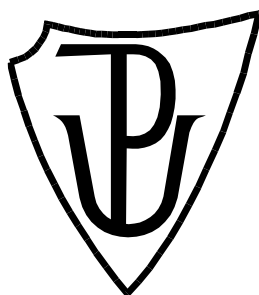


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



Význam a funkce elektrických signálů v rostlinách

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Jana Jakšová**
Studijní program: B1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.**
Termín obhajoby práce: 29. 8. 2016

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Jana Jakšová
Název práce	Význam a funkce elektrických signálů v rostlinách
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	<p>Tato práce se věnuje problematice elektrických signálů v rostlinách v souvislosti se systémovou odpovědí. Systémová odpověď byla zkoumána na experimentálních modelech - masožravých rostlinách mucholapce podivné (<i>Dionaea muscipula</i>) a rosnatkce kapské (<i>Drosera capensis</i>) v průběhu chytání hmyzí kořisti, po popálení a po opakovaném mechanickém poškození pletiva. Extracelulární elektrické potenciály byly zaznamenávány pomocí nepolarizovatelných povrchových Ag/AgCl elektrod, které byly připojeny vždy k lokálnímu a zároveň k systémovému listu. Nedílnou součástí tohoto experimentu byla také chemická analýza stresových fytohormonů – kyseliny jasmonové (JA) a jejích metabolitů (JA-Ile, cis-12-OPDA), kyseliny abscisové (ABA), salicylové (SA) a indol-3-octové (IAA) pomocí UHPLC-MS/MS. Kvalitativní a zejména kvantitativní analýza napomohla objasnit význam těchto nízkomolekulárních látek při systémové odpovědi v masožravých rostlinách.</p>
Klíčová slova	Elektrické signály, systémová odpověď, kyselina jasmonová, extracelulární měření, masožravé rostliny
Počet stran	49
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Jana Jakšová
Title of thesis	The function and importance of electrical signals in plants
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.
The year of presentation	2016
Abstract	<p>This work is devoted to electrical signals in plants in the context of a systemic response. Systemic response was investigated in experimental models - carnivorous plants Venus flytrap (<i>Dionaea muscipula</i>) and Cape sundew (<i>Drosera capensis</i>) during catching insects prey, after burning and after repeated mechanical tissue damage. Extracellular electrical potentials were recorded using non-polarizable Ag/AgCl surface electrodes, which were always connected to the local and also to the systemic leaf. An integral part of this experiment was also a chemical analysis of stress phytohormones - jasmonic acid (JA) and its metabolites (JA-Ile, <i>cis</i>-12-OPDA), abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA) and indole-3-acetic acid (IAA) with UHPLC-MS/MS. Qualitative and quantitative analyses shed light on importance of these low molecular weight substances in systemic response in carnivorous plants.</p>
Keywords	Electrical signals, systemic response, jasmonic acid, extracellular measurement, carnivorous plant
Number of pages	49
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením doc. Mgr. Andreje Pavloviče Ph.D., za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Jana Jakšová

Poděkování patří všem, kteří mi jakkoli pomohli s mou bakalářskou prací. Jmenovitě především mému vedoucímu doc. Mgr. Andreji Pavlovičovi Ph.D., za skvělé vedení práce, poskytnutí základní literatury a za to jaký je. Evě Hirnerové, pod jejíž vedením byly pro mě dny strávené v laboratořích růstových regulátorů tou nejlepší praxí. Mgr. Ondřejovi Novákovi, Ph.D. a Mgr. Ivanovi Petříkovi za provedení analýz fytohormonů. Dále Prof. RNDr. Janu Naušovi, CSc. za přiblížení tématu z fyzikální stránky při přednáškách z předmětu Fyzikální aspekty fyziologie rostlin. V neposlední řadě Mgr. Martinu Petráskovi, který mě přivedl k problematice elektrických signálů v rostlinách již v letech gymnaziálních a který dobře radil, jak postupovat nejen při výběru bakalářské práce. A všem, kteří mi věří.

Obsah:

Seznam zkratk	8
1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE	10
2. SYSTÉMOVÁ ODPOVĚĎ	11
2.1 Role jasmonátů v odpovědi na poranění rostlinného pletiva	11
2.2 Role elektrických signálů při systémové odpovědi	13
2.3 Účinek ostatních analyzovaných stresových rostlinných hormonů	14
2.3.1 Kyselina salicylová (SA)	14
2.3.2 Kyselina abscisová (ABA)	15
2.3.3 Kyselina indol-3-octová (IAA)	15
3. ELEKTRICKÉ SIGNÁLY V ROSTLINÁCH	16
3.1 Historie elektrických signálů v rostlinách	16
3.2 Přenos elektrických signálů rostlinou	16
3.3 Druhy a vlastnosti povrchových elektrických potenciálů	17
3.4 Iontový mechanismus	18
3.5 Význam a funkce elektrických signálů v rostlinách	19
3.5.1 Význam a funkce AP – modelová rostlina mucholapka podivná (<i>Dionaea muscipula</i>)	19
3.5.2 Význam a funkce AP - modelová rostlina rosnatka kapská (<i>Drosera capensis</i>)	21
3.5.3 Význam AP u citlivky stýdlivé (<i>Mimosa pudica</i>)	22
3.5.4 Význam AP při stresu ze sucha	22
3.5.5 Význam AP při reprodukci	22
3.5.6 Další významy a funkce AP	23
3.6 Význam a funkce VP	23
4. METODY	25
4.1 Techniky používané pro měření elektrických signálů v rostlinách	25
4.2 Metody analýzy rostlinných hormonů	27
4.2.1 Metody extrakce	27
4.2.2 Metody purifikace	27
4.2.3 Kapalinová chromatografie (HPLC)	28
4.2.4 Hmotnostní spektrometrie	29
4.2.5 UHPLC-MS/MS	30
5. MATERIÁL A METODY	31
5.1 Rostlinný materiál	31
5.2 Chemikálie a použitý materiál	31

5.3	Měření povrchových elektrických potenciálů	31
5.4	Biotest	32
5.5	Odběr vzorků pro analýzu rostlinných hormonů	32
5.6	Extrakce.....	33
5.7	Extrakce pevnou fází (SPE)	34
5.8	Parametry UHPLC-MS/MS	34
6.	VÝSLEDKY.....	36
6.1	Měření povrchových elektrických potenciálů	36
6.2	Analýzy rostlinných hormonů.....	39
6.3	Biotest	42
7.	DISKUZE	43
8.	ZÁVĚR.....	45
9.	Seznam použité literatury	46

Seznam zkratek

A/D	analogovo-digitální převodník
ABA	kyselina abscisová
A _N	rychlost fotosyntézy
AP	akční potenciál
ATP	adenosintrifosfát
C ₁₈	polymerně vázaná oktadecylová fáze na nosiči
CI	chemická ionizace
COI1	Coronatine insensitive 1
COR	coronatin
DEAE	zesíťovaná dextranová jednotka (Sephadexu) s diethyl-aminoethylovým kationtem
EI	ionizace nárazem elektronů
EKG	elektrokardiograf
ESI	ionizace elektrosprejem
FW	čerstvá hmota
[² H ₂]-JA-Ile	deuterovaný standard isoleucinového konjugátu s kyselinou jasmonovou
[² H ₄]-SA	deuterovaný standard kyseliny salicylové
[² H ₅]-IAA	deuterovaný standard kyseliny indol-3-octové
[² H ₅]-OPDA	deuterovaný standard <i>cis</i> -12-oxo-fytodienové kyseliny
[² H ₆]-ABA	deuterovaný standard kyseliny abscisové
[² H ₆]-JA	deuterovaný standard kyseliny jasmonové
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
I/U	převodník proud/napětí
IAA	kyselina indol-3-octová
IEP	intracelulární elektrické potenciály
IS	interní standard
JA	kyselina jasmonová
JA-Ile	isoleucinový konjugát kyseliny jasmonové
JAs	jasmonáty
JAZ protein	jasmonate ZIM-domain protein
m/z	poměr hmotnosti iontu a celkového náboje
Me-JA	methylester kyseliny jasmonové

MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometr
NPR1	non-expressor of pathogenesis related 1
OPDA	<i>cis</i> -12-oxo-fytodienová kyselina
PEP	povrchové elektrické potenciály
PR	Pathogenesis related
PRRs	receptory rozpoznávající patogeny (pattern recognition receptors)
QAE	zesíťovaná dextranová jednotka (Sephadexu) s diethyl-(2-hydroxypropyl) aminoethylovým kationtem
SA	kyselina salicylová
SPE	extrakce pevnou fází
TFs	transkripční faktory
U/I	převodník napětí/proud
UHPLC-MS/MS	ultra účinná kapalinová chromatografie spojená s tandemovým hmotnostním spektrometrem
VP	variační potenciál
Φ_{PSII}	fotochemický kvantový výtěžek fotosystému II

1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Rostliny jsou organismy, které v případě působení nepříznivých podmínek nedokáží opustit svá stanoviště, a proto si vyvinuly dokonalé senzorké systémy, pomocí kterých jsou schopné vnímat podněty z okolí. Regulací exprese genetické informace rostlina dokáže reagovat na změnu vnějších faktorů a přizpůsobit se nové situaci. Nezastupitelnou úlohu v této odpovědi hrají fytohormony. Hormonální odpověď je ovšem u živočichů i rostlin obecně pomalá, a proto v odpovědi na různé podněty jako je chlad, teplo, světlo či herbivorní organismy, rostliny generují elektrické signály, podobné těm, které jsou popsány u živočichů. Tyto signály se dokáží šířit cévními svazky celou rostlinou a informují tak vzdálené orgány, které s podnětem nepřišli do styku (tzv. systémová odpověď). Signální cesty zahrnuté do těchto systémových obranných reakcí rostlin jsou stále neprozkoumány a jsou předmětem intenzivního vědeckého výzkumu. Velmi zajímavým předmětem studia v této oblasti jsou masožravé rostliny schopné dokonale vnímat přítomnost kořisti v pasti na základě mechanických a chemických signálů, které rostlinný hormon kyselina jasmonová „překládá“ do fyziologické odpovědi.

Cílem teoretické části této práce je zpracovat přehled o problematice elektrických signálů v rostlinách a jejich fyziologické odpovědi. V experimentální části pak optimalizovat metodu měření elektrických signálů na experimentálních modelech mucholapce podivné a rosnatce kapské a z nich také připravit vzorky pro analýzu stresových fytohormonů. Závěrem vyhodnotit a diskutovat obdržené výsledky.

2. SYSTÉMOVÁ ODPOVĚĎ

Rostliny pro svou vlastní výživu produkují procesem fotosyntézy mnoho sacharidů. Tyhle látky ale vyhovují jako potrava i živočichům. Na rostlinách jsou závislá všechna zvířata, ať už primárně anebo sekundárně a kdykoliv proto mohou být napadeny (Attenborough, 1996). Na poškození, která mohou být způsobena býložravci, ale i patogeny nebo mechanickými stimuly, jsou rostlinná pletiva velmi citlivá. Rostliny jakožto přisedlé organismy proto musí vyvíjet velké úsilí, aby se ochránily a k tomu si vyvinuly odlišné strategie (Koo & Howe, 2009). Mezi způsoby, jakým se rostlina chrání, spadá například vytváření pichlavých cípatých listů cesmíny (*Ilex aquifolium*) nebo modifikovaných listů v trny u sukulentů (*Cactaceae*). Rostlinami nejvíce využívanou však není ochrana fyzikální ani mechanická, nýbrž chemická. Produkují toxické chemické detergenty, jimiž různými způsoby dokáží odradit útočníky. Příkladem jsou žahavé trichomy kopřivy (*Urtica dioica*). Nicméně některé rostliny tyto obranné struktury nebo metabolity postrádají a na místo toho se spoléhají na zahájení indukované obranné reakce tzv. na poptávku (Meldau, Erb & Baldwin, 2012). Tahle strategie vyžaduje odpovídající sensorický systém a rychlou komunikaci mezi rostlinnými orgány. Rostliny tak vytváří složité signální sítě, které propojují signály vyvolané poškozením s příslušnými změnami v metabolismu, růstu a vývoji. Mnoho z těchto adaptačních odpovědí je spouštěno *de novo* syntézou rostlinných hormonů jasmonátů, které se prudce akumulují v orgánech vzdálených od místa poškození (Howe & Jander, 2008; Koo & Howe, 2009).

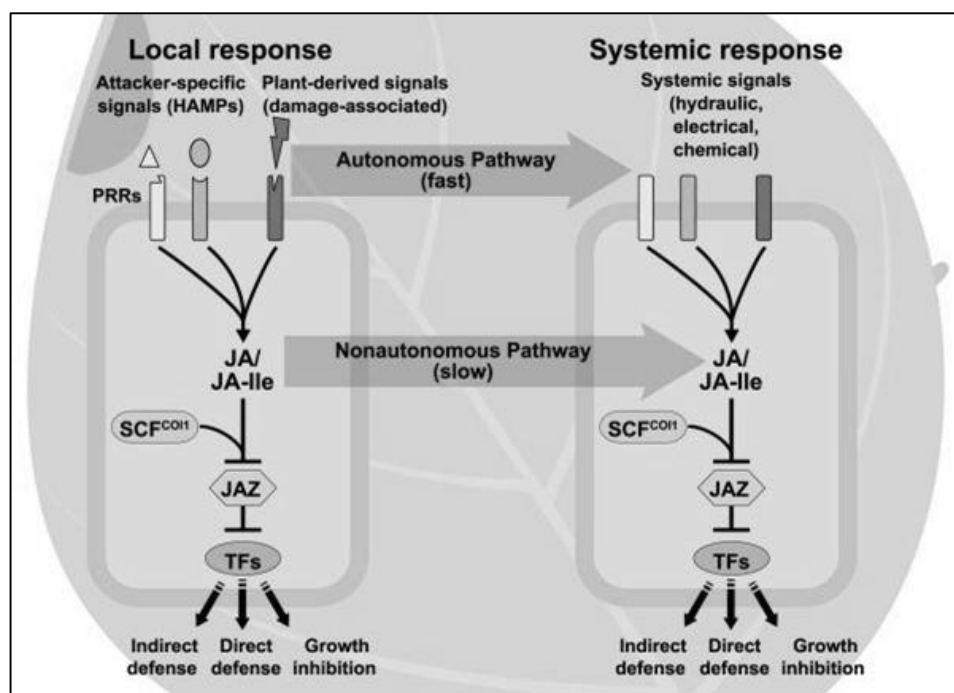
2.1 Role jasmonátů v odpovědi na poranění rostlinného pletiva

Látky, které se souhrnně nazývají jasmonáty, zahrnují kyselinu jasmonovou (JA) a její deriváty. Tyto látky se významně podílejí na regulaci růstu rostlin při změně vnějších nebo vnitřních podmínek, kdy stimulují obranný a adaptační mechanismus rostlinného organismu. Jasmonáty vznikají oxidací lipidů a po chemické stránce jsou to sloučeniny s cyklopentanovým kruhem, nesoucím keto- či hydroxyskupinu v pozici C6. Poloha C7 na cyklopentanovém kruhu je substituována *cis*-pent-2'-enylovým řetězcem, který může být za účelem změny biologické aktivity modifikován enzymatickou redukcí dvojné vazby a hydroxylací. Mezi nejčastější reakce metabolismu kyseliny jasmonové patří metylace karboxylové skupiny a tvorba konjugátů s izoleucinem.

Mechanismus působení jasmonátů a obecně fytohormonů je založen na jejich interakci s odpovídajícím receptorem a následné aktivaci signální dráhy, která vede k aktivaci transkripce cílových genů (Podlešáková *et al.*, 2012).

V případě, že rostlina nečelí stresovým podmínkám, je hladina jasmonátů nízká a transkripce genů odpovídajících na JA je reprimována pomocí proteinů JAZ (*Jasmonate ZIM-domain*), které jsou navázány na promotor JA-responzivních genů. Po poškození rostlinného pletiva je zahájena lokální odpověď tím způsobem, že specifické signály chemické nebo fyzikální povahy vyvolané útokem jsou rozpoznány receptory rozpoznávajícími patogeny (PRRs) na povrchu buňky. Mechanismem, který není z velké části ještě znám, je následně aktivována *de novo* syntéza JA, která následně přejde do její aktivní formy - JA-Ile. Ta se váže na receptor COI1 (*Coronatine insensitive 1*). COI1 určuje substrátovou specifitu ubiquitin ligázy SCF^{COI1}. Proteiny JAZ jsou navázány komplexem SCF s COI1. Tento komplex je poté označen ubiquitinem a 26 S proteasom zprostředkovává degradaci JAZ proteinů, čím se uvolní transkripční faktory (např. MYC2) z represe a aktivuje se exprese genů souvisejících s obranou (Koo & Howe, 2009).

