteázy, fosfatázy, chitinázy, peroxidázy, nukleázy, fosfolipázy a glukonázy (Schulze *et al.*, 2012; Bemm *et al.*, 2016). Složení trávicích šťáv se mění podle složení kořisti (Pavlovič *et al.*, 2014). Aktivace produkce trávicích enzymů má za následek podstatné ultrastrukturální změny v buňkách sekreční žlázy (Bemm *et al.*, 2016).

Chitinázy jsou pravděpodobně první na kořist aktivně působící enzymy trávicích šťáv. Nejčastější kořisti mucholapky podivné jsou členovci a právě jejich exoskelet je bohatý na chitin, který chitinázy rozkládají. Uvolňují tak dusík a umožňují dalším trávicím enzymům proniknout k měkkým tkáním trávené kořisti (Grover, 2012). Během prvních tří dnů je z trávicích žláz mucholapky podivné hojně sekretována VF-I chitináza, patří do třídy I chitináz. Jedná se tedy o chitinázu hrající roli v obraně nemasožravých rostlin před patogeny a býložravci. Její aktivita je pravděpodobně podporována dalšími dvěma chitinázami (Schulze *et al.*, 2012; Paszota *et al.*, 2014; Bemm *et al.*, 2016).

Hlavní složkou trávicí tekutiny mucholapky podivné jsou enzymy proteázy (také peptidázy), patřící do třídy hydroláz, rozkládající proteiny. Konkrétně se jedná o čtyři cystein proteázy, dvě aspartát proteázy a serin karboxypeptidázy

(Schulze *et al.*, 2012). Tyto proteolytické enzymy však nepůsobí na trávenou kořist zároveň, vzhledem k měnícímu se pH v uzavřené pasti během trávení a rozdílnému pH optimu těchto enzymů, dosahují různé proteázy svého optima v různou dobu (Fukushima *et al.*, 2017).

Poslední enzymy dominující svou aktivitou a zastoupením v trávicí šťávě mucholapky podivné jsou fosfatázy. Jedná se o běžné rostlinné enzymy, katalyzující hydrolýzu fosfátových esterů. Při trávení slouží k uvolnění fosforu z kořisti, kterého je v místě výskytu mucholapky podivné v půdě nedostatek (Juniper *et al.*, 1989; Pavlovič *et al.* 2014; Schulze *et al.*, 2012).

Aktivita sekrečních žláz je regulována jasmonáty a je úměrná počtu generovaných AP. Po zachycení chemických signálů z rozkládající se kořisti se produkce trávicích enzymů ještě zvyšuje (Libiaková *et al.*, 2014; Bemm *et al.*, 2016). Chemické signály následně udržují koncentraci JA a JA-Ile a produkci enzymů zvýšenou i přesto, že mechanická stimulace kořisti a tvorba AP ustanou. Mucholapka podivná tak díky chemickým signálům může využít veškeré dostupné živiny a z kořisti zbude pouze tvrdý chitinový skelet (Studnička, 1984; Libiaková *et al.*, 2014; Bemm *et al.*, 2016; Jakšová *et al.*, 2020).

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Materiály

##### 3.1.1 Rostlinný materiál

- Mucholapka podivná (*Dionaea muscipula* Ellis) - Experimentální rostliny byly pěstovány v plastových květináčích na okenním parapetu na katedře biofyziky Univerzity Palackého v Olomouci (Česká republika) při pokojové teplotě.

##### 3.1.2 Použité chemikálie

- Spectrum<sup>TM</sup> Plant Total RNA (Sigma-Aldrich, Německo)
- Clean and Concentrator<sup>TM</sup> kit (ZYMO RESEARCH, USA)
- iScript<sup>TM</sup> cDNA Syntesis Kit (BIO-RAD, USA).
- β-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, Německo)
- primery pro *dionain*, *chitinázu I* a referenční gen *aktin* (Sigma-Aldrich, Německo)
- Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Německo)
- TRIzol<sup>®</sup> Reagent (ZYMO RESEARCH, USA)
- PureLink<sup>TM</sup> RNA Mini Kitem (Thermo Fisher Scientific, Německo)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich, Německo)
- 98% etanol (Sigma-Aldrich, Německo)
- RNaseZAP<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich, Německo)
- EV gel (Hellada, Praha, Česká republika)
- Ultračistá voda bez DNáz a RNáz (ZYMO RESEARCH, USA)
- MeOH, čistota HPLC (Merck, Německo)
- MeOH, čistota LC-MS (Merck, Německo)
- Acetonitril, čistota HPLC (Merck, Německo)
- Acetonitril, čistota LC-MS (Merck, Německo)
- Systém přípravy MilliQ vody (Millipore, USA)
- Kyselina mravenčí, HPLC čistota (Sigma-Aldrich, Německo)
- Roztok hydroxidu amonného (p.a. Lach:Ner, Česká republika)
- Fytohormony od firmy Merck (Německo):
  - Kyselina jasmonová, JA i D5-JA

- Kyselina salicylová, SA
- Kyselina indolyl-3-octová, IAA
- Fytohormony od firmy OlChemIm (Česká republika):
  - Jasmonoyl-isoleucin (značený i neznačený),
  - 12-oxofytodienová kyselina (značená i neznačená),
  - Kyselina abscisová (značená i neznačená),
  - Kyselina salicylová (D4-SA),
  - Kyselina indolyl-3-octová (13C6-IAA)

### 3.1.3 Použité přístroje

- Vícekanálová aparatura pro povrchové měření elektrického potenciálu podle Ilík *et al.* (2010)
- NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, Německo)
- QuantStudio5 (Thermo Fisher Scientific, Německo)
- Automatické pipety různého objemu (Eppendorf, Německo)
- Ultrazvuková vodní lázeň Bandelin Sonorex digitec DT 106 (Bandelin electronic, Německo)
- Termoblok (Bio TDB-100, BioSan, Lotyšsko)
- Termocyklér Eppendorf AG (Eppendorf, Německo)
- Vortex Velp Scintifica, Usmate, Itálie
- Zymo-Spin™ IC Column (ZYMO RESEARCH, USA)
- Stolní centrifuga Eppendorf 5810 (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga Sigma 3K30 (Sigma-Aldrich, Německo)
- Centrifugační koncentrátor, Centrifugační vakuová odparka CentriVap (Labconco, USA)
- Kolony pro extrakci na pevné fázi Oasis™ HLB 30 mg, 1ml (Waters, USA)
- Vakuový manifold pro extrakci na pevné fázi s membránovou pumpou (Supelco, USA)
- Modulární kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem, Nexera X2 s LC-MS8050 (Shimadzu, Japonsko)
- Kolona pro ultra-účinnou kapalinovou chromatografii Waters Acquity CSH™ C18 2,1×150 mm; 1,7 μm (Waters, USA)

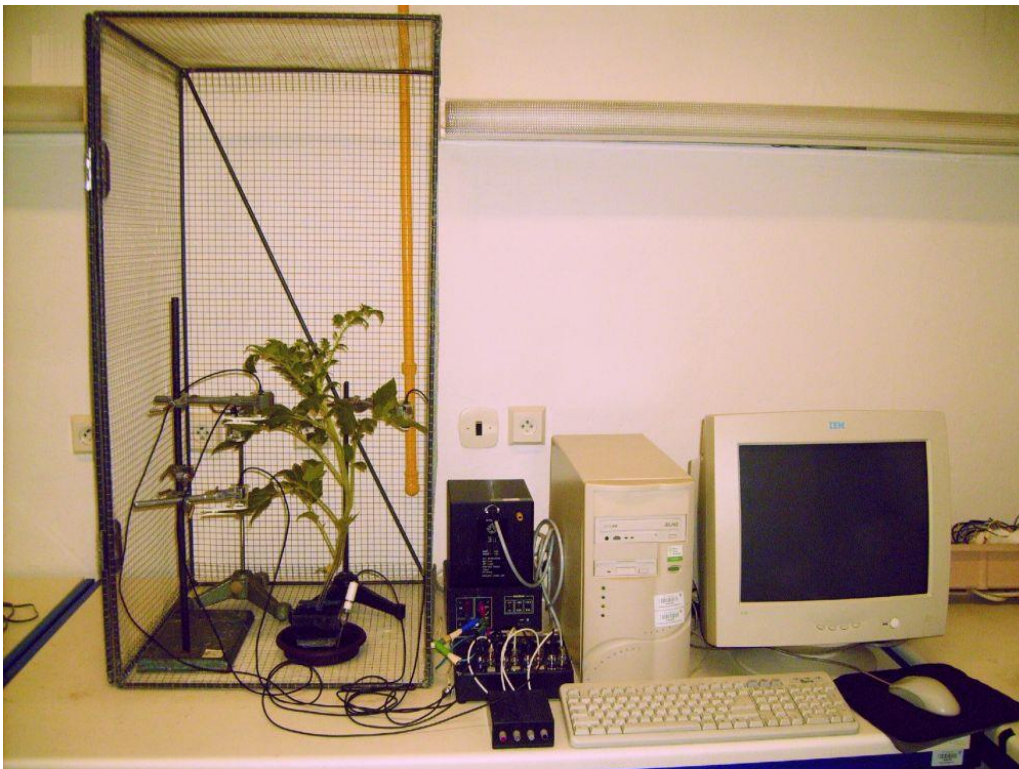
### 3.1.4 Použité software

- ScopeWin (Tedia, Plzeň, Česká republika)
- Microsoft Excel (Redmond, WA, USA)
- Origin 2022 (OriginLab, Northampton, MA, USA)
- QuantStudio™ Design and Analysis (Thermo Fisher Scientific, Německo)
- LabSolutions ver. 5,97 SP1 (Shimadzu, Japonsko)

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Povrchové měření elektrických signálů Ag/AgCl elektrodou

Pro povrchové měření elektrického potenciálu byla použita vícekanálová aparatura podle Ilík *et al.* (2010), zobrazená na obr. 4. Mucholapka podivná umístěná v Petriho misce s vodou, byla vložena do Faradayovy klece. Na zvolenou lokální past nebo asimilační část listu byla následně umístěna elektroda. Mezi elektrodou a zvolenou past nebo asimilační část listu byl pro zvýšení poměru signálu k šumu nanesen vodivý EV gel, běžně využívaný v elektrokardiografii. Do Petriho misky byla nakonec umístěna elektroda referenční. Veškeré elektrody jsou zapojeny do zesilovače, z něhož je signál



**Obr. 2:** Vícekanálová aparatura pro povrchové měření elektrického potenciálu podle Ilík *et al.* (2010).

převeden do analogově-digitálního počítačového konvertoru. Získaná data byla následně shromažďována v pravidelných časových intervalech s vysokou frekvencí. Tato metoda byla použita pro měření akčního potenciálu v pasti a listu mucholapky podivné po poranění jehlou.

Po připojení elektrod byly nastaveny parametry měření v software ScopeWin. Měření probíhalo po dobu 1290 s, každých 30 ms, při laboratorní teplotě. Naměřený signál byl čtyřicetkrát zesílen. Před začátkem samotného měření proběhlo ustálení měřeného napětí. Zhruba 60 s po zahájení měření byla jehlou poškozena nebo mechanicky stimulována sledovaná část mucholapky podivné a naměřený signál byl uložen. Zaznamenané grafy změny membránového potenciálu byly následně zpracovány pomocí programu Origin 2022.

### **3.2.1.1 Příprava vzorků pro měření ovlivnění amplitudy elektrických signálů Ag/AgCl elektrodou**

Pro první měření ovlivnění amplitudy AP byly použity masožravé rostliny mucholapky podivné, u kterých byla 16 h před měřením poškozena asimilační část listu. Příprava vzorků spočívala ve stimulaci asimilační části listu jehlou tak, že byla v pravidelných 3 min intervalech po dobu 1,5 h propichována asimilační část listu blízko primární žilnatině. Jako kontrola sloužily nepoškozené mucholapky podivné. Elektroda byla při měření umístěna na pasti mucholapky podivné a AP byl vyvolán stimulací mechanosenzitivních výběžků uvnitř měřené pasti.

Pro druhé měření ovlivnění amplitudy AP byly použity masožravé rostliny mucholapky podivné, na jejichž pasti byl 24 h před měřením aplikován 50  $\mu$ M roztok ABA v 0,2% etanolu. Jako kontrola sloužily mucholapky podivné, jejichž pasti nebyly ošetřeny roztokem ABA, ale jen 0,2% etanolem. Elektroda byla při měření umístěna na pasti mucholapky podivné a AP byl vyvolán stimulací mechanosenzitivních výběžků uvnitř měřené pasti.

### **3.2.1.2 Statistická analýza výsledků povrchového měření elektrických signálů Ag/AgCl elektrodou**

Z výsledků měření ovlivnění amplitudy AP byla provedena statistická analýza v programu Microsoft Excel a Origin 2022. Využit byl dvouvýběrový t-test s nerovností rozptylů. Výsledky jsou prezentovány jako průměrné hodnoty  $\pm$  SD.

### 3.2.2 LC-MS/MS pro stanovení koncentrace fytohormonů

Kapalinová chromatografie v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS, *liquid chromatography with tandem mass spectrometry*) je chromatografická metoda pro kvalitativní a kvantitativní analýzu. V případě kvalitativní analýzy je tato metoda použita pro zjištění nebo ověření identity analyzované látky a při kvantitativní analýze je zjišťována množství analyzované látky ve vzorku. Pro stanovení jednotlivých složek směsi je používá metoda vnějšího standardu, vnitřního standardu, metoda normalizace nebo metoda kalibrační křivky. Detekce je prováděna tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Tato metoda byla využita pro kvantitativní analýzu fytohormonů (jasmonátů, SA, ABA, IAA) u pastí a listů mucholapky podivné. Konkrétně jsme zjišťovali zda došlo k systémové tvorbě fytohormonů v asimilačním listu v případě, že byla poraněna past na tomto listu a naopak.

