

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra biofyziky



DIZERTAČNÍ PRÁCE

Regulace enzymatických aktivit v masožravých rostlinách

Vypracoval: Mgr. Ondřej Kocáb

Studijní obor: Biofyzika

Vedoucí bakalářské práce: Doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.

Olomouc, 2021

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracoval samostatně, pod vedením Doc. Mgr. Andreje Pavloviče, Ph.D. a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Mgr. Ondřej Kocáb
Název práce	Regulace enzymatických aktivit v masožravých rostlinách
Typ práce	Disertační
Pracoviště	Katedra biofyziky
Vedoucí práce	Doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	<p>Pro správnou funkci pastí masožravých rostlin je klíčová jasmonátová signální dráha, která iniciuje tvorbu enzymů sloužící k trávení zachycené kořisti. Zastoupení trávících enzymů a způsob regulace karnivorie se může lišit dle způsobu života konkrétního druhu masožravé rostliny. Tato disertační práce se věnuje dvěma souvisejícím tématům. První téma se zaměřuje na doposud nezkoumanou regulaci enzymatických aktivit u tučnic (<i>Pinguicula</i>) z řádu Lamiales. Druhá část práce se zabývá enzymatickými aktivitami v trávící tekutině láčkovky <i>Nepenthes hemsleyana</i>, u které panovalo podezření z částečné ztráty karnivorie v důsledku mutualistického (oboustranně výhodná symbióza) vztahu s konkrétním druhem netopýrů (<i>Kerivoula hardwickii</i>). Ukázalo se, že enzymatická aktivita tučnic nejsou řízeny jasmonátovou signální dráhou a že karnivorie u <i>Nepenthes hemsleyana</i> zůstává i přes mutualistický stav zachována.</p>
Klíčová slova	Masožravé rostliny, <i>Pinguicula</i> , <i>Nepenthes</i> , jasmonátová signální dráha, trávící enzymy, enzymatické aktivity, alternativní zdroje kořisti, <i>Nepenthes hemsleyana</i>
Počet stran	79
Počet stran příloh	19
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's name and surname	Mgr. Ondřej Kocáb
Title	Regulation of enzymatic activities in carnivorous plants
Thesis type	Doctoral
Department	Department of Biophysics
Supervisor	Doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.
Year of presentation	2021
Abstract	Jasmonate signalling pathway plays a key-role in enzyme synthetization of carnivorous plants traps, which are responsible for digesting of trapped prey. The type of digestive enzymes and carnivory-regulating pathway can be different due to lifestyle of carnivorous plant species. This thesis contains two related themes. The first of them is focused on the unknown mechanism of enzymatic activity regulation in butterwort (<i>Pinguicula</i>) from order Lamiales. The second part of this work looks closer on enzymatic activity in digestive fluid of <i>Nepenthes hemsleyana</i> , which was suspected to have a partial loss of carnivory due to its mutualistic (mutually beneficial symbiosis) relationship with a specific kind of bats (<i>Kerivoula hardwickii</i>). Our results show no jasmonate signalling pathway effect in butterwort enzymatic activities and no effect of <i>Nepenthes hemsleyana</i> mutualism on carnivory of this plant.
Keywords	Carnivorous plants, <i>Pinguicula</i> , <i>Nepenthes</i> , jasmonate signalling pathway, digestive enzymes, enzymatic activities, alternative source of prey, <i>Nepenthes hemsleyana</i>
Number of pages	79
Pages of Appendices	19
Language	Czech

OBSAH

Poděkování.....	6
Seznam užitých zkratk.....	7
Seznam publikací.....	8
1. Úvod.....	9
2. Masožravé rostliny.....	11
2.1. Jasmonátová signální dráha.....	14
2.2. Enzymy masožravých rostlin.....	21
2.3. Kořist masožravých rostlin.....	26
2.4. Cíle práce.....	29
3. Regulace enzymatických aktivit tučnic.....	30
3.1. Materiál a metody.....	32
3.2. Výsledky.....	37
3.3. Diskuze.....	44
4. Vliv potravních strategií láčkovek na aktivitu enzymů.....	47
4.1. Materiál a metody.....	51
4.2. Výsledky.....	55
4.3. Diskuze.....	62
5. Závěr.....	64
6. Citace.....	65
7. Publikované články (přílohy).....	79

Poděkování

Tvůrčí činnost se nikdy neodehrává v sociálním vakuu. Věda i psaní jsou náročnými řemesly, vyžadující mnoho úsilí, času a energie. Proto mi nyní dovozte, abych nejprve poděkoval všem, kteří mi tím či oním způsobem pomohli tuto dizertační práci dovést do zdárného konce.

Mé největší díky si zaslouží Andrej Pavlovič, který na mě jakožto můj školitel po celou dobu dohlížel, pomáhal a radil mi, byl na mě hodný (podle mého soudu více, než bych si zasloužil) a směřoval mé studium ke zdárnému konci. Bez jeho přičinění bych nejenže nestudoval tak zajímavé téma (kterým masožravé rostliny nepochybně jsou), ale pravděpodobně bych své studium z vlastního rozhodnutí i předčasně ukončil. Ještě jednou díky!

Dále se sluší poděkovat všem, kteří mi pomohli při zvládnutí experimentální části či získali data pro mě nedosažitelná. Jmenovitě si poděkování zaslouží Lukáš Nosek, který mě již v předchozích částech studia zasvětil do tajů elektroforézy. Dále děkuji Janě Jakšové, která stanovila hladiny fytohormonů u tučnic a kolegiálně se mnou sdílela studijní i vědecké poznatky. Mé díky si zaslouží Boris Bokor, který mi velmi pomohl s qPCR a díky jehož přičinění jsem se podíval do zahraničí. Dík patří i mnoha dalším zainteresovaným tvářím, zejména spřízněným biochemikům (kteří zpracovali data pro hmotnostní spektroskopii).

Krom samotného experimentování a zpracovávání výsledků si vždy velmi cením psychické podpory. Rád bych poděkoval Tereze Štenclové, že mi v temných časech byla oporou; dále Petře Čechové, která po ní tuto štafetu převzala. Udělaly jste ze mě (ne)nesitelnějšího člověka.

Pak jsou tu specifické záležitosti. Děkuji Hance Crlíkové za trpělivost, kterou s mým krajně zmateným já měla při řešení řady studijních nejasností. Děkuji své osvědčené korektorce Katce Cukrové, že se i v časovém presu podívala na odborný text a vychytala gramatické nedostatky, které jsem opomněl. Děkuji všem svým nápomocným vědeckým kolegům; za jejich pomoc a za to, že během uplynulých let snášeli mou tvrdohlavost, samomluvu, vtipy i depresivní stavy.

Děkuji své rodině, že respektuje má rozhodnutí. Děkuji české autorské komunitě a svým čtenářům, že trpělivě počkali, až studium ukončím. Děkuji všem, na které jsem snad nějakým nedopatřením zapomněl. A děkuji i tobě, čtenáři – bez tebe by tento text postrádal smysl.

Vědu uchovám ve svém srdci, ale nyní je čas pokračovat dál...

Seznam užitých zkratek (abecedně)

- 12-OH-JA – kyselina 12-hydroxyjasmonátová
- ABA – kyselina abscisová
- AMT1 – ammonium transporter 1
- AP – akční potenciál/y
- BSA – hovězí sérový albumin
- cis*-OPDA – kyselina *cis*-(+)-12-oxofytodienová
- COI1 – CORONATINE INSENSITIVE1
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- DNázy – deoxyribonukleázy
- DTT - dithiotreitol
- EDTA – kyselina edetová
- GH – glykosidické hydrolázy
- GH18 – glykosidické hydrolázy z rodiny 18
- GH 19 – glykosidické hydrolázy z rodiny 19
- Ia – chitináza I s C-koncem
- IAA – kyselina indol-3-octová
- Ib – chitináza I bez C-konce
- JA – kyselina jasmonová
- JA-Ile – konjugát isoleucinu s kyselinou jasmonovou
- JAZ – JASMONATE ZIM-DOMAIN
- mRNA – messenger RNA
- MS – hmotnostní spektrometrie
- NAP – nepenthesin type aspartate protease
- PAR – fotosynteticky aktivní záření
- qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce
- RNA – ribonukleová kyselina
- RNáza – ribonukleáza
- SA – kyselina salicylová
- T_a – annealing temperature; teplota nasednutí primeru
- TBS – Tris-buffered saline
- T2 – ribonukleáza z rodiny 2
- TCA – kyselina trichloroctová

Seznam publikací

Kocáb O, Jakšová J, Novák O, Petřík I, Lenobel R, Chamrád I, Pavlovič A (2020). Jasmonate-independent regulation of digestive enzyme activity in the carnivorous butterwort *Pinguicula x Tina*. *Journal of Experimental Botany* 71: 3749-3758.

Kocáb O, Bačovčinová M, Bokor B, Šebela M, Lenobel R, Schöner CR, Schöner MG, Pavlovič A (2021). Enzyme activities in two sister-species of carnivorous pitcher plants (*Nepenthes*) with contrasting nutrient sequestration strategies. *Plant Physiology and Biochemistry* 161: 113-121.

1. Úvod

Rostlinná říše zůstává pro člověka stále velkou hádankou. Oproti mnoha živočichům se do rostlinného způsobu života a vnímání existence můžeme vcítit jen s krajními obtížemi. I malé dítě ví, že rostliny jsou živé; nicméně rostliny nevydávají zvuky, nepohybují se a většinou od nich nehrozí bezprostřední nebezpečí. Možná proto si celá řada lidí myslí, či namlouvá, že rostlinstvo své okolí nevnímá a nedokáže na něj aktivně reagovat.

Přítom je pro nás, jakožto živočichy přítomnost rostlinstva naprosto esenciální. Stavba domů, nábytek i lidský oděv – to vše by bez rostlin vypadalo zcela jinak. Od romantických gest, od darování růže až po pro živočichy esenciální tvorbu kyslíku, jsou to právě rostliny, které hýbou světem. Koneckonců, i tuto autorovu závěrečnou práci byste si bez existence papíru přečetli jen stěží.

Pro člověka je jedním ze zásadních přínosů rostlin přirozený koloběh života; či lépe řečeno, zakomponování stavebních látek jako dusík, uhlík a dalších prvků do rostlinné biomasy. Živočichové takto dokážou přijímat a zpracovávat hmotu již organického původu; nicméně aby se potřebné látky do jejich potravy dostaly, bez rostlinstva se obejít nelze. Právě zde přichází ke slovu rostliny a jejich jedinečný proces známý jako fotosyntéza, která se u živočichů nevyskytuje.

Fotosyntéza je chemicko-fyzikální reakcí v biologických systémech umožňující za přítomnosti světelného záření a vody přeměnu anorganických látek (energeticky chudých) na energeticky bohaté organické sloučeniny (cukry). Tato reakce probíhá v chloroplastech zelených rostlin, a dále probíhá podobný proces také u řas, sinic či vybraných bakterií (přičemž fotosyntetická dráha zde oproti zeleným rostlinám může být odlišná). Jsou zde takřkajíc zabity dvě mouchy jednou ranou, neboť právě tato reakce je základem pro tvorbu atmosférického kyslíku a tvorbu rostlinné hmoty (obojí živočichové spotřebovávají, ale nedokážou z neživé přírody vytěžit).

Energie získaná rostlinstvem je investována do vývinu a růstu rostlinných orgánů, které lze rozdělit na vegetativní (kořen, stonek, list) či generativní (květ, semena, plody). První jmenované slouží zejména ke vstřebávání a zpracovávání získaných látek, druhé jmenované pro reprodukci a k uskladnění živin pro vznik potomstva rostliny.

V rámci přežití a zachování druhu u rostlin vzniká adaptace na okolní podmínky. Faktory jako přílišná světelná ozáření, nedostatek živin v půdě, vysoká teplota (a mnoho dalších) mohou ovlivnit průběh fotosyntézy či další důležité bioreakce v těle rostliny. Jelikož rostliny jsou svými kořeny pevně ukotveny v zemi a nemohou se před nežádoucími vrtochy přírody

skrýt, vyvinuly si v rámci evoluce celou řadu specifických adaptačních mechanismů.

Kromě hrozeb přicházejících z neživé přírody jsou zde však i jiné rostliny, herbivorní organismy či patogeny (houby, bakterie, viry). Za tímto účelem se u rostlin vyvinula řada obranných mechanismů, jako například trny, jedy či hypersenzitivní reakce. Co víc, rostliny jsou schopny vzájemného dorozumívání, umožňujícího včasné varování rostlin v okolí. U varovaných rostlin jsou pak nastartovány signální dráhy vedoucí k tvorbě příslušných látek. Tato rostlinná komunikace je uskutečňována molekulami uvolňovanými do ovzduší (což však může být nepraktické při nepříznivých povětrnostních podmínkách) či pomocí vzájemně propojeného kořenového systému. Druhému jmenovanému je přezdíváno „rostlinný internet“. Ten v rámci lesů tvoří jakýsi „superorganismus“, skrze který jsou vysílány například živiny či dokonce části genetické informace od starších rostlin k mladším.

Takový je běžný pohled na rostlinstvo – avšak na planetě se vyvinuly rostliny, u nichž byla obrana přetavena v útok a nepřátelé (nejen) z řad živočišné říše začali být požíráni. Důvody vzniku masožravosti u rostlin jsou stále studovány. Masožravých rostlin lze nalézt po celém světě mnoho různých druhů. Studium jejich evoluce a fungování může výrazně napomoci našemu pochopení přizpůsobivosti života, historie vzniku života naší planety a v důsledku i rostlin jako takových.

Tato práce se věnuje vybraným masožravým rostlinám z hlediska regulace jejich enzymatických aktivit. Prvním ze studovaných typů rostlin jsou tučnice (*Pinguicula*), jejichž regulace enzymatických aktivit ani složení enzymů v trávících šťávách doposud nebyla řádně probádána. Druhým předmětem našeho výzkumu se stala rozdílnost dvojice vzájemně příbuzných druhů lácůvek (*Nepenthes*), kde byla u každé z nich odhalena odlišná strategie získání živin. U obou studovaných případů byly studovány regulační mechanismy masožravosti a složení trávících šťáv příslušných rostlin. Abychom se však na tyto rostliny mohli podívat podrobněji, je třeba čtenáři nejprve přiblížit masožravé rostliny a způsob jejich života a fungování z hlediska dosavadních poznatků.

2. Masožravé rostliny

U většiny rostlin jsou živiny získávány skrze kořeny přímo z půdy. Důvod vzniku mixotrofie masožravých rostlin lze tedy odvodit z jejich přirozeného prostředí růstu. Většina může být nalezena v prosluněných krajinách, kde jsou svými kořeny ukotveny v podmáčené půdě nepříliš bohaté na živiny a s trvale nízkým pH. Tyto vnější podmínky jsou rostlinami obvykle vnímány jako stresové faktory, čímž je vytvořen selekční tlak k adaptaci rostliny.

Pro aktivní příjem nezbytných živin (uhlík, dusík, fosfor, aj.) se u masožravých rostlin vyvinuly speciální orgány sloužící k zachycení hmyzu (či jiné drobné kořisti). Tyto orgány nazýváme pasti a během evoluce došlo k jejich vzniku morfologickou i funkční přeměnou listu. V současné době je rozlišováno celkem pět typů pastí: adhezní, gravitační, mechanické, hypotenzní a detektivní (Pavlovič a Saganová, 2015).

Adhezní pasti produkují lepivý sekret na vrcholech např. tentakulí (drobné žláznaté emergence, umožňující vypouštění a vstřebávání látek) nacházejících se na povrchu listu. Hmyz je přilákán vůní či blyštivými kapkami. Při doteku s viskózním lepem rostliny se však kořist nedokáže uvolnit a při těchto marných pokusech dochází k dalšímu kontaktu oběti s rostlinným lepem. Oběť se postupně vysílí a je strávena enzymy vylučovanými rostlinou. Mnohé adhezivní pasti mohou disponovat určitou mírou pomalého pohybu celého listu či samostatných tentakulí, díky čemuž je kořist obklopena větším množstvím trávících šťáv. Typickými rostlinami využívajícími tohoto typu pasti jsou rosnatky (*Drosera*), rosnolist (*Drosophyllum*), byblidy (*Byblis*) či tučnice (*Pinguicula*) (Poppinga *et al.*, 2012).

Gravitační pasti jsou tvořeny převážně nálevkovitými útvary zvanými láčky. Hmyz je přilákán vůní či zbarvením rostliny k ústí láčky, odkud spadne do jejího nitra. Na dně se nachází trávící viskózní tekutina rostliny, skládající se převážně z enzymů a symbiotických mikroorganismů. Pokud by kořist unikla tekutině, je jejímu opuštění láčky bráněno prostřednictvím voskové zóny nebo trichomy v horní části pasti. S touto jednoduchou a efektivní pastí se lze setkat například u láčkovek (*Nepenthes*), cefalotu (*Cephalotus*), darlingtonie (*Darlingtonia*), špirlic (*Sarracenia*) či heliamfor (*Heliophora*) (Bohn a Federle, 2004; Gaume *et al.*, 2004).

Mechanické pasti se sestávají ze dvou protichůdných čepelí, z nichž je každá pokryta několika citlivými výčnělky. Když se kořist dostane mezi čepele a senzor je aktivován jejím pohybem, spustí se signální dráha, díky níž je rostlina připravena na přítomnost potenciální kořisti. Je-li v krátkém časovém intervalu spuštěn další signál, čepele rychlým pohybem kořist sevrou a uvězní. Zatímco se kořist pokouší uniknout, opakovaně je jejím pohybem spouštěna

signální dráha, vedoucí k masožravé reakci. Nejznámějším příkladem je mucholapka podivná (*Dionaea muscipula*), která je endemitem vyskytujícím se výhradně v oblasti Jižní Karolíny, ale například i u nás rostoucí aldrovandka měchýřkatá (*Aldrovanda vesiculosa*) (Volkov *et al.*, 2008).

Hypotenzní pasti jsou drobné měchýřky, využívající vnitřního podtlaku. Jakmile je kořisti aktivován spouštěč pasti, je v reakci odsunuta záklopka a potrava je pod tlakem vcucnuta do nitra váčku, kde následuje trávení. Tato past vyžaduje vlhké či přímo vodní prostředí. Najdeme ji výhradně u bublinek (*Utricularia*) (Adamec, 2012).

Detentivní past je tunelem s protichůdnými chloupky, jimiž je kořisti bráněno, aby při průchodu změnila směr svého putování. Podobně jako u láček je zde hmyz nalákán dovnitř bez možnosti návratu, avšak jeho zachycení v tomto případě není otázkou působení gravitace. Tato past je typická pro genliseje (*Genlisea*) ale třeba i pro špirlici (*Sarracenia psittacine*) (Adamec, 2003).

I přes podobnost jednotlivých typů pastí probíhal vývoj masožravých rostlin po celém světě z genetického hlediska zcela odděleně (Albert *et al.*, 1992; Givnish, 2015; Fleischmann *et al.*, 2018). Tento jev se nazývá konvergentní evoluce. Je jím označován vývin stejných evolučních znaků vznikajících pod podobnými selekčními tlaky nezávisle na sobě. Opakem je evoluce divergentní, při níž namísto k oddělenému směřování ke stejnému znaku, dochází evolučně k rozrůzňování charakteristických znaků. Z tohoto důvodu je řada rostlin s totožným mechanismem lapání kořisti fylogeneticky nepříbuzných (konvergence) anebo se v rámci jedné čeledi střetáváme s různými typy pastí (divergence). (Viz obrázek č.1.)

Vegetativní orgány a jejich funkce zůstaly u masožravých rostlin zachovány. Za výjimku lze považovat kořeny, jejichž schopnost čerpat mikroelementy a makroelementy (zejména dusík, fosfor, draslík) byla zřejmě z větší části převzata právě pastmi (Palfalvi *et al.*, 2020). Kořeny jsou buď částečně nebo úplně redukovány (např. u vodních masožravých rostlin). Zelené části rostlin zůstávají fotosynteticky aktivní a přinášejí rostlině zejména organický uhlík. V případě zelených pastí (listy s tentakulemi, zelené láčky, aj.) zůstává proces fotosyntézy zachován. U nezelených podzemních pastí bublinek a genliseí fotosyntéza absentuje, a proto jsou v rostlinném pletivu obsaženy fotosyntetické proteiny jen ve velmi malém množství, případně vůbec. Je předpokládáno, že primární funkce pastí spočívá v získávání živin z kořisti a proces fotosyntézy je zde tedy utlumen. Na tuto skutečnost může poukazovat i malá koncentrace chlorofylu (pigment hrající roli při záhytu světelného záření při fotosyntéze); jeho nedostatek způsobuje zbarvení do červena, signalizující převládající roli antokyanů ve vábení kořisti (Pavlovič a Saganová, 2015).

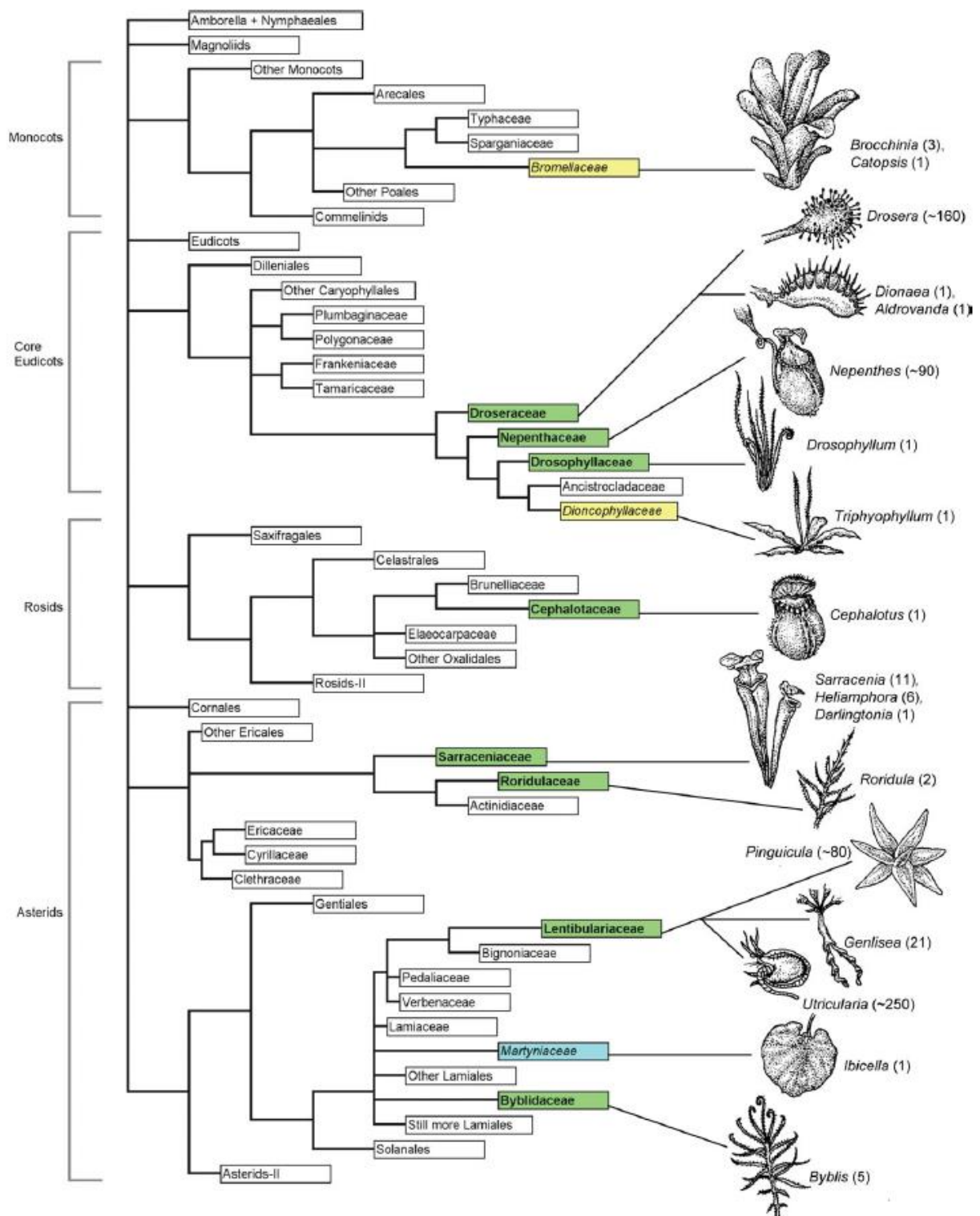
Schopnost rostlinné masožravosti v sobě zahrnuje schopnost aktivního lákání, zachycení a trávení kořisti; a to takovým způsobem, aby rostlina vstřebala z mrtvé kořisti živiny pro svůj růst či reprodukci. Takto je možno rostlinnou masožravost odlišit od běžných obranných mechanismů rostlin (Pavlovič a Saganová, 2015).

Lákání kořisti je obvykle zprostředkováno skrze výrazné zbarvení pastí, případně díky produkci vosků odrážejících světelné záření v oblasti viditelného spektra hmyzu. Další strategie spočívá v uvolňování vůní, případně může být vábničkou i samotný pach rozkládající se kořisti. V neposlední řadě může být rostlinou produkován cukernatý nektar, kterým je váben nejen hmyz, ale v některých případech i drobní savci. Ve speciálních případech může sloužit jako lákadlo i specifický tvar pastí (Schaefer a Ruxton, 2008; Jürgens *et al.*, 2009; Bennett a Ellison, 2009).

Jak již bylo zmíněno výše, k lapení kořisti je využívána celá řada pastí. Aby však nedocházelo k neefektivnímu plýtvání energií, musí být masožravost v reakci na kořist řízena. Za tímto účelem pastí samotné obsahují autoregulační systém, který signalizuje přítomnost kořisti a aktivuje (či udržuje) signální dráhy vedoucí k masožravému chování rostliny (Böhm *et al.*, 2016; Higashi *et al.*, 1993).

V epitelu pastí jsou umístěny na příslušných místech žlázy sloužící k vypouštění rostlinných enzymů sloužících k rozkladu kořisti. Získané živiny jsou absorbovány skrze přenašeče nebo endocytózou v oblasti trávících žláz (Adlassnig *et al.*, 2012; Schulze *et al.*, 1999). Rostlinné enzymy umožňující trávit kořist jsou převzaty od obranných mechanismů rostliny (Pavlovič a Mithöfer, 2019).

O regulaci enzymatické aktivity, rostlinných trávících enzymech a adaptaci na různé druhy kořisti je pojednáváno v následujících třech podkapitolách.



Obrázek č. 1: Fylogenetický strom znázorňující pozici rodů masožravých rostlin vůči jiným rodům. Jde o ukázkou konvergentní evoluce, kdy byl stejný typ pasti vyvinut u mnoha rodů nezávisle na sobě bez genetické příbuznosti; případně naopak divergentní evoluce s různými druhy pastí v rámci jedné čeledi. Výlučně masožravé čeledi masožravých rostlin jsou zvýrazněny zeleně, v případě zastoupení masožravosti jedním či dvěma členy čeledi žlutě a podezřením na masožravost u jednoho ze členů čeledi je vyznačeno modře (Obrázek převzat z Ellison a Gotelli, 2009.)

