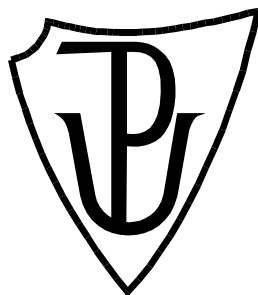


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biofyziky



Jasmonátová signální dráha: od obrany k masožravosti rostlin

Autoreferát

Jana Jakšová

Olomouc 2022

Uchazeč: **Mgr. Jana Jakšová**
Katedra biofyziky
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Palackého v Olomouci

Název práce: Jasmonátová signální dráha: od obrany k masožravosti rostlin

Školitel: **doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.**
Katedra biofyziky
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Palackého v Olomouci

Oponenti práce: **doc. Mgr. Ildikó Matušíková, Ph.D.**
Katedra ekochémie a rádioekologie
Fakulta přírodních věd
Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave

RNDr. Miroslav Srba, Ph.D.
Katedra experimentální biologie rostlin
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Karlova v Praze

Místo a termín obhajoby: Šlechtitelů 27, Olomouc

.....

Autoreferát byl rozeslán dne:

S disertační prací a posudky je možné se seznámit na Katedře biofyziky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Anotace

Aby rostliny prosperovaly a přežily v neustále měnících se nepřátelských podmínkách, vyvinuly si jedinečné obranné mechanismy. Významnými hráči v indukované obraně rostlin proti býložravcům jsou elektrické a vápníkové signály a neméně důležité rostlinné hormony jasmonáty. Jasmonátová signální dráha je též klíčová pro správnou funkci pastí některých druhů masožravých rostlin, u nichž je potřebná k iniciaci tvorby enzymů důležitých pro trávení zachycené kořisti. Nicméně to, že jsou jasmonáty zodpovědné za aktivaci a regulaci trávicího procesu bylo prokázáno jen u tří rodů masožravých rostlin – mucholapka (*Dionaea*), rosnatka (*Drosera*) a láčkovka (*Nepenthes*), všechny spadající do řádu hvozdíkotvaré (Caryophyllales). U těchto druhů se předpokládá exaptace jasmonátové signální dráhy od obranného mechanismu rostlin. To znamená, že masožravé rostliny převzaly již existující signální dráhu a použily ji pro své účely (tzn. indukce tvorby enzymů). V práci jsme ukázali, že jasmonátová signalizace nebyla exaptována všemi rody masožravých rostlin a indukce trávicích enzymů musí být spuštěna i jinými způsoby, které nejsou dosud známé. Signální dráha od tvorby elektrického signálu přes akumulaci jasmonátů po expresi specifických genů se dá blokovat anestetikem dietyléterem. Dosud se neví, jak přesně různá anestetika lišící se svou chemickou strukturou působí, k rozluštění by však mohly pomoci rostlinné modelové druhy.

Annotation

Plants have developed unique defense mechanisms in order to survive and prosper in fluctuating environmental conditions. Electrical and calcium signals, along with equally important plant hormones jasmonates, play an important role in the induced defense of plants against herbivores. Jasmonate signalling pathway is also crucial for the proper function of traps of some carnivorous plant species and are essential to initiate the production of enzymes important for the digestion of captured prey. It was shown that jasmonates are responsible for activating and regulating the digestion process in three genera of carnivorous plants - *Dionaea*, *Drosera* and *Nepenthes*, all of which belong to the order Caryophyllales. In these species, it has been suggested that jasmonate signalling pathway was co-opted from plant defense mechanism. This means that carnivorous plants took over the already existing signalling pathway and used it for their own purposes (induction of enzyme production). Here we showed that jasmonate signalling has been not co-opted by all carnivorous genera and the induction of digestive enzymes have to be trigger by other ways, which are not yet known. Signalling pathway from electrical signal generation through jasmonate accumulation to the expression of specific genes can be blocked by anaesthetic diethyl ether. It is not yet fully understood how exactly anaesthetics differing in their chemical structure work, but the model plants could help to elucidate it.

Obsah

CÍLE PRÁCE	1
1. Obrana rostlin proti býložravcům	3
1.1. Elektrické signály rostlin	4
1.2. Druhý posel – cytosolický Ca^{2+}	5
1.3. Dekódování Ca^{2+}	6
1.4. Ca^{2+} aktivuje syntézu jasmonátů	6
1.5. Biosyntéza jasmonátů	7
1.6. Mechanismus vnímání a regulace genové exprese jasmonáty	8
1.7. Proteiny související s patogenezí v obranné reakci rostlin	8
2. Od obrany k masožravosti rostlin	9
ZÁVĚR.....	13
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	16
SEZNAM PUBLIKACÍ	19
Souhrn publikace 0.....	21
Souhrn publikace 1	23
Souhrn publikace 2.....	25
Souhrn publikace 3.....	27
Souhrn publikace 4.....	29
Souhrn publikace 5.....	32
Souhrn publikace 6.....	34

CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této disertační práce je zaměřit velkou pozornost teoretickým základům dané problematiky, která za posledních pár let, v průběhu mého doktorského studia, výrazně pokročila kupředu. Tato část je i nosným pilířem autoreferátu. Dosáhnuté výsledky jsou zdokumentovány prostřednictvím přiložených publikací v samotné disertační práci, aby nedošlo k duplikaci textu a obrázků.

V první kapitole této práce shrnuji dosud získané poznatky o sloučeninách pro dálkový přenos v rostlinách, jak spolu pravděpodobně souvisí a jak jsou regulovány, přičemž jsem se zaměřila na jeden hlavní stresor, který vyvolává tuto systémovou reakci, a to vnější poškození, zahrnující mechanické poškození a poškození býložravcem nebo hmyzem. Je nutno hned na začátku podotknout, že známe spíše jen kousky skládačky a ty jsou spojeny do podoby hypotéz, kterými se snažíme vytvořit komplexní obraz o tom, jak celá systémová signalizace v rostlinách funguje. Hypotézy ale nejsou ani potvrzeny, ani vyvráceny. Sekvence reakcí po poškození je velmi podobná signální dráze, kterou využívají některé masožravé rostliny. Příbuzenství mezi karnivorii a obranným mechanismem rostlin se věnuji ve druhé kapitole. Další kapitola je věnována principům, na kterých je založena použitá metodika.

Samostatné publikace se věnují dvěma velkými tématům, která jsou propojena skrze jednu sledovanou signální dráhu. První část je věnována masožravým rostlinám (publikace 0., I., II., III. a IV.) a druhá vlivu anestetik na rostliny (publikace V. a VI.).

Hlavním cílem první části bylo zabývat se rolí elektrických signálů a fytohormonů jasmonátů v indukci enzymatických aktivit v masožravých rostlinách, rozšířit znalosti o trávicích enzymech a o způsobu jejich regulace podněty získanými z polapené kořisti. Fytohormony kontrolují všechny aspekty růstu a vývoje rostlin, takže se předpokládalo, že mají funkci také při jejich masožravosti. Ve srovnání s nemasožravými rostlinami, se hormonální signalizaci v těch masožravých, věnovalo jen pár studií a ty byly omezeny hlavně právě na jasmonáty. Ty se hromadí v pletivu pasti mucholapky podivné (*Dionaea muscipula*) bez ohledu na podnět. Jak na mechanostimulaci spouštěcího výčnělku uvnitř pasti, tak na poranění pasti reaguje rostlina expresí genů spojených s masožravostí, a tedy produkcí trávicích enzymů. To proto, že obrana rostlin a botanická masožravost mucholapky sdílejí stejné signální dráhy. Jak tedy mucholapka pozná, že se v její pasti nachází opravdu živočišná kořist, aby se jí vyplatilo produkovat množství trávicí tekutiny, což je energeticky náročné? Jak je regulován tento proces?

Jasmonáty hrají roli při indukci trávicích procesů u tří rodů masožravých rostlin (mucholapka, rosnatka, láčkovka; *Dionaea*, *Drosera*, *Nepenthes*), které se v této oblasti dají považovat za modelové. Všechny tři jsou ale příbuzné a spadají do řádu hvozdíkotvaré (Caryophyllales). Cílem bylo prozkoumat, zda byla jasmonátová signalizace exaptována také jinými rody nepříbuznými s hvozdíkotvarými. V řádu hluchavkotvaré (Lamiales) jsme se zabývali rody tučnice (*Pinguicula*) a bublinatka (*Utricularia*), v řádu šřavelotvaré (Oxalidales) rodem láčkovice (*Cephalotus*), a v řádu vřesovcotvaré (Ericales) rodem špirlice (*Sarracenia*). Do studie byly zahrnuty také další neprozkoumané rody z hvozdíkotvarých: rosnolist (*Drosophyllum*) a aldrovandka (*Aldrovanda*). Některé z těchto rodů (např. špirlice a láčkovice) používají stejné trávicí enzymy nebo stejnou lovicí strategii, takže lze předpokládat, že využívají stejnou signální dráhu. Na druhou stranu se mnoho rodů spoléhá více na trávicí enzymy pocházející ze symbiotických organismů nebo je produkce enzymů spíše konstitutivní, což zpochybňuje potřebu jedinečné signální dráhy.

Při druhé části výzkumu byla pozornost zaměřena na komplexní studii, která by pokryla několik aspektů anestetických účinků na rostliny. Během výzkumu v první části výzkumu byl vytvořen velmi dobrý experimentální systém v masožravé rostlině mucholapce podivné pro monitorování odpovědi rostliny na poranění a mechanickou stimulaci. Cílem bylo využít tento systém ke zkoumání těchto odpovědí pod vlivem anestetika a bez něj, sledovat elektrickou signalizaci, akumulaci jasmonátů, genovou expresi a produkci proteinů. Ve studii Yokawa *et al.* (2018) byla již prokázána inhibice tvorby akčního potenciálu (AP) anestetikem dietyléterem, naším cílem ale bylo prozkoumat efekt inhibice elektrické aktivity na následující reakce.

Jelikož bylo v první části zjištěno, že mucholapka využívá k regulaci trávicích enzymů dráhu, kterou v průběhu evoluce exaptovala z obranného mechanismu běžných rostlin, předchozí znalosti a dovednosti byly využity ke zkoumání toho, zda anestetikum může zastavit systémovou obrannou reakci huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) v reakci na poškození. V mucholapce anestetika inhibují AP. V reakci na útok nebo poranění býložravců ale rostliny obvykle generují variační (VP) a/nebo systémový potenciál. Protože se AP a VP liší svým původem (AP se šíří samovolně, zatímco propagace VP závisí na uvolnění napětí vodního sloupce xylému při poranění), bylo otázkou, zda anestetika mohou inhibovat tvorbu a šíření VP a všechny následující reakce, tj. Ca^{2+} vlnu a/nebo akumulaci kyseliny jasmonové (*jasmonic acid*, JA) a JA-závislou genovou expresi.

1. Obrana rostlin proti býložravcům

Rostliny pro svou vlastní potřebu produkují procesem fotosyntézy sacharidy. Tyto látky ale vyhovují jako potrava také živočichům. Na rostlinách jsou závislá všechna zvířata, a to ať primárně nebo sekundárně. Přisedlé organismy, jakými jsou rostliny, jsou ale ke svému prostředí vázány kořeny a nemohou v případě napadení jednoduše utéct. I přes tento fakt jsou ale rostliny schopny útokům odolat. Rostliny a býložravý hmyz žijí pospolu po více než 400 milionů let a obě skupiny si vyvíjí opravdu rafinované strategie, aby obelstily toho druhého (War *et al.* 2012).

Obranné mechanismy rostlin mohou být buď mechanického, nebo chemického charakteru. Mechanické bariéry představují první vrstvu ochrany proti býložravcům. Odolnost rostlin vůči nim je dána morfologickými vlastnostmi — už jen samotný tvar listu, jako např. cípatý list cesmíny, odrazuje útočníky. Složkou mechanické obrany rostlin jsou i jejich povrchové struktury. Příkladem takových struktur jsou papily či dlouhé výběžky epidermálních buněk známé jako trichomy. Pokožka rostlin je dále často chráněna vrstvou kutikulárních vosků a můžeme se setkat také s různými modifikacemi listu, jako jsou např. trny sukulentů. Účinnost tohoto druhu fyzikálních bariér však závisí na velikosti a také mechanismu, jakým se krmí daný býložravec (War *et al.* 2012).

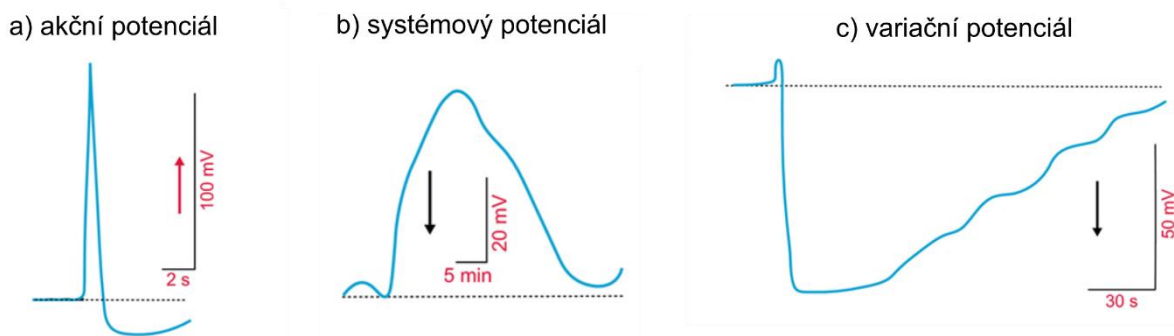
Kromě těchto fyzikálních bariér rostliny využívají obranu chemickou – produkují velké množství sekundárních metabolitů, toxinů a dále také proteinů, jako jsou např. inhibitory proteáz. Kromě mechanické a chemické obrany, díky které rostliny konfrontují býložravce přímo (odtud přímá obrana), produkují rostliny také těkavé sloučeniny k přilákání druhů na vyšší trofické úrovni, jako jsou přirození nepřátelé útočícího hmyzu. Vzhledem k tomu, že těkavé látky ve skutečnosti nepůsobí přímo na býložravce, ale používají se jako prostředníky k přivolání jiných organismů na pomoc, tento druh obrany se nazývá nepřímá (Mithöfer and Boland 2012).

Přímá a nepřímá obrana se může nacházet v rostlině konstitutivně, ale jelikož je produkce sloučenin působící proti býložravcům pro rostlinu poměrně nákladná, některé obranné metabolity jsou produkovány až po napadení býložravcem. Tyto metabolity pak nazýváme jako indukovaná obrana (Meldau *et al.* 2012). Indukovaná obrana vyžaduje v těle rostliny dynamickou a rychlou distribuci informací. V mnoha případech není zasažena celá rostlina, ale pouze orgán, několik buněk nebo jen jedna buňka rostlinného pletiva. Vazbou příslušného ligandu na receptor uvnitř buňky nebo na plasmatické membráně se aktivuje vhodný obranný program převedením na odpovídající stresovou reakci. Informace pak putují do sousedních orgánů, a dokonce i do sousedních rostlin, a také zde aktivují příslušné reakce. Informační tok je zprostředkován buď rychle se pohybujícími malými metabolity, hormony, proteiny/peptidy, RNA, reaktivními formami kyslíku, vápníkovou vlnou a těkavými látkami, tedy chemickými signály nebo elektrickými potenciály a hydraulickými vlnami, které jsou však velmi úzce spjaty. Signální

molekuly se pohybují z jedné buňky do druhé skrz plasmodesmata, přes apoplast, uvnitř vaskulární tkáně nebo jako těkavé látky – vzduchem. Reakce specifické pro poškození pravděpodobně vyžadují kombinaci různých cestujících sloučenin. Své rozmanitosti navzdory, mají signální molekuly společné rysy. Jejich koncentrace v místech působení je přísně kontrolována, je velmi nízká v nestimulovaných buňkách, přechodně vysoká v reakci na podněty a následně obnovena na nízkou hladinu buď chemickými reakcemi (např. degradací, modifikací a konjugací) nebo rozdělením do intracelulárních nebo mezibuněčných prostor pomocí aktivních transportních mechanismů. Jelikož šířící se signály musí cestovat přes dlouhé vzdálenosti a více bariér, s rostoucí vzdáleností signál obvykle klesá. To vyžaduje trvalé procesy zesílení, zpětnovazebné smyčky a pravděpodobně též krátkodobou paměť (Oelmüller 2021).

1.1. Elektrické signály rostlin

Jaká je povaha systémového signálu, který je po napadení šířen jako první po velké části rostlinného těla a vede k obranné reakci? Mezi mnoha scénáři, které byly navrženy, je elektrická signalizace. Ačkoli si rostliny nevytvořily komplexní nervovou soustavu, jakou známe u živočichů, elektrické signály hrají v jejich životě podstatnou úlohu. Pojem elektrické signály je v této práci použit pro události, které jsou detekovány pomocí citlivých elektrod. Obecná podstata metod, které jsou používány pro měření elektrických signálů, pak spočívá v tom, že rostlina představuje zdroj elektromotorického napětí. Je využíváno měření elektrostatického potenciálního rozdílu (napětí) mezi místem na rostlině, kde je umístěna elektroda a referenčním místem, kterým bývá z pravidla vodivý půdní roztok. Následně jsou detekovány buď stacionární hodnoty (klidový potenciál) nebo časové změny vyvolané nějakým lokálním podnětem (Ilík *et al.* 2010). Evokované změny membránového potenciálu mají různé tvary, kinetiku, trvání, vlastnosti a funkce. V dnešních dnech rozeznáváme tři rozdílné druhy elektrické signalizace v rostlinách, které se šíří na dlouhé vzdálenosti: akční potenciály (APs), variační (VPs) také označovány jako potenciály pomalé vlny a systémové potenciály (SPs; **Obr. 1**). Elektrické signály se mohou skládat z více typů, pak je nazýváme jako signály kompozitní (Farmer *et al.* 2020).



Obr. 1: Základní typy elektrických signálů v rostlinách generované po mechanostimulaci nebo poškození. Tečkovaná linie představuje základní membránový potenciál. Plné modré čáry představují změny membránového potenciálu. Červené šipky ukazují směr depolarizace membrány, která je detekována intracelulárními elektrodami. Černé šipky ukazují směr depolarizace, která je měřena neinvazivními povrchovými elektrodami. a) Akční potenciál je reprezentován obvykle velmi rychlou depolarizací i repolarizací. V tomto příkladu po repolarizaci následuje také hyperpolarizace. AP mohou mít variabilní strukturu a hyperpolarizace není vždy zjevná. b) Systémové potenciály jsou depolarizace často měřené extracelulárními elektrodami. Hyperpolarizací často předchází AP, který v příkladu není ukázán c) Variační potenciál se skládá z rychlé membránové depolarizace, která je následována pomalejší a často nepravidelnou repolarizací. Převzato a upraveno z Farmer *et al.*, (2020).

1.2. Druhý posel – cytosolický Ca^{2+}

Ihned po generaci elektrického signálu dochází v rostlinných buňkách ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} v cytosolu ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$). V eukaryotech od kvasinek přes rostliny až po živočichy slouží v buněčné signalizaci Ca^{2+} jako druhý posel (Berridge *et al.* 2000). Proč právě Ca^{2+} jako signál? Díky své chemické povaze je za normálních podmínek volný Ca^{2+} v cytosolu udržován na nízké úrovni (obvykle kolem 100-200 nM), a to převážně v důsledku precipitace a chelatace intracelulárním fosfátem a dalšími molekulami vázajícími Ca^{2+} . V extracelulárním prostoru (apoplastu) a určitých organelových zásobárnách (např. endoplazmatickém retikulu) však může volný Ca^{2+} dosáhnout milimolárních hodnot, tj. 10 000krát vyšších (Demidchik *et al.* 2018). Tento gradient poskytuje hnací sílu pro import Ca^{2+} , který pak funguje jako intracelulární signál (Lecourieux *et al.* 2006).

Dosud není zcela jasné, jak vápník může způsobit zcela specifickou reakci. Nicméně kromě trvání se signály Ca^{2+} mohou lišit také svou frekvencí a intracelulárním nebo tkáňově specifickým umístěním (McAinsh *et al.* 1997; Dodd *et al.* 2010). Všechny tyto časoprostorové charakteristiky vápníkových signálů, tzv. kalciový podpis, kódují informaci o vyskytující se podnětu. Dále, souhra s jinými buněčnými posly, jako jsou reaktivní formy kyslíku, změny membránového potenciálu nebo změny pH, může přenést specifické informace o změně prostředí do rostlinné buňky (McAinsh *et al.* 1997).

1.3. Dekódování Ca²⁺

Aby rostlinná buňka mohla využít informace o vyskytujícím se stimulu, který je zprostředkován specifickým zvýšením [Ca²⁺]_{cyt}, musí tyto signály dekodovat a převést je do následných reakcí, jako je genová exprese nebo tvorba metabolitů. Snímání Ca²⁺ iontů Ca²⁺-vazebnými proteiny je prvním krokem k dekodování. U huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) bylo identifikováno přibližně 250 Ca²⁺ snímacích proteinů. Všechny nesou alespoň jednu vazebnou doménu pro Ca²⁺, tzv. EF-Hand motiv (Day *et al.* 2002). Tyto domény jsou tvořeny dvěma šroubovicemi, nazývanými E- a F-helix, které jsou spojeny smyčkou vázající iont Ca²⁺ (La Verde *et al.* 2018).

Po navázání Ca²⁺ procházejí tyto proteiny konformační změnou, která jim umožňuje vázat se na následující cíl, jakým jsou kinázy, fosfatázy nebo jiné enzymy, iontové pumpy, kanály či transkripční faktory (Dodd *et al.* 2010; La Verde *et al.* 2018). To vede buď přímo ke změně genové exprese a tím k určité stresové reakci, nebo je Ca²⁺ signál interakcí s cílem přeložen do jiného signálního režimu, což vede k dalším událostem přenosu signálu. Kromě EF-Hands motivu mají některé Ca²⁺ vazebné proteiny další funkční domény. Jsou klasifikovány jako sensorové respondéry. Příkladem pro sensorové respondéry je rodina Ca²⁺-dependentních proteinkináz v huseníčku. Tyto proteiny mají kromě svých EF-Hand motivu kinázovou doménu, která je aktivována konformační změnou iniciovanou vazbou Ca²⁺ (Sanders *et al.* 2002). Mohou tak přímo transformovat signál na jiné signály nebo změny genové exprese.

Kromě sensorových respondérů má většina rodin Ca²⁺ sensorů známých v huseníčku pouze EF-Hand jako funkční doménu, a proto jsou schopné vázat pouze Ca²⁺. Říká se jim sensorová relé. Tyto proteiny potřebují interagovat s jinými proteiny, aby transformovaly signál Ca²⁺ do následných signalizačních událostí nebo stresových reakcí. Mezi skupinou sensorových relé jsou rodiny sensorů Ca²⁺, jako jsou proteiny podobné kalcineurinu B, kalmoduliny (CaM) a proteiny podobné kalmodulinu (Sanders *et al.* 2002; Dodd *et al.* 2010).

1.4. Ca²⁺ aktivuje syntézu jasmonátů

Změny v intracelulárních koncentracích Ca²⁺ jsou pravděpodobně mediátory aktivace syntézy hormonů v reakci na elektrické signály. Ve všech listech, které obdrží Ca²⁺ signál se také během pár minut hromadí fytohormony jasmonáty (Koo *et al.* 2009; Mousavi *et al.* 2013; Gilroy *et al.* 2016). Těsné spojení mezi zvýšenou [Ca²⁺]_{cyt} a akumulací kyseliny jasmonové (*jasmonic acid*, JA) prokázaly už dávější farmakologické studie (Fisahn *et al.* 2004). Nebylo však dlouho zcela jasné, jak rostliny zpočátku aktivují biosyntézu JA pro obranu rostlin. Možným spojením může být aktivace enzymu 13-lipoxygenázy LOX6 pomocí Ca²⁺, který katalyzuje syntézu prekurzoru JA, čímž přispívá k rychlé syntéze JA v systémových listech (Chauvin *et al.* 2013). Stejně tak se uvažuje o úloze mitogenem-aktivovaných protein kináz (MAPK), které interagují

s kalmodulinem, a mohou fosforylovat a aktivovat klíčové enzymy biosyntézy JA, např. aktivovat fosfolipázy (Seo *et al.* 1995; Maffei *et al.* 2007). Nový pohled přinesl Yan a kolektiv autorů (2018), kteří odhalili, že biosyntézu JA k obraně proti napadení hmyzem řídí nový komplex represorů JAV1-JAZ8-WRKY51 (Yan *et al.* 2018). Tento model však nevysvětluje náhlou akumulaci JA v průběhu několika sekund po poranění, která svou rychlou kinetikou nemůže být vysvětlena aktivací transkripce JA biosyntetických genů. Studie Kimberlin a kolektivu autorů (2022) ukazuje, že časný nárůst JA po poranění huseníčku rolního nezávisí na expresi biosyntetických genů pro JA, ale spíše na rychlé aktivaci (např. pomocí MAPK) fosfolipáz (např. DAD1), které uvolňují mastné kyseliny z fosfolipidů a galaktolipidů v plastidových membránách a vytváří tak substrát pro syntézu JA. Akumulace JA je totiž tak rychlá, že za ní nemůže stát genová transkripce a translace, tento mechanismus však může hrát roli v pozdější fázi. Krok lipolýzy, který vytváří prekurzory mastných kyselin, ze kterých se následně syntetizuje JA, je považován za první biosyntetický a regulační krok. Závisí tedy možná a pouze na dostupnosti substrátu, tedy tzv. substrátové limitaci (Kimberlin *et al.* 2022).

1.5. Biosyntéza jasmonátů

Jasmonáty (*jasmonates*, JAs) jsou skupinou fytohormonů, mezi něž patří JA (chemicky popsána jako 3-oxo-2-2'-*cis*-pentenyl-cyklopentan-1-octová kyselina), její prekurzory a deriváty. Ať už je syntéza JAs spuštěna jakkoliv, v současné době jsou známy již tři dráhy, kterými se jasmonáty syntetizují. Prekurzory jsou ve všech případech polynenasycené mastné kyseliny: oktadekanová dráha vychází z kyseliny α -linolenové (18:3), hexadekanová dráha začíná kyselinou hexadekatrienovou (16:3). Nově navržená na reduktáze kyseliny oxofytodienové (*OPDA reductase 3*, OPR3) nezávislá dráha startuje sice z kyseliny 12-oxofytodienové (*12-oxo-phytodienoic acid*, OPDA), ta je ale produktem kyseliny α -linolenové. Všechny tři dráhy vyžadují tři reakční místa: chloroplast, peroxisom a cytoplasmu (Chini *et al.* 2018; Ruan *et al.* 2019). Výsledným produktem těchto biosyntetických drah je JA, která je uvolněna do cytoplasmy, kde může procházet další metabolickou přeměnou například spojením s různými aminokyselinami. Dlouho byla JA považována za bioaktivní jasmonát. Nicméně Staswick and Tirryaki (2004) a Fonseca *et al.* (2009) odhalili, že bioaktivní formou je isoleucinový konjugát kyseliny jasmonové, jasmonoyl-L-isoleucin (JA-Ile). Produkce JA-Ile v cytoplasmě je katalyzována amidosyntetázou kyseliny jasmonové (JAR1, JASMONATE RESISTANT 1). Ačkoli se JA-Ile stále považuje za hlavní bioaktivní molekulu, JA konjugáty s jinými aminokyselinami vykazují také biologickou aktivitu (Yan *et al.* 2016).

1.6. Mechanismus vnímání a regulace genové exprese jasmonáty

Jakmile se JA-Ile po určitých podnětech dostane do jádra, musí se navázat na svůj receptor. V současné době se má za to, že JA-Ile v jádře podporuje interakci mezi proteiny CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1) a JASMONATE ZIM DOMAIN (JAZ). COI1 je F-box protein, který se spojuje s proteiny SKP1 a CULLIN za vzniku komplexu SCF^{COI1}. Tento komplex slouží jako E3 ubiquitin ligáza. Po navázání JA-Ile komplex SCF^{COI1} ubiquitínuje proteiny JAZ, což vede k jejich degradaci proteazomem 26S (Xie *et al.* 1998; Zhai *et al.* 2015). Proteiny JAZ jsou represory transkripce, váží se na transkripční faktory (TF) při nízkých hladinách JA-Ile (Thines *et al.* 2007; Chini *et al.* 2007). V roce 2010 Sheard a kolektiv pomocí analýzy krystalové struktury potvrdili, že komplex COI1-JAZ je vysoce afinitní receptor pro bioaktivní JA-Ile; to znamená, že COI1 a JAZ jsou koreceptory jasmonátové signalizace. COI1 obsahuje otevřenou kapsu rozeznávající JA-Ile s vysokou specifitou. Vysoce afinitní vazba hormonu ale vyžaduje bipartitní JAZ dekonovou sekvenci. Tou je Jas doména nacházející se na C-konci JAZ, obsahující krátký konzervativní motiv LPIARR, vytvářející α -helix. Tato aminokyselinová smyčka v přítomnosti JA-Ile silně interaguje s COI1, uzavře ligand ve vazebné kapse a to vede ke stabilizaci komplexu COI1-JAZ (Sheard *et al.* 2010). Tedy vnímání JA-Ile koreceptorem umožňuje degradaci proteinů JAZ a tím uvolnění TF, což vede k expresi genů relevantních pro obranu rostlin.

1.7. Proteiny související s patogenezí v obranné reakci rostlin

Proteiny, které jsou kódované rostlinou za patologických nebo tomu příbuzných podmínek, se nazývají proteiny související s patogenezí (PRp; *pathogenesis-related proteins*). Jsou základní složkou inducibilních obranných mechanismů rostlin, ale mohou se vyskytovat také konstitutivně. Jejich exprese může být spuštěna jak po infekci patogeny (víry, bakterie, houby, oomycety), tak po napadení nematodami, hmyzem nebo býložravci. PRp mají nízkou molekulovou hmotnost (6-43 kDa) a jsou koordinovány na úrovni transkripce, která je aktivována signálními molekulami, jako jsou stresové hormony (kyselina sylicylová, JA a jejich metylestery). Jako elicitory exprese genů mohou působit fragmenty chitinu, glykoproteiny, glukany, peptidy, proteiny a oligosacharidy bakterií a hub. Indukce PRp při měření na časovém měřítku jsou pozdní událostí a jejich účinek na časnou infekci či poškození je omezený. Lokalizace a distribuce PRp přímo souvisí se způsobem a povahou infekce patogenem. PRp byly klasifikovány do různých rodin na základě sdílené sekvence homologie. PRp lze také seskupit do různých tříd na základě migrace v nativní polyakrylamidové gelové elektroforóze, reakce se specifickými antiséry a mRNA sondami. PRp byly také klasifikovány na základě biologické aktivity indukovaných obranných proteinů. Bylo identifikováno sedmáct různých tříd PRp (Sudisha *et al.* 2012; Sinha *et al.* 2014).

2. Od obrany k masožravosti rostlin

Fenomén masožravosti je u rostlin nápadným příkladem evoluce a adaptability organismů, aby se vyrovnaly s náročnými podmínkami prostředí, jako je nedostatek živin. Masožravé rostliny (MR) našly řešení, jak v takovém prostředí získat přístup k dusíku, fosforečnanu a minerálům. Givnish a kolektiv autorů navrhli, že rostlina musí splňovat dva základní požadavky, aby mohla být považována za masožravou. Zaprvé musí být schopna absorbovat živiny z mrtvé kořisti a tím získat určité zvýšení kondice ve smyslu zrychlení procesu fotosyntézy vedoucí k intenzivnějšímu růstu, dále produkce pylu nebo tvorby semen. Zadruhé rostlina musí mít určitou adaptaci, jejímž primárním výsledkem je aktivní lákání, chytání a/nebo trávení kořisti. První požadavek je důležitý k odlišení masožravosti od obrany rostlin, která znehybňuje nebo zabíjí zvířecí nepřátele, aniž by to vedlo k podstatné absorpci živin. Druhý je nutný, protože mnoho rostlin může pasivně profitovat z přijímání některých živin z mrtvých zvířat rozkládajících se v půdě nebo na povrchu listů. Rostlina musí mít alespoň jednu adaptaci, aby byla kvalifikována za masožravou. Mnoho rodů MR některý z těchto důležitých znaků postrádá (Givnish *et al.* 1984; Pavlovič and Saganová 2015).

Nespornou adaptací MR k chytání a/nebo trávení kořisti je vytvoření si lapacích orgánů, které vznikly přímou vývojovou přeměnou listů. Patří mezi ně: lepkavý list neboli adhézní past rodů tučnice (*Pinguicula*), rosnatka (*Drosera*), rosnolist (*Drosophyllum*), byblida (*Byblis*); láčka neboli gravitační past rodů láčkovka (*Nepenthes*), láčkovice (*Cephalotus*), heliamfora (*Heliamphora*), darlingtonie (*Darlingtonia*), špirlice (*Sarracenia*); vrš neboli detektivní past špirlice papouščí (*Sarracenia psittacina*) a rodu genlisej (*Genlisea*); sací měchýřek neboli hypotenzní past rodu bublinatka (*Utricularia*); a svírací čepel neboli mechanická past rodů mucholapka (*Dionaea*) a aldrovandka (*Aldrovanda*). Tyto lapací orgány se dělí na aktivní a pasivní. Účinek sacích měchýřků a svírací čepele je jednoznačně založen na velmi rychlém pohybu. Mezi aktivní nebo též pohyblivé pasti se řadí také adhezivní pasti rodu rosnatka a některé druhy rodu tučnice, které sice lapají kořist stejně jako typicky pasivní pasti, později se ale jejich lepkavé listy dávají do velmi pomalého pohybu a zlepšují tak styk s kořistí, což umožňuje lepší trávení, ale má to význam i jako ochrana před ztrátou kořisti. Možnosti tohoto pohybu se ale u různých druhů těchto dvou rodů mohou lišit. Např. tučnice siná (*P. agnata*) má listy ploché a nepohyblivé, zatímco tučnice lusitánská (*P. lusitanica*) má listy se silně svinutými okraji. Rosnatka nitřovitá (*D. filiformis*) může pohybovat pouze stopkatými žlázami na listu, kdežto rosnatka kapská (*D. capensis*) dokáže list přehnout přes kořist. Za zcela nepohyblivé jsou považovány pasti typu vrš, pasti všech rodů s láčkami a také lepkavé listy u byblid a rosnolistu (Studnička 1984; Ellison and Adamec 2018).

Lapací orgány neslouží jen k polapení kořisti a jejímu strávení, ale některé také splňují atribut lákání kořisti. K tomu zneužívají reflexů, které živočichům umožňují vyhledávat různé zdroje potravy a někdy i substráty pro kladení vajíček. Z tohoto důvodu lapací orgány MR napodobují svým vzhledem, barvou nebo vůní či pachem květy jiných rostlin (špirlice), plodnice hub (tučnice) nebo kvasící ovoce (láčkovky). Ačkoliv je vůně či zápach špirlic, láčkovek, tučnic, rosnatek a rosnolistu pro lidský čich sotva postřehnutelný, hmyz na ně reaguje velmi citlivě. Lákadlem je i nektar vylučovaný na povrchu lapacích orgánů láčkovek, špirlic, heliamfor, darlingtonie a mucholapky nebo třpytivé krůpěje na listech rosnatek, rosnolistu, tučnic a byblid. U rostlin, jejichž pasti jsou závislé na vodním prostředí, se předpokládá, že kořist je vábena vylučovaným slizem, který je tvořen ve speciálních žlázách lapacích orgánů bublinek, genlisei a aldrovandky (Studnička 1984).

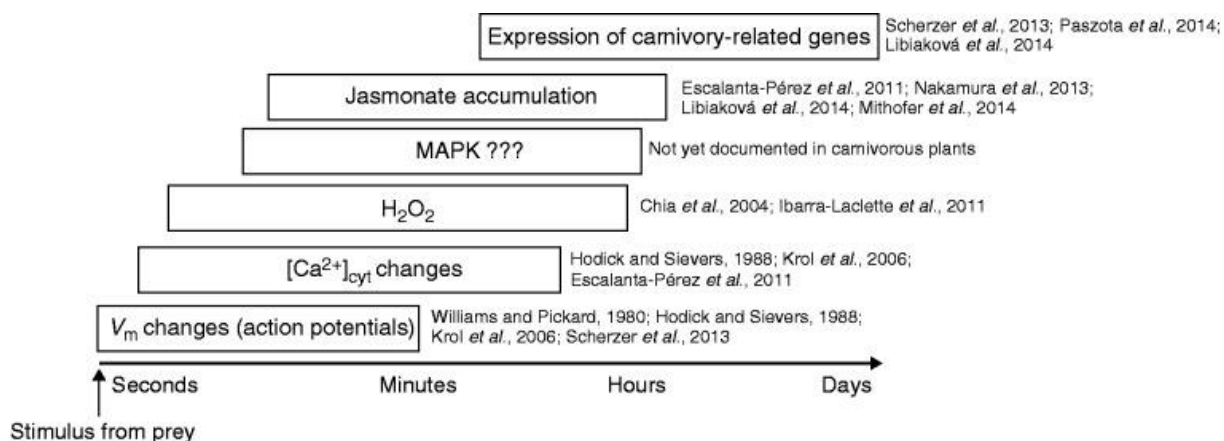
Většina taxonů MR patří do řádů hvozdíkotvaré (Caryophyllales), hluchavkotvaré (Lamiales) a vřesovcotvaré (Ericales); tři druhy pak spadají do řádu lipnicotvaré (Poales) a výjimečná je láčkovice australská (*C. follicularis*), která představuje jediný druh z monospecifické čeledi láčkovcovité (Cephalotaceae) a jediný masožravý druh z celého řádu šťavelotvaré (Oxalidales; (Ellison and Adamec 2018). Nedávno byla objevena zcela nová linie masožravých rostlin reprezentována rostlinou *Triantha occidentalis* spadající do řádu žabníkotvaré (Alismatales; Lin *et al.* 2021). Předpokládá se, že se v průběhu evoluce masožravost v těchto šesti různých řádech vyšších rostlin vyvinula nejméně jedenáctkrát zcela nezávisle na sobě, což představuje konvergentní vývoj (Ellison and Gotelli 2009; Givnish 2015). Konvergentní vývoj nebo též konvergentní/sbíhavá evoluce je proces, při němž se nepříbuzné druhy rostoucí ve vzdálených oblastech vyvíjejí pod podobnými selekčními tlaky, tj. v podobném prostředí a na základě toho dospějí k podobnému vzhledu nebo mají obdobné životní strategie (King *et al.* 2013). Jelikož je láčkovice z evolučního hlediska zcela izolována od všech ostatních MR, dokonce i od jiných láčkovek, udělalo to z ní ideálního kandidáta pro studium konvergentní evoluce masožravosti rostlin (Fukushima *et al.* 2017). Příklady konvergence na molekulární úrovni jsou velmi vzácné, pokud je nalezneme, zpravidla je pozorujeme jen mezi taxonomicky blízkými skupinami, najít konvergenci u vzdálených skupin je opravdovou raritou (Holicová 2015). Fukushima a kolektiv autorů (2017) provedli komplexní studii genomu a proteomu této láčkovice, která umožnila hluboký vhled do genetických změn souvisejících s masožravostí rostlin. Kromě mnoha dalších výsledků prokázali expanzi genů kódujících enzymy, které jsou spojovány s lákáním, chytáním a trávením hmyzu v láčce. Přítomnost a využití hydrolytických enzymů v trávicí tekutině, které jsou známé z láčkovky nebo mucholapky, odkazuje na ortologické vztahy mezi masožravými rostlinami navzdory jejich mnohočetnému původu. Skutečnost, že stejné základní principy masožravosti byly identifikovány jak u láčkovice australské, fylogeneticky

izolovaného druhu, tak i u jiných masožravých rostlin, silně podporuje hypotézu, že konvergentní evoluční strategie tvoří základ masožravosti a podporují její vznik v rostlinách. Pokud je však tato hypotéza správná, existují zjevná omezení pro rozvoj takového životního stylu. Z evolučního hlediska by měla být možná jakákoli cesta k tomuto konečnému bodu, ale převládající podmínky stanovují jistá omezení. MR žijí v chudých a stresujících prostředích, a to ovlivňuje ekonomiku této adaptace (Fukushima *et al.* 2017).

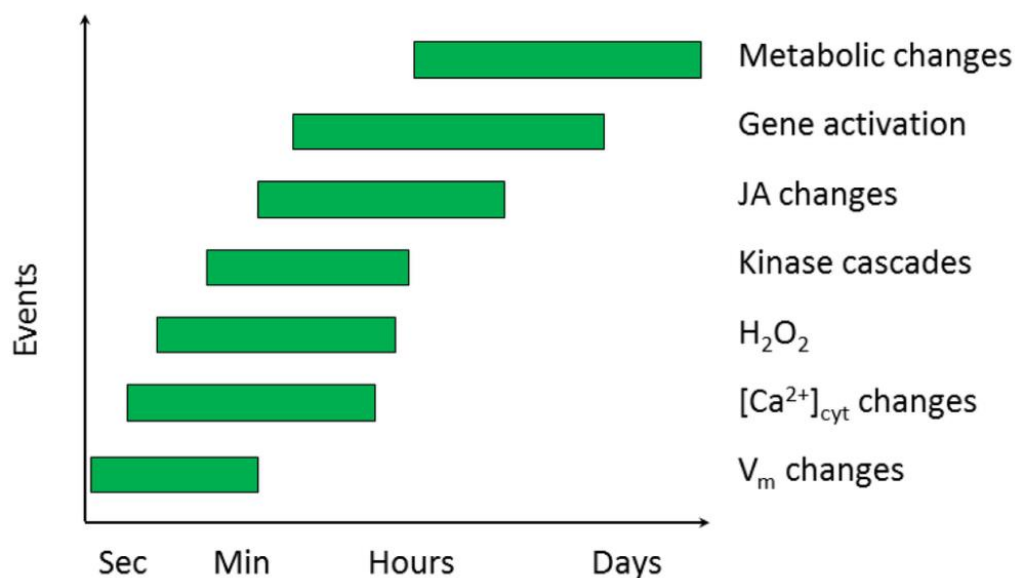
Vývoj nových funkcí může být nákladný, tak proč nepřizpůsobit ty stávající? Analýza proteinů trávicí tekutiny z láčkovice australské a tří dalších masožravých rostlin s nezávislým masožravým původem odhalila opakovanou exaptaci proteinových linií reagujících na stres spojené s konvergentními substitucemi aminokyselin k získání fyziologie trávení (Fukushima *et al.* 2017). Exaptace (ang. *Co-option*) je evoluční mechanismus, který usnadňuje vznik nových funkcí. Ve funkci znaku v průběhu působení evoluce dochází ke změně. Znak, který původně sloužil k jedné funkci, je časem využit na jinou – to může být případ nejen fenotypických znaků, ale i genů ovlivňujících chování. Klasickým příkladem je peří u ptáků, jehož původním účelem byla termoregulace, ale později bylo využito pro plachtění (Gould and Vrba 1982). Čím více se o masožravosti rostlin dozvídáme, tím více si uvědomujeme, že jejím evolučním pozadím je schopnost rostlin bránit se například proti býložravému hmyzu. Má se za to, že MR tedy exaptovali signální dráhu obranného mechanismu rostlin pro svůj účel – nikoliv k odpuzení, ale k přilákání, zabítí a trávení živočišné kořisti¹.

Už na první pohled může někomu přijít, že některé struktury v MR jsou podobné strukturám, které jsou zapojené do konstitutivní přímé obrany běžných rostlin. Například žláznaté trichomy jsou často využívány jak k obraně rostlin, tak k trávení kořisti. V některých případech se dokonce hranice mezi obranou a masožravostí rostlin stírá. Někdy to vede dokonce i ke zmatku a tvrzením, že MR je mnohem více, což silně naznačuje příbuznost a společný původ (Chase Fls *et al.* 2009). Koncept, že botanická masožravost a obranné mechanismy spolu vzájemně souvisejí, je starý (Juniper *et al.* 1989), ale objev, že využívají stejnou signální dráhu, je relativně nový. Na **Obr. 2** je uvedena pravděpodobná časová hierarchie událostí, které byly detekovány u masožravých rostlin s aktivním lapacím mechanismem kromě bublinatky. Na **Obr. 3** je poté pro srovnání ukázána sekvence po sobě jdoucích událostí detekovatelných po poškození běžných rostlin hmyzem.

¹ V průběhu sepisování této disertace autorka již věděla, že toto tvrzení je zcela platné pouze pro řád hvozdíkotvaré, nicméně se snaží zachytit dobu a myšlení před publikováním jejích vlastních článků. Pár odkazů na příložené publikace se ale může vyskytnout.



Obr. 2: Pravděpodobná časovaná hierarchie po sobě jdoucích událostí detekovatelných u masožravých rostlin s aktivním lapacím mechanismem (vyjímaje bublinatku) v reakci na zachycení kořisti, která je převzatá z obranných mechanismů rostlin (Maffei *et al.* 2007). Nejčasnějšími měřitelnými událostmi jsou akční potenciály generované mechanickými podněty (Williams and Pickard 1980; Hodick and Sievers 1988; Krol *et al.* 2006; Escalante-Perez *et al.* 2011) nebo chemickými podněty z kořisti (Scherzer *et al.* 2013), které iniciují zvýšení koncentrace vápníku v cytosolu (Escalante-Perez *et al.* 2011) a tvorbu H₂O₂ (Chia *et al.* 2004; Ibarra-Laclette *et al.* 2011). Ca²⁺ v cytosolu je pravděpodobně snímán vazbou na kalmodulin (CaM) nebo jiný protein vnímající vápník, který může interagovat s mitogenem aktivovanými protein kinázami (MAPK); tato část signální dráhy nebyla dosud u masožravých rostlin zdokumentována. MAPKs regulují biosyntézu jasmonátů, které spouštějí expresi genů souvisejících s masožravostí (Scherzer *et al.* 2013; Nakamura *et al.* 2013; Libiaková *et al.* 2014; Paszota *et al.* 2014; Mithöfer *et al.* 2014). Převzato z Pavlovič and Saganová (2015).



Obr. 3: Časovaná hierarchie po sobě jdoucích událostí detekovatelných v rostlinných tkáních, které jsou iniciovány útokem herbivora. Nejčasnějšími měřitelnými událostmi jsou změny potenciálu na plazmatické membráně (V_m), bezprostředně následované změnami v intracelulární koncentraci Ca²⁺ a tvorbou H₂O₂. Během několika minut jsou detekovatelné kinázy a fytohormony kyselina jasmonová (JA) a salicylová (SA). Aktivace genů a následné metabolické změny jsou nejdříve patrné asi po 1 hodině. (Převzato z Maffei *et al.* 2007).

ZÁVĚR

Rostliny obecně si vyvinuly komplexní řadu lokálních a systémových signalizačních systémů, které umožňují integraci a koordinaci jejich fyziologie a vývoje. V biotopech chudých na živiny si speciální skupina rostlin, takzvaně masožravých, vyvinula důmyslné mechanismy, jak chybějící živiny v půdě nahradit. Získávají je z živočišné kořisti, k čemuž si přeměnily jejich listy na pasti. Tato schopnost spojuje všechny druhy z nejrůznějších podnebných a zeměpisných oblastí. Masožravé rostliny reprezentují ekologicky i morfologicky různorodou skupinu s více než 800 druhy, které spadají do jen vzdáleně příbuzných třinácti čeledí s celkem dvaceti rody kvetoucích rostlin. Charles Darwin ve své knize *Insectivorous plants* o těchto rostlinách napsal: „...vidíme, jak málo bylo rozluštěno ve srovnání s tím, co zůstává nevysvětleno nebo neznámo“ (Darwin 1875). To platí ale i dnes, i přesto že disponujeme velmi pokrokovými metodami. Má práce přinesla alespoň pár nových dílků skládačky k tomu, abychom pochopili, jak nejen tyto rostliny fungují.

Ukázalo se, že některé masožravé rostliny pro chycení a regulaci trávicího procesu využívají elektrickou a jasmonátovou signalizaci. V publikaci Pavlovič *et al.* (2017), která sloužila jako odrazový můstek pro tuto disertační práci a plynule na ni navazují, bylo dokázáno, že sekvence událostí po chycení kořisti masožravou rostlinou mucholapkou podivnou připomíná dobře známou signální dráhu obrany rostlin v reakci na napadení patogenem nebo býložravcem. Po poškození generují rostliny elektrické signály, které vyvolají akumulaci rostlinných hormonů jasmonátů následovanou expresí genů odpovídajících na jasmonáty. Mucholapka pak začne vylučovat do pasti trávicí enzymy schopné trávit chitin, proteiny, DNA a RNA, tedy molekuly bohaté hlavně na dusík. Nicméně elektrická signalizace v mucholapce není specifická, a tak mucholapka zatížená evoluční minulostí není schopna rozeznat, zda je poškozována býložravcem nebo mechanicky stimulována opravdovou kořistí (publikace 0.). Až jakmile ucítí protein a nikoli chitin, který je první chemickou látkou, se kterou přijdou trávicí žlázy do styku, protože se převážně z něj skládá exoskeleton hmyzu, spustí svůj trávicí proces naplno (publikace I.). Chemické signály z kořisti jsou důležitějším induktorem pro stabilní a vysokou akumulaci jasmonátů a aktivit enzymů než samostatná mechanická stimulace.

V době zveřejnění publikace 0 se mělo obecně za to, že masožravost rostlin byla vyvinuta z obranného mechanismu rostlin. Nicméně společné znaky s obranným mechanismem, tedy to že jsou jasmonáty zodpovědné za aktivaci a regulaci trávicích enzymů, byly prokázány jen u tří rodů masožravých rostlin: mucholapka (*Dionaea*), rosnatka (*Drosera*), a láchkovka (*Nepenthes*) řádu hvozdíkotvaré (Caryophyllales). Jak je jasmonátová signální dráha rozšířená mezi ostatní linie masožravých rostlin nebylo známé. Rozhodli jsme se proto prostudovat také ostatní zástupce masožravých rostlin: tučnici (hybrid *Pinguicula* × *Tina*) a bublinatky (*Utricularia reflexa* a *U.*

vulgaris) z řádu hluchavkotvaré (Lamiales), láčkovici australskou (*Cephalotus follicularis*) z řádu šťavelotvaré (Oxalidales), špirlici nachovou (*Sarracenia purpurea* ssp. *venosa*) z řádu vřesovcotvaré (Ericales) a také další masožravé rostliny z řádu hvozdíkotvaré (Caryophyllales) – rosnolist lusitánský (*Drosophyllum lusitanicum*) a aldrovandkau měchýřkatou (*Aldrovanda vesiculosa*). Ukázalo se, že jasmonátová signalizace není univerzální a všudypřítomnou drahou, která je využívána masožravými rostlinami pro regulaci trávicích enzymů. Ačkoli masožravé rostliny z různých evolučních linií využívají stejné trávicí enzymy, přičemž některé z nich spadají do skupiny od patogeneze odvozených proteinů, regulace jejich aktivit se výrazně liší. Přestože masožravé rostliny využívají jasmonáty pro svou odvěkou roli – obranu, exaptace jasmonátové signalizace pro botanickou masožravost se pravděpodobně vyskytla pouze jednou v nejstarší linii masožravých rostlin – hvozdíkotvaré, a poté již nikdy nebyla kooptována znovu (publikace II., III. a IV).

Nedávno bylo v publikaci Yokawa *et al.* (2017) zjištěno, že masožravá rostlina mucholapka s její pohyblivou čepelí je dobrým experimentálním modelem pro výzkum vlivu anestetik. Primárním místem účinku celkových anestetik u živočichů je nervový systém, kde anestetika inhibují přenos nervového vzruchu. Existuje několik teorií, jak tato nesourodá skupina látek účinkuje. Moderní teorie působení anestetik vycházejí z existence specifických receptorů (např. receptory kyseliny γ -aminomáselné anebo ionotropní glutamátové receptory), v centrálním nervovém systému, jejich agonistů/antagonistů a případně jsou založeny na ovlivnění akčního potenciálu nervů, zejména prostřednictvím sodíkových kanálů. Ačkoli rostliny nemají neurony, generují elektrické signály v odpovědi na biotický a abiotický stres. Tyto vjemy rostlina ztrácí, pokud je vystavena účinku některých anestetik. Ukazuje se, že elektrická signalizace v rostlinách využívá podobné proteiny jako v našem mozku. A právě na elektrické signály anestetika cílí také v rostlinách. Dietyléter kompletně inhiboval tvorbu akčního potenciálu v mucholapce a past nebyla schopná se pod vlivem anestetika uzavřít. Akční potenciály byly však plně obnoveny po odstranění anestetika. Dietyléter také kompletně inhiboval další reakce: akumulaci jasmonátů a expresi genů odpovídajících na jasmonáty. Nicméně externí aplikace kyseliny jasmonové do pasti obešla inhibici akčního potenciálu a obnovila genovou expresi i pod vlivem anestetika, což naznačuje, že reakce následující po akumulaci kyseliny jasmonové nejsou inhibovány (publikace V.).

Mucholapka však má jakožto experimentální model také své nevýhody jako např. malé množství existujících a dostupných mutantů a oproti jiným experimentálním rostlinám není elektrický signál šířen systémově. Jasmonáty jsou tak akumulovány pouze v pasti s kořistí nebo po poškození pasti (publikace 0). Elektrické signály nehrají ale roli pouze v pohyblivých rostlinách, ale jsou nesmírně důležité i v životě běžných rostlin při reakci na různé biotické

a abiotické faktory. To, co jsme se naučili na masožravých rostlinách, jsme aplikovali na huseníček rolní, kde se elektrický signál šíří také do sousedních listů, abychom proces prozkoumali více do hloubky. Buněčná odpověď byla v systémových listech zcela blokována, nicméně lokální poškozený list stále cítil a reagoval na podněty. Jelikož je systémové šíření elektrického signálu v huseníčku závislé na kanálech podobných glutamátovým receptorům, mohl by právě na ně dietyléter nespecificky cílit. To potvrdila také inhibice glutamátem indukovaných elektrických signálů anestetiky (publikace VI.). Inhibice elektrických signálů a jasmonátové odpovědi vlivem anestetik dokumentuje významnou podobnost mezi signálními drahami masožravosti a obrany rostlin.

Stále nám ale mnohé zůstává zahaleno a čeká na odpověď...

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. 2000.** The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1**: 11–21.
- Chase Fs MW, Christenhusz Fs MJM, Fs DS, Fs MFF. 2009.** Murderous plants: Victorian Gothic, Darwin and modern insights into vegetable carnivory. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**: 329–356.
- Chauvin A, Caldelari D, Wolfender JL, Farmer EE. 2013.** Four 13-lipoxygenases contribute to rapid jasmonate synthesis in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves: A role for lipoxygenase 6 in responses to long-distance wound signals. *New Phytologist* **197**: 566–575.
- Chia TF, Aung HH, Osipov AN, Goh NK, Chia LS. 2004.** Carnivorous pitcher plant uses free radicals in the digestion of prey. *Redox Report* **9**: 255–261.
- Chini A, Fonseca S, Fernández G, et al. 2007.** The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666–671.
- Chini A, Monte I, Zamarreño AM, et al. 2018.** An OPR3-independent pathway uses 4,5-didehydrojasmonate for jasmonate synthesis. *Nature Chemical Biology* **14**: 171–178.
- Darwin C. 1875.** *Insectivorous plants*. John Murray, London.
- Day IS, Reddy VS, Shad Ali G, Reddy A. 2002.** Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. *Genome Biology* **3**: 1–24.
- Demidchik V, Shabala S, Isayenkov S, Cuin TA, Pottosin I. 2018.** Calcium transport across plant membranes: Mechanisms and functions. *New Phytologist* **220**: 49–69.
- Dodd AN, Kudla J, Sanders D. 2010.** The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 593–620.
- Ellison AM, Adamec L. 2018.** *Carnivorous plants: Physiology, ecology, and evolution*. Oxford University Press.
- Ellison AM, Gotelli NJ. 2009.** Energetics and the evolution of carnivorous plants - Darwin's "most wonderful plants in the world." *Journal of Experimental Botany* **60**: 19–42.
- Escalante-Perez M, Krol E, Stange A, et al. 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 of the United States of America* **108**: 15492–15497.
- Farmer EE, Gao Y, Lenzoni G, Wolfender J, Wu Q. 2020.** Wound- and mechano-stimulated electrical signals control hormone responses. *New Phytologist* **227**: 1037–1050.
- Fisahn J, Herde O, Willmitzer L, Peña-Cortés H. 2004.** Analysis of the transient increase in cytosolic Ca²⁺ during the action potential of higher plants with high temporal resolution: requirement of Ca²⁺ transients for induction of jasmonic acid biosynthesis and PINII gene expression. *Plant Cell Physiol* **45**: 456–459.
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, et al. 2009.** (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isooleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* **5**: 344–350.
- Fukushima K, Fang X, Alvarez-Ponce D, et al. 2017.** Genome of the pitcher plant *Cephalotus* reveals genetic changes associated with carnivory. *Nature Ecology and Evolution* **1**: 1–9.
- Gilroy S, Bialasek M, Suzuki N, et al. 2016.** ROS, calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant Physiology* **171**: 1606–1615.
- Givnish TJ. 2015.** New evidence on the origin of carnivorous plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: 10–11.
- Givnish TJ, Burkhardt EL, Happel RE, Weintraub JD. 1984.** Carnivory in the bromeliad *Brocchinia reducta*, with a cost/benefit model for the general restriction of carnivorous plants to sunny, moist, nutrient-poor habitats. *American Naturalist* **124**: 479–497.
- Gould SJ, Vrba ES. 1982.** Exaptation—a missing term in the science of form. *Paleobiology* **8**: 4–15.
- Hodick D, Sievers A. 1988.** The action potential of *Dionaea muscipula* Ellis. *Planta* **174**: 8–18.
- Holicová T. 2015.** Předvídatelná evoluce. *Vesmír* **94**: 667–668.

- Ibarra-Laclette E, Albert VA, Pérez-Torres CA, et al. 2011.** Transcriptomics and molecular evolutionary rate analysis of the bladderwort (*Utricularia*), a carnivorous plant with a minimal genome. *BMC Plant Biology* **11**: 101.
- 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.
- Juniper BE, Robins RJ, Joel DM. 1989.** *The carnivorous plants*. Academic Press.
- Kimberlin AN, Holtsclaw RE, Zhang T, Mulaudzi T, Koo AJ. 2022.** On the initiation of jasmonate biosynthesis in wounded leaves. *Plant Physiology*: 1–18.
- King RC, Mulligan PK, Stansfield WD. 2013.** *A Dictionary of Genetics*. Oxford University Press.
- Koo AJK, Gao X, Daniel Jones A, Howe GA. 2009.** A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **59**: 974–986.
- Krol E, Dziubinska H, Stolarz M, Trebacz K. 2006.** Effects of ion channel inhibitors on cold- and electrically-induced action potentials in *Dionaea muscipula*. *Biologia Plantarum* **50**: 411–416.
- Lecourieux D, Ranjeva R, Pugin A. 2006.** Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist* **171**: 249–269.
- Libiaková M, Floková K, Novák O, Slováková L, 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**: e104424.
- Lin Q, Ané C, Givnish TJ, Graham SW. 2021.** A new carnivorous plant lineage (Triantha) with a unique sticky-inflorescence trap. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **118**.
- Maffei ME, Mithöfer A, Boland W. 2007.** Before gene expression : early events in plant–insect interaction. *Trends in Plant Science* **12**: 310–316.
- McAinsh MR, Brownlee C, Hetherington AM. 1997.** Calcium ions as second messengers in guard cell signal transduction. *Physiologia Plantarum* **100**: 16–29.
- Meldau S, Erb M, Baldwin IT. 2012.** Defence on demand: Mechanisms behind optimal defence patterns. *Annals of Botany* **110**: 1503–1514.
- Mithöfer A, Boland W. 2012.** Plant defense against herbivores: Chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology* **63**: 431–450.
- Mithöfer A, Reichelt M, Nakamura Y. 2014.** Wound and insect-induced jasmonate accumulation in carnivorous *Drosera capensis* : two sides of the same coin. *Plant Biology* **16**: 982–987.
- Mousavi SAR, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S, Farmer EE. 2013.** GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* **500**: 422–426.
- Nakamura Y, Reichelt M, Mayer VE, Mithofer A. 2013.** Jasmonates trigger prey-induced formation of “outer stomach” in carnivorous sundew plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **280**: 20130228.
- Oelmüller R. 2021.** Threat at one end of the plant: What travels to inform the other parts? *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 3152.
- Paszota P, Escalante-Perez M, Thomsen LR, et al. 2014.** Secreted major Venus flytrap chitinase enables digestion of Arthropod prey. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1844**: 374–383.
- 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.
- Pavlovič A, Saganová M. 2015.** A novel insight into the cost–benefit model for the evolution of botanical carnivory. *Annals of Botany* **115**: 1075–1092.
- Ruan J, Zhou Y, Zhou M, et al. 2019.** Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **20**: 2479.
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF. 2002.** Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* **14**: 401–417.
- Scherzer S, Krol E, Kreuzer I, et al. 2013.** The *Dionaea muscipula* ammonium channel DmAMT1 provides NH₄⁺ uptake associated with Venus flytrap’s prey digestion. *Current Biology* **23**: 1649–1657.

- Seo S, Okamoto M, Seto H, Ishizuka K, Sano H, Ohashi Y. 1995.** Tobacco MAP kinase: A possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science* **270**: 1988–1992.
- Sheard LB, Tan X, Mao H, et al. 2010.** Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1–JAZ co-receptor. *Nature* **468**: 400–405.
- Sinha M, Singh RP, Kushwaha GS, et al. 2014.** Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *The Scientific World Journal* **2014**.
- Staswick PE, Tiryaki I. 2004.** The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**: 2117–2127.
- Studnička M. 1984.** *Masožravé rostliny*. Praha: Academia.
- Sudisha J, Sharathchandra RG, Amruthesh KN, Kumar A, Shetty HS. 2012.** Pathogenesis related proteins in plant defense response In: *Plant Defence: Biological Control*. Springer Netherlands, 379–403.
- Thines B, Katsir L, Melotto M, et al. 2007.** JAZ repressor proteins are targets of the SCFCOI1 complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**: 661–665.
- La Verde V, Dominici P, Astegno A. 2018.** Towards understanding plant calcium signaling through calmodulin-like proteins: A biochemical and structural perspective. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 1331.
- War AR, Paulraj MG, Ahmad T, et al. 2012.** Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling and Behavior* **7**: 1306–1320.
- Williams SE, Pickard BG. 1980.** The role of action potentials in the control of capture movements of *Drosera* and *Dionaea* In: *Plant growth substances 1979*. Springer, Berlin, Heidelberg, 470–480.
- Xie DX, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M, Turner JG. 1998.** COI1: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**: 1091–1094.
- Yan C, Fan M, Yang M, et al. 2018.** Injury activates Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphorylation of JAV1-JAZ8-WRKY51 complex for jasmonate biosynthesis. *Molecular Cell* **70**: 136–149.
- Yan J, Li S, Gu M, et al. 2016.** Endogenous bioactive jasmonate is composed of a set of (+)-7- iso- JA-amino acid conjugates. *Plant Physiology* **172**: 2154–2164.
- Yokawa K, Kagenishi T, Pavlovic A, et al. 2017.** Anaesthetics stop diverse plant organ movements, affect endocytic vesicle recycling and ROS homeostasis, and block action potentials in Venus flytraps. *Annals of Botany* **122**: 747–756.
- Zhai Q, Zhang X, Wu F, et al. 2015.** Transcriptional mechanism of jasmonate receptor COI1-mediated delay of flowering time in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **27**.

SEZNAM PUBLIKACÍ

Vědecké publikace autorky relevantní pro disertační práci, publikované před nástupem na doktorské studium:

0. **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. IF (2016) = 7.71

Publikace relevantní pro disertační práci:

- I. **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. IF (2019) = 3.983
- II. **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**, 3749–3758. IF (2019) = 5.908
- III. **Jakšová J., Adamec L., Petřík I., Novák O., Šebela M., Pavlovič A. (2021)** Contrasting effect of prey capture on jasmonate accumulation in two genera of aquatic carnivorous plants (*Aldrovanda*, *Utricularia*). *Plant Physiology and Biochemistry* **166**, 459–465. IF (2020) = 4.143
- IV. **Pavlovič A., Jakšová J., Lenobel R., Vrobel O., Tarkowski P. (2022)** Jasmonate signalling in different evolutionary lineages of carnivorous plants. Manuskript v přípravě.
- V. **Pavlovič A., Libiaková M., Bokor B., Jakšová J., Petřík I., Novák O., Baluška F. (2019)** Anaesthesia with diethyl ether impairs jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). *Annals of Botany* **125**, 173–183. IF (2018) = 4.005
- VI. **Jakšová J., Rác M., Bokor B., Petřík I., Novák O., Reichelt M., Mithöfer A., Pavlovič A. (2021)** Anaesthetic diethyl ether impairs systemic electrical and jasmonate signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **169**, 311–321. IF (2020) = 4.143

Další vědecké publikace autorky:

Pavlovič A., Jakšová J., Kučerová Z., Špundová M., Rác M., Roudnický P., Mithöfer A. (2022) Diethyl ether anaesthesia induces transient cytosolic $[Ca^{2+}]$ increase, heat shock proteins and heat stress tolerance of photosystem II in *Arabidopsis*. Manuskript v recenzním řízení.

Pavlovič A., Štedrá A, Jakšová J, Šimková L, Bartoš J. (2022) Light-dependent greening of etiolated barley (*Hordeum vulgare*) is inhibited by diethyl ether anaesthesia. Manuskript v přípravě.

Populárně-vědecká publikace autorky:

Jakšová J. (2020) Elektrická a jasmonátová signalizace v mucholapce podivné. *Živa 1*, 20–22.

Souhrn publikace 0

Název: Triggering a false alarm: wounding mimics prey capture in the carnivorous Venus flytrap (*Dionaea muscipula*)

Autoři: Pavlovič A., Jakšová J., Novák O.

Status: publikována v roce 2017 v New Phytologist

DOI: 10.1111/nph.14747

Souhrn:

Opakovaná mechanická stimulace spouštěcích výčnělků, které vystupují z pokožky uvnitř pasti mucholapky podivné (*Dionaea muscipula*), vyvolává elektrické signály (akční potenciály) a spouští jasmonátovou signalizaci a expresi genů trávicích enzymů, které jsou příbuzné s proteiny související s patogenezí. Tato sekvence událostí připomíná dobře známou signální dráhu obrany rostlin v odpovědi na útok patogena nebo býložravce. V této studii byla sledována elektrická signalizace, hromadění jasmonátů v pletivu pasti a vylučování trávicích enzymů v odpovědi na chycení kořisti, umělou mechanickou stimulaci spouštěcích výčnělků a poranění, aby byla dokázána podobnost mezi obranným mechanismem a masožravostí rostlin. Výsledky ukázaly, že mucholapka podivná nedokáže rozpoznat poranění od mechanické stimulace spouštěcích výčnělků kořistí. Oba typy stimulace vyvolaly stejné akční potenciály, rychlé sklapnutí pasti, hermetické uzavření, akumulaci kyseliny jasmonové (JA) a jejího isoleucinového konjugátu (JA-Ile), sekreci aspartátových a cysteinových proteáz, fosfatáz a chitináz typu I. Zevní podání JA vyvolalo taktéž sekreci trávicích enzymů, což potvrdilo zapojení signalizace kyseliny jasmonové v masožravosti rostlin.

Navzdory sofistikovanému systému rozpoznávající kořist tedy tato studie ukazuje, že mucholapka může být jednoduše pomýlena poškozením, typickým aktivátorem obranné reakce rostlin. U mucholapky poškození pasti aktivuje rychlé sklapnutí pasti, její hermetické uzavření a sekreci trávicí tekutiny obsahující enzymy, je vyvolána tedy typická masožravá reakce. Tato skutečnost je výsledkem její evoluční historie a exaptace chování, tedy evolučního posunu ve funkci vlastnosti, což naznačuje, že tyto rostliny pravděpodobně používají stejné vnímání a signální dráhu a nedokáže rozlišit mezi přítomností kořisti nebo býložravého hmyzu.

Akumulace jasmonátů a sekrece enzymů v odpovědi na poranění i krmení byla potvrzena pouze v lokálních pastech, což koreluje se šířením elektrických signálů. Znamená to, že na rozdíl od obranného mechanismu rostlin mucholapka postrádá systémovou odpověď, což může představovat účinnou strategii šetření energetických zdrojů. Pro mucholapku by bylo velmi energeticky náročné produkovat trávicí tekutinu také v sousedních pastech, které nechytily žádnou

kořist. Modifikací systémové elektrické signalizace známé u běžných rostlin do lokální v průběhu evoluce tak minimalizovali energetické náklady spojené s masožravostí.

V době publikování tohoto článku se má za to, že botanická masožravost se vyvinula z obranných mechanismů rostlin, což podporuje i skutečnost, že mnoho proteinů vylučovaných v reakci na zachycení kořisti souvisí s patogenezí.

Příspěvní autorů:

Výzkum:

- příprava a odebrání materiálů pro měření: J. Jakšová
- měření elektrických signálů: J. Jakšová
- kvantifikace fytohormonů: J. Jakšová, O. Novák
- měření enzymových aktivit: J. Jakšová
- SDS-PAGE a Western bloty: J. Jakšová
- Konceptualizace: A. Pavlovič

Supervize: A. Pavlovič, O. Novák

Vizualizace: A. Pavlovič

Statistická analýza: A. Pavlovič, O. Novák

Psaní – původní rukopis: A. Pavlovič

Psaní – editace: A. Pavlovič

Získání financování: A. Pavlovič, O. Novák

Podíl J. Jakšové: 40 %

Souhrn publikace 1

Název: Taste for protein: Chemical signal from prey stimulates enzyme secretion through jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap

Autoři: Jakšová J., Libiaková M., Bokor B., Petřík I., Novák O., Pavlovič A.

Status: publikována v roce 2020 v Plant Physiology and Biochemistry 146, 90–97.

DOI: 10.1016/j.plaphy.2019.11.013

Souhrn:

Chycení kořisti a trávení mucholapky podivné je řízeno dvěma typy stimulů – mechanickými a chemickými. Mechanické stimuly spouštěcích výčnělků uvnitř pasti, které jsou spojovány s tvorbou akčních potenciálů a zvýšením cytosolické koncentrace Ca^{2+} , jsou důležité hlavně v prvních hodinách po chycení kořisti a jsou zodpovědné za rychlé hermetické uzavření pasti a uvolňování trávicí tekutiny. Co se ale odehrává v pasti, jakmile stimulace pohybem kořisti ustane a jak mucholapka pozná, že se jedná opravdu o živočišnou kořist, aby byla schopná ušetřit své zdroje? Chemické signály z částečně rozložené kořisti mohou udržovat vysokou koncentraci kyseliny jasmonové a jejího isoleucinového konjugátu a produkci trávicích enzymů zvýšenou i přesto, že vyvolání elektrických signálů kořistí ustane. Vnímání chemických látek a tzv. pozdní fázi trávicího procesu se věnuje tato publikace. Bylo k tomu využito dvou na dusík bohatých látek v pevné formě, chitinu a proteinu (konkrétně hovězího sérového albuminu), ve spojení s mechanostimulací citlivých výčnělků uvnitř pasti. Mnoho výzkumníků se při jejich studiích zaměřilo na chitin, protože vnější kostra hmyzu se skládá převážně právě z něj. Ačkoli je chitin pravděpodobně první chemickou látkou, se kterou se trávicí žlázy mucholapky dostávají do přímého kontaktu, není pro rostlinu hlavním zdrojem dusíku v porovnání s proteinem. Chemická stimulace proteinem ve spojení s mechanostimulací vyvolala největší akumulaci kyseliny jasmonové a jejího isoleucinového konjugátu, stejně jako expresi vybraných genů kódující cystein proteázu (dionain) a chitinázu. Také se ukázalo, že trávicí tekutina, která byla sbírána po 48 hodinách od stimulace, vykazovala fosfatázovou, chitinázovou a proteolytickou aktivitu a tato aktivita byla ve všech případech největší po dodatečné stimulaci proteinem. Taky abundance enzymů odpovědných za uvedené aktivity byla nejvyšší po podání proteinu. Chitin neměl žádný významný aditivní efekt na enzymové aktivity, navzdory tomu stále indukoval vysokou hladinu jasmonátů. Na základě těchto výsledků bylo zřejmé, že enzymové aktivity v mucholapce nejsou substrátově specifické a protein byl nejlepším induktorem nejen proteolytických, ale také ostatních aktivit.

Příspěvní autorů:

Výzkum:

- příprava a odebrání materiálů pro měření: J. Jakšová
- měření elektrických signálů: J. Jakšová
- kvantifikace fytohormonů: J. Jakšová, I. Petřík
- měření genové exprese s použitím qPCR: M. Libiaková, B. Bokor
- měření enzymových aktivit: J. Jakšová
- SDS-PAGE a Western bloty: J. Jakšová

Konceptualizace: A. Pavlovič

Supervize: A. Pavlovič, O. Novák

Vizualizace: J. Jakšová, A. Pavlovič

Statistická analýza: J. Jakšová, A. Pavlovič

Psaní – původní rukopis: J. Jakšová, A. Pavlovič

Psaní – editace: J. Jakšová, A. Pavlovič

Získání financování: A. Pavlovič, O. Novák

Podíl J. Jakšové: 50 %

Souhrn publikace 2

Název: Jasmonate-independent regulation of digestive enzyme activity in the carnivorous butterwort *Pinguicula* × *Tina*

Autoři: Kocáb O., Jakšová J., Novák O., Petřík I., Lenobel R., Chamrád I., Pavlovič A.

Status: publikována v roce 2020 v *Journal of Experimental Botany* 71, 3749-3758

DOI: 10.1093/jxb/eraa159

Souhrn:

Při studiu masožravých rostlin byla nalezena nová role pro rostlinné hormony jasmonáty – regulace aktivity trávicích enzymů. Předchozí studie, které odhalily zapojení jasmonátů do trávicího procesu, byly ale zaměřeny pouze na tři rody masožravých rostlin – rosnatka (*Drosera*), mucholapka (*Dionaea*) a láčkovka (*Nepenthes*), které všechny spadají do řádu hvozdíkotvaré (Caryophyllales). V této studii nás zajímalo, zdali je jasmonátová signalizace univerzální a v masožravých rostlinách všudypřítomnou signální drahou, která tedy existuje i mimo řád hvozdíkotvaré. Aby bylo odpovězeno na tuto otázku, byla použita masožravá tučnice (hybrid *Pinguicula* × *Tina*) z řádu hluchavkotvaré (Lamiales) a jako kořist sloužila octomilka (*Drosophila melanogaster*). Kořist vyvolala významně zvýšenou aktivitu proteáz, kyselých fosfatáz, amyláz a exochitináz po 2 hodinách po krmení. Po 24 byly významně zvýšené aktivity také dalších studovaných trávicích enzymů endochitinázy a chitobiositázy. Obsah kyseliny jasmonové (JA) se však významně nezvýšila ani po 2 ani po 24 hodinách od krmení. Aby se vyloučila možnost, že by analýzy byly ovlivněny použitím nemodelového rostlinného materiálu, byl list tučnice opakovaně poraněn jehlou. To oproti krmení vyvolalo významné zvýšení JA i jejího isoleucinového konjugátu (JA-Ile). Aby bylo dále vyloučeno, že se v tučnici jasmonáty opravdu nepodílejí na vylučování enzymů, byla na list zevně aplikovaná kyselina jasmonová a koronatin (molekulární agonista JA-Ile). Ani jedna chemikálie ale nebyla schopna enzymovou aktivitu zvýšit. Ačkoli jsou tedy jasmonáty v rostlinném pletivu přítomny a uplatňují se při obraně proti poškození, tučnice nepřevzala jasmonátovou signalizaci pro indukci enzymových aktivit v odpovědi na chycení kořisti a způsob regulace enzymů se liší. Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo dále identifikováno osm enzymů, z nichž mnohé byly již dříve objeveny v jiných rodech masožravých rostlin. Tomu se však vymyká alfa-amyláza, která je zatím v masožravých rostlinách unikátní. To může naznačovat, že pro masožravost byly také exaptovány geny, které nesouvisejí s obrannými mechanismy rostlin. Navíc bylo poprvé ukázáno, že jako masožravý orgán může kromě listu sloužit i květní stopka.

Příspěvní autorů:

Výzkum:

- příprava a odebrání materiálů: O. Kocáb
- měření elektrických signálů: A. Pavlovič
- kvantifikace fytohormonů: J. Jakšová, I. Petřík, O. Novák
- měření enzymových aktivit: O. Kocáb
- SDS-PAGE a Western bloty: O. Kocáb
- identifikace proteinů: R. Lenobel, I. Chamrád

Konceptualizace: A. Pavlovič

Supervize: A. Pavlovič, I. Petřík, O. Novák

Vizualizace: A. Pavlovič

Statistika: A. Pavlovič

Psaní – původní rukopis: O. Kocáb, A. Pavlovič

Psaní – editace: O. Kocáb, A. Pavlovič

Získání financování: A. Pavlovič, O. Novák

Podíl J. Jakšové: 10 %

Souhrn publikace 3

Název: Contrasting effect of prey capture on jasmonate accumulation in two genera of aquatic carnivorous plants (*Aldrovanda*, *Utricularia*)

Autoři: Jakšová J., Adamec L., Petřík I., Novák O., Pavlovič A.

Status: publikováno v roce 2021 v Plant Physiology and Biochemistry

DOI: 10.1016/j.plaphy.2021.06.014

Souhrn:

Suchozemské masožravé rostliny druhů rosnatka (*Drosera*), mucholapka (*Dionaea*) a láčkovka (*Nepenthes*) řádu hvozdíkotvaré (Caryophyllales) využívají k regulaci enzymových aktivit fytohormony jasmonáty. V této studii byla pozornost zaměřena na vodní masožravé rostliny, jejichž morfologické a fyziologické rysy a růstové strategie jsou zcela odlišné od těch suchozemských. Byly vybrány dva rody s odlišným lapacím mechanismem a z odlišných čeledí a řádů: aldrovandka (*Aldrovanda*; rosnatkovité, hvozdíkotvaré) se sklapávací pastí a bublinatka (*Utricularia*; bublinatkovité, hluchavkotvaré) se sacím typem pasti. Jako kořist sloužil různý zooplankton jako lasturnatky, hrotnatky či vznášivky. Aby bylo odpovězeno na otázku, zda jsou jasmonáty zapojeny do aktivace masožravé reakce podobně jako je to známo v pastech suchozemské čeledi rosnatkovité (druh rosnatka, mucholapka), byly provedeny fytohormonální analýzy a jednoduchý biotest. Výsledky ukázaly, že bublinatka na rozdíl od aldrovandky jasmonáty k aktivaci masožravé odpovědi nevyužívá. Totéž bylo dříve dokumentováno u hybridu tučnice (*Pinguicula* × *Tina*) a bublinatka je tak druhým rodem v řádu hluchavkotvaré, díky kterému můžeme říci, že jasmonátová signalizace nebyla exaptována ve všech rodech masožravých rostlin. V krmených pastech obou vodních druhů byly významně zvýšeny také hladiny dalších fytohormonů – SA a IAA, což lze ale připsat vysokému obsahu těchto fytohormonů v samotném zooplanktonu, který zůstal uzavřen v pastech a byl tak s nimi společně analyzován. Biotest u aldrovandky však dokázal fyziologický efekt pouze JA. Pomocí velmi tenké skleněné kapiláry, která byla napojena na peristaltickou pumpu byly dále odebírány trávicí tekutiny na proteomickou analýzu. Analýzy pomocí nano-kapalilové chromatografie ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem odhalily, že oba rody vylučují trávicí tekutinu, která obsahuje cysteinovou proteázu homologní s dionaiem (cysteinová proteáza v mucholapce podivné), která je u aldrovandky indukována kořistí a JA a u bublinatky je přítomná konstitutivně. Ačkoli byly pro botanickou masožravost exaptovány podobné trávicí enzymy, způsob jejich regulace se liší. Má se za to, že hydrolytické enzymy v trávicí tekutině bublinatky pocházejí převážně ze žijících organismů uvnitř pasti, avšak rostliny vylučují také své vlastní enzymy.

Příspěvní autorů:

Výzkum:

- příprava a odebrání materiálů: J. Jakšová, L. Adamec
- kvantifikace fytohormonů: J. Jakšová, I. Petřík, O. Novák
- identifikace proteinů: M. Šebela, J. Jakšová
- biotest: L. Adamec., J. Jakšová

Konceptualizace: J. Jakšová, L. Adamec, A. Pavlovič

Supervize: A. Pavlovič, O. Novák

Vizualizace: A. Pavlovič

Statistika: A. Pavlovič

Psaní – rukopis: J. Jakšová, A. Pavlovič

Psaní – editace: J. Jakšová, A. Pavlovič

Získání financování: A. Pavlovič, O. Novák, M. Šebela

Podíl J. Jakšové: 50 %

Souhrn publikace 4

Název: Phylogeny of jasmonate signaling in the carnivorous plants

Autoři: Pavlovič A., Jakšová J., Vrobel O., Tarkowski P.

Status: manuskript v přípravě

Souhrn:

V této publikaci byl doplněn obrázek o zapojení jasmonátové signalizace do botanické masožravosti. Již bylo známo, že masožravé rostliny řádu hvozdíkotvaré (Caryophyllales) převzaly jasmonátovou signální dráhu od obranného mechanismu rostlin pro své účely, tedy pro botanickou masožravost. Pokud tyto rostliny, zahrnující aldrovandku (*Aldrovanda*), rosnatku (*Drosera*), mucholapku (*Dionaea*) a láčkovku (*Nepenthes*), zaznamenají mechanické a chemické podněty pocházející z kořisti, jasmonáty spustí expresi genů souvisejících s masožravostí vedoucí k produkci a sekreci trávicích enzymů. Masožravé rostliny však mají nejméně jedenáct nezávislých původů a zde bylo otázkou, zda signalizace jasmonátu byla opakovaně exaptována v různých evolučních liniích masožravých rostlin. K tomu byly využity masožravé rostliny tří různých řádů: šťavelotvaré (Oxalidales) reprezentovaný láčkovicí australskou (*Cephalotus follicularis*), vřesovcotvaré (Ericales) reprezentovaný špirlicí nachovou (*Sarracenia purpurea* ssp. *venosa*) a hvozdíkotvaré reprezentovaný rosnolistem lusitánským (*Drosophyllum lusitanicum*). Testované rostliny byly experimentálně krmeny nebo poraněny a také byl do/na pastí/i aplikován koronatin, molekulární agonista aktivního jasmonátu — konjugátu kyseliny jasmonové s isoleucinem, aby se potvrdila nebo vyvrátila úloha jasmonátů v indukcii trávicího procesu.

Nejprve byla naše pozornost zaměřena na špirlici, u které se výsledky předchozích studií zabývající se schopností produkovat enzymy rostlinného původu liší. Tato studie potvrdila, že se v trávicí tekutině takovéto enzymy vyskytují, nicméně rostlina produkuje jen velmi malé množství trávicí tekutiny. Jelikož špirlice nachová postrádá víčko, chrání láčku před deštěm, enzymy jsou v přírodě silně zředěné dešťovou vodou a trávení přebírají mikroorganismy žijící v pastech. Co se týče aktivity enzymů, v reakci na krmení nebyla zpozorována stimulace fosfatáz, proteolytická aktivita ale ano. Zvýšené množství aspartát proteázy a chitinázy III a aktivity aspartát proteázy po přidání destilované vody do pasti vykazuje v průběhu času jasný trend v kontrolních i krmených pastech — enzymové aktivity jsou u špirlice nachové regulovány nejprve spíše vývojově a teprve později reagují na chemické podněty kořisti. Mladé špirlice tedy vykazují slabou stimulaci enzymové aktivity v reakci na přidání kořisti, jasmonáty se ale neúčastní signalizace.

Na rozdíl od špirlice nachové, i uzavřené a nezralé pasti láčkovice australské již produkují stabilní hladinu tekutiny obsahující trávicí enzymy. Enzymová aktivita je u láčkovice konstitutivní, což bylo potvrzeno nezvýšením enzymové aktivity a množství aspartát proteázy po přidání kořisti. Stejně tak aplikace koronatinu neovlivnila množství a aktivitu aspartát proteázy,

ani nebyla změřena zvýšená koncentrace jasmonátů v rostlinném pletivu po podání kořisti, což indikuje, že jasmonátová signální dráha se neúčastní reakce ani u této rostliny.

V porovnání se studovanými láchkovkami je situace u rosnolistu zcela odlišná. Indukce enzymových aktivit a zvýšení množství enzymů byla jasně prokázána, naznačující stimulační způsob sekrece trávicích enzymů regulovaný jasmonáty, jak je známo u rosnatky a mucholapky. Na rozdíl od nich ale tentakuly rosnolistu nejsou schopny vykonávat žádný pohyb a také negenerují žádné elektrické signály v reakci na mechanickou stimulaci. Jak je známo z láchkovek, jasmonáty se mohou akumulovat také bez elektrické signalizace na základě chemických signálů pocházející z kořisti a toto by mohlo platit také u rosnolistu.

Všechny tři masožravé rostliny zahrnuté do této studie využívají pro trávení aspartát proteázu. Podle nomenklatury dle Takahashi *et al.* (2012)² byly nazvány sarracenciasin, cephalotusin a drosophyllusinsin. Tyto proteiny stejně jako další proteiny nalezeny v masožravých rostlinách (např. chitinázy, glukonázy, ribonukleázy) spadají do skupiny od patogeneze odvozených proteinů. Což znamená, že tyto proteiny byly exaptovány od obrany rostlin pro botanickou masožravost několikrát nezávisle na sobě také ve vzdáleně příbuzných rodech masožravých rostlin. Oproti tomu je jasmonátová signalizace regulující aktivitu enzymů zapojená pouze se masožravých rostlin rodu hvozdíkotvaré.

Tato studie jasně ukázala, že ačkoli masožravé rostliny z různých evolučních linií sice kooptovaly stejné trávicí enzymy, jak ukázala studie Fukushima *et al.* (2017)³, regulace jejich aktivit se výrazně liší. Přestože masožravé rostliny využívají jasmonáty pro svou odvěkou roli – obranu, exaptace jasmonátové signalizace pro botanickou masožravost se pravděpodobně vyskytla pouze jednou v nejstarší linii masožravých rostlin – hvozdíkotvaré, a poté již nikdy nebyla využita.

² **Takahashi K, Nishii W, Shibata C. 2012.** The digestive fluid of *Drosera indica* contains a cysteine endopeptidase ("Droserain") similar to dionain from *Dionaea muscipula*. *Carnivorous Plant Newsletter* **41**: 132-134.

³ **Fukushima K, Fang X, Alvarez-Ponce D, et al. 2017.** Genome of the pitcher plant *Cephalotus* reveals genetic changes associated with carnivory. *Nature Ecology and Evolution* **1**: 1–9.

Příspěvní autorů:

Výzkum:

- příprava a odebrání materiálů: A. Pavlovič
- měření elektrických signálů: A. Pavlovič
- kvantifikace fytohormonů: J. Jakšová, O. Vrobel, P. Tarkowski
- měření enzymových aktivit: J. Jakšová
- SDS-PAGE a Western bloty: J. Jakšová

Konceptualizace: A. Pavlovič

Supervize: A. Pavlovič

Vizualizace: A. Pavlovič

Statistika: A. Pavlovič

Psaní – rukopis: A. Pavlovič

Psaní – editace: A. Pavlovič

Získání financování: A. Pavlovič

Podíl J. Jakšové: 30 %

Souhrn publikace 5

- Název:** Anaesthesia with diethyl ether impairs jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*)
- Autoři:** Pavlovič A., Libiaková M., Bokor B., Jakšová J., Petřík I., Novák O., Baluška F.
- Status:** publikováno v roce 2019 v *Annals of Botany* 125, 173-183.
DOI: 10.1093/aob/mcz177

Souhrn:

Masožravá rostlina mucholapka podivná (*Dionaea muscipula*) odpovídá na mechanickou stimulaci mechanosenzitivních výčnělků uvnitř pasti nebo poškození její pasti tvorbou elektrických signálů, konkrétně akčních potenciálů (AP). Tyto signály jsou zásadní pro zahájení jasmonátové signální dráhy, která spouští expresi genů reagujících na kyselinu jasmonovou (JA). Ty v mucholapce kódují trávicí enzymy. Tato sekvence signalizačních událostí je podobná velmi dobře známé signální dráze v odpovědi na poškození nebo útok býložravce v běžných rostlinách, což podporuje hypotézu, že botanická masožravost byla vyvinuta z obranného mechanismu rostlin. Díky své elektrické signalizaci se mucholapka podivná jeví jako zajímavý experimentální model pro výzkum vlivu anestetik na rostliny. Ačkoli je primárním místem působení celkových anestetik u zvířat a lidí centrální nervový systém a rostliny přímo tímto systémem nedisponují, jsou také schopné generovat elektrické signály. Tato studie tedy zkoumala efekt celkového těkavého anestetika dietyléteru na schopnost mucholapky vnímat potenciální kořist nebo útok býložravce. Ukázalo se, že mucholapka během anestezie není schopná vnímat své prostředí. Dietyléter kompletně inhiboval vznik AP, schopnost uzavřít past a také následné reakce: akumulaci JA a expresi vybraných genů (cystein proteázy a chitinázy typu I). Po odstranění éteru byly tyto reakce snadno a rychle opět obnoveny. Nicméně jakmile byla u mucholapky pod anestézou zevně přímo do pasti aplikována JA, JA byla schopna inhibované akční potenciály obejít a obnovila genovou expresi i pod vlivem anestetika, což naznačuje, že reakce, které následují ve zkoumané signální dráze po akumulaci JA nejsou inhibovány. Primárním cílem anestetika jsou tomu předcházející reakce, tedy elektrická signalizace. Tato situace připomíná účinek anestezie na živočichy, u nichž anestezie vede ke ztrátě vědomí. Skutečnost, že anestezie inhibuje šíření elektrického signálu nejen u zvířat, ale také u rostlin a v obou případech ovlivňuje jejich citlivost a vnímavost, dokumentuje další pozoruhodnou podobnost mezi zvířaty a rostlinami.

Příspěvní autorů:

Výzkum:

- příprava a odebrání materiálů: J. Jakšová, A. Pavlovič
- měření elektrických signálů: A. Pavlovič
- kvantifikace fytohormonů: J. Jakšová, I. Petřík, O. Novák
- měření genové exprese: M. Libiaková, B. Bokor
- SDS-PAGE a Western bloty: J. Jakšová

Konceptualizace: A. Pavlovič, F. Baluška

Supervize: A. Pavlovič, O. Novák

Vizualizace: A. Pavlovič

Statistika: J. Jakšová, A. Pavlovič

Psaní – rukopis: A. Pavlovič

Psaní – editace: A. Pavlovič

Získání financování: A. Pavlovič

Podíl J. Jakšové: 10 %

Souhrn publikace 6

Název: Anaesthetic diethyl ether impairs systemic electrical and jasmonate signalling in *Arabidopsis thaliana*

Autoři: Jakšová J., Rác M., Bokor B., Petřík I., Novák O., Reichelt M., Mithöfer A., Pavlovič A.

Status: publikováno v roce 2021 v Plant Physiology and Biochemistry
DOI: 10.1016/j.plaphy.2021.11.019

Souhrn:

Celková těkavá anestetika (CTA) inhibují šíření elektrického signálu v živočišných neuronech. Ačkoli rostliny nemají neurony, rostlinné buňky mají mnoho vlastností, které byly původně přisuzovány jen neuronům, včetně excitabilních plazmatických membrán s napětově řízenými iontovými kanály, které stojí za generací pro rostlinu specifických elektrických potenciálů a recyklací endocytických vezikul, která je podobná té na synapsích živočichů. Rostliny využívají i identické molekuly k neurotransmiterům v našem mozku (např. glutamát)

V této publikaci jsme se zaměřili na efekt CTA dietyléteru na systémový elektrický signál a po něm následující reakce v huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*). Zjistili jsme, že šíření elektrického signálu a doprovázející vápníkové vlny do sousedních systémových listů byly dietyléterem zcela potlačeny. Souběžně se v systémových listech nezvýšila ani hladina jasmonátů a exprese genů závislých na jasmonátech (*AOS*, *OPR3*, *JAZ10*) tam také nebyla detekována. Vysoké hladiny jasmonátů a transkriptů indukovatelné kyselinou jasmonovou se ale stále vyskytovaly v poškozených lokálních listech.

Fakt, že CTA inhibují šíření elektrického signálu nejen u zvířat, ale také u rostlin je velmi zajímavý. Buněčná odpověď je ale zcela blokována pouze u systémových listů; lokální poškozený list stále reaguje na škodlivé podněty. Protože systémové šíření elektrického signálu u huseníčku závisí na kanálech podobných glutamátovým receptorům (*glutamate receptor-like*; GLR) u živočichů, mohl by dietyléter nespécificky mířit právě na něj. To dokazuje také experiment, ve kterém byla ukázána inhibice elektrické signalizace vyvolána glutamátem pod vlivem dietyléteru. Nicméně generace elektrických signálů v lokálních listech, která byla CTA také inhibována, je nezávislá na GLR, což může naznačovat, že účinek dietyléteru není specifický pouze pro GLR kanály. To upřednostňuje Mayerovu a Overtonovu lipidovou teorii a její modifikace, která říká, že anestetika mohou cílit na plazmatickou membránu a ovlivňovat různé funkce kanálů, na rozdíl od proteinové teorie, kde anestetika působí přímou vazbou na konkrétní protein.

Příspěvní autorů:

Výzkum:

- příprava a odebrání materiálů pro měření: J. Jakšová
- měření elektrických signálů: J. Jakšová
- měření luminiscence aequorinu: M. Rác, A. Pavlovič, J. Jakšová
- měření ultra-slabé fotonové emise: M. Rác, A. Pavlovič, J. Jakšová
- kvantifikace fytohormonů: J. Jakšová, I. Petřík, O. Novák
- kvantifikace volných aminokyselin: J. Jakšová, M. Reichelt
- měření genové exprese s použitím qPCR: J. Jakšová, B. Bokor

Konceptualizace: A. Pavlovič

Supervize: A. Pavlovič, A. Mithöfer, O. Novák

Vizualizace: J. Jakšová, A. Pavlovič

Statistická analýza: J. Jakšová, A. Pavlovič

Psaní – původní rukopis: J. Jakšová, A. Pavlovič

Psaní – editace: A. Mithöfer

Získání financování: A. Pavlovič, A. Mithöfer

Podíl J. Jakšové: 50 %

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biofyziky



Jasmonátová signální dráha: od obrany k masožravosti rostlin

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor:	Mgr. Jana Jakšová
Studijní program:	P1703 - Fyzika
Studijní obor:	Biofyzika
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.
Rok:	2022

Bibliografická identifikace autora

Jméno a příjmení:	Jana Jakšová
Název práce:	Jasmonátová signální dráha: od obrany k masožravosti rostlin
Typ práce:	disertační
Pracoviště:	Katedra biofyziky
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2022

Anotace:

Aby rostliny prosperovaly a přežily v neustále měnících se nepřátelských podmínkách, vyvinuly si jedinečné obranné mechanismy. Významnými hráči v indukované obraně rostlin proti býložravcům jsou elektrické a vápníkové signály a neméně důležité rostlinné hormony jasmonáty. Jasmonátová signální dráha je též klíčová pro správnou funkci pastí některých druhů masožravých rostlin, u nichž je potřebná k iniciaci tvorby enzymů důležitých pro trávení zachycené kořisti. Nicméně to, že jsou jasmonáty zodpovědné za aktivaci a regulaci trávicího procesu bylo prokázáno jen u tří rodů masožravých rostlin – mucholapka (*Dionaea*), rosnatka (*Drosera*) a láchkovka (*Nepenthes*), všechny spadající do řádu hvozdíkotvaré (Caryophyllales). U těchto druhů se předpokládá exaptace jasmonátové signální dráhy od obranného mechanismu rostlin. To znamená, že masožravé rostliny převzaly již existující signální dráhu a použily ji pro své účely (tzn. indukce tvorby enzymů). V práci jsme ukázali, že jasmonátová signalizace nebyla exaptována všemi rody masožravých rostlin a indukce trávicích enzymů musí být spuštěna i jinými způsoby, které nejsou dosud známé. Signální dráha od tvorby elektrického signálu přes akumulaci jasmonátů po expresi specifických genů se dá blokovat anestetikem dietyléterem. Dosud se neví, jak přesně různá anestetika lišící se svou chemickou strukturou působí, k rozluštění by však mohly pomoci rostlinné modelové druhy.

Klíčová slova: anestezie, dietyléter, elektrické signály, jasmonáty, vápník, masožravé rostliny, obrana, poškození, systémová reakce

Počet stran:	75 + 212 stran příloh
Jazyk:	český

Author's bibliographical identification

Name and surname:	Jana Jakšová
Title of thesis:	Jasmonate signalling pathway: from defence to botanical carnivory
Type of thesis:	doctoral
Department:	Department of Biophysics
Supervisor:	Assoc. prof. Andrej Pavlovič, Ph.D.
The year of defence:	2022

Annotation:

Plants have developed unique defense mechanisms in order to survive and prosper in fluctuating environmental conditions. Electrical and calcium signals, along with equally important plant hormones jasmonates, play an important role in the induced defense of plants against herbivores. Jasmonate signalling pathway is also crucial for the proper function of traps of some carnivorous plant species and are essential to initiate the production of enzymes important for the digestion of captured prey. It was shown that jasmonates are responsible for activating and regulating the digestion process in three genera of carnivorous plants - *Dionaea*, *Drosera* and *Nepenthes*, all of which belong to the order Caryophyllales. In these species, it has been suggested that jasmonate signalling pathway was co-opted from plant defense mechanism. This means that carnivorous plants took over the already existing signalling pathway and used it for their own purposes (induction of enzyme production). Here we showed that jasmonate signalling has been not co-opted by all carnivorous genera and the induction of digestive enzymes have to be trigger by other ways, which are not yet known. Signalling pathway from electrical signal generation through jasmonate accumulation to the expression of specific genes can be blocked by anaesthetic diethyl ether. It is not yet fully understood how exactly anaesthetics differing in their chemical structure work, but the model plants could help to elucidate it.

Keywords: anaesthesia, calcium, carnivorous plants, defence, diethyl ether, electrical signals, jasmonates, systemic signalling, wounding

Number of pages	75 + 212 pages of appendices
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých zdrojů a literatury. Souhlasím se zveřejněním disertační 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:

.....

Mgr. Jana Jakšová

Poděkování

Vše začíná elektrickými signály. Nejen teoretická část této práce, signalizace v živočiších a rostlinách, ale také celý můj příběh. Začalo to zjištěním o jejich existenci v letech gymnaziálních, a to mě dovedlo až sem, k sepsání disertační práce. Bylo dost o štěstí, že jsem nakonec mohla studovat v až neskutečně úžasné Olomouci a o náhodě (nebo snad osudu?), že na Univerzitu Palackého přestoupil z Univerzity Komenského v Bratislavě též můj vedoucí. Katedra biofyziky disponovala přístrojem na měření elektrických signálů v rostlinách, a tak jsem mohla začít studovat téma, které jsem si přála. Tímto především děkuji mému vedoucímu doc. Mgr. Andreji Pavlovičovi, Ph.D. za mé vedení, vždy vstřícný přístup, a za to že mě vždy podpořil ať se dělo cokoliv. Děkuji Mgr. Martinu Petráskovi za nespočet nápadů, jak si v gymnaziálních letech přivydělat peníze. Právě pěstování a prodej exotických rostlin zahrnující citlivku stydlivou (*Mimosa pudica*) mě dovedlo až sem. On sice nikdy nepřizná, že by za to nějakým způsobem mohl, ale já mu to nikdy nezapomenu. Každý by měl mít osobu, kterou se inspiruje, motivuje ho a ač nevědomky, ale nastartuje něčí kariéru. Přála bych to každému.

Dále bych ráda poděkovala také vedení Katedry biofyziky Univerzity Palackého v Olomouci za to, že jejich přístup je férový. Vedení katedry a Erasmu⁺ dále děkuji za zprostředkování a finanční podporu zahraničních stáží, neskutečně jsem si je užila. Za to děkuji též kolegům ze spolupracujících institucí, zejména Mgr. Borisi Bokorovi Ph. D. z Katedry rostlinné fyziologie Univerzity Komenského v Bratislavě za to, že mu můžu kdykoli zavolat, aby mi poradil ohledně qPCR. Dále doc. Axelu Mithöferovi Ph.D. za vždy podnětné otázky a připomínky k mému výzkumu. Dále celému jeho týmu za vytváření skvělých pracovních podmínek a veškerou pomoc při mých experimentech v průběhu mé stáže na Max Plack Institute for Chemical Ecology v německé Jeně. Mnoho času jsem také strávila s Dr. Lubomírem Adamcem Ph.D. při opakovaných výjezdech do Botanického ústavu AVČR v Třeboni. Děkuji mu za dlouhé diskuse a za věnování knihy *Carnivorous plants*, která se mi hodila k dalšímu studiu.

Rodině a přátelům děkuji za to, že prostě jsou.

Obsah

Poděkování	5
SEZNAM PUBLIKACÍ	8
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	10
CÍLE PRÁCE	12
1. Obrana rostlin proti býložravcům	14
1.1. Elektrické signály rostlin.....	15
1.1.1. Klidový membránový potenciál	16
1.1.2. Akční potenciál.....	17
1.1.3. Systémový potenciál.....	18
1.1.4. Variační potenciál.....	19
1.1.5. Možné kanály zapojené do elektrické signalizace – elektrické potenciály jsou geneticky propojeny s Ca^{2+}	22
1.2. Druhý posel – cytosolický Ca^{2+}	23
1.2.1. Ca^{2+} jsou geneticky spojeny s reaktivními formami kyslíku.....	24
1.2.2. Dekódování Ca^{2+}	26
1.3. Ca^{2+} aktivuje syntézu jasmonátů	28
1.3.1. Biosyntéza jasmonátů.....	29
1.3.2. Mechanismus vnímání a regulace genové exprese jasmonáty	31
1.3.3. Lokální a systémová akumulace jasmonátů v pletivu huseníčku rolního	33
1.4. Proteiny související s patogenezí v obranné reakci rostlin	34
2. Od obrany k masožravosti rostlin.....	37
2.1. Elektrické signály v masožravých rostlinách	41
2.2. Ca^{2+} v masožravých rostlinách.....	43
2.3. Reaktivní formy kyslíku v masožravých rostlinách	44
2.4. Jasmonáty a další rostlinné hormony v masožravých rostlinách	45
2.5. Enzymy v masožravých rostlinách.....	48
3. Metodika.....	50
3.1. Měření elektrických signálů v rostlinách	50
3.2. Monitorování fluktuací intracelulárního vápníku	52
3.3. Analýza rostlinných hormonů	53
3.4. Izolace RNA a kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase	56
3.5. Elektroforetické separační metody.....	57
3.6. Western blot	58
3.7. Měření enzymatické aktivity.....	59
3.8. Identifikace neznámých proteinů	59

ZÁVĚR.....	61
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64
PŘÍLOHY.....	76

SEZNAM PUBLIKACÍ

Vědecké publikace autorky relevantní pro disertační práci, publikované před nástupem na doktorské studium:

- 0.** 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. IF (2016) = 7.71

Publikace relevantní pro disertační práci:

- I.** **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. IF (2019) = 3.983
- II.** 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**, 3749–3758. IF (2019) = 5.908
- III.** **Jakšová J.**, Adamec L., Petřík I., Novák O., Šebela M., Pavlovič A. (2021). Contrasting effect of prey capture on jasmonate accumulation in two genera of aquatic carnivorous plants (*Aldrovanda*, *Utricularia*). *Plant Physiology and Biochemistry* **166**, 459–465. IF (2020) = 4.143
- IV.** Pavlovič A., **Jakšová J.**, Lenobel R., Vrobel O., Tarkowski P. (2022) Jasmonate signalling in different evolutionary lineages of carnivorous plants. Manuskript v přípravě.
- V.** Pavlovič A., Libiaková M., Bokor B., **Jakšová J.**, Petřík I., Novák O., Baluška F. (2019) Anaesthesia with diethyl ether impairs jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). *Annals of Botany* **125**, 173–183. IF (2018) = 4.005
- VI.** **Jakšová J.**, Rác M., Bokor B., Petřík I., Novák O., Reichelt M., Mithöfer A., Pavlovič A. (2021) Anaesthetic diethyl ether impairs systemic electrical and jasmonate signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **169**, 311–321. IF (2020) = 4.143

Další vědecké publikace autorky:

Pavlovič A., Jakšová J., Kučerová Z., Špundová M., Rác M., Roudnický P., Mithöfer A. (2022) Diethyl ether anaesthesia induces transient cytosolic $[Ca^{2+}]$ increase, heat shock proteins and heat stress tolerance of photosystem II in *Arabidopsis*. Manuskript v recenzním řízení.

Pavlovič A., Štedrá A, Jakšová J, Šimková L, Bartoš J. (2022) Light-dependent greening of etiolated barley (*Hordeum vulgare*) is inhibited by diethyl ether anaesthesia. Manuskript v přípravě.

Populárně-vědecká publikace autorky:

Jakšová J. (2020) Elektrická a jasmonátová signalizace v mucholapce podivné. *Živa* **1**, 20–22.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

$[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$	koncentrace Ca^{2+} v cytosolu
4,5-ddh-JA	4,5-didehydrojasmonová kyselina (<i>4,5-didehydrojasmonic acid</i>)
ABA	kyselina abscisová (<i>abscisic acid</i>)
AHA	H^+ -ATPáza
ANN	annexiny
AOC	allenoxidcykláza
AOS	allenoxidsyntáza
AP	akční potenciál
CaM	kalmodulin
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina (<i>complementary DNA</i>)
CNGC	kanál (CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL)
COI1	receptor, jednotka komplexu multiproteinu E3 ubiquitin ligázy SCF (CORONATINE INSENSITIVE 1)
CTA	celková těkavá anestetika
dnOPDA	kyselina dinor-12-oxo-fytodienová (<i>dinor-oxo-phytodienoic acid</i>)
GLR	kanál, rostlinný homolog glutamátových receptorů (GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IAA	kyselina indol-3-octová (<i>indol-3-acetic acid</i>)
JA	kyselina jasmonová (<i>jasmonic acid</i>)
JA-Ile	jasmonoyl-L-isoleucin, též konjugát kyseliny jasmonové s isoleucinem
JAR1	syntetáza JA-Ile
JAs	jasmonáty (<i>jasmonates</i>)
JAT1	ABC transportér AtJAT1/AtABCG1 (JASMONIC ACID TRANSFER PROTEIN 1)
JAV1	JASMONATE-ASSOCIATED VQ MOTIF GENE 1
JAZ	negativní regulátor signální dráhy kyseliny jasmonové (JASMONATE ZIM DOMAIN)
JJW	komplex JAV1-JAZ8-WRKY51
LC	kapalinová chromatografie (<i>liquid chromatography</i>)
LOX	lipoxygenáza

LTP	proteiny přenášející lipidy (<i>lipid-transfer protein</i>)
MALDI-TOF	ionizace laserem za účasti matrice ve spojení s analyzátozem doby letu (<i>matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight</i>)
MAPK	mitogenem-aktivovaná protein kináza
MR	masožravé rostliny
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (<i>mass spectrometry/mass spectrometry</i>)
OPC4	kyselina 4-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl)butanová
OPC6	kyselina 6-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl)hexanová
OPC8	kyselina 8-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl)oktanová
OPDA	kyselina 12-oxo-fytodienová (<i>12-oxo-phytodienoic acid</i>)
OPR3	reduktáza kyseliny oxofytodienové (<i>OPDA reductase 3</i>)
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PMF	peptidové mapování (<i>peptide mass fingerprinting</i>)
PRp	proteiny související s patogenezi (<i>pathogenesis-related proteins</i>)
PS	peptidové sekvenování (<i>peptide sequencing</i>)
RBOH	NADPH oxidáza (RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGS)
ROS	reaktivní formy kyslíku (<i>reactive oxygen species</i>)
RT-qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
SA	kyselina salicylová (<i>salicylic acid</i>)
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v denaturujících podmínkách (<i>sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SP	systémový potenciál
SPE	extrakce na pevné fázi (<i>solid phase extraction</i>)
TF	transkripční faktor
TIBA	kyselina 2,3,5-trijodbezoová (<i>2,3,5-triiodobenzoic acid</i>)
tnOPDA	tetranor-kyselina 12-oxo-fytodienová (<i>tetranor-oxo-phytodienoic acid</i>)
TPC	kanál, TWO PORE CHANNELS
TPK1	kanál, TANDEM PORE K ⁺ CHANNEL 1
VP	variační potenciál

CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této disertační práce je zaměřit velkou pozornost teoretickým základům dané problematiky, která za posledních pár let, v průběhu mého doktorského studia, výrazně pokročila kupředu. Tato část je i nosným pilířem autoreferátu. Dosáhnuté výsledky jsou zdokumentovány prostřednictvím přiložených publikací v samotné disertační práci, aby nedošlo k duplikaci textu a obrázků.

V první kapitole této práce shrnuji dosud získané poznatky o sloučeninách pro dálkový přenos v rostlinách, jak spolu pravděpodobně souvisí a jak jsou regulovány, přičemž jsem se zaměřila na jeden hlavní stresor, který vyvolává tuto systémovou reakci, a to vnější poškození, zahrnující mechanické poškození a poškození býložravcem nebo hmyzem. Je nutno hned na začátku podotknout, že známe spíše jen kousky skládačky a ty jsou spojeny do podoby hypotéz, kterými se snažíme vytvořit komplexní obraz o tom, jak celá systémová signalizace v rostlinách funguje. Hypotézy ale nejsou ani potvrzeny, ani vyvráceny. Sekvence reakcí po poškození je velmi podobná signální dráze, kterou využívají některé masožravé rostliny. Příbuzenství mezi karnivorii a obranným mechanismem rostlin se věnuji ve druhé kapitole. Další kapitola je věnována principům, na kterých je založena použitá metodika.