Následující systémová odpověď může být zprostředkována dvěma různými cestami. V obou případech jsou bioaktivní jasmonáty rozpoznány receptorovým systémem založeném na F-box proteinu, který spojuje vazbu hormonu a ubiquitin dependentní degradaci transkripčních represorových proteinů JAZ. V neautonomní buněčné dráze je JA nebo její derivát, který vznikl v poškozeném listu, přemístěn do distálních/vzdálených míst (např. nepoškozený list), kde vyvolává reakce v cílových buňkách. V autonomní buněčné dráze poškozením vyvolaný mobilní signál (elektrický, hydraulický, chemický) aktivuje syntézu JA/JA-Ile a následnou reakci v distálním pletivu. Tyto dvě cesty mohou pracovat synergicky a optimalizovat tak časově i prostorově vyjádření odpovědi vyvolanou různými formami poranění tkáně (Koo & Howe, 2009).



Obr. 1: Role jasmonátů v odpovědi na poškození pletiva. Schéma popisuje výše popsany proces lokální a systémové odpovědi. (Převzato z: Koo & Howe, 2009).

2.2 Role elektrických signálů při systémové odpovědi

Nyní se dostáváme k tomu, že primárním signálem, který vyvolává systémovou odpověď, je signál elektrický (Maffei, Mithöfer & Boland, 2007). Důvodem, proč si rostliny vyvinuly dráhy pro přenos elektrického signálu, je s největší pravděpodobností nutnost reagovat rychle na stresové faktory jejich životního prostředí. Na rozdíl od signálů chemických, jako jsou fytohormony, je totiž elektrický signál schopný přenášet informaci velmi rychle a to i na dlouhé vzdálenosti. Mnoha výzkumy bylo dokázáno, že různé environmentální podněty vyvolávají v buňkách určité reakce, které elektrický signál přenáší do reagujících oblastí (Lautner *et al.*, 2005). Na to, jak rostliny generují a propagují elektrické signály, přišel S. A. R. Mousavi a kolektiv autorů. Jimi byly identifikovány dva proteinové receptory, které jsou příbuzné s glutamátovými receptory živočichů. Právě tyto dva receptory jsou rozhodující pro indukci elektrické vlny iniciované poškozením listu, a která je přenášena do ostatních orgánů rostliny. Jako model pro výzkum interakce mezi rostlinou a herbivorem byl použit houseníček (*Arabidopsis thaliana*) a housenka blýskavky (*Spodoptera littoralis*). Housenka byla položena na jeden list a byly zaznamenávány změny v povrchových elektrických potenciálech (PEP) na ostatních listech. Jestliže se housenka volně pohybovala po listu, PEP se neměnily. Jakmile ale začala list požírat, byly blízko tohoto místa vyvolány elektrické signály, které se následně šířily do sousedních listů rychlostí 9 cm min⁻¹. Elektrický signál se přenášel do těch listů, které byly přímo spojeny cévními svazky, které vedou vodu a organické sloučeniny. Ve všech místech, kde dorazil elektrický signál, byla

v odpovědi na poranění spuštěna syntéza jasmonátů, která zprostředkovala expresi genetické informace. V mutantní rostlině *A. thaliana*, ve které chyběl receptor pro jasmonáty, byly elektrické signály sice propagovány, ale nebyla vyvolána žádná obranná odpověď. Mutantní rostliny, ve kterých chyběly glutamátové receptory, neuměly generovat ani elektrickou vlnu a tím pádem nespustily ani jasmonátovou signalizaci. Tato pozorování jasně demonstrují, že generace a propagace elektrických signálů hraje rozhodující roli při iniciaci obranné reakce ve vzdálených místech od místa útoku herbivorů (Mousavi *et al.*, 2013).

2.3 Účinek ostatních analyzovaných stresových rostlinných hormonů

Rostlinné hormony (fytohormony) jsou nízkomolekulární látky, které se zásadním způsobem podílejí na regulaci růstu a vývoje rostlin. Podobně jako hormony živočichů se vyskytují v pletivech ve velmi nízkých koncentracích. Liší se od nich tím, že jsou méně specifické a nejsou produkovány specializovanými žlázami. Na základě současných poznatků se předpokládá, že signální dráhy jednotlivých fytohormonů nejsou nezávislé, ale že tvoří složitou síť vzájemně se regulujících drah (Podlešáková *et al.*, 2012).

2.3.1 Kyselina salicylová (SA)

Akumulace kyseliny salicylové je spojována s nepřebýrným množstvím biotických a abiotických odpovědí. V rostlinách má vliv na fotosyntézu, transpiraci, transport iontů, indukci kvetení, anatomii listů a stavbu chloroplastů. Výzkum je ale převážně směřován k její roli v obranných reakcích na patogeny.

NPR1 (*non-expressor of pathogenesis related 1*) je regulační protein, kterým jsou řízeny signální dráhy SA. Po jeho aktivaci SA se chová jako transkripční koaktivátor velké skupiny obranných genů např. *PR* (*Pathogenesis related* = spojené s patogenezí). Tato skupina genů je velmi různorodá a kódují například proteiny s antimikrobiální aktivitou. *PR-1* se používá jako markerový gen odpovědi na kyselinu salicylovou (Loake & Grant, 2007).

Signální dráha SA je antagonistická k signální dráze JA. Poprvé byl tento efekt popsán na mutantní rostlině rajčete. Bylo zjištěno, že SA účinně potlačuje odpověď na mechanické poškození, zprostředkované JA (Glazebrook, 2005).

Signální dráhy obou hlavních hormonů mohou na sebe působit i synergicky. Jejich synergická funkce byla popsána na houseničku (*Arabidopsis thaliana*), který byl ošetřen dvěma koncentracemi SA a JA. Nízká koncentrace vyvolala synergistický efekt u genů indukovaných JA (*PDF1.2*) a SA (*PR-1*). Ve vyšších koncentracích SA a JA byl pozorovaný antagonistický efekt, z čehož vyplývá, že výsledná reakce záleží na relativní koncentraci obou hormonů (Mur *et al.*, 2006).

2.3.2 Kyselina abscisová (ABA)

Tento od karotenu odvozený seskviterpen je zapojen do procesů regulujících v rostlinách růst a klíčení, desikaci semen, vývoj embrya a semenáčků. Důležitou regulační funkci má ABA při abiotickém stresu, tj. sucha, chladu, nevhodných osmotických podmínek a emisí, což se projevuje několika násobným zvýšením její endogenní hladiny (Podlešáková *et al.*, 2012). Při takovýchto stresových podmínkách má vliv na hospodaření rostliny s vodou. Je ústředním prvkem turgorové regulace v rostlinných buňkách. Při nedostatku vláhy kořenový systém produkuje větší množství ABA, která je pak transportována do listů. Tam aktivuje aniontové kanály, které vedou například ke snížení turgoru v svěřacích buňkách průduchů. Snížení turgoru je nutný k uzavření průduchů, čímž se zabraňuje únikům vody v období sucha (Munemasa *et al.*, 2007). Při odpovědi na biotický stres hraje roli negativního regulátoru, protože tlumí expresi genů aktivovaných JA/ET drahou. Tlumí také rezistenci, která je indukovaná kyselinou salicylovou (Pieterse *et al.*, 2009).

2.3.3 Kyselina indol-3-octová (IAA)

IAA je fytohormon spadající do skupiny auxinů, hrající roli při růstu rostlin. Dříve se mělo za to, že je IAA stresový fytohormon a že pohyb pastí a tvorba „vnějšího žaludku“ rosnatky je spojen s působením právě tohoto rostlinného hormonu (Bopp & Weiler, 1985; Boop & Weber, 1981).

3. ELEKTRICKÉ SIGNÁLY V ROSTLINÁCH

3.1 Historie elektrických signálů v rostlinách

Zvláštní rostlina mucholapka podivná (*Dionaea muscipula* Ellis.) fascinovala již Charlese Darwina. V dopise svému příteli se o ní vyjádřil jako o nejpozoruhodnější rostlině světa a na jeho popud britský fyziolog John Burdon Sanderson v roce 1873 jako první v mucholapce objevil a popsal elektrické signály (Sanderson, 1873). Od této doby elektrické signály nenáleží výhradně do živočišné říše a byly studovány v různých druzích rostlin.

V roce 1926, Bose použil izolované cévní svazky kapradiny k tomu, aby ukázal, že excitace byla přenesena jako elektrický podnět, který se zdál být kontrolován podobnými fyziologickými mechanismy jako v nervech živočichů (Bose, 1926). V roce 1930 byly zaznamenány akční potenciály (AP) v buňkách řasy skleněnky (*Nitella*) použitím mikroelektrod (Umrath, 1930), což bylo dříve než první intracelulární měření AP v živočišných buňkách (Nastuk & Hodgkin 1950; Tasaki 1952). V 50. letech 20. století, Sibaoka také demonstroval na citlivce stydlivé (*Mimosa pudica*), že propagace elektrických signálů vykazuje podobné charakteristiky jako AP v nervech. Sibaoka (1966, 1969) a Pickard (1973) publikovali shrnutí, které ukazovalo, že všechny vyšší rostliny mohou využívat elektrických signálů k regulaci různých fyziologických funkcí. V roce 1984 byly objeveny v rostlinách iontové kanály, které jsou základem pro AP (Schroeder, Hedrich & Fernandez, 1984). Od této chvíle byla jednou z nejdůležitějších otázek, zda je excitace u rostlin a zvířat založena na stejné sadě iontových kanálů. Mnoho z chemických komponentů neuromotorického systému zvířat bylo nalezeno také v rostlinách, např. neurotransmitery jako je acetylcholin a buněční poslové jako je kalmodulin (Baluška *et al.*, 2006). Mnohokrát byla také u rostlin dokázána přítomnost sensorů pro dotek, světlo, gravitaci a teplotu (Gallé *et al.*, 2014).

3.2 Přenos elektrických signálů rostlinou

I přes podobnosti s chemickými komponenty neuromotorického systému živočichů elektrická signalizace v rostlinách nedosáhla takové komplexnosti jako je tomu v nervech. Nicméně jednoduchá „neuronová“ síť, sloužící k rychlé signalizaci byla vytvořena také u rostlin. Elektrické signály se šíří buňkami, které primárně slouží pro transport vody, minerálních látek, anebo asimilátů. Jeden z druhů elektrického signálu, variační potenciál, se šíří vodivými elementy xylému (dřevní části cévního svazku) a druhý, akční potenciál, vodivými elementy floému (lýkové části cévního svazku). Tyto buňky jsou pro šíření

takového signálu ideální, protože nemají příčné buněčné stěny (xylém), případně je mají silně perforované (floém). Na krátkou vzdálenost se přenášejí plasmodezmaty, tedy specializovanými otvory v buněčných stěnách rostlin (Lautner *et al.*, 2005; Pavlovič, 2014).

3.3 Druhy a vlastnosti povrchových elektrických potenciálů

Povrchový elektrický potenciál (PEP) je napětí mezi daným místem povrchu rostliny a definovaným referenčním bodem, kterým může být jiné místo rostliny nebo půdní roztok (Ilík *et al.*, 2010). PEP pak rozdělujeme na klidový potenciál, obecný potenciál, akční (AP) a variační potenciál (VP). Nedávno byl taky charakterizován systémový potenciál (SP; (Zimmermann *et al.*, 2009).

Klidový membránový potenciál, který je dán nerovnoměrným rozdělením základních fyziologických iontů, je u rostlin udržován funkcí aktivních vápenatých (Ca^{2+}) a protonových (H^+) pump. Je tvořen dvěma silami, které působí v daném okamžiku na jednotlivý ion. Sílou chemickou, kdy na základě difuze přechází ionty z míst o větší koncentraci do míst s nižší koncentrací a silou elektrickou, kdy elektrické pole vytvořené na membráně pohání ionty podle jejich polarity. Souhrnně tyto síly pohánějící solut přes membránu nazýváme gradientem elektrochemického potenciálu. Ve výsledku je pak cytoplasmatická strana nabitá záporně vůči vnější straně membrány, která je nabitá kladně. Klidový potenciál je neměnný nebo pomalu se měnící v čase na stabilizované rostlině a jeho hodnoty jsou uváděny až (-50) – (-200) mV (Alberts *et al.*, 1998).

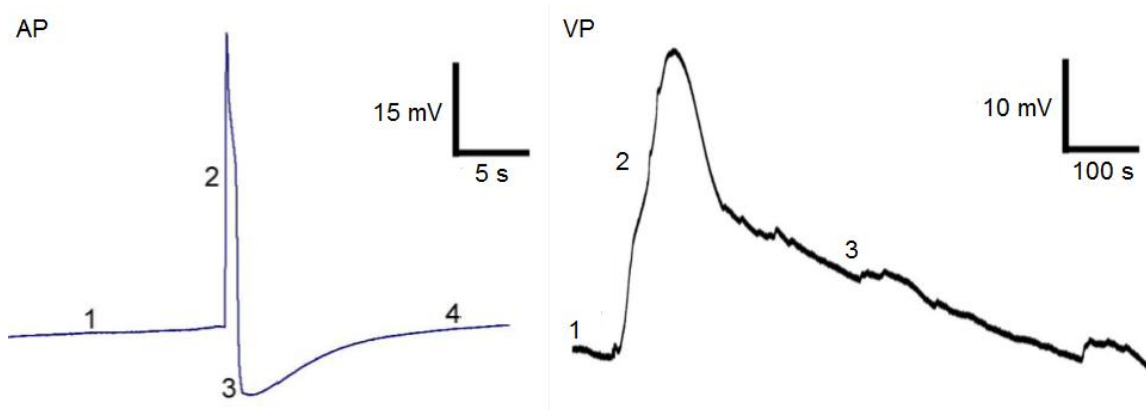
U obecného potenciálu jde o pomalé změny povrchového potenciálu, které jsou vyvolané slabými podněty, jako například světlem nebo teplotou a vlhkostí vzduchu. I když je měřen dlouhou dobu (více jak 50 let), jeho podstata není jasná. Pravděpodobně se jedná o změny iontového složení a potenciálů v apoplastu v důsledku potenciálových změn na plazmatických membránách.

Při signalizaci na dlouhé vzdálenosti se v rostlinách uplatňují dva hlavní typy elektrických signálů – rychlé akční potenciály a pomalejší variační potenciály. Akční potenciál je vyvolán nedestruktivními stimuly, jako je například chlad, dotyk a elektrický puls (Trebacz *et al.*, 2006, Fromm & Lautner, 2006). Takový podnět změní rozdíl elektrického potenciálu napříč plazmatickou membránou buněk. Poté co je AP vyvolán se šíří z místa stimulace cestou nejmenšího odporu kontinuou cytoplasmatické membrány v buňkách všemi směry téměř do všech živých orgánů rostliny. Zastaven je v mrtvých (nekrotických) oblastech, protože je nutná metabolická aktivita buněk. Po dobu svého šíření udržuje konstantní rychlost (8 – 100 mm s^{-1} , dle Volkova až 40 m s^{-1} ; Volkov, 2007) a amplitudu (Hille, 1992). Dále se řídí zákonem „vše nebo nic“ (Fromm & Spanswick,

1993), což znamená, že stimul, který nepřekročí určitou prahovou hodnotu, nemůže vyvolat AP. AP je tedy vyvolán podnětem, který právě stačí snížit absolutní hodnotu klidového potenciálu (prahový podnět), anebo jakýmkoli silnějším podnětem (nadprahový podnět) (Dziubinska *et al.*, 2001).

Variační potenciál vzniká v odpovědi na destruktivní podněty, jako například řeznou ránu a popálení. Ve srovnání s AP se neřídí zákonem všechno nebo nic, je charakterizován poklesem amplitudy se vzdáleností od stimulovaného místa a její amplituda závisí na intenzitě stimulu (Fromm & Lautner, 2007). VP na rozdíl od AP mohou také přecházet do buněk, s nimiž nemají cytoplasmatické spojení přes plazmodezmy nebo lýkovou část cévního svazku. Podle jedné z hypotéz se šíří se jako hydraulická vlna v xylému. Za normálních podmínek se v xylému nachází díky výparu vody přes průduchy negativní hydrostatický tlak. Ten je poškozením pletiva narušen a vodní sloupec při kontaktu s atmosférickým tlakem vyvolává zpětnou hydraulickou vlnu, která ovlivňuje propustnost mechanosenzitivních kanálů a toky H^+ přes membránu. VP se proto mohou šířit na delší vzdálenosti než AP, ale pomaleji (Stahlerg *et al.*, 2006).

Nedávno byl charakterizován systémový potenciál (SP, Zimmermann *et al.*, 2009). Jeho amplituda závisí také na intenzitě stimulu a od VP se liší opačnou polaritou. Jeho existence jako samostatného typu elektrického signálu však vyžaduje další studie.