#### 3.2.2.1 Příprava vzorků pro LC-MS/MS

Příprava vzorků spočívala ve stimulaci listu a pastí poškozením jehlou tak, že vždy byla poškozena buď past a asimilační část listu, na které se past nacházela byla netknutá nebo byla poškozena asimilační část listu a navazující past zůstala netknutá. Cílem bylo vyvolat tvorbu elektrických signálů a následnou akumulaci jasmonátů a dalších fytohormonů v pozorovaných částech rostliny mucholapky podivné. Pastí, nebo asimilační části listu, byly v pravidelných 3 min rozestupech propichovány jehlou po dobu 1,5 h. Celkem tedy byly poraněny 30x. Ihned po stimulaci byly vzorky odebrány, past a asimilační část listu byly odděleny a ihned zmrazeny v tekutém dusíku. Takto připravené vzorky byly uloženy při -80 °C a následně využity pro analýzu fytohormonů. Cílem bylo zjistit, zda jsou jasmonáty systémově akumulovány i v neporaněných pastech a asimilačních listech díky meziorgánové komunikaci.

Dále byly vzorky vždy po jednom homogenizovány ve třecí misce pomocí tloučku na suchém ledu v tekutém dusíku tak, aby nedošlo k jejich tání a materiál byl navážen do mikrozkušavek. 25 mg vzorku bylo extrahováno 1 ml ledově vychlazeného 50% acetonitrilu. Extrakční činidlo obsahovalo směs interních standardů značených stabilními izotopy (D<sub>5</sub>-JA, D<sub>2</sub>-JA-Ile, D<sub>5</sub>-cisOPDA, D<sub>6</sub>-ABA, D<sub>4</sub>-SA, <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-IAA). Extrakce probíhala na ledově vychlazené ultrazvukové lázni po dobu 30 min. Následně byly vzorky centrifugovány 15 min (20000 g,



4 °C) a přečištěny pomocí extrakce na pevné fázi (SPE). Použity byly kolony Oasis™ HLB od firmy Waters s 30 mg sorbentu o objemu 1 ml. Kolony byly aktivovány 1 ml methanolu, následně 1 ml MilliQ vody a ekvilibrovány 1 ml 50% acetonitrilu. Následně byl nanesen supernatant vzorku a promyt 30% acetonitrilem. Tyto poslední 2 frakce byly sesbírány do 3 ml borosilikátových zkumavek. Spojené frakce byly odpařeny pomocí centrifugační vakuové odparky do sucha. Suché odparky byly v případě potřeby zmrazeny při -20 °C.

### 3.2.2.2 Analýza vzorků LC-MS/MS

Odparky byly rozpuštěny ve 40 µl mobilní fáze (v počátečním složení: 80 % A, 20 % B). Zkumavky byly sonikovány na ultrazvukové lázni po dobu 5 min. Vzorky byly filtrovány pomocí mikrospinů (Ciro, velikost pórů 0,2 µm) a převedeny do chromatografických vialek se zúženým dnem. Analýza LC-MS/MS byla provedena s ionizací elektrosprejem (ESI) pomocí modulárního chromatografického systému Nexera X2 s hmotnostní detekcí pomocí MS-8050 s trojitým kvadrupólovým analyzátozem. Chromatografické separace v systému reverzních fází byla provedena na koloně Waters CSH™ C18 2,1×150 mm; 1,7 µm. Solventem A byla 15 mM kyselina mravenčí pH 3 (titrováno hydroxidem amonným) a solventem B acetonitril. Separace bylo docíleno gradientovou elucí s průtokem 0,4 ml·min<sup>-1</sup> při 40 °C. (0-1 min 20 % B, 1-11 min 20-80 % B, 11-13 min 100 % B, 13-18 min 20 % B). Hmotnostní detekce

**Tab. 1:** Seznam MRM přechodů analytů. Přechody jsou uvedeny ve formátu Q1 m/z > Q3 m/z (Kolizní energie v jednotkách eV). (MRM) Multiple Reaction Monitoring, (ESI) Electrospray ionization.

<b>Analyt</b>	<b>ESI mód</b>	<b>MRM 1</b>	<b>MRM 2</b>	<b>MRM 3</b>
OPDA	(-)	291,30>165,35 (20)	291,30>247,40 (19)	291,30>273,35 (18)
JA	(-)	209,35>59,00 (14)	209,35>40,90 (37)	
JA-Ile	(+)	324,30>278,0 (-13)	324,30>151,20 (-15)	324,20>133,20 (-19)
ABA	(-)	263,20>153,20 (13)	263,20>204,20 (21)	263,20>219,20 (14)
SA	(-)	137,20>93,05 (21)	137,20>65,00 (29)	
IAA	(+)	176,00>130,05 (-16)	176,00>77,20 (-42)	176,00>103,15 (-32)
<b>Interní standardy</b>	<b>ESI mód</b>	<b>MRM 1</b>	<b>MRM 2</b>	<b>MRM 3</b>
D5-OPDA	(-)	296,20>170,45 (21)	296,20>252,45 (17)	296,20>278,40 (17)
D5-JA	(-)	214,30>61,95 (13)	214,30>42,05 (40)	
D2-JA-Ile	(+)	326,30>280,00 (-13)	326,30>151,2 (-15)	326,30>133,20 (-19)
D6-ABA	(-)	269,25>159,25 (12)	269,25>225,25 (15)	269,25>207,20 (22)
D4-SA	(-)	141,20>97,10 (21)	141,20>69,10 (31)	
<sup>13</sup> C6-IAA	(+)	182,05>136,05 (-16)	182,05>109,10 (-31)	182,05>81,10 (-43)

probíhala v módu selektivního záznamu více vybraných reakcí (MRM, *Multiple Reaction Monitoring*). U většiny analytů byly zaznamenávány 3 MRM přechody pro co nejspolehlivější určení identity analytu ve složité matici rostlinných pletiv. MRM přechody jsou uvedeny v Tab.1.

Surová data byla zpracována pomocí softwaru LabSolutions ver. 5,97 SP1. Data byla log-transformována a vyjádřena jako molární koncentrace analytů v rostlinných pletivech za pomoci MS Excel.

### **3.2.2.3 Statistická analýza výsledků LC-MS/MS**

Z výsledků měření byla provedena statistická analýza v programu Origin 2022. Homogenita rozptylu byla testována pomocí Brown-Forsythe testu a dále byla provedena one-way ANOVA s Tukey testem. Výsledky jsou prezentovány jako průměrné hodnoty  $\pm$  SD.

### **3.2.3 qPCR pro stanovení hladiny mRNA**

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR, *quantitative real-time polymerase chain reaction*) je v dnešní době jednou z nejpopulárnějších metod stanovení množství různých RNA. Tato metoda je používána především v diagnostice. Spolehlivost a reprodukovatelnost zcela závisí na podmínkách provedení experimentu a způsobu vyhodnocení výsledků, proto není možné zcela zobecnit popis této metody.

Kvantitativní real-time PCR je založena na klasické PCR s využitím speciálního termocykléru, který v průběhu PCR kontinuálně zaznamenává množství transkriptu. Pro monitorování průběhu qPCR se používají fluorescenční barviva, která můžeme rozdělit na nespecifická interkalační (např. SYBR Green) a specifická hybridizační (např. TaqMan). Při provedení reakce s mRNA je mRNA nejprve převedena na cDNA. Obvykle se tato metoda provádí v 96-ti jamkových destičkách a úroveň fluorescence je zaznamenávána v každé jamce zvlášť.

Vyhodnocení a analýza dat u qPCR probíhá na základě křivky tání a může dávat buď hodnoty „absolutní“, kdy získáme množství stanoveného transkriptu pomocí porovnání se standardní křivkou nebo „relativní“, kdy pouze porovnáme množství stanoveného transkriptu mezi dvěma typy vzorku (např. před a po ovlivnění).

Tato metoda byla použita pro měření exprese genů pro chitinasu I a proteasu (dionain), které je možné očekávat v poraněných pastech a popřípadě v poraněných asimilačních listech (Jakšová *et al.*, 2020). Cílem bylo zjistit, zda jsou geny pro tyto enzymy exprimovány i v neporaněných pastech a asimilačních listech díky meziorgánové komunikaci.

### **3.2.3.1 Příprava vzorků pro qPCR**

Příprava vzorků spočívala ve stimulaci listu a pasti pomocí jehly poškozením tak, že vždy byla poškozena buď past a asimilační část listu, na které se past nacházela byla netknutá nebo byla poškozena asimilační část listu a navazující past byla netknutá. Cílem bylo vyvolat tvorbu elektrických signálů a následnou aktivaci JA signální dráhy a expresi genů účastnících se jak trávení kořisti, tak v reakci rostliny na útok býložravce v pozorovaných částech rostliny mucholapky podivné. Pasti, respektive asimilační části listu byly v pravidelných 3 min rozestupech propichovány jehlou po dobu 1,5 h. Celkem tedy byly poraněny 30x. Následně byly stimulované rostliny ponechány 16 h přes noc při pokojové teplotě na okenním parapetu a následující den po stimulaci byly po vzorky odebrány tak, že past a asimilační část listu byly odděleny a ihned zmrazeny v tekutém dusíku. Tento časový bod byl vybrán na základě předchozí zkušenosti s dynamikou exprese u mucholapky podivné (Jakšová *et al.*, 2020). Připravené vzorky byly uloženy při -80 °C a následně využity pro analýzu fytohormonů.

Zmražené vzorky byly vždy po jednom homogenizovány ve třecí misce pomocí tloučku na suchém ledu v tekutém dusíku tak, aby nedošlo k jejich tání. Následně jsem navážila 50 -100 mg do 1,5 ml vychlazené eppendorfky, přidala jsem 500  $\mu$ l čerstvého lyzačního pufru, který byl připraven dle návodu v kitu Spectrum<sup>TM</sup> Plant Total RNA a promíchala pomocí vortexu. Takto připravené vzorky jsem dále použila pro izolaci RNA.

### **3.2.3.2 Izolace RNA pomocí kombinace komerčních kitů**

Nejprve byl pro izolaci RNA ze vzorků použit Spectrum<sup>TM</sup> Plant Total RNA kit. Jako první krok byl k lyzačnímu pufru, který byl součástí této komerční sady, přidán  $\beta$ -merkaptóetanol (10  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptóetanolu na každý 1 ml lyzačního pufru).  $\beta$ -merkaptóetanol rychle degraduje, proto se přidává do lyzačního roztoku až těsně před použitím. Použití mixu staršího než 1 den by mohlo způsobit snížení výtěžku RNA. Následně byl mix lyzačního pufru s  $\beta$ -merkaptóetanolem

rozpipetován do mikroskopických ke 100 mg vzorku po 0,5 ml na jednu mikroskopickou. Obsah byl promíchán pomocí vortexu po dobu 30 s a zahříván v termobloku při 56 °C, 3-5 min. Po inkubaci byl obsah mikroskopické centrifugován při 16000 g, po dobu 3 min, aby se oddělil pelet. Supernatant byl přepipetován na předpřipravené filtrační kolonky, vložené do čisté sběrné mikroskopické. Následovala opět centrifugace při 16000 g, po dobu 1 min, aby se odfiltroval případný zbylý pelet. Filtrační kolonky byly vyjmuty a do roztoku filtrátu bylo přidáno 0,5 ml vazebného roztoku. Roztok byl promíchán pomocí vortexu a přepipetován na předpřipravenou vazebnou kolonku v čistých sběrných mikroskopických. Následovala opět centrifugace při 16000 g, po dobu 1 min. Vzhledem k objemu roztoku filtrátu a vazebného pufru byl tento krok proveden dvakrát s tím, že filtrát byl odlit do odpadu, na kolonku byl nanesen zbylý roztok a proces byl zopakován. Sběrná kolonka byla následně promyta 0,5 ml promývacího roztoku 1, centrifugována při 16000 g, po dobu 1 min, filtrát byl odlit do odpadu a vazebná kolonka vrácena do sběrné mikroskopické. Následovalo promytí 0,5 ml promývacího roztoku 2, opět centrifugace při 16000 g po dobu 30 s, dekantace filtrátu a navrácení vazebné kolonky do sběrné mikroskopické. Promytí vazebné kolonky promývacím roztokem 2 bylo provedeno dvakrát. Následně byla vazebná kolonka ve sběrné mikroskopické centrifugována ještě jednou pro vysušení a vazebná kolonka byla přesunuta do čisté sběrné mikroskopické. Na kolonku bylo nanášeno 50 µl elučního roztoku a po 1 min byl vzorek na kolonce centrifugována při 16000 g po dobu 1 min. Eluát byl nanesen zpět na kolonku a opět centrifugován za stejných podmínek. Eluovaná RNA na dně mikroskopické byla uložena na ledu a následovalo pročištění a zakoncentrování pomocí RNA Clean and Concentrator™ kitu.

Pročištění a zakoncentrování RNA pomocí Clean and Concentrator™ kitu se skládá ze dvou částí. Nejprve byla vyizolovaná RNA ošetřena DNázou I, kdy k 40 µl vyeluované RNA bylo přidáno 5 µl DNA štěpného pufru a 5 µl DNasy I. Takto připravený roztok byl pomocí pipety promíchán a ponechán 15 min při pokojové teplotě. S takto připraveným vzorkem byla provedena druhá část RNA Clean and Concentrator™ kitu. K 50 µl vzorku ošetřeného DNázou I bylo přidáno 100 µl RNA vazebného pufru a vše bylo řádně promícháno. K tomuto objemu bylo připipetováno 150 µl 98% etanolu a celý obsah

**Tab. 2:** Tabulka zobrazuje použité primery, jejich teplotu tání ( $T_m$ ) a sekvenci.

<b>Název</b>	<b><math>T_m</math></b>	<b>Sekvence (5'-3')</b>
actin_F	63,9	TCTTTGATTGGGATGGAAGC
actin_R	64,1	CTCTCTGGAGGAGCAACCAC
dionain I_F	64,1	ATGGGGCGATGATGATCTTA
dionain I_R	64,2	CTTCTCCGCATCATCCTTGT
chitinasa I_F	64,0	GCTCTGCATTTACCCGTTTT
chitinasa I_R	64,8	ACAATGGAGCCAACATCACC

mikrozkumavky byl přesunut na Zymo-Spin<sup>TM</sup> IC Column kolonku umístěnou ve sběrné mikrozkumavce. Mikrozkumavky s kolonkou byly centrifugovány při 16000 g po dobu 30 s a filtrát byl odlit do odpadu. Na kolonku bylo nanášeno 400  $\mu$ l RNA přípravného pufru, vzorky na kolonce byly opět centrifugovány při 16000 g po dobu 30 s a filtrát byl odlit do odpadu. Následně bylo na kolonku nanášeno 700  $\mu$ l RNA promývacího pufru a následovala centrifugace po dobu 2 min při 16000 g. Odlití filtrátu do odpadu a opětovné nanášení 400  $\mu$ l RNA promývacího pufru na kolonku, centrifugace po dobu 2 min při 16000 g a nakonec ještě jedna centrifugace po dobu 2 min při 16000 g, aby se z kolonky odstředil případný zbylý RNA promývací pufr. Kolonky byly přesunuty do čisté mikrozkumavky bez RNáz a přímo na matrici kolonky bylo nanášeno 25  $\mu$ l ultračisté vody zbavené DNáz a RNáz. Následovala opětovná centrifugace při 10000 g po dobu 1 min. Výsledná eluovaná RNA byla uložena na ledu po nezbytně dlouhou dobu k přenesení k spektrofotometru NanoDrop<sup>TM</sup> 1000 a následně uložena při -80 °C.