2.1. Jasmonátová signální dráha

I přes odlišnosti jednotlivých typů pastí se ukazuje, že obecný princip regulace masožravosti je u lépe probádaných rodů masožravých rostlin (*Dionaea*, *Drosera* a *Nepenthes*) založen na jasmonátové signální dráze. Jasmonáty patří mezi rostlinné hormony hrající roli zejména při obranných mechanismech rostlin. Tím jsou myšleny případy mechanického poškození (např. napadení herbivorem), přítomnosti fytopatogenů či obecně působení stresorů na rostlinu. Chemicky jde o krátké řetězce alkylycyklopentenonových a alkylycyklopentanonových karboxylátů, jejichž biosyntéza vychází z kyseliny linolenové. Pod výraz jasmonáty je zahrnuta kyselina jasmonová (JA) a její deriváty, mezi které patří například konjugát isoleucinu s kyselinou jasmonovou (JA-Ile), kyselina *cis*-(+)-12-oxofytodienová (*cis*-OPDA) či kyselina 12-hydroxyjasmonátová (12-OH-JA, Creelman a Mullet, 1997; Schaller *et al.*, 2004; Howe, 2010).

Obecný mechanismus působení jasmonátů spočívá v navázání příslušného ligandu k odpovídajícímu receptoru, což vede k aktivaci signální dráhy zodpovídající za transkripci konkrétních genů (a tedy biosyntéze proteinů). Prozatím je však z molekulárního hlediska objasněn pouze regulační mechanismus skrze JA-Ile. Efekt ostatních jasmonátů doposud nebyl zcela probádán. Aktivovaná molekula JA-Ile je navázána na protein CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1), což je signální receptor, kterým je zprostředkována degradace (ubiquitinace) represorů JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ). Odstranění represorů JAZ má za následek umožnění aktivace genové exprese původně blokovaných genů (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2009; Sheard *et al.*, 2010).

Jasmonátová signální dráha je u nemasožravých rostlin aktivována v případě poškození či obrany, u masožravých rostlin také při reakci na přítomnost kořisti (Pavlovič a Saganová, 2015; Bemm *et al.*, 2016; Pavlovič a Mithöfer, 2019). Zahrnuje rychlý i pomalý pohyb listů a sekreci trávících enzymů (Escalante-Pérez *et al.*, 2011; Mithöfer *et al.*, 2014, Krausko *et al.*, 2017). Rostlinou však není rozlišování mezi oběma druhy iniciátorů (obrana, masožravost), jak ukázali Pavlovič *et al.* (2017) a Krausko *et al.* (2017) v případě mucholapky podivné (*Dionaea muscipula*) ani rosnatky kapské (*Drosera capensis*). Bez přítomnosti kořisti jsou však (v závislosti na okolní teplotě, vlhkosti aj.) pasti rodu *Dionaea* přibližně během dne znovu rozevřeny. Obsahují-li však pasti živou kořist, může být tato doba prodloužena až na týden, během něhož je kořist aktivně rozkládána a získané živiny jsou rostlinou absorbovány.

Aktivační stimuly jasmonátové signální dráhy lze dělit na mechanické (po doteku se vytváří akční potenciál) či chemické (proteiny, chitin, NH_4^+) (Pavlovič a Mithöfer, 2019).

Mechanické stimuly jsou typickým spouštěčem u tentakulí rodu *Drosera* či dosud otevřených pastí rodu *Dionaea*. Chemické stimuly jsou charakteristické pro pasivní pasti typu láček rodu *Nepenthes* (Gallie a Cheng, 1997; Yilamujiang *et al.*, 2016; Saganová *et al.*, 2018) či v případě již zachycené kořisti rostlin *Dionaea* či *Drosera* (Libiaková *et al.*, 2014; Bemm *et al.*, 2016; Krausko *et al.*, 2017; Jakšová *et al.*, 2020). Oba druhy stimulů vedou k akumulaci JA-Ile, která je zodpovědná za expresi genů trávících enzymů (Bemm *et al.*, 2016; Yilamujiang *et al.*, 2016; Pavlovič *et al.*, 2017; Jakšová *et al.*, 2020) či sekundárních metabolitů. Graficky je výše popsán znázorněno na obrázku č. 2.

Mechanickou stimulaci lze dobře demonstrovat na cyklu masožravosti pastí mucholapky podivné. Zjednodušeně byl tento mechanismus popsán již výše (kapitola 2.), zde bude rozebrán podrobněji; jeho grafické znázornění se nachází na obrázku č. 3.

Poté, co se kořist dotkne jednoho ze spouštěcích výčnělků v pasti rostliny, dojde k deformaci a stimulaci buněk, vedoucí k otevření iontových kanálů (Procko *et al.*, 2021). U rostlin se jedná konkrétně o ionty draselné (K^+), vápenaté (Ca^{2+}) a chloridové (Cl^-). (Pozn.: u živočichů se jedná o ionty draselné K^+ a sodné Na^+ .) Vzniká receptorový potenciál, který je amplifikací skrze napěťově řízené kanály přetransformován v akční potenciál. Tím je dotyčná past dočasně přepnuta do „módu vyčkávání“, kdy je od pohybující se kořisti očekáván další mechanický stimul. Dojde-li k němu v rozmezí mezi 20 až 30 sekundami, past je vybuzením aditivního akčního potenciálu sklapnuta a kořisti je zabráněno v úniku. Tento mechanismus dvojitého spouštění je ochranou vůči stimulům nepřicházejícím od kořisti, například kapka vody či spadlý list. Je regulován koncentrací intracelulárního vápníku, který rapidně vzroste po první stimulaci, avšak ne natolik dostatečně, aby aktivoval pohyb pasti. Následně jeho koncentrace v průběhu 20-30 sekund (viz výše) klesá k původní hladině, pokud nepřijde druhý stimul, který způsobí překročení prahové hodnoty koncentrace a spustí rychlý pohyb pasti (Suda *et al.*, 2020). Reakce pasti je také ovlivněna teplotou – chladnější teploty mohou způsobovat nižší reaktivitu pastí.

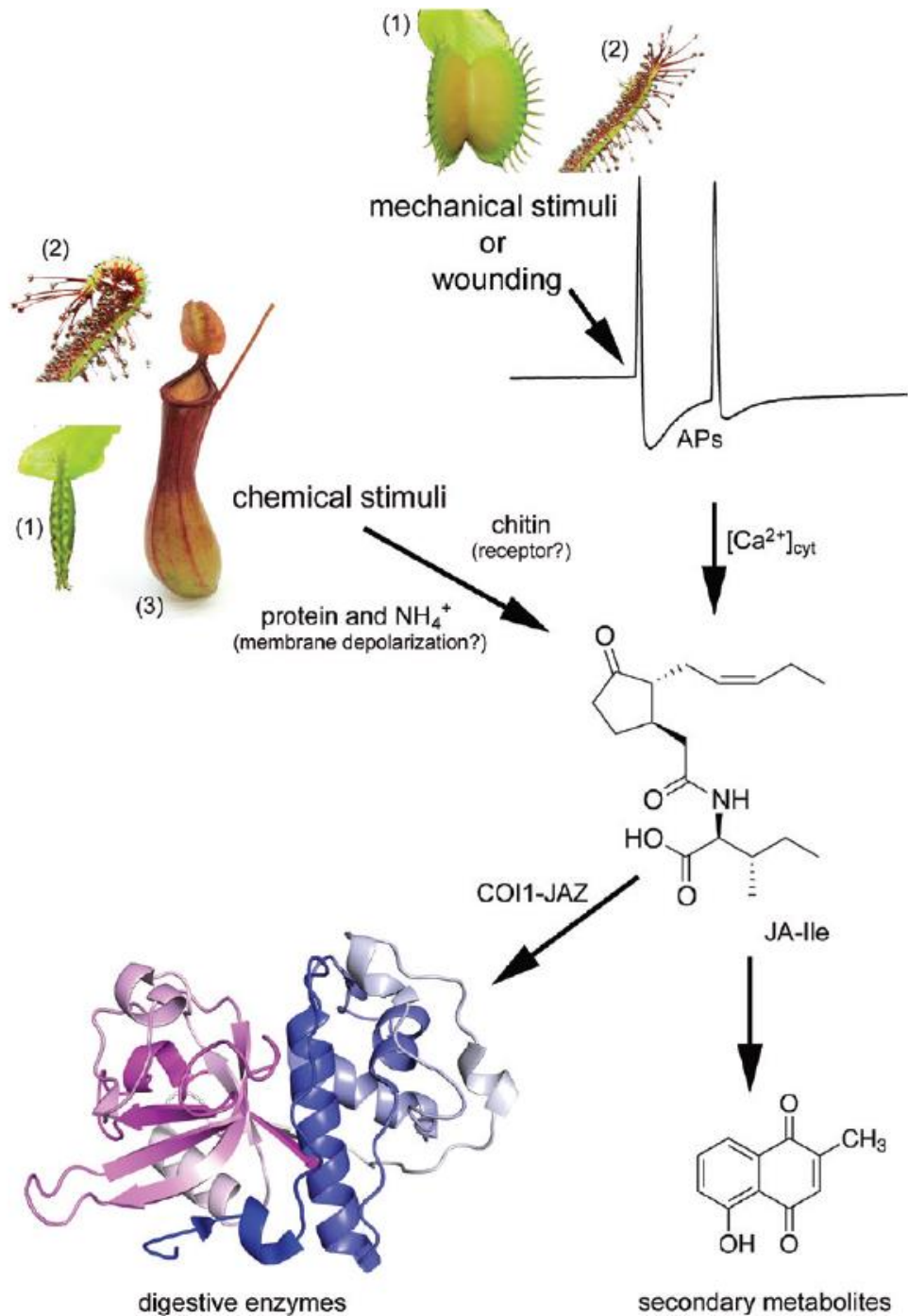
Je-li kořist chycena, jsou jejími pokusy o útěk mechanicky spouštěny další akční potenciály, vedoucí k hermetickému uzavření pasti (tzv. „zelený žaludek“). Souběžně jsou v důsledku těchto stimulací akumulovány jasmonáty, které spouštějí expresi trávících enzymů. Dle velikosti a aktivity polapeného tvora je tak v souladu s množstvím signálu uvolňováno odpovídající množství trávících šťáv a enzymů (Böhm *et al.*, 2016). Jakmile se kořist začne rozkládat, jsou její stavební prvky skrze příslušné přenašeče přenášeny rostlinou do jejího pletiva a využity pro další růst (Adlassnig *et al.*, 2012; Schulze *et al.*, 1999). Po úhynu kořisti nejsou mechanické stimuly nadále buzeny a enzymatická aktivita je regulována na základě

chemických složek získaných z potravy. Jako dominantní regulant se z tohoto hlediska jeví koncentrace proteinů, chitinu a NH_4^+ (Libiaková *et al.*, 2014; Bemm *et al.*, 2016; Jakšová *et al.*, 2020). Zejména v prvopočátcích trávicích procesů je rozkládán také chitin, tvořící exoskelet hmyzu, který však není považován za snadno rozložitelný zdroj dusíku (Pavlovič *et al.*, 2016).

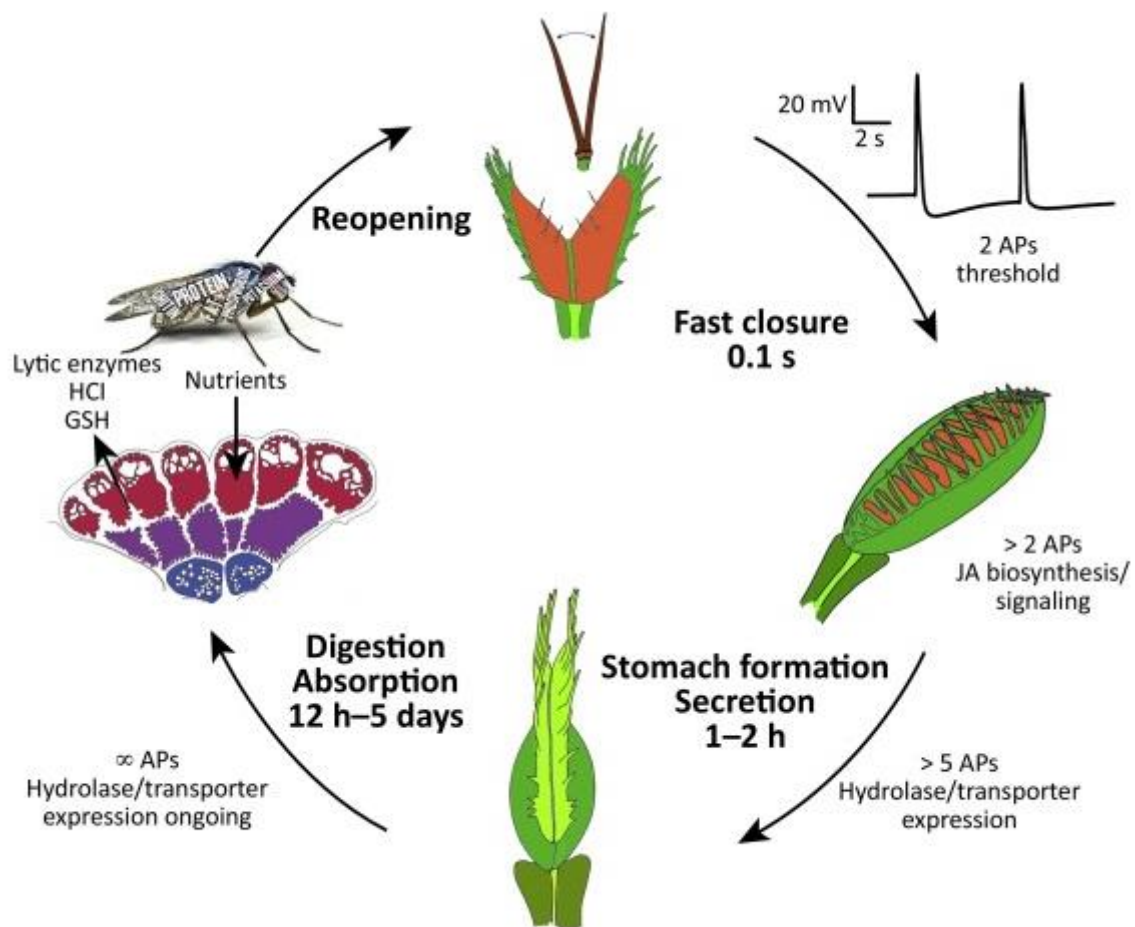
Po vstřebání dostupných látek je past znovu rozevřena. Tento cyklus je u každé pasti zopakován několikrát, až do vyčerpání pasti a jejího odumření. Pokud je past poraněna, zareaguje díky působení jasmonátové signální dráhy podobně jako při záchytu kořisti. To lze považovat za důkaz převzetí rostlinné masožravosti ze signálních mechanismů obrany rostlin. (Pavlovič a Mithöfer, 2019).

Podobným případem, kdy jsou pohybem kořisti vybudeny elektrické signály vedoucí k znehybnění a strávení kořisti vykazuje například i rod *Drosera* (Krausko *et al.*, 2017). Ty jsou schopny svými tentakulemi v blízkosti záchyty potravy pohnout tak, aby byly s kořistí v bližším kontaktu. Tímto je dosaženo zvětšení oblasti rozkladu oběti a příjmu živin.

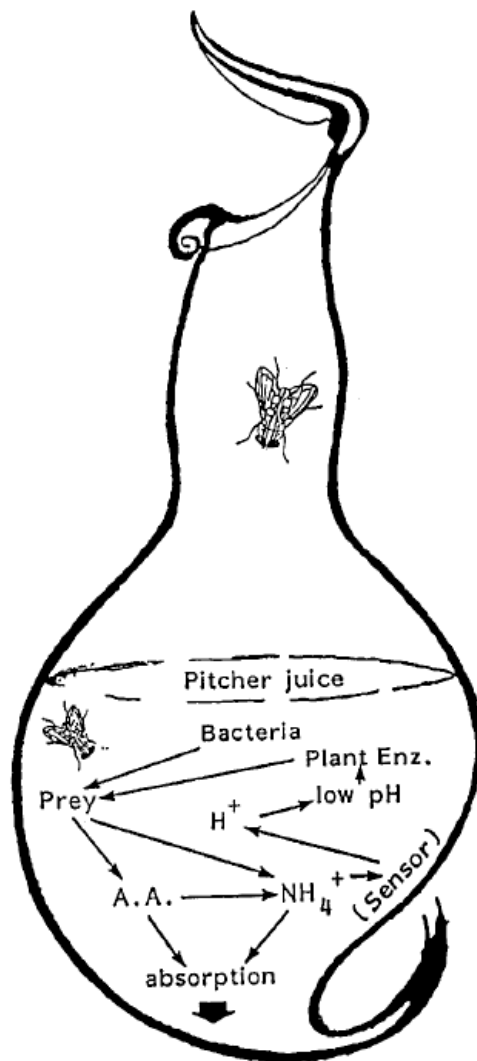
V případě rodu *Nepenthes* je aktivita jasmonátů regulována chemicky skrze přítomnost látek pocházejících z rozkládající se kořisti v trávicí tekutině láčky. Samotný příjem živin však může způsobit depolarizaci membránového potenciálu, což vede k aktivaci jasmonátové signální dráhy (Saganová *et al.*, 2018). Chemické stimuly jsou typicky zprostředkovány skrze proteiny, chitinem či pro rostlinu esenciálním dusíkem, který je z kořisti přijímán ve formě NH_4^+ (Libiaková *et al.*, 2014; Yilamujiang *et al.*, 2016; Saganová *et al.*, 2018). Uvolněný amoniak je vstřebáván skrze přenašeče amoniaku (AMT1) v trávicích žlázách (Schulze *et al.*, 1999). Interakce molekuly amoniaku se stěnami láčky současně dovoluje vpouštět do trávicí tekutiny protony H^+ a okyselovat tak trávicí tekutinu (Higashi *et al.*, 1993; An *et al.*, 2001), čímž je regulována katalytická aktivita uvolňovaných enzymů. Těmi je kořist opětovně rozkládána a celý cyklus se opakuje. Schematický koloběh masožravosti uvnitř láčky je znázorněn na obrázku č. 4.



Obrázek č. 2: Grafické znázornění působení stimulů jasmonátové signální dráhy. Mechanická stimulace (či poškození rostliny) vede ke vzniku akčních potenciálů, jimiž je spuštěna molekulární signalizace. Obdobně je již zachycenou kořistí vyvolávána chemická stimulace (proteiny, chitin, NH₄⁺), vedoucí ke spuštění signální dráhy. Chemicky řízená jasmonátová signální dráha je využívána také v láčkovkách. Výsledným efektem jasmonátů je regulace enzymatické aktivity či tvorba sekundárních metabolitů. (Obrázek převzat z Pavlovič a Mithöfer, 2019.)



Obrázek č. 3: Grafické znázornění cyklu masožravosti pasti mucholapky podivné (*Dionaea muscipula*). V prvním kroku (nahore) se do otevřené pasti dostane kořist a vybudí svým pohybem dva krátce po sobě jdoucí akční potenciály. Rychlým uzavřením pasti je kořist uvězněna a během pár hodin i hermeticky uzavřena za syntézy trávicích enzymů. Kořist je takto na základě stimulace jasmonátové signální dráhy během týdne strávena a živiny z ní rostlina absorbuje ke svému dalšímu růstu a vývoji. Znovuotevřená past pak čeká na další kořist. (Obrázek převzat z Hedrich a Neher, 2018.)



Obrázek č. 4: Schématické znázornění cyklu masožravosti v láčce. Kořist zachycená v trávící tekutině je s pomocí bakteriálních a rostlinných enzymů rozebrána na menší podsložky. Z hlediska regulačních mechanismů jasmonátové signální dráhy hraje klíčovou roli chitin a velmi pravděpodobně i molekula NH_4^+ . Tyto signální molekuly udávají informaci o koncentraci kořisti v pasti a vedou k akumulaci jasmonátů, které regulují množství uvolňovaných trávících enzymů. Současně je regulováno pH v trávící tekutině (skrze kanály propouštějící H^+), čímž je zvyšována či utlumována aktivita přítomných enzymů. (Obrázek převzat z Higashi et al, 1993.)

2.2. Enzymy masožravých rostlin

Jasmonátová signální dráha reguluje tvorbu a uvolňování enzymů masožravých rostlin. Díky hmotnostní spektrometrii jich u různých druhů masožravých rostlin bylo objeveno více než 20, podobných napříč taxony (Eilenberg *et al.*, 2006; Hatano a Hamada, 2008, 2012; Rottloff *et al.*, 2011, 2016; Lee *et al.*, 2016; Fukushima *et al.*, 2017, Krausko *et al.*, 2017). Tyto enzymy jsou většinou odvozeny či převzaty od rostlinných enzymů běžně uplatňovaných při patogenezí. Jedná se tedy o další z důkazů odvození znaků masožravosti z obranných mechanismů rostliny. Koktejl trávících šťáv je rostlinou vylučován skrze specifické žlázy; rozložené stavební prvky z kořisti jsou poté skrze další žlázy absorbovány do rostlinných pletiv (Adlassnig *et al.*, 2012; Schulze *et al.*, 1999).

Při zachycení hmyzí kořisti se trávící šťávy nejprve dostávají do styku s chitinovým exoskeletem hmyzu. K jeho trávení je využívána chitináza, enzym původně sloužící k rozkladu buněčné stěny patogenních hub. Tyto enzymy můžeme rozdělit do dvou rodin glykosidických hydroláz (GH), označovaných jako GH18 s GH19 (dle katalytické domény). Chitinázami jsou hydrolyticky štěpeny β -1,4-glykosidické vazby chitinových řetězců N-acetylglukosaminových oligomerů, z nichž se chitinový řetězec skládá. Chitináza může být dle způsobu štěpení chitinového řetězce dělena na exochitinázu (štěpení vazby na okrajích řetězce) a endochitinázu (štěpení vazby uvnitř řetězce).

Chitináza je dělena do celkem šesti tříd podmiňujících její charakteristické vlastnosti (Athuda *et al.*, 2004; Hatano a Hamada, 2008, 2012; Lee *et al.*, 2016; Rottloff *et al.*, 2016; Wan Zakaria *et al.*, 2019). V trávící tekutině však nemusí být přítomno všech šest tříd; například u rodu *Nepenthes* byly objeveny jen tři třídy chitináz (I, III a IV) (Eilenberg *et al.*, 2006; Rottloff *et al.*, 2011; Ishisaki *et al.*, 2012a,b; Lee *et al.*, 2016).

Chitináza I je složena ze čtyř na sebe navazujících domén: hydrofobního N-konce vázajícího chitin, domény bohaté na cystein (formující disulfidické můstky), variabilní části bohaté na prolin a katalytické oblasti. Dodatečně může být přítomno i prodloužení v podobě C-konce, sloužícího k přenosu proteinu do vakuoly (Renner a Specht, 2012).

Chitinázu I (GH19) lze rozdělit na dvě podtřídy. V první z nich je C-konec přítomen (chitináza Ia), ve druhém nikoliv (chitináza Ib). Jsou-li chitináza Ia a Ib uvolňovány během trávení kořisti, je každá z podtříd distribuována v jiné míře; zatímco chitináza Ia je uvolňována neustále, chitináza Ib je upregulována v reakci na přítomnost chitinu. Chitináza Ia hraje roli při ochraně vůči patogenům, Chitináza Ib i při trávení kořisti (Renner a Specht, 2012). Předpokládá se, že původní chitináza I sloužící při obraně byla duplikována a následně duplikáty byly

neofunkcionalizované na dvě různé funkce (Renner a Specht, 2012). V masožravých rostlinách byla poprvé popsána a charakterizována v masožravé rosnatce *Drosera rotundifolia* (Matušíková *et al.*, 2005), v láčkovce *Nepenthes khasiana* (Eilenberg *et al.*, 2006) a mucholapce *Dionaea muscipula* (Paszota *et al.*, 2014).

Chitináza III (GH18) nemá ve své sekvenci přílišnou podobnost se členy rodiny GH19. Postrádá oblast pro navázání chitinu (Tuppo *et al.*, 2018) a svou strukturou připomíná spíše α/β skládaný list (Ubhayasekera *et al.*, 2009; Funkhouser a Aronson, 2007) nežli α -šroubovici (typická spíše pro třídy chitináz I, II, IV). Největší příbuznost vykazuje s chitinázou V (taktéž GH18) skrze charakteristickou sekvenci DXDXE (Ishisaki *et al.*, 2012a), jinak je ovšem jejich homologie nízká. Členové rodiny GH18 jsou výrazně více rozptýleni mezi různé typy organismů (viry, bakterie, houby, zvířata i rostliny) ve srovnání s členy GH19, které byly objeveny výlučně v rostlinách a některých bakteriích (Funkhouser a Aronson, 2007). V masožravých rostlinách byla poprvé popsána v láčkovce *Nepenthes rafflesiana* (Rottloff *et al.*, 2011) a *Nepenthes alata* (Ishisaki *et al.*, 2012a). Štěpí spíše delší chitinové polymery.

Chitináza IV (GH19) je strukturou podobná chitináze I, ovšem dosahuje menších rozměrů v důsledku delece, která narušuje oblast navazující chitin a katalytickou oblast (Ubhayasekera *et al.*, 2009), což způsobuje kratší a širší katalytický rozštěp. Jejich biologický význam tedy spočívá zejména ve štěpení menších substrátových segmentů. V masožravých rostlinách byla poprvé detekována při *Nepenthes alata* (Hatano a Hamada, 2008; 2012; Ishisaki *et al.*, 2012b).

Natrávením chitinového cytoskeletu je umožněn přístup ke snadněji rozložitelným (a tedy preferovaným) částem kořisti (Pavlovič *et al.*, 2016). Ke štěpení bílkovin jsou využívány zejména proteázy, hydrolyticky rozrušující peptidické vazby mezi aminokyselinami. Proteázy mohou být děleny na exoproteázy (štěpí vazby od konců řetězce) či endoproteázy (štěpí vazby uvnitř řetězce). V masožravých rostlinách hrají úlohu zejména cystein proteázy a aspartát proteázy, serin carboxypeptidázy a prolyl endoproteázy.

Podle toho, která aminokyselina se v aktivním místě enzymu podílí na rozrušení peptidické vazby, se proteázy dělí do několika skupin, od kterých je odvozen i jejich název. Proteázy se obecně vyznačují aktivitou při nižším pH okolního prostředí. Skládají se z jednoho polypeptidového řetězce, který z hlediska 3D struktury nabývá tvaru dvou přibližně symetrických laloků (záhybů). Aktivní místo štěpení se nachází v rozsedlině mezi těmito laloky (Kadek *et al.*, 2014).