Samostatné publikace se věnují dvěma velkými tématům, která jsou propojena skrze jednu sledovanou signální dráhu. První část je věnována masožravým rostlinám (publikace 0., I., II., III. a IV.) a druhá vlivu anestetik na rostliny (publikace V. a VI.).

Hlavním cílem první části bylo zabývat se rolí elektrických signálů a fytohormonů jasmonátů v indukci enzymatických aktivit v masožravých rostlinách, rozšířit znalosti o trávicích enzimech a o způsobu jejich regulace podněty získanými z polapené kořisti. Fytohormony kontrolují všechny aspekty růstu a vývoje rostlin, takže se předpokládalo, že mají funkci také při jejich masožravosti. Ve srovnání s nemasožravými rostlinami, se hormonální signalizaci v těch masožravých, věnovalo jen pár studií a ty byly omezeny hlavně právě na jasmonáty. Ty se hromadí v pletivu pasti mucholapky podivné (*Dionaea muscipula*) bez ohledu na podnět. Jak na mechanostimulaci spouštěcího výčnělku uvnitř pasti, tak na poranění pasti reaguje rostlina expresí genů spojených s masožravostí, a tedy produkcí trávicích enzymů. To proto, že obrana rostlin a botanická masožravost mucholapky sdílejí stejné signální dráhy. Jak tedy mucholapka pozná, že se v její pasti nachází opravdu živočišná kořist, aby se jí vyplatilo produkovat množství trávicí tekutiny, což je energeticky náročné? Jak je regulován tento proces?

Jasmonáty hrají roli při indukci trávicích procesů u tří rodů masožravých rostlin (mucholapka, rosnatka, láčkovka; *Dionaea*, *Drosera*, *Nepenthes*), které se v této oblasti dají považovat za modelové. Všechny tři jsou ale příbuzné a spadají do řádu hvozdíkotvaré (Caryophyllales). Cílem bylo prozkoumat, zda byla jasmonátová signalizace exaptována také jinými rody nepříbuznými s hvozdíkotvarými. V řádu hluchavkotvaré (Lamiales) jsme se zabývali rody tučnice (*Pinguicula*) a bublinatka (*Utricularia*), v řádu šťavelotvaré (Oxalidales) rodem láčkovice (*Cephalotus*), a v řádu vřesovcotvaré (Ericales) rodem špirlice (*Sarracenia*). Do studie byly zahrnuty také další neprozkoumané rody z hvozdíkotvarých: rosnolist (*Drosophyllum*) a aldrovandka (*Aldrovanda*). Některé z těchto rodů (např. špirlice a láčkovice) používají stejné trávicí enzymy nebo stejnou lovicí strategii, takže lze předpokládat, že využívají stejnou signální dráhu. Na druhou stranu se mnoho rodů spoléhá více na trávicí enzymy pocházející ze symbiotických organismů nebo je produkce enzymů spíše konstitutivní, což zpochybňuje potřebu jedinečné signální dráhy.

Při druhé části výzkumu byla pozornost zaměřena na komplexní studii, která by pokryla několik aspektů anestetických účinků na rostliny. Během výzkumu v první části výzkumu byl vytvořen velmi dobrý experimentální systém v masožravé rostlině mucholapce podivné pro monitorování odpovědi rostliny na poranění a mechanickou stimulaci. Cílem bylo využít tento systém ke zkoumání těchto odpovědí pod vlivem anestetika a bez něj, sledovat elektrickou signalizaci, akumulaci jasmonátů, genovou expresi a produkci proteinů. Ve studii Yokawa *et al.* (2018) byla již prokázána inhibice tvorby akčního potenciálu (AP) anestetikem dietyléterem, naším cílem ale bylo prozkoumat efekt inhibice elektrické aktivity na následující reakce.

Jelikož bylo v první části zjištěno, že mucholapka využívá k regulaci trávicích enzymů dráhu, kterou v průběhu evoluce exaptovala z obranného mechanismu běžných rostlin, předchozí znalosti a dovednosti byly využity ke zkoumání toho, zda anestetikum může zastavit systémovou obrannou reakci huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) v reakci na poškození. V mucholapce anestetika inhibují AP. V reakci na útok nebo poranění býložravců ale rostliny obvykle generují variační (VP) a/nebo systémový potenciál. Protože se AP a VP liší svým původem (AP se šíří samovolně, zatímco propagace VP závisí na uvolnění napětí vodního sloupce xylému při poranění), bylo otázkou, zda anestetika mohou inhibovat tvorbu a šíření VP a všechny následující reakce, tj. Ca^{2+} vlnu a/nebo akumulaci kyseliny jasmonové (*jasmonic acid*, JA) a JA-závislou genovou expresi.

1. Obrana rostlin proti býložravcům

Rostliny pro svou vlastní potřebu produkují procesem fotosyntézy sacharidy. Tyto látky ale vyhovují jako potrava také živočichům. Na rostlinách jsou závislá všechna zvířata, a to ať primárně nebo sekundárně. Přisedlé organismy, jakými jsou rostliny, jsou ale ke svému prostředí vázány kořeny a nemohou v případě napadení jednoduše utéct. I přes tento fakt jsou ale rostliny schopny útokům odolat. Rostliny a býložravý hmyz žijí pospolu po více než 400 milionů let a obě skupiny si vyvíjí opravdu rafinované strategie, aby obelstily toho druhého (War *et al.* 2012).

Obranné mechanismy rostlin mohou být buď mechanického, nebo chemického charakteru. Mechanické bariéry představují první vrstvu ochrany proti býložravcům. Odolnost rostlin vůči nim je dána morfologickými vlastnostmi – už jen samotný tvar listu, jako např. cípatý list cesmíny, odrazuje útočníky. Složkou mechanické obrany rostlin jsou i jejich povrchové struktury. Příkladem takových struktur jsou papily či dlouhé výběžky epidermálních buněk známé jako trichomy. Pokožka rostlin je dále často chráněna vrstvou kutikulárních vosků a můžeme se setkat také s různými modifikacemi listu, jako jsou např. trny sukulentů. Účinnost tohoto druhu fyzikálních bariér však závisí na velikosti a také mechanismu, jakým se krmí daný býložravec (War *et al.* 2012).

Kromě těchto fyzikálních bariér rostliny využívají obranu chemickou – produkují velké množství sekundárních metabolitů, toxinů a dále také proteinů, jako jsou např. inhibitory proteáz. Inhibitory proteáz jsou schopny vázat se na trávicí proteiny hmyzu a tím zablokují trávení proteinů, což má za následek nedostatek aminokyselin, zpožděný vývoj organismu, a hladovění, což často vede k mortalitě hmyzu. Kromě mechanické a chemické obrany, díky které rostliny konfrontují býložravce přímo (odtud přímá obrana), produkují rostliny také těkavé sloučeniny k přilákání druhů na vyšší trofické úrovni, jako jsou přirození nepřátelé útočícího hmyzu. Vzhledem k tomu, že těkavé látky ve skutečnosti nepůsobí přímo na býložravce, ale používají se jako prostředníky k přivolání jiných organismů na pomoc, tento druh obrany se nazývá nepřímá (Mithöfer and Boland 2012).

Přímá a nepřímá obrana se může nacházet v rostlině konstitutivně, ale jelikož je produkce sloučenin působící proti býložravcům pro rostlinu poměrně nákladná, některé obranné metabolity jsou produkovány až po napadení býložravcem. Tyto metabolity pak nazýváme jako indukovaná obrana (Meldau *et al.* 2012). Indukovaná obrana vyžaduje v těle rostliny dynamickou a rychlou distribuci informací. V mnoha případech není zasažena celá rostlina, ale pouze orgán, několik buněk nebo jen jedna buňka rostlinného pletiva. Vazbou příslušného ligandu na receptor uvnitř buňky nebo na plasmatické membráně se aktivuje vhodný obranný program převedením na odpovídající stresovou reakci. Informace pak putují

do sousedních orgánů, a dokonce i do sousedních rostlin, a také zde aktivují příslušné reakce. Informační tok je zprostředkován buď rychle se pohybujícími malými metabolity, hormony, proteiny/peptidy, RNA, reaktivními formami kyslíku, vápníkovou vlnou a těkavými látkami, tedy chemickými signály nebo elektrickými potenciály a hydraulickými vlnami, které jsou však velmi úzce spjaty. Signální molekuly se pohybují z jedné buňky do druhé skrz plasmodesmata, přes apoplast, uvnitř vaskulární tkáně nebo jako těkavé látky – vzduchem. Reakce specifické pro poškození pravděpodobně vyžadují kombinaci různých cestujících sloučenin. Svě rozmanitosti navzdory, mají signální molekuly společné rysy. Jejich koncentrace v místech působení je přísně kontrolována, je velmi nízká v nestimulovaných buňkách, přechodně vysoká v reakci na podněty a následně obnovena na nízkou hladinu buď chemickými reakcemi (např. degradací, modifikací a konjugací) nebo rozdělením do intracelulárních nebo mezibuněčných prostor pomocí aktivních transportních mechanismů. Jelikož šířící se signály musí cestovat přes dlouhé vzdálenosti a více bariér, s rostoucí vzdáleností signál obvykle klesá. To vyžaduje trvalé procesy zesílení, zpětnovazebné smyčky a pravděpodobně též krátkodobou paměť (Oelmüller 2021).

1.1. Elektrické signály rostlin

Jaká je povaha systémového signálu, který je po napadení šířen jako první po velké části rostlinného těla a vede k obranné reakci? Mezi mnoha scénáři, které byly navrženy, je elektrická signalizace. Ačkoli si rostliny nevytvořily komplexní nervovou soustavu, jakou známe u živočichů, elektrické signály hrají v jejich životě podstatnou úlohu.

Pokud se podíváme trochu do historie, akční potenciál (AP), nejcharakterističtější a nejrychlejší forma elektrické komunikace, byl objeven u rostlin, konkrétně u masožravé rostliny mucholapky podivné (*Dionaea muscipula*) po jejím podráždění, už roku 1873 (Burdon-Sanderson 1873). V tomto čase ještě ani nebyla akceptována buněčná stavba živočišného mozku a neuronální procesy se v něm právě začaly objevovat. Stejně jako byla nejprve pod mikroskopem pozorována rostlinná buňka (Hooke 1665), byl v roce 1930 pomocí mikroelektrod zaznamenán AP v buňkách řasy skleněnky (*Nitella*; Umrath, 1930), což bylo také dříve, než vznikl první intracelulární záznam AP v buňkách živočišných (Nastuk and Hodgkin 1950). Poté byl Sibaoka (1962) schopný demonstrovat, že šíření elektrického signálu v citlivce stydlivé (*Mimosa pudica*) vykazuje velmi podobné charakteristiky jako AP v nervech. Následně se začaly objevovat názory, že všechny rostliny, nikoliv jen ty senzitivní, by mohly využívat elektrické signály při koordinaci různých funkcí. Přehled upevňující data a myšlenky, které potvrzovaly tento úhel pohledu, publikovali Sibaoka (1966, 1969) a Pickard (1973). V roce 1984 bylo díky technice terčíkové zámky umožněno poprvé u buněk vyšších rostlin

studium elektrických vlastností plazmatické membrány oddělené od tonoplastu. Byl objeven iontový kanál selektivní pro K^+ , který je základem pro akční potenciál (Schroeder *et al.* 1984). Nicméně, hlavní proud rostlinné biologie dlouho kompletně nepřijímal rostlinnou elektrofyziologii jakožto nově vznikající obor rostlinných věd, takže toto pole výzkumu přežívalo v jakémisi dormantním stádiu až do začátku 21. století, kdy došlo v biologii rostlin k pokroku a na tomto poli k dalším převratným objevům (Baluška *et al.* 2006). Momentálně asi nejvýznamnějším z nich je identifikování dvou genů pro kanál podobný glutamátovému receptoru (*glutamate receptor-like*; GLR) a to GLR3.3 a GLR3.6, které se podílejí na šíření elektrické aktivity z poškozených do nepoškozených listů (Mousavi *et al.* 2013). Od této chvíle se zjistilo o tomto elektrickém fenoménu v rostlinách obrovské množství údajů, mnohé je nám ale stále zahaleno. Nezbytné je např. identifikovat další geny, které jsou základem tohoto jevu.

1.1.1. Klidový membránový potenciál

Pojem elektrické signály je v této práci použit pro události, které jsou detekovány pomocí citlivých elektrod (více v Metodice, kapitola 3.1). Obecná podstata metod, které jsou používány pro měření elektrických signálů, pak spočívá v tom, že rostlina představuje zdroj elektromotorického napětí. Je využíváno měření elektrostatického potenciálního rozdílu (napětí) mezi místem na rostlině, kde je umístěna elektroda a referenčním místem, kterým bývá z pravidla vodivý půdní roztok. Následně jsou detekovány buď stacionární hodnoty (klidový potenciál) nebo časové změny vyvolané nějakým lokálním podnětem (Ilík *et al.* 2010). Elektrické signály tedy vychází z klidového membránového potenciálu, který je dán nerovnoměrným rozdělením základních fyziologických iontů (u rostlin K^+ , H^+ , Ca^{2+} a Cl^-) a je udržován funkcí iontových kanálů, elektrogenních membránových transportérů a aktivních transportních systémů. Díky těmto transportním mechanismům a celkově selektivním vlastnostem membrány vzniká transmembránový potenciálový rozdíl. Tím je myšlen rozdíl mezi napětím vnitřní strany membrány vztaženým k vnějšímu povrchu (Gradmann 2001). Potenciálový rozdíl je utvářen dvěma silami, které působí v daném okamžiku na konkrétní ion. Silou elektrickou, kdy elektrické pole vytvořené na membráně pohání ionty podle jejich polaritě a silou chemickou, kdy na základě difúze přechází ionty z míst o větší koncentraci do míst s nižší koncentrací. Souhrnně tyto síly pohánějící solut přes membránu nazýváme gradientem elektrochemického potenciálu (Alberts *et al.* 2005). Pokud jsou buňky v klidném stavu, je čistý tok iontů přes selektivní membránu roven nule, což je stanoveno konvencí. Tomuto stavu se říká negativní klidový membránový potenciál. Znamená to, že odtoky a přítoky transportovaných iontů jsou vyvážené ve výsledku je pak cytoplasmatická strana nabitá záporně

vůči vnější straně membrány, která je nabitá kladně. Jakýkoli nevyvážený pohyb iontů má za následek změny klidového potenciálu (Król *et al.* 2010).

Tyto nerovnováhy mohou být vyvolány různými podněty, jakými jsou např. elektrický proud, světlo, tlak (mechanický nebo osmotický), chemické látky různého původu nebo poškození. Výše uvedené stimuly jsou buď přímo nebo nepřímo zodpovědné za aktivaci/inhibici iontového kanálu, transportéru nebo pumpy, která přechodně mění permeabilitu membrány pro odpovídající ionty, a tím mění klidový potenciál (Gradmann 1976). Evokované změny membránového potenciálu mají různé tvary, kinetiku, trvání, vlastnosti a funkce. V dnešních dnech rozeznáváme tři rozdílné druhy elektrické signalizace v rostlinách, které se šíří na dlouhé vzdálenosti: akční potenciály (APs), variační (VPs) také označovány jako potenciály pomalé vlny a systémové potenciály (SPs). Elektrické signály se mohou skládat z více typů, pak je nazýváme jako signály kompozitní (Farmer *et al.* 2020).

1.1.2. Akční potenciál

Akční potenciály (**Obr. 1**) jsou důsledkem nepoškozujících stimulů zahrnující chlad, elektrický pulz, mechanický stimul (dotek), působení některých chemikálií a jsou reakcí také na působení světla nebo stínu (Fromm and Lautner 2007). AP může být zaznamenán po velmi slabých stimulech. Výjimkou jsou některé masožravé rostliny, kdy po poškození, konkrétně vpichu jehlou, byly zaznamenány AP u mucholapky podivné (*Dionaea muscipula*, Pavlovič *et al.* 2017), a pravděpodobně také u rosnatky kapské (*Drosera capensis*; Krausko *et al.* 2017). U druhé zmíněné se však autoři pouze domnívají, že to byl AP, ale nemohou vyloučit, že zaznamenaný elektrický signál byl složen z více než jednoho typu (kompozitní signál složený z AP, VP nebo SP). Funkce AP, které vznikají v reakci na dotek u jiných než masožravých rostlin nebo poškození, není dosud zcela pochopena. Důležité je zmínit, že i slabý stimul je schopen překročit určitou prahovou hodnotu k tomu, aby byl generován AP, který se šíří pravidlem „vše nebo nic“. To znamená, že elektrická odpověď nevzniká podprahovými stimuly. Pokud ale působení nějakého stimulu překročí tuto prahovou hodnotu, AP se šíří s konstantní amplitudou a rychlostí. Rychlost se ale liší u různých druhů rostlin (Fromm and Spanswick 1993).

Další charakteristikou AP je, že je to krátkodobý, samotně se šířící elektrický signál, který pro své šíření potřebuje biologicky aktivní, tedy živé buňky. Buněčným typem, ve kterém byly AP dosud detekovány napříč jednotlivými druhy, jsou sítkovice floému (Farmer *et al.* 2020). Může být detekován intracelulárními elektrodami a poté se skládá ze dvou hlavních fází: rychlé depolarizace (posun elektrického potenciálu napříč plazmatickou membránou do kladnějších hodnot) a repolarizace (obnovení potenciálního rozdílu na počáteční hodnotu

(Sibaoka 1991). Někdy po repolarizaci následuje také hyperpolarizace (posun hodnoty membránového potenciálu do záporných hodnot; (Felle and Zimmermann 2007). Nicméně APs mohou mít velmi variabilní strukturu i trvání a hyperpolarizace není vždy evidentní. Musí být zmíněno, že AP (stejně jako ostatní elektrické potenciály) je ale také často měřen extracelulárními elektrodami (Felle and Zimmermann 2007; Krausko *et al.* 2017; Pavlovič *et al.* 2017) a v tomto případě depolarizaci provází posun měřeného potenciálu do více záporných hodnot, repolarizaci pozitivní posun potenciálu do původní hodnoty a hyperpolarizaci do více kladných hodnot.

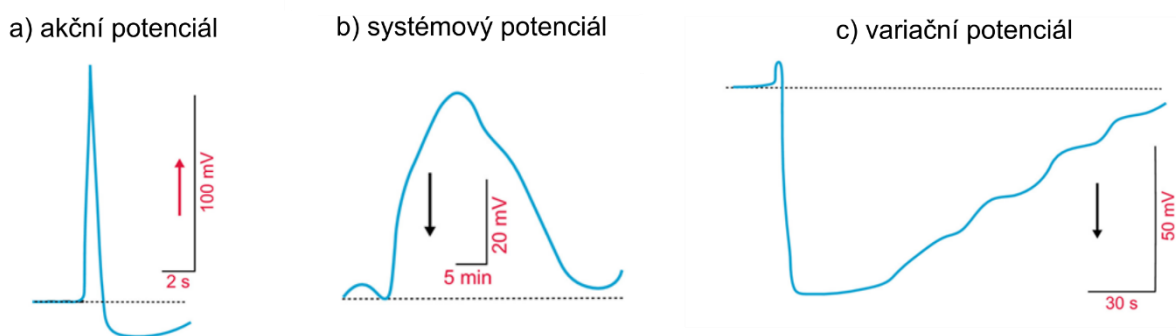
Iontový počátek depolarizační fáze je způsoben mechanosenzitivními anebo napětově řízenými kanály pro Ca^{2+} , které uvolňují Ca^{2+} z vnitřních (mitochondrie, vakuola a endoplazmatické retikulum) a vnějších zdrojů (apoplast) do cytoplazmy (Reddy *et al.* 2011). Původ tohoto vtoku Ca^{2+} z apoplastu je stále ještě diskutován. Aktivace napětově řízených Ca^{2+} kanálů pro AP ještě nejsou spojeny s žádným specifickým genovým produktem (Demidchik *et al.* 2018). V huseníčku byly identifikovány dva geny pro GLR kanál (GLR3.3 a 3.6; Mousavi *et al.*, 2013), AP jsou však iniciovány a propagovány nezávisle na těchto kanálech (Hedrich *et al.* 2016). Zvýšení koncentrace Ca^{2+} aktivuje aniontové kanály závislé na Ca^{2+} , přes něž Cl^- ionty difundují elektrochemickým gradientem ven z buňky (Lunevsky *et al.* 1983) a inaktivuje H^+ -ATPázu v plazmatické membráně (Vodeneev *et al.*, 2006; Sukhov and Vodeneev, 2009). Rychlá depolarizace inaktivuje Ca^{2+} kanály a aktivuje K^+ kanály, díky čemuž dochází k výtoku také K^+ iontů z buňky (Felle and Zimmermann 2007). Pokles koncentrace Ca^{2+} inaktivuje aniontové kanály a reaktivuje H^+ -ATPázu a rozvíjí se fáze repolarizace, které dominuje výtok H^+ . Nakonec je třeba obnovit koncentrace Ca^{2+} , Cl^- a K^+ na původní hodnotu (Vodeneev *et al.*, 2006; Sukhov and Vodeneev, 2009). Navzdory známému iontovému mechanismu, konkrétní kanály, které stojí za přesunem iontů, nejsou celkem známy (Böhm and Scherzer 2021).

Iosip a kolektiv autorů nedávno (2020) objevili v mucholapce gen pro kanál KDM1, který je zodpovědný za hyperpolarizační fázi. Elektrofyziologicky je charakterizován jako hyperpolarizací a acidifikací aktivovaný K^+ -selektivní kanál, který umožňuje zpětný příjem K^+ iontů do smyslových buněk spouštěcího výčnělku uvnitř pasti mucholapky. Pro návrat z hyperpolarizace do původního stavu H^+ -ATPáza aktivuje obnovení K^+ a Cl^- , dokud není znovu dosaženo počáteční rovnováhy (Iosip *et al.* 2020).

1.1.3. Systémový potenciál

Systémový potenciál (**Obr. 1**) byl navržen jako elektrický signál pohybující se na dlouhé vzdálenosti teprve nedávno. Průkopníkem v této oblasti je M. R. Zimmermann, který spolu s kolektivem autorů detekoval SP v bobu obecném (*Vicia faba*), ječmeni setém (*Hordeum*

vulgare) a tabáku virginském (*Nicotiana tabacum*; Zimmermann et al., 2009, 2016). SP je samostatně systémově šířící se hyperpolarizace, která dosahuje rychlosti 5-10 cm·min⁻¹. Hyperpolarizaci často předchází AP. Tyto hyperpolarizace jsou vyvolány aplikací některých chemických látek, mechanickým poškozením nebo požerem býložravce. Ve výše uvedených rostlinách po aplikaci kationtů (Ca²⁺, K⁺) nebo glutamátu do předem vytvořené rány byly zaznamenány hyperpolarizace membrány o různých amplitudách (řádově 10–60 mV) a trvání (4–30 min; Zimmermann et al., 2009). Po poranění je SP šířen po apoplastu. SP lze od ostatních elektrických signálů odlišit dle původu jejich aktivace. Zatímco AP a VP jsou iniciovány prouděním vápníku přes plazmatickou membránu, SP začínají aktivací protonových pump (tok K⁺, Cl⁻, a Ca²⁺ jsou spuštěny skrz SP). Výhodou samošířících se SP je, že nedodržují pravidlo „vše nebo nic“. Intenzitu SP lze tedy modulovat, aby přenášela informaci o závažnosti poranění (Zimmermann *et al.* 2009). Dosud není zaznamenáno, že by SP měl vliv na syntézu hormonů (Farmer *et al.* 2020).



Obr. 1: Základní typy elektrických signálů v rostlinách generované po mechanostimulaci nebo poškození. Tečkovaná linie představuje základní membránový potenciál. Plné modré čáry představují změny membránového potenciálu. Červené šipky ukazují směr depolarizace membrány, která je detekována intracelulárními elektrodami. Černé šipky ukazují směr depolarizace, která je měřena neinvazivními povrchovými elektrodami. a) Akční potenciál je reprezentován obvykle velmi rychlou depolarizací i repolarizací. V tomto příkladu po repolarizaci následuje také hyperpolarizace. AP mohou mít variabilní strukturu a hyperpolarizace není vždy zjevná. b) Systémové potenciály jsou depolarizace často měřené extracelulárními elektrodami. Hyperpolarizací často předchází AP, který v příkladu není ukázán c) Variační potenciál se skládá z rychlé membránové depolarizace, která je následována pomalejší a často nepravidelnou repolarizací. Převzato a upraveno z Farmer *et al.*, (2020).

1.1.4. Variační potenciál

Pokud je elektrický signál vyvolán vážným poškozením rostlinného pletiva zahrnující lokální popálení, stříhnutí apod., je jím obvykle VP (**Obr. 1**). VP má několik specifických charakteristik. Jak už název napovídá, má velmi variabilní strukturu, zahrnující dlouhotrvající nebo naopak rychlou depolarizaci a často také akčnímu potenciálu podobné amplitudy. O VP

se uvádí, že je to signál složený (Van Bel *et al.* 2014), obsahující některé nebo všechny z následujících komponent: AP, SP a signály generované po poškození jednotlivých buněk (Farmer *et al.* 2020). V systémových listech huseníčku VP často také začíná malou (několik mV) a přechodnou hyperpolarizací. Možnost, že se jedná pouze o artefakt záznamu VP za pomoci extracelulárních povrchových elektrod spojených s půdou pomocí referenční elektrody, nemůže být vyloučeno (Mousavi *et al.* 2013), avšak v našich záznamech byla nalezena stejná disturbance (Jakšová *et al.* 2021). Rozdíly v architektuře signálu pak nalezneme, porovnáme-li různé druhy (např. Boari and Malone, 1993), ale také srovnáme-li průběh zaznamenaných VP v rámci jednoho rostlinného druhu (např. Malone and Stanković, 1991). VP nikdy nebývá stejný, a proto se velmi těžko provádí statistická analýza naměřených amplitud a trvání poloviční šířky. Tento typ signálu se pohybuje rychlostí v rozmezí od $0,2 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ do $20 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ (Stahlberg, Cleland, *et al.* 2006) a může trvat desítky minut nebo déle (Hlaváčková *et al.* 2006; Sukhova *et al.* 2017). Tyto parametry závisí na typu poškození a jeho intenzitě. VP se mohou šířit z jednoho rostlinného orgánu do druhého, v mnoha rostlinách ale VP s rostoucí vzdáleností od místa poškození slábne (Stahlberg, Cleland, *et al.* 2006). Byly však nalezeny také výjimky, u kterých se vůbec nezdá, že by tomu tak bylo – např. u slunečnice roční (*Helianthus annuus*, (Stahlberg, Stephens, *et al.* 2006) a huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*; Mousavi *et al.* 2013). VP je také schopen projít neaktivními nebo mrtvými rostlinnými pletivy (Fromm and Lautner 2007). Ukazuje se ale, že aby byl signál z mrtvých buněk převeden do následné reakce, musí kooperovat s živými buňkami (Farmer *et al.* 2014, 2020).

Po desetiletí panuje názor, že VP má dvě složky – jednu elektrickou a druhou neelektrickou. VP je pravděpodobně lokální elektrickou odpovědí, která je spuštěna hydraulickým (Mancuso 1999) nebo chemickým signálem tzv. Ricca faktorem (Ricca 1926; Vodeneev *et al.* 2015), či kombinací obou (Malone 1994; Vodeneev *et al.* 2012). Jako skvělý prostředek pro rychlou výměnu informací slouží voda, která je spojovacím médiem kolujícím mezi jednotlivými orgány. Voda je v rostlinách transportována pod negativním hydrostatickým tlakem po kontinuu půda-rostlina-vzduch díky rostoucímu rozdílu vodního potenciálu, který je do značné míry určený dostupností vody v půdě a výparu vody z listu (Zimmermann 1983). Změnou tohoto vodního tlaku při mechanickém poškození v xylému cévních svazků rostlin je vyvolán hydraulický signál. Jelikož ale změny tlaku nemohou být vnímány mrtvými buňkami xylému, musí být dekodovány sousedními buňkami xylémového parenchymu a docházet k jejich interakci. Proto Farmer a kolektiv autorů (2014) navrhl *squeeze cell* hypotézu: Uvolnění transpiračního napětí vede k rychlému šíření mechanického signálu skrze xylém. Výsledný mechanický signál pak spouští otevření mechanosenzitivních iontových kanálů v sousedním xylémovém parenchymu, a to vede ke zvýšení cytosolického Ca^{2+} . K tomu může dojít buď

přímo prostřednictvím mechanosenzitivních kanálů propustných pro Ca^{2+} , nebo např. prostřednictvím mechanosenzitivního prvku, který mění membránový potenciál, a tak nepřímo umožňuje přítok Ca^{2+} přes výše zmíněné kanály. Mechanické napětí také indukuje produkci reaktivních forem kyslíku (*reactive oxygen species*, ROS), pravděpodobně prostřednictvím aktivace enzymu jako je NADPH oxidáza RESPIRATORY BURST HOMOLOG (RBOH), který by mohl sám spustit příliv Ca^{2+} skrze ROS-ovládaný kanál. Buněčný vápníkový a/nebo signál tvořený ROS by poté mohl spustit následnou reakci. Kromě toho mohou parenchymové buňky samy vnímat a procházet změnami tlaku (turgorové změny) prostřednictvím elastických a odolných buněčných stěn. Navíc je pravděpodobné, že parenchymové buňky jsou také schopné převádět hydraulické signály na fyziologický signál pomocí mechanicky citlivých kanálů v plazmatické membráně (Farmer *et al.* 2014).

Na základě nejnovějších výsledků Farmer a jiný kolektiv autorů (2020) navrhli nový model pro elektrickou signalizaci. Ten je založen na rychlém elektroosmotickém spojení mezi floémem a xylémem. Model naznačuje, že depolarizace membrán v cévní tkáni, která je vyvolána fyzikálními stimuly a/nebo chemickými elicitory, je spojena se změnami ve floémovém turgoru a hraje zásadní roli v šíření elektrického signálu z listu do listu. Jednotlivé kroky jsou pak následující: Poškození způsobí ztrátu floémového tlaku a ztrátu napětí v xylému. Homeostatické mechanismy rychle redistribuuji vodu mezi tato pletiva, a to je spojeno s tokem iontů. Díky změnám tlaku ve floému a xylému, mohou být elicitory vtaženy do xylému, kde mohou interagovat s kontaktními buňkami, aby byla spuštěna dodatečná membránová depolarizace. V tuto chvíli jsou detekovány elektrické signály intracelulárními elektrodami ve floému nebo povrchovými elektrodami. Jakmile je tlak ve vaskulatuře obnoven, dochází k velkému nárůstu koncentrace Ca^{2+} v cytosolu ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$; Farmer *et al.* 2020).

Nicméně rychlost šíření hydraulického signálu je v podstatě větší než rychlost přenosu VP (Vodeneev *et al.* 2015), srovnávací graf rychlostí signálů také v Huber and Bauerle (2016). Dá se říci, že tento mechanismus není stále dobře prozkoumán, a v současné době existuje více hypotéz než dat. A proto se pozornost stáčí také na chemické signály. Další hypotézy tvrdí, že lokální poškození spouští šíření specifické chemické látky skrze xylém a ta iniciuje elektrickou odpověď (Vodeneev *et al.* 2015; Sukhov *et al.* 2016). Dle posledních výzkumů by touto chemickou látkou mohl být glutamát (Toyota *et al.* 2018) nebo také ROS (Johns *et al.* 2021). Více o glutamátu v následující kapitole 1.1.6., o ROS v kapitole 1.2.1.

Ať je elektrická složka spuštěna hydraulickým nebo chemickým signálem, iontový mechanismus je navržen následovně. První fáze VP je aktivace mechanosenzitivního nebo na ligand-dependentního Ca^{2+} kanálu, který je vyvolán hydraulickou vlnou nebo propagací specifické chemické látky. Je možné, že nárůst koncentrace Ca^{2+} může být hlavním důvodem

pro dlouhotrvající inaktivaci H⁺-ATPázy v plasmatické membráně, která je základem dlouhotrvající depolarizace. Není vyloučeno, že potlačení aktivních transportů Ca²⁺ se může také podílet na zvýšení koncentrace Ca²⁺ ve spojení s VP. Nicméně šíření první rychlé depolarizace a akčního potenciálu podobné amplitudy je pravděpodobně spojeno s aktivací napětově-dependentního kanálu a přídatné zvýšení [Ca²⁺]_{cyt}. Tento proces stimuluje aktivaci Ca²⁺-dependentní aniontový kanál a vyvolání elektrické odpovědi, která je podobná AP. Změny v intracelulárním a extracelulárním pH, koncentraci Ca²⁺ a dalších iontů jsou silně spojeny s vyvoláním VP (Sukhov *et al.* 2019).

1.1.5. Možné kanály zapojené do elektrické signalizace – elektrické potenciály jsou geneticky propojeny s Ca²⁺

Zatímco je již dlouho známo, že toky Ca²⁺, K⁺, Cl⁻ a H⁺ přes membrány vytvářejí elektrické signály, specifické kanály a pumpy, které jsou zapojeny do tohoto procesu, teprve začínají být identifikovány. Moderní genetické metody a přístupy postupně odhalují geny zapojené do této elektrické signalizace, která je vyvolána poraněním. Patří sem geny H⁺-ATPázy *Arabidopsis* (*AHA*), *CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL (CNGC)*, *TWO PORE CHANNEL1 (TPC1)*, *ANNEXINI (ANNI)* a již dříve zmíněné *glr* a *rboh* (Farmer *et al.* 2020; Johns *et al.* 2021; Malabarba *et al.*, 2021).

Je známo, že H⁺-ATPázy jsou deaktivovány během depolarizační fáze elektrického signálu a následně znovu aktivovány během repolarizace. Jaké konkrétní H⁺-ATPázy jsou zapojeny do tohoto procesu, bylo definováno teprve nedávno. V huseníčku rolním se nachází dvanáct *AHA*. Původně se nepředpokládalo, že by mutanti *aha 1*, *-2* a *-3* hráli nějakou roli při VP vyvolaným poraněním (Mousavi *et al.* 2013), nedávná analýza však ukázala, že *AHA1* se na repolarizaci plasmatické membrány po poranění podílí (Kumari *et al.* 2019). K tomu je v *aha1* prodloužena doba trvání systémového Ca²⁺ signálu, který byl vyvolán poraněním, což poskytuje další mechanickou vazbu mezi Ca²⁺ vlnou, toky iontů a šířením VP. Samotné GLR kanály jsou regulovány pH, což poskytuje další spojení mezi pumpováním H⁺ a Ca²⁺ signálem (Shao *et al.* 2020).

V současné době máme nejpodrobnější model kanálu GLR, který je nedílnou součástí VP (Mousavi *et al.* 2013). GLR jsou neselektivní kationtové kanály řízené ligandem (aminokyseminami) propustné pro Na⁺ a Ca²⁺ (Wudick, Portes, *et al.* 2018; Shao *et al.* 2020). GLR kanály huseníčku sdílejí rozsáhlou sekvenční identitu se zvířecími ionotropními glutamátovými receptory, které jsou kritické pro učení a paměť savců, což naznačuje, že velmi odlišné fyziologické procesy mohou být zprostředkovány příbuznými proteiny z rostlinné a živočišné říše (Wudick, Michard, *et al.* 2018). Živočišné ionotropní glutamátové receptory

i rostlinné GLR jsou si podobné také doménou vázající ligand (Lam *et al.* 1998), kterým je glutamát. Glutamát působí jako excitační neurotransmitter v centrálním nervovém systému obratlovců a je také nedávno objeveným vývojovým signálem u rostlin (Forde 2014). Po poranění se v rostlině huseníčku glutamát uvolňuje z intracelulárních zdrojů a GLR kanály zde působí jako senzory, které převádějí tento signál na zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} následně šířící se do vzdálených orgánů (Kiep *et al.* 2015; Nguyen *et al.* 2018; Toyota *et al.* 2018). Vápníková systémová odpověď byla vyvolána i vnější aplikací glutamátu, ale ne jinými aminokyselinami (Toyota *et al.* 2018). Možnost aktivace GLR kanálů bez jakékoli vazby ligandu je v rostlinách ale stále možná (Farmer *et al.* 2014, 2020; Grenzi *et al.* 2021). Toyota a kolektiv autorů (2018) demonstrují, že tato dálková signalizace je ztracena u rostlin s mutacemi v GLR3.3 a GLR3.6 (Toyota *et al.* 2018). Přesný mechanismus, kterým jsou tyto kanály aktivovány, a zejména jaká je fyziologická role jejich vazby na aminokyseliny, však zůstává neobjasněný, nicméně Shao a spolupracující autoři (2020) zjistili, že poranění kořenů nebo aplikace glutamátu na poraněné kořeny byly dostatečné ke spuštění vln Ca^{2+} a VP. Oba tyto systémové signály byly inhibovány buď narušením GLR3.3 a GLR3.6, které kódují GLR kanály, nebo konstitutivní aktivací H^+ -ATPázy AHA1. Dále bylo ukázáno, že GLR3.3 a GLR3.6 vykazovaly aktivity Ca^{2+} -permeabilního kanálu řízené jak glutamátem, tak extracelulárním pH. Tyto výsledky společně podporují hypotézu, že poranění inhibuje aktivitu H^+ -ATPázy, což vede k apoplastické alkalizaci. To spolu s glutamátem uvolněným z poškozeného floému aktivuje GLR kanály, což má za následek depolarizaci membrán ve formě VP a zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ sloužícího k šíření systémové signalizace v reakci na poškození (Shao *et al.* 2020).

CNGC je dalším slibným kandidátem pro kanál související se systémovou signalizací. CNGCs jsou kationtové kanály propustné pro Ca^{2+} , které se údajně nacházejí jak na plazmatické membráně (Meena *et al.* 2019) tak možná i vakuole (Yuen and Christopher 2013). CNGC jsou spojeny s reakcemi na podněty, o kterých je známo, že spouštějí systémovou signalizaci – tepelným stresem, poranění nebo útok patogena. Po poškození lokálního listu mutantní rostliny huseníčku rolního v genu *cngc19* selhává účinnost systémového přenosu Ca^{2+} vlny (Meena *et al.* 2019). Zda rodina CNGC jako celek hraje v těchto systémových událostech tak integrální roli jako GLR, je třeba ještě prozkoumat.

1.2. Druhý posel – cytosolický Ca^{2+}

V tomto momentě signální kaskády se v rostlinných buňkách objevuje zvýšená $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, k čemuž dochází ihned po generaci elektrického signálu. Tato po sobě jdoucí sekvence událostí je potvrzena tím, že zatímco nástup elektrického signálu a první zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ se zdají být

průvodní, hlavní cytosolický vrchol Ca^{2+} nastává mnohem později než počáteční GLR-dependentní depolarizační fáze (Nguyen *et al.* 2018).

V eukaryotech od kvasinek přes rostliny až po živočichy slouží v buněčné signalizaci Ca^{2+} jako druhý posel (Berridge *et al.* 2000). Proč právě Ca^{2+} jako signál? Díky své chemické povaze je za normálních podmínek volný Ca^{2+} v cytosolu udržován na nízké úrovni (obvykle kolem 100-200 nM), a to převážně v důsledku precipitace a chelatace intracelulárním fosfátem a dalšími molekulami vázajícími Ca^{2+} . V extracelulárním prostoru (apoplastu) a určitých organelových zásobárnách (např. endoplazmatickém retikulu) však může volný Ca^{2+} dosáhnout milimolárních hodnot, tj. 10 000krát vyšších (Demidchik *et al.* 2018). Tento gradient poskytuje hnací sílu pro import Ca^{2+} , který pak funguje jako intracelulární signál (Lecourieux *et al.* 2006).

Dosud není zcela jasné, jak vápník může způsobit zcela specifickou reakci. Nicméně kromě trvání se signály Ca^{2+} mohou lišit také svou frekvencí a intracelulárním nebo tkáňově specifickým umístěním (McAinsh *et al.* 1997; Dodd *et al.* 2010). Všechny tyto časoprostorové charakteristiky vápníkových signálů, tzv. kalciový podpis, kódují informaci o vyskytující se podnětu. Dále, souhra s jinými buněčnými posly, jako jsou reaktivní formy kyslíku, změny membránového potenciálu nebo změny pH, může přenést specifické informace o změně prostředí do rostlinné buňky (McAinsh *et al.* 1997).

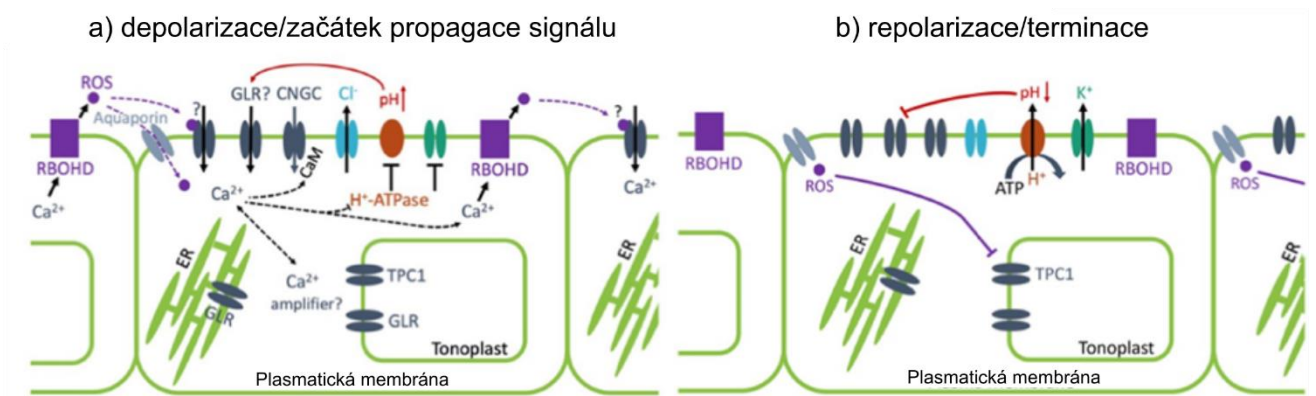
1.2.1. Ca^{2+} jsou geneticky spojeny s reaktivními formami kyslíku

Kromě vln Ca^{2+} a elektrických signálů rostliny navíc využívají vlny ROS jako součást svého systémového signalizačního aparátu. Vlna ROS se může šířit vaskulárními i nevaskulárními tkáněmi v závislosti na stimulu (Fichman *et al.* 2019; Lew *et al.* 2020). Mezi ROS patří reaktivní chemické látky, které obsahují kyslík (superoxid a peroxid vodíku) nebo zahrnují hydroxylový radikál (peroxydy a singletový kyslík). ROS jsou produkovány během reakcí v buňce a mohou způsobit poškození biologických makromolekul, jako jsou proteiny, lipidy a nukleové kyseliny kvůli jejich vysoce reaktivní povaze. Signály ROS se zdají být závislé na RBOHD a RBOHF (Zandalinas *et al.* 2020). RBOHs jsou rodinou NADPH oxidáz a oxidázy pro oba výše uvedené geny jsou umístěny v plazmatické membráně. Jsou to na Ca^{2+} závislé enzymy a očekává se tedy, že jejich aktivita je modulována v odpovědi na změny $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, které jsou spojené s membránovou depolarizací (Kimura *et al.* 2012). Jejich enzymatická aktivita spočívá v odebrání elektronu z NADPH v cytosolu a jeho přenosu skrze plazmatickou membránu na molekulární kyslík za vzniku superoxidového radikálu. Superoxiddismutáza pak působí na tuto chemicky vysoce reaktivní formu kyslíku za vzniku mnohem stabilnějšího peroxidu vodíku. Ten může být dále zpracován katalázou za vzniku vody a kyslíku (Smirnov

and Arnaud 2019). O ROS-produkujících NADPH oxidázách je známo, že jsou ústředním prvkem řady signálních systémů od obrany proti patogenům po sucho (Kadota *et al.* 2015).

Byla identifikována řada kanálů, u kterých byla regulace ROS buď odvozena nebo přímo monitorována, patří mezi ně např. kanál TPC1. Kanály TPC1 se nacházejí v tonoplastu a ukázalo se, že jsou taktéž důležité pro šíření systémového signálu po poranění, jejich působení konkrétně zvyšuje $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Kiep *et al.* 2015). Zdá se ale, že TPC1 působí ve shodě s TANDEM PORE K⁺ CHANNEL 1 (TPK1) a -3, aby zprostředkoval elektrickou excitabilitu tonoplastu (Jašlan *et al.* 2019). Předpokládá se však, že TPK1 a -3 nehrají roli v dynamice VP vyvolané poraněním (Mousavi *et al.* 2013). Je zřejmé, že jsme teprve na začátku odhalování složitosti a schopností vakuoly jako signalizačního uzlu.

Johns a kolektiv autorů (2021) navrhl nový model pro systémové šíření signálů vyvolanými poraněním při zapojení dosud známých kanálů. Tento model je znázorněn na **Obr. 2**. Proces začíná aktivací některého z kationtových kanálů (šedá barva) prostřednictvím vazby ligandu nebo ROS a přílivem Ca^{2+} do buňky. Potenciálně k tomu mohou přispět CNGSs a GLRs na plazmatické membráně. Molekulární identita navrhovaného Ca^{2+} -permeabilního kanálu v plazmatické membráně, který by byl aktivován pomocí ROS, zůstává v tomto systému neznámá. GLR kanál na vnitřních membránách endoplazmatického retikula a tonoplastu spolu s kanály TPC1 na tonoplastu (šedá barva) by mohly fungovat v amplifikačním systému, který by dále podpořil zvýšení $[Ca^{2+}]_{cyt}$ přílivem Ca^{2+} z těchto intracelulárních zdrojů. Na přítok Ca^{2+} buňka reaguje výtokem Cl^- a Ca^{2+} také inhibuje funkci H^+ -ATPázy (červená barva), což vede k depolarizaci plazmatické membrány. Procesy závislé na Ca^{2+} jsou pravděpodobnými kandidáty na koordinaci těchto aktivit, ale čeká se na definování přesných molekulárních mechanismů. Doprovodné zvýšení pH apoplastu v důsledku inhibice H^+ -ATPázy dále aktivuje domnělou vodivost GLR kanálů pro Ca^{2+} umístěných na plazmatické membráně. Výsledné zvýšení $[Ca^{2+}]_{cyt}$ by pak mělo vést k aktivaci NADPH oxidázy a další apoplastické produkci ROS, a tedy ke smyčce podporující šíření signálu z buňky do buňky. Pomalý příliv ROS do cytosolu prostřednictvím akvaporinů by pak mohl inaktivovat TPC1, tzn. inhibovat cytosolický zesilovač Ca^{2+} . Repolarizace by pak byla řízena reaktivací H^+ -ATPázy a uvolněním K^+ z buňky, čímž by se obnovil membránový potenciál. Snížení pH v apoplastu by inhibovalo aktivitu GLR, což by dále přispělo k resetování systému (Johns *et al.* 2021).



Obr. 2: Navržený model pro systémové šíření související s VP a Ca²⁺ vlnou vyvolanými poraněním při zapojení známých kanálů. Celý proces je výjimečně popsán v textu. Převzato z Johns *et al.*, 2021 a upraveno v programu Inkscape.

Nicméně stále nebyly identifikovány všechny Ca²⁺ kanály, které by přispívaly k systémové signalizaci, ani není znám jejich přesný způsob působení. Některé studie ukázaly, že konvenční kanály nemusí být vždy zapojené do drah zodpovědných za vtok Ca²⁺. Zajímavou možností se tak stává zapojení dalších pasivních proteinů zprostředkujících transport Ca²⁺, jako jsou annexiny (Laohavisit and Davies 2011; Davies 2014). Annexiny tvoří různorodou multigenovou superrodinu Ca²⁺-závislých proteinů vázajících se k buněčné membráně. Schopnost annexinů vést Ca²⁺ je evidentní z různých *in vivo* a *in vitro* testů. Na rozdíl od konvenčních Ca²⁺ kanálů, které jsou směřovány z Golgiho komplexu, aby sídlily ve specifické membráně, jsou annexiny schopny obsadit více buněčných míst současně. Mezi osmi dosud popsanými annexiny huseníčku rolního je nejlépe prozkoumaným ANN1. Ten byl nejprve detekován v cytosolu buněk, později v plasmatické membráně, endoplazmatickém retikulu, vakuole, mitochondriích, chloroplastech a v buněčné stěně. Tato charakteristická vlastnost umožňuje annexinům rychlou odezvu (Laohavisit and Davies 2011; Clark *et al.* 2012). V nové studii Malabarba *et al.* (2021) se ukázalo, že zvýšení [Ca²⁺]_{cyt} po poranění nebo simulované býložravosti, bylo narušeno v systémových listech huseníčku rolního se ztrátou funkce *ann1*. Býložravost a poranění vyvolaly obranné reakce jako je akumulace jasmonátu a exprese obranného genu v lokálních listech. Tyto reakce zůstaly lokální a byly silně sníženy v systémových listech v rostlinách *ann1*. Tyto výsledky ukázaly, že ANN1 hraje důležitou roli v aktivaci spíše systémové nežli lokální obrany rostlin napadených hmyzem (Malabarba *et al.* 2021). Výše popsaný model tedy pravděpodobně postrádá některé důležité prvky.

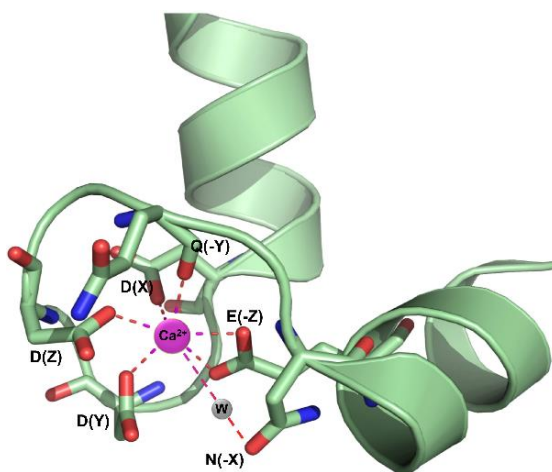
1.2.2. Dekódování Ca²⁺

Aby rostlinná buňka mohla využít informace o vyskytujícím se stimulu, který je zprostředkován specifickým zvýšením [Ca²⁺]_{cyt}, musí tyto signály dekodovat a převést je do následných reakcí,

jako je genová exprese nebo tvorba metabolitů. Snímání Ca^{2+} iontů Ca^{2+} -vazebnými proteiny je prvním krokem k dekódování. U huseníčku rolního bylo identifikováno přibližně 250 Ca^{2+} snímacích proteinů. Všechny nesou alespoň jednu vazebnou doménu pro Ca^{2+} , tzv. EF-Hand motiv (Day *et al.* 2002). Tyto domény jsou tvořeny dvěma šroubovicemi, nazývanými E- a F-helix, které jsou spojeny smyčkou vážající iont Ca^{2+} (**Obr. 3**, La Verde *et al.* 2018).

Po navázání Ca^{2+} procházejí tyto proteiny konformační změnou, která jim umožňuje vázat se na následující cíl, jakým jsou kinázy, fosfatázy nebo jiné enzymy, iontové pumpy, kanály či transkripční faktory (Dodd *et al.* 2010; La Verde *et al.* 2018). To vede buď přímo ke změně genové exprese a tím k určité stresové reakci, nebo je Ca^{2+} signál interakcí s cílem přeložen do jiného signálního režimu, což vede k dalším událostem přenosu signálu. Kromě EF-Hands motivu mají některé Ca^{2+} vazebné proteiny další funkční domény. Jsou klasifikovány jako sensorové respondéry. Příkladem pro sensorové respondéry je rodina Ca^{2+} -dependentních proteinkináz v huseníčku. Tyto proteiny mají kromě svých EF-Hand motivu kinázovou doménu, která je aktivována konformační změnou iniciovanou vazbou Ca^{2+} (Sanders *et al.* 2002). Mohou tak přímo transformovat signál na jiné signály nebo změny genové exprese.

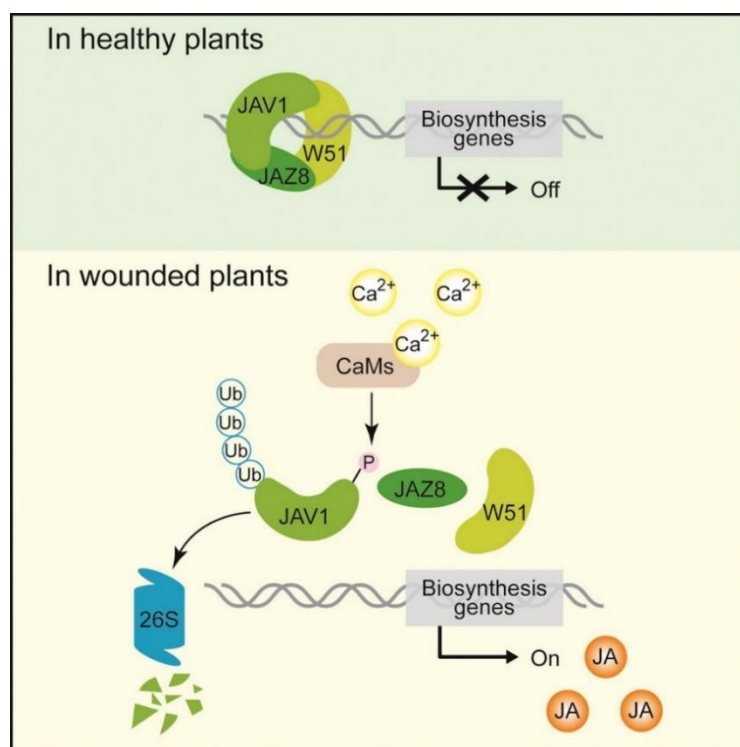
Kromě sensorových respondérů má většina rodin Ca^{2+} sensorů známých v huseníčku pouze EF-Hand jako funkční domény, a proto jsou schopné vázat pouze Ca^{2+} . Říká se jim sensorová relé. Tyto proteiny potřebují interagovat s jinými proteiny, aby transformovaly signál Ca^{2+} do následných signalizačních událostí nebo stresových reakcí. Mezi skupinou sensorových relé jsou rodiny sensorů Ca^{2+} , jako jsou proteiny podobné kalcineurinu B, kalmoduliny (CaM) a proteiny podobné kalmodulinu (Sanders *et al.* 2002; Dodd *et al.* 2010).



Obr. 3: 3D struktura EF-Hand motivu kalmodulinu CaM7 huseníčku rolního. Iont Ca^{2+} (fialový) se váže do smyčkové struktury, která spojuje E- a F helix. W (šedá) označuje molekulu vody. Převzato z La Verde *et al.* (2018).

1.3. Ca²⁺ aktivuje syntézu jasmonátů

Změny v intracelulárních koncentracích Ca²⁺ jsou pravděpodobně mediátory aktivace syntézy hormonů v reakci na elektrické signály. Ve všech listech, které obdrží Ca²⁺ signál se také během pár minut hromadí fytohormony jasmonáty (Koo *et al.* 2009; Mousavi *et al.* 2013; Gilroy *et al.* 2016). Těsné spojení mezi zvýšenou [Ca²⁺]_{cyt} a akumulací kyseliny jasmonové (*jasmonic acid*, JA) prokázaly už dávější farmakologické studie (Fisahn *et al.* 2004). Nebylo však dlouho zcela jasné, jak rostliny zpočátku aktivují biosyntézu JA pro obranu rostlin. Možným spojením může být aktivace enzymu 13-lipoxygenázy LOX6 pomocí Ca²⁺, který katalyzuje syntézu prekursoru JA, čímž přispívá k rychlé syntéze JA v systémových listech (Chauvin *et al.* 2013). Stejně tak se uvažuje o úloze mitogenem-aktivovaných protein kináz (MAPK), které interagují s kalmodulinem, a mohou fosforylovat a aktivovat klíčové enzymy biosyntézy JA, např. aktivovat fosfolipázy (Seo *et al.* 1995; Maffei *et al.* 2007). Nový pohled přinesl Yan a kolektiv autorů (2018), kteří odhalili, že biosyntézu JA k obraně proti napadení hmyzem řídí nový komplex represorů JAV1-JAZ8-WRKY51 (JJW; **Obr. 4**).



Obr. 4: U zdravých rostlin je komplex JAV1-JAZ8-WRKY51 vázán a potlačuje tak biosyntézu JA, aby udržel JA na nízké bazální úrovni, čímž je zajištěn správný růst rostlin. JAZ8 zde působí jako represor transkripce – potlačuje expresi genů biosyntézy JA. JAV1 i WRKY51 jsou fyzicky vázány na promotor genů biosyntézy JA, aby nesly JAZ8 směrem k cílovému regionu promotoru. Když jsou rostliny poraněny, poškození rychle indukuje zvýšení [Ca²⁺]_{cyt} a takováto jedinečná signatura Ca²⁺ je vnímána CaM, který dále interaguje s JAV1 a spouští jeho fosforylaci. Fosforylovaný JAV1 nedokáže interagovat s JAZ8, exportuje se z jádra do cytoplazmy, je označen ubikvitinem a podléhá degradaci zprostředkovanou 26S-proteazomem. Tím je dezintegrován komplex JJW, aby došlo k derepresi genů biosyntézy JA, což vede k rychlému hromadění JA ve zraněné rostlině (Schéma převzato z Yan *et al.*, 2018).

Jakmile Ca^{2+} vlna dorazí to systémových tkání, aktivuje na Ca^{2+} závislý protein CaM, který zase aktivuje proteinkinázu fosforylující JASMONATE-ASSOCIATED VQ MOTIF GENE1 (JAV1). JAV1 je součástí represorového komplexu, který spolu s JAZ8 a WRKY51 inhibuje expresi genů důležitých pro biosyntézu JA. Fosforylace JAV1 způsobuje disociaci tohoto komplexu a spouští ubikvitinylaci JAV1 prostřednictvím E3-ubikvitin ligázy, čímž je cílen JAV1 do proteazomu 26S k degradaci. Narušením inhibičního komplexu JJW dochází k de-represi genů biosyntézy JA, což vede k rychlému hromadění JA ve zraněné rostlině (Yan *et al.* 2018).

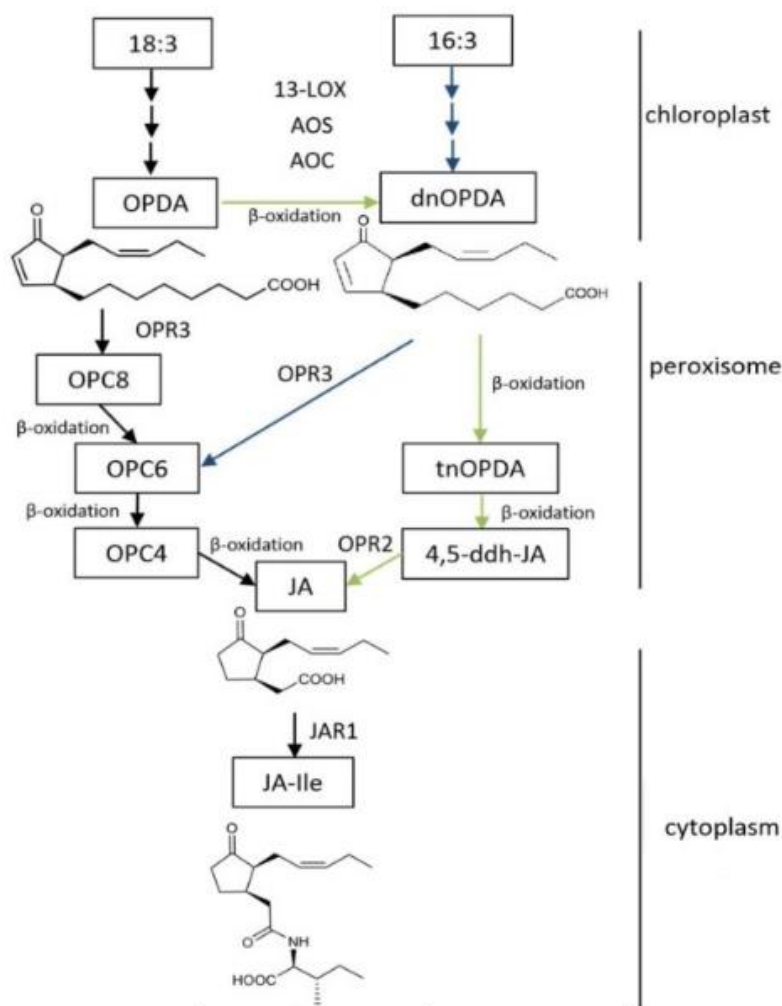
Výše popsaný model však nevysvětluje náhlou akumulaci JA v průběhu několika sekund po poranění, která svou rychlou kinetikou nemůže být vysvětlena aktivací transkripce JA biosyntetických genů. Studie Kimberlin a kolektivu autorů (2022) ukazuje, že časný nárůst JA po poranění huseníčku rolního nezávisí na expresi biosyntetických genů pro JA, ale spíše na rychlé aktivaci (např. pomocí MAPK) fosfolipáz (např. DAD1), které uvolňují mastné kyseliny z fosfolipidů a galaktolipidů v plastidových membránách a vytváří tak substrát pro syntézu JA. Akumulace JA je totiž tak rychlá, že za ní nemůže stát genová transkripce a translace, tento mechanismus však může hrát roli v pozdější fázi. Krok lipolýzy, který vytváří prekurzory mastných kyselin, ze kterých se následně syntetizuje JA, je považován za první biosyntetický a regulační krok. Závisí tedy možná a pouze na dostupnosti substrátu, tedy tzv. substrátové limitaci (Kimberlin *et al.* 2022).

1.3.1. Biosyntéza jasmonátů

Jasmonáty (*jasmonates*, JAs) jsou skupinou fytohormonů, mezi něž patří JA (chemicky popsána jako 3-oxo-2'-*cis*-pentenyl-cyklopentan-1-octová kyselina), její prekurzory a deriváty. Ať už je syntéza JAs spuštěna jakkoliv, v současné době jsou známy již tři dráhy, kterými se jasmonáty syntetizují (**Obr. 5**). Prekurzory jsou ve všech případech polynenasycené mastné kyseliny: oktadekanová dráha vychází z kyseliny α -linolenové (18:3), hexadekanová dráha začíná kyselinou hexadekatrienovou (16:3). Nově navržená na reduktáze kyseliny oxofytodienové (*OPDA reductase 3*, OPR3) nezávislá dráha startuje sice z kyseliny 12-oxofytodienové (*12-oxo-phytodienoic acid*, OPDA), ta je ale produktem kyseliny α -linolenové. Všechny tři dráhy vyžadují tři reakční místa: chloroplast, peroxisom a cytoplasmu (Chini *et al.* 2018; Ruan *et al.* 2019).

Uvnitř chloroplastů se kyselina α -linoleová přeměňuje ve třech krocích na OPDA a stejně tak kyselina hexadekatrienová na kyselinu dinor-12-oxo-fytodienovou (dnOPDA; *dinor-oxo-phytodienoic acid*). Reakce jsou katalyzovány stejnými enzymy: lipoxygenázou

(LOX), allenoxidsyntázou (AOS) a allenoxidcyklázou (AOC). OPDA a dnOPDA jsou poté transportovány do peroxisomu, kde jsou redukovány OPR3 na kyselinu 8-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl)oktanovou (OPC8). Dále OPC8 prochází třemi β -oxidacemi. Každý β -oxidační krok zkracuje karboxylový postranní řetězec o dva uhlíky, což vede k produkci kyseliny 6-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl)hexanové (OPC6), kyseliny 4-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl)butanové (OPC4) a nakonec vznikne JA (Ruan *et al.* 2019).



Obr. 5: Schéma biosyntézy kyseliny jasmonové v huseníčku rolním. Černé šipky ukazují oktadekanovou dráhu, modré šipky ukazují hexadekanovou dráhu a zelené alternativní na reduktáze kyseliny oxofytodienové (OPR3) nezávislou dráhu. Enzymy jsou označeny následovně: LOX pro lipoxygenázu, AOS pro allenoxidsyntázu, AOC pro allenoxidcyklázu, OPR3 pro OPDA reduktázu, JAR1 pro jasmonovou-amidosyntetázu. Meziprodukty a produkty jsou označeny následovně: 18:3 pro α -linolenovou kyselinu, 16:3 pro hexadekatrienovou kyselinu, OPDA pro 12-oxo-fytodienovou kyselinu, dnOPDA pro dinor-12-fytodienovou kyselinu, OPC8 pro kyselinu 8-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl)oktanovou, OPC6 pro kyselinu 6-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl)hexanovou, OPC4 pro kyselinu 4-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl)butanovou, tnOPDA pro tetranor-OPDA, 4,5-ddh-JA pro 4,5-didehydrojasmonovou kyselinu, JA pro jasmonovou kyselinu a JA-Ile pro jasmonoyl-L-isooleucin. Schéma převzato z Ruan *et al.*, 2019 a upraveno v programu Inkscape.

Nedávno Chini a kolektiv autorů (2018) ukázali, že JA lze také produkovat cestou nezávislou na OPR3 (**Obr. 5**), kde OPDA přímo prochází třemi β -oxidačními cykly, což vede nejprve k produkci kyseliny dinor-12-oxofytodienové (dnOPDA), poté kyseliny tetranor-12-oxofytodienové (tnOPDA; *tetranor-oxo-phytodienoic acid*) a nakonec kyseliny 4,5-didehydrojasmonové (4,5-ddh-JA; *4,5-didehydrojasmonic acid*). 4,5-ddh-JA je pak redukován pomocí OPR2 na JA (Chini *et al.* 2018).

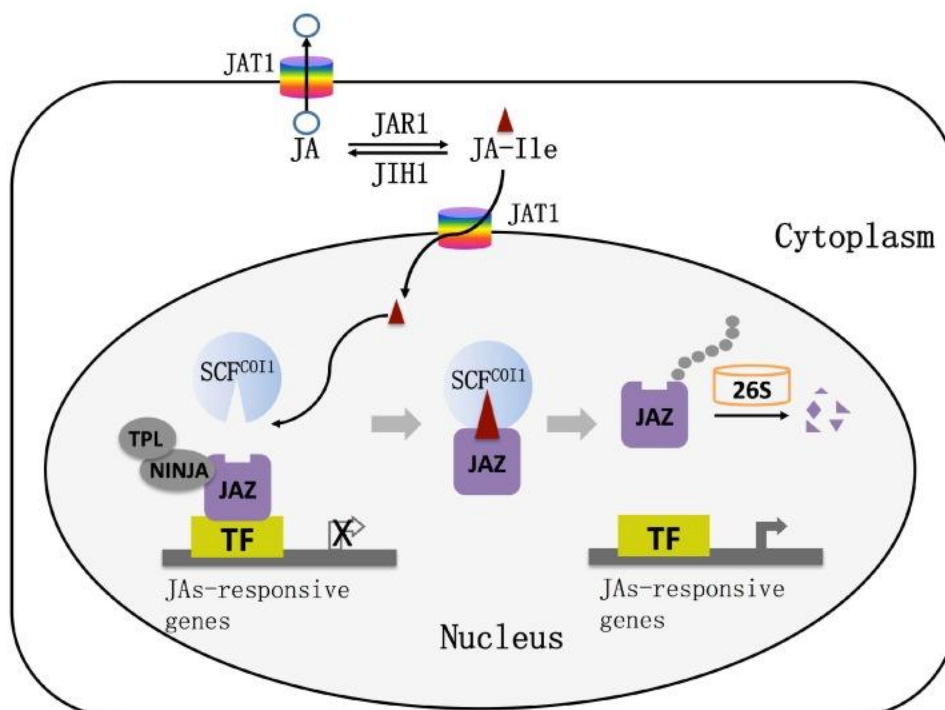
Dlouho byla JA považována za bioaktivní jasmonát. Nicméně Staswick and Tiryaki (2004) a Fonseca *et al.* (2009) odhalili, že bioaktivní formou je isoleucinový konjugát kyseliny jasmonové, jasmonoyl-L-isoleucin (JA-Ile). Produkce JA-Ile v cytoplazmě je katalyzována amidosyntetázou kyseliny jasmonové (JAR1, JASMONATE RESISTANT 1; **Obr. 5**). Ačkoli se JA-Ile stále považuje za hlavní bioaktivní molekulu, JA konjugáty s jinými aminokyselinami vykazují také biologickou aktivitu (Yan *et al.* 2016).

1.3.2. Mechanismus vnímání a regulace genové exprese jasmonáty

V tomto kroku se JA-Ile nachází v cytoplazmě. V nedávné době byl v huseníčku objeven ABC transportér AtJAT1/AtABCG1, dále jen jako JAT1 (JASMONIC ACID TRANSFER PROTEIN 1), který slouží jako vysokoafinitní transportér pro regulaci subcelulární distribuce JA. Ukázalo se, že JAT1 je lokalizován jak na jaderných, tak plazmatických membránách rostlinných buněk a zprostředkovává transport JA přes plazmatickou membránu a bioaktivního JA-Ile přes vnitřní jadernou membránu (**Obr. 6**). Při vysoké koncentraci JAs se stává funkce transportéru umístěného v cytoplasmatické membráně dominantní, což snižuje intracelulární koncentraci JA a JA-Ile v buňce. Díky transportu JA do apoplastu je aktivována jasmonátová signální dráha také v jiných buňkách. JAT1 může velmi rychle regulovat dynamiku JA/JA-Ile – rychle transportuje JA-Ile do jádra, pokud je rostlina ve stresových podmínkách, stejně tak rychle snižuje množství JA v buňce, aby nedošlo k inhibici růstu a vývoje rostliny kvůli obranné reakci (Li *et al.* 2017).

Jakmile se JA-Ile po určitých podnětech dostane do jádra, musí se navázat na svůj receptor. V současné době se má za to, že JA-Ile v jádře podporuje interakci mezi proteiny CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1) a JASMONATE ZIM DOMAIN (JAZ; **Obr. 6**). COI1 je F-box protein, který se spojuje s proteiny SKP1 a CULLIN za vzniku komplexu SCF^{COI1}. Tento komplex slouží jako E3 ubiquitin ligáza. Po navázání JA-Ile komplex SCF^{COI1} ubikvitinuje proteiny JAZ, což vede k jejich degradaci proteazomem 26S (Xie *et al.* 1998; Zhai *et al.* 2015). Proteiny JAZ jsou represory transkripce, váží se na transkripční faktory (TF) při nízkých hladinách JA-Ile (Thines *et al.* 2007; Chini *et al.* 2007). V roce 2010 Sheard a kolektiv pomocí analýzy krystalové struktury potvrdili, že komplex COI1-JAZ je vysoce afinitní

receptor pro bioaktivní JA-Ile; to znamená, že COI1 a JAZ jsou koreceptory jasmonátové signalizace. COI1 obsahuje otevřenou kapsu rozeznávající JA-Ile s vysokou specifitou. Vysoce afinitní vazba hormonu ale vyžaduje bipartitní JAZ degronovu sekvenci. Tou je JAs doména nacházející se na C-konci JAZ, obsahující krátký konzervativní motiv LPIARR, vytvářející α -helix. Tato aminokyselinová smyčka v přítomnosti JA-Ile silně interaguje s COI1, uzavře ligand ve vazebné kapse a to vede ke stabilizaci komplexu COI1-JAZ (Sheard *et al.* 2010). Tedy vnímání JA-Ile koreceptorem umožňuje degradaci proteinů JAZ a tím uvolnění TF, což vede k expresi genů relevantních pro obranu rostlin (**Obr. 6**).



Obr. 6: Pracovní model transportu kyseliny jasmonové (JA) a mechanismu exprese genů odpovídajících na JA. JAT1: transportní protein kyseliny jasmonové, JASMONIC ACID TRANSFER PROTEIN1; SCF: SKP1, CULLIN a F-box proteiny; COI1: CORONATINE INSENSITIVE1; JAZ: JASMONATE ZIM-DOMAIN protein, TF: transkripční faktor; TPL: TOPLESS protein, NINJA: NOVEL INTERACTOR OF JAZ; 26S: 26S proteazom. (Převzato z Ruan *et al.*, 2019).

Na této úrovni je silně regulováno, jaký proces nakonec proběhne. JAZ proteiny fungující jako represory interagují totiž s několika rodinami pozitivně působících TF, které spočívají v promotorové oblasti JA-responzivních genů a regulují zapojení JAs-responzivních genů v různých procesech. Nejdůležitější roli při expresi genů odpovídajících na JA má MYC2. Tento hlavní regulátor má dvojí roli: působí pozitivně na expresi genů odpovídajících na poranění, ale potlačuje geny obrany proti patogenům (Chini *et al.* 2009; Pauwels *et al.* 2009). Kromě TF MYC nedávné studie ukázaly, že TF MYB se také vážou s represory JAZ a mohou být aktivovány degradací JAZ v přítomnosti JA-Ile. Kromě toho je do signalizace JA zapojeno

také několik dalších TF, jako je NAC, ERF a WRKY. Tyto TF regulují expresi mnoha genů zapojených do růstu a vývoje rostlin a zejména reakcí a adaptací rostlin na prostředí (Ruan *et al.* 2019). Jak bylo napsáno výše, WRKY jsou zapojeny do regulace genů spojených s biosyntézou JA jako LOX, AOS, AOC a OPR, zvyšující koncentraci JA a JA-Ile v buňce (Yan *et al.* 2018).

1.3.3. Lokální a systémová akumulace jasmonátů v pletivu huseníčku rolního

Lokální poranění vede k velmi rychlé syntéze JA a to nejen v lokálních listech, ale také v listech od poranění vzdálených, což je způsobeno systémovou reakcí (Hlaváčková *et al.* 2006; Koo and Howe 2009). Systémové signály, které jsou zodpovědné za zvýšení množství JA ve vzdálených listech jsou elektrické signály (Mousavi *et al.* 2013), vlna Ca^{2+} (Toyota *et al.* 2018), ROS (Miller *et al.* 2009) a/nebo samotná JA (Li *et al.* 2020) a tyto signály se šíří společně (Gilroy *et al.* 2014). Ve všech listech, které obdrží tento signál, se během několika minut nahromadí JA. V minulých letech se ukázalo, že signální molekuly se mohou rychle šířit mezi rostlinou prostřednictvím cévního systému. Rostlina tak využívá systémové spojení mezi cévními svazky jednotlivých listů a dle toho můžeme pozorovat také reakci pouze v konkrétních listech (Mousavi *et al.* 2013; Salvador-Recatalà *et al.* 2014; Kiep *et al.* 2015; Gasperini *et al.* 2015; Nguyen *et al.* 2018). U huseníčku rolního jsou tato spojení výsledkem vývoje růžice (Dengler 2006). Cévní svazky zárodečných listů, děložních lístků a prvních čtyř juvenilních listů se vyvíjí přímo z cévního válce hypokotylu. Cévní svazky následujících listů 5 až 8 vznikají z větví vaskulární stopy prvních čtyř listů podle pravidla $n+3$ nebo $n+5$, přičemž n je číslo předchozího listu v této stopě. List 9 a následující listy jsou odvozeny z větví podle pravidel $n+8$ a $n+5$ (Kang *et al.* 2003; Dengler 2006). Stále však sdílejí nepřímé vazby na jiné listy podle pravidla $n\pm 3$, tzv. kontaktní parastichy (Dengler 2006; Mousavi *et al.* 2013). Všechny listy v růžici huseníčku jsou tedy spojeny prostřednictvím své vaskulatury s ostatními listy podle pravidel $n\pm 3$, $n\pm 5$ a $n\pm 8$.

Pokud jsou systémové signály nějakým způsobem přerušeny nebo utlumeny, např. použitím anestetika dietyléteru, v poškozeném, tedy lokálním listu, je stále analyzováno zvýšené množství JAs (Jakšová *et al.* 2021). To může být způsobeno uvolněním fragmentů buněčné stěny při poškození. Stěny rostlinných buněk jsou sofistikované struktury bohaté na sacharidy, které představují bezprostřední kontakt povrchu s extracelulárním prostředím a často slouží jako první bariéra proti biotickým a abiotickým stresům. Několik důkazů naznačuje, že samotná porucha buněčné stěny je schopna vyvolat biosyntézu JA. Konkrétně exogenní aplikace fragmentů buněčné stěny a inhibitorů celulózy, enzymů degradujících buněčnou stěnu a genetické poruchy ve stěnách rostlinných buněk vedou k aktivaci dráhy JA. Signální dráhy

zapojené do vnímání změn buněčné stěny a přenos informací intracelulárně k zahájení produkce JA v plastidech jsou v současnosti neznámé (Mielke and Gasperini 2019). Nicméně by to mohlo vysvětlovat, proč je v lokálních listech stále vysoká hladina jasmonátů s výrazně zeslabenými elektrickými a částečně Ca^{2+} signály.

1.4. Proteiny související s patogenezí v obranné reakci rostlin

Proteiny, které jsou kódované rostlinou za patologických nebo tomu příbuzných podmínek, se nazývají proteiny související s patogenezí (PRp; *pathogenesis-related proteins*). Jsou základní složkou inducibilních obranných mechanismů rostlin, ale mohou se vyskytovat také konstitutivně. Jejich exprese může být spuštěna jak po infekci patogeny (viry, bakterie, houby, oomycety), tak po napadení nematodami, hmyzem nebo býložravci. PRp mají nízkou molekulovou hmotnost (6-43 kDa) a jsou koordinovány na úrovni transkripce, která je aktivována signálními molekulami, jako jsou stresové hormony (kyselina salicylová, JA a jejich metylestery). Jako elicitory exprese genů mohou působit fragmenty chitinu, glykoproteiny, glukany, peptidy, proteiny a oligosacharidy bakterií a hub. Indukce PRp při měření na časovém měřítku jsou pozdní události a jejich účinek na časnou infekci či poškození je omezený. Lokalizace a distribuce PRp přímo souvisí se způsobem a povahou infekce patogenem. PRp byly klasifikovány do různých rodin na základě sdílené sekvenční homologie. PRp lze také seskupit do různých tříd na základě migrace v nativní polyakrylamidové gelové elektroforóze, reakce se specifickými antiséry a mRNA sondami. PRp byly také klasifikovány na základě biologické aktivity indukovaných obranných proteinů. Bylo identifikováno sedmnáct různých tříd PRp (Sudisha *et al.* 2012; Sinha *et al.* 2014). Uvedu vlastnosti a funkce tříd, které jsou důležité pro tuto disertační práci.

Třída PR-1 obsahuje proteiny pojmenované stejně jako celá skupina – s patogenezí související proteiny. Tato třída je nejvíce zastoupenou skupinou PRp. Hrají důležitou roli v rostlinném metabolismu a v obranných reakcích rostlin v odpovědi na biotický i abiotický stres. Jejich molekulární funkce ale nejsou přesně známy (Akbudak *et al.* 2020). PR-1 jsou vysoce rezistentní k proteolýze a jsou dobře přizpůsobeny extracelulárnímu prostředí. Můžeme je rozdělit na proteiny kyselé a bazické. Geny kódující kyselé PR-1 proteiny neobsahují žádnou sekvenci pro cílení do vakuoly. Bazické PR-1 proteiny obsahují hydrofobní N-koncovou oblast z třiceti aminokyselin, která funguje jako signální peptid pro translokaci do endoplazmatického retikula a C-konec obsahuje signál pro přesun do vakuoly (Sudisha *et al.* 2012).

Do rodiny PR-2 jsou seskupeny glukonázy. Tyto proteiny katalyzují hydrolytické štěpení 1,3- β -D-glukosidických vazeb v β -1,3-glukanech (Leubner-Metzger and Meins 1999). V rostlinách se vyskytují hojně a byly charakterizovány u široké škály druhů. Hrají klíčovou

rolí v buněčném dělení, transportu materiálů přes plasmodesmata, při odolávání abiotickým stresům a podílejí se na tvorbě květů až po zrání semen. Také chrání rostliny proti houbovým patogenům buď samostatně, nebo ve spojení s chitinázami a jinými antifungálními proteiny (Balasubramanian *et al.* 2012).

Do skupiny PR-3, 4, 8 a 11 spadají rostlinné chitinázy. Do těchto čtyř tříd jsou rozděleny na základě sekvenční homologie a také přítomnosti nebo nepřítomnosti domény vázající chitin (Sudisha *et al.* 2012). Chitin je přírodní homopolymer β -1,4-vázaných N-acetylglukosaminových zbytků. Chitinázy katalyzují hlavně hydrolytické štěpení β -1,4-glykosidové vazby chitinu a deacetylovanou formu chitinu, který je označován jako chitosan, ale i jiné sloučeniny. Chitin a chitosan se hojně vyskytují v buněčných stěnách hub a některých řas, v bakteriích a v exoskeletu bezobratlých. Bakteriální chitinázy se podílejí hlavně na degradaci chitinu, aby poskytovaly buňkám výživu uhlíkem a dusíkem. Chitinázy mají úlohu také při obraně nebo při zvyšování konkurenceschopnosti u vyšších rostlin a živočichů, kteří neobsahují chitin. V rostlinách se chitinázy podílejí na biotických a abiotických stresových reakcích a také na růstových a vývojových procesech (Grover 2012). Většina rostlinných chitináz je endochitinázami, které náhodně štěpí vazby uvnitř polymeru. Naopak exochitinázy štěpí na neredukujícím konci chitinového řetězce. Mnoho rostlinných exochitináz má také lysozymovou aktivitu, hydrolyzující β -1,4 vazby mezi zbytky N-acetylglukosaminu a N-acetylmuramové kyseliny v peptidoglykanu bakterií (Collinge *et al.* 1993). Zda jsou takové bifunkční enzymy klasifikovány jako lysozym nebo chitináza, závisí pravděpodobně na poměru aktivity lysozymu k chitináze za podmínek, které maximalizují obě aktivity. Rodiny chitinázových genů jsou organizovány do pěti tříd, které jsou založené na sekvenční podobnosti a základní homologii. Třídy I, II a IV (rodina GH19) sdílejí homologní katalytickou doménu, zatímco třídy III a V (rodina GH18) jsou více podobné houbovým a bakteriálním chitinázám a mají dodatečnou lysozymovou aktivitu (Grover 2012). Chitinázy třídy I jsou dále děleny do dvou podtříd: podtřída Ia s prodlouženým karboxylovým koncem, které cílí chitinázy do rostlinné vakuoly a podtřída Ib bez prodlouženého karboxylového konce a chitináza se tak stává extracelulární (Neuhaus *et al.* 1991).

Do skupiny PR-5 patří thaumatinu podobné proteiny, vykazující vysokou homologii s thaumatinem rostliny *Thaumatococcus daniellii*. Struktura některých proteinů ze skupiny PR5 se také podobá struktuře stresového proteinu osmotinu, odtud pak pochází označení protein podobný osmotinu, který spadá do této skupiny. Funkcí proteinů této skupiny je zabránění růstu houbového patogena tím, že inhibuje jeho enzymy štěpící polysacharidy buněčných stěn rostlinných buněk (např. xylanasy). Tímto způsobem je znemožněn vstup patogena do hostitelské buňky a čerpat z ní živiny (Liu *et al.* 2010).

Skupina PR-7 zahrnuje proteiny s endoproteinázovou aktivitou. Proteázy (také proteinázy či peptidázy) jsou skupinou enzymů, která štěpí proteiny a patří do třídy hydroláz. Hydrolýza peptidické vazby mezi jednotlivými aminokyselinami je možná jak ve vnitřní části peptidových řetězců (endopeptidázami), tak i na terminálních koncích proteinů (exo-peptidázami). Endopeptidázy se dále dělí podle katalytických skupin přítomných v místě, kde proteázy na bílkovinu působí do šesti skupin – cysteinové, serinové, threoninové proteázy, metalloproteázy, glutamátové a aspartátové proteázy (Sudisha *et al.* 2012).

Skupina PR-9 obsahuje peroxidázy vykazující peroxidázovou aktivitu, to znamená, že katalyzují reakci peroxidu vodíku s širokým spektrem organických a anorganických substrátů. Jedná se o glykoproteiny obsahující –jako kofaktor hem, vyskytující se v několika isoformách. Peroxidázy jsou zapojeny do celé řady fyziologických procesů. Mají podstatnou roli při obranné reakci proti patogenům a mohou tak přispět k rezistenci rostliny, např. pomocí hypersenzitivní reakce, zasítování polysacharidů, biosyntézou ligninu a suberinu (Sudisha *et al.* 2012).

Skupina PR-14 zahrnuje proteiny přenášející lipidy (*lipid-transfer protein*; LTP). LTP jsou rodinou proteinů, které se podílejí na přesunu lipidů mezi organelami. Jsou vylučovány také do extracelulárního prostoru, kde se zřejmě podílí na modifikacích v rámci buněčné stěny. LTP jsou polypeptidy o délce 90–95 aminokyselin. Mají globulární strukturu, která se skládá ze čtyř α helixů spojených pružnými smyčkami s hydrofobní dutinou, která může pojmout širokou škálu lipidů, což napomáhá při jejich přenosu (García-Olmedo *et al.* 1998).

2. Od obrany k masožravosti rostlin

Fenomén masožravosti je u rostlin nápadným příkladem evoluce a adaptability organismů, aby se vyrovnaly s náročnými podmínkami prostředí, jako je nedostatek živin. Masožravé rostliny (MR) našly řešení, jak v takovém prostředí získat přístup k dusíku, fosforečnanu a minerálům. Givnish a kolektiv autorů navrhli, že rostlina musí splňovat dva základní požadavky, aby mohla být považována za masožravou. Zaprvé musí být schopna absorbovat živiny z mrtvé kořisti a tím získat určité zvýšení kondice ve smyslu zrychlení procesu fotosyntézy vedoucí k intenzivnějšímu růstu, dále produkce pylu nebo tvorby semen. Zadruhé rostlina musí mít určitou adaptaci, jejímž primárním výsledkem je aktivní lákání, chytání a/nebo trávení kořisti. První požadavek je důležitý k odlišení masožravosti od obrany rostlin, která znehybňuje nebo zabíjí zvířecí nepřátele, aniž by to vedlo k podstatné absorpci živin. Druhý je nutný, protože mnoho rostlin může pasivně profitovat z přijímání některých živin z mrtvých zvířat rozkládajících se v půdě nebo na povrchu listů. Rostlina musí mít alespoň jednu adaptaci, aby byla kvalifikována za masožravou. Mnoho rodů MR některý z těchto důležitých znaků postrádá (Givnish *et al.* 1984; Pavlovič and Saganová 2015).

Nespornou adaptací MR k chytání a/nebo trávení kořisti je vytvoření si lapacích orgánů, které vznikly přímou vývojovou přeměnou listů. Patří mezi ně: lepkavý list neboli adhézní past rodů tučnice (*Pinguicula*), rosnatka (*Drosera*), rosnolist (*Drosophyllum*), byblida (*Byblis*); láčka neboli gravitační past rodů láčkovka (*Nepenthes*), láčkovice (*Cephalotus*), heliamfora (*Heliamphora*), darlingtonie (*Darlingtonia*), špirlice (*Sarracenia*); vrš neboli detektivní past špirlice papouščí (*Sarracenia psittacina*) a rodu genlisej (*Genlisea*); sací měchýřek neboli hypotenzní past rodu bublinatka (*Utricularia*); a svírací čepel neboli mechanická past rodů mucholapka (*Dionaea*) a aldrovandka (*Aldrovanda*). Tyto lapací orgány se dělí na aktivní a pasivní. Účinek sacích měchýřků a svírací čepel je jednoznačně založen na velmi rychlém pohybu. Mezi aktivní nebo též pohyblivé pasti se řadí také adhezivní pasti rodu rosnatka a některé druhy rodu tučnice, které sice lapají kořist stejně jako typicky pasivní pasti, později se ale jejich lepkavé listy dávají do velmi pomalého pohybu a zlepšují tak styk s kořistí, což umožňuje lepší trávení, ale má to význam i jako ochrana před ztrátou kořisti. Možnosti tohoto pohybu se ale u různých druhů těchto dvou rodů mohou lišit. Např. tučnice siná (*P. agnata*) má listy ploché a nepohyblivé, zatímco tučnice lusitánská (*P. lusitanica*) má listy se silně svinutými okraji. Rosnatka niťovitá (*D. filiformis*) může pohybovat pouze stopkatými žlázami na listu, kdežto rosnatka kapská (*D. capensis*) dokáže list přehnout přes kořist. Za zcela nepohyblivé jsou považovány pasti typu vrš, pasti všech rodů s láčkami a také lepkavé listy u byblid a rosnolistu (Studnička 1984; Ellison and Adamec 2018).

Lapací orgány neslouží jen k polapení kořisti a jejímu strávení, ale některé také splňují atribut lákání kořisti. K tomu zneužívají reflexů, které živočichům umožňují vyhledávat různé zdroje potravy a někdy i substráty pro kladení vajíček. Z tohoto důvodu lapací orgány MR napodobují svým vzhledem, barvou nebo vůní či pachem květy jiných rostlin (špirlice), plodnice hub (tučnice) nebo kvasící ovoce (láčkovky). Ačkoliv je vůně či zápach špirlic, láčkovek, tučnic, rosnatek a rosnolistu pro lidský čich sotva postřehnutelný, hmyz na ně reaguje velmi citlivě. Lákadlem je i nektar vylučovaný na povrchu lapacích orgánů láčkovek, špirlic, heliamfor, darlingtonie a mucholapky nebo třpytivé krůpěje na listech rosnatek, rosnolistu, tučnic a byblid. U rostlin, jejichž pasti jsou závislé na vodním prostředí, se předpokládá, že kořist je vábena vylučovaným slizem, který je tvořen ve speciálních žlázách lapacích orgánů bublinatky, genlisei a aldrovandky (Studnička 1984).

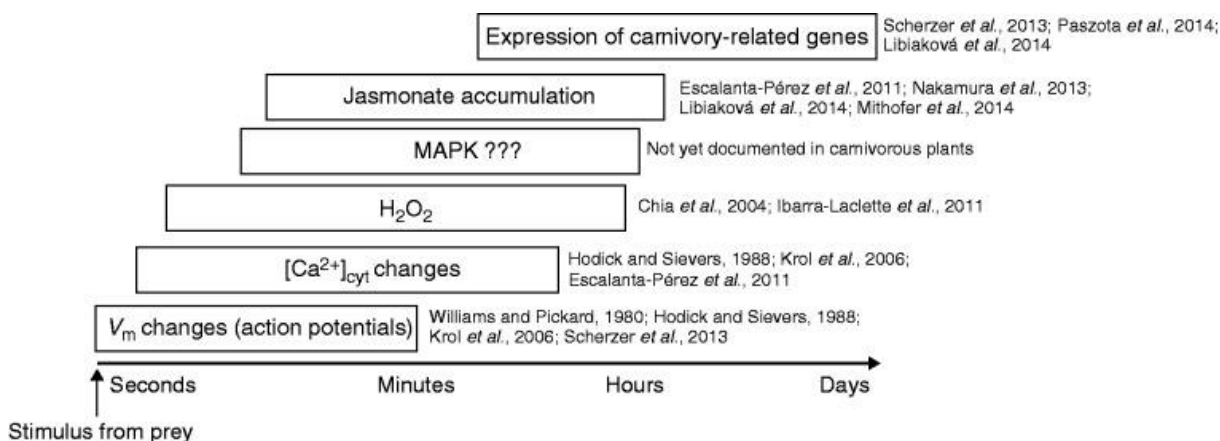
Většina taxonů MR patří do řádů hvozdíkotvaré (Caryophyllales), hluchavkotvaré (Lamiales) a vřesovcotvaré (Ericales); tři druhy pak spadají do řádu lipnicotvaré (Poales) a výjimečná je láčkovice australská (*C. follicularis*), která představuje jediný druh z monospecifické čeledi láčkovcovité (Cephalotaceae) a jediný masožravý druh z celého řádu šťavelotvaré (Oxalidales; (Ellison and Adamec 2018). Nedávno byla objevena zcela nová linie masožravých rostlin reprezentována rostlinou *Triantha occidentalis* spadající do řádu žabníkotvaré (Alismatales; Lin *et al.* 2021). Předpokládá se, že se v průběhu evoluce masožravost v těchto šesti různých řádech vyšších rostlin vyvinula nejméně jedenáctkrát zcela nezávisle na sobě, což představuje konvergentní vývoj (Ellison and Gotelli 2009; Givnish 2015). Konvergentní vývoj nebo též konvergentní/sbíhavá evoluce je proces, při němž se nepříbuzné druhy rostoucí ve vzdálených oblastech vyvíjejí pod podobnými selekčními tlaky, tj. v podobném prostředí a na základě toho dospějí k podobnému vzhledu nebo mají obdobné životní strategie (King *et al.* 2013). Jelikož je láčkovice z evolučního hlediska zcela izolována od všech ostatních MR, dokonce i od jiných láčkovek, udělalo to z ní ideálního kandidáta pro studium konvergentní evoluce masožravosti rostlin (Fukushima *et al.* 2017). Příklady konvergence na molekulární úrovni jsou velmi vzácné, pokud je nalezneme, zpravidla je pozorujeme jen mezi taxonomicky blízkými skupinami, najít konvergenci u vzdálených skupin je opravdovou raritou (Holicová 2015). Fukushima a kolektiv autorů (2017) provedli komplexní studii genomu a proteomu této láčkovice, která umožnila hluboký vhled do genetických změn souvisejících s masožravostí rostlin. Kromě mnoha dalších výsledků prokázali expanzi genů kódujících enzymy, které jsou spojovány s lákáním, chytáním a trávením hmyzu v láčce. Přítomnost a využití hydrolytických enzymů v trávicí tekutině, které jsou známé z láčkovky nebo mucholapky, odkazuje na ortologické vztahy mezi masožravými rostlinami navzdory jejich mnohočetnému původu. Skutečnost, že stejné základní principy

masožravosti byly identifikovány jak u láčkovice australské, fylogeneticky izolovaného druhu, tak i u jiných masožravých rostlin, silně podporuje hypotézu, že konvergentní evoluční strategie tvoří základ masožravosti a podporují její vznik v rostlinách. Pokud je však tato hypotéza správná, existují zjevná omezení pro rozvoj takového životního stylu. Z evolučního hlediska by měla být možná jakákoli cesta k tomuto konečnému bodu, ale převládající podmínky stanovují jistá omezení. MR žijí v chudých a stresujících prostředích, a to ovlivňuje ekonomiku této adaptace (Fukushima *et al.* 2017).

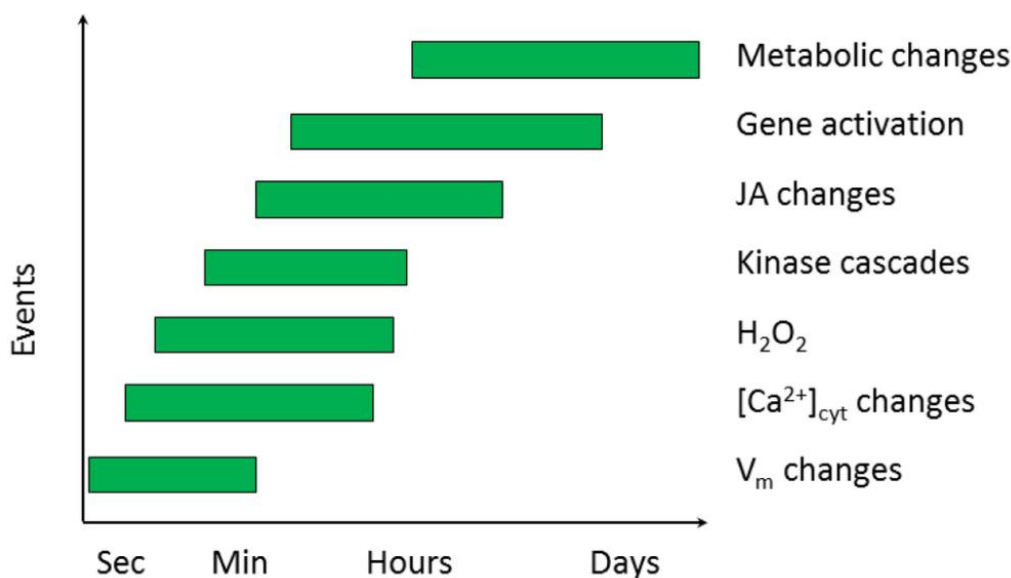
Vývoj nových funkcí může být nákladný, tak proč nepřizpůsobit ty stávající? Analýza proteinů trávicí tekutiny z láčkovice australské a tří dalších masožravých rostlin s nezávislým masožravým původem odhalila opakovanou exaptaci proteinových linií reagujících na stres spojené s konvergentními substitucemi aminokyselin k získání fyziologie trávení (Fukushima *et al.* 2017). Exaptace (ang. *Co-option*) je evoluční mechanismus, který usnadňuje vznik nových funkcí. Ve funkci znaku v průběhu působení evoluce dochází ke změně. Znak, který původně sloužil k jedné funkci, je časem využit na jinou – to může být případ nejen fenotypických znaků, ale i genů ovlivňujících chování. Klasickým příkladem je peří u ptáků, jehož původním účelem byla termoregulace, ale později bylo využito pro plachtění (Gould and Vrba 1982). Čím více se o masožravosti rostlin dozvídáme, tím více si uvědomujeme, že jejím evolučním pozadím je schopnost rostlin bránit se například proti býložravému hmyzu. Má se za to, že MR tedy exaptovali signální dráhu obranného mechanismu rostlin pro svůj účel – nikoliv k odpuzení, ale k přilákání, zabití a trávení živočišné kořisti¹.

Už na první pohled může někomu přijít, že některé struktury v MR jsou podobné strukturám, které jsou zapojené do konstitutivní přímé obrany běžných rostlin. Například žláznaté trichomy jsou často využívány jak k obraně rostlin, tak k trávení kořisti. V některých případech se dokonce hranice mezi obranou a masožravostí rostlin stírá. Někdy to vede dokonce i ke zmatku a tvrzením, že MR je mnohem více, což silně naznačuje příbuznost a společný původ (Chase Fls *et al.* 2009). Koncept, že botanická masožravost a obranné mechanismy spolu vzájemně souvisejí, je starý (Juniper *et al.* 1989), ale objev, že využívají stejnou signální dráhu, je relativně nový. Na **Obr. 7** je uvedena pravděpodobná časová hierarchie událostí, které byly detekovány u masožravých rostlin s aktivním lapacím mechanismem kromě bublinatky. Na **Obr. 8** je poté pro srovnání ukázána sekvence po sobě jdoucích událostí detekovatelných po poškození běžných rostlin hmyzem.

¹ V průběhu sepsování této disertace autorka již věděla, že toto tvrzení je zcela platné pouze pro řád hvozdíkotvaré, nicméně se snaží zachytit dobu a myšlení před publikováním jejich vlastních článků. Pár odkazů na přiložené publikace se ale může vyskytnout.



Obr. 7: Pravděpodobná časovaná hierarchie po sobě jdoucích událostí detekovatelných u masožravých rostlin s aktivním lapacím mechanismem (vyjímáje bublinatku) v reakci na zachycení kořisti, která je převzatá z obranných mechanismů rostlin (Maffei *et al.* 2007). Nejčasnějšími měřitelnými událostmi jsou akční potenciály generované mechanickými podněty (Williams and Pickard 1980; Hodick and Sievers 1988; Krol *et al.* 2006; Escalante-Perez *et al.* 2011) nebo chemickými podněty z kořisti (Scherzer *et al.* 2013), které iniciují zvýšení koncentrace vápníku v cytosolu (Escalante-Perez *et al.* 2011) a tvorbu H₂O₂ (Chia *et al.* 2004; Ibarra-Laclette *et al.* 2011). Ca²⁺ v cytosolu je pravděpodobně snímán vazbou na kalmodulin (CaM) nebo jiný protein vnímající vápník, který může interagovat s mitogenem aktivovanými protein kinázami (MAPK); tato část signální dráhy nebyla dosud u masožravých rostlin zdokumentována. MAPKs regulují biosyntézu jasmonátů, které spouštějí expresi genů souvisejících s masožravostí (Scherzer *et al.* 2013; Nakamura *et al.* 2013; Libiaková *et al.* 2014; Paszota *et al.* 2014; Mithöfer *et al.* 2014). Převzato z Pavlovič and Saganová (2015).



Obr. 8: Časovaná hierarchie po sobě jdoucích událostí detekovatelných v rostlinných tkáních, které jsou iniciovány útokem herbivora. Nejčasnějšími měřitelnými událostmi jsou změny potenciálu na plazmatické membráně (V_m), bezprostředně následované změnami v intracelulární koncentraci Ca²⁺ a tvorbou H₂O₂. Během několika minut jsou detekovatelné kinázy a fytohormony kyselina jasmonová (JA) a salicylová (SA). Aktivace genů a následné metabolické změny jsou nejdříve patrné asi po 1 hodině. (Převzato z Maffei *et al.* 2007).

2.1. Elektrické signály v masožravých rostlinách

Stejně jako citlivka stydlivá (*Mimosa pudica*) velice rychle sklápí své listy, aby je schovala před býložravci, některé aktivní pasti se velmi rychle zavírají, aby chytily svou kořist. Masožravé rostliny s aktivním lapacím mechanismem musí být nějakým způsobem na kořist upozorněny, aby zahájily svůj pohyb. K rychlému uzavření, ale také k regulaci aktivit trávicích enzymů v reakci na zachycení kořisti vyžadují MR vnímající a komunikační prvky, a to již bez ohledu na pohyblivost pastí. Některé MR k tomu využívají elektrické signály, konkrétně AP.

Mucholapka podivná (*D. muscipula*) je jediným druhem svého rodu, spadajícím do čeledi rosnatkovité. Na vnitřní straně ledvinovitých laloků velmi důmyslné pasti vyčnívají z pokožky citlivé výčnělky. Obvykle bývají tři, ale může se jich vyskytnout i více. Tyto mechanosenzorické orgány představují místo vnímání signálu. Po jejich doteku mucholapka aktivuje mechanosenzitivní iontové kanály a generují receptorový potenciál, který přechází v AP. Elektrická signalizace, která je spojována s uzavřením pasti a také zvýšenou spotřebou energie na trávení kořisti, má za následek snížení rychlosti fotosyntézy a zvýšení mitochondriálního dýchání (Pavlovič *et al.* 2010, 2014; Kruse *et al.* 2014; Pavlovič and Saganová 2015). Aby byl přínos ve formě zvýšení fotosyntézy díky absorpci živin z chycené kořisti optimalizován a byly tak sníženy náklady na tento proces, mucholapka si vyvinula několik kontrolních mechanismů. Zaprvé, při pokojové teplotě jsou zapotřebí minimálně dva doteky spouštěcích výčnělků, tedy generování dvou AP, k uzavření pasti (Brown 1916). Jeden dotek rovný jednomu AP k uzavření pasti za běžných podmínek nestačí, čímž mucholapka předchází nechtěnému uzavření v případě dopadu nějakého neživého předmětu (kapka deště, semena nebo listy stromů apod.). Za vyšší teploty nebo při vyvinutí silného tlaku na spouštěcí výčnělek však stačí i jeden dotek (Burri *et al.* 2020). Druhým kontrolním mechanismem je možnost úniku příliš malé kořisti, a to díky mezerám mezi špičatými výčnělky na obvodu pasti. To šetří energii, protože malá kořist by neposkytla takové množství živin, které by vykompenzovaly náklady spojené se zadržením kořisti a jejím trávením. Pokud se kořisti podaří rychle uniknout, past do několika hodin znovu otevře, protože postrádá dostatek stimulů na produkci trávicích enzymů (Libiaková *et al.* 2014). Pokud kořist zůstane v kořisti, svým pohybem a dotykem spouštěcích výčnělků vyvolává až stovky dalších akčních potenciálů, což vede k fyziologické odpovědi.

Sto let po objevu AP u mucholapky bylo objeveno, že AP mohou také za ohybovou reakci tentakul rosnatky, kde ohýbání tentakul je úměrné počtu spuštěných AP (Williams and Pickard 1972). Elektrickými signály rosnatky kapské (*Drosera capensis*) se podrobně zabýval Krausko a kolektiv autorů (2017). Mechanický stimul ve formě položení drobných

polystyrenových kuliček na past spustil receptorový potenciál a sérii APs. Vlastnosti a sekvence APs byly velmi podobné těm, které zpozorovali Williams and Spanswick (1976) v rosnatce okrouhlolisté (*D. rotundifolia*) a rosnatce prostřední (*D. intermedia*). Williams and Pickard (1972, 1980) zjistili, že AP začíná těsně pod hlavičkou tentakuly a je šířen pouze do její báze, nešíří se ale do čepele pasti. Podle těchto studií se tedy každá tentakula chová individuálně a nezávisle na sousedních tentakulách. Otázkou bylo, jak vysvětlit skutečnost, že se sousední tentakuly, které nejsou v přímém kontaktu s kořistí, časem pomalu ohýbají k místu, kde je zadržen hmyz. Krausko a kolektiv ukázali, že zároveň se zpožděným pohybem okrajových tentakul ke středu listu, začíná rychlá oscilace membránového potenciálu na spodní straně pasti. Ohýbání okrajových chapadel, které nejsou v kontaktu s kořistí, tedy není spuštěn AP, ale oscilací membránového potenciálu a také jasmonáty, které se v této chvíli začínají hromadit v pletivu pasti (Nakamura *et al.* 2013; Krausko *et al.* 2017). Tyto oscilace jsou pravděpodobně stupňovanými potenciály (*graded potentials*), které byly zaznamenány ve spodní části listu mucholapky podivné v důsledku vyvolání AP v pasti (horní části). Stupňovaný potenciál je vlna elektrické excitace, která se objevuje jako výsledek krátkodobé depolarizace nebo hyperpolarizace nějaké oblasti plasmatické membrány a zmenšuje se vzdáleností (Volkov *et al.* 2007). Jak je informace o ulovené kořisti převedena do fyziologické odpovědi (tj. zahájení trávicích procesů), zůstalo záhadou další téměř půldruhé století od objevu AP u rosnatky a souvisí právě s hromaděním rostlinných hormonů jasmonátů v pletivu pasti, o čemž se píše více v kapitole 2.4.

Aldrovandka měchýřkatá (*Aldrovanda vesiculosa*) je jediným zástupcem botanického rodu aldrovandka z čeledi rosnatkovité (Droseraceae). Má 3–6 mm velkou svírací čepel, která připomíná past blízce příbuzné mucholapky: skládá se ze dvou konvexních laloků, které jsou připojeny ke střednímu žeburu. Dvacet až čtyřicet spouštěcích výčnělků je soustředěno podél středního žebra a podél hranice uzavíratelné plochy každé pasti (Lloyd 1942; Cross 2012). Po mechanickém podráždění jsou generovány AP. Past se pak uzavře během 14–50 ms (Iijima and Sibaoka 1981, 1982). Charakteristiky klidového, receptorového a akčního potenciálu a vzory přenosu signálu jsou podobné těm v mucholapce (Juniper *et al.* 1989; Sibaoka 1991). Elektrické a chemické podněty také vedou k uzavření pasti (Ashida 1935). Protože aldrovandka generuje AP v reakci na mechanickou stimulaci, následná sekvence signalizačních událostí je pravděpodobně také podobná a zahrnuje akumulaci JAs indukovanou Ca^{2+} .

Pohyblivé pasti mají také vodní druhy bublinatek. Jejich sací měchýřky jsou 1–6 mm velké, diskovité duté měchýřky s pružnými bočními stěnami a obsahují citlivá pohyblivá dvířka, hermeticky uzavírající past. Nepřetržitě odčerpávání vody z pasti udržuje uvnitř pasti podtlak, který je hnací silou pro chycení kořisti (Poppinga *et al.* 2016, 2018; Adamec 2018).

Když se kořist (typicky malí korýši) dotkne jednoho ze spouštěcích chloupků uvnitř pasti bublinatky, také se spustí její ultrarychlé sklapnutí. Tento pohyb je nejrychlejší v rostlinné říši. Dosud není zcela jasné, zda je základní proces tohoto pohybu čistě mechanický, nebo zda je zapojena elektrická signalizace stejně jako v mucholapce, aldrovandce a rosnatce. Dosavadní výsledky ale zatím nasvědčují tomu, že elektrická signalizace v této rostlině není využívána. Např. Masi *et al.* (2016) měřili pomocí multielektrodového systému elektrické odezvy v buňkách pasti bublinatky (*Utricularia reflexa*), ale neprokázali přenos signálu. Pokusy o sklapnutí pastí bublinatky elektricky nebyly úspěšné (Sydenham and Findlay 1973), a působením nízké teploty či blokátorů iontových kanálů neovlivnilo spuštění, což odkazuje na čistě mechanický spouštěcí mechanismus (Adamec 2014).

V láčkách nebyly dosud naměřeny žádné elektrické signály (Saganová *et al.* 2018).

2.2. Ca^{2+} v masožravých rostlinách

Vápníková signalizace byla dosud nejvíce zkoumána u mucholapky. Jak bylo napsáno v předchozí kapitole, mucholapka velmi rychle sklapne past, aby chytila kořist. Tento pohyb vyžaduje obvykle dva úspěšné mechanické stimuly spouštěcího výčnělku uvnitř pasti v intervalu přibližně 30 vteřin. Mechanická stimulace vyvolává APs, které se šíří do obou laloků pasti (Sibaoka 1966). Předpokládá se, že neznámý biologický systém v mucholapce si zapamatuje první podnět a přenesení signál z citlivého výčnělku uvnitř pasti na čepel listu (Juniper *et al.* 1989). Báze spouštěcích výčnělků mucholapky obsahuje bohatě vyvinuté membrány endoplazmatického retikula, sloužící jako zásobárna Ca^{2+} . Studie, které publikoval Hodick a Sievers (1988, 1989) ukázaly, že uzavírání pastí je blokováno inhibitory Ca^{2+} kanálů, které by měly inhibovat zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ v buňkách, což zdůrazňuje význam Ca^{2+} při této reakci. Na základě těchto výsledků byl navržen následující mechanismus paměti mucholapky (Hodick and Sievers 1988; Hedrich and Neher 2018): 1) $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ se zvyšuje během excitace; 2) $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ nebo koncentrace některých Ca^{2+} -aktivovaných regulačních molekul musí dosáhnout určitého prahu, aby byl zahájen pohyb; 3) jediný akční potenciál nestačí ke zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ na prahovou hodnotu a ke spuštění pohybu jsou nutné alespoň dva akční potenciály; 4) $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ klesá po prvním stimulu a po 30 vteřinách nedosáhne prahu ani při druhém stimulu. Tato hypotéza ale nebyla dlouho přímo testována, protože chyběla metoda časoprostorového monitorování vápníku. To se ale změnilo v roce 2020. Týmu profesora Mitsuyasu Hasebe se podařila úspěšná transformace mucholapky exprimující senzor Ca^{2+} pro sledování jeho dynamiky. První mechanický stimul spouštěcího výčnělku způsobil zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ začínající ve výčnělku a šířící se do čepele pasti. Druhý stimul zvýšil $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ na ještě vyšší úroveň a dosáhl prahu, který koreluje s uzavřením listové čepele. Protože $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ se po prvním

stimulu postupně snižovala, zvýšení $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$, které bylo vyvoláno druhým stimulem po více než 30 sekundách, bylo nedostatečné k dosažení domnělého prahu pro pohyb. Vlna Ca^{2+} spouštěná mechanickou stimulací se pohybovala o řád rychleji než vlna vyvolaná poraněním řapíků huseníčku (Suda *et al.* 2020).