Kontrola přítomnosti RNA byla provedena pomocí NanoDrop<sup>TM</sup> 1000. Dále byl pro přepis do cDNA použit iScript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit. Použité primery pro *dionain*, *chitinázu I* a referenční gen *actin* byly designovány v programu Primer3plus a jejich sekvence jsou uvedeny v Tab. 2. Roztok pro qPCR byl připraven podle návodu v Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) a pro samotnou qPCR byl použit program QuantStudio<sup>TM</sup> Design and Analysis spolu s přístrojem QuantStudio5. qPCR probíhala na 96-jamkových destičkách o objemu 0,1 ml s nespecifickým barvivem SYBR Green, během 40 cyklů. Výše popsáný postup je původně navržený tak, aby byl proveditelný i s náročným materiálem, jako je mucholapka podivná.

### 3.2.3.3 Izolace RNA pomocí alternativních metod

Druhou metodou využitou pro izolaci RNA z homogenizovaných vzorků mucholapky podivné byla modifikace fenol-chloroformové metody extrakce RNA využívající komerčně dostupné reagentie TRIzol<sup>®</sup> Reagent. Vzhledem k náročnosti materiálu byla tato metoda použita ve čtyřech kombinacích: čistě za použití s využitím TRIzol<sup>®</sup> Reagent a chloroformu dle protokolu designovaného pro huseníček rolní (*A. thaliana*), izolace RNA pomocí TRIzol<sup>®</sup> Reagent a chloroformu v kombinaci s Clean and Concentrator<sup>™</sup> kitem, izolace RNA pomocí TRIzol<sup>®</sup> Reagent a chloroformu v kombinaci s PureLink<sup>™</sup> RNA Mini Kitem a využití pouze PureLink<sup>™</sup> RNA Mini Kitu.

V případě první varianty, byla izolace prováděna v digestoři, kde byl povrch v pravidelných časových intervalech desinfikován 70% etanolem a následně i přípravkem RNaseZAP<sup>™</sup>, sloužícím k eliminaci RNáz. Do mikrozkuhavky s homogenizovaným vzorkem o hmotnosti 100 mg byl přidán 1 ml reagentie TRIzol<sup>®</sup> Reagent. Vzorek byl promíchán pomocí vortexu a skladován na ledu. Následně byly všechny vzorky ještě jednou promíchány pomocí vortexu a inkubovány po dobu 20 min při pokojové teplotě. Po skončení inkubace bylo přidáno 300  $\mu$ l chloroformu a roztok byl 20 s míchán pomocí vortexu. Následovala 20 min inkubace na ledu. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány po dobu 30 min, při 4 °C a 16000 g. Vzniklá vodná fáze byla napipetována do předpřipravených autoklávovaných mikrozkuhovek o objemu 1,5 ml s 600  $\mu$ l isopropanolu a takto připravené vzorky byly inkubovány přes noc při -20 °C.

Následující den byly vzorky centrifugovány 30 min, při 4 °C a 16000 g, a supernatant byl odlit do odpadu. Vzniklý pelet byl promyt 800  $\mu$ l 80% etanolu a následovala opět centrifugace vzorků po dobu 10 min při 4 °C a 16000 g a tekutý obsah mikrozkuhavky byl odlit do odpadu. Tento krok byl zopakován ještě jednou a po dokončení byly mikrozkuhavky ponechány v uzavřené digestoři dostatečně dlouho schnout, aby se veškerý zbylý ethanol vypařil. Již suchý pelet byl následně rozpuštěn v 40  $\mu$ l ultračisté vody zbavené DNáz a RNáz o teplotě 60 °C a následně byla provedena kontrola přítomnosti RNA pomocí spektrofotometru NanoDrop<sup>™</sup> 1000. Vzorky byly uloženy při -80 °C.

V případě druhé varianty, kdy byl kombinován TRIzol<sup>®</sup> Reagent s Clean and Concentrator<sup>™</sup> kitem byl postup obdobný až po přidání 300  $\mu$ l chloroformu

ke vzorku, kdy byl vzorek promíchán pomocí vortexu, následně inkubován po dobu 20 min na ledě a centrifugován 30 min při teplotě 4 °C a 16000 g. Následně však navazuje právě zmíněný Clean and Concentrator™ kit. Vzniklá vodná fáze byla přenesena do čisté mikrozkušavky a dále se pokračovalo dle protokolu TRIzol clean-up, Clean and Concentrator™ kitu. K vodné fázi získané pomocí TRIzol® Reagent bylo přidáno 150 µl 98% etanolu, takto vzniklý roztok byl přenesen na Zymo-Spin™ IC Column kolonku umístěnou ve sběrné mikrozkušavce. Vzorky na kolonkách byly centrifugovány při 16000 g po dobu 30 s a filtrát byl odlit do odpadu. Na kolonku bylo následně nanášeno 400 µl RNA přípravného pufru, mikrozkušavky s kolonkou byly centrifugovány při 16000 g po dobu 30 s a filtrát byl odlit do odpadu. Následně bylo na kolonku nanášeno 700 µl RNA promývacího pufru a opět proběhla centrifugace po dobu 2 min při 16000 g. Filtrát byl odlit do odpadu a na kolonku bylo opětovně nanášeno 400 µl RNA promývacího pufru, centrifugace po dobu 2 min při 16000 g a nakonec ještě jedna centrifugace po dobu 2 min při 16000 g, aby se z kolonky odstředil případný zbylý RNA promývací pufr. Kolonky byly přesunuty do čisté mikrozkušavky bez RNáz a přímo na matici kolonky bylo nanášeno 40 µl ultračisté vody zbavené DNáz a RNáz. Následovala opětovná centrifugace při 10000 g po dobu 1 min. Výsledný eluovaný roztok byl podroben DNáza I ošetření, kdy bylo k 40 µl eluátu přidáno 5 µl DNáza I a DNA štěpného pufru. Vše bylo promícháno a inkubováno 15 min při pokojové teplotě. Výsledné vzorky byly uloženy na ledu po nezbytně dlouhou dobu k přenesení k spektrofotometru NanoDrop™ 1000, kde byla ověřena přítomnost RNA a následně byly vzorky uloženy při -80°C.

Třetí variantou byla izolace RNA pomocí TRIzol® Reagent v kombinaci s přečištěním RNA PureLink™ RNA Mini Kitem. Postup izolace RNA pomocí reagentie TRIzol® Reagent byl opět obdobný až po přidání 300 µl chloroformu ke vzorku, kdy byl vzorek promíchán pomocí vortexu, následně inkubován po dobu 20 min na ledu a centrifugován 30 min při teplotě 4 °C a 16000 g. Následně byla odebraná vodná fáze použita pro navázání na postup u PureLink™ RNA Mini Kitu. K získané vodné fázi bylo přidáno 600 µl 100% etanolu, roztok byl promíchán pomocí vortexu a přepipetován na kolonku vloženou do sběrné mikrozkušavky. Následně byly vzorky na kolonkách centrifugovány po dobu 15 s při 12000 g a pokojové teplotě. Obsah sběrné mikrozkušavky byl vylit

do odpadu a kolonka byla vrácena zpět. Do stejné kolonky byl napipetován zbylý roztok a tento krok byl opakovaně prováděn do doby, než protekl veškerý tekutý obsah kolonky. Kolonka byla poté promyta promývacím pufrem I, centrifugována po dobu 15 s při 12000 g a pokojové teplotě. Kolonky byly přesunuty do čisté sběrné mikrozkušavky a následovalo druhé promytí promývacím pufrem II, centrifugace po dobu 15 s při 12000 g a pokojové teplotě. Takto bylo druhé promytí ještě jednou zopakováno.

Aby nedošlo ke kontaminaci vzorku, byly vzorky na kolonkách centrifugovány za účelem vysušení po dobu 1 min při 12000 g a pokojové teplotě a kolonky byly poté přesunuty do čisté 1,5 ml mikrozkušavky. Přímo na suchou kolonku bylo následně nanášeno 40  $\mu$ l ultračisté vody zbavené DNáz a RNáz a inkubace při pokojové teplotě po dobu 1 min. Centrifugací po dobu 2 min při 12000 g a pokojové teplotě byla následně eluována RNA. Takto získaná RNA byla podrobena DNáza I ošetření (postup podle Clean and Concentrator™ kitu). Výsledné vzorky byly uloženy na ledu po nezbytně dlouhou dobu k přenesení k spektrofotometru NanoDrop™ 1000, kde byla ověřena přítomnost RNA a následně byly vzorky uloženy při -80 °C.

Poslední z testovaných metod bylo využití pouze RNA PureLink™ RNA Mini Kitu. K již homogenizovanému vzorku bylo přidáno vhodné množství lyzačního pufru (na 100 mg vzorku 1 ml lyzačního pufru) s  $\beta$ -merkaptoethanolem (10  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoethanolu na každý 1 ml lyzačního pufru), vzorek byl promíchán pomocí vortexu a inkubován při pokojové teplotě po dobu 3 min. Po skončení inkubace byla odebrána tekutá fáze, ke které byl dle objemu přidán 98% etanol v objemu 1,5 x objem vzorku. Směs byla promíchána pomocí vortexu a přenesena na kolonku vloženou do sběrné mikrozkušavky. Následně byl vzorek centrifugován po dobu 15 s při 12000 g a pokojové teplotě. Obsah sběrné mikrozkušavky byl vylit do odpadu a kolonka byla vrácena zpět. Do stejné kolonky byl napipetován zbylý roztok a tento krok byl opakovaně prováděn do doby než protekl veškerý tekutý obsah kolonky. Dále metoda pokračuje stejně, jako ve třetí variantě. Výsledné vzorky byly taktéž uloženy na ledu po nezbytně dlouhou dobu k přenesení k spektrofotometru NanoDrop™ 1000, kde byla ověřena přítomnost RNA a následně byly vzorky uloženy při -80 °C.



## 4 VÝSLEDKY

Jak již název této diplomové práce napovídá, cílem praktické části je sledovat biofyzikální a biochemickou meziorgánovou komunikaci v masožravé rostlině mucholapce podivné. V této kapitole jsou prezentovány dosažené výsledky všech měření, či snahy o jejich dosažení.

Vzhledem k tomu, že je známo, že jednotlivé listy a pasti mucholapky podivné mezi sebou systémově elektricky nekomunikují (Pavlovič *et al.*, 2017), pozorování bylo zaměřeno na komunikaci mezi asimilační částí listu a navazující pastí. Nejprve byla měřena elektrická meziorgánová komunikace, neboť mucholapka podivná je známá především rychlostí, kterou je schopna elektrické signály přenášet. Jak již bylo v teoretické části popsáno, elektrické signály spouští JA signální dráhu. Proto byly kvantitativně měřeny fytohormony pomocí LC-MS/MS. Signální dráha JA vede v konečném důsledku k expresi genů pro trávicí enzymy, byla tedy měřena genová exprese v pasti a asimilační části listu pomocí qPCR.

### 4.1 Povrchové měření elektrických signálů Ag/AgCl elektrodou

Pro povrchové měření elektrických signálů byla použita vícekanálová aparatura podle Ilík *et al.* (2010). Nejprve byla měřena meziorgánová elektrická signalizace mezi pastí a asimilační částí listu, na kterém se past nacházela. Po vyhodnocení výsledků z kvantitativního měření fytohormonů pomocí LC-MS/MS byla provedena doplňková měření elektrických signálů v pasti mucholapky podivné nejprve po předchozím poranění (16 h před samotným měřením) a následně i po aplikaci 50  $\mu\text{M}$  ABA na celou rostlinu (aplikace ABA provedena 24 h před samotným měřením).