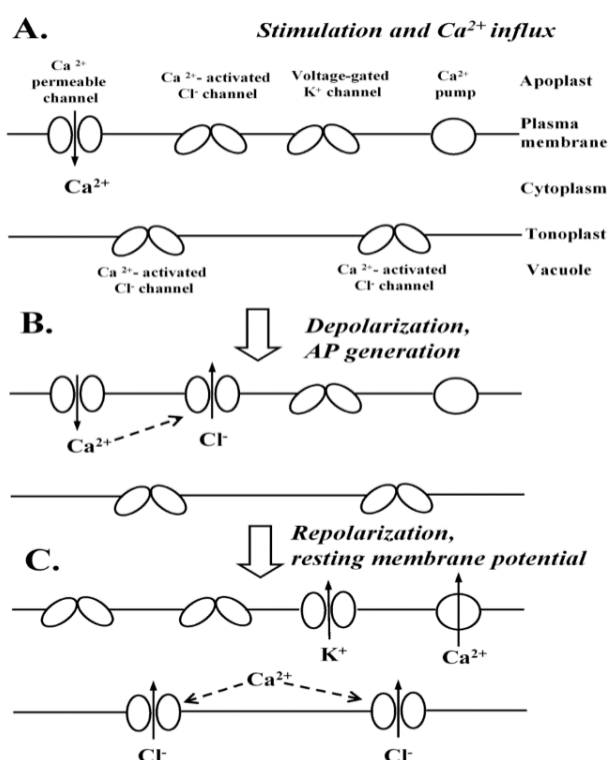
Obr. 2: Typický průběh akčního a variačního potenciálu – 1) klidový potenciál 2) depolarizace 3) repolarizace až hyperpolarizace 4) obnovení klidového potenciálu. Oproti AP má VP dlouhou repolarizaci. (Převzato z: Pavlovič, 2014)

3.4 Iontový mechanismus

Akční potenciály jsou velmi dobře popsány u živočichů. V rostlinách se však jejich iontový mechanismus liší. Zatímco u živočichů je AP vyvolaný tokem sodných (Na^+) a draselných (K^+) iontů přes membránu, u rostlin jsou za něj zodpovědné toky vápenatých (Ca^{2+}), chloridových (Cl^-) a draselných iontů. Pokud po působení nějakého podnětu potenciálový rozdíl překročí určitou prahovou hodnotu, dojde ke vzniku AP. Postupně dochází k otevření kanálů v plasmalemě pro Ca^{2+} a cytoplasmu rostlinné buňky zaplaví ionty Ca^{2+}

z intracelulárních a extracelulárních zdrojů. Kationty Ca^{2+} aktivují výtok Cl^- iontů z buňky, což vede k depolarizaci membrány.

Depolarizace membránového potenciálu způsobí výtok K^+ iontů z cytoplasmy, nastane částečná hyperpolarizace membrány a zpětný tok K^+ iontů do buňky vyústí v obnovení klidového potenciálu. Iontový mechanismus variačního potenciálu není v současné době tak dobře popsán jako v případě AP, má se ale za to, že se na něm podílejí zejména toky H^+ a pravděpodobně i jiných iontů (Fromm & Lautner, 2006).



Obr. 3: Iontový mechanismus akčního potenciálu (Převzato z: Hlaváčková 2009).

3.5 Význam a funkce elektrických signálů v rostlinách

Je dokázáno, že všechny vyšší rostliny využívají elektrické signály k regulaci různých fyziologických funkcí (Pickard, 1973). V posledních několika letech se výzkum elektrické signalizace přesouvá ze signalizace na krátké vzdálenosti (lokální odpověď) na dlouhé vzdálenosti, tedy systémovou odpověď. Různé typy stimulace vyvolávají charakteristické elektrické signály a každý z nich má konkrétní vliv na fyziologické procesy (Gallé *et al.*, 2014).

3.5.1 Význam a funkce AP – modelová rostlina mucholapka podivná (*Dionaea muscipula*)

Jako první byl popsán význam a funkce AP v mucholapce podivné (Burdon-Sanderson, 1873). Už od dob Charlese Darwina se vědci usilovně snaží porozumět biologickým a biomechanickým sensorům této rostliny (Escalante Pérez *et al.*, 2011).

Ačkoliv je pravdou, že rostliny jsou prapůvodním zdrojem obživy pro živočichy, existuje pár případů, kdy je tomu naopak a mucholapka neboli „Venušina past na létající hmyz“ je jedním z nich. Masožravé rostliny rostou tam, kde je prostředí extrémně chudé na živiny – v močálech, slatinách a na deštěm vymletých horských svazích. Pokud mají přežít, pak se musí živit živočichy.

Mucholapka je příbuzná s rosnatkami, ale je v této čeledi jediným druhem, který vytváří pasti tak důmyslné. Mucholapka tvoří růžice o velikosti několika centimetrů v průměru a úzké zelené listy jsou na obě strany od středního žebra protažené ve dvojici červenavých ledvinovitých laloků (Attenborough, 1996). Tato modifikovaná vrchní část listu mucholapky, nazývána past, má na svém vnitřním povrchu citlivé trichomy. Obvykle jsou tři, ale někdy je jich i více. Jejich báze obsahují bohatě vyvinuté membrány endoplazmatického retikula, sloužícího jako zásobárna Ca^{2+} . Trichomy tak představují místo vnímání signálu (Pavlovič, 2014). Po dotyku těchto mechanosenzorických orgánů vyčnívajících z vrchní části epidermis mucholapka aktivuje mechanosenzitivní iontové kanály a generuje receptorové potenciály, které vyvolávají vznik AP (Sanderson, 1882). Receptorový potenciál vždy předchází AP (Forterre *et al.*, 2005). Dotknout se ho jen jednou není smrtelně nebezpečné, protože jeden akční potenciál není dostatečně silný k tomu, aby způsobil rychlý pohyb pasti. K tomu je nutné druhé podráždění v krátkém časovém intervalu. Jakmile se hmyz dotkne jednoho trichomu uvnitř pasti podruhé, nebo se dotkne více trichomů najednou, laloky pasti se náhle zavřou a chytí kořist. V tuto chvíli ovšem není past zcela uzavřena. Hermetické uzavření pasti vyžaduje přetrvávající aktivaci mechanosenzorických trichomů. Tu spouští kořist bojující o život. Čím více se kořist pohybuje, tím více stimuluje vnitřní povrch pasti a vyvolává velké množství AP. Tím se laloky pasti sevřou těsně k sobě za tvorby tzv. vnějšího „žaludku“. AP stimulují sekreci trávicí tekutiny a dochází k trávení a rozkladu těla hmyzu (Darwin, 1875).

Za zmínku stojí, že se AP šíří pouze v pasti a nezasahuje do spodní asimilační části listu, což pravděpodobně umožňuje účinné šetření zdrojů. Při lapání a zadržování kořisti rostlina vyžaduje vyšší metabolické a energetické náklady spojené s uhlíkovým metabolismem (Pavlovič *et al.*, 2010).

Mechanostimulace spouštěcích trichomů způsobuje v pastech akumulaci jasmonátů. María Escalante-Pérez uvádí, že chycení hmyzí kořisti mucholapkou podivnou je kromě jasmonátů „modulováno“ také kyselinou abscisovou. Mucholapky vystavené stresu z nedostatku vody a ty, na jejichž pasti byla aplikována kyselina abscisová, byly méně citlivé na mechanické podráždění. Oproti tomu po aplikaci prekursoru kyseliny jasmonové – *cis*-12-oxofytodienové kyseliny (OPDA), methylesteru kyseliny jasmonové (Me-JA) a molekulárními mimikry isoleucinového konjugátu kyseliny jasmonové – koronatinu (COR) byla spuštěna sekrece trávicích enzymů a to i bez předcházející mechanické stimulace (Escalanté-Peréz *et al.*, 2011).

Tvorba a šíření AP po mechanickém dráždění spouštěcích trichomů na povrchu pasti vede také k inhibici fotosyntézy a stimulace respirace. Po uzavření pasti v ní došlo k poklesu

fotochemického kvantového výtěžku fotosystému II (Φ_{PSII}). Zároveň došlo k poklesu rychlosti fotosyntézy (A_N) a zvýšení intracelulární CO_2 . Asimilační list pod pastí zůstal bez odpovědi. V případě inhibice fotosyntézy jde zřejmě o vedlejší efekt způsobený interakcí Ca^{2+} s reakcemi fotosyntézy, při které jsou ionty Ca^{2+} regulátory enzymů Calvinova cyklu a ATP-syntázy (Pavlovič, 2010). Zvýšení respirace pravděpodobně souvisí s úbytkem adenosintrifosfátu (ATP) v pletivu pastí, protože je ATP spotřebováván při obnově klidového potenciálu plasmatické membrány a při rychlém pohybu listů (Jaffé, 1973).

3.5.2 Význam a funkce AP - modelová rostlina rosnatka kapská (*Drosera capensis*)

Aby masožravá rostlina rosnatka získala potřebné živiny jako je fosfor a dusík, chytá svoji kořist, stejně jako mucholapka pomocí aktivních pastí (Darwin, 1875). Její listy jsou zakončeny mnohobuněčnými žláznatými výčnělky s cévními svazky, tzv. tentakulemi, které produkují lepkavý mukopolysacharidový sliz. Pokud není počasí příliš suché, hromadí se sliz na jejich konci za tvorby drobných kapiček (Rost & Schauer, 1977). Sliz obsahuje trávicí enzymy, díky nimž rostlina kořist rozloží a kapalné produkty trávení absorbuje (Juniper *et al.*, 1989). Ačkoliv neprodukují tentakuly jakýkoliv nektar, je na ně hmyz doslova přitahován. Když s nimi kořist přijde do styku, zaručeně se alespoň na jednu tentakuli přilepí (Attenborough, 1996). Po kontaktu chycené kořisti s tentakulou se i postranní tentakuly, o které kořist ani nezavadila, začnou ohýbat směrem ke kořisti a posouvat ji doprostřed listu. Rychlý pohyb tentakul je iniciován mechanickými a chemickými signály z kořisti, které indukují elektrické potenciály. Ty však prostupují pouze od špičky k bázi tentakuly a stejně jako v případě mucholapky, AP nezasahují asimilační list (Williams & Pickard, 1972). Nakonec rosnatka výraznou ohýbací reakcí vytváří tzv. vnější žaludek (Darwin, 1875). Tato formace je spuštěna jasmonáty, fytohormony obvykle podílejících se na obranné reakci rostlin vyvolanou poškozením pletiva herbivory nebo poraněním. Zda jasmonáty vyvolávají tvorbu vnějšího žaludku po jiném stimulu, než je lapení hmyzí kořisti, bylo zkoumáno Mithöferem a kolektivem autorů. Po třech různých stimulech aplikovaných na rosnatku – poranění, trávení hmyzí kořisti a působení hmyzích ústních sekretů, byly listy analyzovány na výskyt jasmonátů – JA a JA-Ile. V listech, které trávily kořist i po poranění pletiva, se akumulovalo vysoké množství JA i JA-Ile, i když ten vykazoval nižší hladinu. Po kombinaci poranění a aplikaci orálního sekretu hmyzu rapidně vzrostla hladina obou fytohormonů. Ale pouze trávení hmyzu nebo kombinace poranění a orálního sekretu vyvolala tvorbu vnějšího žaludku. Pouze poranění nebo orální sekret samotný tuhle formaci nezpůsobil. Z toho se vyvozuje, že jasmonáty jsou stále součástí obranné reakce na poranění, ale rovněž se

využívají v reakcích indukovaných hmyzem, včetně reakcí na herbivory i masožravost (Mithöfer, Reichelt & Nakamura, 2013).

3.5.3 Význam AP u citlivky stydlivé (*Mimosa pudica*)

Rychlý seizmonastický pohyb listů iniciován AP je také typický pro citlivku stydlivou, která své listy dokáže schovat doslova bleskově. V běžném provozu jsou řady jejích lístku rozležené, aby pochytily co nejvíce slunečního záření. Už jen po jemném dotyku se začínají lístky jeden po druhém sklápět. Během několika málo vteřin se vztyčí a přitisknou ke stonku, přičemž v závislosti na síle stimulu mohou listy udělat další manévr. Sklopí se dolů a odkytí tak lodyhu s malými ostny. Význam této reakce nebyl ještě zcela objasněn, ale velmi pravděpodobně představuje obranný mechanismus proti herbivornímu hmyzu, který po přistání na listu způsobí mechanické podráždění. Po složení předtím tolik vábného listoví a odkrytí trnů přestane být citlivka pro hmyz atraktivní. Oproti mucholapce a rosnatce, kde se AP šíří na krátké vzdálenosti plazmodezmaty, se u citlivky elektrický signál šíří na dlouhé vzdálenosti přes floém (Attenborough, 1996; Pavlovič, 2014).

3.5.4 Význam AP při stresu ze sucha

Elektrická signalizace hraje důležitou roli v komunikaci mezi kořenovým systémem a nadzemní částí rostliny. V období nedostatku vody jsou rostliny nucené jí šetřit. Aby zabránily nevyžadujícímu výparu, uzavírají průduchy na povrchu listů. Při vynuceném uzavření průduchů se ale na druhou stranu omezuje dodávka oxidu uhličitého do mezibuněčných prostor. Tento proces je pro rostliny značně nevýhodný, protože nedostatek CO₂ snižuje rychlost fotosyntézy. Po zalití vyschlého substrátu rostliny vyšlou z kořenů signál ve formě akčního potenciálu do nadzemních částí rostliny, který otevře průduchy dříve, než k nim voda dorazí. Po otevření průduchů dojde k opětovnému vypařování vody z listu a následným negativním hydrostatickým tlakem je voda zdvihána xylémem do nadzemních částí rostliny a opět se zvýší rychlost fotosyntézy. Tento velmi praktický význam byl studován pomocí speciálního barviva v suchem stresovaných kukuřicích (*Zea mays*). Kukuřice skutečně odpovídala na AP, který se šířil rostlinou rychleji než voda (Fromm & Fei, 1998).

3.5.5 Význam AP při reprodukci

K tvorbě AP dochází také při opylení a kontaktu pylu s bliznou. Aplikace pylu, mechanického poškození a chladu (4 °C) na bliznu ibišku čínské růže (*Hibiscus rosa-sinensis*) vyvolala elektrický potenciál, který se šířil směrem k vaječníku rychlostí od 1,3 do

3,5 cm s⁻¹. Každý ze stimulů vyvolal jinou elektrickou aktivitu a taky odpověď na ni. Aplikace pylu stimulovala respiraci v semeníku. Se zvýšenou intenzitou dýchání se zvýšila koncentrace ATP a tvorba škrobu, čímž se rostlina připravuje na oplodnění. Tuto odpověď vyvolává pouze pyl stejného rostlinného druhu. Chlad vedl také k tvorbě AP, avšak s odlišnými charakteristikami (doba trvání, průběh, počet) a výsledkem byla opačná odpověď. Došlo ke snížení respirace a tím pádem také snížení koncentrace ATP (Fromm *et al.*, 1995).

3.5.6 Další významy a funkce AP

Akční potenciály mají v rostlinách i další významné funkce, které jen stručně zmíním. Např. tepelným šokem (působení chladu) je redukován floémový tok kukuřice seté (Fromm & Bauer, 1994). U rodu *Luffa* (tropická popínavá rostlina z čeledi tykvovité) elektrický stimul a působení chladu způsobuje pokles prodlužovacího růstu stonku (Shiina & Tazawa, 1986). V neposlední řadě AP vyvolávají expresi inhibitoru proteáz *PIN2*, který se uplatňuje v obranných reakcích rostlin tím, že inhibuje trávicí enzymy hmyzu (*Lycopersicon*, Stankovic & Davies, 1996).

3.6 Význam a funkce VP

VP ovlivňují některé procesy stejným způsobem jako AP, akorát je ovlivňují na delších vzdálenostech. VP stejně jako AP vyvolávají expresi inhibitoru proteáz *PIN2* (Fisahn *et al.*, 2004) a po jejich průchodu dochází k poklesu respirace (Filek & Koscielniak, 1997).

Také ovlivňují fotosyntézu podobně jako AP, to znamená že přechodem VP dochází k poklesu příjmu CO₂ fotosyntézou a k zavírání průduchů (pokles výdeje H₂O). Rovněž dochází k poklesu rychlosti elektronů pro fotosystém II. Tychle procesy jsou ale ovlivňovány na výrazně delší vzdálenosti. Například popálení nebo ožírání listů citlivky stydlivé vyvolá průchod VP celou rostlinou a působí tak na fotosyntézu a otevřenost průduchů v sousedních listech (Koziolek *et al.*, 2013). Tato reakce na popálení se vyskytuje i v běžných rostlinách jako je tabák virginský (*Nicotiana tabacum*; Hlaváčková *et al.*, 2006) nebo dokonce v dřevinách rodu topol (*Populus*; Lautner *et al.*, 2005). Po popálení VP vyvolal ve vzdálených listech zároveň akumulaci JA a ABA. Tyto dva fytohormony pravděpodobně mohou inhibovat fotosyntézu a uzavírat průduchy i po odeznění VP. Zde se ukazuje, že VP mají význam při signalizaci (Hlaváčková *et al.*, 2006).

Po průchodu VP se akumulují i JA a JA-Ile, které spouští obranné reakce. Po navázání na receptory spouští JA a JA-Ile v cílovém místě signální dráhu, která vede k expresi enzymů syntetizujících sekundární metabolity, které mají antiherbivorní účinek

(nikotin, vinblastin, artemisinin, camalexin, proteázové inhibitory atd.) Tyto sekundární metabolity se indukují nejen v rámci rostliny, ale pomocí některých látek jako je methyl-JA se mohou indukovat i v sousedních rostlinách, čímž se mohou připravit na příchod herbivorního hmyzu (Mousavi *et al.*, 2013).