Pravděpodobné zapojení Ca^{2+} do aktivace jasmonátové signální dráhy u láčkovky baňaté (*Nepenthes alata*) popsal nedávno (Vadassery *et al.* 2019). Přišel na to pomocí neomycinu, což je aminoglykosidové antibiotikum, které blokuje uvolňování Ca^{2+} z extracelulárních zdrojů. Bylo známo, že u huseníčku neomycin ovlivnil akumulaci $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ i JA-Ile a také expresi genů odpovídajících na JA-Ile (*vsp2* a *lox2*), pokud byly rostliny ošetřeny ústním sekretem z býložravých larev (*Spodoptera littoralis*; Vadassery *et al.* 2014). V publikaci Vadassery *et al.* (2019) byla měřena proteolytická aktivita nepenthesinu, která jak je známo, je regulována JA a to za přítomnosti nebo nepřítomnosti neomycinu. Neomycin významně snížil proteázovou aktivitu, z čehož lze odvodit zablokování uvolnění Ca^{2+} důležitých pro následnou vápníkovou signalizaci.

2.3. Reaktivní formy kyslíku v masožravých rostlinách

Role ROS při vyvolání masožravé reakce nebyla dosud podrobně studována, nicméně pár autorů se jí zabývalo. Záhy po chycení kořisti chycení kořisti trávicí žlázy MR začínají vylučovat různé deriváty naftochinonu, jako je plumbagin a droseron. Naftochinon je sekundární metabolit v přírodě se vyskytující v rámci různých čeledí rostlin. Naftochinony jsou popsány zejména jako antimikrobiální metabolity, proto je zajímavé, že byly nalezeny také v trávicí tekutině láčkovek, např. droseron (5-*O*-metyl-droseron) v láčkovce khasijské (*N. khasiana*; Eilenberg *et al.* 2010) a plumbagin (7-metyl-juglon) v láčkovce břichaté (*N. ventricosa*; Buch *et al.* 2013). Tyto sekundární metabolity přicházejí do styku s elektrontransportními flavinovými enzymy zahrnující NAD(P)H-dehydrogenázy nebo oxidázy (diaforázy) na buněčné stěně kořisti a vytvářejí tak ROS předurčující kořist pro proteolytickou degradaci (Galek *et al.* 1990; Chia *et al.* 2004; Eilenberg *et al.* 2010). Koncentrace naftochinonů v trávicí tekutině láčkovky byla indukována chitinem (Eilenberg *et al.* 2010). Do tohoto procesu jsou zapojeny pravděpodobně taky peroxidázy, které jsou mezi enzymy detekovanými v trávicí tekutině mucholapky (Schulze *et al.* 2012) a dalších láčkovkách (Rottloff *et al.* 2016; Lee *et al.* 2016). Aby bylo zabráněno škodlivým účinkům oxidace, pasti aktivně odstraňují produkty oxidace pomocí speciálních mechanismů. Případné apoptóze vyvolané ROS předcházejí syntézou inhibitorů programované buněčné smrti (Bemm *et al.* 2016). Přesná role ROS v dráze přenosu signálu a/nebo trávení je u masožravých rostlin ale nejasná a zaslouží si další pozornost.

2.4. Jasmonáty a další rostlinné hormony v masožravých rostlinách

Fytohormony kontrolují všechny aspekty růstu a vývoje rostlin, takže se předpokládalo, že mají funkci také při masožravosti rostlin, kde je trávicí proces také indukovatelný. Např. o rosnatce kapské se vědělo, že rychlá reakce tentakul (během 10-30 s), které jsou v přímém kontaktu s kořistí, je spojena s akčními potenciály. U pomalé reakce ostatních tentakul, které nejsou v přímém kontaktu s kořistí, a začíná až několik hodin po stimulaci, se účast elektrických signálů neprokázala. S pomalou reakcí tentakul začíná i více či méně silné ohnutí celé listové čepele, která pak obepíná kořist. Předpokládalo se tedy, že excitační podnět je přenášen rostlinnými hormony, které způsobí tento pomalý pohyb tentakul i ohyb listové čepele. (Williams and Spanswick 1976; Williams and Pickard 1980). O hormonech podílejících se na regulaci tohoto typu pohybu však nebylo nic známo, a proto za účelem získání určitého náhledu na tento regulační proces a účast hormonů na něm, aplikovali (Bopp and Weber 1981) na list rosnatky kapské kyselinu indol-3-octovou (*indol-3-acetic acid*; IAA) a různé sloučeniny, které jsou vůči IAA antagonistické jako kyselinu abscisovou (*abscisic acid*; ABA) a kyselinu 2,3,5-trijodobenzoovou (*triodobenzoic acid*; TIBA). Aplikace IAA buď na kořist, nebo na špičku listu, zesílila ohybovou reakci. TIBA inhibovala ohyb reverzibilně a ABA ireverzibilně. Aplikace TIBA mezi kořist a špičku listu snižovala ohybovou reakci. Aplikace TIBA na bazální část listu ale neměla žádný účinek. Z těchto výsledků došli autoři k závěru, že ohyb je důsledkem vnitřního proudu auxinu od špičky listu do bodu ohybu, vyvolaného kořistí (Bopp and Weber 1981). Později se ale ukázalo, že auxin není zodpovědný za zahájení trávení kořisti, ale je spíše důsledkem ohybu listu (Nakamura *et al.* 2013). Roli auxinu v ohybové reakci pasti rosnatky nedávno oživil La Porta *et al.* (2019). Jelikož však účinek nastává až po několika hodinách, jedná se spíše o důsledek než příčinu ohybové reakce.

Cesta za objevením sloučeniny, která by byla zodpovědná za aktivaci pastí a spuštění trávicích procesů ani po dalších třiceti letech nebyla úplně jednoduchá. Svým způsobem přispěl Ueda a kolektiv autorů (2010), kteří hledali nějaký bioaktivní metabolit, který by byl postupně akumulován v pasti mucholapky v reakci na stimuly, a mohl by být zodpovědný za její uzavření. Tuto neznámou molekulu pojmenovali jako faktor uzavírající past (*trap-closing factor*). Nejprve byl proveden biotest, kdy byly jednotlivé listy s pastí ustřiženy a vloženy do nádoby s roztokem vzorků různých sloučenin. Roztok se nechal absorbovat do listů transpirací a bylo sledování chování pastí. Roztok vzorku, který způsobil uzavření více než polovinu všech pastí bez jakéhokoliv podnětu během 96 hodin, byl považován za biologicky aktivní. Nicméně pomocí tohoto biologického testu bylo testováno také šest rostlinných hormonů: IAA, giberelin, cytokinin, brassinolid, ABA a JA. Žádný z nich však nezpůsobil uzavření pasti při

fyziologických koncentracích, z čehož autoři odvodili, že uzavření pasti není regulováno rostlinnými hormony. Přesto se zde objevil první náznak, že se JA účastní masožravé reakce. Derivát kyseliny jasmonové, 7-*iso*-JA-Ile byl slabě účinný, nicméně koronatin, molekulární napodobenina 7-*iso*-JA-Ile byl velmi účinný – způsobil uzavření pasti při koncentraci pouhých 0,03 μM . V uzavřené pasti byl také identifikován jasmonátový derivát β -D-glukopyranosyl 12-hydroxyjasmonové kyseliny, jehož 7-*iso* forma byla aktivní již při 3 μM . Tento objev poskytl základ pro další zkoumání tohoto fenoménu a umožnil navrhnout vhodné molekulární nástroje k objasnění dalších podrobností fyziologického mechanismu zavírání pasti (Ueda *et al.* 2010).

O rok později studie profesora Rainera Hedricha a jeho týmu ukázala, že mucholapka při trávení kořisti akumuluje OPDA, a autoři předpokládali, JA-nezávislou a OPDA-závislou regulaci trávících procesů podobnou popínavé rostlině *Bryonia dioica* (Escalante-Perez *et al.* 2011). Avšak aplikace molekulární napodobeniny JA-Ile, koronatinu byla účinná pro aktivaci trávících žláz mucholapky. Kromě koronatinu, byla spuštěna sekrece trávících enzymů, a to i bez předcházející mechanické stimulace, také po přímé aplikaci OPDA a metylesteru kyseliny jasmonové do pasti. Tato sekrece enzymů byla doprovázena pomalým uzavíráním pastí. Co je zajímavé, dle autorů jsou jasmonáty aktivní také systémově, protože aplikace jasmonátů do jedné pasti vyvolalo sekreci a pomalé uzavírání také v ostatních pastech, nejen v té do které byla látka aplikována. Autoři také uvádí, že chycení kořisti mucholapkou je kromě jasmonátů modulováno také ABA. Rostliny, které byly vystaveny stresu z nedostatku vody, stejně jako ty, které byly posprejovány 50 μM ABA, byly méně citlivé na mechanické podráždění. Nicméně ABA neovlivnila žlázovou aktivitu vyvolanou aplikací OPDA. Tyto objevy demonstrují, že mucholapka kombinuje speciální signální dráhy. Vypadá to, že signály pro pohyb pasti a sekreci enzymu vyžadují podobné signální dráhy (Escalante-Perez *et al.* 2011).

K výraznému pokroku při identifikaci látky zapojující se do trávícího procesu došlo s vyvinutím lepších metod pro identifikaci rostlinných hormonů z malého množství rostlinného vzorku založených na kapalinové chromatografii ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. U nás se o to zasloužila hlavně Kristýna Floková a Ondřej Novák z Laboratoře růstových regulátorů v Olomouci – podle jejich postupu v publikaci Floková *et al.* (2014) byly zpracovány naše vzorky masožravých rostlin. Oba jsou spoluautory článků, kde bylo zjištěno zvýšení endogenních koncentrací JA a JA-Ile v aktivovaných pastech mucholapky (Libiaková *et al.* 2014; Pavlovič *et al.* 2017) a rosnatky (Krausko *et al.* 2017). V publikaci Pavlovič *et al.* (2017) je dokumentováno, že by přirozená endogenní akumulace JA kořistí vyvolala systémovou reakci, tedy uzavření a aktivaci trávení také v ostatních systémových pastí (Pavlovič *et al.* 2017). Dalším průkopníkem v této oblasti je Michael Reichelt z Max Planck Institutu v německé Jeně, kde jsem byla na stáži. Díky němu byly zjištěno zvýšení endogenních

koncentrací JA a JA-Ile také v rosnatce (Nakamura *et al.* 2013; Mithöfer *et al.* 2014) a láčkovce (Yilamujiang *et al.* 2016). V publikaci Mithöfer *et al.* (2014) byly zvýšené hladiny těchto hormonů analyzovány po různých stimulech. V pastech, které trávily kořist, byly detekovány výrazně zvýšené hladiny JA i JA-Ile. Poranění pletiva pasti vyvolalo zvýšení JA, které bylo srovnatelné se zvýšením po podání kořisti, ale jen nízkou hladinu JA-Ile. Po kombinaci poranění a aplikaci ústního sekretu hmyzu vzrostla koncentrace obou fytohormonů rapidně. Pouze podání kořisti nebo kombinace poranění a aplikace ústního sekretu hmyzu, nikoliv však poranění samotné, vyvolala ohybovou reakci rosnatky. Jasmonáty jsou tedy zapojeny jak do masožravosti, tak stále i do obranné reakce masožravých rostlin vůči poškození (Mithöfer *et al.* 2014) a rostlina mezi nimi nedokáže vždy účinně rozlišit (Krausko *et al.* 2017). Exogenní aplikace JA a JA-Ile (případně koronatinu) byla účinná i při iniciaci sekrece enzymů (Libiaková *et al.* 2014; Bemm *et al.* 2016; Böhm, Scherzer, Krol, *et al.* 2016; Krausko *et al.* 2017; Pavlovič *et al.* 2017). Všechny tyto výsledky ukázaly, že JA-Ile sám o sobě je zodpovědný za zahájení trávení. Transkripční aktivace genů kódujících enzymy odpovědné za biosyntézu JA-Ile byla dokumentována v pasti mucholapky po stimulaci kořistí, včetně syntetázy JAR1 zodpovědné za konjugaci Ile na JA (Bemm *et al.* 2016). Také účast JA-Ile ligandu COI1 a jeho interakce s JAZ represorem byla nepřímo potvrzena použitím inhibitoru koronatin-O-methyloximu, který zabraňuje interakci COI1-JAZ u mucholapky (Bemm *et al.* 2016; Böhm, Scherzer, Krol, *et al.* 2016), čímž autoři vyvrátili svou původní hypotézu: JA-nezávislou a OPDA-závislou regulaci trávicích procesů v mucholapce.

Existuje také několik důkazů, že stresový hormon kyselina salicylová (SA), který je často v antagonistickém vztahu k JA (Mur *et al.* 2006), se nepodílí na procesech iniciace trávení, alespoň u rodů rosnatka a láčkovka (Matušíková *et al.* 2005; Buch *et al.* 2015; Krausko *et al.* 2017). Krausko a kolektiv autorů, kteří potvrdili blízký vztah mezi obsahem jasmonátů a enzymovou aktivitou u rosnatky kapské, zkoumali také možnou interakci JA s SA a ABA. Ani SA ani ABA nebyly schopné vyvolat zvýšenou aktivitu zkoumaných enzymů. Nicméně ABA nezměnila aktivitu enzymů vyvolanou JA, zatímco SA ji snížila (s výjimkou fosfodiesterové aktivity), ačkoli ne až na základní hladinu. Tato částečná inhibice byla ale pravděpodobně způsobena reakcí, která je podobná hypersenzitivní reakci, protože listy, na které byla aplikována kombinace JA a SA do 48 hodin seschly. Nová publikace (Wan Zakaria *et al.* 2019) uvádí, že ABA by mohla být zapojena do regulace trávicích tekutin v láčkovce. Jak tyto fytohormony interagují s jasmonátovou signální drahou čeká na další zkoumání.

2.5. Enzymy v masožravých rostlinách

Aby byly masožravé rostliny schopné natrávit kořist a čerpat z ní živiny, musí disponovat trávicími enzymy. Na to, jakým způsobem masožravé rostliny kořist tráví, se snažil přijít už Charles Darwin Darwin (1875) a mnozí další vědci jeho práci byli inspirováni. Tvorba trávicích enzymů je pro rostliny ale nákladná. Jedním z prostředků, kterými by mohly zlepšit poměr nákladů a přínosů masožravosti je to, aby byly hydrolytické enzymy indukovány pouze v reakci na přítomnost kořisti. Taková regulace vyžaduje, aby rostliny byly schopny vnímat signály spojené s kořistí a tyto informace převést na indukci exprese hydroláz (Gallie and Chang 1997).

Masožravé rostliny s aktivními lapacími mechanismy (např. mucholapka a rosnatka) definitivně spoléhají na mechanickou stimulaci kořisti, která indukuje elektrické signály, a ty spouští syntézu trávicích enzymů (Bemm *et al.* 2016; Böhm, Scherzer, Krol, *et al.* 2016; Krausko *et al.* 2017; Pavlovič *et al.* 2017). Později, když boj s kořistí ustane, chemické podněty uvězněné kořisti udrží trávicí proces v chodu několik dní (Pavlovič *et al.* 2014; Krausko *et al.* 2017). Ne všechny druhy MR ale disponují aktivními pastmi a trávicí enzymy se zde mohou vyskytovat i v nepřítomnosti kořisti. Zdá se, že láčkovky disponují autoregulačním mechanismem, kterým si udržují určitou hladinu trávicích enzymů i bez podnětů z kořisti (Goh *et al.* 2020; Ravee *et al.* 2021). Po desetiletí však nebylo jasné, zda i takové MR mohou aktivovat enzymovou aktivitu v přítomnosti kořisti. V láčkách nebyly dosud zjištěny žádné akční potenciály (Saganová *et al.* 2018). Zda je i zde exprese hydrolytických enzymů potřebných pro trávení regulována v reakci na přítomnost kořisti bylo nejprve zkoumáno na špirlici nachové (*Sarracenia purpurea*). Špirlice nevykazovala žádnou indukci sekrece enzymů v reakci na mechanickou stimulaci, ale zvýšení aktivity proteázy, RNázy, nukleázy a fosfatázy bylo indukováno v tekutině neaktivních pastí přidáním nukleových kyselin, proteinu nebo redukovaného dusíku, což naznačuje, že exprese hydroláz je indukována po vnímání příslušného chemického signálu (Gallie and Chang 1997). To, že láčkovky se musí spoléhat pouze na chemické podněty pocházející z chycené kořisti, potvrzují i pozdější studie Yilamujiang *et al.* (2016) a Saganová *et al.* (2018). U láčkovek se vědci dlouho dohadovali, zdali je trávení prováděno za pomoci bakterií nebo tyto rostliny disponují svými vlastními enzymy. Dnes víme, že oba způsoby pravděpodobně přispívají k rozložení kořisti (Takeuchi *et al.* 2011).

Nedávné studie ukázaly, že všechny studované rody masožravých rostlin v rámci řádu hvozdíkotvaré bez ohledu na lapací mechanismy (adhezivní pasti rosnatky, svírací čepel mucholapky, láčky láčkovek) akumulovaly JA a JA-Ile v reakci na experimentální krmení

a regulovaly aktivitu trávicích enzymů. Jak již bylo zmíněno výše, role endogenních JAs v regulaci botanické masožravosti byla u těchto druhů potvrzena i exogenní aplikací JA nebo koronatinu (Nakamura *et al.* 2013; Libiaková *et al.* 2014; Mithöfer *et al.* 2014; Buch *et al.* 2015; Böhm, Scherzer, Krol, *et al.* 2016; Böhm, Scherzer, Shabala, *et al.* 2016; Yilamujiang *et al.* 2016; Krausko *et al.* 2017; Pavlovič *et al.* 2017; Jakšová *et al.* 2020).

Mnoho raných studií se při charakterizaci enzymů v trávicí tekutině spoléhalo pouze specifické měření enzymových aktivit. Nové genomické přístupy, moderní proteomické analýzy, pokrok v rekombinantních technologiích a také čištění proteinů urychlily identifikaci a charakterizaci enzymů v MR. Poprvé byly vyčištěny a prozkoumány enzymatické a strukturální vlastnosti dvou kyselých proteáz endogenního původu (nepenthesins I and II) v láčkovce (*Nepenthes distillatoria*; Athauda *et al.* 2004). Tuto přelomovou studii následovaly práce Matušíková *et al.* (2005) a Eilenberg *et al.* (2006), kteří našli chitinasu typu I v trávicích tekutinách rosnatky okrouhlolisté a láčkovky khasijské. Hatano a Hamada (2008) provedli proteomickou analýzu trávicí tekutiny láčkovky baňaté (*N. alata*) pomocí štěpení v gelu trypsinem, *de novo* sestavování peptidů a vyhledávání homologií pomocí veřejných databází, ve které byly identifikovány sekretované chitinázy, glukánázy, xylosidázy a protein podobný thaumatinu. Později byly stejnými autory identifikovány také peroxidázy. Některé z enzymů se podařilo naklonovat a blíže charakterizovat, např. chitinázy III a IV (Rottloff *et al.* 2011; Ishisaki, Honda, *et al.* 2012; Ishisaki, Arai, *et al.* 2012). Nedávno byl u dalších láčkovek (*N. ampullaria*, *N. rafflesiana*, *N. × hookeriana* a *N. × ventrata*) využit transkriptomický přístup (Wan Zakaria *et al.* 2016; Zulkapli *et al.* 2017), který může dobře posloužit jako referenční sekvence pro identifikaci dalších trávicích enzymů prostřednictvím proteomické analýzy (Wan Zakaria *et al.* 2018). Tento přístup založený na transkriptomice zvolili (Schulze *et al.* 2012) k určení proteinů vysoce exprimovaných v trávicí tekutině mucholapky. Objevili koordinovaný mechanismus trávení kořisti usnadněný různými enzymy. Trávicí tekutina obsahovala nukleázy, chitinázy, fosfolipázy, fosfatázy, peroxidázy, glukánázy a proteolytické enzymy zahrnující cystein proteázu, dvě aspartát proteázy a serin karboxypeptidázu.

Některé z těchto proteinů jsou silně strukturálně i funkčně homologní se skupinou běžných enzymů obrany rostlin, které se podílejí na reakci při patogenezí, tedy PRp. V minulém desetiletí byly identifikovány různé PRp v proteomu trávicí tekutiny láčkovek a transkriptomu mucholapek a získané z genomu také dalších masožravých hvozdíkotvarých (Caryophyllales; (Hatano and Hamada 2008, 2012; Schulze *et al.* 2012; Renner and Specht 2012; Bemm *et al.* 2016; Butts *et al.* 2016). Mezi PRp objevenými v MR patří proteázy, chitinázy, proteiny podobné osmotinu, proteiny odvozené od patogenezí, proteiny přenášející lipidy, peroxidázy a β -1,3-glukanáza. Proteiny v trávicích tekutinách MR byly dále zkoumány, aby se zjistilo,

jakou roli hraje exaptace v jejich funkční diverzifikaci. Aby bylo možné přejít z obrany na masožravost, bylo mnoho proteinů/trávicích enzymů modifikováno, což bylo pravděpodobně řízeno selektivními tlaky přicházejícími z prostředí trávicí tekutiny. Molekulárně evoluční studie odhalily, že mnoho genů původně zapojených do odpovědi na patogenezu u předků nemasožravých rostlin se během evoluce masožravosti duplikovalo a diverzifikovalo (Eilenberg *et al.* 2006; Renner and Specht 2012). K získání fyziologie trávení bylo využito proteinových linií odvozených od patogenezu spojené s konvergentními substitucemi aminokyselin u nepříbuzných vývojových linií MR (Renner and Specht 2012; Arai *et al.* 2015; Fukushima *et al.* 2017).

3. Metodika

Tato kapitola je zaměřena na principy experimentálních technik, které byly použity pro dosažení cílů této disertační práce. Nicméně konkrétní podrobnosti jsou uvedeny v odpovídajících publikacích.

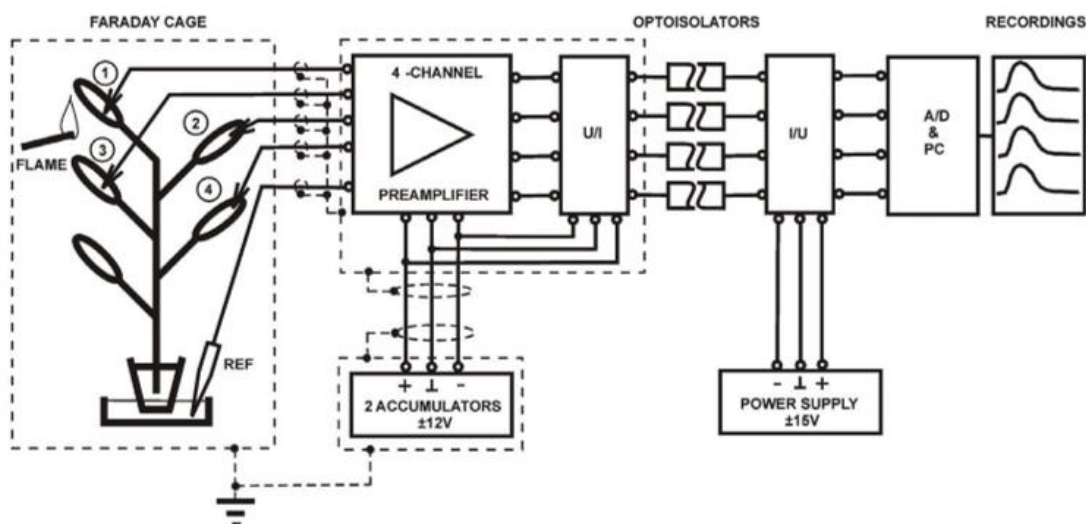
3.1. Měření elektrických signálů v rostlinách

Pojem elektrické signály je v této práci použit pro události, které jsou detekovány pomocí citlivých elektrod. Ty mohou být napíchnuté buď přímo do buněk nebo buněčných stěn (intracelulární elektrody) nebo umístěné na povrchu rostlinných orgánů (povrchové elektrody). Oba typy elektrod mají své výhody i nevýhody. Intracelulární elektrody poskytují fascinující pohled na excitabilitu různých typů buněk jako např. sítkovce floému, buňky pokožky nebo průvodní buňky floému. Nicméně složení signálů měřených v každém ze zmíněných typů buněk je hodně variabilní, a to i když se opakovaně měří ve stejném typu buňky. Povrchové elektrody podávají zprávu o elektrických aktivitách mnoha buněk. Jejich výhodou je, že jsou neinvazivní, a proto nekomplikují studie zahrnující poranění rostlinného pletiva. Nevýhodné je, že bez relevantních mutantů obvykle nelze identifikovat buněčný původ měřené elektrické aktivity. Kromě toho mohou také záznam ovlivnit elektrické vlastnosti apoplastu, které jsou z velké části neznámé (Farmer *et al.* 2020).

Pro měření elektrických signálů šířících se na dlouhou vzdálenost bylo na Katedře biofyziky Univerzity Palackého vyvinuto vícekanálové zařízení, které je podrobně popsáno v publikaci Ilík *et al.* (2010), proto dále jen stručně. Šíření elektrického signálu lze tímto zařízením měřit až čtyřmi elektrodami připojených k různým místům rostlinného těla najednou. Je využito nepolarizovatelných povrchových Ag/AgCl elektrod (průměr 1 mm). Tyto elektrody jsou složeny ze stříbrného drátku, který byl vložen do roztoku chloridu draselného o standardní

koncentraci 1M. Tenká vrstva chloridu stříbrného byla vytvořena elektrolýzou chloridu draselného za použití platinové elektrody jako katody, při působení napětí o 0,5 V na stříbrnou elektrodu po určitou dobu (Eggins 1997). Tyto elektrody zahrnují výhodu povrchových elektrod popsaných výše, tedy to že jsou nedestruktivní, obvykle tedy nezpůsobují stresovou reakci v rostlině a je zde možnost opakovaného měření na téže rostlině. Kromě toho mají také makroskopický rozměr, díky čemuž jsou jednoduše instalovatelné a jejich umístění je přesně definováno. Stabilní kontakt elektrod s povrchem rostliny je umožněn díky běžně dostupnému vodivému gelu, který je používán při elektrokardiografii u lidí. Elektrický potenciál konkrétní části rostliny s připojenou povrchovou elektrodou je měřen proti referenční elektrodě v kompletním obvodu. Referenční elektroda je stejného typu jako měřící elektroda, akorát je vložena do skleněné trubice zakončenou skleněnou fritou. Trubička je naplněna 0,3 M KCl. Hrot referenční elektrody je při měření ponořen do podmisky s vodou, která je umístěna pod květináčem s měřenou rostlinou (Ilík *et al.* 2010).

Elektrický signál je měřen s citlivostí na desítky mikrovoltů. Jejich detekce může být snadno narušena vnějším elektromagnetickým polem nebo šumem elektrického vedení. Jakékoli zapojení elektrického zařízení v blízkosti může narušit řádné měření, proto je rostlina a elektrody uvnitř Faradayovy klece, která je uzemněna spolu s vývodem elektrod. Galvanické oddělení měřící jednotky eliminující rušivé podněty elektrického vedení spadá také do výhod našeho multikanálového měřicího systému. Výstupní signál z voltmetru je digitalizován analogovo/digitálním převodníkem, který představuje data karta v počítači (**Obr. 8**). Záznamy elektrických signálů jsou následně zpracovány softwarem ScopeWin (Ilík *et al.* 2010).

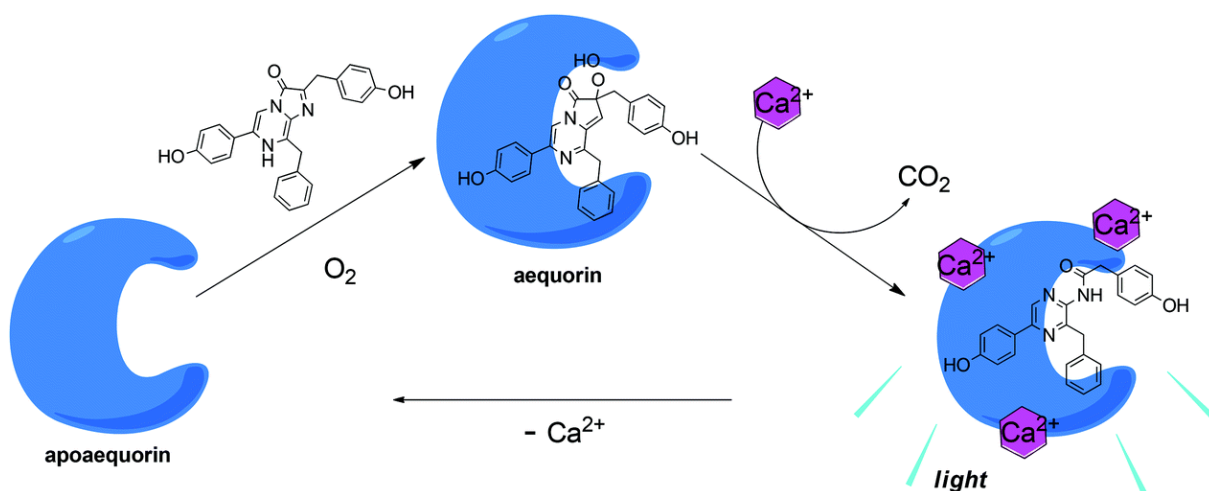


Obr. 8: Elektrické schéma námi používaného zařízení pro měření povrchových elektrických potenciálů v rostlinách, umístěné uvnitř Faradayovy klece. Přerušované čáry představují obvody, které jsou uzemněny. Signál je veden přes předzesilovač a optické oddělení na převodník a počítač. (Převzato z Ilík *et al.*, 2010).

3.2. Monitorování fluktuací intracelulárního vápníku

Přímé intracelulární monitorování fluktuací vápníku *in vivo* je prováděno buď pomocí fluorescenčních sond, nebo aequorinové technologie založené na bioluminiscenci. Naše experimenty byly prováděny dle Kiep *et al.* (2015), kteří využili k monitorování zvýšení volného vápníku v cytosolu neinvazivní sledování celých rozet huseníčku rolního právě na základě bioluminiscence. Byly využity transgenní rostliny huseníčku (*Arabidopsis thaliana* Heynh. Col-0 divokého typu) exprimující gen *APOAEQUORIN*, který je pod kontrolou CaMV 35S promotoru (Kiep *et al.* 2015). Apoaequorin je proteinovou částí aequorinu (**Obr. 9**). Aequorin je členem rodiny proteinů vázajících vápník. Tento vápníkem aktivovaný fotoprotein byl poprvé izolován z medúzy *Aequorea victoria* a dle ní byl také pojmenován (Shimomura 1995a). Aequorin je holoprotein složený ze dvou odlišných jednotek: jak již bylo napsáno, apoproteinu, který se nazývá apoaequorin, o přibližné molekulové hmotnost 21 kDa a prostetické skupiny coelenterazinu, luciferinu (Shimomura and Johnson 1978). To znamená, že apoaequorin je enzym a coelenterazin substrát, jehož oxidaci enzym katalyzuje (**Obr. 9**). Protein obsahuje tři domény, tzv. EF-Hand, které fungují jako vazebná místa pro Ca^{2+} (Charbonneau *et al.* 1985). Vazebné místo pro první dva atomy vápníku vykazuje 20krát větší afinitu k vápníku než třetí místo (Shimomura 1995b). Nicméně dřívější tvrzení, že pouze dvě vazebné domény vážou vápník, byla později zpochybněna (Deng *et al.* 2005). Titrační studie ukázaly, že všechna tři místa vázající vápník jsou aktivní, ale ke spuštění enzymatické reakce jsou potřeba pouze dva ionty (Shimomura and Inouye 1996).

Před každým měřením jsou rostliny postříkány 10 μM coelenterazinem rozpuštěným v 0,01% Tweenu 20 a poté uschována na 6 hodin do tmy. Jakmile je rostlina nějakým způsobem stimulována, např. poškozena, Ca^{2+} je navázán na aequorin a protein emituje záření. Maximální emise aequorinové bioluminiscence závislé na Ca^{2+} je v rozsahu 440 až 475 nm. Za použití vysoce citlivých chlazených fotonásobičů a CCD kamer s vysokým rozlišením jsme schopni tuto emisi detekovat.



Obr. 9: Schéma luminiscenční reakce aequorinu. Aequorin se skládá z komplexu apoaequorinu (apoproteinu) a chromoforu, coelenterazinu. Luminiscenční reakce je zahájena vazbou Ca²⁺ na aequorin „nabíý koelenterazinem“ v přítomnosti nebo nepřítomnosti molekulárního kyslíku. Obecně platí, že maximální emise aequorinové bioluminiscence závislé na Ca²⁺ je v rozsahu 440 až 475 nm. (Převzato z Jiang *et al.* (2016).

3.3. Analýza rostlinných hormonů

Rostlinné hormony (fytohormony) se v rostlinném pletivu vyskytují v extrémně nízkých koncentracích (fmol až pmol·g⁻¹ čerstvé hmoty rostlinného materiálu) společně s molekulami s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Rostlinné hormony jsou rozděleny do několika strukturních tříd. V jedné skupině fytohormonů se přitom nachází i několik desítek derivátů. Jedná se o různé konjugáty s aminokyselinami či sacharidy, často jde také o izomery se stejnou strukturou ale s významně odlišnou biologickou aktivitou. Z těchto důvodů je analýza fytohormonů velmi náročná (Podlešáková *et al.* 2012; Šimura *et al.* 2018). V Laboratoři růstových regulátorů Univerzity Palackého a Akademie věd České republiky byla ovšem vyvinuta vysoce citlivá a účinná metoda, která umožnila kvantitativní analýzu 16 stresem indukovaných fytohormonů včetně JA, jejích biosyntetických prekurzorů a konjugátů, IAA, ABA a SA. Použitím protokolu, který je popsán v publikaci Floková *et al.* (2014) jsme byli schopni dosáhnout vysokého výtěžku z minimálního množství rostlinného materiálu (4–20 mg čerstvé hmoty).

Celkový úspěch analytického stanovení rostlinných hormonů záleží na provedení přípravy vzorků před samotnou analýzou. Volba vhodné metody přípravy vzorku rozhoduje nejen o přesnosti stanovení dané látky (analytu), ale vůbec o možnosti jejího určení. Po homogenizaci a navážení rostlinného materiálu (vše probíhající za nízké teploty při použití tekutého dusíku a nejlépe také suchého ledu, aby nešlo k roztopení vzorku, a tedy degradaci žádaných analytů), nastává extrakce. Úlohou extrakčních procesů je převedení látek, které jsou předmětem našeho zájmu, do extrakčního činidla. Fytohormony jsou obvykle extrahovány do

organických rozpouštědel snadno mísitelných s vodou, jako jsou metanol, etanol a aceton. V našem případě byl zvolen 10% metanol. Aby byla možná následná kvantitativní analýza, je ke vzorku s rozpouštědlem přidáno známé množství směsi interních standardů, tj. odpovídající rostlinné hormony značené deuteriem nebo jiným stabilním izotopem. Aby nedošlo v průběhu extrakce k enzymatické, tepelné či oxidativní degradaci látek, probíhá extrakce preventivně za snížené teploty. Použitá teplota závisí na obsahu vodné složky v extrakčním činidle a pohybuje se v rozmezí 4 °C až -20 °C (Tarkowski *et al.* 2004). Tuhé podíly jsou následně odstraněny centrifugací a přenesením extraktu do čisté mikrozkušavky.

Pro zesílení signálů stopových sloučenin, jako jsou rostlinné hormony, je (většinou) nezbytné před instrumentální analýzou snížit vliv hojných interferujících sloučenin přítomných v rostlinných matricích důslednou purifikací extraktů (Du *et al.* 2012). K tomu se využívá nejčastěji přečištění pomocí extrakce na pevné fázi (SPE, *solid phase extraction*) s univerzálními sorbenty. Purifikace musí poskytnout dostatečný stupeň přečištění, přitom ale musí být zachována uspokojivá návratnost analytů. Jednotlivé stupně purifikačního protokolu by měly z původního rostlinného extraktu eliminovat všechny ostatní látky (sekundární metabolity, cukry, peptidy, aminokyseliny, pigmenty apod.). Přečištěný biologický materiál by pak měl obsahovat jen požadované rostlinné hormony, případně látky, které následnou analýzu neruší. (Tarkowski *et al.* 2004). V našem případě byl využit jedнокrokový purifikační protokol při použití SPE kolonky Oasis® HLB. HLB sorbent je popsán jako makroporézní kopolymer [poly-(divinylbenzen-co-*N*-vinylpyrrolidon)] s hydrofilními i lipofilními retenčními vlastnostmi. Na tomto sorbentu, přes který protéká vzorek, dojde v důsledku molekulových interakcí k zadržení požadované látky. Nežádoucí příměsi jsou z kolonky selektivně odstraněny promytím správně zvoleným rozpouštědlem (v našem případě 10% metanol). Na závěr jsou z kolonky žadoucí analyty znovuzískány/eluovány elučním rozpouštědlem (v našem případě 80% metanolem) v podobě vysoce čistého extraktu. Takovýto extrakt má často podstatně vyšší koncentraci analytu, než měl původní vzorek. Průtok kapalin vedených přes kolonku je urychlován vakuem na výstupu z kolonky nebo tlakem na vstupu kolonky (Klouda 2003).

V dalším kroku je nutno provést zahuštění vzorku, na což je možné využít vícero metod (odpařováním v proudu dusíku, na rotační vakuové odparce nebo lyofilizací), v našem případě bylo zvoleno odpaření pod proudem dusíku. Do sucha odpařený vzorek je dále rozpuštěn do roztoku, který odpovídá mobilní fázi kapalinové chromatografie (Tarkowski *et al.* 2004). V našem případě do 40 µl 15% acetonitrilu okyseleným 10 mM kyselinou mravenčí. Takhle je vzorek připraven pro analýzu.

V průběhu mého doktorského studia jsem měla možnost vyzkoušet si i jiný způsob přípravy vzorků pro analýzu fytohormonů. Ve spolupráci s Mgr. Ondřejem Vrobelem a doc.

RNDr. Petrem Tarkowskim Ph.D. z oddělení Fytochemie Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum byla analýza rostlinných hormonů provedena dle postupu popsaném v Šimura *et al.* (2018). Změna v postupu spočívala v použití jiného extrakčního činidla (50% acetonitril) a HLB sorbent byl použit k zadržení možných interferujících sloučenin, zatímco cílené sloučeniny procházely přes sorbent SPE kolony a jednotlivé frakce byly sbírány do borosilikátových zkumavek. Následně byla kolonka ještě promyta 30% acetonitrem a tato frakce byla sesbírána do zkumavky se vzorkem. Spojené frakce byly odpařeny do sucha pomocí centrifugační vakuové odparky. Při mé stáži na Max Planck Institutu v německé Jeně byly analýzy fytohormonů prováděny ve spolupráci s Dr. Michaelem Reicheltem. Příprava vzorku zcela postrádala purifikační krok a nevýhodou byla nutnost použití většího množství vstupního rostlinného materiálu. Celý postup popsán např. v Heyer *et al.* (2018). Nároky na množství materiálu a stupni pročištění jsou totiž kladeny dle typu analytické metody.

Nejpoužívanější metody jsou založeny na separaci kapalinovou chromatografií (LC; *liquid chromatography*) nebo plynovou chromatografií v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS; *mass spectrometry/mass spectrometry*). Hlavní předností těchto kombinací je vysoká citlivost a všestrannost. Dnes zřejmě nejpoužívanější technikou v oblasti kvalitativní a kvantitativní analýzy rostlinných hormonů je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC; *High Performance Liquid Chromatography*). Vedle vysoké separační účinnosti a rychlosti je její velkou výhodou možnost spojení s celou řadou technik finální analýzy včetně MS/MS (Tarkowski *et al.*, 2004). Nejmodernějším HPLC systémem je ultra účinná kapalinová chromatografie, která pracuje za použití vyšších tlaků (100 MPa) a s menšími velikostmi sorbentů (< 2 μm ; Motyka and Hlaváč 2009).

Daný analyt je identifikován na základě retenčního času v části LC a pomocí vysoce selektivního monitorování přechodů iontů z prekurzoru na produkt v části MS/MS. Retenční čas je zcela specifický pro každou molekulu. Je to celkový čas, jaký stráví příslušný analyt v separační koloně závisující na molekulových interakcích analytu ke stacionární fázi kolony. Jednotlivé analyty rozdělené na koloně dále pokračují do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Molekuly vzorku jsou z kapalně fáze převedeny do plynné fáze a následně převedeny na ionty. Prekurzorový ion je excitován v kolizní cele srážkou s molekulou inertního plynu. Dochází k fragmentaci, tj. rozpadu molekuly na menší části (ionty a neutrální molekuly). Fragmenty jsou charakteristické pro danou strukturu a fragmentační spektra lze vyhledat v databázích. Signál z detektoru je zaznamenáván pomocí počítače do podoby chromatogramu. Koncentrace analytu při kvantitativní analýze je pak zjednodušeně vypočítána

z plochy pod píkem vzorku a odpovídající interního standardu a známé koncentraci interního standardu.

3.4. Izolace RNA a kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

K objasnění exprese klíčových genů, jejichž produkty se podílejí na biosyntetické dráze JA, byla použita kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-qPCR). K tomu je ale nejprve nezbytná izolace vysoce kvalitní celkové RNA z rostlinného materiálu. V průběhu mého doktorského studia jsem si vyzkoušela vícero metod izolace RNA: fenol-chloroformovou izolaci, precipitaci RNA etanolem a octanem sodným, v našich publikacích jsou ale popsány následující dvě. V současnosti asi nejpoužívanější je modifikace tradiční fenol-chloroformové izolace, kdy se místo fenolu používá komerčně dostupné reagensie TRIzol[®] Reagent. TRIzol[®] je jednofázový roztok fenolu, guanidin isothiokyanátu a dalších proprietárních složek. Princip této metody je ale stejný jako v případě klasické fenol-chloroformové extrakce. TRIzol[®] slouží jako extrakční činidlo, poté se k němu přidá chloroform a po centrifugaci se homogénát rozdělí na tři fáze: RNA se selektivně extrahuje do horní čiré vodné fáze, mezifáze ve formě bílého prstence obsahuje DNA a fialová spodní organická vrstva obsahuje proteiny. Z vodné fáze se RNA vysráží isopropanolem. Následně se promývá etanolem a vysušená sraženina se rozpustí ve vodě (Thermo Fisher Scientific Inc. 2016).

V současnosti je pro izolaci RNA k dispozici velké množství komerčních souprav, které jsou založené na několikero často velmi podobných principech, které jsou součástí patentové ochrany. Rostliny jsou dobře známé svou rozmanitostí v sekundárních metabolitech. Některá rostlinná pletiva jsou obohacena o polyfenolické sloučeniny nebo třísloviny a jiné jsou obohaceny o polysacharidy. Tyto sekundární metabolity často interferují s izolací RNA a použitím RNA v následných aplikacích. Námi nejvíce využívaná je souprava Spectrum[™] Plant Total RNA Kit, která osvědčeně eliminuje tyto interferující složky a další výhodou je, že neobsahuje nebezpečné organické solventy jako je fenol a chloroform. Je to pohodlná metoda pro purifikaci vysoce kvalitní celkové RNA z náročných rostlinných druhů, jako jsou např. právě masožravé rostliny. Princip této metody spočívá v tom, že RNA z rozmělněného rostlinného materiálu na jemný prášek je extrahována v lyzačním roztoku, který zároveň inaktivuje přítomné ribonukleázy a interferující sekundární metabolity. Po odstranění buněčných zbytků pomocí centrifugace je extrakt smíchán s unikátním vazebným roztokem a tento mix je aplikován na vazebnou kolonku. Vazebný roztok účinně zabraňuje ucpání kolony polysacharidy i genomovou DNA. Zbytkové nečistoty a zbytky genomové DNA jsou následně odstraněny promývacími roztoky a čistá RNA je na závěr eluována z kolony vodou, ve které je

RNA rozpustná (Sigma-Aldrich Co. 2010). Takto purifikovaná RNA je připravena k okamžitému použití pro různé aplikace, nicméně v našem případě ještě dále pokračuje v přečištění a zakoncentrování RNA soupravou Clean and Concentrator™, která je založená na stejném principu. Takto purifikovaná RNA by teoreticky již neměla obsahovat žádnou genomickou DNA nebo jen stopová množství, pro některé citlivé aplikace jako je RT-qPCR je však nutné genomovou DNA odstranit, k čemuž se využívá DNáza přiložená k soupravě (Zymo Research 2021). Koncentrace RNA je změřena na spektrofotometru NanoDrop™ 1000 a integrita RNA bývá zkontrolována pomocí agarové gelové elektroforézy.

Nicméně vstupem do RT-qPCR je komplementární DNA (cDNA), která je syntetizována podle RNA, sloužící jako templát. Metoda PCR je cílená na DNA, proto je nejprve nutné provést reverzní transkripci, např. iScript™ cDNA Syntesis Kit. RT-qPCR je varianta PCR, kde se množství PCR produktů DNA spektrofluorometricky spočítá po každém cyklu amplifikace, tedy v reálném čase, nikoli na jejím konci jako u klasické PCR. Aby bylo možné spektrofluorescenční měření, je nutné fluorescenční značení PCR produktu. K tomu využíváme interkalační fluorescenční barvivo SYBR Green, které se specificky váže na dvojvláknovou DNA. Toto barvivo vykazuje v nevázaném stavu velmi nízkou fluorescenci, po vazbě na dvojvláknovou DNA se fluorescence zvyšuje až 1000x. Tento fluorescenční signál je kontinuálně zaznamenáván (Gbelcová *et al.* 2017).

3.5. Elektroforetické separační metody

Elektroforéza je metoda používaná pro separaci sloučenin, založená na pohybu nabitých částic (molekul) v elektrickém poli. V našich experimentech byly použity dva typy elektroforézy: elektroforézu na polyakrylamidovém gelu v denaturujících podmínkách pro proteiny a elektroforézu na agarózovém gelu pro separaci nukleových kyselin.

První uvedený typ elektroforézy je založen na separaci v polyakrylamidovém gelu (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* – PAGE). Elektroforetický gel se připravuje ze směsi monomerních (akrylamid) a dimerních (bisakrylamid) forem. Proporcionální množství těchto dvou sloučenin má za následek konečné vlastnosti gelu, charakterizované velikostí pórů v gelu, a tedy kvalitou separace (Rüchel *et al.* 1978). Složení gelu je charakterizováno hodnotami T a C, kde T znamená celkovou (*total*) koncentraci akrylamidu a bisakrylamidu a C udává procentuální koncentraci „cross-linkeru“, kterým je bisakrylamid. Polymerace roztoku akrylamidu je iniciována přidáním persíranu amonného, přičemž síranové radikály slouží jako donor elektronů a reakce je katalyzována N,N,N',N'-tetramethylendiaminem, který slouží jako nosič elektronů.

Pro elektroforetickou separaci proteinů v denaturačních podmínkách jsme použili SDS-PAGE, kdy se dodecylsírán sodný (SDS; *sodium dodecyl sulphate*) naváže na proteiny, způsobí jejich denuraci a přidá jim negativní náboj, který se využívá při separaci proteinů v elektrickém poli. SDS spolu s některými redukčními činidly (např. dithiotreitol, merkaptoetanol) způsobuje disociaci kvartérních a ternárních proteinových struktur, čímž dochází k disociaci proteinových komplexů na jednotlivé proteiny (Laemmli 1970). Při SDS-PAGE jsou proteiny separovány podle jejich molekulové hmotnosti. V našich experimentech jsme použili Tricinový systém (Schägger 2006)), který poskytuje lepší separaci menších molekul. Proteiny v gelech byly buď vizualizovány barvením stříbrem (ProteoSilver; Sigma Aldrich).

Elektroforéza na agarózovém gelu byla použita pro separaci nukleových kyselin k potvrzení velikosti produktů PCR amplifikace v experimentech s měřením genové exprese. Agaróza je polysacharid (lineární polymer D-galaktózy a 3,6-anhydro-L-galaktózy) získaný čištěním agaru, který se izoluje z červených řas. Agaróza se objevuje obvykle ve formě prášku, který se vaří ve vhodném pufru, nejčastěji 1 x TAE (Tris – acetát – EDTA) a roztok agarózy po ochlazení tuhne. Analogicky jako polyakrylamidové gely mají i agarózové gely síťovitou strukturu umožňující separaci nukleových kyselin podle jejich molekulové hmotnosti. Pohyb nukleových kyselin v elektrickém poli je zajištěn fosfátovými skupinami, které molekulám udělují záporný náboj (Serwer 1983; Zimm and Levene 1992). Po elektroforetické separaci je DNA vizualizována díky UV barvivu Serva DNA Stain G. Toto barvivo je bezpečnější alternativou k tradičně používanému ethidium bromidu. Když je toto barvivo navázáno na nukleovou kyselinu, emituje zelenou fluorescenci, kterou je možno pozorovat pod UV zářením (Serva Electrophoresis GmbH).

3.6. Western blot

Western blot je analytická semikvantitativní metoda založená na imunodetekci zájmového proteinu (Corley 2005). V našich experimentech byla před Western bloty provedena SDS-PAGE pro separaci proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. Následně, aby byly proteiny přístupné pro protilátky, byly přeneseny z gelu na nitrocelulózovou membránu. K přenosu jsme použili elektroblotovací postup, který využívá elektrický proud k vytažení proteinů z gelu na membránu. Před inkubací membrány v roztoku protilátky musí být membrána uložena v blokovacím roztoku, který se skládá z 5 % hovězího sérového albuminu zředěného ve vhodném pufru s detergentem (Tween 20), aby se zabránilo nesespecifickým vazbám mezi protilátkou a membránou. Po zablokování byly membrány inkubovány ve specifických

primárních protilátkách. Po promytí membrán od primárních protilátek byly membrány inkubovány v sekundární protilátce (konjugát kozí anti-králičí IgG (H+L) s křenovou peroxidázou) a následně vizualizovány pomocí chemiluminiscenčního HRP substrátu pro křenovou peroxidázu (HRP = *horseradish peroxidase*) Immobilon Western. Chemiluminiscenční detekce využívá reportérového enzymu křenové peroxidázy, který je obsažen v sekundární protilátce, ke katalýze reakce, jejíchž výsledkem je generace viditelného záření. Chemiluminiscenční reakce je založena na katalyzované oxidaci luminolu peroxidázou. Oxidovaný luminol emituje záření, když se navrácí do základního stavu (Millipore).

3.7. Měření enzymatické aktivity

Enzymatická aktivita představuje množství přeměněného substrátu enzymem za jednotku času za daných podmínek. Základní jednotkou je 1 katal, který se rovná $1 \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$. Protože jde ale velkou jednotku, v praxi se využívá U, které se rovná $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$. Jedno U odpovídá 16.67 nanokatalům. Jednotka proteolytické aktivity je definována jako vzrůst absorbance o 0,001 za minutu při 280 nm (Matušíková *et al.* 2005). Metodické postupy pro jednotlivé enzymy se v mnohém liší a konkrétní postup stanovení jejich aktivity je popsán v materiálu a metodách publikací.

3.8. Identifikace neznámých proteinů

Postup identifikace neznámého proteinu se sestává z několika kroků, jejichž počet a pořadí se může lišit v závislosti na tom, zdali se proteiny štěpí takzvaně v roztoku (*in solution digestion*) nebo zdali se proteiny nejprve odseparují pomocí gelové elektroforézy a štěpí se takzvaně v gelu (*in gel digestion*). V našich publikacích byly využity oba tyto přístupy.

Při štěpení v roztoku po rozpuštění proteinů ve vhodném pufru nastávají dva důležité kroky – redukce a alkylace. V proteinech se vyskytují disulfidové vazby vznikající oxidací dvou thiolových skupin, které jsou součástí bočního řetězce aminokyseliny cysteinu. Před štěpením proteinu je nutné tyto vazby nejprve přerušit redukcí, k čemuž se nejčastěji využívá dithiothreitol. Poté je žádoucí zabránit opětovnému sestavení těchto vazeb např. v důsledku oxidace vzdušným kyslíkem. K tomu slouží alkylace alkylačním činidlem (např. akrylamid, jodacetamid). Pokud jsou přerušeny disulfidové vazby, které jsou důležité pro stabilizaci prostorového uspořádání proteinu, může se přejít ke štěpení proteinu na menší fragmenty – peptidy. K tomu se mohou využít různá chemická činidla, nicméně běžnější je štěpení proteolytickými enzymy – proteázami. Nejpoužívanější proteázou je trypsin, který vykazuje vysokou specifitu štěpení (štěpí protein za aminokyselinami lysinem a argininem směrem k C-

konci) a produkuje peptidy o délce v průměru 7-15 aminokyselin, které jsou vhodné pro následnou analýzu.

Při štěpení v gelu jsou proteiny nejprve pomocí SDS-PAGE. Příslušný proteinový pás je vyříznut skalpelem. V případě barvení gelu v Coomassie Brilliant Blue je gel nejprve odbarven vhodným organickým rozpouštědlem. Následující kroky jsou stejné jako při štěpení v roztoku. Po štěpení jsou vzniklé peptidy extrahovány a přečištěny na mikrokolonkách, které jsou plněné reverzní fází (C18).

Dalším faktorem, ovlivňujícím pořadí a počet jednotlivých kroků vědoucích k identifikaci proteinu, je typ hmotnostního spektrometru, který je pro identifikaci proteinu použit. Zde opět existují dva přístupy, které rozlišujeme: metodu peptidového mapování (*peptide mass fingerprinting*, PMF) a metodu peptidového sekvenování (*peptide sequencing*, PS).

Metoda PMF je založena na tom, že štěpením daného proteinu vzniká soubor peptidů, jejichž velikost je unikátní právě pro daný protein. Tato metoda se typicky využívá ve spojení s hmotnostními spektrometry s konfigurací MALDI-TOF, tj, ionizace laserem za účasti matrice (*matrix assisted laser desorption ionisation*) ve spojení s analyzátozem podle doby letu (*time of flight*). Měření na MS analyzátoru jsou získány měrné hmotnosti (m/z) peptidů, které jsou zpracovány pomocí bioinformatických nástrojů. Algoritmy jsou schopny porovnat experimentální hodnoty s teoretickými hodnotami měrných hmotností peptidů. K tomuto čistě matematickému procesu slouží celá řada nástrojů, např. Mascot, které mohou využívat jak veřejně dostupných databází proteinových sekvencí umístěných v proteomických depozitářích tak i specifických databází připravených pro konkrétní projekty.

Při metodě PS je identifikace proteinu provedena na základě části jeho aminokyselinové sekvence, která se získá řízenou fragmentací proteolyticky naštěpených peptidů s následným stanovením molekulové hmotnosti fragmentových iontů. K tomuto přístupu je nutné použití LC-MS/MS nebo nanoLC-Q-TOF. Finální identifikace peptidů se provádí prohledáváním neinterpretovaných MS/MS fragmentačních spekter proti databázi (Chamrád *et al.* 2017).

Je nutné podotknout, že jsem si pouze jedenkrát vyzkoušela přípravu vzorku (štěpení v roztoku), nicméně co bylo důležitější, vyzkoušela jsem si také určení proteinů na základě shodnosti peptidu v databázích.

ZÁVĚR

Rostliny obecně si vyvinuly komplexní řadu lokálních a systémových signalizačních systémů, které umožňují integraci a koordinaci jejich fyziologie a vývoje. V biotopech chudých na živiny si speciální skupina rostlin, takzvaně masožravých, vyvinula důmyslné mechanismy, jak chybějící živiny v půdě nahradit. Získávají je z živočišné kořisti, k čemuž si přeměnily jejich listy na pastě. Tato schopnost spojuje všechny druhy z nejrůznějších podnebných a zeměpisných oblastí. Masožravé rostliny reprezentují ekologicky i morfologicky různorodou skupinu s více než 800 druhy, které spadají do jen vzdáleně příbuzných třinácti čeledí s celkem dvaceti rody kvetoucích rostlin. Charles Darwin ve své knize *Insectivorous plants* o těchto rostlinách napsal: „...vidíme, jak málo bylo rozluštěno ve srovnání s tím, co zůstává nevysvětleno nebo neznámo“ (Darwin 1875). To platí ale i dnes, i přesto že disponujeme velmi pokrokovými metodami. Má práce přinesla alespoň pár nových dílků skládačky k tomu, abychom pochopili, jak nejen tyto rostliny fungují.

Ukázalo se, že některé masožravé rostliny pro chycení a regulaci trávicího procesu využívají elektrickou a jasmonátovou signalizaci. V publikaci Pavlovič *et al.* (2017), která sloužila jako odrazový můstek pro tuto disertační práci a plynule na ni navazují, bylo dokázáno, že sekvence událostí po chycení kořisti masožravou rostlinou mucholapkou podivnou připomíná dobře známou signální dráhu obrany rostlin v reakci na napadení patogenem nebo býložravcem. Po poškození generují rostliny elektrické signály, které vyvolají akumulaci rostlinných hormonů jasmonátů následovanou expresí genů odpovídajících na jasmonáty. Mucholapka pak začne vylučovat do pastě trávicí enzymy schopné trávit chitin, proteiny, DNA a RNA, tedy molekuly bohaté hlavně na dusík. Nicméně elektrická signalizace v mucholapce není specifická, a tak mucholapka zatížená evoluční minulostí není schopna rozeznat, zda je poškozována býložravcem nebo mechanicky stimulována opravdovou kořistí (publikace 0.). Až jakmile ucítí protein a nikoli chitin, který je první chemickou látkou, se kterou přijdou trávicí žlázy do styku, protože se převážně z něj skládá exoskeleton hmyzu, spustí svůj trávicí proces naplno (publikace I.). Chemické signály z kořisti jsou důležitějším induktorem pro stabilní a vysokou akumulaci jasmonátů a aktivit enzymů než samostatná mechanická stimulace.

V době zveřejnění publikace 0 se mělo obecně za to, že masožravost rostlin byla vyvinuta z obranného mechanismu rostlin. Nicméně společné znaky s obranným mechanismem, tedy to že jsou jasmonáty zodpovědné za aktivaci a regulaci trávicích enzymů, byly prokázány jen u tří rodů masožravých rostlin: mucholapka (*Dionaea*), rosnatka (*Drosera*), a láčkovka (*Nepenthes*) řádu hvozdíkotvaré (Caryophyllales). Jak je jasmonátová signální dráha rozšířená mezi ostatní linie masožravých rostlin nebylo známo. Rozhodli jsme se proto

prostudovat také ostatní zástupce masožravých ropstlin: tučnici (hybrid *Pinguicula* × *Tina*) a bublinatky (*Utricularia reflexa* a *U. vulgaris*) z řádu hluchavkotvaré (Lamiales), láčkovici australskou (*Cephalotus follicularis*) z řádu šťavelotvaré (Oxalidales), špirlici nachovou (*Sarracenia purpurea* ssp. *venosa*) z řádu vřesovcotvaré (Ericales) a také další masožravé rostliny z řádu hvozdíkotvaré (Caryophyllales) – rosnolist lusitánský (*Drosophyllum lusitanicum*) a aldrovandkau měchýřkatou (*Aldrovanda vesiculosa*). Ukázalo se, že jasmonátová signalizace není univerzální a všudypřítomnou drahou, která je využívána masožravými rostlinami pro regulaci trávicích enzymů. Ačkoli masožravé rostliny z různých evolučních linií využívají stejné trávicí enzymy, přičemž některé z nich spadají do skupiny od patogeneze odvozených proteinů, regulace jejich aktivit se výrazně liší. Přestože masožravé rostliny využívají jasmonáty pro svou odvěkou roli – obranu, exaptace jasmonátové signalizace pro botanickou masožravost se pravděpodobně vyskytla pouze jednou v nejstarší linii masožravých rostlin – hvozdíkotvaré, a poté již nikdy nebyla kooptována znovu (publikace II., III. a IV).

Nedávno bylo v publikaci Yokawa *et al.* (2017) zjištěno, že masožravá rostlina mucholapka s její pohyblivou čepelí je dobrým experimentálním modelem pro výzkum vlivu anestetik. Primárním místem účinku celkových anestetik u živočichů je nervový systém, kde anestetika inhibují přenos nervového vzruchu. Existuje několik teorií, jak tato nesourodá skupina látek účinkuje. Moderní teorie působení anestetik vycházejí z existence specifických receptorů (např. receptory kyseliny γ -aminomáselné anebo ionotropní glutamátové receptory), v centrálním nervovém systému, jejich agonistů/antagonistů a případně jsou založeny na ovlivnění akčního potenciálu nervů, zejména prostřednictvím sodíkových kanálů. Ačkoli rostliny nemají neurony, generují elektrické signály v odpovědi na biotický a abiotický stres. Tyto vjemy rostlina ztrácí, pokud je vystavena účinku některých anestetik. Ukazuje se, že elektrická signalizace v rostlinách využívá podobné proteiny jako v našem mozku. A právě na elektrické signály anestetika cílí také v rostlinách. Dietyléter kompletně inhiboval tvorbu akčního potenciálu v mucholapce a past nebyla schopná se pod vlivem anestetika uzavřít. Akční potenciály byly však plně obnoveny po odstranění anestetika. Dietyléter také kompletně inhiboval další reakce: akumulaci jasmonátů a expresi genů odpovídajících na jasmonáty. Nicméně externí aplikace kyseliny jasmonové do pasti obešla inhibici akčního potenciálu a obnovila genovou expresi i pod vlivem anestetika, což naznačuje, že reakce následující po akumulaci kyseliny jasmonové nejsou inhibovány (publikace V.).

Mucholapka však má jakožto experimentální model také své nevýhody jako např. malé množství existujících a dostupných mutantů a oproti jiným experimentálním rostlinám není elektrický signál šířen systémově. Jasmonáty jsou tak akumulovány pouze v pasti s kořistí nebo

po poškození pasti (publikace 0). Elektrické signály nehrají ale roli pouze v pohyblivých rostlinách, ale jsou nesmírně důležité i v životě běžných rostlin při reakci na různé biotické a abiotické faktory. To, co jsme se naučili na masožravých rostlinách, jsme aplikovali na huseníček rolní, kde se elektrický signál šíří také do sousedních listů, abychom proces prozkoumali více do hloubky. Buněčná odpověď byla v systémových listech zcela blokována, nicméně lokální poškozený list stále cítil a reagoval na podněty. Jelikož je systémové šíření elektrického signálu v huseníčku závislé na kanálech podobných glutamátovým receptorům, mohl by právě na ně dietyléter nespécificky cílit. To potvrdila také inhibice glutamátem indukovaných elektrických signálů anestetiky (publikace VI.). Inhibice elektrických signálů a jasmonátové odpovědi vlivem anestetik dokumentuje významnou podobnost mezi signálními drahami masožravosti a obrany rostlin.

Stále nám ale mnohé zůstává zahaleno a čeká na odpověď...

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adamec L. 2014.** Different reutilization of mineral nutrients in senescent leaves of aquatic and terrestrial carnivorous *Utricularia* species. *Aquatic Botany* **119**: 1–6.
- Adamec L. 2018.** Ecophysiology of aquatic carnivorous plants In: *Carnivorous Plants: Physiology, Ecology, and Evolution*. Oxford University Press, 256–269.
- Akbudak MA, Yildiz S, Filiz E. 2020.** Pathogenesis related protein-1 (PR-1) genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.): Bioinformatics analyses and expression profiles in response to drought stress. *Genomics* **112**: 4089–4099.
- Alberts B, Bray D, Johnson A, et al. 2005.** *Základy buněčné biologie - Úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero Publishing.
- Arai N, Nishimura E, Kikuchi Y, Ohyama T. 2015.** Functional analyses of carnivorous plant-specific amino acid residues in S-like ribonucleases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **465**: 108–112.
- Ashida J. 1935.** Effect of mechanical, thermal, electrical, osmotic and chemical influence In: *Studies on the leaf movement of Aldrovanda vesiculosa L.* . Kyoto Imperial University, 55–113.
- Athauda SBP, Matsumoto K, Rajapakshe S, et al. 2004.** Enzymic and structural characterization of nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases. *Biochemical Journal* **381**: 295–306.
- Balasubramanian V, Vashisht D, Cletus J, Sakthivel N. 2012.** Plant β -1,3-glucanases: Their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnology letters* **34**: 1983–1990.
- Baluška F, Volkmann D, Mancuso S. 2006.** *Communication in plants: Neuronal aspects of plant life*. Heidelberg: Springer.
- Van Bel AJE, Furch ACU, Will T, Buxa S V., Musetti R, Hafke JB. 2014.** Spread the news: Systemic dissemination and local impact of Ca²⁺ signals along the phloem pathway. *Journal of Experimental Botany* **65**: 1761–1787.
- Bemm F, Becker D, Larisch C, et al. 2016.** Venus flytrap carnivorous lifestyle builds on herbivore defense strategies. *Genome Research* **26**: 812–825.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. 2000.** The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1**: 11–21.
- Boari F, Malone M. 1993.** Wound-induced hydraulic signals: Survey of occurrence in a range of species. *Journal of Experimental Botany* **44**: 741–746.
- Böhm J, Scherzer S. 2021.** Signaling and transport processes related to the carnivorous lifestyle of plants living on nutrient-poor soil. *Plant Physiology* **187**: 2017–2031.
- Böhm J, Scherzer S, Krol E, et al. 2016.** The Venus flytrap *Dionaea muscipula* counts prey-induced action potentials to induce sodium uptake. *Current Biology* **26**: 286–295.
- Böhm J, Scherzer S, Shabala S, et al. 2016.** Venus flytrap HKT1-type channel provides for prey sodium uptake into carnivorous plant without conflicting with electrical excitability. *Molecular Plant* **9**: 428–436.
- Bopp M, Weber I. 1981.** Hormonal regulation of the leaf blade movement of *Drosera capensis*. *Physiologia Plantarum* **53**: 491–496.
- Brown WH. 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.
- Buch F, Kaman WE, Bikker FJ, Yilamujiang A, Mithöfer A. 2015.** Nepenthesin protease activity

indicates digestive fluid dynamics in carnivorous *Nepenthes* plants. *PLOS ONE* **10**: e0118853.

Buch F, Rott M, Rottloff S, et al. 2013. Secreted pitfall-trap fluid of carnivorous *Nepenthes* plants is unsuitable for microbial growth. *Annals of Botany* **111**: 375–383.

Burdon-Sanderson J. 1873. Note on the electrical phenomena which accompany stimulation of the leaf of *Dionaea muscipula* Ellis. *Proceedings of The Royal Society of London* **21**: 495–496.

Burri JT, Saikia E, Läubli NF, et al. 2020. A single touch can provide sufficient mechanical stimulation to trigger Venus flytrap closure. *PLOS Biology* **18**: e3000740.

Butts CT, Zhang X, Kelly JE, et al. 2016. Sequence comparison, molecular modeling, and network analysis predict structural diversity in cysteine proteases from the Cape sundew, *Drosera capensis*. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **14**: 271–282.

Chamrád I, Lenobel R, Simerský R. 2017. *Laboratorní cvičení z proteomiky* (Univerzita Palackého, Ed.). Olomouc.

Charbonneau H, Walsh KA, McCann RO, Cormier MJ, Prendergast FG, Vanaman TC. 1985. Amino acid sequence of the calcium-dependent photoprotein aequorin. *Biochemistry* **24**: 6762–6771.

Chase Fls MW, Christenhusz Fls MJM, Fls DS, Fls MFF. 2009. Murderous plants: Victorian Gothic, Darwin and modern insights into vegetable carnivory. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**: 329–356.

Chauvin A, Caldelari D, Wolfender JL, Farmer EE. 2013. Four 13-lipoxygenases contribute to rapid jasmonate synthesis in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves: A role for lipoxygenase 6 in responses to long-distance wound signals. *New Phytologist* **197**: 566–575.

Chia TF, Aung HH, Osipov AN, Goh NK, Chia LS. 2004. Carnivorous pitcher plant uses free radicals in the digestion of prey. *Redox Report* **9**: 255–261.

Chini A, Boter M, Solano R. 2009. Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module. *FEBS Journal* **276**: 4682–4692.

Chini A, Fonseca S, Fernández G, et al. 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666–671.

Chini A, Monte I, Zamarreño AM, et al. 2018. An OPR3-independent pathway uses 4,5-didehydrojasmonate for jasmonate synthesis. *Nature Chemical Biology* **14**: 171–178.

Clark GB, Morgan RO, Fernandez M, Roux SJ. 2012. Evolutionary adaptation of plant annexins has diversified their molecular structures, interactions and functional roles. *New Phytologist* **196**: 695–712.

Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K. 1993. Plant chitinases. *Plant Journal* **3**: 31–40.

Corley RB. 2005. *A guide to methods in the biomedical sciences*. Springer.

Cross A. 2012. *Aldrovanda: The Waterwheel Plant*. Poole: Redfern Natural History Productions Ltd.

Darwin C. 1875. *Insectivorous plants*. John Murray, London.

Davies JM. 2014. Annexin-mediated calcium signalling in plants. *Plants* **3**: 128–140.

Day IS, Reddy VS, Shad Ali G, Reddy A. 2002. Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. *Genome Biology* **3**: 1–24.

Demidchik V, Shabala S, Isayenkov S, Cuin TA, Pottosin I. 2018. Calcium transport across plant membranes: Mechanisms and functions. *New Phytologist* **220**: 49–69.

Deng L, Vysotski ES, Markova S V., et al. 2005. All three Ca²⁺-binding loops of photoproteins bind calcium ions: The crystal structures of calcium-loaded apo-aequorin and apo-obelin. *Protein Science* **14**: 663–675.

- Dengler NG. 2006.** The shoot apical meristem and development of vascular architecture. *Canadian Journal of Botany* **84**: 1660–1671.
- Dodd AN, Kudla J, Sanders D. 2010.** The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 593–620.
- Du F, Ruan G, Liu H. 2012.** Analytical methods for tracing plant hormones. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403**: 55–74.
- Eggs BR. 1997.** *Biosensors: An Introduction*. Wiley.
- Eilenberg H, Pnini-Cohen S, Rahamim Y, et al. 2010.** Induced production of antifungal naphthoquinones in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *Journal of Experimental Botany* **61**: 911–922.
- Eilenberg H, Pnini-Cohen S, Schuster S, Movtchan A, Zilberstein A. 2006.** Isolation and characterization of chitinase genes from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *Journal of Experimental Botany* **57**: 2775–2784.
- Ellison AM, Adamec L. 2018.** *Carnivorous plants: Physiology, ecology, and evolution*. Oxford University Press.
- Ellison AM, Gotelli NJ. 2009.** Energetics and the evolution of carnivorous plants - Darwin's "most wonderful plants in the world." *Journal of Experimental Botany* **60**: 19–42.
- Escalante-Perez M, Krol E, Stange A, et al. 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 of the United States of America* **108**: 15492–15497.
- Farmer EE, Gao Y, Lenzoni G, Wolfender J, Wu Q. 2020.** Wound- and mechano-stimulated electrical signals control hormone responses. *New Phytologist* **227**: 1037–1050.
- Farmer EE, Gasperini D, Acosta IF. 2014.** The squeeze cell hypothesis for the activation of jasmonate synthesis in response to wounding. *Journal of Physiology* **204**: 282–288.
- Felle HH, Zimmermann MR. 2007.** Systemic signalling in barley through action potentials. *Planta* **226**: 203–214.
- Fichman Y, Miller G, Mittler R. 2019.** Whole-plant live imaging of reactive oxygen species. *Molecular Plant* **12**: 1203–1210.
- Fisahn J, Herde O, Willmitzer L, Peña-Cortés H. 2004.** Analysis of the transient increase in cytosolic Ca²⁺ during the action potential of higher plants with high temporal resolution: Requirement of Ca²⁺ transients for induction of jasmonic acid biosynthesis and PINII gene expression. *Plant Cell Physiol* **45**: 456–459.
- Floková K, Tarkowská D, Miersch O, Strnad M, Wasternack C, Novák O. 2014.** UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry* **105**: 147–157.
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, et al. 2009.** (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* **5**: 344–350.
- Forde BG. 2014.** Glutamate signalling in roots. *Journal of Experimental Botany* **65**: 779–787.
- Fromm J, Lautner S. 2007.** Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant, Cell & Environment* **30**: 249–257.
- Fromm J, Spanswick R. 1993.** Characteristics of action potentials in Willow (*Salix viminalis* L.). *Journal of Experimental Botany* **44**: 1119–1125.
- Fukushima K, Fang X, Alvarez-Ponce D, et al. 2017.** Genome of the pitcher plant *Cephalotus* reveals genetic changes associated with carnivory. *Nature Ecology and Evolution* **1**: 1–9.
- Galek H, Osswald WF, Elstner EF. 1990.** Oxidative protein modification as predigestive mechanism

- of the carnivorous plant *Dionaea muscipula*: An hypothesis based on in vitro experiments. *Free Radical Biology and Medicine* **9**: 427–434.
- Gallie DR, Chang SC. 1997.** Signal transduction in the carnivorous plant *Sarracenia purpurea*. Regulation of secretory hydrolase expression during development and in response to resources. *Plant physiology* **115**: 1461–71.
- García-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodríguez-Palenzuela P. 1998.** Plant defense peptides. *Biopolymers* **47**: 479–491.
- Gasperini D, Chauvin A, Acosta IF, et al. 2015.** Axial and radial oxylipin transport. *Plant Physiology* **169**: 2244–2254.
- Gbelcová H, Repiská V, Shawkatová I. 2017.** *Nukleové kyseliny a proteiny. Analytické metody a postupy*. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave.
- Gilroy S, Bialasek M, Suzuki N, et al. 2016.** ROS, calcium, and electric signals: Key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant Physiology* **171**: 1606–1615.
- Gilroy S, Suzuki N, Miller G, et al. 2014.** A tidal wave of signals: Calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends in Plant Science* **19**: 623–630.
- Givnish TJ. 2015.** New evidence on the origin of carnivorous plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: 10–11.
- Givnish TJ, Burkhardt EL, Happel RE, Weintraub JD. 1984.** Carnivory in the bromeliad *Brocchinia reducta*, with a cost/benefit model for the general restriction of carnivorous plants to sunny, moist, nutrient-poor habitats. *American Naturalist* **124**: 479–497.
- Goh HH, Baharin A, Mohd Salleh F ‘Imadi, Ravee R, Wan Zakaria WNA, Mohd Noor N. 2020.** Transcriptome-wide shift from photosynthesis and energy metabolism upon endogenous fluid protein depletion in young *Nepenthes ampullaria* pitchers. *Scientific Reports* **10**: 1–17.
- Gould SJ, Vrba ES. 1982.** Exaptation—a missing term in the science of form. *Paleobiology* **8**: 4–15.
- Gradmann D. 1976.** “Metabolic” action potentials in *Acetabularia*. *The Journal of Membrane Biology* **29**: 23–45.
- Gradmann D. 2001.** Models for oscillations in plants In: *Australian Journal of Plant Physiology*. CSIRO, 577–590.
- Grenzi M, Bonza MC, Alfieri A, Costa A. 2021.** Structural insights into long-distance signal transduction pathways mediated by plant glutamate receptor-like channels. *New Phytologist* **229**: 1261–1267.
- Grover A. 2012.** Plant ghitinases: Genetic diversity and physiological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences* **31**: 57–73.
- Hatano N, Hamada T. 2008.** Proteome analysis of pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Journal of Proteome Research* **7**: 809–816.
- Hatano N, Hamada T. 2012.** Proteomic analysis of secreted protein induced by a component of prey in pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Journal of Proteomics* **75**: 4844–4852.
- Hedrich R, Neher E. 2018.** Venus flytrap: How an excitable, carnivorous plant works. *Trends in Plant Science* **23**: 220–234.
- Hedrich R, Salvador-Recatalà V, Dreyer I. 2016.** Electrical wiring and long-distance plant communication. *Trends in Plant Science* **21**: 376–387.
- Heyer M, Reichelt M, Mithöfer A. 2018.** A holistic approach to analyze systemic jasmonate accumulation in individual leaves of *Arabidopsis* rosettes upon wounding. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1569.

- Hlaváčková V, Krchňák P, Nauš J, Novák O, Špundová M, Strnad M. 2006.** Electrical and chemical signals involved in short-term systemic photosynthetic responses of tobacco plants to local burning. *Planta* **225**: 235–244.
- Hodick D, Sievers A. 1988.** The action potential of *Dionaea muscipula* Ellis. *Planta* **174**: 8–18.
- Hodick D, Sievers A. 1989.** On the mechanism of trap closure of Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis). *Planta* **179**: 32–42.
- Holicová T. 2015.** Předvídatelná evoluce. *Vesmír* **94**: 667–668.
- Hooke R. 1665.** *Micrographia, or, some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses: With observations and inquiries thereupon.* London: The British Library.
- Huber AE, Bauerle TL. 2016.** Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: The gap in knowledge. *Journal of Experimental Botany* **67**: 2063–2079.
- Ibarra-Laclette E, Albert VA, Pérez-Torres CA, et al. 2011.** Transcriptomics and molecular evolutionary rate analysis of the bladderwort (*Utricularia*), a carnivorous plant with a minimal genome. *BMC Plant Biology* **11**: 101.
- Iijima T, Sibaoka T. 1981.** Action potential in the trap-lobes of *Aldrovanda vesiculosa*. *Plant and Cell Physiology* **22**: 1595–1601.
- Iijima T, Sibaoka T. 1982.** Propagation of action potential over the trap-lobes of *Aldrovanda vesiculosa*. *Plant and Cell Physiology* **23**: 679–688.
- 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.
- Iosip AL, Böhm J, Scherzer S, et al. 2020.** The Venus flytrap trigger hair-specific potassium channel KDM1 can reestablish the K⁺ gradient required for hapto-electric signaling. *PLoS Biology* **18**: e3000964.
- Ishisaki K, Arai S, Hamada T, Honda Y. 2012.** Biochemical characterization of a recombinant plant class III chitinase from the pitcher of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Carbohydrate Research* **361**: 170–174.
- Ishisaki K, Honda Y, Taniguchi H, Hatano N, Hamada T. 2012.** Heterogenous expression and characterization of a plant class IV chitinase from the pitcher of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Glycobiology* **22**: 345–351.
- 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.
- Jakšová J, Rác M, Bokor B, et al. 2021.** Anaesthetic diethyl ether impairs long-distance electrical and jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **169**: 311–321.
- Jašlan D, Dreyer I, Lu J, et al. 2019.** Voltage-dependent gating of SV channel TPC1 confers vacuole excitability. *Nature Communications* **10**: 1–9.
- Jiang T, Du L, Li M. 2016.** Lighting up bioluminescence with coelenterazine: Strategies and applications. *Photochemical and Photobiological Sciences* **15**: 466–480.
- Johns S, Hagihara T, Toyota M, Gilroy S. 2021.** The fast and the furious: Rapid long-range signaling in plants. *Plant Physiology* **185**: 694–706.
- Juniper BE, Robins RJ, Joel DM. 1989.** *The carnivorous plants.* Academic Press.
- Kadota Y, Shirasu K, Zipfel C. 2015.** Regulation of the NADPH oxidase RBOHD during plant immunity. *Plant and Cell Physiology* **56**: 1472–1480.
- Kang J, Tang J, Donnelly P, Dengler N. 2003.** Primary vascular pattern and expression of ATHB-8 in

shoots of *Arabidopsis*. *New Phytologist* **158**: 443–454.

Kiep V, Vadassery J, Lattke J, et al. 2015. Systemic cytosolic Ca²⁺ elevation is activated upon wounding and herbivory in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **207**: 996–1004.

Kimberlin AN, Holtsclaw RE, Zhang T, Mulaudzi T, Koo AJ. 2022. On the initiation of jasmonate biosynthesis in wounded leaves. *Plant Physiology*: 1–18.

Kimura S, Kaya H, Kawarazaki T, et al. 2012. Protein phosphorylation is a prerequisite for the Ca²⁺-dependent activation of *Arabidopsis* NADPH oxidases and may function as a trigger for the positive feedback regulation of Ca²⁺ and reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1823**: 398–405.

King RC, Mulligan PK, Stansfield WD. 2013. *A Dictionary of Genetics*. Oxford University Press.

Klouda P. 2003. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda.

Koo AJK, Gao X, Daniel Jones A, Howe GA. 2009. A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **59**: 974–986.

Koo AJK, Howe GA. 2009. The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* **70**: 1571–1580.

Krausko M, Perutka Z, Šebela M, et al. 2017. The role of electrical and jasmonate signalling in the recognition of captured prey in the carnivorous sundew plant *Drosera capensis*. *New Phytologist* **213**: 1818–1835.

Krol E, Dziubinska H, Stolarz M, Trebacz K. 2006. Effects of ion channel inhibitors on cold- and electrically-induced action potentials in *Dionaea muscipula*. *Biologia Plantarum* **50**: 411–416.

Król E, Dziubińska H, Trębacz K. 2010. What do plants need action potentials for? In: *Action potential*. Nova Science Publisher, Inc., 1–26.

Kruse J, Gao P, Honsel A, et al. 2014. Strategy of nitrogen acquisition and utilization by carnivorous *Dionaea muscipula*. *Oecologia* **174**: 839–851.

Kumari A, Chételat A, Nguyen CT, Farmer EE. 2019. *Arabidopsis* H⁺-ATPase AHA1 controls slow wave potential duration and wound-response jasmonate pathway activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**: 20226–20231.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.

Lam HM, Chiu J, Hsieh MH, et al. 1998. Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* **396**: 125–126.

Laohavisit A, Davies JM. 2011. Annexins. *New Phytologist* **189**: 40–53.

Lecourieux D, Ranjeva R, Pugin A. 2006. Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist* **171**: 249–269.

Lee L, Zhang Y, Ozar B, Sensen CW, Schriemer DC. 2016. Carnivorous nutrition in pitcher plants (*Nepenthes* spp.) via an unusual complement of endogenous enzymes. *Journal of Proteome Research* **15**: 3108–3117.

Leubner-Metzger G, Meins F. 1999. Functions and regulation of plant beta-1,3-glucanases (PR-2) In: *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. Boca Raton: CRC Press, 49–76.

Lew TTS, Koman VB, Silmore KS, et al. 2020. Real-time detection of wound-induced H₂O₂ signalling waves in plants with optical nanosensors. *Nature Plants* **6**: 404–415.

Li M, Wang F, Li S, et al. 2020. Importers drive leaf-to-leaf jasmonic acid transmission in wound-induced systemic immunity. *Molecular Plant* **13**: 1485–1498.

Li Q, Zheng J, Li S, et al. 2017. Transporter-mediated nuclear entry of jasmonoyl-isoleucine is essential for jasmonate signaling. *Molecular Plant* **10**: 695–708.

- Libiaková M, Floková K, Novák O, Slovák L, 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**: e104424.
- Lin Q, Ané C, Givnish TJ, Graham SW. 2021.** A new carnivorous plant lineage (*Triantha*) with a unique sticky-inflorescence trap. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **118**.
- Liu JJ, Sturrock R, Ekramoddoullah AKM. 2010.** The superfamily of thaumatin-like proteins: Its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Reports* **29**: 419–436.
- Lloyd FE. 1942.** *The carnivorous plants*. Waltham, Mass., USA: Chronica Botanica Company.
- Lunevsky VZ, Zherelova OM, Vostrikov IY, Berestovsky GN. 1983.** Excitation of Characeae cell membranes as a result of activation of calcium and chloride channels. *The Journal of Membrane Biology* **72**: 43–58.
- Maffei ME, Mithöfer A, Boland W. 2007.** Before gene expression: Early events in plant–insect interaction. *Trends in Plant Science* **12**: 310–316.
- Malabarba J, Meents AK, Reichelt M, et al. 2021.** ANNEXIN1 mediates calcium-dependent systemic defense in *Arabidopsis* plants upon herbivory and wounding. *New Phytologist* **231**: 243–254.
- Malone M. 1994.** Wound-induced hydraulic signals and stimulus transmission in *Mimosa pudica* L. *New Phytologist* **128**: 49–56.
- Malone M, Stanković B. 1991.** Surface potentials and hydraulic signals in wheat leaves following localized wounding by heat. *Plant, Cell & Environment* **14**: 431–436.
- Mancuso S. 1999.** Hydraulic and electrical transmission of wound-induced signals in *Vitis vinifera*. *Australian Journal of Plant Physiology* **26**: 55–61.
- Masi E, Ciszak M, Colzi I, Adamec L, Mancuso S. 2016.** Resting electrical network activity in traps of the aquatic carnivorous plants of the genera *Aldrovanda* and *Utricularia*. *Scientific Reports* **6**: 1–11.
- Matušíková I, Salaj J, Moravčíková J, Mlynárová L, Nap JP, Libantová J. 2005.** Tentacles of in vitro-grown round-leaf sundew (*Drosera rotundifolia* L.) show induction of chitinase activity upon mimicking the presence of prey. *Planta* **222**: 1020–1027.
- McAinsh MR, Brownlee C, Hetherington AM. 1997.** Calcium ions as second messengers in guard cell signal transduction. *Physiologia Plantarum* **100**: 16–29.
- Meena MK, Prajapati R, Krishna D, et al. 2019.** The Ca²⁺ channel CNGC19 regulates *Arabidopsis* defense against spodoptera herbivory. *Plant Cell* **31**: 1539–1562.
- Meldau S, Erb M, Baldwin IT. 2012.** Defence on demand: Mechanisms behind optimal defence patterns. *Annals of Botany* **110**: 1503–1514.
- Mielke S, Gasperini D. 2019.** Interplay between plant cell walls and jasmonate production. *Plant and Cell Physiology* **60**: 2629–2637.
- Miller G, Schlauch K, Tam R, et al. 2009.** The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling* **2**: ra45–ra45.
- Millipore.** Immobilon western chemiluminescent HRP substrate | WBKLS0500. : 1–4.
- Mithöfer A, Boland W. 2012.** Plant defense against herbivores: Chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology* **63**: 431–450.
- Mithöfer A, Reichelt M, Nakamura Y. 2014.** Wound and insect-induced jasmonate accumulation in carnivorous *Drosera capensis*: Two sides of the same coin. *Plant Biology* **16**: 982–987.
- Motyka K, Hlaváč J. 2009.** *Stručný přehled separačních metod*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci.

- Mousavi SAR, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S, Farmer EE. 2013.** GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* **500**: 422–426.
- Mur LAJ, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C. 2006.** The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology* **140**: 249–262.
- Nakamura Y, Reichelt M, Mayer VE, Mithöfer A. 2013.** Jasmonates trigger prey-induced formation of “outer stomach” in carnivorous sundew plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **280**: 20130228.
- Nastuk WL, Hodgkin AL. 1950.** The electrical activity of single muscle fibers. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **35**: 39–73.
- Neuhaus JM, Sticher L, Meins F, Boller T. 1991.** A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 10362–10366.
- Nguyen CT, Kurenda A, Stolz S, Chételat A, Farmer EE. 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.
- Oelmüller R. 2021.** Threat at one end of the plant: What travels to inform the other parts? *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 3152.
- Paszota P, Escalante-Perez M, Thomsen LR, et al. 2014.** Secreted major Venus flytrap chitinase enables digestion of Arthropod prey. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1844**: 374–383.
- Pauwels L, Inzé D, Goossens A. 2009.** Jasmonate-inducible gene: What does it mean? *Trends in Plant Science* **14**: 87–91.
- Pavlovič A, Demko V, Hudák J. 2010.** Trap closure and prey retention in Venus flytrap (*Dionaea muscipula*) temporarily reduces photosynthesis and stimulates respiration. *Annals of Botany* **105**: 37–44.
- 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.
- 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.
- Pavlovič A, Saganová M. 2015.** A novel insight into the cost–benefit model for the evolution of botanical carnivory. *Annals of Botany* **115**: 1075–1092.
- Pickard BG. 1973.** Action potentials in higher plants. *Botanical Review* **39**: 172–201.
- Podlešáková K, Tarkowská D, Pěňčík A, et al. 2012.** Nové trendy v analýze fytohormonů. *Chemické Listy* **106**: 373–379.
- Poppinga S, Bauer U, Speck T, Volkov AG. 2018.** Motile traps In: *Carnivorous Plants: Physiology, Ecology, and Evolution*. Oxford University Press, 180–193.
- Poppinga S, Weisskopf C, Westermeier AS, Masselter T, Speck T. 2016.** Fastest predators in the plant kingdom: Functional morphology and biomechanics of suction traps found in the largest genus of carnivorous plants. *AoB PLANTS* **8**.
- La Porta CAM, Lionetti MC, Bonfanti S, et al. 2019.** Metamaterial architecture from a self-shaping carnivorous plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**: 18777–18782.
- Ravee R, Baharin A, Cho W, Ting T, Goh H. 2021.** Protease activity is maintained in *Nepenthes ampullaria* digestive fluids depleted of endogenous proteins with compositional changes. *Physiologia*

Plantarum **173**: 1967–1978.

Reddy ASN, Ali GS, Celesnik H, Day IS. 2011. Coping with stresses: Roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression. *Plant Cell* **23**: 2010–2032.

Renner T, Specht CD. 2012. Molecular and functional evolution of class I chitinases for plant carnivory in the Caryophyllales. *Molecular Biology and Evolution* **29**: 2971–2985.

Ricca U. 1926. Transmission of stimuli in plants. *Nature* **117**: 654–655.

Rottloff S, Miguel S, Biteau F, et al. 2016. Proteome analysis of digestive fluids in *Nepenthes* pitchers. *Annals of Botany* **117**: 479–495.

Rottloff S, Stieber R, Maischak H, Turini FG, Heubl G, Mithöfer A. 2011. Functional characterization of a class III acid endochitinase from the traps of the carnivorous pitcher plant genus, *Nepenthes*. *Journal of Experimental Botany* **62**: 4639–4647.

Ruan J, Zhou Y, Zhou M, et al. 2019. Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **20**: 2479.

Rüchel R, Steere RL, Erbe EF. 1978. Transmission-electron microscopic observations of freeze-etched polyacrylamide gels. *Journal of Chromatography A* **166**: 563–575.

Saganová M, Bokor B, Stolárik T, Pavlovič A. 2018. Regulation of enzyme activities in carnivorous pitcher plants of the genus *Nepenthes*. *Planta* **248**: 451–464.

Salvador-Recatalà V, Tjallingii FW, Farmer EE. 2014. Real-time, in vivo intracellular recordings of caterpillar-induced depolarization waves in sieve elements using aphid electrodes. *New Phytologist* **203**: 674–684.

Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF. 2002. Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* **14**: 401–417.

Schägger H. 2006. Tricine–SDS–PAGE. *Nature Protocols* **1**: 16–22.

Scherzer S, Krol E, Kreuzer I, et al. 2013. The *Dionaea muscipula* ammonium channel DmAMT1 provides NH₄⁺ uptake associated with Venus flytrap's prey digestion. *Current Biology* **23**: 1649–1657.

Schroeder JI, Hedrich R, Fernandez JM. 1984. Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* **312**: 361–362.

Schulze WX, Sanggaard KW, Kreuzer I, et al. 2012. The protein composition of the digestive fluid from the Venus flytrap sheds light on prey digestion mechanisms. *Molecular & Cellular Proteomics* **11**: 1306–1319.

Seo S, Okamoto M, Seto H, Ishizuka K, Sano H, Ohashi Y. 1995. Tobacco MAP kinase: A possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science* **270**: 1988–1992.

Serva Electrophoresis GmbH. SERVA DNA Stain G. : 1.

Serwer P. 1983. Agarose gels: Properties and use for electrophoresis. *Electrophoresis* **4**: 375–382.

Shao Q, Gao Q, Lhamo D, Zhang H, Luan S. 2020. Two glutamate- and pH-regulated Ca²⁺ channels are required for systemic wound signaling in *Arabidopsis*. *Science Signaling* **13**: eaba1453.

Sheard LB, Tan X, Mao H, et al. 2010. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1–JAZ co-receptor. *Nature* **468**: 400–405.

Shimomura O. 1995. A short story of aequorin. *The Biological bulletin* **189**: 1–5.

Shimomura Osamu. 1995. Luminescence of aequorin is triggered by the binding of two calcium ions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **211**: 359–363.

Shimomura O, Inouye S. 1996. Titration of recombinant aequorin with calcium chloride. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **221**: 77–81.

- Shimomura O, Johnson FH. 1978.** Peroxidized coelenterazine, the active group in the photoprotein aequorin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 2611–2615.
- Sibaoka T. 1962.** Excitable cells in *Mimosa*. *Science* **137**: 226.
- Sibaoka T. 1966.** Action potentials in plant organs. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **20**: 49–73.
- Sibaoka T. 1969.** Physiology of rapid movements in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* **20**: 165–184.
- Sibaoka T. 1991.** Rapid plant movements triggered by action potentials. *The Botanical Magazine Tokyo* **104**: 73–95.
- Sigma-Aldrich Co. 2010.** Spectrum™ plant total RNA kit user guide. : 1–16.
- Šimura J, Antoniadi I, Široká J, et al. 2018.** Plant hormonomics: Multiple phytohormone profiling by targeted metabolomics. *Plant Physiology* **177**: 476–489.
- Sinha M, Singh RP, Kushwaha GS, et al. 2014.** Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *The Scientific World Journal* **2014**.
- Smirnoff N, Arnaud D. 2019.** Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist* **221**: 1197–1214.
- Stahlberg R, Cleland RE, Van Volkenburgh E. 2006.** Slow wave potentials - A propagating electrical signal unique to higher plants In: *Communication in Plants: Neuronal Aspects of Plant Life*. Springer, 291–308.
- Stahlberg R, Stephens NR, Cleland RE, Van Volkenburgh E. 2006.** Shade-induced action potentials in *Helianthus annuus* L. Originate primarily from the epicotyl. *Plant Signaling & Behavior* **1**: 15–22.
- Staswick PE, Tiryaki I. 2004.** The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**: 2117–2127.
- Studnička M. 1984.** *Masožravé rostliny*. Praha: Academia.
- Suda H, Mano H, Toyota M, et al. 2020.** Calcium dynamics during trap closure visualized in transgenic Venus flytrap. *Nature Plants* **6**: 1219–1224.
- Sudisha J, Sharathchandra RG, Amruthesh KN, Kumar A, Shetty HS. 2012.** Pathogenesis related proteins in plant defense response In: *Plant Defence: Biological Control*. Springer Netherlands, 379–403.
- 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.
- Sukhov V, Surova L, Morozova E, Sherstneva O, Vodeneev V. 2016.** Changes in H⁺-ATP synthase activity, proton electrochemical gradient, and pH in Pea chloroplast can be connected with variation potential. *Frontiers in Plant Science* **07**: 1092.
- Sukhov V, Vodeneev V. 2009.** A mathematical model of action potential in cells of vascular plants. *Journal of Membrane Biology* **232**: 59–67.
- Sukhova E, Akinchits E, Sukhov V. 2017.** Mathematical models of electrical activity in plants. *Journal of Membrane Biology* **250**: 407–423.
- Sydenham PH, Findlay GP. 1973.** Solute and water transport in the bladders of *Utricularia* In: *Ion Transport in Plants*. Elsevier, 583–587.
- Takeuchi Y, Salcher MM, Ushio M, et al. 2011.** *In situ* enzyme activity in the dissolved and particulate fraction of the fluid from four pitcher plant species of the genus *Nepenthes*. *PLoS ONE* **6**: e25144.

- Tarkowski P, Doležal K, Strnad M. 2004.** Analytické metody studia cytokininů. *Chemické Listy* **98**: 834–841.
- Thermo Fisher Scientific Inc. 2016.** TRIzol reagent user guide: 1–6.
- Thines B, Katsir L, Melotto M, et al. 2007.** JAZ repressor proteins are targets of the SCFCO11 complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**: 661–665.
- Toyota M, Spencer D, Sawai-Toyota S, et al. 2018.** Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science* **361**: 1112–1115.
- Ueda M, Tokunaga T, Okada M, et al. 2010.** Trap-closing chemical factors of the Venus flytrap (*Dionaea muscipulla* Ellis). *ChemBioChem* **11**: 2378–2383.
- Umrath K. 1930.** Untersuchungen über plasma und plasmaströmung an Characeen - IV. Potentialmessungen an *Nitella mucronata* mit besonderer nerücksichtigung der erregungserscheinungen. *Protoplasma* **9**: 576–597.
- Vadassery J, Ballhorn DJ, Fleming SR, et al. 2019.** Neomycin: An effective inhibitor of jasmonate-induced reactions in plants. *Journal of Plant Growth Regulation* **38**: 713–722.
- Vadassery J, Reichelt M, Jimenez-Aleman GH, Boland W, Mithöfer A. 2014.** Neomycin inhibition of (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine accumulation and signaling. *Journal of Chemical Ecology* **40**: 676–686.
- La Verde V, Dominici P, Astegno A. 2018.** Towards understanding plant calcium signaling through calmodulin-like proteins: A biochemical and structural perspective. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 1331.
- Vodeneev V, Akinchits E, Sukhov V. 2015.** Variation potential in higher plants: Mechanisms of generation and propagation. *Plant Signaling and Behavior* **10**: e1057365.
- Vodeneev VA, Opritov VA, Pyatygin SS. 2006.** Reversible changes of extracellular pH during action potential generation in a higher plant *Cucurbita pepo*. *Russian Journal of Plant Physiology* **53**: 481–487.
- Vodeneev V, Orlova A, Morozova E, et al. 2012.** The mechanism of propagation of variation potentials in wheat leaves. *Journal of Plant Physiology* **169**: 949–954.
- Volkov AG, Adesina T, Jovanov E. 2007.** Closing of Venus flytrap by electrical stimulation of motor cells. *Plant Signaling and Behavior* **2**: 139–145.
- Wan Zakaria W, Aizat WM, Goh H-H, Mohd Noor N. 2019.** Protein replenishment in pitcher fluids of *Nepenthes × ventrata* revealed by quantitative proteomics (SWATH-MS) informed by transcriptomics. *Journal of Plant Research* **132**: 681–694.
- Wan Zakaria WNA, Aizat WM, Goh HH, Noor NM. 2018.** Proteomic analysis of pitcher fluid from *Nepenthes × ventrata*. *Data in Brief* **17**: 517–519.
- Wan Zakaria W, Loke KK, Goh HH, Mohd Noor N. 2016.** RNA-seq analysis for plant carnivory gene discovery in *Nepenthes × ventrata*. *Genomics Data* **7**: 18–19.
- War AR, Paulraj MG, Ahmad T, et al. 2012.** Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling and Behavior* **7**: 1306–1320.
- Williams SE, Pickard BG. 1972.** Receptor potentials and action potentials in *Drosera* tentacles. *Planta* **103**: 193–221.
- Williams SE, Pickard BG. 1980.** The role of action potentials in the control of capture movements of *Drosera* and *Dionaea* In: *Plant growth substances 1979*. Springer, Berlin, Heidelberg, 470–480.
- Williams SE, Spanswick RM. 1976.** Propagation of the neuroid action potential of the carnivorous plant *Drosera*. *Journal of Comparative Physiology A* **108**: 211–223.

- Wudick MM, Michard E, Oliveira Nunes C, Feijó JA. 2018.** Comparing plant and animal glutamate receptors: Common traits but different fates? *Journal of Experimental Botany* **69**: 4151–4163.
- Wudick MM, Portes MT, Michard E, et al. 2018.** CORNICHON sorting and regulation of GLR channels underlie pollen tube Ca²⁺ homeostasis. *Science* **360**: 533–536.
- Xie DX, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M, Turner JG. 1998.** COI1: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**: 1091–1094.
- Yan C, Fan M, Yang M, et al. 2018.** Injury activates Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphorylation of JAV1-JAZ8-WRKY51 complex for jasmonate biosynthesis. *Molecular Cell* **70**: 136–149.
- Yan J, Li S, Gu M, et al. 2016.** Endogenous bioactive jasmonate is composed of a set of (+)-7- iso- JA-amino acid conjugates. *Plant Physiology* **172**: 2154–2164.
- Yilamujiang A, Reichelt M, Mithöfer A. 2016.** Slow food: Insect prey and chitin induce phytohormone accumulation and gene expression in carnivorous *Nepenthes* plants. *Annals of botany* **118**: 369–75.
- Yokawa K, Kagenishi T, Pavlovic A, et al. 2017.** Anaesthetics stop diverse plant organ movements, affect endocytic vesicle recycling and ROS homeostasis, and block action potentials in Venus flytraps. *Annals of Botany* **122**: 747–756.
- Yuen CCY, Christopher DA. 2013.** The group IV-A cyclic nucleotide-gated channels, CNGC19 and CNGC20, localize to the vacuole membrane in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany PLANTS* **5**.
- Zandalinas SI, Fichman Y, Mittler R. 2020.** Vascular bundles mediate systemic reactive oxygen signaling during light stress. *The Plant Cell* **32**: 3425–3435.
- Zhai Q, Zhang X, Wu F, et al. 2015.** Transcriptional mechanism of jasmonate receptor COI1-mediated delay of flowering time in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **27**.
- Zimm BH, Levene SD. 1992.** Problems and prospects in the theory of gel electrophoresis of DNA. *Quarterly Reviews of Biophysics* **25**: 171–204.
- Zimmermann MH. 1983.** *Xylem Structure and the Ascent of Sap*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Zimmermann MR, Maischak H, Mithöfer A, Boland W, Felle HH. 2009.** System potentials, a novel electrical long-distance apoplastic signal in plants, induced by wounding. *Plant Physiology* **149**: 1593–1600.
- Zimmermann MR, Mithöfer A, Will T, Felle HH, Furch ACU. 2016.** Herbivore-triggered electrophysiological reactions: Candidates for systemic signals in higher plants and the challenge of their identification. *Plant Physiology* **170**: 2407–2419.
- Zulkapli MM izzuddin, Rosli MAF, Salleh FIM, Mohd Noor N, Aizat WM, Goh HH. 2017.** Iso-Seq analysis of *Nepenthes ampullaria*, *Nepenthes rafflesiana* and *Nepenthes* × *hookeriana* for hybridisation study in pitcher plants. *Genomics Data* **12**: 130–131.
- Zymo Research. 2021.** DNA Clean & Concentrator ®-5. : 1–15.

Publikace 0.

**Triggering a false alarm: wounding mimics prey capture in the carnivorous
Venus flytrap (*Dionaea muscipula*)**

Název: Triggering a false alarm: wounding mimics prey capture in the carnivorous Venus flytrap (*Dionaea muscipula*)

Autoři: Pavlovič A., Jakšová J., Novák O.

Status: publikována v roce 2017 v *New Phytologist*

DOI: 10.1111/nph.14747

Souhrn:

Opakovaná mechanická stimulace spouštěcích výčnělků, které vystupují z pokožky uvnitř pasti mucholapky podivné (*Dionaea muscipula*), vyvolává elektrické signály (akční potenciály) a spouští jasmonátovou signalizaci a expresi genů trávicích enzymů, které jsou příbuzné s proteiny související s patogenezí. Tato sekvence událostí připomíná dobře známou signální dráhu obrany rostlin v odpovědi na útok patogena nebo býložravce. V této studii byla sledována elektrická signalizace, hromadění jasmonátů v pletivu pasti a vylučování trávicích enzymů v odpovědi na chycení kořisti, umělou mechanickou stimulaci spouštěcích výčnělků a poranění, aby byla dokázána podobnost mezi obranným mechanismem a masožravostí rostlin. Výsledky ukázaly, že mucholapka podivná nedokáže rozpoznat poranění od mechanické stimulace spouštěcích výčnělků kořistí. Oba typy stimulace vyvolaly stejné akční potenciály, rychlé sklapnutí pasti, hermetické uzavření, akumulaci kyseliny jasmonové (JA) a jejího isoleucinového konjugátu (JA-Ile), sekreci aspartátových a cysteinových proteáz, fosfatáz a chitináz typu I. Zevní podání JA vyvolalo taktéž sekreci trávicích enzymů, což potvrdilo zapojení signalizace kyseliny jasmonové v masožravosti rostlin.

Navzdory sofistikovanému systému rozpoznávající kořist tedy tato studie ukazuje, že mucholapka může být jednoduše pomýlena poškozením, typickým aktivátorem obranné reakce rostlin. U mucholapky poškození pasti aktivuje rychlé sklapnutí pasti, její hermetické uzavření a sekreci trávicí tekutiny obsahující enzymy, je vyvolána tedy typická masožravá reakce. Tato skutečnost je výsledkem její evoluční historie a exaptace chování, tedy evolučního posunu ve funkci vlastnosti, což naznačuje, že tyto rostliny pravděpodobně používají stejné vnímání a signální dráhu a nedokáže rozlišit mezi přítomností kořisti nebo býložravého hmyzu.

Akumulace jasmonátů a sekrece enzymů v odpovědi na poranění i krmení byla potvrzena pouze v lokálních pastech, což koreluje se šířením elektrických signálů. Znamená to, že na rozdíl od obranného mechanismu rostlin mucholapka postrádá systémovou odpověď, což může představovat účinnou strategii šetření energetických zdrojů. Pro mucholapku by bylo velmi energeticky náročné produkovat trávicí tekutinu také v sousedních pastech, které nechytili žádnou kořist. Modifikací systémové elektrické signalizace známé u běžných rostlin do lokální v průběhu evoluce tak minimalizovali energetické náklady spojené s masožravostí.

V době publikování tohoto článku se má za to, že botanická masožravost se vyvinula z obranných mechanismů rostlin, což podporuje i skutečnost, že mnoho proteinů vylučovaných v reakci na zachycení kořisti souvisí s patogenezí.

Příspěvní autorů:

Výzkum:

- příprava a odebrání materiálů pro měření: J. Jakšová
- měření elektrických signálů: J. Jakšová
- kvantifikace fytohormonů: J. Jakšová, O. Novák
- měření enzymových aktivit: J. Jakšová
- SDS-PAGE a Western bloty: J. Jakšová
- Konceptualizace: A. Pavlovič

Supervize: A. Pavlovič, O. Novák

Vizualizace: A. Pavlovič

Statistická analýza: A. Pavlovič, O. Novák

Psaní – původní rukopis: A. Pavlovič

Psaní – editace: A. Pavlovič

Získání financování: A. Pavlovič, O. Novák

Podíl J. Jakšové: 40 %

Triggering a false alarm: wounding mimics prey capture in the carnivorous Venus flytrap (*Dionaea muscipula*)

Andrej Pavlovič¹, Jana Jakšová^{1,2} and Ondřej Novák²

¹Department of Biophysics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, CZ-783 71, Olomouc, Czech Republic; ²Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany ASCR and Palacký University, Šlechtitelů 11, CZ-783 71, Olomouc, Czech Republic

Author for correspondence:
Andrej Pavlovič
Tel: +420 585 634 831
Email: andrej.pavlovic@upol.cz

Received: 14 March 2017
Accepted: 14 July 2017

New Phytologist (2017)
doi: 10.1111/nph.14747

Key words: action potential, carnivorous plant, defence, digestive enzyme, electrical signal, jasmonic acid (JA), systemic response, Venus flytrap.

Introduction

Plants are sessile organisms that are anchored to the ground through their root systems, so they have evolved diverse strategies to combat herbivores. These include mechanical defences such as prickles in the rose or chemical deterrents such as moroidin in the stinging tree. However, some plants do not invest in constitutive defensive structures or metabolites and rely on the initiation of defence responses. This requires sensing and communication elements. A localized injury activates defence mechanisms throughout the plant, both in the directly damaged tissue (local response) as well as the nonwounded areas (systemic response). The phytohormone jasmonic acid (JA) plays an indispensable role in this process (Wasternack & Hause, 2013). Jasmonates exert their protective effects by regulating a wide range of defence-related processes, including the synthesis of toxic secondary metabolites (Pauwels *et al.*, 2009; De Geyter *et al.*, 2012), the production of morphological barriers (Yoshida *et al.*, 2009) and changes in the rate of vegetative growth (Yan *et al.*, 2007; Zhang & Turner, 2008). The isoleucine conjugate of jasmonic acid (JA-Ile) is the only jasmonate for which the molecular basis of its gene-regulatory activity has been elucidated. The binding of JA-Ile to the CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1) receptor

Summary

- In the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*), the sequence of events after prey capture resembles the well-known plant defence signalling pathway in response to pathogen or herbivore attack. Here, we used wounding to mimic prey capture to show the similarities and differences between botanical carnivory and plant defence mechanisms.
- We monitored movement, electrical signalling, jasmonate accumulation and digestive enzyme secretion in local and distal (systemic) traps in response to prey capture, the mechanical stimulation of trigger hairs and wounding.
- The Venus flytrap cannot discriminate between wounding and mechanical trigger hair stimulation. Both induced the same action potentials, rapid trap closure, hermetic trap sealing, the accumulation of jasmonic acid (JA) and its isoleucine conjugate (JA-Ile), and the secretion of proteases (aspartic and cysteine proteases), phosphatases and type I chitinase. The jasmonate accumulation and enzyme secretion were confined to the local traps, to which the stimulus was applied, which correlates with the propagation of electrical signals and the absence of a systemic response in the Venus flytrap.
- In contrast to plant defence mechanisms, the absence of a systemic response in carnivorous plant may represent a resource-saving strategy. During prey capture, it could be quite expensive to produce digestive enzymes in the traps on the plant without prey.

mediates the ubiquitin-dependent degradation of JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) repressors, resulting in the activation of jasmonate-dependent gene expression (Thines *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2009; Sheard *et al.*, 2010). However, signalling activity has also been demonstrated for other jasmonate molecules for which the molecular mechanism is largely unknown, such as *cis*(+)-12-oxo-phytodienoic acid (*cis*-OPDA) or 12-hydroxyjasmonic acid glucoside (Stelmach *et al.*, 1998; Blechert *et al.*, 1999; Stintzi *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2011).

