

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2023

Tereza Jílková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Under water: Signalizace masožravých
rostlin pod vodou**

Bakalářská práce

Tereza Jílková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

Vedoucí práce: doc. Mgr. Andrej Pavlovič Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Tereza JILKOVÁ
Osobní číslo:	R20700
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Molekulární a buněčná biologie
Téma práce:	Under water: signalizace masožravých rostlin pod vodou
Zadávatel katedra:	Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
2. Stanovení hladiny fytohormonů (jasmonátů) v mucholapce podivné (*Dionaea muscipula*)
3. Detekce a kvantifikace trávicích enzymů
4. Interpretace dat a vyhodnocení výsledků
5. Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

1. 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 (*Nepenthes*, *Utricularia*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 166, 459–465.
2. Koo, A. J. K., Gao, X., Daniel Jones, A., & Howe, G. A. (2009). A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 59(6), 974–986.
3. Lee, H.-J., Park, J.-S., Shin, S. Y., Kim, S.-G., Lee, G., Kim, H.-S., Jeon, J. H., & Cho, H. S. (2020). Submergence deactivates wound-induced plant defence against herbivores. *Communications Biology*, 3(1).
4. Pavlovič, A., & Nithöfer, A. (2019). Jasmonate signalling in carnivorous plants: Copycat of Plant Defence Mechanisms. *Journal of Experimental Botany*, 70(13), 3379–3389.
5. 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(3), 927–938.
6. 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(6), 1021–1058.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.
Centrum regionu Haná

Datum zadání bakalářské práce: 14. března 2022
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2023

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 18. března 2022

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Tereza Jílková

Název práce: Under water: Signalizace masožravých rostlin pod vodou

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra molekulární a buněčné biologie, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2023

Klíčová slova: mucholapka podivná, obranyschopnost rostlin, jasmonátová signální dráha, zatopení

Počet stran: 40

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

Souhrn

Záplavy patří mezi přírodní katastrofy, které negativně ovlivňují nejenom nás, ale i rostliny. V důsledku záplav dochází u rostlin ke snížení obranyschopnosti a nedokáží se účinně bránit proti herbivornímu hmyzu, který je napadá. Konkrétně dochází k inaktivaci jasmonátové signální dráhy, kterou si v průběhu evoluce exaptovala odlišná skupina rostlin. Masožravé rostliny využívají součásti obranného systému nejenom ke své obraně, ale také k lovu. Masožravé rostliny, jako například mucholapka podivná (*Dionaea muscipula* Ellis), rostou v oblastech, kde dochází k častým záplavám a dokáží tyto podmínky přežít. Cílem této práce bylo stanovení hladin fytohormonů a detekce a kvantifikace trávících enzymů v odpovědi na zatopení rostlin mucholapky podivné. Během experimentu byla skupina rostlin umístěna na vzduchu a druhá skupina byla zatopena a následně byla část rostlin z obou skupin hodinu mechanostimulována. Kvantitativní analýza fytohormonů byla provedena pomocí metody LC-MS/MS a detekce a kvantifikace trávících enzymů byla provedena pomocí metod SDS-PAGE a Western blotting. Výsledky ukázaly, že v případě zatopení dochází i u mucholapky podivné ke snížení akumulace kyseliny jasmonové, čímž dochází i ke snížení sekrece trávících enzymů. Avšak hladina kyseliny jasmonové po indukcii mechanostimulací je stále dostačující k aktivaci trávícího procesu, který je pro rostlinu životně důležitý.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Tereza Jílková

Title: Under water: signalling in submerged carnivorous plants

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc

Supervisor: assoc. prof. MSc. Andrej Pavlovič, Ph.D.

The year of presentation: 2023

Keywords: Venus flytrap, plant defenses, jasmonate signalling pathway, flooding

Number of pages: 40

Number of appendices: 0

Language: czech

Summary

Floods belong among the natural disasters that don't negatively affect only us but also affect plants. As a result of flooding, plants have reduced defences and are unable to defend themselves effectively against herbivorous insects that attack them. Specifically, the jasmonate signalling pathway, which was co-opted by another group of plants during evolution, is inactivated. Carnivorous plants use parts of plant defense system not only for their own defense but also for hunting. Carnivorous plants such as the Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis) grow in wet habitats where frequent flooding occurs and are able to survive these conditions. The aim of this study was to determine the levels of phytohormones and to detect and quantify digestive enzymes in response to flooding in Venus flytrap plants. During the experiment, one group of plants was placed in air, while the other group was flooded, and then a half of the plants from both groups were mechanically stimulated for an hour. Quantitative analysis of phytohormones was performed using the LC-MS/MS method, and detection and quantification of digestive enzymes were performed using SDS-PAGE and Western blotting. The results showed that in the case of flooding, there is also a reduction in the accumulation of jasmonic acid in Venus flytrap plants, which leads to a decrease in the secretion of digestive enzymes. However, the level of jasmonic acid after mechanostimulation induction is still sufficient to activate the digestive process that is vital for the plant.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Mgr. Andreje Pavloviče, Ph.D. za použití citovaných literárních zdrojů

V Olomouci dne

Tereza Jílková

Poděkování

Především bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce doc. Mgr. Andreji Pavlovičovi, Ph.D. za vstřícný přístup a cenné rady a připomínky při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Koller, Ph.D. a Mgr. Ondřeji Vrobelovi za veškerou pomoc a ochotu při praktické části práce.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce.....	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	Obranyschopnost rostlin.....	3
3.2	Kyselina jasmonová a jasmonáty.....	4
3.2.1	Biosyntéza kyseliny jasmonové a jasmonátů.....	4
3.2.2	Signální dráha kyseliny jasmonové.....	6
3.3	Masožravé rostliny.....	9
3.4	Mucholapka podivná (<i>Dionaea muscipula</i>).....	9
3.4.1	Morfologie.....	10
3.4.2	Mechanismus lovu.....	10
3.4.3	Trávicí enzymy.....	12
3.4.3.1	Chitinázy.....	13
3.4.3.2	Proteázy.....	13
4	Materiál a metody.....	15
4.1	Biologický materiál.....	15
4.2	Použité chemikálie, roztoky a soupravy.....	15
4.3	Použité přístroje a zařízení.....	17
4.4	Použité metody.....	17
4.4.1	Stanovení koncentrace fytohormonů pomocí LC-MS/MS.....	17
4.4.1.1	Příprava vzorků.....	17
4.4.1.2	Analýza vzorků.....	18
4.4.2	SDS-PAGE a Western blotting.....	19
5	Výsledky.....	22
5.1	Koncentrace fytohormonů získané pomocí metody LC-MS/MS.....	22
5.2	Analýza trávicích enzymů metodou SDS-PAGE a Western blotting.....	26
6	Diskuse.....	27
7	Závěr.....	31
8	Seznam použité literatury.....	32

Seznam použitých zkratk

ABA	kyselina abscisová
ACID	ACTIVATOR INTERACTION DOMAIN
ACX	acyl-CoA oxidáza
AOC	allenoxid cykláza
AOS	allenoxid syntáza
APs	akční potenciály
ATP	adenosin trifosfát
bHLH	transkripční faktor <i>basic-helix-loop-helix</i>
COI1	CORONATINE INSENSITIVE 1
CTS1	ABC transportér COMATOSE
dnOPDA	dinor-12-oxo-fytodienová kyselina
DPA	kyselina dihydrofazeová
GLR	receptor podobný glutamátovým receptorům
IAA	kyselina indol-3-octová
JA	kyselina jasmonová
JAD	JAZ Interaction Domain
JA-Ile	isoleucinový konjugát kyseliny jasmonové
JAR1	JA syntáza aminokyselinového derivátu
JAs	jasmonáty
JAZ	transkripční faktor JASMONATE ZIM DOMAIN
JMT	JA karboxyl metyltransferáza
KAT	ϵ -3-ketoacyl-CoA thioláza
LOX	13-lipoxygenáza
MeJA	metylester kyseliny jasmonové
MFP	multifunkční protein
NINJA	transkripční faktor NOVEL INTERACTORS OF JAZ
OPC-6	3-oxo-2-(2' [Z]-pentenyl)-cyklopentan-1-hexanová kyselina
OPC-8	3-oxo-2-(2' [Z]-pentenyl)-cyklopentan-1-oktanová kyselina
OPDA	12-oxo-fytodienová kyselina
OPR3	OPDA reduktáza 3
PA	kyselina fazeová

PLA ₁	fosfolipáza A1
SA	kyselina salicylová
SCF ^{COI1}	Skp1/Cullin/F-box komplex zahrnující COI1
TAG	triacylglycerol
TF	transkripční faktor
TPL	korepresor TOPLESS
WASPs	<i>wound-activated surface potentials</i> (poraněním aktivovaný povrchový potenciál)
α -Lea	α -linolenová kyselina

Seznam obrázků

Obr. 1: Schéma biosyntézy kyseliny jasmonové (Převzato a upraveno z Wasternack et Kombrink, 2010).

Obr. 2: Schéma percepce JA-Ile a regulace JA indukované genové exprese (Převzato a upraveno z Wasternack, 2015).

Obr. 3: Lovící cyklus mucholapky podivné (*Dionaea muscipula*) (Převzato a upraveno z Hedrich et Neher, 2018).

Obr. 4: Koncentrace kyseliny jasmonové (JA) v kontrolních a mechanostimulovaných rostlinách umístěných na vzduchu a ve vodě.

Obr. 5: Koncentrace isoleucinového konjugátu kyseliny jasmonové (JA-Ile) v kontrolních a mechanostimulovaných rostlinách umístěných na vzduchu a ve vodě.

Obr. 6: Koncentrace kyseliny salicylové (SA) v kontrolních a mechanostimulovaných rostlinách umístěných na vzduchu a ve vodě.

Obr. 7: Koncentrace kyseliny abscisové (ABA) v kontrolních a mechanostimulovaných rostlinách umístěných na vzduchu a ve vodě.

Obr. 8: Koncentrace kyseliny indol-3-octové (IAA) v kontrolních a mechanostimulovaných rostlinách umístěných na vzduchu a ve vodě.

Obr. 9: Koncentrace kyseliny fazeové (PA) v kontrolních a mechanostimulovaných rostlinách umístěných na vzduchu a ve vodě.

Obr. 10: Koncentrace kyseliny dihydrofazeové (DPA) v kontrolních a mechanostimulovaných rostlinách umístěných na vzduchu a ve vodě.

Obr. 11: Stříbrem barvený SDS-PAGE a imunodetekce trávicích enzymů rostlin stimulovaných na vzduchu a ve vodě.

Seznam tabulek

Tab. 1: Seznam MRM přechodů analytů. Přechody jsou uvedeny ve formátu Q1 m/z >Q3 m/z (Kolizní energie v jednotkách eV).

Tab. 2: Složení zaostřovacího a separačního gelu.

1 Úvod

Taktéž jako živočichové si rostliny vyvinuly svůj vlastní sofistikovaný obranný systémem proti svým nepřátelům. Od morfologických či mechanických bariér po složité signální dráhy, rostliny si vytvořily jedinečný způsob obrany. Avšak žádný systém není plně bezchybný. V důsledku záplav se obranyschopnost rostlin výrazně snižuje. Konkrétně dochází k inaktivaci jasmonátové signální dráhy, která indukuje akumulaci defenzivních enzymů a hraje tak důležitou roli v obranném systému rostlin.

Určitá skupina rostlin nevyužívá tento systém výhradně ke své obraně, ale také k lovu kořisti. Masožravé rostliny v průběhu evoluce exaptovaly obranný systém rostlin ke svému vlastnímu prospěchu, aby dokázaly přežít na místech s nedostatkem živin v půdě. Snad nejznámější masožravou rostlinou je mucholapka podivná (*Dionaea muscipula* Ellis), která díky schopnosti lovu kořisti dokáže přežít na nutričně chudých půdách slatinišť Severní a Jižní Karolíny, USA. Tento habitat se mimo nutričně chudých půd vyznačuje i častými požáry, ale také prudkými dešti, po kterých zůstávají rostliny i několik dnů zatopeny.

Pokud tedy dochází k jejich zatopení, jsou mucholapky podivné nadále schopny lovu? Dochází ke kompletní inaktivaci či pouze ke snížení signalizace jasmonátovou signální dráhou a jsou vůbec schopné *de novo* syntézy trávicích enzymů? A právě získání odpovědí na tyto otázky bylo náplní této bakalářské práce.

2 Cíle práce

Cílem teoretické části této bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše na téma obranyschopnosti a masožravosti rostlin s následným zaměřením na mucholapku podivnou (*Dionaea muscipula*).

Cílem experimentální části bylo stanovení hladin fytohormonů a detekce a kvantifikace trávicích enzymů v odpovědi na zatopení.

3 Literární přehled

3.1 Obranyschopnost rostlin

Rostliny, taktéž jako všechny jiné organismy, oplývají systémem obrany před nepřáteli. V případě rostlin se jedná o obranu převážně proti širokému spektru herbivorního hmyzu, kdy tyto dvě skupiny organismů koexistují již přes 350 miliónů let a neustále vyvíjejí své obranné a útočné mechanismy proti sobě navzájem (War *et al.*, 2012).

Obranný systém rostlin lze rozdělit do dvou skupin: i) konstitutivní obrana a ii) indukovatelná obrana. Podstatou konstitutivní obrany je její neustálá přítomnost v rostlině. Konstitutivní obrana může být založena na morfologii rostliny nebo na jejích sekundárních metabolitech. Mezi morfologické či mechanické bariéry patří trny, trichomy, sklerenchymatická pletiva či zesílení buněčných stěn a mezi obranné chemické látky patří například fenoly (taniny, flavonoidy, lignin), glukosinoláty (sinalbin, sinigrin), terpeny (saponin) a alkaloidy (War *et al.*, 2012).