4. METODY

4.1 Techniky používané pro měření elektrických signálů v rostlinách

Podstata metod používaných pro měření elektrických signálů v rostlinách spočívá v tom, že rostlina představuje zdroj elektromotorického napětí. Využívá se měření elektrostatického potenciálního rozdílu (napětí) mezi různými místy rostliny a referenčním místem, kterým bývá obvykle vodivý půdní roztok. Detekují se buď stacionární hodnoty (klidový potenciál) nebo časové změny (akční, variační a obecný potenciál) vyvolané nějakým lokálním podnětem (Ilík *et al.*, 2010).

Obecně se pro měření elektrických potenciálů používají dvě odlišné metody – extracelulární a intracelulární měření. Extracelulární elektrické potenciály (EEP) odráží nerovnováhy v iontové aktivitě v apoplastu. EEP může být měřen buď invazně, prostřednictvím propíchnutí rostlinné tkáně tenkou elektrodou, nebo neinvazivně připojením elektrody na povrch rostliny. Při použití invazivního přístupu je nutná dlouhá stabilizace kontaktu mezi elektrodou a rostlinou. Nicméně jakmile je tento kontakt založen, poskytuje stabilní iontové spojení až na několik dní (Zawadzki *et al.*, 1995).

Intracelulární elektrické potenciály (IEP) se měří mikroelektrodami, které jsou napíchnuté do buňky pomocí mikromanipulátoru a odráží nerovnováhy v iontové aktivitě uvnitř jedné konkrétní buňky. Tímto způsobem však můžeme měřit pouze po dobu 1-2 hodin (Fromm & Lautner, 2007) a je třeba mít na paměti, že každé propíchnutí rostlinné tkáně způsobuje poškození. Z tohoto hlediska je neinvazivní přístup lepší a i přesto, že oba způsoby měření EEP dávají podobné výsledky (např. Mancuso 1999), neinvazivní metodě by měla být obecně dávana přednost. (Ilík *et al.*, 2010).

Vzhledem k tomu, že je floém umístěn uvnitř rostlinného těla a elektrické signály jsou u některých rostlin, jako je citlivka stydlivá (Fromm, 1991), kukuřice (Fromm & Bauer, 1994) a topol (Lautner *et al.*, 2005) obtížně měřitelné, využívá se zajímavé metody s využitím mšic, které dokáží napíchnout svým bodcem jednotlivou sítkovici. Mšice je poté oddělena od svého sosáku laserovým pulsem. Ten tak vytváří průchod do floémové části, ke kterému se připojí špička mikroelektrody (Fromm & Lautner, 2007).

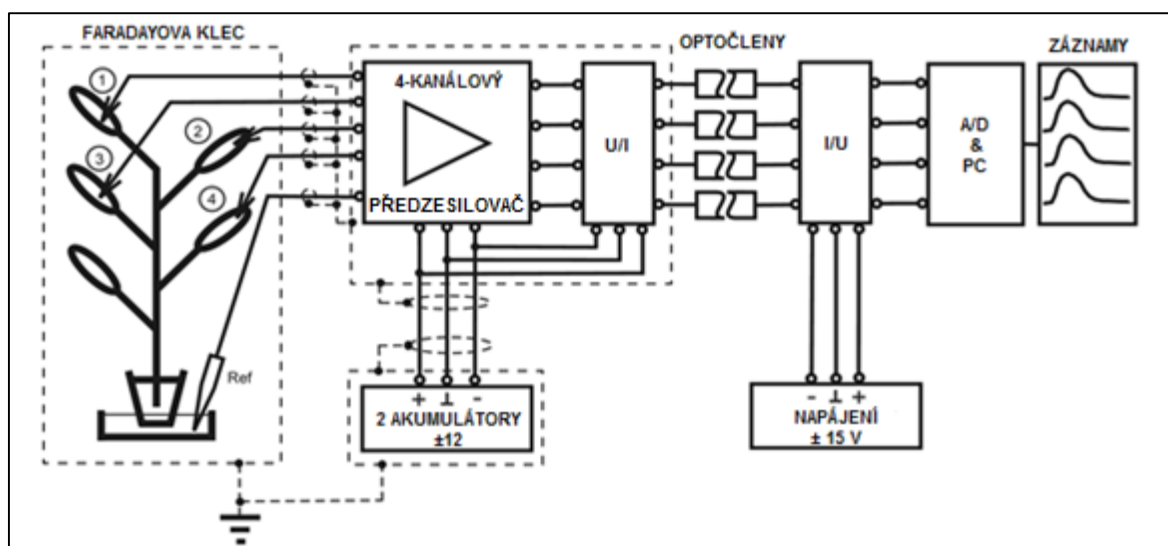
Při měření byly použity nepolarizovatelné Ag/AgCl elektrody, které se skládají ze stříbrného drátku vloženého do roztoku chloridu draselného (KCl) o standardní koncentraci 1M. Tenká vrstva AgCl se vytvoří elektrolýzou KCl za použití platinové elektrody jako katody, při působení napětí o 0,5 V na stříbrnou elektrodu po dobu 30 minut (Eggins, 1997). Výhodou těchto elektrod je snadná instalace, makroskopický rozměr, jsou nedestruktivní

a dochází tak k minimálnímu poškození rostlinného pletiva. Obvykle nezpůsobují žádnou stresovou reakci, je přesně definované umístění a máme také možnost opakovaného měření na téže rostlině. S povrchem rostliny je elektroda v kontaktu přes vodivý EKG gel (v jiných případech přes vodivou kapalinu, nit s agarem apod.) Šíření elektrických signálů lze měřit i více elektrodami, které mohou být připojeny k různým místům rostlinného těla.

Signál musí být měřen s citlivostí desítek mikrovoltů. Tento signál může být snadno narušen šumem elektrického vedení nebo vnějším elektromagnetickým polem a tyto poruchy mohou napodobovat potenciály generované rostlinou. Jakékoli zapojení elektrického zařízení v blízkosti zkoumané rostliny může tedy narušit řádné měření EPP. Z tohoto důvodu je rostlina a elektrické zařízení připojené k rostlině uvnitř Faradayovy klece, která je uzemněna společně s vývodem elektrod. Je samozřejmé, že elektrický potenciál země se považuje za konstantní.

Maximální naměřená amplituda PEP v rostlinách je v rozsahu desítek milivoltů, a proto měřicí zařízení musí mít vysoký vstupní odpor a jejich rozlišení by mělo být alespoň několik desítek mikrovoltů. Vstupní odpor voltmetru používaný v současné době pro tato měření je obvykle v rozmezí od 10^{12} - 10^{15} Ω . Výstupní signál z voltmetru je digitalizován analogovo/digitálním (A/D) převodníkem, který je dnes reprezentován data kartou v počítači. Záznamy jsou zpracovány pomocí počítačového softwaru ScopeWin.

Mezi hlavní výhody našeho mutltikanálového měřicího systému tedy patří galvanické oddělení měřicí jednotky, což má za následek eliminaci rušivých podnětů elektrického vedení a stabilní kontakt Ag/AgCl elektrod s povrchem rostlin, který usnadnil gel, běžně využívaným v lidské elektrokardiografii. Tato vylepšení nám umožnila detekovat variační a akční potenciály (Ilík *et al.*, 2010).



Obr. 4: Elektrické schéma používaného zařízení pro měření povrchových elektrických potenciálů, umístěné uvnitř Faradayovy klece. Signál je veden přes předzesilovač a optické oddělení na převodník a počítač. Přerušované čáry představují uzemňovací obvod. (Převzato z Ilík *et al.*, 2010).

4.2 Metody analýzy rostlinných hormonů

Fytohormony se v rostlinném materiálu vyskytují ve velmi nízkých koncentracích (pg–ng/g čerstvé hmoty) společně s molekulami podobných fyzikálně-chemických vlastností. V jedné skupině fytohormonů se přitom nachází i několik desítek derivátů, jež se mezi sebou v mnoha ohledech liší. Jedná se o různé konjugáty se sacharidy či aminokyselinami, často o isomery s významně odlišnou biologickou aktivitou. Z těchto důvodů je analýza rostlinných hormonů velmi náročná (Podlešáková *et al.*, 2012).

V Laboratoři růstových regulátorů Univerzity Palackého a Akademie věd České republiky byla ovšem vyvinuta vysoce citlivá a účinná metoda, která umožňuje kvantitativní analýzu 16 stresem indukovaných fytohormonů včetně JA, jejích biosyntetických prekurzorů a konjugátů aminokyselin, SA, ABA a IAA. Použitím tohoto protokolu jsme schopni vysokého výtěžku z minimálního množství rostlinného materiálu (méně než 20 mg čerstvé hmoty). Podmínky extrakce a purifikace byly optimalizovány tak, aby umožnily efektivní návratnost nestabilních analytů a minimalizovat dopad matrixového efektu. Bylo využito extrakce na pevné fázi, která byla spojena s ultra účinnou kapalinovou chromatografií s tandemovým hmotnostním spektrometrem (UHPLC-MS/MS; Floková *et al.*, 2014).

4.2.1 Metody extrakce

Příprava vzorku patří k základním úkonům při analýze biologických vzorků. Na jejím provedení záleží celkový úspěch analytického stanovení – a to jak z kvalitativního, tak i z kvantitativního hlediska. Volbou vhodné metody přípravy vzorku tedy rozhodujeme nejenom o přesnosti stanovení dané látky (analytu), ale vůbec o možnosti jejího určení.

Úlohou extrakčních procesů je převedení látek, které jsou předmětem našeho zájmu, do extrakčního činidla. Rostlinné hormony jsou obvykle extrahovány do organických rozpouštědel snadno mísitelných s vodou, jako jsou metanol, etanol a aceton. V našem případě byl zvolen 10% metanol. Aby nedošlo v průběhu extrakce k enzymatické, tepelné či oxidativní degradaci látek a aby byl extrakční výtěžek přijatelně vysoký pro požadované spektrum metabolitů, 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).

4.2.2 Metody purifikace

Po extrakci a odstranění tuhých podílů centrifugací či filtrací následuje čistící proces. Nároky na čištění jsou kladeny dle typu analytické koncovky. Purifikace musí poskytnout dostatečný

stupeň přečištění, přičemž by měla být zachována uspokojivá návratnost analytů. To znamená, že jednotlivé stupně by měly eliminovat z původního rostlinného extraktu všechny ostatní látky (sekundární metabolity, cukry, peptidy, aminokyseliny apod.). Přečištěný biologický materiál by pak obsahoval jen požadované rostlinné hormony, případně látky, které následnou kvalitativní či kvantitativní analýzu neruší. (Tarkowski *et al.*, 2004)

Nejnovější purifikační technikou pro analýzu UHPLC-MS/MS je extrakce pevnou fází (Solid Phase Extration – SPE). Základem je upotřebením nepříliš drahých extrakčních kolonek na jedno použití o nejrůznějších velikostech a náplních sorbentů, např. SPE kombinující nepolární (C₁₈) a iontovýměnné (QAE-Sephadex, DEAE-Sephadex) fáze nebo polymerní a směsné sorbenty (Oasis[®] HLB; Oasis[®] MAX; Podlešáková *et al.*, 2012). Na těchto sorbentech, přes které protéká vzorek, v důsledku mezimolekulových interakcí nebo nábojích ulpívají molekuly požadované látky. Nežádoucí příměsi mohou být z kolonky selektivně odstraněny promytím správně zvolenými rozpouštědly. Nakonec mohou být z kolonky žádoucí analyty znovuzískány elučním rozpouštědlem v podobě vysoce čistého extraktu. Tento extrakt má často podstatně vyšší koncentraci analytu, než měl původní vzorek. Průtok kapalin vedených přes kolonku urychlujeme třemi metodami – vakuem na výstupu z kolonky, tlakem na vstupu kolonky nebo centrifugací (Klouda, 2003).

V posledním stupni čistícího postupu je nutno provést zahuštění vzorku (na rotační vakuové odparce, odpařováním v proudu dusíku nebo lyofilizací) a převedení do roztoku jiného složení (Tarkowski *et al.*, 2004). V našem případě do 40 µl 15% acetonitrilu a 10 mM kyseliny mravenčí. Takhle je vzorek připraven pro přímé použití na UHPLC-MS/MS.

4.2.3 Kapalinová chromatografie (HPLC)

Kapalinová chromatografie je separační metodou, která je založená na rovnovážné distribuci složek obsažených ve vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze – mobilní a stacionární. Mobilní fází je zde kapalina a stacionární pevný sorbent v koloně. Čas, jaký stráví analyt v jedné nebo druhé fázi, závisí na jeho afinitě ke každé z nich. Kapalinový chromatograf se skládá z vysokotlakého čerpadla, směšovacího zařízení, zásobníků mobilní fáze, dávkovacího zařízení, kolony, detektorem. Signál z detektoru je zaznamenáván pomocí PC do podoby chromatogramu. Vyhodnocení se provádí na základě retenčního času, tedy času, který stráví látka v koloně (Klouda, 2013).

HPLC je dnes zřejmě nejpoužívanější technikou v oblasti kvalitativní a kvantitativní analýzy rostlinných hormonů. Vedle rychlosti a vysoké separační účinnosti je její velkou výhodou možnost spojení s celou řadou technik finální analýzy včetně hmotnostní spektrometrie (Tarkowski *et al.*, 2004). Nejmodernějším HPLC systémem je ultra účinná

kapalinová chromatografie (UHPLC), která pracuje za použití vyšších tlaků (100 MPa) a s menšími velikostmi sorbentů (< 2 μm; Motyka & Hlaváč, 2009).

4.2.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (*Mass spectrometry* – MS) je separační technika, která ionizuje molekuly vzorku a štěpí je na soubor fragmentů lišících se poměrem hodnoty jejich hmotnosti a náboje (m/z). Druhy vzniklých fragmentů a jejich zastoupení je pro danou látku charakteristické a umožňují její identifikaci. Hlavními částmi hmotnostního spektrometru jsou zaváděcí zařízení, iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. Dále se skládá z vakuového systému, iontové optiky a počítače.

Zaváděcí zařízení jsou zásobníky pro plynné a těkavé vzorky nebo sondy pro přímý vstup do iontového zdroje (pro méně těkavé a pevné vzorky). V iontovém zdroji je vzorek látky změněn na plynnou fázi (pokud již v plynné fázi nevstupuje) a její neutrální molekuly jsou převáděny na ionty. Známe mnoho druhů ionizace, pro spojení s kapalinovou chromatografií jsou však nejvhodnější tzv. měkké ionizační techniky, mezi něž patří ionizace nárazem elektronů (EI), chemická ionizace (CI) a ionizace elektrosprejem (ESI). U elektronové ionizace dochází k interakci proudu elektronů s molekulami vzorku, ze kterých vyráží valenční elektrony a tím vznikají kladně nabitě molekule ionty. Při CI dochází k interakci proudu elektronů s reakčním plynem (N_2 nebo He), jehož molekuly ionizuje. Tyto molekuly ionizovaného plynu reagují se vzorkem a ionizují ho. Použitím elektrospreje dochází k malé fragmentaci a v kladném módu vznikají molekule ionty $[M + H]^+$ a adukty $[M + Na]^+$, $[M + K]^+$. V záporném módu dochází k deprotonizaci molekuly.

Hmotnostní analyzátoři pak umožňují v čase nebo prostoru rozdělit směs iontů o různých hmotnostech. Jako analyzátor se používá iontová past, kvadrupól, průletový nebo hybridní analyzátor. Proud padajících iontů je pak převáděn detektorem na proud elektronů. Detektor poskytuje analogový signál úměrný počtu dopadajících iontů a výsledné spektrum je tedy závislostí intenzity signálu na m/z .

Hmotnostní spektrometry mohou být také spojeny jako tandemové hmotnostní spektrometry (MS/MS), kdy první reakce generuje ionty, z nichž se separuje požadovaný ion. Ten se podrobí další reakci a z něj vzniklé ionty jsou analyzovány (Klouda, 2013). Naše měření byla provedena na tandemovém hmotnostním spektrometru XevoTM TQ MS (Waters MS Technologie, Manchester, UK).

4.2.5 UHPLC-MS/MS

Dříve hojně využívanou GC-MS postupně nahrazuje LC-MS; v posledních letech zejména ultra účinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (UHPLC-MS). Tradiční radioimunoanalýza (RIA) a enzymová imunoanalýza (ELISA) jsou nahrazovány HPLC-MS/MS. Tato technika umožnila mimo jiné *cis/trans* stereochemickou analýzu významného isoleucinového konjugátu s kyselinou jasmonovou (JA-Ile). Při nedávném studiu kinetického profilu hladin JA a jejích metabolitů v odezvě na mechanický stres, byla použita metoda UHPLC-TOF-MS, která vyniká chromatografickým rozlišením a nově umožňuje separovat některé isomery (Podlešáková *et al.*, 2012).

5. MATERIÁL A METODY

5.1 Rostlinný materiál

Při této studii byly použity rostliny mucholapky podivné (*Dionaea muscipula* Ellis.) a rosnatky kapské (*Drosera capensis* L.) pěstované v klasických plastových květináčích na okenním parapetu a podlévány destilovanou vodou. Rostly tak v podmínkách rozsahu teplot 20 – 35 °C a fotosynteticky účinného záření do 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Všechny pokusy byly provedeny na zdravých a mladých listech.