It has been suggested that the events leading to jasmonate accumulation distal to the wound (systemic response) can be reduced by two principal mechanisms: the transport of jasmonates between cells (cell-nonautonomous pathway typical for family Solanaceae; Schilmiller & Howe, 2005; Wasternack *et al.*, 2006) and a rapid electrical, hydraulic or chemical signal that triggers JA synthesis in distal leaves (autonomous pathway typical for the model plant *Arabidopsis*, Glauser *et al.*, 2008; Koo *et al.*, 2009; Koo & Howe, 2009; Mousavi *et al.*, 2013; Farmer *et al.*, 2014; Gaupels *et al.*, 2017). Moreover, both pathways may work synergistically to optimize the spatial and temporal expression of defence responses (Koo & Howe, 2009; Huber & Bauerle, 2016). However, a recent study has demonstrated the importance of electrical signalling in long-distance communication in

Arabidopsis (Mousavi *et al.*, 2013). Three main types of electrical signals have been recognized in plants: action potentials (APs), variation potentials (VPs) and systemic potentials (SPs; Fromm & Lautner, 2007; Zimmermann *et al.*, 2009). Of these, APs have long been understood as rapidly self-propagated electrical signals evoked by nondamaging stimuli (e.g. cold shock or touch). They usually have an all-or-nothing character; that is, after a stimulus reaches a certain threshold, further increases in the strength of the stimulus do not change its amplitude and shape. By contrast, VPs are slow-wave potentials (SWPs) evoked by damaging stimuli (e.g. burning or wounding), and the strength of the signal varies with the intensity of the stimulus with longer delayed repolarization. The VP is characterized by amplitudes and speeds that decrease with increasing distance from the site of injury, so it is nonself-propagating (Fromm & Lautner, 2007; Fromm *et al.*, 2013). It has been hypothesized that VPs are induced by axial hydraulic waves in the xylem that affect the mechanosensitive ion channel in contact cells by radially transmitted changes in pressure (Cosgrove & Hedrich, 1991; Mancuso, 1999; Farmer *et al.*, 2014) or, if a chemical is transported, via the ligand-activated channel (Malone, 1996). The SPs have only recently been recognized as self-propagating signals with reverse polarity (membrane hyperpolarization as opposed to the depolarization in APs and VPs) that display an all-or-nothing character and are not caused by a hydraulic pressure surge (Zimmermann *et al.*, 2009, 2016). Some authors use a different classification for electrical signaling based on animal electrophysiology and recognize, for example, electrotonic (or graded) potentials whose amplitude exponentially decreases with distance but that are not caused by a change in hydraulic pressure (Volkov *et al.*, 2007, 2008, 2013, 2017). At all sites that receive the electrical signals, jasmonates accumulate, and jasmonate-mediated gene expression is activated (Wildon *et al.*, 1992; Mousavi *et al.*, 2013; Farmer *et al.*, 2014). The recognition of the jasmonate signal in leaves distal to a wound initiates a defence reaction and may lead to priming, which evidently comprises changes at the molecular level and leads to a so-called primed state in undamaged leaves. Leaves in a primed state are then able, through poorly understood mechanisms, to respond more quickly or vigorously to herbivore attack should it occur (Frost *et al.*, 2008).

The fact that electrical signals are important for sensing insect prey on the surface of a trap in some species of carnivorous plants has been known for centuries (Burdon-Sanderson, 1873; Hodick & Sievers, 1988), but the role of jasmonates in botanical carnivory has been resolved only recently (Ueda *et al.*, 2010; Escalante-Pérez *et al.*, 2011; Nakamura *et al.*, 2013; Libiaková *et al.*, 2014). Such similarity to plant defence is not surprising because it has previously been postulated that botanical carnivory probably evolved from plant defence mechanisms (Hatano & Hamada, 2008; Mithöfer, 2011; Rottloff *et al.*, 2011; Schulze *et al.*, 2012; Nishimura *et al.*, 2014; Pavlovič & Saganová, 2015; Bemm *et al.*, 2016; Krausko *et al.*, 2017). Mechanical stimuli from prey result in generation of electrical signals, and the subsequent accumulation of jasmonates triggers the expression of genes related to carnivory. For example, touching the trigger hairs on the surface of the Venus flytrap twice generates two APs that are

necessary for rapid trap closure at room temperature (Hodick & Sievers, 1988) and the activation of jasmonate signalling (Böhm *et al.*, 2016a). Jasmonates trigger the expression and secretion of digestive enzymes (e.g. cysteine protease dionain and type I chitinase), the ammonium channel, and potassium and sodium transporters (Escalante-Pérez *et al.*, 2011; Scherzer *et al.*, 2013, 2015; Libiaková *et al.*, 2014; Paszota *et al.*, 2014; Böhm *et al.*, 2016a, b). The electrical and jasmonate signalling in carnivorous plants resembles the well-known plant defence signalling pathway (Maffei *et al.*, 2007; Pavlovič & Saganová, 2015; Bemm *et al.*, 2016), but there is little information about long-distance signalling in carnivorous plants.

In the present study, we investigated the long-distance electrical and jasmonate signalling in the Venus flytrap carnivorous plant. We applied mechanical stimulation (the typical activator of the carnivorous response) and repeated wounding (i.e. the typical activator of the defence response) and measured the electrical signals, jasmonate content and enzyme secretion in local and distal traps to answer the following questions: can the carnivorous plant recognize different stimuli to trigger the appropriate response? Can the trap that successfully captured its prey inform distal systemic traps about the event and prime them for potential capture in the sense that if there is one prey item then there may be more, or does each trap behave independently? The results presented here support the hypothesis that electrical signalling is not specific and that each trap behaves independently.

Materials and Methods

Plant material and culture conditions

The Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis.) is native to subtropical wetlands of North and South Carolina on the East Coast of the United States. Experimental plants were grown under standard glasshouse conditions at the Department of Biophysics of Palacký University in Olomouc (Czech Republic). Well-drained peat moss in plastic pots placed in a tray filled with distilled water to a depth of 1–2 cm was used as a substrate. Daily temperatures fluctuated between 20 and 35°C; relative air humidity ranged from 50% to 100%; and the maximum daily irradiance reached 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetically active radiation (PAR).

Measurements of electrical signals

The extracellular electrical potential was recorded inside a Faraday cage using a noninvasive device according to Ilík *et al.* (2010) and Libiaková *et al.* (2014) under standard laboratory conditions (room temperature of $23 \pm 1^\circ\text{C}$ and relative air humidity of $50 \pm 5\%$). The electrical signals were measured on two fully developed traps with nonpolarizable Ag–AgCl surface electrodes (Scanlab Systems, Praha, Czech Republic) that were fixed to the abaxial side of the trap or the lower photosynthetic part of the leaf and moistened with a drop of conductive EV gel (VUP, Prievidza, Slovakia) that is commonly used in electrocardiography. A stimulus was applied to some of the monitored traps,

which were considered local, and other traps were observed for a systemic response (Fig. 1). The local trap was fed an insect, and the electrical response in both the local and systemic traps was monitored for several hours. Because the live prey did not provide stable conditions and periodic electrical signals, which can be directly compared to wounding, and because insect prey can also contaminate digestive fluid with foreign proteins, we performed a second experiment. In this experiment, the trap was closed, gently fixed in a clip and then mechanically stimulated 40 times with the tip of a pipette (which had been melted by heat and then hardened at room temperature to avoid a wound response by sharp tip) every 3 min for 2 h. In the next experiment, a closed local trap was fixed in a clip and pierced with a needle 40 times every 3 min. The reference electrodes were submerged in a dish filled with 1–2 cm of water beneath the pot. The electrodes were connected to two independent channels of an amplifier that had been made in-house (gain: 1–1000, noise: 2–3 mV, bandwidth (–3 dB): 10^5 Hz, response time: 10 μ s, input impedance: 10^{12} Ω). The signals from the amplifier were transferred to an analogue-digital PC data converter (12-bit converter, ± 10 V, PCA-7228AL supplied by TEDIA, Plzeň, Czech Republic), and the data were collected every 6 ms. The sensitivity of the device was 13 μ V. Moistened electrodes were equilibrated on the leaves for approximately half an hour before measurement. At least five measurements were performed for each type of experiment.

Quantification of phytohormones

In many plant species, not all leaves are directly connected by vascular bundles, for example, parastichies in *Arabidopsis*

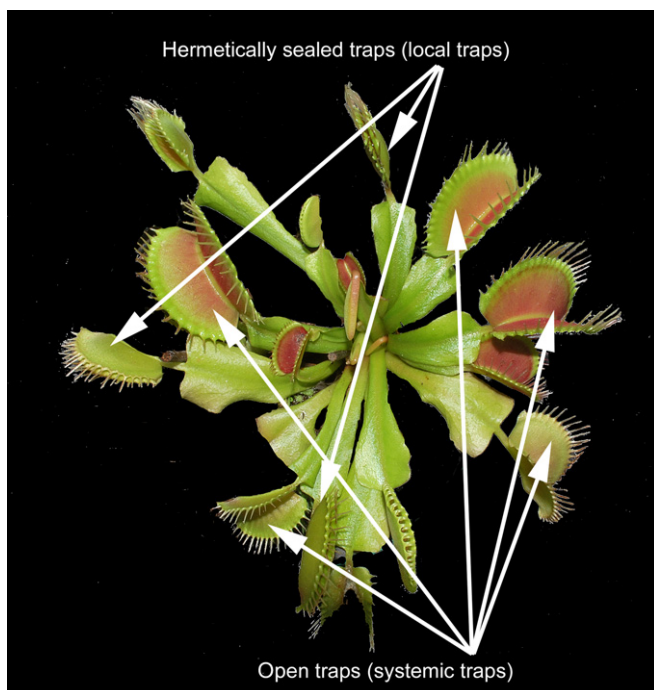


Fig. 1 Experimental setup. The local and systemic traps of the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*) are denoted.

(Mousavi *et al.*, 2013). Venus flytrap has a rosette with five to ten leaves that arise from a short, bulb-like, subterranean stem. The leaves are probably vascularly connected as indicated by isotopic labelling experiments (Fasbender *et al.*, 2017) and the exogenous application of coronatine (Escalante-Pérez *et al.*, 2011). To avoid uncertainty about the possible absence of a vascular connection, the three or four traps of a single Venus flytrap plant were fed insects at different time points to intensify a possible systemic response, and the fed traps were harvested at 1, 18, 24 and 168 h (1 wk) after prey capture. The remaining four fully developed nonfed traps (systemic traps) within the same rosette of leaves on the same plants were harvested at the same time (Fig. 1). In the second experiment, two or three traps were either mechanically stimulated with pipette tips or pierced with a needle 40 times every 3 min, and after 2 h, those traps and the traps within the individual leaf rosettes were harvested. As a control, traps were also harvested on plants where none of the traps were fed, mechanically stimulated or injured as a control. Because wounding leaf tissue by cutting is known to increase the concentration of jasmonates, we used a rapid method of sample collection (Glauser *et al.*, 2008), by which the samples were cut and immediately (within 10 s) frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. We analysed JA, JA-Ile, cis-OPDA, abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA) and indole-3-acetic acid (IAA) contents. Frozen plant material (10 mg) was homogenized using an MM 301 vibration mill (Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Germany) at a frequency of 27 Hz for 3 min and extracted with 1 ml of ice cold 10% MeOH/ H_2O (v/v) extraction solution in the presence of stable, isotopically labelled internal standards ($[^2\text{H}_6]$ -(\pm)-JA, $[^2\text{H}_2]$ -(-)-JA-Ile, $[^2\text{H}_5]$ -IAA, $[^2\text{H}_4]$ -SA, $[^2\text{H}_6]$ -(+)-cis,trans-ABA, $[^2\text{H}_5]$ -OPDA) provided by Olchemim (Olomouc, Czech Republic). The samples were incubated for 20 min at 4°C by shaking using a laboratory rotator and centrifuged (3 min, 36 670 g, 4°C). The collected supernatants were further purified by solid-phase extraction (SPE). After the sample application onto equilibrated 30 mg polymer-based solid-phase sorbent (Oasis[®] HLB, Waters), the columns were washed with 1 ml of extraction solution, and the analytes were eluted by 3 ml of 80% MeOH/ H_2O (v/v). Samples were evaporated to dryness under the nitrogen stream and dissolved in 30 μ l of mobile phase (15% acetonitrile: 85% 10 mM HCOOH, v/v). The final analysis of the selected phytohormones was performed with an Acquity UPLC[®] I-Class System (Waters, Milford, MA, USA) coupled to a Xevo[™] TQ-S quadrupole mass spectrometer (Waters MS Technologies, Manchester, UK) under the following conditions. Reversed-phase separation was performed using an Acquity UPLC CSH[®] C₁₈ (100 \times 2.1 mm; 1.7 μ m; Waters) column, and the analytes were eluted with linear (0–5 min, 15% A; 5–15 min, 45% A), logarithmic (15–28 min, 48.6% A) and linear (28–29 min, 100% A) gradients of acetonitrile (A) and 10 mM formic acid (B), as mobile phases, at a 0.4-ml min⁻¹ flow rate. Phytohormones were determined in the multiple reaction monitoring mode using the following mass transitions: 215.2 > 58.8,

326.2 > 151.1, 181.2 > 134.1, 141.1 > 96.8, 269.2 > 159.1, 209.2 > 58.8, 324.3 > 151.2, 293.3 > 275.3, 176.3 > 130.2, 137.1 > 92.8, 263.2 > 153.1 for [$^2\text{H}_6$]-(\pm)-JA, [$^2\text{H}_2$]-(-)-JA-Ile, [$^2\text{H}_3$]-IAA, [$^2\text{H}_4$]-SA, [$^2\text{H}_6$]-(+)-*cis,trans*-ABA, (-)-JA, (-)-JA-Ile, *cis*-(+)-OPDA, IAA, SA and ABA, respectively. Optimized MS/MS measurement parameters were as follows: capillary/cone voltage, 3 kV/23–30 V; source/desolvation temperature, 120/550°C; cone/desolvation gas flow, 70/650 l h $^{-1}$; collision energy, 12–23 eV; collision gas flow, 0.21 ml min $^{-1}$. Quantification was carried out by using the isotope dilution method, and calibration curves with good correlation coefficients (0.9963–0.9999) were obtained (Floková *et al.*, 2014). Two independent technical measurements were performed on four to eight biological replicates.

Biotest

We were interested in whether a trap is more sensitive (i.e. is in the primed state) when neighbouring traps on the same individual plant digest animal prey. Therefore, two or three traps on single plants were fed, and after 24 h, when the digestive fluid was secreted, the remaining neighbouring, open, unfed traps (systemic) were tested for sensitivity (Fig. 1) by counting the number of touches necessary for rapid trap closure. Plants without any digested animals in the traps were used as a control. Fifteen plants with several tested traps (three to seven per plant) were used for each group.

Measurements of enzyme activities

The digestive fluid was collected after 48 h, when a sufficient amount was secreted, by forcing a pipette in between the trap lobes. Digestive fluids secreted in response to mechanical stimulation, wounding and the exogenous application of 20 μl of 2 mM (\pm)-jasmonic acid (hereinafter referred as JA) were collected. To measure the activity of acid phosphatases, we used the chromogenic substrate 4-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich). The substrate was prepared in 50 mM acetate buffer (pH 5.0), and the concentration was 5 mM. Twenty-five microlitres of the collected fluid was added to 525 μl of 50 mM acetate buffer (pH 5.0) and mixed with 400 μl of the substrate. As a control, 400 μl of the substrate solution was mixed with 550 μl of the acetate buffer. Mixed samples were incubated at 25°C for 1 h and then 160 μl of 1.0 N NaOH was added to terminate the reaction. Absorbance was measured at 405 nm with a Specord 250 Plus double-beam spectrophotometer (Analytik Jena, Germany). A calibration curve was determined using 4-nitrophenol.

Endochitinase activity was measured using a chitinase assay kit (Sigma Aldrich) with 4-nitrophenyl β -D-N,N',N''-triacylchitotriose as a substrate. Twenty-five microlitres of the collected fluid was added to 175 μl of substrate at a concentration 0.2 mg ml $^{-1}$. Mixed samples were incubated at 37°C for 24 h and then 400 μl of stop solution (sodium carbonate) was added to terminate the reaction. As a control, 200 μl of the substrate solution was also incubated. Absorbance was measured at 405 nm with a Specord 250 Plus double-beam spectrophotometer

(Analytik Jena). A calibration curve was determined using 4-nitrophenol.

The proteolytic activity of the leaf exudates was determined by incubating 150 μl of a sample with 150 μl of 2% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in 200 mM glycine-HCl (pH 3.0) at 37°C for 1 h. The reaction was stopped by the addition of 450 μl of 5% (w/v) trichloroacetic acid (TCA). Samples were incubated on ice for 10 min and centrifuged at 20 000 g for 10 min at 4°C. The amount of released non-TCA-precipitable peptides was used as a measure of proteolytic activity, which was determined by comparing the absorbance of the supernatant at 280 nm to a blank sample with a Specord 250 Plus double-beam spectrophotometer (Analytik Jena). One unit of proteolytic activity is defined as an increase of 0.001 per min in the absorbance at 280 nm (Matusšíková *et al.*, 2005).

SDS-PAGE and Western blots

To detect and quantify cysteine protease (dionain), aspartic protease (dionaeasin) and type I chitinase, polyclonal antibodies against these proteins were raised in rabbits by Agrisera (Vännäs, Sweden) and Genscript (Piscataway, NJ, USA). The following amino acid sequences (epitopes) were synthesized: cysteine protease, (NH $_2$ -) CAFQYVVNNQGIDTE (-CONH $_2$) (Agrisera, Vännäs, Sweden); aspartic protease and type I chitinase, (NH $_2$ -) SAIMDTGSDLIWTQC (-CONH $_2$) and (NH $_2$ -) CTS-HETTGGWATAPD (-CONH $_2$), respectively (Genscript, Piscataway, NJ, USA). All sequences were coupled to a carrier protein (keyhole limpet haemocyanin, KLH) and injected into two rabbits each. The terminal cysteine of the peptide was used for conjugation. The rabbit serum was analysed for the presence of antigen-specific antibodies using an ELISA test.

The digestive fluid collected for the enzyme assays was subjected to Western blotting. The samples were heated and denatured for 30 min at 70°C and mixed with modified Laemmli sample buffer to a final concentration of 50 mM tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 1% β -mercaptoethanol, 12.5 mM EDTA, and 0.02% bromophenol blue. The same volume of digestive fluid was electrophoresed in 10% (v/v) SDS-polyacrylamide gel (Schägger, 2006). The proteins in the gels were either visualized by silver staining (ProteoSilver; Sigma Aldrich) or transferred from the gel to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad) using a Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). After blocking in TBS-T containing 5% BSA overnight, the membranes were incubated with the primary antibody for 1 h at room temperature, and after washing, the membrane was incubated with the secondary antibody: the goat antirabbit IgG (H + L)-horseradish peroxidase conjugate (Bio-Rad). Blots were visualized and chemiluminescence was quantified by an Amersham Imager 600 gel scanner (GE HealthCare Life Sciences, Tokyo, Japan).

Statistical analyses

The results are presented as the means \pm SE. Significant differences among the treatments were evaluated by one-way ANOVA

followed by Tukey's test (Origin 2015, Northampton, MA, USA).

Results

Electrical and jasmonate signalling in response to insect capture

In order to monitor electrical and jasmonate signalling in response to prey capture, we placed a fly on the surface of a trap. Touching the trigger hairs twice generated two APs and rapid trap closure (Supporting Information Fig. S1), and the struggling insect continued to stimulate the hairs in the closed trap, resulting in the generation of hundreds of APs. Several minutes after prey capture, the APs were very frequently evoked by the frantic movements of the prey inside the closed trap but were more sporadic later (Fig. 2a), and after 4–5 h, the electrical activity usually ceased. The APs did not spread into the lower photosynthetic part of the leaf; only a small disturbance of membrane potential was sometimes recorded (Fig. S2). Systemic traps were simultaneously monitored for electrical activity, but no APs were detected for 5 h (Fig. 2a). We repeated this experiment several times with the same results. We analysed the tissue phytohormone concentrations in traps on the same plants that had trapped animal prey for 1, 18, 24 and 168 h to establish different digestion time points to monitor the systemic response. Due to the huge variance in the accumulation of jasmonates in the fed traps at the different time points during the digestive period (1–168 h), no statistical significance was apparent, but the average concentrations of JA, JA-Ile and *cis*-OPDA increased 12-, 1.3- and four-fold, respectively, compared to unfed traps (Fig. 2b). None of the systemic traps accumulated a significant amount of jasmonates; the low average values were comparable to the amount in the control traps (Fig. 2b). The kinetics of jasmonate accumulation revealed that high concentrations of JA and JA-Ile mainly accumulated in the local traps in the early phase of the response (after the first hour when the extensive mechanical stimulation from the prey elicited hundreds of APs; Fig. 2a) and then declined. By contrast, a high concentration of *cis*-OPDA was accumulated later in the digestive cycle (Fig. S3). Based on the measurements of the electrical signals and jasmonate concentrations, the traps that digested insect prey for different durations did not affect the sensitivity of other traps on the same plants, which indicated the absence of a systemic response and priming; two touches were still required for rapid trap closure (Fig. 2c).

Wounding mimics the mechanical stimulation by insect prey

Because the movement of the live prey inside the traps was unpredictable and the insect prey could contaminate the traps with foreign animal proteins, we replaced the live prey with mechanical stimulation of the trigger hairs. This allowed us to perform the experiment under more controlled conditions because the Venus

flytrap can count the number of APs (Böhm *et al.*, 2016a). Touching the trigger hairs two times within 20 s provoked rapid trap closure (Fig. S1), and mechanical stimulation allowed us to then periodically deliver stimuli every 3 min. Typical APs were generated, which induced hermetic trap sealing and the secretion of digestive fluid within 2 h (Fig. 3a,b; Video S1). To investigate the wound response, the trap was first pierced with a needle twice within 20 s to induce rapid trap closure. Then, the local trap was pierced with a needle at the same time intervals as the mechanical stimulation, which surprisingly evoked the same APs as those generated in response to touch and induced hermetic trap sealing and digestive fluid secretion (Fig. 3c,d; Video S2). In both cases, no APs were recorded in the systemic traps (Fig. 3b,d). After 2 h of stimulation, the local and systemic traps were harvested to investigate the phytohormone concentration, and we found a 183-fold increase in the concentration of JA and a 302-fold increase in JA-Ile in the local, mechanically stimulated traps but not in the systemic traps (Fig. 4a). Wounding also increased JA (51-fold increase) and JA-Ile (14-fold increase) concentrations in the local but not systemic traps (Fig. 4b). The concentrations of *cis*-OPDA, ABA, IAA and SA did not change significantly within 2 h.

Enzyme activities

Because wounding and mechanical stimulation induced jasmonate accumulation in local traps, we exogenously applied JA on the trap surface as a positive control, after which the local traps snapped shut within 24 h and the secretion of digestive fluid was initiated. When a sufficient amount was secreted, the digestive fluid was collected after 48 h for enzyme assay and SDS-PAGE. The systemic traps remained open and did not produce any digestive fluid. In all cases, the digestive fluid collected from local traps exhibited phosphatase, endochitinase and proteolytic activities. Mechanical stimulation induced phosphatase activity comparable to that from exogenous JA application, and the activity was slightly lower in wounded traps (Fig. 5a). The proteolytic activity did not differ significantly between mechanical stimulation and wounding, but it was strongly increased by the exogenous application of JA (Fig. 5b). The endochitinase activity was also highest after exogenous JA application (Fig. 5c). To semi-quantify the amount of enzymes responsible for these activities in the digestive fluid, the same volume of digestive fluid was electrophoresed, and the SDS-PAGE revealed the secretion of identical protein profiles in response to mechanical stimulation and wounding, and a very similar protein profile in response to the exogenous application of JA. The intensity of staining revealed that the highest protein secretion was induced after exogenous JA application (Fig. 6a). Immunoblot analysis confirmed the presence of the following dominant digestive enzymes in the fluid: aspartic protease dionaeasin (Fig. 6b), cysteine protease dionain (Fig. 6c) and VF1 chitinase (Fig. 6d). Consistent with the enzyme activity results, the amounts of the enzymes were comparable between mechanically stimulated and wounded traps but higher in response to the exogenous application of JA. Based on the results presented here, it is obvious that wounding can mimic

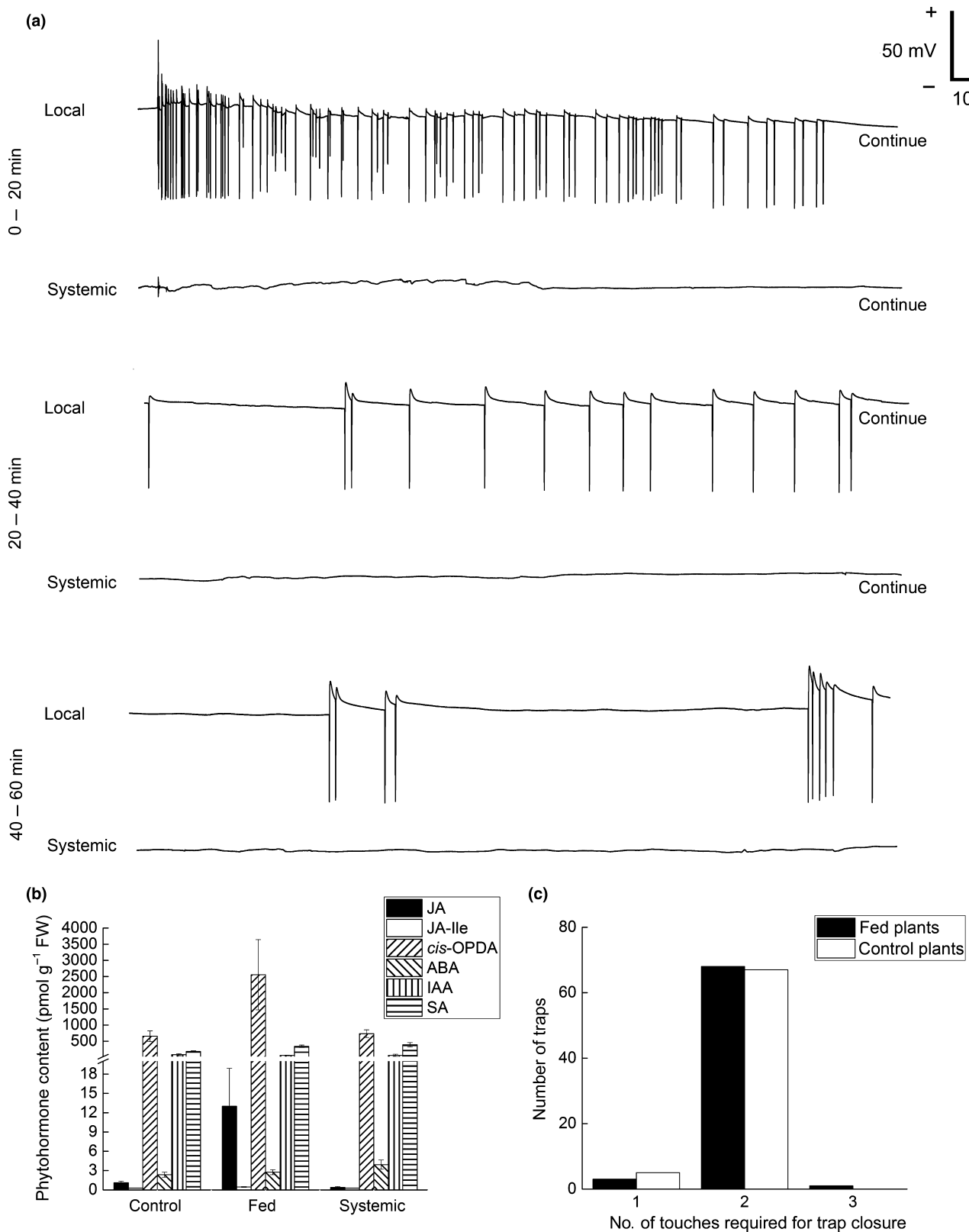


Fig. 2 Local and systemic electrical signalling in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*) in response to prey capture. (a) Extracellular recording of action potentials from the surface of a Venus flytrap lobe during prey (fly) capture (upper trace) and in systemic trap (lower trace) during the first hour. (b) The average phytohormone accumulation during the digestive period (1 h to 1 wk after prey capture) in local and systemic traps. For details on the kinetics of jasmonate accumulation, see Supporting Information Fig. S3. The results shown are means \pm SE, $n = 4$. (c) Trap sensitivity expressed as the number of hair displacements required for trap closure 24 h after prey capture, $n = 72$. JA, jasmonic acid; JA-Ile, isoleucine conjugate of jasmonic acid; *cis*-OPDA, *cis*-(+)-12-oxo-phytodienoic acid; ABA, abscisic acid; IAA, indole-3-acetic acid; SA, salicylic acid.

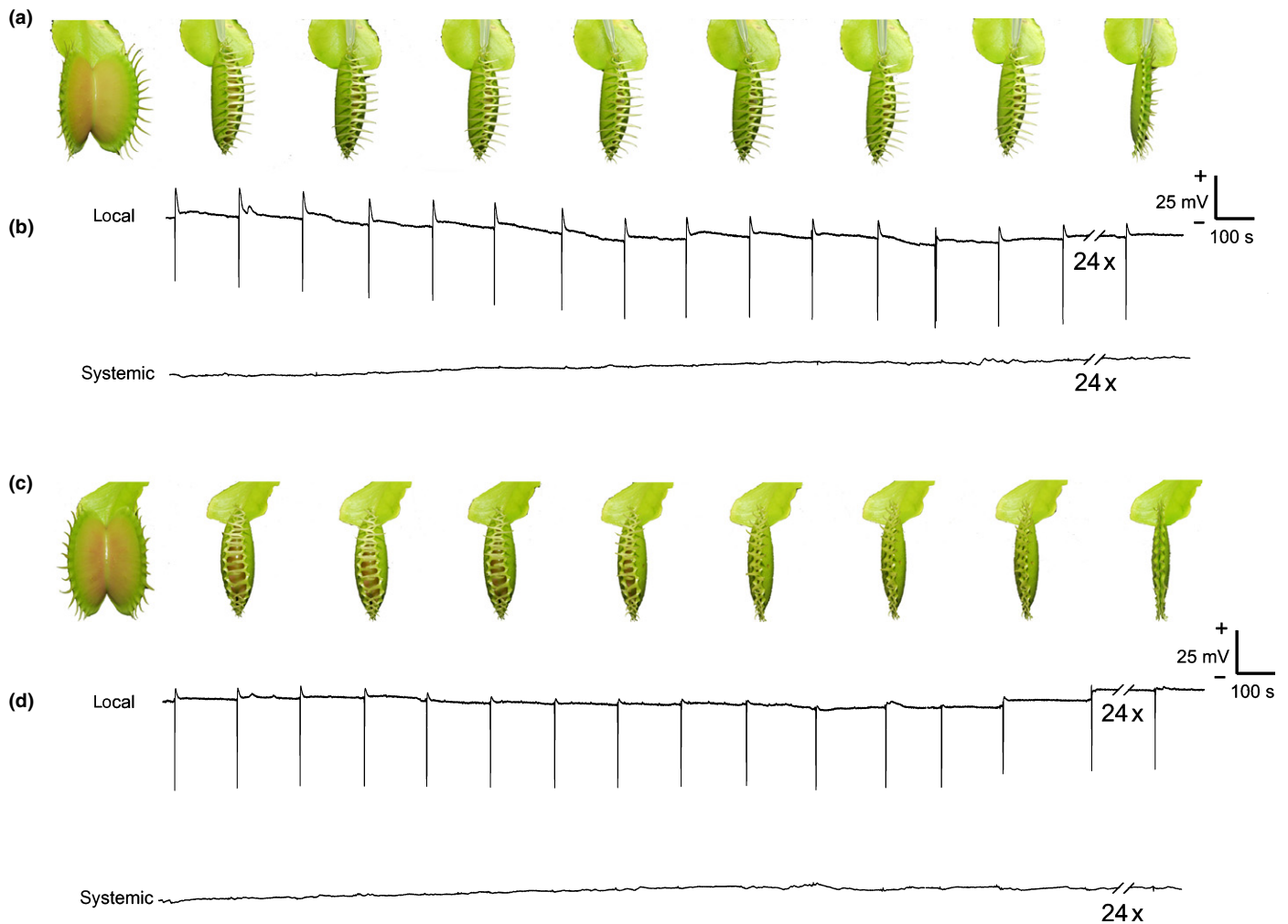


Fig. 3 Controlled mechanical stimulation and wounding of trap tissue in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). (a) Induction of trap narrowing in response to mechanical stimulation. (b) Extracellular recording of action potentials in response to mechanical stimulation in local and systemic traps. (c) Induction of trap narrowing in response to wounding. (d) Extracellular recording of action potentials in response to wounding in local and systemic traps. The timescale of pictures (a) and (c) approximately corresponds to the timescale of pictures (b) and (d). To observe the trap-narrowing reactions, see Supporting Information Video S1 and S2.

mechanical stimulation from insect prey through electrical and jasmonate signalling and that the response is always local and not systemic.

Discussion

On the one hand, after prey digestion and nutrient absorption, the carnivorous plant Venus flytrap can increase its rate of photosynthesis (A_N) and growth. On the other, the electrical signalling associated with prey capture and increased demand for energy during prey digestion results in decreased A_N and an increased rate of mitochondrial respiration (Pavlovič *et al.*, 2010; Kruse *et al.*, 2014; Libiaková *et al.*, 2014; Pavlovič & Saganová, 2015; Fasbender *et al.*, 2017). However, the Venus flytrap has evolved several control mechanisms to optimize this benefit by reducing its associated costs. First, at least two touches and two action potentials (APs) are necessary for trap closure at room temperature (Fig. S1; Brown, 1916); the lack of response to the first

touch benefits the plants by preventing accidental closure due to nonprey items such as wind-blown sand, seeds or raindrops. Second, if the trap snaps, the small gaps between the marginal teeth of the trap allow small prey to escape. This second control point can help save energy because small prey do not provide sufficient amounts of nutrients to compensate for the costs associated with prey retention and digestion, and the trap slowly reopens again (Libiaková *et al.*, 2014). Third, if a larger prey is secured, repeated mechanical stimulation of the trigger hairs by struggling prey in the closed trap generates hundreds of APs (Fig. 2a), causing the trap to narrow and secrete digestive fluid (Affolter & Olivo, 1975; Lichtner & Williams, 1977). At least two APs are necessary to activate the jasmonate acid signalling pathway, and five APs are required to trigger the significant expression of digestive enzymes. It appears that the Venus flytrap may control the amount of digestive enzymes produced in and secreted by the gland cells *via* the number of APs activating the jasmonate signalling pathway (Böhm *et al.*, 2016a). It has been

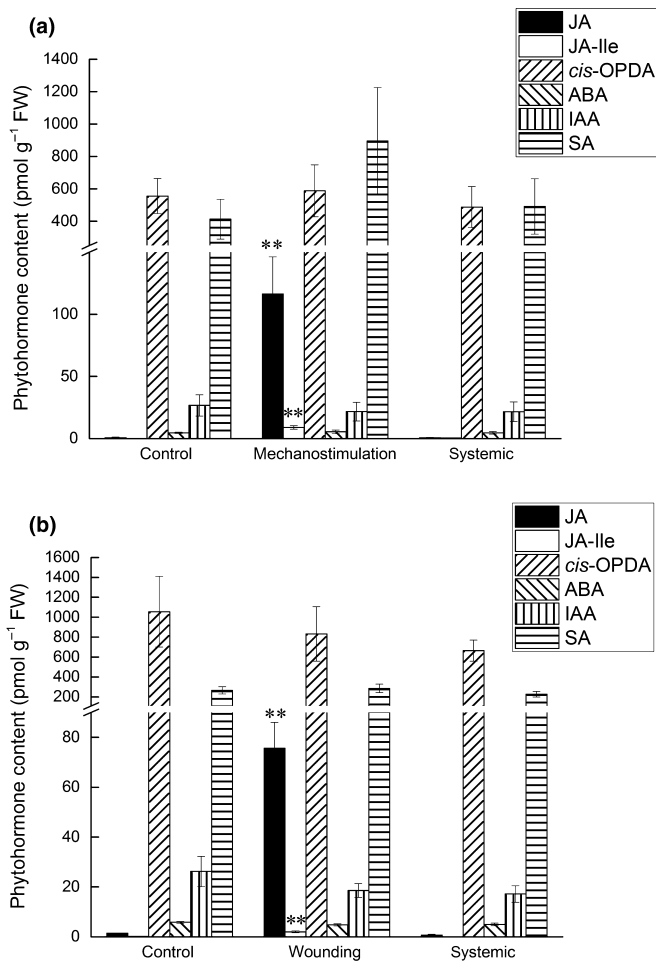


Fig. 4 Phytohormone accumulation in local and systemic traps 2 h after the initiation of stimulation in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). (a) Mechanical stimulation and (b) wounding. Means \pm SE, $n = 4-8$. Significant differences are indicated (ANOVA, Tukey's test): **, $P < 0.01$. JA, jasmonic acid; JA-Ile, isoleucine conjugate of jasmonic acid; *cis*-OPDA, *cis*-(+)-12-oxo-phytyldienoic acid; ABA, abscisic acid; IAA, indole-3-acetic acid; SA, salicylic acid.

postulated that the Venus flytrap, in contrast to sundew and pitcher plants, relies more on 12-oxo-phytyldienoic acid (OPDA) than JA or JA-Ile (Escalante-Pérez *et al.*, 2011), but we observed JA and JA-Ile accumulation in prey-activated traps in this as well as our previous study (Libiaková *et al.*, 2014). The recent finding that prey capture induced the transcription of the JASMONIC ACID RESISTANT1 (JAR1) gene, which converts JA into its physiologically active form, JA-Ile (Bemm *et al.*, 2016), support our findings that JA-Ile is bioactive in the Venus flytrap *per se*. This is also strongly supported by the fact that the secretion of digestive fluid began within 2 h when the JA and JA-Ile contents were increased due to intensive electrical activity and that the *cis*-OPDA concentration was comparable with that of the control plants (Figs 2a, 4, S3); the concentration of *cis*-OPDA is only increased in the later phases of digestion (Fig. S3, Escalante-Pérez *et al.*, 2011; Libiaková *et al.*, 2014). The elevated concentration of *cis*-OPDA may provide a reservoir for JA synthesis (Koo *et al.*, 2009), but the signalling role of *cis*-OPDA in this phase of

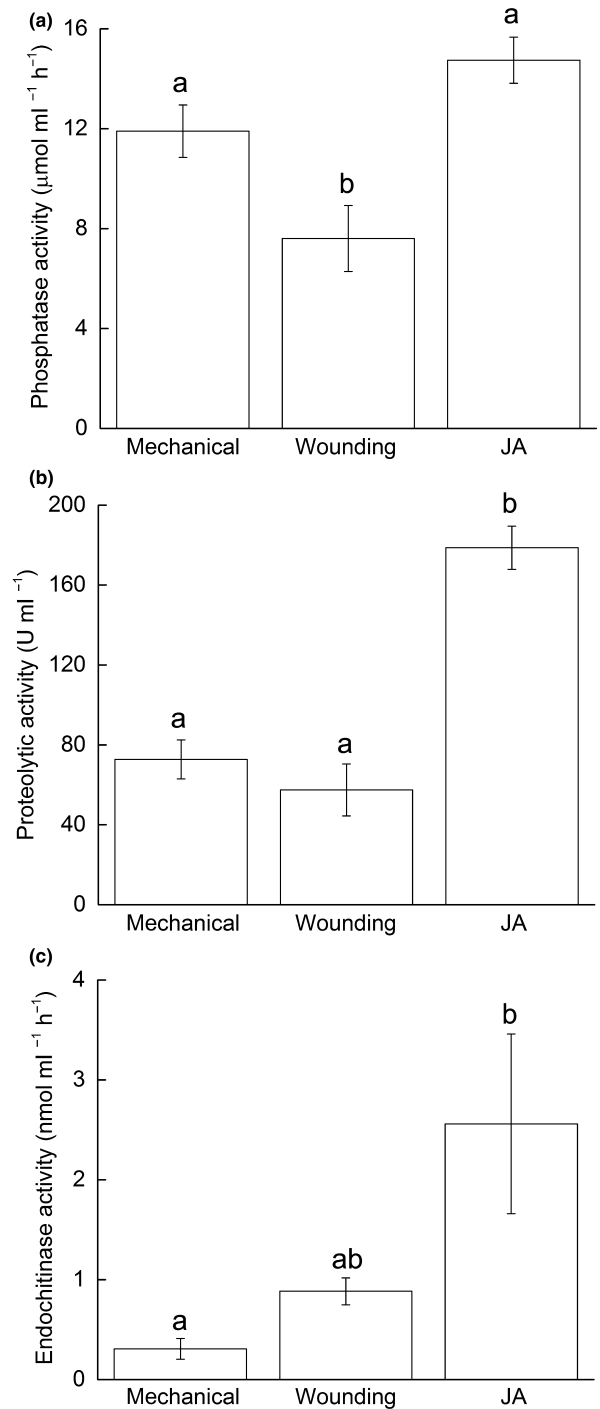


Fig. 5 Measurements of enzyme activity in digestive fluid 48 h after mechanical stimulation, wounding and exogenous application of 2 mM jasmonic acid (JA) in local traps of the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). Systemic traps did not snap shut or produce any digestive fluid, so their enzyme activity is zero. (a) Phosphatase activity, (b) proteolytic activity, (c) endochitinase activity. Different letters denote significant differences at $P < 0.05$ (ANOVA, Tukey's test). Means \pm SE, $n = 4$ (chitinase activity)–8 (proteolytic and phosphatase activity).

digestion cannot be excluded. The increased concentrations of JA and JA-Ile during the first hours after prey capture also has been documented in carnivorous sundew plants (Mithöfer *et al.*, 2014; Krausko *et al.*, 2017).

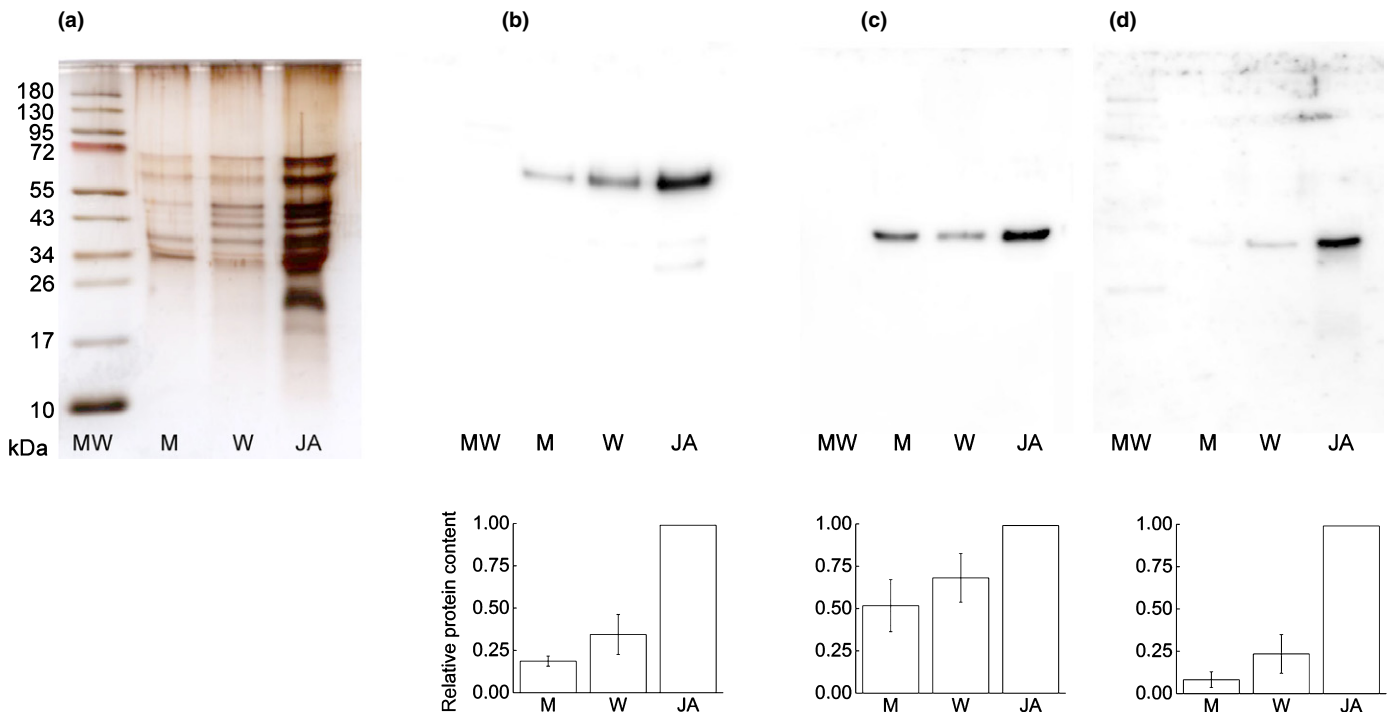


Fig. 6 Protein profile and immunodetection of aspartic protease (dionaeasin), cysteine protease (dionain) and VF-1 chitinase in the digestive fluid of the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). The digestive fluid was collected 48 h after induction, and the proteins were separated in 10% (v/v) SDS-polyacrylamide gel and subjected to Western blot analysis. (a) Silver-stained SDS-PAGE of the digestive fluid in response to different stimuli. (b) Western blot analysis of aspartic protease dionaeasin in response to different stimuli using a protein-specific antibody. (c) Western blot analysis of cysteine protease dionain using a protein-specific antibody. (d) Western blot analysis of type I chitinase using a protein-specific antibody. MW, molecular weight; M, mechanical stimulation; W, wounding; JA, 2 mM jasmonic acid. The same volume (8 μ l) of secreted digestive fluid was loaded. The blots shown are representative of three independent experiments, and the signal was quantified by chemiluminescence. Means \pm SE, $n = 3$.

Despite this sophisticated prey recognition system, the present study showed that carnivorous plants can be easily misled by wounding, a typical activator of the plant defence response. In the Venus flytrap, wounding activates rapid trap closure, hermetic trap sealing and the secretion of digestive fluid containing enzymes; together these comprise a typical carnivorous response (Figs 3c,d, 5, 6; Video S2). Recently, we found the same reaction in the Cape sundew (*Drosera capensis*) but also observed some differences (Krausko *et al.*, 2017). In response to wounding, sundew plants generate different electrical signals than those generated in response to mechanical stimulation. This wound-induced electrical signal is probably composed of different types (AP, variation potentials (VP) and systemic potential (SP)) and not only spreads systemically to all neighbouring traps and tentacles, but also activates enzyme secretion in distal traps, a typical systemic response. It is quite surprising that the Venus flytrap generated APs instead of VPs, which have been believed to be generated in response to damaging stimuli (Fromm & Lautner, 2007). It is known that APs triggered by mechanical stimulation do not even penetrate to the photosynthetic part of the leaf in the Venus flytrap, so these two parts of the leaf are probably electrically independent (Volkov *et al.*, 2007, 2008, 2013). Only graded potentials, which have very low amplitude, were recorded in the photosynthetic part of the leaf (Fig. S2, Volkov *et al.*, 2007). Our study also showed that wound-induced APs are confined to the local trap in the Venus flytrap (Fig. 3d). Such restricted propagation of typical

APs, in contrast to VPs, was also recently documented in noncarnivorous plants (Zimmermann *et al.*, 2016) and is also known in sensitive plant (*Mimosa pudica*; Fromm & Lautner, 2007). But Escalante-Pérez *et al.* (2011) argued that there is a systemic response in the Venus flytrap based on experiments involving the external application of 1 mM coronatine (a structural mimic of JA-Ile) on local traps. Within 3–24 h, they found an increased concentration of OPDA in systemic leaves and argued that the successful capture of one insect leads to the production of OPDA which is delivered to the other traps in a systemic fashion (cell-nonautonomous pathway). Such artificial stimulation induced secretion in all the other neighbouring traps, but this behaviour has never been observed naturally, indicating that natural prey capture is a more local than systemic response. Koo & Howe (2009) criticized such jasmonate application experiments as inadequate for inferring a role for endogenous jasmonates in the wound response, and based on our studies, we can exclude the propagation of electrical signals (cell-autonomous pathway) and jasmonates (cell-nonautonomous pathway) to neighbouring traps after prey capture in the Venus flytrap and Cape sundew (Krausko *et al.*, 2017). The fact that the carnivorous response is always local is strongly supported by the findings of Nakamura *et al.* (2013) and Krausko *et al.* (2017), who found the accumulation of jasmonates spatially restricted to the bending segment of the sundew trap with captured prey and that only this segment generates electrical signals and digestive enzymes. Our results

agree with those of Mousavi *et al.* (2013), who demonstrated a crucial role of electrical signalling in the initiation of defence responses at remote sites. In this and our previous study (Krausko *et al.*, 2017), we found a particularly close correlation between electrical signal propagation, jasmonate accumulation and enzyme secretion in carnivorous plants, confirming a general assumption of the importance of long-distance electrical signalling in the systemic response of plants (Mousavi *et al.*, 2013). Based on the results from the sundew plant and the Venus flytrap, we can conclude that carnivory is always a local response, which seems reasonable; it would be quite expensive to produce digestive enzymes in all the traps on a plant that had not captured any prey. The regulation of enzyme production is under transcription control and proportional to the number of APs, but once the chemical component from the prey is sensed, enzyme production is boosted (Libiaková *et al.*, 2014; Bemm *et al.*, 2016; Böhm *et al.*, 2016a; Krausko *et al.*, 2017). Chemical signals can keep the concentration of JA and JA-Ile and enzyme production elevated once the mechanical stimulation from prey ceases to occur (Libiaková *et al.*, 2014). This type of signalling definitely recognizes entrapped prey. The application of chitin or ammonium salts activated the jasmonate signalling pathway and the expression of digestive enzymes probably through the LysM receptor or the depolarization of the membrane potential in digestive glands, respectively (Matušíková *et al.*, 2005; Scherzer *et al.*, 2013, 2015; Libiaková *et al.*, 2014; Bemm *et al.*, 2016; Jopčík *et al.*, 2017; Krausko *et al.*, 2017). Chemical sensing is extremely important for inducing the carnivorous response through jasmonate signalling in passive *Nepenthes* pitcher traps, which are probably not able to generate electrical signals in response to prey capture (Buch *et al.*, 2015; Yilamujiang *et al.*, 2016).

A long-standing question in plant electrophysiology is the specificity of electrical signalling, for which there is some evidence according to some authors (Fromm *et al.*, 2013). For example, Fromm *et al.* (1995) documented that different, stimulus-dependent electrical signals cause specific ovarian metabolism responses in *Hibiscus* plants. However, wounding, heat or electrical currents all lead to the same response in tomato plants, the activation of *Pin2* gene expression (Peña-Cortés *et al.*, 1995; Herde *et al.*, 1999). According to Pyatygin *et al.* (2008), there is good evidence that the APs of higher plants are a nonspecific bioelectric signal independent of stimulus origin, so they do not carry any stimulus-specific information but signal the onset of adverse conditions in some region of the plant to resting tissues and organs. From the qualitative perspective, our results are consistent with this opinion, and even electrical signalling in the sundew plant, which generates different electrical signals in response to wounding and touch, triggers the same response of tentacle bending and enzyme secretion (Krausko *et al.*, 2017). However, from the quantitative perspective, the number of APs is important for regulating the strength of the response in carnivorous plants. Single or double touching or wounding is not sufficient to trigger the secretion of digestive fluid and enzymes in the Venus flytrap and Cape sundew (personal observation), and the number of APs regulates the tentacle-bending reactions in sundew plants (Williams & Pickard, 1972) and the transcription of genes

involved in prey digestion and nutrient uptake in the Venus flytrap (Böhm *et al.*, 2016a).

The fact that carnivorous plants cannot discriminate between wounding and mechanical stimulation by their prey is a result of their evolutionary history and behavioural exaptation, that is, an evolutionary shift in the function of a trait, which indicates that these plants probably employ the same sensing and signalling pathways, and cannot discriminate between the presence of prey or herbivorous insects. Recently, Mithöfer *et al.* (2014) showed that the combination of wounding and oral secretion in sundew plants obtained from *Spodoptera littoralis* larvae had an even stronger effect on jasmonate signalling than wounding alone. Chemical cues from entrapped prey are also much better inducers of enzyme activities than mechanical stimulation alone (Matušíková *et al.*, 2005; Libiaková *et al.*, 2014; Bemm *et al.*, 2016; Jopčík *et al.*, 2017; Krausko *et al.*, 2017). Currently, it is generally believed that botanical carnivory has evolved from plant-defence mechanisms, and this is supported by the fact that many proteins secreted in response to prey capture are related to pathogenesis (Hatano & Hamada, 2008; Renner & Specht, 2012; Schulze *et al.*, 2012; Bemm *et al.*, 2016; Fukushima *et al.*, 2017; Krausko *et al.*, 2017). Higher plants express pathogenesis-related proteins as a response to attack by a pathogen or chewing insect, and many of these proteins possess hydrolytic activities that have been exploited by carnivorous plants (Schulze *et al.*, 2012). It is tempting to assume that the early evolving, imperfect traps were often damaged by struggling, chewing prey, as can sometimes be seen even today (wasps can often bite their way out), which determined the direction of the evolution of botanical carnivory. In light of a recent study showing that there are constraints on the available evolutionary routes to botanical carnivory (Fukushima *et al.*, 2017), the question of how the jasmonate signalling pathway became widespread among different carnivorous plant lineages remains to be investigated.

Acknowledgements

This work was supported by the Czech Science Foundation Agency (project GACR 16-07366Y) and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic through the National Program of Sustainability I (grant LO1204).

Author contributions

A.P. designed the study; A.P., J.J. and O.N. performed the experiments; A.P., J.J. and O.N. analysed the data; and A.P. wrote the manuscript.

References

- Affolter JM, Olivo RF. 1975. Action potentials in Venus's-flytraps: long term observations following the capture of prey. *American Midland Naturalist* **93**: 443–445.
- Bemm F, Becker D, Larisch C, Kreuzer I, Escalante-Perez M, Schulze WX, Ankenbrand M, Van de Weyer A-L, Krol E, Al-Rasheid K *et al.* 2016. Venus flytrap carnivorous lifestyle builds on herbivore defense strategies. *Genome Research* **26**: 812–825.

- Blechert S, Bockelmann C, Fülllein M, Schrader TV, Stelmach B, Niesel U, Weiler EW. 1999. Structure-activity analyses reveal the existence of two separate groups of active octadecanoids in elicitation of the tendril-coiling response of *Bryonia dioica* Jacq. *Planta* 207: 470–479.
- Böhm J, Scherzer S, Krol E, Kreuzer I, Meyer K, Lorey C, Mueller TD, Shabala L, Monte I, Solano R *et al.* 2016a. The Venus flytrap *Dionaea muscipula* counts prey-induced action potentials to induce sodium uptake. *Current Biology* 26: 286–295.
- Böhm J, Scherzer S, Shabala S, Krol E, Neher E, Mueller TD, Hedrich R. 2016b. Venus Flytrap HKT1-type channel provides for prey sodium uptake into carnivorous plant without conflicting with electrical excitability. *Molecular Plant* 9: 428–436.
- Brown WH. 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.
- Buch F, Kaman WE, Bikker FJ, Yilamujiang A, Mithöfer A. 2015. Nepenthesis protease activity indicates digestive fluid dynamics in carnivorous *Nepenthes* plants. *PLoS ONE* 10: e0118853.
- Burdon-Sanderson JS. 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.
- Cosgrove DJ, Hedrich R. 1991. Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in the plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* 186: 143–153.
- De Geyter N, Gholami A, Goormachtig S, Goossens A. 2012. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science* 17: 349–359.
- Escalante-Pérez M, Krol E, Stange A, Geiger D, Al-Rasheid KA, Hause B, Neher E, 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, USA* 108: 15492–15497.
- Farmer EE, Gasperini D, Acosta I. 2014. The squeeze cell hypothesis for the activation of jasmonate synthesis in response to wounding. *New Phytologist* 204: 282–288.
- Fasbender L, Maurer D, Kreuzwieser J, Kreuzer I, Schulze WX, Kruse J, Becker D, Alfarraj S, Hedrich R, Werner C *et al.* 2017. The carnivorous Venus flytrap uses prey-derived amino acid carbon to fuel respiration. *New Phytologist* 214: 597–606.
- Floková K, Tarkowská D, Miersch O, Strnad M, Wasternack C, Novák O. 2014. UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry* 105: 147–157.
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R. 2009. (+)-7-iso-Jasmonyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* 5: 344–350.
- Fromm J, Hajirezaei M-R, Becker VK, Lautner S. 2013. Electrical signaling along the phloem and its physiological responses in the maize leaf. *Frontiers in Plant Science* 4: article 239.
- Fromm J, Hajirezaei M, Wilke I. 1995. The biochemical response of electrical signalling in reproductive system of *Hibiscus* plants. *Plant Physiology* 109: 375–384.
- Fromm J, Lautner S. 2007. Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant, Cell & Environment* 30: 249–257.
- Frost CJ, Mescher MC, Carlson JE, De Moraes CM. 2008. Plant defense priming against herbivores: getting ready for a different battle. *Plant Physiology* 146: 818–824.
- Fukushima K, Fang X, Alvarez-Ponce D, Cai H, Carretero-Paulet L, Chen C, Chang T-H, Farr KM, Fujita T, Hiwatashi Y *et al.* 2017. Genome of the pitcher plant *Cephalotus* reveals genetic changes associated with carnivore. *Nature Ecology & Evolution* 1: e0059.
- Gaupels F, Durner J, Kogel K-H. 2017. Production, amplification and systemic propagation of redox messengers in plants? The phloem can do it all!. *New Phytologist* 214: 554–560.
- Glauser G, Grata E, Dubugnon L, Rudaz S, Farmer EE, Wolfender J-L. 2008. Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding. *Journal of Biological Chemistry* 283: 16400–16407.
- Hatano N, Hamada T. 2008. Proteome analysis of pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Journal of Proteome Research* 7: 809–816.
- Herde O, Peña-Cortés H, Wasternack C, Willmitzer L, Fisahn J. 1999. Electrical signaling and *Pin2* gene expression on different abiotic stimuli depend on a distinct threshold level of endogenous abscisic acid in several abscisic acid-deficient tomato mutants. *Plant Physiology* 119: 213–218.
- Hodick D, Sievers A. 1988. The action potential of *Dionaea muscipula* Ellis. *Planta* 174: 8–18.
- Huber AE, Bauerle TL. 2016. Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: the gap in knowledge. *Journal of Experimental Botany* 67: 2063–2079.
- Ilík P, Hlaváčková V, Krchňák P, Naus J. 2010. A low-noise multi-channel device for the monitoring of systemic electrical signal propagation in plants. *Biologia Plantarum* 54: 185–190.
- Jopčík M, Moravčíková J, Matusíková I, Bauer M, Rajnínec M, Libantová J. 2017. Structural and functional characterization of a class I endochitinase of the carnivorous sundew (*Drosera rotundifolia* L.). *Planta* 245: 313–327.
- Koo AJK, Gao X, Jones AD, Howe GA. 2009. A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 59: 974–986.
- Koo AJK, Howe GA. 2009. The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* 70: 1571–1580.
- Krausko M, Perutka Z, Šebela M, Šamajová O, Šamaj O, Novák O, Pavlovič A. 2017. The role of electrical and jasmonate signalling in the recognition of captured prey in the carnivorous sundew plant *Drosera capensis*. *New Phytologist* 213: 1818–1835.
- Kruse J, Gao P, Honsel A, Kreuzwieser J, Burzlaff T, Alfarraj S, Hedrich R, Rennenberg H. 2014. Strategy of nitrogen acquisition and utilization by carnivorous *Dionaea muscipula*. *Oecologia* 174: 839–851.
- Libíková M, Floková K, Novák O, Slovákova L, 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: e104424.
- Lichtner FT, Williams SE. 1977. Prey capture and factors controlling trap narrowing in *Dionaea* (Droseraceae). *American Journal of Botany* 64: 881–886.
- Maffei ME, Mithöfer A, Boland W. 2007. Before gene expression: early events in plant-insect interaction. *Trends in Plant Science* 12: 310–316.
- Malone M. 1996. Rapid, long-distance signal transmission in higher plants. *Advances in Botanical Research* 22: 163–228.
- Mancuso S. 1999. Hydraulic and electrical transmission of wound-induced signals in *Vitis vinifera*. *Australian Journal of Plant Physiology* 26: 55–61.
- Matusíková I, Salaj J, Moravčíková J, Mlynárová L, Nap JP, Libantová J. 2005. Tentacles of *in vitro*-grown round-leaf sundew (*Drosera rotundifolia* L.) show induction of chitinase activity upon mimicking the presence of prey. *Planta* 222: 1020–1027.
- Mithöfer A. 2011. Carnivorous pitcher plants: insights in an old topic. *Phytochemistry* 72: 1678–1682.
- Mithöfer A, Reichelt M, Nakamura Y. 2014. Wound and insect-induced jasmonate accumulation in carnivorous *Drosera capensis*: two sides of the same coin. *Plant Biology* 5: 982–987.
- Mousavi SAR, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S, Farmer EE. 2013. Glutamate receptor-like genes mediate leaf-to-leaf wound signals. *Nature* 500: 422–426.
- Nakamura Y, Mithöfer A, Kombrink E, Boland W, Hamamoto S, Uozumi N, Tohma K, Ueda M. 2011. 12-Hydroxyjasmonic acid glucoside is a COI1-JAZ-independent activator of leaf-closing movement in *Samanea saman*. *Plant Physiology* 155: 1226–1236.
- Nakamura Y, Reichelt M, Mayer VE, Mithöfer A. 2013. Jasmonates trigger prey-induced formation of ‘outer stomach’ in carnivorous sundew plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: 20130228.
- Nishimura E, Jumyo S, Arai N, Kanna K, Kume M, Nishikawa J, Tanase J, Ohyama T. 2014. Structural and functional characteristics of S-like ribonucleases from carnivorous plants. *Planta* 240: 147–159.
- Paszota P, Escalante-Perez M, Thomsen LR, Risør MW, Dembski A, Sanglas L, Nielsen TA, Karring H, Thøgersen IB, Hedrich R *et al.* 2014. Secreted major Venus flytrap chitinase enables digestion of Arthropod prey. *Biochimica et Biophysica Acta* 1844: 374–383.

- Pauwels L, Inzé D, Goossens A. 2009. Jasmonate-inducible gene: what does it mean? *Trends in Plant Science* 14: 87–91.
- Pavlović A, Demko V, Hudák J. 2010. Trap closure and prey retention in Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis.) temporarily reduces photosynthesis and stimulates respiration. *Annals of Botany* 105: 37–44.
- Pavlović A, Saganová M. 2015. A novel insight into the cost–benefit model for the evolution of botanical carnivory. *Annals of Botany* 115: 1075–1092.
- Peña-Cortés H, Fisahn J, Willmitzer L. 1995. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 92: 4106–4113.
- Pyatygin SS, Opritov VA, Vodeneev VA. 2008. Signaling role of action potential in higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 55: 285–291.
- Renner T, Specht CD. 2012. Molecular and functional evolution of class I chitinases for plant carnivory in the Caryophyllales. *Molecular Biology and Evolution* 29: 2971–2985.
- Rottloff S, Stieber R, Maischak H, Turini FG, Heubl G, Mithöfer A. 2011. Functional characterization of a class III acid endochitinase from the traps of the carnivorous pitcher plant genus, *Nepenthes*. *Journal of Experimental Botany* 62: 4639–4647.
- Schägger H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* 1: 16–22.
- Scherzer S, Böhm J, Krol E, Shabala L, Kreuzer I, Larisch C, Bemm F, Al-Rasheid KA, Shabala S, Rennenberg H *et al.* 2015. Calcium sensor kinase activates potassium uptake systems in gland cells of Venus flytraps. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 112: 7309–7314.
- Scherzer S, Krol E, Kreuzer I, Kruse J, Karl F, von Rüden M, Escalante-Perez M, Müller T, Rennenberg H, Al-Rasheid KAS *et al.* 2013. The *Dionaea muscipula* ammonium channel DmAMT1 provides NH_4^+ uptake associated with Venus flytrap's prey digestion. *Current Biology* 23: 1649–1657.
- Schilmiller AL, Howe GA. 2005. Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 369–377.
- Schulze WX, Sanggaard KW, Kreuzer I, Knudsen AD, Bemm F, Thøgersen IB, Bräutigam A, Thomsen LR, Schliesky S, Dyrland TF *et al.* 2012. The protein composition of the digestive fluid from the Venus flytrap sheds light on prey digestion mechanisms. *Molecular and Cellular Proteomics* 11: 1306–1319.
- Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu F-F, Sharon M, Browse J *et al.* 2010. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI-JAZ co-receptor. *Nature* 468: 400–407.
- Stelmach BA, Müller A, Hennig P, Laudert D, Andert L, Weiler EW. 1998. Quantitation of the octadecanoid 12-oxo-phytodienoic acid, a signalling compound in plant mechanotransduction. *Phytochemistry* 47: 539–546.
- Stintzi A, Weber H, Reymond P, Browse J, Farmer E. 2001. Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentanones. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98: 12837–12842.
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J. 2007. JAZ repressor proteins are targets of the SCF (COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* 448: 661–665.
- Ueda M, Tokunaga T, Okada M, Nakamura Y, Takada N, Suzuki R, Kondo K. 2010. Trap-closing chemical factors of the Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis). *ChemBioChem* 11: 2378–2383.
- Volkov AG, Adesina T, Jovanov E. 2007. Closing of Venus flytrap by electrical stimulation of motor cell. *Plant Signaling and Behavior* 2: 139–145.
- Volkov AG, Adesina T, Jovanov E. 2008. Charge induced closing of *Dionaea muscipula* Ellis trap. *Bioelectrochemistry* 74: 16–21.
- Volkov AG, Nyasani EK, Tuckett C, Scott JM, Jackson MZ, Greeman EA, Greenidge AS, Cohen DO, Volkova MI, Shtessel YB. 2017. Electrotonic potentials in *Aloe vera* L.: effect of intercellular and external electrodes arrangement. *Bioelectrochemistry* 113: 60–68.
- Volkov AG, Vilfranc CL, Murphy VA, Mitchell C, Volkova MI, O'Neal L, Markin VS. 2013. Electrotonic and action potentials in the Venus flytrap. *Journal of Plant Physiology* 170: 838–846.
- Wasternack C, Hause B. 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany* 111: 1024–1058.
- Wasternack C, Stenzel I, Hause B, Hause G, Kutter C, Maucher H, Neumerkel J, Feussner I, Miersch O. 2006. The wound response in tomato – role of jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology* 163: 297–306.
- Wildon DC, Thain JF, Minchin PEH, Gubb IR, Reilly AJ, Skipper YD, Doherty HM, Donnell PJO, Bowles DJ. 1992. Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plants. *Nature* 360: 62–65.
- Williams SE, Pickard BG. 1972. Properties of action potentials in *Drosera* tentacles. *Planta* 103: 222–240.
- Yan Y, Stolz S, Chetelat A, Reymond P, Pagni M, Dubugnon L, Farmer EE. 2007. A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *The Plant Cell* 19: 2470–2483.
- Yilamujiang A, Reichelt M, Mithöfer A. 2016. Slow food: insect prey and chitin induce phytohormone accumulation and gene expression in carnivorous *Nepenthes* plants. *Annals of Botany* 118: 369–375.
- Yoshida Y, Sano R, Wada T, Takabayashi J, Okada K. 2009. Jasmonic acid control of GLABRA3 links inducible defense and trichome patterning in *Arabidopsis*. *Development* 136: 1039–1048.
- Zhang Y, Turner JG. 2008. Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *PLoS ONE* 3: e3699.
- Zimmermann MR, Maischak H, Mithöfer A, Boland W, Felle HH. 2009. System potentials, a novel electrical long-distance apoplastic signal in plants, induced by wounding. *Plant Physiology* 149: 1593–1600.
- Zimmermann MR, Mithöfer A, Will T, Felle HH, Furch AC. 2016. Herbivore-triggered electrophysiological reactions: candidates for systemic signals in higher plants and the challenge of their identification. *Plant Physiology* 170: 2407–2419.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information tab for this article:

Fig. S1 Two touches of trigger hairs (arrow) within *c.* 20 s generate two action potentials and rapid trap closure in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).

Fig. S2 Electrical signals in response to prey capture from the trap and photosynthetic part of the same leaf in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).

Fig. S3 Kinetics of jasmonate accumulation in response to prey capture in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).

Video S1 Time lapse video showing hermetic trap closure in response to mechanical stimulation every 3 min in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).

Video S2 Time lapse video showing hermetic trap closure in response to wounding every 3 min in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).

Please note: Wiley Blackwell are not responsible for the content or functionality of any Supporting Information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.

New Phytologist Supporting Information

Article title: Triggering a false alarm: wounding mimics prey capture in the carnivorous Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis.)

Authors: Andrej Pavlovič, Jana Jakšová, Ondřej Novák

Article acceptance date: 14 July 2017

The following Supporting Information is available for this article:

Fig. S1 Two touches of trigger hairs (arrow) within approximately 20 seconds generate two action potentials and rapid trap closure in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).

Fig. S2 Electrical signals in response to prey capture from the trap and photosynthetic part of the same leaf in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).

Fig. S3 Figure S3 Kinetics of jasmonate accumulation in response to prey capture in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).

Video/Movie S1 Time lapse video showing hermetical trap closure in response to mechanical stimulation every 3 minutes in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).

Video/Movie S2 Time lapse video showing hermetical trap closure in response to wounding every 3 minutes in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).

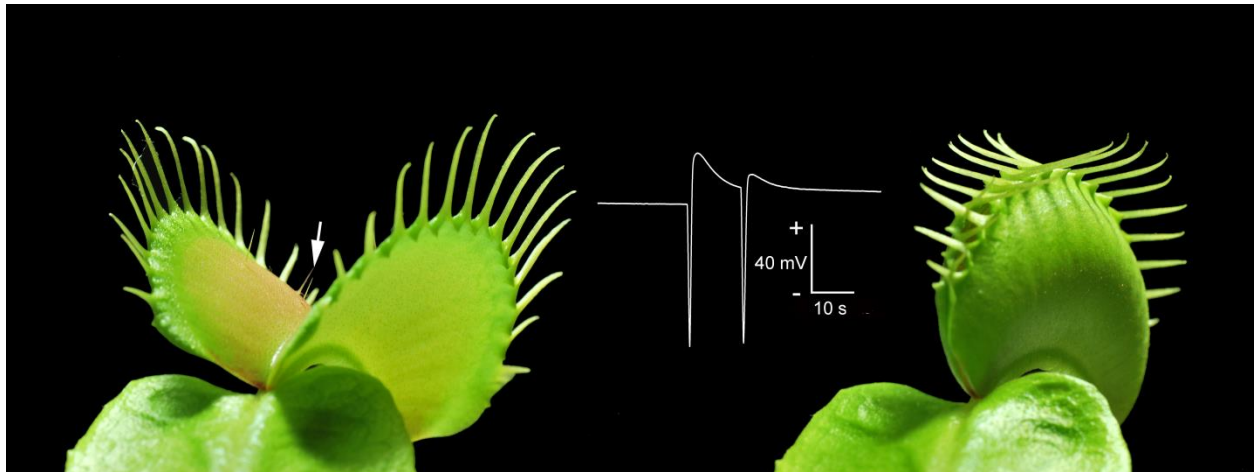


Fig. S1 Two touches of trigger hairs (arrow) within approximately 20 seconds generate two action potentials and rapid trap closure in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). In its closed stage, the trap requires further mechanical stimuli to activate the digestive process; otherwise, the trap reopens within 24 hours.

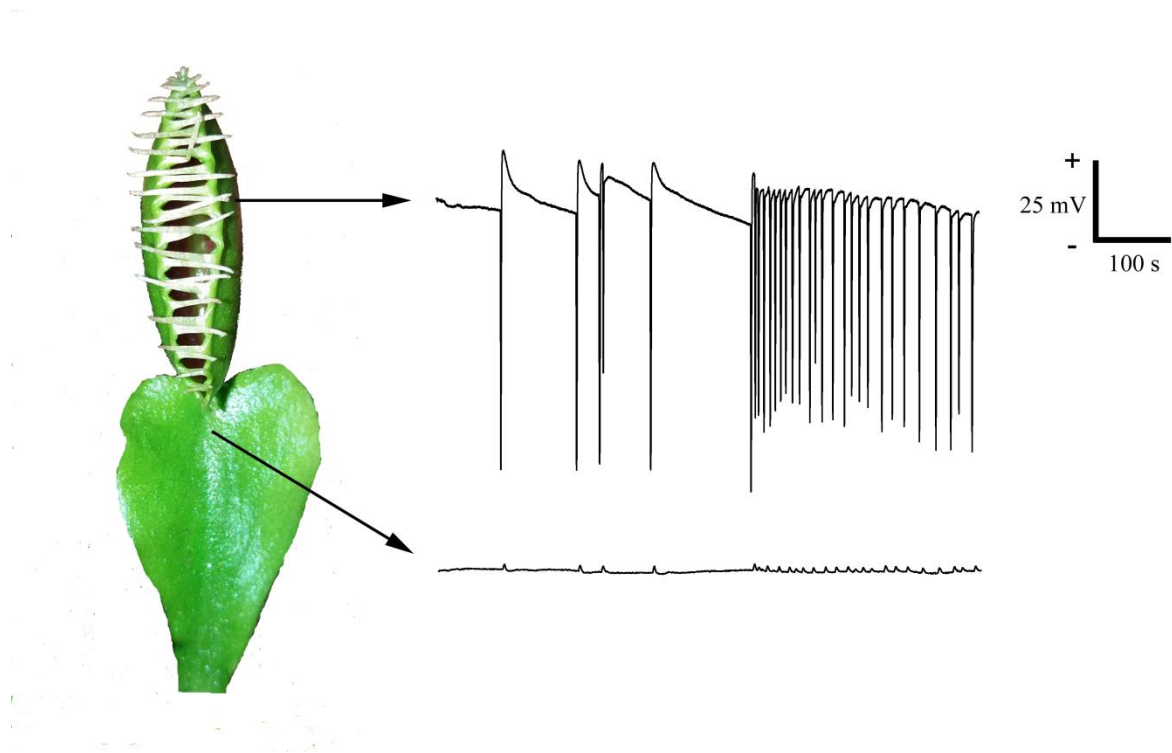


Figure S2 Electrical signals in response to prey capture from the trap and photosynthetic part of the same leaf in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). Trap (upper trace) and photosynthetic lamina (lower trace).

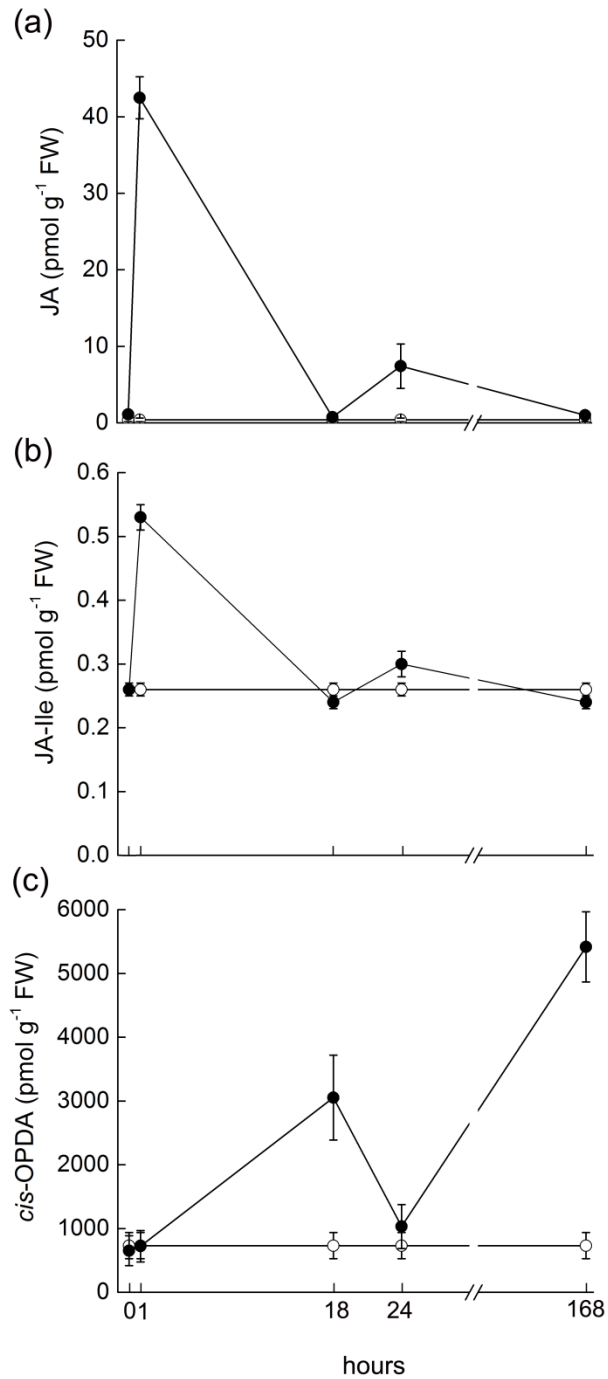


Figure S3 Kinetics of jasmonate accumulation in response to prey capture in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). (a) Jasmonic acid (JA), (b) isoleucine conjugate of jasmonic acid (JA-Ile), (c) *cis*-(+)-12-oxo-phytodienoic acid (*cis*-OPDA). The local traps (closed circles) and systemic traps (open circles) before (0 hour) and after (1, 18, 24 and 168 hours) prey capture. Means \pm SE, n = 2-4.

Video/Movie S1 Time lapse video showing hermetical trap closure in response to mechanical stimulation every 3 minutes in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). In real time, the reaction took 2 hours and 30 minutes.

Video/Movie S2 Time lapse video showing hermetical trap closure in response to wounding every 3 minutes in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). In real time, the reaction took 2 hours and 30 minutes.

Publikace I.

Taste for protein: Chemical signal from prey stimulates enzyme secretion through jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap

Název: Taste for protein: Chemical signal from prey stimulates enzyme secretion through jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap

Autoři: Jakšová J., Libiaková M., Bokor B., Petřík I., Novák O., Pavlovič A.

Status: publikována v roce 2020 v Plant Physiology and Biochemistry 146, 90–97.
DOI: 10.1016/j.plaphy.2019.11.013

Souhrn:

Chycení kořisti a trávení mucholapky podivné je řízeno dvěma typy stimulů – mechanickými a chemickými. Mechanické stimuly spouštěcích výčnělků uvnitř pasti, které jsou spojovány s tvorbou akčních potenciálů a zvýšením cytosolické koncentrace Ca^{2+} , jsou důležité hlavně v prvních hodinách po chycení kořisti a jsou zodpovědné za rychlé hermetické uzavření pasti a uvolňování trávicí tekutiny. Co se ale odehrává v pasti, jakmile stimulace pohybem kořisti ustane a jak mucholapka pozná, že se jedná opravdu o živočišnou kořist, aby byla schopná ušetřit své zdroje? Chemické signály z částečně rozložené kořisti mohou udržovat vysokou koncentraci kyseliny jasmonové a jejího isoleucinového konjugátu a produkci trávicích enzymů zvýšenou i přesto, že vyvolání elektrických signálů kořisti ustane. Vnímání chemických látek a tzv. pozdní fázi trávicího procesu se věnuje tato publikace. Bylo k tomu využito dvou na dusík bohatých látek v pevné formě, chitinu a proteinu (konkrétně hovězího sérového albuminu), ve spojení s mechanostimulací citlivých výčnělků uvnitř pasti. Mnoho výzkumníků se při jejich studiích zaměřilo na chitin, protože vnější kostra hmyzu se skládá převážně právě z něj. Ačkoli je chitin pravděpodobně první chemickou látkou, se kterou se trávicí žlázy mucholapky dostávají do přímého kontaktu, není pro rostlinu hlavním zdrojem dusíku v porovnání s proteinem. Chemická stimulace proteinem ve spojení s mechanostimulací vyvolala největší akumulaci kyseliny jasmonové a jejího isoleucinového konjugátu, stejně jako expresi vybraných genů kódující cystein proteázu (dionain) a chitinázu. Také se ukázalo, že trávicí tekutina, která byla sbírána po 48 hodinách od stimulace, vykazovala fosfatázovou, chitinázovou a proteolytickou aktivitu a tato aktivita byla ve všech případech největší po dodatečné stimulaci proteinem. Taky abundance enzymů odpovědných za uvedené aktivity byla nejvyšší po podání proteinu. Chitin neměl žádný významný aditivní efekt na enzymové aktivity, navzdory tomu stále indukoval vysokou hladinu jasmonátů. Na základě těchto výsledků bylo zřejmé, že enzymové aktivity v mucholapce nejsou substrátově specifické a protein byl nejlepším induktorem nejen proteolytických, ale také ostatních aktivit.

Příspěvní autorů:

Výzkum:

- příprava a odebrání materiálů pro měření: J. Jakšová
- měření elektrických signálů: J. Jakšová
- kvantifikace fytohormonů: J. Jakšová, I. Petřík
- měření genové exprese s použitím qPCR: M. Libiaková, B. Bokor
- měření enzymových aktivit: J. Jakšová
- SDS-PAGE a Western bloty: J. Jakšová

Konceptualizace: A. Pavlovič

Supervize: A. Pavlovič, O. Novák

Vizualizace: J. Jakšová, A. Pavlovič

Statistická analýza: J. Jakšová, A. Pavlovič

Psaní – původní rukopis: J. Jakšová, A. Pavlovič

Psaní – editace: J. Jakšová, A. Pavlovič

Získání financování: A. Pavlovič, O. Novák

Podíl J. Jakšové: 50 %



Research article

Taste for protein: Chemical signal from prey stimulates enzyme secretion through jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap

Jana Jakšová^a, Michaela Libiaková^b, Boris Bokor^{b,c}, Ivan Petřík^d, Ondřej Novák^d, Andrej Pavlovič^{a,*}

^a Department of Biophysics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, CZ-783 71, Olomouc, Czech Republic

^b Department of Plant Physiology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Ilkovičova 6, Mlynská dolina B2, SK-842 15, Bratislava, Slovakia

^c Comenius University Science Park, Comenius University in Bratislava, Ilkovičova 8, SK-841 04, Bratislava, Slovakia

^d Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University & Institute of Experimental Botany, The Czech Academy of Sciences, Šlechtitelů 27, CZ-78371, Olomouc, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Action potential
Carnivorous plant
Chitinase
Digestive enzyme
Jasmonic acid
Protease
Venus flytrap

ABSTRACT

Hunting cycle of the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis) is comprised of mechanism for rapid trap closure followed by slow hermetic sealing and activation of gene expression responsible for digestion of prey and nutrient uptake. In the present study, we focus on the late phase of Venus's flytrap hunting cycle when mechanical stimulation of the prey ceases and is replaced by chemical cues. We used two nitrogen-rich compounds (chitin and protein) in addition to mechanostimulation to investigate the electrical and jasmonate signalling responsible for induction of enzyme activities. Chemical stimulation by BSA protein and chitin did not induce any additional spontaneous action potentials (APs). However, chemical stimulation by protein induced the highest levels of jasmonic acid (JA) and its isoleucine conjugate (JA-Ile) as well as the expression of studied gene encoding a cysteine protease (dionain). Although chitin is probably the first chemical agent which is in direct contact with digestive glands, presence of protein in the secured trap mimics the presence of insect prey best.

1. Introduction

The Venus flytrap (*Dionaea muscipula*) is the most famous plant in which botanical carnivory has ever been described (Darwin, 1875). Since that time researchers have been interested in biomechanics and molecular aspects of its carnivorous lifestyle. The snap-trap of *D. muscipula* consists of bilaterally symmetric lobes connected by a midrib. On the inner side of the trap are trigger hairs which are responsible for prey capture (Juniper et al., 1989). A mechanical stimulus of the trigger hair delivered by the animal prey initiates electrical signal, namely action potential (AP), which is capable of triggering a hunting cycle (Burdon-Sanderson, 1873; Lichtner and Williams, 1977; Volkov et al., 2011). The hunting cycle is comprised of mechanism for rapid trap closure followed by slow hermetic sealing and activation of gene expression responsible for digestion of prey and nutrient uptake (Hedrich and Neher, 2018). The AP is initiated by opening of mechanosensitive ion channels, depolarization of the cell membrane and generation of a receptor potential (Hodick and Sievers, 1988; Sibaoka, 1991; Krol et al.,

2006; Escalante-Pérez et al., 2011). The receptor potential is amplified by voltage-gated ion channels and the AP is generated (Juniper et al., 1989; Volkov et al., 2008). At room temperature, two prey-evoked APs snap the trap within a fraction of second (Brown, 1916; Hodick and Sievers, 1988) and third AP results in rise of cytosolic Ca²⁺ level which decay if no further APs are triggered (Escalante-Pérez et al., 2011; Hedrich and Neher, 2018). Although some steps in signalling cascade in carnivorous plants have not been confirmed yet, it was suggested that they copycat the cascade known from plant defence mechanism in response to wounding (Pavlovič and Saganová, 2015; Bemm et al., 2016; Pavlovič et al., 2017; Pavlovič and Mithöfer, 2019). The transient increase in cytosolic Ca²⁺ after third AP is probably decoded by an array of sensing proteins activating a jasmonic acid (JA) biosynthesis (Fisahn et al., 2004; Yan et al., 2018). It is initiated in a chloroplast and is completed by released of JA into the cytosol, where JA conjugates with isoleucine (Wasternack and Kombrink, 2010). The isoleucine conjugate of jasmonic acid (JA-Ile) interacts with the CORONATINE-INSENSITIVE1 (COI1) receptor (Staswick and Tiryaki, 2004; Sheard et al., 2010)

* Corresponding author.,

E-mail address: andrej.pavlovic@upol.cz (A. Pavlovič).

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.013>

Received 8 October 2019; Received in revised form 7 November 2019; Accepted 7 November 2019

Available online 08 November 2019

0981-9428/ © 2019 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

thereby promotes binding of COI1 to JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) repressors. The binding of JA-Ile to COI1 receptor mediates the ubiquitin-dependent degradation of JAZ repressors, resulting in the activation of jasmonate-dependent gene expression (Thines et al., 2007; Fonseca et al., 2009; Sheard et al., 2010), i.e. carnivory-related genes in the carnivorous plants (Bemm et al., 2016; Böhm et al., 2016a; Pavlovič et al., 2017). The JA-Ile was found to accumulate in many genera of carnivorous plants and is probably bioactive *per se* (Libiaková et al., 2014; Nakamura et al., 2013; Yilamujiang et al., 2016; Krausko et al., 2017; Pavlovič et al., 2017). Experiments with the JA antagonist coronatine-O-methylxime (COR-MO), which prevents COI1–JAZ interaction and JAZ degradation support this idea (Bemm et al., 2016). External application of jasmonates can trigger expression of carnivory related genes without any preceding mechanical stimuli (Böhm et al., 2016a; Krausko et al., 2017; Pavlovič et al., 2017). Glands covering the inner surface of the green stomach start to produce digestive fluid (Scherzer et al., 2017).

The composition of digestive fluid in Venus flytrap is now well recognized. Proteins of digestive fluid have been studied using high-throughput techniques and nine different proteins were identified – peroxidases, nucleases, phosphatases, phospholipases, glucanase, chitinases and proteolytic enzymes, including four cysteine proteases, two aspartic proteases, and a serine carboxypeptidase (Takahashi et al., 2011; Schulze et al., 2012; Bemm et al., 2016). The regulation of enzyme production is under transcriptional control and proportional to the number of APs triggered (Böhm et al., 2016a). However, the digestive fluid released in response to mechanical stimulation has not the full power to digest prey. There must be some chemical substances released from partially decomposed prey, which trigger the full enzyme activity and keep the digestive process running for several days after prey movement ceases. Many researchers focused on chitin as constituent of insect exoskeleton which is able to upregulate enzyme activity in many carnivorous genera (*Dionaea*, *Drosera*, *Nepenthes*, Matušiková et al., 2005; Eilenberg et al., 2006; Bemm et al., 2016; Yilamujiang et al., 2016; Jopčík et al., 2017). Although chitin is probably the first chemical agent which is in direct contact with digestive glands, it is not a significant source of nitrogen from prey for carnivorous plants in contrast to protein (Pavlovič et al., 2016). The ability of protein to induce digestive enzyme synthesis/secretion has been much less studied using modern molecular methods (Gallie and Chang, 1997; Matušiková et al., 2005).

In the present study, we focus on the late phase of Venus's flytrap hunting cycle when mechanical stimulation of the prey ceases and is replaced by chemical cues. We used two nitrogen-rich compounds (chitin and protein) in addition to mechanostimulation to investigate the electrical and jasmonate signalling responsible for induction of enzyme activities. We found that the presence of protein in the secured trap stimulates jasmonate production and mimics the presence of insect prey best.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and culture conditions

The Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis.) is native to subtropical wetlands of North and South Carolina on the East Coast of the United States. Experimental plants were grown under standard glasshouse conditions at the Department of Biophysics of Palacký University in Olomouc (Czech Republic) and Department of Plant Physiology of Comenius University in Bratislava (Slovakia). Well-drained peat moss in plastic pots placed in a tray filled with distilled water to a depth of 1–2 cm was used as a substrate. Daily temperatures fluctuated between 20 and 35 °C; relative air humidity ranged from 50% to 100%; and the maximum daily irradiance reached 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ photosynthetically active radiation (PAR).

2.2. Experimental setup and biotest

We used solely mechanical stimulation to induce secretion of digestive fluid, or mechanical stimulation combined with chitin and BSA protein. The chemicals were added in solid phase to avoid dilution of secreted digestive fluid by water. Four mg of protein (bovine serum albumin, BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 4 mg of chitin from shrimp shells (95% deacetylated, Sigma-Aldrich) were added into several open traps within a single plant. Some traps remained empty. After that, the pipette tip was inserted into some empty traps and each trap containing BSA and chitin. Touching the trigger hairs twice within 20 s provoked rapid trap closure. Then, the traps were mechanically stimulated 2 h every 3 min (app. 40-times) to mimic prey struggle (Pavlovič et al., 2017). For experiments with abscisic acid (ABA), 25 μL of 500 μM ABA was pipetted into the Venus flytrap 2 h after last mechanical stimulus. The tissue samples and digestive fluids were collected at regular time intervals after rapid trap closure up to 48 h. The number of hermetically sealed traps reopened up to 48 h was evaluated.

2.3. Extracellular measurements of electrical signals

Electrical signals were measured continuously for 48 h on solely mechanically induced traps and mechanically stimulated and supplemented with chemical stimuli (i.e. BSA, chitin). Extracellular measurements were conducted on the trap surface inside a Faraday cage with non-polarizable Ag–AgCl surface electrodes (Scanlab systems, Prague, Czech Republic) and moistened with a drop of conductive EV gel (Hellada, Prague, Czech Republic) commonly used in electrocardiography. The reference electrode was taped to the side of the plastic pot containing the plant submerged in 1–2 cm of water in a dish beneath the pot. The electrodes were connected to an amplifier made in-house [gain 1–1000, noise 2–3 μV , bandwidth (–3 dB) 10^5 Hz, response time 10 μs , input impedance $10^{12} \Omega$]. The signals from the amplifier were transferred to an analog–digital PC data converter (eight analog inputs, 12-bit converter, ± 10 V, PCA-7228AL, supplied by TEDIA, Plzeň, Czech Republic), collected every 6 ms (Hlaváčková et al., 2006; Ilík et al., 2010).

2.4. Quantification of phytohormones

Traps stimulated solely mechanically, mechanically supplemented with BSA or chitin as well as open non-stimulated traps were harvested after 0, 6, 24, and 48 h for quantification of plant hormones and stored at –80 °C. Quantification of JA, JA-Ile, *cis*-12-oxo-phytodienoic acid (*cis*-OPDA) and ABA, was performed according to the method described previously with minor modifications (Floková et al., 2014). Briefly, frozen plant material (20 mg) was homogenized and extracted using 1 mL of ice cold 10% MeOH/H₂O (v/v). A cocktail of stable isotope-labelled standards was added as follows: 10 pmol of [²H₆]JA, [²H₆]ABA, and [²H₅]cis-OPDA, and 0.1 pmol of [²H₂]JA-Ile (all from Olchemim Ltd, Czech Republic) per sample to validate the LC-MS/MS method. The extracts were purified using Oasis® HLB columns (30 mg/1 mL, Waters) and hormones were eluted with 80% methanol. Eluent was evaporated to dryness under a stream of nitrogen. Phytohormone levels were determined by ultra-high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) using an Acquity UPLC® I-Class System (Waters, Milford, MA, USA) equipped with an Acquity UPLC CSH® C18 column (100 × 2.1 mm; 1.7 μm ; Waters) coupled to a triple quadrupole mass spectrometer Xevo™ TQ-S MS (Waters MS Technologies, Manchester, UK). Two or three independent technical measurements were performed on five biological replicates.

2.5. Real time polymerase chain reaction (qPCR)

Samples were harvested 0, 2, 6, 12, 24 and 48 h after rapid trap closure, frozen in liquid nitrogen and stored in –80 °C before gene

expression analyses. Total RNA was extracted using Spectrum Plant Total RNA kit (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), DNase I treated and purified by RNA Clean & Concentrator-5 kit (Zymoresearch, USA) according to manufacturer's instructions. The integrity of RNA was checked by agarose (1%) gel electrophoresis. The concentration and sample purity were measured by NanoDrop™ 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The synthesis of first strand of cDNA was performed by ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA) using Oligo(dT)15 primers using manufacturer's protocol. The primers (Table S1) for *dionain*, *VF chitinase I* and reference genes *actin* were designated by Primer3plus tool (http://primer3plus.com/web_3.0.0/primer3web_input.htm). Gradient PCR was used to determine annealing temperature (T_a) of primers (Table S1). Each amplified product was checked by agarose (2%) gel electrophoresis and subsequently sequenced by Sanger method to verify product specificity at Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava. The stability of reference genes was evaluated by $2^{-\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) and BestKeeper tool (<http://www.gene-quantification.info/>) and the *actin* gene was suitable for gene expression analysis. For real time PCR, specific gene sequences were amplified by Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Melting curve analysis was performed at the end of each qPCR run. Real-time PCR reactions were performed in 96-well plates on Light Cycler II 480 (Roche, Basel, Switzerland) device and the relative changes in gene expression were estimated according to Pfaffl (2001). All samples for PCR experiments were analysed in three biological and three technical replicates.

2.6. SDS-PAGE and Western blots

For detection and quantification of cysteine protease (*dionain*), aspartic protease (*dionaeasin*) and type I chitinase, polyclonal antibodies against these proteins were raised in rabbits as described previously (Pavlovič et al., 2017).

The digestive fluid was collected 48 h after rapid trap closure, when the sufficient amount was secreted into the digestive cavity. Digestive fluid was collected in response to solely mechanical stimulation, and mechanical stimulation supplemented with chitin or BSA using a pipette forced in between the trap lobes. The digestive fluid from 10 different traps were pooled together to have sufficient volume for analyses. The samples for SDS-PAGE were heated and denatured for 30 min at 70 °C and mixed with modified Laemmli sample buffer to a final concentration of 50 mM tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 1% β -mercaptoethanol, 12.5 mM EDTA, and 0.02% bromophenol blue. The same volume of digestive fluid was electrophoresed in 10% (v/v) SDS-polyacrylamide gel (Schägger, 2006). The proteins in gels were either visualised by silver staining (ProteoSilver, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) or were transferred from the gel to a nitrocellulose membrane (Biorad, Germany) using a Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Biorad, Hercules, CA, USA). After blocking in TBS-T containing 5% BSA overnight, the membranes were incubated with the primary antibody (dilution 1:1000) for 1 h at room temperature. After washing, the membrane was incubated with the secondary antibody (dilution 1:10 000); the goat antirabbit IgG (H + L)-horse-radish peroxidase conjugate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Blots were visualised and chemiluminescence quantified by gel scanner Amersham Imager 600 (GE HealthCare Life Sciences, Japan).

2.7. Measurements of enzyme activities

Digestive fluid collected for Western blotting was also used for enzyme assays. To measure the activity of acid phosphatases we used chromogenic substrates, 4-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The substrate was prepared in 50 mM (pH 5.0) acetate buffer, and the concentration was 5 mM. Twenty five μ L of collected fluid was added to 525 μ L of 50 mM acetate buffer (pH 5.0), and mixed

with 400 μ L of the substrate. For control, 400 μ L of the substrate solution was mixed with 550 μ L of the acetate buffer. Mixed samples were incubated at 25 °C for 1 h and then 160 μ L of 1.0 N NaOH was added to terminate the reaction. Absorbance was measured at 405 nm with double-beam spectrophotometer Specord 250 Plus (Analytik Jena, Germany). A calibration curve was determined using 4-nitrophenol.

Endochitinase activity was measured using Chitinase assay kit (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) using 4-nitrophenyl β -D-N,N',N'-triacetylchitotriose as a substrate. Twentyfive μ L of collected fluid was added to 175 μ L of substrate at concentration 0.2 mg mL⁻¹. Mixed samples were incubated at 37 °C for 24 h and then 400 μ L of stop solution (sodium carbonate) was added to terminate the reaction. For control, 200 μ L of the substrate solution was also incubated. Absorbance was measured at 405 nm with double-beam spectrophotometer Specord 250 Plus (Analytik Jena, Germany). A calibration curve was determined using 4-nitrophenol.

Proteolytic activity of leaf exudates was determined by incubating 150 μ L of a sample with 150 μ L of 2% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in 200 mM glycine-HCl (pH 3.0) at 37 °C for 1 h. The reaction was stopped by the addition of 450 μ L of 5% (w/v) trichloroacetic acid. Samples were incubated on ice for 10 min, and centrifuged at 20,000 g for 10 min at 4 °C. Absorbance of the supernatant at 280 nm was measured by double-beam spectrophotometer Specord 250 Plus (Analytik Jena, Germany).

2.8. Statistical analyses

Before statistical analyses, the data were tested for homogeneity of variance (Brown-Forsythe test). If the homogeneity was fulfilled, one way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-hoc test was used (Origin 8.5.1, Northampton, MA, USA). If homogeneity was not present multiple comparisons by Welch's test with Bonferroni corrected alpha was used (Microsoft Excel).

3. Results

3.1. Electrical activity

Two touches of trigger hairs within few seconds induced two APs and rapid trap closure. Periodic mechanical stimulation delivered every 3 min interval induced a series of APs during 2 h (Fig. 1). After that, chemical stimulation by BSA and chitin did not induce any additional spontaneous APs during the course of 48 h (data not shown).

3.2. Factors affecting trap reopening

The induction of the narrowing phase was triggered by both mechanical stimulation and mechanical stimulation combined with chemostimulation (BSA, chitin) with 100% efficiency and all type of stimulations triggered secretion of digestive fluid. On average, almost three out of ten, closed traps without any additional chemical



Fig. 1. Typical action potentials (APs) generated in response to touching of trigger hair in Venus flytrap. Two touches generate two APs, and then the mechanical stimuli were delivered every 3 min. First 720 s is shown. No such AP was recorded in response to protein or chitin application during the course of 48 h.

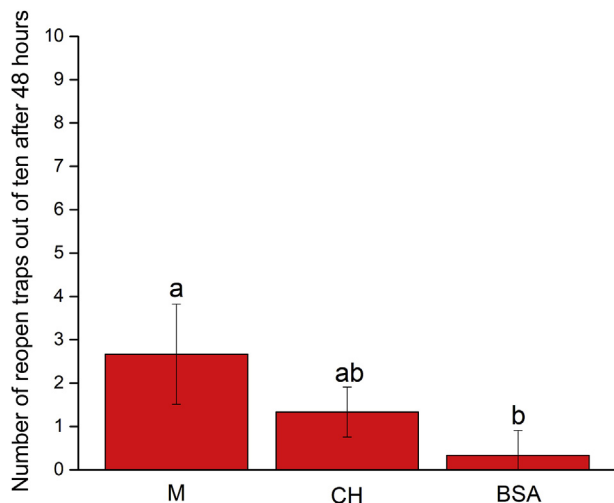


Fig. 2. Number of reopened hermetically sealed traps out of ten 48 h after rapid trap closure. Hermetical trap sealing was induced in 10 traps by mechanical stimulation (M) and mechanical stimulation combined with chitin (CH) or protein (BSA) and the number of reopened traps was evaluated after 48 h since the first mechanical stimulus. Means \pm S.D., $n = 3$.

stimulation reopened within 48 h with digestive fluid reabsorbed/evaporated. The presence of protein was the most effective in keeping the traps hermetically sealed after 48 h. On average, only one out of thirty traps reopened after 48 h. The presence of chitin was less effective than protein in keeping the traps hermetically sealed (Fig. 2).

3.3. Jasmonate accumulation in response to mechanical and chemical stimuli

Stimulated traps were harvested to investigate the concentration of stress-related phytohormones. At almost each time point, analysis of treated traps showed that presence of chitin but mainly protein induced higher accumulation of JA than mechanostimulation alone (Fig. 3A). The similar trend was found for JA-Ile (Fig. 3B). The rise of *cis*-OPDA after addition of protein and chitin was also evident after 6 and 48 h, respectively (Fig. 3C). The significant increase of ABA was found after mechanical stimulation supplemented with chitin. Mechanical stimulation and BSA resulted in significant decrease of ABA after 6 h (Fig. 3D).

3.4. Induction of gene expression

Based on the phytohormone analysis, which revealed increased jasmonate concentration in trap tissue in response to all stimuli, we analysed the time dependence of mRNA level of two selected JA-responsive genes: cysteine protease dionain and type I chitinase

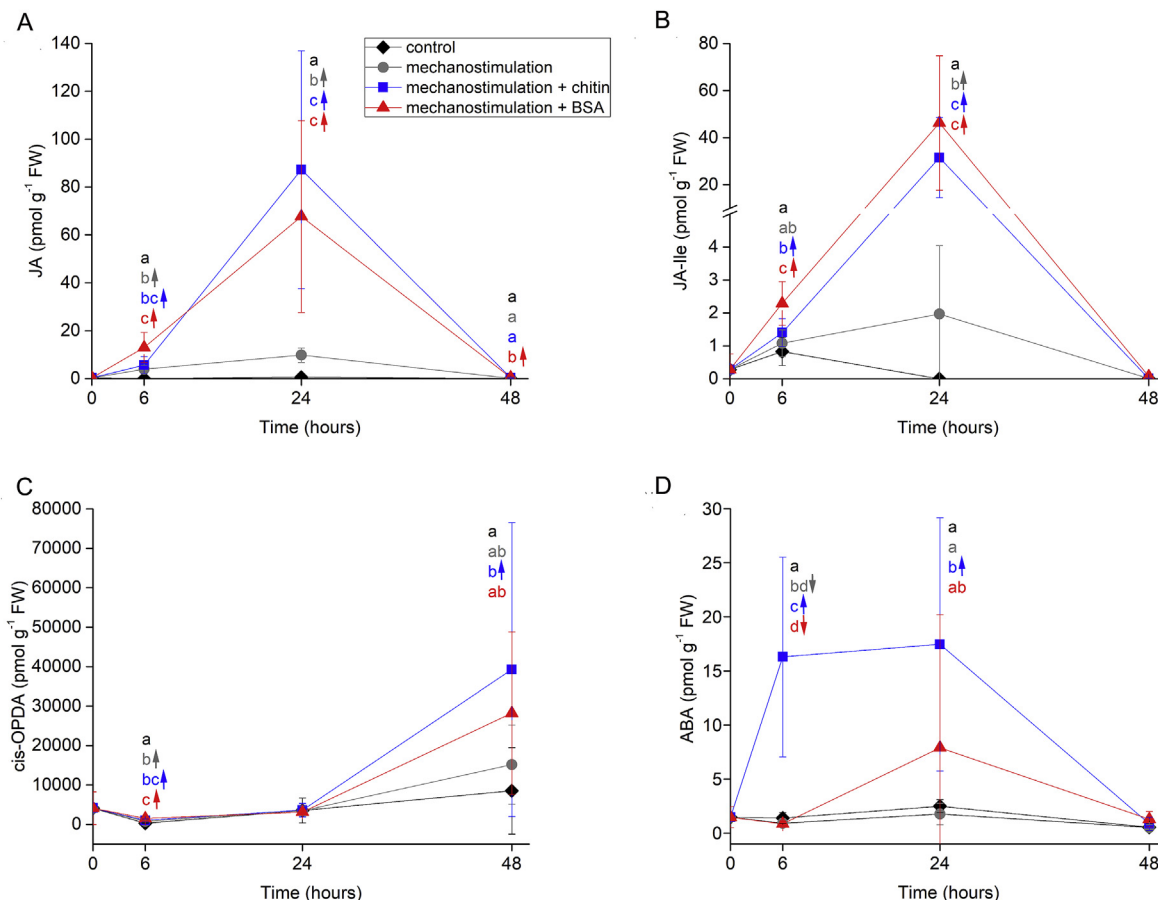


Fig. 3. Timecourse of phytohormone accumulation in response to mechanostimulation, and mechanostimulation supplemented with BSA or chitin. (A) Jasmonic acid (JA), (B) Jasmonoyl-L-isoleucine (JA-Ile), (C) *Cis*-12-oxophytodienoic acid (*cis*-OPDA), (D) Abscisic acid (ABA). Black rhombus – control open traps, grey circle – 2 h of solely mechanical stimulation, blue square – 2 h mechanical stimulation + chitin, red triangle – 2 h mechanical stimulation + protein (BSA). Means \pm S.D., $n = 10$ –15. Different letters denote significant differences at given time point at $P < 0.05$ (ANOVA, Tukey's test or Welch's test if non-homogeneity was present). Downward pointing arrows indicate significant decrease in comparison to control traps, upward pointing arrows indicate significant increase in comparison to control traps. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

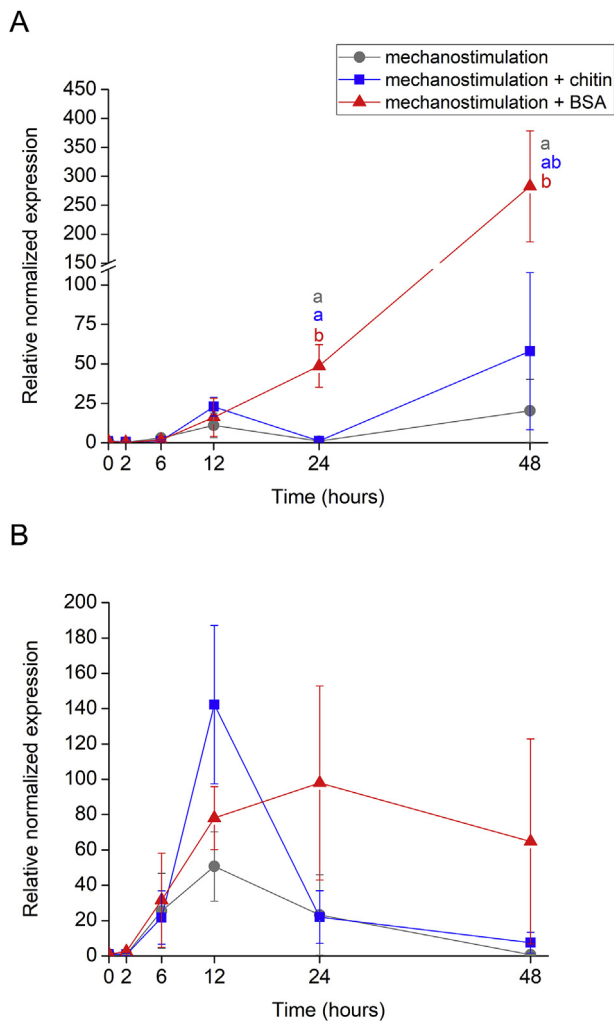


Fig. 4. Timecourse of gene expression in response to mechanostimulation, and mechanostimulation supplemented with BSA or chitin. (A) Cysteine protease dionain, (B) type I chitinase. Grey circle – 2 h of solely mechanical stimulation, blue square – 2 h mechanical stimulation + chitin, red triangle – 2 h mechanical stimulation + protein (BSA). Gene expression for control traps was set as 1. Mean expression \pm S.E. from three biological replicates ($n = 3$). Different letters denote significant differences at given timepoint at $P < 0.05$ (ANOVA, Tukey's test or Welch's test if non-homogeneity was present). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

responsible for proteolytic and endochitinase activities, respectively. All stimuli significantly increase mRNA level encoding both enzymes but with different kinetic. Whereas induced expression of both genes was obvious in response to solely mechanical stimulation, mechanical stimulation supplemented with chitin and mainly mechanical stimulation supplemented with BSA kept the highest pool of mRNA level (Fig. 4A and B). Whereas, chitin induced high expression of chitinase mainly after 12 h, proteins induced high expression for longer time period (Fig. 4B). But because of high variability among individual traps, the statistical significance was evident only for dionain after 24 and 48 h for BSA treatment (Fig. 4A).

3.5. Digestive enzymes and enzyme activities

To semiquantify the amount of secreted enzymes responsible for activities in the digestive fluid, the same volume of digestive fluid was electrophoresed, and the SDS-PAGE revealed the secretion of very similar protein profiles in response to mechanical stimulation and

mechanical stimulation supplemented with chitin and BSA. The intensity of silver staining revealed that the highest protein secretion was induced after addition of BSA and the lowest after application of chitin (Fig. 5A). Immunoblot analysis confirmed the presence of the following dominant digestive enzymes in the fluid: cysteine protease dionain (Fig. 5B), aspartic protease dionain (Fig. 5C) and VF1 chitinase (Fig. 5D) in response to all stimuli. The signal intensity for all enzymes was the highest in response to mechanical stimulation supplemented with protein. On the other hand, chitin induced the lowest secretion of cysteine protease dionain but statistical significance was not obvious (Fig. 5B).