Podstata indukovatelné obrany spočívá v tom, že dokud nedojde k napadení rostliny herbivorem, je tato obrana neaktivní. Výhodou tohoto typu obrany jsou nízké metabolické náklady (Chen, 2008). Indukovatelnou obranu lze dále rozdělit na obranu přímou, kdy dochází ke přímé konfrontaci býložravce a rostliny a obranu nepřímou. Nepřímá obrana spočívá ve spolupráci rostliny a přirozených nepřátel jejích útočníků, které rostlina přiláká pomocí těkavých látek (Kessler *et Baldwin*, 2002). Obrana se odehrává ve třech krocích: zjištění napadení rostliny, přenos signálu a produkce obranných látek (Walling, 2000; Kessler *et Baldwin*, 2002; Ferry *et al.*, 2004; Dangl *et McDowell*, 2006). V případě poranění rostliny dochází nejdříve k lokální odpovědi poškozeného místa a posléze k systémové odpovědi nepoškozených tkání. Přenos této informace do systémových tkání musí být bleskový, a proto si rostliny vyvinuly několik různých signálních mechanismů. Pro tuto potřebu rostliny využívají volných kyslíkových radikálů, vápníkové vlny a elektrických signálů (Gilroy *et al.*, 2016). V případě poranění například dochází k uvolnění glutamátu, který se váže na proteiny *glutamate like-receptor* (GLR) fungující jako iontové kanály. Dochází tak ke zvýšení hladiny Ca^{2+} v cytosolu a jeho propagaci do okolních tkání, kde dochází k aktivaci biosyntézy kyseliny jasmonové (JA) hrající zásadní roli při biotickém i abiotickém stresu (Toyota *et al.*, 2018).

3.2 Kyselina jasmonová a jasmonáty

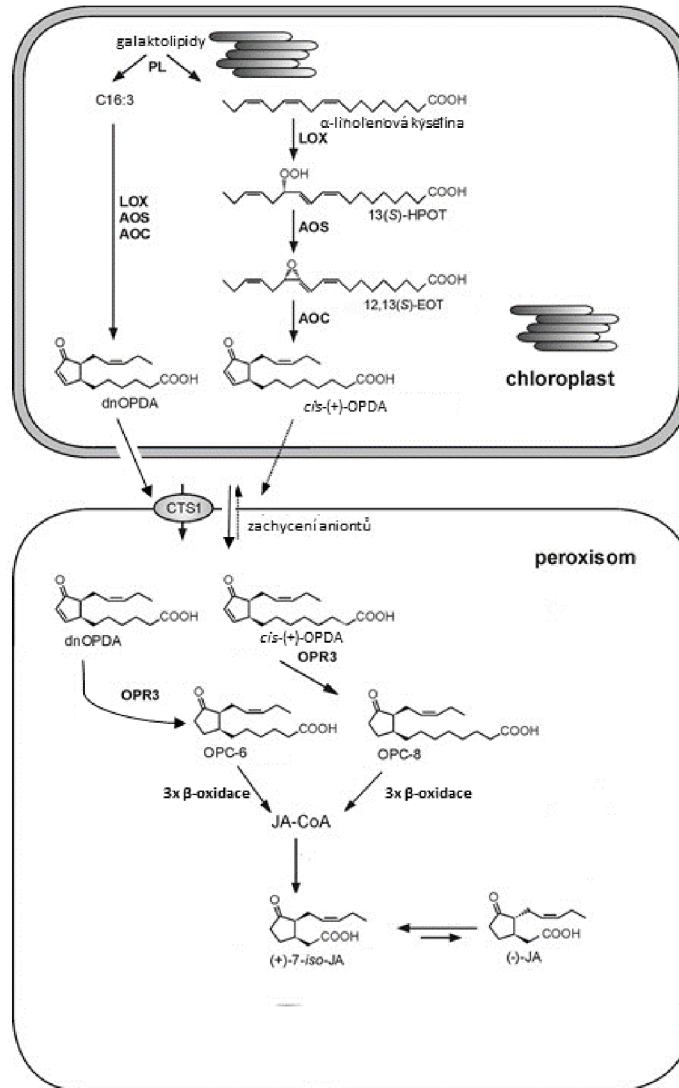
Fytohormony hrají zásadní roli v signálních mechanismech rostliny a mezi jejich funkce patří například řízení regulace růstu rostliny či odpovědi na stres. Mezi takové fytohormony právě patří i kyselina jasmonová (JA) a její deriváty zvané jasmonáty (JAs). Kyselina jasmonová, chemicky 3-oxo-2-(2'-cis-pentenyl)cyklopentan-1-octová kyselina, její metylester (MeJA) a isoleucinový konjugát kyseliny jasmonové (JA-Ile) patří mezi deriváty lipidů a sdílí značnou část své stavby a funkce se živočišnými prostaglandiny. Přesněji se jedná o oxylipiny, jejichž stavba se stává z cyklopentanového kruhu, pentenylového bočního řetězce a bočního řetězce zbytku karboxylové kyseliny odvozené od α -linolenové kyseliny (Wasternack *et* Feussner, 2018; Ruan *et al.*, 2019). Jako první byl v roce 1962 izolován MeJA z esenciálního oleje květů *Jasminum grandiflorum* (jasmín velkokvětý) (Demole *et al.*, 1962). Samotná JA byla izolována o několik let později z houby *Botryodiplodia theohromae* (Aldridge *et al.*, 1971) a poté z vyšších rostlin jako jsou *Cucurbita pepo* (Fukui *et al.*, 1977) nebo *Vicia faba* (Dathe *et al.*, 1981).

Role JA a JAs spočívá v regulaci mnoha fyziologických procesů rostlin. Jako první byla popsána jejich role v regulaci odpovědi na biotický a abiotický stres. Další roli hraje například při klíčení semen, při senescenci, inhibuje růst kořenů, řídí růst hlíz či trichomů (Wasternack, 2007).

3.2.1 Biosyntéza kyseliny jasmonové a jasmonátů

Vick a Zimmerman (1984) jako první popsali biosyntetickou dráhu kyseliny jasmonové. Biosyntéza je rozdělena do třech míst: chloroplast, peroxisom a cytoplasma. Počátečními substráty v biosyntéze JA jsou α -linolenová kyselina (α -Lea, C18:3) nebo hexadekatrienová kyselina (C16:3), které jsou uvolněny z galaktolipidů chloroplastů pomocí fosfolipázy A1 (PLA₁) hydrolyzující *snI* pozici galaktolipidů. Uvolněná α -Lea je dále oxidována 13-lipoxygenázou (LOX) na 13(S)-hydroperoxyoktadekatrienovou kyselinu (13(S)-HPOT), která je nadále substrátem pro enzym allenoxid syntáza (AOS). Produktem AOS je 12,13(S)-epoxyoktadekatrienová kyselina (12,13(S)-EOT) a jedná se o nestabilní allylický epoxid dále cyklizovaný allenoxid cyklázou (AOC), jejíž produktem je *cis*-(+)-12-oxo-fytodienová kyselina (*cis*-OPDA). Z C16:3 substrátu vzniká za stejných podmínek a pomocí stejných enzymů v paralelní dráze dinor kyseliny 12-oxo-fytodienové (dnOPDA) (Wasternack *et* Kombrink, 2010; Kombrink, 2012). Není zcela jasné, jak jsou OPDA a dnOPDA transportovány z chloroplastu do peroxisomu. Na vnější

a vnitřní membráně chloroplastu nebyly zatím nalezeny transportéry OPDA, ale import do peroxisomu je pravděpodobně zařízený pomocí ABC transportéru COMATOSE (CTS1, jinak známý i jako PXA1/PED3) či pomocí zachycování aniontů (Theodoulou *et al*, 2005).



Obr. 1: Schéma biosyntézy kyseliny jasmonové (Převzato a upraveno z Wasternack *et Kombrink*, 2010).

Legenda: (PL): fosfolipáza, (C16:3): hexadekatrienová kyselina, (LOX): 13-lipoxygenáza, (13(S)-HPOT): 13(S)-hydroperoxyoktadekatrienová kyselina (AOS): allenoxid syntáza, (12,13(S)-EOT): 12,13(S)-epoxyoktadekatrienová kyselina, (AOC): allenoxid cykláza, (*cis*-(+)-OPDA): *cis*-(+)-12-oxo-fytodienová kyselina, (dnOPDA): dinor kyseliny 12-oxo-fytodienové, (CTS1): ABC transportér COMATOSE, (OPR3): OPDA reduktáza 3, (OPC-8): 3-oxo-2-(2' [Z]-pentenyl)-cyklopentan-1-oktanová kyselina, (OPC-6): 3-oxo-2-(2' [Z]-pentenyl)-cyklopentan-1-hexanová kyselina, (JA-CoA): jasmonoyl-CoA, ((+)-7-*iso*-JA): kyselina (+)-7-*iso*-jasmonová, ((-)-JA): (-)-jasmonová kyselina

Dále v peroxisomech dochází k redukci *cis*-OPDA a dnOPDA pomocí OPDA reduktázy 3 (OPR3) na příslušné produkty: 3-oxo-2-(2'[Z]-pentenyl)-cyklopentan-1-oktanovou kyselinu (OPC-8) a kyselinu 3-oxo-2-(2'[Z]-pentenyl)-cyklopentan-1-hexanovou (OPC-6). Posledním krokem je β -oxidace, která probíhá ve třech krocích. Je katalyzovaná acyl-CoA oxidázou (ACX), multifunkčním proteinem (MFP) a L -3-ketoacyl-CoA thiolázou (KAT) za produkce finálního produktu jasmonoyl-CoA, který je následně štěpen prozatím neznámou thioesterázou na (+)-7-*iso*-JA, která se ustálí na stabilnější (-)-JA.

Pomocí neznámého mechanismu dojde k uvolnění (+)-7-*iso*-JA do cytoplasmy, kde dochází k syntéze derivátů JA. Dvěma nejvýznamnějšími reakcemi jsou methylace karboxylové skupiny JA pomocí JA karboxyl methyltransferázy (JMT) a konjugace JA k isoleucinu pomocí JA syntázy aminokyselinového derivátu (JAR1) za vzniku bioaktivní formy (+)-7-*iso*-jasmonoyl- L -isoleucinu (JA-Ile). Dalšími méně významnými reakcemi jsou konjugace k jiným aminokyselinám či hydroxylace JA na uhlíku C12 (Wasternack *et Kombrink*, 2010).

3.2.2 Signální dráha kyseliny jasmonové

Přenos signálu JA v rostlině může být na krátké i dlouhé vzdálenosti. Bývá zprostředkovaný samotnou JA (neautonomní cesta) nebo jiným signálem (autonomní cesta), který spouští její akumulaci v distálních listech (Koo *et Howe*, 2009). Neautonomní cesta byla dlouho studována a je dobře popsána u rostlin z čeledi lilkovité (Solanaceae). V případě napadení rostliny herbivorním hmyzem dojde k rapidní akumulaci JA a JA-Ile v místě poškození a dochází k lokální obranné reakci. Jako první dochází k produkci peptidového hormonu systeminu, který má roli signální molekuly. Pomocí floému a apoplastu se dostává do okolních buněk, aby aktivoval biosyntézu JA. Dále JA a JA-Ile, indukované systeminem, slouží jako signální molekuly a jsou transportovány do okolních buněk, kde aktivují obrannou reakci (Truman *et al.*, 2007).

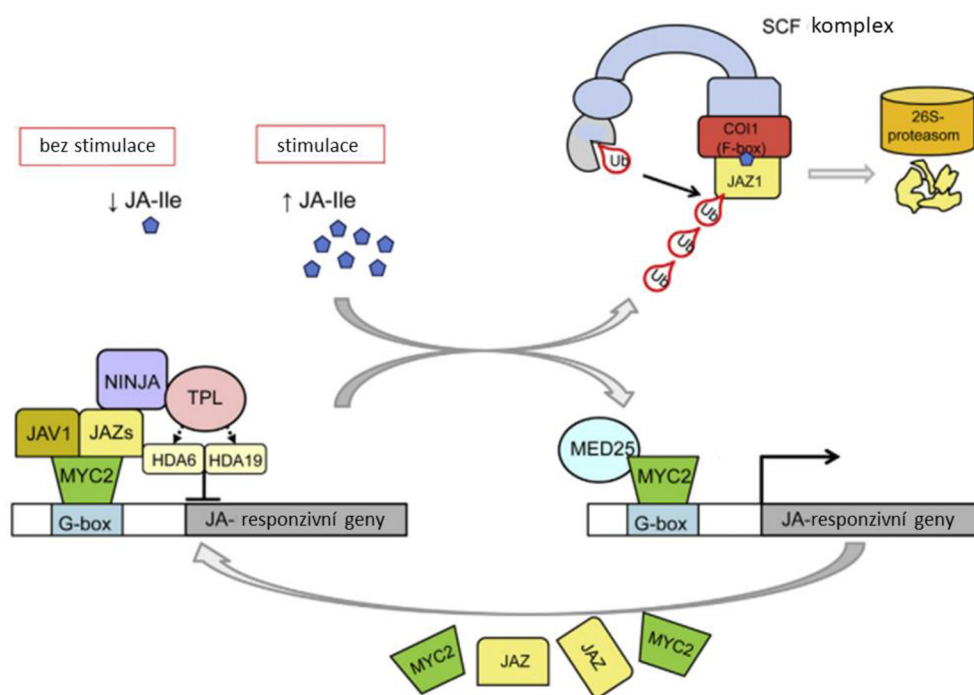
V případě autonomního přenosu JA signálu na dlouhé vzdálenosti a pro vytvoření systematické reakce v *Arabidopsis* jsou zásadní GLR geny. Během poranění dochází ke změně povrchových potenciálů (*wound-activated surface potentials*; WASPs), které jsou zásadní ve spuštění obranné reakce v distálních listech (Mousavi *et al.*, 2013). Při poranění dojde k aktivnímu uvolnění nebo k úniku glutamátu z poškozených buněk. Ten dále aktivuje *ligand gated* GLR iontové kanály a dochází tak k propagaci Ca^{2+} signálu WASPs (Toyota *et al.*, 2018, Bellandi *et al.*, 2022).