#### 4.1.1 Paralelní měření elektrické meziorgánové komunikace mezi pastí a asimilační částí listu mucholapky podivné

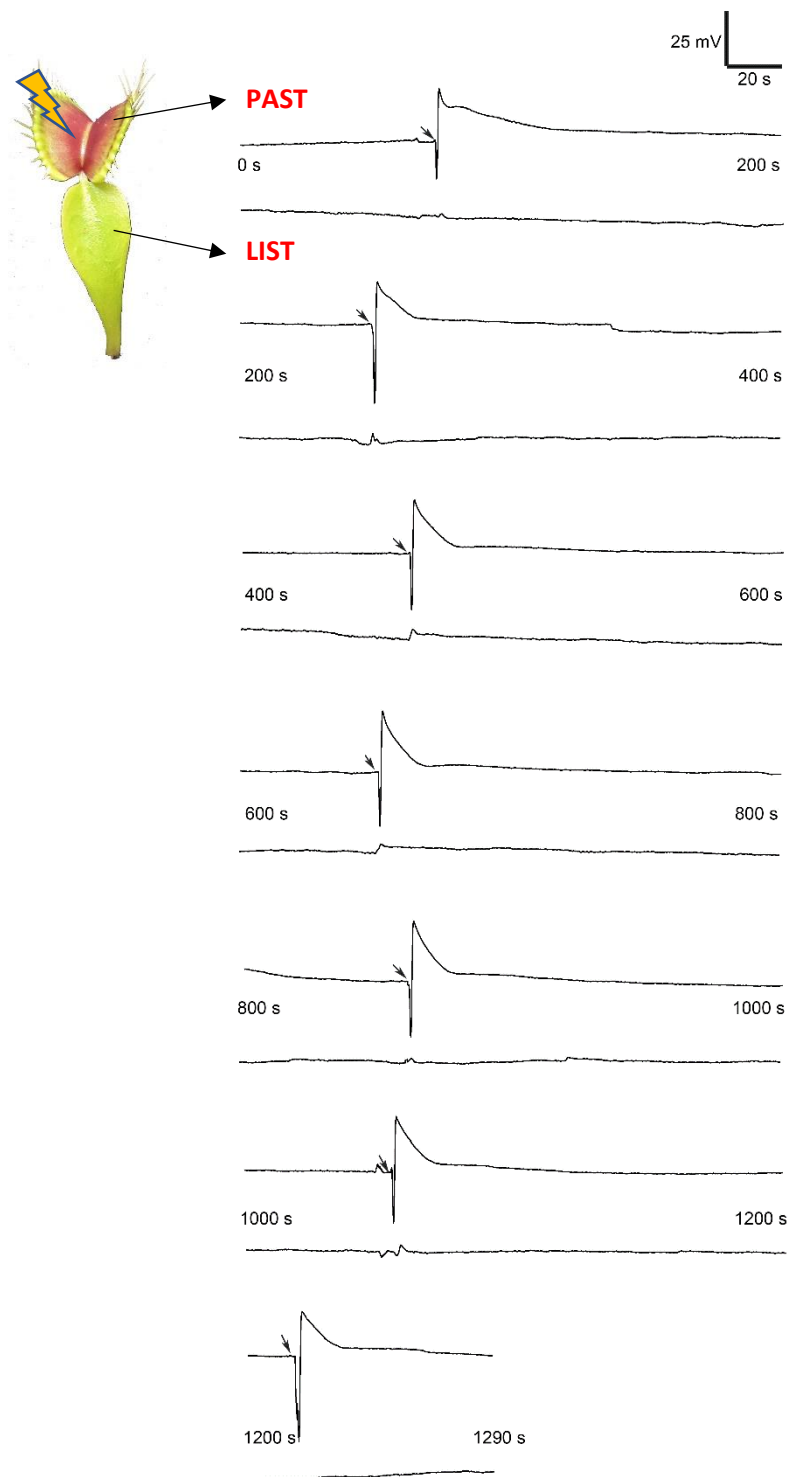
Nejprve byla měřena elektrická signalizace paralelně na pasti a asimilační části listu na kterém se past nacházela. Cílem tohoto měření bylo zjistit, zda AP generovaný poškozením pasti vyvolá elektrický signál v asimilační části listu a naopak, zda akční potenciál iniciovaný poškozením asimilační části listu vyvolá elektrický signál v nepoškozené pasti. Poškození bylo provedeno vpichem jehly do předem zvolené části listu mucholapky podivné a signál byl měřen po dobu 491 s, každých 30 ms.

Záznam změny elektrického potenciálu na obr. 5 byl získán složením záznamů paralelního měření pasti a asimilační části listu. V tomto případě byla jehlou poškozována předem uzavřená past. Na obr. 5 je okamžik poškození značen šipkou. Past byla předem uzavřena stimulací mechanosenzitivních výběžků, z důvodu stability signálu, pokud by se past během měření vlivem indukce elektrických signálů poškozením uzavřela, elektroda by se odpojila, ztratila kontakt a měření by muselo být přerušeno. Jak je z paralelního záznamu patrné, past na poškození jehlou reagovala změnou elektrického potenciálu, kterou je možné popsat jako AP vzhledem k průběhu záznamu (obr. 5). AP je charakteristický rychlou depolarizací a rychlou repolarizací plasmatické membrány. Kdežto v asimilační části listu ke změně elektrického potenciálu nedošlo. Drobný šum na záznamu elektrického potenciálu asimilační části listu v čase poškození pasti je způsoben manipulací s rostlinou.

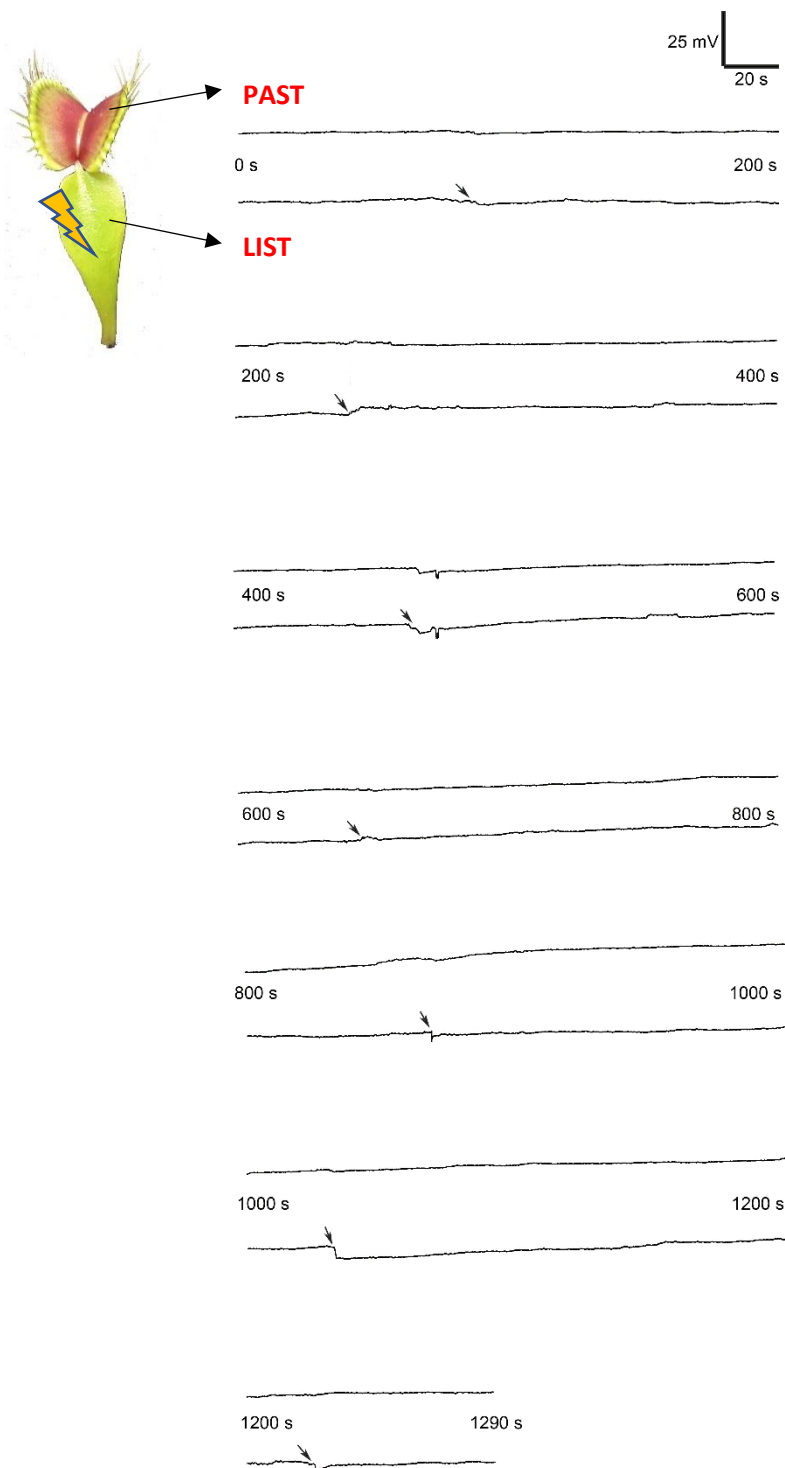
Záznam změny elektrického potenciálu na obr. 6 byl opět získán složením záznamů paralelního měření pasti a asimilační části listu. Tentokrát však byla jehlou poškozována asimilační část listu. Na obr. 6 je čas poškození značen šipkou. Past byla opět předem uzavřena stimulací mechanosenzitivních výběžků, ze stejného důvodu jako v předchozím případě. Tento záznam přinesl zjištění, že samotná asimilační část listu nereaguje na poškození indukci výrazných elektrických signálů a v měřené pasti na konci tohoto listu taktéž nebyla naměřena žádná změna elektrického potenciálu. Drobný šum na záznamu elektrického potenciálu pasti v čase poškození asimilační části listu je způsoben manipulací s rostlinou.

Ze získaných záznamů změny elektrického potenciálu vyplývá, že past je schopna tvořit elektrický signál, konkrétně akční potenciál, po poškození. Tento elektrický signál se však nešíří do asimilační části listu, na které se past nachází. A to i přesto, že by se takovéto šíření elektrického potenciálu dalo předpokládat, vzhledem k propojení poškozené pasti a asimilační část listu primární žilnatinou, jak je známo u běžných rostlin.

Dále ze záznamu změny elektrického potenciálu na obr. 6, kdy byla poškozována asimilační část listu vyplývá, že asimilační část listu nejspíš není schopna tvořit AP ani VP. Meziorgánová elektrická signalizace tedy mezi pastí a asimilační částí listu mucholapky podivně neprobíhá ani jedním směrem.



**Obr. 5:** Záznam elektrických signálů měřených pomocí vícekanálové aparatury pro povrchové měření elektrických signálů podle Ilík *et. al* (2010). Oba záznamy byly naměřeny během 1290 s, přičemž horní záznam označený jako „PAST“ i spodní záznam označený jako „LIST“ byly měřeny současně, a proto jsou umístěny nad sebou. Na jednu elektrodu byla připojena past a na druhou elektrodu asimilační část listu, na které se pas nacházela. Poraněna byla past, jak znázorňuje piktogram blesku. Na záznamu elektrody umístěné na pasti můžeme pozorovat akční potenciál. Na záznamu elektrody umístěné na asimilační části listu nepozorujeme žádný elektrický signál. Reprezentativní záznam je složený ze 3 měření. Šipka označuje poranění pomocí jehly.

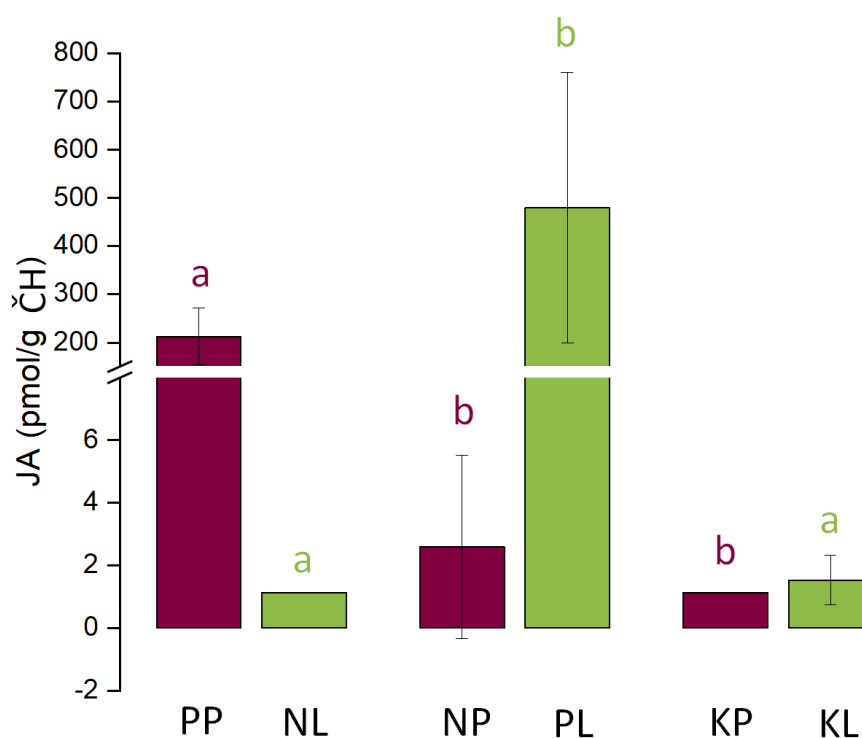


**Obr. 6:** Záznam elektrických signálů měřených pomocí vícekanálové aparatury pro povrchové měření elektrických signálů podle Ilík *et. al* (2010). Oba záznamy byly naměřeny během 1290 s, přičemž horní záznam označený jako „PAST“ i spodní záznam označený jako „LIST“ byly měřeny současně, a proto jsou umístěny nad sebou. Na jednu elektrodu byla připojena past a na druhou elektrodu asimilační část toho stejného listu, na které se past nacházela. Poraněna byla asimilační část listu, jak znázorňuje piktogram blesku. Jak na záznamu elektrody umístěné na pasti, tak na záznamu elektrody umístěné na asimilační části listu nepozorujeme žádný elektrický signál. Reprezentativní záznam je složený ze 3 měření. Šipka označuje okamžik poranění pomocí jehly.

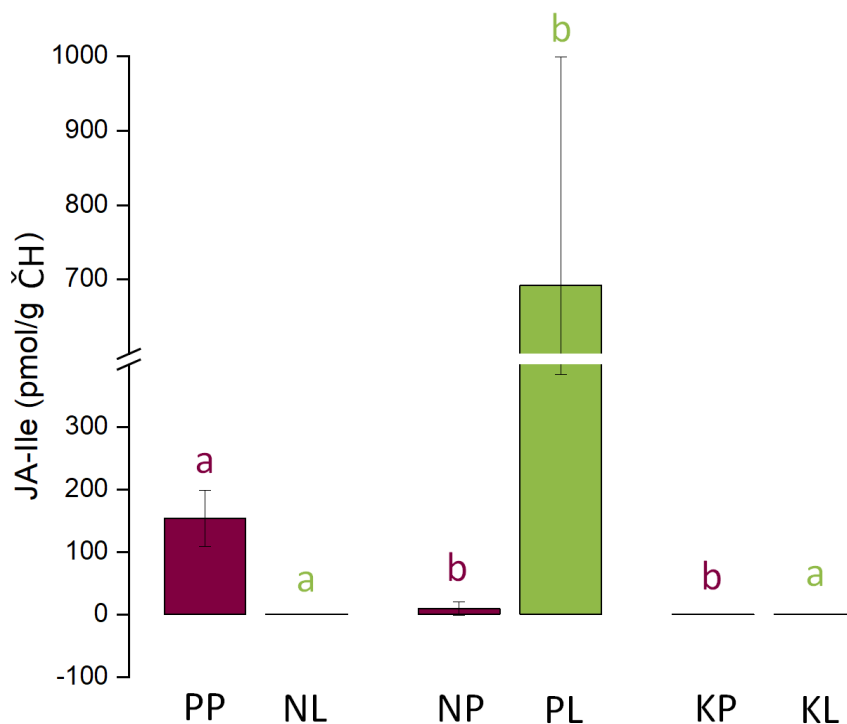
## 4.2 LC-MS/MS

Elektrické signály vyvolávají aktivaci dráhy JA. Analýza LC-MS/MS byla tedy provedena za účelem kvantifikace fytohormonů, především jasmonátů v mucholapce podivné po poranění. Při porovnání experimentálních vzorků s kontrolou je v případě JA, JA-Ile jasně patrné, že se hromadí pouze v poškozené části rostliny (Obr. 7 a 8). Prekurzor *cis*-OPDA již tak jednoznačné výsledky nemá. V případě poranění pasti se *cis*-OPDA nehromadilo ani v samotné poraněné pasti, ani v asimilační části listu. V asimilační části listu byla jeho koncentrace v porovnání s kontrolou dokonce snížena. V případě poškození asimilační části listu byla koncentrace *cis*-OPDA v poraněné části listu zvýšená oproti kontrole, avšak s velkým rozptylem hodnot (Obr. 9).