In all cases, the digestive fluid collected after 48 h exhibited phosphatase, endochitinase and proteolytic activities and these activities were in accordance with Western blots the highest after additional stimulation with BSA. Chitin inhibited phosphatase and protease activity in comparison to solely mechanical stimulation (Fig. 6A and B). Application of chitin increased endochitinase activity by 200% in comparison to mechanical stimulation but not significantly (Fig. 6C). The exogenously applied ABA was not able to reverse mechanically induced enzyme activities (Fig. S1).

4. Discussion

Early electrical events during and after prey capture in Venus flytrap are known for centuries (Burdon-Sanderson, 1873; Hodick and Sievers, 1989; Volkov et al., 2008) but later elements in signal transduction are much less understood. Mechanical stimulation and generation of APs are able to trigger not only rapid trap movement but also hermetical trap sealing and release of digestive fluid with the enzymes (Lichtner and Williams, 1977; Libiaková et al., 2014). The synthesis of the enzymes is under transcriptional control. More than three APs are required to trigger an expression of genes encoding the enzymes and this expression is proportional to the number of APs (Böhm et al., 2016a). However mechanical stimuli alone are not sufficient to trigger full and long-term enzyme activity in digestive fluid (Libiaková et al., 2014) and solely mechanically induced traps reopened soon (Fig. 2). It has been proposed that various nitrogenous substances, amino acids and ions present in insect prey are able to trigger and keep hermetical trap sealing and release of digestive fluid with enzymes. Beneficial to plant, chemical stimuli may keep the digestive process running for several days after prey death, otherwise the trap would reopen with incompletely digested prey after mechanical stimulation by prey ceases. Among the most effective chemical substances are uric acid, glutamine, ammonium and sodium (Robins, 1976; Lichtner and Williams, 1977; Libiaková et al., 2014). However, it is unclear how these chemical signals keep the digestive process running, whether the electrical signals are involved or not. Balotin and Di Palma (1962), Scherzer et al. (2013) and Böhm et al. (2016b) documented spontaneous generation of APs after application of 3% NaCl and 10 mM NH_4Cl . However, APs have never been recorded in hermetically closed traps containing dead prey (Affolter and Olivo, 1975), in response to NH_4Cl applied to non-activated traps (Scherzer et al., 2013; Libiaková et al., 2014) or protein and chitin (this study). It is tempting to assume that spontaneous generation of APs recorded in response to chemical stimuli is reaction to sudden application of chemicals and thus experimental artefacts, because prey digestion is rather slow and continuous process, where chemical stimuli are slowly released from decomposing prey. In this view, it is more probable that rather slow depolarization of membrane potential in digestive glands occurred, as was documented for the uptake of K^+ , Na^+ and NH_4^+ (Scherzer et al., 2013, 2015; Böhm et al., 2016b) and the ion fluxes may participate to control jasmonate signalling pathway (Lenglet et al., 2017). Indeed, application of NH_4Cl kept higher jasmonate level and enzyme activity than mechanical stimulation alone after 36–48 h in Venus flytrap (Libiaková et al., 2014). This is consistent with our results, where application of BSA protein was the most effective in jasmonate accumulation, keeping the trap hermetically sealed, and

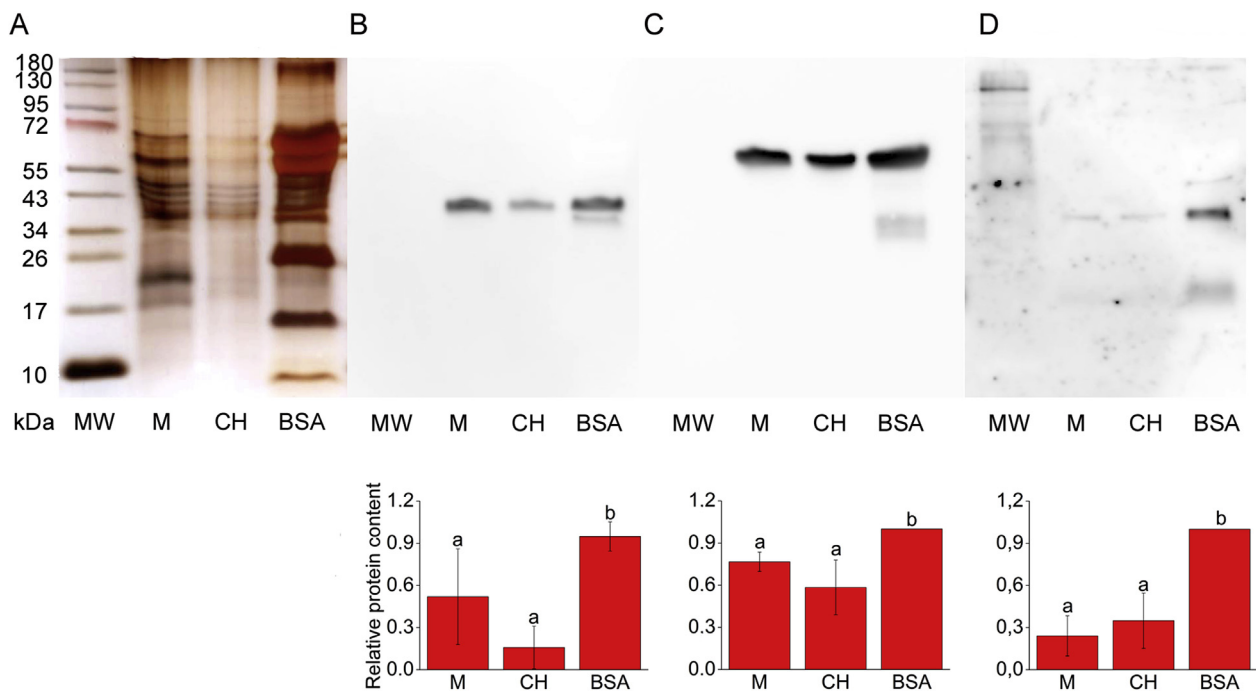


Fig. 5. Immunodetection of digestive enzymes and their quantification from the secreted fluid 48 h after rapid trap closure. (A) Silver-stained SDS-PAGE of digestive fluid in response to different stimuli, (B) Western blot analysis using antibody against cysteine protease dionain, (C) Western blot analysis using antibody against aspartic protease dionaecin, (D) Western blot analysis using antibody against type I chitinase. MW – molecular weight, M – 2 h of mechanical stimulation and 46 h waiting before harvesting, CH – 2 h of mechanical stimulation and 48 h of chitin, BSA – 2 h of mechanical stimulation and 48 h of protein (BSA). The same volume (20 μ L) of secreted digestive fluid was loaded. The blots shown are representative of three independent experiments and the average signal was quantified by chemiluminescence. Means \pm S.D., $n = 3$. Different letters denote significant differences at $P < 0.05$ (ANOVA, Tukey's test or Welch's test if non-homogeneity was present).

upregulation of enzyme activity. Scherzer et al. (2013) documented activity of unknown deaminase which release NH_4^+ from proteins in digestive fluid of Venus flytrap. Therefore the ability of proteins keeping the jasmonate level high and digestive process running for several days after prey capture may be mediated by NH_4^+ (Libiaková et al., 2014).

Our results clearly showed that the ability to induce enzyme activity is not substrate specific; BSA protein was the best not only in upregulation of proteolytic activities but also for phosphatase and chitinase activities (Fig. 6A,B,C). The similar results were obtained in the study of Saganová et al. (2018) in pitcher plant *Nepenthes x Mixta*. Gallie and Chang (1997) also showed that BSA was powerful inducer of proteolytic, phosphatase and RNase activities in the pitcher plant *Sarracenia purpurea*. Nishimura et al. (2013) revealed that transcription of S-like RNase genes was non-specifically induced in response to application of BSA in Venus flytrap. However, our results are in discrepancy with studies of Matušíková et al. (2005) and Jopčík et al. (2017) on the sundew plants *Drosera rotundifolia*, who found that chitinase activity was markedly increased due to the induction of chitinase gene expression upon application of notably chitin. Application of gelatine protein increased mainly the proteolytic activity of leaf exudates, although chitinase activity was also increased but to lesser extent what indicated that the reaction of sundew leaves depended more on the molecular nature of the inducer applied. This discrepancy could be caused by using different form of chitin and protein applied, by using *in vitro* plants in their experiments or different response in the genus *Drosera*. Our results of enzymatic activities could be related to the fact, that carnivorous plants prefer protein over chitin as a source of nitrogen and only after the protein is tasted the digestive process is fully activated. The leaf nitrogen content was doubled in protein-fed sundew plants in comparison to chitin-fed plants indicating that the proteins were digested more effectively and resulted in significantly higher chlorophyll contents (Pavlovič et al., 2016). Indeed, the chitin

exoskeleton of a digested prey seems to be hard dissolved or non-significantly affected after digestion in carnivorous plants (Juniper et al., 1989). Even Darwin has classified chitin among the substances which are not digested by the secretion of *D. rotundifolia* (Darwin, 1875). Chitin did not have any significant additive effect to mechanical stimulation but rather inhibitory on proteolytic activity (Fig. 6B).

Mechanical stimulation alone is sufficient for accumulation of high level of jasmonates during first 2 h after prey capture (Pavlovič et al., 2017) but for sustained enzyme production, chemical stimuli from prey are necessary keeping jasmonate level high. In the present study we have shown a clear connection between chemical stimuli in the form of BSA and accumulation of jasmonates. Libiaková et al. (2014) mimicked a prey and looked at mechanical and chemical stimulation as a device for prey capture and digestion separately. They showed accumulation of JA and JA-Ile in response to mechanical stimulation but much higher in response to chemical stimulation (by KH_2PO_4 and NH_4Cl) after 36–48 h. They also found that the external application of JA bypassed the mechanical and chemical stimulation and induced a high abundance of dionain and proteolytic activity in digestive fluid. These results documented the role of jasmonates in regulation of proteolytic activity in response to different stimuli from captured prey. Yilamujiang et al. (2016) used chitin as component of the insect's exoskeleton which triggered the accumulation of jasmonates as well as the transcription of studied genes encoding the aspartic protease nepenthesin I and type III chitinase in *Nepenthes alata* plants, but in comparison to insect prey to a lower level. They suggested that some additional stimuli from insect prey was necessary to mimic the prey. We think that this additional stimulus is protein. In our study, the high enzymatic activities after addition of protein correlate with the high pool of jasmonates (Fig. 3A and B). There was a clear trend toward higher expression of cysteine protease in traps which digested the protein (Fig. 4A). The protein was also the most effective in keeping the traps hermetically sealed (Fig. 2). On the other hand, the mechanostimulation supplemented with chitin

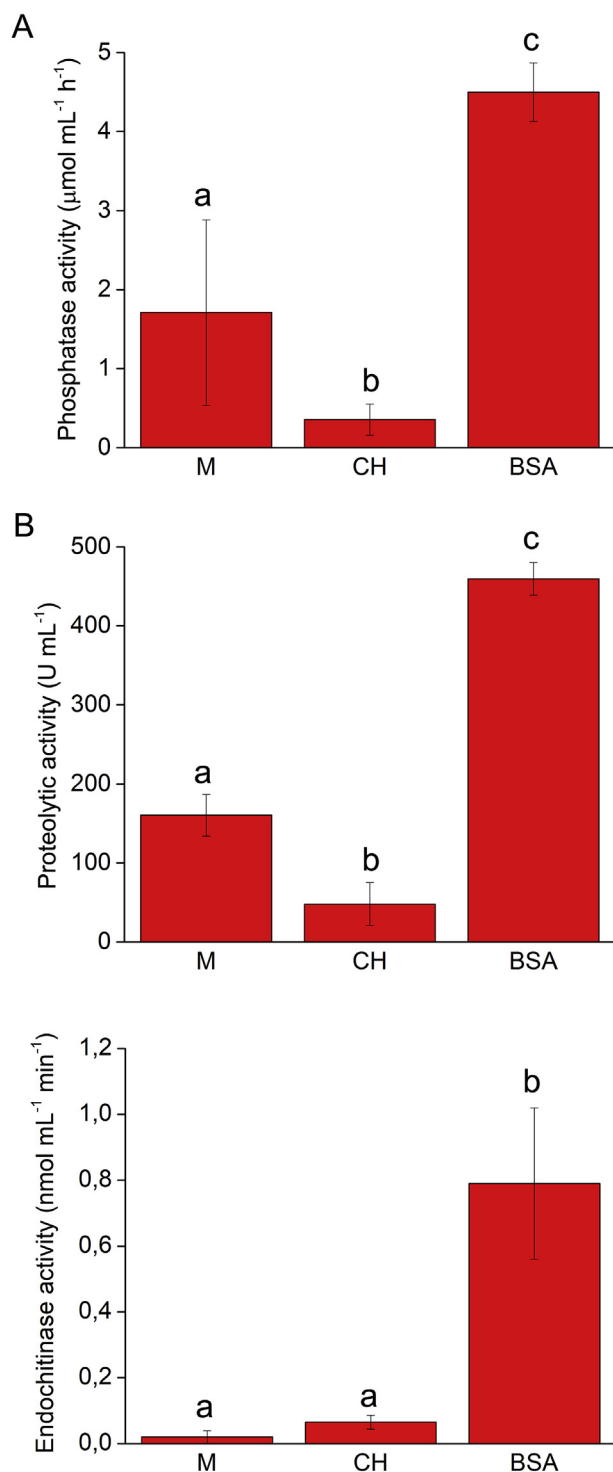


Fig. 6. Enzyme activity in digestive fluid 48 h after rapid trap closure. (A) Phosphatase activity, (B) proteolytic activity, (C) endochitinase activity. M – 2 h of mechanical stimulation and 46 h waiting before harvesting, CH – 2 h of mechanical stimulation and 48 h of chitin, BSA – 2 h of mechanical stimulation and 48 h of protein (BSA). Different letters denote significant differences at $P < 0.05$ (ANOVA, Tukey's test or Welch's test if the non-homogeneity was present). Means \pm S.D., $n = 6-7$.

induced much higher pool of jasmonates than mechanostimulation alone (Fig. 3A and B) but the transcript level for dionain was more-less the same (Fig. 4A), and overall proteolytic activity and abundance of dionain was rather lower (Fig. 5B, 6B). Such discrepancy between jasmonate level and gene expression was also documented in response to

chitin and fruit fly application in *Nepenthes alata*. Chitin induced higher accumulation of jasmonates but lower transcript levels than live prey what indicates additional regulatory elements (Yilamujiang et al., 2016). It would be tempting to assume that increased level of ABA after chitin application (Fig. 3D) is involved in suppression of proteolytic activity. Increased level of ABA after chitosan application was documented in non-carnivorous plants where it was suggested to mediate chitin-induced stomata closure after pathogen attack (Iriti and Faoro, 2008; Iriti et al., 2009). However external application of ABA was not able to significantly inhibit enzyme activity triggered by mechanical stimulation (Fig. S1). Krausko et al. (2017) also showed that the high enzyme activity was induced only by JA and ABA did not reverse JA-induced enzyme activity in sundew plants what exclude the inhibitory role of ABA on JA-induced secretion in carnivorous plants. The ABA was found to may affect trap sensitivity through APs (Escalante-Pérez et al., 2011), however no APs were detected in response to chemical stimulation in this and previous studies (Affolter and Olivo, 1975; Libiaková et al., 2014). Thus increased level of ABA does not play any role in down-regulation of JA-dependent enzyme activity and is a probably only the consequence of conserved defence mechanisms in plants.

5. Conclusions

Our study clearly showed that chemical signals from prey are important for regulation of enzyme activities. Although chitin is rather a weak stimulant in addition to mechanical stimulation and can even inhibit protease activity in the fluid, the presence of protein induced the highest accumulation of jasmonates, mRNA levels, enzyme abundances and activities of chitinase and protease in digestive fluid. Thus, protein in traps represents an universal signal for activation of digestive process in Venus flytrap and most probably also in others carnivorous genera.

Author contributions

AP designed the study; JJ, IP and ON did phytohormone analysis, ML and BB performed the qPCR, JJ measured electrical signals, enzyme activities and did SDS-PAGE and Western blots, JJ and AP wrote the manuscript and AP and ON provided materials and financial support.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We would like to thank grant No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000827 (Plants as a Tool for Sustainable Global Development) from the Operational Programme Research, Development and Education, MEYS and Internal Grant of Palacký University (IGA_PrF_2019_030 and IGA_PrF_2019_20). This publication is the result of the project implementation: Comenius University in Bratislava Science Park supported by the Research and Development Operational Programme funded by the ERDF. Grant number: ITMS 26240220086.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.013>.

References

Affolter, J.M., Olivo, R.F., 1975. Action potentials in Venus's-flytraps: long-term observations following the capture of prey. *Am. Midl. Nat.* 93, 443.

- Balotin, N.M., Di Palma, J.R., 1962. Spontaneous electrical activity of *Dionaea muscipula*. Science 138, 1338–1339.
- Bemm, F., Becker, D., Larisch, C., Kreuzer, I., Escalante-Perez, M., Schulze, W.X., Ankenbrand, M., Van de Weyer, A.-L., Krol, E., Al-Rasheid, K.A., et al., 2016. Venus flytrap carnivorous lifestyle builds on herbivore defense strategies. Genome Res. 26, 812–825.
- Böhm, J., Scherzer, S., Krol, E., Kreuzer, I., von Meyer, K., Lorey, C., Mueller, T.D., Shabala, L., Monte, I., Solano, R., et al., 2016a. The venus flytrap *Dionaea muscipula* counts prey-induced action potentials to induce sodium uptake. Curr. Biol. 26, 286–295.
- Böhm, J., Scherzer, S., Shabala, S., Krol, E., Neher, E., Mueller, T.D., Hedrich, R., 2016b. Venus flytrap HKT1-type channel provides for prey sodium uptake into carnivorous plant without conflicting with electrical excitability. Mol. Plant 9, 428–436.
- Brown, W.H., 1916. The mechanism of movement and the duration of the effect of stimulation in the leaves of *Dionaea*. Am. J. Bot. 3, 68–90.
- Burdon-Sanderson, J., 1873. Note on the electrical phenomena which accompany stimulation of the leaf of *Dionaea muscipula* Ellis. Proc. R. Soc. Lond. 21, 495–496.
- Darwin, C., 1875. Insectivorous Plants. John Murray, London.
- Eilenberg, H., Pnini-Cohen, S., Schuster, S., Movtchan, A., Zilberstein, A., 2006. Isolation and characterization of chitinase genes from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. J. Exp. Bot. 57, 2775–2784.
- Escalante-Pérez, M., Krol, E., Stange, A., Geiger, D., Al-Rasheid, K.A., Hause, B., Neher, E., Hedrich, R., 2011. A special pair of phytohormones controls excitability, slow closure, and external stomach formation in the Venus flytrap. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 15492–15497.
- Fisahn, J., Herde, O., Willmitzer, L., Peña-Cortés, H., 2004. Analysis of the transient increase in cytosolic Ca^{2+} during the action potential of higher plants with high temporal resolution: requirement of Ca^{2+} transients for induction of jasmonic acid biosynthesis and PINII gene expression. Plant Cell Physiol. 45, 456–459.
- Floková, K., Tarkovská, D., Miersch, O., Strnad, M., Wasternack, C., Novák, O., 2014. UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. Phytochemistry 105, 147–157.
- 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. Nat. Chem. Biol. 5, 344–350.
- Gallie, D.R., Chang, S.C., 1997. Signal transduction in the carnivorous plant *Sarracenia purpurea*. Regulation of secretory hydrolase expression during development and in response to resources. Plant Physiol. 115, 1461–1471.
- Hedrich, R., Neher, E., 2018. Venus flytrap: how an excitable, carnivorous plant works. Trends Plant Sci. 23, 220–234.
- Hlaváčková, V., Krchňák, P., Nauš, J., Novák, O., Špundová, M., Strnad, M., 2006. Electrical and chemical signals involved in short-term systemic photosynthetic responses of tobacco plants to local burning. Planta 225, 235–244.
- Hodick, D., Sievers, A., 1988. The action potential of *Dionaea muscipula* Ellis. Planta 174, 8–18.
- Hodick, D., Sievers, A., 1989. On the mechanism of trap closure of Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis). Planta 179, 32–42.
- 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. Biol. Plant. 54, 185–190.
- Iriti, M., Faoro, F., 2008. Abscisic acid is involved in chitosan-induced resistance to tobacco necrosis virus (TNV). Plant Physiol. Biochem. 46, 1106–1111.
- Iriti, M., Picchi, V., Rossoni, M., Gomasaras, S., Ludwig, N., Gargano, M., Faoro, F., 2009. Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. Environ. Exp. Bot. 66, 493–500.
- Jopčík, M., Moravčíková, J., Matušíková, I., Bauer, M., Rajnec, M., Libantová, J., 2017. Structural and functional characterisation of a class I endochitinase of the carnivorous sundew (*Drosera rotundifolia* L.). Planta 245, 313–327.
- Juniper, B.E., Robins, R.J., Joel, D.M., 1989. The Carnivorous Plants. Academic Press.
- Krausko, M., Perutka, Z., Šebela, M., Šamajová, O., Šamaj, J., Novák, O., Pavlovič, A., 2017. The role of electrical and jasmonate signalling in the recognition of captured prey in the carnivorous sundew plant *Drosera capensis*. New Phytol. 213, 1818–1835.
- Krol, E., Dziubinska, H., Stolarz, M., Trebacz, K., 2006. Effects of ion channel inhibitors on cold- and electrically-induced action potentials in *Dionaea muscipula*. Biol. Plant. 50, 411–416.
- Lenglet, A., Jašlan, D., Toyota, M., Mueller, M., Müller, T., Schönknecht, G., Marten, I., Gilroy, S., Hedrich, R., Farmer, E.E., 2017. Control of basal jasmonate signalling and defence through modulation of intracellular cation flux capacity. New Phytol. 216, 1161–1169.
- Libíková, M., Floková, K., Novák, O., Slovácová, L., 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, e104424.
- Lichtner, F.T., Williams, S.E., 1977. Prey capture and factors controlling trap narrowing in *Dionaea* (Droseraceae). Am. J. Bot. 64, 881–886.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 25, 402–408.
- Matušíková, I., Salaj, J., Moravčíková, J., Mlynářová, L., Nap, J.P., Libantová, J., 2005. Tentacles of in vitro-grown round-leaf sundew (*Drosera rotundifolia* L.) show induction of chitinase activity upon mimicking the presence of prey. Planta 222, 1020–1027.
- Nakamura, Y., Reichelt, M., Mayer, V.E., Mithöfer, A., 2013. Jasmonates trigger prey-induced formation of “outer stomach” in carnivorous sundew plants. Proc. R. Soc. Biol. Sci. 280, 20130228.
- Nishimura, E., Kawahara, M., Kodaira, R., Kume, M., Arai, N., Nishikawa, J., Ohya, T., 2013. S-like ribonuclease gene expression in carnivorous plants. Planta 238, 955–967.
- Pavlovič, A., Jakšová, J., Novák, O., 2017. Triggering a false alarm: wounding mimics prey capture in the carnivorous Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). New Phytol. 216, 927–938.
- Pavlovič, A., Krausko, M., Adamec, L., 2016. A carnivorous sundew plant prefers protein over chitin as a source of nitrogen from its traps. Plant Physiol. Biochem. 104, 11–16.
- Pavlovič, A., Mithöfer, A., 2019. Jasmonate signalling in carnivorous plants: copycat of plant defence mechanisms. J. Exp. Bot. 70, 3379–3389.
- Pavlovič, A., Saganová, M., 2015. A novel insight into the cost–benefit model for the evolution of botanical carnivory. Ann. Bot. 115, 1075–1092.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 29, 2003–2007.
- Robins, R.J., 1976. The nature of the stimuli causing digestive juice secretion in *Dionaea muscipula* Ellis (Venus's flytrap). Planta 128, 263–265.
- Saganová, M., Bokor, B., Stolarík, T., Pavlovič, A., 2018. Regulation of enzyme activities in carnivorous pitcher plants of the genus *Nepenthes*. Planta 248, 451–464.
- Schägger, H., 2006. Tricine-SDS-PAGE. Nat. Protoc. 1, 16–22.
- Scherzer, S., Böhm, J., Krol, E., Shabala, L., Kreuzer, I., Larisch, C., Bemm, F., Al-Rasheid, K.A., Shabala, S., Rennenberg, H., et al., 2015. Calcium sensor kinase activates potassium uptake systems in gland cells of Venus flytraps. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 7309–7314.
- Scherzer, S., Krol, E., Kreuzer, I., Kruse, J., Karl, F., von Rüden, M., Escalante-Perez, M., Müller, T., Rennenberg, H., Al-Rasheid, K.A., et al., 2013. The *Dionaea muscipula* ammonium channel DmAMT1 provides NH_4^+ uptake associated with Venus flytrap's prey digestion. Curr. Biol. 23, 1649–1657.
- Scherzer, S., Shabala, L., Hedrich, B., Fromm, J., Bauer, H., Munz, E., Jakob, P., Al-Rasheid, K.A.S., Kreuzer, I., Becker, D., et al., 2017. Insect haptoelectrical stimulation of Venus flytrap triggers exocytosis in gland cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 114, 4822–4827.
- 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. Mol. Cell. Proteom. 11, 1306–1319.
- Sheard, L.B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T.R., Kobayashi, Y., Hsu, F.F., Sharon, M., Browse, J., et al., 2010. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentialized COI1–JAZ co-receptor. Nature 468, 400–405.
- Sibaoka, T., 1991. Rapid plant movements triggered by action potentials. Bot. Mag. Tokyo 104, 73–95.
- Staswick, P.E., Tiryaki, I., 2004. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. The Plant Cell 16, 2117–2127.
- Takahashi, K., Suzuki, T., Nishii, W., Kubota, K., Shibata, C., Isobe, T., Dohmae, N., 2011. A cysteine endopeptidase (“Dionain”) is involved in the digestive fluid of *Dionaea muscipula* (Venus's Fly-trap). Biosci. Biotechnol. Biochem. 72, 346–348.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandoor, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., Browse, J., 2007. JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. Nature 448, 661–665.
- Volkov, A.G., Adesina, T., Markin, V.S., Jovanov, E., 2008. Kinetics and mechanism of *Dionaea muscipula* trap closing. Plant Physiol. 146, 694–702.
- Volkov, A.G., Pinnock, M.-R., Lowe, D.C., Gay, M.S., Markin, V.S., 2011. Complete hunting cycle of *Dionaea muscipula*: consecutive steps and their electrical properties. J. Plant Physiol. 168, 109–120.
- Wasternack, C., Kombrink, E., 2010. Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. ACS Chem. Biol. 5, 63–77.
- Yan, C., Fan, M., Yang, M., Zhao, J., Zhang, W., Su, Y., Xiao, L., Deng, H., Xie, D., 2018. Injury activates Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphorylation of JAV1-JAZ8-WRKY51 complex for jasmonate biosynthesis. Mol. Cell 70, 136–149.
- Yilamujiang, A., Reichelt, M., Mithöfer, A., 2016. Slow food: insect prey and chitin induce phytohormone accumulation and gene expression in carnivorous *Nepenthes* plants. Ann. Bot. 118, 369–375.

SUPPLEMENTARY DATA

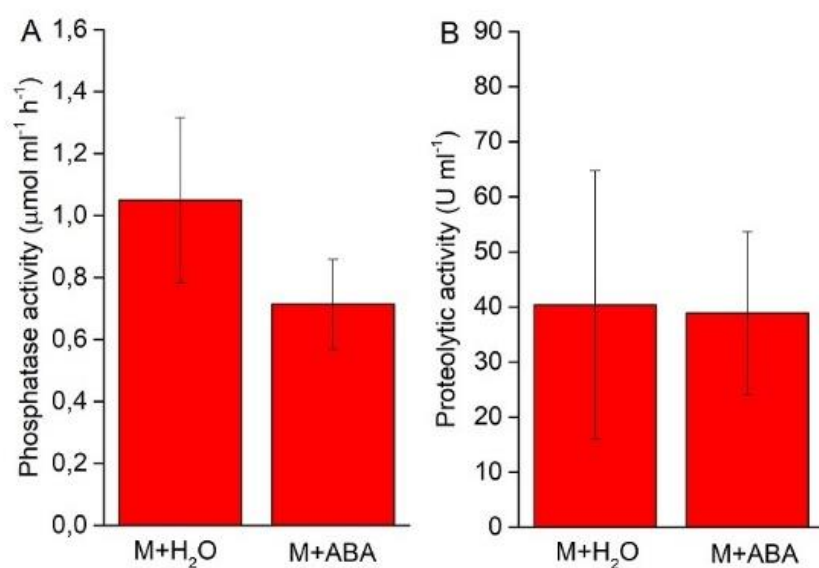


Fig. S1 Enzyme activity in digestive fluid 48 hours after external application of abscisic acid (ABA). (A) Phosphatase activity, (B) proteolytic activity. Means \pm S.E., $n = 3$. No significant differences were found (Student's t -test).

Table S1 Primer sequences and properties for the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).

T_a – annealing temperature.

Primer / accession number	Product size (bp)	Primer sequence (5' - 3' direction)	T _a (°C)
<i>actin</i> / KC285589.1.	212	Forward: TCTTTGATTGGGATGGAAGC Reverse: CTCTCTGGAGGAGCAACCAC	58
<i>dionain I</i> / KP663370.1	161	Forward: ATGGGGCGATGATGATCTTA Reverse: CTTCTCCGCATCATCCTTGT	58
<i>chitinase I</i> / KF597524.1	207	Forward: GCTCTGCATTTACCGTTTT Reverse: ACAATGGAGCCAACATCACC	58

Publikace II.

**Jasmonate-independent regulation of digestive enzyme activity in the carnivorous
butterwort *Pinguicula* × *Tina***

Název: Jasmonate-independent regulation of digestive enzyme activity in the carnivorous butterwort *Pinguicula* × *Tina*

Autoři: Kocáb O., Jakšová J., Novák O., Petřík I., Lenobel R., Chamrád I., Pavlovič A.

Status: publikována v roce 2020 v *Journal of Experimental Botany* **71**, 3749-3758
DOI: 10.1093/jxb/eraa159

Souhrn:

Při studiu masožravých rostlin byla nalezena nová role pro rostlinné hormony jasmonáty – regulace aktivity trávicích enzymů. Předchozí studie, které odhalily zapojení jasmonátů do trávicího procesu, byly ale zaměřeny pouze na tři rody masožravých rostlin – rosnatka (*Drosera*), mucholapka (*Dionaea*) a láchkovka (*Nepenthes*), které všechny spadají do řádu hvozdíkotvaré (Caryophyllales). V této studii nás zajímalo, zdali je jasmonátová signalizace univerzální a v masožravých rostlinách všudypřítomnou signální drahou, která tedy existuje i mimo řád hvozdíkotvaré. Aby bylo odpovězeno na tuto otázku, byla použita masožravá tučnice (hybrid *Pinguicula* × *Tina*) z řádu hluchavkotvaré (Lamiales) a jako kořist sloužila octomilka (*Drosophila melanogaster*). Kořist vyvolala významně zvýšenou aktivitu proteáz, kyselých fosfatáz, amyláz a exochitináz po 2 hodinách po krmení. Po 24 byly významně zvýšené aktivity také dalších studovaných trávicích enzymů endochitinázy a chitobiositázy. Obsah kyseliny jasmonové (JA) se však významně nezvýšila ani po 2 ani po 24 hodinách od krmení. Aby se vyloučila možnost, že by analýzy byly ovlivněny použitím nemodelového rostlinného materiálu, byl list tučnice opakovaně poraněn jehlou. To oproti krmení vyvolalo významné zvýšení JA i jejího isoleucinového konjugátu (JA-Ile). Aby bylo dále vyloučeno, že se v tučnici jasmonáty opravdu nepodílejí na vylučování enzymů, byla na list zevně aplikovaná kyselina jasmonová a koronatin (molekulární agonista JA-Ile). Ani jedna chemikálie ale nebyla schopna enzymovou aktivitu zvýšit. Ačkoli jsou tedy jasmonáty v rostlinném pletivu přítomny a uplatňují se při obraně proti poškození, tučnice nepřevzala jasmonátovou signalizaci pro indukci enzymových aktivit v odpovědi na chycení kořisti a způsob regulace enzymů se liší. Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo dále identifikováno osm enzymů, z nichž mnohé byly již dříve objeveny v jiných rodech masožravých rostlin. Tomu se však vymyká alfa-amyláza, která je zatím v masožravých rostlinách unikátní. To může naznačovat, že pro masožravost byly také exaptovány geny, které nesouvisejí s obrannými mechanismy rostlin. Navíc bylo poprvé ukázáno, že jako masožravý orgán může kromě listu sloužit i květní stopka.

Příspěvní autorů:

Výzkum:

- příprava a odebírání materiálů: O. Kocáb
- měření elektrických signálů: A. Pavlovič
- kvantifikace fytohormonů: J. Jakšová, I. Petřík, O. Novák
- měření enzymových aktivit: O. Kocáb
- SDS-PAGE a Western bloty: O. Kocáb
- identifikace proteinů: R. Lenobel, I. Chamrád

Konceptualizace: A. Pavlovič

Supervize: A. Pavlovič, I. Petřík, O. Novák

Vizualizace: A. Pavlovič

Statistika: A. Pavlovič

Psaní – původní rukopis: O. Kocáb, A. Pavlovič

Psaní – editace: O. Kocáb, A. Pavlovič

Získání financování: A. Pavlovič, O. Novák

Podíl J. Jakšové: 10 %



RESEARCH PAPER

Jasmonate-independent regulation of digestive enzyme activity in the carnivorous butterwort *Pinguicula* × *Tina*

Ondřej Kocáb¹, Jana Jakšová¹, Ondřej Novák², Ivan Petřík², René Lenobel³, Ivo Chamrád³, and Andrej Pavlovič^{1,*}

¹ Department of Biophysics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, Olomouc CZ-783 71, Czech Republic

² Laboratory of Growth Regulators, Institute of Experimental Botany, The Czech Academy of Sciences and Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, Olomouc CZ-783 71, Czech Republic

³ Department of Protein Biochemistry and Proteomics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, Olomouc CZ-783 71, Czech Republic.

* Correspondence: andrej.pavlovic@upol.cz

Received 12 December 2019; Editorial decision 23 March 2020; Accepted 25 March 2020

Editor: John Lunn, Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Germany

Abstract

Carnivorous plants within the order Caryophyllales use jasmonates, a class of phytohormone, in the regulation of digestive enzyme activities. We used the carnivorous butterwort *Pinguicula* × *Tina* from the order Lamiales to investigate whether jasmonate signaling is a universal and ubiquitous signaling pathway that exists outside the order Caryophyllales. We measured the electrical signals, enzyme activities, and phytohormone tissue levels in response to prey capture. Mass spectrometry was used to identify proteins in the digestive secretion. We identified eight enzymes in the digestive secretion, many of which were previously found in other genera of carnivorous plants. Among them, alpha-amylase is unique in carnivorous plants. Enzymatic activities increased in response to prey capture; however, the tissue content of jasmonic acid and its isoleucine conjugate remained rather low in contrast to the jasmonate response to wounding. Enzyme activities did not increase in response to the exogenous application of jasmonic acid or coronatine. Whereas similar digestive enzymes were co-opted from plant defense mechanisms among carnivorous plants, the mode of their regulation differs. The butterwort has not co-opted jasmonate signaling for the induction of enzyme activities in response to prey capture. Moreover, the presence of alpha-amylase in digestive fluid of *P.* × *Tina*, which has not been found in other genera of carnivorous plants, might indicate that non-defense-related genes have also been co-opted for carnivory.

Keywords: Butterwort, carnivorous plant, digestive enzymes, electrical signals, jasmonic acid, *Pinguicula*, protease, variation potential.

Introduction

The carnivorous plants have evolved specialized leaves or leaf parts that function as traps for prey capture and digestion to obtain scarce nutrients. This adaptation to low nutrient content in the soil has independently evolved by convergent evolution at

least 10 times in several orders of flowering plants (Albert *et al.*, 1992; Givnish *et al.*, 2015; Fleischmann *et al.*, 2018). Whereas the mechanisms of prey capture have been studied in great detail during the past two centuries, the process of digestion

was almost completely unknown. The first endogenous enzyme in carnivorous plants was described only at the beginning of this century in the pitcher plant (genus *Nepenthes*), which resolved the longstanding question of whether prey digestion is mediated by symbiotic microorganisms or plant-derived enzymes (Athauda *et al.*, 2004). In the decade that followed, the development of mass spectrometry techniques enabled the discovery of over 20 other digestive enzymes in different species of carnivorous plants, which are surprisingly very similar across distantly related taxa (Eilenberg *et al.*, 2006; Hatano and Hamada, 2008; 2012; Rottloff *et al.*, 2011; 2016; Lee *et al.*, 2016; Fukushima *et al.*, 2017; Krausko *et al.*, 2017). Yet, the mechanism by which the secretion of these digestive enzymes is regulated by stimuli from prey remained unknown until Escalanté-Pérez *et al.* (2011) found that a phytohormone from the group of jasmonates, 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA), was responsible for activation of the digestive process in Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). An increased level of the true bioactive compound in jasmonate signaling, the isoleucine conjugate of jasmonic acid (JA-Ile), was later found in Venus flytrap, sundew plant (*Drosera capensis*), and the pitcher plant *Nepenthes alata* in response to prey capture (Nakamura *et al.*, 2013; Libiaková *et al.*, 2014; Yilamujiang *et al.*, 2016; Krausko *et al.*, 2017; Pavlovič *et al.*, 2017). The binding of JA-Ile to CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1) protein as part of a co-receptor complex mediates the ubiquitin-dependent degradation of JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) repressors, resulting in the activation of jasmonate-dependent gene expression (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2009; Sheard *et al.*, 2010). In ordinary plants, JA-Ile is responsible for the activation of defense mechanisms after herbivore attack or wounding, and it was postulated that the carnivorous plants co-opted the jasmonate signaling pathway for prey capture (Pavlovič and Saganová 2015; Bemm *et al.*, 2016; Pavlovič and Mithöfer, 2019). Unfortunately, the studies to date have generally been confined to three genera of carnivorous plants (*Drosera*, *Dionaea*, and *Nepenthes*), which all are within the order Caryophyllales (or, according to some authors, the separate order Nepenthales; Fleischmann *et al.*, 2018) and are monophyletic. Therefore, it remains unclear whether the jasmonate signaling pathway is a universal and ubiquitous signaling pathway in other phylogenetic lineages of carnivorous plants.

In this study, we focused on carnivorous plants of the genus *Pinguicula* (butterworts), which belongs to the order Lamiales and is distantly related to the Venus flytrap, sundew, and pitcher plant (Albert *et al.*, 1992; Givnish, 2015). Most species of *Pinguicula* have a basal rosette of compact leaves that are more or less broadly ovate, and only a few species (*Pinguicula heterophylla*, *Pinguicula gypsicola*) have filiform upright leaves. Some species can bend their leaf edges slightly in response to prey capture, while others have no such ability (Fleischmann and Rocca, 2018). The leaves are covered by two types of glands. The stalked glands produce sticky mucilage and serve mainly for prey capture, but with the capacity to produce their own digestive enzymes. The sessile glands are the main site for the production of digestive enzymes (Heslop-Harrison and Knox, 1971; Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1980, 1981; Legendre, 2000; Heslop-Harrison, 2004). Both types of

digestive glands of *Pinguicula* share a special characteristic with the Venus flytrap and sundew in that they do not secrete enzymes until stimulated by the presence of prey (Darwin, 1875). It has been postulated that the glands of *Pinguicula* undergo a type of total autophagy and are simply a sac of enzymes that are discharged in response to prey capture, in contrast to the jasmonate-mediated expression/secretion of digestive enzymes in the carnivorous plants within the order Caryophyllales. The initial event associated with the onset of secretion is the rapid movement of chloride ions followed by water across the glands, flushing out the stored enzymes from the cell walls of the glands (Heslop-Harrison and Knox, 1971; Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1980). Contrary to this eccrine hypothesis, Vassilyev and Muravnik (1988a, b) showed that the glands remain highly active during the entire secretion process and additional digestive enzymes are synthesized and secreted into the digestive fluid after stimulation, much in common with the process in Venus flytrap. In this study, we aimed to shed light on this discrepancy in the view of jasmonate signaling within a less-studied genus of carnivorous plant, *Pinguicula*. We were interested in whether the jasmonate signaling pathway was co-opted for plant carnivory outside the order Caryophyllales. We measured electrical activity, analyzed the composition of the digestive fluid and its enzymatic activity in response to prey capture, and assessed endogenous phytohormone content. We did not find any evidence that butterworts use jasmonate signaling for the induction of enzyme activities.

Materials and methods

Plant material and experimental setup

We used a horticultural hybrid of *Pinguicula* × *Tina* (*Pinguicula agnata* × *Pinguicula zecheri*) purchased from Gartneriet Lammehave (Ringe, Denmark) and *Drosera capensis* in our experiments (Fig. 1A). *Pinguicula* × *Tina* is famous for being vigorous and easy to grow, with many flowers, and producing large leaves with a sufficient amount of digestive fluid for analyses. Plants were grown at the Department of Biophysics of Palacký University in Olomouc, Czech Republic, under standard greenhouse conditions. Plants were grown in plastic pots filled with well-drained peat moss, placed in a tray filled with distilled water to a depth of 1–2 cm. During the experiments the plants were placed in a growth chamber maintained at 21–22 °C and 100 μmol m⁻² s⁻¹ photosynthetically active radiation, with a 16/8 h light/dark period.

Fruit flies (*Drosophila melanogaster*) were used as a model prey. Flies were cultured from eggs in a carbohydrate-rich medium and were provided by the Department of Genetics, Faculty of Natural Sciences Comenius University in Bratislava, Slovakia. Before the experiments, adult flies were cooled in a refrigerator at 4 °C for 15 minutes to facilitate manipulation. Ten fruit flies were placed on one leaf surface or one flower stalk of plant under study (Fig. 1B, C). After 2 h and 24 h, 10 control and 10 fed leaves were cut off the plant using a scalpel, and leaf blades were submerged one at a time in 4 ml of 50 mM sodium acetate buffer solution (pH 5.0) for 3 min to collect the exudates. Because of seasonal blooming, the limited number and low biomass of flower stalks available were collected only after 24 h.

In the experiments with jasmonates (see below), plants were sprayed with 1 mM jasmonic acid or 100 μM coronatine in 0.001% Tween 20. Control plants were sprayed with 0.001% Tween 20 only. The leaf exudates were collected after 24 h as described above. For this experiment, sundew plants (*D. capensis*) were used as a positive control, as this species is known to increase digestive enzyme synthesis in response to the exogenous application of jasmonates (Krausko *et al.*, 2017). For experiments



Fig. 1. Butterwort *Pinguicula* × *Tina*. (A) Whole plant. (B) Flower stalk covered with digestive glands. (C) Leaf covered with stalked and sessile glands.

with hypertonic NaCl solution, 20 μl drops of 5% NaCl or distilled water (as a control) were applied on the glandular leaf surface and collected using a pipette after 15 min. This time point was chosen as sufficiently long to induce the flow of water from the glands but too short for the synthesis and secretion of digestive enzymes *de novo* (based on our experience with Venus flytrap; Jakšová *et al.*, 2020; Pavlovič *et al.*, 2020). For wounding experiments, a leaf was wounded with a needle once for electrical signal measurement or 10–15 times for phytohormone analyses (see below).

Extracellular recording of electrical signals

Changes in the surface potential were measured by using non-polarizable Ag–AgCl surface electrodes (Scanlab Systems, Prague, Czech Republic) moistened with a drop of conductive EV gel (Hellada, Prague, Czech Republic) that is commonly used in electrocardiography. The electrode was attached on the abaxial side of the leaf either beneath an applied fly (*D. melanogaster*) or 1 cm from a wounding site that was made with a needle. The electrical signals were recorded by a non-invasive device inside a Faraday cage according to Ilík *et al.* (2010). The reference electrode was taped to the side of the plastic pot containing the plant, submerged in 1–2 cm of water in a dish beneath the pot. The electrodes were connected to an amplifier [gain 1–1000, noise 2–3 μV , bandwidth (~ 3 dB) 10^5 Hz, response time 10 μs , input impedance 10^{12} Ω]. The signals from the amplifier were transferred to an analogue–digital PC data converter (eight analogue inputs, 12-bit converter, ± 10 V, PCA-7228AL, supplied by TEDIA, Plzeň, Czech Republic), collected every 6 ms.

Measurements of enzyme activities

The proteolytic activity of digestive fluid was determined by incubating 150 μl of the collected sample of digestive fluid with 150 μl of 2% (w/v) bovine serum albumin in 200 mM glycine–HCl (pH 3.0) at 37 °C for 2 h. The reaction was stopped by the addition of 450 μl of 5% (w/v) trichloroacetic acid (TCA). Samples were incubated on ice for 10 min and then centrifuged at 20 000 g for 10 min at 4 °C. The amount of released non-TCA-precipitable peptides was used as a measure of proteolytic activity, which was determined by comparing the absorbance of the supernatant at 280 nm with that of a blank sample with a Specord 250 Plus double-beam spectrophotometer (Analytik Jena). One unit of proteolytic activity is defined as an increase of 0.001 min^{-1} in the absorbance at 280 nm (Matušiková *et al.*, 2005).

We used 5 mM 4-nitrophenyl phosphate (Sigma–Aldrich) in 50 mM acetate buffer (pH 5) to estimate the activity of acid phosphatases. A 50 μl sample of the collected digestive fluid was added to 500 μl of the acetate buffer and mixed with 400 μl of the substrate. As a control, 400 μl of substrate solution was added to 550 μl of buffer. Mixed samples were incubated at 25 °C for 2 h. Thereafter, 160 μl of 1.0 M NaOH was added

to terminate the reaction. Absorbance was measured at 410 nm with a Specord 250 Plus double-beam spectrophotometer (Analytik Jena). The calibration curve was determined using 4-nitrophenol and the activities were expressed in $\mu\text{mol ml}^{-1} \text{h}^{-1}$.

Amylase activity was measured using an amylase assay kit (Sigma–Aldrich). Ethylidene–pNP–G7 was used as a substrate, which upon cleavage by amylase generates 4-nitrophenyl. A 20 μl aliquot of collected digestive fluid was added to a 96-well plate and adjusted to 50 μl with the amylase assay buffer. Then 100 μl of substrate was added, the reaction mixture was incubated at 25 °C, and absorbance at 405 nm was measured every 15 min for 2 h using a SynergyMx microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Positive control (amylase enzyme) and 4-nitrophenyl standard at different concentrations were incubated under the same conditions on the same microplate.

Chitinase activities were measured using a fluorimetric chitinase assay kit (Sigma Aldrich). We used 4-methylumbelliferyl *N*-acetyl- β -D-glucosaminide, 4-methylumbelliferyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside, and 4-methylumbelliferyl β -D-*N,N',N''*-triacetylchitotriose for the detection of β -*N*-acetylglucosaminidase (exochitinase), chitobiosidase, and endochitinase activities, respectively, according to the manufacturer's instructions. A 10 μl aliquot of collected digestive fluid was incubated with 90 μl of substrate working solution at 37 °C and after 2 h the reaction was stopped by the addition of 200 μl of sodium carbonate provided in the kit. The fluorescence of liberated 4-methylumbelliferone was measured in alkaline pH using a SynergyMx microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) with excitation at 360 nm and emission at 450 nm. Chitinase from *Trichoderma viride* (positive control) and 4-methylumbelliferone standard at different concentrations were incubated under the same conditions on the same microplate.

All enzyme activities were measured on pooled samples from 10 leaves from 3 plants to have sufficiently concentrated samples within the limit of detection.

SDS-PAGE electrophoresis

Digestive fluid collected for the enzyme assays was subjected to SDS-PAGE. The samples were heated and denatured for 30 min at 70 °C and then mixed with modified Laemmli sample buffer to a final concentration of 50 mM Tris–HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 1% β -mercaptoethanol, 12.5 mM EDTA, and 0.02% bromophenol blue. The same volume of digestive fluid was electrophoresed in 10% (v/v) SDS-polyacrylamide gel (Schägger, 2006). The proteins in the gels were visualized by silver staining (ProteoSilver; Sigma Aldrich).

Proteomic analysis of digestive fluid

Freshly collected digested fluid from fed plants was divided into 1 ml aliquots, which were subsequently frozen in liquid nitrogen

and lyophilized overnight. The dry residue corresponding to one aliquot was adjusted to 100 μl with 10 \times cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Switzerland) in 100 mM NaCl, and proteins were precipitated using the TCA/acetone method. Briefly, the protein sample was thoroughly mixed with 8 volumes of ice-cold acetone and 1 volume of TCA, and the resulting solution was kept at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 h. The protein pellet was recovered by centrifugation at 20 000 g and $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min, rinsed twice with 2 volumes of ice-cold acetone (Kim et al., 2006), dissolved in Laemmli sample buffer, and separated by SDS-PAGE (Laemmli, 1970). The resolved proteins were stained with colloidal Coomassie (Candiano et al., 2004) and digested in-gel with raffinose-modified trypsin (Šebela et al., 2006) as described elsewhere (Shevchenko et al., 2006). Peptides were cleaned on home-made C18 StageTips (Rappsilber et al., 2008), and mass spectrometry (MS) analysis was done on a UHR-QTOF maXis tandem mass spectrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) coupled to a RSLCnano nanoflow capillary liquid chromatography system (Dionex, Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA) via online nanoESI source (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). The specific settings of the chromatography system and the mass analyzer were identical to those described previously (Simerský et al., 2017).

The acquired MS data were either processed by classical MASCOT searches against a selected database or subjected to *de novo* sequencing. In the first case, the precursor and fragmentation data were extracted from raw data using DataAnalysis v 4.3 x64 (Bruker Daltonik, Bremen, Germany), exported into MGF files, and uploaded to Protein Scape v. 2.1 (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). Peptide and protein searches were performed employing the MASCOT algorithm (v2.2.07, in-house server; Matrix Science, London, UK) against an order Lamiales-specific protein database (NCBI; 325 526 sequences; downloaded 23 October 2017) that was supplemented with common protein contaminants. The following parameters were used for each MASCOT search: MS and MS/MS tolerance were set at ± 25 ppm and ± 0.03 Da, respectively; trypsin was selected as the protease and two missed cleavages were allowed; carbamidomethylation of cysteine was included as a fixed modification; and *N*-terminal protein acetylation and methionine oxidation were selected as variable modifications. A positively identified protein had to fulfil the following parameters: contain at least one peptide with identity score calculated by the MASCOT algorithm (a cut-off score required for the other assigned peptides was 25 with *P*-value of 0.05); pass over a protein cut-off score of 30. For *de novo* sequencing, the DeNovoGUI interface (v1.16.0; Muth et al., 2014) containing the Novor (Ma, 2015), DirecTag (Tabb et al., 2008), PepNovo (Frank and Pevzner, 2005), and pNovo (Chi et al., 2010) algorithms was applied to generate full-length peptide sequences directly from raw data. The same settings were adopted as for the MASCOT searches described above. To assign all obtained *de novo* peptide sequences, a local pBLAST search was carried out against a compiled list of proteins identified in digestive fluids from all carnivorous plant species that have been examined to date. The BLAST hits were filtered by similarity with following requirements: an alignment length of at least five amino acids; cut-off values for overall identity and positivity were set at 75%. After manual quality control of peptide spectra, all assigned *de novo* peptides were considered as positive identifications.

Quantification of phytohormones

At 2 h and 24 h after prey feeding or wounding with a needle, leaves were collected from control and fed plants and immediately (within 10 s) frozen in liquid nitrogen and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. Quantification of jasmonic acid (JA), JA-Ile, *cis*-12-oxo-phytodienoic acid (*cis*-OPDA), abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA), and indole-3-acetic acid (IAA) was performed according to the modified method described by Floková et al. (2014). Briefly, frozen plant material (20 mg) was homogenized and extracted using 1 ml of ice-cold 10% methanol/ H_2O (v/v). A cocktail of stable isotope-labeled standards was added as follows: 10 pmol of [$^2\text{H}_6$]JA, [$^2\text{H}_5$]JA-Ile, [$^2\text{H}_5$]OPDA, [$^2\text{H}_6$]ABA, and [$^{13}\text{C}_6$]-IAA, and 20 pmol of [$^2\text{H}_4$]SA (all from Olchemim Ltd, Czech

Republic) per sample to validate the LC-MS/MS method. The extracts were purified using Oasis® HLB columns (30 mg 1 ml^{-1} , Waters) and hormones were eluted with 80% methanol. The eluent was evaporated to dryness under a stream of nitrogen. Phytohormone levels were determined by ultra-high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) using an Acquity UPLC® I-Class System (Waters, Milford, MA, USA) equipped with an Acquity UPLC CSH® C₁₈ column (100 \times 2.1 mm; 1.7 μm ; Waters) coupled to a Xevo™ TQ-S MS triple quadrupole mass spectrometer equipped with electrospray ionization technique (Waters MS Technologies, Manchester, UK). Three independent technical measurements were performed on 5–15 biological replicates.

Statistical analyses

Throughout this paper, data are presented as means \pm SD. To evaluate the significance of differences between the control and treated plants, two-tailed Student's *t*-tests was used (Origin 2015, Northampton, MA, USA). Before the statistical tests, the data were analyzed for normality and homogeneity of variance. When non-homogeneity was present, the *t*-test was used with the appropriate corrected degrees of freedom (Welch's *t*-test).

Results

Electrical signaling

The presence of live prey did not elicit any electrical signal in the leaf for the duration of measurements (6 h). By contrast, wounding with a needle elicited depolarization of membrane potential, a typical variation potential (VP) with amplitude 15–50 mV and duration 200–400 s (negative voltage shift recorded extracellularly, representing intracellular depolarization; Fig. 2).

Insect prey-induced enzyme activity

The activities of proteases, acid phosphatases, amylases, and exochitinases increased 2 h after prey feeding (Fig. 3A–D). After 24 h, all measured enzyme activities in leaf exudates were significantly increased (Fig. 3A–F). Surprisingly, the flower stalk exudates also had increased proteolytic, acid phosphatase, amylase, and exochitinase activities 24 h after feeding (Fig. 3A–D).

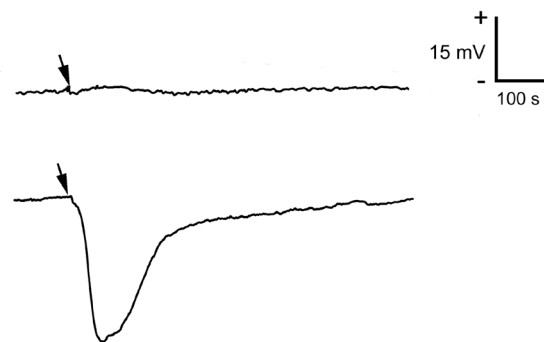


Fig. 2. Extracellular membrane potential in response to prey (*Drosophila melanogaster*) applied on the trap surface (upper trace) and wounding (lower trace) in *Pinguicula* \times *Tina*. Arrows indicate the time point of stimulus application. These representative records are shown from five independent measurements.

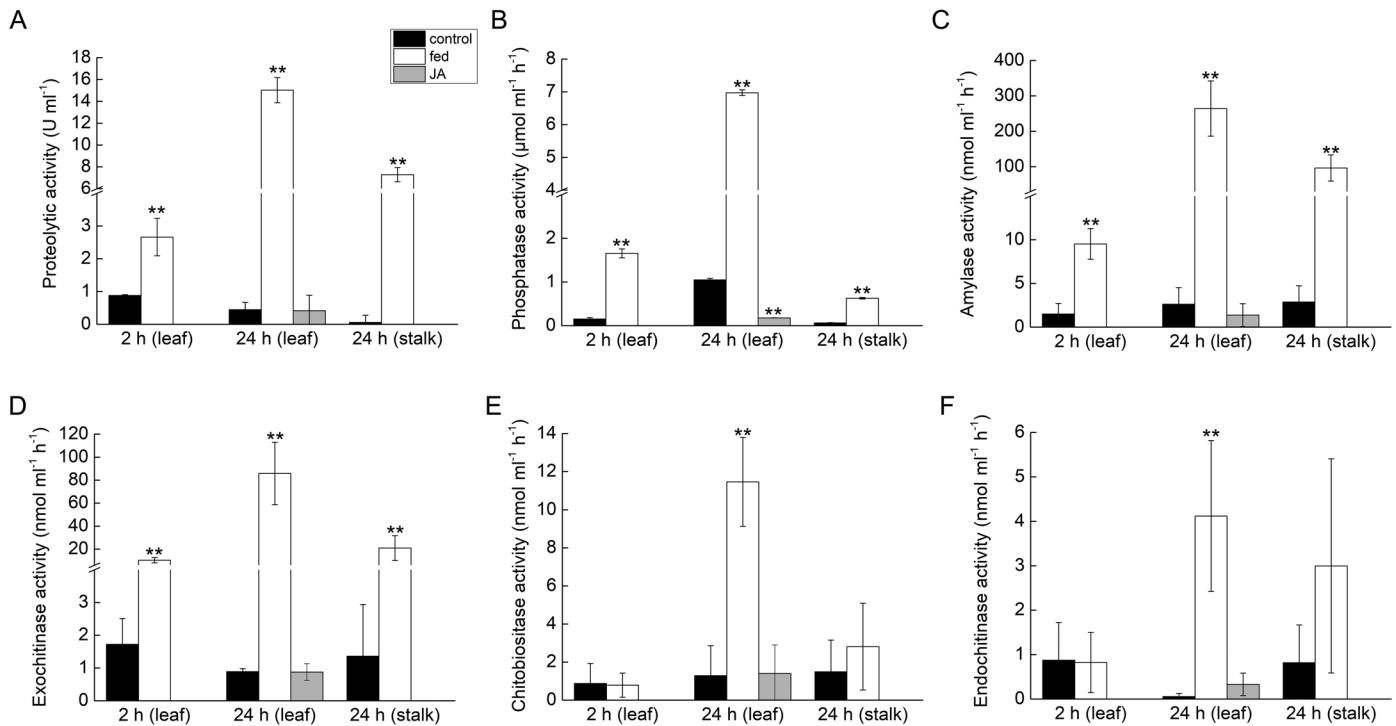


Fig. 3. Enzyme activities in *Pinguicula* × *Tina* in response to insect prey feeding and jasmonic acid (JA) application. Enzyme activities were measured 2 h and 24 h after feeding in leaf exudates, 24 h after feeding in flower stalk exudates, and 24 h after the application of 1 mM JA on the trap surface. (A) Proteolytic activity. (B) Phosphatase activity. (C) Amylase activity. (D) Exochitinase activity. (E) Chitobiosidase activity. (F) Endochitinase activity. Data are mean ±SD ($n=5-6$). Significant differences between control and fed plants, and between control and JA-applied plants, were evaluated by Student's *t*-test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Composition of digestive fluid

Our homology based-identification strategy enabled the identification of 14 protein sequences covering 8 different catalytic activities, which included aspartic and cysteine proteases, peroxidases, esterase/lipase and endonuclease. Interestingly, the presence of alpha-amylase, an enzyme that has not been described before in the digestive fluids of the other carnivorous plants, was identified as well (Table 1; see also Supplementary Table S1 and Fig. S1 at JXB online).

Jasmonates are not responsible for induction of enzyme activity

The level of JA did not significantly increase at 2 h or 24 h after feeding plants with fruit flies. To investigate whether *Pinguicula* increases JA in response to damaging stimuli, leaves were wounded 10–15 times with a needle. Wounding resulted in a 10-fold increase of JA after 2 h; this increase was significant (Fig. 4A). While feeding resulted in a slight (1-fold) but significant increase of JA-Ile, wounding caused a 200-fold increase (Fig. 4B). The level of the JA precursor *cis*-OPDA was not altered significantly (Fig. 4C). Wounding also increased the level of ABA after 2 h and 24 h, whereas feeding increased the level of ABA only after 24 h (Fig. 4D). The level of SA did not increase in response to either stimulus, and only a significant decrease in response to wounding was detected at 24 h (Fig. 4E). The level of IAA level remained more or less constant in fed plants (Fig. 4F); IAA analysis in wounded leaves failed.

To confirm that jasmonates are not involved in enzyme secretion, we applied JA and coronatine (a molecular mimic of JA-Ile) exogenously. Neither JA nor coronatine was able to induce enzyme activity (Figs 3 and 5). SDS-PAGE confirmed that JA, ABA, and coronatine did not induce the secretion of proteins, and the protein profile of treated plants was comparable to that of control plants (Fig. 6). For control experiments, we used sundew plants (*D. capensis*), which are known to regulate enzyme production through jasmonates (Krausko *et al.*, 2017). Sundew plants showed a significant increase in enzyme activity in leaf exudates after coronatine treatment (Fig. 5). In response to exogenous coronatine, sundew plants folded their tentacles and traps not only locally to the site of coronatine application but also systemically, and both local and systemic leaves started to secrete digestive fluid. No such behaviour was observed in *Pinguicula* × *Tina* plants, which cannot fold their leaves.

Rapid efflux of water is responsible for induction of phosphatase activity

To induce a rapid efflux of water from the digestive glands of *Pinguicula* plants, we applied hypertonic 5% NaCl solution to the glandular leaf surface. The secretion was collected 15 min later for further analyses. Measurements of enzyme activity showed a 30-fold increase of phosphatase activity in digestive fluid within 15 min (Fig. 7B). The proteolytic activity was not significantly increased in comparison to controls (leaves treated with water) (Fig. 7C). Amylase and chitobiosidase

Table 1. Proteins identified by mass spectrometry analysis in *Pinguicula* × *Tina* digestive fluid collected 24 h after feeding on fruit flies

MS data processing method	Identification characteristics				
MASCOT search	Detected sequence	Assigned protein	Accession ^a	MASCOT score	Peptides/PSMs/SC ^b
	LAASILR	Peroxidase 10-like	KZV23101.1	33.5	1/3/2.1
	AVADIVNHR	Alpha-amylase	EPS60632.1	38.9	1/1/2.8
	GILQAAVQGELWR	Alpha-amylase	KZV28895.1	39.9	1/4/3.4
De novo sequencing pBLAST search	Detected sequence	Homologous protein	Accession ^a	De novo score	pBLAST identity/positivity ^c
	TVPMVLNGAGLLNMGPPHMK	Nepenthesin II	BAD07475.1	30.28	77/88
	WESSLNWVLCMK	Asp protease	GAV80475.1	30.93	75/75
	HQMLVALQYGCNR	Cysteine protease	BAW35427.1	32.63	83/83
	MVQGGSGKVAQQTAAAN	Desiccation-related protein	BAW35440.1	31.03	75/100
	GRLMVAGLGGGLMKER	Cinnamyl alcohol dehydrogenase	-	35.07 ^d	87/87 ^d
	PNKFGVGLGGLMQR	Leu-rich repeat protein	-	35.08 ^d	100/100 ^d
	MPVDFNVTATFHLQ	NrLRR1	-	33.77	75/100
	SLNLSLRGNVK	Peroxidase	BAM28609.1	32.28	100/100
	YYFNLNYPEGFTK	Beta-xylosidase	AAX92967.1	40.02	85/85
	TLLSDLVNSTTAMMK	Peroxidase	-	34.23	77/100
	ARMTNMRNKVQVQQNMPR	GDSL esterase/lipase	XP_004232991.1	30.64	77/77
	AQQRNWWQQWQR	Endonuclease 2	-	32.59	100/100

^a NCBI database accession. ^b PSMs, peptide-spectrum matches; SC, sequence coverage in %. ^c pBLAST identity and positivity in %. ^d Characteristics for two independent peptide hits acquired for the respective protein.

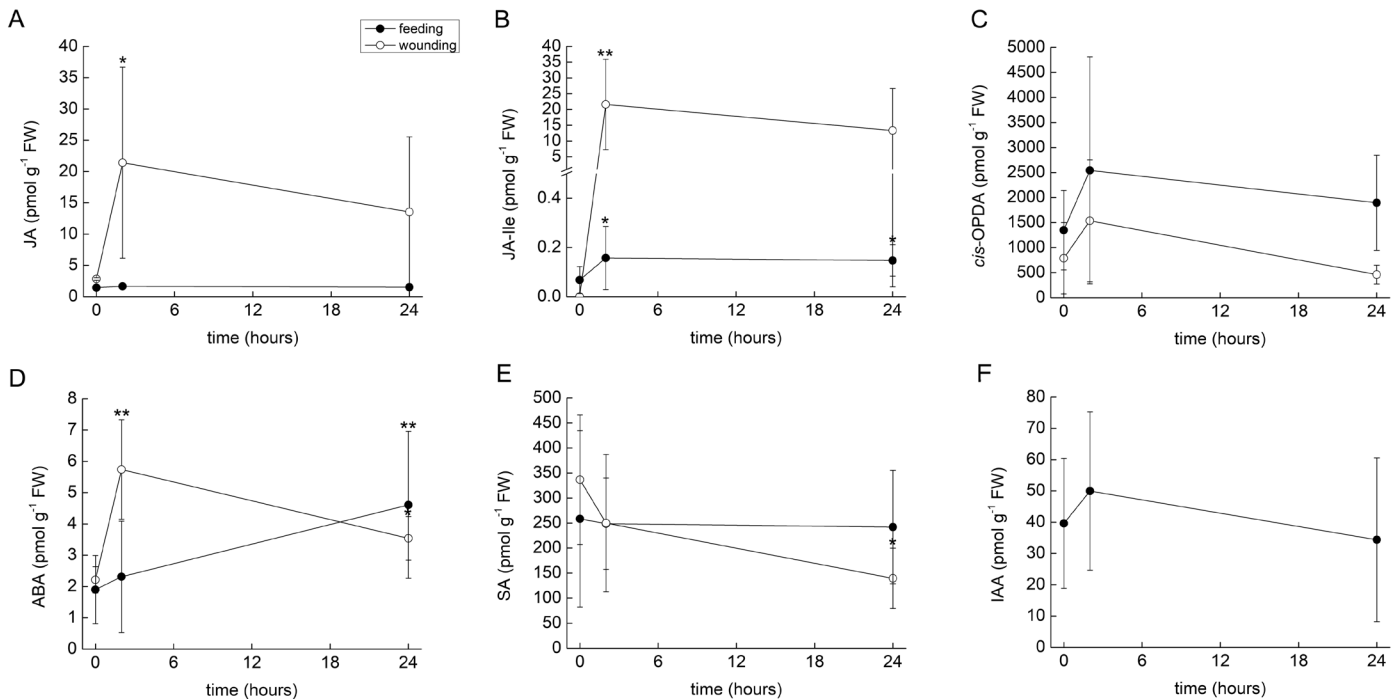


Fig. 4. Tissue levels of phytohormones in *Pinguicula* × *Tina* in response to feeding and wounding. (A) Jasmonic acid (JA). (B) Isoleucine conjugate of jasmonic acid (JA-Ile). (C) *cis*-12-oxophytodienoic acid (*cis*-OPDA). (D) Abscisic acid (ABA). (E) Salicylic acid (SA). (F) Indole-3-acetic acid (IAA). Data are mean ±SD ($n=5-15$). Significant differences between control (time 0) and fed plants after 2 h and 24 h were evaluated by Student's *t*-test: * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

activities were not detected. Exochitinase and endochitinase activities were slightly but significantly increased relative to controls (Fig. 7D, E). SDS-PAGE showed the clear appearance of some proteins in the digestive fluid of NaCl-treated leaves. The most prominent was the appearance of a band at ~20 kDa (Fig. 7A).

Discussion

In order to save available resources in nutrient-poor environments, carnivorous plants produce digestive enzymes not constitutively but in response to prey capture. Mechanical and chemical stimuli from insect prey have an indispensable role

in this process (for review, see Pavlovič and Mithöfer, 2019). The carnivorous plants with active trapping mechanisms (e.g. *Drosera* and *Dionaea* spp.) rely on both stimuli (Libiaková *et al.*, 2014; Bemm *et al.*, 2016; Krausko *et al.*, 2017; Jakšová *et al.*, 2020). The carnivorous plants with passive trapping mechanisms (*Nepenthes* and *Sarracenia* spp.) rely solely on chemical stimuli (Gallie and Chang, 1997; Yilamujiang *et al.*, 2016; Saganová *et al.*, 2018). The presence of chitin, protein, or different ions (e.g. NH_4^+) has been shown to be effective in induction processes (Libiaková *et al.*, 2014; Yilamujiang *et al.*, 2016; Saganová *et al.*, 2018; Jakšová *et al.*, 2020). All these stimuli increase the level of jasmonates, which transcriptionally activate the genes encoding digestive enzymes (Bemm *et al.*, 2016; Yilamujiang *et al.*, 2016; Pavlovič *et al.*, 2017; Jakšová *et al.*, 2020). However, all these studies were confined to carnivorous plants within the order Caryophyllales.

In this study, we showed that the butterwort (*Pinguicula* × *Tina*, order Lamiales) had increased enzyme activities in digestive fluid from leaves in response to prey capture. Interestingly, the enzyme activities were also increased in flower stalk exudate, which indicates that the flower stalk of *Pinguicula* is an additional carnivorous organ—a unique adaptation among carnivorous

plants. This is consistent with the uptake of nitrogen from prey captured by the flower stalk, as was previously documented in *Pinguicula vulgaris* and *Pinguicula villosa* (Hanslin and Karlsson, 1996). After prey capture, MS revealed the presence of enzymes in leaf exudate well known from other non-related genera of carnivorous plants, such as cysteine and aspartic proteases, endonuclease, and peroxidase (Hatano and Hamada, 2008, 2012; Schulze *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2016; Rottloff *et al.*, 2016; Fukushima *et al.*, 2017; Krausko *et al.*, 2017). We propose the names ‘pinguiculain’ for cysteine protease and ‘pinguiculasin’ for aspartic protease, following the nomenclature of Takahashi *et al.* (2009, 2012). This finding supports the hypothesis that carnivorous plants with independent origins repeatedly co-opted the same plant defense protein lineages to acquire digestive physiology (Fukushima *et al.*, 2017). However, we also found one unique enzyme that has not been identified in the secretome of carnivorous plants before: alpha-amylase. Amylase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of starch, a polysaccharide produced by most green plants as an energy store. Our finding is consistent with the work of Heslop-Harrison and Knox (1971), which demonstrated amylase activity in the digestive glands of *Pinguicula*. The flat leaves of *Pinguicula* often trap significant amounts of plant material (Darwin, 1875) and amylases may help to digest this alternative source of carbon, implying that *Pinguicula* is a true mixotroph. When grown in axenic culture, plants of *Pinguicula lusitanica* showed significant increases in the numbers of leaves and flowers when fed with pine pollen (Harder and Zemlin, 1968). This ‘vegetarianism’ of carnivorous plants within the order Lamiales is not rare; on the contrary, it is very common in the genus *Utricularia* (Peroutka *et al.*, 2008, Koller-Peroutka *et al.*, 2015) and probably also in *Genlisea* (Plachno and Wolowski, 2008). The presence of alpha-amylase in digestive fluid might represent another example of non-defense-related genes that have been co-opted for the syndrome of carnivory. The class V β -1,3-glucanases in *Nepenthes* and *Dionaea*, like alpha-amylase, are involved in embryo and pollen development and germination rather than defense responses (Michalko *et al.*, 2017). The detection of phosphatase and chitinase activities (Fig. 3) but the absence of

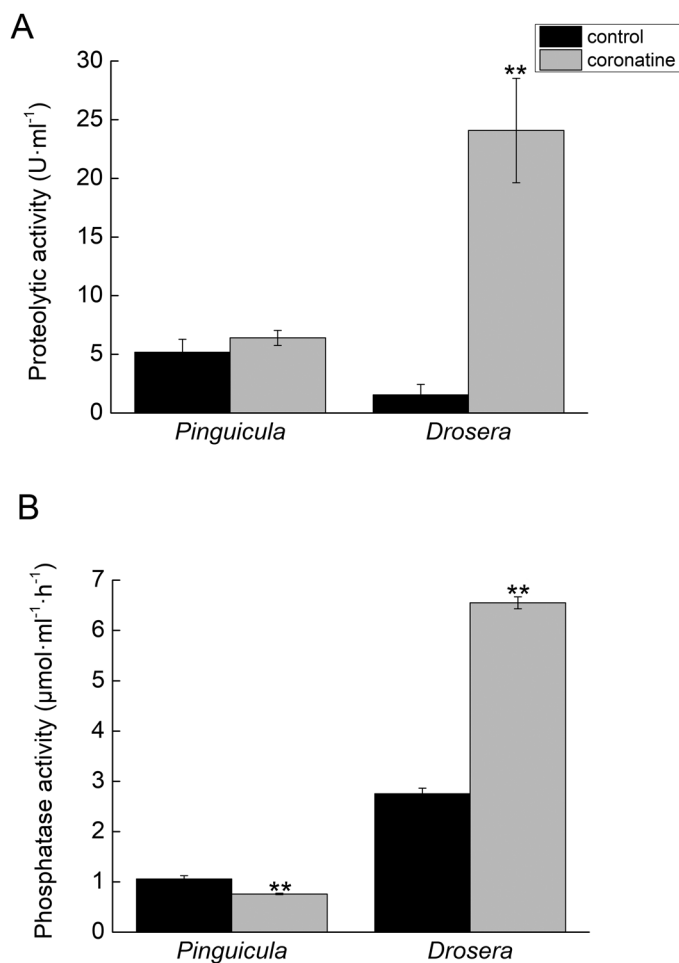


Fig. 5. Effect of application of 100 μM coronatine on enzyme activities in leaf exudates of *Pinguicula* × *Tina* and *Drosera capensis*. (A) Protease activity. (B) Phosphatase activity. Data are mean ±SD (n=5). Significant differences between control and coronatine-treated plants were evaluated by Student's *t*-test: **P*<0.05, ***P*<0.01.

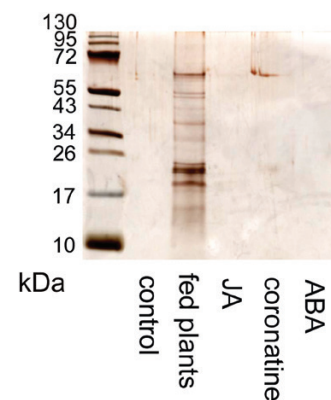


Fig. 6. Silver-stained SDS-PAGE of digestive fluid released in response to different stimuli in *Pinguicula* × *Tina*. The same volume of digestive fluid 24 h after different treatments was electrophoresed and the proteins were separated in 10% (v/v) SDS-polyacrylamide gel and silver stained. ABA, abscisic acid; JA, jasmonic acid.

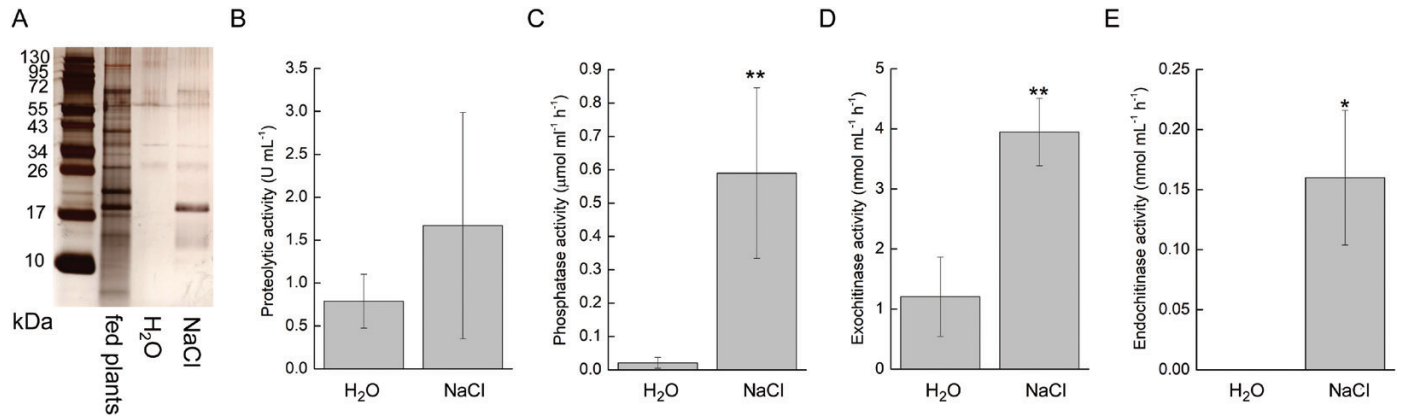


Fig. 7. Silver-stained SDS-PAGE and enzyme activities in the digestive fluid released in response to salt application in *Pinguicula* × *Tina*. (A) Protein profile resolved by SDS-PAGE. The same volume of digestive fluids 15 minutes after H₂O and 5% NaCl application and 24 h after feeding was electrophoresed and the proteins were separated in 10% (v/v) SDS-polyacrylamide gel and silver stained. (B) Proteolytic activity. (C) Phosphatase activity. (D) Exochitinase activity. (E) Endochitinase activity. Data are mean ±SD ($n=3-6$). Significant differences between H₂O and 5% NaCl treated plants were evaluated by Student's *t*-test: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

corresponding enzymes in the acquired dataset, together with rather modest coverages obtained for the assigned sequences, indicate that our proteomic analysis was not exhaustive and more enzymes could be present in the digestive fluid of *Pinguicula*. The most probable cause of this disparity is the lack of appropriate genomic background, which is a prerequisite for each protein identification experiment.

If these proteins were repeatedly co-opted for digestive physiology, it is tempting to assume that the signaling pathway would also be. Jasmonate signaling has been investigated in only three genera of carnivorous plants so far (*Dionaea*, *Drosera*, and *Nepenthes*), all of which are within the order Caryophyllales. All of these carnivorous plants increase their endogenous level of jasmonates (JA and JA-Ile) in response to prey capture and secrete enzymes in response to the exogenous application of these jasmonates (Nakamura et al., 2013; Yilamujiang et al., 2016; Krausko et al., 2017; Pavlovič et al., 2017). However, in this study we showed that neither of these phenomena occur in *Pinguicula*. A slight increase in JA-Ile was found in response to feeding (Fig. 4B), but such an increase could be caused by the presence of chitin in the applied insect exoskeleton and has probably no function in plant carnivory. This is supported by the fact that the exogenous application of JA and coronatine could not mimic insect prey and enzyme production was not increased in response to their application (Figs 3 and 5). The slight increase of endogenous ABA after feeding (Fig. 4B) was probably also caused by the presence of chitin in the insect exoskeleton, which may increase ABA concentrations (Iriti and Faoro, 2008; Iriti et al., 2009; Jakšová et al., 2020). The SDS-PAGE protein profiles in response to coronatine, JA, and ABA application strongly differ from those induced by insect prey and resemble control (unfed) plants, with no detectable protein bands (Fig. 6). In carnivorous plants of the genera *Drosera* and *Dionaea*, the exogenous application of jasmonates induces the same protein spectra as the application of live prey (compare Fig. 7 in Krausko et al., 2017, or Fig. 6 in Pavlovič et al., 2017). In other words, the application of jasmonates to *Pinguicula* cannot mimic the presence of insect prey, which is

in contrast to the response to exogenous jasmonates of carnivorous plants in the order Caryophyllales. To investigate whether other plant hormones might activate enzyme secretion by *Pinguicula*, we applied 100 μM gibberellic acid (GA₃), 250 μM SA, and 200 nM IAA, but none of these phytohormones was able to trigger significant enzyme activities in digestive fluid (data not shown).

The absence of jasmonate signaling in the genus *Pinguicula* could be explained by the absence of electrical signaling in its prey-detection system, in contrast to *Drosera* and *Dionaea* (Böhm et al., 2016; Krausko et al., 2017; Pavlovič et al., 2017). In these genera, electrical and jasmonate signaling enable the coordinated activation of digestive processes in neighbouring glands that have not touched the insect prey. In *Pinguicula*, the activation of digestive glands is confined to the release of digestive fluid in response to chemical stimuli from the prey itself and the glands that have made contact with it (Heslop-Harrison and Knox, 1971). However, in some carnivorous plant species the presence of chemical signals from insect prey alone is able to trigger JA accumulation, as was documented in passive pitcher traps of *Nepenthes* (Yilamujiang et al., 2016). This indicates that rapid electrical signals are not necessary for the induction of JA signaling in carnivorous plants. Thus, their absence in prey detection cannot account for the observation that *Pinguicula* does not use jasmonate signaling for the regulation of enzyme secretion.

The mechanism triggering enzyme secretion in the genus *Pinguicula* remains a subject for future research, given that our findings indicate that the jasmonates were not co-opted for plant carnivory in this genus. Heslop-Harrison and Knox (1971) proposed that the enzymes are pre-synthesized and stored in the vacuoles and cell walls of digestive glands, and are released only by the flux of water triggered by prey capture. They suggested total autolysis of the cells, in contrast to Vassilyev and Muravnik (1988a, b), who argued that secretory cells of the digestive glands remain highly active during the entire period of prey digestion. Vassilyev and Muravnik (1988a, b) also suggested that additional digestive enzymes are synthesized

de novo after stimulation, as occurs in Venus flytrap. Based on our experiments with NaCl, it seems that at least phosphatases are pre-synthesized and are only flushed away from the cell walls of the digestive glands by chloride ion movement (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1980). Indeed, a cytochemical study of the leaf gland enzymes in *Pinguicula* showed the presence of phosphatases in the spongy radial walls of the head of the unstimulated gland, which are clearly flushed away by the flux of water (Heslop-Harrison and Knox, 1971). However, some of the enzymes need to be synthesized *de novo* (e.g. proteases and amylases). The signal that triggers the expression of these enzymes remains unknown.

Conclusions

Our study clearly shows that whereas the proteomic composition of digestive fluid is similar among different orders of carnivorous plants (with the exception of alpha-amylase), the mode of their regulation may differ. This finding is consistent with the study of Nishimura *et al.* (2013), who found S-like RNases in three genera of carnivorous plants from two orders, but with different regulation of their expression. Although the genus *Pinguicula* shows strongly enhanced enzyme secretion in response to prey capture, jasmonates are not involved in this process. The hypothesis that the digestive enzymes are pre-synthesized and only flushed away by water outflow cannot be accepted entirely. The type of signal that is involved after prey capture in *Pinguicula* remains unknown.

Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online.

Fig. S1. Protein profile of the digestive fluid from *Pinguicula* × *Tina* in response to feeding.

Table S1. Proteins identified in the digestive fluid of *Pinguicula* × *Tina*.

Acknowledgements

This work was supported by Internal Grant of Palacký University (IGA_PrF_2019_030 and IGA_PrF_2019_020) and grant no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000827 (Plants as a Tool for Sustainable Global Development) from the Operational Programme Research, Development and Education, Ministry of Education Youth and Sports, Czech Republic. We thank Tanya Renner (Pennsylvania State University, USA) for critical reading of the early version of the manuscript.

Author contributions

AP designed the study and measured electrical signals; JJ, IP, and ON did phytohormone analysis; OK measured enzyme activities and SDS-PAGE; IC and RL analysed the composition of digestive fluid; OK and AP wrote the manuscript; AP and ON provided materials and financial support.

References

Albert VA, Williams SE, Chase MW. 1992. Carnivorous plants: phylogeny and structural evolution. *Science* **257**, 1491–1495.

Athauda SB, Matsumoto K, Rajapakse S, *et al.* 2004. Enzymic and structural characterization of nepenthesin, a unique member of a novel sub-family of aspartic proteinases. *Biochemical Journal* **381**, 295–306.

Bemm F, Becker D, Larisch C, *et al.* 2016. Venus flytrap carnivorous lifestyle builds on herbivore defense strategies. *Genome Research* **26**, 812–825.

Böhm J, Scherzer S, Krol E, *et al.* 2016. The Venus flytrap *Dionaea muscipula* counts prey-induced action potentials to induce sodium uptake. *Current Biology* **26**, 286–295.

Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. 2004. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**, 1327–1333.

Chi H, Sun RX, Yang B, *et al.* 2010. pNovo: *de novo* peptide sequencing and identification using HCD spectra. *Journal of Proteome Research* **9**, 2713–2724.

Chini A, Fonseca S, Fernández G, *et al.* 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**, 666–671.

Darwin C. 1875. *Insectivorous plants*. London: John Murray.

Eilenberg H, Pnini-Cohen S, Schuster S, Movtchan A, Zilberstein A. 2006. Isolation and characterization of chitinase genes from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *Journal of Experimental Botany* **57**, 2775–2784.

Escalante-Pérez M, Krol E, Stange A, Geiger D, Al-Rasheid KA, Hause B, Neher E, 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, USA* **108**, 15492–15497.

Fleischman A, Rocca A. 2018. Systematics and evolution of Lentibulariaceae: I. *Pinguicula*. In: Ellison AM, Adamec L, eds. *Carnivorous plants. Physiology, ecology, and evolution*. Oxford: Oxford University Press, 70–80.

Fleischmann A, Schläuer J, Smith SA, Givnish TJ. 2018. Evolution of carnivory in angiosperms. In: Ellison AM, Adamec L, eds. *Carnivorous plants. Physiology, ecology, and evolution*. Oxford: Oxford University Press, 22–41.

Floková K, Tarkovská D, Miersch O, Strnad M, Wasternack C, Novák O. 2014. UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry* **105**, 147–157.

Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R. 2009. (+)-7-*iso*-Jasmonyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* **5**, 344–350.

Frank A, Pevzner P. 2005. PepNovo: *de novo* peptide sequencing via probabilistic network modeling. *Analytical Chemistry* **77**, 964–973.

Fukushima K, Fang X, Alvarez-Ponce D, *et al.* 2017. Genome of the pitcher plant *Cephalotus* reveals genetic changes associated with carnivory. *Nature Ecology Evolution* **1**, 0059.

Gallie DR, Chang SC. 1997. Signal transduction in the carnivorous plant *Sarracenia purpurea*. *Plant Physiology* **115**, 1461–1471.

Givnish TJ. 2015. New evidence on the origin of carnivorous plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **112**, 10–11.

Hanslin HM, Karlsson PS. 1996. Nitrogen uptake from prey and substrate as affected by prey capture level and plant reproductive status in four carnivorous plant species. *Oecologia* **106**, 370–375.

Harder R, Zemlin I. 1968. Blütenbildung von *Pinguicula lusitanica* *in vitro* durch Fütterung mit pollen. *Planta* **78**, 72–78.

Hatano N, Hamada T. 2008. Proteome analysis of pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Journal of Proteome Research* **7**, 809–816.

Hatano N, Hamada T. 2012. Proteomic analysis of secreted protein induced by a component of prey in pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Journal of Proteomics* **75**, 4844–4852.

Heslop-Harrison Y. 2004. *Pinguicula* L. *Journal of Ecology* **92**, 1071–1118.

Heslop-Harrison Y, Heslop-Harrison J. 1980. Chloride ion movement and enzyme secretion from the digestive glands of *Pinguicula*. *Annals of Botany* **45**, 729–731.

Heslop-Harrison Y, Heslop-Harrison J. 1981. The digestive glands of *Pinguicula*: structure and cytochemistry. *Annals of Botany* **47**, 293–319.

- Heslop-Harrison Y, Knox RB.** 1971. A cytochemical study of the leaf-gland enzymes of insectivorous plants of the genus *Pinguicula*. *Planta* **96**, 183–211.
- Ilík P, Hlaváčková V, Krchňák P, Nauš J.** 2010. A low-noise multichannel device for the monitoring of systemic electrical signal propagation in plants. *Biologia Plantarum* **54**, 185–190.
- Iriti M, Faoro F.** 2008. Abscisic acid is involved in chitosan-induced resistance to tobacco necrosis virus (TNV). *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 1106–1111.
- Iriti M, Valentina Picchi V, Rossoni M, Gomasasca S, Ludwig N, Gargano M, Faoro F.** 2009. Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. *Environmental and Experimental Botany* **66**, 493–500.
- Jakšová J, Libiaková M, Bokor B, Petřík I, Novák O, Pavlovič A.** 2020. Taste for protein: chemical signal from prey activates jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis). *Plant Physiology and Biochemistry* **146**, 90–97.
- Kim SC, Chen Y, Mirza S, Xu Y, Lee J, Liu P, Zhao Y.** 2006. A clean, more efficient method for in-solution digestion of protein mixtures without detergent or urea. *Journal of Proteome Research* **5**, 3446–3452.
- Koller-Peroutka M, Lendl T, Watzka M, Adlassnig W.** 2015. Capture of algae promotes growth and propagation in aquatic *Utricularia*. *Annals of Botany* **115**, 227–236.
- Krausko M, Perutka Z, Šebela M, Šamajová O, Šamaj J, Novák O, Pavlovič A.** 2017. The role of electrical and jasmonate signalling in the recognition of captured prey in the carnivorous sundew plant *Drosera capensis*. *New Phytologist* **213**, 1818–1835.
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Legendre L.** 2000. The genus *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae): an overview. *Acta Botanica Gallica* **147**, 77–95.
- Lee L, Zhang Y, Ozar B, Sensen CW, Schriemer DC.** 2016. Carnivorous nutrition in pitcher plants (*Nepenthes* spp.) via an unusual complement of endogenous enzymes. *Journal of Proteome Research* **15**, 3108–3117.
- Libiaková M, Floková K, Novák O, Slovácová L, 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**, e104424.
- Ma B.** 2015. Novor: real-time peptide de novo sequencing software. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **26**, 1885–1894.
- Matušíková I, Salaj J, Moravčíková J, Mlynárová L, Nap JP, Libantová J.** 2005. Tentacles of in vitro-grown round-leaf sundew (*Drosera rotundifolia* L.) show induction of chitinase activity upon mimicking the presence of prey. *Planta* **222**, 1020–1027.
- Michalko J, Renner T, Mészáros P, Socha P, Moravčíková J, Blehová A, Libantová J, Polóniová Z, Matušiková I.** 2017. Molecular characterization and evolution of carnivorous sundew (*Drosera rotundifolia* L.) class V β -1,3-glucanase. *Planta* **245**, 77–91.
- Muth T, Weilnböck L, Rapp E, Huber CG, Martens L, Vaudel M, Barsnes H.** 2014. DeNovoGUI: an open source graphical user interface for *de novo* sequencing of tandem mass spectra. *Journal of Proteome Research* **13**, 1143–1146.
- Nakamura Y, Reichelt M, Mayer VE, Mithöfer A.** 2013. Jasmonates trigger prey-induced formation of ‘outer stomach’ in carnivorous sundew plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **280**, 20130228.
- Nishimura E, Kawahara M, Kodaira R, Kume M, Arai N, Nishikawa J, Ohyama T.** 2013. S-like ribonuclease gene expression in carnivorous plants. *Planta* **238**, 955–967.
- 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.
- Pavlovič A, Libiaková M, Bokor B, Jakšová J, Petřík I, Novák O, Baluška F.** 2020. Anaesthesia with diethyl ether impairs jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). *Annals of Botany* **125**, 173–183.
- Pavlovič A, Mithöfer A.** 2019. Jasmonate signalling in carnivorous plants: copycat of plant defence mechanisms. *Journal of Experimental Botany* **70**, 3379–3389.
- Pavlovič A, Saganová M.** 2015. A novel insight into the cost–benefit model for the evolution of botanical carnivory. *Annals of Botany* **115**, 1075–1092.
- Peroutka M, Adlassnig W, Volgger M, Lendl T, Url WG, Lichtscheidl IK.** 2008. *Utricularia*: a vegetarian carnivorous plant? *Plant Ecology* **199**, 153–162.
- Plachno BJ Wolowski K.** 2008. Algae commensal community in *Genlisea* traps. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **77**, 77–86.
- Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y.** 2008. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols* **2**, 1896–1906.
- Rottloff S, Miguel S, Biteau F, et al.** 2016. Proteome analysis of digestive fluids in *Nepenthes* pitchers. *Annals of Botany* **117**, 479–495.
- Rottloff S, Stieber R, Maischak H, Turini FG, Heubl G, Mithöfer A.** 2011. Functional characterization of a class III acid endochitinase from the traps of the carnivorous pitcher plant genus, *Nepenthes*. *Journal of Experimental Botany* **62**, 4639–4647.
- Saganová M, Bokor B, Stolárik T, Pavlovič A.** 2018. Regulation of enzyme activities in carnivorous pitcher plants of the genus *Nepenthes*. *Planta* **248**, 451–464.
- Schägger H.** 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* **1**, 16–22.
- Schulze WX, Sanggaard KW, Kreuzer I, et al.** 2012. The protein composition of the digestive fluid from the Venus flytrap sheds light on prey digestion mechanisms. *Molecular and Cellular Proteomics* **11**, 1306–1319.
- Šebela M, Štosová T, Havlis J, Wielsch N, Thomas H, Zdráhal Z, Shevchenko A.** 2006. Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. *Proteomics* **6**, 2959–2963.
- Sheard LB, Tan X, Mao H, et al.** 2010. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* **468**, 400–405.
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M.** 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* **1**, 2856–2860.
- Simerský R, Chamrád I, Kania J, Strnad M, Šebela M, Lenobel R.** 2017. Chemical proteomic analysis of 6-benzylaminopurine molecular partners in wheat grains. *Plant Cell Reports* **36**, 1561–1570.
- Tabb DL, Ma ZQ, Martin DB, Ham AJ, Chambers MC.** 2008. DirecTag: accurate sequence tags from peptide MS/MS through statistical scoring. *Journal of Proteome Research* **7**, 3838–3846.
- Takahashi K, Matsumoto K, Nishi W, Muramatsu M, Kubota K, Shibata C, Athauda SBP.** 2009. Comparative studies on the acid proteinase activities in the digestive fluids of *Nepenthes*, *Cephalotus*, *Dionaea*, and *Drosera*. *Carnivorous Plant Newsletter* **38**, 75–82.
- Takahashi K, Nishii W, Shibata C.** 2012. The digestive fluid of *Drosera indica* contains a cysteine endopeptidase (“Droserain”) similar to dionain from *Dionaea muscipula*. *Carnivorous Plant Newsletter* **41**, 132–134.
- Thines B, Katsir L, Melotto M, et al.** 2007. JAZ repressor proteins are targets of the SCF (COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**, 661–665.
- Vassilyev AE, Muravnik LE.** 1988a. The ultrastructure of the digestive glands in *Pinguicula vulgaris* L. (Lentibulariaceae) relative to their function. I. The changes during maturation. *Annals of Botany* **62**, 329–341.
- Vassilyev AE, Muravnik LE.** 1988b. The ultrastructure of the digestive glands in *Pinguicula vulgaris* L. (Lentibulariaceae) relative to their function. II. The changes on stimulation. *Annals of Botany* **61**, 343–351.
- Yilamujiang A, Reichelt M, Mithöfer A.** 2016. Slow food: insect prey and chitin induce phytohormone accumulation and gene expression in carnivorous *Nepenthes* plants. *Annals of Botany* **118**: 369–735.

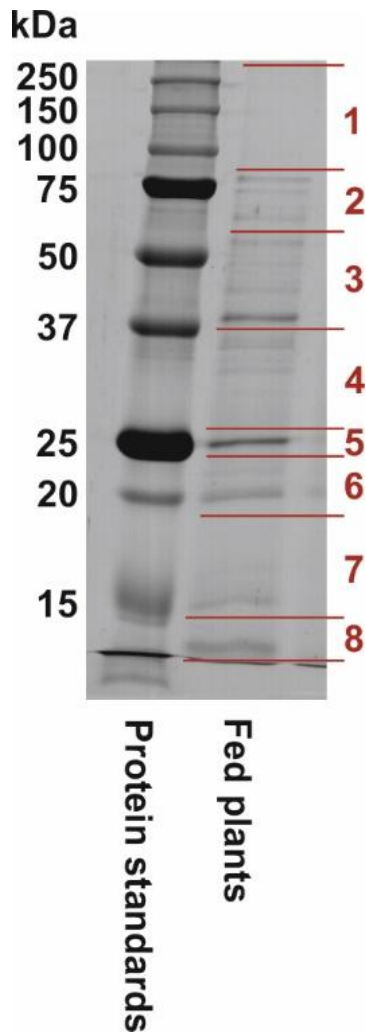


Fig. S1 Protein profile of the digestive fluid from *Pinguicula* x *Tina* in response to feeding. An aliquot (1 mL) of freshly collected digestive fluid secreted in response to feeding was frozen in liquid nitrogen and lyophilized overnight. The resulting dry residue was taken to 100 μ L with 100mM NaCl, 10x cOmplete protease inhibitor cocktail (Roche, Switzerland) and proteins were precipitated using the TCA/acetone method. The obtained protein pellet was dissolved in Laemmli sample buffer, separated by SDS-PAGE and stained with colloidal Coomassie. Then, the gel was divided into 8 slices (shown with numbers) and the resolved proteins were digested in-gel with trypsin with raffinose-modified trypsin as described elsewhere. The resultant tryptic digest was cleaned on home-made C18 StageTips and analyzed by LC-ESI-MS/MS according to Simerský et al. (2017). For more detailed information, see Materials and Methods and the Supplementary Table 1.

Publikace III.

Contrasting effect of prey capture on jasmonate accumulation in two genera of aquatic carnivorous plants (*Aldrovanda*, *Utricularia*)

Název: Contrasting effect of prey capture on jasmonate accumulation in two genera of aquatic carnivorous plants (*Aldrovanda*, *Utricularia*)

Autoři: Jakšová J., Adamec L., Petřík I., Novák O., Pavlovič A.

Status: publikováno v roce 2021 v Plant Physiology and Biochemistry

DOI: 10.1016/j.plaphy.2021.06.014

Souhrn:

Suchozemské masožravé rostliny druhů rosnatka (*Drosera*), mucholapka (*Dionaea*) a láčkovka (*Nepenthes*) řádu hvozdíkotvaré (Caryophyllales) využívají k regulaci enzymových aktivit fytohormony jasmonáty. V této studii byla pozornost zaměřena na vodní masožravé rostliny, jejichž morfologické a fyziologické rysy a růstové strategie jsou zcela odlišné od těch suchozemských. Byly vybrány dva rody s odlišným lapacím mechanismem a z odlišných čeledí a řádů: aldrovandka (*Aldrovanda*; rosnatkovité, hvozdíkotvaré) se sklápávací pastí a bublinatka (*Utricularia*; bublinatkovité, hluchavkotvaré) se sacím typem pastí. Jako kořist sloužil různý zooplankton jako lasturnatky, hrotnatky či vznášivky. Aby bylo odpovězeno na otázku, zda jsou jasmonáty zapojeny do aktivace masožravé reakce podobně jako je to známo v pastech suchozemské čeledi rosnatkovité (druh rosnatka, mucholapka), byly provedeny fytohormonální analýzy a jednoduchý biotest. Výsledky ukázaly, že bublinatka na rozdíl od aldrovandky jasmonáty k aktivaci masožravé odpovědi nevyužívá. Totéž bylo dříve dokumentováno u hybridu tučnice (*Pinguicula* × *Tina*) a bublinatka je tak druhým rodem v řádu hluchavkotvaré, díky kterému můžeme říci, že jasmonátová signalizace nebyla exaptována ve všech rodech masožravých rostlin. V krmených pastech obou vodních druhů byly významně zvýšeny také hladiny dalších fytohormonů – SA a IAA, což lze ale připsat vysokému obsahu těchto fytohormonů v samotném zooplanktonu, který zůstal uzavřen v pastech a byl tak s nimi společně analyzován. Biotest u aldrovandky však dokázal fyziologický efekt pouze JA. Pomocí velmi tenké skleněné kapiláry, která byla napojena na peristaltickou pumpu byly dále odebírány trávicí tekutiny na proteomickou analýzu. Analýzy pomocí nano-kapalilové chromatografie ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem odhalily, že oba rody vylučují trávicí tekutinu, která obsahuje cysteinovou proteázu homologní s dionaiem (cysteinová proteáza v mucholapce podivné), která je u aldrovandky indukována kořistí a JA a u bublinatky je přítomná konstitutivně. Ačkoli byly pro botanickou masožravost exaptovány podobné trávicí enzymy, způsob jejich regulace se liší. Má se za to, že hydrolytické enzymy v trávicí tekutině bublinatky pocházejí převážně ze žijících organismů uvnitř pastí, avšak rostliny vylučují také své vlastní enzymy.

Příspěví autorů:

Výzkum:

- příprava a odebírání materiálů: J. Jakšová, L. Adamec
- kvantifikace fytohormonů: J. Jakšová, I. Petřík, O. Novák
- identifikace proteinů: M. Šebela, J. Jakšová
- biotest: L. Adamec., J. Jakšová

Konceptualizace: J. Jakšová, L. Adamec, A. Pavlovič

Supervize: A. Pavlovič, O. Novák

Vizualizace: A. Pavlovič

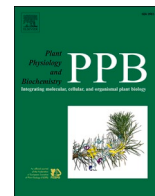
Statistika: A. Pavlovič

Psaní – rukopis: J. Jakšová, A. Pavlovič

Psaní – editace: J. Jakšová, A. Pavlovič

Získání financování: A. Pavlovič, O. Novák, M. Šebela

Podíl J. Jakšové: 50 %



Short communication

Contrasting effect of prey capture on jasmonate accumulation in two genera of aquatic carnivorous plants (*Aldrovanda*, *Utricularia*)

Jana Jakšová^a, Lubomír Adamec^b, Ivan Petřík^c, Ondřej Novák^c, Marek Šebela^d,
Andrej Pavlovič^{a,*}

^a Department of Biophysics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, CZ-783 71, Olomouc, Czech Republic

^b Institute of Botany of the Czech Academy of Sciences, Department of Experimental and Functional Morphology, Dukelská135, CZ-379 82, Treboň, Czech Republic

^c Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University and Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences, Šlechtitelů 27, CZ-783 71, Olomouc, Czech Republic

^d Department of Biochemistry, Faculty of Science, and Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, CATRIN, Palacký University, Šlechtitelů 27, CZ-783 71, Olomouc, Czech Republic



ARTICLE INFO

Keywords:

Abscisic acid
Aldrovanda vesiculosa
Carnivorous plant
Jasmonic acid
Salicylic acid
Utricularia reflexa

ABSTRACT

Terrestrial carnivorous plants of genera *Drosera*, *Dionaea* and *Nepenthes* within the order Caryophyllales employ jasmonates for the induction of digestive processes in their traps. Here, we focused on two aquatic carnivorous plant genera with different trapping mechanism from distinct families and orders: *Aldrovanda* (Droseraceae, Caryophyllales) with snap-traps and *Utricularia* (Lentibulariaceae, Lamiales) with suction traps. Using phytohormone analyses and simple biotest, we asked whether the jasmonates are involved in the activation of carnivorous response similar to that known in traps of terrestrial genera of Droseraceae (*Drosera*, *Dionaea*). The results showed that *Utricularia*, in contrast with *Aldrovanda*, does not use jasmonates for activation of carnivorous response and is the second genus in Lamiales, which has not co-opted jasmonate signalling for botanical carnivory. On the other hand, the nLC-MS/MS analyses revealed that both genera secreted digestive fluid containing cysteine protease homologous to dionain although the mode of its regulation may differ. Whereas in *Utricularia* the cysteine protease is present constitutively in digestive fluid, it is induced by prey and exogenous application of jasmonic acid in *Aldrovanda*.

1. Introduction

Carnivorous plants represent an ecological group of ca. 800 species which capture, kill and digest animal prey in specialised modified leaves called traps, and use the absorbed nutrients for growth and development (Ellison and Adamec, 2018). It has been documented that three genera of carnivorous plants (*Dionaea*, *Drosera*, and *Nepenthes*) from order Caryophyllales use jasmonates (JAs) for activation of the digestive process in their traps. Jasmonic acid (JA), its isoleucine conjugate (JA-Ile) as well as their biosynthetic precursor, *cis*-(+)-12-oxo-phytodienoic acid (*cis*-OPDA), significantly accumulated in traps over time after experimental feeding and their exogenous application triggered the secretion of digestive enzymes and formation of digestive cavity (Escalante-Pérez et al., 2011; Nakamura et al., 2013; Libiaková et al., 2014; Yilamujiang et al., 2016; Krausko et al., 2017;

Pavlovič et al., 2017, 2020). In non-carnivorous plants, JAs accumulate in response to pathogen or herbivore attack and activate plant defense reactions by transcriptional activation (Wasternack and Hause, 2013). It has been suggested that the jasmonate signalling pathway as well as digestive enzymes, which belong to pathogenesis-related proteins, have been co-opted by carnivorous plants from plant defense to prey digestion during evolution (Mithöfer, 2011; Pavlovič and Saganová, 2015; Bemm et al., 2016; Pavlovič and Mithöfer, 2019). The true bioactive compound JA-Ile binds to the CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1) protein as a part of a co-receptor complex, mediates the ubiquitin-dependent degradation of JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) repressors, resulting in the activation of jasmonate-dependent gene expression (Thines et al., 2007; Fonseca et al., 2009; Sheard et al., 2010); in carnivorous plants, it initiates the expression of carnivory-related genes, mainly for nutrient transport and digestive enzymes (Bemm et al., 2016; Böhm et al., 2016;

* Corresponding author.

E-mail address: andrej.pavlovic@upol.cz (A. Pavlovič).

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.06.014>

Received 9 April 2021; Accepted 8 June 2021

Available online 16 June 2021

0981-9428/© 2021 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

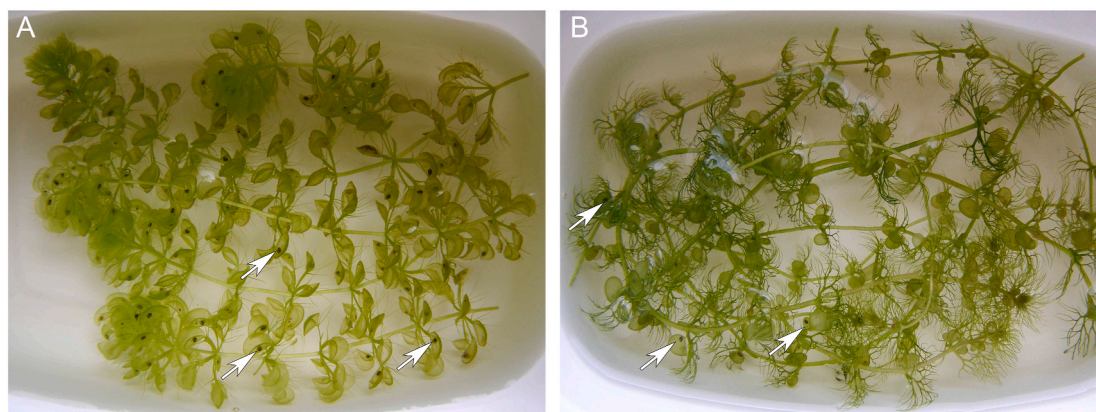


Fig. 1. Experimental setup. The plants were fed on aquatic prey for a short period. (A) *Aldrovanda vesiculosa*; (B) *Utricularia reflexa*. Arrows show the traps which successfully trapped prey and were used for analyses as fed traps.

Krausko et al., 2017; Pavlovič et al., 2017; Jakšová et al., 2020). However, all three genera mentioned above are closely related within the same order Caryophyllales. It has been recently reported that a carnivorous butterwort hybrid *Pinguicula* × *Tina* from the family Lentibulariaceae (order Lamiales) does not use jasmonate signalling for the induction of enzyme activities in response to prey capture, indicating that the jasmonate signalling is not a universal signalling pathway in all carnivorous plant genera (Kocáb et al., 2020).

In this study, we focused on two contrasting species of aquatic carnivorous plants. Aquatic carnivorous plants include monotypic *Aldrovanda vesiculosa* L. (Droseraceae, Caryophyllales) and about 60 submerged or amphibious species of *Utricularia* L. (Lentibulariaceae, Lamiales; Adamec, 2018). Although both genera of aquatic carnivores are ecologically very similar, the structures and functional principles of their motile traps are very different. *Aldrovanda* has 3–6 mm large snap-traps, reminiscent of those of the closely-related terrestrial Venus flytrap (*Dionaea muscipula*): two convex trap lobes are attached to a midrib and after mechanical irritation, generate action potentials and close within 14–50 ms (Iijima and Sibaoka, 1981, 1982; Poppinga et al., 2018; Westermeier et al., 2018, 2020). Although no digestive enzymes have been directly identified in the digestive fluid in *Aldrovanda* traps so far (Matusířková et al., 2018), exact ultrastructural studies on its digestive glands clearly revealed the stimulation mode of hydrolytic enzyme secretion after prey capture (Muravnik et al., 1995; Muravnik, 1996; Atsuzawa et al., 2020).

Suction traps of aquatic *Utricularia* species are 1–6 mm large, discoid hollow bladders with flexible side walls and contain a mobile sensitive trapdoor, hermetically sealing the trap. Continuous pumping of water out of the trap maintains a negative pressure inside the trap, which is the driving force for the prey capture (Adamec, 2018; Poppinga et al., 2016, 2018). The reset trap can open (‘fire’) very quickly after a mechanical stimulation or spontaneously after a critical negative pressure is reached (Adamec and Poppinga, 2016) and can repeatedly capture new prey every 30–60 min. Microbial commensal communities live inside the traps and function partly as digestion mutualists (Sirová et al., 2018a,b). Several classes of hydrolytic enzyme activities independent of prey capture have been reported from *Utricularia* traps (Sirová et al., 2003), but again no enzyme has been directly identified from the digestive fluid (Matusířková et al., 2018).

Analyses of phytohormones in traps were used in this study in two aquatic carnivores, *A. vesiculosa* and *Utricularia reflexa*, to find out whether their traps accumulate JAs in response to experimental feeding similar to terrestrial *Drosera*, *Dionaea* or *Nepenthes*. Simple biotests with JA, abscisic acid (ABA) and salicylic acid (SA) were conducted on the *Aldrovanda* trap closing reaction to reveal the possible regulatory effect of these metabolites on the activation of carnivory. In addition, LC-MS/MS analyses were used to identify new digestive enzymes in the

digestive fluid.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Aldrovanda vesiculosa L. (origin from E Poland) and *Utricularia vulgaris* L. (from S Moravia, Czech Rep.) were grown outdoors in a 2 m² (volume 750 L) plastic container, while *Utricularia reflexa* Oliv. (from Botswana) and *Aldrovanda vesiculosa* (from N Australia) were grown indoors in naturally lit 3 L aquaria at the Institute of Botany in Treboň (Czech Republic). A litter of robust *Carex* species was used as a substrate to mimic natural conditions. The water in both cultures was considered oligotrophic and moderately humic (for all details, see Sirová et al., 2003). Adult *Aldrovanda* plants were 12–20 cm long with traps 3–6 mm large, while *U. reflexa* plants were 20–30 cm long with traps 3–6 mm large and those of *U. vulgaris* were 60–80 cm long with traps 3.5–4.0 mm large. The use of *U. reflexa* was advantageous as this species has a small number of large traps.