Aby došlo ke genové expresi, musí jako první dojít k transportu JA-Ile do jádra. Hodnoty JA a JA-Ile v jádře a v cytoplasmě jsou řízeny pomocí ABC transportéru AtJAT1/AtABCG16, který se nachází na cytoplasmatické a jaderné membráně buněk. Do jádra se pomocí transportéru dostává pouze bioaktivní JA-Ile v případě stresu rostliny, samotná JA se do jádra nedostává. Pokud je koncentrace JA v cytoplasmě vysoká, aktivuje se cytoplasmatický transportér a dojde ke snížení hodnot cytoplasmatického JA, tudíž se deaktivuje JA signalizace. Transportér AtJAT1/AtABCG16 hraje tedy zásadní roli v dynamice hodnot JA/JA-Ile v buňce, kdy v případě stresu dochází k rychlé odpovědi, ale také k rychlé deaktivaci signalizace, aby nedošlo k inhibici růstu a vývoje rostliny (Li *et al.*, 2017).

V jádře se JA-Ile váže na F-box protein, CORONATIVE INSENSITIVE 1 (COI1), rozeznávající cíle pro degradaci. COI1 byl objeven pomocí mutanta *Arabidopsis coronative insensitive (coi1)*, který je necitlivý k JA a ke coronatinu, což je bakteriální toxin napodobující účinky jasmonátů (Feys *et al.*, 1994; Xie *et al.*, 1998). COI1 je součástí SCF^{COI1} komplexu, který se skládá z proteinů Skp1/Cullin/F-box a celý tento komplex má funkci jako E3 ubiquitin ligáza, kdy odpovídá za ubiquitinaci cílového proteinu a jeho následnou degradaci v proteasomu 26S (Loake *et al.*, 2017). Cílem SCF^{COI1} komplexu jsou JASMONATE ZIM DOMAIN (JAZ) represory. Byly objevené zároveň třemi týmy v roce 2007 (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2007) a dnes je známo 12 JAZ proteinů v *Arabidopsis* z nichž většina obsahuje dvě domény Jas a ZIM. Doména Jas se nachází na C-konci a je esenciální v interakci COI1-JAZ (Melotto *et al.*, 2008). Doména ZIM se skládá ze 30 aminokyselin a nachází se v centrální části JAZ. Obsahuje konzervativní TIFY motiv, který je důležitý pro formaci homo- a heterodimerů. Důležitou interakcí TIFY motivu je interakce s NOVEL INTERACTORS OF JAZ (NINJA), který zprostředkovává represi JA-Ile zprostředkované genové exprese pomocí histon deacetyláza (HDA)/acetylačního cyklu. Spolu s NINJA interagují korepresory TOPLESS (TPL) a TPL-related proteiny (TPRs) (Pauwels *et al.*, 2010; Wasternack *et Strnad*, 2015).

JAZ represory mají obzvláště velmi silnou afinitu ke *basic-helix-loop-helix* (bHLH) transkripčním faktorům (TF) mezi které patří například MYC2, MYC3, MYC4 či MYB TF. Nejzásadnějším z nich je však MYC2 (Woldemariam *et al.*, 2011). MYC2 hraje roli v rané expresi genů z JA signalizace. Karboxylový konec MYC2 obsahuje bHLH doménu skládající se z amfipatických α -helixů hydrofobních aminokyselin. Aby

došlo k regulaci transkripce cílených genů, tvoří MYC2 homo- nebo heterodimery s příbuznými TF MYC3 a MYC4 právě pomocí amfipatických α -helixů hydrofobních aminokyselin. Tyto homo- či heterodimery se dále pojí na G-box (5'-CACGTG-3') nacházející se na cílených promotorech. K iniciaci transkripce MYC2 reaguje s rostlinným Mediátorovým komplexem pomocí domnělé transkripční aktivační domény (TAD), která interaguje s ACTIVATOR INTERACTION DOMAIN (ACID) a s 10 aminokyselinami v Middle Domain (MD) MED25 podjednotky Mediátorového komplexu. MYC2, MYC3 a MYC4 interagují s Jas doménou JAZ pomocí jejich terminální domény JAZ Interaction Domain (JAD) (Kidd *et al.*, 2009; Fernández-Calvo *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012a). I když MYC2 pozitivně reguluje obranu proti hmyzu, odpověď na poranění, metabolismus flavonoidů a toleranci oxidativního stresu během JA signalizace, dochází k tomu na úkor negativní regulace exprese obrany proti patogenům a sekundárního metabolismu rostliny (Kazan *et Manners*, 2008).



Obr. 2: Schéma percepce JA-Ile a regulace JA indukované genové exprese (Převzato a upraveno z Wasternack, 2015).

Legenda: (JA-Ile): jasmonoyl-L-isoleucin, (Ub): ubiquitin, (COI1): CORONATINE INSENSITIVE 1F-box protein, (JAZ1): JASMONATE ZIM DOMAIN 1 protein, (NINJA): NOVEL INTERACTORS OF JAZ, (JAZs): JASMONATE ZIM DOMAIN proteiny, (JAV1): JASMONATE-ASSOCIATED VQ MOTIF GENE 1, (MYC2): transkripční faktor MYC2, (TPL): TOPLESS, (HDA6): histon deacetyláza 6, (HDA19): histon deacetyláza 19, (MED25): podjednotka Mediátorového komplexu

3.3 Masožravé rostliny

Obecně vnímáme vztah mezi rostlinami a živočichy jako nevyrovnaný. Rostliny díky své nemožnosti pohybu investují převážně do obranných systémů, naopak živočichové investují převážně do systému ofenzivních (Ehrlich *et* Raven, 1964). Avšak neexistuje pravidlo bez výjimek. Existuje přes 800 druhů masožravých rostlin, které jsou rozdělené do 19 rodů, 12 čeledí a 5 řádů. Masožravost u rostlin se s největší pravděpodobností vyvinula z důvodu nedostatku živin v půdě, avšak nezávisle na místě výskytu. Z kořisti rostliny vstřebávají větší množství dusíku, ale i fosfor, síru, draslík, vápník a možná i jiné prvky (Studnička, 1984; Ellison *et* Adamec, 2018). S touto hypotézou vývoje masožravosti u rostlin přišel a dále ji rozvíjel jako první Darwin (1875), kdy masožravé rostliny nazýval ještě jako „insektivorní“ (hmyzožravé). Masožravé rostliny rostou především v tropických a v subtropických oblastech s jasnou preferencí na teplé a vlhké prostředí, avšak existují i druhy, které rostou v sezóně suchých oblastech (Ellison *et* Adamec, 2018). Ellison *et* Adamec (2018) definovali pět esenciálních charakteristik, aby rostlina mohla být považována za „masožravou“: (1) kořist musí být chycena pomocí specializovaných pastí, (2) kořist musí být zabita, (3) musí dojít k jejímu strávení, (4) musí dojít k absorpci živin ze strávené kořisti, (5) rostlina musí využít tyto živiny ke svému růstu. Masožravé rostliny využívají k nalákání kořisti různé druhy napodobování květů či plodnic hub pomocí vzhledu, barvy či vůně, jako je například vůně kvasícího se ovoce (Studnička, 1984). Pastí masožravých rostlin lze rozdělit do dvou kategorií: pasivní a aktivní. Aktivní pastí zahrnují nějaký pohyb během lovení (např. zavření pastí), zatímco pasivní pastí nevyžadují žádný pohyb k chycení kořisti, kdy syntéza trávicích enzymů je silně indukovaná v přítomnosti amoniaku a proteinů z živé kořisti (Heslop-Harrison, 1975; Saganová *et al.*, 2018). Mezi pastí pasivní patří například lepkavé listy, láčky či vrše a mezi aktivní se řadí například sací měchýřky nebo svírací čepele. Veškeré druhy pastí vznikly přímou vývojovou přeměnou z listů (Studnička, 1984).

3.4 Mucholapka podivná (*Dionaea muscipula*)

Mucholapka podivná (*Dionaea muscipula*) byla objevena roku 1759 anglickým guvernérem Severní Karolíny Arthurem Dobbsem. O dalších deset let později byla roku 1770 navržena botanikem Johnem Ellisem teorie souvislosti lapání hmyzu s možnou výživou rostliny (Studnička, 1984). Tato hypotéza byla dále experimentálně testovaná Darwinem (1875), který mucholapku podivnou nazval tou „nejpodivuhodnější rostlinou na světě“.

Mucholapka podivná patří do čeledi *Droseraceae*. Tento druh je endemitem na slatiništích Severní a Jižní Karolíny, USA. Roste v kyselých a nutričně chudých rašelinách či hlinitých půdách nebo v křovinné vegetaci smrkových lesů. Jelikož tyto rostliny rostou v oblastech se silnými zimami, horkými a vlhkými léty s občasnými požáry, mají striktně sezónní dobu růstu spolu se zimním obdobím dormance. Požáry a zimu přežívají pomocí podzemních cibulovitých orgánů. Nový růst rostliny začíná pozdní zimou či brzkým jarem, kvetení probíhá během brzkého léta a tvorba semen v průběhu poloviny léta (Studnička, 1984; Ellison *et Adamec*, 2018).

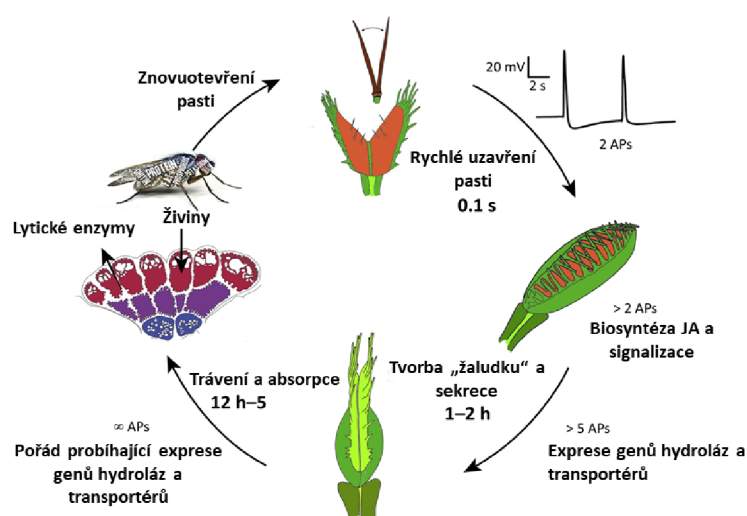
3.4.1 Morfologie

Nadzemní část rostliny se skládá z přízemní růžice o průměru 7–14 cm, která je tvořena listy o délce přibližně 7 cm. Listy mají výraznou žilnatinu táhnoucí se jejich středem. Skládají se z křídlatě rozšířeného řapíku, krátké stopky a z čepele, která se skládá ze dvou laloků a formuje tak past, jejíž maximální rozměr je 3 cm. Čepele svírají úhel 40° až 50° a jejich okraje jsou ztlustělé a nachází se na nich vábící nektarové žlázy a dlouhé špičaté výčnělky podobné zubům o přibližné délce 18 mm. Střední část plochy čepele je žlutozelená až leskle tmavě červená (Studnička, 1984; Ellison *et Adamec*, 2018). Tmavě červená barva střední části plochy čepele je charakteristická pro hladovějící rostliny, které se tímto zbarvením snaží zvýšit šanci na nalákání hmyzu. Rostlina pro nalákání hmyzu, mimo svých nektarových žláz a zbarvení, také vylučuje více než 60 těkavých organických látek, přičemž většina z nich je součástí ovocných či květových vůní (Kreuzwieser *et al.* 2014; Hedrich *et Neher*, 2018). Snad nejdůležitější součástí pasti jsou tři citlivé trichomy, nacházející se na obou polovinách čepele a slouží jako spoušť v celém mechanismu. Na délku mají přibližně 2 mm a mají pružnou ohebnou bázi, dále snadno ohebné zaškrcení a nad tím dlouhý tuhý hrot (Studnička, 1984).

3.4.2 Mechanismus lovu

Po nalákání kořisti do pasti je třeba, aby kořist mechanicky stimulovala citlivé výčnělky, které konvertují mechanický stimulus na elektrické signály. Pouhá výchylka o 2,9° kombinovaná se silou několika mN stačí ke tvorbě akčních potenciálů (APs) (Scherzer *et al.*, 2019). K úspěšnému chycení kořisti je zapotřebí minimálně 2 APs během časového úseku 20 sekund, aby došlo ke sklapnutí pasti (Böhm *et al.* 2016). Při prvním AP se past uvede do „pozornostního módu“ a úroveň Ca^{2+} v cytoplasmě se zvýší. Při druhém stimulu se past bleskově zavře díky překročení prahové úrovně Ca^{2+} v cytoplasmě (Suda *et Toyota*, 2022). Jakmile je past uzavřena a nedochází k další tvorbě APs, dojde k jejímu

otevření po 12 hodinách (Hedrich *et* Neher, 2018). Časté zavírání pastí a generování akčních potenciálů je pro rostlinu nevýhodné, jelikož dochází k inhibici fotosyntézy a ke stimulaci mitochondriální respirace (Pavlovič *et al.*, 2010). K uzavření pasti dochází pravděpodobně skrze iontové kanály, které mění turgor buněk řídící pohyb pasti. Jak se kořist snaží z pasti uniknout, dále stimuluje výčnělky a dochází tak k postupnému hermetickému uzavření pasti (Escalante-Peréz *et al.*, 2014). Při zavření pasti, tudíž během druhého stimulu, dochází k syntéze JA. Pět a více APs je potřeba k formování „zeleného žaludku“ rostliny a k indukci enzymů a transportérů, které zprostředkovávají trávení a absorpci živin z chycené kořisti (Böhm *et al.*, 2016). Čím častěji dochází ke stimulaci výčnělků, tím je JA více syntetizována. Díky tomuto systému získává rostlina informace o tom, jak je kořist velká a dochází tak k větší syntéze trávicích tekutin a enzymů. Past se po strávení kořisti otevírá přibližně po týdnu a je znovu připravena k lovu (Volkov *et al.*, 2011; Bemm *et al.*, 2016). Pokud je kořist moc malá, past se začne znovu pomalu otevírat. Rostlina tak ušetří potřebnou energii a prostředky pro chycení a strávení větší kořisti, která ji poskytne mnohem více živin (Pavlovič *et al.*, 2010).



Obr. 3: Lovící cyklus mucholapky podivné (*Dionaea muscipula*) (Převzato a upraveno z Hedrich *et* Neher, 2018).