Kvantitativní analýza IAA ukazuje, že koncentrace tohoto fytohormonu se v žádném z případů nemění (Obr. 10). Stejně tak kvantitativní analýza SA,



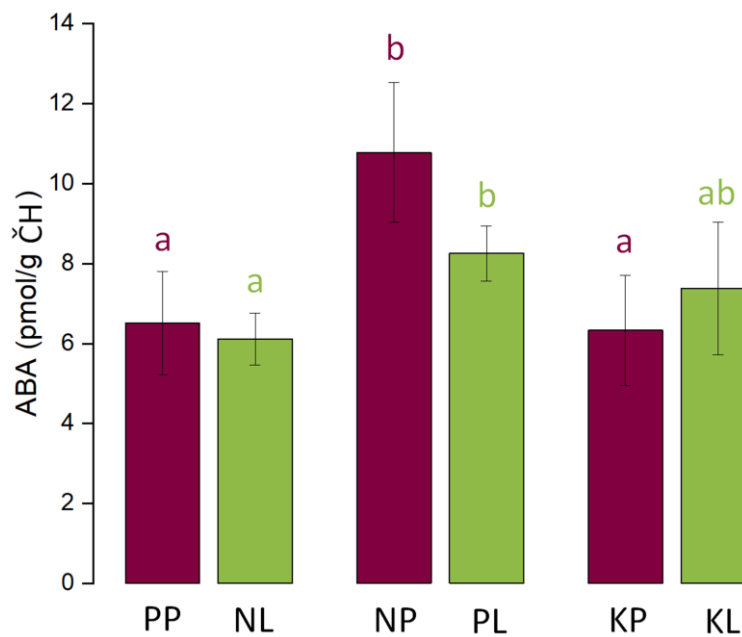
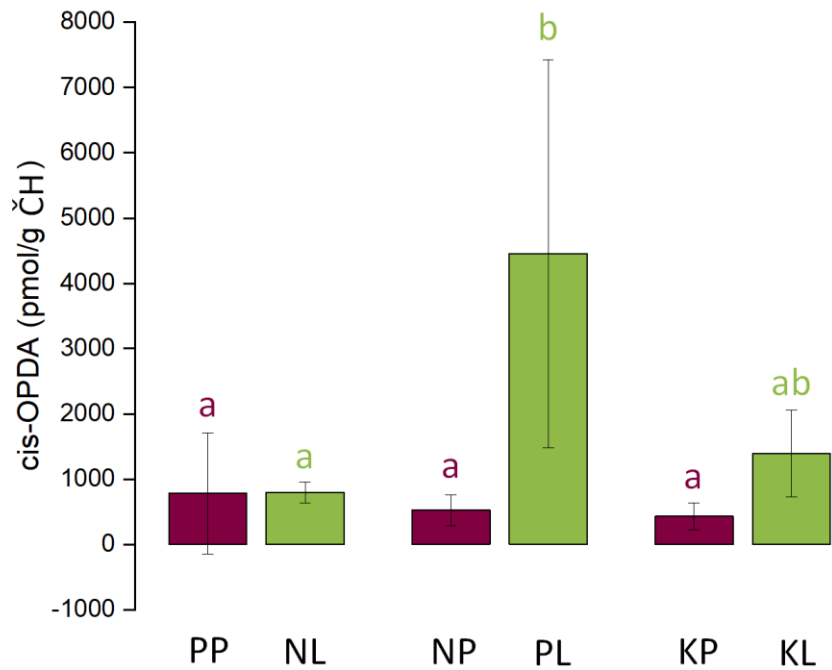
**Obr. 7:** Akumulace kyseliny jasmonové (JA) v lokálních poškozených a systémových pastech (fialová) a v lokálně poškozených a systémových asimilačních částech listu (zelená), 1,5 h od prvního poškození v mucholapce podivné (*Dionaea muscipula*). (PP) poraněná past, (NL) systémový asimilační list, (NP) systémová past, (PL) poraněný asimilační list, (KP) kontrolní past, (KL) kontrolní asimilační list. Naměřené hodnoty  $\pm$  SD,  $n = 4$ , statistická analýza byla provedena pomocí one-way ANOVA s následným Tukey testem. Signifikantní rozdíly jsou znázorněny odlišnými písmeny na hranici průkaznosti  $P < 0,05$ . Jednotlivé skupiny podrobené statistické analýze jsou barevně odlišeny: fialová, zelená.



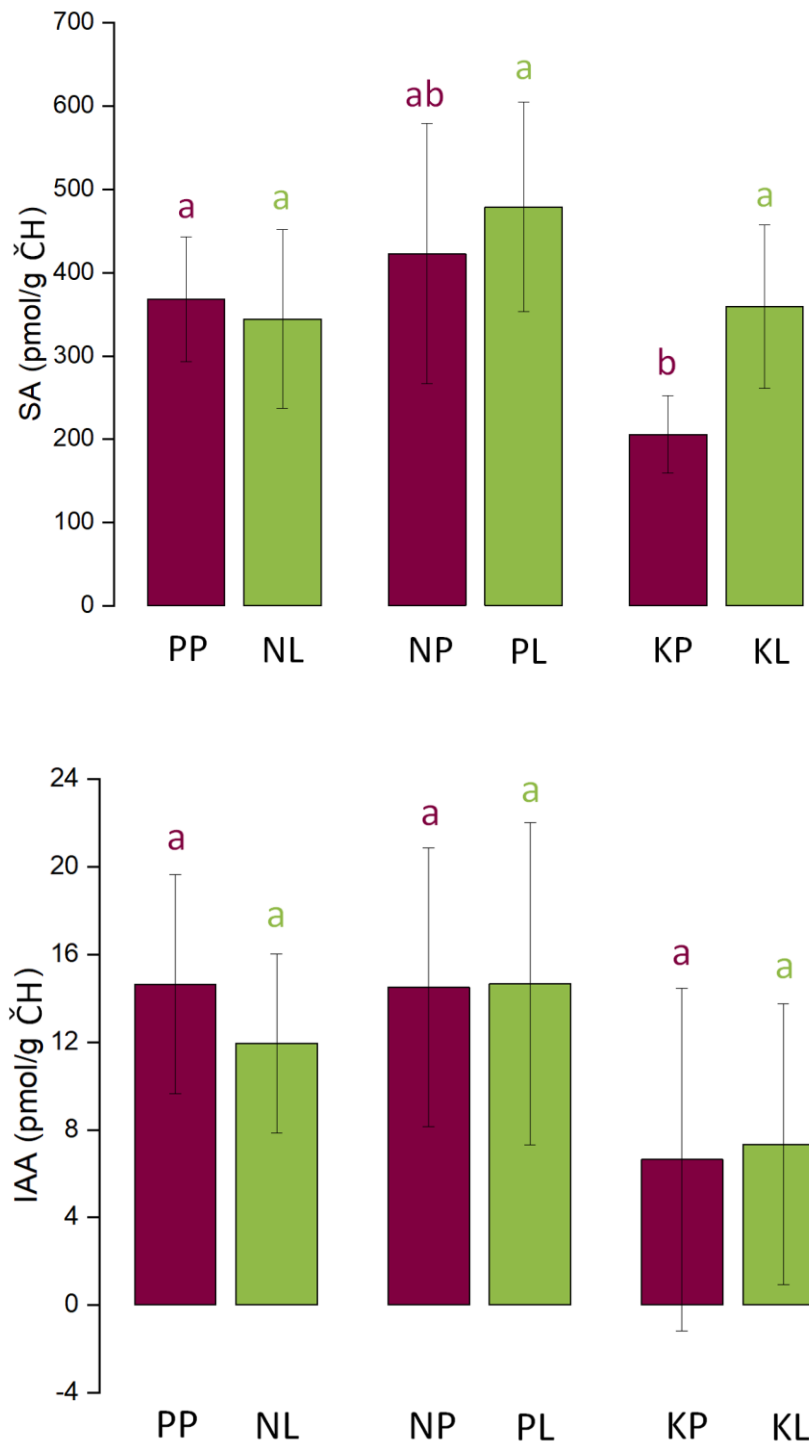
**Obr. 8:** Akumulace isoleucin jasmonátu (JA-Ile) v lokálních poškozených a systémových pastech (fialová) a v lokálně poškozených a systémových asimilačních částech listu (zelená), 1,5 h od prvního poškození v mucholapce podivné (*Dionaea muscipula*). (PP) poraněná past, (NL) systémový asimilační list, (NP) systémová past, (PL) poraněný asimilační list, (KP) kontrolní past, (KL) kontrolní asimilační list. Naměřené hodnoty  $\pm$  SD,  $n = 4$ , statistická analýza byla provedena pomocí one-way ANOVA s následným Tukey testem. Signifikantní rozdíly jsou znázorněny odlišnými písmeny na hranici průkaznosti  $P < 0,05$ . Jednotlivé skupiny podrobené statistické analýze jsou barevně odlišeny: fialová, zelená.

kde se mění její koncentrace pouze v případě poraněné pasti. Při poranění asimilační části listu můžeme pozorovat mírné zvýšení koncentrace SA i v neporaněné pasti, vzhledem k velkému rozptylu naměřených hodnot však není výsledek statisticky průkazný (Obr. 10).

Zajímavý výsledek nabízí kvantitativní analýza ABA (Obr. 9), kde je možné pozorovat, že při poranění asimilační části listu se ABA akumuluje jak v samotné poraněné části, tak i v pasti, kdežto při poranění pasti se ABA nehromadí ani v poraněné pasti, ani v navazující asimilační části listu. Zajímavé je pozorování, kdy 16 hodin od opakovaného poranění asimilačního listu, strácí příslušná past schopnost reagovat na mechanické podněty svým rychlým zavřením. Tento fenomén byl zkoumán v další části.



**Obr. 9:** Akumulace kyseliny *cis*-12-oxofytodienové (*cis*-OPDA) a kyseliny abscisové (ABA) v lokálních poškozených a systémových pastech (fialová) a v lokálně poškozených a systémových asimilačních částech listu (zelená), 1,5 h od prvního poškození v mucholapce podivné (*Dionaea muscipula*). (PP) poraněná past, (NL) systémový asimilační list, (NP) systémová past, (PL) poraněný asimilační list, (KP) kontrolní past, (KL) kontrolní asimilační list. Naměřené hodnoty  $\pm$  SD,  $n = 4$ , statistická analýza byla provedena pomocí one-way ANOVA s následným Tukey testem. Signifikantní rozdíly jsou znázorněny odlišnými písmeny na hranici průkaznosti  $P < 0,05$ . Jednotlivé skupiny podrobené statistické analýze jsou barevně odlišeny: fialová, zelená.

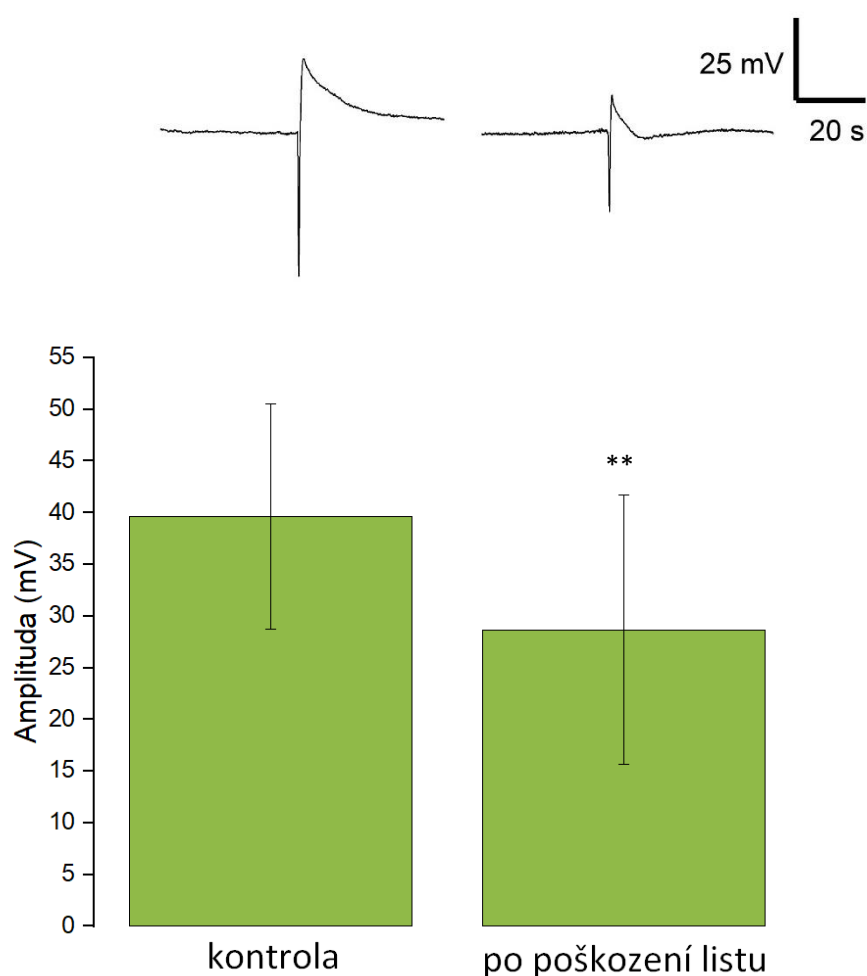


**Obr. 10:** Akumulace kyseliny salicylové (SA) a kyseliny indol-3-octové (IAA) v lokálních poškozených a systémových pastech (fialová) a v lokálně poškozených a systémových asimilačních částech listu (zelená), 1,5 h od prvního poškození v mucholapce podivné (*Dionaea muscipula*). (PP) poraněná pasta, (NL) systémový asimilační list, (NP) systémová pasta, (PL) poraněný asimilační list, (KP) kontrolní pasta, (KL) kontrolní asimilační list. Naměřené hodnoty  $\pm$  SD,  $n = 4$ , statistická analýza byla provedena pomocí one-way ANOVA s následným Tukey testem. Signifikantní rozdíly jsou znázorněny odlišnými písmeny na hranici průkaznosti  $P < 0,05$ . Jednotlivé skupiny podrobené statistické analýze jsou barevně odlišeny: fialová, zelená.