Cystein proteáza má ve svém aktivním místě konzervovaný cystein a histidin. Většinou se kovalentně váže na substrát vytvářením dočasné tiolesterové vazby. Tohoto typu proteáz existuje velké množství, které se dělí na několik superrodin a v užším dělení na několik rodin.

V rostlinách se typicky vyskytuje v ovoci (např. papain v papáji a bromelian v ananasu, podílí se na štěpení látek ve vakuolách a dozrávání ovoce), ale i v řadě jiných typů organismů. V masožravých rostlinách plní svou roli v ochraně před patogeny a při trávení kořisti (Butts *et al.*, 2016). Je syntetizována jako zymogen, který se při kyselém pH aktivuje odštěpením propeptidu. Poprvé byla detekována v masožravé mucholapce, kde se nazývá dionain (Takahashi *et al.*, 2011) a v rosnatkách *Drosera indica* (Takahashi *et al.*, 2012), *D. capensis* (Krausko *et al.*, 2017), *D. adelae* (Fukushima *et al.*, 2017), v nichž se nazývá droserain. Krystalovou strukturu a bližší charakterizaci dionainu uskutečnili Risør *et al.* (2016). Výrazná expanze genových rodin kódujících cystein proteázy, které se preferenčně experimentují v pasti bublinek *Utricularia gibba*, indukuje, že tenhle rod masožravých rostlin využívá taky cystein proteázy (Lan *et al.*, 2017).

Aspartát proteáza má ve svém aktivním místě konzervovány dvě kyseliny aspartátové, které napomáhají při štěpení dipeptidových vazeb. Existuje celkem pět superrodin vzniklých nezávisle na sobě a sdílejících štěpící mechanismus. Na rozdíl od cystein proteázy nevytvářejí během štěpícího procesu kovalentní vazbu – jejich interakce se substrátem je pouze jedнокroková (Rao *et al.*, 1998). V případě masožravých rostlin se vyskytla řada specifických aspartát proteáz účinných při trávení kořisti. Prvními objevenými a charakterizovanými aspartát proteázami byly dvě aspartát proteázy z láčkovky *Nepenthes distillatoria* a *Nepenthes gracilis* specificky pojmenovány Nepenthesin I a II (Athauda *et al.*, 2004). Od té doby byly popsány minimálně další čtyři izoformy tohoto enzymu v různých druzích láčkovek: nepenthesin I, II, III, IV, V a VI (Lee *et al.*, 2016; Wan Zakaria *et al.*, 2019). Jsou syntetizovány jako zymogeny, které se při kyselém pH aktivují odštěpením propeptidu. Nepenthesin se od ostatních aspartát proteáz odlišuje specifickým NAP inzertem (*nepenthesin type aspartate protease*) bohatým na aminokyselinu cystein, což mu umožňuje vytvářet v porovnání s např. pepsinem více disulfidických můstků. Athauda *et al.* (2004) uvádí, že právě tenhle NAP inzert je odpovědný za vysokou odolnost vůči zvýšené teplotě či nízkému pH okolního prostředí, než je běžné u klasických aspartát proteáz (Kadek *et al.*, 2014). Podobně se v literatuře lze setkat (Takahashi *et al.*, 2009, 2012, Schulze *et al.*, 2012) s pojmy Dionaeasin, Droserasin či Cephalotusin, které jsou analogickým vyjádřením přítomnosti NAP specifické aspartát proteázy u příslušného typu masožravých rostlin (*Dionaea*, *Drosera*, *Cephalotus*, Fukushima *et al.*, 2017). Díky své vysoké stabilitě a rozdílnému štěpení peptidů (v porovnání s jinými enzymy) už aspartát proteáza nepenthesin našla uplatnění i v protémických studiích (Kadek *et al.*, 2014).

Serin karboxypeptidáza s aminokyselinou serin v aktivním místě enzymu je exoproteáza štěpící peptidy z C-konce proteinu. Poprvé byla identifikována v masožravé mucholapce

(Schultze *et al.*, 2012) a několika různých druhů láčkovek *Nepenthes* (Lee *et al.*, 2016; Rottloff *et al.*, 2016).

Prolyl endoproteáza štěpí peptidickou vazbu na C konci aminokyseliny prolinu a je zatím poslední (teprve nedávno) objevenou proteázou v masožravých rostlinách. Prolyl endoproteáza Neprosin I byla poprvé identifikována v masožravých láčkovkách *Nepenthes ventrata* (Rey *et al.*, 2016; Schröder *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2016) a *Nepenthes rafflesiana* a *Nepenthes ampullaria* (Zulkapli *et al.*, 2021). Ukázalo se, že tento enzym dokáže štěpit lepek a představuje proto potenciální možnost přírodní léčby celiakie (Rey *et al.*, 2016).

Ačkoli chitináza, aspartát proteáza či cystein proteáza se jeví jako klíčové enzymy trávicího procesu masožravých rostlin, ne vždy byla zaznamenána přítomnost všech tří. Například v trávicí tekutině některých druhů láčkovek (*Nepenthes*) nebyla v mnoha případech doposud odhalena cystein proteáza; existují však i opačné případy, například u *Nepenthes ampullaria* (Zulkapli *et al.*, 2021) či *Nepenthes ventricosa* (Stephenson a Hogan, 2006). *Sarracenia purpurea* a *Cephalotus follicularis* se taky při trávení více spoléhají na aspartát proteázu; cystein proteáza zatím u nich detekována nebyla (Fukushima *et al.*, 2017).

V trávicích šťávách bylo analyzováno i mnoho dalších podpůrných enzymů, katalyzujících rozklad dílčích součástí rozkládané kořisti. Jako příklad budiž uvedeny enzymy fosfatáza (odštěpení fosfátové skupiny), peroxidáza (štěpení volných radikálů), nukleáza (štěpení fosfodiesterové vazby nukleových kyselin), fosfolipáza (štěpení fosfolipidů), glukonázy (štěpení polysacharidu glukanu) atd. Tyhle enzymy jsou většinou studovány v menší míře. Jako příklad těchto podpůrných enzymů jsou zde stručně nastíněny enzymy ribonukleáza a glukonáza.

Ribonukleázy (RNázy) jsou nukleázy umožňující štěpení ribonukleových kyselin (RNA). Jde zde o hydrolytické štěpení fosfodiesterových vazeb (tj. dvě esterové vazby propojené skrze fosfor). Existuje mnoho variant tohoto druhu enzymu; z hlediska masožravých rostlin je zajímavá S-RNáza (rodina T2), která se běžně uplatňuje v rostlinách za účelem obrany proti patogenům (zejména virům), stresu při nedostatku fosforu či při senescenci. V trávicí tekutině masožravých rostlin byla poprvé popsána v rosnatce *Drosera adelae*, kde se tento enzym nazývaný S-like RNáza podílí na štěpení RNA z kořisti (Okabe *et al.*, 2005; Arai *et al.*, 2015). Později byla detekována taky v *Dionaea muscipula* a *Cephalotus follicularis*, přičemž regulace její exprese je u různých druhů rozdílná (Nishimura *et al.*, 2013). Existují dvě třídy tohoto enzymu; S-like RNáza I a II, které se liší množstvím intronů (tj. oblastí vystřižených z mRNA při tvorbě proteinu), kde třída I má tři a třída II jich má více (Nishimura *et al.*, 2014). Aktivní místo S-like RNázy sestávají z jádra stabilizovaného dvěma histidiny (Nishimura *et al.*, 2013).

Glukanázy slouží ke štěpení polysacharidu glukanu, který se skládá z několika molekul glukózy. Konkrétně jde o hydrolytické štěpení glukosidických vazeb. V rostlinách sehrávají svou roli v mnoha fyziologických procesech i v obraně vůči biotickým i abiotickým stresům. (Michalko a Matušíková, 2012). V případě trávících šťáv masožravých rostlin se hovoří především o β -1,3-glukanáze (celým svým názvem glukan endo-1,3-glukosidáze, pocházející z rodiny GH17), které katalyzují štěpení 1,3- β -D-glukosidické vazby (Michalko *et al.*, 2013, 2017). Mimo antipatogenní ochranu a trávení hmyzí kořisti tak může jít i o enzym „vegetariánských“ masožravých rostlin, rozkládajících pyl, semena, spory, detrit či další objekty bohaté na glukan. Toto však bylo doposud studováno nepřímo, například krmením tučnic pylem borovic v práci Harder a Zemlin (1968), kdy toto stimulovalo růst a kvetení. Dále se ukazuje, že β -1,3-glukanáza masožravých rostlin svou skladbou spadá mezi glukanázy V (Michalko *et al.*, 2017), avšak k úplnější představě bude třeba dalších studií.

V různých druzích masožravých rostlin se zastoupení jednotlivých enzymů trávící tekutiny může lišit. V některých případech je znám výskyt enzymu specifický pro konkrétní druh masožravých rostlin – jako příklad budiž uvedena amylasa (štěpení škrobu na jednodušší sacharidy) v exudátu listů tučnic (*Pinguicula*) (Heslop-Harrison a Knox, 1971; Kocáb *et al.*, 2020). Mnoho enzymů je naopak stejných napříč mnohými nepříbuznými fylogenetickými skupinami – například aspartát nebo cystein proteáza (Fukushima *et al.*, 2017).

K trávení kořisti mohou přispívat i bakterie či houby z okolního prostředí, které disponují vlastní sadou rozkladných enzymů (Young *et al.*, 2018). Tyto organismy se do pasti dostávají společně s kořistí (viz dále). Zda díky enzymům rostliny či spřízněných organismů budou v prostředí masožravé rostliny katalyzovány reakce s dostatečnou účinností, se odvíjí od pH trávící tekutiny. Aktivita proteáz nabývá nejvyšší účinnost při $\text{pH} < 3$, zatímco aktivita chitináz se blíží maximu při méně kyselém pH (4 až 7).

Rozkladné procesy mohou být usnadněny i prostřednictvím mutualistických savců. Například u láčkovky Lowovy (*Nepenthes lowii*) či u *Nepenthes hemsleyana* přijímá rostlina živočichem již předtrávenou potravu ve formě moči a výkalů, které mohou být rostlinou zpracovány s nižším vynaložením energie. Zachycená močovina není metabolizována v pasti samotné, ale absorbována do rostlinného pletiva, kde je rozložena všeobecně v rostlinách přítomným enzymem ureáza, jenž katalyzuje hydrolytické štěpení močoviny (Yilamujiang *et al.*, 2017). Z toho plyne, že pro rozklad mutualistických výměšků láčka dané rostliny nepotřebuje dodatečné adaptace ke koprofagii.

2.3. Kořist masožravých rostlin

Ačkoli využívaným výrazem „kořist“ je v souvislosti s masožravými rostlinami povětšinou myšlen „hmyz“, poskytuje tato kapitola pro účely práce drobné rozšíření tohoto pojmu.

Jelikož karnivorie masožravých rostlin nahrazuje přísun dusíku z půd chudých na živiny, stala se právě hmyzí kořist ideálním zdrojem dusíku. Hmyz totiž obsahuje několikanásobně vyšší koncentraci dusíku a fosforu než rostlina (Pavlovič *et al.*, 2016). Skutečnost, jak moc je dusík pro rostlinu důležitý, může být reflektována například s fotosyntézou spřízněných proteinů, čímž se pro správný chod rostliny stává tento prvek esenciální. A právě po úspěšném strávení kořisti je dusík z hmyzu inkorporován do fotosyntetického aparátu (Capó-Bauçà *et al.*, 2020). Navzdory výhodnému přeorientování na insektivornímu chování však mimo hmyz u některých rostlin dochází ke specializaci na jiné typy potravy, pravděpodobně v důsledku mezidruhové konkurence, adaptivní radiace a specializace na různé zdroje dusíku v prostředí (Chin *et al.*, 2014). Jedná se zejména o výkaly zvířat či spadený rostlinný materiál. Se změnou stravy navíc souvisí i změny ve složení trávicích šťáv či nejrůznější morfologické změny; ty mohou past učinit pro hmyz méně atraktivní (Moran, 1996; Adam *et al.*, 1997; Clarke, 1997; Moran *et al.*, 2003; Bauer *et al.*, 2011; Chin *et al.*, 2014). Jelikož je však hmyz ve většině případů pro masožravou rostlinu stále nejefektivnějším zdrojem dusíku (Pavlovič *et al.*, 2016), bývají v porovnání s nimi zdroje potravy jako výkaly (cca poloviční obsah dusíku) či rozkládající se listy (cca desetinový obsah dusíku) využívány méně (Pavlovič *et al.*, 2011). Často se také stává, že daná rostlina nezmění své stravovací návyky zcela, nýbrž si částečně ponechá otevřená zadní vrátka pro možnost insektivorie.

Za příklad čistě insektivorní rostliny může být považována například mucholapka podivná (*Dionaea muscipula*). Některé rostliny však vykazují preferenční specializaci i v oblasti hmyzí kořisti. Například láčkovka lemovaná (*Nepenthes albomarginata*) tvoří pod svým obústím trichomy, které se vizuálně jeví jako bílý pás. Ten je atraktivní pro termity rodu *Hospitalitermes*, kteří bílou část považují za lišejník, sloužící tomuto druhu hmyzu jako potrava (Moran *et al.*, 2001; Merbach *et al.*, 2002). Zatímco termiti putují za vidinou potravy, nemalá část končí v lácce a sama se potravou stane (uvádí se, že až 54 % celkového dusíku v listech pochází právě z tohoto jednoho druhu termitů).

Z řad laické veřejnosti je často pokládán dotaz, zda insektivorní rostlina dokáže strávit i pokročilejší živočichy nežli hmyz (myšleno například malé savce či obojživelníky). V některých větších láčkách rodu *Nepenthes* lze skutečně najít roztrávené zbytky obratlovců, avšak jedná se spíše o výjimky. Předpokládá se, že tyto zachycení živočichové byli

handicapování, díky čemuž se nedokázali z pasti osvobodit. Ačkoli je tedy rostlina strávit dokáže, nejsou jejím primárním cílem, neboť rostlina samotná ani nevykládá energii na jejich aktivní lákání do pasti. Příliš velká kořist dokonce může vést k zániku pasti nebo k úhynu části či celé rostliny.

U některých druhů masožravých rostlin je vzhledem k přítomnosti drobných pastí lov většího hmyzu takřka nemožný (Friday, 1991). Mezi masožravé rostliny jsou však řazeny díky lovu menších organismů (zooplankton, roztoči, aj.). Do této kategorie spadá například bublinatka obecná (*Utricularia vulgaris*).

O částečném odklonu od rostlinné karnivorie se dá hovořit například u láčkovky soudečkové (*Nepenthes ampullaria*), která se přizpůsobila zachytávání detritu (tj. odumírajících organických pozůstatků), zejména pak spadených listů. Tvar láčky je soudečkovitý, tenké víčko je odklopené dozadu, aby nebránilo průniku dopadající listové hmoty (Moran *et al.*, 2003; Pavlovič *et al.*, 2011). Mezi další znaky adaptace k převážně saprofágnímu způsobu života (detritivorie) patří redukce retenčních mechanismů (Gaume *et al.*, 2002; Moran *et al.*, 2010), absence nektarových žláz či slabší okyselování trávící tekutiny rostlinou samotnou (Moran *et al.*, 2010; Fleischmann *et al.*, 2018). Změna pH v láčce je způsobena samotným rozkladem opadu a je většinou vyšší než optimální hodnota pro fungování nepenthesinu (Clarke, 1997; Moran *et al.*, 2010, Saganová *et al.*, 2018). Hmota spadená do láčky je do větší míry rozkládána skrze bakterie a houby, uzpůsobené životu v trávící tekutině láčky rostliny. Jelikož však rostlinná hmota nepostačuje k získání dostatečného množství živin (pochází z ní pouze 35 % dusíku vstřebaného do listů), zůstala zde schopnost trávení živočišné kořisti a produkce enzymů zachována (Zulkapli *et al.*, 2021). Výše zmínění rozkladači (bakterie, houby) slouží jako potrava dalším organismům, které se po svém úhynu stávají další složkou potravy láčkovky.

Podle některých teorií (viz kapitola 3) jsou záchyty detritu schopny například i tučnice (*Pinguicula*), které údajně mohou na lepu svých listů zachytit a strávit pylová zrna jiných rostlin. Experimentální přikrmování rostlin *P. lusitanica* pylem borovice vedlo k nárůstu listové hmoty a podpory kvetení (Harder a Zemlin, 1968). Více o této doposud nepříliš probádané rostlině jest popsáno v kapitole 3.1. *Tučnice (Pinguicula)*.

Některé z dalších forem rostlinné masožravosti mohou být spojeny s mutualismem (oboustranně výhodná symbióza) rostliny s živočichem. V některých případech dokonce i s hmyzem samotným, jako je tomu například u láčkovky dvojostruhaté (*Nepenthes bicalcarata*). Ta skýtá úkryt mravencům *Camponotus schmitzi*, zvaných též jako „mravenčí potápěči“. Ti se jednak živí na nektaru produkovaném láčkou, dále také interagují se zachycenou kořistí (Thornham *et al.*, 2012). Ta je buď mravenci odnesena k vlastní konzumaci, nebo je kořist

snažící se o útěk shazována zpět do trávicí tekutiny. Díky tomuto je u tohoto druhu láčkovky redukována například vosková zóna, běžně se vyskytující v horní části láčky. Další profit rostliny pak spočívá v trávení mravenčího trusu, čištění peristomu, odhánění rostlině škodlivého hmyzu (který je mravenci rozeznán) a redukcí parazitických organismů (například komářích larev) v láčce (Bonhomme *et al.*, 2011; Merbach *et al.*, 2007; Scharmann *et al.*, 2013).

Mutualismus však není pouze devízou vztahu rostlina-hmyz. V případě láčkovky Lowovy (*Nepenthes lowii*) je princip oboustranně výhodného soužití možný i v případě savců. Zde dochází k interakci s drobným savcem tana horská (*Tupaia montana*), která rostlinu navštěvuje kvůli cukernatému nektaru v horní části víčka. Zatímco savec okupuje zdroj potravy, jeho moč a výkaly jsou zachytávány do láčky a rozkládány – uvádí se, že 57 % až 100 % dusíku z této potravy končí v listech rostliny (Clarke *et al.*, 2009; Chin *et al.*, 2011; Greenwood *et al.*, 2011). Tato potravní adaptace však způsobila evoluční redukcí insektivorie například ve výrazně nižší atraktivitě pro hmyz, absenci funkčního peristomu, odkloněného víčka (a tím ředění trávicí tekutiny deštěm), malé viskozitě trávicí tekutiny či absence voskové zóny (Clarke *et al.*, 2009). Minimálně u dalších dvou druhů láčkovek (*Nepenthes macrophylla* a *Nepenthes rajah*) se setkáváme se stejnou strategií. *Nepenthes rajah* navštěvuje v nočních hodinách taky větší savec, *Rattus baluensis* (Greenwood *et al.*, 2011), čímž dochází k časové segregaci mutualistických partnerů (*Tupaia montana* navštěvuje *Nepenthes rajah* jen v denních hodinách).

S obdobným koprofágním chováním se lze setkat například u masožravé rostliny *Nepenthes hemsleyana*, u níž se vyvinul mutualistický vztah s drobnými vlněnými netopýry *Kerivoula hardwickii*. Zatímco láčky slouží tomuto druhu netopýrů jako denní úkryt, profit rostliny spočívá v získání netopýřích výměšků bohatých na živiny. Netopýry je tato láčkovka odhalena díky specifickému odrazu zvuku v rámci echolokace (Schöner *et al.*, 2015).



Obrázek č. 5: Vybraní zástupci masožravých rostlin z rodu *Nepenthes* a jejich mutualističtí partneři z řad savců: (A) *Nepenthes lowii* a krmící se *Tupaia montana*, (B) *Nepenthes rajah* a krmící se *Rattus baluensis*, (C) *Nepenthes hemsleyana* a *Kerivoula hardwickii*, nalézající hnízdiště. (Obrázky byly převzaty z internetu a upraveny.)

2.4. Cíle práce

V předchozích kapitolách byl shrnut obecný princip fungování masožravých rostlin z hlediska regulace enzymatických procesů. Následující kapitoly jsou zaměřeny na obeznámení čtenáře s konkrétními studovanými druhy rostlin, které z pohledu výše zmíněných principů budí otázky ohledně regulace enzymatické aktivity. Provedená analýza studovaných rostlin je posléze diskutována více do hloubky. Na konci práce jsou tradičně přiloženy výsledky výzkumu v podobě publikovaných článků.

Za první ze studovaných témat byla zvolena regulace enzymatické aktivity v tučnicích (*Pinguicula*). Ačkoli masožravé chování této rostliny bylo pozorováno již Charlesem Darwinem (popsal ji i ve své knize *Insectivorous plants* z roku 1875), ve vědecké literatuře jí nebylo věnováno tolik pozornosti, jako některým dalším druhům masožravých rostlin (typicky řád hvozdíkotvarých (Caryophyllales)). Ačkoli stavba rostliny i způsob chytání kořisti již v některých starších pracích byla zkoumána, enzymatické složení trávících šťáv a regulace rozkladného procesu doposud nebyly řádně probádány.

Druhým zpracovaným tématem je otázka enzymatické aktivity v láčkách rostliny *Nepenthes hemsleyana*, u níž byl popsán mutualistický vztah s jedním druhem netopýřů *Kerivoula hardwickii*. Tento savec láčky rostliny využívá jako denní úkryt výměnou za netopýří exkrementy a moč, které rostlina využívá jako zdroj živin. Dosud však nebylo známo, jak z hlediska regulace enzymatické aktivity koprofágní chování ovlivnilo původní insektivorii. Pro lepší vzhled a porovnání byla současně studována i typicky insektivorní láčkovka Rafflesova (*Nepenthes rafflesiana*), která je geneticky nejbližším příbuzným rostliny *Nepenthes hemsleyana* (v době psaní textu bez oficiálního českého názvu).

V souhrnu je tedy v této práci zkoumána nepříliš probádaná problematika regulace enzymatických procesů v tučnicích (*Pinguicula*), spadajícího do řádu hluchavkotvarých (*Lamiales*). Dále jsou zkoumány a diskutovány vlivy různých zdrojů dusíku u insektivorní (*Nepenthes rafflesiana*) a koprofágní (*Nepenthes hemsleyana*) masožravé rostliny na enzymatickou aktivitu obou rostlin při krmení charakteristickým druhem potravy.

3. Regulace enzymatických aktivit tučnic

Tučnice (*Pinguicula*) jsou masožravé rostliny z řádu hluchavkotvarých (*Lamiales*). Stejně jako ostatní masožravé rostliny vyrůstají tučnice v podmáčených půdách s nedostatkem živin či rašeliništích. Rozšířeny jsou až na výjimky po celém světě, v Česku se lze setkat se dvěma druhy: tučnicí obecnou (*Pinguicula vulgaris*) a tučnicí českou (*Pinguicula bohemica*). U druhé jmenované ovšem panuje spor, zda ji lze považovat za samostatně vyvinutý druh nebo pouze lokální poddruh tučnice obecné (Studnicka a Hejny, 1992).

Tučnice jsou tvořeny různými zelenými listy vejčitého až elipsovitého tvaru. Kořeny jsou nevětvené, sloužící zejména pro ukotvení rostliny v půdě. Rostlina tvoří dlouhé stopky s květy nafialovělé barvy. Tučnice vyskytující se v teplých oblastech jsou aktivní celoročně, naopak tučnice rostoucí v sezónních pásmech po příchodu chladnějšího klimatu dočasně přestávají být masožravé a vytváří přezimující pupeny (hibernakula, např. naše tučnice obecná). Třetí skupina tučnic (tzv. mexické tučnice) se v přírodě setkává s výrazně suchým obdobím, a proto jejich listy v tomto období získávají sukulentní charakter bez tvorby masožravých struktur (Legendre, 2000).

Na listech i stopce květu se nacházejí dva typy žláz. První stopkatý typ (ang. *stalked glands*) se nachází na vyvýšených žlázách, které na své špičce nesou kapky viskózního lepu, viditelné pouhým okem. Druhý přisedlý typ žláz (ang. *sessile glands*) je přisedlý v povrchu listu a vyplavuje trávicí šťávy po záchytu kořisti (Heslop-Harrison a Knox, 1971; Heslop-Harrison a Heslop-Harrison, 1980, 1981; Legendre, 2000; Heslop-Harrison, 2004). Lep v této adhezni pasti však není natolik silný jako například u rosnatek, a proto je lapená kořist spíše drobnějšího charakteru. Některé druhy tučnic v reakci na lapenou kořist ohýbají okraje listu vzhůru, čímž vzniká malý „bazének“ trávicích šťáv (Darwin, 1875; Fleischmann a Rocca, 2018).

Zajímavým úkazem se jeví přítomnost enzymu amyláza, katalyzujícího štěpení škrobu. Ukázalo se, že amyláza se vyskytuje zejména v trávicích šťávách žlázek. Na základě tohoto vznikla teorie o možném záchytu a trávení pylových zrn, která však doposud nebyla prokázána. Mezi další nalezené enzymy patří proteázy, nukleázy, fosfatázy a další (Heslop-Harrison a Knox, 1971; Kocáb *et al.*, 2020).

V literatuře se objevuje určitý rozpor ohledně toho, jestli jde o žlázy holokrinní nebo merokrinní. Podle jedné z teorií jsou žlázy pouze jednorázové (holokrinní), tedy jde o váčky naplněné předsyntetizovanými enzymy (Heslop-Harrison a Knox, 1971; Heslop-Harrison a Heslop-Harrison, 1980). Po záchytu kořisti ihned dojde k rychlému vyplavení chloridových iontů (Cl⁻), což má za následek proudění vody na povrch listu, vyplavující enzymy vstříc kořisti.

Jiné práce (Vassilyev a Muravnik, 1988a,b) však naopak ukazují, že enzymy jsou průběžně syntetizovány po celou dobu trávení kořisti, podobně jako je tomu například u rosnatek či mucholapky podivné (merokrinní).

Tato práce si klade za cíl nahlédnout do hlubin tohoto rozporu a prozkoumat regulaci enzymatické aktivity u tučnice (řád Lamiales) i z pohledu jasmonátové regulace, která byla doposud studována jenom u masožravých rostlin z řádu hvozdíkotvaré (Caryophyllales).



Obrázek č. 6: Tučnice *Pinguicula x Tina*, která se stala předmětem našeho bádání. (A) Vzhled rostliny. (B) Květná stopka nesoucí květ, pokrytý trávíciemi žlázami. (C) List pokrytý stopkatými žlázkami s lepem (stalked glands) a přisedlých žláz (sessile glands).

3.1. Materiál a metody

Pro účely experimentu byl využit hybrid *Pinguicula x Tina* (*Pinguicula agnata* x *Pinguicula zecheri*) vypěstovaný v Gartneretit Lammehave (Ringe, Denmark). Dále byla při našem výzkumu použita *Drosera capensis*. Rostliny byly pěstovány na Oddělení biofyziky na Univerzitě Palackého v Olomouci (Česko) za standartních skleníkových podmínek. Půdou pro pěstování byla vrchovisková rašelina. Samotné rostliny byly zalévány destilovanou vodou (cca 1 až 2 cm výšky plastových květináčů). Před samotným experimentem bylo na růst rostlin dohlíženo ve fytotronu při průměrné teplotě 21,5 °C a ozáření 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR. Perioda světlo-tma byla nastavena na 16/8 hodin.