Legenda: (APs): akční potenciály

Avšak pouhá mechanostimulace kořisti nestačí k tomu, aby došlo k plné a dlouhodobé proteolytické aktivitě enzymů. Proto je důležitá i chemická stimulace, která

je způsobena postupným rozkladem kořisti. Díky chemické stimulaci dochází k úplnému strávení kořisti i po jejím zabití, kdy nedochází ke tvorbě APs. Předchází se tak k předčasnému otevření pasti s nedokonale strávenou kořistí. Bylo dokázáno, že proteiny jsou univerzálním signálem při indukci postupného trávení (Libiaková *et al.*, 2014, Jakšová *et al.*, 2020).

Principy lovicích mechanismů masožravých rostlin napovídají tomu, že masožravé rostliny využívají systémů vyskytujících se v obranných systémech rostlin. Od stavby struktur v pastech, trávících enzymů až po signální dráhy, masožravé rostliny exaptovaly tyto obranné mechanismy ke svému prospěchu (Pavlovič *et Mithöfer*, 2019). Například při poranění pasti reaguje rostlina podobně jako při chycení kořisti, a to aktivací JA signalizační dráhy, což nadále podporuje důkaz o využívání obranné signální dráhy rostlin masožravými rostlinami. Masožravé rostliny navíc využívají trávící enzymy, které patří do rodiny tzv. *pathogenesis-related (PR) proteins*. Například chitináza, která je v běžných rostlinách indukována patogenem a tráví chitin v buněčných stěnách patogenních hub, byla masožravými rostlinami exaptoována na trávení exoskeletu hmyzu (Pavlovič *et al.*, 2017).

3.4.3 Trávící enzymy

Každá z trávících žláz mucholapky se skládá ze 46 buněk, které jsou uspořádány do tří vrstev. Dvě bazální buňky jsou obklopeny čtyřmi endodermálními (stonkovými) buňkami, které v sobě obsahují velké množství oleosomů s vysokým obsahem triacylglycerolu (TAG) a představují tak možnou primární zásobu substrátu pro výrobu energie. Tato skutečnost je podporována i vysokou expresí transkriptů peroxisomální β -oxidace TAG v těchto buňkách. Nad třetí vrstvou se nachází druhá vrstva složená z osmi buněk, které obsahují vakuoly a velké množství mitochondrií a dochází tak zde ke tvorbě ATP. Nad druhou vrstvou se nachází vnější vrstva. Je složena ze 32 sekrečních buněk tvořící hlavičku zralé trávící žlázy a obsahují rozšířené drsné endoplazmatické retikulum a velké vakuoly, u kterých dojde během stimulace k rozptýlení. Na basálních koncích buněk první a druhé vrstvy se nachází výrazné invaginace plasmatických membrán. Tyto invaginace indikují zvýšenou kapacitu pro rozpoznání živin a jejich následný transport. Všechny buňky trávících žláz jsou navzájem propojené plazmodezmaty a tvoří tak metabolické kontinuum (Bemm *et al.*, 2016).

Signalizace JA spouští okyselení vezikulů a *de novo* syntézu trávících enzymů. Sekrece trávících enzymů započiná až přibližně po 12 hodinách po stimulaci (Scherzer

et al., 2017). Trávící šťávy mají pH okolo 4,3 a během sekreční fáze a tvoření „zeleného žaludku“ dále klesá na hodnoty okolo 3,4 (Takahashi *et al.*, 2009; Escalante-Peréz *et al.*, 2011). Dochází tak k různým změnám maximálních aktivit enzymů v průběhu rozkladu kořisti. Složení trávící tekutiny se mění a přizpůsobuje složení chycené kořisti (Pavlovič *et al.*, 2014). Největší zastoupení v trávící tekutině mají proteázy. Dále se v trávící tekutině nachází chitinázy, fosfatázy, nukleázy, peroxidázy, fosfolipázy a glukanázy (Schulze *et al.*, 2012).

3.4.3.1 Chitinázy

Aby se rostlina mohla vůbec dostat k potřebným živinám z hmyzí kořisti, musí se jako první dostat přes chitinový exoskelet hmyzu. Chitin je nerozpustný lineární polymer skládající se z N-acetylglukosaminových podjednotek spojených 1,4- β -glykosidickou vazbou a nachází se ve třech krystalických formách α , β a γ . Na základně primární sekvence jsou chitinázy rozděleny do 5 tříd (I–V) (Cohen-Kupiec *et Chet*, 1998). Třída I je rozdělena do dvou podtříd Ia a Ib. Podtřída Ia má prodloužený karboxylový konec, zatímco podtřída Ib tento prodloužený karboxylový konec nemá a je extracelulární (Neuhaus *et al.*, 1991). Mezi nejzastoupenější chitinázu mucholapky podivné patří VF chitináza-I a je jedním z nejvíce zastoupených trávících enzymů 48 hodin po stimulaci. Patří mezi chitinázy Ib třídy a štěpí krystalický α -chitin. Nukleotidová sekvence VF chitinázy-I je 924 bp dlouhá a molekulová hmotnost enzymu je 33,4 kDa. Její funkce je pravděpodobně podporována dalšími dvěma chitinázami, které jsou syntetizované v menším množství (Paszota *et al.*, 2014; Bemm *et al.*, 2016).

3.4.3.2 Proteázy

Proteolytické enzymy patří do třídy hydroláz. Nejzastoupenějšími proteázami v trávící tekutině mucholapky podivné jsou cystein proteázy a dále aspartát proteázy, alternativními názvy také dionain a dionaesin. Přímou se jedná o čtyři cystein proteázy (dionain-1, dionain-2, dionain-3 a dionain-4) a o dvě aspartát proteázy (dionaesin-1 a dionaesin-2). Všechny čtyři cystein proteázy patří do podrodiny C1A, která je reprezentována cystein proteázou papainem, se kterým sdílejí reaktivní místa a cysteiny tvořící disulfidické můstky. Také mají podobné pH optimum a molekulovou hmotnost okolo 45 kDa. Aspartát proteázy hrají menší roli v trávení kořisti u mucholapky podivné v porovnání s jinými druhy masožravých rostlin (Takahashi *et al.*, 2011; Schulze *et al.*, 2012). Jsou příbuzné k aspartát proteáze nepenthesinu, což byl vůbec první vyizolovaný

a charakterizovaný endogenní enzym masožravé rostliny. Vyznačuje se velmi vysokou stabilitou v širokém rozpětí teplot a pH (Athauda *et al.*, 2004).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

- Mucholapka podivná (*Dionaea muscipula*) (Cresco Carnivora)

4.2 Použité chemikálie, roztoky a soupravy

Použité chemikálie

- 12-oxofytodienová kyselina (D₅-cisOPDA) (OlChemIm, kat. č. 036 6191)
- 12-oxofytodienová kyselina (OlChemIm, kat. č. 014 6191)
- 96% Ethanol (Lachner, kat. č. 20025-AP0)
- Acetonitril, čistota HPLC (Merck, kat. č. 100030)
- Acetonitril, čistota LC-MS (Merck, kat. č. 100029)
- Akrylamid (Sigma-Aldrich, kat. č. A8887)
- Bisakrylamid (Biorad, kat. č. 1610201)
- Deionizovaná voda (Milipore)
- Dodecylsírán sodný (SDS) (Biorad, kat. č. 1610302)
- Glycerol (Lachner, kat. č. 40058-AP0)
- Glycin (Lachner, kat. č. 40059-AP0)
- Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, kat. č. A7906)
- Jasmonoyl-isoleucin (D₂-JA-Ile) (OlChemIm, kat. č. 036 6861)
- Jasmonoyl-isoleucin (OlChemIm, kat. č. 014 6861)
- Kyselina abscisová (D₆-ABA) (OlChemIm, kat. č. 034 2721)
- Kyselina abscisová (OlChemIm, kat. č. 013 2701)
- Kyselina dihydrofazeová (D₃-DPA) (NRC)
- Kyselina dihydrofazeová (NRC)
- Kyselina fazeová (D₃-PA) (NRC)
- Kyselina fazeová (NRC)
- Kyselina chlorovodíková (HCl) (Penta, kat. č. 19360-11000)
- Kyselina indol-3-octová (¹³C₆-IAA) (OlChemIm, kat. č. 031 7331)
- Kyselina indol-3-octová (Merck, kat. č. 100353)
- Kyselina jasmonová (D₅-JA) (Merck, kat. č. 900378)
- Kyselina jasmonová (Merck, kat. č. 14631)
- Kyselina mravenčí, čistota HPLC (Sigma-Aldrich, kat. č. 5.43804)
- Kyselina salicylová (D₄-SA) (OlChemIm, kat. č. 037 6581)

- Kyselina salicylová (Merck, kat. č. 818731)
- Methanol (Roth, kat. č. 0082.3)
- Methanol, čistota HPLC (Merck, kat. č. 106007)
- Methanol, čistota LC-MS (Merck, kat. č. 106035)
- NaCl (Lachner, kat. č. 30093-AP0)
- PageRuler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, kat. č. 26616)
- Peroxodisíran amonný (APS) (Biorad, kat. č. 1610700)
- Primární králičí protilátka anti-aspartát proteáza (Genescript)
- Primární králičí protilátka anti-cystein proteáza (Genescript)
- Primární králičí protilátka anti-chitináza (Agrisera)
- Tekutý dusík (Linde)
- Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Biorad, kat. č. 1610800)
- Tricín (Sigma-Aldrich, kat. č. T0377)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) (Roche, kat. č. 10085423)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, kat. č. P1379)

Použité roztoky a jejich příprava

- **10% APS:** 20 mg APS + 200 μ l dH₂O
- **10x Anodový tlumivý roztok (pH 8,9):** 121,14 g Tris + titrovat HCl na pH 8,9 a doplnit dH₂O do objemu 1000 ml
- **10x Blotovací roztok:** 15,1 g Tris-báze + 72 g glycin + 0,01 g SDS a doplnit dH₂O do objemu 1000 ml
- **10x Katodový tlumivý roztok (pH 8,25):** 60,6 g Tris + 89,6 g Tricín + 5 g SDS a doplnit dH₂O do objemu 500 ml
- **10x TBS (pH 7,4):** 7,5 Tris-báze + 44 g NaCl a doplnit dH₂O do objemu 500 ml, pH upravit koncentrovanou HCl
- **1x TBS:** 100 ml 10x TBS + 900 ml dH₂O
- **1x Transférový roztok:** 700 ml dH₂O + 100 ml 10x blotovací roztok + 200 ml methanol
- **1x TSBT:** 100ml 10 x TBS + 1 ml Tween 20 + 899 ml dH₂O
- **3x Gelový tlumivý roztok (pH 8,45):** 36,3 g Tris + 300 mg SDS + titrovat HCl na pH 8,45 a doplnit dH₂O do objemu 100 ml
- **AB-3:** 48 g akrylamid + 1,5 bisakrylamid a doplnit dH₂O do objemu 100 ml
- **Blokovací roztok:** 100 ml TSBT + 5 g BSA

- **Vzorkovací tlumivý roztok (Sample buffer):** 2,5 ml 1 mol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 6,8) + 0,5 ml ddH₂O + 1,0 g SDS + 0,8 ml bromfenolová modř + 4 ml 100% glycerol + 2 ml 1 mol·l⁻¹ DTT

Použité soupravy

- ProteoSilver Plus Silver Stain Kit (Sigma-Aldrich, kat.č. PROTSIL2)
- Immobilon Western Chemiluminiscent HRP substrate (Milipore, kat. č. WBKLS0500)

4.3 Použité přístroje a zařízení

- Analytické váhy Explorer EX225DM (Ohaus)
- Centrifugační koncentrátor CentriVap Cold Trap (Labconco)
- Elektrický zdroj PowerPac Universal (Bio-Rad)
- Gel skener Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences)
- Lyofilizátor (Martin Christ)
- Modulární kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem Nexera X2 s LC-MS8050 (Shimadzu)
- Sestava pro elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad)
- Sestava pro Western blotting Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad)
- Stolní centrifuga Microspin 12 (Biosan)
- Termoblok Bio TDB-100 (Biosan)
- Ultrazvuková vodní lázeň Sonorex Digitec DT 106 (Bandelin)
- Vakuový manifold pro extrakci na pevné fázi s membránovou pumpou Visiprep (Supelco)
- Výkyvná třepačka RK-2D (Witeg)

4.4 Použité metody

4.4.1 Stanovení koncentrace fytohormonů pomocí LC-MS/MS

4.4.1.1 Příprava vzorků

Prvním krokem bylo provedení experimentu a získání materiálu, kdy bylo pět kontrolních rostlin umístěno na vzduchu a pět rostlin bylo umístěno 1 hodinu před provedení experimentu do vody (6:1 destilovaná voda a voda z kohoutku), tak aby byly rostliny zcela ponořené. Stimulace pastí proběhla pomocí tupé špičky pipety. Jako první proběhla stimulace pro zavření pastí a poté následovala stimulace po dobu 1 hodinu v intervalech po 1 minutě, kdy docházelo k postupnému hermetickému uzavírání pastí a akumulaci

jasmonátů a dalších fytohormonů. Po stimulaci byly pasti rychle odebrány a zamrazeny v tekutém dusíku, aby nedošlo k nechtěné akumulaci jasmonátů a jiných fytohormonů z důvodu poranění. Vzorky byly dále uchovány v lednici při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Sesbírané pasti byly po jedné homogenizovány ve vychlazené třecí misce s tloučkem za stálého chlazení tekutým dusíkem, aby nedošlo k jejich roztání. Takto homogenizovaný materiál byl po 35–40 mg navážen do jednotlivých mikrozkušavek pro každý biologický replikát. Vzorky byly dále po dobu 3 dnů lyofilizovány za následujících podmínek: 36 hodin při tlaku 0,31 mbar a teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně 36 hodin při tlaku 0,01 mbar a teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Lyofilizované vzorky byly extrahovány v 1 ml extrakčního činidla (ledově vychlazený 50% acetonitril), které obsahovalo směs interních standardů značených stabilními izotopy ($\text{D}_5\text{-JA}$, $\text{D}_2\text{-JA-Ile}$, $\text{D}_5\text{-cisOPDA}$, $\text{D}_6\text{-ABA}$, $\text{D}_4\text{-SA}$, $^{13}\text{C}_6\text{-IAA}$, $\text{D}_3\text{-PA}$, $\text{D}_3\text{-DPA}$). Extrakce probíhala po dobu 30 minut na ledově vychlazené ultrazvukové lázni a následně byly vzorky centrifugovány 15 minut ($20000\times\text{g}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). K přečištění vzorků byla použita extrakce na pevné fázi (SPE). K extrakci byly použity kolonky OasisTM HLB (Waters) s 30 mg sorbentu o objemu 1 ml. K aktivaci kolonek byl použit 1 ml methanolu a poté 1 ml MiliQ vody a k ekvilibraci 1 ml 50% acetonitrilu. Po ekvilibraci byl nanesen supernatant vzorku a promyt 30% acetonitrem. Poslední dvě frakce byly sesbírány do 3 ml borosilikátových zkumavek a spojené frakce byly odpařeny pomocí centrifugační vakuové odparky do sucha. Suché odparky byly poté zmrazeny při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.1.2 Analýza vzorků

K rozpuštění odparků bylo použito 40 μl mobilní fáze v počátečním složení 80% solvent A a 20% solvent B. Solventem A byla 15 mM kyselina mravenčí s hodnotou pH 3 (titrováno hydroxidem amonným) a solventem B byl acetonitril. Po rozpuštění byly zkumavky sonifikovány na ultrazvukové lázni po dobu 5 minut a následně byly přefiltrovány pomocí mikrospinů (Ciro) s velikostí pórů 0,2 μm (nylon) a převedeny do chromatografických vialek se zúženým dnem. Chromatografická separace a hmotnostní detekce (LC-MS/MS s ionizací elektrosprejem (ESI)) proběhla na modulárním chromatografickém systému Nexera X2 s hmotnostní detekcí pomocí MS-8050 s trojitým kvadrupólovým analyzátozem (Shimadzu). Chromatografie byla provedena v systému reverzních fází kolonou CSHTM (Waters) C18 2,1 \times 150 mm; 1,7 μm . Gradientovou elucí bylo docíleno separace s průtokem 0,4 ml \cdot min⁻¹ při 40 $^{\circ}\text{C}$ (0-1 min 20 % solvent B, 1-11 min 20-80 % solvent B, 11-13 min 100 % solvent B, 13-18 min 20 % solvent B).