5.2 Chemikálie a použitý materiál

Standardy JA, JA-Ile, *cis*-12-OPDA, ABA, IAA, SA a izotopově stabilně značené standardy [$^2\text{H}_6$]-JA, [$^2\text{H}_2$]-JA-Ile, [$^2\text{H}_6$]-ABA, [$^2\text{H}_5$]-IAA a [$^2\text{H}_4$]-SA byly zakoupeny od firmy OlChemIn Ltd. (Olomouc, Česká republika). *Cis*-12-OPDA a [$^2\text{H}_5$]-OPDA byly syntetizovány enzymaticky z α -linoleové kyseliny (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Tyto standardy byly rozpuštěny v 50% acetonitrilu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). K namíchání extrakčního a elučního činidla (10% a 80% methanolu) byl použit 100% methanol (*gradient grade*, Merck, Darmstadt, Německo) a deionizovaná voda (Milli-Q), která byla získávána z přístroje Simplicity 185 (Millipore, Bedford, Massachusetts, USA). Před analýzou na UHPLC-MS/MS byly vzorky rozpuštěny v 15% acetonitrilu a 10 mM kyselině mravěčí (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Tyto dvě chemikálie sloužily jako mobilní fáze a obě splňovaly podmínky čistoty pro LC-MS analýzu.

Při zpracovávání vzorku byly použity 2ml plastové mikrozkušavky (Eppendorf, Německo), purifikační kolonky (Oasis[®] HLB / 30 mg sorbent/ objem 1 ml; Waters Co., Milford, MA, USA) a různé druhy laboratorního skla – kádinky, odměrné válce a jednorázové skleněné zkumavky. Všechny ostatní použité přístroje jsou v textu.

Při měření povrchového potenciálu rostlin bylo využito Ag/AgCl elektrod (Scanlab systems, Praha, Česká republika) a EKG gelu (VUP, Prievidza, Slovensko).

5.3 Měření povrchových elektrických potenciálů

Bylo provedeno několik měření povrchových elektrických potenciálů (PEP). PEP byly zaznamenány neinvazivním zařízením (vyrobena na Katedře biofyziky Univerzity Palackého, Olomouc), které bylo umístěno uvnitř Faradayovy klece. Na rostlinu byly připojeny dvě nepolarizovatelné elektrody s Ag/AgCl povrchem (Scanlab systems, Praha, Česká republika). Elektrody byly fixované v plastových 1 ml špičkách v držácích na zkumavky. Před připojením k rostlině byla na elektrody nanесena kapka zvlhčujícího

vodivého EKG gelu (VUP, Prievidza, Slovensko). Referenční elektroda byla umístěna do kořenového média, kterým byla destilovaná voda v podmisce. Elektrody byly napojeny na dvou nezávislých kanálech zesilovače (vyroben na Katedře biofyziky Univerzity Palackého; zisk 1-1000, šum 2-3 μV , vlnový rozsah [-3 dB] 15 Hz, čas odezvy 10 μs , vstupní odpor 10^{12} Ω). Signály ze zesilovače byly převedeny analogově-digitálním převodníkem (osm analogových vstupů, 12bitový převodník, ± 10 V, PCA-7228AL, dodává TEDIA, Plzeň, Česká republika), data byla shromažďována každých 30 ms a zobrazována na monitoru počítače. Citlivost zařízení byla 13 μV . Minimálně 36 minut před každým měřením byly vlhčené elektrody ekvilibrovány, aby došlo k ustálení hodnot. (Hlaváčková *et al.*, 2006). Poté bylo spuštěno měření PEP.

Měření PEP na experimentálních modelech mucholapka podivná a rosnatka kapská jsme provedli v různých variacích zapojení dvou elektrod a za použití různých druhů stimulačních podnětů (vlození kořisti, popálení, opakované mechanické poškození rostlinného pletiva), přičemž byla sledována odpověď v lokálním i systémovém listu. Data byla zpracována v Originu (Origin 8.5.1., OriginLab corporation, Northampton, MA, USA).

5.4 Biotest

Pro biotest bylo použito celkem osm rostlin rodu *Dionaea*. Několik pastí čtyř rostlin bylo 24 hodin před biotestem nakrmeno moučnými červy. Zbylé čtyři rostliny sloužily jako kontrola. Po 24 hodinách od nakrmení byly všechny otevřené systémové pasti pozavírány dotykem dřevěnou špejlí citlivého trichomu uvnitř pasti. Bylo počítáno, kolik dotyků postačí k uzavření pasti. Doba mezi dvěma doteky 10 sekund. Biotest byl zopakován dvakrát.

5.5 Odběr vzorků pro analýzu rostlinných hormonů

Sada vzorků 1

Z rostlin rodu *Dionaea* bylo odebráno celkem 16 vzorků. Čtyři rostliny byly nakrmeny larvami potměníka moučného (*Tenebrio molitor*). Z těchto rostlin byla krmená past odebrána po 1 hodině (FT1), 18 hodinách (FT18), 24 hodinách (FT24) a 1 týdně (FT). Z každé z uvedených krmených rostlin byla odebrána i systémová past (FN1 – FN4). Past další rostliny byla lehce popálena pomocí hořící dřevěné špejle. Z této rostliny byly po 2 hodinách po lokálním popálení odebrány popálené pasti (P2) a čtyři systémové pasti (S1 – S4). Z nekrmených a nepopálených rostlin byly odejmuty čtyři kontrolní pasti.

Z rostlin rodu *Drosera* bylo odebráno celkem 20 vzorků. Čtyři rostliny byly nakrmeny octomilkami (*Drosophila melanogaster*), které byly poskytnuty Katedrou genetiky Univerzity Komenského v Bratislavě. Z těchto rostlin byly odebrány dva

krmené listy po 24 hodinách (F_{1-2} 24) a dva po 2 hodinách (F_{3-4} 2). Z každé krmené rostliny byl odebrán i systémový nekrmený list (FN1 – FN4). Další čtyři listy byly odebrány dvě hodiny po poškození mírným popálením hořící dřevěnou špejlí (W1 – W4). Z těchto rostlin byly odebrány i systémové listy (S1 – S4). Z nekrmených a nepopálených rostlin byly odejmuty čtyři kontrolní pasti.

Sada vzorků 2

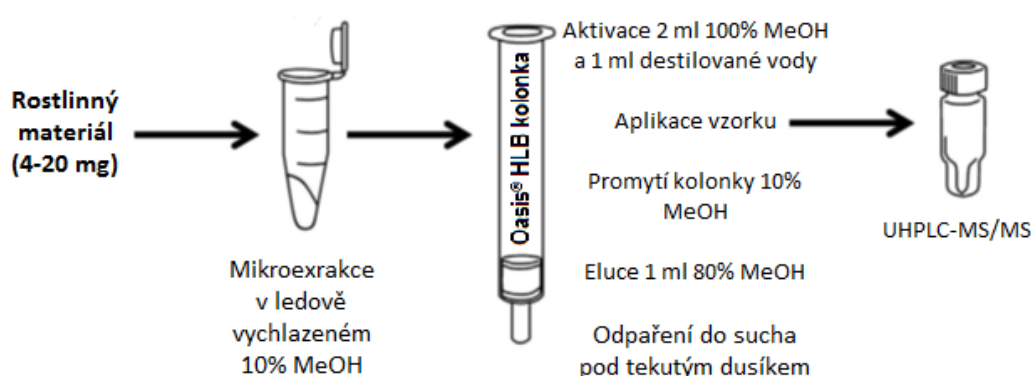
Pletiva obou druhů rostlin byla mechanicky poškozována opakovaným vpichem jehlou. Vpichy byly prováděny co tři minuty po dobu 1 hodiny 45 minut na třech rostlinách a další tři rostliny sloužily jako kontrola. Následně byly odebrány tři poraněné listy a k nim tři systémové listy z každé rostliny. Tři listy byly odebrány z kontrolních rostlin. Všechny vzorky byly okamžitě po odběru zmrazeny v tekutém dusíku a následně skladovány při -70 °C, aby bylo zabráněno enzymatickým přeměnám.

5.6 Extrakce

Vzorky zamražených listů byly postupně homogenizovány s použitím kapalného dusíku, třecí misky a tloučku. Rostlinný materiál byl rozvážen do 2ml plastových mikrozkmavek (Eppendorf, Německo) a na analytických vahách Ohaus (Sartorius, Gettingen, Německo). Při navážení bylo vždy vytvořeno druhé vyhotovení mající přibližně stejnou hmotnost jako originál. K rostlinnému materiálu byl přidán 1 ml ledově vychlazeného extrakčního roztoku (10% methanol), čtyři kovové kuličky a 10 μ l stabilních izotopově značených interních standardů - [$^2\text{H}_6$]-JA, [$^2\text{H}_2$]-JA-Ile, [$^2\text{H}_6$]-ABA, [$^2\text{H}_5$]-IAA, [$^2\text{H}_5$]-OPDA (10 pmol/vzorek), [$^2\text{H}_4$]-SA (20 pmol/vzorek). U sady vzorků 2 byla koncentrace [$^2\text{H}_2$]-JA-Ile snížena (0,1 pmol/vzorek). Na každých 11 vzorků byl připraven jeden srovnávací vzorek, obsahující pouze extrakční roztok, interní standardy a čtyři kovové kuličky. Vzorky byly dále homogenizovány s pomocí MM 301 vibračního oscilačního mlýnu (Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Německo) při frekvenci 27 Hz po dobu 5 minut. Poté byly sonikovány tři minuty v ultrazvukové lázni (transsonic T310, Elma GmbH & Co KG, Singen, Německo) předem vychlazené na 4 °C pomocí zásobníku s ledem. Následně se vzorky extrahovaly za použití laboratorního rotátoru Stuart SB3 (BibbyScientific Ltd., Staffordshire, UK) po dobu 30 minut v lednici při teplotě 4 °C. Po odstředění v centrifuze (5 min, 20 000 rpm, 4 °C, Beckman Avanti TM 30, Německo) byly získané supernatanty přeneseny do čistých skleněných zkumavek a pelet byl reextrahován za stejných podmínek (přidání 1 ml 10% methanolu, protřepání na vortexu (Velp Scintifica, Usmate, Itálie), centrifugace)). Sekundární supernatant byl přidán k primárnímu.

5.7 Extrakce pevnou fází (SPE)

Smíchané supernatanty byly purifikovány pomocí extrakce na pevné fázi (Oasis[®] HLB kolonky/ 30 mg sorbent/ objem 1 ml). SPE sorbent byl aktivován 2 ml 100% methanolu a 1 ml redestilované vody. Po nanesení 2 ml vzorku byly kolony promyty 1 ml extrakčního roztoku (10% methanol) a následně byly analyty eluovány 3 ml 80% methanolem. Protlačený eluát byl odpařen pod dusíkem k suchu při maximální teplotě 30 °C za použití TurboVap LV dusíkové odparky (Biotage, Hengoe, Velká Británie) a skladován v mrazicím boxu při -20 °C až do analýzy. Před analýzou byly vzorky rozpuštěny ve 40 µl 15% acetonitrilu/10 mM HCOOH.



Obr. 5: Popis přípravy vzorku pro analýzu fytohormonů za použití jednokrokového SPE protokolu. Rostlinný materiál (4-20 mg FW) byl extrahován za pomoci vodného roztoku metanolu (10% MeOH/H₂O, v/v) se stabilními isotopicky značenými standardy. Extrakty byly purifikovány pomocí HLB sorbentu. Všechny získané frakce, které obsahovaly neutrální a kyselé sloučeniny, byly odpařeny do sucha a poté rozpuštěny v 40 µl 15 % acetonitrilu/10 mM HCOOH a 10 µl bylo vstříknuto do systému HPLC-MS/MS. (Převzato z: Floková et al., 2014).

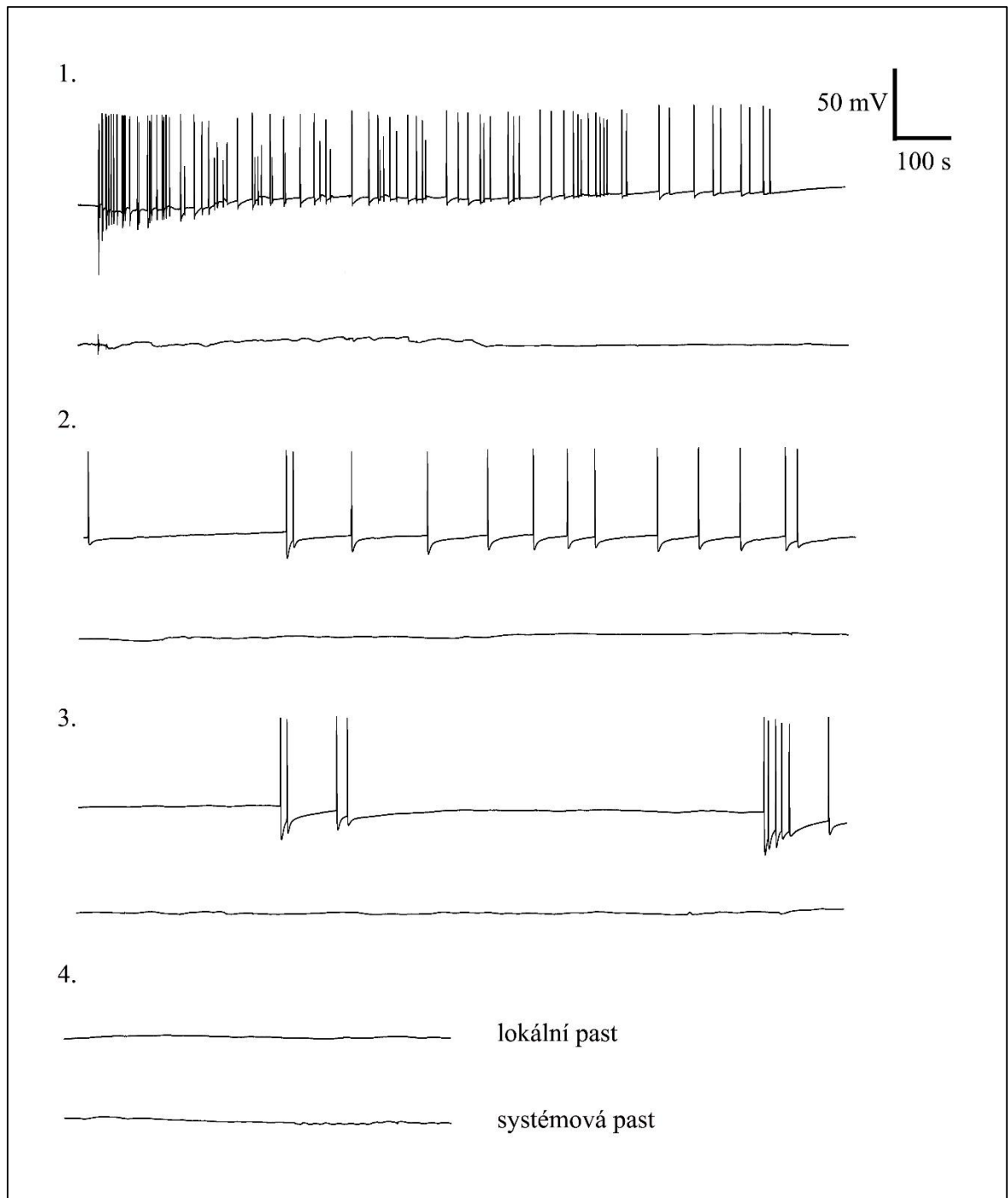
5.8 Parametry UHPLC-MS/MS

JA a její metabolity, ABA, SA a IAA byly analyzovány Acquity UPLC[®] systémem (Waters, Milford, MA, USA) spojeným s kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem Xevo[™] TQ MS (Waters MS Technologie, Manchester, UK) a z každého vzorku bylo vstříknuto 10 µl do RP kolony (Acquity UPLC[®] CSH[™] C18; 2,1 × 100 mm; 1,7 µm; Waters, Irsko) o průtokové rychlosti 0,4 ml/min. Analyt byl separován gradientovou elucí za použití acetonitrilu (A) a 10 mM kyseliny mravenčí (B). Celkový čas analýzy byl 14 minut a probíhala následovně: 0-1 minut izokratická eluce (15% A; v/v); následoval lineární gradient: 1-7 minut do 60% A; 7-9 min do 80% A, 9-10 minut do 100% A; poté 10-11 min izokratická eluce (100% A; v/v). Nakonec proběhlo minutové promytí (10-11 minuta) 100% A a dvouminutová (12-14 min) ekvilibrace kolony v počátečních podmínkách (15% A/85% B). Eluát byl zaveden do iontového zdroje (ionizace elektrosprejem v negativním módu – ESI(-)) tandemového hmotnostního spektrometru, analýza probíhala za následujících

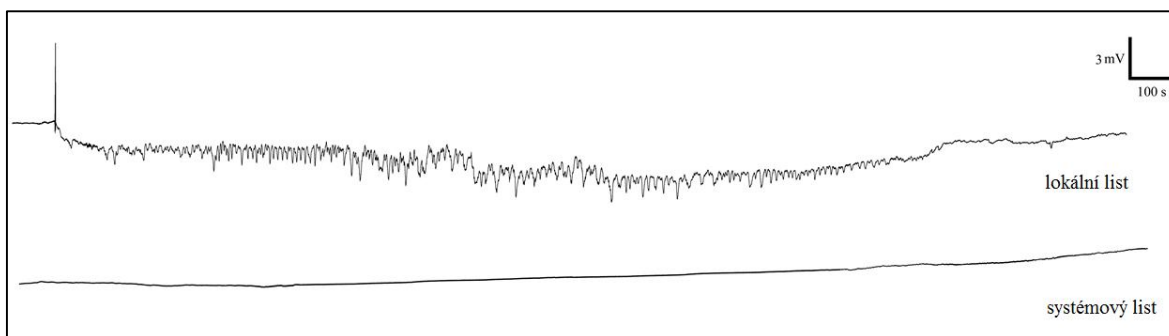
podmínek: Na kapiláru bylo přivedeno napětí 3 kV, na vstupní štěrbinu 23-30 V. Průtok zmlžovacího plynu dusíku byl 1000 l/hod a průtok plynu na vstupní štěrbině byl 150 l/hod. Záznam dat byl prováděn v režimu MRM za optimalizovaných podmínek kolizního napětí 12 eV při tlaku kolizního plynu (argon) $4,3 \cdot 10^{-3}$ mbar.