Jako modelovou kořist jsme využili octomilky (*Drosophila melanogaster*), které byly pěstovány z vajíček v médiu bohatém na sacharidy. Toto bylo poskytnuto Oddělením genetiky na Přírodovědecké fakultě Univerzity Komenského v Bratislavě (Slovensko). Před experimentem byly pro snadnější manipulaci dospělé octomilky po 15 minut zchlazeny v lednici při 4 °C. Na povrch listu nebo stopky květu studované rostliny bylo položeno deset mušek. Po 2 a 24 hodinách bylo od rostliny odděleno 10 kontrolních a 10 krmených listů. Poté byly listy během 3 minut jeden po druhém proplachovány ve 4 ml 50 mM tlumivém roztoku octanu sodného (pH 5) kvůli zisku exudátů. V případě stopek květů byla sesbírána data pouze pro 24hodinový experiment z důvodu sezónního kvetení, a tedy jejich omezeného množství.

V níže zmiňovaném experimentu s jasmonáty byly rostliny sprejovány 1 mM kyseliny jasmonové (JA) nebo 100 μM koronatinem v 0,001% Tweenu 20. Kontrolní rostliny byly sprejovány pouze 0,001% Tweenem 20. Exudáty byly poté sesbírány postupem uvedeným výše. Při tomto experimentu jsme použili rosnatky (*Drosera capensis*) jako pozitivní kontrolu, u níž již odpovídající reakce na externí podání JA byla pozorována (Krausko *et al.*, 2017).

Při experimentu s hypertonickým roztokem NaCl byly na povrch listů aplikovány 20 μl kapky 5% NaCl či destilované vody (jako kontrola). Po 15 minutách byly tyto kapky pipetou sesbírány. (15 minut je dostatečný časový interval pro uvolnění předsyntetizovaných enzymů skrze trávící žlázy a nedostatečný pro syntézu nových enzymů. Řídili jsme se zkušenostmi z experimentů s *Dionaea muscipula* (Jakšová *et al.*, 2020; Pavlovič *et al.*, 2020).

U dat v následující kapitole jsou hodnoty uváděny se směrodatnými odchylkami. Ke zhodnocení významnosti rozdílů mezi kontrolami a ovlivněnými rostlinami bylo užito dvoustranného Studentova t-testu (Origin 2015, Northampton, MA, USA). Před započítáním statistického testu jsme data analyzovali z hlediska normality a homogenity rozptylu. V případě zjištěných nehomogenit byl použit Welchův t-test.

3.1.1. Extracelulární záznam elektrického signálu

Změny v povrchovém potenciálu byly měřeny s užitím nepolarizovatelných povrchových Ag-AgCl elektrod (Scanlab Systems, Praha, Česko) zvlhčených kapkou vodivého EV gelu (Hellada, Praha, Česko), běžně užívaného v elektrokardiografii. Elektroda byla připojena k abaxiální straně listu, a to buď pod aplikovanou kořist, nebo 1 cm od jednorázového poškození pletiva jehlou. Elektrické signály byly zaznamenány neinvazivním zařízením ve Faradayově kleci dle Ilík *et al.* (2010). Srovnávací elektroda byla připojena na okraj plastového květináče s rostlinou, stojícího zhruba v 1,5 cm destilované vody. Elektrody byly připojeny k zesilovači (zesílení 1 až 1000, šum 2 až 3 μV , šířka pásma (-3 dB) 10^5 Hz, doba odezvy 10 μs , vstupní impedance 10^{12} Ω). Signály ze zesilovače byly přeneseny analogově digitálním převodníkem (8 analogových vstupů, 12bitový konvertor, ± 10 V, PCA-7228AL, dodáno od TEDIA, Plzeň, Česko) do PC. Ke sběru dat docházelo každých 6 ms.

3.1.2. Měření enzymatických aktivit

Proteolytická aktivita trávicích šťáv byla měřena inkubací 150 μl sesbíraného vzorku trávicí tekutiny a 150 μl 2% (w/v) albuminu hovězího sérového v 200 mM glycinu-HCl (pH 3) za teploty 37 $^{\circ}\text{C}$ po 2 hodiny. Reakce byla zastavena přidáním 450 μl 5% (w/v) trichloroctové kyseliny (TCA). Vzorky byly deset minut inkubovány v ledu; poté byly deset minut centrifugovány při 20 000 g při teplotě 4 $^{\circ}\text{C}$. Nevysrážené peptidy poté byly užity k měření proteolytické aktivity. Ta byla dána srovnáním absorbance supernatantu a blanku při 280 nm pomocí dvojpaprskového spektrofotometru Specord 250 Plus (Analytik Jena). Jednotka proteolytické aktivity je definována jako vzrůst absorbance o 0,001 za minutu při 280 nm (Matušíková *et al.*, 2005).

K určení aktivity kyselých fosfatáz jsme použili 5 mM 4-nitrofenylfosfát (Sigma-Aldrich) v 50 mM acetátovém pufru (pH 5). Do 500 μl acetátového pufru bylo přidáno 50 μl sesbíraných trávicích tekutin; tento roztok byl pak smísen s 400 μl substrátu. Jako kontrola pak bylo použito 550 μl acetátového pufru s 400 μl substrátu. Směs poté byla inkubována při 25 $^{\circ}\text{C}$ po 2 hodiny. K zastavení reakce bylo přidáno 160 μl 1 M NaOH. Absorbance byla měřena při 410 nm pomocí dvojpaprskového spektrofotometru Specord 250 Plus (Analytik Jena). Kalibrační křivka byla stanovena s pomocí 4-nitrofenolu a aktivita byla vyjádřena v $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

Amylázová aktivita byla měřena použitím amylázového kitu (Sigma-Aldrich). Jako substrát byl použit ethylden-pNP-G7. Do 96-jamkové titrační destičky bylo napipetováno 20 μl a doplněno do 50 μl amylázovým kitem. Následovalo přidání 100 μl výše zmíněného substrátu a inkubace při 25 $^{\circ}\text{C}$. Po dvě hodiny byla v intervalu 15 minut měřena absorbance při

405 nm pomocí destičkové čtečky SynergyMx (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Jako pozitivní kontrola byl použit enzym amyláza. Dále byl použit 4-nitrofenylový standard v různých koncentracích jako kalibrační řada. Pozitivní kontrola i kalibrační řada byly na titrační destičce inkubovány za stejných podmínek jako zkoumané vzorky.

V případě měření chitinázových aktivit byl využit fluorimetrický chitinázový kit na testování (Sigma-Aldrich). Použili jsme 4-methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glukosaminid, 4-methylumbelliferyl N,N'-diacetyl- β -D-chitobiosid, 4-methylumbelliferyl β -D-N,N',N''-triacetylchitotrióza k určení aktivity exochitinázy, chitobiosidázy a endochitinázy (pořadí látek zde seřazujeme s pořadím enzymů). Substrátový pracovní roztok v objemu 90 μ l byl smíchán s 10 μ l sesbírané trávící tekutiny v 96jamkové fluorescenční titrační destičce. Tento mix byl po 2 hodiny inkubován při 37 °C a poté zastaven příměsí 200 μ l uhličitanu sodného dodaného v testovací soupravě. Fluorescence uvolňovaného 4-methylumbelliferonu byla měřena v zásaditém pH s užitím destičkové čtečky Synergy Mx (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). K pozitivní kontrole byla použita již izolovaná chitináza z *Trichoderma viride*. Dále byla také napipetována 4-methylumbelliferon v rozdílných koncentracích jako kalibrační řada. Pozitivní kontrola i kalibrační řada byly na fluorescenční titrační destičce inkubovány za stejných podmínek jako zkoumané vzorky.

Všechny enzymové aktivity byly měřeny na souhrnném materiálu z deseti listů ze tří rostlin, aby byly získány dostatečně koncentrované vzorky v limitu detekce.

3.1.3. SDS-PAGE elektroforéza

Trávící tekutina sesbíraná pro testování enzymatické aktivity byla analyzována SDS-PAGE. Zkoumané vzorky byly nejprve zahřáty (denaturovány) při 70 °C. Následně byly smíchány s modifikovaným Laemmliho vzorkovým tlumivým roztokem (50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 10% glycerol, 1% β -merkapt ethanol, 12,5 mM EDTA a 0,02% bromfenylové modři). Do jamek v 10% (v/v) SDS-polyakrylamidovém gelu (Schägger, 2006) byl vždy napipetován stejný objem daného typu vzorku. Proteiny byly zviditelněny pomocí citlivého barvení stříbrem (ProteoSilver; Sigma-Aldrich).

3.1.4. Proteomická analýza trávící tekutiny

Čerstvě sesbírané trávící šťávy z krmených rostlin byly rozděleny do 1 ml alikvot, které byly následně zmrazeny v tekutém dusíku a přes noc lyofilizovány. Suchá rezidua (popsáno pro obsah jedné alikvoty) byla doplněna do 100 μ l pomocí 10x cOmpleteTM Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Švýcarsko) v 100 mM NaCl. Poté byly proteiny vysráženy s užitím

TCA/Acetonové metody. Vzorek byl důkladně promíchán s osmi díly ledově vychlazeného acetonu a jedním dílem TCA; výsledný roztok byl poté 1 hodinu udržován v prostředí o teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Proteinový pelet byl znovuzískán pomocí centrifugace při $20\ 000\ \text{g}$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, s dobou centrifugace 10 minut. Následně byl dvakrát vypláchnut dvěma díly ledově vychlazeného acetonu (Kim *et al.*, 2006), rozpuštěn v Laemmliho vzorkovém tlumivém roztoku a separován pomocí SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Rozlišené proteiny byly obarveny pomocí koloidního Coomassie (Candiano *et al.*, 2004) a rozštěpeny v gelu s využitím rafinózou-modifikovaného trypsinu (Šebela *et al.*, 2006), jak je popsáno v práci Shevchenko *et al.* (2006). Peptidy byly očištěny na podomácku vyrobeném C18 StageTips (Rappsilber *et al.*, 2007). Následná analýza pomocí hmotnostní spektrometrie byla provedena na tandemovém hmotnostním spektrometru UHR-QTOF maXis (Bruker Daltonik, Bremen, Německo), spárovaném se systémem „nanoflow“ kapilární kapalinové chromatografie RSLCnano (Dionex, Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA) skrze online zdroj nanoESI (Bruker Daltonik, Bremen, Německo). Specifické nastavení chromatografického systému a analyzátoru hmotnosti byly identické s těmi, jež jsou popsány v Simerský *et al.* (2017).

Získaná data z hmotnostního spektrometru byla zpracována buď pomocí klasického hledání ve vybrané databázi MASCOT, nebo podrobena sekvencování *de novo*. V prvním případě byl prekurzor a fragmentační data extrahovány z nezpracovaných dat, využívající DataAnalysis v. 4.3 x64 (Bruker Daltonik, Bremen, Německo). Ta byla exportována do souborů MGF a nahrány do Protein Scape v. 2.1 (Bruker Daltonik, Bremen, Německo). Hledání proteinů a peptidů bylo učiněno nasazením algoritmu MASCOT (v2.2.07, in-house server; Matrix Science, London, UK) vůči databázi proteinů specifických pro řád Lamiales (NCBI; 325 526 sekvencí; staženo k 23. říjnu 2017), kterýžto proces byl doplněn běžnými proteinovými kontaminanty. Pro každé hledání skrze MASCOT bylo užito následujících parametrů: tolerance byla nastavena na $\pm 25\ \text{ppm}$ a $\pm 0,03\ \text{kDa}$; trypsin byl navolen jako proteáza a byly povoleny dvě chybějící štěpení; karbamidomethylation cysteinu byl zahrnut jako fixní modifikace; acetylace proteinového N-konce a oxidace methioninu byly navoleny jako variabilní modifikace. Kladně identifikovaný protein musel splňovat následující parametry: obsahovat minimálně jeden peptid se skórem příslušnosti vypočítaným na základě algoritmu MASCOT (mezní skóre požadované pro přiřazené proteiny bylo 25 s P-hodnotou 0,05), a dále překročení mezního skóre proteinu 30.

Pro sekvencování *de novo* bylo k vygenerování plné délky sekvence peptidů z nezpracovaných dat využito algoritmů z DeNovoGUI interface (v1. 16.0; Muth *et al.*, 2014) obsahujícího Novor (Ma, 2015), Direc Tag (Tabb *et al.*, 2008), PePNovo (Frank a Pevzner,

2005) a pNovo (Chi *et al.*, 2010). Byla použita stejná nastavení jako pro hledání v MASCOT (viz výše). K přiřazení všech peptidových sekvencí obdržených *de novo* bylo využito vyhledávání skrze lokální pBLAST vůči sestavenému seznamu proteinů identifikovaných v trávících šťávách všech doposud známých masožravých rostlin. Výstup BLASTu byl filtrován na základě podobnosti s následujícím: seřazení alespoň pěti aminokyselin v řadě, mezní hodnoty celkové identity a pozitivity byly nastaveny na 75 %. Po kontrole kvality peptidového spektra, byly všechny peptidy přiřazené *de novo* považovány za pozitivně identifikované.

3.1.5. Kvantifikace fytohormonů

Listy, na něž byla aplikována kořist či byly poraněny jehlou (10krát až 15krát), byly po 2 a 24 hodinách z rostliny odebrány a ihned zmrazeny v tekutém dusíku. Před započítím analýzy byly uskladněny při teplotě -80 °C. Byly zde kvantifikovány fytohormony JA, JA-Ile, *cis*-OPDA (význam zkratek viz kapitola 2.1.), kyselina abscisová (ABA), kyselina salicylová (SA) a kyselina indol-3-octová (IAA) dle metody popsané v Floková *et al.* (2014).

Obsah fytohormonů byl zjištěn ultra vysoce účinnou kapalinovou chromatografií – elektrosprejovou tandemovou hmotnostní spektrometrií (UPLC-MS/MS) s využitím Acquity UPLC® I-Class Systém (Waters, Milford, MA, USA) vybaveného Acquity UPLC CSH® C₁₈ kolony (100 x 2.1 mm; 1,7 µm; Waters). Současně bylo využito trojitého kvadrupólového hmotnostního spektrometru Xevo™ TQ-S MS vybaveného technikou pro elektrosprejovou ionizaci (Waters MS Technologies, Manchester, UK).

Byla provedena tři nezávislá technická opakování na 5 až 15 biologických replikátech.

3.2. Výsledky

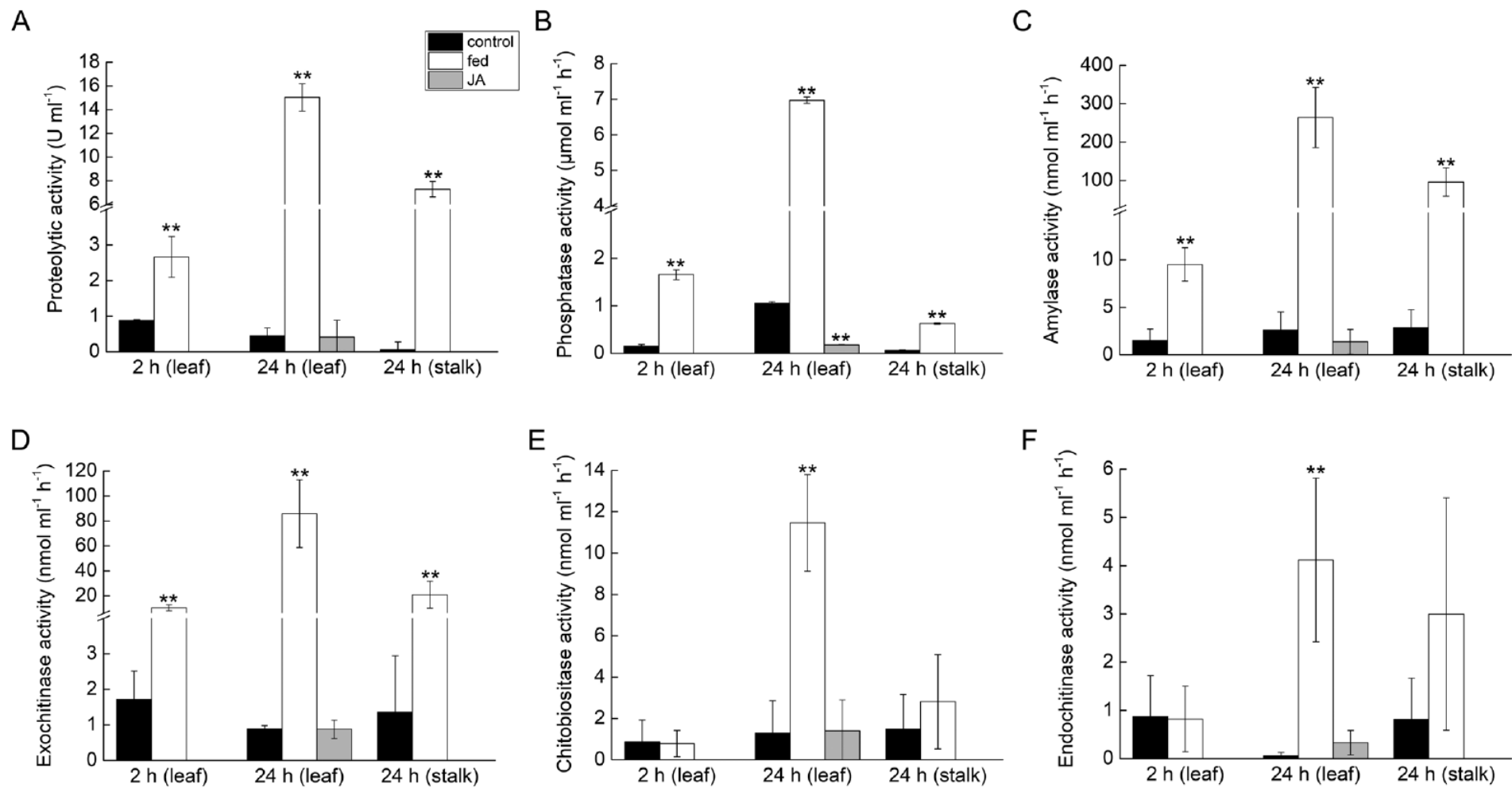
V této kapitole jsou shrnuty výsledky našich experimentů na tučnicích (*Pinguicula x Tina*). Prezentujeme zde výsledky studia elektrické signalizace, enzymové aktivity vybuzené hmyzem a poraněním, a složení trávících šťáv. Dále zde ukážeme, že jasmonáty u tučnic nejsou zodpovědné za aktivaci enzymatických procesů. Nakonec ukážeme, že rychlý výtok kapaliny z listu odpovídá zvýšenému nárůstu fosfatázové aktivity.

Jak ukazuje obrázek č. 7, po aplikaci živé kořisti na list nedošlo během experimentu ke změně elektrického signálu. Na druhou stranu po poškození jehlou se objevil typický variační potenciál (VP). Amplituda tohoto VP je 15 až 50 mV a doba trvání 200 až 400 s.

Na obrázku č. 8 je ukázáno, že aktivity proteáz, fosfatáz, amyláz a exochitináz vzrostly již dvě hodiny po nakrmení (grafy A až D). Po 24 hodinách už výrazně vzrostly aktivity všech studovaných enzymů (grafy A až F). Zajímavým úkazem je nárůst enzymatické aktivity u květné stopky po 24 hodinách. Dále se ukazuje, že externí aplikace JA nemá na zvýšení enzymatické aktivity v listech signifikantnější vliv ani po 24 hodinách.



Obrázek č. 7: Záznam extracelulárního elektrického signálu listů tučnice po aplikaci kořisti (nahore) a po poranění listu jehlou (dole). Šipky označují začátek aplikace příslušného vnějšího stimulu (kořist, poranění). Uvedené záznamy jsou reprezentativní a pocházejí z pěti nezávislých měření.



Obrázek č. 8: Grafy enzymatických aktivit (A) proteáz, (B) fosfatáz, (C) amyláz, (D) exochitináz, (E) chitobiositáz, (F) endochitináz. U každé z nich je zobrazena enzymatická aktivita listů (po 2 a 24 hodinách) a stopky květu (po 24 hodinách). Aktivita u kontrolních rostlin je označena černě, u krmených rostlin bíle a u rostlin s aplikací 1 mM JA šedě. Uvedená data jsou průměrem ± SD (n = 5-6); signifikantní rozdíly mezi kontrolou a krmenými rostlinami (popř. kontrolou a rostlinami ovlivněnými JA) byly znázorněny pomocí Studentova t-testu (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$.

Tabulka č. 1 prezentuje proteinové složení trávicích šťáv. Bylo zde identifikováno 14 proteinů, z toho 8 s katalytickou funkcí. Jmenovitě zde byly nalezeny aspartát proteázy, cystein proteázy, peroxidázy, esterázy/lipázy, endonukleázy a u jiných masožravých rostlin doposud nedetekovaný enzym amyláza.

Na obrázku č. 9 je ukázáno, že hladina JA nevzrůstá po 2 ani 24 hodinách od nakrmení. V reakci na poškození listu jehlou však hladina JA značně vzrostla již po 2 hodinách (A). Podobně tomu bylo i v případě JA-Ile, kde se hladina fytohormonu v reakci na kořist zvýšila jen minoritně, zatímco v reakci na poškození došlo k výraznému nárůstu (B). Prekurzor JA, *cis*-OPDA, neukázal žádné význačné rozdíly mezi krmením a poškozením rostliny (C). U kyseliny abscisové (ABA) je zjevný v případě poškození nárůst po 2 i 24 hodinách, zatímco v případě krmení pouze po 24 hodinách (D). Kyselina salicylová (SA) vykazala u poraněných listů pokles (u krmených listů nedošlo k výraznější změně), a to až po 24 hodinách (E). V případě kyseliny indol-3-octové (IAA) se po aplikaci kořisti nevyskytly důraznější změny (F); analýza poškozených listů selhala, není tedy uvedena.

Abychom ověřili, zda jasmonáty v případě tučnic skutečně nesehrávají úlohu v sekreci enzymů, aplikovali jsme na listy tučnic zevně koronatin (molekulární agonista JA-Ile). Jako kontrolní rostlinu jsme použili rosnatku (*Drosera capensis*), u které je známá regulace tvorby enzymů skrze jasmonátovou signální dráhu (viz teorie). Výsledky jsme shrnuli na obrázku č. 10. Rosnatka ukázala oproti kontrole výrazný nárůst proteolytické (A) i fosfatázové (B) aktivity. Oproti tomu enzymatická aktivita tučnic zůstala po aplikaci koronatinu přibližně na úrovni kontrol.

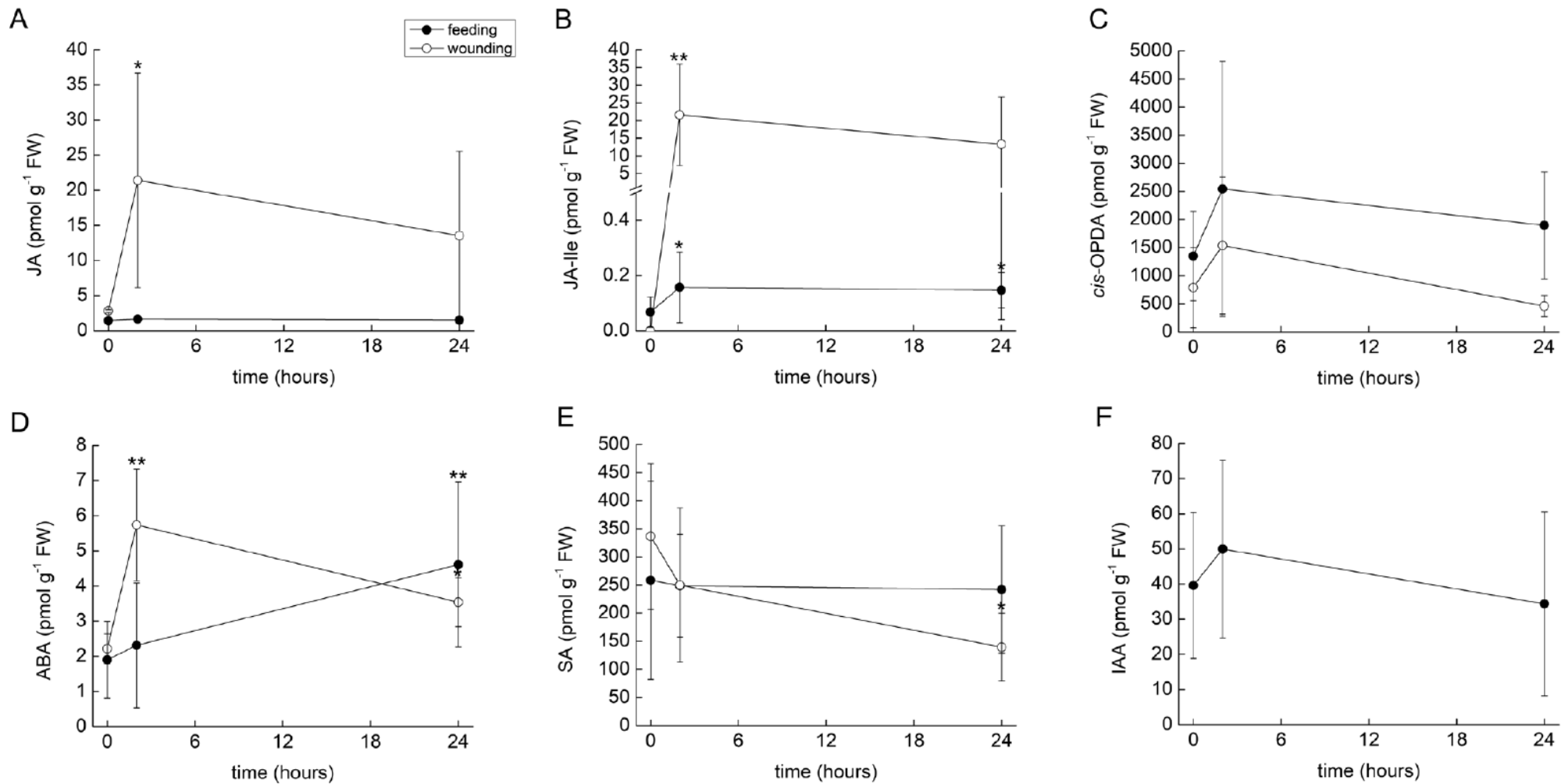
Výsledky v předchozím odstavci popsaného experimentu potvrdila i separace proteinů skrze SDS-PAGE a barvení stříbrem (viz obrázek č. 11). Výsledný snímek jasně implikuje, že JA, ABA ani koronatin neindukují sekreci proteinů, zatímco aplikace kořisti ano.