Hmotnostní detekce probíhala v módu selektivního záznamu více vybraných reakcí (MRM). U většiny analytů byly zaznamenávány 3 MRM přechody pro co nejspolehlivější určení identity analytu ve složité matrici rostlinných pletiv. MRM přechody jsou uvedeny v tabulce Tab. 1.

Tab. 1: Seznam MRM přechodů analytů. Přechody jsou uvedeny ve formátu Q1 m/z >Q3 m/z (Kolizní energie v jednotkách eV).

Analyt	ESI Mód	MRM 1	MRM 2	MRM 3
OPDA	(-)	291,30>165,35 (20)	291,30>247,40 (19)	291,30>273,35 (18)
JA	(-)	209,35>59,00 (14)	209,35>40,90 (37)	
JA-Ile	(+)	324,30>278,0 (-13)	324,30>151,20 (-15)	324,20>133,20 (-19)
ABA	(-)	263,20>153,20 (13)	263,20>204,20 (21)	263,20>219,20 (14)
DPA	(-)	281,00>237,3 (15)	281,00>171,3 (19)	281,00>123,05 (19)
PA	(-)	279,00>139,15 (16)	279,00>205,25 (15)	279,00>187,15 (20)
SA	(-)	137,20>93,05 (21)	137,20>65,00 (29)	
IAA	(+)	176,00>130,05 (-16)	176,00>77,20 (-42)	176,00>103,15 (-32)
Interní standardy		MRM 1	MRM 2	MRM 3
D ₅ -OPDA	(-)	296,20>170,45 (21)	296,20>252,45 (17)	296,20>278,40 (17)
D ₅ -JA	(-)	214,30>61,95 (13)	214,30>42,05 (40)	
D ₂ -JA-Ile	(+)	326,30>280,00 (-13)	326,30>151,2 (-15)	326,30>133,20 (-19)
D ₆ -ABA	(-)	269,25>159,25 (12)	269,25>225,25 (15)	269,25>207,20 (22)
D ₃ -DPA	(-)	284,05>240,25 (16)	284,05>174,25 (21)	284,05>183,1 (17)
D ₃ -PA	(-)	282,00>142,25 (16)	282,00>208,15 (16)	282,00>171,30 (16)
D ₄ -SA	(-)	141,20>97,10 (21)	141,20>69,10 (31)	
¹³ C ₆ -IAA	(+)	182,05>136,05 (-16)	182,05>109,10 (-31)	182,05>81,10 (-43)

Legenda: (ESI): Electrospray ionization, (MRM): Multiple reaction monitoring

Surová data byla zpracována pomocí softwaru LabSolutions ver. 5,97 SP1 (Shimadzu) a byla ošetřena, log-transformována a vyjádřena jako molární koncentrace v rostlinných pletivech za pomoci programu Excel (Microsoft).

4.4.2 SDS-PAGE a Western blotting

Vzorky trávících tekutin pro detekci a kvantifikaci trávících enzymů byly získány po provedení experimentu. Průběh a podmínky experimentu byly totožné průběhu a podmínkám zmíněných v kapitole 4.4.1.1 Příprava vzorků. Pět kontrolních rostlin bylo umístěno na vzduchu a pět rostlin bylo umístěno 1 hodinu před experimentem do vody. Následně proběhla stimulace pastí pomocí tupé špičky pipety po dobu 1 hodinu v intervalech po 1 minutě. Jediný rozdíl spočíval v odebrání vzorků trávících tekutin, které byly z pastí odebrány po 24 hodinách pomocí pipety.

Pro separaci a následnou detekci a kvantifikaci bylo použito polyakrylamidové gelové elektroforézy v denaturujících podmínkách v tris-tricinovém systému podle Schäggera (2006). Byl použit zaostřovací gel s koncentrací 4% a separační gel s koncentrací 10%. Separační gel byl připraven smícháním všech složek (viz. Tab. 2) a napipetován mezi skla. Ihned po nanesení byl roztok separačního gelu převrstven 96% ethanolom. Po polymerizaci separačního gelu byl ethanol odstraněn vylitím a vysušením filtračním papírem. Zaostřovací gel byl během polymerizace separačního gelu připraven smícháním všech složek (viz. Tab. 2) a následně napipetován mezi skla na vrstvu separačního gelu. Ihned po nanesení zaostřovacího gelu byl mezi skla vložen hřebínek. Celkem byly připraveny gely čtyři.

Tab. 2: Složení zaostřovacího a separačního gelu.

	4% zaostřovací gel	8% separační gel
3x gelový tlumivý roztok	2,25 ml	7,50 ml
dH₂O	6,00 ml	8,55 ml
AB-3	0,75 ml	4,50 ml
Glycerol	-	2,40 ml
10% APS	70,00 µl	115,00 µl
TEMED	7,50 µl	15,00 µl

Vzorky byly smíchány se vzorkovacím tlumivým roztokem v poměru 80 µl vzorek a 30 µl vzorkovací tlumivý roztok. Následně byly vzorky zahřívány a denaturovány při 70 °C po dobu 10 minut. Byla sestavena elektroforetická aparatura a mezi skla byl vlit 1x katodový tlumivý roztok, na každý z gelů bylo nanášeno 20 µl vzorku z rostlin stimulovaných na vzduchu, 20 µl vzorku z rostlin stimulovaných ve vodě a 2 µl markeru molekulových hmotností PageRuler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific) a do vaničky byl vlit 1x anodový tlumivý roztok. Elektroforetická separace probíhala při konstantním napětí 110 V přibližně po dobu 80 minut. Separované proteiny z jednoho z gelů byly následně vizualizovány pomocí barvení stříbrem (ProteoSilver Plus Silver Stain Kit, Sigma-Aldrich).

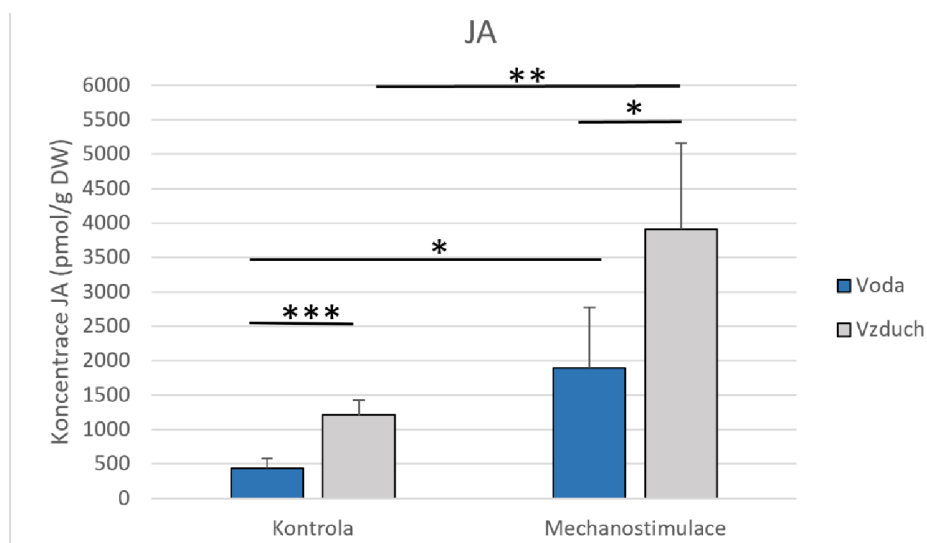
Proteiny ze tří zbývajících gelů byly přebírány na nitrocelulózu membránu (Bio-Rad) při konstantním proudu 50mA na gel po dobu 70 minut. Membrány byly následně přes noc inkubovány v blokovacím roztoku v lednici při 4 °C. Po blokování byly membrány promyty v 1x TBS po dobu 10 minut. Po promytí byly membrány inkubované na výkyvné třepačce po dobu 1 hodiny v příslušných králících primárních protilátkách (aspartát proteáza, chitináza, cystein proteáza) v 5% BSA v 1x TBST. Po inkubaci se

membrány promývaly 5x po dobu 10 minut v 1x TBST a poté 10 minut v 1x TBS. Po promytí se membrány inkubovaly sekundární koží anti-králičí protilátkou (H + L) s navázanou křenovou peroxidázou v 5% BSA v 1x TBST po dobu 60 minut. Po inkubaci sekundární protilátkou byly membrány znovu promývány 5x po dobu 10 minut v 1x TBST a poté 10 minut v 1x TBS. Proteiny na membránách byly následně po napipetování chemiluminiscenčního HRP substrátu (Immobilon Western Chemiluminiscent HRP substrate) detekovány pomocí gel skeneru Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences).

5 Výsledky

5.1 Koncentrace fytohormonů získané pomocí metody LC-MS/MS

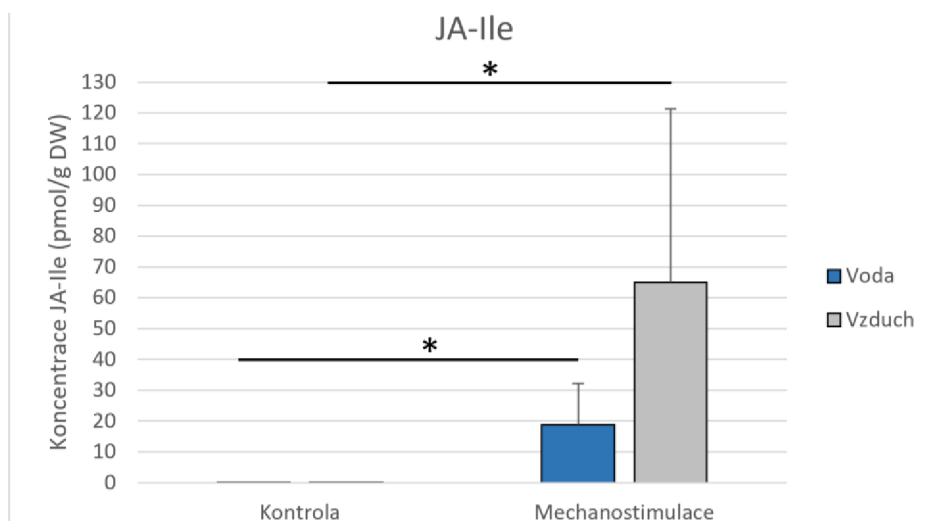
Mechanická stimulace pastí na vzduchu i pod vodou indukovala hermetické uzavření pastí, což indikuje aktivaci trávících procesů prostřednictvím jasmonátů. Koncentrace fytohormonů byly měřeny u kontrolních (nestimulovaných) a mechanostimulovaných rostlin, které byly umístěny na vzduchu nebo byly ponořené ve vodě. Při porovnání koncentrací JA v kontrolních rostlinách je patrné, že koncentrace JA u ponořených rostlin byly signifikantně nižší než u rostlin umístěných na vzduchu. Během hodinové mechanostimulace došlo podle očekávání u obou skupin k nárůstu JA, přičemž rostliny ve vodě měly hodnoty koncentrace JA 2× signifikantně nižší než rostliny na vzduchu (Obr. 4). K akumulaci JA-Ile došlo pouze při stimulaci rostlin, kdy hodnoty koncentrace JA-Ile byly 3× nižší u rostlin ve vodě v porovnání s rostlinami na vzduchu, avšak tyto hodnoty vykazovaly velký rozptyl a nejsou tedy statisticky významné (Obr. 5). Prekurzor *cis*-OPDA se nepodařilo detekovat.