2.2. Experimental design

Approximately 15 h before the feeding experiments, 25 robust plants of *A. vesiculosa* from the stock culture were shortened to 10 leaf whorls with mature traps (from the apex, shoot length 7–8 cm) and their branches were removed. Simultaneously, 10 plants of *U. reflexa* with large traps from the aquarium were shortened to 10–15 leaf nodes (again from the apex, shoot length 6–8 cm) with mature traps; leaves bearing traps were excised from 3rd–12th mature leaf nodes (from the apex) of five *U. vulgaris* plants from the stock culture. The 15 h time period was chosen as sufficient based on the fact, that JA tissue level peaked 15–30 min after wounding in systemic tissue and then rapidly declined within 3 h to basal level (Koo et al., 2009). The plants or leaves were thoroughly washed in tap water and transferred to small plastic vessels with ca. 120 ml of filtered cultivation water taken from the outdoor plastic container. Five shoots (or seven excised leaves of *U. vulgaris*) were put in each small vessel. All traps with larger items of previously captured prey were removed. During ca. 15 h, most of the *Aldrovanda* traps were open and all *Utricularia* traps were reset and without air bubbles.

Relatively large zooplankton species (ostracods *Heterocypris incongruens* or diaptomids, copepods or daphnids) were added to the small vessels to feed the plants. After 20 min, at least 50% of *Aldrovanda* and 25% of *Utricularia* traps contained a prey (Fig. 1). Plants were then thoroughly washed in tap water again and put in small plastic vessels with ca. 200 ml of fresh filtered cultivation water without zooplankton. The vessels were transferred to a miniclimabox in continuous light (25

± 1 °C, fluorescent light $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR).

For phytohormone analyses, 2 and 24 h since prey addition, 12–20 traps (usually from 1 to 2 different shoots) with the captured prey, were cut as fast as possible for one sample and stored in ice-cold water during the manipulation. As a control, prey-free traps were sampled in parallel. The excised traps were then promptly (1–2 s) washed in tap water, blotted dry, weighed for fresh weight (FW), placed immediately in frozen 2 ml Eppendorf vials and stored in a freezer at -25 °C. Plant material was lyophilized immediately. Each sample had 1.5–3.7 mg of dry weight (DW). A DW/FW ratio (DW, 80 °C) was estimated in parallel material and each variant included 4–5 parallel samples from different plants. The zooplankton remained enclosed in the trap and it was not possible to remove it without causing trap damage. To estimate the hormone content in the prey, ostracods *Heterocypris incongruens* were also lyophilized for hormone analyses.

For protein determination experiment, the trap fluid was collected 24 h after feeding using the same set up from 240 fed traps of *A. vesiculosa* (unfed *A. vesiculosa* traps did not contain any digestive fluid and thus were not collected), 40 unfed and 50 fed traps of *U. reflexa*, and 26 unfed and 50 fed traps of *U. vulgaris*. The small glass capillary connected to peristaltic pump was inserted into *Utricularia* traps through the trap door or pierced through the *Aldrovanda* trap wall and digestive fluid was sampled. By this way, we obtained 130–400 μL of digestive fluid from different treatments.

2.3. Trap closing experiments

For studying the effect of JA, SA and ABA to induce trap closing, adult *Aldrovanda* plants from N Australia growing in indoor 3 L aquaria were used. Six short shoot segments containing 3rd–4th or 3rd–5th mature leaf whorls were cut, thoroughly washed in tap water, lightly blotted dry, and each segment was put in a transparent 30 mL plastic vial into 10 mL of the filtered cultivation water. The traps were left fully re-open for ca. 15 h. The individual phytohormones were added at a final concentration of 0.5 mM JA or 0.5 mM SA or 20 μM ABA at time 0 when each segment bore 15–23 open traps. These concentrations were chosen based on previous experiments on carnivorous plants, where they were found to be biologically active (Escalante-Perez et al., 2011; Nakamura et al., 2013; Buch et al., 2015; Krausko et al., 2017; Pavlović et al., 2017). The segments were exposed under the same conditions as above. Closed traps were counted after 20, 40, 55, 120 and 180 min and observed for additional 48 h. Segments without added phytohormones were used as a control. Digestive fluid from JA-induced closed *Aldrovanda* traps was also collected as described above for MS analyses 24 h after the application of 0.5 mM JA. Due to spontaneous firing of *Utricularia* traps several times per day (Adamec, 2011; Vincent et al., 2011), it was pointless to repeat the same experiment with *U. reflexa* traps.

2.4. Quantification of phytohormones

The phytohormones were quantified in *A. vesiculosa* and *U. reflexa*. Quantification of phytohormones was performed according to the method described by Floková et al. (2014); the extraction process was modified for a small amount of dry plant tissue. One mL of ice-cold 10% MeOH/H₂O (v/v), internal standards and four small metallic beads were added to the dry biomass. Dry plant material was homogenized using a MM 301 vibration mill (Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Germany) at a frequency of 27 Hz for 5 min. The samples were incubated at 4 °C by shaking using a laboratory rotator for 30 min and centrifuged (20,000 rpm, 4 °C, 15 min). The supernatant was transferred into a new Eppendorf vial, the volume was measured and the extract of most of the samples was subdivided (as dependent on the FW) into two aliquots. At the end, each sample contained stable isotope-labelled standards as follows: 10 pmol of [²H₆]JA, [²H₅]OPDA, [²H₆]ABA, [¹³C₆]IAA, 0.1 pmol of [²H₂]JA-Ile and 20 pmol of [²H₄]SA (all from Olchemim Ltd., Czech Republic) to validate the LC-MS/MS method. The extracts were

purified using Oasis® HLB columns (30 mg mL⁻¹, Waters, Milford, MA, USA) and hormones were eluted with 80% methanol. The eluent was evaporated to dryness under a stream of nitrogen. Phytohormone levels were determined by ultra-high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) using an Acquity UPLC I-Class System (Waters, Milford, MA, USA) equipped with an Acquity UPLC CSH C18 column (100 \times 2.1 mm; 1.7 μm ; Waters) coupled to a triple quadrupole mass spectrometer Xevo TQ-S MS (Waters MS Technologies, Manchester, UK).

2.5. Protein identification analysis

Protein concentration was determined by the bicinchoninic acid assay (Smith et al., 1985). Sample of fed *A. vesiculosa* showed the highest value of 2.1 mg mL⁻¹ protein, sample of fed *U. vulgaris* contained 0.1 mg mL⁻¹; the others had even lower content. All samples were subjected to SDS-PAGE (Laemmli, 1970) in a 12% T/2.7% C resolving gel and 4% T/2.7% C stacking gel; 30- μL aliquots in Laemmli sample buffer were loaded per well onto an 8 \times 7 cm minigel, 1-mm thick. Coomassie-stained protein bands were excised from the gel slab, which was followed by an in-gel digestion step (Shevchenko et al., 2006). The resulting digests were purified on ZipTip C18 pipette tips (Merck-Millipore, Ireland) and the recovered desalted peptides separated by nanoflow liquid chromatography coupled to electrospray ion trap tandem mass spectrometry (nLC-ESI-IT-MS/MS) on an amaZon speed ETD instrument (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) as already described (Panáček et al., 2018).

MGF formatted nLC-ESI-IT-MS/MS data files were searched against Caryophyllales and Lamiales protein sequences downloaded from the NCBI Protein database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) in March 2021, and supplemented with CRAP contaminants database (<https://www.thegpm.org/crap/>), using PEAKS X software (Bioinformatics Solutions, Inc., Waterloo, ON, Canada). The data were also searched against the reviewed database Swiss-Prot (release 2021_01; <https://www.uniprot.org/downloads>), taxonomy Vidiriplantae. Parameters of the searches were as follows: monoisotopic masses; error tolerance for precursor mass of 50 ppm; error tolerance for fragment ions of 0.5 Da; semispecific trypsin digestion mode; up to three missed cleavages; carbamidomethylation of cysteine as a fixed modification; oxidation of methionine and acetylation of protein N-terminus as variable modifications; three maximum variable modifications per peptide.

Gel-based protein identification after the induction by 0.5 mM JA in *Aldrovanda* was not successful because of a low protein content. To overcome this, a 200- μL aliquot of the digestive fluid was dried out in a vacuum centrifuge. The solid residue was dissolved in 50 μL of 100 mM NH₄HCO₃ and alkalinized by adding 1 μL of 25% (v/v) ammonia. Disulfides were reduced by adding 2 μL of 100 mM dithiothreitol (DTT) in 100 mM NH₄HCO₃ and incubating at 37 °C for 30 min. After cooling down, 5 μL of 100 mM iodoacetamide in 100 mM NH₄HCO₃ were added and the mixture incubated at 23 °C in the dark for 20 min. Then 2.5 μL of 100 mM DTT in 100 mM NH₄HCO₃ were added for quenching the unreacted alkylating reagent. After 20 min, the solution was adjusted to a total volume of 300 μL by 50 mM NH₄HCO₃. Digestion was initiated by 3 μL of SOLu trypsin (Merck, Germany) and proceeded at 37 °C for 24 h. The digest was evaporated to dryness in vacuum centrifuge and reconstituted in 10 μL of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid. Peptides from the digest were purified using a ZipTip C18 pipette tip. The procedure of protein identification was based on nLC coupled via an eluate-spotting device to MS/MS on a MALDI-TOF/TOF instrument as already described (Petrovská et al., 2014). MS/MS data were processed by database searches using PEAKS X as above (plus manually evaluated using flexAnalysis 3.4 and BioTools 3.2 by Bruker Daltonik); glutamine/asparagine deamidation was an additionally considered variable modification.

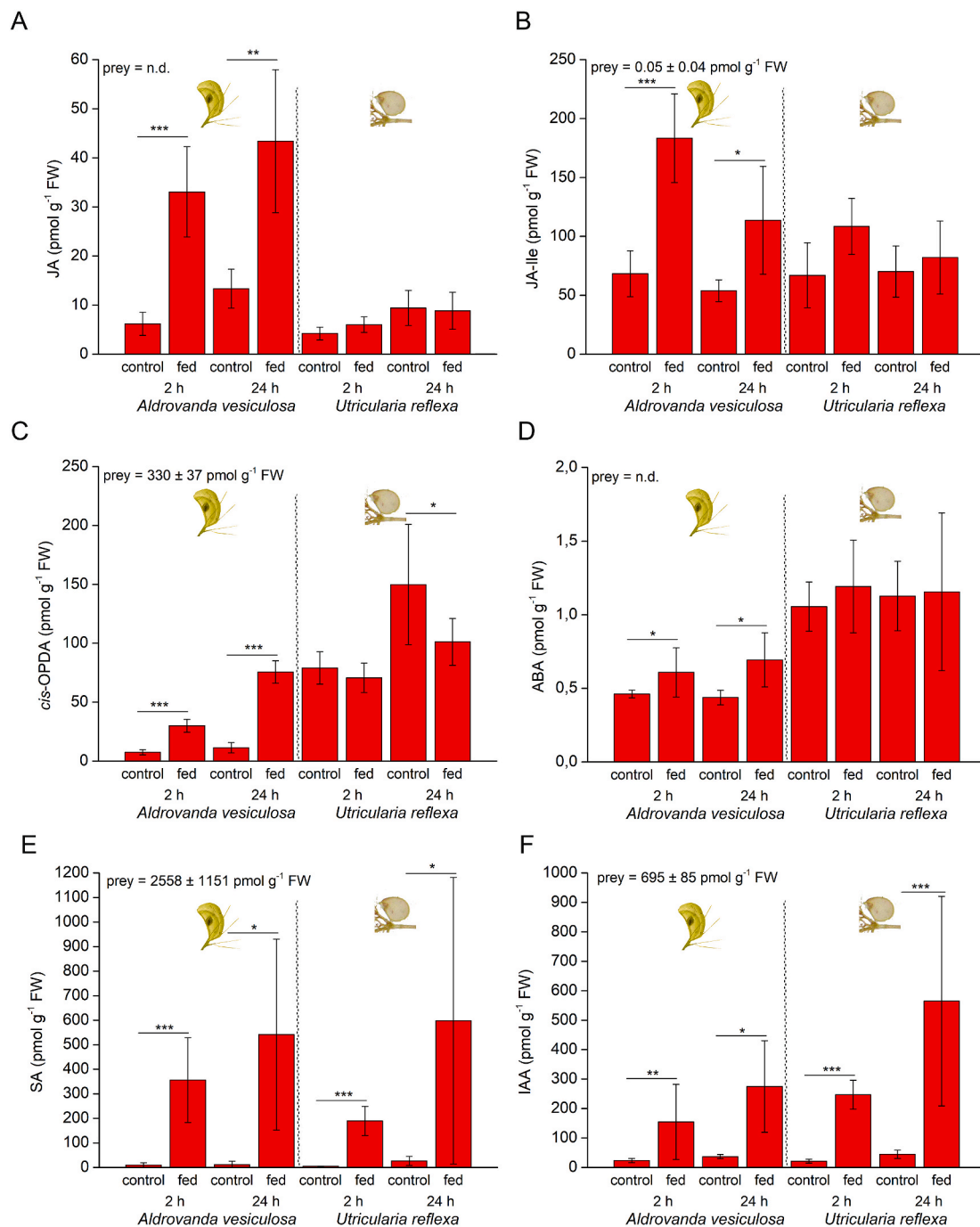


Fig. 2. Phytohormone trap tissue content. (A) Jasmonic acid, (B) jasmonic acid isoleucine conjugate, (C) *cis*-12-oxophytodienoic acid, (D) abscisic acid, (E) salicylic acid, (F) 3-indolacetic acid. Phytohormone content in the prey is shown in upper left corner. Means ± S.D., n = 4–10, n.d. – not determined (below detection limit).

2.6. Statistical analyses

Means ± SD intervals are shown. The statistically significant differences between fed variants and unfed controls were tested by the Student *t*-test. If non-homogeneity was present, the Welch *t*-test was used (Microsoft Excel).

3. Results and discussion

Morphological and physiological features and growth strategies of aquatic carnivorous plants are quite dissimilar from those of terrestrial ones (Adamec, 2018). The submerged aquatic or amphibious species of *Aldrovanda* and *Utricularia* are strictly rootless vascular plants that grow

in dystrophic, barren waters. Here, we investigated whether the JAs accumulated in response to feeding in the traps of two distantly-related aquatic species of carnivorous plants, *Aldrovanda vesiculosa* and *Utricularia reflexa*, are similar to that in traps of some terrestrial species.

Aldrovanda vesiculosa accumulated significantly increased levels of JA, JA-Ile, *cis*-OPDA and ABA in trap tissues after both 2 and 24 h following experimental feeding on zooplankton. In contrast, *Utricularia reflexa* did not accumulate significant levels of these phytohormones in trap tissues after experimental feeding (Fig. 2A–D). The significant increase in the level of SA and indole-3-acetic acid (IAA) in fed traps of both species can be attributed to the high content of these phytohormones in the applied zooplankton, which remained enclosed in the traps and was thus analyzed together with trap tissue (Fig. 2E and F). To verify

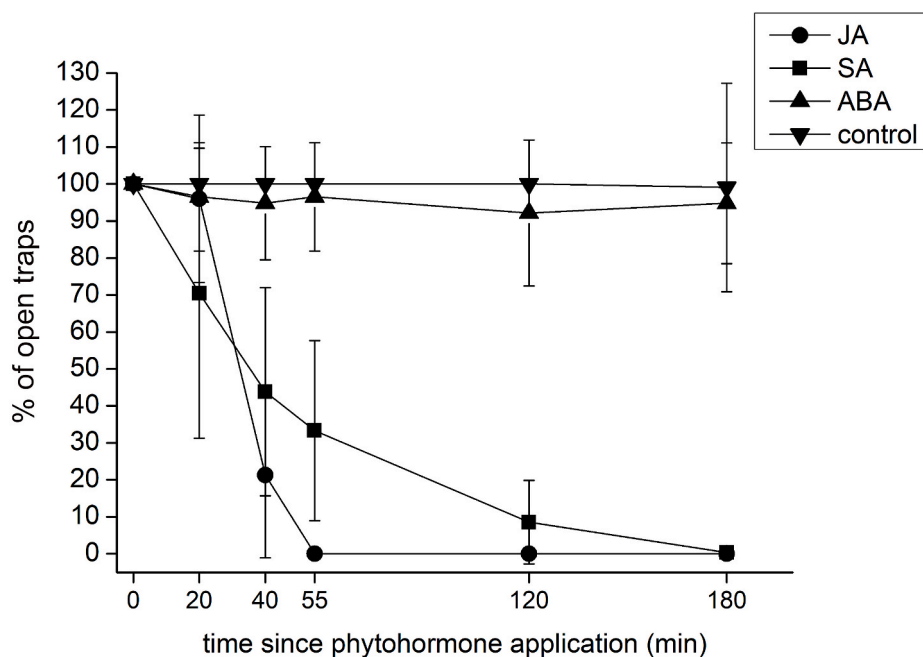


Fig. 3. Trap closing response in *Aldrovanda vesiculosa*. The phytohormones (0.5 mM JA, 0.5 mM SA, 20 μ M ABA) were applied at time point 0 min, and numbers of closed traps were counted at regular time interval. Means \pm S.D., n = 6 shoot segments.

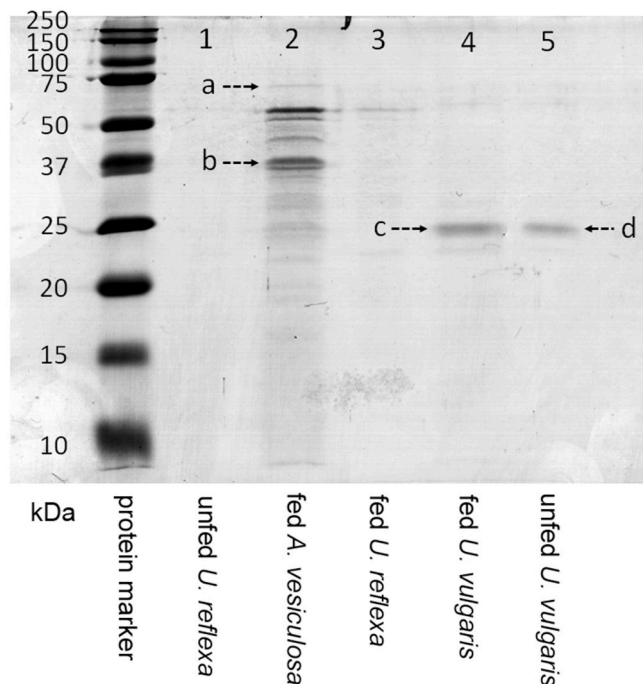


Fig. 4. Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis of digestive fluids. Protein samples were separated using a 12% resolving gel and 4% stacking gel. The resolving gel was stained afterwards by Coomassie Brilliant Blue G-250. The separation lanes show, from the left, a protein marker with the indicated molecular mass values of its components, and samples of digestive fluid from: 1 - unfed *U. reflexa*, 2 - fed *A. vesiculosa*, 3 - fed *U. reflexa*, 4 - fed *U. vulgaris*, 5 - unfed *U. vulgaris*. Arrows indicate the visualized proteins bands (2-a, 2-b, 4-c, 5-d), which were confirmed to contain hydrolytic enzymes as identified by nLC-ESI-IT-MS/MS.

the physiological effect of JAs; JA, SA and ABA were added into the cultivation water to a final concentration of 0.5 mM, 0.5 mM and 20 μ M, respectively, and we observed the trap closing reaction. In the trap

closing experiments on applied phytohormones, all *Aldrovanda* traps were closed after the application of JA after 55 min (Fig. 3) and stayed closed for a period of 48 h. Moreover, traps immersed in the JA medium for 10 h also stayed closed in the fresh medium without JA for the next 84 h (data not shown). The trap closing reaction was also induced by SA (Fig. 3), but after 44 h, all traps were damaged by SA and most probably were dead. After transfer into the fresh medium without SA, the traps only slightly re-opened but did not react to mechanical stimuli, indicating a pharmacologically damaging effect of SA. ABA was not able to induce the trap closing reaction at all (Fig. 3) and the traps fully closed upon mechanical stimulation after 44 h of the ABA treatment.

Despite its aquatic lifestyle, *Aldrovanda* accumulates JAs in response to prey capture and responds also to their exogenous application in a way similar to the terrestrial carnivorous members of Droseraceae, *Drosera capensis* and *Dionaea muscipula* (Nakamura et al., 2013; Libiaková et al., 2014; Krausko et al., 2017; Pavlovič et al., 2017). As *Aldrovanda* generates APs in response to mechanical stimulation (Iijima and Sibaoka, 1981, 1982) like its closest relative *Dionaea* (Hodick and Sievers, 1988), the downstream sequence of signalling events is probably similar and involves Ca^{2+} induced JAs accumulation as is well-known in non-carnivorous plants (Toyota et al., 2018; Farmer et al., 2020; Suda et al., 2020). In *Dionaea*, accumulated JAs activated the expression of digestive enzymes including cysteine protease dionain and VF chitinase I (Libiaková et al., 2014; Böhm et al., 2016; Pavlovič et al., 2017) and we found similar enzyme in *Aldrovanda*. Based on our nLC-MS/MS analysis and homology search, we identified a cysteine protease dionain3 from *Dionaea muscipula* (accession no. gi|794462956 assigned by a single peptide NSWGTSWGENGYIR to the band 2-b in Fig. 4) in the digestive fluid collected from fed *Aldrovanda* traps (we called it aldrovandain). Digestive fluid collected from hermetically closed traps induced by exogenously added 0.5 mM JA also contained cysteine protease in *Aldrovanda* (identification based on the same sequence as above). Therefore the mechanism of enzyme synthesis is the same as in *Dionaea*. Moreover, putative nucleotide pyrophosphatase/-phosphodiesterase from *Nepenthes mirabilis* (accession no. gi|1002635122) was assigned by a single peptide FLAFGDMGK to the protein band 2-a in Fig. 4. A recent genomic study has revealed that *Aldrovanda*, *Dionaea* and *Drosera* have significantly expanded gene

families related to jasmonate signalling (Palfalvi et al., 2020). Thus, our phytohormone analyses in *Aldrovanda*, *Drosera* (Krausko et al., 2017) and *Dionaea* (Libiaková et al., 2014; Pavlovič et al., 2017, 2020) are important physiological evidence to genome studies supporting the hypothesis that jasmonate signalling was co-opted for carnivory likely already in a common ancestor of the Droseraceae (Palfalvi et al., 2020). Based on the molecular evidence, it was proposed that the snap-traps of *Aldrovanda* and *Dionaea* were derived from a common terrestrial ancestor that had flypaper-traps (Cameron et al., 2002) which co-opted JA signalling from plant defense (Palfalvi et al., 2020). Later, probably terrestrial ancestor of *Aldrovanda* was becoming adapted to permanently aquatic lifestyle (Cameron et al., 2002).

On the other hand, the aquatic *Utricularia reflexa*, which uses different trapping mechanism and is not related to Droseraceae, does not accumulate significant amount of JAs in response to feeding. This is in accordance with genome analysis of *U. gibba*, where, in contrast with Droseraceae, gene families related to jasmonate signalling are not significantly expanded (Ibarra-Laclette et al., 2013; Carretero-Paulet et al., 2015; Lan et al., 2017). The findings that enzyme activity in *Utricularia* bladders is independent of prey capture and is rather constitutive (Sirová et al., 2003) question the necessity to possess a JA-inducible system for enzyme secretion. In the trap fluids of *Utricularia*, there are many species of living bacteria, algae, fungi and protozoa and it has been suggested that *Utricularia* are rather more ‘farmers’ than ‘hunters’ (Sirová et al., 2018a,b). Even more, putative losses of the defense response genes in *U. gibba* are apparent (Renner et al., 2018). Microbiome organisms certainly contribute to hydrolytic activities in the digestive fluid, but the plants also secrete their own digestive enzymes (Sirová et al., 2003). Using our nLC-MS/MS analyses and homology search we were unsuccessful to identify any secreted enzyme in *U. reflexa*. Therefore, we used another *Utricularia* species and found that the major bands in samples from fed and unfed *U. vulgaris* digestive fluid, i.e. 4-c and 5-d (Fig. 4), respectively, were assigned by a single peptide DQGQCGSCWAF to dionain 4 from *Dionaea muscipula* (accession no. gi|1114672835) or cysteine protease from *Spinacia oleracea* (accession no. gi|222425026). Indeed, the *U. gibba* genome reveals large expansions of cysteine protease gene family which are predominantly expressed in trap tissue (Lan et al., 2017). It seems that different evolutionary lineages of carnivorous plants co-opted similar digestive enzymes with convergent amino acid changes (Fukushima et al., 2017), but the mode of their regulation may differ. Moreover, there is an obvious difference in the molecular mass (Fig. 4). Additional protein identifications in samples including abundant plant intracellular proteins such as actin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, fructose biphosphate aldolase, triosephosphate isomerase, calmodulin, histones, and ubiquitin were considered contaminants arising from a mechanical injury of plants during the sample collection process.

In addition to our previous study on *Pinguicula* (Kocáb et al., 2020), *Utricularia* is the second genus of carnivorous plant in the order Lamiales, which has not co-opted jasmonate signalling for botanical carnivory. On the other hand, activation of digestive process in aquatic *Aldrovanda* is similar to terrestrial *Dionaea* and both rely on jasmonates. Interestingly, both genera of aquatic carnivorous plants used cysteine protease homologous to dionain for prey digestion, which is prey and JA-induced in *Aldrovanda* and constitutively present in *Utricularia*. Thus, although the similar digestive enzymes were co-opted for botanical carnivory, the mode of their regulation may differ in different taxa. How are the carnivory-related processes activated by prey in other genera of CPs remains to be investigated.

Author's contribution

AP and LA designed the experiments; JJ and LA collected samples and did the biotest; JJ, IP and ON analyzed phytohormone tissue level; MS performed nLC-MS/MS; JJ and AP wrote the manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This study was partly supported (to LA) by the Long-term research development project No. RVO 67985939 and by the Internal Grant Agency of Palacký University (IGA_PrF_2021_011 and IGA_PrF_2020_028). Sincere thanks are due to Dr. Brian G. McMillan (Glasgow, Scotland) for correction of the language.

References

- Adamec, L., 2011. The comparison of mechanically stimulated and spontaneous firings in traps of aquatic carnivorous *Utricularia* species. *Aquat. Bot.* 94, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2010.09.004>.
- Adamec, L., 2018. Ecophysiology of aquatic carnivorous plants. In: *Carnivorous Plants: Physiology, Ecology, and Evolution*. Oxford University Press, pp. 256–269. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198779841.003.0019>.
- Adamec, L., Poppinga, S., 2016. Measurement of the critical negative pressure inside traps of aquatic carnivorous *Utricularia* species. *Aquat. Bot.* 133, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2016.04.007>.
- Atsuzawa, K., Kanaizumi, D., Ajisaka, M., Kamada, T., Sakamoto, K., Matsushima, H., Kaneko, Y., 2020. Fine structure of *Aldrovanda vesiculosa* L: the peculiar lifestyle of an aquatic carnivorous plant elucidated by electron microscopy using cryo-techniques. *Microscopy* 69, 214–226. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfaa019>.
- Bemm, F., Becker, D., Larisch, C., Kreuzer, I., Escalante-Perez, M., Schulze, W.X., Ankenbrand, M., Van De Weyer, A.L., Krol, E., Al-Rasheid, K.A.S., Mithöfer, A., Weber, A.P., Schultz, J., Hedrich, R., 2016. Venus flytrap carnivorous lifestyle builds on herbivore defense strategies. *Genome Res.* 26, 812–825. <https://doi.org/10.1101/gr.202200.115>.
- Böhm, J., Scherzer, S., Krol, E., Kreuzer, I., Von Meyer, K., Lorey, C., Mueller, T.D., Shabala, L., Monte, I., Solano, R., Al-Rasheid, K.A.S., Renneberg, H., Shabala, S., Neher, E., Hedrich, R., 2016. The Venus flytrap *Dionaea muscipula* counts prey-induced action potentials to induce sodium uptake. *Curr. Biol.* 26, 286–295. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.057>.
- Buch, F., Kaman, W.E., Bikker, F.J., Yilamujiang, A., Mithöfer, A., 2015. Nepenthesin protease activity indicates digestive fluid dynamics in carnivorous *Nepenthes* plants. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118853> e0118853.
- Cameron, K.M., Wurdack, K.J., Jobson, R.W., 2002. Molecular evidence for the common origin of snap-traps among carnivorous plants. *Am. J. Bot.* 89, 1503–1509. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.9.1503>.
- Carretero-Paulet, L., Librado, P., Chang, T.-H., Ibarra-Laclette, E., Herrera-Estrella, L., Rozas, J., Albert, V.A., 2015. High gene family turnover rates and gene space adaptation in the compact genome of the carnivorous plant *Utricularia gibba*. *Mol. Biol. Evol.* 32, 1284–1295. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv020>.
- Ellison, A.M., Adamec, L., 2018. Introduction: what is a carnivorous plant?. In: *Carnivorous Plants: Physiology, Ecology, and Evolution*. Oxford University Press, pp. 3–6. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198779841.003.0001>.
- Escalante-Perez, M., Krol, E., Stange, A., Geiger, D., Al-Rasheid, K.A.S., Hause, B., Neher, E., Hedrich, R., 2011. A special pair of phytohormones controls excitability, slow closure, and external stomach formation in the Venus flytrap. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 15492–15497. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112535108>.
- Farmer, E.E., Gao, Y., Lenzoni, G., Wolfender, J., Wu, Q., 2020. Wound- and mechano-stimulated electrical signals control hormone responses. *New Phytol.* 227, 1037–1050. <https://doi.org/10.1111/nph.16646>.
- Floková, K., Tarkowská, D., Miersch, O., Strnad, M., Wasternack, C., Novák, O., 2014. UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry* 105, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.05.015>.
- 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. *Nat. Chem. Biol.* 5, 344–350. <https://doi.org/10.1038/nchembio.161>.
- Fukushima, K., Fang, X., Alvarez-Ponce, D., Cai, H., Carretero-Paulet, L., Chen, C., Chang, T.H., Farr, K.M., Fujita, T., Hiwatashi, Y., Hoshi, Y., Imai, T., Kasahara, M., Librado, P., Mao, L., Mori, H., Nishiyama, T., Nozawa, M., Palfalvi, G., Pollard, S.T., Rozas, J., Sánchez-Gracia, A., Sankoff, D., Shibata, T.F., Shigenobu, S., Sumikawa, N., Uzawa, T., Xie, M., Zheng, C., Pollock, D.D., Albert, V.A., Li, S., Hasebe, M., 2017. Genome of the pitcher plant *Cephalotus* reveals genetic changes associated with carnivory. *Nat. Ecol. Evol.* 1, 59. <https://doi.org/10.1038/s41559-016-0059>.
- Hodick, D., Sievers, A., 1988. The action potential of *Dionaea muscipula* Ellis. *Planta* 174, 8–18. <https://doi.org/10.1007/BF00394867>.
- Ibarra-Laclette, E., Lyons, E., Hernández-Guzmán, G., Pérez-Torres, C.A., Carretero-Paulet, L., Chang, T.H., Lan, T., Welch, A.J., Juárez, M.J.A., Simpson, J., Fernández-Cortés, A., Arteaga-Vázquez, M., Góngora-Castillo, E., Acevedo-Hernández, G., Schuster, S.C., Himmelbauer, H., Minoche, A.E., Xu, S., Lynch, M., Oropeza-Aburto, A., Cervantes-Pérez, S.A., De Jesús Ortega-Estrada, M., Cervantes-

- Luevano, J.I., Michael, T.P., Mockler, T., Bryant, D., Herrera-Estrella, A., Albert, V. A., Herrera-Estrella, L., 2013. Architecture and evolution of a minute plant genome. *Nature* 498, 94–98. <https://doi.org/10.1038/nature12132>.
- Iijima, T., Sibaoka, T., 1981. Action potential in the trap-lobes of *Aldrovanda vesiculosa*. *Plant Cell Physiol.* 22, 1595–1601. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076312>.
- Iijima, T., Sibaoka, T., 1982. Propagation of action potential over the trap-lobes of *Aldrovanda vesiculosa*. *Plant Cell Physiol.* 23, 679–688. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076396>.
- 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 Physiol. Biochem.* 146, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.013>.
- 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 × Tina*. *J. Exp. Bot.* 71, 3749–3758. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa159>.
- Koo, A.J.K., Gao, X., Jones, A.D., Howe, A.G., 2009. A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *Plant J.* 59, 974–986. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2009.03924.x>.
- Krausko, M., Perutka, Z., Šebela, M., Šamajová, O., Šamaj, J., Novák, O., Pavlovič, A., 2017. The role of electrical and jasmonate signalling in the recognition of captured prey in the carnivorous sundew plant *Drosera capensis*. *New Phytol.* 213, 1818–1835. <https://doi.org/10.1111/nph.14352>.
- Lan, T., Renner, T., Ibarra-Laclette, E., Farr, K.M., Chang, T.H., Cervantes-Pérez, S.A., Zheng, C., Sankoff, D., Tang, H., Purbojati, R.W., Putra, A., Drautz-Moses, D.L., Schuster, S.C., Herrera-Estrella, L., Albert, V.A., 2017. Long-read sequencing uncovers the adaptive topography of a carnivorous plant genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, E4435–E4441. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702072114>.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Libiaková, M., Floková, K., Novák, O., Slováková, L., 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, e104424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104424>.
- Matusífková, I., Pavlovič, A., Renner, T., 2018. Biochemistry of Prey Digestion and Nutrient Absorption, Carnivorous Plants: Physiology, Ecology, and Evolution. Oxford University Press, pp. 207–220. <https://doi.org/10.1093/oso/978019879841.003.0016>.
- Mithöfer, A., 2011. Carnivorous pitcher plants: insights in an old topic. *Phytochemistry* 72, 1678–1682. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.11.024>.
- Muravnik, L.E., 1996. Morphometric approach to the determination of secretory activity in digestive glands of *Aldrovanda vesiculosa* (Droseraceae). *Bot. Zh. (Kiev)* 81, 1–8.
- Muravnik, L.J., Vasil'ev, A.J., Potapova, J.J., 1995. Ultrastructural aspects of digestive gland functioning in *Aldrovanda vesiculosa*. *Russ. J. Plant Physiol.* 42, 1–8.
- Nakamura, Y., Reichelt, M., Mayer, V.E., Mithöfer, A., 2013. Jasmonates trigger pre-induced formation of “outer stomach” in carnivorous sundew plants. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 280 <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.0228>, 20130228.
- Palfalvi, G., Hackl, T., Terhoeven, E., Shibata, T.F., Nishiyama, T., Ankenbrand, M., Becker, D., Förster, F., Freund, M., Iosip, A., Kreuzer, I., Saul, F., Kamida, C., Fukushima, K., Shigenobu, S., Tamada, Y., Adamec, L., Hoshi, Y., Ueda, K., Winkelmann, T., Fuchs, J., Schubert, I., Schwacke, R., Al-Rasheid, K., Schultz, J., Hasebe, M., Hedrich, R., 2020. Genomes of the Venus flytrap and close relatives unveil the roots of plant carnivory. *Curr. Biol.* 30, 2312–2320. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.04.051>.
- Panáček, A., Kvítek, L., Směkalová, M., Večeřová, R., Kolář, M., Röderová, M., Dyčka, F., Šebela, M., Prucek, R., Tomanec, O., Zbořil, R., 2018. Bacterial resistance to silver nanoparticles and a way how to overcome it. *Nat. Nanotechnol.* 13, 65–71. <https://doi.org/10.1038/s41565-017-0013-y>.
- Pavlovič, A., Jakšová, J., Novák, O., 2017. Triggering a false alarm: wounding mimics prey capture in the carnivorous venus flytrap (*Dionaea muscipula*). *New Phytol.* 216, 927–938. <https://doi.org/10.1111/nph.14747>.
- Pavlovič, A., Libiaková, M., Bokor, B., Jakšová, J., Petřík, I., Novák, O., Baluška, F., 2020. Anaesthesia with diethyl ether impairs jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). *Ann. Bot.* 125, 173–183. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz177>.
- Pavlovič, A., Mithöfer, A., 2019. Jasmonate signalling in carnivorous plants: copycat of plant defence mechanisms. *J. Exp. Bot.* 70, 3379–3389. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz188>.
- Pavlovič, A., Saganová, M., 2015. A novel insight into the cost-benefit model for the evolution of botanical carnivory. *Ann. Bot.* 115, 1075–1092. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv050>.
- Petrovská, B., Jeřábková, H., Chamrád, I., Vrána, J., Lenobel, R., Urínová, J., Šebela, M., Doležel, J., 2014. Proteomic analysis of barley cell nuclei purified by flow sorting. *Cytogenet. Genome Res.* 143, 78–86. <https://doi.org/10.1159/000365311>.
- Poppinga, S., Bauer, U., Speck, T., Volkov, A.G., 2018. Motile traps, in: *Carnivorous Plants: Physiology, Ecology, and Evolution*. Oxford University Press, pp. 180–193. <https://doi.org/10.1093/oso/978019879841.003.0014>.
- Poppinga, S., Weisskopf, C., Westermeier, A.S., Masselter, T., Speck, T., 2016. Fastest predators in the plant kingdom: functional morphology and biomechanics of suction traps found in the largest genus of carnivorous plants. *AoB Plants* 8, plv140. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv140>.
- Renner, T., Lan, T., Farr, K.M., Ibarra-Laclette, E., Herrera-Estrella, L., Schuster, S.C., Hasebe, M., Fukushima, K., Albert, V.A., 2018. Carnivorous Plant Genomes, Carnivorous Plants: Physiology, Ecology, and Evolution. Oxford University Press, pp. 135–153. <https://doi.org/10.1093/oso/978019879841.003.0011>.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havliš, J., Olsen, J.V., Mann, M., 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* 1, 2856–2860. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>.
- Sheard, L.B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T.R., Kobayashi, Y., Hsu, F.-F., Sharon, M., Browne, M., Browne, J., He, S.Y., Rizo, J., Howe, G.A., Zheng, N., 2010. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1–JAZ co-receptor. *Nature* 468, 400–405. <https://doi.org/10.1038/nature09430>.
- Smith, P.K., Krohn, R.L., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- Sirová, D., Adamec, L., Vrba, J., 2003. Enzymatic activities in traps of four aquatic species of the carnivorous genus *Utricularia*. *New Phytol.* 159, 669–675. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00834.x>.
- Sirová, D., Bárta, J., Borovec, J., Vrba, J., 2018a. The Utricularia-associated microbiome: composition, function, and ecology. In: *Carnivorous Plants: Physiology, Ecology, and Evolution*. Oxford University Press, pp. 349–358. <https://doi.org/10.1093/oso/978019879841.003.0025>.
- Sirová, D., Bárta, J., Šimek, K., Posch, T., Pech, J., Stone, J., Borovec, J., Adamec, L., Vrba, J., 2018b. Hunters or farmers? Microbiome characteristics help elucidate the diet composition in an aquatic carnivorous plant. *Microbiome* 6, 225. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0600-7>.
- 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. *Nature Plants* 6, 1219–1224. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-00773-1>.
- 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 signaling. *Science* 361, 1112–1115. <https://doi.org/10.1126/science.aat7744>.
- Vincent, O., Roditchev, I., Marmottant, P., 2011. Spontaneous firings of carnivorous aquatic *Utricularia* traps: temporal patterns and mechanical oscillations. *PLoS One* 6, 20205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020205>.
- Wasternack, C., Hause, B., 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review. *Annals of Botany*. *Ann. Bot.* 111, 1021–1058. <https://doi.org/10.1093/aob/mct067>.
- Westermeier, A.S., Hiss, N., Speck, T., Poppinga, S., 2020. Functional–morphological analyses of the delicate snap-traps of the aquatic carnivorous waterwheel plant (*Aldrovanda vesiculosa*) with 2D and 3D imaging techniques. *Ann. Bot.* 126, 1099–1107. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa135>.
- Westermeier, A.S., Sachse, R., Poppinga, S., Vögele, P., Adamec, L., Speck, T., Bischoff, M., 2018. How the carnivorous waterwheel plant (*Aldrovanda vesiculosa*) snaps. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 285 <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0012>, e20180012.
- Yilamujiang, A., Reichelt, M., Mithöfer, A., 2016. Slow food: insect prey and chitin induce phytohormone accumulation and gene expression in carnivorous *Nepenthes* plants. *Ann. Bot.* 118, 369–375. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw110>.

Publikace IV.

Phylogeny of jasmonate signaling in the carnivorous plants

Název: Phylogeny of jasmonate signaling in the carnivorous plants

Autoři: Pavlovič A., Jakšová J., Vrobel O., Tarkowski P.

Status: manuskript v přípravě

Souhrn:

V této publikaci byl doplněn obrázek o zapojení jasmonátové signalizace do botanické masožravosti. Již bylo známo, že masožravé rostliny řádu hvozdíkotvaré (Caryophyllales) převzaly jasmonátovou signální dráhu od obranného mechanismu rostlin pro své účely, tedy pro botanickou masožravost. Pokud tyto rostliny, zahrnující aldrovandku (*Aldrovanda*), rosnatku (*Drosera*), mucholapku (*Dionaea*) a láčkovku (*Nepenthes*), zaznamenají mechanické a chemické podněty pocházející z kořisti, jasmonáty spustí expresi genů souvisejících s masožravostí vedoucí k produkci a sekreci trávicích enzymů. Masožravé rostliny však mají nejméně jedenáct nezávislých původů a zde bylo otázkou, zda signalizace jasmonátu byla opakovaně exaptována v různých evolučních liniích masožravých rostlin. K tomu byly využity masožravé rostliny tří různých řádů: šťavelotvaré (Oxalidales) reprezentovaný láčkovcí australskou (*Cephalotus follicularis*), vřesovcotvaré (Ericales) reprezentovaný špirlicí nachovou (*Sarracenia purpurea* ssp. *venosa*) a hvozdíkotvaré reprezentovaný rosnolistem lusitánským (*Drosophyllum lusitanicum*). Testované rostliny byly experimentálně krmeny nebo poraněny a také byl do/na pastí/i aplikován koronatin, molekulární agonista aktivního jasmonátu — konjugátu kyseliny jasmonové s isoleucinem, aby se potvrdila nebo vyvrátila úloha jasmonátů v indukci trávicího procesu.

Nejprve byla naše pozornost zaměřena na špirlici, u které se výsledky předchozích studií zabývající se schopností produkovat enzymy rostlinného původu liší. Tato studie potvrdila, že se v trávicí tekutině takovéto enzymy vyskytují, nicméně rostlina produkuje jen velmi malé množství trávicí tekutiny. Jelikož špirlice nachová postrádá víčko, chránící láčku před deštěm, enzymy jsou v přírodě silně zředěné dešťovou vodou a trávení přebírají mikroorganismy žijící v pastech. Co se týče aktivity enzymů, v reakci na krmení nebyla zpozorována stimulace fosfatáz, proteolytická aktivita ale ano. Zvýšené množství aspartát proteázy a chitinázy III a aktivity aspartát proteázy po přidání destilované vody do pasti vykazuje v průběhu času jasný trend v kontrolních i krmených pastech — enzymové aktivity jsou u špirlice nachové regulovány nejprve spíše vývojově a teprve později reagují na chemické podněty kořisti. Mladé špirlice tedy vykazují slabou stimulaci enzymové aktivity v reakci na přidání kořisti, jasmonáty se ale neúčastní signalizace.

Na rozdíl od špirlice nachové, i uzavřené a nezralé pasti láčkovice australské již produkují stabilní hladinu tekutiny obsahující trávicí enzymy. Enzymová aktivita je u láčkovice

konstitutivní, což bylo potvrzeno nezvýšením enzymové aktivity a množství aspartát proteázy po přidání kořisti. Stejně tak aplikace koronatinu neovlivnila množství a aktivitu aspartát proteázy, ani nebyla změřena zvýšená koncentrace jasmonátů v rostlinném pletivu po podání kořisti, což indikuje, že jasmonátová signální dráha se neúčastní reakce ani u této rostliny.

V porovnání se studovanými láčkovkami je situace u rosnolistu zcela odlišná. Indukce enzymových aktivit a zvýšení množství enzymů byla jasně prokázána, naznačující stimulační způsob sekrece trávicích enzymů regulovaný jasmonáty, jak je známo u rosnatky a mucholapky. Na rozdíl od nich ale tentakuly rosnolistu nejsou schopny vykonávat žádný pohyb a také negenerují žádné elektrické signály v reakci na mechanickou stimulaci. Jak je známo z láčkovek, jasmonáty se mohou akumulovat také bez elektrické signalizace na základě chemických signálů pocházející z kořisti a toto by mohlo platit také u rosnolistu.

Všechny tři masožravé rostliny zahrnuté do této studie využívají pro trávení aspartát proteázu. Podle nomenklatury dle Takahashi *et al.* (2012)¹ byly nazvány sarracenciasin, cephalotusin a drosophyllumsin. Tyto proteiny stejně jako další proteiny nalezeny v masožravých rostlinách (např. chitinázy, glukánázy, ribonukleázy) spadají do skupiny od patogeneze odvozených proteinů. Což znamená, že tyto proteiny byly exaptovány od obrany rostlin pro botanickou masožravost několikrát nezávisle na sobě také ve vzdáleně příbuzných rodech masožravých rostlin. Oproti tomu je jasmonátová signalizace regulující aktivitu enzymů zapojená pouze se masožravých rostlin rodu hvozdíkotvaré.

Tato studie jasně ukázala, že ačkoli masožravé rostliny z různých evolučních linií sice kooptovaly stejné trávicí enzymy, jak ukázala studie Fukushima *et al.* (2017)², regulace jejich aktivit se výrazně liší. Přestože masožravé rostliny využívají jasmonáty pro svou odvěkou roli – obranu, exaptace jasmonátové signalizace pro botanickou masožravost se pravděpodobně vyskytla pouze jednou v nejstarší linii masožravých rostlin – hvozdíkotvaré, a poté již nikdy nebyla využita.

¹ Takahashi K, Nishii W, Shibata C. 2012. The digestive fluid of *Drosera indica* contains a cysteine endopeptidase ("Droserain") similar to dionain from *Dionaea muscipula*. *Carnivorous Plant Newsletter* 41: 132-134.

² Fukushima K, Fang X, Alvarez-Ponce D, *et al.* 2017. Genome of the pitcher plant *Cephalotus* reveals genetic changes associated with carnivory. *Nature Ecology and Evolution* 1: 1–9.

Příspěvní autorů:

Výzkum:

- příprava a odebrání materiálů: A. Pavlovič
- měření elektrických signálů: A. Pavlovič
- kvantifikace fytohormonů: J. Jakšová, O. Vrobel, P. Tarkowski
- měření enzymových aktivit: J. Jakšová
- SDS-PAGE a Western bloty: J. Jakšová

Konceptualizace: A. Pavlovič

Supervize: A. Pavlovič

Vizualizace: A. Pavlovič

Statistika: A. Pavlovič

Psaní – rukopis: A. Pavlovič

Psaní – editace: A. Pavlovič

Získání financování: A. Pavlovič

Podíl J. Jakšové: 30 %

Phylogeny of jasmonate signaling in the carnivorous plants.

Andrej Pavlovič¹, Jana Jakšová¹, Ondřej Vrobel², Peter Tarkowski²

¹ *Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, CZ-783 71, Olomouc, Czech Republic.*

² *Department*

Abstract

- The carnivorous plants in the order Nepentales co-opted jasmonate signaling from plant defence to botanical carnivory. After detection of prey, jasmonates induce expression and secretion of digestive enzymes. However, carnivorous plants have at least eleven independent origins and here we ask whether jasmonate signaling has been co-opted repeatedly in different evolutionary lineages of carnivorous plants.
- We experimentally wounded and fed the carnivorous plants (*Sarracenia purpurea*, *Cephalotus follicularis*, *Drosophyllum lusitanicum*) and we measured electrical signals, phytohormone tissue level and digestive enzymes activity. Coronatine was added exogenously to confirm role of jasmonates in induction of digestive process. Immunodetection of aspartic protease and MS analysis of digestive fluid was also performed.
- Only *D. lusitanicum* increased enzyme activities in response to prey capture and coronatine application. In *C. follicularis* the enzyme activity is constitutive, in *S. purpurea* rather regulated developmentally. Different digestive enzymes were found in its digestive fluid of *D. lusitanicum*: xxx.
- Although the carnivorous plants from different evolutionary lineages use the same digestive enzymes, the mechanism of their regulation differs. All investigated genera use jasmonates for their ancient role - defense, but the co-option of jasmonate signalling for botanical carnivory probably occurred only once in the oldest lineage of carnivorous plant – Nepentales.

Key words: aspartic protease, carnivorous plant, digestive enzymes, electrical signal, defense, jasmonic acid, phytohormone, wounding,

Introduction

Jasmonates (JAs) are important regulators in plant responses to biotic and abiotic stresses as well as in development (Wasternack and Hause, 2013). Mechanical wounding or herbivore attack is one of the most prominent examples where JAs are involved as a signal (Koo et al., 2009). The endogenous rise of JAs upon wounding or herbivore and pathogen attack is associated with the induction of synthesis of secondary metabolites and activation of defence response (Wasternack and Hause, 2013). Local wounding by herbivores leads to a burst in newly synthesized JAs not only in local leaves, but also in leaves distal to wounds activating systemic response. The signals responsible for systemic JAs accumulation in distal leaves are electrical signals (Mousavi et al., 2013), Ca^{2+} wave (Toyota et al., 2018), reactive oxygen species (ROS, Miller et al., 2009; Suzuki et al., 2013) and/or JAs themselves (Li et al. 2020), and the signals co-propagate together (Gilroy et al., 2014). All leaves that receive the signals accumulate JAs within few minutes. In the nucleus, the bioactive isoleucine conjugate of JA (JA-Ile) triggers an interaction between the CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1) receptor and members of the JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) family of repressors. COI1-mediated degradation of JAZ repressors activates reprogramming of gene expression leading to plant defence response (Chini et al. 2007, Thines et al. 2007, Fonseca et al. 2009, Sheard et al. 2010).

Jasmonate signaling is very old pathway present already in Bryophyta and first appeared in the common ancestor of extant land plants more than 450 Mya ago. Already liverwort *Marchantia polymorpha* contain all core components of the jasmonate signaling pathway (COI1, JAZ etc.) but it is not able to synthesize bioactive ligand JA-Ile known from flowering plants (Monte et al., 2018), what probably first appeared in Lycophytes (Pratiwi et al., 2017). Later jasmonate signaling pathway was also co-opted for regulation of fertility in plants (Monte et al., 2018). Thus, it can be suggested that the first flowering plants (angiosperms) dated to approx. 194 Mya surely has complete jasmonate signaling pathway as we know today from experimental model plant *Arabidopsis thaliana*.

In nutrient poor habitats, a special group of so called carnivorous plants have evolved sophisticated mechanisms how to obtain deficient nutrients in the soil from animal prey. They modified their leaves into the traps which capture animal prey by five different mechanisms: adhesive ('flypaper') traps with a sticky glandular surface; pitfall ('pitcher') traps forming a central cavity or small tanks; mobile snap-traps with rapidly closing lobes; suction ('bladder') traps actively forming negative pressure inside; and specialized eel ('lobster-pot' and 'cork-screw') traps formed by screwed, tubular leaves with a narrow cavity lined with retrorse hairs

(Adamec et al., 2021). The phylogenetically oldest lineage of carnivorous plants is Nepentales, dating back to 83-95.1 Mya (Fleischmann et al., 2018), and they surely exploited jasmonate signaling pathway for defence as we know in non-carnivorous plants (Dávila-Lara et al., 2021). Recent studies have shown that all the studied genera of carnivorous plants within the order Nepentales regardless of trapping mechanisms (adhesive traps in *Drosera*, snap-traps in *Dionaea* and *Aldrovanda*, pitfall traps in *Nepenthes*) accumulated JA and JA-Ile in response to experimental feeding. Moreover, the exogenous application of JA (or its molecular mimic coronatine) induced the carnivorous response, i.e. formation of digestive cavity, expression of digestive enzymes and transporters (Libiaková et al., 2013, Nakamura et al., 2013; Mithöfer et al., 2014; Buch et al., 2015; Yilamujiang et al., 2016; Böhm et al., 2016a,b; Krausko et al., 2017; Pavlovič et al., 2017; Jakšová et al., 2020; 2021) confirming the role of endogenous JAs in regulation of botanical carnivory. Taken into account the phylogenetic age of carnivorous plants and angiosperms, regulation of carnivory by the JAs is therefore not an ancient character, but derived from plant defence more recently in evolution. Thus, carnivorous plants co-opted pre-existing jasmonate signaling pathway from plant defence to botanical carnivory and has turned defense into offense (Pavlovič and Saganová, 2015; Bemm et al., 2016, Pavlovič and Mithöfer, 2019). However, carnivorous plants have polyfyletic origin and have evolved at least ten times independently in time span 95,1 – 1.9 Mya (Fleischmann et al., 2018) in six orders, 13 families and 20 genera (Adamec et al., 2021 and updated by the genera *Triantha*, Lin et al., 2021). All the studied genera mentioned above belong to the same oldest order: Nepentales. Only recently, it was shown that carnivorous plants from the order Lamiales (*Pinguicula*, *Utricularia*) have not co-opted jasmonate signalling pathway for regulation of digestive physiology despite using similar enzymes (Kocáb et al., 2020; Jakšová et al., 2021), indicating that JAs are not ubiquitous signaling molecules in botanical carnivory.

In this study, we investigate the function of jasmonates in botanical carnivory in three non-related order of carnivorous plants: Oxalidales (represented by *Cephalotus folicularis*), Ericales (represented by *Sarracenia purpurea* ssp. *venosa*) and Nepentales (represented by *Drosophyllum lusitanicum*) to complement the picture about involvement of JAs in botanical carnivory. The tested plants were experimentaly fed or wounded and analysed for phytohormone tissues level and enzyme activities. Coronatine, a molecular mimic of JA-Ile, was exogenously added to confirm or refuse the role of jasmonates in carnivorous response.

Material and Methods

Plant material and experimental setup

The carnivorous plants *Sarracenia purpurea* ssp. *venosa* L., *Cephalotus follicularis* Labill. and *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link (Fig. 1) growing under standard greenhouse conditions at Palacký University in Olomouc were used in our experiments. In 10 – 20 days old *S. purpurea* pitchers after opening, 6 mL of distilled water was added into the pitcher shortly before feeding, because this species is not able to secrete permanent level of digestive fluid but collect a rainfall water. In contrast, *C. follicularis* pitchers are protected by the lid, which prevents rainwater entering the pitcher, and thus diluting the digestive enzymes inside. The mature fully developed pitchers of *S. purpurea* and *C. follicularis* were fed on two pieces of meal worms (*Tenebrio molitor*). The 0.5 mL of digestive fluid was collected from the mature and fully developed pitchers before feeding (0 hour) and then after 24, 48, 96, 168 hours for enzyme assay and Western blotting. The 0.5 mL of digestive fluids were also collected from control non-fed pitchers at the same time points. In a parallel experiment with another group of plants, the lower digestive part of the pitchers, which have a contact with digestive fluid, were collected before (0 h) and 2, 24, 48 (96) hours after feeding and immediately frozen in liquid nitrogen for phytohormone analyses. The lower digestive part of control non-fed pitchers were also collected at the same time points. Because *D. lusitanicum* with its sticky leaves is specialized for smaller prey in comparison to pitcher plants, it was fed on fruit flies (*Drosophila melanogaster*). Each investigated 10 - 15 cm long sticky leaf was fed on five fruit flies. Before (0 h) and 24, 48, 96 hours after feeding three non-fed control and fed leaves were cut off using a scalpel, and the traps were submerged in 4 ml of 50 mM Na-acetate buffer solution (pH 5.0) for 3 min to collect the exudates for enzyme assay and Western blotting. In a parallel experiment with another group of plants, four leaves were collected before (0 h) and 2, 24 hours after feeding and frozen in liquid nitrogen for phytohormone analyses.

To investigate the possible role of JAs in enzyme induction, the molecular mimic of JA-Ile, coronatine was added into the pitchers *S. purpurea* and *C. follicularis* to final 100 μ M concentrations. The same volume of water was added to control pitcher to avoid dilution of enzyme in coronatine treated plants. The 0.5 mL of digestive fluid was collected at the same time points as mentioned above from coronatine-treated and control pitchers. *D. lusitanicum* was sprayed by 100 μ M coronatine and the exudate was collected by the same way as mentioned above. The potency of 100 μ M used coronatine was tested on *Drosera capensis* plants, where it induce strong leaf and tentacle bending reaction on applied as well as systemic leaves.

In wounding experiments, the pitcher plants *S. purpurea* and *C. follicularis* were ten times wounded by needle within one minute in lower digestive part of the pitchers and the same pitcher part was collected 2 h after wounding for phytohormone analyses. *D. lusitanicum* was wounded five times (because it was fed on five fruit flies in previous experiment) and the four wounded leaves were collected 2 hours after wounding for phytohormone analyses.

For testing developmental control of enzyme secretion, we monitored developing pitchers in *C. follicularis*. On the day these pitchers first opened their lids (time point 0), 100 μ L of digestive fluid was sampled and then every week for 7 weeks long period.

For testing developmental control of enzyme secretion in *S. purpurea* ...

Quantitative analysis of phytohormones

Endogenous levels of phytohormones were quantified using isotope dilution LC-MS/MS method (Ljung *et al.*, 2010). The collected plant tissues were frozen in liquid nitrogen and ground using mortar and pestle. Homogenized material was extracted and purified as described in Šimura *et al.*, (2018). Briefly, 25 mg of sample were extracted with 1 ml of ice-cold 50% acetonitrile (ACN) containing a mixture of stable isotope labeled standards. Unlabeled (SA, JA-Ile) and labeled standards ($^{13}\text{C}_6$ -IAA, D4-SA, D2-JA-Ile) were purchased from OlChemIm (Olomouc, Czech Republic), JA and D5-JA were purchased from Merck (Germany). The extraction was performed with assistance of an ice-cold ultrasonic bath for 30 min. After centrifugation (20 000 g, 15 min, 4° C) samples were purified using SPE. Waters (USA) Oasis™ HLB columns (30 mg, 1 ml cartridge) were activated by 1 ml MeOH and equilibrated by 1 ml H₂O and 1 ml of 50% ACN. During sample loading, flow-through fraction was collected and pooled with the fraction from a single washing step of 1 ml 30% ACN. Collected fractions were evaporated under vacuum. If necessary, dried samples were stored at -20 °C prior to analysis. For analysis, samples were resuspended in 40 μ l of mobile phase, filtered through 0.2 μ m microspins (Ciro; USA) and analysed by LC-(+)ESI-MS/MS in multiple reaction monitoring (MRM) mode. LC-MS/MS analysis were performed using a Nexera X2 modular liquid chromatograph system coupled to an MS-8050 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Japan) via an electrospray interface. Chromatographic separation was performed using a reverse-phase analytical column Waters CSH™ C18, 2.1 mm \times 150 mm, 1.7 μ m. The aqueous solvent A consisted of 15 mM formic acid adjusted to pH 3.0 with ammonium hydroxide. Solvent B was pure ACN. Separation was achieved with gradient elution at a flow rate of 0.4 ml/min at 40 °C. 0-1 min 20 % B; 1-11 min 80 % B linear gradient followed by washing and equilibration to initial conditions for a further 7 min. If

possible, up to 3 MRM transitions (1 quantitative, the others qualitative; Supplementary Table X) were monitored for each analyte to ensure as much confidence as possible in the correct identification of analytes in the different plant matrices. Raw data were processed via Shimadzu software LabSolutions ver. 5.97 SP1. All data were log-transformed to calculate the results. To reduce experimental biases, procedure included randomized sample list and the blinding was imposed on the analyst (OV).

Extracellular recording of electrical signals

The electrical signals were measured using non-invasive, non-polarizable Ag–AgCl surface electrodes (Scanlab Systems, Prague, Czech Republic) moistened with a drop of conductive EV gel (Hellada, Prague, Czech Republic) that is commonly used in electrocardiography inside a Faraday cage under standard laboratory conditions (room temperature of $23 \pm 1^\circ\text{C}$ and relative air humidity of $50 \pm 5\%$) according to Ilík et al. (2010). The electrode was attached to the lower external part of *S. purpurea* and *C. follicularis* pitchers in area where the pitcher is in contact with digestive fluid inside. After signal stabilization on the leaves for approximately half an hour, two mealworms were added into the pitchers or the pitcher was wounded in 1 – 2 cm distance from the recording electrode. In *S. purpurea* the 6 mL of distilled water was added few minutes before feeding. In *D. lusitanicum*, the electrode was attached to stalked tentacle gland and electrical signals were monitored in response to gentle touch as had been described for sundew plants (*Drosera* sp.) before (Williams and Pickard 1972; Krausko et al., 2017) or in response to leaf wounding 1 - 2 cm distance from the recorded tentacle. The reference electrode was sub-merged in a dish filled with 1–2 cm of water beneath the pot. The electrodes were connected to an amplifier (gain: 1–1000, noise: 2–3 mV, bandwidth (-3 dB): 10^5 Hz, response time: 10 ls, input impedance: 10^{12} Ω). The signals from the amplifier were transferred to an analogue-digital PC data converter (12-bit converter, ± 10 V, PCA-7228AL supplied by TEDIA, Plzeň, Czech Republic), and the data were collected every 30 ms. The sensitivity of the device was 13 μV .

Enzyme assay

Proteolytic activity of digestive fluid was determined by incubating 150 μL of digestive fluid with 150 μL of 2% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in 200 mM glycine-HCl (pH 3.0) at 37°C for 1 (*D. lusitanicum*) – 2 h (*C. follicularis*, *S. purpurea*). The reaction was stopped by the addition of 450 μL of 5% (w/v) trichloroacetic acid. Samples were incubated on ice for 10 min, and centrifuged at 20,000g for 10 min at 4°C . The amount of released non-TCA-precipitable peptides was used as a measure of proteolytic activity, which was determined by comparing the

absorbance of the supernatant at 280 nm with that of a blank sample with a Specord 250 Plus double-beam spectrophotometer (Analytik Jena). One unit of proteolytic activity is defined as an increase of 0.001 min^{-1} in the absorbance at 280 nm (Matušíková et al., 2005).

To measure the activity of acid phosphatases, we used chromogenic substrate 4-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich). The substrate was prepared in 50 mM (pH 5.0) acetate buffer at the concentration 5 mM. 150 μL of collected fluid was added to 400 μL of 50 mM acetate buffer (pH 5.0), and mixed with 400 μL of the substrate. For control, 400 μL of the substrate solution was mixed with 550 μL of the acetate buffer. Mixed samples were incubated at 25 °C for 1 hour, and then, 160 μL of 1.0 N NaOH were added to terminate the reaction. Absorbance was measured at 405 nm with a double-beam spectrophotometer Specord 250 Plus (Analytik Jena, Germany).

Western blotting

To detect and quantify aspartic protease and type III chitinase, polyclonal antibodies against these proteins were raised in rabbits by Genscript (Piscataway, NJ, USA). The following amino acid sequences (epitopes) were synthesized: aspartic protease, (NH₂-) SAIMDTGSDLIWTQC (-CONH₂) (based on sequences BAD07474.1, BAD07474.1, AFV26025.1, AFV26024.1 from *N. gracilis* and *N. mirabilis*) and type III chitinase (NH₂-) CWSKYDNGYSSAIKD (-CONH₂) (based on sequence ABF74624.1 from *N. rafflesiana*), respectively (Genscript, Piscataway, NJ, USA). Because we were not able to detect positive reaction for aspartic proteases despite their presence in digestive fluid in *S. purpurea* (Fukushima et al., 2017), we synthesized new epitope based on the sequence of aspartic protease (BAW35441.1) directly from *S. purpurea ssp. venosa*: (NH₂-) QQDPTFDPSKSTTC (-CONH₂) (Genscript, Piscataway, NJ, USA). All sequences were coupled to a carrier protein (keyhole limpet haemocyanin, KLH) and injected into two rabbits each. The terminal cysteine of the peptide was used for conjugation. The rabbit serum was analysed for the presence of antigen-specific antibodies using an ELISA test.

The digestive fluid collected for the enzyme assays was subjected to Western blotting. The samples were heated and denatured for 30 min at 70°C and mixed with modified Laemmli sample buffer to a final concentration of 50mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 1% β -mercaptoethanol, 12.5mM EDTA, and 0.02% bromophenol blue. The same volume of digestive fluid was electrophoresed in 10% (v/v) SDS polyacrylamide gel (Schägger, 2006). The proteins in the gels were either visualized by silver staining (ProteoSilver; Sigma Aldrich)

or transferred from the gel to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad) using a Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). After blocking in TBS-T containing 5% BSA overnight, the membranes were incubated with the primary antibody for 1 h at room temperature, and after washing, the membrane was incubated with the secondary antibody: the goat antirabbit IgG (H + L)-horseradish peroxidase conjugate (Bio-Rad). Blots were visualized and chemiluminescence was quantified by an Amersham Imager 600 gel scanner (GE HealthCare Life Sciences, Tokyo, Japan).

Results

Electrical signals

In contrast to *C. follicularis*, *S. purpurea* does not produce significant level of digestive fluid and relies on collecting of rain water. For this purpose, *S. purpurea* lacks pitcher lid in contrast to majority of pitcher plants, where the lid prevents dilution of digestive fluid by rain (Fig. 1a). Adding the distilled water into *S. purpurea* pitcher resulted in fast hyperpolarization of membrane potential (negative voltage shift recorded extracellularly, representing intracellular depolarization). When the prey was added few minutes later, the membrane potential repolarized or even hyperpolarized (positive voltage shift recorded extracellularly, representing intracellular hyperpolarization, Fig. 2a). The pitcher of *S. purpurea* did not generate electrical signals in response to wounding regularly, the weak hyperpolarization (negative voltage shift recorded extracellularly, representing intracellular depolarization) was recorded only occasionally and resemble typical action potential (AP, Fig. 2a). No changes of membrane potential were recorded in pitcher of *C. follicularis* (Fig. 2b) in response to prey addition but wounding generated hyperpolarization of membrane potential (negative voltage shift recorded extracellularly, representing intracellular depolarization) representing typical variation potential (VP, Fig. 2b). The tentacles of *D. lusitanicum* (Fig. 1c) generated weak depolarization in response to touch stimuli, but the probability that this is an artefact of recording cannot be excluded. No typical APs, as had been documented in tentacles of sundew plants before (*Drosera* spp., Williams and Pickard, 1972; Krausko et al., 2017), were found. Typical VP was triggered in tentacle in response to leaf wounding (Fig. 2c).

Phytohormone accumulation

The pitcher plants *S. purpurea* and *C. follicularis* did not accumulate significant level of JA and JA-Ile in response to feeding in contrast to *D. lusitanicum* (Fig. 3a-f). But two hours after wounding, the level of JA and JA-Ile significantly increased in all studied plants, documenting

the ability of carnivorous plants synthesize JAs in response to damaging stimuli as is well known in non-carnivorous plants (Fig. 3a-f). The other stress-related hormones, ABA and SA, were not significantly increased in response to feeding or wounding (Fig. 3g-l). Only the content of ABA was significantly decreased 2 hours after wounding in *D. lusitanicum*, and 48 hours after feeding in *C. follicularis* (Fig. 3h,i).

Enzyme activities

The overall proteolytic activity was significantly higher in fed *S. purpurea* pitchers in comparison to control (Fig. 4a). In *C. follicularis*, the proteolytic activity was constitutive (Fig. 4b). In *D. lusitanicum* proteolytic activity significantly increased in response to feeding (Fig. 4c). In *S. purpurea*, phosphatase activity in digestive fluid increased over time in both control as well as fed pitchers without significant differences (Fig. S1a). In *C. follicularis* the phosphatase activity was constitutive without any effect of prey addition on the enzyme activities (Fig. S1b). In *D. lusitanicum* the activity significantly increased in response to feeding (Fig. S1c).

To reveal regulatory role of jasmonates in enzyme activities, 100 μ M coronatine (a molecular agonist of JA-Ile) was applied exogenously and the enzyme activities were measured. As expected from phytohormone tissue level, the strong induction of proteolytic and phosphatase activities were detected only in *D. lusitanicum* (Fig. 4f, Fig S1f). The coronatine also enhanced secretion of sticky mucilage in *D. lusitanicum* what was observable by our own eyes. The pitcher plants *S. purpurea* and *C. follicularis* did not increase enzyme activities (Fig. 4d,e, Fig. S1d,e) but the traps of *C. follicularis*, in which the coronatine was applied, got red 20 days after its application. These traps contained significantly less chlorophyll *a* + *b* and accumulated increased concentration of anthocyanins (Fig. S2).

Western blotting

In *S. purpurea*, the initial concentration of aspartic protease saracenciasin was extremely variable among different pitchers. Overall, the concentration of saracenciasin in digestive fluid increased over time regardless of pitcher feeding status (Fig. 5a). On the other hand, the aspartic protease cephalotusin was constitutively present in digestive fluid of control as well as fed pitchers in *C. follicularis* (Fig. 5b). The enzyme is present in high abundance already in freshly open pitchers and decreased over time (Fig. S3). In contrast, aspartic protease drosophyllumsin in *D. lusitanicum* was clearly upregulated in response to feeding (Fig. 5c).

In coronatine treated traps, the clear upregulation of aspartic protease was detected only in the case of *D. lusitanicum* (Fig. 6c). The abundance of aspartic proteases in digestive fluids is in accordance with the measurements of proteolytic activity (Fig. 4f).

Among the other antibodies available from our previous studies on carnivorous plants we were successful in immunodetection of type III chitinase in *S. purpurea*. The amount of chitinase III enzyme in digestive fluid increased over time in both control as well as fed pitchers (Fig. S4), however this upward trend was significantly reduced when coronatine was added into the digestive fluid (Fig. S5).

Discussion

In this study, we investigated the regulatory role of jasmonates on enzyme activities in three distantly related taxa of carnivorous plants. The role of jasmonates in regulation of enzyme secretion has been confirmed in four taxa of carnivorous plants (*Aldrovanda*, *Dionaea*, *Drosera*, *Nepenthes*), which are all related and belong to the same order Nepenthales (Libiaková et al., 2013; Nakamura et al., 2013; Mithöfer et al., 2014; Buch et al., 2015; Yilamujiang et al., 2016; Böhm et al., 2016a,b; Krausko et al., 2017; Pavlovič et al., 2017; Jakšová et al., 2020; 2021). In this study, we were interested in, whether jasmonate signaling regulates enzyme activities outside the order Nepenthales.

First, we investigated species *S. purpurea* ssp. *venosa*. The data about ability of *S. purpurea* produce endogenous plant-derived enzymes are contradictory. Some studies showed that the pitchers have no ability produce plant-derived enzymes (Koller-Peroutka et al., 2019). Some others showed that the plant secretes limited amount of digestive enzymes into pitcher fluid but with primary role of microbes in the digestion of prey (Luciano and Newell 2017; Young et al., 2018). Recently, Fukushima et al. (2017) unequivocally confirmed presence of plant-derived enzymes in the digestive fluid of *S. purpurea* and our data are in agreement with their findings. The plant produces only a few droplets of digestive fluid and due to the absence of pitcher lid, typical pitchers may contain up to 30 mL of rainwater (Adlassnig et al., 2011). Thus, the enzymes are strongly diluted in nature, what hampered their identification using less sensitive methods (Koller-Peroutka et al., 2019), and digestion is taken over by microorganisms living in these phytotelmata-like traps. We did not observe stimulation of phosphatase, but proteolytic activity in response to feeding in accordance with the study of Young et al. (2018). Another studies showed stimulation of both enzyme activities in response to prey or protein additions (Gallie and Chang 1999; Luciano and Newell, 2017). However, there is a clear trend

toward increased enzyme activities and abundance of aspartic protease and chitinase III after addition of distilled water into the trap over time in control as well as fed traps. This agrees with previous studies which documented that enzyme activities in *S. purpurea* are first rather developmentally regulated and only later are responsive to chemical stimuli from prey (Gallie and Chang, 1999; Luciano and Newell, 2017). The addition of water (or rain in nature) into freshly open pitcher may also act as stimulus although this probability was refuted by Gallie and Chang (1999) in their experiments. Based on these and our studies, we can conclude that young *S. purpurea* pitchers exhibit weak stimulation of enzyme activity in response to prey addition, but the jasmonates are not involved in signaling.

In contrast to situation in *S. purpurea*, even closed immature traps of *C. follicularis* already contain stable level of plant-derived fluid with digestive enzymes (Adlassnig et al., 2011; Takahashi et al., 2009; Fukushima et al., 2017). The pitchers are covered by the lid protecting the digestive fluid against enzyme dilution. Indeed, comparing the enzyme activities between *S. purpurea* and *C. follicularis* confirmed strongly diluted fluid and enzymes in the former. The enzyme activities and abundance of aspartic protease cephalotusin in the pitcher fluid did not respond to prey addition, indicating that the enzyme activity is constitutive. The jasmonates did not accumulate and external application of coronatine had no effect on enzyme activities and abundance of cephalotusin. In accordance with our study, Nishimura et al. (2013) reported constitutive expression of S-like RNase in *C. follicularis* in contrast to its induced expression in *D. muscipula*. In this view, the traps of *C. follicularis* are completely passive *sensu stricto*. We observed that coronatine treated pitchers turned red after two weeks, indicating jasmonate-mediated accumulation of anthocyanins in *C. follicularis*. Jasmonate-induced accumulation of anthocyanins in non-carnivorous plants has already been described (Shan et al., 2009; An et al., 2021).

The situation in *D. lusitanicum* is completely different in comparison to the studied pitcher plants. We showed clear induction of enzyme activities and enzyme abundance indicating stimulatory mode of secretion regulated by jasmonates, as is known in *Drosera* and *Dionaea* plants (Krausko et al., 2017; Pavlovič et al., 2017). However, in contrast to these plants, tentacles and leaf traps of *D. lusitanicum* are not capable of any movement and are not able to generate any APs in response to mechanical stimulation in contrast to sundew plants (Williams and Pickard, 1976; Krausko et al., 2017). Although there is a clear connection between fast electrical signals (i.e. APs and VPs) and jasmonate accumulation in non-carnivorous (Mousavi et al. 2013; Farmer et al., 2020) as well as in carnivorous plants (Krausko

et al., 2017; Pavlovič et al., 2017), the jasmonates can accumulate also without fast electrical signaling in passive pitcher traps of *Nepenthes* (Yilamujiang et al., 2016). Recent study has shown that chemical signals from prey (chitin and protein) are more important for stable and high accumulation of jasmonates and digestive enzymes in *Dionaea* than mechanical stimuli alone (Jakšová et al., 2020). Similarly, *D. lusitanicum* may respond mainly to chemical stimuli from insect prey. In accordance with our study, the ultrastructural study on digestive glands of *D. lusitanicum* showed increased surface density of rough endoplasmic reticulum as well as number of Golgi stacks after stimulation indicating sharp rise in the rate of synthesis and secretion of digestive enzymes after stimulation (Vassilyev 2005).

All three investigated genera of carnivorous plants in this study use aspartic protease for protein digestion. According to Takahashii et al. (2012) nomenclature, we called them sarraceniain, cephalotusin and drosophyllumsin. The aspartic proteases are used for protein digestion also by the genera *Drosera*, *Dionaea*, *Nepenthes* and *Pinguicula* (Athauda et al., 2004; Schulze et al., 2012; Krausko et al., 2017; Kocáb et al., 2020). Together with other digestive enzymes found in carnivorous plants (i.e. chitinases, glucanases, ribonucleases), they belong to the group of pathogenesis-related (PR) proteins (Mithöfer, 2011). They were co-opted from plant defence to botanical carnivory several times independently in distantly related genera of carnivorous plants, in contrast to jasmonate signalling regulating their activity only in Nepenthales.

Figure 7 shows involvement of jasmonates in botanical carnivory from the phylogenetic point of view. Although jasmonate signaling in carnivorous plants has been studied only in 9 out of 20 genera of carnivorous plants so far, it is clearly seen that jasmonates have been co-opted for botanical carnivory only in the order Nepenthales. Carnivory arose more recently and four times independently in monocots in orders Poales (genera *Catopsis*, *Brocchinia*, *Paepalanthus*) and Alismatales (genus *Triantha*, Lin et al., 2021), however we still don't have experimental evidence that these plants anyway use endogenous digestive enzymes for prey digestion. Instead, as in the case of other plant phytotelmata (except *Triantha*), they probably rely on symbiotic microorganisms (Adlassnig et al., 2011). Another genus of carnivorous plant which does not produce digestive enzymes is *Roridula* (Ellis and Midgley 1996; Plachno et al., 2009). Two species of carnivorous *Roridula* in the genus *Ericales* rely on symbiotic bugs of the genus *Pameridea*, which consume prey captured by sticky resin mucilage of the plant and the plant absorbs nitrogen from the liquid hemipteran faeces directly through the cuticle (Anderson et al., 2005). Thus, it is unlikely that these genera have co-opted

jasmonates for regulation of something what they do not produce indeed. The endogenous enzyme secretion was dubious also in the genera *Darlingtonia* and *Heliamphora* but we can not completely rule it out as some studies indicates (Jaffe et al., 1992; Koller-Peroutka et al., 2019) and deserve our further attention. But because the sister *Sarracenia* does not use jasmonates for enzyme regulation it is also highly likely the same for *Darlingtonia* and *Heliamphora*. The underground traps of *Genlisea* complicate rigorous controlled feeding experiments. It is also still not clear if *Genlisea* produces its own endogenous digestive enzymes or relies on symbiotic microorganisms. The sister taxa *Utricularia* and *Pinguicula* produce endogenous enzymes, however do not use jasmonates for their induction (Kocáb et al., 2020; Jakšová et al., 2021). Due to their rarity, two genera of carnivorous plant within Lamiales with independent origin of carnivory, *Byblis* and *Philcoxia* remain also totally unexplored group of carnivorous plants in the view of digestive physiology. It was suggested that *Byblis* resembles *Roridula* and relies on digestive mutualisms (Ellis and Midgley 1996), however Takahashii et al. (2009) mentioned unpublished results about protease activity in *Byblis liniflora* what makes *Byblis* an interesting object for the further investigation.

Taken into account that carnivory in Nepenthales (including families Droseraceae, Nepenthaceae, Drosophyllaceae and Dioncophyllaceae) has evolved only once (Fleischmann et al., 2018), it is tempting to assume that jasmonate signaling for botanical carnivory has been co-opted also only once in the last common ancestor before 85.6 Mya. However monophyletic origin of carnivorous plants within Nepenthales have recently been questioned by Palfalvi et al. (2020) based on genomic studies within Droseraceae and transcriptomic data for *Nepenthes alata*. They suggested that co-option of JA signaling for botanical carnivory has evolved in most recent common ancestor of Droseraceae (including genera *Drosera*, *Dionaea* and *Aldrovanda*). However our biochemical data clearly showed that monotypic family Drosophyllaceae including *D. lusitanicum*, uses jasmonate signalling for botanical carnivory. Also previous studies on *Nepenthes* showed involvement of jasmonates in botanical carnivory in the family Nepenthaceae (Buch et al., 2015, Yilmujiang et al., 2016). Although the possibility, that jasmonate signalling has been co-opted three times independently in families Droseraceae, Nepenthaceae and Drosophyllaceae cannot be completely ruled out, we consider this scenario as unlikely with an unnecessary complexity. This can be supported also by the fact that no other phylogenetic lineage of carnivorous plants investigated so far co-opted jasmonates for botanical carnivory. To complement the picture about jasmonate signalling in Nepenthales it remains to investigate the monotypic genus *Triphyphyllum* (family Dioncophyllaceae)

including *T. peltatum*. However this plant is extremely rare in nature and is under-represented in private and scientific collections of carnivorous plants. Moreover it produce only few (3) carnivorous leaves with mucilage secretion resembling *Drosophyllum* only during a short part of its juvenile phase and were not frequently observed (Green et al., 1979; Rembold et al., 2010) what hampers serious experimental investigation. The part-time carnivorous *T. peltatum* might be in evolutionary transition away from carnivory, because consecutive sisters *Habropetalum* and *Dioncophyllum* within Dioncophyllaceae are non-carnivorous (Rembold et al., 2010). *T. peltatum* remains an interesting object for investigation of jasmonate signalling in carnivorous plants.

Our study clearly showed that although carnivorous plants from different evolutionary lineages co-opted the same digestive enzymes (Fukushima et al., 2017), the regulation of their activities strongly differs. Although the carnivorous plants use jasmonates for their ancient role - defense, the co-option of jasmonate signalling for botanical carnivory probably occurred only once in the oldest lineage of carnivorous plant – Nepenthales and was never recruited again. Our experimental data are in agreement with the genome studies, where expansions of genes families involved in JA signalling were documented in Droseraceae, but not in *Cephalotus*, and even contraction was documented in aquatic *Utricularia* (Fukushima et al., 2017; Sun et al., 2018; Palfalvi et al., 2020). Thus, the constraints on the available routes to evolve plant carnivory are less than was previously thought.

References

- Adamec L, Matušíková I, Pavlovič A. 2021.** Recent ecophysiological, biochemical and evolutionary insights into plant carnivory. *Ann. Bot.* 128: 241-259.
- Adlassnig W, Peroutka M, Lendl T. 2011.** Traps of carnivorous pitcher plants as a habitat: composition of the fluid, biodiversity and mutualistic activities. *Ann. Bot.* 107: 181–194.
- An J-P, Xu R-R, Liu X, Zhang J-C, Wang X-F, You C-X, Hao Y-J. 2021.** Jasmonate induces biosynthesis of anthocyanin and proanthocyanidin in apple by mediating the JAZ1–TRB1–MYB9 complex. *Plant Journal* 106: 1414-1430.
- Anderson B. 2005.** Adaptations to foliar absorption of faeces: a pathway in plant carnivory. *Ann. Bot.* 95: 757–761.
- Athauda SB, Matsumoto K, Rajapakshe S, et al. 2004.** Enzymic and structural characterization of nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases. *Biochemical Journal* 381, 295–306.
- Bemm F, Becker D, Larisch C, et al. 2016.** Venus flytrap carnivorous lifestyle builds on herbivore defense strategies. *Genome Research* 26: 812–825.
- Böhm J, Scherzer S, Król E, et al. 2016a.** The Venus flytrap *Dionaea muscipula* counts prey-induced action potentials to induce sodium uptake. *Current Biology* 26: 286–295.
- Böhm J, Scherzer S, Shabala S, et al. 2016b.** Venus flytrap HKT1-type channel provides for prey sodium uptake into carnivorous plant without conflicting with electrical excitability. *Molecular Plant* 9: 428–436.
- Buch F, Kaman WE, Bikker FJ, Yilamujiang A, Mithöfer A. 2015.** Nepenthesin protease activity indicates digestive fluid dynamics in carnivorous *Nepenthes* plants. *PLoS One* 10: e0118853.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., et al., 2007.** The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448, 666–671.
- Dávila-Lara A, Rahman-Soad A, Reichelt M, Mithöfer A. 2021.** Carnivorous *Nepenthes x ventrata* plants use a naphthoquinone as phytoanticipin against herbivory. *PLoS One* 16 :e0258235.
- Ellis AG, Midgley JJ. 1996.** A new plant-animal mutualism involving a plant with sticky leaves and a resident hemipteran insect. *Oecologia* 106: 478–481.
- Farmer EE, Gao Y-Q, Lenzoni G, Wolfender J-C, Wu Q. 2020.** Wound- and mechanostimulated electrical signals control hormone responses. *New Phytol.* 227: 1037–1050.
- Fleischmann A, Schlauer J, Smith SA, Givnish TJ. 2018.** Evolution of carnivory in angiosperms. In: Ellison AM, Adamec L, eds. *Carnivorous plants: physiology, ecology, and evolution*. Oxford: Oxford University Press, 23–41.
- 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. *Nat. Chem. Biol.* 5, 344–350.
- Fukushima K, Fang X, Alvarez-Ponce D, et al. 2017.** Genome of the pitcher plant *Cephalotus* reveals genetic changes associated with carnivory. *Nature Ecology & Evolution* 1: e0059.

- Jaffe K, Michelangeli F, Gonzalez JM, Miras B, Ruiz MC. 1996.** Carnivory in pitcher plants of the genus *Heliamphora* (Sarraceniaceae). *New Phytol.* 122: 733-744.
- Gallie DR, Chang SC. 1997.** Signal transduction in the carnivorous plant *Sarracenia purpurea*. Regulation of secretory hydrolase expression during development and in response to resources. *Plant Physiology* 115, 1461–1471.
- Gilroy S, Suzuki N, Miller G, Choi WG, Toyota M, Devireddy AR, Mittler R. 2014.** A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends in Plant Science* 19, 623–630.
- Green S, Green TL, Heslop-Harrison Y. 1979.** Seasonal heterophylly and leaf gland features in *Triphyophyllum* (Dioncophyllaceae), a new carnivorous plant genus. *Bot. J. Linn. Soc.* 78: 99-116.
- 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. *Biol. Plantarum* 54, 185–190.
- 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.
- Jakšová J, Novák O, Adamec L, Pavlovič A. 2021.** Contrasting effect of prey capture on jasmonate accumulation in two genera of aquatic carnivorous plants (*Aldrovanda*, *Utricularia*). *Plant Physiology and Biochemistry* 166: 459–465.
- Koo, A.J.K., Gao, X., Jones, A.D., Howe, A.G., 2009.** A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *Plant J.* 59, 974–986.
- Kocáb O, Jakšová J, Novák O, et al. 2020.** Jasmonate-independent regulation of digestive enzyme activity in the carnivorous butterwort *Pinguicula × Tina*. *Journal of Experimental Botany* 71: 3749–3758.
- Koller-Peroutka M, Krammer S, Pavlik A, Edlinger M, Lang I, Adlassnig W. 2019.** Endocytosis and digestion in carnivorous pitcher plants of the family Sarraceniaceae. *Plants* 8: 367.
- Krausko M, Perutka Z, Šebela M, et al. 2017.** The role of electrical and jasmonate signalling in the recognition of captured prey in the carnivorous sundew plant *Drosera capensis*. *New Phytologist* 213: 1818–1835.
- Li, M., Wang, F., Li, S., Yu, G., Wang, L., Li, Q., Zhu, X., Li, Z., Yuan, L., Liu, P., 2020.** Importers drive leaf-to-leaf jasmonic acid transmission in wound-induced systemic immunity. *Mol. Plant* 13, 1485–1498.
- Lin Q, Ané C, Givnish TJ, Graham SW. 2021.** A new carnivorous plant lineage (*Triantha*) with a unique sticky-inflorescence trap. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 118 :e2022724118.
- Libiaková M, Floková K, Novák O, Slováková L, 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: e104424.
- Ljung K, Sandberg G, Moritz T. 2010.** Methods of plant hormone analysis. In: Davies PJ. (ed.) *Plant Hormones*, Springer, pp. 717-740.
- Luciano CS, Newell SJ. 2017.** Effects of prey, pitcher age, and microbes on acid phosphatase activity in fluid from pitchers of *Sarracenia purpurea* (Sarraceniaceae). *PLoS One* 12 :e0181252.

- Matušiková I, Salaj J, Moravčíková J, Mlynárová L, Nap JP, Libantová J. 2005.** Tentacles of in vitro-grown round-leaf sundew (*Drosera rotundifolia* L.) show induction of chitinase activity upon mimicking the presence of prey. *Planta* 222: 1020–1027.
- Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shualev V, Dangl JL, Mittler R. 2009.** The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling* 2:p.ra45.
- Mithöfer A. 2011.** Carnivorous pitcher plants: insights in an old topic. *Phytochemistry* 72:1678-1682.
- Mithöfer A, Reichelt M, Nakamura Y. 2014.** Wound and insect-induced jasmonate accumulation in carnivorous *Drosera capensis*: two sides of the same coin. *Plant Biology* 5: 982–987.
- Monte I, Ishida S, Zammareño AM. 2018.** Ligand-receptor co-evolution shaped the jasmonate pathway in land plants. *Nat. Chem. Biol.* 14: 480–488.
- Mousavi SA, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S, Farmer EE. 2013.** Glutamate receptor-like genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* 500, 422–426.
- Nakamura Y, Reichelt M, Mayer VE, Mithöfer A. 2013.** Jasmonates trigger prey-induced formation of ‘outer stomach’ in carnivorous sundew plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: e20130228-28.
- Nishimura E, Kawahara M, Kodaira R, et al. 2013.** S-like ribonuclease gene expression in carnivorous plants. *Planta* 238: 955–967.
- Palfalvi G, Hackl T, Terhoeven N, et al. 2020.** Genomes of the Venus flytrap and close relatives unveil the roots of plant carnivory. *Current Biology* 30: 2312–2320.
- 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.
- Pavlovič A, Mithöfer A. 2019.** Jasmonate signalling in carnivorous plants: copycat of plant defence mechanisms. *Journal of Experimental Botany* 70: 3379–3389.
- Pavlovič A, Saganová M. 2015.** A novel insight into the cost–benefit model for the evolution of botanical carnivory. *Annals of Botany* 115: 1075–1092.
- Plachno B, Adamec L, Huet H. 2009.** Mineral nutrient uptake from prey and glandular phosphatase activity as a dual test of carnivory in semi-desert plants with glandular leaves suspected of carnivory. *Ann. Bot.* 104: 649–654.
- Pratiwi, P, Tanaka G, Takahashi T, Xie X, Yoneyama K, Matsuura H, Takahashi K. 2017.** Identification of jasmonic acid and jasmonoyl-isoleucine, and characterization of AOS, AOC, OPR and JAR1 in the model lycophyte *Selaginella moellendorffii*. *Plant Cell Physiol.* 58, 789–801.
- Rembold K, Irmer A, Poppinga S, Rischer H, Bringmann G. 2010.** Propagation of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae) and observations on its carnivory. *Carnivorous Plant Newsletter* 39: 71-77.
- Schulze WX, Sanggaard KW, Kreuzer I, et al. 2012.** The protein composition of the digestive fluid from the venus flytrap sheds light on prey digestion mechanisms. *Molecular & Cellular Proteomics* 11, 1306–1319.

- Shan X, Zhang Y, Peng W, Wang Z, Xie D. 2009.** Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 60:3849-3860.
- Sheard, L.B., Tan, X., Mao, H., et al., 2010.** Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1–JAZ co-receptor. *Nature* 468, 400–405.
- Sun G, Xu Y, Liu H, et al., 2018.** Large-scale gene losses underlie the genome evolution of parasitic plant *Cuscuta australis*. *Nature Comm.* 9, 2683.
- Suzuki N, Miller G, Salazar C, et al. 2013.** Temporal–spatial interaction between reactive oxygen species and abscisic acid regulates rapid systemic acclimation in plants. *The Plant Cell* 25, 3553–3569.
- Šimura J, Antoniadi I, Široká J, Tarkowská D, Strnad M, Ljung K, Novák O. 2018.** Plant hormonomics: Multiple phytohormone profiling by targeted metabolomics.
- Takahashi K, Matsumoto K, Nishii W, Muramatsu M, Kubota K, Shibata C, Athauda SBP. 2009.** Comparative studies on the acid proteinase activities in the digestive fluids of *Nepenthes*, *Cephalotus*, *Dionaea*, and *Drosera*. *Carnivorous Plant Newsletter* 38: 75-82.
- Takahashi K, Nishii W, Shibata C. 2012.** The digestive fluid of *Drosera indica* contains a cysteine endopeptidase (“Droserain”) similar to dionain from *Dionaea muscipula*. *Carnivorous Plant Newsletter* 41: 132-134.
- 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 SCFCOI1 complex during jasmonate signalling. *Nature* 448, 661–665.
- 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 signaling. *Science* 361, 1112–1115.
- Young EB, Sielicki J, Grothjan JJ. 2018.** Regulation of hydrolytic enzyme activity in aquatic microbial communities hosted by carnivorous pitcher plants. *Microb. Ecol.* 76 :885-898.
- Vassilyev AE. 2005.** Dynamics of ultrastructural characters of *Drosophyllum lusitanicum* Link (Droseraceae) digestive glands during maturation and after stimulation. *Taiwania* 50: 167-182.
- Wasternack, C., Hause, B. 2013.** Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review. *Annals of Botany.* *Ann. Bot.* 111, 1021–1058.
- Williams SE. 1976.** Comparative sensory physiology of the Droseraceae – the evolution of a plant sensory system. *Proceedings of the American Philosophical Society* 2: 187-204.
- Williams SE, Pickard BG. 1972.** Properties of action potentials in *Drosera* tentacles. *Planta* 103: 222–240.
- Yilamujiang A, Reichelt M, Mithöfer A. 2016.** Slow food: insect prey and chitin induce phytohormone accumulation and gene expression in carnivorous *Nepenthes* plants. *Annals of Botany* 118: 369–375.

Figure legends

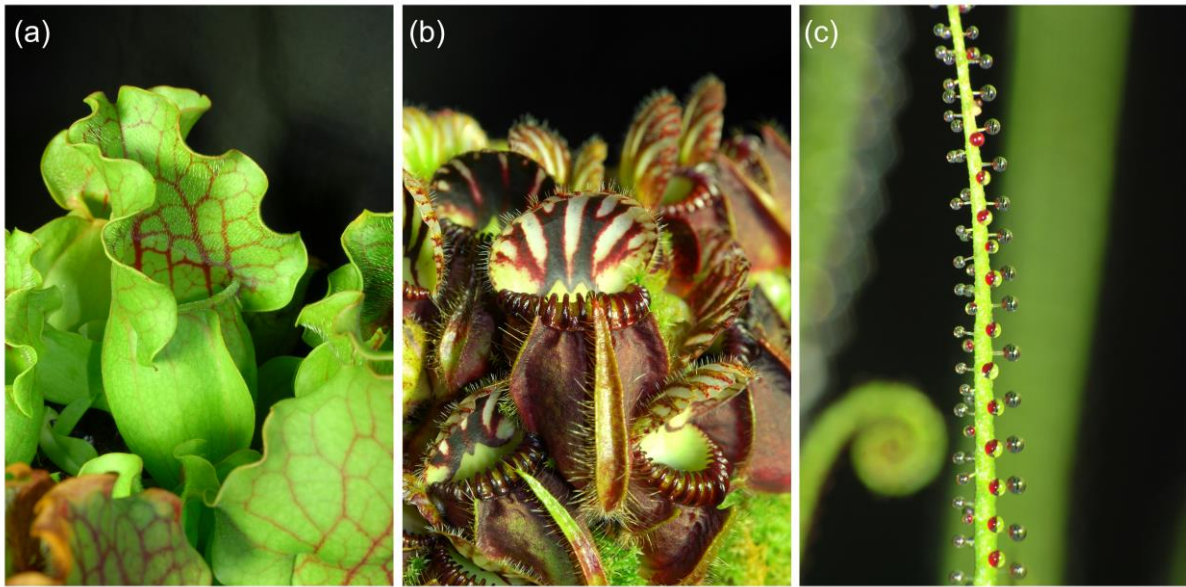


Fig. 1 Experimental plants. (a) *Sarracenia purpurea* ssp. *venosa*. (b) *Cephalotus follicularis*. (c) *Drosophyllum lusitanicum*.

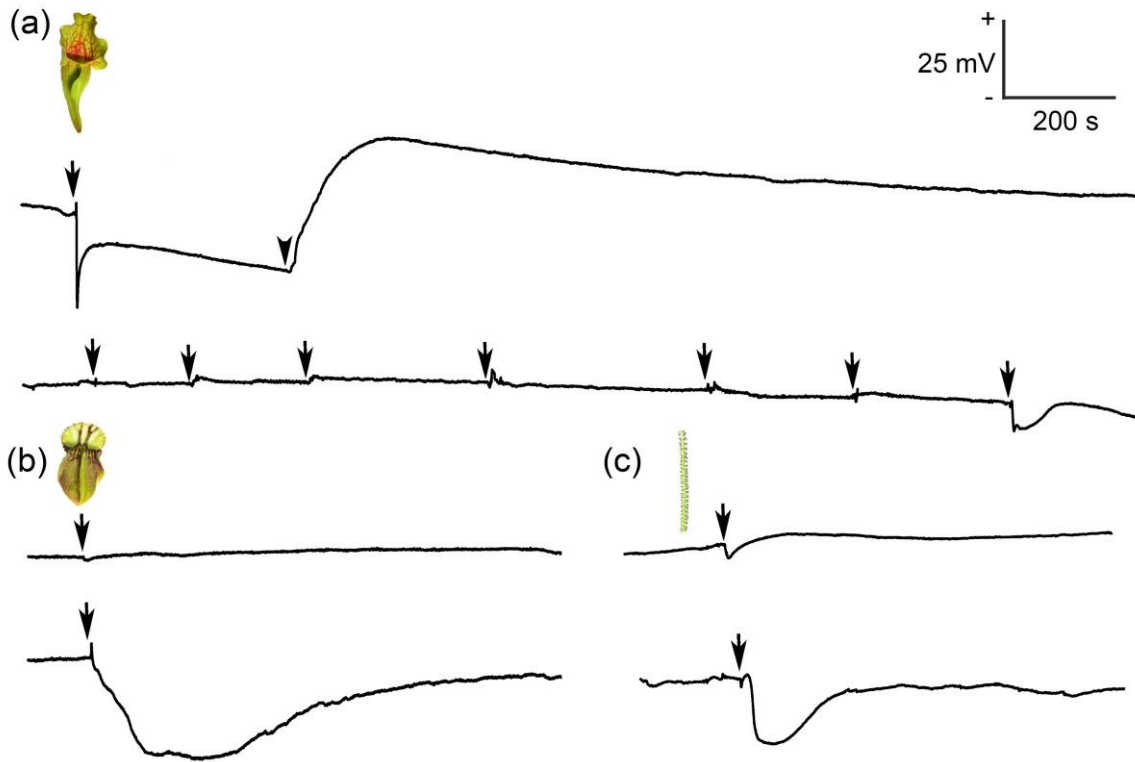


Fig. 2. Extracellular recording of electrical signals. (a) Changes of membrane potential in response to water addition (arrow, upper trace), prey (arrowhead, upper trace) and repeated wounding with needle 1-2 cm distance from recording electrode (arrows, lower trace) in the pitcher of *Sarracenia purpurea*. (b) Recording of membrane potential in response to prey addition (arrow, upper trace) or wounding 1-2 cm distance from recording electrode (arrow, lower trace) in *Cephalotus follicularis*. (c) Recording of membrane potential from tentacle of *Drosophyllum lusitanicum* in response to mechanical contact (arrow, upper trace) or wounding of leaf 1 - 2 cm distance from the recorded tentacle (arrow, lower trace).

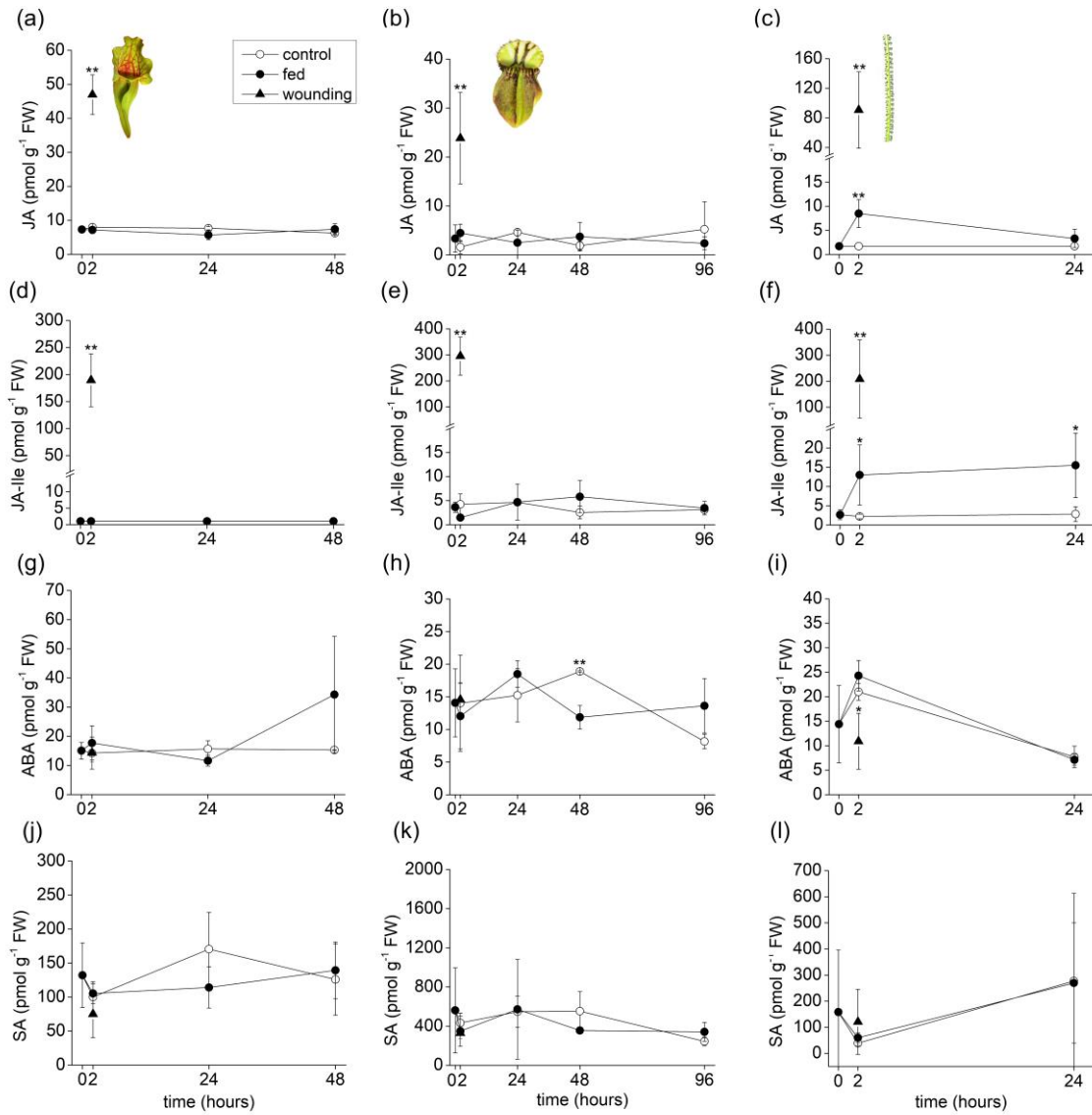


Fig. 3 Phytohormone accumulation in response to feeding and wounding. (a-c) Jasmonic acid (JA); (d-f); isoleucine conjugate of jasmonic acid (JA-Ile); (g-i) abscisic acid (ABA); (j-l) salicylic acid (SA). (a,d,g,j) *Sarracenia purpurea* ssp. *venosa*; (b,e,h,k) *Cephalotus follicularis*; (c,f,i,l) *Drosophyllum lusitanicum*. Control plants (open circles), fed plants (closed circles), wounded plants (closed triangles). Significant differences (Student's t-test) between the control and treated samples at the same time points are indicated at P < 0.05 (*) and P < 0.01 (**). Means \pm S.D., n = 4.

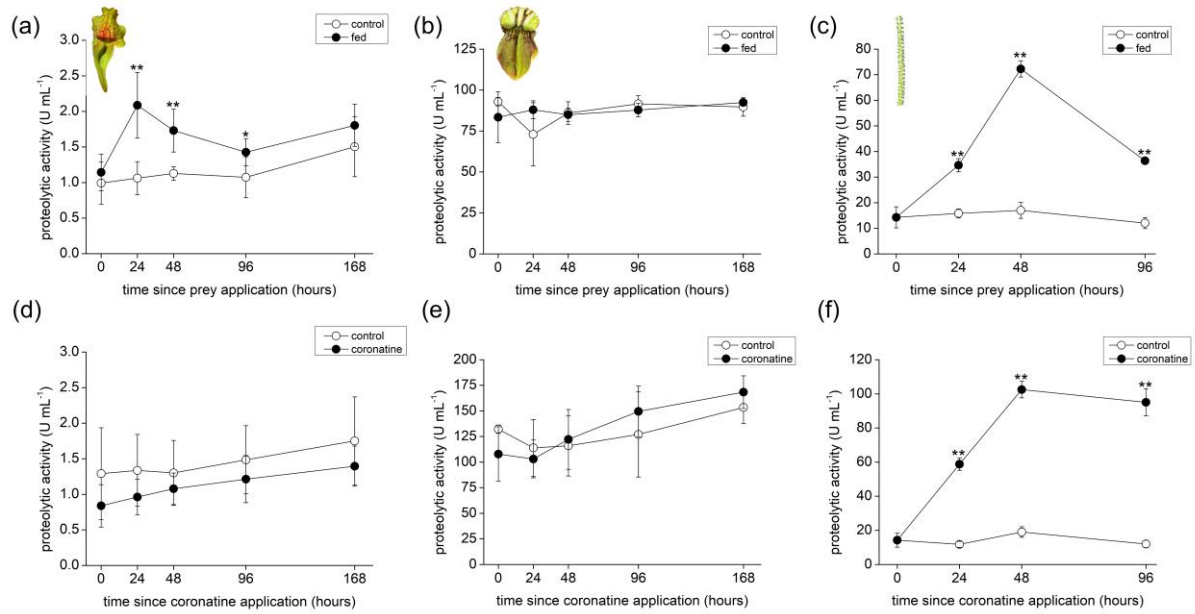


Fig. 4 Proteolytic activities in digestive fluid of carnivorous plants. (a-c) feeding with insect prey; (d-f) coronatine application. (a,d) *Sarracenia purpurea* ssp. *venosa*; (b,e) *Cephalotus follicularis*; (c,f) *Drosophyllum lusitanicum*. Means \pm S.D., n = 4. Significant differences (Student's *t*-test) between the control and treated samples at the same time point are indicated, which appeared at $P < 0.05$ (*) and $P < 0.01$ (**).

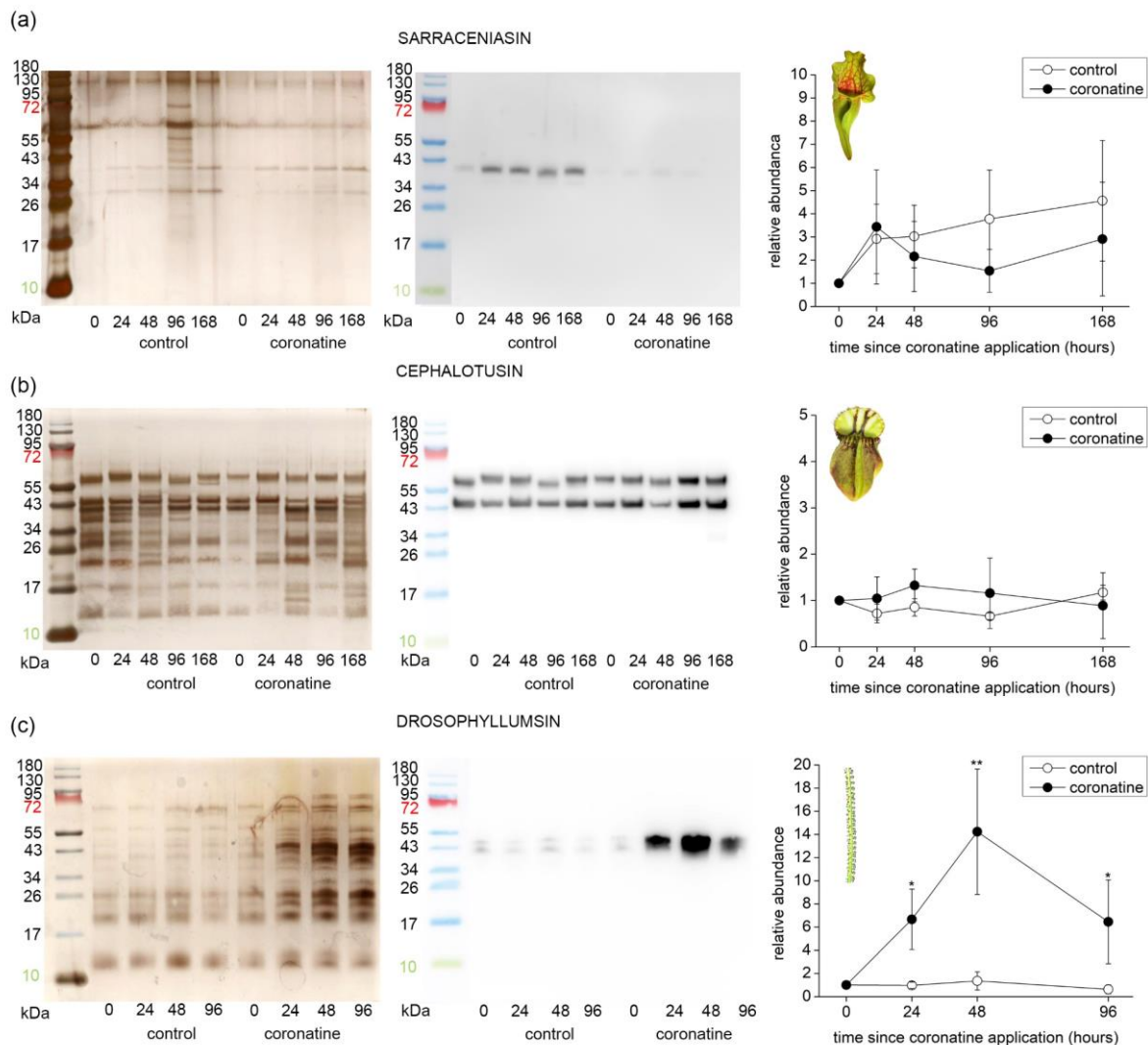


Fig. 5 Immunodetection of aspartic protease in digestive fluid in response to feeding. (a) *Sarracenia purpurea* ssp. *venosa*; (b) *Cephalotus follicularis*; (c) *Drosophyllum lusitanicum*. The proteins were separated in 10% (v/v) sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and silver stained (on the left) or subjected to Western blot analysis (in the middle) and the chemiluminescence signal intensity was quantified (on the right). Signal intensity at zero time point was set up as 1. Means \pm S.D., $n = 4$. Significant differences (Student’s t-test) between the control and treated samples at the same time point are indicated, which appeared at $P < 0.05$ (*) and $P < 0.01$ (**). Protein marker in the picture of immunodetected protein was added manually based on merged image from gel scanner.