Výsledky měření enzymatické aktivity po rychlém výtoku vody z trávicích žláz (iniciován hypertonickým 5% roztokem NaCl) se nachází na obrázku č. 12. Proteolytická aktivita se oproti kontrole (destilovaná voda) příliš nezměnila (B), aktivita amyláz a chitobiosidázy nebyla detekována vůbec. Slabého, avšak signifikantně význačného nárůstu aktivit oproti kontrole došlo u exochitináz (D) a endochitináz (E). Výrazný nárůst enzymatické aktivity byl však pozorován u fosfatáz (C). Následná SDS-PAGE a barvení stříbrem (A) tento trend potvrdili a u vzorků trávicích tekutin z listů ovlivněných hypertonickým roztokem se objevil nový zřetelný pás proteinů v oblasti okolo 20 kDa.

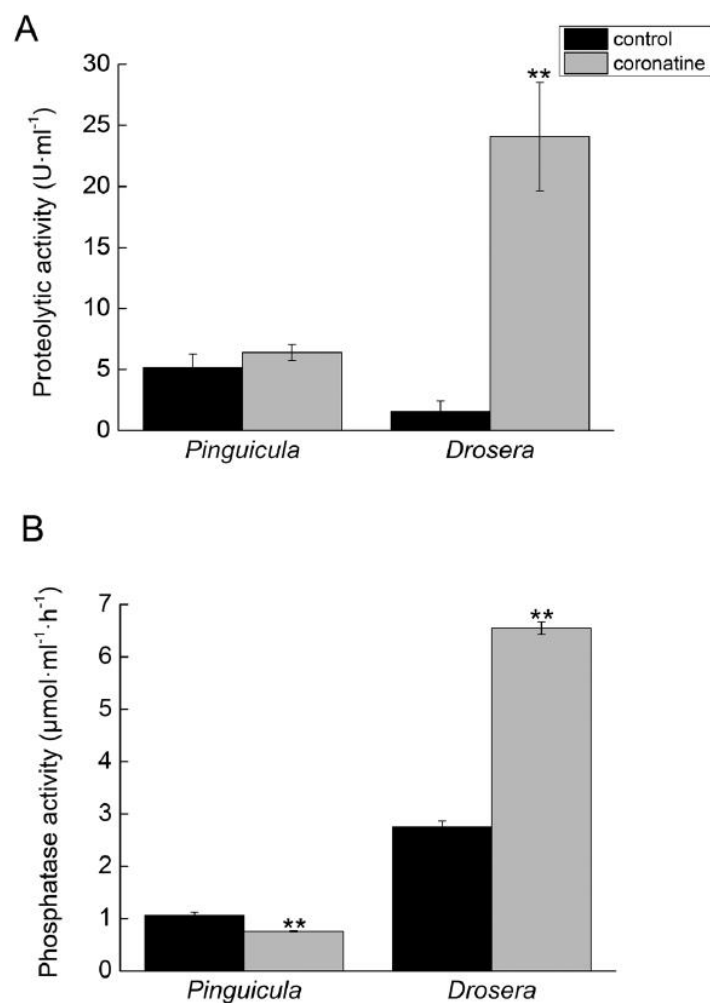
Tabulka č. 1: Proteiny v trávicí šťávě tučnice (získány 24 hodin po nakrmení), které byly identifikovány analýzou skrze hmotnostní spektrometrii.

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

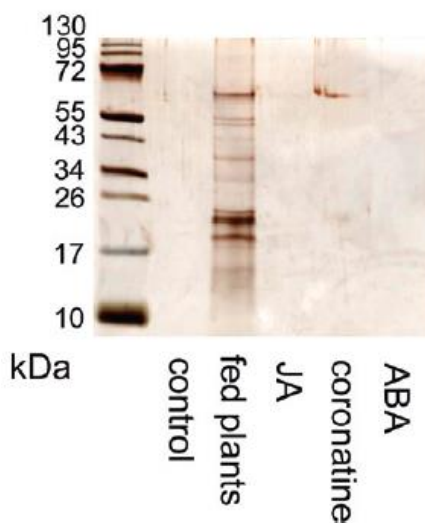
^a NCBI database accession. ^b PSMs, peptide-spectrum matches; SC, sequence coverage in %. ^c pBLAST identity and positivity in %. ^d Characteristics for two independent peptide hits acquired for the respective protein.



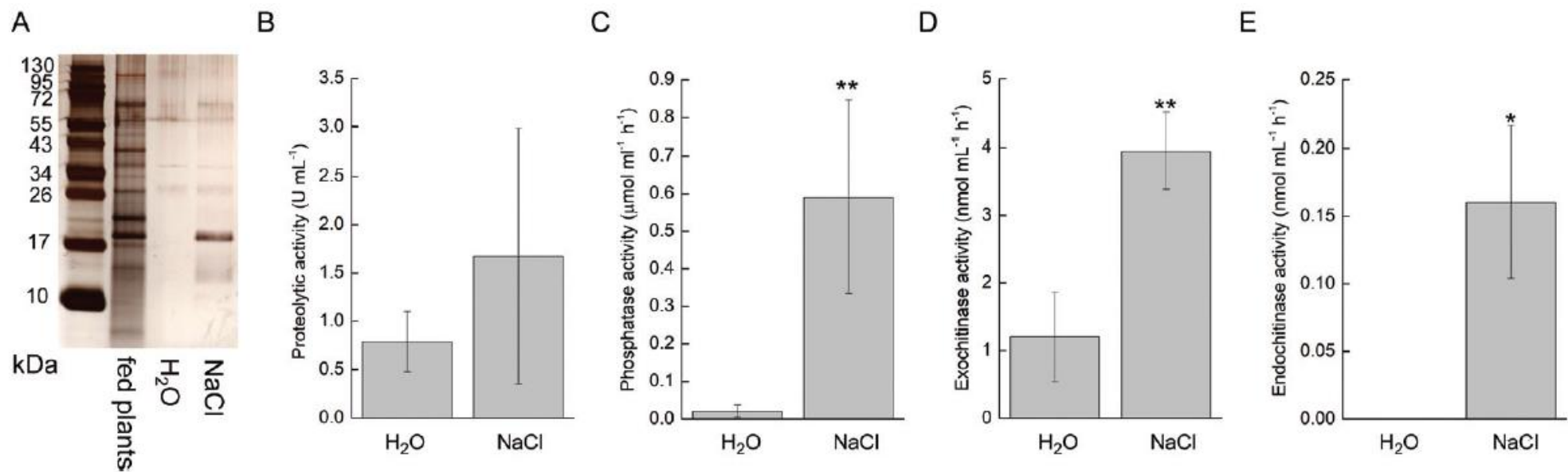
Obrázek č. 9: Grafy zobrazující hladinu fytohormonů JA (A), JA-Ile (B), cis-OPDA (C), ABA (D), SA (E), IAA (F) v listech tučnic v čase (0, 2 a 24 hodin). Černě je vyznačena aplikace kořisti, bíle zranění jehlou (10x – 15x). Data pro IAA po poranění rostliny nebyla vyobrazena z důvodu selhání analýzy. Uvedená data jsou průměrem ± SD (n = 5-15); signifikantní rozdíly mezi kontrolou (v čase 0) a ovlivněnými rostlinami (krmení, poranění) byly znázorněny pomocí Studentova t-testu (*) P < 0,05; (**) P < 0,01.



Obrázek č. 10: Grafy zobrazující proteolytické (A) a fosfatázové aktivity (B) u tučnice a rosnatky po zevní aplikaci koronatinu. Černě jsou vyznačeny kontrolní rostliny, šedě rostliny vystavené působení koronatinu. Uvedená data jsou průměrem \pm SD ($n = 5$); signifikantní rozdíly mezi kontrolami a rostlinami ovlivněnými koronatinem byly znázorněny pomocí Studentova *t*-testu (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$.



Obrázek č. 11: SDS-PAGE trávicích tekutin obarvených stříbrem. Do jamek byl napipetován stejný objem tekutiny získané 24 hodin po aplikaci kořisti, JA, koronatinu či ABA.



Obrázek č. 12: Grafy enzymatických aktivit listů tučnic po aplikaci hypertonického roztoku 5% NaCl (jako kontrola sloužila destilovaná voda). Zobrazeny jsou detekované aktivity proteáz (B), fosfatáz (C), exochitináz (D) a endochitináz (E). Aktivity pro amylázy a chitobiosidázy nebyly detekovány. S výsledky koresponduje i SDS-PAGE pro trávící enzymy z exudátů odebraných z listů po aplikaci příslušných stimulantů – po aplikaci hypertonického roztoku se objevuje jasný pás v oblasti přibližně 20 kDa. Uvedená data jsou průměrem ± SD ($n = 3-6$); signifikantní rozdíly mezi vzorky ovlivněnými H₂O a 5% roztokem NaCl byly znázorněny pomocí Studentova *t*-testu (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$.

3.3. Diskuze

Předchozí výzkumy regulace enzymatických procesů byly prováděny zejména u rostlin řádu hvozdíkotvaré (Caryophyllales). Jak bylo popsáno v úvodní teoretické části, masožravost je regulována pomocí jasmonátové signální dráhy, která může být aktivována mechanicky (přímý kontakt s kořistí) nebo chemicky (zprostředkováno získanými ionty, zejména NH_4^+). V případě rodů *Dionaea* a *Drosera* jsou využity oba druhy stimulů (mechanický při zachycení kořisti, chemický pro udržování trávicích procesů). U rodu *Nepenthes* převládají stimuly chemické. My jsme v této práci zkoumali regulaci enzymatického působení u geneticky vzdáleného rodu *Pinguicula* z řádu Lamiales (Albert *et al.*, 1992; Givnish, 2015).

Obdržené výsledky ukazují u tučnic několik doposud neznámých specifík. Analýzou trávicí tekutiny tučnic skrze hmotnostní spektrometrii (Tabulka č.1) se ukázala přítomnost peroxidáz, esteráz/lipáz, endonukleáz, cystein proteáz a aspartát proteáz, tedy enzymů, které již byly detekovány v jiných rodech masožravých rostlin (Hatano a Hamada, 2008; Schulze *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2016; Rottloff *et al.*, 2016; Fukushima *et al.*, 2017; Krausko *et al.*, 2017). Navrhli jsme pro případ tučnice užívat názvu pinguiculain pro cystein proteázu a výrazu pinguiculasin pro aspartát proteázu, dle nomenklatury uvedené v Takahashi *et al.* (2009, 2012). Dále je třeba brát na zřetel, že seznam objevených enzymů v Tabulce č. 1 není vyčerpávající (ve srovnání s obrázkem č. 8 některé enzymy v tabulce absentují) a trávicí tekutiny tučnice by bylo vhodné detailněji probádat během dalšího výzkumu. Velmi zajímavá je však i přítomnost enzymu alfa-amylázy, která doposud nebyla u jiných masožravých rostlin pozorována. Enzym amyláza je katalyzátorem štěpení škrobu na jednodušší sacharidy; běžně jej lze nalézt například ve slinách savců. Toto pozorování potvrzuje dřívější studie, kde byla aktivita tohoto enzymu taktéž nalezena, ale enzym nebyl detekován. Některé teorie poukazují na „vegetariánské“ chování tučnic (Harder a Zemlin, 1968), které lepem na svých listech dokážou zachytávat a trávit pyl jiných rostlin, díky čemuž dochází ke zvýšení počtu listů a květů. Jelikož lep tučnic je oproti lepu rosnatek znatelně slabší a nedokáže zadržet větší hmyz (osobní pozorování autora), dávala by teorie o nepohyblivé kořisti smysl – o její vyvrácení či potvrzení se bude muset postarat další výzkum.

Dalším zajímavým úkazem, u jiných masožravých rostlin doposud nevídaným, je aditivní schopnost lapat a trávit kořist nejen listy, ale i stopkou květu (viz obrázek č. 6 a 8). I toto naše zjištění je v souladu s předchozími výzkumy u *Pinguicula vulgaris* a *Pinguicula villosa*, kde byl pozorován příjem dusíku z kořisti zachycené na květní stopce (Hanslin a Karlsson, 1996). Dále je na obrázku č. 7 vidno, že zatímco v reakci na hmyz dochází k vzrůstu enzymatické

aktivity, aplikace JA tento efekt nemá. To je v rozporu s doposud publikovanými údaji studovaných rostlin (*Dionaea*, *Drosera*, *Nepenthes*), kde tento fytohormon vyvolává aktivaci dané signální dráhy (Krausko *et al.*, 2017; Pavlovič *et al.*, 2017).

Jelikož akumulace jasmonátů je úzce spjata s tvorbou elektrických signálů (Mousavi *et al.*, 2013), zajímalo nás, zdali je tučnice po podání kořisti generuje. Na obrázku č. 7 je jednoznačně vidět, že po nakrmení rostliny nevzniká žádný elektrický signál, který by mohl iniciovat jasmonátovou signalizaci. Naopak poranění listu vedlo ke zcela typickému variačnímu potenciálu. Dále jsme otestovali, jaký efekt má nakrmení či poranění listu na produkci fytohormonů (obrázek č. 8). Ukázalo se, že zatímco v případě poranění došlo opět k vzrůstu hladiny jasmonátů, přidání kořisti (tedy mechanický + chemický stimul) nemělo na množství jasmonátů žádný či minimální vliv. Z toho vyplývá, že jasmonáty při regulaci enzymatických aktivit v tučnicích nehrají roli (naopak v obranných mechanismech rostliny však tato signální dráha zůstává zachována tak, jako u většiny rostlin).

Z fytohormonů (mimo jasmonáty) na obrázku č. 9 stojí nárůst ABA po 24 hodinách po krmení. Tento nárůst by mohl být způsoben například přítomností chitinu v exoskeletu hmyzu, který může hladinu ABA zvýšit (Iriti a Faoro, 2008; Iriti *et al.*, 2009; Jakšová *et al.*, 2020). Exogenní aplikace ABA však při pozdější analýze skrze SDS-PAGE (obrázek č. 11) neukázala žádný vliv na regulaci masožravosti.

K ověření skutečnosti, že jasmonátová signální dráha v masožravosti tučnic nefiguruje, jsme aplikovali na tučnici a rosnatku koronatin (bakteriální nápodoba JA-IIe). Obě rostliny využívají k zisku kořisti adhezních pastí, přičemž u rosnatky již byla pozitivní reakce (v podobě nárůstu vylučovaných enzymů) na podání kyseliny jasmonové či koronatinu zdokumentována (Krausko *et al.*, 2017). Výsledky na obrázku č. 10 zřetelně ukazují, že u rosnatky se dle očekávání oproti kontrole zvýšila produkce trávících enzymů, zatímco u tučnice zůstalo množství uvolněných enzymů na úrovni kontrolních rostlin. To indikuje, že u tučnice (z řádu Lamiales) zřejmě figuruje jiný princip regulace enzymatické aktivity, než u masožravých rostlin z řádu Caryophyllales (kam patří například zmíněná rosnatka). Výsledný snímek z SDS-PAGE pro trávící tekutiny tučnice potvrzuje, že aplikace JA či koronatinu na aktivaci vylučování trávících enzymů nemá vliv. Z předchozích výsledků tedy vyplývá, že stimulace trávení kořisti je zřejmě chemického charakteru, ovšem jiného druhu, než je známo například u *Nepenthes* (kde dochází po nakrmení k akumulaci JA, uvolnění trávících enzymů a úpravě pH tekutiny v láčce, Yilamujiang *et al.*, 2016).

Výzkum aktivace a regulace trávících procesů pastí tučnic zůstává tedy otázkou a jedním z možných cílů dalšího výzkumu. Možným vodítkem může být teorie vyslovená v

Heslop-Harrison a Knox (1971), podle níž by enzymy mohly být předsyntetizovány a uloženy ve vakuolách, ze kterých by po zachycení kořisti byly vypláchnuty na povrch rychlým proudem vody. Tato holokrinní hypotéza zahrnuje úplnou autolýzu buněk. Avšak podle Vassilyev a Muravnik (1988a,b) si trávící žlázy zachovávají svou integritu i po zachycení kořisti a některé enzymy jsou po zachycení kořisti syntetizovány *de novo*. Výsledky našeho experimentu na obrázku č. 11C ukazují, že minimálně v případě fosfatáz, jsou v listech předsyntetizovány a po aktivaci kanálů skrze Cl⁻ iontů vodou vyplaveny na povrch (Heslop-Harrison a Heslop-Harrison, 1980). Fosfatázy byly lokalizovány v buněčných stěnách trávících žláz, odkud mohou být velmi rychle vyplaveny na povrch listu s kořistí (Přachno *et al.*, 2006). To ovšem neznamená, že některé z ostatních enzymů nemohou být po záchytu kořisti syntetizovány zcela nově. Nicméně signální dráha vedoucí k expresi těchto enzymů (především proteáz a amyláz) doposud nebyla odhalena.

4. Vliv potravních strategií láčkovek na aktivitu enzymů

Láčkovky (*Nepenthes*) jsou masožravé rostliny z řádu hvozdíkotvaré (Caryophyllales). Stejně jako většina masožravých rostlin rostou v půdách s nízkým obsahem živin. Vyskytují se v tropických ostrovních oblastech, například v pralesech Bornea, Sumatry či Filipín.

Láčkovky jsou šplhavé rostliny liánovitého typu. K chytání kořisti jí slouží gravitační pasti zvané láčky (Clarke, 1997; Pavlovič *et al.*, 2007; Osunkoya *et al.*, 2007), které jsou liánovitou úponkou propojeny s asimilujícími listy. Okraj láčky je obkroužen obústím (peristom), kam je hmyz váben na sladký nektar. Tento okraj je však velmi kluzký, díky čemuž po ztrátě stability padá do kyselé trávící tekutiny. Spodní část láčky obsahuje trávící žlázy, jimiž jsou uvolňovány trávící enzymy a zároveň absorbovány živiny z rozkládané kořisti. Úniku hmyzu je bráněno viskozitou kapaliny, dále pak voskovou zónou v horní části láčky, díky níž prchající hmyz ztrácí kontakt s povrchem rostliny a padá zpět (Owen *et al.*, 1999; Gaume *et al.*, 2002; Bohn a Federle, 2004; Gorb *et al.*, 2004; Gaume a Forterre, 2007; Bauer *et al.*, 2007; Bonhomme *et al.*, 2011; Bazile *et al.*, 2015). Aby nedocházelo k naředění trávící kapaliny či produkovaného nektaru, nachází se nad otvorem láčky nepohyblivé víčko, na němž také dochází k produkci nektaru.

Ne všechny láčkovky však disponují charakteristickými znaky tak, jak je popsáno výše. Lišit se mohou dokonce i v rámci jedné rostliny, u níž jsou obvykle tvořeny dolní (při zemi) a horní (ve vzduchu) láčky. Dále obvykle dochází ke specializaci na základě biotopu, v němž se rostlina vyskytuje, a tedy dostupné hmyzí kořisti. Tato se mění dle nadmořské výšky výskytu láčkovek (až 3200 m n. m.). Platí, že v pastech i v prostředí s rostoucí nadmořskou výškou klesá množství pozemního hmyzu; naopak roste zastoupení hmyzu létavého (a obráceně). Zatímco létavý hmyz je lépe zadržován ve viskózní kapalině, na zadržení pozemního hmyzu lépe působí vosková zóna v horní části láčky. Tomu odpovídá i morfologie láček. Ty s voskovou zónou nabývají protáhle podlouhlého tvaru a vyskytují se u nížinných druhů, zatímco ty spoléhající na viskozitu své tekutiny jsou spíše rozšířeně nálevkovitého tvaru a jsou typické pro vysokohorské druhy (Gaume and Di Giusto, 2009; Bonhomme *et al.*, 2011). Další specializace se mohou týkat specifických strategií zisku potravy, které jsou více rozepsány v jedné z úvodních kapitol. Pro připomenutí můžeme zmínit rozklad detritu, koprofagii či mutualistický vztah se spřízněnými organismy.

V této práci nás zajímá porovnání rozdílů enzymatické aktivity koprofágní *Nepenthes hemsleyana* a karnivorní *Nepenthes rafflesiana*. Vzhledem ke koprofágní výživě a absenci některých funkčních prvků masožravosti byla vyslovena hypotéza, že se tyto rostliny vyvíjejí

směrem ke ztrátě masožravosti (Fleischmann *et al.*, 2018). Proto je předpokládána částečná ztráta enzymatické aktivity vůči typicky insektivorní láchkovce. Obě rostliny jsou vyobrazeny na obrázku č. 13.



Obrázek č. 13: Obrázek dvojice studovaných láchkovek v jejich přirozeném prostředí (Borneo). (A) Láčkovka *Rafflesova* (*Nepenthes rafflesiana*). (B) *Nepenthes hemsleyana*, jejíž prodloužená láčka poskytuje dostatečný denní úkryt pro netopýry druhu *Kerivoula hardwickii*.

Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, u *Nepenthes hemsleyana* (ve starších vědeckých pracích známá jako *Nepenthes rafflesiana* var. *elongata* nebo *Nepenthes baramensis* viz Clarke *et al.*, 2011; Scharmann a Grafe, 2013) se vyvinul mutualistický vztah s drobnými netopýry *Kerivoula hardwickii* (Grafe *et al.*, 2011; Schöner *et al.*, 2017a). Netopýři využívají dutinu láček jako denní úkryt. Profit rostliny spočívá zejména v získávání výkalů a moči netopýrů, které jsou využity při výživě rostliny – údajně je zpracováno až 95 % dusíku z výkalů a moči (Grafe *et al.*, 2011; Schöner *et al.*, 2017a).

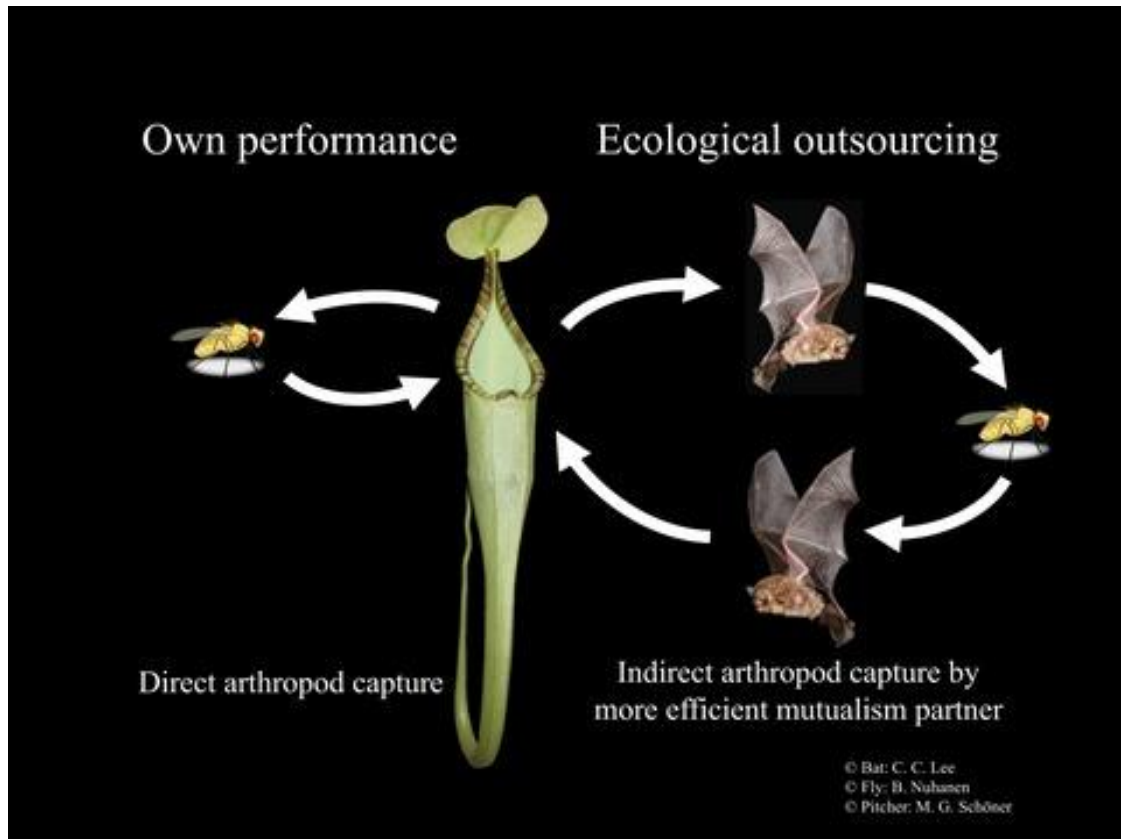
Vzhledem ke koprofágnímu stylu života došlo u láchky této pasti k výrazným změnám. Její láčka je podlouhlá a přesně odpovídá objemu těla netopýrů *Kerivoula hardwickii* (Lim *et al.*, 2014). Úroveň hladiny trávicí tekutiny v láčce je snížena, aby nepřicházela do styku

s mutualistickým partnerem. Samotní netopýři rostlinu dokáží v lesním porostu vyhledat a rozlišit od jiných rostlin rodu *Nepenthes* na základě echolokace (orientace v prostoru založená na vysílání a příjmu zvuku). Specifický signál vznikající odrazem od tvaru láčky netopýrovi umožní zamířit ke správné rostlině (Schöner *et al.*, 2015a). Ukázalo se, že úpravy láčky (například ustřížení víčka) činí rostlinu pro netopýry výrazně méně atraktivní, neboť specifický ultrazvukový odraz nevzniká. Naznačuje to, že drobné úpravy v konstrukci a fyziologii láčky mohou vést evolučně k novým zdrojům esenciálních prvků pro rostlinu a mohou tak představovat selekční výhodu oproti klasické, výhradně hmyzožravé výživě.

Na druhou stranu je u této rostliny očekáváno potlačení prvků charakteristických pro hmyzožravost. Toto se naplňuje například v již zmíněné nižší (avšak velmi viskózní) úrovni hladiny trávící kapaliny (Lim *et al.*, 2014). Láčka také postrádá kontrastní barevné vzory a těkavé látky k lákání hmyzu (Moran, 1996, Clarke *et al.*, 2011). Nicméně láčka i tak stále produkuje malé množství nektaru pro lákání hmyzu (ovšem mnohem nižší než *Nepenthes rafflesiana*), má kluzký peristom a voskovou zónu (Bauer *et al.*, 2011). V kyselé tekutině láčky byl zaznamenán i výskyt lapeného hmyzu. Zdá se tedy, že v tomto případě rostlina nemusí při této adaptaci vynakládat tolik energie, jako při lákání a trávení hmyzu (Schöner *et al.*, 2015b). Hypoteticky by se ovšem dal vzhledem k předtrávenosti hmyzí potravy netopýrem očekávat i pokles enzymatické aktivity v trávící tekutině *Nepenthes hemsleyana* a tím částečná ztráta masožravosti. (Fleischmann *et al.*, 2018)

Nejbližší geneticky spřízněnou rostlinou s *Nepenthes hemsleyana* je láčkovka Rafflesova (*Nepenthes rafflesiana*), kterou lze považovat za typického zástupce insektivorní masožravé rostliny. Patří tedy spíše k nížinným druhům, které se specializují na pozemní hmyz. Zaměření na pozemní kořist (např. mravence) odpovídá i prezence typických znaků masožravosti, jako vosková zóna v horní části láčky či méně viskózní trávící tekutina. Vnější část láčky svým povrchem umožňuje reflexi pro hmyz viditelných vlnových délek, např. UV oblasti (Moran, 1996), čímž dochází k jejich vábení k láčce. Enzymatické složení trávících šťáv i styl života se výrazně neodchyluje od faktů uvedených v předchozích kapitolách.