### 4.3 Ovlivnění amplitudy AP po poškození asimilační části listu, nebo ošetření pasti roztokem ABA

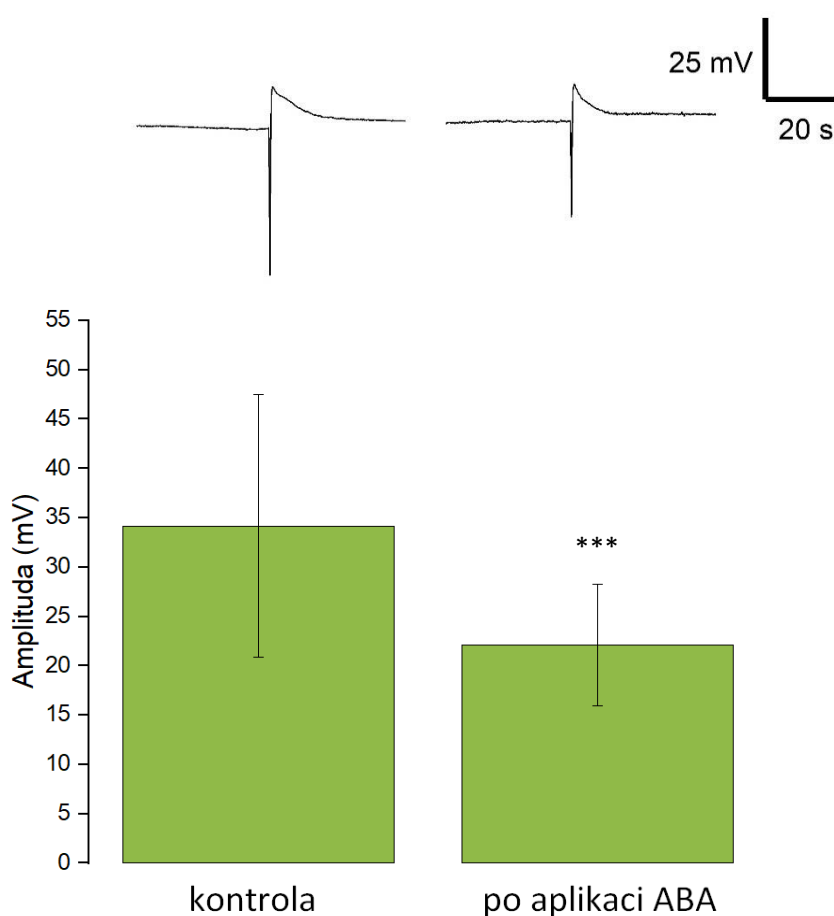
Jelikož poškození asimilační části listu vedlo na druhý den k celkovému nebo částečnému znecitlivění pasti, nabízela se otázka, jestli za tím stojí inhibice elektrické signalizace nebo inhibice mechanismu zavírání pasti. Při měření elektrických signálů, při kterém byla měřena amplituda AP v pasti na konci asimilační části listu, která byla 16 h před měřením opakovaně poškozena (Obr. 11) stejným způsobem jako v předchozím experimentu, byla naměřena snížená amplituda AP v porovnání s kontrolou, jak je možné vidět



**Obr. 11:** Záznam doplňkového měření amplitudy AP v pasti na konci asimilační části listu, která byla 16 h před měřením poškozena. (nahore) Porovnání naměřených AP v pasti po mechanické stimulaci senzitivních výběžků uvnitř pasti na konci nepoškozené kontrolní asimilační části listu (vlevo) a na konci poškozené asimilační části listu (vpravo). Zobrazen je reprezentativní AP z  $n = 19 - 22$ . (dole). Statistické vyhodnocení naměřených hodnot velikosti amplitudy u kontrolních a poškozených rostlin. Naměřená hodnota  $\pm$  SD,  $n = 19 - 22$ , statistická analýza byla provedena pomocí t-testu s nerovností rozptylu. Signifikantní rozdíly jsou znázorněny \*\* na hranici průkaznosti  $P < 0,01$ .

na reprezentativních záznamech z povrchového měření změny elektrického potenciálu na obr. 11. Výsledek měření byl potvrzen statistickou analýzou, která potvrdila statisticky významný rozdíl mezi velikostí amplitudy AP u kontrolních rostlin a rostlin po poškození asimilační části listu. U poškozených rostlin byly čepele pastí na konci poškozené asimilační části listu konkávně prohnuté. Po stimulaci mechanosenzitivních výběžků uvnitř těchto pastí se navíc zavíraly velmi pomalu nebo se nezavíraly vůbec.

Jelikož z výsledků analýz fytohormonů poškozené asimilační části listu vyplývá zřejmý systémový nárůst koncentrace pouze v případě ABA, byl otestován účinek exogenní aplikace 50  $\mu\text{M}$  ABA na velikost amplitudy (Obr. 12).



**Obr. 12:** Záznam doplňkového měření amplitudy AP v pasti na konci asimilační části listu, na kterou byl 24 h před měřením aplikován 50  $\mu\text{M}$  roztok ABA. (nahore) Porovnání naměřených AP v pasti po mechanické stimulaci senzitivních výběžků uvnitř pasti na konci neošetřené kontrolní asimilační části listu (vlevo) a na konci asimilační části listu po aplikaci roztoku ABA (vpravo). Zobrazen je reprezentativní AP z  $n = 23 - 26$ . (dole). Statistická analýza naměřených hodnot velikosti amplitudy u kontrolních rostlin a rostlin po aplikaci roztoku ABA. Naměřená hodnota  $\pm$  SD,  $n = 23 - 26$ , analýza rozptylu byla provedena pomocí t-testu s nerovností rozptylu. Signifikantní rozdíly jsou znázorněny \*\*\* na hranici průkaznosti  $P < 0,001$ .

Statistická analýza i zde potvrdila statisticky významný rozdíl ve velikosti amplitudy mezi kontrolními pastmi a pastmi ošetřenými roztokem ABA. Avšak pasti ošetřené roztokem ABA, na rozdíl od pastí na poškozených asimilačních listech, reagovaly na mechanické podráždění citlivých výčnělků jako pasti kontrolních rostlin mucholapky podivné. Z toho vyplývá, že akumulace ABA vede k inhibici amplitudy AP, ale není zodpovědná za necitlivost pastí, na které se spíše podílí mechanismus zavírání pastí.

#### **4.4 Optimalizace protokolu izolace RNA z mucholapky podivné pro qPCR**

I přes to, že byla kombinace kitů Spectrum<sup>TM</sup> Plant Total RNA kit a RNA Clean and Concentrator<sup>TM</sup> navržena tak, aby bylo možné izolovat RNA i z tak náročného materiálu, jako je mucholapka podivná, došlo k prvním potížím již při použití kitu Spectrum<sup>TM</sup> Plant Total RNA kit. V kroku, kdy bylo přidáno 0,5 ml vazebného roztoku k filtrátu v mikrozkuhavce, se po promíchání pomocí vortexu tvořily kuličky gelové struktury na dně sběrné mikrozkuhavky. Tyto gelové kuličky byly přeneseny na vazebné kolonky a postup prozatím nebyl měněn. U některých vazebných kolonek docházelo k zadržení části vzorku, a bylo tak nutné některé kolonky centrifugovat opakovaně. Vzhledem k tomu, že navržený postup při dřívějším použití vedl k úspěšné izolaci RNA, zatím nedošlo k jeho optimalizaci. Na kit určený k izolaci RNA bylo navázáno kitem RNA Clean and Concentrator<sup>TM</sup>, který slouží k pročištění a zakoncentrování izolované RNA. Po měření pomocí NanoDrop<sup>TM</sup> 1000 zařazeného pro ověření přítomnosti RNA před samotnou qPCR bylo zjištěno, že vzorek neobsahuje téměř žádnou RNA a protokol byl tedy následovně upraven:

1. Lyzační roztok s  $\beta$ -merkptoethanolem byl obohacen o 2% polyvinylpolypyrrolidon (PVPP), který váže sekundární metabolity a mohl by tak zabránit ucpání kolonky.
2. Bylo sníženo množství vzorku ze 100 mg na 50 mg.
3. Po homogenizaci materiálu byl přidán dvojnásobný objem lyzačního roztoku (místo 500  $\mu$ l byl použit 1 ml).
4. Při použití Spectrum<sup>TM</sup> Plant Total RNA kitu bylo na kolonku s navázanou RNA přidáno 500  $\mu$ l etanolu a následovala centrifugací 1 min při 16000 g.

5. Byl zvýšen počet kroků s promývacím pufrem ze 2 na 3.

V případě Spectrum™ Plant Total RNA kitu se po provedení úprav již netvořily gelové kuličky na dně sběrné zkumavky a po přidání kroku s etanolem (4.) po navázání RNA na kolonku, protekl kolonkou veškerý obsah. Gelové kuličky se tentokrát vysrážely až při použití RNA Clean and Concentrator™ kitu po inkubaci s DNázou I. Následovalo opět měření pomocí spektrofotometru NanoDrop™ 1000 a vzhledem k celkem uspokojivým výsledkům následoval prepis RNA do cDNA u vybraných vzorků s nejvyšší koncentrací RNA za pomoci iScript™ cDNA Synthesis Kitu a postup na Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) a samotnou qPCR (40 cyklů) na 96-jamkových destičkách o objemu 0,1 ml za použití programu QuantStudio™ Design and Analysis spolu s přístrojem QuantStudio5. Výsledky vyšly opět rozporuplné. Naměřené hodnoty nebyly stabilní u regenerčního genu (*actin*) ani u genu pro *chitinasu I* a *dionain* ve vzorcích, kde lze expresi těchto genů očekávat, tedy ve vzorcích získaných z poškozených pastí.

Pro třetí pokus byl proto zvolen nový postup pro izolaci RNA a to pomocí metody fenol-chloroformové metody s využitím reagentie TRIzol® Reagent spolu s PureLink™ RNA Mini Kitem v několika kombinacích, jak bylo popsáno v kapitole „Metody“.

Byly připraveny čerstvé vzorky dle popsaného postupu, pouze s tím rozdílem, že pasti ani listy nebyly poškozeny. Vzorky měřené pomocí spektrofotometru NanoDrop™ 1000 z kombinace využití TRIzol® Reagent s přečištěním RNA PureLink™ RNA Mini Kitem byly zcela bez RNA, tento postup byl tedy ihned vyloučen, navíc u této varianty docházelo po přidání 100% etanolu k vodné fázi získané pomocí TRIzol® Reagent k tvorbě bílé sraženiny. Výsledky za použití pouze PureLink™ RNA Mini Kitu měly velmi nízký výtěžek RNA a zároveň velmi vysoké znečištění, tento postup byl tedy také vyloučen.

Nejslibněji se jevílo využití reagentie TRIzol® Reagent pro izolaci RNA a dále postupovat stejně jako v původním protokolu a navázat RNA Clean and Concentrator™ kitem. Po izolaci RNA za použití TRIzol® Reagent byla získána RNA o vysoké koncentraci, stále však velmi znečištěná a následovalo přečištění pomocí RNA Clean and Concentrator™ kitu. Paralelně byla testována i varianta za použití fenol-chloroformové metody s reagentií TRIzol® Reagent a vzorky z obou navržených postupů, byly následně měřeny pomocí přístroje

spektrofotometrem NanoDrop™ 1000 společně. Výsledky z kontrolního měření ovšem vyšly opět znepokojivé, neboť koncentrace RNA u obou skupin vzorků byla naměřena nulová. A obě metody byly tedy vyloučeny.

Bohužel se nepodařilo vyizolovat RNA z mucholapky podivné žádným z výše uvedených postupů a vzhledem k absenci vzorků pro qPCR, nebyla qPCR uskutečněna s výsledkem vhodným k prezentaci v této diplomové práci.

## 5 DISKUSE

Mucholapka podivná si vyvinula schopnost lapit hmyz mechanismem, který je pravděpodobně evolučně odvozený ze signální dráhy obrany před býložravými organismy (Pavlovič a Mithöfer, 2019). V nemasožravých rostlinách dochází při poškození listů k indukci VP, čímž se aktivuje JA signální dráha nejen v místě poranění, ale i v odlehlých částech rostliny díky šíření elektrických a chemických signálů na dlouhou vzdálenost (Koo *et al.*, 2009; Mousavi *et al.*, 2013; Toyota *et al.*, 2018). V mucholapce podivné systémová odpověď však nebyla zaznamenána ani v odpovědi na poranění, ani krmení hmyzem, oba stimuly generují stejné lokální AP (Pavlovič *et al.*, 2017). Vzhledem k tomu, že mucholapka podivná využívá AP k lapení kořisti a tím k doplnění potřebných živin, nabízí se otázka, zda AP generované poškozením listu je mucholapkou podivnou rozpoznáno jako signál k zavření pasti nebo k aktivaci obranné reakce. A navíc, zda se AP generované stimulací mechanosenzitivních výběžků uvnitř pasti mucholapky podivné šíří alespoň do asimilační části téhož listu a vyvolává případnou odpověď, či nikoli. Mucholapka je unikátní tím, že při poškození generuje AP místo VP, který je typickým elektrickým signálem při mechanickém poškození.