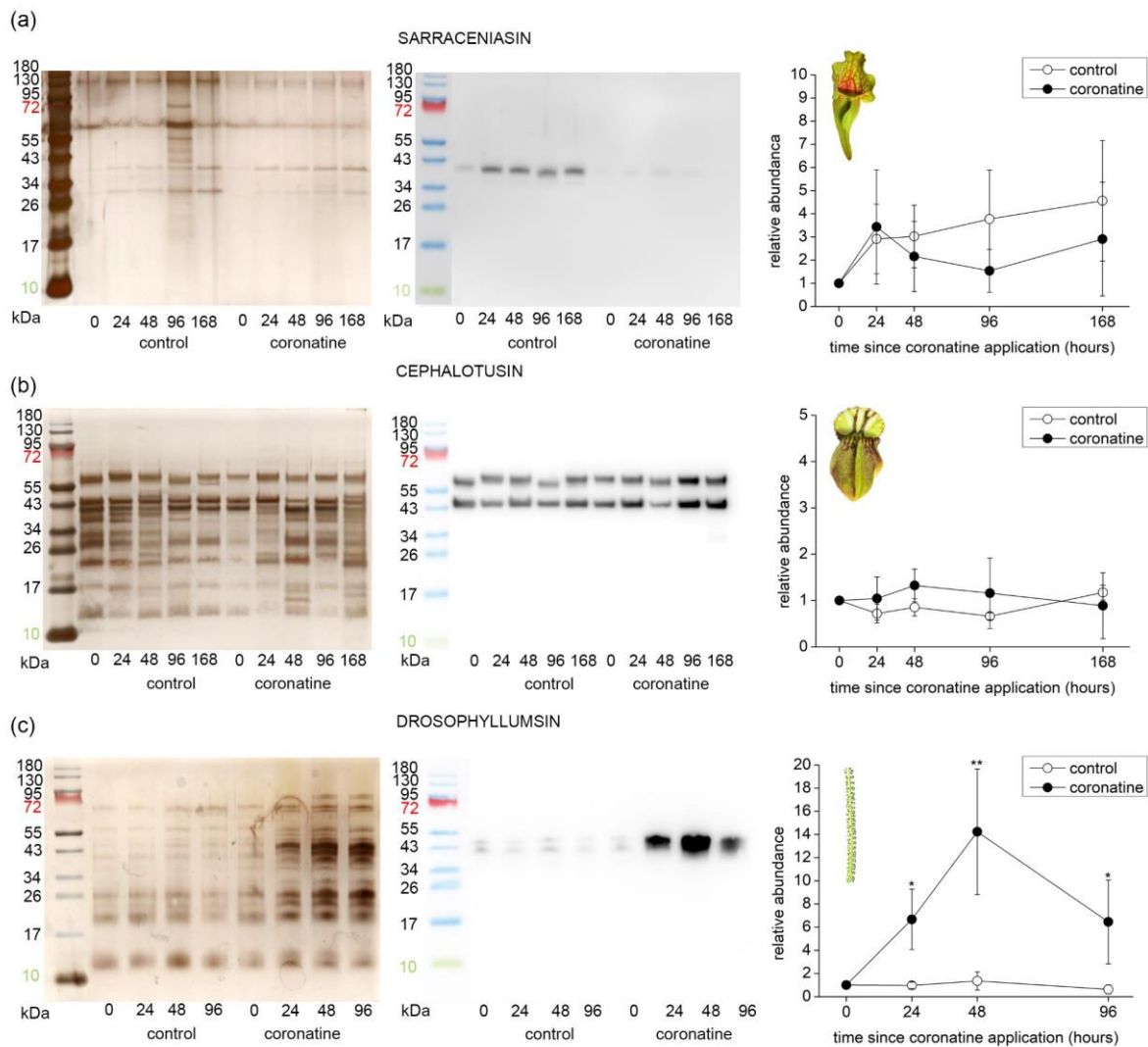


Fig. 6 Immunodetection of aspartic protease in digestive fluid in response to coronatine application. (a) *Sarracenia purpurea* ssp. *venosa*; (b) *Cephalotus follicularis*; (c) *Drosophyllum lusitanicum*. The proteins were separated in 10% (v/v) sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and silver stained (on the left) or subjected to Western blot analysis (in the middle) and the chemiluminescence signal intensity was quantified (on the right). Signal intensity at zero time point was set up as 1. Means \pm S.D., n = 4. Significant differences (Student’s t-test) between the control and treated samples at the same time point are indicated, which appeared at $P < 0.05$ (*) and $P < 0.01$ (**). Protein marker in the picture of immunodetected protein was added manually based on merged image from gel scanner.

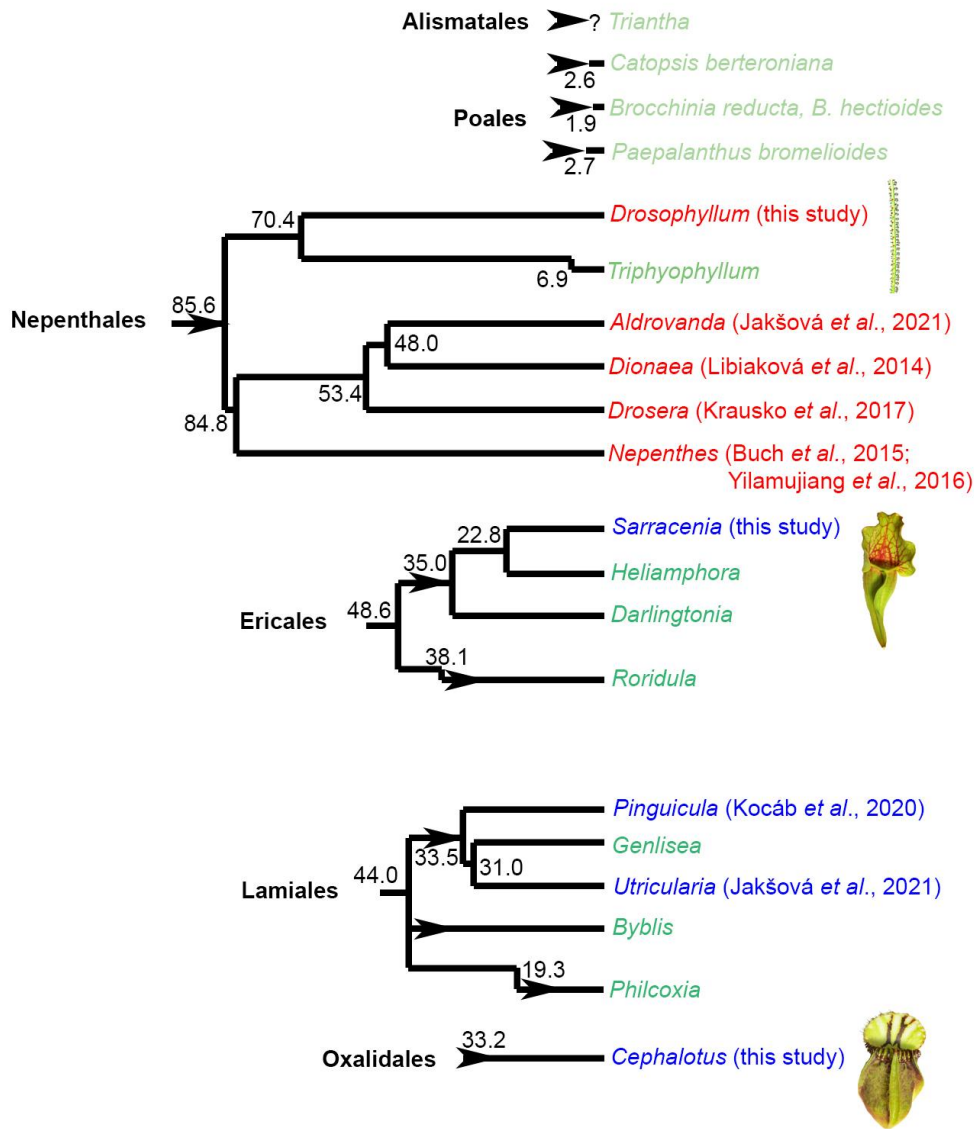


Fig. 7 Jasmonate signaling in carnivorous plants from phylogenetic point of view. Carnivorous plants have evolved at least eleven times independently (arrowheads) in six orders of angiosperms. The genera of carnivorous plants in which the jasmonates are involved in regulation of enzyme secretion are depicted in red. The genera in which jasmonates do not play any role in regulation of enzyme activities are depicted in blue. The genera which have not yet been investigated in this respect are in green. It is clearly seen, that involvement of jasmonates in regulation of enzyme activities has evolved probably only once in order Caryophyllales. Estimated phylogenetic age depicted is in millions of years before present according to Fleischmann et al. (2018). References which first time showed (or did not) increased endogenous level of bioactive isoleucine conjugate of jasmonic acid (JA-Ile) in response to prey application and enzyme secretion in response to exogenous application of jasmonates or coronatine are shown.

Supplementary figures

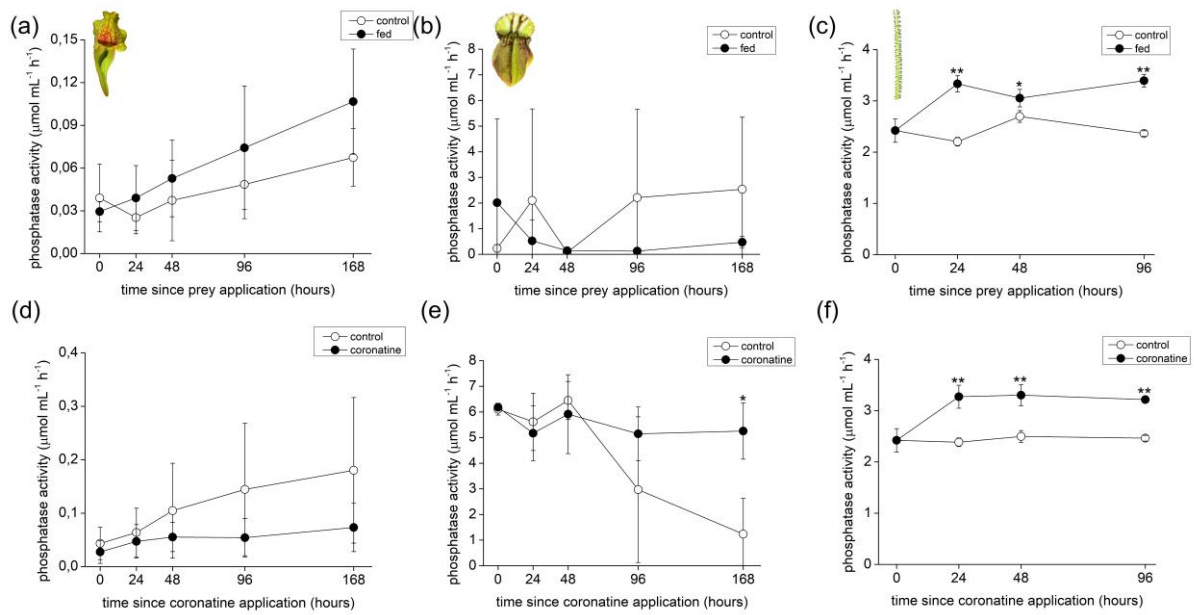


Fig. S1 Phosphatase activities in digestive fluid of carnivorous plants. (a-c) feeding with insect prey; (d-f) coronatine application. (a,d) *Sarracenia purpurea* ssp. *venosa*; (b,e) *Cephalotus follicularis*; (c,f) *Drosophyllum lusitanicum*. Means \pm S.D., $n = 4-8$. Significant differences (Student's t -test) between the control and treated samples at the same time point are indicated, which appeared at $P < 0.05$ (*) and $P < 0.01$ (**).

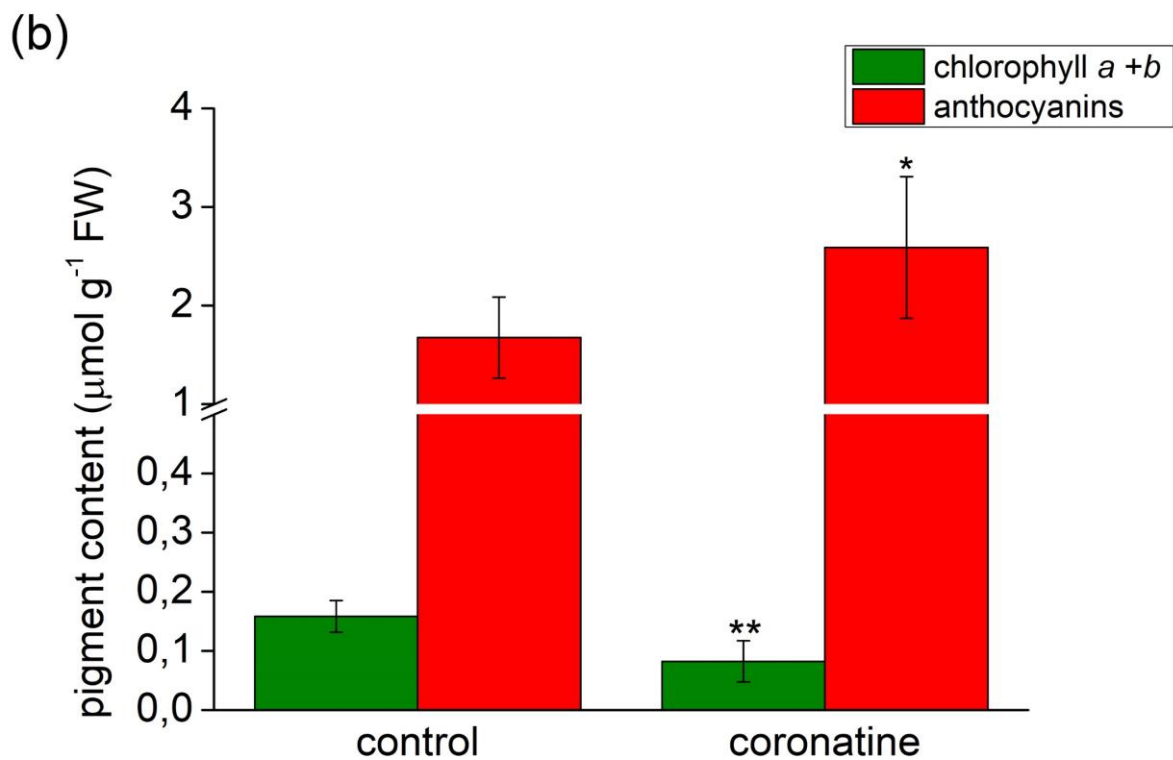
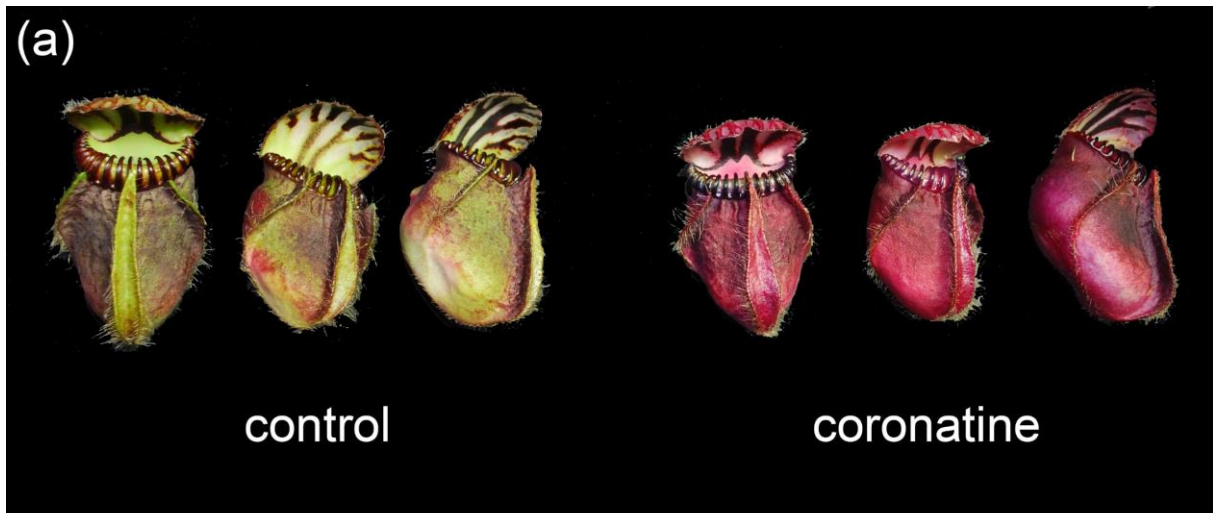


Fig. S2 Pigment content 20 days after 100 μ M coronatine application in *Cephalotus follicularis*. (a) pitcher coloration; (b) pigment content. Means \pm S.D., n = 4. Significant differences (Student's *t*-test) between control and coronatine-treated plants are indicated, which appeared at $P < 0.05$ (*) and $P < 0.01$ (**).

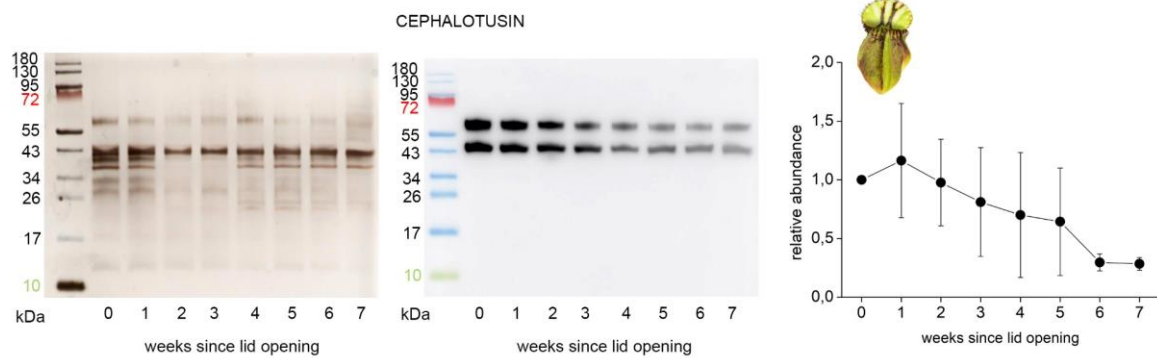


Fig. S3 Immunodetection of aspartic protease cephalotusin in digestive fluid during pitcher ontogeny in *Cephalotus follicularis*. The day the pitcher opened is marked as zero. The proteins were separated in 10% (v/v) sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and silver stained (on the left) or subjected to Western blot analysis (in the middle) and the chemiluminescence signal intensity was quantified (on the right). Means \pm S.D., n = 4.

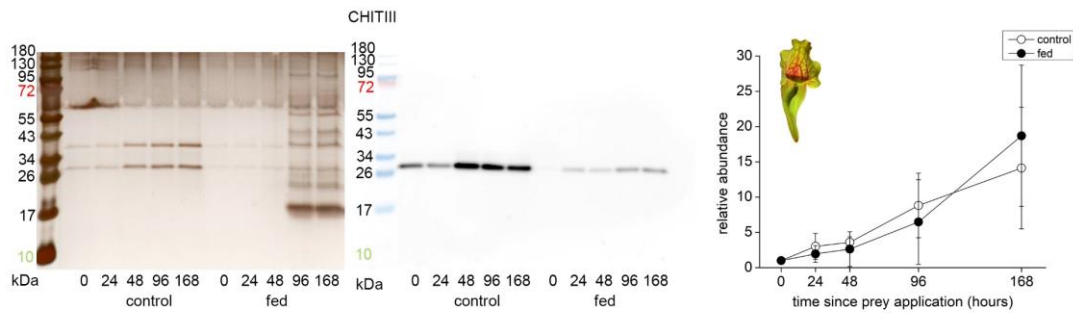


Fig. S4 Immunodetection of type III chitinase in digestive fluid of *Sarracenia purpurea* ssp. *venosa* in response to feeding. The proteins were separated in 10% (v/v) sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and silver stained (on the left) or subjected to Western blot analysis (in the middle) and the chemiluminescence signal intensity was quantified (on the right). Signal intensity at zero time point was set up as 1. Means \pm S.D., $n = 4$. Significant differences (Student’s t-test) between the control and treated samples at the same time point are indicated, which appeared at $P < 0.05$ (*) and $P < 0.01$ (**). Protein marker in the picture of immunodetected protein was added manually based on merged image from gel scanner.

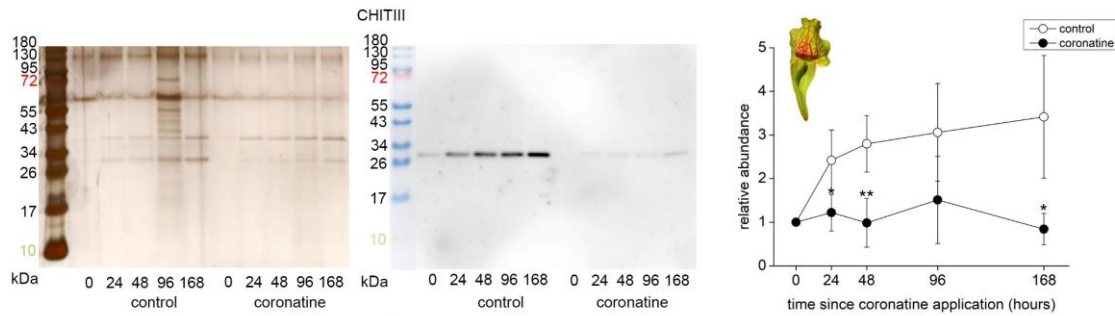


Fig. S5 Immunodetection of type III chitinase in digestive fluid of *Sarracenia purpurea* ssp. *venosa* in response to coronatine application. The proteins were separated in 10% (v/v) sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and silver stained (on the left) or subjected to Western blot analysis (in the middle) and the chemiluminescence signal intensity was quantified (on the right). Signal intensity at zero time point was set up as 1. Means \pm S.D., n = 4. Significant differences (Student’s t-test) between the control and treated samples at the same time point are indicated, which appeared at $P < 0.05$ (*) and $P < 0.01$ (**). Protein marker in the picture of immunodetected protein was added manually based on merged image from gel scanner.

Publikace V.

Anaesthesia with diethyl ether impairs jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*)

Název: Anaesthesia with diethyl ether impairs jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*)

Autoři: Pavlovič A., Libiaková M., Bokor B., Jakšová J., Petřík I., Novák O., Baluška F.

Status: publikováno v roce 2019 v *Annals of Botany* **125**, 173-183.
DOI: 10.1093/aob/mcz177

Souhrn:

Masožravá rostlina mucholapka podivná (*Dionaea muscipula*) odpovídá na mechanickou stimulaci mechanosenzitivních výčnělků uvnitř pasti nebo poškození její pasti tvorbou elektrických signálů, konkrétně akčních potenciálů (AP). Tyto signály jsou zásadní pro zahájení jasmonátové signální dráhy, která spouští expresi genů reagujících na kyselinu jasmonovou (JA). Ty v mucholapce kódují trávicí enzymy. Tato sekvence signalizačních událostí je podobná velmi dobře známé signální dráze v odpovědi na poškození nebo útok býložravce v běžných rostlinách, což podporuje hypotézu, že botanická masožravost byla vyvinuta z obranného mechanismu rostlin. Díky své elektrické signalizaci se mucholapka podivná jeví jako zajímavý experimentální model pro výzkum vlivu anestetik na rostliny. Ačkoli je primárním místem působení celkových anestetik u zvířat a lidí centrální nervový systém a rostliny přímo tímto systémem nedisponují, jsou také schopné generovat elektrické signály. Tato studie tedy zkoumala efekt celkového těkavého anestetika dietyléteru na schopnost mucholapky vnímat potenciální kořist nebo útok býložravce. Ukázalo se, že mucholapka během anestezie není schopná vnímat své prostředí. Dietyléter kompletně inhiboval vznik AP, schopnost uzavřít past a také následné reakce: akumulaci JA a expresi vybraných genů (cystein proteázy a chitinázy typu I). Po odstranění éteru byly tyto reakce snadno a rychle opět obnoveny. Nicméně jakmile byla u mucholapky pod anestézou zevně přímo do pasti aplikována JA, JA byla schopna inhibované akční potenciály obejít a obnovila genovou expresi i pod vlivem anestetika, což naznačuje, že reakce, které následují ve zkoumané signální dráze po akumulaci JA nejsou inhibovány. Primárním cílem anestetika jsou tomu předcházející reakce, tedy elektrická signalizace. Tato situace připomíná účinek anestezie na živočichy, u nichž anestezie vede ke ztrátě vědomí. Skutečnost, že anestezie inhibuje šíření elektrického signálu nejen u zvířat, ale také u rostlin a v obou případech ovlivňuje jejich citlivost a vnímavost, dokumentuje další pozoruhodnou podobnost mezi zvířaty a rostlinami.

Příspěvní autorů:

Výzkum:

- příprava a odebrání materiálů: J. Jakšová, A. Pavlovič
- měření elektrických signálů: A. Pavlovič
- kvantifikace fytohormonů: J. Jakšová, I. Petřík, O. Novák
- měření genové exprese: M. Libiaková, B. Bokor
- SDS-PAGE a Western bloty: J. Jakšová

Konceptualizace: A. Pavlovič, F. Baluška

Supervize: A. Pavlovič, O. Novák

Vizualizace: A. Pavlovič

Statistika: J. Jakšová, A. Pavlovič

Psaní – rukopis: A. Pavlovič

Psaní – editace: A. Pavlovič

Získání financování: A. Pavlovič

Podíl J. Jakšové: 10 %

Anaesthesia with diethyl ether impairs jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*)

Andrej Pavlovič^{1,*}, Michaela Libiaková², Boris Bokor^{2,3}, Jana Jakšová¹, Ivan Petřík⁴, Ondřej Novák⁴ and František Baluška⁵

¹Department of Biophysics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, CZ-783 71, Olomouc, Czech Republic, ²Department of Plant Physiology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Ilkovičova 6, Mlynská dolina B2, SK-842 15, Bratislava, Slovakia, ³Comenius University Science Park, Comenius University in Bratislava, Ilkovičova 8, SK-841 04, Bratislava, Slovakia, ⁴Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University and Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences, Šlechtitelů 27, CZ-783 71, Olomouc, Czech Republic and ⁵IZMB, University of Bonn, Kirschallee 1, 53115 Bonn, Germany

* For correspondence. E-mail: andrej.pavlovic@upol.cz

Received: 21 May 2019 Returned for revision: 6 August 2019 Editorial decision: 23 October 2019 Accepted: 25 October 2019

- **Background and Aims** General anaesthetics are compounds that induce loss of responsiveness to environmental stimuli in animals and humans. The primary site of action of general anaesthetics is the nervous system, where anaesthetics inhibit neuronal transmission. Although plants do not have neurons, they generate electrical signals in response to biotic and abiotic stresses. Here, we investigated the effect of the general volatile anaesthetic diethyl ether on the ability to sense potential prey or herbivore attacks in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).
- **Methods** We monitored trap movement, electrical signalling, phytohormone accumulation and gene expression in response to the mechanical stimulation of trigger hairs and wounding under diethyl ether treatment.
- **Key Results** Diethyl ether completely inhibited the generation of action potentials and trap closing reactions, which were easily and rapidly restored when the anaesthetic was removed. Diethyl ether also inhibited the later response: jasmonic acid (JA) accumulation and expression of JA-responsive genes (cysteine protease dionain and type I chitinase). However, external application of JA bypassed the inhibited action potentials and restored gene expression under diethyl ether anaesthesia, indicating that downstream reactions from JA are not inhibited.
- **Conclusions** The Venus flytrap cannot sense prey or a herbivore attack under diethyl ether treatment caused by inhibited action potentials, and the JA signalling pathway as a consequence.

Key words: Anaesthesia, anaesthetic, action potential, carnivorous plant, *Dionaea muscipula*, diethyl ether, electrical signal, jasmonic acid, plant movement, Venus flytrap.

INTRODUCTION

The carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*) has evolved modified leaves called traps for prey capture (Gibson *et al.*, 2009). The trap consists of two lobes that close rapidly in response to a mechanical stimulus delivered to the trigger hairs protruding from the trap epidermis. Two touches of a trigger hair by an insect prey within 20 s generate two action potentials (APs) which trigger the trap closing reaction (Escalante-Pérez *et al.*, 2011; Volkov, 2019). After rapid closure secures the insect prey, the movement of the entrapped prey in the closed trap results in the generation of further APs (Affolter and Olivo, 1975; Libiaková *et al.*, 2014). The third touch and AP increase cytosolic Ca²⁺ levels in digestive glands. The Ca²⁺ level decays if no further APs are triggered (Escalante-Pérez *et al.*, 2011; Hedrich and Neher, 2018). Prey struggling, repeated mechanical stimulation and the generation of hundreds of APs result in the accumulation of phytohormones from the jasmonate group (Escalante-Pérez *et al.*, 2011; Libiaková *et al.*, 2014; Pavlovič

et al., 2017). Binding of the isoleucine conjugate of jasmonic acid (JA-Ile) to the CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1) protein as part of a co-receptor complex mediates the ubiquitin-dependent degradation of JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) repressors, resulting in the activation of jasmonate-dependent gene expression (Staswick and Tiryaki, 2004; Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Sheard *et al.*, 2010). Transcriptional activation leads to the synthesis of transport proteins and digestive enzymes that are secreted into the closed trap cavity (Scherzer *et al.*, 2013, 2015, 2017; Libiaková *et al.*, 2014; Böhm *et al.*, 2016a,b). After the prey movement is stopped by exhaustion or death, chemical stimuli from the prey (e.g. chitin, ammonia) further enhance the synthesis of digestive enzymes through jasmonate signalling (Libiaková *et al.*, 2014; Paszota *et al.*, 2014; Bemm *et al.*, 2016; Pavlovič and Mithöfer, 2019).

Several lines of evidence indicate that the generation of electrical signals, jasmonate accumulation and expression of genes encoding digestive enzymes are tightly coupled in the Venus

flytrap. First, repeated mechanical stimulation of trigger hairs is sufficient to induce accumulation of the well-known bioactive compound JA-Ile within the first hour in stimulated traps (Pavlovič *et al.*, 2017). Just two APs are necessary to induce transcription of *JAZ1* within 4 h, and after five APs, *JAZ1* transcripts accumulated to the highest level. More than three APs are necessary to induce significant gene expression of digestive enzymes (e.g. dionain and type I chitinase), and the magnitude of expression is dependent on the number of APs triggered. Gene expression can also be triggered by exogenous application of jasmonic acid (JA), JA-Ile or coronatine without any mechanical stimulus. In contrast, application of the JA perception antagonist coronatine-*O*-methyloxime (COR-MO), which prevents the COI1–JAZ interaction, blocked gene expression despite triggering 60 APs (Böhm *et al.*, 2016a; Bemm *et al.*, 2016).

Thus, the sequence of signalling events in Venus flytrap resembles the well-known signalling pathway in response to wounding or herbivore attack in non-carnivorous plants (Maffei *et al.*, 2007), supporting the hypothesis that botanical carnivory has evolved from plant-defence mechanisms (Pavlovič and Saganová, 2015; Bemm *et al.*, 2016; Pavlovič and Mithöfer, 2019). The fast electrical signals, generated in local leaves in response to wounding or herbivore attack and propagating to neighbouring leaves, are the first cellular response to biotic and abiotic stresses in plants (Maffei *et al.*, 2007). A breakthrough study in this regard was that by Wildon *et al.* (1992), who revealed the link between electrical signal propagation and biochemical response in tomato plants. Electrical signals are often followed by changes in intracellular Ca^{2+} concentration and generation of reactive oxygen species (e.g. H_2O_2 ; Maffei *et al.*, 2007; Kiep *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2018) which often co-propagate together (Gilroy *et al.*, 2014). A direct link between increased cytosolic Ca^{2+} and activation of JA biosynthesis genes by Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphorylation of the JAV1-JAZ8-WRKY5 (JJW) repressor complex was recently provided by Yan *et al.* (2018). As a result, increased levels of jasmonates (JA-Ile in particular) trigger the expression of JA-responsive pathogenesis-related (PR) proteins through a COI1–JAZ-dependent pathway (De Geyter *et al.*, 2012). Recently, we showed that carnivorous plants are not able to distinguish between mechanical stimulation and wounding because these processes share the same signalling pathway with plant defence mechanisms. Both induce electrical signals, jasmonate accumulation and digestive enzyme synthesis, confirming the link among electrical signal propagation, jasmonate accumulation and the expression of digestive enzymes (Krausko *et al.*, 2017; Pavlovič *et al.*, 2017). Moreover, the secreted enzymes predominantly belong to PR-proteins, indicating that carnivorous plants have exploited their hydrolytic properties, further emphasizing the similarity between botanical carnivory and plant defence mechanisms (Hatano and Hamada, 2008, 2012; Schulze *et al.*, 2012).

Recently, we documented that Venus flytraps, sundew traps, *Mimosa* leaves and pea tendrils lost both autonomous and touch-induced movements after exposure to local and general anaesthetics (Yokawa *et al.*, 2018, 2019). General anaesthetics (e.g. diethyl ether) are often defined as compounds that induce a reversible loss of consciousness in humans or loss of righting reflex in animals. Anaesthesia can also be defined as loss of

responsiveness to environmental stimuli. Clinical definitions are extended to include the lack of awareness to painful stimuli, which is sufficient to facilitate surgical applications in clinical and veterinary practice (Franks, 2008). The primary site of action of general anaesthetics in animals and humans is the central nervous system, where these molecules enhance inhibitory neurotransmission or inhibit excitatory neurotransmission (Zhou *et al.*, 2012). Although plants do not have neurons and lack a central nervous system, they are able to generate electrical signals (Fromm and Lautner, 2007; Hedrich *et al.*, 2016). Claude Bernard (1878) concluded that volatile anaesthetics not only act on neurons but also affect physiological processes in all cells (Grémiaux *et al.*, 2014). The electrical signals in plants not only trigger rapid leaf movements in ‘sensitive’ plants, such as *Mimosa pudica* or *D. muscipula*, but also induce physiological processes in non-carnivorous plants (Fromm and Lautner, 2007; Mousavi *et al.*, 2013). Interestingly, our recent study showed that inhibition of rapid trap closure in Venus flytrap by the general anaesthetic diethyl ether is caused by inhibition of electrical signalling. There were no toxic impacts of the anaesthetics used, and the effects were fully and rapidly reversible after their removal (Yokawa *et al.*, 2018).

Although carnivorous plants still do not belong to the model group of plants, the signalling events described above indicate that Venus flytrap is a suitable model for studying inducibility and plant responses to external stimuli under anaesthesia due to its rapid trap movement. Considering the tight coupling between electrical signal propagation and jasmonate signalling in carnivorous plants (Böhm *et al.*, 2016a; Bemm *et al.*, 2016; Krausko *et al.*, 2017), we hypothesize that anaesthesia can impair not only rapid trap movement triggered by APs but also the cascade of jasmonate signalling events leading to activation of the digestive process. Our study showed that the Venus flytrap cannot sense potential insect prey or a herbivore attack under anaesthesia due to blocked jasmonate signalling.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and culture conditions

The Venus flytrap (*D. muscipula* Ellis.) is native to the subtropical wetlands of North and South Carolina on the East Coast of the USA. Experimental plants were grown under standard glasshouse conditions at the Department of Biophysics of Palacký University in Olomouc (Czech Republic) and the Department of Plant Physiology of Comenius University in Bratislava (Slovakia). As substrate we used well-drained peat moss in plastic pots placed in a tray filled with distilled water to a depth of 1–2 cm. Daily temperatures fluctuated between 20 and 35 °C; relative air humidity ranged from 50 % to 100 %; and the maximum daily irradiance reached 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetically active radiation (PAR).

Experimental set-up

The Venus flytrap plants were incubated in 15 % diethyl ether for 2 h in a polypropylene bag. The approximate volume of diethyl ether was calculated using ideal gas constant (standard

state of gas as $22.4 \text{ L}^{-1} \text{ mol}$). To obtain 15 % vapour in 1 litre of air, a liquid phase of $700 \mu\text{L}$ diethyl ether (74.12 g mol^{-1} , 0.71 g cm^{-3}) was allowed to evaporate inside the sealed polypropylene bag. This was sufficient to anaesthetize the plants, as we found in our previous study, and the plants did not react to mechanical stimulation by rapid trap closure (Yokawa *et al.*, 2018). Thereafter, one group of plants served as a non-stimulated control, and the second group was mechanically stimulated or wounded. For this, a small opening in the polypropylene bag was made. For mechanostimulation, the trigger hairs were mechanically stimulated twice within a short period of time and then once every 3 min for 2 h (40 times together) with the tip of a pipette (which had been melted by heat and then hardened at room temperature to avoid a wound response by the sharp tip, see Pavlovič *et al.*, 2017). In the second experiment, a trap was pierced/wounded with a needle twice within a short period of time and then 40 times every 3 min. In one of the experiments, extracellular measurements of electrical signals were performed on a separate group of plants during stimulation (see below). After 2 h of stimulation, the plants were removed from the bag to allow the plants to recover from anaesthesia. Immediately thereafter, the traps from other groups of plants were sampled for phytohormone analysis. Ten hours later, the traps from the third group of plants were sampled for quantitative PCR (qPCR). At the same time, the non-stimulated traps under diethyl ether for 4 h were also harvested. Control plants, bagged non-stimulated plants or identically stimulated plants but in the absence of diethyl ether were also harvested for phytohormone analysis and qPCR at the same time points (Supplementary Data Fig. S1A). For each method, different groups of plants were used because wounding during sampling could activate the jasmonate signalling pathway.

Extracellular measurements of electrical signals

Each Venus flytrap incubated in diethyl ether for 2–4 h in a polypropylene bag with attached electrodes inside was mechanically stimulated or wounded as described above. Mechanical stimulation or wounding was performed through a small opening in the bag. For recovery, the bag was cut off, and the trigger hair was touched repeatedly every 100 s. Control traps without anaesthetics were also measured. APs were measured on the trap surface inside a Faraday cage with non-polarizable Ag/AgCl surface electrodes (Scanlab Systems, Prague, Czech Republic) fixed with a plastic clip and moistened with a drop of conductive EV gel (Hellada, Prague, Czech Republic) as described previously (Ilík *et al.*, 2010; Pavlovič *et al.*, 2017).

Quantification of phytohormone tissue level

Two hours after initiation of mechanical stimulation and wounding under anaesthesia (4 h etherized), trap tissue samples were collected. Control traps without any stimuli under anaesthesia, as well as stimulated (positive control) and non-stimulated (negative control) control traps without anaesthesia were also harvested. The traps were cut off with scissors and immediately (within 10 s) frozen in liquid nitrogen and stored

at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ until analysis. Ten minutes after diethyl ether removal the remaining traps on plants were mechanically stimulated to ensure that plants were only anaesthetized and not dead (the traps had to close). Quantification of JA, JA-Ile, JA-valine (Ja-Val), *cis*-12-oxo-phytodienoic acid (*cis*-OPDA), 9,10-dihydrojasmonic acid (9,10-DHJA), abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA) and indole-3-acetic acid (IAA) was performed according to the method described by Floková *et al.* (2014). Two independent technical measurements were performed on four or five biological replicates.

Real-time qPCR

To study the induction of gene expression in the trap tissue, two corresponding genes of well-characterized proteins from digestive fluid were chosen: the cysteine protease dionain (Schulze *et al.*, 2012; Risør *et al.* 2016) and chitinase I (Paszota *et al.*, 2014). To determine the effect of anaesthesia on gene expression, we had to find the time point where the induction of gene expression is high. Therefore, we first collected 100 mg of trap tissue from plants after 0, 2, 6, 12, 24 and 48 h from initiation of mechanical stimulation, wounding or external application of 2 mM JA under a normal atmosphere (air).

Based on this experiment, we chose the 12-h time point for mechanostimulation and wounding under anaesthesia. First, the plants were enclosed in polypropylene bags with diethyl ether for 2 h and then repeatedly mechanically stimulated for 2 h or wounded as described above. After 4 h of anaesthesia, the plants were removed from the bag. Ten hours later, 100 mg of trap tissue sample was harvested (Supplementary Data Fig. S1A). Control plants without anaesthesia in the air were also mechanically stimulated or wounded (positive controls) or were without any stimulation (in the air and under diethyl ether, negative controls).

To determine the effect of JA under diethyl ether treatment, the plants were again enclosed in polypropylene bags with diethyl ether for 2 h. We applied 2 mM JA to the trap surface (volume dependent on the size of the trap), and the second group of plants had no JA application but was still under a diethyl ether atmosphere. The same was done in the control air-only plants. After 7 h, trap samples were collected for qPCR analyses (Supplementary Data Fig. S1B). The sampling time was shorter than in the previous experiment because prolonged exposure of plants to diethyl ether caused damage to trap tissue. This is probably caused by non-polar aprotic solvent properties of diethyl ether and its interactions with lipid membranes if exposed for prolonged periods.

To exclude the lethal impact of diethyl ether on plants, the recovery of gene expression was also investigated. After 2 h in diethyl ether, the plants were removed from the bag and kept for 2 h in air. The plants were then mechanically stimulated or wounded as described above, and after 10 h, trap samples were collected for qPCR analyses.

RNA extraction and gene expression were performed as described previously (Saganová *et al.*, 2018) using the primers detailed in Supplementary Data Table S1. All samples for PCR experiments were analysed in four biological and three technical replicates.

Western blotting

To detect and quantify cysteine protease (dionain) and type I chitinase, polyclonal antibodies against these proteins were raised in rabbits by Agrisera (Vännäs, Sweden) and Genscript (Piscataway, NJ, USA) as described previously (Pavlovič *et al.*, 2017). Digestive fluid was collected 48 h after the beginning of mechanical stimulation and wounding only from plants in the air (no digestive fluid was secreted under diethyl ether). SDS-PAGE, silver staining and Western-blotting were done as described previously (Pavlovič *et al.*, 2017).

Statistical analyses

All data are from biological replicates, and each biological sample was analysed in two or three technical replicates. Before statistical analyses, the data were tested for homogeneity of variance (Brown–Forsythe test). If homogeneity was fulfilled, one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-hoc test was used (Origin 8.5.1, Northampton, MA, USA). If homogeneity was not fulfilled, multiple comparison by Welch's test with Bonferroni-corrected alpha was used (Microsoft Excel).

RESULTS

Anaesthesia inhibits electrical signalling and trap closing reactions

The trap of the Venus flytrap plant generates typical APs in response to mechanical stimulation of trigger hairs or to wounding. Two APs resulted in rapid trap closure within 1 s (Fig. 1A, Supplementary Data Movies S1 and S4). The shape, duration and amplitude of APs triggered by mechanostimulation and wounding were the same (Supplementary Data Fig. S2). However, after 2 h under diethyl ether anaesthesia, the trap lost the closing response and the ability to generate APs in response to both stimuli (Fig. 1B, Supplementary Data Movies S2 and S5). One hundred seconds after removal of diethyl ether, APs with a reduced amplitude and increased half-width were detected (Fig. 2A), but they were not able to trigger trap closure. In some traps, the first AP was detected after 200 s during recovery. The amplitude and spike half-width of the recorded APs gradually recovered (recorded every 100 s, Fig. 2B, C). When

the amplitude of APs was lower and the spike half-width longer during recovery, more touches, and thus more APs, were necessary to induce rapid trap closure. The closing response of the trap was fully restored within 10–15 min, and again, only two touches were sufficient for trap closure after recovery (Supplementary Data Movies S3 and S6).

Anaesthesia inhibits the accumulation of jasmonates

In a previous study, we found that tissue levels of jasmonate in Venus flytrap were highest within the first 2 h of stimulation (Pavlovič *et al.*, 2017). Therefore, we chose this time point for phytohormone analysis under anaesthesia. We found a clear activation of the JA signalling pathway for both mechanostimulation and wounding, consistent with our previous study (Pavlovič *et al.*, 2017). There was a more than 300-fold increase in the JA tissue level for both types of stimulation in air (Fig. 3A, I). The bioactive compound JA-Ile increased 23- and 13-fold in response to mechanostimulation and wounding, respectively (Fig. 3B, J). The content of other oxylipins (JA-Val, *cis*-OPDA, 9,10-DHJA) did not change significantly (Fig. 3C–E, K–M). Under anaesthesia, diethyl ether completely inhibited jasmonate accumulation in response to mechanostimulation (Fig. 3A, B). In response to wounding, there was only a slight but significant increase of jasmonates. The JA level increased seven-fold, and the bioactive JA-Ile level increased two-fold (Fig. 3I, J). This increase probably did not reach the threshold level for activation of the JA signalling pathway, as indicated by the qPCR data (see below). The JA-Val content decreased in wounded plants under ether atmosphere in comparison to air (Fig. 3K). A similar, but not significant, pattern was detected also for *cis*-OPDA (Fig. 3L). The levels of other plant hormones (ABA, IAA) did not change significantly (Fig. 3F, H, N, P). There was a trend towards a two-fold non-significant increase in SA level in response to both stimuli, irrespective of treatment (air vs. diethyl ether; Fig. 3G, O).

Transcription of JA-responsive genes is inhibited under anaesthesia

First, we analysed the time dependence of the mRNA levels of two selected JA-responsive genes in Venus flytrap: the cysteine

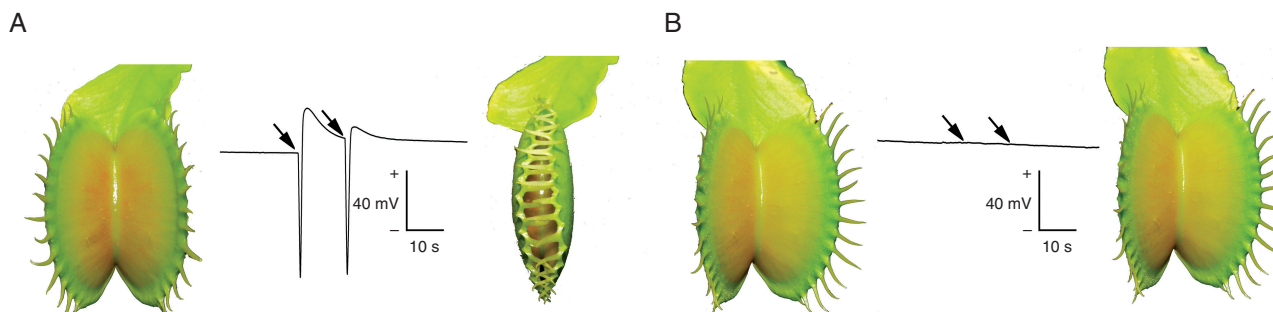


FIG. 1. Electrical signalling in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*) under anaesthesia with diethyl ether. (A) Two touches of trigger hairs (arrows) or wounds generate two action potentials and rapid trap closure. (B) Action potentials are not generated in response to two touches (arrows) when exposed to diethyl ether.

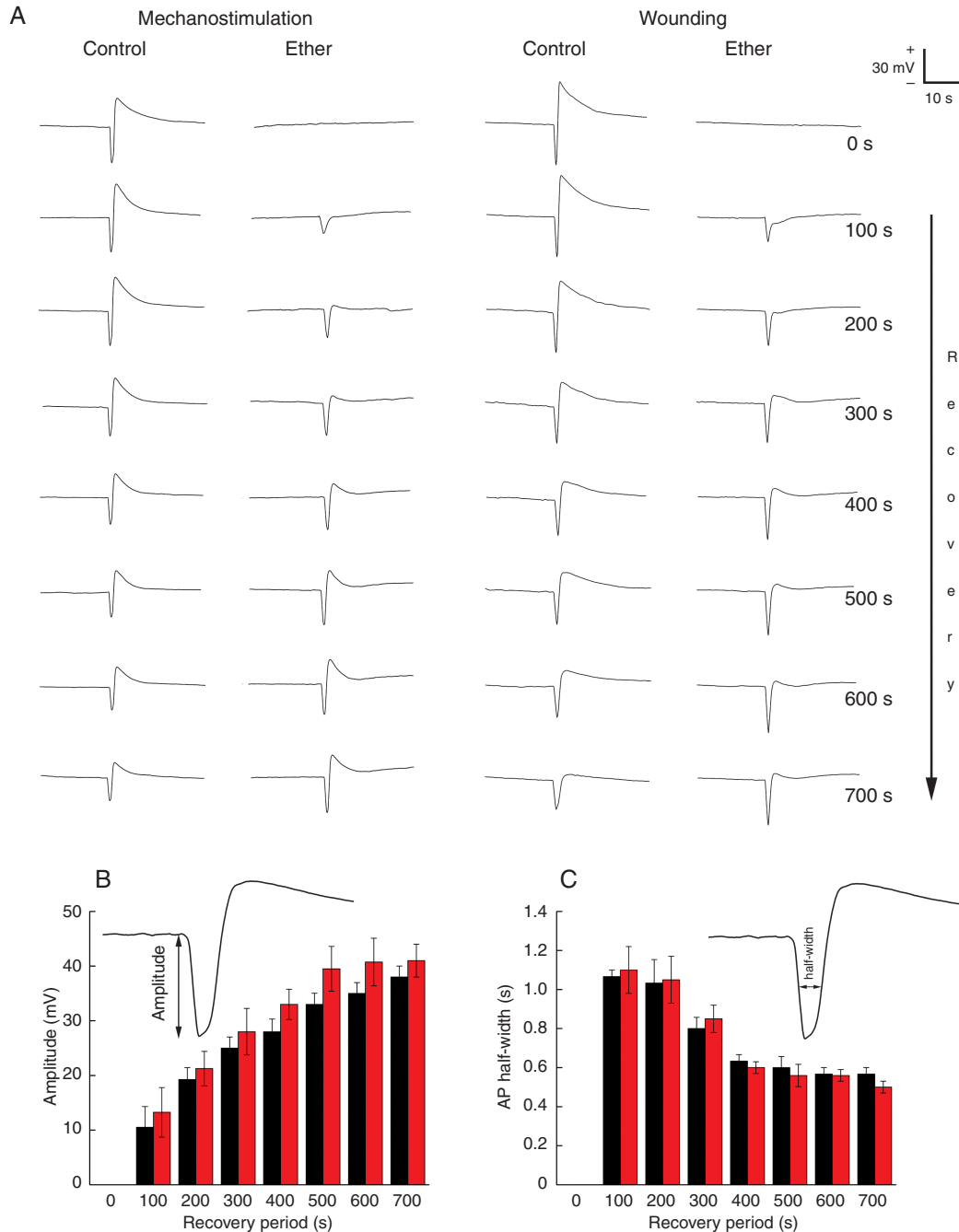


FIG. 2. Recovery of electrical signalling after removing of diethyl ether in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). (A) Recovery of action potentials (APs) in response to mechanical stimulation and wounding. Representative APs from four independent experiments are depicted. (B) Recovery of AP amplitude. (C) Recovery of AP spike half-width. Black bars – mechanostimulation, red bars – wounding. Data are means \pm s.e., $n = 4$. There were no significant differences between APs generated in response to wounding and mechanical stimulation.

protease *dionain* and *chitinase I* (Böhm et al., 2016a; Bemm et al., 2016). The kinetics of the upregulation of mRNA levels for both genes were similar. The highest mRNA level was found between 12 and 24 h after the first AP was triggered for both types of stimulation. At 48 h, the mRNA levels declined. The kinetics of mRNA levels were different for the external application of JA; the mRNA levels of both genes gradually increased over 48 h (Supplementary Data Fig. S3A, B). The protein

product of these genes was detected in digestive fluid after 48 h (Supplementary Data Fig. S4). Based on these results, we chose the earliest possible time point, where the upregulation of gene expression was evident, to investigate the effect of anaesthesia. In this experiment, plants were exposed to diethyl ether for 2 h, and the traps were mechanostimulated or wounded for the next 2 h. The diethyl ether was removed, and the traps were sampled 10 h later (12 h after the first mechanostimulus, Supplementary

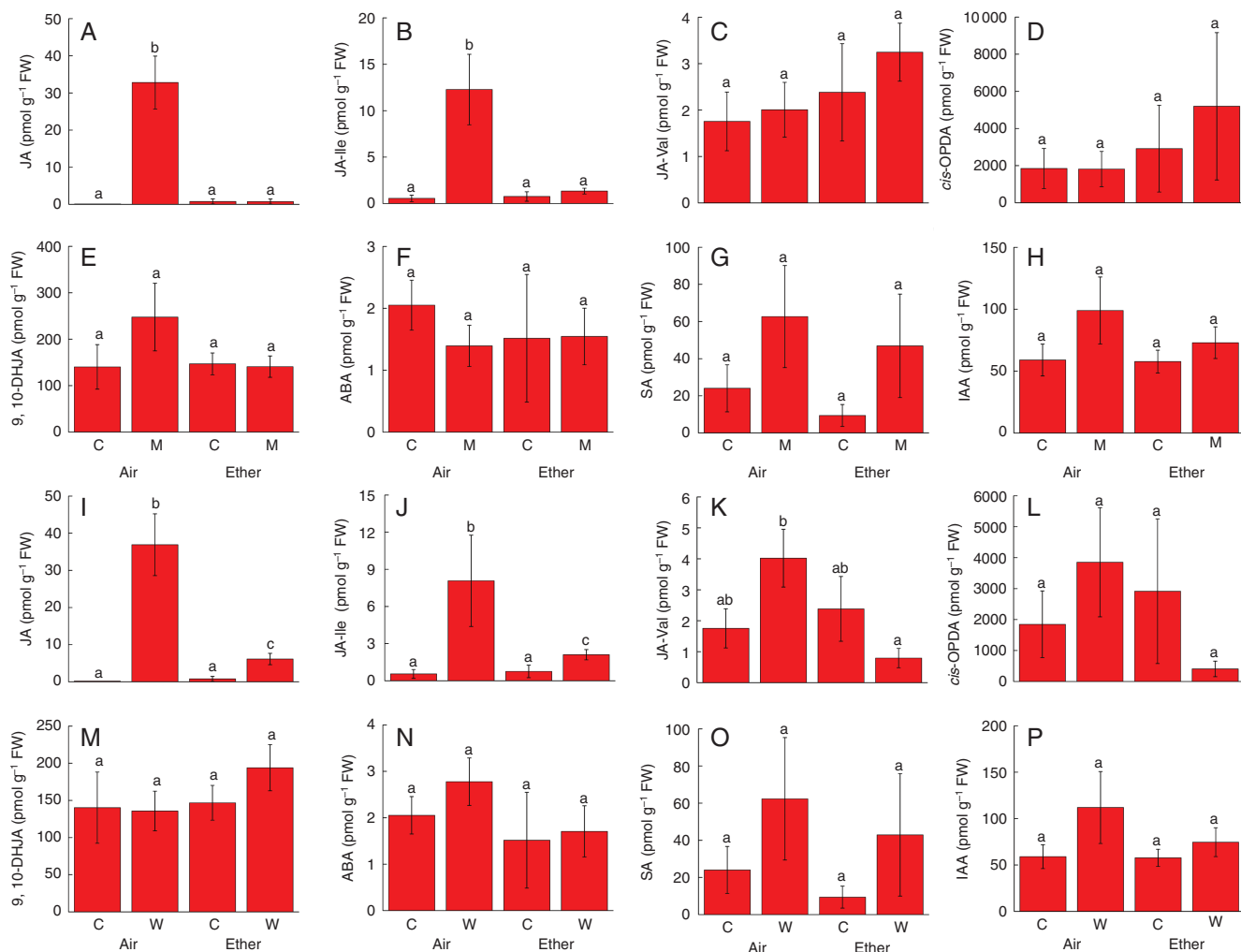


FIG. 3. Accumulation of phytohormones in trap tissue of the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*) 2 h after mechanostimulation and wounding in the air and under anaesthesia with diethyl ether. (A–H) Mechanostimulation, (I–P) wounding. (A,I) Jasmonic acid (JA), (B,J) isoleucine conjugate of jasmonic acid (JA-Ile), (C,K) valine conjugate of jasmonic acid (JA-Val), (D,L) *cis*-12-oxo-phytodienoic acid (*cis*-OPDA), (E,M) 9,10-dihydrojasmonic acid (9,10-DHJA), (F,N) abscisic acid (ABA), (G,O) salicylic acid (SA), (H,P) indole-3-acetic acid (IAA). C, control; M, mechanostimulation; W, wounding. Values are means \pm s.d. from four biological replicates, $n = 4$ –5. Different lower-case letters denote statistically significant differences at $P < 0.05$.

Data Fig. S1A). Figure 4 clearly shows that the mRNA levels of both investigated genes (*dionain*, *chitinase 1*) were not increased under anaesthesia and were comparable with the non-stimulated control in air or diethyl ether. Two hours after removing diethyl ether, the Venus flytrap was again able to upregulate gene expression in response to mechanostimulation and wounding (Supplementary Data Fig. S5).

External application of JA bypassed electrical signalling and restored gene expression under anaesthesia

We used the following experiment to determine whether we can bypass the inhibition of electrical signalling by direct application of JA and thus restore gene expression under anaesthesia. The plants were exposed to diethyl ether for 2 h. Then, a few drops of 2 mM JA were applied to the trap surface, and the plants were kept for 7 h under anaesthesia, which was the

longest possible time to avoid tissue damage. The traps were then sampled for qPCR (Supplementary Data Fig. S1B). Figure 5B shows that JA clearly restored the expression of *chitinase 1* under diethyl ether. By contrast, *Dionaea* showed a rather weak non-significant response (Fig. 5A); however, at the 6 h time point, the increase was not statistically significant in the experiment depicted in Supplementary Data Fig. S3A. This result is consistent with the finding that *chitinase 1* expression increased earlier (somewhere between 2 and 6 h) than *dionain* (between 6 and 12 h, Supplementary Data Fig. S3) in response to mechanical stimulation, wounding and JA application.

DISCUSSION

In this study, we showed that during diethyl ether treatment, Venus flytrap plants could not sense their environment, and after ‘waking up’, did not ‘remember’ what occurred. This was shown by inhibition of APs and trap movement, an inability

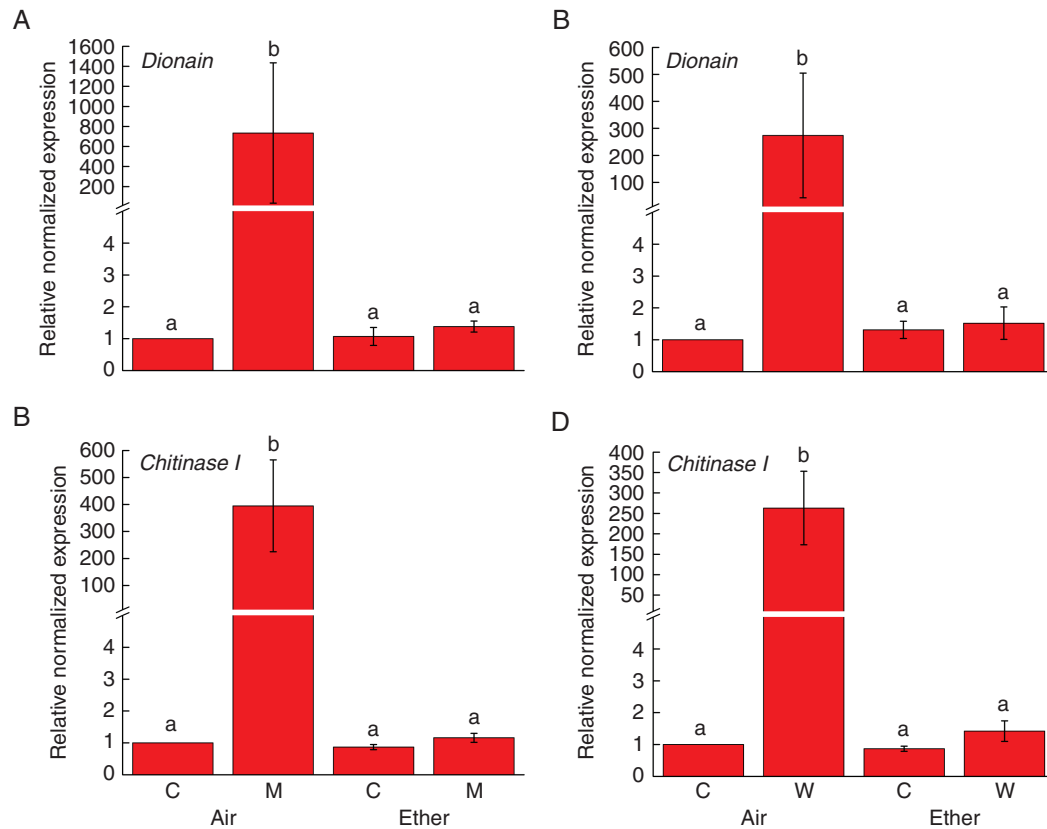


FIG. 4. Gene expression in the air and under anaesthesia with diethyl ether in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). The traps were kept in the air or under diethyl ether for 2 h and then mechanostimulated 40 times or pierced/wounded by needle for the next 2 h. The diethyl ether was then removed and trap tissue was sampled for qPCR after 10 h. Relative expression of *dionain* after (A) mechanostimulation and (B) wounding. Relative expression of *chitinase* after (C) mechanostimulation and (D) wounding. Gene expression for the non-stimulated control in the air was set as 1. Data show mean expression \pm s.e. from four biological replicates ($n = 4$). Different lower-case letters denote statistically significant differences at $P < 0.05$.

to accumulate jasmonates and no induction of genes encoding digestive enzymes and thus no physiological response. Our observations resemble those in animals and humans where general anaesthesia suppresses central nervous system activity. The volatile anaesthetic halothane (halogenated derivative of ether) produced a concentration-dependent depression of AP amplitude accompanied by an increased spike half-width with complete inhibition at 3 vol.% in mammalian nociceptors (MacIver and Tanelian, 1990). Electrical signalling in the Venus flytrap was fully recovered in the range of minutes; a similar recovery period was recorded in mammal neurons (MacIver and Tanelian, 1990). During this period, more than two touches were necessary to induce rapid trap closure, supporting the summation of smaller subthreshold charges of APs necessary for trap closing reactions, consistent with electrical memory in the Venus flytrap (Volkov et al., 2008, 2009). Several previous studies have indicated that ‘shy’ plants (*M. pudica*) are also sensitive to anaesthesia. The leaf closing reaction after mechanical stimulus was inhibited by exposure to diethyl ether, halothane and lidocaine but not ketamine (Milne and Beamish, 1999; De Luccia, 2012; Yokawa et al., 2018). Although electrical signals were not investigated in these studies, it is tempting to assume that anaesthesia also inhibited electrical signals, because electrical signalling and rapid trap movements are tightly coupled (Fromm and Lautner, 2007).

Two hypotheses regarding the mechanisms of anaesthetic action in animals and humans have been proposed: the lipid (membrane) theory and protein (receptor) theory (Franks, 2008; Rinaldi, 2014), with several modifications (Lerner et al., 1997; Tang and Xu, 2002). Meyer (1899) and Overton (1901) concluded that solubilization of a lipophilic general anaesthetic in the lipid bilayer of the neuron causes its malfunction and anaesthetic effect. On the other hand, Franks and Lieb (1984) demonstrated that the relationship reported by Meyer (1899) and Overton (1901) could be reproduced using a soluble protein. Until now, many proteins have been shown to contribute to general anaesthesia. Among them are γ -aminobutyric acid type A receptor ($GABA_A$), glutamate gated *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, and potassium and sodium channels (Mihic et al., 1997; Orser et al., 2002; Weir, 2006; Zhou et al., 2012; Herold and Hemmings, 2012.). Diethyl ether was shown to interact with $GABA_A$, NMDA receptors and the potassium channel TREK-1 in animals (Martin et al., 1995; Patel et al., 1999; Krasowski and Harrison, 2000; Zhou et al., 2012). However, the exact nature of general anaesthetic–protein interactions remains a mystery. Anaesthetics may bind to the preformed cavities on proteins by fitting into structurally compatible pockets (key-lock mechanism), causing structural perturbation to the protein channel. Volatile general anaesthetics may have not changed the structure of the membrane channel

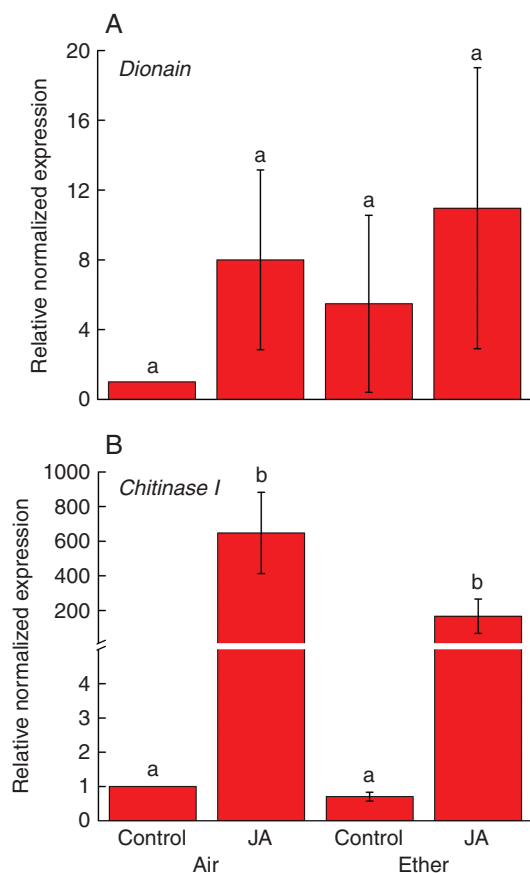


FIG. 5. Gene expression in response to exogenous application of 2 mM jasmonic acid (JA) after 7 h in the air or under diethyl ether in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). The plants were kept in the air or under diethyl ether for 2 h and then a few drops of JA were applied on the trap surface. The plants were kept in the same conditions for the next 7 h and the traps were then sampled for qPCR. (A) Relative expression of *dionain*. (B) Relative expression of *chitinase I*. Data show mean expression \pm s.e. from four biological replicates ($n = 4$). Different lower-case letters denote statistically significant differences at $P < 0.05$.

by a key-lock mechanism but by changing its dynamics by becoming an integral part of amphipathic domains where they can either disrupt the association of the channel with its surroundings or facilitate the formation of structured water clusters within the protein (Tang and Xu, 2002). Another proposed explanation is a combination of the lipid and protein hypotheses: anaesthetics alter the cell membrane properties and may distort the channel protein to block channel function (Lerner et al., 1997; Andersen and Koeppel, 2007).

Surprisingly, similar proteins that are suspected as possible targets of the volatile anaesthetic diethyl ether in animals and humans have also been discovered in plants, where they are also responsible for electrical signalling. First, glutamate receptor-like proteins (GLRs) in plants are the most closely related proteins to NMDA channels in mammals. They even share similar extensive sequence identity and secondary structure (Lam et al., 1998; Weiland et al., 2016). GLR3.3 and GLR3.6 are Ca^{2+} channels that mediate the propagation of wound-induced electrical and Ca^{2+} signals in *Arabidopsis* from damaged to

undamaged leaves (Mousavi et al., 2013; Salvador-Recatalà et al., 2014; Hedrich et al., 2016; Toyota et al., 2018). Moreover, glutamate, which acts as an excitatory neurotransmitter in the vertebrate central nervous system, accumulates in response to wounding in *Arabidopsis*, and GLRs act as sensors that convert the wound signal into an electrical signal that propagates to distant organs where defence responses are induced (Toyota et al., 2018). Salvador-Recatalà et al. (2014) and Hedrich et al. (2016) extended these studies and found that APs triggered by cold water and wounding are not inhibited in local leaves of *glr3.3* and *glr3.6* double mutants. Therefore, the elicitation and propagation of APs is independent of GLR3.3 and GLR3.6 in plants, and they are only important for channelling the signal to neighbouring systemic leaves. However, systemic electrical signals were not found in the Venus flytrap (Pavlovič et al., 2017). These findings are consistent with the results of De Luccia, (2012), who found that ketamine, which mediates anaesthesia by blockade of the NMDA receptor in animals, had no effect on the trap closing reaction in the Venus flytrap and closing leaflets in *M. pudica*.

In addition to Ca^{2+} influx, which is important for the initial depolarization during AP generation, efflux of Cl^- accelerates depolarization with the subsequent K^+ efflux/influx needed for repolarization (Felle and Zimmermann, 2007). The anion QUAC1-type channels and AKT2/3 and SKOR/GORK-type K^+ channels have been proposed to be involved in AP generation in plants (van Bel et al., 2014; Hedrich et al., 2016). Indeed, AKT2 modulates tissue excitability and GORK shapes APs in *Arabidopsis* (Cuin et al., 2018). Diethyl ether activated another potassium channel, TREK-1, causing hyperpolarization of the membrane in mammals and inhibiting excitability (Patel et al., 1999; Peyronnet et al., 2014). The most closely related proteins in plants are TPK potassium channels, which are known to be involved in mechanosensing and controlling membrane potential (Becker et al., 2004). The third receptor that was suspected to be a target of diethyl ether anaesthesia in animals is the GABA_A receptor. GABA is the main inhibitory neurotransmitter in the central nervous system of vertebrates and exerts its inhibitory effect by activating Cl^- currents through the GABA_A receptor, hyperpolarizing the membrane and inhibiting excitability. GABA_A receptor function is allosterically enhanced by diethyl ether and its halogenated derivatives (Krasowski and Harrison, 2000). Decades ago, GABA was shown to rapidly accumulate in plant tissue in response to different biotic and abiotic stresses, but its receptor was unknown. Recently, the first GABA receptor was found in plants and identified as aluminium-activated malate transporter (ALMT, Ramesh et al., 2015; Žárský, 2015). Activation of ALMT results in depolarization of the membrane, and inversely, GABA inhibition results in hyperpolarization of the membrane potentials, generating a state of low excitability (Žárský, 2015). Although the outcome is surprisingly similar to the effect of GABA on animal neurons, there is no sequence homology to the GABA_A receptor except for the small region responsible for the GABA interaction (Ramesh et al., 2015). This finding decreases the probability that diethyl ether may have the same effect on two unrelated proteins, even if it is only a positive allosteric modulator. As we lack exact data that would allow us to identify the molecular bases underlying the initiation and propagation of

APs in plants, it is impossible to identify the protein target of an anaesthetic on electrical signals in plants. Either other molecules represent targets of diethyl ether in plants or the membrane theories proposed by Meyer (1899), Overton (1901) and Lerner *et al.* (1997) are relevant in the case of plants as we supposed also in our previous study (Yokawa *et al.*, 2018).

There is an intriguing parallel to the effects of anaesthetics on animals and humans. Anaesthesia induces loss of responsiveness to environmental stimuli as well as loss of pain perception during surgical operation. Pain sensing in humans results from the action of prostaglandins on peripheral sensory neurons (nociceptors) and on central sites within the spinal cord and the brain (Funk *et al.*, 2001; Ricciotti and FitzGerald, 2011). Tissue injury triggers cyclooxygenase-2 (COX-2) in peripheral tissue to convert arachidonic acid to prostaglandin E2 (PGE2), resulting in stimulation/sensitizing of the nociceptor in peripheral nerves to send a signal for pain to the central nervous system. The oxylipin pathway leading to prostaglandin synthesis in animals is mimicked in plants by a similar pathway that leads to the synthesis of jasmonates (Pan *et al.*, 1998). We do not claim that plants feel pain, but accumulate structurally similar molecules as warning signals. We believe that the suppression of jasmonate accumulation under anaesthesia is mediated by the inhibition of electrical signalling, which is tightly coupled to the JA response in non-carnivorous plants (Mousavi *et al.*, 2013; Toyota *et al.*, 2018) and carnivorous plants (Böhm *et al.*, 2016a; Bemm *et al.*, 2016). However, the mechanism of action differs strongly between animals and plants. Whereas the production of oxylipins in plants is mainly downstream from electrical signalling, in animals, it is upstream (prostaglandins sensitize nociceptors for pain). Thus, under anaesthesia, the warning signal (prostaglandins) in animals can be synthesized but is not sensed; in plants, the warning signal (JA) is not synthesized at all. Because of this, exogenous application of JA under anaesthesia can bypass inhibited electrical signalling in plants and trigger the response (Fig. 5). Although wounding still slightly increased JA and JA-Ile accumulation under anaesthesia in this study (Fig. 3I, J), this increase probably did not reach the threshold level for activation of gene expression. This slight increase after wounding but not mechanostimulation can be explained by disruption of cell walls and release of cellular contents and signalling molecules which may activate JA biosynthesis directly or indirectly (Ellis *et al.*, 2002; Mielke and Gasperini, 2019). A further increase of JA level is mediated by Ca²⁺ which derepresses JA biosynthesis genes, and accumulated JA-Ile may then transcriptionally activate expression of JA biosynthesis genes by a positive feedback mechanism (Yan *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019). Ca²⁺ is involved in the generation of APs in Venus flytrap, and its increased level in the cytoplasm was detected after the third AP (Hodick and Sievers, 1988; Krol, 2006; Escalante-Pérez *et al.*, 2011). Therefore due to the inhibited APs, Ca²⁺ does not enter the cytoplasm, and this stage of JA accumulation is probably blocked under anaesthesia.

In conclusion, we have shown that the carnivorous plant Venus flytrap cannot sense its environment during anaesthesia with diethyl ether. This situation resembles the effect of general anaesthesia on animals and humans, resulting in a total lack of sensation. After removing the anaesthesia, the recovery of sensitivity is very fast. We have shown that one of the many possible

targets of anaesthetics are electrical signals (APs), which affect the later reactions, such as generation of warning signals (JA) and transcription of JA-responsive genes. Because jasmonates are important stress hormones that redirect gene expression from growth to defence (Pauwels *et al.*, 2009; Attaran *et al.*, 2014), the use of anaesthesia during vegetative propagation and plant manipulation in horticultural practice may be plausible, although more experimental studies with non-carnivorous plants are needed. The fact that anaesthesia inhibits electrical signal propagation not only in animals but also in plants, and that in both it affects their sensibility indicates a remarkable similarity between animals and plants.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at [https://academic.oup.com/aob](https://academic.oup.com/aob/advance-article-abstract/doi/10.1093/aob/mcz177/561149) and consist of the following. Figure S1: Timeline of experimental set-up for diethyl ether treatment. Figure S2: Comparison of action potentials triggered on the same plant by mechanostimulation and 200 s later by wounding. Figure S3: Time course of gene expression in response to mechanostimulation, wounding and external application of jasmonic acid over 48 h in the Venus flytrap. Figure S4: Protein profile and immunodetection of cysteine protease and VF-1 chitinase in the digestive fluid of the Venus flytrap after 48 h. Figure S5: Recovery of gene expression after anaesthesia in the Venus flytrap. Table S1: Primer sequences and their properties for the Venus flytrap. Movie S1: Mechanical stimulation of trigger hairs twice results in rapid trap closure in the Venus flytrap. Movie S2: The trap remains open after repeated mechanical stimulation of trigger hairs under anaesthesia with diethyl ether in the Venus flytrap. Movie S3: 700 s after removing of diethyl ether the trap reaction to mechanostimulation is restored in the Venus flytrap. Movie S4: Wounding the trap by needle triggers rapid trap closure in the Venus flytrap. Movie S5: The trap remains open after wounding under anaesthesia with diethyl ether in the Venus flytrap. Movie S6: 700 s after removal of diethyl ether the trap reaction to wounding is restored in the Venus flytrap.

FUNDING

This work was supported by the Czech Science Foundation Agency [project GAČR 16-07366Y] and Internal Grant Agency of Palacký University [projects IGA_PrF_2019_030 and IGA_PrF_2019_20]. This publication is also the result of the project implementation: Comenius University in Bratislava Science Park supported by the Research and Development Operational Programme funded by the ERDF [Grant number: ITMS 26240220086].

ACKNOWLEDGEMENTS

A.P. and F.B. designed the study, A.P. measured electrical signals, M.L. and B.B. performed qPCR, J.J., I.P. and O.N. performed phytohormone analysis, and A.P. wrote the manuscript and provided materials and financial support. All authors discussed the results and contributed to the manuscript. The authors declare no conflicts of interest.

LITERATURE CITED

- Andersen OS, Koeppe RE, 2nd. 2007. Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 36:107–130.
- Affolter JM, Olivo RF. 1975. Action potentials in Venus's-flytraps: long term observations following the capture of prey. *American Midland Naturalist* 93: 443–445.
- Attaran E, Major IT, Cruz JA, et al. 2014. Temporal dynamics of growth and photosynthesis suppression in response to jasmonate signaling. *Plant Physiology* 165: 1302–1314.
- Becker D, Geiger D, Dunkel M, et al. 2004. AtTPK4, an Arabidopsis tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 15621–15626.
- van Bel AJ, Furch AC, Will T, Buxa SV, Musetti R, Hafke JB. 2014. Spread the news: systemic dissemination and local impact of Ca²⁺ signals along the phloem pathway. *Journal of Experimental Botany* 65: 1761–1787.
- Bemm F, Becker D, Lariä C, et al. 2016. Venus flytrap carnivorous lifestyle builds on herbivore defense strategies. *Genome Research* 26: 812–825.
- Bernard C. 1878. *Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux*. (Librairie J.-B. Baillière et Fils).
- Böhm J, Scherzer S, Krol E, et al. 2016a. The Venus flytrap *Dionaea muscipula* counts prey-induced action potentials to induce sodium uptake. *Current Biology* 26: 286–295.
- Böhm J, Scherzer S, Shabala S, et al. 2016b. Venus Flytrap HKT1-Type Channel provides for prey sodium uptake into carnivorous plant without conflicting with electrical excitability. *Molecular Plant* 9: 428–436.
- Chini A, Fonseca S, Fernández G, et al. 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448: 666–671.
- Cuin TA, Dreyer I, Michard E. 2018. The role of potassium channels in *Arabidopsis thaliana* long distance electrical signalling: AKT2 modulates tissue excitability while GORK shapes action potentials. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 926.
- De Geyter N, Gholami A, Goormachtig S, Goossens A. 2012. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science* 17: 349–359.
- De Luccia TP. 2012. *Mimosa pudica*, *Dionaea muscipula* and anesthetics. *Plant Signaling & Behavior* 7: 1163–1167.
- Ellis C, Karafyllidis I, Wasternack C, Turner JG. 2002. The *Arabidopsis* mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *The Plant Cell* 14: 1557–1566.
- Escalante-Pérez M, Krol E, Stange A, et al. 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 USA* 108: 15492–15497.
- Felle HH, Zimmermann MR. 2007. Systemic signalling in barley through action potentials. *Planta* 226: 203–214.
- Floková K, Tarkowská D, Miersch O, Strnad M, Wasternack C, Novák O. 2014. UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry* 105: 147–157.
- Franks NP. 2008. General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nature Reviews Neuroscience* 9: 370–386.
- Franks NP, Lieb WR. 1984. Do general anaesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Nature* 310: 599–601.
- Fromm J, Lautner S. 2007. Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant, Cell and Environment* 30: 249–257.
- Funk CD. 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871–1875.
- Gibson TC, Waller DM. 2009. Evolving Darwin's 'most wonderful' plant: ecological steps to a snap-trap. *New Phytologist* 183: 575–587.
- Gilroy S, Suzuki N, Miller G, et al. 2014. A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends in Plant Science* 19: 623–630.
- Grémiaux A, Yokawa K, Mancuso S, Baluška F. 2014. Plant anesthesia supports similarities between animals and plants: Claude Bernard's forgotten studies. *Plant Signaling and Behavior* 9: e27886.
- Hatano N, Hamada T. 2008. Proteomic analysis of pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Journal of Proteome Research* 7: 809–816.
- Hatano N, Hamada T. 2012. Proteomic analysis of secreted protein induced by a component of prey in pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Journal of Proteomics* 75: 4844–4452.
- Hedrich R, Neher E. 2018. Venus flytrap: how an excitable, carnivorous plant works. *Trends in Plant Science* 23: 220–234.
- Hedrich R, Salvador-Recatalà V, Dreyer I. 2016. Electrical wiring and long-distance plant communication. *Trends in Plant Science* 21: 376–387.
- Herold KF, Hemmings HC. 2012. Sodium channels as targets for volatile anesthetics. *Frontiers in Pharmacology* 3, article 50.
- Hodick D, Sievers A. 1988. The action potential of *Dionaea muscipula* Ellis. *Planta* 174: 8–18.
- 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.
- Kiep V, Vadassery J, Lattke J, Maaß JP, Boland W, Peiter E, Mithöfer A. 2015. Systemic cytosolic Ca²⁺ elevation is activated upon wounding and herbivory in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 207: 996–1004.
- Krasowski MD, Harrison NL. 2000. The actions of ether, alcohol and alkane general anaesthetics on GABA_A and glycine receptors and the effects of TM2 and TM3 mutations. *British Journal of Pharmacology* 129: 731–743.
- Krausko M, Perutka Z, Šebela M, et al. 2017. The role of electrical and jasmonate signalling in the recognition of captured prey in the carnivorous sundew plant *Drosera capensis*. *New Phytologist* 213: 1818–1835.
- Krol E, Dziubinska H, Stolarz M, Trebacz K. 2006. Effects of ion channel inhibitors on cold- and electrically-induced action potentials in *Dionaea muscipula*. *Biologia Plantarum* 50: 411–416.
- Lam HM, Chiu J, Hsieh MH, et al. 1998. Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* 396: 125–126.
- Lerner RA. 1997. A hypothesis about the endogenous analogue of general anesthesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 13375–13377.
- Libiaková M, Floková K, Novák O, Slováková L, 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: e104424.
- MacIver BM, Tanelian DL. 1990. Volatile anesthetics excite mammalian nociceptor afferents recorded in vitro. *Anesthesiology* 72: 1022–1030.
- Maffei ME, Mithöfer A, Boland W. 2007. Before gene expression: early events in plant–insect interaction. *Trends in Plant Science* 12: 310–316.
- Martin DC, Plagenhoef M, Abraham J, Dennison RL, Aronstam RS. 1995. Volatile anesthetics and glutamate activation of *N*-methyl-D-aspartate receptors. *Biochemical Pharmacology* 49: 809–817.
- Mielke S, Gasperini D. 2019. Interplay between plant cell walls and jasmonate production. *Plant Cell and Physiology* (in press), doi:10.1093/pcp/pcz119.
- Meyer H. 1899. Zur Theorie der Alkoholnarkose. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 42: 109–118.
- Milne A, Beamish T. 1999. Inhalation and local anesthetics reduce tactile and thermal responses in *Mimosa pudica*. *Canadian Journal of Anesthesia* 46: 287–289.
- Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, et al. 1997. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature* 389: 385–389.
- Mousavi SAR, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S, Farmer EE. 2013. Glutamate receptor-like genes mediate leaf-to-leaf wound signals. *Nature* 500: 422–426.
- Nguyen CT, Kurenda A, Stolz S, Chételat A, Farmer EE. 2018. Identification of cell populations necessary for leaf-to-leaf electrical signaling in wounded plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 115: 10178–10183.
- Orser BA, Canning KJ, Macdonald JF. 2002. Mechanisms of general anesthesia. *Current Opinion in Anesthesiology* 15: 427–433.
- Overton CE. 1901. *Studien über die Narkose zugleich ein Beitrag zur Allgemeinen Pharmakologie*. Berlin: Fischer Verlag.
- Pan Z, Camara B, Gardner HW, Backhaus RA. 1998. Aspirin inhibition and acetylation of the plant cytochrome P450, allene oxide synthase, resembles that of animal prostaglandin endoperoxide H synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 18139–18145.
- Paszota P, Escalante-Pérez M, Thomsen LR, et al. 2014. Secreted major Venus flytrap chitinase enables digestion of arthropod prey. *Biochimica et Biophysica Acta* 1844: 374–383.
- Patel AJ, Honoré E, Lesage F, Fink M, Romey G, Lazdunski M. 1999. Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nature Neuroscience* 2: 422–426.
- Pauwels L, Inzé D, Goossens A. 2009. Jasmonate-inducible gene: what does it mean? *Trends in Plant Science* 14: 87–91.

- 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.
- Pavlovič A, Mithöfer A. 2019.** Jasmonate signalling in carnivorous plants: copycat of plant defence mechanisms *Journal of Experimental Botany* **70**: 3379–3389.
- Pavlovič A, Saganová M. 2015.** A novel insight into the cost–benefit model for the evolution of botanical carnivory. *Annals of Botany* **115**: 1075–1092.
- Pena-Cortés H, Albrecht T, Prat S, Weiler EW, Willmitzer L. 1993.** Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* **191**: 123–128.
- Peyronnet R, Tran D, Girault T, Frachisse J-M. 2014.** Mechanosensitive channels: feeling tension in a world under pressure. *Frontiers in Plant Science* **5**: 558.
- Ramesh SA, Tyerman SD, Xu B, et al. 2015.** GABA signalling modulates plant growth by directly regulating the activity of plant-specific anion transporters. *Nature Communication* **6**: 7879.
- Ricciotti E, FitzGerald GA. 2011.** Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **31**: 986–1000.
- Rinaldi A. 2014.** Reawakening anaesthesia research. *EMBO Reports* **15**: 1113–1118.
- Risør MW, Thomsen LR, Sanggaard KW, et al. 2016.** Enzymatic and structural characterization of the major endopeptidase in the Venus flytrap digestion fluid. *Journal of Biological Chemistry* **291**: 2271–2287.
- Saganová M, Bokor B, Stolárik T, Pavlovič A. 2018.** Regulation of enzyme activities in carnivorous pitcher plants of the genus *Nepenthes*. *Planta* **248**: 451–464.
- Salvador-Recatalà V, Tjallingii WF, Farmer EE. 2014.** Real-time, in vivo intracellular recordings of caterpillar-induced depolarization waves in sieve elements using aphid electrodes. *New Phytologist* **203**: 674–684.
- Schägger H. 2006.** Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* **1**: 16–22.
- Scherzer S, Böhm J, Krol E, et al. 2015.** Calcium sensor kinase activates potassium uptake systems in gland cells of Venus flytraps. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **112**: 7309–7314.
- Scherzer S, Krol E, Kreuzer I, et al. 2013.** The *Dionaea muscipula* ammonium channel DmAMT1 provides NH_4^+ uptake associated with Venus flytrap's prey digestion. *Current Biology* **23**: 1649–1657.
- Scherzer S, Shabala L, Hedrich B, et al. 2017.** Insect haptoelectrical stimulation of Venus flytrap triggers exocytosis in gland cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **114**: 4822–4827.
- Schulze WX, Sanggaard KW, Kreuzer I, et al. 2012.** The protein composition of the digestive fluid from the Venus flytrap sheds light on prey digestion mechanisms. *Molecular and Cellular Proteomics* **11**: 1306–1319.
- Sheard LB, Tan X, Mao H, et al. 2010.** Jasmonate perception by inositolphosphate-potentiated COI-JAZ co-receptor. *Nature* **468**: 400–407.
- Staswick PE, Tiryaki I. 2004.** The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**: 2117–2127.
- Tang P, Xu Y. 2002.** Large-scale molecular dynamics simulations of general anesthetic effects on the ion channel in the fully hydrated membrane: the implication of molecular mechanisms of general anesthesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**: 16035–16040.
- Thines B, Katsir L, Melotto M, et al. 2007.** JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**: 661–665.
- Toyota M, Spencer D, Sawai-Toyota S, et al. 2018.** Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science* **361**: 1112–1114.
- Volkov AG. 2019.** Signaling in electrical networks of the Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis). *Bioelectrochemistry* **125**: 25–32.
- Volkov AG, Adesina T, Markin VS, Jovanov E. 2008.** Kinetics and mechanism of *Dionaea muscipula* trap closing. *Plant Physiology* **146**: 694–702.
- Volkov AG, Carrell H, Baldwin A, Markin VS. 2009.** Electrical memory in Venus flytrap. *Bioelectrochemistry* **75**: 142–147.
- Wang J, Wu D, Wang Y, Xie D. 2019.** Jasmonate action in plant defense against insect. *Journal of Experimental Botany* **70**: 3391–3400.
- Weiland M, Mancuso S, Baluška F. 2016.** Signalling via glutamate and GLRs in *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology* **43**: 1–25.
- Weir CJ. 2006.** The molecular mechanisms of general anaesthesia: dissecting the GABA_A receptor. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* **6**: 49–53.
- Wildon DC, Thain JF, Minchin PEH, et al. 1992.** Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* **360**: 62–65.
- Yan C, Fan M, Yang M, et al. 2018.** Injury activates Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphorylation of JAV1-JAZ8-WRKY51 complex for jasmonate biosynthesis. *Molecular Cell* **70**: 136–149.
- Yokawa K, Kagenishi T, Baluška F. 2019.** Anesthetics, anesthesia, and plants. *Trends in Plant Science* **24**: 12–14.
- Yokawa K, Kagenishi T, Pavlovič A, et al. 2018.** Anaesthetics stop diverse plant organ movements, affect endocytic vesicle recycling and ROS homeostasis, and block action potentials in Venus flytraps. *Annals of Botany* **122**: 747–756.
- Zhou C, Liu J, Chen X-D. 2012.** General anesthesia mediated by effects on ion channels. *World Journal of Critical Care Medicine* **1**: 80–93.
- Žárský V. 2015.** Signal transduction: GABA receptor found in plants. *Nature Plants* **1**: article number 15115.

SUPPLEMENTARY DATA

Anaesthesia with diethyl ether impairs jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).

Andrej Pavlovič, Michaela Libiaková, Boris Bokor, Jana Jakšová, Ivan Petřík, Ondřej Novák, František Baluška

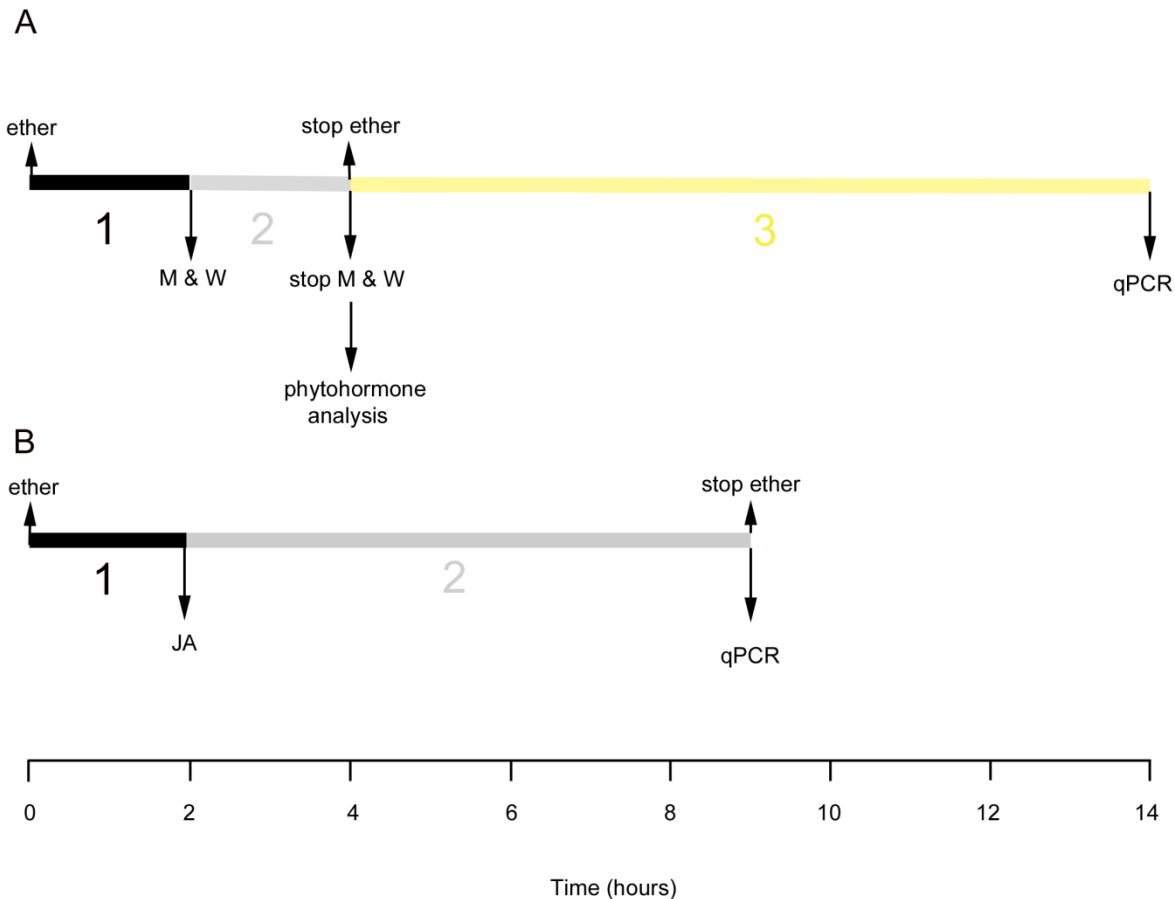


Fig. S1 Timeline of experimental setup for diethyl ether treatment. (A) The plants were anaesthetized for 2 hours with diethyl ether (black area, 1). Then the trap was mechanically stimulated or wounded (M & W) for the next two hours (grey area, 2). After 4 hours under anaesthesia including 2 hours of stimulation, the trap tissue was sampled for phytohormone analysis. Diethyl ether was removed and after 10 hours trap tissue for qPCR was sampled (yellow area, 3). (B) The plants were anaesthetized for 2 hours with diethyl ether (black area, 1). Then few drops of 2mM JA was applied on trap surface for the next seven hours (grey area, 2). Then the trap tissue was sampled for qPCR. For controls black (1) and grey (2) area is in the air. The non-stimulated control under diethyl ether was without any stimuli.

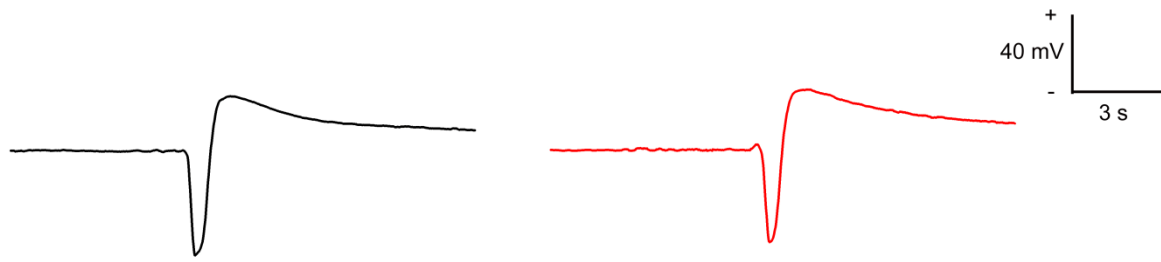


Fig. S2 Comparison of action potentials triggered on the same plant by mechanostimulation (black line) and 200 seconds after by wounding (red line). There are no significant differences between amplitude, half-width and overall shape of action potential triggered by different stimuli.

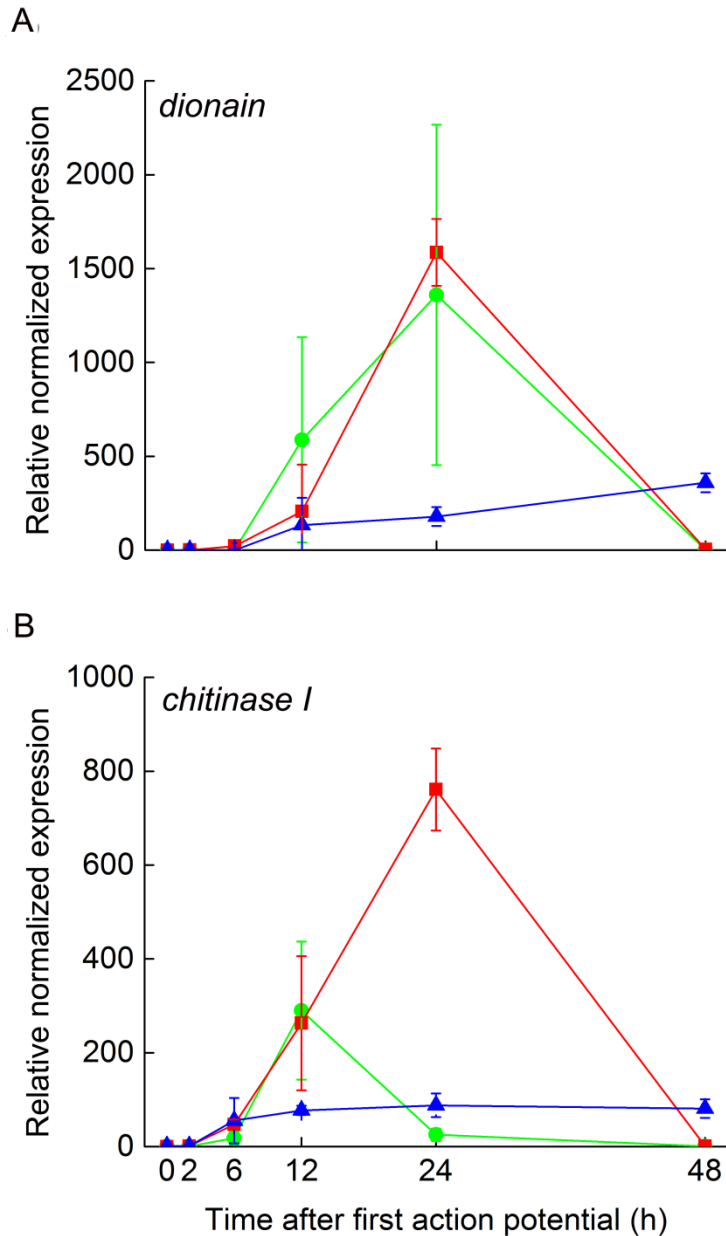


Fig. S3 Timecourse of gene expression in response to mechanostimulation, wounding and external application of jasmonic acid during 48 hours in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). The traps were 40-times mechanostimulated or pierced/wounded by needle within the first two hours. Jasmonic acid was applied during whole 48 hours. (A) Cysteine protease dionain, (B) type I chitinase. Mechanostimulation (green circle), wounding (red square), jasmonic acid (blue triangle). Gene expression for 0h (before any stimulation) was set as 1. Mean expression \pm S.E. from four biological replicates ($n = 4$).

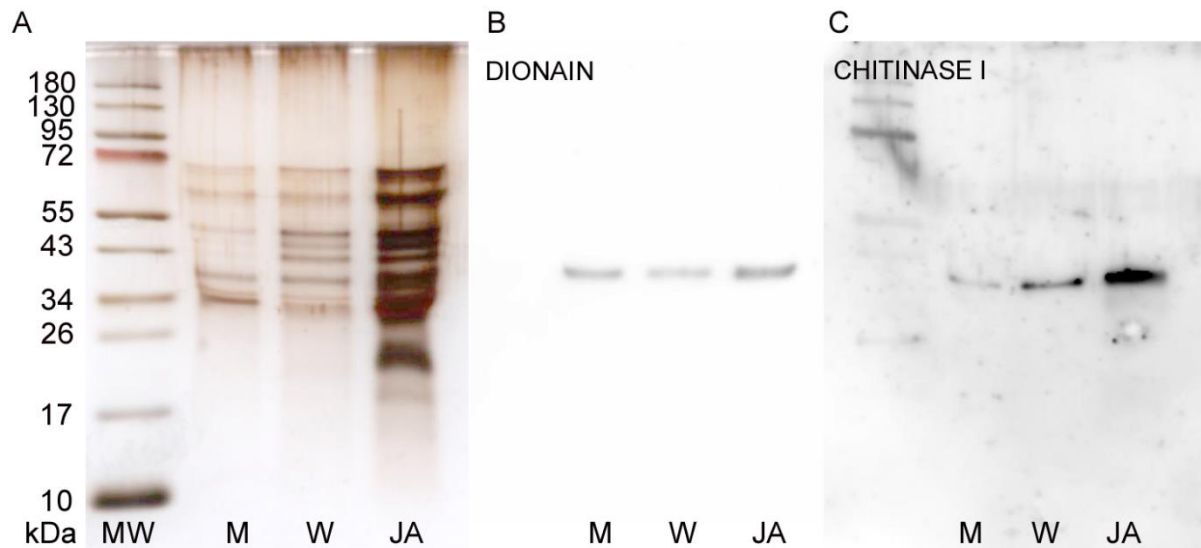


Fig. S4 Protein profile and immunodetection of cysteine protease (dionain) and VF-1 chitinase in the digestive fluid of the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*) after 48 hours. The digestive fluid was collected 48 h after induction, and the proteins were separated in 10% (v/v) SDS polyacrylamide gel and subjected to Western blot analysis. (A) Silver-stained SDS-PAGE of the digestive fluid in response to different stimuli. (B) Western blot analysis of cysteine protease dionain using a protein-specific antibody. (C) Western blot analysis of type I chitinase using a protein-specific antibody. MW, molecular weight; M, mechanical stimulation; W, wounding; JA, 2mM jasmonic acid. The same volume (8 μ l) of secreted digestive fluid was loaded. The blots shown are representative of three independent experiments.

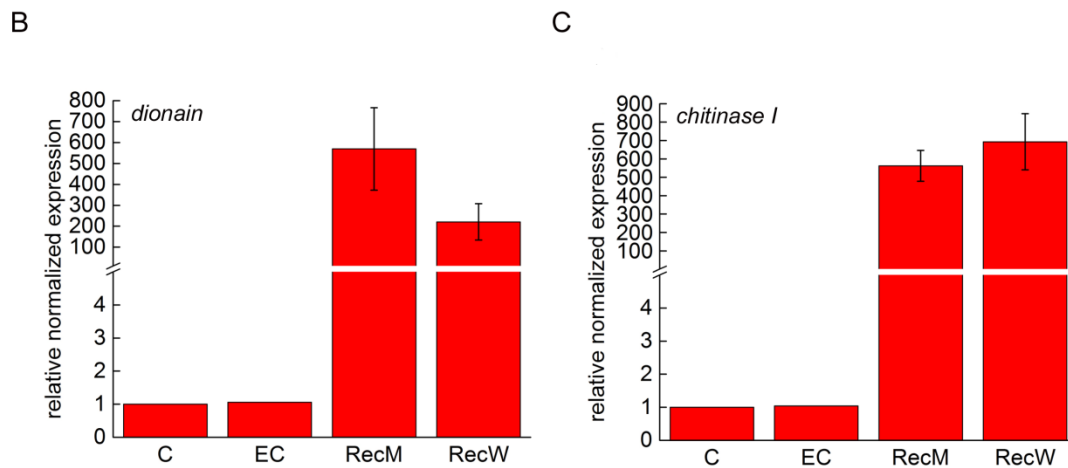
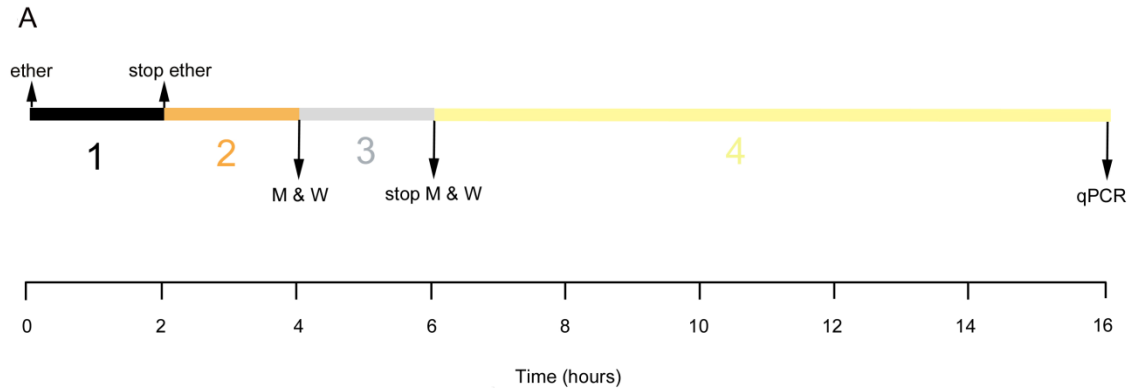


Fig. S5 Recovery of gene expression after anaesthesia in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). (A) Timeline of experimental setup for recovery experiments. The plants were anaesthetized for 2 hours with diethyl ether (black area, 1). For recovery, the diethyl ether was removed and plants were kept 2 hours in the air (orange area, 2). Then the traps were mechanically stimulated or wounded (M & W) for the next two hours (grey area, 3). After 10 hours, the trap tissue was sampled for qPCR (yellow area, 4). (B) Relative expression of cysteine protease *dionain*. (C) Relative expression of type I chitinase. Mean expression \pm S.E., $n = 4$. C – control in the air, EC – control in diethyl ether, RecM – recovery after mechanostimulation, RecW – recovery after wounding.

Table S1 Primer sequences and properties for the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).

T_a – annealing temperature.

Primer / accession number	Product size (bp)	Primer sequence (5' - 3' direction)	T _a (°C)
<i>actin</i> / KC285589.1.	212	Forward: TCTTTGATTGGGATGGAAGC Reverse: CTCTCTGGAGGAGCAACCAC	58
<i>dionain I</i> / KP663370.1	161	Forward: ATGGGGCGATGATGATCTTA Reverse: CTTCTCCGCATCATCCTTGT	58
<i>chitinase I</i> / KF597524.1	207	Forward: GCTCTGCATTTACCCGTTTT Reverse: ACAATGGAGCCAACATCACC	58

Movie S1 Mechanical stimulation of trigger hairs twice results in rapid trap closure in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).

Movie S2 The trap remains open after repeated mechanical stimulation of trigger hairs under anaesthesia with diethyl ether in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).

Movie S3 700 seconds after removing of diethyl ether the trap reaction to mechanostimulation is restored in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).

Movie S4 Wounding the trap by needle triggers rapid trap closure in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).

Movie S5 The trap remains open after wounding under anaesthesia with diethyl ether in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).

Movie S6 700 seconds after removing of diethyl ether the trap reaction to wounding is restored in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).

Publikace VI.

**Anaesthetic diethyl ether impairs systemic electrical and jasmonate signalling in
*Arabidopsis thaliana***

Název: Anaesthetic diethyl ether impairs systemic electrical and jasmonate signalling in *Arabidopsis thaliana*

Autoři: Jakšová J., Rác M., Bokor B., Petřík I., Novák O., Reichelt M., Mithöfer A., Pavlovič A.

Status: publikováno v roce 2021 v Plant Physiology and Biochemistry
DOI: 10.1016/j.plaphy.2021.11.019

Souhrn:

Celková těkavá anestetika (CTA) inhibují šíření elektrického signálu v živočišných neuronech. Ačkoli rostliny nemají neurony, rostlinné buňky mají mnoho vlastností, které byly původně přisuzovány jen neuronům, včetně excitabilních plazmatických membrán s napěťově řízenými iontovými kanály, které stojí za generací pro rostlinu specifických elektrických potenciálů a recyklací endocytických vezikul, která je podobná té na synapsích živočichů. Rostliny využívají i identické molekuly k neurotransmiterům v našem mozku (např. glutamát)

V této publikaci jsme se zaměřili na efekt CTA dietyléteru na systémový elektrický signál a po něm následující reakce v huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*). Zjistili jsme, že šíření elektrického signálu a doprovázející vápníkové vlny do sousedních systémových listů byly dietyléterem zcela potlačeny. Souběžně se v systémových listech nezvýšila ani hladina jasmonátů a exprese genů závislých na jasmonátech (*AOS*, *OPR3*, *JAZ10*) tam také nebyla detekována. Vysoké hladiny jasmonátů a transkriptů indukovatelné kyselinou jasmonovou se ale stále vyskytovaly v poškozených lokálních listech.

Fakt, že CTA inhibují šíření elektrického signálu nejen u zvířat, ale také u rostlin je velmi zajímavý. Buněčná odpověď je ale zcela blokována pouze u systémových listů; lokální poškozený list stále reaguje na škodlivé podněty. Protože systémové šíření elektrického signálu u huseníčku závisí na kanálech podobných glutamátovým receptorům (*glutamate receptor-like*; GLR) u živočichů, mohl by dietyléter nescificky mířit právě na něj. To dokazuje také experiment, ve kterém byla ukázána inhibice elektrické signalizace vyvolána glutamátem pod vlivem dietyléteru. Nicméně generace elektrických signálů v lokálních listech, která byla CTA také inhibována, je nezávislá na GLR, což může naznačovat, že účinek dietyléteru není specifický pouze pro GLR kanály. To upřednostňuje Mayerovu a Overtonovu lipidovou teorii a její modifikace, která říká, že anestetika mohou cílit na plazmatickou membránu a ovlivňovat různé funkce kanálů, na rozdíl od proteinové teorie, kde anestetika působí přímou vazbou na konkrétní protein.

Příspěví autorů:

Výzkum:

- příprava a odebírání materiálů pro měření: J. Jakšová
- měření elektrických signálů: J. Jakšová
- měření luminiscence aequorinu: M. Rác, A. Pavlovič, J. Jakšová
- měření ultra-slabé fotonové emise: M. Rác, A. Pavlovič, J. Jakšová
- kvantifikace fytohormonů: J. Jakšová, I. Petřík, O. Novák
- kvantifikace volných aminokyselin: J. Jakšová, M. Reichelt
- měření genové exprese s použitím qPCR: J. Jakšová, B. Bokor

Konceptualizace: A. Pavlovič

Supervize: A. Pavlovič, A. Mithöfer, O. Novák

Vizualizace: J. Jakšová, A. Pavlovič

Statistická analýza: J. Jakšová, A. Pavlovič

Psaní – původní rukopis: J. Jakšová, A. Pavlovič

Psaní – editace: A. Mithöfer

Získání financování: A. Pavlovič, A. Mithöfer

Podíl J. Jakšové: 50 %



Anaesthetic diethyl ether impairs long-distance electrical and jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*

Jana Jakšová^a, Marek Rác^a, Boris Bokor^{b,c}, Ivan Petřík^d, Ondřej Novák^d, Michael Reichelt^e, Axel Mithöfer^f, Andrej Pavlovič^{a,*}

^a Department of Biophysics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, CZ-783 71, Olomouc, Czech Republic

^b Department of Plant Physiology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Ilkovičova 6, Mlynská dolina B2, SK-842 15, Bratislava, Slovakia

^c Comenius University Science Park, Comenius University in Bratislava, Ilkovičova 8, SK-841 04, Bratislava, Slovakia

^d Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University and Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences, Šlechtitelů 27, CZ-783 71, Olomouc, Czech Republic

^e Department of Biochemistry, Max Planck Institute for Chemical Ecology, Hans-Knöll-Straße 8, D-07745, Jena, Germany

^f Research Group Plant Defense Physiology, Max Planck Institute for Chemical Ecology, Hans-Knöll-Straße 8, D-07745, Jena, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Anaesthesia
Arabidopsis thaliana
Calcium
Electrical signal
Heat wounding
Jasmonic acid

ABSTRACT

General volatile anaesthetics (GVA) inhibit electrical signal propagation in animal neurons. Although plants do not have neurons, they generate and propagate electrical signals systemically from a local damaged leaf to neighbouring leaves. This systemic electrical signal propagation is mediated by ligand-gated glutamate receptor-like (GLR) channels. Here, we investigated the effect of GVA diethyl ether on the systemic electrical and further downstream responses in *Arabidopsis thaliana*. We monitored electrical signals, cytoplasmic Ca^{2+} level ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$), ultra-weak photon emission, amino acid contents, phytohormone response as well as gene expression in response to heat wounding during diethyl ether anaesthesia. We found complete suppression of electrical and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ signal propagation from damaged leaf to neighbouring systemic leaves upon diethyl ether treatment. Concomitantly, jasmonates (JAs) did not accumulate and expression of JA-responsive genes (*AOS*, *OPR3*, *JAZ10*) was not detected in systemic leaves. However local damaged leaves still showed increased $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ and accumulated high level of JAs and JA-inducible transcripts. An exogenously added GLR ligand, L-glutamate, was not able to trigger Ca^{2+} wave in etherized plants indicating that GLRs are targeted by diethyl ether, but not specifically. The fact that GVA inhibit electrical signal propagation not only in animals but also in plants is intriguing. However, the cellular response is completely blocked only in systemic leaves; the local damaged leaf still senses damaging stimuli.