Abychom ověřili hypotézu o nižší enzymatické aktivitě (zejména proteáz) v *Nepenthes hemsleyana* v reakci na živiny dodané netopýry v podobě výkalů (tzv. *ecological outsourcing* dle Schöner *et al.*, 2017a), porovnali jsme její enzymatickou aktivitu s geneticky nejbližší spřízněnou rostlinou, *Nepenthes rafflesiana*.



Obrázek č. 14: Znárodnění mechanismu zisku kořisti u *Nepenthes hemsleyana*. Obdobně jako u jiných masožravých láčkovek je schopna lovu hmyzí kořisti („own performance“). V případě *Nepenthes hemsleyana* však dochází i k mutualistické interakci s hmyzožravými netopýry *Kerivoula Hardwickii*, kteří poskytnou láčce rostliny nestrávené zbytky své potravy (výkaly, moč), kterou nachytili v noci výměnou za denní úkryt. Pro tento způsob zisku předtrávených zdrojů živin se ustálil výraz „ecological outsourcing“ (zisk z interakcí vnějšího prostředí), viz zdroj obrázku Schöner et al. (2017a).

4.1. Materiál a metody

K experimentu byly využity rostliny *Nepenthes rafflesiana* a *Nepenthes hemsleyana*, vypěstované ve sklenících v Griefswaldu (Německo) v časovém intervalu od 17. srpna až do 14. prosince 2017. Rostliny byly pěstovány v substrátovém mixu (rašeliník, kůra, listy, mech) při průměrné teplotě 23 °C (noc) až 25 °C (den) a vysoké vzdušné vlhkosti (80% – 100%). Rostliny byly vystaveny světlu minimálně 12 hodin denně. Všechny testované rostliny měly na výšku alespoň 80 cm a jednu až dvě horní láčky.

Pro zjištění míry indukce genové exprese pomocí qPCR se monitoroval vývin láček u všech experimentálních rostlin. Jakmile se odklopilo víčko od ústí láčky, bylo toto víčko manuálně uzavřeno balící fólií a vatou zvlhčenou v destilované vodě (takto bylo zabráněno předčasnému záchytu hmyzu). Jakmile u obou typů rostlin bylo čerstvě otevřeno šest láček během sedmi dní, byl jednotlivým láčkám přiřazen jeden ze dvou druhů kořisti – hmyz nebo výkaly. Změřil se objem trávicí tekutiny v odměrném válci a určila se hodnota pH pomocí testovacích proužků (Macherey-Nagel, Düren, Německo). Průměrné pH bylo vypočteno na pH kalkulačce, dostupné online (<https://www.wgr-sw.com/pH/>). Poté byly láčky nakrmeny 6 mg hmyzu (*Drosophila hydei*) či 6 mg výkalů (mix zmražených výkalů z *Myotis bechsteinii*, *Myotis nattereri* a *Plecotus auritus*) na 12 ml trávicí tekutiny, což odpovídá přirozenému záchytu *Nepenthes hemsleyana* v přírodě (Schöner *et al.*, 2017b). Po 24 a 48 hodinách bylo odebráno 200 mg čerstvé váhy trávicí zóny láčky ze všech hmyzem i výkaly krmených láček obou druhů rostlin. Byly také odebrány kontrolní vzorky bez přídavku jakékoli kořisti. Získaná pletiva byla uložena do zkumavky Eppendorf a zmražena v tekutém dusíku. Uskladněna byla při teplotě -80 °C.

V případě hmotnostní spektrometrie, metody western blotting a měření enzymatických aktivit se u rostlin figurujících v experimentu opět monitorovala tvorba láček. Čerstvě otevřené láčky se uzavřely způsobem popsáným výše. Jakmile byly u obou druhů tři otevřené pasti během sedmi dní, byl změřen objem trávicí tekutiny a její pH. Rostliny byly (dle popisu výše) krmeny hmyzem, výkaly; případně krmeny nebyly (kontrola). Před odebráním vzorku byly láčky jemně protřepány za účelem homogenizace trávicí tekutiny. Z každé láčky byly odebírány po 0,5 ml trávicí tekutiny celkem čtyři typy vzorků: před krmením, po 2 dnech, po 4 dnech a po 6 dnech od nakrmení. Po každém odebrání vzorku byl opětovně vyrovnán objem tekutiny v lácce přidáním 0,5 ml destilované vody. Vzorky byly poté uchovány při teplotě -20 °C.

Ke studiu významných vnitrodruhových rozdílů mezi druhy aplikované kořisti či mezi druhy rostlin, na něž byla tato kořist aplikována, byly užity párové t-testy (Microsoft Excel).

4.1.1. Real-time PCR

K prostudování genové exprese v trávící zóně láček byly zvoleny čtyři geny odpovídající dobře známým proteinům z tekutiny láčkovek: NEPENTHESIN I a II (Athauda *et al.*, 2004), CHITINASE III (Rottloff *et al.*, 2011; Hatano a Hamada, 2012; Ishisaki *et al.*, 2012a), CHITINASE IV (Hatano a Hamada, 2008; Hatano a Hamada, 2012; Ishisaki *et al.*, 2012b). Celková RNA byla extrahována s využitím soupravy Spectrum Plant Total RNA (Sigma-Aldrich), aplikována DNáza I odstranila zbytky DNA a získaná RNA byla pročištěna pomocí soupravy RNA Clean & Concentrator (Zymoresearch, USA). Integrita RNA byla ověřena elektroforeticky v 1% agarózovém gelu. Koncentrace a čistota vzorku byla měřena pomocí spektrofotometru NanoDrop™ 1000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Syntéza prvního vlákna cDNA byla provedena skrze ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA) s použitím Oligo (dT)₁₅ primerů. K rozlišení kontaminace genomovou DNA byla použita pro každý ze vzorků negativní kontrola (bez reverzní transkriptázy). Primery pro studované geny (NEPENTHESIN I a II, CHITINASE III, CHITINASE IV; jako reference pak ACTIN a 18S rRNA) byly navrženy nástrojem Primer3plus (Tabulka č. 2).

K určení anelační teploty nasednutí primeru (*annealing temperature*; T_a) bylo využito gradientové PCR (polymerázová řetězová reakce; *polymerase chain reaction*). Každý amplifikovaný produkt byl zkontrolován v 2% agarózovém gelu pomocí elektroforézy a následně sekvencován Sangerovou metodou k ověření výsledné specifity. Stabilita referenčních genů (viz výše) byla zhodnocena metodou 2^{-ΔCT} (Livak a Schmittgen, 2001) a nástrojem BestKeeper. Následně byly specifické genové sekvence amplifikovány a detekovány pomocí Maxima SYBRGreen/ROX qPCR Master Mix (ThermoFisher Scientific). Reakce real-time PCR byly provedeny v 96-jamkové titrační destičce v přístroji Light Cycler II 480 (Roche, Basel, Švýcarsko). Analýza teploty tání amplifikovaných produktů PCR byla zahrnuta v každém z průběhů qPCR. Všechny vzorky byly analyzovány ve třech replikátech.

Metodika popisovaná v této kapitole byla provedena v laboratořích Katedry molekulární biologie a Katedry fyziologie rostlin na Přírodovědecké fakultě Univerzity Komenského v Bratislavě (Slovensko).

4.1.2. Měření enzymatických aktivit

Ke zjištění proteolytické aktivity v trávící tekutině jsme smíchali 150 μl vzorku a 150 μl 2% (w/v) BSA rozpuštěného v 200 mM glycinu upraveného HCl na pH 3. Tuto směs jsme

inkubovali při 37 °C po 2 hodiny. Reakce poté byla zastavena přidavkem 450 µl 5% (w/v) kyseliny trichloroctové (TCA, viz výše). Následovala desetiminutová inkubace vzorků na ledu a centrifugace o 20 000 g a teplotou 4 °C po 10 minut. Množství nesražených krátkých peptidů (v supernatantu) bylo stanoveno měřením absorbance vzorků při 280 nm ve srovnání s blankem na dvojpaprskovém spektrofotometru Specord 250 Plus (Analytik Jena, Německo). Za jednotku proteolytické aktivity se považuje vzrůst absorbance (280 nm) o 0,001 za minutu (Matušíková *et al.*, 2005).

Pro studium inhibice aspartát proteázy se výše určená směs skládala z 3 µl přídatku 150 µM pepstatinu (inhibitor aspartát proteáz) do směsi 150 µl vzorku a 147 µl 2% (w/v) BSA (viz výše). Inkubace i měření proběhly ve shodě s výše uvedeným postupem.

Chitinázové aktivity byly měřeny pomocí soupravy pro fluorimetrické stanovení chitináz (Sigma Aldrich). Pro určení endochitinázových aktivit byla použita 4-methylumbelliferyl β-D-N,N',N''-triacetylchitotrióza. Směs 10 µl vzorku s 90 µl substrátového pracovního roztoku byla inkubována při 37 °C. Po jedné hodině byla reakce zastavena přidavkem 200 µl uhličitanu sodného. Poté byla při pH > 7 změřena fluorescence uvolněného 4-methylumbelliferonu na destičkové čtečce SynergyMx (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) za excitace při 360 nm a emise při 450 nm. Výsledky jsou průměrem šesti biologických replikátů.

Tabulka č. 2: Sekvence použitých primerů pro Real-time PCR a jejich vlastnosti (T_a – anelační teplota).

Primer	Product size (bp)	Primer sequence (5' - 3' direction)	T_a (°C)
<i>ACTIN (ACT)</i>	100	Forward: CTCTTAACCCCAAAGCAAACAGG Reverse: GTGAGAGAACAGCCTGGATG	59
<i>18S rRNA</i>	100	Forward: CTTGATTCTATGGGTGGTGGTG Reverse: GTTAGCAGGCTGAGGTCTC	59
<i>NEPENTHESIN I (NEPI)</i>	193	Forward: CCAACTCTGTCAAGCCCTTC Reverse: CCGAATGTGATATTAGGGATGG	59
<i>NEPENTHESIN II (NEPII)</i>	210	Forward: TTCCTTGGCAGAGCCAGTAT Reverse: CCGAATCCCTGGTTGTCTT	59
<i>CHITINASE III (CHITIII)</i>	213	Forward: GCTCCGGCATAGCAGTCTAC Reverse: CTTGGTTTTGGCATGAGGTT	60
<i>CHITINASE IV (CHITIV)</i>	219	Forward: ATGTCACGCATGAGACTGGA Reverse: CCACCGTTTTGAGGTGAGTTT	59

4.1.3. SDS-PAGE a western blotting

Trávicí tekutina sesbíraná za účelem enzymatických testů byla separována pomocí SDS-PAGE a analyzována metodou western blotting. Vzorky o objemu 100 μ l byly po deset minut zahřívány (denaturovány) při 70 °C. Poté byly smíchány s Laemmliho vzorkovým tlumivým roztokem (50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 10% glycerol, 1% β -merkaptoethanol, 12,5 mM EDTA a 0,02% bromfenylové modři). Do jamek 10% SDS-plyakryamidového gelu (Schägger, 2006) byl napipetován shodný obsah vzorků (20 μ l) a následně byla provedena elektroforetická separace.

Proteiny v gelech byly buď zvýrazněny barvením stříbrem (ProteoSilver; Sigma Aldrich) nebo přebloťovány z gelu na nitrocelulózovou membránu (Bio-Rad) pomocí zařízení Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Po celonočním blokování v TBS-T s obsahem 5% BSA byly membrány po jednu hodinu inkubovány v primární protilátce (ředění 1:500 až 1:1000) při pokojové teplotě. Po následném cyklu promývání byly membrány dále inkubovány v sekundární protilátce (ředění 1:10000; Bio-Rad). Bloty byly vizualizovány a kvantifikovány pomocí chemiluminiscence na skeneru gelů Amersham Imager 600 (GE HealthCare Life Sciences, Tokyo, Japan). Výsledky jsou průměrem šesti biologických replikátů.

4.1.4. Hmotnostní spektrometrie

Pro analýzu byla použita trávící tekutina z kontroly (den 0) a krmených láček (dny 2, 4 a 6 smíšené dohromady z důvodů nedostatku materiálu). Alikvota s trávící tekutinou (500 μ l) byla vysušena pomocí vakuové centrifugy. K získanému peletu bylo přidáno 50 μ l 50mM NH_4HCO_3 a 15 μ l močoviny. Poté byl obsah zkumavky sonifikován po dobu 5 minut. Následně byly proteiny redukovány přídatkem 4 μ l 55 mM dithiothreitolu (DTT) a inkubovány při teplotě 60 $^\circ\text{C}$ po 30 minut. Dále byly přidány 4 μ l 330 mM jodoacetamidu a směs byla inkubována ve tmě a za laboratorní teploty po 20 minut. Přebytek alkylačního činidla byl zhašen pomocí 8 μ l 55 mM DTT s následným přidáním 118 μ l 50 mM NH_4HCO_3 . Štěpení proteinů bylo iniciováno přídatkem 1 μ l dimethylovaného SOLu-tripsinu (Sigma-Aldrich, Německo) a ponecháno celou noc při 37 $^\circ\text{C}$. Výsledný obsah byl vysušen s využitím vakuové centrifugy a obnoven přídatkem 10 μ l 0,1% kyseliny trifluoroctové a zbaven solí pomocí pipetových špiček s obrácenou fází Zip Tip- C_{18} (Merck Millipore, Irsko). Odsolený peptidový vzorek byl podroben analýze LC-ESI-MS/MS v zařízení Q-TOF (Chamrád *et al.*, 2014). Získané soubory dat byly zpracovány pro vyhledávání v databázi na základě homologie programem PEAKS X (Bioinformatics Solutions, Canada).

4.2. Výsledky

Tato část práce prezentuje výsledky našich experimentů týkajících se enzymatické regulace *Nepenthes hemsleyana* a *Nepenthes rafflesiana* v reakci na odlišnou kořist (hmyz, výkaly). Je zde ukázán výsledek analýzy genové exprese, dále také rozbor množství vybraných enzymů v obou rostlinách po aplikaci rozdílné kořisti na časové škále nultý až šestý den. Nechybí ani enzymatické aktivity studovaných enzymů, změny pH v tekutině láčky a proteiny nalezené v jednotlivých typech vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie.

Výsledky analýzy genové exprese jsou na obrázku č. 15. Ukazuje se zde, že mRNA kódující důležité enzymy láčekovek (nepenthesin I a II, chitináza III a chitináza IV), vzrostly po 48 hodinách v obou druzích studovaných rostlin pro oba typy kořisti (grafy A až H). Vnitrodruhové srovnání neodhalilo žádné význačné rozdíly v reakci na výkaly či hmyz (mezidruhové srovnání je v tomto případě nemožné, zejména kvůli možnosti rozdílné míry exprese house-keepingového genu v jednotlivých druzích). Data ukázala vysokou variabilitu v genové expresi. Ukázalo se, že *Nepenthes rafflesiana* vykazuje větší genovou expresi chitinázy III po nakrmení hmyzem, než je tomu u *Nepenthes hemsleyana*; naopak po nakrmení výkaly je vyšší exprese chitinázy III pozorována v případě *Nepenthes hemsleyana*, tyhle rozdíly

však nebyly signifikantní.

Obrázky č. 16 a 17 ve výsledcích barvení stříbrem a metody western blotting ukazují, že množství studovaných proteinů se v obou typech rostlin zvýšilo při přidavku výkalů i při přidavku hmyzu. Jelikož v jednom gelu byly vždy analyzovány vzorky od jednoho druhu rostliny, byli jsme schopni opět studovat efekt daného typu kořisti v rámci pouze jednoho druhu rostliny (avšak nikoli mezi oběma druhy rostlin, kvůli možnosti různých sekvencí enzymů a tím i afinity našeho epitopu protilátky).

U trávící tekutiny *Nepenthes rafflesiana* (obrázek č. 16) se aplikací western blottingu ukazuje, že obsah obou nepenthesinů se po přidavku výkalů výrazně zvýšil již druhý den po začátku experimentu, zatímco po přidavku hmyzu došlo jenom k mírnějšímu nárůstu. Imunodetekce chitinázy III (úspěšná pouze ve 3 z 6 případů) byla zaznamenána zejména po přidavku hmyzí kořisti. V případě chitinázy IV naopak imunodetekce odhalila její zvýšené množství spíše po přidavku výkalů nežli hmyzu, a to zejména druhý a čtvrtý den po zahájení experimentu.

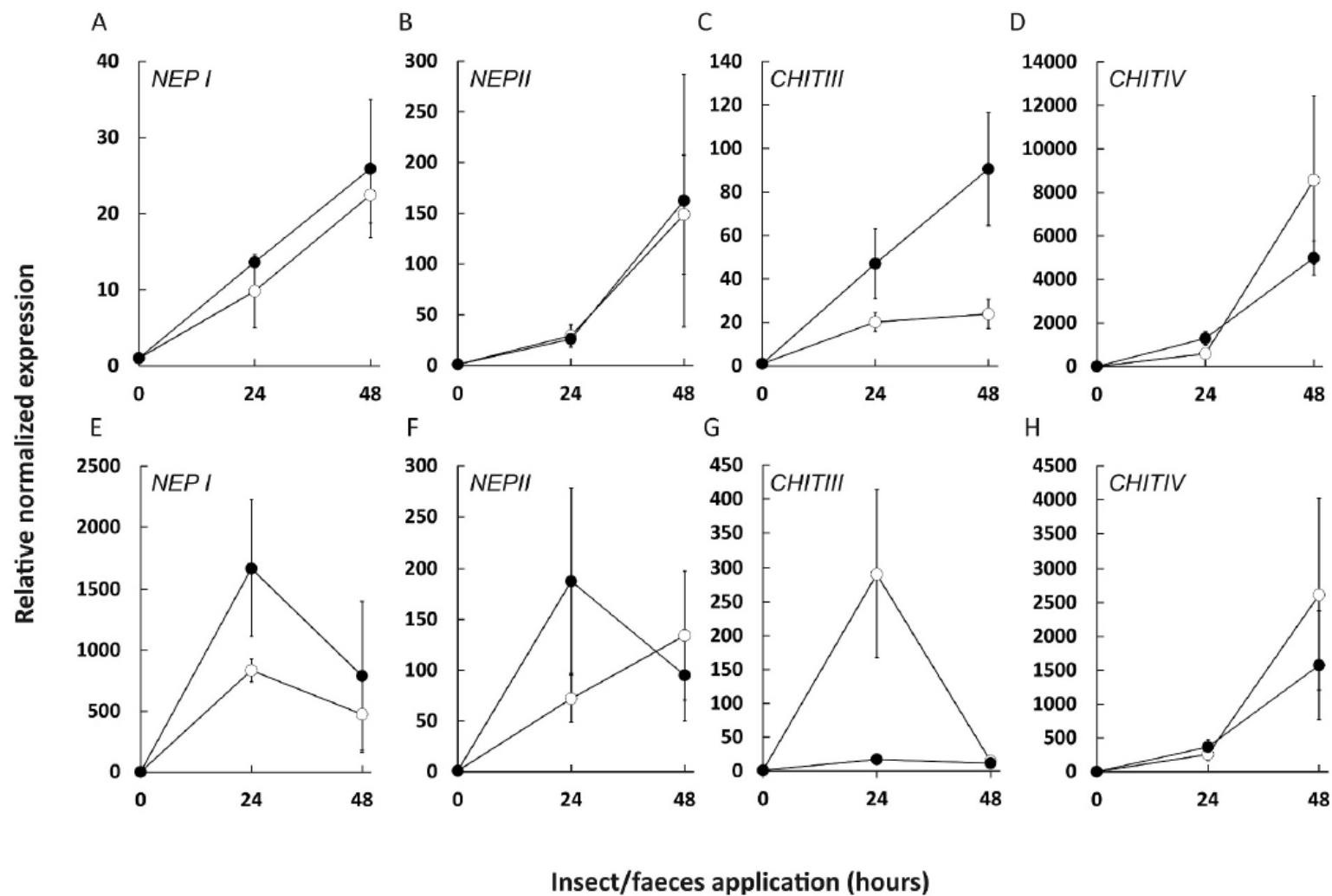
Trávící tekutina *Nepenthes hemsleyana* (obrázek č. 17) imunodetekcí odhalila mírně zvýšený obsah nepenthesinu po nakrmení výkaly oproti hmyzu. Výsledky pro chitinázu IV u obou typů potravy ukázaly velmi podobný nárůst napříč celou dobou trvání experimentu. Chitinázu III jsme nedokázali pomocí imunodetekční metody odhalit – důvodem může být nespecificita námi použité protilátky nebo nepřítomnost enzymu.

Dalším našim krokem byla analýza enzymatických aktivit (obrázek č. 18), která dovoluje mezidruhové i vnitrodruhové srovnání. Ukazuje se, že aplikace výkalů v trávící tekutině výrazně zvyšuje aktivitu proteáz, a to bez ohledu na potravní strategii dané rostliny (A). Z toho mimo jiné plyne, že netopýří výkaly jsou lepším induktorem proteolytické aktivity než hmyz. Dalším překvapivým výsledkem je minoritní aktivita endochitináz v trávící tekutině *Nepenthes hemsleyana* ve srovnání s hmyzožravou *Nepenthes rafflesiana*, která však nebyla signifikantně významná, kvůli velké variabilitě dat (B). Do třetice, *Nepenthes hemsleyana* má z obou rostlin mnohem výraznější schopnost acidifikace své trávící tekutiny, a to jak po přidavku výkalů, tak hmyzí kořisti (C).

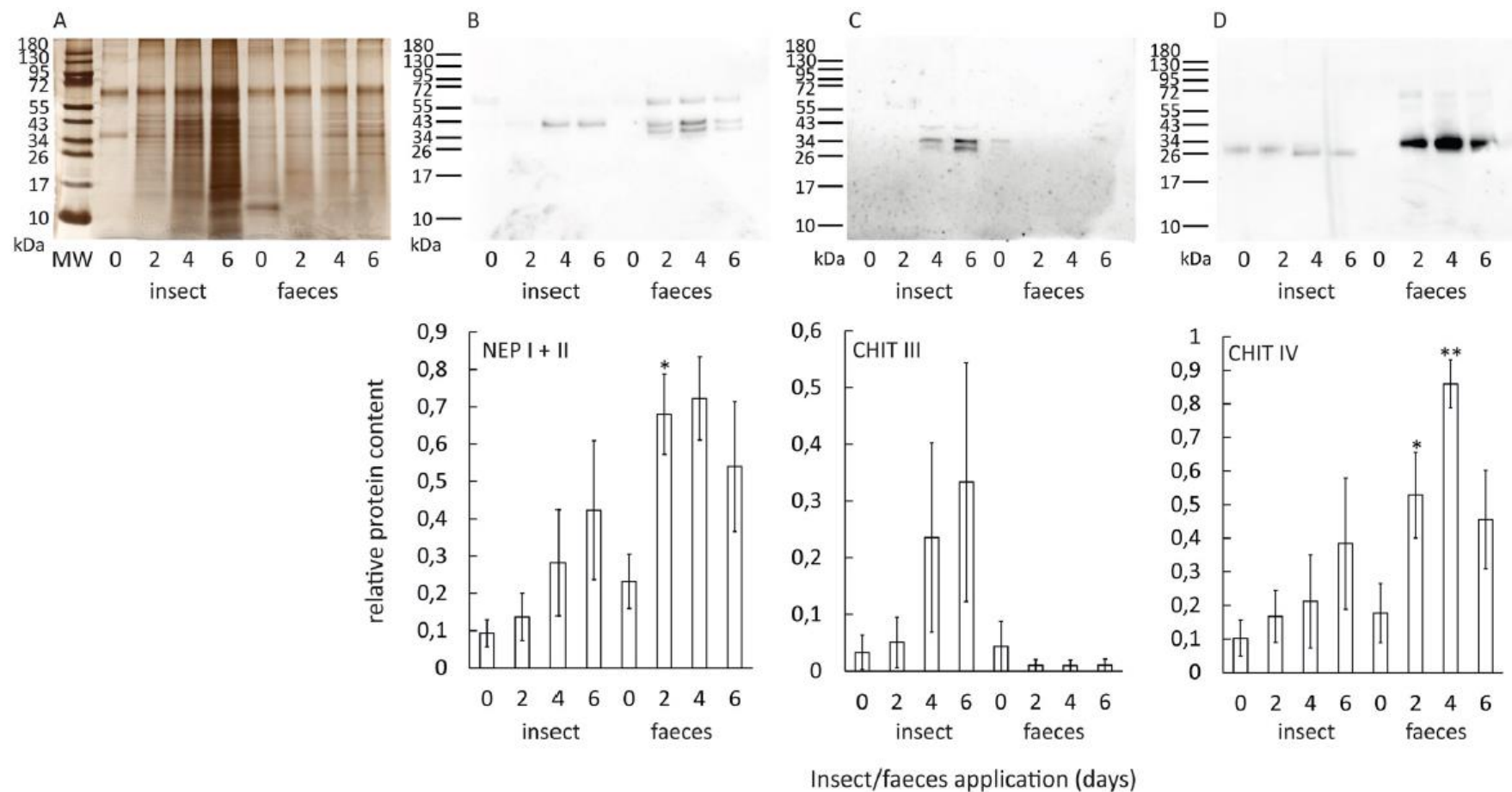
Na důkaz toho, že za měřenými proteolytickými aktivitami stojí aspartát proteázy, jsme učinili experiment s využitím pepstatinu (známý inhibitor aspartátových proteáz), jehož výstup lze analyzovat na obrázku č. 19. Experiment prokázal, že 70 až 80 % proteolytické aktivity na obrázku 18 je důsledkem působení aspartát proteázy, která je zřejmě pro obě rostliny majoritní proteázou (tedy nepenthesin).