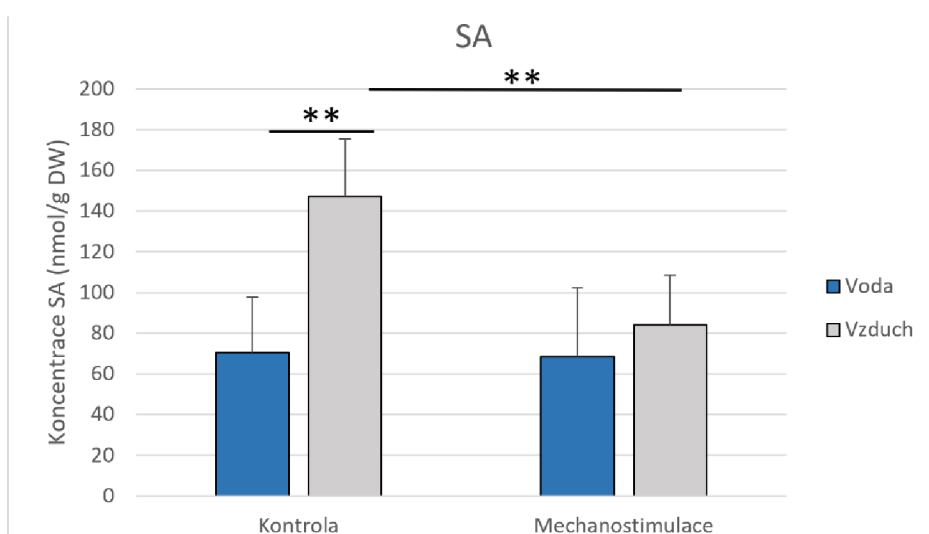
Obr. 4: Koncentrace kyseliny jasmonové (JA) v kontrolních a mechanostimulovaných rostlinách umístěných na vzduchu a ve vodě. Průměr naměřených hodnot + SD, n=5, statistická analýza provedena pomocí dvouvýběrového Studentova t-testu s nerovností rozptylů, *** = P<0,001, ** = P<0,01, * = P<0,05.

Podobný výsledek se ukázal i u kyseliny salicylové (SA), kdy kontrolní hodnoty mezi rostlinami ve vodě a na vzduchu se od sebe signifikantně lišily. Kontrolní rostliny na vzduchu měly přibližně 2× vyšší koncentraci SA než rostliny ve vodě. Na rozdíl od hodnot JA u stimulovaných rostlin na vzduchu, avšak hodnoty SA signifikantně poklesly

v porovnání se stimulovanými rostlinami ve vodě, u kterých pokles SA nebyl detekován (Obr. 6).



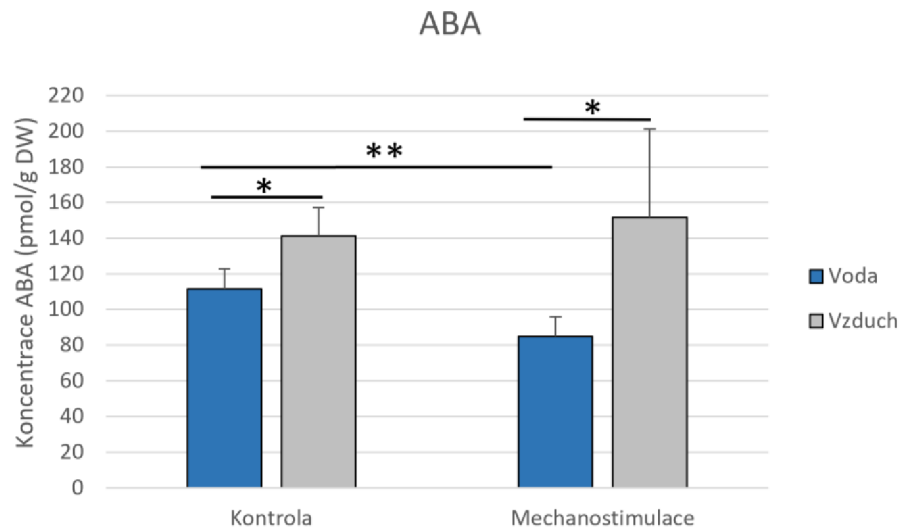
Obr. 5: Koncentrace isoleucinového konjugátu kyseliny jasmonové (JA-Ile) v kontrolních a mechanostimulovaných rostlinách umístěných na vzduchu a ve vodě. Průměr naměřených hodnot + SD, n=5, statistická analýza provedena pomocí dvouvýběrového Studentova t-testu s nerovností rozptylů, * = P<0,05.



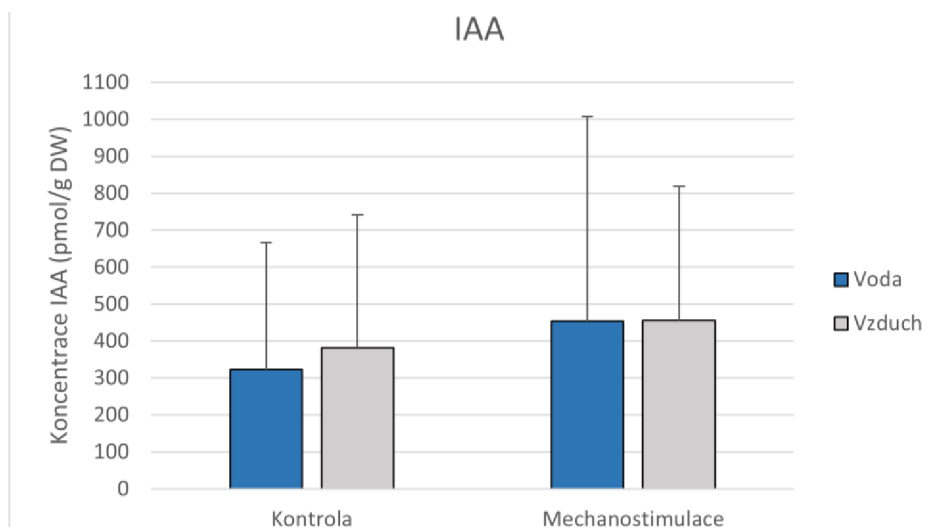
Obr. 6: Koncentrace kyseliny salicylové (SA) v kontrolních a mechanostimulovaných rostlinách umístěných na vzduchu a ve vodě. Průměr naměřených hodnot + SD, n=5, statistická analýza provedena pomocí dvouvýběrového Studentova t-testu s nerovností rozptylů, ** = P<0,01.

Koncentrace kyseliny abscisové (ABA) se v kontrolních rostlinách na vzduchu pohybovala ve vyšších koncentracích nežli u kontrolních rostlin ve vodě. U stimulovaných rostlin, které se nacházely ve vodě došlo k signifikantnímu poklesu

koncentrace ABA, zatímco u rostlin na vzduchu byly hodnoty porovnatelné (Obr. 7). V případě kyseliny indol-3-octové (IAA) se hodnoty v kontrolních rostlinách od sebe příliš nelišily a došlo pouze k mírnému, ale nesignifikantnímu nárůstu koncentrací u mechanostimulovaných rostlin. Ve všech případech lze pozorovat velké rozptyly hodnot (Obr. 8).

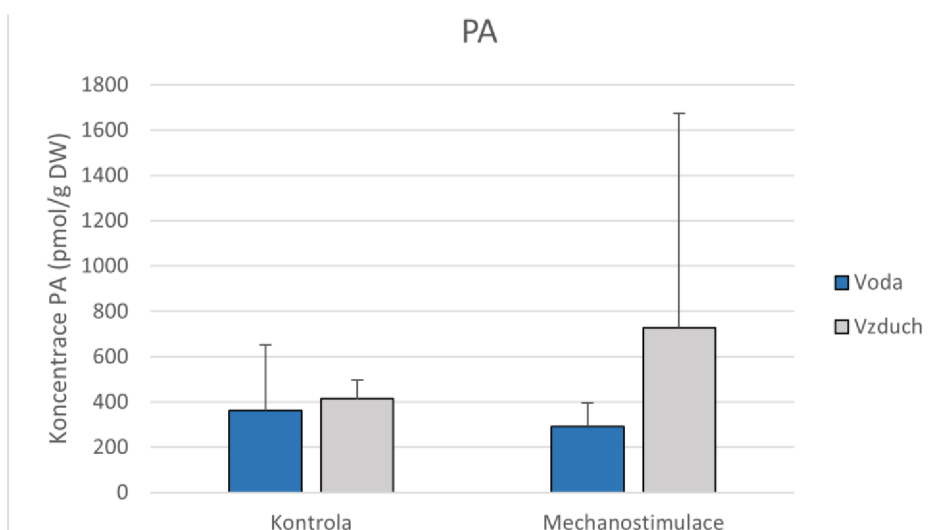


Obr. 7: Koncentrace kyseliny abscisové (ABA) v kontrolních a mechanostimulovaných rostlinách umístěných na vzduchu a ve vodě. Průměr naměřených hodnot + SD, n=5, statistická analýza provedena pomocí dvouvýběrového Studentova t-testu s nerovností rozptylů, ** = $P < 0,01$ * = $P < 0,05$.

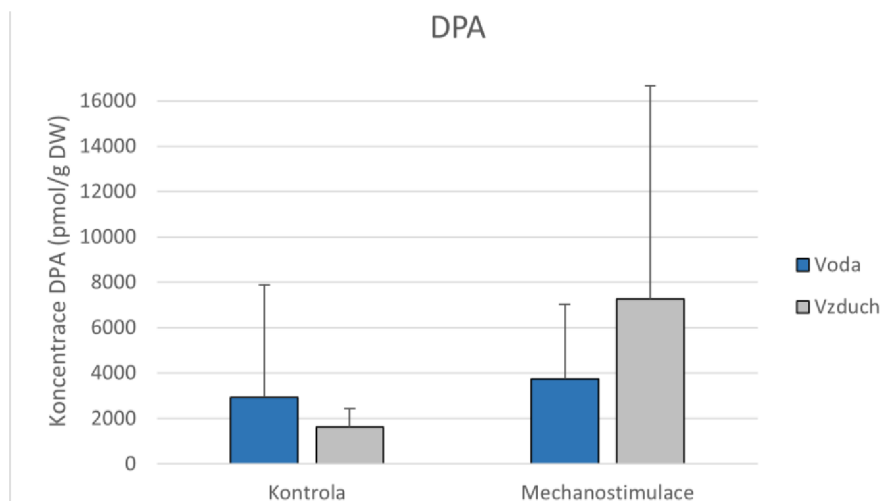


Obr. 8: Koncentrace kyseliny indol-3-octové (IAA) v kontrolních a mechanostimulovaných rostlinách umístěných na vzduchu a ve vodě. Průměr naměřených hodnot + SD, n=5, statistická analýza provedena pomocí dvouvýběrového Studentova t-testu s nerovností rozptylů.

Koncentrace kyseliny fazeové (PA) se v kontrolních rostlinách nacházely na přibližně stejných hladinách. Během stimulace došlo k mírnému k nárůstu u rostlin na vzduchu, kdy hodnoty byly přibližně 2,5× vyšší než u rostlin ve vodě, avšak rozdíly nebyly statisticky významné (Obr. 9). Koncentrace kyseliny dihydrofazeové (DPA) byla v kontrolní skupině stejná, avšak během stimulace došlo u rostlin na vzduchu k nárůstu, který však nebyl signifikantní (Obr. 10).



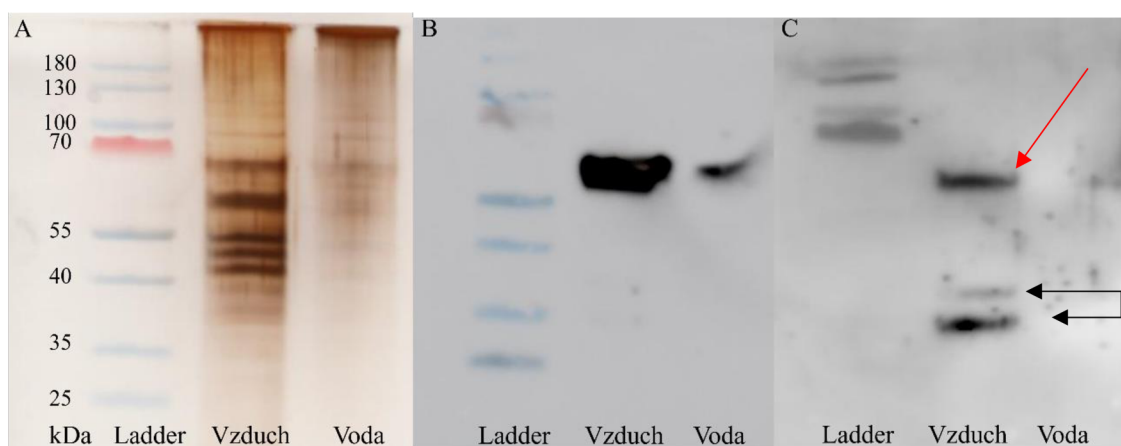
Obr. 9: Koncentrace kyseliny fazeové (PA) v kontrolních a mechanostimulovaných rostlinách umístěných na vzduchu a ve vodě. Průměr naměřených hodnot + SD, n=5, statistická analýza provedena pomocí dvouvýběrového Studentova t-testu s nerovností rozptylů.



Obr. 10: Koncentrace kyseliny dihydrofazeové (DPA) v kontrolních a mechanostimulovaných rostlinách umístěných na vzduchu a ve vodě. Průměr naměřených hodnot + SD, n=5, statistická analýza provedena pomocí dvouvýběrového Studentova t-testu s nerovností rozptylů.

5.2 Analýza trávicích enzymů metodou SDS-PAGE a Western blotting

Pomocí metod SDS-PAGE a Western blotting byla zjišťována přítomnost či nepřítomnost trávicích enzymů v pastích rostlin, které byly mechanostimulovány ponořené ve vodě. Barvení stříbrem nám prokázalo, že trávicí enzymy se nacházely v odebrané trávicí tekutině rostlin, které byly stimulovány na vzduchu, ale i ve vodě. Proteinový profil byl stejný, intenzita barvení nám však ukázala, že v případě rostlin ve vodě došlo k menší expresi trávicích enzymů, avšak v ponořených pastích se mimo trávicí tekutiny nacházela i voda, která odebrané vzorky zředila. Western blotting nám odhalil přítomnost aspartát proteázy (dionaesinu) v trávicí tekutině obou skupin (Obr. 11B). V případě cystein proteázy (dionainu) došlo pouze k detekci u rostlin, které byly mechanostimulovány na vzduchu, a navíc došlo k nežádoucí reakci s aspartát proteázou (Obr. 11C). Chitináza I nebyla detekována ani u jedné ze skupin.



Obr. 11: Stříbrem barvený SDS-PAGE a imunodetekce trávicích enzymů rostlin stimulovaných na vzduchu a ve vodě.