1. Introduction

Plants are sessile organisms permanently exposed to environmental stimuli and have evolved mechanisms how to rapidly respond to cues like changes in temperature, light, touch or wounding. The plasma membrane is the first sensing element able to recognize environmental changes and triggers downstream cascades of cellular events. Electrical signals and membrane depolarization are among the first cellular responses (Maffei et al., 2007). They can propagate through the entire

plant from the point of origin in so called systemic response (Mousavi et al., 2013). Currently we recognize three types of electrical signals in plants: action (AP) and variation potentials (VP, or slow wave potential SWP) which depolarize the membrane (Fromm and Lautner, 2007). The third one - system potentials (SP) – is a self-propagating hyperpolarization of membrane recognized and characterized by Zimmermann et al. (2009, 2016). The APs usually have an all-or-nothing character, that is, after a stimulus reaches a certain threshold (which leads to membrane depolarization), further increases in stimulus strength do not

Abbreviations: ABA, abscisic acid; AP, action potential; GABA, γ -aminobutyric acid; *cis*-OPDA, *cis*-12-oxo-phytyldienoic acid; GVA, general volatile anaesthetic; GLR, glutamate receptor like channel; JA, Jasmonic acid; JA-Ile, isoleucine conjugate of jasmonic acid; LA, α -linolenic acid; NMDA, N-methyl-D-aspartate; SA, salicylic acid; SP, system potential; SWP, slow wave potential; VP, variation potential.

* Corresponding author.

E-mail address: andrej.pavlovic@upol.cz (A. Pavlovič).

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.11.019>

Received 4 October 2021; Received in revised form 5 November 2021; Accepted 11 November 2021

Available online 16 November 2021

0981-9428/© 2021 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

change its amplitude and shape. In contrast to APs, in VPs the amplitude varies with the intensity of the stimulus and appears to be a local change to a hydraulic pressure wave. It can be generated by wounding, organ excision or flaming, and was studied in numerous plant species (Mancuso, 1999; Koziolek et al., 2004; Lautner et al., 2005; Fromm and Lautner, 2007; Farmer et al., 2014; Krausko et al., 2017; Sukhova et al., 2018). Recent studies have shown that the SWP can be a composite signal with AP, VP and SP components (Zimmermann et al., 2016; Farmer et al., 2020). The strength of physiological response depends on number and frequency of the stimulus in the case of AP, or on amplitude in the case of VP (Fromm and Lautner, 2007; Böhm et al., 2016). Physiological response to SP has not been studied yet (Zimmermann et al., 2016).

Recent studies showed remarkable similarity between signaling in animal nervous system and systemic plant signaling. In *Arabidopsis thaliana*, glutamate, which acts as an excitatory neurotransmitter in the vertebrate nervous system, leaks or is actively released from damaged plant cells upon wounding and activates glutamate receptor-like (GLR) proteins GLR3.3 and GLR3.6, which are localized in vascular tissue (Nguyen et al., 2018; Toyota et al., 2018; Shao et al., 2020). Another possibility of GLR channel activation can be radial pressure changes dependent on the release of xylem water column tension upon wounding (Farmer et al. 2014, 2020), because GLR3.3 channels can also be activated without any ligand binding (Wudick et al. 2018). Anyway, in *Arabidopsis* GLRs from a family of cation-permeable ion channels act as sensors that convert the wound signal into an electrical and Ca^{2+} signals (Mousavi et al., 2013; Toyota et al., 2018; Shao et al., 2020). The GLR3.3 and GLR3.6 are indispensable in systemic propagation (to neighbouring leaves) of electrical SWP and Ca^{2+} signals, as *glr3.3* and *glr3.6* double mutant has impaired systemic electrical and Ca^{2+} signal propagation (Mousavi et al., 2013; Salvador-Recatalà et al., 2014; Nguyen et al., 2018; Toyota et al., 2018; Shao et al., 2020). At all leaves that received the electrical and Ca^{2+} signals, phytohormones of the jasmonate class accumulated within few minutes (Mousavi et al., 2013; Gilroy et al., 2016). Jasmonic acid (JA) is synthesized in chloroplast by oxygenation of α -linolenic acid (LA) and further conversion into a cyclic *cis*-(+)-12-oxo-phytodienoic acid (*cis*-OPDA) intermediate. The *cis*-OPDA is translocated to peroxisome for subsequent reduction by OPDA reductase 3 (OPR3) and β -oxidation to produce JA (Wasternack and Hause, 2013). Pharmacological studies showed tight connection between increased cytoplasmic Ca^{2+} level and JA accumulation (Fisahn et al., 2004). A possible link may be the activation of 13-lipoxygenase LOX6 by Ca^{2+} , catalyzing JA precursor synthesis and, thus, contributing to rapid JA synthesis in systemic leaves (Chauvin et al., 2013; Farmer et al., 2020). Another way of activation of JA biosynthesis genes is by Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphorylation of the JAV1-JAZ8-WRKY5 repressor complex (Yan et al., 2018). On the other hand, wounding itself may trigger accumulation of JAs by releasing of cell wall fragments or LA from galactolipids in plastid membranes (Mielke and Gasperini, 2019). Whichever is the origin of JA, it is conjugated with isoleucine (Ile) by jasmonoyl-L-amino acid synthetase (JAR1) in cytoplasm, forming the bioactive compound: isoleucine conjugate of jasmonic acid (JA-Ile, Staswick and Tiryaki, 2004). In the nucleus, binding of JA-Ile to CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1) as part of the receptor complex mediates an ubiquitin-dependent degradation of JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) repressors, resulting in the activation of jasmonate-dependent gene expression (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Fonseca et al., 2009; Sheard et al., 2010).

General volatile anaesthetics (GVA) are usually defined as compounds which induce reversible loss of consciousness in humans (Franks, 2006). In fact, the term anaesthesia was coined to describe what happens during the process of etherisation and diethyl ether dominated general anaesthesia for the first 100 years of its existence (for review see: Urban and Bleckwenn, 2002). However such narrow definition is applicable only for subset of organisms with cortical networks. Organisms such as single cell *Paramecium* and plants can be also anaesthetized

but we cannot consider them as conscious (Taiz et al., 2019; Draguhn et al., 2020). Therefore, Kelz and Mashour (2019) suggested to define GVA as compounds which cause disconnection from environment what is much more suited for whole range of organisms including plants. Claude Bernard (1878) was the first who performed many anaesthesia experiments on plants. Several studies have shown that plants exposed to diethyl ether anaesthesia were not able to sense mechanical stimuli, wounding or light and lack also expressive motoric responses (e.g. leaf and trap closing reactions in sensitive plant *Mimosa pudica* and carnivorous plants *Dionaea muscipula*, *Drosera capensis*; tendrils of pea (*Pisum sativum*) completely stopped their autonomous circumnutations, Bernard 1878; Milne and Beamish 1999; De Luccia 2012; Yokawa et al., 2018). Only recently, we have shown that general anaesthetic diethyl ether inhibited one of the well defined electrical signal in plants - APs in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*), a remarkably similar to the effect of anaesthesia on neuronal pathway in animals (Yokawa et al., 2018; Pavlović et al., 2020; Böhm and Scherzer, 2021). Because the Venus flytrap co-opted plant defense mechanism for botanical carnivory, as a result of inhibited electrical signals, the plant does not activate jasmonate signaling and expression of digestive enzymes (Pavlović et al., 2020). However propagation of AP is not systemic in Venus flytrap (Pavlović et al., 2017) in contrast to systemic propagation of VPs and SPs in *A. thaliana* (Mousavi et al., 2013). Due to the different types of electrical signals and their systemic propagation in *A. thaliana*, we were interested if the same GVA diethyl ether would be able to inhibit systemic long-distance electrical signaling in non-carnivorous plant. We took advantage of the model plant *A. thaliana*, where in contrast to *D. muscipula*, the molecular mechanisms involved in long-distance electrical signaling have been elucidated recently (Mousavi et al., 2013; Toyota et al., 2018). In this study we investigated the effect of GVA diethyl ether on local and systemic electrical and jasmonate signaling in *A. thaliana* in response to heat wounding. We found different effect of anaesthesia on jasmonate signaling in both local and systemic leaves, indicating different origins of such signals in local and distal leaves. Moreover, we provided further evidence for link between electrical and jasmonate response in plants with use of methods other than molecular biology.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and culture conditions

Six weeks old *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Columbia-0 wild-type and transgenic *A. thaliana* (L.) Heynh. Columbia-0, expressing the *APOAEQUORIN* gene under control of the CaMV 35S promoter, were grown on a soil substrate (Potgrond H; Klasmann-Deilmann GmbH) in a growth chamber (AR75L; Percival-Scientific; USA) set to a 8 h: 16 h photoperiod at $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 21 °C: 21 °C, day: night, and 60% relative air humidity.

2.2. Experimental setup

Before all experiments, the individual leaves of the *Arabidopsis* rosettes were numbered according to their phyllotactic sequence, beginning with the youngest leaves at the centre of the rosette and proceeding towards the oldest leaf (Fig. S1). To investigate influence of anaesthetic on local and systemic signaling, the plants were incubated in the air or in 15% diethyl ether (Sigma Aldrich, USA, Catalog No. 309966) for 2.5 h in a polypropylene bag or beaker, sufficient to anaesthetize the plants as was found in Yokawa et al. (2018). Thereafter, local leaf (number 8) was wounded across a midrib with tweezers which had been previously red-hot with a lighter (hereinafter referred to as heat wounding). For this, the polypropylene bag was opened and closed very quickly or in the case of measuring electrical signals, a small opening in the polypropylene bag was made by scissors. Systemic reactions were investigated in adjacent leaf ($n + 5$), which shares direct vascular connections

by parastichies to the local leaf, and the opposite leaf ($n + 4$) without any vascular connections (Dengler, 2006). One group of non-damaged etherized plants was removed from the diethyl ether in the bag for 1 h to allow the plants to recover from anaesthesia and local leaf was heat wounded as described above. The local (leaf 8), adjacent ($n + 5$) and opposite ($n + 4$) leaves from each groups of plants were sampled for phytohormone and amino acid analyses, and quantitative PCR (qPCR) at 1 h after heat wounding. This time point was chosen based on previous publications to best capture jasmonate response in systemic leaf (Mousavi et al., 2013; Floková et al., 2014; Ishimaru et al., 2016). Control plants and anaesthetized non-stimulated plants were also harvested for phytohormone analysis and qPCR at the same time points. For each method, different groups of plants were used because wounding during sampling could activate the jasmonate signaling pathway (for experimental setup see Fig. S2).

For glutamate experiments, 75 mM L-glutamic acid (Sigma Aldrich, USA, Catalog No. G1251) was dissolved in distilled water and the pH was adjusted to 5.5. At this pH the L-glutamate anion is formed and it was applied to a cut surface of leaf 20 min after cutting the apical part of the leaf in control, etherized and recovered plants. This pre-cutting was necessary to allow reproducible access of the compounds to the leaf interior according to Toyota et al. (2018).

2.3. Extracellular measurements of electrical signals

For surface potential recordings, a non-invasive non-polarizable Ag–AgCl electrodes were used (Scanlab systems, Prague, Czech Republic) and moistened with a drop of conductive EV gel (Hellada, Prague, Czech Republic) commonly used in electrocardiography. Electrodes were placed at the base of leaf blade in local, adjacent and opposite leaves, always at the midrib. The apical part of the local leaf was wounded with red-hot tweezers. The electrical signals were recorded inside a Faraday cage according to Hlaváčková et al. (2006) and Ilík et al. (2010).

2.4. Aequorin luminescence imaging

Transgenic *A. thaliana* (L.) Heynh. Col-0 wild-type expressing the APOAEQUORIN gene under control of the CaMV 35S promoter, was used for monitoring cytosolic free calcium $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Kiep et al., 2015). Aequorin was reconstituted by spraying plants with 10 μ M coelenterazine (Invitrogen, Eugene, OR, USA, Catalog No. C2944) in 0.01% Tween 20 (Sigma Aldrich, UK, Catalog No. 93773) and subsequent incubation for 6 h in the dark. Aequorin luminescence imaging was performed using a highly sensitive CCD camera VersArray 1300B (Princeton Instruments, Trenton, NJ, USA). To reduce the dark current, CCD camera was cooled down to -110 °C using a liquid-nitrogen cooling system. The CCD camera was equipped with a 50-mm focal distance lens with a f-number of 1.2 (Nikon, Tokyo, Japan) to enhance the light collecting efficiency. Spectral sensitivity of CCD camera was within the range of $\lambda = 200$ –1000 nm with almost 90% quantum efficiency in the visible range of the spectrum. The spectral sensitivity was limited to $\lambda = 350$ –1000 nm by the lenses. CCD camera parameters were as follows: scan rate, 100 kHz; gain, 2. Photons were captured in photon-counting mode with a 10 s acquisition time. Signal acquisition and processing were performed with Win View (Princeton Instruments, Trenton, NJ, USA) and ImageJ 1.49 (NIH, USA), respectively. After each treatment remaining aequorin was discharged by spraying the rosette with discharge solution (1 M $CaCl_2$ in 10% ethanol) while imaging aequorin luminescence with 1 min acquisition time. The CCD camera was situated in the experimental dark room ($3 \times 1.5 \times 2.5$ m) painted in black. The door in the experimental dark room was protected completely with a black curtain to restrict any external light. All experiments were repeated several times to ensure reproducibility.

2.5. Imaging of ultra-weak photon emission

The same CCD camera VersArray 1300B (Princeton Instruments, Trenton, NJ, USA) was used also for the ultra-weak photon imaging (Rastogi et al., 2014). To reduce the dark current, CCD camera was cooled down to -110 °C using a liquid-nitrogen cooling system. CCD camera parameters for ultra-weak photon emission imaging were set up as follows: scan rate, 100 kHz; gain, 2; and acquisition time, 30 min.

2.6. Quantification of phytohormones

Quantification of phytohormones was performed according to the method described by Floková et al. (2014), modified for single leaf. Briefly, local, adjacent and opposite leaves were harvested from each group of plants 1 h after treatment (see Fig. S2), frozen in liquid nitrogen and stored in -80 °C. Frozen plant material was homogenized and 3–15 mg, depending on leaf size, were extracted using 1 mL of ice cold 10% MeOH/H₂O (v/v). A cocktail of stable isotope-labelled standards was added as follows: 10 pmol of [²H₆]JA, [²H₅]OPDA, [²H₆]ABA, [¹³C₆]IAA, 0.1 pmol of [²H₂]JA-Ile and 20 pmol of [²H₄]SA (Catalog No. 036 2821, 036 6191, 034 2721, 031 7331, 036 6861, 037 6581, respectively, all from Olchemim Ltd, Olomouc, Czech Republic) per sample to validate the LC-MS/MS method. The extracts were purified using Oasis® HLB columns (30 mg/1 mL, Catalog No. WAT094225, Waters) and hormones were eluted with 80% methanol. Eluent was evaporated to dryness under a stream of nitrogen. Phytohormone levels were determined by ultra-high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) using an Acquity UPLC I-Class System (Waters, Milford, MA, USA) equipped with an Acquity UPLC CSH C18 column (100 \times 2.1 mm; 1.7 μ m; Waters) coupled to a triple quadrupole mass spectrometer Xevo TQ-S MS (Waters MS Technologies, Manchester, UK). All samples were analyzed in four biological and two technical replicates.

2.7. Quantification of amino acids

Extraction and quantification of free amino acids was performed according to the method described by Scholz et al. (2015, 2017) and Crocoll et al. (2016) modified for single leaf. The single leaves were cut, immediately frozen in liquid nitrogen and 50–200 mg was weighted depending on the size of the leaf. The leaf material was homogenized in a Geno/Grinder® 2010 (Spex Sample Prep, Stanmore, UK) equipped with aluminium racks. The racks were cooled in liquid nitrogen prior to usage to prevent a thawing of leaf material during the whole homogenization process. The amino acids (including GABA) were extracted with 1 mL of methanol on ice. Ten microliters of the resulting extract was diluted in a ratio of 1:20 (v:v) in water containing the ¹³C, ¹⁵N labelled amino acid mix (algal amino acids ¹³C, ¹⁵N, Isotec, Miamisburg, USA, Catalog no. 487910, at a concentration of 10 μ g of the mix per mL) and 5 μ M (Indol-D5)-L-tryptophan (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA). The concentration was analyzed by LC-MS/MS according to previous studies (Crocoll et al., 2016; Scholz et al., 2015) with some modifications. A QTRAP6500 tandem mass spectrometer (AB Sciex, Darmstadt, Germany) was operated in positive ionization mode with multiple reaction monitoring (MRM) to monitor analyte parent ion \rightarrow product ion: γ -aminobutyric acid (GABA) (m/z 104.1 \rightarrow 87.0; DP 20, CE 17); this MRM is specific for GABA and does not detect any α -aminobutyric acid, for all other amino acids see Suppl. Table 1. Individual amino acids in the sample were quantified by the respective ¹³C, ¹⁵N-labeled amino acid internal standard, except for GABA, tryptophan, and asparagine: GABA was quantified using ¹³C, ¹⁵N-Ala applying an experimentally determined response factor of 1.0; tryptophan was quantified using (Indol-D5)-L-tryptophan (in MRM modus this generates three different fragments with different degrees of isotopic labelling: m/z 193, m/z 192; m/z 191; the sum of the three signals is used); asparagine was quantified using ¹³C, ¹⁵N-Asp applying a response

factor of 1.0.

2.8. Real time polymerase chain reaction (qPCR)

Local, adjacent and opposite leaves were harvested 1 h after treatment, frozen in liquid nitrogen and stored in -80°C before gene expression analyses (see Fig. S2). Extraction of total RNA was done according to Jakšová et al. (2020) with minor modifications. Briefly, RNA was extracted using Spectrum Plant Total RNA kit (Sigma–Aldrich, USA, Catalog No. STRN50) and DNase I treated and purified by RNA Clean & Concentrator kit (Zymoresearch, USA, Catalog No. R1013) according to manufacturer's instructions. The integrity of RNA was checked by agarose (1%) gel electrophoresis. The concentration and sample purity were measured by NanoDrop™ 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Germany). The synthesis of first strand of cDNA was performed by iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD, Catalog No. 1708890) using manufacturer's protocol. A control without reverse transcriptase was done for each sample to determine traces of genomic DNA. cDNA samples were 10-times diluted prior to qPCR run.

For real time PCR, specific gene sequences were amplified by Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Catalog No. K0221). Primers for amplification of housekeeping gene sequence (*ubiquitin-conjugating enzyme - UBC21*) and sequence for gene of interest (*JASMONATE-ZIM DOMAIN 10*, *JAZ10*; *OPDA REDUCTASE 3*, *OPR3*; *ALLENE OXIDE SYNTHASE*, *AOS*) were used according to Mousavi et al. (2013) and Chini et al. (2018), (Suppl. Table 2). We determined the stability of reference gene, prior to the gene expression evaluation, by the BestKeeper tool (Pfaffl et al., 2004) using C_T values of all treatments used in this study. This analysis showed that UBC21 is stably expressed and thus suitable as a reference gene (low (<1) SD of the C_T and a low SD (<2) of the fold change of gene expression). Real time PCR reactions were performed in 96-well plates on Light Cycler II 480 (Roche) device and the relative changes in gene expression were estimated according to Pfaffl (2001). Melt curve analysis of qPCR products was included at the end of each qPCR run to verify product specificity. All samples for PCR experiments were analyzed in three biological and three technical replicates.

2.9. Statistical analyses

All data are from biological replicates and each biological sample was analyzed in three or four technical replicates. Before statistical analyses, the data were tested for homogeneity of variance (Brown-Forsythe test). If the homogeneity was fulfilled, one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-hoc test was used (Origin 8.5.1, Northampton, MA, USA). If homogeneity was not present multiple comparisons by Welch's test with Bonferroni corrected alpha was used (Microsoft Excel).

3. Results

3.1. Anaesthesia completely inhibits systemic electrical signaling

To investigate the local and systemic electrical signal propagation under diethyl ether treatment, we attached first electrode on local leaf and two more electrodes on systemic leaves, adjacent ($n + 5$) and opposite ($n + 4$), always at the midrib (Fig. S1). Heat wounding in local leaf induced the hyperpolarization of the membrane potential (negative voltage shift recorded extracellularly, representing intracellular depolarization), representing SWP (but showing its composite character with VP, AP and SP components). Within several seconds after heat wounding, the electrical signal was transmitted to systemic leaves. In opposite unwounded systemic leaf, only depolarization (representing intracellular hyperpolarization) was recorded, representing SP. In adjacent systemic leaf, the surface potential recorded was more complex. First, transient depolarization (representing intracellular hyperpolarization)

with subsequent hyperpolarization (representing intracellular depolarization) was recorded, or in some cases the initial depolarization was absent (red line in Fig. 1A). After 2.5 h under diethyl ether, electrical signal in local leaf was either not detected or only small depolarization (representing intracellular hyperpolarization) of the membrane potential was recorded (red line in Fig. 1B). Electrical signals have never been recorded in systemic leaves (Fig. 1B). One hour after removal of diethyl ether, heat wounding was able again to trigger the potential changes comparable to control plants (Fig. 1C).

3.2. Monitoring cytoplasmic Ca^{2+} concentration $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$

Because electrical and Ca^{2+} signals are tightly coupled, we further monitored $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. First, we tested whether aequorin luminescence in transgenic *A. thaliana* expressing the apoaequorin is affected by diethyl ether treatment. Control and diethyl ether treated plants were discharged by CaCl_2 in 10% ethanol and luminescence was recorded in 1 min intervals for 9 min. We found that aequorin luminescence under diethyl ether treatment was reduced in average by ca. 25% (Figs. S3A–E) but was still clearly detectable (Figs. S3B and D). This indicates that the experimental system is suitable for investigating the effect of diethyl ether but the signal intensity comparison among different treatments up to 25% cannot be considered as significant. This affect resembles effects of anaesthetics on firefly luciferase based on which the protein theory of general anaesthesia was established (Franks and Lieb, 1984).

Heat wounding clearly induced a Ca^{2+} wave. First, the signal intensity was increased in local and later on also in adjacent systemic leaves. In opposite systemic leaves the signal was not detected (Fig. 2A, Video S1). Under diethyl ether treatment, the Ca^{2+} signal was recorded in local heat wounded leaf but not in any systemic leaves. In some local leaves, short basipetal transmission of Ca^{2+} wave was detectable (Fig. 2B, Video S2). After removing of diethyl ether for 1 h, the plant was heat wounded and the signal propagation was restored (Fig. 2C, Video S3).

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.11.019>.

Application of a drop of 75 mM L-glutamate to the middle vein of pre-cut leaf induced local Ca^{2+} response every time and systemic response in four out of seven cases (Fig. S4A, Video S4). Under diethyl ether treatment, small increase $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in local leaf was also detectable every time, but systemic response was completely absent (zero out of five cases; Fig. S4B, Video S5). The plants recovered from anaesthesia after 1 h and glutamate application triggered systemic response again (two out of three cases; Fig. S4C, Video S6). Squeezing the leaf between fingers also induced local increase $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, which was lower but not completely inhibited under diethyl ether atmosphere (Fig. S5, Videos S7 and S8). Application of drop of distilled water on leaf surface, which is known to induce JA response (Moerkercke et al., 2019), also increased local $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ under diethyl ether treatment (data not shown). All these experiments show that diethyl ether cannot completely block local rise of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in perturbed leaf, but it completely blocks its systemic propagation. This indicates that ion channels directly responsible for transduction of mechanical forces (wounding, touching, squeezing) into Ca^{2+} signal are not targeted by diethyl ether, in contrast to ion channels responsible for Ca^{2+} systemic propagation.

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.11.019>.

3.3. Anaesthesia with diethyl ether impairs systemic jasmonate accumulation

In the local leaf, there was almost a 1000-fold increase of the JA tissue level 1 h after heat wounding in comparison to control unwounded plants. The significant 300-fold increase was also detected in adjacent systemic leaf but not in systemic opposite leaf. The volatile anaesthetic diethyl ether significantly decreased JA tissue level in the

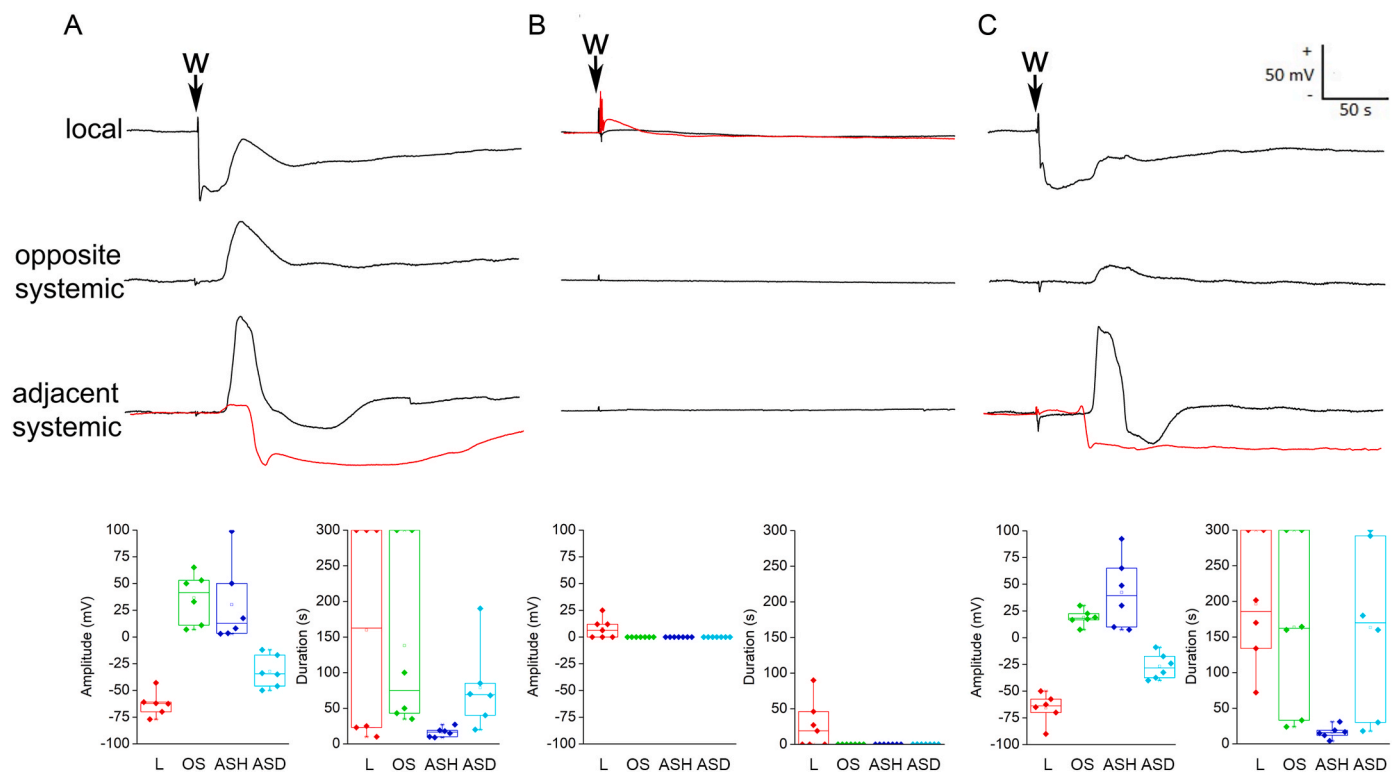


Fig. 1. Surface potential changes generated in local and systemic leaves after heat wounding (W) of local leaf. (A) Extracellular recording of electrical signals in control plants. (B) Inhibition of electrical signals after exposure of plants to diethyl ether. (C) Recovery of electrical signaling after removing of diethyl ether. Representative electrical signals from 6 to 7 independent experiments are depicted. Sometimes, two types of surface potential changes were observed on different plants (black and red lines). Below is a comparison of amplitude and half-width duration of surface potentials (for explanation see Fig. S1). Boxplots show the minimum, 25th percentile, median, 75th percentile, and maximum of the data points. Duration longer than 300 s are depicted as 300 s data points, because surface potential did not recover during 300 s long recording. L – local leaves, OS – opposite systemic leaves, ASH – adjacent systemic leaf hyperpolarization, ASD – adjacent systemic leaf depolarization. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

local wounded leaf, but the level was still 300-fold higher in comparison to resting level in unwounded etherized leaf. However, in adjacent systemic leaf, the JA tissue level was not significantly higher in comparison to etherized control. After 1 h recovery period, the accumulation of JA in adjacent leaf was restored by heat wounding of local leaf (Fig. 3A). The similar trend was found for JA-Ile (Fig. 3B) but not for *cis*-OPDA (Fig. 3C). The significant increase of ABA was found after heat wounding in all studied leaves and diethyl ether inhibited its accumulation in both systemic leaves but not in the local leaf. Heat wounding after 1 h recovery period restored ABA accumulation in both systemic leaves (Fig. 3D). The significant rise of SA was evident only after wounding in local leaf (Fig. 3E). The levels of IAA did never change significantly at the time point 1 h after heat wounding (Fig. 3F).

3.4. Heat wounding triggers accumulation of γ -aminobutyric acid (GABA) but not glutamate in local leaf

Because glutamate was suspected to be responsible for GLR activation (Shao et al., 2020), we analyzed amino acid contents. We did not find any significant changes in glutamate concentration in comparison to control plants in local and systemic leaves. Remaining 17 analyzed amino acids also did not show significant changes in concentration in response to wounding and diethyl ether treatments, only some showed slightly higher concentration during recovery period (Ile, Leu, Lys, Phe, Trp, Tyr, Val, Fig. S6). But we found more than 15-fold significant increase of non-proteinogenic amino acid, γ -aminobutyric acid (GABA). It accumulated in response to wounding in local leaf and diethyl ether was not able to inhibit its accumulation (Fig. 4).

3.5. Transcript level of jasmonic-acid responsive genes remains low in systemic leaves

To confirm that diethyl ether could impairs jasmonate signaling in systemic leaves, the expression of marker genes involved in JA biosynthesis (*AOS*, *OPR3*) and signaling (*JAZ10*) was monitored. The expression pattern (Fig. 5) clearly mirrored accumulation of JA and JA-Ile (Fig. 3A and B). There was a significant 1500-fold increase of *JAZ10* mRNA in response to heat wounding in local leaf and 750-fold increase in adjacent systemic leaves. Diethyl ether suppressed *JAZ10* expression in wounded local leaf but was still 230-fold higher than in etherized control. In adjacent systemic leaf of etherized wounded plant, the level of *JAZ10* was not significantly higher than in etherized control leaf. After 1 h recovery period, the accumulation of *JAZ10* in adjacent leaf was restored upon heat wounding of local leaf (Fig. 5A). Similar trends were found also for *AOS* and *OPR3*, only the recovery for *AOS* transcripts was somehow blocked (Fig. 5B and C).

3.6. Ultra-weak photon emission as indicator of LOX activity

Recently it was shown that ultra-weak photon emission is a sensitive *in vivo* indicator of LOX2 activity in local wounded leaf (Prasad et al., 2017). Here, ultra-weak photon emission in wounded local leaf was not inhibited by diethyl ether, indicating that LOX2 enzyme is active under diethyl ether atmosphere (Fig. S7).

4. Discussion

In our experiments we used heat wounding for induction of systemic electrical signal propagation in *A. thaliana*. The heat wounding has been

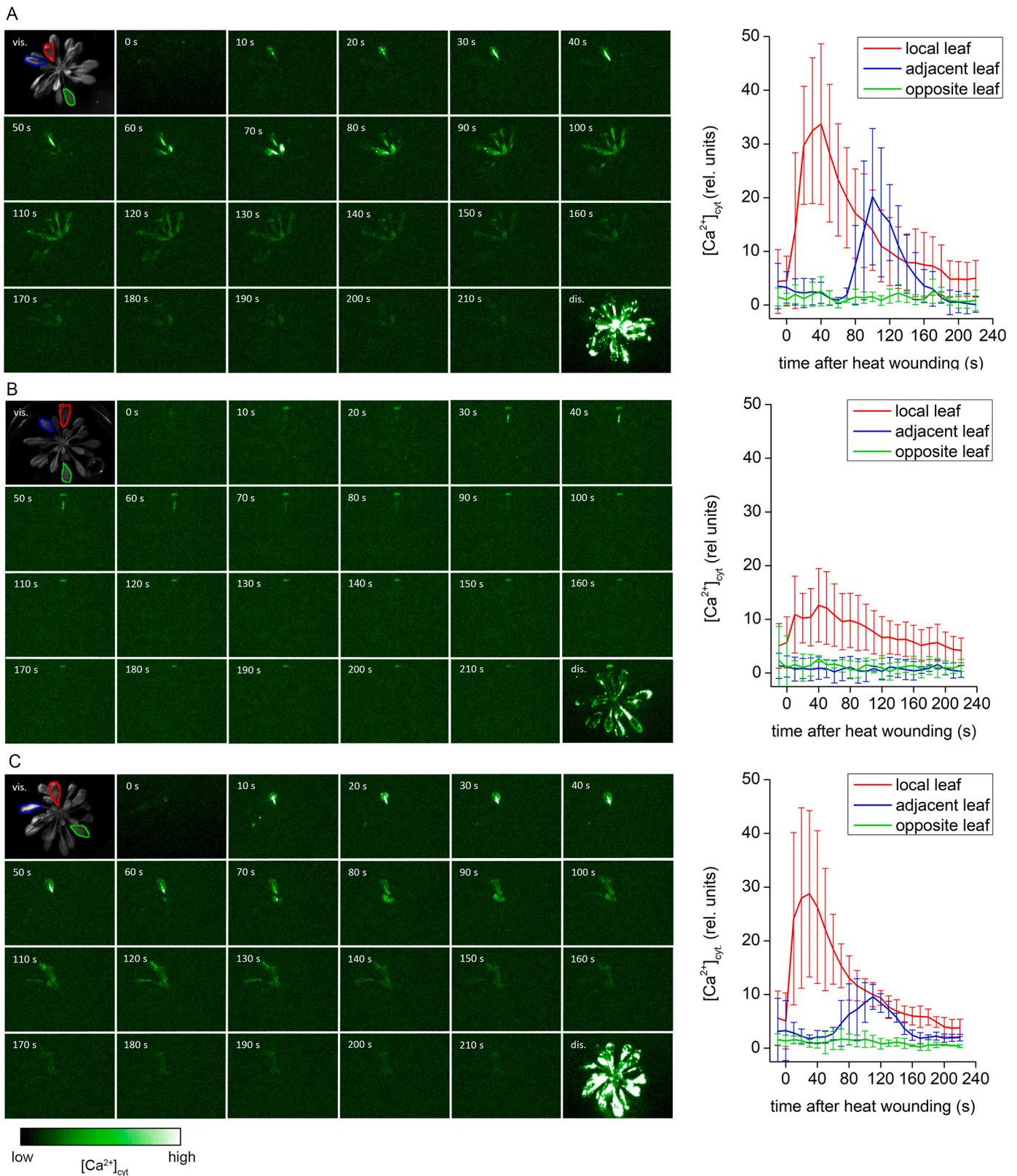


Fig. 2. Local and systemic $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signals in whole *Arabidopsis thaliana* rosette in response to heat wounding. (A) Plants were kept in air or (B) under diethyl ether for 2.5 h or (C) the plant had recovered from diethyl ether treatment for 1 h and before local leaf was wounded. Representative time courses are shown on the left; average \pm S.D. ($n = 5$) signal intensities in local and systemic leaves are shown on the right. Photograph of rosette in visible light (vis.), the site of wounding across a midrib of local leaf is marked with a red rectangle. The region of interest (ROI) used for signal quantification of local leaf (red), adjacent systemic (blue) and opposite systemic leaves (green) are depicted. Time course (0–210 s) of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ accumulation in response to heat wounding in local and distal leaves, heat wounding was performed in the range of 0–10 s on local leaf (frame exposure time is 10 s). Cumulative image of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -dependent photon counts after discharge of the whole rosette (dis., frame exposure time is 1 min). Movies are available as [Supplementary Videos 1–3](#). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

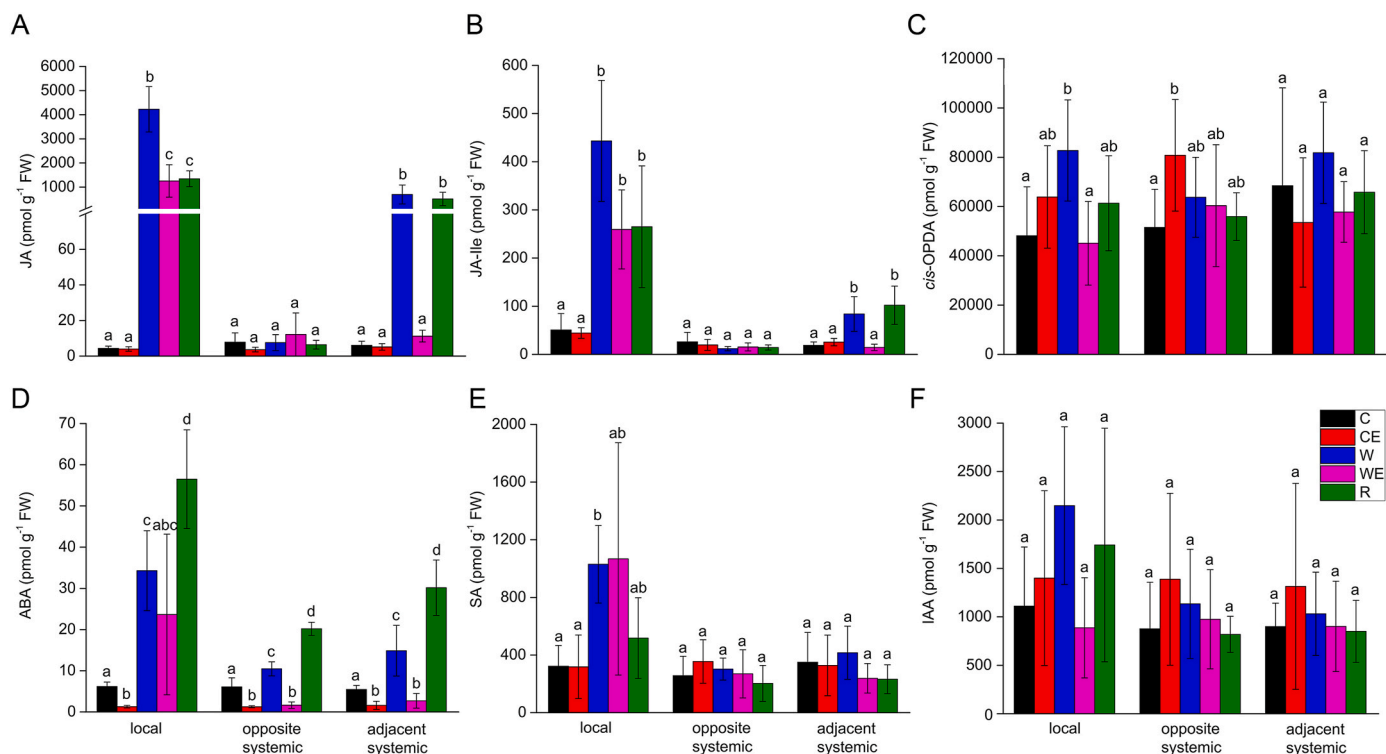


Fig. 3. Phytohormone content in local and systemic leaves after heat wounding. The plants were kept in the air or under diethyl ether for 2.5 h or the diethyl ether had been removed 1 h before the local leaf was wounded. Local and systemic leaves were sampled for phytohormone analysis 1 h after treatment. (A) Jasmonic acid (JA), (B) isoleucine conjugate of jasmonic acid (JA-Ile), (C) *cis*-12-oxo-phytodienoic acid (*cis*-OPDA), (D) abscisic acid (ABA), (E) salicylic acid (SA), (F) indole-3-acetic acid (IAA). C – control plants in the air, CE – plants in ether without any treatment, W – wounded plants in the air, WE – wounded plants in the diethyl ether, R – wounded plants after recovery. Data show means ± S.D., n = 8. Different letters denote significant differences at P < 0.05 (ANOVA, Tukey’s test or Welch’s test if non-homogeneity was present).

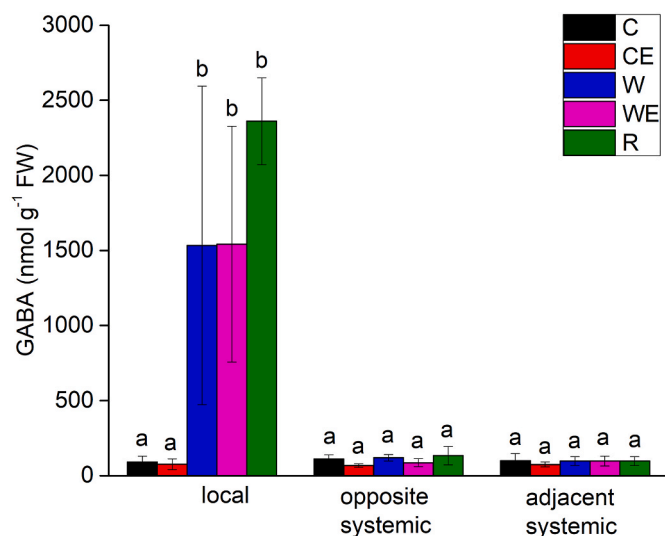


Fig. 4. GABA content in local and systemic leaves after heat wounding. The plants were kept in the air or under diethyl ether for 2.5 h or the diethyl ether had been removed 1 h before the local leaf was wounded. Local and systemic leaves were sampled for amino acids analysis 1 h after treatment. C – control plants in the air, CE – plants in ether without any treatment, W – wounded plants in the air, WE – wounded plants in the diethyl ether, R – wounded plants after recovery. Data show means ± S.D., n = 8. Different letters denote significant differences at P < 0.05 (ANOVA, Tukey’s test).

shown to be a sufficiently strong stimulus used in many studies for monitoring electrical signal propagation in plants (Wildon et al., 1989; Herde et al., 1996; Koziolok et al., 2004; Lautner et al., 2005; Fromm and Lautner, 2007; Sukhov et al., 2016). We also chose heat wounding because it is much stronger stimulus than simple mechanical wounding which does not trigger systemic response every time (see Table S1 in Toyota et al., 2018). The electrical signal propagation induced by heat wounding resembles electrical signal propagation triggered by simple wounding in *A. thaliana* (Mousavi et al., 2013): intracellular depolarization (recorded as extracellular hyperpolarization) was recorded in local and adjacent systemic leaves, whereas opposite systemic leaves showed intracellular hyperpolarization (recorded as extracellular depolarization). Electrical signals are tightly linked genetically with increase of [Ca²⁺]_{cyt} (Farmer et al., 2020). The relationship between changes in [Ca²⁺]_{cyt} and electrical activities is not known but they are both attenuated in systemic leaves of *glr3.3 glr3.6* double mutants indicating that they are tightly coupled (Mousavi et al., 2013; Toyota et al., 2018; Nguyen et al., 2018). Elevated [Ca²⁺]_{cyt} was documented in our as well as in previous studies in local and adjacent systemic leaves, i. e. in leaves which propagate intracellular depolarization (Kiep et al., 2015; Toyota et al., 2018) and wound-induced membrane depolarization preceded large Ca²⁺ influx (Nguyen et al., 2018). Changes of intracellular Ca²⁺ concentrations are probably mediators of jasmonate synthesis in response to electrical signals (Yan et al., 2018) and all local and adjacent leaves which received electrical depolarization and Ca²⁺ signal activate jasmonate mediated signaling (Mousavi et al., 2013; Toyota et al., 2018; Nguyen et al., 2018).

Here we showed that GVA diethyl ether completely blocked electrical, Ca²⁺ and jasmonate signals mainly in systemic leaves. This behaviour resembles attenuated systemic signaling in a *glr3.3 glr3.6* mutant (Mousavi et al., 2013; Toyota et al., 2018; Nguyen et al., 2018)

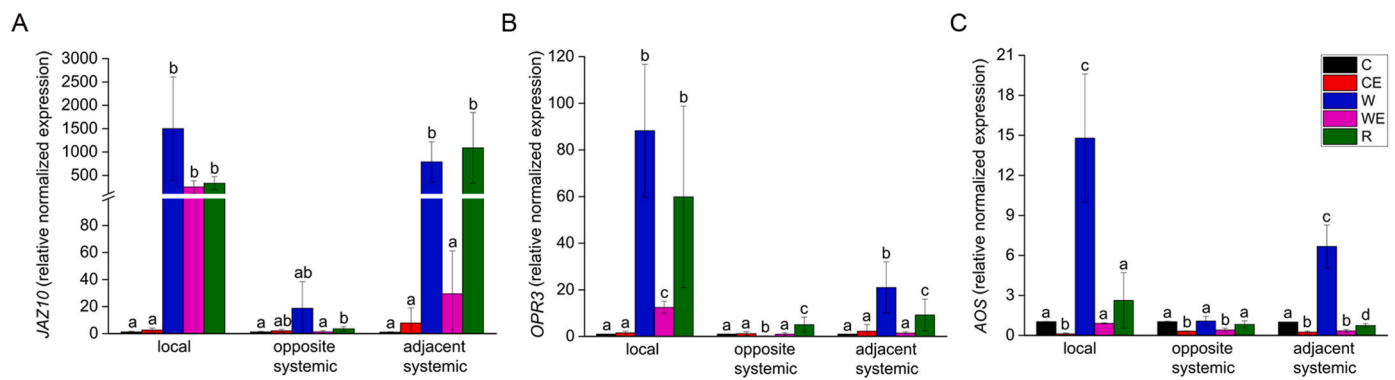


Fig. 5. Transcript level of JA-responsive genes in local and systemic leaves after heat wounding. The plants were kept in the air or under diethyl ether for 2.5 h or the diethyl ether had been removed 1 h before the local leaf was wounded. Local and systemic leaves were sampled for qPCR analysis 1 h after treatment. (A) *JAZ10*, (B) *OPR3*, (C) *AOS*. C – control plants in the air, CE – plants in ether without any treatment, W – wounded plants in the air, WE – wounded plants in the diethyl ether, R – wounded plants after recovery. Data show means \pm S.D., $n = 9$. Different letters denote significant differences at $P < 0.05$ (Welch's test with Bonferroni corrected alpha).

or in a Ca^{2+} -permeable vacuolar *tpc1-2* mutant (Kiep et al., 2015) what might suggest that GLR and/or TPC1 are targeted by diethyl ether directly, or indirectly via changes of membrane properties (Lerner, 1997; Pavel et al., 2020). The *Arabidopsis* GLRs share extensive sequence identity with animal ionotropic N-methyl-D-aspartate (NMDA) channels including ligand binding domain (Lam et al., 1998). Indeed, animal NMDA as well as plant GLRs are gated by the same ligand: glutamate, which is released in plant upon wounding (Toyota et al., 2018; Shao et al., 2020), but the possibility that GLRs are activated without any ligand binding is still possible (Farmer et al., 2014, 2020; Grenzi et al., 2020). Several studies have indicated important functional interactions between GVA and the animal NMDA class of glutamate receptors and inhibition of post-synaptic neuronal transmission through multiple allosteric effects on the NMDA-channel activation mechanism and the glutamate binding site (Martin et al., 1995; Zhou et al., 2012). The possibility that plant GLR channels are targeted by GVA as in animal NMDA channels is intriguing. But it is still possible that plant GLR channels only alter the plant's ability to propagate SWP without themselves being responsible for the major ion fluxes (Farmer et al., 2020). To resolve how exactly GVAs work in plants, we need to know more details about function and activation of GLR channels in plants.

However, diethyl ether attenuated electrical signals not only in systemic but also local damaged leaf although elevated $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ was still detectable. In the *glr3.3 glr3.6* double mutant, a significant depolarization with the same amplitude but reduced duration was still detected in local damaged leaf indicating that GLR3.3 and GLR3.6 are only important for channelling the signal to neighbouring systemic leaves (Mousavi et al., 2013; Hedrich et al., 2016). The fact that generation of electrical signals in local leaf is GLR3.3 GLR3.6 independent (Mousavi et al., 2013; Hedrich et al., 2016) and diethyl ether inhibited generation of local SWP indicates that the effect of diethyl ether is not specific only to GLR channels. This may favour the Meyer (1899) and Overton (1901) membrane theory of general anaesthesia and its modifications suggesting that anaesthetics could target the plasma membrane and affects different channel functions (Lerner, 1997; Tang and Xu, 2002; Pavel et al., 2020) in contrast to protein-theory that anaesthetics are acting by binding directly to specific sensitive protein (Franks and Lieb, 1984). Given that the diethyl ether in plants impairs sensation and interaction with environment in much broader sense (i.e.: germination, endocytic vesicle recycling, reactive oxygen species (ROS) balance, light perception and chlorophyll synthesis, Yokawa et al., 2018) indicates their broad and non-specific functions. Nevertheless, even the physicians who administer these compounds still lack a molecular understanding for their action in animals and humans.

The concentration of the putative GLR ligand, glutamate, was neither affected by wounding nor by diethyl ether treatment in comparison to

control plants and is probably only released from the damaged cell into the apoplast as was suggested by Toyota et al. (2018). The absolute concentration of glutamate is the highest among detected amino acids in accordance with its high mM concentration in phloem sap needed for activation of GLR channel (Hunt et al., 2010; Toyota et al., 2018; Shao et al., 2020), but exogenously added glutamate was not able to activate GLR channels under anaesthesia (Fig. S4). This indicates that leaf glutamate level is not affected by anaesthesia, it is probably released by tissue damage but cannot activate systemic response. Nonetheless, the accumulation of another neurotransmitter-like signaling molecule detected in plants, which is synthesized from glutamate (Tarkowski et al., 2020), γ -aminobutyric acid (GABA), was increased in wounded local leaf within 1 h (Fig. 4). In plants, the non-proteinogenic amino acid GABA is a ligand of the aluminium activated malate transporter (ALMT) and probably of the outward-rectifying potassium channel (GORK); upon binding it induces membrane hyperpolarization (Ramesh et al., 2015; Žárský, 2015). However, in contrast to GLR channels there is no sequence homology of ALMT and GORK to the GABA_A receptor in animals, except small region responsible for GABA interaction (Ramesh et al., 2015; Žárský, 2015; Adem et al., 2020). The GABA is important signaling molecule which accumulates in response to different biotic and abiotic stresses in plants (Fromm, 2020). In response to wounding, GABA accumulated not only in local but also in systemic leaves but Ca^{2+} and JA –independently (Scholz et al. 2015, 2017). In our study, heat wounding did not induce systemic accumulation of GABA, and diethyl ether had no effect on its accumulation in response to heat wounding indicating its electrical-signal independent accumulation as has been suggested previously (Scholz et al., 2017).

In accordance with inhibition of electrical and Ca^{2+} signals in systemic leaves, the accumulation of jasmonates and transcripts of jasmonate responsive genes were strongly attenuated under anaesthesia. In contrast, local damaged leaves still accumulated significant amount of jasmonates and responsive transcripts. Besides Ca^{2+} , which was still detected in local leaf at a reduced level and represents a link to JA synthesis (Chauvin et al., 2013; Farmer et al., 2020; Yan et al., 2018), it has been believed that jasmonate accumulation in local damaged leaves is triggered by releasing of cell wall fragments or LA from galactolipids in plastid membranes (Mielke and Gasperini, 2019). This may explain why still high level of jasmonates is present in local leaf with significantly attenuated electrical and partially Ca^{2+} signals. It is worth mentioning, that another wound-induced hormone ABA accumulated not only in adjacent systemic leaves but also in systemic opposite leaves, where electrical signals and jasmonates were not detected in response to heat wounding. Interestingly, diethyl ether significantly suppressed ABA accumulation in all these systemic leaves (Fig. 3D). It was shown that systemic ABA accumulation is dependent on electrical/ Ca^{2+} /ROS wave

(Suzuki et al., 2013; Devireddy et al., 2018), but ABA is also easily translocated via vascular tissue (Jaschke et al., 1997). What is behind this diethyl ether-induced suppression of electrical signal-independent ABA accumulation remains unknown. Moreover, ABA accumulation was significantly decreased also in control etherized plants indicating that even basal level of ABA is affected by diethyl ether (Fig. 3D).

Recently, it has been documented that JA itself acts as mobile signal and is translocated from local damaged leaf to neighbouring systemic leaves via JA importers AtJAT3 and AtJAT4, however in co-operation with GLR3.3 (Li et al., 2020). By this way, only ~1.7% of JA was translocated but accounted for ~40% of the wound-induced JA in systemic leaves. The authors suggested that GLR-dependent systemic electrical signals may be decoded to JA/JA-Ile, which in turn promotes the long-distance transport of JA by inducing expression of *At-JAT3/4*. In our study, the JA and transcript levels were completely abolished in systemic leaves indicating that GVA may also suppress JA translocation directly or indirectly through inhibited GLR-dependent electrical signals as suggested.

The effect of anaesthesia with diethyl ether on inhibition of electrical signaling in *Arabidopsis* is very similar to our previous study with the carnivorous plant Venus flytrap (Yokawa et al., 2018; Pavlović et al., 2020). The Venus flytrap generates AP and Ca^{2+} wave in response to mechanostimulation of trigger hairs but the signals propagate only in local trap without any systemic response (Pavlović et al., 2017; Suda et al., 2020). Diethyl ether completely inhibited APs induced by mechanostimulation and wounding in local trap but wounding still induce small accumulation of jasmonates favouring the hypothesis that leaf tissue damage alone without electrical signal is sufficient to trigger jasmonate accumulation in local leaf. The mechanosensitive chloride-permeable ion channel (MscS)-like (MSL) homolog in Venus flytrap (FLYC1, FLYC2) in combination with mechanosensitive calcium permeable channel (OSCA) have been suspected to be responsible for initial AP depolarization in Venus flytrap (Procko et al., 2021). However they only remain outstanding candidates for this physiological role because knock-out or knock-down experiments have not been performed. Only recently, Iosip et al. (2020) found that GLR3.6. is among trigger hair-specifically expressed genes what may also indicate its participation on generation and propagation of APs and Ca^{2+} wave in *Dionaea* but how the glutamate could be released in response to mechanical stimulus is not clear.

5. Conclusions

This study clearly showed that GVA diethyl ether inhibited systemic electrical signal propagation in *Arabidopsis* and downstream sequence of responses. It is another evidence for link between electrical signaling and JA pathway in distal tissues with use of methods other than molecular biology (i.e. *glr* mutants). Although our study showed that diethyl ether inhibited GLR function in long-distance electrical signaling, it is tempting to assume that the effect is also non-specific on different groups of ion channels favouring rather non-specific membrane hypothesis of GVA in plants. On the other hand, local leaves still respond to damaging stimuli, indicating different mechanism of defense response activation in local and systemic leaves. The mechanosensitive ion channels which are directly responsible for transduction of wound/touch stimuli into elevated $[Ca^{2+}]_{cyt}$ are not targeted by GVA in contrast to GLR responsible for Ca^{2+} long-distance propagation. To resolve how exactly anaesthetics work in plants, we need to know more details about function and activation of GLR channels in plants. But the fact that the GVA inhibits long-distance electrical signal propagation by inhibition of GLR channels not only in animals and humans but also in plants is intriguing. It is another piece of evidence that impaired sensation and interaction with the environment appear to be common anaesthetic endpoints from single-celled organisms, plants, to primates. This call for more general definition of anaesthesia as was suggested by Kelz and Mashour (2019) as compounds which cause disconnection from

environment, both in receptive (e.g. sensation) and/or expressive (e.g. motoric responses) arms of interaction.

Funding

This work was supported by the Czech Science Foundation Agency [project GAČR 21-03593S], by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic from European Regional Development Fund-Projects: ‘Centre for Experimental Plant Biology’ [CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000738] and ‘Plants as a tool for sustainable global development’ [CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000827]. The work is also the result of the project implementation: Comenius University in Bratislava Science Park (Slovakia) supported by the Research and Development Operational Programme funded by the European Regional Development Fund [Grant No. ITMS 26240220086]. We would like to acknowledge also internal grant of Palacký University in Olomouc [IGA_PrF_2021_017].

Author contributions

AP planned and designed the research, JJ, MRá, BB, IP, ON, MRE, AP performed the measurements and analyzed data, JJ and AP wrote the manuscript, all authors discussed and contributed to the final version, AP and AM provided material and financial support.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.11.019>.

References

- Adem, G.D., Chen, G., Shabala, L., Chen, Z.-H., Shabala, S., 2020. GORK channel: a master switch of plant metabolism? *Trends Plant Sci.* 25, 434–445.
- Bernard, C., 1878. Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux. Librairie J.-B. Baillière et Fils.
- Böhm, J., Scherzer, S., 2021. Signaling and transport processes related to the carnivorous lifestyle of plants living on nutrient-poor soil. *Plant Physiol.* (in press).
- Böhm, J., Scherzer, S., Krol, E., et al., 2016. The Venus flytrap *Dionaea muscipula* counts prey-induced action potentials to induce sodium uptake. *Curr. Biol.* 26, 286–295.
- Chauvin, A., Caldeleri, D., Wolfender, J.L., Farmer, E.E., 2013. Four 13-lipoxygenases contribute to rapid jasmonate synthesis in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves: a role for lipoxygenase 6 in responses to long-distance wound signals. *New Phytol.* 197, 566–575.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., et al., 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448, 666–671.
- Chini, A., Monte, I., Zamarreno, A.M., et al., 2018. An OPR3-independent pathway uses 4,5-didehydrojasmonate for jasmonate synthesis. *Nat. Chem. Biol.* 14, 171–178.
- Crocoll, C., Mirza, N., Reichelt, M., Gershenzon, J., Halkier, B.A., 2016. Optimization of engineered production of the glucoraphanin precursor dihomomethionine in *Nicotiana benthamiana*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 4, 14.
- De Luccia, T.P.B., 2012. *Mimosa pudica*, *Dionaea muscipula* and anesthetics. *Plant Signal. Behav.* 7, 1–5.
- Dengler, N.G., 2006. The shoot apical meristem and development of vascular architecture. *Can. J. Bot.* 84, 1660–1671.
- Devireddy, A.R., Zandalinas, S.I., Gómez-Cadenas, A., Blumwald, E., Mittler, R., 2018. Coordinating the overall stomatal response of plants: rapid leaf-to-leaf communication during light stress. *Science Signalling* 11, eaam9514.
- Draguhn, A., Mallatt, J.M., Robinson, D.G., 2021. Anesthetics and plants: no pain, no brain, and therefore no consciousness. *Protoplasma* 258, 239–248.
- Farmer, E.E., Gao, Y., Lenzoni, G., Wolfender, J., Wu, Q., 2020. Wound- and mechano-stimulated electrical signals control hormone responses. *New Phytol.* 227, 1037–1050.
- Farmer, E.E., Gasperini, D., Acosta, I.F., 2014. The squeeze cell hypothesis for the activation of jasmonate synthesis in response to wounding. *New Phytol.* 204, 282–288.
- Fisahn, J., Herde, O., Willmitzer, L., Peña-Cortés, H., 2004. Analysis of the transient increase in cytosolic Ca^{2+} during the action potential of higher plants with high

- temporal resolution: requirement of Ca²⁺ transients for induction of jasmonic acid biosynthesis and PIN1 gene expression. *Plant Cell Physiol.* 45, 456–459.
- Floková, K., Tarkowská, D., Miersch, O., Strnad, M., Wasternack, C., Novák, O., 2014. UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry* 105, 147–157.
- 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. *Nat. Chem. Biol.* 5, 344–350.
- Franks, N.P., Lieb, W.R., 1984. Do general anaesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Nature* 310, 599–601.
- Franks, N.P., 2006. Molecular targets underlying general anaesthesia. *Br. J. Pharmacol.* 147, S72–S81.
- Fromm, J., Lautner, S., 2007. Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant Cell Environ.* 30, 249–257.
- Fromm, H., 2020. GABA signaling in plants: targeting the missing pieces of the puzzle. *J. Exp. Bot.* 71, 6238–6245.
- Gilroy, S., Bialasek, M., Suzuki, N., Górecka, M., Devireddy, A.R., Karpinski, S., Mittler, R., 2016. ROS, calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant Physiol.* 171, 1606–1615.
- Grenzi, M., Bonza, M.C., Alfieri, A., Costa, A., 2021. Structural insights into long-distance signal transduction pathways mediated by plant glutamate receptor-like channels. *New Phytol.* 229, 1261–1267.
- Hedrich, R., Salvador-Recatalá, V., Dreyer, I., 2016. Electrical wiring and long-distance plant communication. *Trends Plant Sci.* 21, 376–387.
- Herde, O., Atzorn, R., Fisahn, J., Wasternack, C., Willmitzer, L., Pena-Cortes, H., 1996. Localized wounding by heat initiates the accumulation of proteinase inhibitor II in abscisic acid-deficient plants by triggering jasmonic acid biosynthesis. *Plant Physiol.* 112, 853–860.
- Hlaváčková, V., Krchnák, P., Nauš, J., Novák, O., Špundová, M., Strnad, M., 2006. Electrical and chemical signals involved in short-term systemic photosynthetic responses of tobacco plants to local burning. *Planta* 225, 235–244.
- Hunt, E., Gattolin, S., Newbury, H.J., Bale, J.S., Tseng, H.-M., Barrett, D.A., Pritchard, J., 2010. A mutation in amino acid permease AAP6 reduces the amino acid content of the *Arabidopsis* sieve elements but leaves aphid herbivores unaffected. *J. Exp. Bot.* 61, 55–64.
- Ilík, P., Hlaváčková, V., Krchnák, P., Nauš, J., 2010. A low-noise multi-channel device for the monitoring of systemic electrical signal propagation in plants. *Biol. Plantarum* 54, 185–190.
- Iosip, A.L., Böhm, J., Scherzer, S., et al., 2020. The Venus flytrap trigger hair-specific potassium channel KDM1 can reestablish the K⁺ gradient required for haptic-electric signaling. *PLoS Biol.* 18, e3000964.
- Ishimaru, Y., Oikawa, T., Suzuki, T., et al., 2016. GTR1 is a jasmonic acid and jasmonoyl-L-isoleucine transporter in *Arabidopsis thaliana*. *Biosc. Biotech. Biochem.* 81, 249–255.
- 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 Physiol. Biochem.* 146, 90–97.
- Jaschke, W.D., Peuke, A.D., Pate, J.S., Hartung, W., 1997. Transport, synthesis and catabolism of abscisic acid (ABA) in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.) under phosphate deficiency and moderate salinity. *J. Exp. Bot.* 48, 1737–1747.
- Kelz, M.B., Mashour, G.A., 2019. The biology of general anesthesia from paramecium to primate. *Curr. Biol.* 29, 1199–1210.
- Kiep, V., Vadassery, J., Latke, J., Maaß, J.-P., Boland, W., Peiter, E., Mithöfer, A., 2015. Systemic cytosolic Ca²⁺ elevation is activated upon wounding and herbivory in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 207, 996–1004.
- Koziolek, C., Grams, T.E.E., Schreiber, U., Matussek, R., Fromm, J., 2004. Transient knockout of photosynthesis mediated by electrical signals. *New Phytol.* 161, 715–722.
- Krausko, M., Peroutka, Z., Šebela, M., Šamajová, O., Šamaj, J., Novák, O., Pavlovič, A., 2017. The role of electrical and jasmonate signalling in the recognition of captured prey in the carnivorous sundew plant *Drosera capensis*. *New Phytol.* 213, 1818–1835.
- Lam, H.M., Chiu, J., Hsieh, M.H., Meisel, L., Oliveira, I.C., Shin, M., Coruzzi, G., 1998. Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* 396, 125–126.
- Lautner, S., Grams, T.E.E., Matussek, R., Fromm, J., 2005. Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis. *Plant Physiol.* 138, 2200–2209.
- Li, M., Wang, F., Li, S., Yu, G., Wang, L., Li, Q., Zhu, X., Li, Z., Yuan, L., Liu, P., 2020. Importers drive leaf-to-leaf jasmonic acid transmission in wound-induced systemic immunity. *Mol. Plant* 13, 1485–1498.
- Lerner, R.A., 1997. A hypothesis about the endogenous analogue of general anesthesia. In: *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, pp. 13375–13377.
- Maffei, M.E., Mithöfer, A., Boland, W., 2007. Before gene expression: early events in plant–insect interaction. *Trends Plant Sci.* 12, 310–316.
- Mancuso, S., 1999. Hydraulic and electrical transmission of wound-induced signals in *Vitis vinifera*. *Aust. J. Plant Physiol.* 26, 55–61.
- Martin, D.C., Plagenhoef, M., Abraham, J., Dennison, R.L., Aronstam, R.S., 1995. Volatile anesthetics and glutamate activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Biochem. Pharmacol.* 49, 809–817.
- Meyer, H., 1899. Zur theorie der Alkoholnarkose. *Arch. Exp. Pathol. Phar.* 42, 109–118.
- Mielke, S., Gasperini, D., 2019. Interplay between plant cell walls and jasmonate production. *Plant Cell Physiol.* 60, 2629–2637.
- Milne, A., Beamish, T., 1999. Inhalational and local anesthetics reduce tactile and thermal responses in *Mimosa pudica*. *Can. J. Anesth.* 46, 287–289.
- Mousavi, S.A.R., Chauvin, A., Pascaud, F., Kellenberger, S., Farmer, E.E., 2013. GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* 500, 422–426.
- 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. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 115, 10178–10183.
- Overton, C.E., 1901. Studien über die Narkose zugleich ein Beitrag zur Allgemeinen Pharmakologie. Fischer Verlag, Berlin.
- Pavel, M.A., Petersen, E.N., Wang, H., Lerner, R.A., Hansen, S.B., 2020. Studies on the mechanism of general anesthesia. In: *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 117, pp. 13757–13766.
- Pavlovič, A., Jakšová, J., Novák, O., 2017. Triggering a false alarm: wounding mimics prey capture in the carnivorous Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). *New Phytol.* 216, 927–938.
- Pavlovič, A., Libiaková, M., Bokor, B., Jakšová, J., Petřík, I., Novák, O., Baluška, F., 2020. Anaesthesia with diethyl ether impairs jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). *Ann. Bot.* 125, 173–183.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 2002–2007.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: bestkeeper—excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26, 509–515.
- Prasad, A., Sedlářová, M., Kale, R.S., Pospíšil, P., 2017. Lipxygenase in singlet oxygen generation as a response to wounding: in vivo imaging in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* 7, 1–10.
- Procko, C., Murthy, S.E., Keenan, W.T., Mousavi, S.A.R., Dabi, T., Coombs, A., Procko, E., Baird, L., Patapoutian, A., Chory, J., 2021. Stretch-activated ion channels identified in the touch-sensitive structures of carnivorous Droseraceae plants. *eLife* 10, e64250.
- Ramesh, S.A., Tyerman, S.D., Xu, B., et al., 2015. GABA signalling modulates plant growth by directly regulating the activity of plant-specific anion transporters. *Nat. Commun.* 6, 7879.
- Rastogi, A., Yadav, D.K., Szymańska, R., Kruk, J., Sedlářová, M., Pospíšil, P., 2014. Singlet oxygen scavenging activity of tocopherol and plastochromanol in *Arabidopsis thaliana*: relevance to photooxidative stress. *Plant Cell Environ.* 37, 392–401.
- Salvador-Recatalá, V., Tjallingii, W.F., Farmer, E.E., 2014. Real-time, in vivo intracellular recordings of caterpillar-induced depolarization waves in sieve elements using aphid electrodes. *New Phytol.* 203, 674–684.
- Scholz, S.S., Malabarba, J., Reichelt, M., Heyer, M., Ludewig, F., Mithöfer, A., 2017. Evidence for GABA-induced systemic GABA accumulation in *Arabidopsis* upon wounding. *Front. Plant Sci.* 8, 388.
- Scholz, S.S., Reichelt, M., Mekonnen, D.W., Ludewig, F., Mithöfer, A., 2015. Insect herbivory-elicited GABA accumulation in plants is a wound-induced, direct, systemic, and jasmonate-independent defense response. *Front. Plant Sci.* 6, 1128.
- Shao, Q., Gao, Q., Lhamo, D., Zhang, H., Luan, S., 2020. Two glutamate- and pH-regulated Ca²⁺ channels are required for systemic wound signaling in *Arabidopsis*. *640 Sci. Signal.* 13, ea1453.
- Sheard, L.B., Tan, X., Mao, H., et al., 2010. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1–JAZ co-receptor. *Nature* 468, 400–405.
- Staswick, P.E., Tiryaki, I., 2004. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 2117–2127.
- 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, 1219–1224.
- Sukhova, V., Surova, L., Morozova, E., Sherstneva, O., Vodenev, V., 2016. Changes in H⁺-ATP synthase activity, proton electrochemical gradient, and pH in pea chloroplast can be connected with variation potential. *Front. Plant Sci.* 7, 1092.
- Sukhova, E., Mudrilov, M., Vodenev, V., Sukhova, V., 2018. Influence of the variation potential on photosynthetic flows of light energy and electrons in pea. *Photosynth. Res.* 136, 215–228.
- Suzuki, N., Miller, G., Salazar, C., et al., 2013. Temporal-spatial interaction between reactive oxygen species and abscisic acid regulates rapid systemic acclimation in plants. *Plant Cell* 25, 3553–3569.
- Taiz, L., Alkon, D., Draguhn, A., Murphy, A., Blatt, M., Hawes, C., Thiel, G., Robinson, D. G., 2019. Plants neither possess nor require consciousness. *Trends Plant Sci.* 24, 677–687.
- Tang, P., Xu, Y., 2002. Large-scale molecular dynamics simulations of general anesthetic effects on the ion channel in the fully hydrated membrane: the implication of molecular mechanisms of general anesthesia. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 16035–16040.
- Tarkowski, L.P., Signorelli, S., Höfte, M., 2020. γ -Aminobutyric acid and related amino acids in plant immune responses: emerging mechanisms of action. *Plant Cell Environ.* 43, 1103–1116.
- 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 SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. *Nature* 448, 661–665.
- Toyota, M., Spencer, D., Sawai-toyota, S., Jiaqi, W., Zhang, T., 2018. Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science* 361, 1112–1115.
- Urban, B.W., Bleckwenn, M., 2002. Concepts and correlations relevant to general anaesthesia. *Br. J. Anaesth.* 89, 3–6.
- Van Moerkercke, A., Duncan, O., Zander, M., 2019. A MYC2/MYC3/MYC4-dependent transcription factor network regulates water spray-responsive gene expression and jasmonate levels. In: *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 116, pp. 23345–23356.
- Wasternack, C., Hause, B., 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann. Bot.* 111, 1021–1058.
- Wildon, D.C., Doherty, H.M., Eagles, G., Bowles, D.J., Thain, J.F., 1989. Systemic responses arising from localized heat stimuli in tomato plants. *Ann. Bot.* 64, 691–695.

- Wudick, M.M., Portes, M.T., Michard, E., et al., 2018. CORNICHON sorting and regulation of GLR channels underlie pollen tube Ca^{2+} homeostasis. *Science* 360, 533–536.
- Yan, C., Fan, M., Yang, M., Zhao, J., Zhang, W., Su, Y., Xiao, L., Deng, H., Xie, D., 2018. Injury activates Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphorylation of JAV1-JAZ8-WRKY51 complex for jasmonate biosynthesis. *Mol. Cell* 70, 136–149.
- Yokawa, K., Kagenishi, T., Pavlovic, A., Gall, S., Weiland, M., Mancuso, S., Baluška, F., 2018. Anaesthetics stop diverse plant organ movements, affect endocytic vesicle recycling and ROS homeostasis, and block action potentials in Venus flytraps. *Ann. Bot.* 122, 747–756.
- Zimmermann, M.R., Maischak, H., Mithöfer, A., Boland, W., Felle, H.H., 2009. System potentials, a novel electrical long-distance apoplastic signal in plants, induced by wounding. *Plant Physiol.* 149, 1593–1600.
- Zimmermann, M.R., Mithöfer, A., Will, T., Felle, H.H., Furch, A.C.U., 2016. Herbivore-triggered electrophysiological reactions: candidates for systemic signals in higher plants and the challenge of their identification. *Plant Physiol.* 170, 2407–2419.
- Zhou, C., Liu, J., Chen, X.-D., 2012. General anesthesia mediated by effects on ion channels. *World J. Crit. Care Med.* 1, 80–93.
- Žárský, V., 2015. Signal transduction: GABA receptor found in plants. *Nat. Plants* 1, e15115.

SUPPLEMENTARY FIGURES

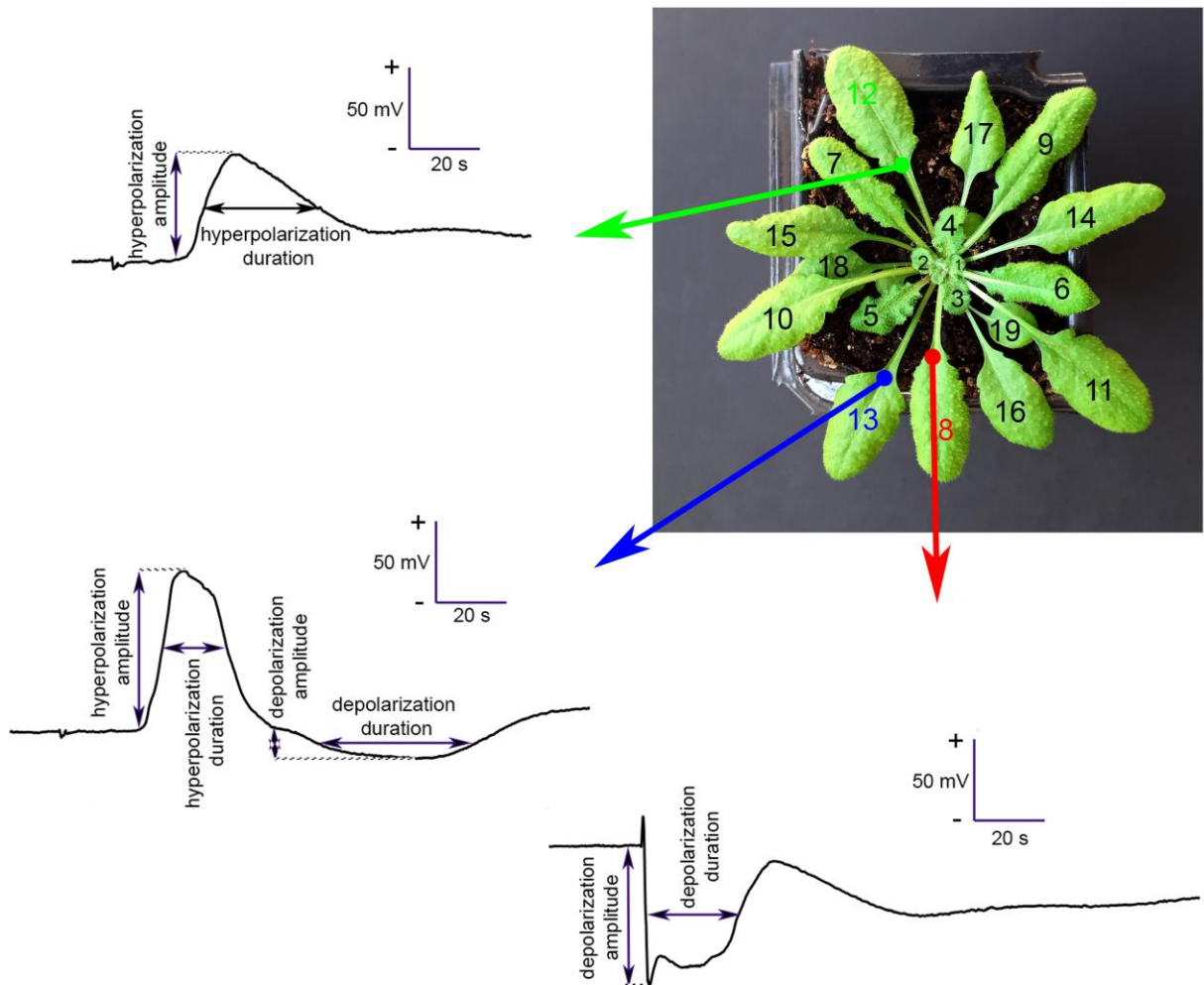


Fig. S1 Leaf numbering for experiments on long distance signaling in *Arabidopsis thaliana* and parameters of electrical signals. Analyses were performed on local leaf no. 8, adjacent leaf no. 13 and opposite leaf no. 12. Parameters of electrical signals quantified (amplitude and half-width duration) are depicted. The terminology used (depolarization/hyperpolarization) is from intracellular point of view.

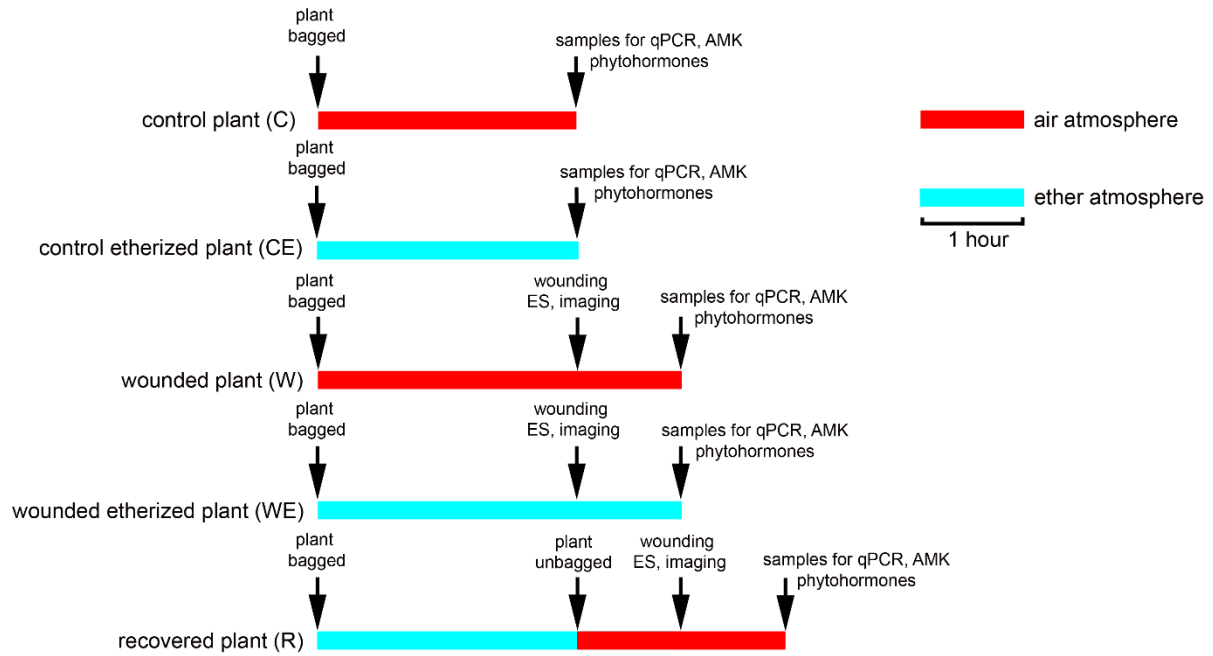


Fig S2 Experimental setup. (A) The plants were bagged either in the air (red) or ether (blue) atmosphere for 2.5 h. The plants were wounded and measured and sampled as indicated. ES, imaging – electrical signal measurements, Ca^{2+} and ROS imaging.

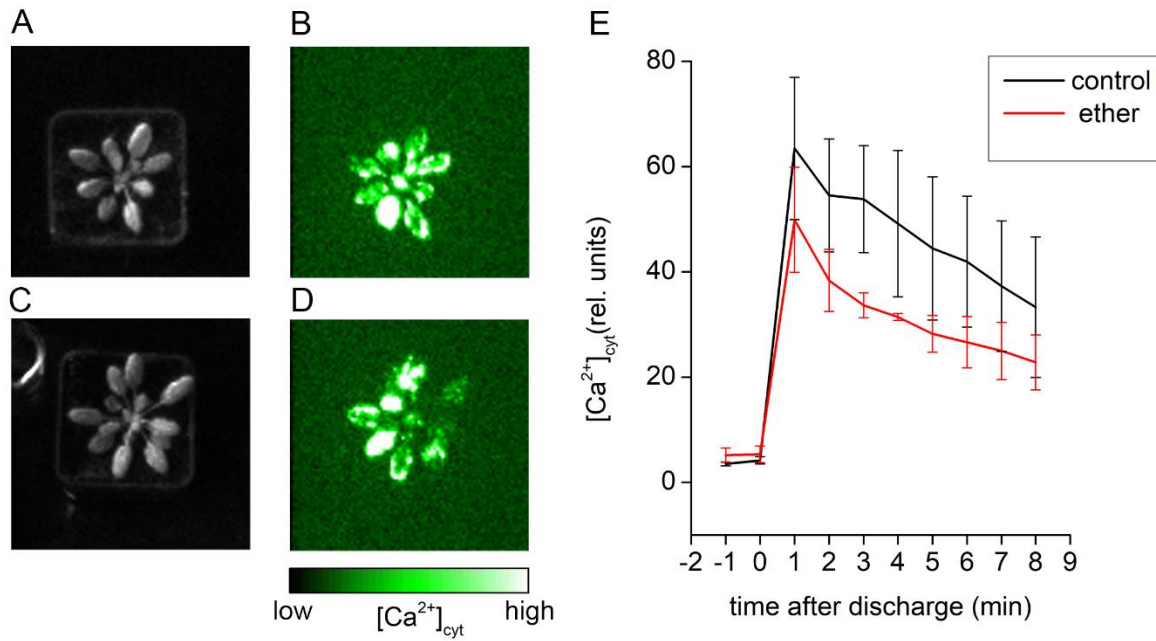


Fig. S3 Discharge of *Arabidopsis thaliana* leaf rosette. Control plants in the air (A,B) or exposed to diethyl ether (C,D). Plants in visible light (A, C) and representative image of maximum [Ca²⁺]_{cyt} signal intensity of plant after discharge at time interval 1-2 min (B, D). (E) Average \pm S.D. (n = 3). [Ca²⁺]_{cyt} signal intensity monitored for 9 min (frame exposure time was 1 min).

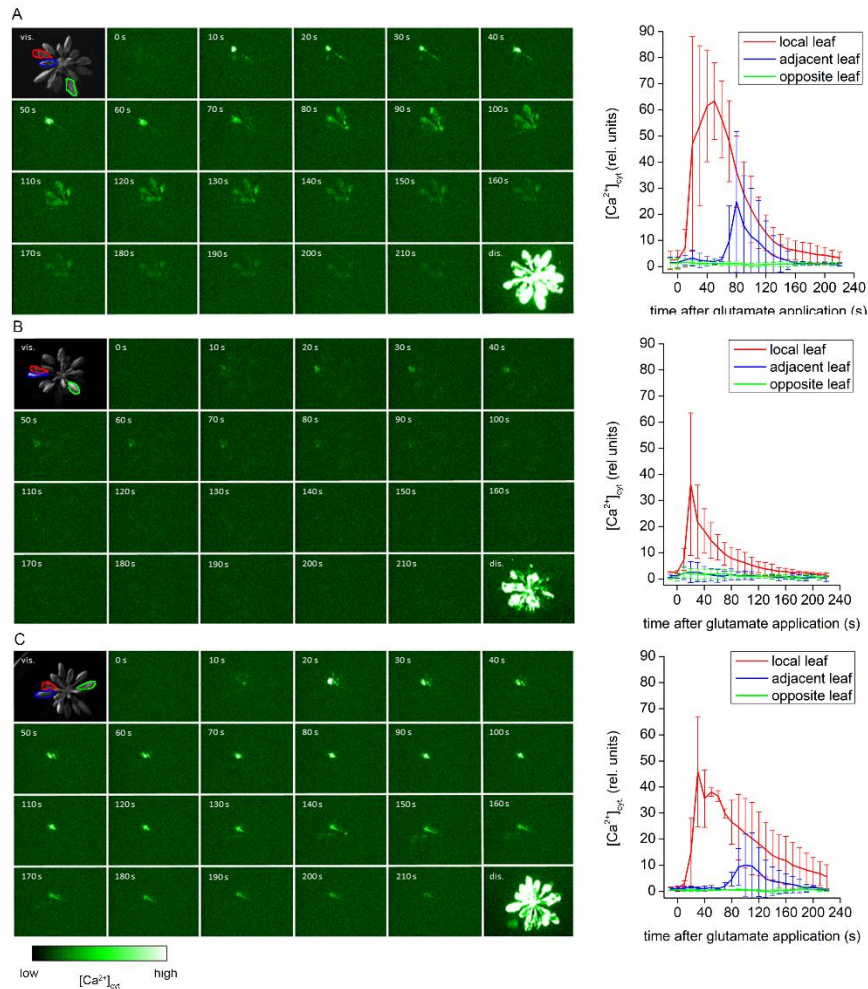


Fig. S4 Local and systemic $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signals in whole *Arabidopsis thaliana* rosette in response to local L-glutamate application. (A) Plants were kept in the air or (B) under diethyl ether for 2.5 h or (C) the plant had recovered from diethyl ether treatment for 1 h before L-glutamate was applied. Representative time courses are shown on the left; average \pm S.D. ($n = 3-7$) signal intensities in local and systemic leaves are shown on the right. Photograph of rosette in visible light (vis.), the site of glutamate application across a midrib of local leaf is marked with a red rectangle. The region of interest (ROI) used for signal quantification of local leaf (red), adjacent systemic (blue) and opposite systemic leaves (green) are depicted. Time course (0-210 s) of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ accumulation in response to glutamate application in local and distal leaves, glutamate was applied in the range of 0-10 s (frame exposure time is 10 s). Cumulative image of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dependent photon counts after discharge of the whole rosette (frame exposure time is 1 min). Movies are available as Supplementary videos 4-6.

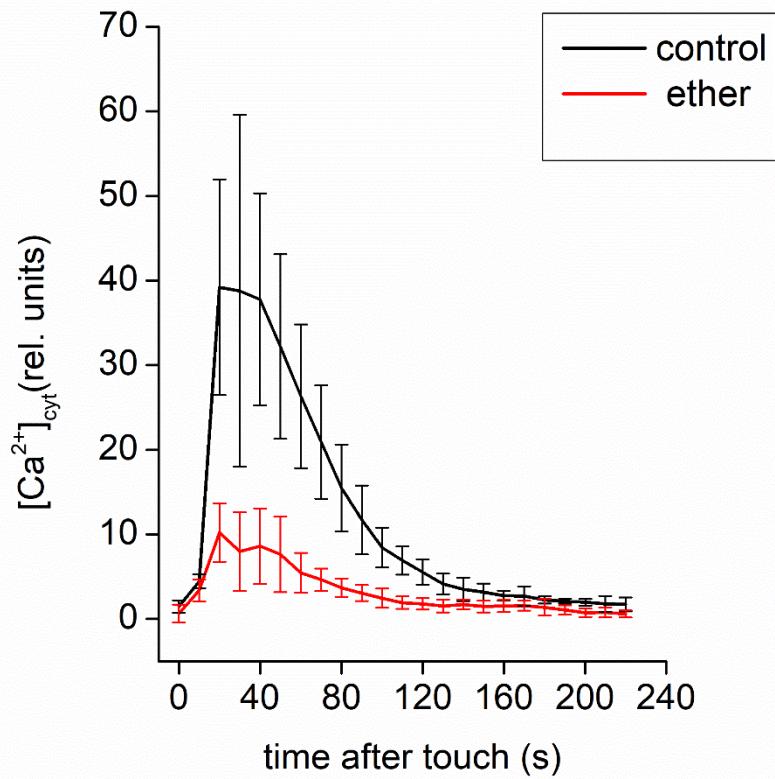


Fig S5 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signals in local *Arabidopsis thaliana* leaf in response to squeezing. The leaf was squeezed in the range of 0-10 s (frame exposure time is 10 s). Average \pm S.D. (n = 5).

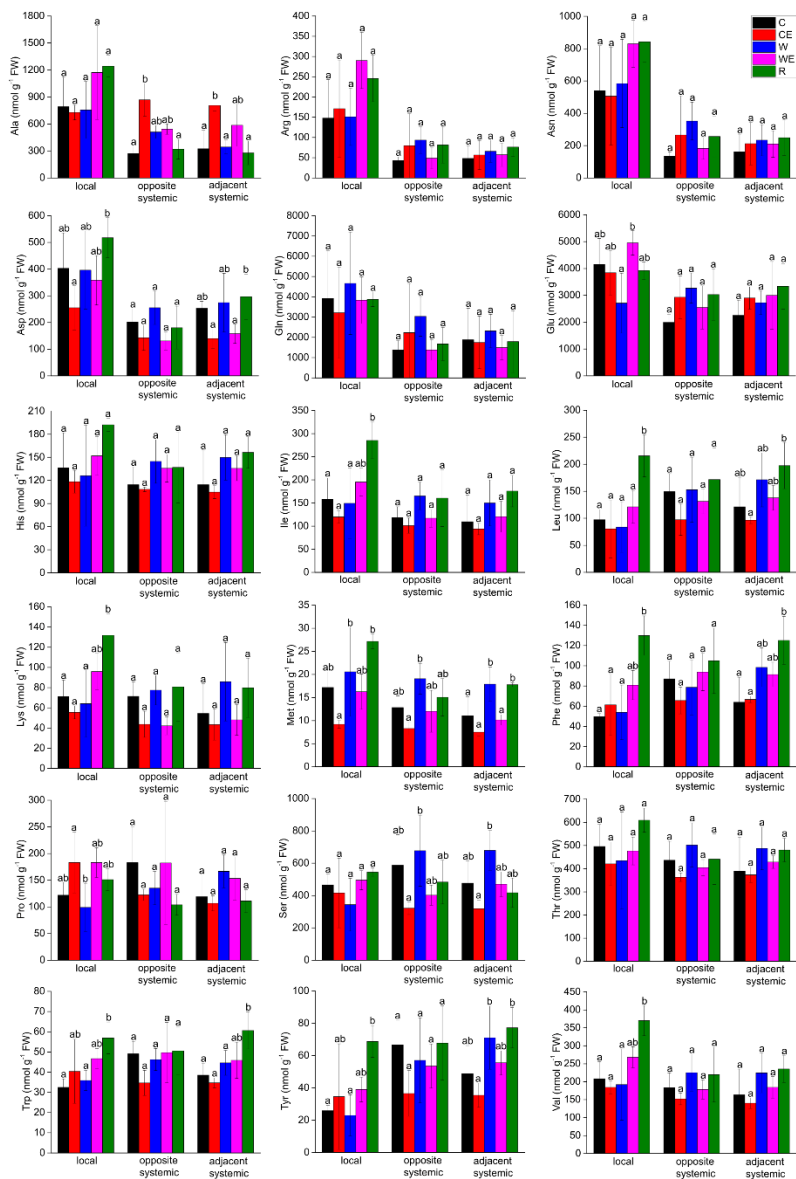


Fig S6 Amino acids content in *Arabidopsis thaliana* local and systemic leaves after heat wounding. The plants were kept in the air or under diethyl ether for 2.5 h or the diethyl ether had been removed 1 h before the local leaf was wounded. Local and systemic leaves were sampled for amino acids analysis 1 h after treatment. C – control plants in the air, CE – plants in ether without any treatment, W – wounded plants in the air, WE – wounded plants in the diethyl ether, R – wounded plants after recovery. Data show means \pm S.D., n = 8. Different letters denote significant differences at $P < 0.05$ (ANOVA, Tukey's test or Welch's test if non-homogeneity was present).

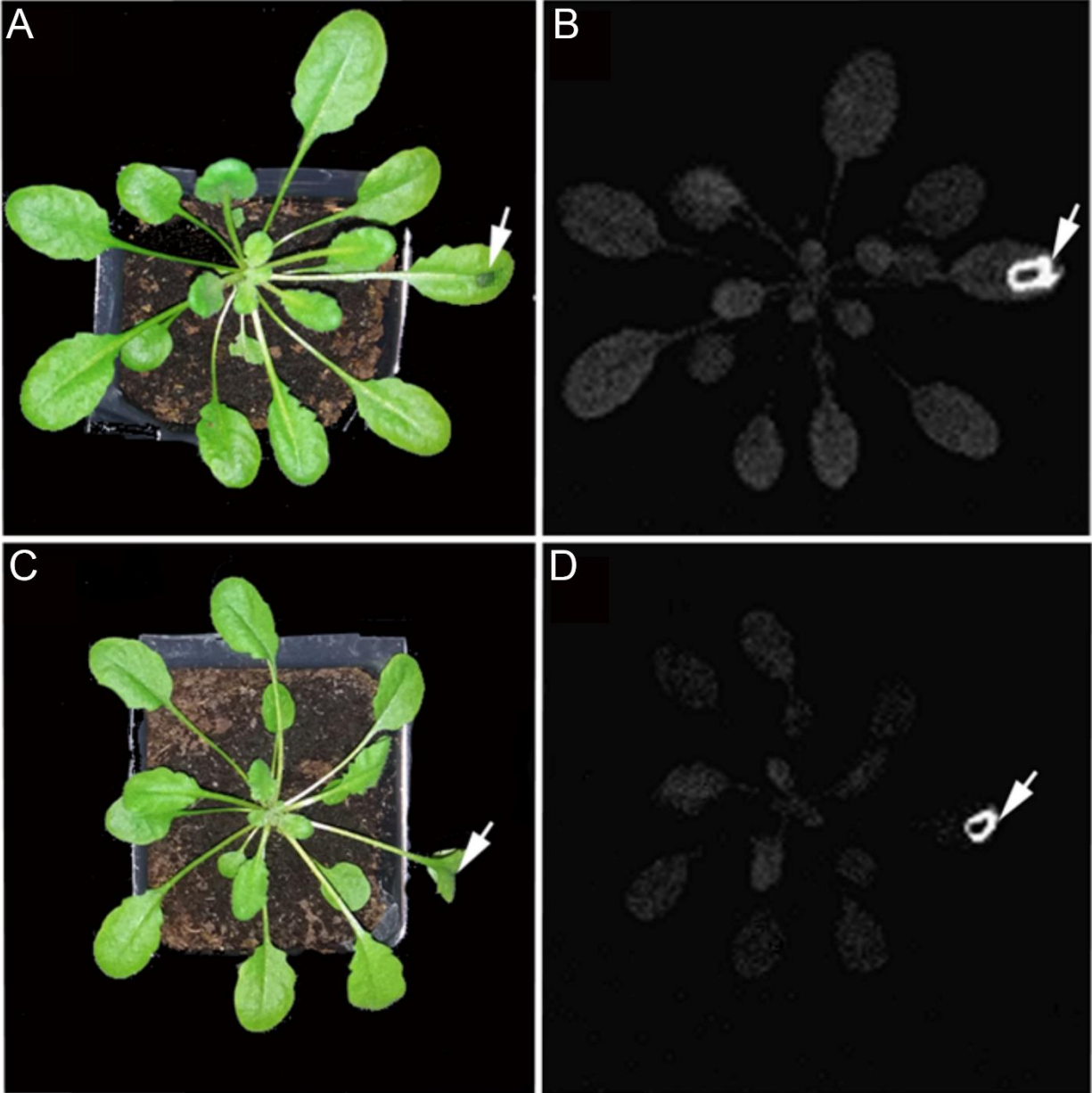


Fig. S7 Imaging of ultra-weak photon emission from WT *Arabidopsis thaliana* leaves after heat wounding of local leaf by CCD camera. The ultra-weak photon emission measured from WT in the air (A, B) and under diethyl ether (C, D). Figure shows photographs (A, C), corresponding image of ultra-weak photon emission (B, D). To avoid any contribution of delayed luminescence, *Arabidopsis thaliana* plants were kept in the darkness for 30 min before each measurement. The arrows indicate place of heat wounding.

SUPPLEMENTARY TABLES

Table S1: Details of the analysis of amino acids by LC-MS/MS using an Agilent HPLC 1260/QTRAP6500 instrument in positive ionisation mode. Abbreviations are: Q1, selected m/z of the first quadrupole; Q3, selected m/z of the third quadrupole; DP, declustering potential (V); and CE, collision energy (V).

amino acid	Q1	Q3	DP	CE	int.Std	Q1	Q3	response factor
Ala	90.1	44.1	20	17	13C,15N-Ala	94.1	47.1	
Ser	106.0	60.1	20	15	13C,15N-Ser	110.0	63.1	
Pro	116.1	70.0	20	19	13C,15N-Pro	122.1	75.0	
Val	118.1	72.2	20	13	13C,15N-Val	124.1	77.2	
Thr	120.1	74.2	20	13	13C,15N-Thr	125.1	78.2	
Ile	132.2	86.1	20	13	13C,15N-Ile	139.2	92.1	
Leu	132.2	86.1	20	13	13C,15N-Leu	139.2	92.1	
Asp	134.1	74.1	20	19	13C,15N-Asp	139.1	77.1	
Glu	148.1	102.1	20	15	13C,15N-Glu	154.1	107.1	
Met	150.2	104.1	20	13	13C,15N-Met	156.2	109.1	
His	156.2	110.1	20	17	13C,15N-His	165.2	118.1	
Phe	166.2	120.2	20	17	13C,15N-Phe	176.2	129.2	
Arg	175.1	70.1	20	31	13C,15N-Arg	185.1	75.1	
Tyr	182.1	136.2	20	17	13C,15N-Tyr	192.1	145.2	
Asn	133.1	74.1	20	21	13C,15N-Asp	139.1	77.1	1.0
Gln	147.1	130.0	20	13	13C,15N-Gln	154.1	136.0	
Lys	147.1	84.1	20	23	13C,15N-Lys	155.1	90.1	
GABA	104.1	87.0	20	17	13C,15N-Ala			1.0
Trp	205.2	188.1	20	13	D5-Trp (sum of fragments)			
					D5-Trp-fragm193	210.0	193.0	
					D5-Trp-fragm192	210.0	192.0	
					D5-Trp-fragm191	210.0	191.0	

Table S2: Primer sequences used in qPCR.

Gene number	Gene name	Primer sequences
At5g13220	<i>JAZ10</i>	forward 5' -ATCCCGATTTCTCCGGTCCA-3' reverse 5' -ACTTTCTCCTTGCGATGGGAAGA-3'
At2g06050	<i>OPR3</i>	forward 5'-GCATGGAAGCAAGTTGTGGAAGCA-3' reverse 5'-CATGCGCCCCGTGGATCTCAAT-3'
At5g42650	<i>AOS</i>	forward 5'-GCGACGAGAGATCCGAAGA-3' reverse 5'-CTCGCCACCAAAACAACAAA -3'
At5g25760	<i>UBC21</i>	forward 5' -CAGTCTGTGTGTAGAGCTATCATAGCAT-3' reverse 5' -AGAAGATTCCCTGAGTCGCAGTT-3'

SUPPLEMENTARY MOVIES

Video/Movie S1 Local and systemic $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signals in whole *Arabidopsis thaliana* rosette in response to heat wounding in control plants. Photograph of plant rosette (A), $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signal (B), discharge (C). The site of heat wounding across a midrib of local leaf is marked with a red rectangle. The leaf was heat wounded between 0-10 s.

Video/Movie S2 Local $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signals in whole *Arabidopsis thaliana* rosette in response to heat wounding in etherized plants. Photograph of plant rosette (A), $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signal (B), discharge (C). The site of heat wounding across a midrib of local leaf is marked with a red rectangle. The leaf was heat wounded between 0-10 s.

Video/Movie S3 Local and systemic $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signals in whole *Arabidopsis thaliana* rosette in response to heat wounding in etherized plants after recovery. Photograph of plant rosette (A), $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signal (B), discharge (C). The site of heat wounding across a midrib of local leaf is marked with a red rectangle. The leaf was heat wounded between 0-10 s.

Video/Movie S4 Local and systemic $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signals in whole *Arabidopsis thaliana* rosette in response to L-glutamate application in control plants. Photograph of plant rosette (A), $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signal (B), discharge (C). The site of glutamate application across a midrib of local leaf is marked with a red rectangle. The glutamate was applied between 0-10 s.

Video/Movie S5 Local and systemic $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signals in whole *Arabidopsis thaliana* rosette in response to L-glutamate application in etherized plants. Photograph of plant rosette (A), $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signal (B), discharge (C). The site of glutamate application across a midrib of local leaf is marked with a red rectangle. The glutamate was applied between 0-10 s.

Video/Movie S6 Local and systemic $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signals in whole *Arabidopsis thaliana* rosette in response to L-glutamate application in etherized plants after recovery. Photograph of plant rosette (A), $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signal (B), discharge (C). The site of glutamate application across a midrib of local leaf is marked with a red rectangle. The glutamate was applied between 0-10 s.

Video/Movie S7 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signals in *Arabidopsis thaliana* rosette in response to gentle leaf squeezing in control plants. Photograph of plant rosette (A), $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signal (B), discharge (C). The site of local leaf squeezing is marked with a red rectangle.

Video/Movie S8 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signals in *Arabidopsis thaliana* rosette in response to gentle leaf squeezing in etherized plants. Photograph of plant rosette (A), $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signal (B), discharge (C). The site of local leaf squeezing between 0-10 s is marked with a red rectangle.

Jana Jakšová

Vědecký pracovník a lektor

Vršovice 41, 747 61, Vršovice
janca.jaksova@seznam.cz

+420733155334



Motto: Be the change you want to see

Dosažené vzdělání

- 2021 – současnost **Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Kabinet pedagogické přípravy** – *obor: Doplnkové pedagogické studium učitelství biologie*
- 2018 – současnost **Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra biofyziky** – *obor: Biofyzika, doktorské studium*

Téma disertační práce: „Jasmonátová signální dráha: od obrany k masožravosti rostlin“
- 2016–2018 **Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Laboratoř růstových regulátorů** – *obor: Experimentální biologie rostlin, navazující studium*
- 2013–2016 **Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Laboratoř růstových regulátorů** – *obor: Experimentální biologie, bakalářské studium*
- 2009–2013 Slezské gymnázium v Opavě

Pracovní zkušenosti - věda

Oblast zájmu: vliv anestetik na rostliny, masožravé rostliny, studium signální dráhy po poškození rostliny

Praktické dovednosti v oblastech: elektrofyziologie rostlin, metabolomika – příprava vzorků pro analýzu rostlinných hormonů s využitím UHPLC-MS/MS a následná kvantifikace, základní proteomické a biochemické techniky – elektroforéza, Western blot, měření enzymové aktivity, transkriptomika – měření genové exprese pomocí qPCR

- 1. 4. 2021 – současnost **Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc**, vědecký pracovník, úv. 0,5
- 10. 10. – 31. 12. 2018 **Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc**, vědecký pracovník, úv. 0,4
- Září 2016 **GRANTA laboratory, Whittlesford, Cambridge, Velká Británie:** testování a kontrola kvality zrn, semen a půdy jako servis pro zemědělský průmysl (3 týdny)

- Zář 2015 **RAGT seeds, Ickleton, Cambridge, Velká Británie:** výpomoc ve šlechtitelské firmě (4 týdny)
- Červen 2015 **Jan Holub Ltd., Hvozdečko, Bouzov, Česká republika:** odborná praxe ve firmě zabývající se produkcí, rozmnožováním a prodejem rostlinných explantátových kultur (metoda *in vitro* mikropropagace; 3 týdny)

Součást týmu v projektech:

- GA ČR, grant č. 16-07366Y, Regulace enzymatických aktivit v masožravých rostlinách
- GA ČR, grant č. 21-03593S, Anestezie v rostlinách: signalizace a odpovědi

Zkušenosti - výuka

Oblast zájmu: moderní didaktické metody, formativní hodnocení, praktické vyučování

- Zimní semestr 2019 – 2021 - Pokročilý oborový seminář 3 (KEF/POS3) – vlastní seminář pro studenty 2. ročníku navazujícího studia Experimentální biologie rostlin, UPOL

Kurzy v rámci celoživotního vzdělávání – další vzdělávání pracovníků UP pro podporu kvality vzdělávání a inovací ve výuce

- Efektivní komunikace vyučujícího – lektorské kompetence
- Kultura mluveného projevu se zaměřením na pedagogickou komunikaci
- Podávání a přijímání kritiky (v procesu výuky)
- Didaktika biologie (tandemová výuka)
- Didaktika biologie (projektová výuka)

Souhrn publikační činnosti

Jakšová J., M. Rác, Bokor B., Petřík I., Novák O., Reichelt M., Mithöfer A., Pavlovič A. (2021) Anaesthetic diethyl ether impairs systemic electrical and jasmonate signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **169**, 311-321. IF (2020) = 4.143

Jakšová J., Adamec L., Petřík I., Novák O., Šebela M., Pavlovič A. (2021) Contrasting effect of prey capture on jasmonate accumulation in two genera of aquatic carnivorous plants (*Aldrovanda*, *Utricularia*). *Plant Physiology and Biochemistry* **166**, 459-465. IF (2020) = 4.143

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**, 3749-3758. IF (2019) = 5.908

Jakšová J. (2020) Elektrická a jasmonátová signalizace v mucholapce podivné. *Živa* **2020(1)**, 20-22

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. IF (2019) = 3.983

Pavlovič A., Libiaková M., Bokor B., Jakšová J., Petřík I., Novák O., Baluška F. (2019) Anaesthesia with diethyl ether impairs jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). *Annals of Botany* **125**, 173-183. IF (2019) = 4.005

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. IF (2016) = 7.71

Další tři spoluautorské manuskripty jsou v přípravě, očekává se brzké odeslání k publikačnímu procesu:

Pavlovič A., Jakšová J., Kučerová Z., Špundová M., Roudnický P., Mithöfer A. (2022) Diethylether anaesthesia induces heat shock proteins (HSPs) and suppresses chlorophyll metabolism in *Arabidopsis thaliana*.

Pavlovič A., Štedrá A., Jakšová J., Šimková L., Bartoš J. (2022) Light-dependent greening of etiolated barley (*Hordeum vulgare*) is inhibited by diethylether anaesthesia.

Pavlovič A., Jakšová J., Lenobel R., Vrobel O., Tarkowski P. (2022) Jasmonate signaling in different evolutionary lineages of carnivorous plants.

Stáže

- 29. června – 29. září 2020: tříměsíční stáž na zahraničním vědecko-výzkumném pracovišti **Max Planck Institute for Chemical Ecology, Jena, Německo**, výzkumná skupina Fyziologie obrany rostlin

Aktivity: HPLC-MS/MS analýzy rostlinných hormonů a volných aminokyselin, příprava vzorků na RNA sekvenování, qPCR analýzy genové exprese, vše ve vzorcích huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) v odpovědi na poškození a možný inhibiční efekt anestetika dietyléteru

- 11.– 21. listopad 2019: **Univerzita Komenského v Bratislavě, Přírodovědecká fakulta, Slovenská republika**

Aktivita: učení se nové metody pro měření genové exprese (kvantitativní PCR)

Konference

- 27.–31. května 2019: **Mezinárodní letní škola 2019, Frontiers in Plant Science, Kolín nad Rýnem, Německo**

Poster: Anaesthesia with diethyl ether impairs jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*).

- 25.–30. srpna 2019: **Plant biology 2019 v Českých Budějovicích, Česká republika**

Studentské dny – ústní prezentace: Chemical sensing in Venus flytrap

Hlavní konference – poster: Taste for protein: chemical signal from prey activates jasmonate signalling in carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis)

Soutěže a další aktivity

- Cena děkana 2021 – Studentská vědecká soutěž Přírodovědné fakulty v Olomouci, 3. místo v doktorské sekci – Biologie a ekologie
- Cena děkana 2019 – Studentská vědecká soutěž Přírodovědné fakulty v Olomouci, 1. místo v doktorské sekci – Biologie a ekologie
- Cena ředitele Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum 2017 a 2019 za jednu z nejlepších vědeckých publikací CRH

- Noc vědců v Olomouci 2018 – prezentace na tématu vlivu anestetik na rostliny a elektrické a vápníkové signalizaci v rostlinách
- Noc vědců v Olomouci 2013

Jazyky a kurzy

Anglický jazyk – upper intermediate (**B2**)

Wall Street English – sedmiměsíční online jazykový kurz

Jazyková škola LITE – čtyři úrovně intenzivního kurzu English as a second language pro středně pokročilé až pokročilé se zaměřením na schopnost mluvit a využít načerpané znalosti v praxi. Studium celkem obsahovalo 240 vyučovacích hodin.

Ostatní dovednosti a záliby

Práce s PC: MS Word, Excel, PowerPoint, Origin, Inkscape, Biorender

Vlastnosti: komunikativní, nekonfliktní, kreativní, svědomitá, mající schopnost vyvinout vysoké pracovní nasazení, rychle se učím novým věcem, vždy pozitivní

Záliby: vzdělávání, pěší/horská turistika, sport, malba, vaření a pečení

V Olomouci, dne 28. února 2022

Mgr. Jana Jakšová