K dodatečnému ověření přítomnosti studovaných enzymů jsme využili analýzy skrze

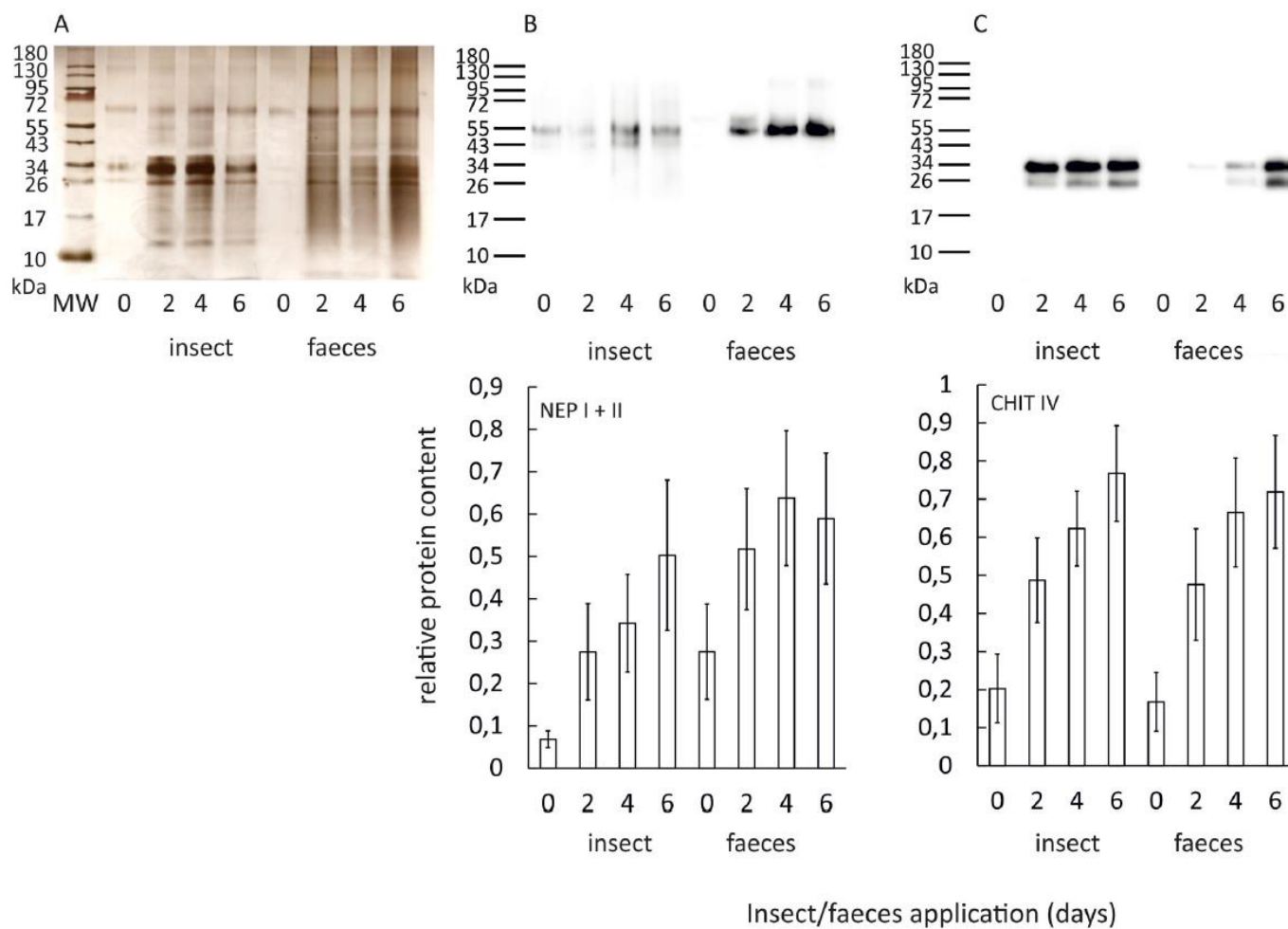
hmotnostní spektrometrii. Jak prozrazuje tabulka č. 3, v obou typech *Nepenthes* byl nalezen nepenthesin I, II a chitináza IV a další v tomto rodu dříve popsané enzymy. Nepodařilo se nám však identifikovat chitinázu III, ačkoli tato byla původně popsána v *Nepenthes rafflesiana* (Rottloff *et al.*, 2011). Vzorky byly značně kontaminovány keratinem, což zamezilo hlubší identifikaci, a díky tomu není seznam identifikovaných proteinů vyčerpávající. V každém případě však MS data potvrzují přítomnost enzymů u obou druhů láčkovek bez ohledu na potravní strategii.



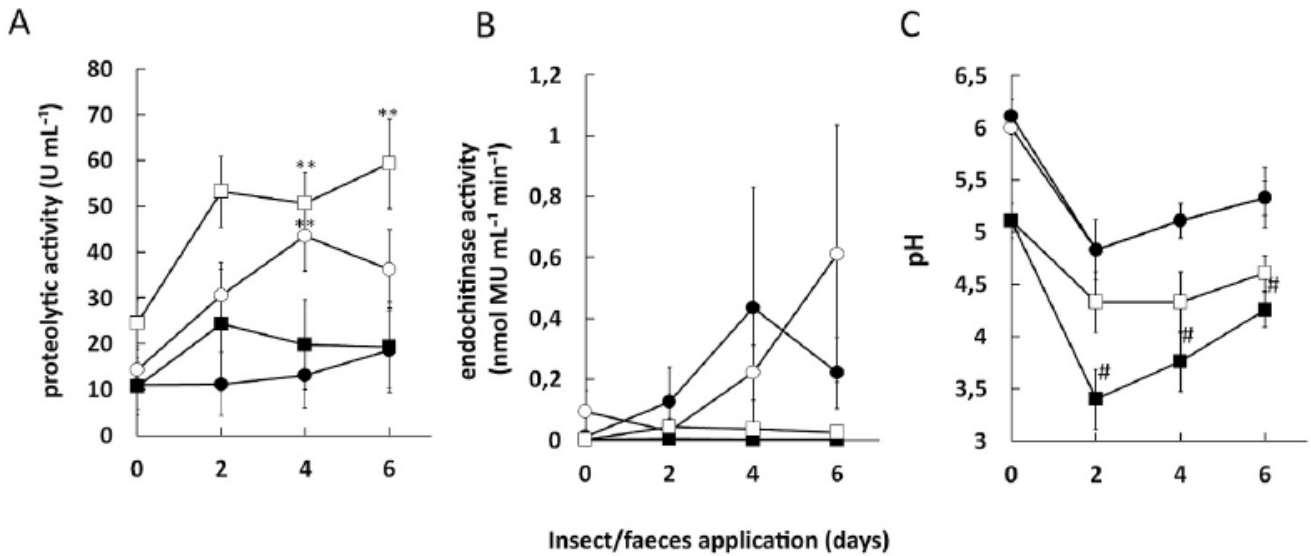
Obrázek č. 15: Grafy ukazující expresi genů nepenthesin I (A, E), nepenthesin II (B, F), chitináza III (C, G) a chitináza IV (D, H) u rostlin *Nepenthes rafflesiana* (A až D) a *Nepenthes hemsleyana* (E až H). Genová exprese před přidavkem kořisti (0 h) je nastavena jako 1. Aplikace hmyzu je označena černě, aplikace výkalů bíle. Uvedená data jsou průměrem \pm SE ($n = 3$); v tomto případě nebyly v rámci Studentova t-testu zjištěny žádné statisticky významné rozdíly.



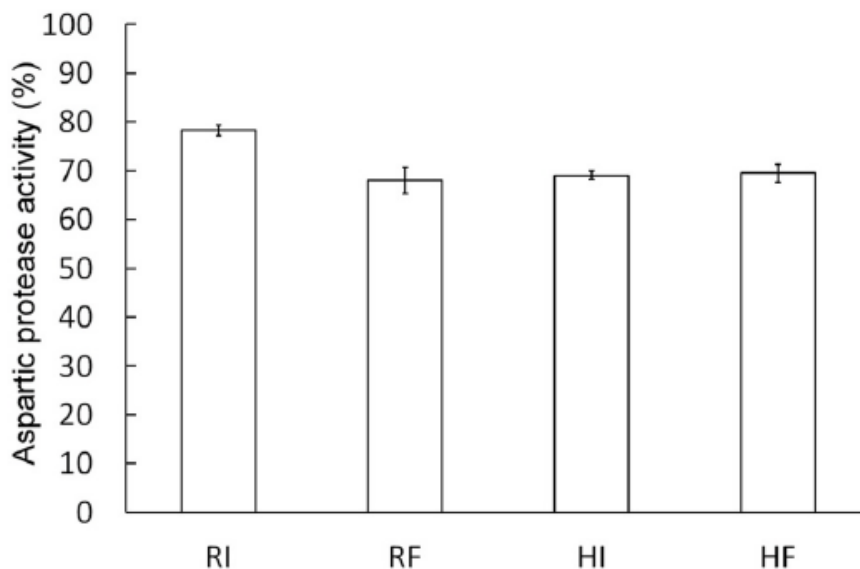
Obrázek č. 16: Shrnutí analýzy skrze SDS-PAGE vybraných enzymů z *Nepenthes rafflesiana* po krmení hmyzem či výkaly. Čísla 0, 2, 4 a 6 označují den odběru trávící tekutiny od započetí experimentu. (A) Elektroforetický gel s rozseparovanými proteiny obarvený stříbrem. (B) Western blotting pro detekci nepenthesinů (zde míněn nepenthesin I a II dohromady). (C) Western blotting pro detekci chitinázy III. (D) Western blotting pro detekci chitinázy IV. Pod každým Western blottingem je uváděna kvantifikace chemiluminiscenčního signálu. Uvedená data jsou průměrem \pm SE ($n = 6$); signifikantní rozdíly mezi odezvou láček na hmyz a výkaly byly znázorněny pomocí párového Studentova *t*-testu (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$).



Obrázek č. 17: Shrnutí analýzy skrze SDS-PAGE vybraných enzymů z *Nepenthes hemsleyana* po krmení hmyzem či výkaly. Čísla 0, 2, 4 a 6 označují den odběru trávící tekutiny od započetí experimentu. (A) Elektroforetický gel s rozseparovanými proteiny obarvený stříbrem. (B) Western blotting pro detekci nepenthesinů (zde míněn nepenthesin I a II dohromady). (C) Western blotting pro detekci chitinázy IV. Pod každým Western blottingem je uváděna kvantifikace chemiluminiscenčního signálu. Uvedená data jsou průměrem \pm SE ($n = 6$); párový Studentův *t*-test v tomto případě neodhalil statisticky významné rozdíly v reakci láček na hmyz a výkaly.



Obrázek č. 18: Enzymatické aktivity proteáz (A), endochitináz (B) a změna pH v trávicí tekutině (C) po odběru vzorku ve dni 0, 2, 4 a 6. Bílé čtverečky označují *Nepenthes hemsleyana* krměnou výkaly, černé čtverečky *Nepenthes hemsleyana* krměnou hmyzem, bílé kruhy *Nepenthes rafflesiana* krměnou výkaly, černé kruhy *Nepenthes rafflesiana* krměnou hmyzem. Uvedená data jsou průměrem \pm SE ($n = 6$), využito bylo Studentova *t*-testu. Signifikantní mezidruhové rozdíly jsou značeny (#), $P < 0,05$; signifikantní vnitrodruhové rozdíly jsou značeny (**), $P < 0,01$.



Obrázek č. 19: Graf ukazující procentuální zastoupení aspartát proteázy (70 až 80 %) v celkové proteolytické aktivitě trávicích šťáv. Jsou zde uvedeny hodnoty pro *Nepenthes rafflesiana* krměnou hmyzem (RI) a výkaly (RF), dále pro *Nepenthes hemsleyana* krměnou hmyzem (HI) a výkaly (HF). Uvedená data jsou průměrem \pm SE ($n = 5$).

Tabulka č. 3: Proteiny identifikované v *Nepenthes rafflesiana* a *Nepenthes hemsleyana* pomocí hmotnostní spektrometrie.

Enzyme	Accession No.	Organism	Sample RC	Sample RI	Sample RF	Sample HC	Sample HI	Sample HF
Chitinase IV	A9ZMK1_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	yes	–	yes	yes	yes
Aspartic protease	AOA1L7NZU0_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	–	–	yes	yes	–
Aspartic protease (nepenthesin I)	NEP1_NEGR	<i>N. gracilis</i>	yes	yes	yes ^a	yes	–	yes
Nepenthesin II	AOA193PDP6_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	–	–	yes	–	yes
Nepenthesin II	AOA0S3TFL4_9CARY	<i>N. rajah</i>	–	yes	yes ^b	–	–	–
C-terminal peptidase	AOA1L7NZU4_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	–	–	yes	yes	yes
C-terminal peptidase	AOA1L7NZU1_NEPAL	<i>N. alata</i>	yes ^c	yes	–	yes	–	yes
Peroxidase	AOA140GMM6_NEPMI	<i>N. mirabilis</i>	yes ^c	–	–	–	yes	yes
Purple acid phosphatase	AOA1L7NZZ7_NEPAL	<i>N. alata</i>	yes ^c	–	–	yes	–	–
Nepenthesin I	AOA1L7NZU6_NEPAL	<i>N. alata</i>	yes	–	–	yes ^c	–	–
Beta-1 3-glucanase	I7H3Q8_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	yes	–	–	–	yes ^c
Carboxypeptidase	AOA140GML6_NEPMI	<i>N. mirabilis</i>	–	–	–	yes ^c	–	yes ^c
GDSL lipase	AOA1L7NZZ8_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	–	–	yes ^c	–	–
Maturase	AOA385Y4W5_9CARY	<i>N. x ventrata</i>	yes ^c	–	–	–	–	–
Non-specific LTP-like	AOA224ANY4_NEPAL	<i>N. alata</i>	yes	–	–	yes ^c	yes ^c	–
RNase2	AOA1L7NZU5_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	yes ^c	–	–	–	–

Samples: C - control non-fed plants, I - fed on insects, F - fed on faeces, H - *N. hemsleyana*, R - *N. rafflesiana*.

^a assigned to A9ZMF9_NEPAL Aspartic proteinase nepenthesin I from *N. alata*.

^b assigned to AOA140GML5_NEPMI Nepenthesin 2-like from *N. mirabilis*.

^c identified by only a single sequenced peptide in this sample.

4.3. Diskuze

Alternativní potravní strategie láčkovek mohou způsobit útlum typicky masožravých znaků, mezi které patří například snížení investice do lákání a trávení kořisti (Fleischmann *et al.*, 2018). Při studiu mutualistické *Nepenthes hemsleyana*, která v odměně za hnízdiště získává výkaly netopýrů *Kerivoula hardwickii*, jsme tedy chtěli ověřit tuhle hypotézu o nižší efektivitě masožravých procesů. Následné srovnání s nejbližší geneticky příbuznou láčkovkou, *Nepenthes rafflesiana*, však prokázalo, že v obou druzích rostlin došlo k výrazné genové expresi trávicích enzymů v odpovědi na hmyz i výkaly (obrázek č. 15). Následný výzkum pak navzdory předpokladům ukázal, že tyto enzymy jsou také sekretovány do trávicí tekutiny obou láčkovek (obrázky č. 16 a 17), kde jejich aktivitu zvyšuje přidavek hmyzu i výkalů (obrázek č. 18).

Jak je ukázáno v grafu na obrázku č. 18-A, indukuje přítomnost výkalů daleko větší enzymatickou aktivitu proteáz než hmyz, a to bez ohledu na rostlinný druh. Dále se ukazuje, že chitinázy jsou v *Nepenthes hemsleyana* stále užitečné (viz obrázek 18-B); důvodem může být antifungicidní obrana či štěpení nestrávených zbytků chitinu ve výkalech hmyzožravých netopýrů (Rottloff *et al.*, 2011; Kaya *et al.*, 2014). Dále graf na obrázku č. 18-C ukazuje, že *Nepenthes hemsleyana* okyseluje svou trávicí tekutinu v reakci na oba typy studované kořisti výrazně více než *Nepenthes rafflesiana*.

Zde se nabízí otázka, proč si *Nepenthes hemsleyana* zachovává enzymatickou kapacitu pro trávení kořisti (viz obrázek č. 19 a tabulka č. 3), když běžně získávají předtrávenou potravu bohatou na dusík v podobě netopýřích výkalů a močoviny (Herrera *et al.*, 2006; Kaya *et al.*, 2014). Skutečnost je však taková, že i *Nepenthes hemsleyana* je schopna záchytu hmyzu, ačkoli ho v její lácce bylo nalezeno asi desetkrát méně než v čistě insektivorní *Nepenthes rafflesiana* díky snížené efektivitě lákání kořisti (Moran, 1996; Gaume a Di Giusto, 2009). Taktéž se ukazuje, že *Nepenthes hemsleyana* si zachovává řadu insektivorních prvků láčkovek (viz úvodní část kapitoly 4).

Tato dvojitá strategie zisku potravy tak rostlině umožňuje prosperovat ze záchytu hmyzu na místech, kde se netopýři *Kerivoula hardwickii* běžně nevyskytují (Schöner *et al.*, 2013); navíc i na místech výskytu tohoto netopýra bylo údajně obydleno během 6,5 týdnů přibližně 30 % z celkového počtu pastí (Grafe *et al.*, 2011) v kompetici se svinutými listy (alternativní hnízdiště tohoto druhu netopýrů). Mají-li netopýři na výběr, volí si raději mutualistickou láčkovku, která je pro ně kvalitnějším hnízdištěm než svinutý list (Schöner *et al.*, 2013, 2017b). Ovšem i tak zůstává přibližně 70 % rostlin bez alternativního zdroje potravy. Co víc, mladé lácčky nejsou natolik velké, aby pojalý tělo netopýra, a tak zůstávají odkázány na hmyzí kořist

(Schöner *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2014).

Výše uvedené je v souladu se zjištěním, že *Nepenthes hemsleyana* je schopná profitovat i ze záchyty hmyzu, ovšem asimilace živin je pomalejší a méně efektivní než v případě výkalů, které jsou již předtráveny zaživacím systémem netopýrů (Schöner *et al.*, 2017a). Za další, *Nepenthes rafflesiana* je taktéž schopna trávit hmyz i výkaly, což indikuje, že pro trávení netopýřích výkalů není potřebná žádná dodatečná adaptace (Schöner *et al.*, 2017a; Yilamujiang *et al.*, 2017).

Kromě zmiňované močoviny obsahují netopýří výměšky také amoniak a chitin (Herrera *et al.*, 2006; Kaya *et al.*, 2014). Obě tyto složky výkalů mohou v láčkovce vybudit trávící procesy (Yilamujiang *et al.*, 2016; Saganová *et al.*, 2018). Jelikož ke zvýšení proteolytické aktivity došlo i v *Nepenthes rafflesiana*, která s tímto typem kořisti v přírodě obvykle nepřichází do styku, jsou výkaly netopýrů zřejmě dobrou nápodobou kořisti z řad hmyzu.

Jelikož *Nepenthes hemsleyana* není na mutualismu s netopýry vyloženě závislá (Grafe *et al.*, 2011), došlo u ní pouze ke změnám týkajících se lákání a hnízdění netopýrů (Schöner *et al.*, 2015a), a tedy nikoli radikálních změn, jaké mohou nastat při silné závislosti obou mutualistů jeden na druhém. Schopnost trávení proteinů a chitinu společně s dalšími insektivními znaky u této rostliny tedy zůstala zachována. Jelikož insektivní adaptace této láčkovky zůstala neovlivněna, může v přírodě přežívat i bez svého mutualistického partnera.

5. Závěr

Tato práce byla zaměřena na dvojí problematiku. První z nich se týká regulace enzymatických aktivit jasmonátů v rostlinách rodu *Pinguicula* z řádu Lamiales, kterážto signální dráha byla doposud studována zejména u řádu Caryophyllales. Druhou studovanou tématikou byla hypotetická redukce enzymatické aktivity u *Nepenthes hemsleyana*, která v rámci svého mutualismu vykazuje koprofagii, oproti geneticky nejbližší spřízněné insektivorní *Nepenthes rafflesiana*.

Výsledky obdržené pro rod *Pinguicula* prokázaly, že tyto rostliny na svých listech i květní stopce produkují podobné trávící enzymy, jaké byly zaznamenány i u dalších masožravých rostlin (s výjimkou alfa-amylázy). Ovšem ukazuje se, že signální dráhy vedoucí k expresi enzymů se mohou od dříve studovaných rostlin lišit (viz například Nishimura *et al.*, 2013); ačkoli je totiž reakce na hmyz pozitivní v podobě vylučování trávících enzymů, nezdá se, že by jasmonáty hrály v procesu signalizace přítomnosti kořisti nějakou roli. Pokusili jsme se ověřit hypotézu o předsyntetizování a následném vyplavení enzymů při záchytu kořisti, avšak tato teorie z námi dosažených výsledků může být aplikována pouze pro fosfatázy, ostatní enzymy jsou pravděpodobně syntetizovány *de novo*. Způsob signalizace přítomnosti lapené kořisti tak zůstává neznámý. Ačkoli se tyto výsledky mohou na první pohled jevit negativně, významně rozvíjejí naše poznání o masožravých rostlinách. Za významné se považuje zjištění, že jasmonátová signální dráha nebyla kooptována ve všech vývojových liniích masožravých rostlin.

Druhé zaměření této práce překvapivě ukázalo, že trávící tekutina *Nepenthes hemsleyana* nemá redukovanou enzymatickou aktivitu navzdory mutualistickému vztahu s netopýry. Dále se ukázalo, že na kořist v podobě výkalů reaguje zvýšenou proteolytickou aktivitou i *Nepenthes rafflesiana*, z čehož plyne, že netopýří výkaly jsou vhodnou nápodobou hmyzí kořisti a k jejich trávení láčkovky nepotřebují výraznější změny v trávících procesech. Obě studované rostliny tedy mohou regulovat své trávící procesy nezávisle na kořisti v podobě hmyzu či výkalů.

V obou tématech byla řešena regulace enzymatických aktivit v masožravých rostlinách a dospěli jsme zde k zajímavým a přínosným výsledkům. Navazující práce by se mohly soustředit na výzkum signálních drah masožravosti v řádu Lamiales (či jiných méně probádaných řádech masožravých rostlin) či na další mutualistické vztahy masožravých rostlin a živočichů vedoucí k obecnějšímu vhledu do fyziologických změn souvisejících se vzájemnou adaptací.

6. Seznam citované literatury

- Adam JH (1997). Prey spectra of Bornean *Nepenthes* species (Nepenthaceae) in Relation to their habitat. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 20: 121-134.
- Adamec L (2003). Zero water flow in the carnivorous genus *Genlisea*. *Carnivorous Plant Newsletter* 32: 46-48.
- Adamec L (2012). Firing and resetting characteristics of carnivorous *Utricularia reflexa* traps: physiological or only physical regulation of trap triggering? *Phyton; Annales Rei Botanicae* 52: 281-290.
- Adlassnig W, Koller-Peroutka M, Bauer S, Koshkin E, Lendl T, Lichtscheidl IK (2012). Endocytotic uptake of nutrients in carnivorous plants. *The Plant Journal* 71: 303-313.
- Albert VA, Williams SE, Chase MW (1992). Carnivorous plants: phylogeny and structural evolution. *Science* 257: 1491-1495
- An CI, Fukusaki EI, Kobayashi A (2001). Plasma-membrane H⁺-ATPases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco. *Planta* 212: 547-555.
- Arai N, Nishimura E, Kikuchi Y, Ohyama T (2015). Functional analyses of carnivorous plant-specific amino acid residues in S-like ribonucleases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 465: 108-112.
- Athuda SBP, Matsumoto K, Rajapakshe S, Kuribayashi M, Kojima M, Kubomura-Yoshida N, Iwamatsu A, Shibata C, Inoue H, Takahashi K (2004). Enzymic and structural characterization of nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases. *Biochemical Journal* 381: 295-306.
- Bauer U, Bohn HF, Federle W (2007). Harmless nectar source or deadly trap: *Nepenthes* pitchers are activated by rain, condensation and nectar. *Proceedings of the Royal Society B* 275: 259-265.
- Bauer U, Grafe TU, Federle W (2011). Evidence for alternative trapping strategies in two forms of the pitcher plant, *Nepenthes rafflesiana*. *Journal of Experimental Botany* 62: 3683-3692.
- Bazile V, Le Moguédec G, Marshall DJ, Gaume L (2015). Fluid physico-chemical properties influence capture and diet in *Nepenthes* pitcher plants. *Annals of Botany* 115: 705-716.
- Bemm F, Becker D, Larish C, Kreuzer I, Esalante-Perez M, Schulze WX, Ankenbrand M, Van de Weyer AL, Krol E, Al-Rasheid KA, Mithöfer A, Weber AP, Schultz J, Hedrich R (2016). Venus flytrap carnivorous lifestyle builds on herbivore defense strategies. *Genome Research* 26: 812-825.
- Bennett KF, Ellison AM (2009). Nectar, not colour, may lure insects to their death. *Biology Letters* 5: 469-472

- Bonhomme V, Pelloux-Prayer H, Jousselin E, Forterre Y, Labat JJ, Gaume L (2011). Slippery or sticky? Functional diversity in the trapping strategy of *Nepenthes* carnivorous plants. *New phytologist* 191: 545-554.
- Böhm J, Scherzer S, Krol E, Kreuzer I, von Meyer K, Lorey C, Mueller TD, Shabala L, Monte I, Solano R, Al-Rasheid KAS, Renneberg H, Shabala S, Neher E, Hedrich R (2016). The venus flytrap *Dionea muscipula* counts prey-induced action potentials to induce sodium uptake. *Current biology* 26: 286-295.
- Bohn HF, Federle W (2004). Insect aquaplaning: *Nepenthes* pitcher plants capture prey with the peristome, a fully wettable water-lubricated anisotropic surface. *PNAS* 101: 14138-14143.
- Butts CT, Bierma JC, Martin RW (2016). Novel proteases from the genome of the carnivorous plant *Drosera capensis*: Structural prediction and comparative analysis. *Proteins* 84: 1517-1533.
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25: 1327-1333.
- Capó-Bauçà S, Font-Carrascosa M, Ribas-Carbó M, Pavlovič A, Galmés J (2020). Biochemical and mesophyll diffusional limits to photosynthesis are determined by prey and root nutrient uptake in the carnivorous pitcher plant *Nepenthes x ventrata*. *Annals of Botany* 126: 25-37.
- Chamrád I, Simerský R, Běrešová L, Strnad M, Šebela M, Lenobel R (2014). Proteomic identification of a candidate sequence of wheat cytokinin-binding protein 1. *Journal of Plant Growth Regulation* 33: 896-902.
- Chi H, Sun RX, Yang B, Song CQ, Wang LH, Liu C, Fu Y, Yuan ZF, Wang HP, He SM, Dong MQ (2010). pNovo: *de novo* sequencing and identification using HCD spectra. *Journal of Proteome Research* 9: 2713-2724.
- Chin L, Chung AYC, Clarke C (2014). Interspecific variation in prey capture behavior by co-occurring *Nepenthes* pitcher plants. *Plant Signaling & Behaviour* 9: e27930.
- Chin L, Moran JA, Clarke C (2011). Trap geometry in three giant montane pitcher plant species from Borneo is a function of tree shrew body size. *New Phytologist* 186: 461-470.
- Chini A, Fonseca S, Fernández G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, García-Casado G, López-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, Micol JL, Solano R (2007). The JAZ family of repressors is missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448: 666-671.
- Clarke C, Moran JA, Lee CC (2011). *Nepenthes baramensis* (*Nepenthaceae*) – a new species from north-western Borneo. *Blumea* 56: 229-233.