A: Stříbrem barvený SDS-PAGE. **B:** Detekce aspartát proteázy (dionaesin) pomocí Western blot. **C:** Detekce cystein proteázy (dionain) pomocí Western blot. Šipkami je označena detekovaná cystein proteáza. Během detekce došlo k nežádoucí reakci s aspartát proteázou (červená šipka).

6 Diskuse

Masožravost rostlin je pravděpodobně odvozena od obranného systému rostlin, kdy masožravé rostliny exaptovaly signální dráhy, trávící enzymy a samotnou stavbu pastí z obranných systémů. Klíčovou roli v obranyschopnosti a v masožravosti rostlin hraje jasmonátová signální dráha (Pavlovič *et Mithöfer*, 2019). Přítomnost a význam JA a jejího konjugátu JA-Ile v aktivovaných pastích mucholapky podivné byly pozorovány v několika pracích a ukázaly, že JA-Ile je zodpovědná za spuštění biosyntézy trávících enzymů (Libiaková *et al.*, 2014; Bemm *et al.*, 2016; Pavlovič *et al.*, 2017).

Bylo pozorováno, že během průběhu záplav a v následném opadu vody, dochází ke snížení obranyschopnosti rostlin. Toho využívá různý býložravý hmyz, který napadá tyto rostliny a dochází tak k mnohem většímu poškození než za normálních okolností (Dyck *et Thomas.*, 1979; Nakamura *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). Důvod, proč dochází k tomuto snížení obrany, byl donedávna neznámý. Lee *et al.*, 2020 v řadě experimentů se zatopenými rostlinami *Arabidopsis thaliana*, které byly systematicky poškozovány, sledovali změnu exprese genů zapojených do biosyntézy JA a JA signální dráhy. Expres těchto genů byla u zatopených rostlin značně redukována a akumulace JA v místech poškození byla snížena.

Experiment praktické části této bakalářské práce se řídil dle parametrů daných v práci Lee *et al.*, 2020. Rostliny mucholapky podivné byly ponořené 1 hodinu ve vodě před začátkem experimentu a další hodinu byla část mechanostimulována spolu s kontrolními rostlinami na vzduchu. Celkově byly rostliny ponořené na dvě hodiny. Hodina navíc ale nehrála moc velkou roli, protože při zatopení rostlin na více než 1 hodinu dochází k minimálním aditivním změnám (Lee *et al.*, 2020).

Pomocí kvantitativní analýzy LC-MS/MS byly sledovány změny hladin fytohormonů mezi rostlinami kontrolními umístěných na vzduchu a ve vodě a mezi rostlinami, které byly mechanostimulovány na vzduchu či ve vodě. Vysoké koncentrace fytohormonů JA a JA-Ile (Obr. 4; Obr. 5) byly pozorovány po hodinové mechanostimulaci u rostlin na vzduchu, kdy došlo k očekávanému nárůstu koncentrace JA a JA-Ile, jak bylo pozorováno v pracích Libiaková *et al.*, 2014 a Pavlovič *et al.*, 2017. Lee *et al.*, 2020 ve své práci tvrdí, že hodnoty JA u zatopených, ale nepoškozených rostlin nejsou nijak odlišné od hodnot u rostlin na vzduchu a liší se pouze v případě poranění,

kdy dochází ke snížení biosyntézy JA. Toto tvrzení v našem případě úplně neplatí, protože hodnoty JA byly nejen v mechanostimulovaných, ale i kontrolních rostlinách ve vodě, signifikantně nižší než u rostlin na vzduchu (Obr. 4). Významnou roli v supresi biosyntetické dráhy JA během zatopení hraje pravděpodobně etylén. Rychlost difuze etylénu jako plynného hormonu se ve vodě výrazně zpomalí, a proto během zatopení dochází ke spuštění etylénové signalizace. Během svých experimentů Lee *et al.*, 2020 testovali etylén-insenzitivní mutantní rostliny *ein2-1 Arabidopsis thaliana*, u kterých při zatopení došlo k částečnému navrácení exprese genů *AOC2*, *JAZ7* a *VSP1* (vegetative storage protein) podílejících se na biosyntéze JA. V přítomnosti etylénu deaktivuje etylénový receptor negativní regulátor CTR1 (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1) a tím dochází k aktivaci EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE 2). EIN2 je klíčovým faktorem v signální dráze etylénu a chrání transkripční faktory EIN3 a EIL1 (EIN3-LIKE 1) před proteozomální degradací, které svoji interakcí s MYC 2 působí jako supresory nejen své vlastní transkripční aktivity ale i MYC 2, který aktivuje JA-responzivní promotory genů podílejících se na biosyntéze JA (Wasternack *et* Hause, 2013; Song *et al.*, 2014). Z důvodu snížené biosyntézy JA došlo i ke snížení koncentrace JA-Ile v potopených rostlinách (Obr. 5).

Všeobecně se JA zapojuje do regulace resistance proti nekrotrofním patogenům, zatímco kyselina salicylová (SA) reguluje široké spektrum obrany proti biotrofním a hemibiotrofním patogenům (Fu *et al.*, 2012). Signalizační dráhy SA a JA se mezi sebou často ovlivňují ve formě reciprokého antagonismu, kdy JA inhibuje akumulaci SA pomocí modulace transkripčních faktorů podílejících se na biosyntéze SA. Na této inhibici se podílí transkripční faktor MYC 2 (Thaler *et* Humphrey, 2012; Zheng *et al.*, 2012). Tento reciproký antagonismus pravděpodobně vysvětluje signifikantní pokles SA u mechanostimulovaných rostlin na vzduchu (Obr. 6), kdy dochází během mechanostimulace k biosyntéze JA, která dále inhibuje biosyntézu SA. Toto tvrzení je i podpořeno tím, že u rostlin ve vodě nedošlo takřka k žádné změně v hodnotách koncentrace SA (Obr. 6). Je tedy možné, že při zatopení dochází k inhibici signální dráhy JA z důvodu zvýšení SA-dependentní resistenci proti patogenům (Lee *et al.*, 2020).

Kyselina abscisová (ABA) je důležitým fytohormonem podílejícím se na odpovědi rostliny na abiotické stresy jako je například sucho, vysoká teplota či vysoká salinita (Voeselek *et* Bailey-Serres, 2015; de Ollas *et* Dodd, 2016). V případě sucha reguluje turgor uvnitř rostlinných buněk a tím reguluje otevřenost průduchů. Díky tomu

má rostlina větší kontrolu nad ztrátou vody. Voda je v případě mucholapky podivně kritická, protože pro stravení kořisti je jí potřeba velké množství. Během sucha dochází k akumulaci ABA a pravděpodobně dochází k snížení citlivosti pastí (Escalante-Perez *et al.*, 2011). V našem případě byl aplikován opačný druh vodního stresu a to zatopení. U rostlin jako je rýže, sója, rajče či *Arabidopsis* dochází během zatopení ke snížení koncentrace ABA (Kende *et al.*, 1998; Mutava *et al.*, 2015; Bui *et al.*, 2020; de Ollas *et al.*, 2021). Dle našich dat dochází i mucholapky podivně k poklesu koncentrace ABA při zatopení v kontrolních a dále v mechanostimulovaných rostlinách (Obr. 7). Pokles ABA během zatopení je z velké části zprostředkován etylén-dependentní indukcí ABA 8'-hydroxylázy, která oxiduje ABA na kyselinu fazeovou (PA) a ta může být dále redukována na kyselinu dihydrofazeovou (DPA; Bramley, 1997; Benschop *et al.*, 2007; Saika *et al.*, 2007; Arbona *et al.*, 2017). Tomuto faktu nevypovídaly naše naměřené hodnoty PA a DPA (Obr. 9; Obr. 10), kdy nedošlo k teoreticky očekávanému nárůstu PA a DPA v případě zatopených rostlin.

Po uplynutí 24 hodin od mechanostimulace byla pozorována přítomnost trávících enzymů v pastích rostlin umístěných na vzduchu a ve vodě. Přítomnost trávících enzymů aspartát proteázy (dionaesin; Obr. 11B) a cystein proteázy (dionain; Obr. 11C) byla pozorovaná u stimulovaných rostlin na vzduchu podobně jako v pracích Libiaková *et al.*, 2014 a Pavlovič *et al.*, 2017. Nepřítomnost VF chitinázy-I mohla být pravděpodobně způsobena dřívějším odběrem trávící tekutiny, kdy trávící tekutina v našem případě byla odebrána pouze 24 hodin po stimulaci, zatímco ve zmíněných pracích byla trávící tekutina odebrána po 48 hodinách. U zatopených rostlin byla detekována pouze aspartát proteáza (Obr. 11B), ale mnohem v menších koncentracích, jak ukazuje nízká intenzita zbarvení. Avšak nelze přesně určit, jak moc se koncentrace mezi sebou lišily z důvodu zředění trávící tekutiny u zatopených rostlin, kdy voda zůstala v pastích během jejich uzavření. Tato pozorování korespondují s nízkými hladinami koncentrací JA (Obr. 4) a JA-Ile (Obr. 5) u zatopených rostlin v porovnání s rostlinami na vzduchu. U zatopených rostlin tak pravděpodobně dochází ke snížení intenzity signalizační dráhy JA. Ta dále spouští *de novo* syntézu trávících enzymů (Scherzer *et al.*, 2017), avšak díky snížené signalizaci je syntéza trávících enzymů nižší.

Naše experimenty ukázaly, že podobným způsobem, jakým zatopení utlumuje jasmonátovou signální dráhu při obraně rostlin, dochází k jejímu potlačení i u masožravých rostlin, kde hraje úlohu v aktivaci trávících procesů. Zdá se však, že hladina

jasmonátů, kterou indikuje mechanická simulace pod vodní hladinou, je stále dostatečná k aktivaci trávících procesů. Svědčí o tom indukce hermetického uzavření pastí a sekrece trávících enzymů. Ty jsou sekretovány pravděpodobně v nižší míře kvůli nižší akumulaci jasmonátů, nakořik byla dokázána přímá korelace mezi počtem AP, akumulací jasmonátů a transkripcí genů kódujících trávící enzymy (Böhm *et al.*, 2016; Iosip *et al.*, 2023). Schopnost aktivace trávících procesů pod vodní hladinou není překvapující, protože masožravé rostliny rostou ve vlhkých a často zaplavovaných biotopech. Nejbližší příbuzný druh mucholapky podivné je vodní rostlina aldrovanda měchýřkatá (*Aldrovanda vesiculosa*) rostoucí i v ČR, která stejně jako mucholapka využívá jasmonátovou signální dráhu k indukci trávících procesů pod vodní hladinou (Jakšová *et al.*, 2021).

7 Závěr

Tato bakalářská práce se zabývala vlivem zatopení na rostliny mucholapky podivné. Tento druh rostliny žije na místech, kdy dochází k prudkým dešťům, které je nechávají i na několik dnů zatopené. Avšak záplavy mají negativní vliv na obranyschopnost rostlin, a to konkrétně na signální dráhu kyseliny jasmonové. Masožravé rostliny si právě tuto signalizační dráhu exaptovaly ke svému vlastnímu prospěchu. Na této skutečnosti byl založen náš experiment, kdy byly sledovány rozdíly v koncentracích fytohormonů a trávících tekutin mezi rostlinami, které byly umístěny na vzduchu nebo byly ponořené ve vodě. Převážně nás zajímalo, zdali i v případě mucholapky podivné dojde ke snížení koncentrací jasmonátů a následnému snížení jejich signalizace.

Po provedení experimentu byly měřeny hodnoty fytohormonů u nestimulovaných rostlin a u rostlin po hodinové mechanostimulaci. Koncentrace jasmonátů byly u zatopených rostlin mnohem nižší než u rostlin umístěných na vzduchu a ani během mechanostimulace nedošlo u zatopených rostlin ke stejnému nárůstu jako u rostlin na vzduchu. Následkem snížené koncentrace jasmonátů, a tedy i jejich sníženou signalizací, byla snížena produkce trávících enzymů v porovnání s rostlinami na vzduchu. Z výsledků je tedy zřejmé, že i v případě mucholapky podivné má zatopení negativní vliv, avšak nedochází k úplné deaktivaci trávících procesů.

8 Seznam použité literatury

- Aldridge D.C., Galt S., Giles D., Turner W.B. (1971): Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *Journal of The Chemical Society C*, 1623–1627.
- Arbona V., Zandalinas S. I., Manzi M., González-Guzmán M., Rodríguez P. L., Gómez-Cadenas A. (2017): Depletion of abscisic acid levels in roots of flooded Carrizo citrange (*Poncirus trifoliata* L. Raf. x *Citrus sinensis* L. Osb.) plants is a stress-specific response associated to the differential expression of PYR/PYL/RCAR receptors. *Plant Molecular Biology* 93, 623–640.
- Athauda S.B., Matsumoto K., Rajapakshe S., Kuribayashi M., Kojima M., Kubomura-Yoshida N., Iwamatsu A., Shibata C., Inoue H., Takahashi K. (2004): Enzymic and structural characterization of nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases. *The Biochemical journal* 381 (1), 295–306.
- Bellandi A., Papp D., Breakspear A., Joyce J., Johnston M.G., de Keijzer J., Raven E.C., Ohtsu M., Vincent T.R., Miller A.J., Sanders D., Hogenhout S.A., Morris R.J., Faulkner C. (2022): Diffusion and bulk flow of amino acids mediate calcium waves in plants. *Science Advances* 8 (42).
- 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., Mithöfer A., Weber A.P., Schultz J., Hedrich R. (2016): Venus flytrap carnivorous lifestyle builds on herbivore defense strategies. *Genome research*, 26 (6), 812–825.
- Benschop J.J., Millenaar F.F., Smeets M.E., Van Zanten M., Voesenek L.A.C.J., Peeters A.J.M. (2007): Abscisic acid antagonizes ethylene-induced hyponastic growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 143, 1013–1023.
- 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., Rennenberg H., Shabala S., Neher E., Hedrich R. (2016): The Venus flytrap *Dionaea muscipula* counts prey-induced action potentials to induce sodium uptake. *Current Biology* 26 (3), 286–295.
- Bramley P.M. (1997): 11-Isoprenoid metabolism, *Plant Biochemistry*, Academic Press, 417–437.
- Bui L.T., Shukla V., Giorgi F., Trivellini, A., Perata P., Licausi F., Giuntoli B. (2020): Differential submergence tolerance between juvenile and adult *Arabidopsis* plants involves the ANAC017 transcription factor. *The Plant Journal* 104, 979–994.