Cílem praktické části této diplomové práce bylo sledovat biofyzikální a biochemickou meziorgánovou komunikaci v mucholapce podivné, která se jeví jako vhodný experimentální objekt. Lokální a systémová elektrická signalizace mezi pastmi této masožravé rostliny v odpovědi na lapení kořisti byla již dříve sledována v práci Pavlovič *et al.* (2017), kde bylo po mechanické stimulaci mechanosenzitivních výběžků v pasti mucholapky podivné pomocí hmyzu naměřeno velké množství AP v lokální pasti a žádné AP v pasti systémové. Tento experiment byl opakován několikrát se stejným výsledkem, elektrický signál se z lokální stimulované pasti do ostatních systémových pastí nešíří, což je v kontrastu se systémovým šířením elektrických signálů po poranění v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* (Mousavi *et al.*, 2013). V rámci výzkumu pro vypracování této diplomové práce byla tedy konkrétně sledována meziorgánová komunikace v odpovědi na poranění mezi pastí a asimilační částí listu mucholapky podivné. Nejprve byly paralelně povrchově měřeny elektrické signály v pasti a asimilační části listu. Vzhledem k výsledkům měření, je patrné,

že se elektrické signály generované v pasti v odpovědi na poranění nepřenáší ani do asimilační části listu mucholapky podivné. Tento výsledek je v souladu s pracemi Volkov *et al.* (2007, 2008, 2013), kde AP indukované tentokrát mechanickou stimulací v pasti do asimilační části listu také neprošli. Je tedy možné tvrdit, že tyto dvě části listu mucholapky podivné nejsou navzájem elektricky propojené bez ohledu na druh podnětu jsou elektricky nezávislé.

Elektrická signalizace u mucholapky podivné slouží k lapení kořisti, zdá se tedy logické, že by byla tato signalizace omezena pouze na stimulovanou past. Vzhledem k energetické náročnosti produkce trávicích enzymů by bylo pro mucholapku podivnou velmi nevýhodné, kdyby se při lapení kořisti jednou pastí, zavřely i všechny ostatní pasti na rostlině a začaly produkovat trávicí enzymy. I LC-MS/MS kvantitativní analýza fytohormonů JA a JA-Ile v této diplomové práci potvrzují absenci systémové odpovědi a tedy i absenci JA a JA-Ile meziorgánové komunikace v mucholapce podivné. Escalante-Peréz *et al.* (2011) však ve své práci tvrdí, že v mucholapce podivné existuje meziorgánová komunikace v podobě jasmonátů hromadících se v systémových pastech po aplikaci 1mM coronatinu na lokální past. Coronatin je strukturně podobný JA-Ile a je jejím molekulárním agonistou, čímž se snažili v pasti simulovat aktivaci signální dráhy kyseliny jasmonové. Po 3-24 h od aplikace naměřili zvýšenou koncentraci *cis*-OPDA v systémové pasti. Autoři tohoto experimentu výsledky interpretovali jako existenci jasmonátové systémové odpovědi. Lapení jedné kořisti dle autorů článku vede k tvorbě *cis*-OPDA a jeho transportu do systémových pastí mucholapky podivné, které jsou pak předpřipravené na potenciální příchod další kořisti. Experimenty tohoto typu se v minulosti často používaly pro interpretaci výsledku endogenně akumulovaných jasmonátů, byly však již v době svého vzniku hojně kritizovány (Koo a Howe, 2009). Takto popsaná systémová odpověď zatím nebyla pozorována přirozeně po stimulaci mechanosenzitivních výběžků ani po poranění a tedy u přirozeně se akumulujících jasmonátů (Pavlovič *et al.*, 2017). Neschopnost mucholapky podivné rozeznat poškození od mechanické stimulace mechanosenzitivních výběžků v pasti je dána evolučně, odvozením schopnosti rozpoznat přítomnost kořisti a jejího lapení od reakce rostliny na poškození býložravcem (Pavlovič *et al.*, 2017).

I přesto, že se na úrovni JA meziorgánová komunikace mezi pastí a asimilační částí listu nepotvrdila, výsledky analýzy fytohormonu ABA by mohly podpořit existenci komunikace mezi pastí a asimilační částí listu mucholapky podivné. Fytohormon ABA reguluje otevřenost průduchů a tím vodní režim rostliny, čímž se podílí na ochraně rostlin před nedostatkem vody. Escalante-Peréz *et al.* (2011) ve své práci tvrdí, že vzhledem k tomu, jak je trávení kořisti v lokální pasti náročné na množství vody sekretované v trávicí tekutině, reguluje mucholapka citlivost svých pastí pomocí ABA. Jestli byly mucholapky vystaveny suchu a akumulovaly ABA endogenně, nebo byly vystaveny exogenní aplikaci 50  $\mu\text{M}$  ABA vede dle autorů v obou případech ke znečitlivění pasti vůči stimulaci mechanosenzitivních výběžků a je tedy nutný větší počet doteků k rychlému uzavření této pasti. Autoři na základě toho předpokládali, že ABA snižuje amplitudu AP, což má za následek právě potřebu více doteků citlivých výběžků k uzavření pasti než v pastech nestresovaných. Vlivem působení ABA je tedy dle Escalante-Peréz *et al.* (2011) ovlivněna schopnost pasti rozeznat kořist a uzavřít se. Z LC-MS/MS měření prezentovaných v této diplomové práci vyplývá, že se v případě poranění asimilační části listu zvyšuje koncentrace ABA i v neporaněné pasti a na druhý den schopnost pasti odpovědět na mechanický stimul výrazně klesá. Na základě těchto výsledků byly navrženy další experimenty a měřeny elektrické signály po stimulaci mechanosenzitivních výběžků v pastech, které se nacházely na poraněných asimilačních částech listu (16 h před měřením). Výsledky měření ukazují, že se amplituda AP v těchto pastech opravdu průkazně snižuje a past se výrazně pomaleji uzavírá. Past reaguje až na větší počet podnětů, případně se nezavírá vůbec. Pasti na koncích poškozených asimilačních částech listu byly navíc často konkávně prohnuté. Velikost amplitudy AP je pro ochotu pasti se uzavřít velice důležitá a vykazuje kumulativní charakter, přičemž past se uzavírá až po dosažení určité souhrnné prahové hodnoty depolarizace (Volkov *et al.*, 2009; Suda *et al.*, 2020). Samotný mechanismus uzavření pasti je dán náhlou změnou tlaku vody mezi vnější a vnitřní stranou pasti, při které dojde ke změně konvexního tvaru pasti na konkávní (Escalante-Peréz *et al.*, 2014). Otázkou tedy je, zda neochota pastí se uzavřít je způsobena sníženou amplitudou AP nebo narušením zásobení pasti vodou a tím sníženým turgorem. Vzhledem k rozsáhlému poškození primární žilnatiný asimilační části listu. Aby bylo možné si na tuto otázku



odpovědět, bylo provedeno měření elektrických signálů v mucholapce podivné po 24 h od ošetření pastí 50  $\mu\text{M}$  roztokem ABA. Z výsledků měření ošetřených pastí vyplývá, že ABA je zodpovědná za snížení amplitudy AP, ale nezpůsobuje zpomalení uzavírání pastí ani nesnižuje počet stimulů potřebných k jejímu uzavření, jak bylo pozorováno v předchozím experimentu s poraněnou asimilační částí listu. Vzhledem k tomu, že exogenní aplikace ABA nezpůsobila inhibici uzavírání pastí navzdory snížené amplitudě AP, je inhibice zavírání pastí po poranění asimilační části listu způsobena jiným mechanismem než je přímý účinek ABA. Tímto mechanismem je pravděpodobně narušený vodní režim.

Protože pletiva mucholapky podivné jsou velmi nestandardní materiál a druh rostliny nepatří úplně mezi modelové organismy, nebylo možné dovést qPCR analýzu do konce. Veškeré testované metody byly upravovány dle nejrůznějších rad a stále se objevovaly nové překážky. V průběhu izolace RNA se tvořili kuličky gelové struktury, bílá sraženina, která nešla rozpustit nebo se ucpávaly kolony. A když už se zdálo, že byla izolace úspěšná, kontrolní měření spektrofotometrem NanoDrop™ 1000 ukázalo velmi nízkou koncentraci RNA ve vzorku nebo vysoké znečištění guanidinovými solemi, které je často vedlejším efektem využití reagentie TRIzol® Reagent. Mimo zmíněných metod provedla Mgr. Martina Kopečná, Ph.D. pokus o izolaci RNA z mucholapky podivné i citrátovou metodou, která však také nebyla úspěšná i přes vysokou účinnost metody. Hlavním důvodem, proč nebylo možná RNA z mucholapky podivné izolovat je nejspíš vysoká koncentrace sekundárních metabolitů a antokyanů, což je způsobeno podmínkami, ve kterých byly pro mucholapky podivné pěstovány.

Optimalizace metody pro izolaci RNA z mucholapky podivné, především z rostlin pěstovaných na slunečném stanovišti se sice nepodařilo dotáhnout do zdárného konce při vypracovávání této diplomové práce, na počátku však optimalizace ani nebyla jejím cílem. Rozhodně se však stala předmětem dalšího snažení.

## 6 ZÁVĚR

Z experimentů provedených v praktické části této diplomové práce vyplývá, že asimilační část listu a pasti nejsou elektricky propojeny a že mucholapka podivná na rozdíl od běžných rostlin nevyužívá elektrickou systémovou signalizaci. Jelikož se elektrické signály v rostlinách uplatňují zejména při obranných reakcích rostlin, kde je taková systémová reakce žádaná, je možné, že v masožravých rostlinách, kde se uplatňují při chytání kořisti naopak taková reakce žádaná není a byla evolučně potlačena. Navzdory absenci elektrické systémové odpovědi rostliny, však asimilační část listu a past spolu komunikují, což dokazuje zvýšená systémová akumulace ABA v pasti po poranění listu, která stojí za snížením amplitudy AP v pasti.

V souladu s absencí systémové elektrické signalizace je i absence systémové akumulace jasmonátů. Ty se dokáží akumulovat pouze v poraněném typu pletiva bez rozdílů, zdali se jedná o past nebo list. Mucholapka podivná tedy nevyužívá biofyzikální ani biochemickou systémovou signalizaci. Výsledky z qPCR analýzy měly ukázat, jestli je JA schopná aktivovat expresi genů kódujících trávicí enzymy i v asimilačních listech, nebo jestli má tuhle schopnost JA jenom v pasti (t.j. pletivová specifická exprese). Výsledky z qPCR ovšem bohužel nejsou nyní k dispozici.

Překážky, které se vyskytly v průběhu výzkumu pro tuto diplomovou práci by však neměly zůstat bez povšimnutí a již dnes se na jejich odstranění vytrvale pracuje. Optimalizace protokolu pro izolaci RNA z mucholapky podivné pěstované na slunci je prvním krokem k získání potřebných informací pro další výzkum.

## 7 LITERATURA

- Adamec, L., Matušíková, I., Pavlovič, A. (2021). Recent ecophysiological, biochemical and evolutionary insights into plant carnivory. *Annals of botany*, 128(3), 241-259. <https://doi.org/10.1093/aob/mcab071>
- Bemm, F., Becker, D., Larisch, C., Kreuzer, I., Escalante-Perez, M., Schulze, W. X., Ankenbrand, M., Van De Weyer, A., Krol, E., Al-Rasheid, K., et al. (2016). Venus flytrap carnivorous lifestyle builds on herbivore defense strategies. *Genome Research*, 26(6), 812-825. <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.202200.115>
- Bertholon, P. (1783). *De l'électricité des végétaux* (1). Paris : P.F. Didot jeune.
- Böhm, J., Scherzer, S., Krol, E., Kreuzer, I., von Meyer, K., Lorey, C., Mueller, T. D., Shabala, L., Monte, I., Solano, R., et al. (2016). The Venus flytrap *Dionaea muscipula* counts prey-induced action potentials to induce sodium uptake. *Current Biology*, 26(3), 286-295. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.057>
- Böhm, J., & Scherzer, S. (2021). Signaling and transport processes related to the carnivorous lifestyle of plants living on nutrient-poor soil. *Plant Physiology*, 187(4), 2017–2031. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab297>
- Brewer, J. S., Baker, D. J., Nero, A. S., Patterson, A. L., Roberts, R. S., Turner, L. M. (2011). Carnivory in plants as a beneficial trait in wetlands. *Aquatic Botany*, 94(2), 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2010.11.005>
- Brown, W. H. (1916). The mechanism of movement and the duration of the effect of stimulation in the leaves of *Dionaea*. *American Journal of Botany*, 3, 68–90. <https://doi.org/10.2307/2435207>
- Burdon-Sanderson, J. S. (1873). Note on the electrical phenomena which accompany stimulation of the leaf of *Dionaea muscipula*. *Proceedings of the Royal Society of London*, 21, 495–496. <https://doi.org/10.1098/rspl.1872.0092>
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico J. M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J. L., Solano, R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448, 666–671. <https://doi.org/10.1038/nature06006>
- Chini, A., Monte, I., Zamarréño, A.M., Hamberg, M., Lassueur, S., Reymond, P., Weiss, S., Stintzi, A., Schaller, A., Porzel, A., García-Mina M., Solano R. (2018). An OPR3-independent pathway uses 4,5-didehydrojasmonate for jasmonatesynthesis. *Nat. Chem. Biol.*, 14, 171–178. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2540>
- Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual review of plant biology*, 48(1), 355-381. <http://arcs://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.355>
- Darwin, C. (1875). *Insectivorous Plants*. D. Appleton & Co.
- Darwin, C. R. (1881). *The formation of vegetable mould, through the action of worms, with observations on their habits*. London: John Murray.
- Davies, E., & Schuster, A. (1981). Intercellular communication in plants: evidence for a rapidly generated, bidirectionally transmitted wound signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(4), 2422-2426. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.4.2422>
- Ellison, A. M., & Adamec, L. (2018). *Carnivorous Plants: Physiology, Ecology, and Evolution*. London: Oxford University Press.
- Escalante-Pérez, M., Krol, E., Stange, A., Geiger, D., Al-Rasheid, K. A., Hause, B. E. Neher & Hedrich, R. (2011). A special pair of phytohormones controls excitability, slow closure, and external stomach formation in the Venus flytrap. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (37), 15492-15497. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112535108>
- Escalante-Pérez, M., Scherzer, S., Al-Rasheid, K. A., Döttinger, C., Neher, E., & Hedrich, R. (2014). Mechano-stimulation triggers turgor changes associated with