6. VÝSLEDKY

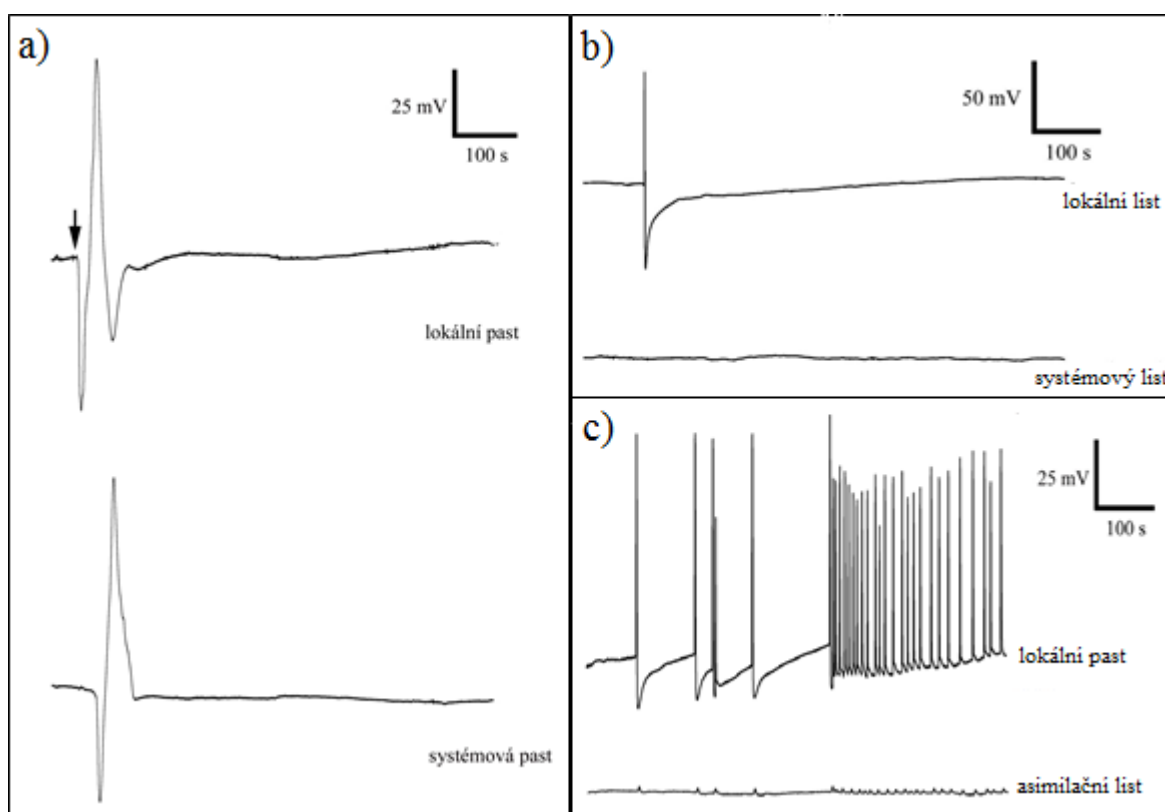
6.1 Měření povrchových elektrických potenciálů



Obr. 6: Záznam akčních potenciálů měřených na povrchu pasti mucholapky podivné. Povrchové potenciály jsou zaznamenávány od lapaní kořisti po její trávení. Trávicí/lokální past nahoře, systémová past dole. Pokus trval 3 hodiny 12 minut.



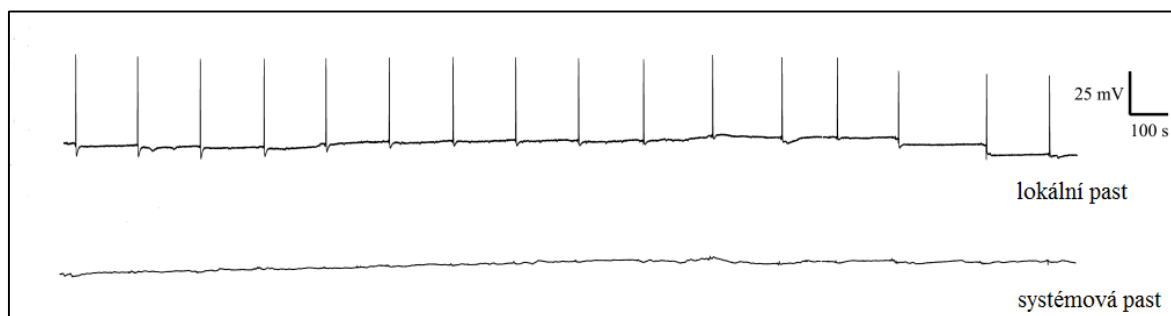
Obr. 7: 48 minutový záznam oscilací membránového potenciálu u rosnatky kapské vyvolaný krmením živou kořistí. Lokální list nahoře, systémový dole.



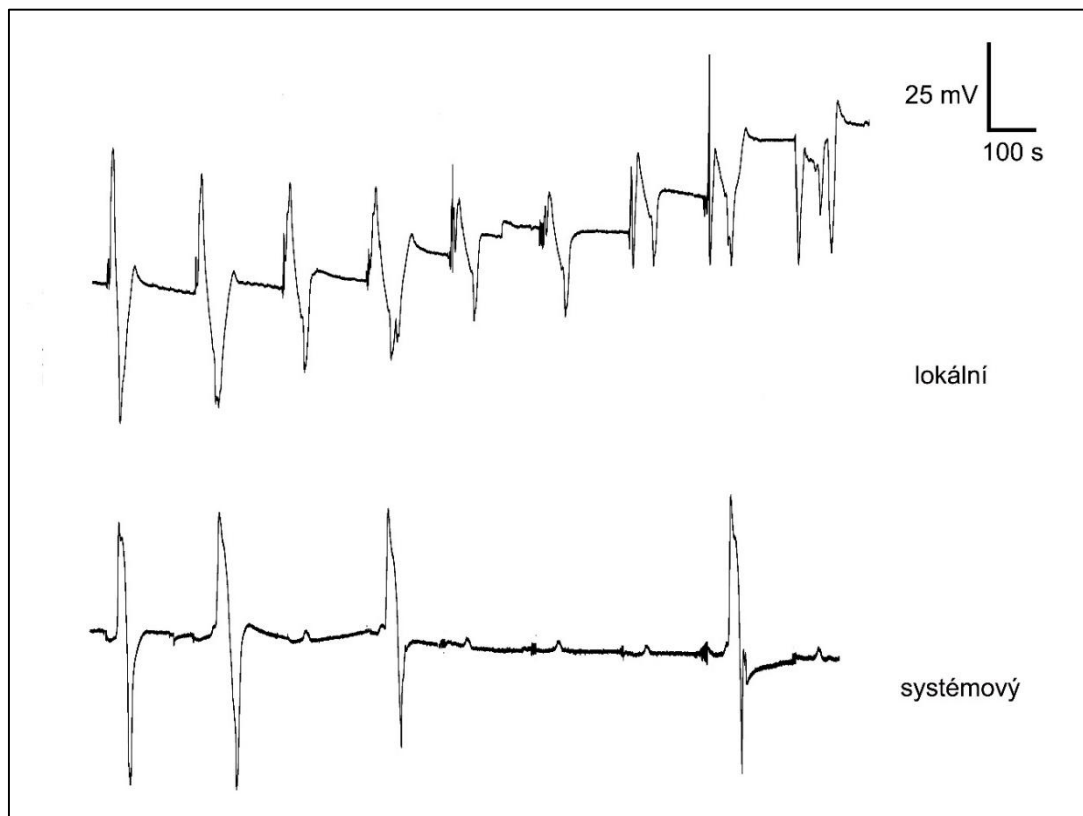
Obr. 8: 12 minutové záznamy akčních potenciálů A) u rosnatky kapské a B) u mucholapky podivné vyvolané lokálním popálením. Lokální listy jsou znázorněny nahoře, systémové dole. C) 12 minutový záznam akčních potenciálů měřených na povrchu pasti mucholapky podivné. Povrchové potenciály jsou zaznamenávány od lapaní kořisti. Lokální list je nahoře, dole je znázorněn asimilační list nesoucí past, která chytla kořist.

Pro pochopení systémové odpovědi v masožravých rostlinách jsme využili mechanismu elektrické signalizace. Byla měřena elektrická aktivita pomocí dvou povrchových Ag/AgCl elektrod napojených na lokálním a systémovém listu. V průběhu zachycení kořisti nebyl zaznamenán přenos elektrického signálu do systémové pasti (**Obr. 6, 7**), což ukazuje, že masožravost je pouze lokální signalizací a rostlina neinformuje ostatní listy o lapaní kořisti. Amplituda měřená na lokální pasti mucholapky byla výrazně větší než v případě rosnatky (50 mV oproti 3 mV). Na obrázku **6C** můžeme pozorovat záznam prvního akčního potenciálu, který nezpůsobí uzavření pasti a druhého, který již past uzavře a následný boj kořisti uvnitř pasti vyvolávající sadu akčních potenciálů. V asimilační části této pasti byly

naměřeny drobné oscilace s několika vteřinovým zpožděním, které však nepřipomínají žádný ze studovaných potenciálů. Jedná se pravděpodobně o změny potenciálu na membráně označované jako *graded potential* (Volkov *et al.* 2007). Lokální popálení vyvolalo odlišné reakce. U rosnatky kapské se EP dostal také do systémového listu (**Obr. 8a**). Systémová elektroda byla připojena na povrchu spodní báze listu 8 cm od lokální elektrody. Elektrický potenciál se dostal do systémového listu se zpožděním 20 sekund. Rychlost přenosu byla tedy $4 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$. Amplituda dosahovala 70 mV a po dobu přenosu byla konstantní. Při opakovaném mechanickém poškození jsme dosáhli podobných výsledků, ale ne každý AP se u rosnatky dostal do systémového listu se stejnou amplitudou (**Obr. 10**), což může vysvětlovat sníženou koncentraci jasmonátů v těchto listech.



Obr. 9: Záznam akčních potenciálů u mucholapky podivné vyvolané opakovaným mechanickým poškozením pletiva. Vpichy byly prováděny co 3 minuty. Lokální past nahoře, systémová dole.



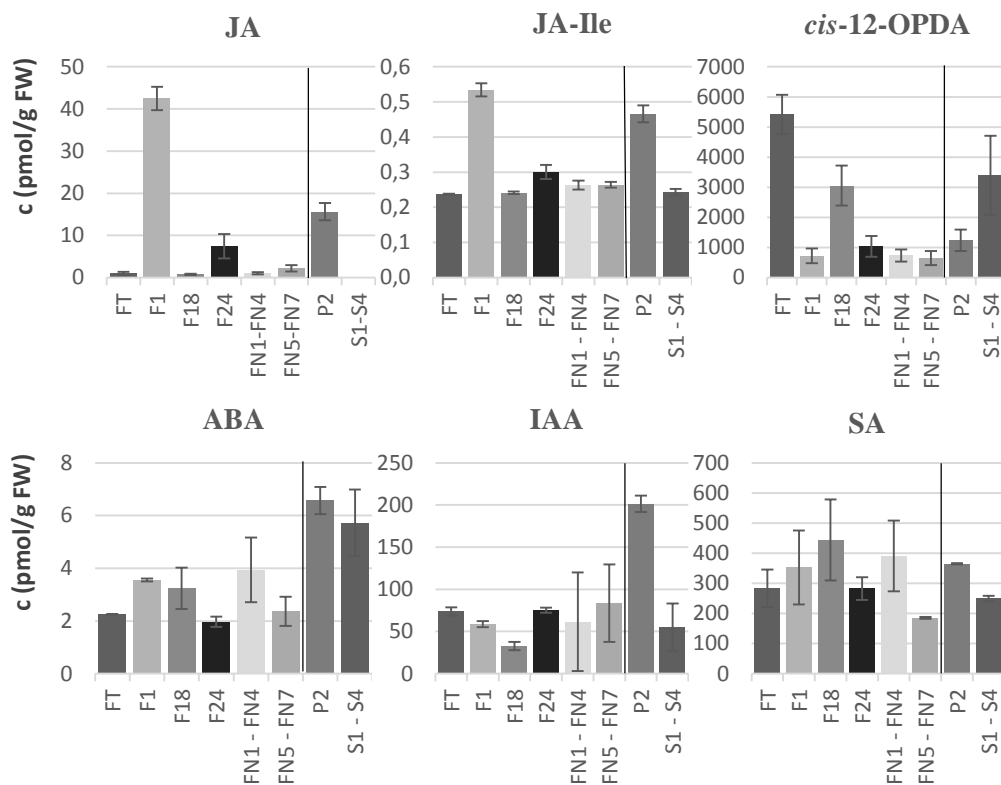
Obr. 10: Záznam akčních potenciálů u rosnatky kapské vyvolané opakovaným mechanickým poškozením pletiva. Vpichy byly prováděny co 3 minuty. Lokální past nahoře, systémová dole.

6.2 Analýzy rostlinných hormonů

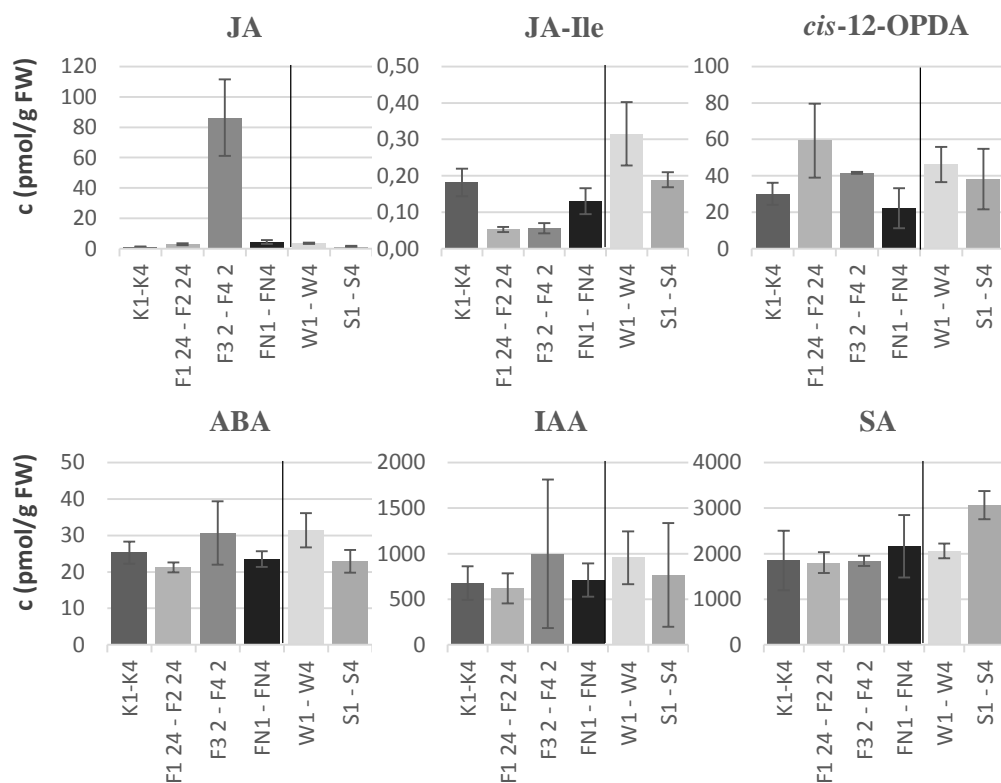
Nedílnou součástí tohoto experimentu byla chemická analýza stresových fytohormonů. Kvalitativní a zejména kvantitativní analýza nám napomohla objasnit význam těchto nízkomolekulárních látek při systémové odpovědi v masožravých rostlinách. S použitím vysoce citlivé metody UHPLC-MS/MS bylo stanovováno vždy celkem šest fytohormonů – jasmonáty: kyselina jasmonová (JA), isoleucinový konjugát s kyselinou jasmonovou (JA-Ile), *cis*-12-oxo-fytodienová kyselina (*cis*-12-OPDA) a další důležité hormony obranné signalizace: kyselina abscisová (ABA), indol-3-octová (IAA) a salicylová (SA). Hladiny fytohormonů v případě mucholapky podivné byly stanovovány z 20 mg čerstvé hmoty (FW), v případě rosnatky kapské při první sadě vzorků průměrně z $6,80 \pm 1,70$ mg FW. Při druhé sadě vzorků bylo množství rostlinného materiálu zvýšeno na $16,54 \pm 2,60$ mg FW. Nejprve jsme nechali rostliny trávit kořist a vzorky z mucholapky byly odebrány ve čtyřech časových intervalech (**Obr. 11**), u rosnatky pouze po 2 a 24 hodinách (**Obr. 12**), abychom vyvolali v systémových listech různý časový interval indukce fytohormonů. Poté jsme rostlinná pletiva mechanicky poškodili popálením a vzorky odebraly po dvou hodinách, které jsou dostatečné na indukci syntézy jasmonátů v systémových listech (**Obr. 11, 12**).