- Cohen-Kupiec R., Chet I. (1998): The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology* 9 (3), 270–7.
- Dangl J.L., McDowell, J.M. (2006): Two modes of pathogen recognition by plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 8575-8576.
- Darwin C. (1875): *Insectivorous Plants*. D. Appleton & Co.
- Dathe W., Ronsch H., Preiss A., Schade W., Sembdner G., Schreiber K. (1981): Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia-faba* L (-)-jasmonic acid, a plant-growth inhibitor in pericarp. *Planta* 153, 530–535.
- de Ollas C., Dodd I.C. (2016): Physiological impacts of ABA–JA interactions under water-limitation. *Plant Molecular Biology* 91, 641–650.
- de Ollas C., González-Guzmán M., Pitarch Z., Matus J.T., Candela H., Rambla J.L., Granell A., Gómez-Cadenas A., Arbona V. (2021): Identification of ABA-mediated genetic and metabolic responses to soil flooding in tomato (*Solanum lycopersicum* L. Mill). *Frontiers in Plant Science* 12.
- Demole E., Lederer E., Mercier D. (1962): Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helvetica Chimica Acta* 45, 675–685.
- Dyck V.A, Thomas B. (1979): The brown planthopper problem. *IRRI*, 61–98.
- Ehrlich P.R., Raven P.H. (1964): Butterflies and Plants: A Study in Coevolution. *Evolution*, 18 (4), 586–608.
- Ellison A.M., Adamec L. (2018). *Carnivorous plants: physiology, ecology, and evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Escalante-Pérez M., Scherzer S., Al-Rasheid K.A.S., Döttinger C., Neher E., Hedrich R. (2014): Mechanostimulation triggers turgor changes associated with trap closure in the Darwin plant *Dionaea muscipula*. *Molecular Plant* 7 (4), 744–46.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 108, 15492-15497.
- Fernández-Calvo P., Chini A., Fernández-Barbero G., Chico J., Gimenez-Ibanez S., Geerinck J., Eeckhout D., Schweizer F., Godoy M., Franco-Zorrilla J. M., Pauwels L., Witters E., Puga M. I., Paz-Ares J., Goossens A., Reymond P., De Jaeger G., Solano R., (2011): The Arabidopsis bHLH Transcription Factors MYC3 and MYC4

- Are Targets of JAZ Repressors and Act Additively with MYC2 in the Activation of Jasmonate Responses. *The Plant Cell* 23 (2), 701–715.
- Ferry N., Edwards M.G., Gatehouse J.A., Gatehouse A.M.R. (2004): Plant-insect interactions: Molecular approaches to insect resistance. *Current Opinion in Biotechnology* 15, 155-161.
- Feys B., Benedetti C.E., Penford C.N., Turner J.G. (1994): Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *The Plant Cell* 6, 751–759.
- Fu Z. Q., Yan S., Saleh A., Wang W., Ruble J., Oka N., Mohan R., Spoel J. S., Tada Y., Zheng N., Dong X. (2012): Npr3 and npr4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* 486, 228–232.
- Fukui H., Koshimizu K., Usuda S., Yamazaki Y. (1977): Isolation of plant-growth regulators from seeds of Cucurbita-pepo L. *Agricultural and Biological Chemistry Tokyo* 41, 175–180.
- Gilroy S., Białasek M., Suzuki N., Górecka M., Devireddy A.R, Karpiński S., Mittler R. (2016): ROS, Calcium, and Electric Signals: Key Mediators of Rapid Systemic Signaling in Plants. *Plant Physiology* 171 (3), 1606–1615.
- Hedrich R., Neher E. (2018): Venus flytrap: how an excitable, carnivorous plant works. *Trends in Plant Science* 23 (3), 220-234.
- Heslop-Harrison Y. (1975): Enzyme release in carnivorous plants. *Frontiers in Biology* 43, 525–578.
- Chen M.-S. (2008): Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science* 15, 101-114.
- Chen R., Jiang H., Li L., Zhai Q., Qi L., Zhou W., Liu X., Li H., Zheng W., Sun J., Li C., (2012): The Arabidopsis Mediator Subunit MED25 Differentially Regulates Jasmonate and Abscisic Acid Signaling through Interacting with the MYC2 and ABI5 Transcription Factors. *The Plant Cell* 24 (7), 2898–2916.
- Chini A., Fonseca S., Fernandez G., Adie B., Chico J., Lorenzo O., Garcia-Casado G., Lopez-Vidriero I., Lozano F., Ponce M. (2007): The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448, 666–671.
- Iosip A.-L., Scherzer S., Bauer S., Becker D., Kruschke M., Al-Rasheid K.A.S., Schultz J., Kreuzer I., Hedrich R. (2023): DYSCALCULIA, a Venus flytrap mutant without the ability to count action potentials. *Current Biology* 33 (3), 589–596.

- 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.
- 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.
- Kazan K., Manners J. M., (2008): Jasmonate Signaling: Toward an Integrated View, *Plant Physiology* 146 (4), 1459–1468.
- Kende H, van der Knaap E, Cho H.-T. (1998): Deepwater rice: a model plant to study stem elongation. *Plant Physiology* 118, 1105–1110.
- Kessler A., Baldwin I.T. (2002): Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual review of plant biology* 53, 299-328.
- Kidd B.N., Edgar C.I, Kumar K.K., Aitken E.A., Schenk P.M., Manners J.M., Kazan K. (2009): The Mediator complex subunit PFT1 is a key regulator of jasmonate-dependent defense in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21, 2237-2252.
- Kombrink E. (2012): Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths. *Planta* 236, 1351–1366.
- Koo A.J., Howe G.A. (2009): The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* 13-14, 1571-80.
- Kreuzwieser J., Scheerer U., Kruse J., Burzlauff T., Honsel A., Alfarraj S., Georgiev P., Schnitzler J., Ghirardo A., Kreuzer I., Hedrich R., Rennenberg H. (2014): The Venus flytrap attracts insects by the release of volatile organic compounds, *Journal of Experimental Botany* 65 (2), 755–766.
- Lee H.J., Park J.S., Shin S.Y., Kim S.G., Lee G., Kim H.S., Jeon J.H., Cho H.S. (2020): Submergence deactivates wound-induced plant defence against herbivores. *Communication Biology* 3, 651.
- Li H., Syvertsen J.P., McCoy C.W., Stuart R.J., Schumann A.W. (2006): Water stress and root injury from simulated flooding and *diaprepes abbreviatus* root weevil larval feeding in citrus. *Soil Science* 171, 138–151.

- Li Q., Zheng J., Li S., Huang G., Skilling S.J., Wang L., Li L., Li M., Yuan L., Liu P. (2017): Transporter-mediated nuclear entry of jasmonoyl-Isoleucine is essential for jasmonate signaling. *Molecular Plant* 10, 695–708.
- Libiaková 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. *Public Library of Science ONE* 9 (8).
- Loake G.J., Ayyar P., Howat S. (2017): Jasmonates. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 430–436.
- Melotto M., Mecey C., Niu Y., Chung H.S., Katsir L., Yao J., Zeng W., Thines B., Staswick P.M, Browse J., Howe G.A., He S.Y (2008): A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine-and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *Plant Journal* 55, 979–988.
- 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, 422–6.
- Mutava R.N., Prince S.J.K., Syed N.H., Song L., Valliyodan B., Chen W., Nguyen H.T. (2015): Understanding abiotic stress tolerance mechanisms in soybean: A comparative evaluation of soybean response to drought and flooding stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 86, 109–120.
- Nakamura M., Utsumi S., Miki T., Ohgushi T. (2005): Flood Initiates Bottom-up Cascades in a Tri-Trophic System: Host plant regrowth increases densities of a leaf beetle and its Predators. *Journal of Animal Ecology* 74 (4), 683–691.
- Neuhaus J.M., 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 Academic Sciences USA* 88, 10362–10366.
- Paszota P., Escalante-Perez M., Thomsen L.R., Risør M.W., Dembski A., Sanglas L., Nielsen T.A., Karring H., Thøgersen I.B., Hedrich R., Enghild J.J., Kreuzer I., Sanggaard K.W. (2014): Secreted major Venus flytrap chitinase enables digestion of Arthropod prey. *Biochimica et Biophysica Acta* 1844 (2), 374-83.
- Pauwels L., Barbero G. F., Geerinck J., Tilleman S., Grunewald W., Pérez A. C., Chico J. M., Bossche R. V., Sewell J., Gil E., García-Casado G., Witters E., Inzé D., Long

- J. A., De Jaeger G., Solano R., Goossens A. (2010): NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* 464 (7289), 788–791.
- Pavlovič A., Demko V., Hudák J. (2010): Trap closure and prey retention in Venus flytrap (*Dionaea muscipula*) temporarily reduces photosynthesis and stimulates respiration. *Annual 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., Mithöfer A. (2019): Jasmonate signalling in carnivorous plants: copycat of plant defence mechanisms. *Journal of Experimental Botany* 70 (13), 3379–3389.
- Ruan J., Zhou Y., Zhou M., Yan J., Khurshid M., Weng W., Cheng J., Zhang K. (2019): Jasmonic Acid Signaling Pathway in Plants. *International journal of molecular sciences* 20 (10), 2479.
- 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.
- Saika H., Okamoto M., Miyoshi K., Kushiro T., Shinoda S., Jikumaru Y., Fujimoto M., Arikawa T., Takahashi H., Ando M., Arimura S., Miyao A., Hirochika H., Kamiya Y., Tsutsumi N., Nambara E., Nakazono M. (2007): Ethylene promotes submergence-induced expression of *OsABA8ox1*, a gene that encodes ABA 8'-hydroxylase in rice. *Plant Cell Physiology* 48, 287–298.
- Schägger H. (2006): Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols* 1 (1), 16–22.
- Scherzer S., Federle W., Al-Rasheid K.A.S., Hedrich R. (2019): Venus flytrap trigger hairs are micronewton mechano-sensors that can detect small insect prey. *Nature Plants* 5, 670–675.
- Scherzer S., Shabala L., Hedrich B., Fromm J., Bauer H., Munz E., Jakob P., Al-Rasheid K.A.S., Kreuzer I., Becker D., Eiblmeier M., Rennenberg H., Shabala S., Bennett M., Neher E., Hedrich R. (2017): Insect haptoelectrical stimulation of Venus flytrap triggers exocytosis in gland cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 114 (18), 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., Escalante-Perez M., Becker D., Schultz J., Karring H., Weber A., Højrup P., Hedrich R., Enghild J.J. (2012): The protein composition of the digestive fluid from the venus flytrap sheds light on prey digestion mechanisms. *Molecular & Cellular Proteomics* 11 (11), 1306-1319.
- Song S., Huang H., Gao H., Wang J., Wu D., Liu X., Yang S., Zhai Q., Li C., Qi T., Xie D. (2014): Interaction between MYC2 and ETHYLENE INSENSITIVE3 modulates antagonism between jasmonate and ethylene signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 26 (1), 263-79.
- Studnička M. (1984): *Masožravé rostliny*. Academia, nakladatelství Československé akademie věd, Praha.
- Suda H., Toyota M. (2022): Integration of long-range signals in plants: A model for wound-induced Ca²⁺, electrical, ROS, and glutamate waves, *Current Opinion in Plant Biology* 69.
- Takahashi K., Matsumoto K., Nishi W., Muramatsu M., Kubota K. (2009): Comparative studies on the acid proteinase activities in the digestive fluids of NEPENTHES, CEPHALOTOUS, DIONAEA, and DROSERA. *Carnivorous Plant Newsletter* 38, 75–82.
- 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), *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75 (2), 346–348.
- Thaler, J.S., Humphrey, P.T., Whiteman, N.K. (2012): Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science*, 17(5), 260–270.
- Theodoulou F.L., Job K., Slocombe S.P., Footitt S., Holdsworth M., Baker A., Larson T. R., Graham I. A. (2005): Jasmonic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant physiology* 137 (3), 835–840.
- 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 signaling. *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.
- Truman W., Bennett M.H., Kubigsteltig I., Turnbull C., Grant M. (2007): Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proceedings of the National Academic Sciences* 104, 1075–1080.
- Vick B.A., Zimmerman D.C. (1984): Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiology* 75, 458–461.
- Voesenek L.A.C.J., Bailey-Serres J. (2015): Flood adaptive traits and processes: an overview. *New Phytologist*, 206, 57-73.
- 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. *Journal Plant Physiology* 168, 109-120.
- Walling L.L. (2000): The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19, 195-216.
- War A.R., Paulraj M.G., Ahmad T., Buhroo A.A., Hussain B., Ignacimuthu S., Sharma H.C. (2012): Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant signaling & behavior* 7 (10), 1306–1320.
- Wasternack C. (2007): Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annual Botany* 100, 681–697.
- Wasternack C. (2015): How Jasmonates Earned their Laurels: Past and Present, *Journal of Plant Growth Regulation* 34, 761–794.
- Wasternack C., Feussner I. (2018): The Oxylipin Pathways: Biochemistry and Function. *Annual Review of Plant Biology* 69 (1), 363-386.
- 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, 1021–1058.
- Wasternack C., Kombrink E. (2010): Jasmonates: Structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chemical Biology* 5 (1), 63–77.
- Wasternack C., Strnad M. (2015): Jasmonate signaling in plant stress responses and development – active and inactive compounds. *New Biotechnology* 33 (5), 604–613.

- Woldemariam M.G., Baldwin I.T., Galis I (2011): Transcriptional regulation of plant inducible defenses against herbivores, a mini-review. *Journal of Plant Interactions* 6, 113-119.
- Xie D.X., Feys B.F., James S., Nieto-Rostro M., Turner J.G. (1998): COI1: An Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280, 1091–1094.
- Yan Y., Stolz S., Chételat A., Reymond P., Pagni M., Dubugnon L., Farmer E.E. (2007): A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* 19, 2470–2483.
- Zheng X.Y., Spivey N.W., Zeng W., Liu P.P., Fu Z.Q., Klessig D.F., He S.Y, Dong X. (2012): Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host Microbe* 11 (6), 587–596.