- trap closure in the Darwin plant *Dionaea muscipula*. *Molecular plant*, 7 (4), 744-746. <https://doi.org/10.1093/mp/sst169>
- Farmer, E.E., Gasperini, D., Acosta, I.F. (2014). The squeeze cell hypothesis for the activation of jasmonate synthesis in response to wounding. *New Phytologist*, 204, 282–288. <https://doi.org/10.1111/nph.12897>
- Farmer, E. E., Gao, Y. Q., Lenzoni, G., Wolfender, J. L., Wu, Q. (2020). Wound-and mechanostimulated electrical signals control hormone responses. *New Phytologist*, 227(4), 1037-1050. <https://doi.org/10.1111/nph.16646>
- Fisahn, J., Herde, O., Willmitzer, L., & Peña-Cortés, H. (2004). Analysis of the transient increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> during the action potential of higher plants with high temporal resolution: requirement of Ca<sup>2+</sup> transients for induction of jasmonic acid biosynthesis and PINII gene expression. *Plant and Cell Physiology*, 45(4), 456-459. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.12.004>
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., Solano, R. (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature chemical biology*, 5 (5), 344-350. <https://doi.org/10.1038/nchembio.161>
- Galvani, L. (1791). *Aloysii Galvani De viribus electricitatis in motu musculari commentarius [microform]* (1). Bononiæ : Instituti Scientiarum.
- Grams, T. E., Lautner, S., Felle, H. H., Matyssek, R., Fromm, J. (2009). Heat-induced electrical signals affect cytoplasmic and apoplastic pH as well as photosynthesis during propagation through the maize leaf. *Plant, Cell & Environment*, 32(4), 319-326. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01922.x>
- Grover, A. (2012). Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31, 57–73. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.616043>
- Hedrich, R., & Neher, E. (2018). Venus flytrap: how an excitable, carnivorous plant works. *Trends in Plant Science*, 23 (3), 220-234. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.12.004>
- Hertig, C. M., & Wolosiuk, R. A. (1983). Studies on the hysteretic properties of chloroplast fructose-1, 6-bisphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 258(2), 984-989. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)33147-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)33147-8)
- Huber, A. E. & Bauerle T. L. (2016). Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: the gap in knowledge. *Journal of Experimental Botany*, 67, 2063–2079. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw099>
- Ilík, P., Hlaváčková, V., Krchňák, P., Nauš, J. (2010). A low-noise multi-channel device for the monitoring of systemic electrical signal propagation in plants. *Biologia Plantarum*, 54, 185–190. <https://doi.org/10.1007/s10535-010-0032-0>
- Jakšová, J., Libiaková, M., Bokor, B., Petřík, I., Novák, O., Pavlovič, A. (2020). Taste for protein: Chemical signal from prey stimulates enzyme secretion through jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap. *Plant Physiology and Biochemistry*, 146, 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.013>
- Juniper, B. E., Robinson, R. J., Joel, D. M. (1989). *The Carnivorous Plants*. New York, Academic Press.
- Kaiser, H., & Grams, T. E. (2006). Rapid hydropassive opening and subsequent active stomatal closure follow heat-induced electrical signals in *Mimosa pudica*. *Journal of experimental botany*, 57(9), 2087-2092. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl070>
- Kocáb, O., Jakšová, J., Novák, O., Petřík, I., Lenobel, R., Chamrád, I., Pavlovič, A. (2020). Jasmonate-independent regulation of digestive enzyme activity in the carnivorous butterwort *Pinguicula x Tina*. *Journal of experimental botany*, 71(12), 3749-3758. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa159>
- Koo, A. J. K., Gao, X., Jones, A.D., Howe, G. A. (2009). A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 59, 974 986. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03924.x>

- Koo, A. J., Howe, G. A. (2009). The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry*, 70 (13-14), 1571-1580. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.018>
- Koziolok C., Grams T.E.E., Schreiber U., Matyssek R., Fromm J. (2004). Transient knockout of photosynthesis mediated by electrical signals. *New Phytologist*, 161, 715-722. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.00985.x>
- Kreimer, G., Melkonian, M., Holtum, J. A., & Lutzko, E. (1988). Stromal free calcium concentration and light-mediated activation of chloroplast fructose-1, 6-bisphosphatase. *Plant physiology*, 86(2), 423-428. <https://doi.org/10.1104/pp.86.2.423>
- Kreuzwieser, J., Scheerer, U., Kruse, J., Burzlaff, T., Honsel, A., Alfarraj, S., Georgiev P., Schnitzler J.-P., Ghirardo A., Kreuzer I., et al. (2014). The Venus flytrap attracts insects by the release of volatile organic compounds. *Journal of experimental botany*, 65(2), 755-766. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv242>
- Lautner S., Grams T.E.E., Matyssek R., Fromm J. (2005). Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis. *Plant Physiology*, 138, 2200–2209. <https://doi.org/10.1104/pp.105.064196>
- Li, C., Liu, G., Xu, C., Lee, G.I., Bauer, P., Ling, H.Q., Ganai, M.W., Howe, G.A. (2003). The tomato suppressor of prosystemin-mediated responses 2 gene encodes a fatty acid desaturase required for the biosynthesis of jasmonic acid and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant Cell*, 15, 1646–1661. <https://doi.org/10.1105/tpc.012237>
- Li, Q., Zheng, J., Li, S., Huang, G., Skilling, S.J., Wang, L., Li, L., Li, M., Yuan, L., Liu, P. (2017). Transporter-mediated nuclear entry of jasmonoyl-Isoleucine is essential for jasmonate signaling. *Mol. Plant.*, 10, 695–708. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.010>
- Libiaková, M., Floková, K., Novák, O., Slovákova, L. U., & Pavlovič, A. (2014). Abundance of cysteine endopeptidase dionain in digestive fluid of Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis) is regulated by different stimuli from prey through jasmonates. *PloS one*, 9(8), e104424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104424>
- Lloyd, F.E. (1942). *The Carnivorous Plants*. Chronica Botanica Company.
- Mousavi, S. A. R., Chauvin, A., Pascaud, F., Kellenberger, S., Farmer, E. E. (2013). GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediated leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* 500, 422–426. <https://doi.org/10.1038/nature12478>
- Nguyen, C.T., Kurenda, A., Stolz, S., Chételat, A., Farmer, E.E. (2018). Identification of cell populations necessary for leaf-to-leaf electrical signaling in a wounded plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115, 10178–10183. <https://doi.org/10.1073/pnas.1807049115>
- Paszota, P., Escalante-Perez, M., Thomsen, L. R., Risør, M. W., Dembski, A., Sanglas, L., Nielsen T. A., Karring, H., Thogersen, I. B., Heidrich, R., Enghild, J. J., Kreuzer, I., Sanggaard, K. W. (2014). Secreted major Venus flytrap chitinase enables digestion of arthropod prey. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1844 (2), 374-383. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.11.009>
- Pavlovič, A., Slovákova, L. U., Pandolfi, C., & Mancuso, S. (2011). On the mechanism underlying photosynthetic limitation upon trigger hair irritation in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis). *Journal of Experimental Botany*, 62(6), 1991-2000. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq404>
- Pavlovič, A. (2012). The Effect of Electrical Signals on Photosynthesis and Respiration. In: *Plant Electrophysiology*. (Volkov A. ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, 33-62. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-29110-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-29110-4_2)
- Pavlovič, A., Krausko, M., Libiaková, M., Adamec, L. (2014). Feeding on prey increases photosynthetic efficiency in the carnivorous sundew *Drosera capensis*. *Annals of Botany*, 113, 69–78. <https://doi.org/10.1093/aob/mct254>

- Pavlovič, A., Jakšová, J., Novák, O. (2017). Triggering a false alarm: wounding mimics prey capture in the carnivorous Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). *New Phytologist*, 216, 927-938. <https://doi.org/10.1111/nph.14747>
- Pavlovič, A., & Mithöfer, A. (2019). Jasmonate signalling in carnivorous plants: copycat of plant defence mechanisms. *Journal of Experimental Botany*, 70, 3379–3389. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz188>
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., Ryan, C.A. (1991). A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science*, 253, 895–897. DOI: 10.1126/science.253.5022.895
- Płachno, B. J., Kapusta, M., Stolarczyk, P., Świątek, P. (2022). Arabinogalactan proteins in the digestive glands of *Dionaea muscipula* J. Ellis traps. *Cells*, 11(3), 586. <https://doi.org/10.3390/cells11030586>
- Procko, C., Murthy, S., Keenan, W. T., Mousavi, S. A. R., Dabi, T., Coombs, A., E. Procko, L. Baird, A. Patapoutian, Chory, J. (2021). Stretch-activated ion channels identified in the touch-sensitive structures of carnivorous Droseraceae plants. *Elife*, 10, e64250. DOI: 10.7554/eLife.64250
- Reddy, A. S. N., Ali, G. S., Celesnik, H., Day I.S. (2011). Coping with stresses: roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression. *The Plant Cell*, 23, 2010–2032. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084988>
- Ricca, U. (1926). Transmission of stimuli in plants. *Nature*, 117(2949), 654-655. <https://doi.org/10.1038/117654a0>
- Robins, R.J., & Juniper, B.E. (1980). The secretory cycle of *Dionaea muscipula* Ellis I. The fine structure and the effect of stimulation on the fine structure of the digestive gland cells. *New Phytol.*, 86, 279–296. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb00789.x>
- Ruan, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., Weng, W., Cheng J., Zhang, K. (2019). Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2479. <https://doi.org/10.3390/ijms20102479>
- Scherzer, S., Krol, E., Kreuzer, I., Kruse, J., Karl, F., von Rüden, M., Escalante-Perez, M., Müller, T., Rennenberg, H., All-Rasheid, K. A. S., et al. (2013). The *Dionaea muscipula* ammonium channel DmAMT1 provides NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake associated with Venus flytrap's prey digestion. *Current Biology*, 23(17), 1649-1657. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.07.028>
- Schulze, W. X., Sanggaard, K. W., Kreuzer, I., Knudsen, A. D., Bemm, F., Thøgersen, I. B., Bräutigam A., Thomsen L. R., Schliesky S., Dyrland T. F., et al. (2012). The protein composition of the digestive fluid from the venus flytrap sheds light on prey digestion mechanisms. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11 (11), 1306-1319. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.021006>
- Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R., Kobayashi Y., Hsu F.-F., Sharon M., Brower J., et al. (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1–JAZ co-receptor. *Nature*, 468(7322), 400-405. <https://doi.org/10.1038/nature09430>
- Shigenaga, A. M., & Argueso, C. T. (2016). No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 56, 174-189. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.06.005>
- Shoji, T., Ogawa, T., & Hashimoto, T. (2008). Jasmonate-induced nicotine formation in tobacco is mediated by tobacco COI1 and JAZ genes. *Plant and cell physiology*, 49(7), 1003-1012. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn077>
- Studnička M. 1984. *Masožravé rostliny*. Academia, nakladatelství Československé akademie věd, Praha.
- Studnička M. 2006. *Masožravé rostliny*, objekt badatelů, dobrodruhů a snílků. Academia, Praha.
- Suda, H., Mano, H., Toyota, M., Fukushima, K., Mimura, T., Tsutsui, I., Hedrich, R., Tamada, Y., Hasebe, M. (2020). Calcium dynamics during trap closure visualized in

- transgenic Venus flytrap. *Nat Plants*, 6(10), 1219-1224. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-00773-1>
- Sukhov, V., Sukhova, E., Vodeneev, V. (2019). Long-distance electrical signals as a link between the local action of stressors and the systemic physiological responses in higher plants. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 146, 63–84. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.11.009>
- Tanaka, K., & Heil, M. (2021). Damage-associated molecular patterns (DAMPs) in plant innate immunity: applying the danger model and evolutionary perspectives. *Annual review of phytopathology*, 59, 53-75. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100146>
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu Y., Mandaokar A., Liu G., Nomura K., He, S.Y., Howe, G.A., Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCFCO11 complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448, 661–665. <https://doi.org/10.1038/nature05960>
- Toyota, M., Spencer, D., Sawai-Toyota, S., Jiaqi, W., Zhang, T., Koo, A.J., Howe, G.A., Gilroy, S. (2018). Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense. *Science*, 361, 1112–1115. DOI: 10.1126/science.aat7744 DOI: 10.1126/science.aat7744
- Trebacz, K., Dziubinska, H., Krol, E. (2006). Electrical signals in long-distance communication in plants. In: *Communication in Plants. Neuronal Aspects of Plant Life*. (Baluška F., Mancuso S., Volkmann D. eds.), Springer-Verlag, 277-290. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-28516-8\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-540-28516-8_19)
- Vodeneev, V., Akinchits, E., Sukhov, V. (2015). Variation potential in higher plants: Mechanisms of generation and propagation. *Plant Signaling & Behavior*, 10, e1057365. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1057365>
- Volkov, A. G., Adesina, T., Jovanov, E. (2007). Closing of Venus flytrap by electrical stimulation of motor cell. *Plant Signaling and Behavior*, 2, 139–145.
- Volkov, A. G., Adesina, T., Jovanov, E. (2008). Charge induced closing of *Dionaea muscipula* Ellis trap. *Bioelectrochemistry*, 74 (1), 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2008.02>
- Volkov, A. G., Vilfranc, C. L., Murphy, V. A., Mitchell, C., Volkova, M. I., O’Neal, L., Markin V. S. (2013). Electrotonic and action potentials in the Venus flytrap. *Journal of Plant Physiology*, 170, 838–846. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.01.009>
- Volkov, A. G. (2019). Signaling in electrical networks of the Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis). *Bioelectrochemistry*, 125, 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.09.001>
- Yamaguchi, Y., Huffaker, A., Bryan, A.C., Tax, F.E., Ryan, C.A. (2010). PEPR2 is a second receptor for the Pep1 andPep2 peptides and contributes to defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell*, 22, 508–522. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.068874>
- Yan, C., Fan, M., Yang, M., Zhao, J., Zhang, W., Su, Y., Xiao, L., Deng, H., Xie, D. (2018). Injury activates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent phosphorylation of JAV1–JAZ8–WRKY51 complex for jasmonate biosynthesis. *Molecular Cell*, 70, 136–149. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.013>
- Zimmermann, M. R., Mithofer, A., Will, T., Felle, H. H., Furch, A. C. (2016). Herbivore-triggered electrophysiological reactions: candidates for systemic signals in higher plants and the challenge of their identification. *Plant Physiology*, 170, 2407–2419. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01736>

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AP	akční potenciál
$\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$	centimetr za sekundu
GLR	GLUTAMATE-RECEPTOR-LIKE kanály
$\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$	milimetr za sekundu
mM ( $\mu\text{M}$ )	milimolární koncentrace (mikromolární koncentrace)
ROS	reaktivní formy kyslíku
SP	systémový potenciál
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
VP	variační potenciál