V kontrolních pastech nebyly zjištěny žádné významné změny v hladině některého z fytohormonů, což dokazuje dodržení stabilních podmínek při experimentu. Při trávení hmyzí kořisti a popálení byly JA, JA-Ile a ABA u mucholapky detekovány v minimálním množství ($50 \text{ pmol g}^{-1} \text{ FW}$). Mírně zvýšené množství bylo zanalyzováno u IAA, SA ($50\text{-}500 \text{ pmol g}^{-1} \text{ FW}$) a byla zjištěna velmi vysoká hladina *cis*-12-OPDA ($< 500 \text{ pmol g}^{-1} \text{ FW}$; **Obr. 11**). Oproti tomu u rosnatky vykazovala *cis*-12-OPDA výrazně nižší hladinu (max $59,32 \pm 20,25 \text{ pmol g}^{-1} \text{ FW}$) a IAA a SA výrazně vyšší ($600\text{-}3000 \text{ pmol g}^{-1} \text{ FW}$; **Obr. 12**).

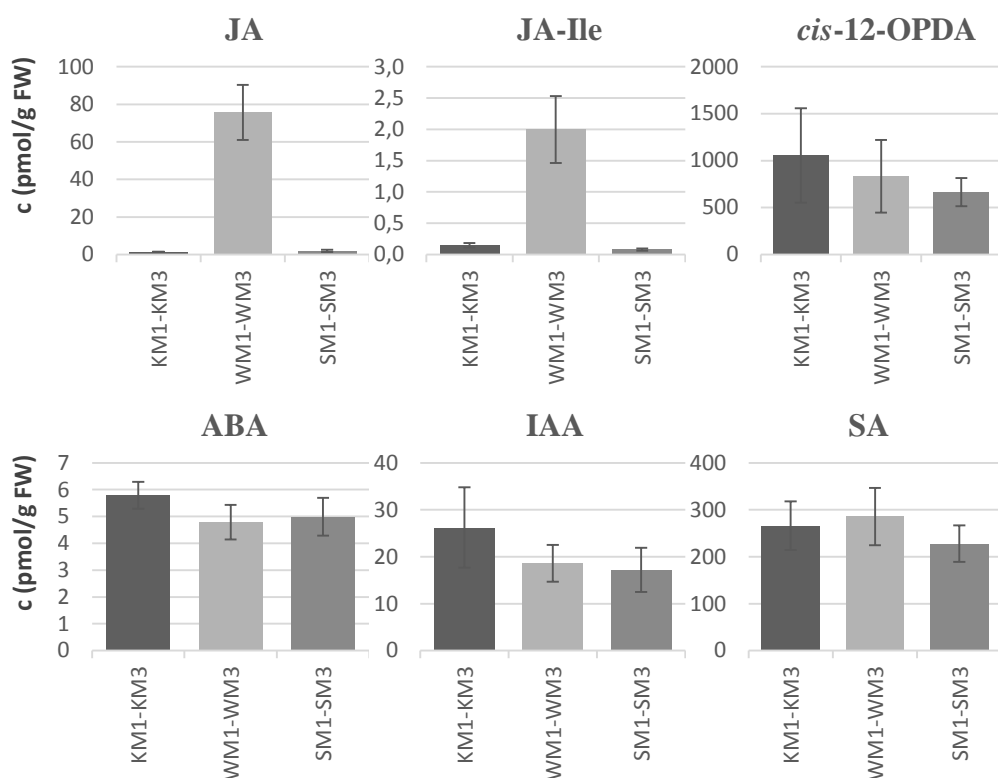
V průběhu trávení hmyzí kořisti u mucholapky došlo ke zvýšení hladiny pouze jasmonátů. JA a JA-Ile měly nejvyšší koncentraci po jedné hodině. Hladina JA se zvýšila až 20x oproti kontrolním listům. Koncentrace *cis*-12-OPDA začala narůstat po 18 hodinách a ještě většího zvýšení dosáhla po jednom týdnu (**Obr. 11**). U rosnatky vzrostla koncentrace pouze kyseliny jasmonové (**Obr. 12**). Ostatní fytohormony vykazují při trávení velmi vyrovnanou hladinu. Ani v jednom případě jsme nezaznamenali v průběhu trávení zvýšení množství fytohormonů v systémových listech, což dobře koreluje s našimi výsledky z měření extracelulárních elektrických potenciálů. Tam kde se neobjevuje elektrický signál, nenacházíme ani akumulaci fytohormonů.



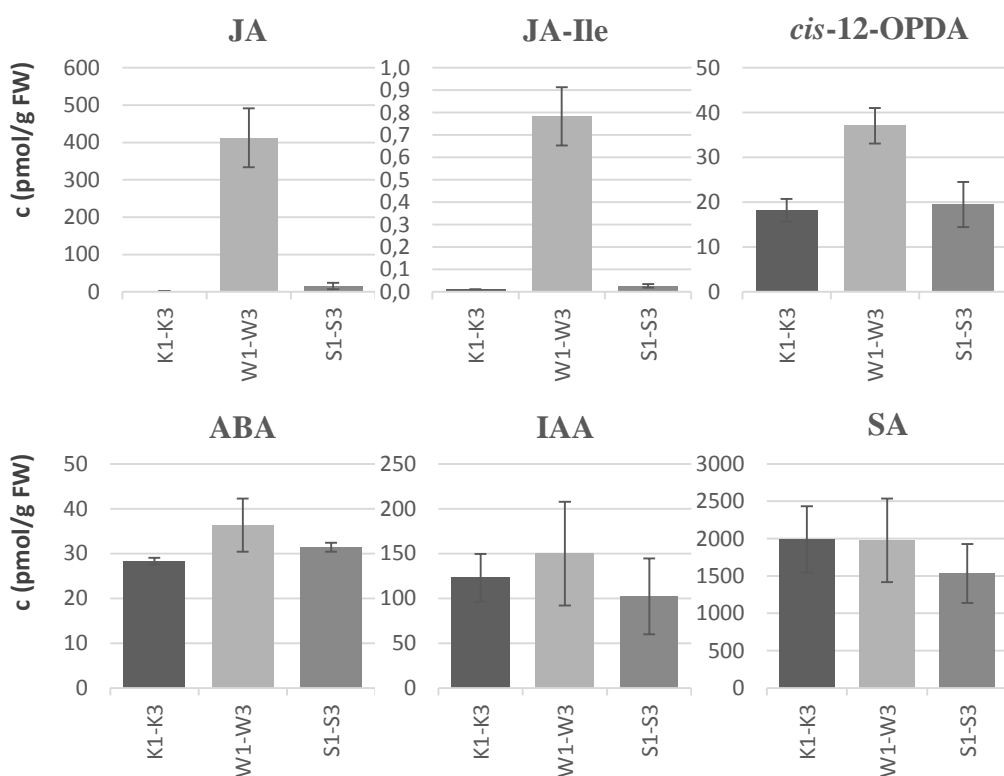
Obr. 11: Koncentrace fytohormonů na 1 g extrahovaného pletiva mucholapky podivné (pmol/g čerstvé hmoty; střední hodnota \pm SD, $n = 2-4$). FT = krmená past odebraná po týdnu, F1 = po 1 hod., F18 = po 18 hod., F24 = po 24 hod., FN1-FN4 = k tomu systémové pasti, FN5-FN7 = kontrolní pasti, tzn. nekrmené pasti na nekrmené rostlině, P2 = popálená past odebraná po 2 hodinách, S1-S4 = k tomu systémové pasti.



Obr. 12: Koncentrace fytohormonů na 1 g extrahovaného pletiva rosnatky kapské (pmol/g čerstvé hmoty; střední hodnota \pm SD, $n = 2-4$). K1-K4 = kontrolní listy, F₁24-F₂24 = krmené listy odebrány po 24 hod., F₃2-F₄2 = krmené listy odebrány po 2 hod., FN1-FN4 = k tomu systémové listy, W1-W4 = popálené listy odebrány po 2 hod., S1-S4 = k tomu systémové listy odebrány po 2 hod.



Obr. 13: Koncentrace fytohormonů na 1 g extrahovaného pletiva mucholapky podivné po opakovaném mechanickém poškození pletiva (pmol/g čerstvé hmoty; střední hodnota ± SD, n = 3). KM1-KM3 = kontrola; WM1-WM3 = listy opakovaně poškozené; SM1-SM3 = k nim systémové listy.



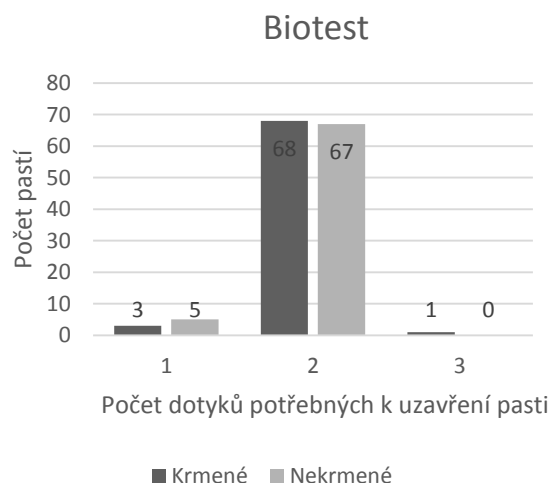
Obr. 14: Koncentrace fytohormonů na 1 g extrahovaného pletiva rosnatky kapské po opakovaném mechanickém poškození pletiva (pmol/g čerstvé hmoty; střední hodnota ± SD, n = 3). K1-K3 = kontrola; W1-W3 = listy opakovaně poškozené; S1-S3 = k nim systémové listy.

Je známo, že rostliny reagují na popálení zahájením obranných procesů a zvyšováním hladiny JA a ABA a to i v systémových listech (Hlaváčková *et al.*, 2006). U mucholapky došlo po dvou hodinách k sedminásobnému nárůstu JA, v systémových listech byla pod limitou detekce. K dvojnásobnému nárůstu došlo u JA-IIe a je velmi zajímavé, že byla detekována zvýšená koncentrace *cis*-12-OPDA v systémových listech i přesto, že jsme zde nezaznamenali elektrické signály. ABA narostla 2× i v systémových listech, což nevíme zda-li je fakt a nebo chyba analýz. Jak se očekávalo, nebyly pozorovány žádné signifikantní změny v případě SA, protože její signální dráhy tohoto endogenního hormonu jsou spíše spuštěny v reakci na biotický stres, například patogeny, než na abiotické stresy jako je popálení (Achuo *et al.*, 2004, **Obr. 11**). U rosnatky nebyly pozorované výraznější změny. Nebyla detekována ani zvýšená koncentrace JA ani ABA (**Obr. 12**).

Kvůli ne příliš přesvědčivé odpovědi na popálení jsme při dalších experimentech použili opakované mechanické poškození pletiva. Lokální poškození listové tkáně vedlo k podstatnému hromadění JA, její koncentrace se zvýšila oproti kontrolním vzorkům až 50× v případě mucholapky (**Obr. 13**) a 275× v případě rosnatky (**Obr. 14**). Hladina JA se u rosnatky zvýšila také v systémových listech (10,5×), což podporuje hypotézu systémové odpovědi na poranění. K výraznému nárůstu došlo také u fyziologicky aktivní sloučeniny JA-IIe, která už ovšem nebyla detekována v systémových listech. U rosnatky byl tento nárůst doprovázen akumulací *cis*-12-OPDA. Hladiny ostatních hormonů byly více méně konstantní (**Obr. 14**).

6.3 Biotest

Citlivost pastí na mechanické podněty je regulovaná fytohormony. Aby se posoudilo, zda a případně jakým způsobem je odpověď kyseliny jasmonové v trávících pastech také systémová, testovali jsme na mucholapce podivné senzitivitu jejich pastí po 24 hodinách od nakrmení. Po této době se okolní pasti neuzavřely a citlivé trichomy uvnitř jsme mechanicky



Obr. 15: Testování sensitivity systémových pastí v mucholapce podivné po 24 hodinách od nakrmení. *n* = 72.

stimulovaly. Stejně jako u pastí nekrmených (kontrolních) první dotyk vyvolal typický akční potenciál, který nevyvolává uzavření pasti. K uzavření pasti stačily klasicky dva dotyky, což dokazuje, že masožravost je lokální signalizace a ostatní pasti nejsou nijak informovány o přítomnosti kořisti a nevykazují zvýšenou citlivost svých pastí.

7. DISKUZE

Ačkoliv mnohá literatura uvádí, že akční potenciál je vyvolán nedestruktivním stimulem, nikoli v odpovědi na poranění (Fromm & Lautner, 2007; Yan *et al.*, 2009) a tato informace se stala téměř dogmatem elektrofyziologie rostlin, tato práce podává důkaz o opaku. Jak je vidět na výsledcích, po mechanickém poškození můžeme pozorovat typický akční potenciál u obou studovaných druhů, který je po dobu svého šíření více méně konstantní, i když v některých případech byla amplituda v systémovém listu rosnatky výrazně redukována (**Obr. 9, 10**). To naznačuje, že v tomto případě může být elektrický signál složen z více než dvou složek. U jiných druhů rostlin nacházíme spíše VP, což může být způsobeno odlišným typem rostlinného pletiva či iontovým mechanismem. Ovšem i u mucholapky a rosnatky můžeme vidět značné rozdíly a to v šíření na dlouhé vzdálenosti, kdy zatímco u rosnatky se AP šíří i do systémového listu, u mucholapky nikoliv (**Obr. 8, 9, 10**).

Elektrické signály mají důležitou roli při signalizaci. Pozorování Mousaviho jasně demonstrují, že generace a propagace elektrických signálů hraje rozhodující roli při iniciaci obranné reakce ve vzdálených listech od místa útoku herbivorů. Blízko místa na listu, do kterého se zakousla housenka, byly vyvolány elektrické signály, které se následně šířily do sousedních listů rychlostí 9 cm min^{-1} . Elektrický signál se přenášel do těch listů, které byly přímo spojeny cévními svazky. Ve všech místech, kde dorazil elektrický signál, byla v odpovědi na poranění spuštěna syntéza jasmonátů (Mousavi *et al.*, 2013). V našem výzkumu zaměřeném na masožravost rostlin v průběhu zachycení a trávení kořisti nebyl zaznamenán přenos elektrického signálu do systémových pastí (**Obr. 7**) a tudíž v nich nedošlo ani k akumulaci jasmonátů, což ukazuje, že masožravost je pouze lokální signalizací a rostlina neinformuje ostatní listy o lapení kořisti. Lokální popálení a opakované mechanické poškození vyvolalo odlišné reakce u druhu rosnatky. Signál se do systémového listu šířil rychlostí přibližně 4 mm s^{-1} (**Obr. 8a**). Ne každý signál se dostal do systémového listu se stejnou amplitudou (**Obr. 10**), což by vysvětlovalo sníženou koncentraci naměřených jasmonátů. Signál u mucholapky podivně může být narušen díky cibulovitému charakteru rostlin, takže listy nemají vaskulární spojení jako je tomu u houseničky.

Rosnatka reaguje na chycení kořisti výraznou ohýbací reakcí, aby vytvořila tak zvaný „vnější žaludek“. Tento fenomén popsal již Charles Darwin (Darwin, 1875). Dříve se mělo za to, že ohyb pastí a tvorba „vnějšího žaludku“ rosnatky je spojen s působením rostlinného hormonu spadajícím do skupiny auxinů – indol-3-octové kyseliny (IAA) (Bopp & Weiler, 1985; Bopp & Weber, 1981). Později byl tento fakt vyvrácen Nakamurou, který potvrdil, že

chycení kořisti vyvolává akumulaci fytohormonů jasmonátů. Analýza listů trávících tři hodiny kořist ukázala, že hladina IAA se nemění, na rozdíl od výrazného zvýšení hladiny kyseliny jasmonové a její nejvíce fyziologicky aktivní formy – isoleucinového konjugátu (JA-Ile). Ve srovnání s kontrolou se jasmonáty akumulovaly pouze ve stočeném segmentu pod lapanou kořistí (Nakamura *et al.*, 2013).

Ve výzkumu *Mithöfera* kořistí indukovaná akumulace jasmonátů v rosnatce vykazovala vysoké hladiny jasmonátů JA a JA-Ile (575 a 55,7 pmol g FW⁻¹). Zatímco při mechanickém poškození pletiva se zvýšila JA (maximum 500 pmol g FW⁻¹) a JA-Ile dosáhla nízké hodnoty (3,1 pmol g FW⁻¹). Po mechanickém poškození a zároveň aplikaci orálních sekretů hmyzu koncentrace JA rapidně vzrostla až na 4000 pmol g FW⁻¹ a JA-Ile na 25 pmol g FW⁻¹. Vzorky byly odebrány po hodině a půl (Mithöfer, Reichelt & Nakamura, 2013). Naše výsledky, kde byly vzorky z rosnatky odebrány po dvou hodinách, dosahují nižších hodnot – při trávení: JA 86,32 ± 25,26 a JA-Ile 0,06 ± 0,01 pmol g FW⁻¹; po mechanickém poškození JA 412,67 ± 78,79 a JA-Ile 0,784 ± 0,130 pmol g FW⁻¹. U mucholapky po jedné hodině trávení: 42,48 ± 2,75 a JA-Ile 0,53 ± 0,02 pmol g FW⁻¹; po mechanickém poškození JA 75,66 ± 14,67 a JA-Ile 1,997 ± 0,535 pmol g FW⁻¹. I přes nižší hodnoty jsou jasmonáty tedy hlavními regulátory v průběhu procesu masožravosti a to nejen u rosnatky kapské, ale také u mucholapky podivné (Escalante-Pérez *et al.*, 2011; Nakamura *et al.*, 2013).

María Escalante-Pérez uvádí, že chycení hmyzí kořisti mucholapkou podivnou je „modulováno“ fytohormony kyselinou abscisovou a jasmonáty. Mucholapky vystavené stresu z nedostatku vody a ty, na jejichž pasti byla aplikována kyselina abscisová, byly méně citlivé na mechanické podráždění. Oproti tomu po aplikaci prekursoru kyseliny jasmonové – *cis*-12-oxofytodienové kyseliny (OPDA), methylesteru kyseliny jasmonové (Me-JA) a molekulárními mimikry isoleucinového konjugátu kyseliny jasmonové – koronatinu (COR) byla spuštěna sekrece trávících enzymů a to i bez předcházející mechanické stimulace. Tvrdí, že jasmonáty jsou systémově aktivní, protože aplikace jasmonátů na jednu past indukuje sekreci trávící tekutiny a pomalé uzavírání pasti, a to nejen dané pasti, ale také pastí všech ostatních, čímž se rostlina připravuje na příchod kořisti (Escalante-Pérez *et al.*, 2011). Z našich výsledků jednoznačně vyplývá, že v mucholapce neexistuje žádná systémová odpověď při chytání a trávení kořisti. Aplikace exogenní kyseliny jasmonové je příliš arteficiální a za fyziologických podmínek mucholapka nevykazuje systémovou odpověď. Jeho výsledky by znamenaly, že bychom měli zaznamenat kyselinu jasmonovou v systémových listech i po trávení kořisti. Jasmonáty se hromadí ale pouze v trávící pasti a v systémové není zaznamenán ani elektrický signál. Masožravost je pouze lokální signalizací.

8. ZÁVĚR

Dlouhé roky se kladl velký důraz na úlohu rostlinných hormonů, které se považovaly za hlavní aktéry rostlinných reakcí na různé podněty. V posledních letech se ale konečně obrací pozornost také na elektrickou signalizaci rostlin. Tato práce o ní podává základní přehled. Seznamuje s hlavními charakteristikami elektrických signálů v rostlinách a na mnoha příkladech ukazuje, že sehrávají skutečně významnou úlohu a jsou pro rostliny nezbytné. Elektrické signály mají význam a funkci například při obranných reakcích, otevírání průduchů v odpovědi na dostupnost vody kořenům, při reprodukci, stimulují sekreci trávicí tekutiny atd. V experimentální části byla optimalizována metoda měření povrchových elektrických potenciálů a bylo dokázáno, že masožravost je pouze lokální signalizací, která je spuštěna akumulací rostlinných hormonů jasmonátů. Mnoho fyziologických účinků elektrické signalizace bylo objeveno teprve nedávno a v řadě případů jejich funkce nebyla ještě zcela objasněna, ale určitě se brzy dočkáme nové kapitoly v klasických učebnicích rostlinné fyziologie, kde jim není zatím věnována žádná pozornost.

Výhledově bych chtěla navázat na tuto bakalářskou práci prací diplomovou s názvem Lokální a systémová odpověď v masožravých rostlinách. Zabývala by se nejen měřením extracelulárních elektrických potenciálů a analýzami rostlinných hormonů, ale také fyziologickou odpovědí, což je v případě masožravých rostlin syntéza trávicích enzymů. Proteomickými technikami bude například studována přítomnost dvou typických trávicích enzymů Dionaesinu (aspartát proteasa) a Dionainu (cystein proteasa) po opakovaném mechanickém poškození pletiva a mechanostimulaci, pomocí specifických protilátek. Dále by byla měřena jejich koncentrace a enzymatická aktivita. Východiskovou hypotézou diplomové práce bude otázka: Dokážou akumulované jasmonáty v odpovědi na poranění indukovat syntézu trávicích enzymů, tedy typickou masožravou odpověď? Anebo dokáží tento falešný signál rostliny vyhodnotit správně a syntézu trávicích enzymů spustit jenom v odpovědi na akumulované jasmonáty po podání živočišnou kořisti? Tato studie by měla objasnit dlouho diskutovanou otázku na téma, jak specifická je elektrická signalizace v rostlinách.

9. Seznam použité literatury

- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Walter P.: *Základy buněčné biologie*. EspPero publishing, Ústí nad Labem, 371-406. ISBN: 80-902906-2-0, 1998.
- Attenborough D.: *Soukromý život rostlin*. Praha: Columbus s.r.o., 1996. ISBN 80-85928-24-8.
- Baluska F., Volkmann D., Hlavacka A., Mancuso S., Barlow P. W.: Neurobiological view of plants and their body plan. *Communication in Plants – Neuronal Aspects of Plant Life*, 19–35. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, Germany, 2006.
- Bopp M., Weber I.: Hormonal regulation of leaf blade movement of *Drosera capensis*. *Physiol. Plant* **53**, 491–496, 1981.
- Bopp M., Weiler EW.: Leaf blade movement of *Drosera* and auxin distribution. *Naturwissenschaften* **72**, 434, 1985.
- Bose J. C.: *The Nervous Mechanism of Plants*, 123–134. Longmans, Green & Co., London, UK, 1926.
- Burdon-Sanderson J.: Note on the electrical phenomena which accompany irritation of the leaf of *Dionaea muscipula*. *Proceedings of the Royal Society of London* **21**, 495–496, 1873.
- Burdon-Sanderson J.: On the electromotive properties of the leaf of *Dionaea* in the excited and unexcited states. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **173**, 1882.
- Darwin C. R.: *Isectivorous plants*. D. Appleton and Company, New York, 1875.
- Dziubinska H., Trebacz K., Zawadzki T.: Transmission route for action potentials and variation potentials in *Helianthus annuus* L. *Plant Physiology* **158**, 1167–72, 2001.
- Egins R. B.: *Biosensors: An Introduction*. Wiley & Teubner, 1997, 224 s. ISBN 0471962856.
- Escalante Pérez M., Krol E., Stange A., Geiger D., Al-Rasheid K. A. S., Hause B., Neher E., Hedrich R.: A special pair of phytohormones controls excitability, slow closure, and external stomach formation in the Venus flytrap. *PNAS* **108**, 15492-15497, 2011.
- Filek M. & Koscielniak J.: The effect of wounding the roots by high temperature on the respiration rate of the shoot and propagation of electric signal in horse bean seedlings (*Vicia faba* L. minor). *Plant Science* **123**, 39–46, 1997.
- Fisahn J., Herde O., Willmitzer L. & Pena-Cortes H.: 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 and Cell Physiology* **45**, 456–459, 2004.
- Floková K., Tarkowská D., Miersch O., Strnad M., Wasternack C., Novák O.: UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry* **105**, 147-157, 2014.
- Forterre Y., Skotheim J. M., Dumais J., Mahadevan L.: How the Venus flytrap snaps. *Nature* **433**, 421-425, 2005.
- Fromm J. & Bauer T.: Action potentials in maize sieve tubes change phloem translocation. *Journal of Experimental Botany* **45**, 463–469, 1994.

- Fromm J. & Bauer T.: Action potentials in maize sieve tubes change phloem translocation. *Journal of Experimental Botany* **45**, 463–469, 1994.
- Fromm J. & Fei H.: Electrical signaling and gas exchange in maize plants of drying soil. *Plant Science* **132**, 203–213, 1998.
- Fromm J. & Lautner S.: Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant Cell Environment* **30**, 249–257, 2006.
- Fromm J. & Spanswick R.: Characteristics of action potentials in willow (*Salix viminalis* L.). *Journal of Experimental Botany* **44**, 1119–1125, 1993.
- Fromm J., Hajirezaei M., Wilke I.: The biomechanical response of electrical signaling in the reproductive system of *Hibiscus* plants. *Plant Physiology* **109**, 375–384, 1995.
- Fromm J.: Control of phloem unloading by action potentials in *Mimosa*. *Physiologia Plantarum* **83**, 529–533, 1991.
- Gallé A., Lautner S., Flexas J., Fromm J.: Environmental stimuli and physiological responses: The current view on electrical signalling. *Environmental and Experimental Botany* **2822**, 2014.
- Glazebrook J: Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 205–227, 2005.
- Hille B.: Ionic Channels of Excitable Membranes. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, MA, USA, 1992.
- Hlaváčková V., Krchňák P., Nauš J., Novák O., Špundová M., Strnad M.: Electrical and chemical signals involved in short-term systemic photosynthetic responses of tobacco plants to local burning. *Planta* **225**, 235–244, 2006.
- Hlaváčková V.: Physical and chemical signals and their action in systemic response of plants to local wounding. In: R. T. Devane (ed.), *New Plant Physiology Research*, 43–95, Nova Science Publishers, 2009.
- Howe, G. A. & Jander, G.: Plant immunity to insect herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 41–66, 2008.
- Ilík P., Hlaváčková V., Krchňák P., Nauš J.: A low-noise multi-channel device for the monitoring of systemic electrical signal propagation in plants. *Biologia Plantarum* **54**, 185–190, 2010.
- Jaffe M. J.: The role of ATP in mechanically stimulated rapid closure of Venus's-flytrap. *Plant Physiology* **51**, 17–18, 1973.
- Juniper B. E., Robins R. J., Joel D. M.: The carnivorous plants. Academic Press, London, UK, 1989.
- Klouda P.: Moderní analytické metody. 2. upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 132 s. ISBN 80-863-6907-2, 2003.
- Koo, A. J. K., Howe G. A.: The Wound Hormone Jasmonate. *Phytochemistry* **70**. 1571–1580, 2009.
- Koziolek C., Grams T. E. E., Schreiber U., Matyssek R. & Fromm J.: Transient knockout of photosynthesis mediated by electrical signals. *New Phytologist* **161**, 715–722, 2004.
- Lautner S., Grams T. E. E., Matyssek R. & Fromm J.: Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis. *Plant Physiology* **138**, 2200–2209, 2005.

- Lautner S., Grams T. E. E., Matyssek R. & Fromm J.: Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis. *Plant Physiology* **138**, 2200–2209, 2005.
- Lautner S., Grams T. E. E., Matyssek R. & Fromm J.: Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis. *Plant Physiology* **138**, 2200–2209, 2005.
- Loake G. & Grant M.: Salicylic acid in plant defence - the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 466-472, 2007.
- Maffei M. E., Mithöfer A. & Boland B.: Before gene expression: early events in plant-insect interaction. *Trends Plant Sci.* **12**, 310-316, 2007.
- Mancuso S.: Hydraulic and electrical transmission of wound-induced signals in *Vitis vinifera*. - *Aust. J. Plant Physiology* **26**: 55-61, 1999.
- Meldau, S., Erb, M. & Baldwin, I. T.: Defence on demand: mechanisms behind optimal defence patterns. *Ann. Bot.* **110**, 1503–1514, 2012.
- Mithöfer A., Reichelt M. & Nakamura Y.: Wound and insect-induced jasmonate accumulation in carnivorous *Drosera capensis*: two sides of the same coin. *Plant biology* **16**, 982-987, 2013.
- Motyka K., Hlaváč J.: Stručný přehled separačních metod. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009, 45 s. ISBN 978-80-244-2304-3.
- Mousavi S. A. R., Chauvin A., Pascaud F., Kellenberger S. & Farmer E. E.: GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* **500**, 422–426, 2013.
- Munemasa S., Oda K., Watanabe-Sugimoto M., Nakamura Y., Shimoishi Y., Murata Y.: The coronatine-insensitive 1 mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in *Arabidopsis* guard cells. Specific impairment of ion channel activation and second messenger production. *Plant Physiol* **143**, 1398-1407, 2007.
- Mur L. A. J., Kenton P., Atzorn R., Miersch O., Wasternack C.: The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol.* **140**, 249–262, 2006.
- Nakamura Y., Reichelt M., Mayer V. E., Mithöfer A.: jasmonates trigger prey-induced formation of 'outer stomach' in carnivorous sundew plants, *Proceedings of the Royal Society B* **280**, 2013.
- Nastuk W. L. & Hodgkin A. L.: The electrical activity of single muscle fibers. *Journal of Cellular and comparative Physiology* **35**, 39–73, 1950.
- Pieterse C. M. J., Leon-Reyes A., Van der Ent S., Van Wees S. C. M.: Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 308–316, 2009.
- Pavlovič A., Demko V., Hudák J.: Trap closure and prey retention in Venus flytrap (*Dionaea muscipula*) temporarily reduces photosynthesis and stimulates respiration. *Annals of Botany* **105**, 37-44, 2010.
- Pavlovič A.: Význam a funkce elektrických signálů v rostlinách, *Živa* **2**, 57-59, 2014.
- Pickard B.: Action potentials in higher plants. *Botanical Review* **39**, 172–201, 1973.
- Podlešáková K., Tarkowská D., Pěňčík A., Oklešťková J., Turečková V., Floková K.,

- Tarkowski P.: Nové trendy v analýze fytohormonů. *Chemické listy* **106**, 373-379, 2012.
- Rost K., Schauer R.: Physical and chemical properties of the mucin secreted by *Drosera capensis*. *Phytochemistry* **16**, 1365-1368, 1977.
- Shiina T. & Tazawa M.: Action potential in *Luffa cylindrica* and its effects on elongation growth. *Plant Cell Physiology* **27**, 1081-1089, 1986.
- Schroeder J. I., Hedrich R. & Fernandez J. M.: Potassiumselective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* **312**, 361-362, 1984.
- Sibaoka T.: Action potentials in plant organs. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **20**, 49-73, 1966.
- Sibaoka T.: Physiology of rapid movements in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* **20**, 165-184, 1969.
- Stahlberg R., Cleland R. E. & Van Volkenburgh E.: Slow wave potentials – a propagating electrical signal unique to higher plants. In *Communication in Plants – Neuronal Aspects of Plant Life* (eds F. Baluska, S. Mancuso & D. Volkmann), pp. 291-308. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, Germany, 2006.
- Stankovic B. & Davies E.: Both action potentials and variation potentials induce proteinase inhibitor gene expression in tomato. *FEBS Letters* **390**, 275-279, 1996.
- Tarkowski P., Doležal K., Strnad M.: Analytické metody studia cytokininů. *Chemické listy* **98**, 834-841, 2004.
- Trebacz K., Dziubinska H. & Krol E.: Electrical signals in long-distance communication in plants. In *Communication in Plants – Neuronal Aspects of Plant Life* (eds F. Baluska, S. Mancuso & D. Volkmann), pp. 277-290. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, Germany, 2006.
- Umrath K.: Untersuchungen über Plasma und Plasmaströmungen an Characeen. IV. Potentialmessungen an *Nitella mucronata* mit besonderer Berücksichtigung der Erregungserscheinungen. *Protoplasma* **9**, 576-597, 1930.
- Volkov A. G., Adesina T., Jovanov E.: Closing of Venus Flytrap by Electrical Stimulation of Motor Cells. *Plant Signaling and Behavior* **2**, 139-145, 2007.
- Williams S. E., Pickard B. G.: Properties of action potentials in *Drosera tentacles*. *Planta* **103**, 222-240, 1972.
- Yan X., Wang Z., Huang L., Wang Ch., Hou R., Xu Z., Qiao X.: Research progress on electrical signals in higher plants, *Natural Science* **19**, 531-541, 2009.
- Zawadzki T., Dziubinska, H., Davies, E.: Characteristics of action potentials generated spontaneously in *Helianthus annuus*. - *Physiol. Plant.* **93**: 291-297, 1995.
- Zimmermann M. R., Maischak H., Mithöfer A., Boland W., Felle H.: System Potentials, a Novel Electrical Long-Distance Apoplastic Signal in Plants, Induced by Wounding. *Plant Physiology* **149**, 1593-1600, 2009.