- Clarke CM (1997). *Nepenthes* of Borneo. Natural History Publication, Kota Kinabalu, Malaysia.
- Clarke CM, Bauer U, Lee CC, Tuen AA, Rembold K, Moran JA (2009). Tree shrew lavatories: a novel nitrogen sequestration strategy in a tropical pitcher plant. *Biology Letters* 5: 632-635.
- Creelman RA, Mullet JE (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 355-381.
- Darwin C (1875). Insectivorous plants. London: John Murray.
- Eilenberg H, Pnini-Cohen S, Schuster S, Movtchan A, Zilberstein A (2006). Isolation and characterization of chitinase genes from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *Journal of Experimental Botany* 57: 2775-2784.
- Ellison AM, Gotelli NJ (2009). Energetics and the evolution of carnivorous plants – Darwin's 'most wonderful plants in the world'. *Journal of Experimental Botany* 60: 19-42.
- Escalante-Pérez M, Krol E, Stange A, Geiger D, Al-Rasheid KAS, Hause B, Neher E, Hedrich R (2011). A special pair of phytohormones controls excitability, slow closure, and external stomach formation in the Venus flytrap. *PNAS* 108: 15492-15497.
- Fleischmann A, Roccia A (2018). Systematics and evolution of Lentibulariaceae: I. Pinguicula. In: Ellison AM, Adamec L, eds. Carnivorous plants: Physiology, ecology and evolution. *Oxford: Oxford University Press*, 70-80.
- Fleischmann A, Schlauer J, Smith SA, Givnish TJ (2018). Evolution of carnivory in angiosperms. In: Ellison AM, Adamec L, eds. Carnivorous plants: Physiology, ecology, and evolution. *Oxford: Oxford University Press*, 22-41.
- Floková K, Tarkowská D, Miersch O, Strnad M, Wasternack C, Novák O (2014). UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry* 105: 147-157.
- Fonseca A, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* 5: 344-350.
- Frank A, Pevzner P (2005). PepNovo: *de novo* peptide sequencing via probabilistic network modelling. *Analytical Chemistry* 77: 964-973.
- Friday LE (1991). The Size and Shape of Traps of *Utricularia vulgaris* L. *Functional Ecology* 5: 602-607.
- Fukushima K, Fang X, Alvarez-Ponce D, Cai H, Carretero-Paulet L, Chen C, Chang TH, Farr KM, Fujita T, Hiwatashi Y, Hoshi Y, Imai T, Kasahara M, Librado P, Mao L, Mori H, Nishiyama T, Nozawa M, Pálfalvi G,

Pollard ST, Rozas J, Sánchez-Gracia A, Sankoff D, Shibata TF, Shigenobu S, Sumikawa N, Uzawa T, Xie M, Zheng C, Pollock DD, Albert VA, Li S, Hasebe M (2017). Genome of the pitcher plant *Celophatus* reveals genetic changes associated with carnivory. *Nature Ecology & Evolution* 1: 0059.

Funkhouser JD, Aronson Jr NN (2007). Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evolutionary Biology* 7: 96.

Gallie DR, Chang SC (1997). Signal transduction in the carnivorous plant *Sarracenia purpurea* (Regulation of secretory hydrolase expression during development and in response to resources). *Plant Physiology* 115: 1461-1471.

Gaume L, Di Giusto B (2009). Adaptive significance and ontogenetic variability of the waxy zone in *Nepenthes rafflesiana*. *Annals of Botany* 104: 1281-1291.

Gaume L, Forterre Y (2007). A viscoelastic deadly fluid in carnivorous pitcher plants. *PLoS ONE* 2: e1185.

Gaume L, Gorb S, Rowe N (2002). Function of epidermal surfaces in the trapping efficiency of *Nepenthes alata* pitchers. *New Phytologist* 156: 479-489

Gaume L., Perret P, Gorb E, Gorb S, Labat JJ, Rowe N. (2004). How do plant waxes cause flies to slide? Experimental tests of wax-based trapping mechanisms in three pitfall carnivorous plants. *Arthropod Structure & Development* 33: 103-111.

Givnish TJ (2015). New evidence on the origin of carnivorous plants. *PNAS* 112: 10-11

Gorb E, Kastner V, Peressadko A, Arzt E, Gaume L, Rowe N, Gorb S (2004). Structure and properties of the glandular surface in the digestive zone of the pitcher in the carnivorous plant *Nepenthes ventrata* and its role in insect trapping and retention. *Journal of Experimental Biology* 207: 2947-2963.

Grafe TU, Schöner CR, Kerth G, Junaidi A, Schöner MG (2011). A novel resource-service mutualism between bats and pitcher plants. *Biology Letters* 7: 436-439.

Greenwood M, Clarke C, Lee CC, Gunsalam A, Clarke RH (2011). A unique resource mutualism between the giant Bornean pitcher plant, *Nepenthes rajah*, and members of a small mammal community. *PLoS ONE* 6: e21114.

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

Harder R, Zemlin I (1968). Blütenbildung von *Pinguicula lusitanica* in vitro durch Fütterung mit Pollen. *Planta* 78: 72-78

- Hatano N, Hamada T (2008). Proteome analysis of pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Journal of Proteome Research* 7: 809-816.
- Hatano N, Hamada T (2012). Proteomic analysis of secreted protein induced by component of prey in pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Journal of Proteomics* 75: 4844-4852.
- Hedrich R, Neher E (2018). Venus flytrap: How an excitable, carnivorous plant works. *Trends in Plant Science* 23: 220-234.
- Herrera MLG, Ramírez PN, Mirón ML (2006). Ammonia excretion increased and urea excretion decreased in urine of a New World nectarivorous bat with decreased nitrogen intake. *Physiological and biochemical Zoology* 79: 801-809.
- Heslop-Harrison Y (2004). *Pinguicula* L. *Journal of Ecology* 92: 1071-1118.
- Heslop-Harrison Y, Heslop-Harrison J (1980). Chloride ion movement and enzyme secretion from the digestive glands of *Pinguicula*. *Annals of Botany* 45, 729-731.
- Heslop-Harrison Y, Heslop-Harrison J (1981). The digestive glands of *Pinguicula*: structure and cytochemistry. *Annals of Botany* 47: 293-319.
- Heslop-Harrison Y, Knox RB (1971). A cytochemical study of the leaf-gland enzymes of insectivorous plants of the genus *Pinguicula*. *Planta* 96: 183-211.
- Higashi S, Nakashima A, Ozaki H, Abe M, Uchiumi T (1993). Analysis of feeding mechanism in pitcher of *Nepenthes hybrida*. *Journal of Plant Research* 106: 47-54.
- Howe G.A. (2010) Jasmonates. In: Davies P.J., ed. *Plant Hormones*. Dordrecht: Springer, 646-680.
- Ilík P, Hlaváčková V, Krchňák P, Nauš J (2010). A low-noise multi-channel device for monitoring of systematic electrical signal propagation in plants. *Biologia Plantarum* 54: 185-190.
- Iriti M, Faoro F (2008). Abscisic acid is involved in chitosan-involved resistance to tobacco necrosis virus (TNV). *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 1106-1111.
- Iriti M, Picchi V, Rossoni M, Gomasasca S, Ludwig N, Gargano M, Faoro F (2009). Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. *Environmental and Experimental Botany* 66: 493-500.

- Ishisaki K, Arai S, Hamada T, Honda Y (2012a). Biochemical characterization of recombinant plant class III chitinase from the pitcher of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Carbohydrate Research* 361: 170-174.
- Ishisaki K, Honda Y, Taniguchi H, Hatano N, Hamada T (2012b). Heterogenous expression and characterization of a plant class IV chitinase from the pitcher of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Glycobiology* 22: 345-351.
- Jakšová J, Libiaková M, Bokor B, Petřík I, Novák O, Pavlovič A (2020). Taste for protein: Chemical signal from prey stimulates enzyme secretion through jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap. *Plant Physiology and Biochemistry* 146: 90-97.
- Jürgens A, El-Sayed AM, Suckling DM (2009). Do carnivorous plants use volatiles for attracting prey insects? *Functional Ecology* 23: 875-887.
- Kadek A, Tretyachenko V, Mrazek H, Ivanova L, Halada P, Rey M, Schreimer DC, Man P (2014). Expression and characterization of plant aspartic protease nepenthesin-1 from *Nepenthes gracilis*. *Protein Expression and Purification* 95: 121-128.
- Kaya M, Seyyar O, Baran T, Turkes T (2014). Bat guano as new and attractive chitin and chitosan source. *Frontiers in Zoology* 11: 59.
- Kim SC, Chen Y, Mirza S, Xu Y, Lee J, Liu P, Zhao Y (2006). A clean, more efficient method for in-solution digestion of protein mixtures without detergent or urea. *Journal of Proteome Research* 5: 3446-3452.
- Kocáb O, Jakšová J, Novák O, Petřík I, Lenobel R, Chamrád I, Pavlovič A (2020). Jasmonate-independent regulation of enzyme activity in the carnivorous butterwort *Pinguicula x Tina*. *Journal of Experimental Botany* 71: 3749-3758.
- Krausko M, Perutka Z, Šebela M, Šamajová O, Šamaj J, Novák O, Pavlovič A (2017). The role of electrical and jasmonate signalling in the recognition of captured prey in the carnivorous sundew plant *Drosera capensis*. *New Phytologist* 213: 1818-1835.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee L, Zhang Y, Ozar B, Sensen CW, Schreimer DC (2016). Carnivorous nutrition in pitcher plants (*Nepenthes* spp.) via an unusual complement of endogenous enzymes. *Journal of Proteome Research* 15: 3108-3117.
- Legendre L (2000). The genus *Pinguicula* L. (*Lentibulariaceae*): an overview. *Acta Botanica Gallica* 147: 77-95.
- Lim YS, Schöner CR, Schöner MR, Kerth G, Thornham DG, Scharmann M, Grafe TU (2014). How a pitcher plant

facilitates roosting of mutualistic woolly bats. *Evolutionary Ecology Research* 16: 581-591.

Libiaková M, Floková K, Novák O, Slovák L, Pavlovič A (2014). Abundance of cysteine endopeptidase dionain in digestive fluid of Venus flytrap (*Dionea muscipula* Ellis) is regulated by different stimuli from prey through jasmonates. *PLoS ONE* 9: e104424.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402-408.

Ma B. (2015). Novor: real-time peptide *de novo* sequencing software. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 26: 1885-1894.

Matušíková I, Salaj J, Moravčíková J, Mlynářová L, Nap JP, Libantová J (2005). Tentacles of in vitro-grown round-leaf sundew (*Drosera rotundifolia* L.) show induction of chitinase activity upon mimicking the presence of prey. *Planta* 222: 1020-1027.

Merbach MA, Merbach DJ, Maschwitz U, Booth WE, Fiala B, Zizka G (2002). Mass march of termites into the deadly trap. *Nature* 415: 36-37.

Merbach MA, Zizka G, Fiala B, Merbach D, Booth WE, Maschwitz U (2007). Why a carnivorous plant cooperates with an ant – selective defense against pitcher destroying weevils in the myrmecophytic pitcher plant *Nepenthes bicalcarata* hook. *F. Ecotropica* 13: 45-56.

Michalko J, Matušiková I (2012). Study on the role of glucanases in digestion of carnivorous plant *Drosera rotundifolia* L. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 1: 671-678.

Michalko J, Renner T, Mészáros P, Socha P, Moravčíková J, Blehová A, Libantová J, Polóniová Z, Matušiková I (2017). Molecular characterization and evolution of carnivorous sundew (*Drosera rotundifolia* L.) class V β -1,3-glucanase. *Planta* 245: 77-91.

Michalko J, Socha P, Mészáros P, Blehová A, Libantová J, Moravčíková J, Matušiková I (2013). Glucan-rich diet is digested and taken up by the carnivorous sundew (*Drosera rotundifolia* L.): implication for a novel role of plant β -1,3-glucanases. *Planta* 238: 715-725.

Mithöfer A, Reichelt M, Nakamura Y (2014). Wound and insect-induced jasmonate accumulation in carnivorous *Drosera capensis*: two sides of the same coin. *Plant Biology* 16: 982-987.

Moran JA (1996). Pitcher dimorphism, prey composition and the mechanisms of prey attraction in the pitcher plant *Nepenthes rafflesiana* in Borneo. *Journal of Ecology* 84: 515-525.

- Moran JA, Clarke CM, Hawkins BJ (2003). From carnivore to detritivore? Isotopic evidence for leaf utilization by the tropical pitcher plant *Nepenthes ampullaria*. *International Journal of Plant Sciences* 164: 635-639.
- Moran JA, Hawkins BJ, Gowen BE, Robbins SL (2010). Ion fluxes across the pitcher walls of three Bornean *Nepenthes* pitcher plant species: flux rates and gland distribution patterns reflect nitrogen sequestration strategies. *Journal of Experimental Botany* 61: 1365-1374.
- Moran JA, Merbach MA, Livingston NJ, Clarke CM, Booth WE (2001). Termite prey specialization in the pitcher plant *Nepenthes albomarginata* – evidence from stable isotope analysis. *Annals of Botany* 88: 307-311.
- Mousavi SAR, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S, Farmer EE (2013). GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* 500: 422-426.
- Muth T, Weilnböck L, Rapp E, Huber CG, Martens L, Vaudel M, Barsnes H (2014). DeNovoGUI: an open source graphical user interface for *de novo* sequencing of tandem mass spectra. *Journal of Proteome Research* 13:1143-1146.
- Nishimura E, Kawahara M, Kodaira R, Kume M, Arai N, Nishikawa J, Ohshima T (2013). S-like ribonuclease gene expression in carnivorous plants. *Planta* 238: 955-967.
- Nishimura E, Jumyo S, Arai N, Kanna K, Kume M, Nishikawa J, Tanase J, Ohshima T (2014). Structural and functional characteristics of S-like ribonucleases from carnivorous plants. *Planta* 240: 147-159.
- Okabe T, Iwakiri Y, Mori H, Ogawa T, Ohshima T (2005). An S-like ribonuclease gene is used to generate a trap-leaf enzyme in the carnivorous plant *Drosera Adelsii*. *FEBS Letters* 579: 5729-5733.
- Osunkoya OO, Daud SD, Di-Giusto B, Wimmer FL, Holige TM (2007). Construction costs and physico-chemical properties of the assimilatory organs of *Nepenthes* species in Northern Borneo. *Annals of Botany* 99: 895-906.
- Owen Jr. TP, Lennon KA, Santo MJ, Anderson AN (1999). Pathways for nutrient transport in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Annals of Botany* 84: 459-466.
- Palfalvi G, Hackl T, Terhoeven N, Shibata TF, Nishiyama T, Ankenbrand M, Becker D, Förster F, Freund M, Iosip A, Kreuzer I, Saul F, Kamida C, Fukusima K, Shigenobu S, Tamada Y, Adamec L, Hoshi Y, Ueda K, Winkelmann T, Fuchs J, Schubert I, Schwacke R, Al-Rasheid K, Schultz J, Hasebe M, Hedrich R (2020). Genomes of the Venus flytrap and close relatives unveil the roots of plant carnivory. *Current Biology* 30: 2312-2320.
- Paszota P, Escalante-Perez M, Thomsen LR, Risør MW, Dembski A, Sanglas L, Nielsen TA, Karring H, Thøgersen, Hedrich R, Enghild JJ, Kreuzer I, Sanggaard KW (2014). Secreted major Venus flytrap chitinase enables digestion of Arthropod prey. *Biochimica et Biophysica Acta* 1844: 374-383.

- Pavlovič A, Jakšová J, Novák O (2017). Triggering a false alarm: wounding mimics prey capture in the carnivorous Venus flytrap (*Dionea muscipula*). *New Phytologist* 216: 927-938.
- Pavlovič A, Krausko M, Adamec L (2016). A carnivorous sundew plant prefers protein over chitin as a source of nitrogen from its traps. *Plant Physiology and Biochemistry* 104: 11-16.
- Pavlovič A, Libiaková M, Bokor B, Jakšová J, Petřík I, Novák O, Baluška F (2020). Anaesthesia with diethyl ether impairs jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionea muscipula*) (2020). *Annals of Botany* 125: 173-183.
- Pavlovič A, Masarovičová E, Hudák J (2007). Carnivorous syndrome in asian pitcher plants of the genus *Nepenthes*. *Annals of Botany* 100: 527-536.
- Pavlovič A, Mithöfer A (2019). Jasmonate signalling in carnivorous plants: copycat of plant defence mechanisms. *Journal of Experimental Botany* 70, 3379-3389.
- Pavlovič A, Saganová M (2015). A novel insight into the cost-benefit model for the evolution of botanical carnivory. *Annals of Botany* 115: 1075-1092.
- Pavlovič A, Slováková L, Šantrůček J (2011). Nutritional benefit from leaf litter utilization in the pitcher plant *Nepenthes ampullaria*. *Plant, Cell & Environment* 34: 1865-1873.
- Plachno BJ, Adamec L, Lichtscheidl IK, Peroutka M, Adlassnig W, Vrba J (2006). Fluorescence labelling of phosphatase activity in digestive glands of carnivorous plants. *Plant Biology* 8: 813-820.
- Poppinga S, Hartmeyer SRH, Seidel R (2012). Capturing tentacles in sticky carnivorous plant. *PLoS One* 7: e45735
- Procko C, Murthy S, Keenan WT, Mousavi SAR, Dabi T, Coombs A, Procko E, Baird L, Patapoutian A, Chory J (2021). Stretch-activated ion channels identified in the touch-sensitive structures of carnivorous Droseraceae plants. *eLife* 10: e64250
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 597-635.
- Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y (2007). Protocol for micro-purification, enrichment, prefractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols* 2: 1896-1906.
- Renner T, Specht CD (2012). Molecular and functional evolution of class I chitinases for plan carnivory in the Caryophyllales. *Molecular Biology and Evolution* 29: 2971-2985.

Rey M, Yang M, Lee L, Zhang Y, Sheff JG, Sensen CW, Mrazek H, Halada P, Man P, McCarville JL, Verdu EF, Schriemer DC (2016). Addressing proteolytic efficiency in enzymatic degradation therapy for celiac disease. *Scientific Reports* 6: 30980.

Risør MW, Thomsen LR, Sanggaard KW, Nielsen TA, Thøgersen IB, Lukassen MV, Rossen L, Garcia-Ferrer I, Guevara T, Scavenius C, Meinjohanns E, Gomis-Rüth FX, Enghild JJ (2016). Enzymatic and structural characterization of the major endopeptidase in the Venus flytrap digestion fluid. *Journal of Biological Chemistry* 291: 2271-2287.

Rottloff S, Miguel S, Biteau F, Nisse E, Hammann P, Kuhn L, Chicher J, Bazile V, Gaume L, Mignart B, Hehn A, Bourgaud F (2016). Proteome analysis of digestive fluids in *Nepenthes* pitchers. *Annals of Botany* 117: 479-495.

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

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

Schaefer HM, Ruxton GD (2008). Fatal attraction: carnivorous plants roll out the red carpet to lure insects. *Biology Letters* 4: 153-155.

Schägger H (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* 1: 16-22.

Schaller F, Schaller A, Stintzi A (2004). Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *Journal of plant growth regulation* 23: 179-199.

Scharmann M, Grafe TU (2013). Reinstatement of *Nepenthes hemsleyana* (*Nepenthaceae*), an endemic pitcher plant from Borneo, with a discussion of associated *Nepenthes* taxa. *Blumea* 58: 8-12.

Scharmann M, Thornham DG, Grafe TU, Federle W (2013). A novel type of nutritional ant-plant interaction: ant partners of carnivorous pitcher plants prevent nutrient export by dipterian pitcher infauna. *PLoS ONE* 8(5): e63556

Schöner CR, Schöner MG, Grafe TU, Clarke CM, Dombrowski L, Tan MC, Kerth G (2017a). Ecological outsourcing: a pitcher plant benefits from transferring pre-digestion of prey to a bat mutualist. *Journal of Ecology* 105: 400-411.

Schöner CR, Schöner MG, Kerth G, Grafe TU (2013). Supply determines demand: influence of partner quality and quantity on the interactions between bats and the pitcher plants. *Oecologia* 173: 191-202.

Schöner CR, Schöner MG, Kerth G, Suhaini SN, Grafe TU (2015b). Low costs reinforce the mutualism between bats and pitcher plants. *Zoologischer Anzeiger – A Journal of Comparative Biology* 258: 1-5.

Schöner MR, Schöner CR, Ermisch R, Puechmaille SJ, Grafe TU, Tan MC, Kerth G (2017b). Stabilization of a bat-pitcher plant mutualism. *Scientific Reports* 7: 13170.

Schöner MR, Schöner CR, Simon R, Grafe TU, Puechmaille SJ, Ji LL, Kerth G (2015a). Bats are acoustically attracted to mutualistic carnivorous plants. *Current Biology* 25: 1911-1916.

Schröder CU, Lee L, Rey M, Sarpe V, Man P, Sharma S, Zabrouskov II V, Larsen B, Schriemer DC (2017). Neprosin, a selective prolyl endoprotease for bottom-up proteomics and histone mapping. *Molecular & cellular proteomics* 6: 1162-1171.

Schulze W, Frommer WB, Ward JM (1999). Transporters for ammonium, amino acids and peptides are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes*. *The Plant Journal* 17: 637-646.

Schulze WX, Sanggaard KW, Kreuzer I, Knudsen AD, Bemm F, Thogersen IB, Bräutigam A, Thomsen LR, Schliesky S, Dyrland TF, Escalante-Perez M, Becker D, Schultz J, Karring H, Weber A, Hojrup P, Hedrich R, Enghild JJ (2012). The protein composition of the digestive fluid from the Venus flytrap sheds light on prey digestion mechanisms. *Molecular & Cellular Proteomics* 11: 1306-1319.

Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu FF, Sharon M, Browse J, He SY, Rizo J, Howe GA, Zheng N (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* 468: 400-405.

Shevchenko A, Tomas H, Havli J, Olsen JV, Mann M (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols* 1: 2856-2860.

Simerský R, Chamrád I, Kania J, Strnad M, Šebela M, Lenobel R (2017). Chemical proteomic analysis of 6-benzylaminopurine molecular partners in wheat grains. *Plant Cell Reports* 36: 1561-1570.

Stephenson P, Hogan J (2006). Cloning and characterization of a ribonuclease, a cysteine proteinase, and an aspartic proteinase from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes ventricosa blanco*. *International Journal of plant species* 167: 239-248.

Studnicka M, Hejny S (1992). Does *Pinguicula bohemica* exist? *Carnivorous Plant Newsletter* 21: 64-67.

Suda H, Mano H, Toyota M, Fukushima K, Mimura T, Tsutsui I, Hedrich R, Tamada Y, Hasebe M (2020). Calcium dynamics during trap closure visualized in transgenic Venus flytrap. *Nature Plants* 6: 1219-1224.

- Šebela M, Štosová T, Havliš J, Wielsch N, Thomas H, Zdráhal Z, Shevchenko A (2006). Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. *Proteomics* 6: 2959-2963.
- Tabb DL, Ma ZQ, Martin DB, Ham AJL, Chambers MC (2008). DirecTag: accurate sequence tags from peptide MS/MS through statistical scoring. *Journal of Proteome Research* 7: 3838-3846.
- Takahashi K, Matsumoto K, Nishii W, Muramatsu M, Kubota K, Shibata C, Athuda SBP (2009). Comparative studies on the acid proteinase activities in the digestive fluids of *Nepenthes*, *Celophatus*, *Dionea*, and *Drosera*. *Carnivorous Plant Newsletter* 38: 75-82.
- Takahashi K, Suzuki T, Nishii W, Kubota K, Shibata C, Isobe T, Dohmae N (2011). A cysteine endopeptidase (“dionain“) is involved in the digestive fluid of *Dionea muscipula* (Venus’s Fly-trap). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 75: 346-348.
- Takahashi K, Nishii W, Shibata C (2012). The digestive fluid of *Drosera indica* contains a cysteine endopeptidase (“Droserain“) similar to dionain from *Dionea muscipula*. *Carnivorous Plant Newsletter* 41: 132-134.
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COII} complex during jasmonate signalling. *Nature* 448: 661-665.
- Thornham DG, Smith JM, Grafe TU, Faderle W (2012). Setting the trap: cleaning behaviour of *Camponotus schmitzi* ants increase long-term capture efficiency of their pitcher plant host, *Nepenthes bicalcarata*. *Functional Ecology* 26: 11-19.
- Tuppo L, Giangrieco I, Alessandri C, Ricciardi T, Rafaiani C, Ciancamerla M, Ferrara R, Zennaro D, Bernardi ML, Tamburrini M, Mari A, Ciardiello MA (2018). Pomegranate chitinase III: identification of a new allergen and analysis of sensitization patterns to chitinases. *Molecular Immunology* 103:89-95.
- Ubhayasekera W, Rawat R, Ho SWT, Wiwger M, Arnold SV, Chye ML, Mowbray SL (2009). The first crystal structures of a family 19 class IV chitinase: the enzyme from Norway spruce. *Plant Molecular Biology* 71: 277-289
- Vassilyev AE, Muravnik LE (1988a). The ultrastructure of the digestive glands in *Pinguicula vulgaris* L. (*Lentibulariaceae*) relative to their function. I. The changes during maturation. *Annals of Botany* 62: 329-341.
- Vassilyev AE, Muravnik LE (1988b). The ultrastructure of the digestive glands in *Pinguicula vulgaris* L. (*Lentibulariaceae*) relative to their function. II. The changes on stimulation. *Annals of Botany* 62: 343-351.
- Volkov AG, Adesina T, Markin VS, Jovanov E (2008). Kinetics and mechanism of *Dionea muscipula* trap closing.

Plant Physiology 146: 694-702.

Wan Zakaria WNA, Aizat WM, Goh HH, Noor NM (2019). Protein replenishment in pitcher fluids of *Nepenthes x ventrata* revealed by quantitative proteomics (SWATH-MS) informed by transcriptomics. *Journal of Plant research* 132: 681-694.

Yilamujiang A, Reichelt M, Mithöfer A (2016). Slow food: insect prey and chitin induce phytohormone accumulation and gene expression in carnivorous *Nepenthes* plants. *Annals of Botany* 118: 369-375.

Yilamujiang A, Zhu A, Ligabue-Braun R, Bartram S, Witte CP, Hedrich R, Hasabe M, Schöner CR, Schöner MG, Kerth G, Carlini CR, Mithöfer A (2017). Coprophagous features in carnivorous *Nepenthes* plants: a task for ureases. *Scientific Reports* 7: 11647.

Young EB, Sielicki J, Grothjan JJ (2018). Regulation of hydrolytic enzyme activity in aquatic microbial communities hosted by carnivorous pitcher plants. *Microbial Ecology* 76: 885-898.

Zulkapli MM, Ghani NSA, Ting TY, Aizat WM, Goh HH, (2021). Transcriptomic and proteomic analyses of *Nepenthes ampullaria* and *Nepenthes rafflesiana* reveal parental molecular expression in the pitchers of their hybrid, *Nepenthes x hookeriana*. *Frontiers in Plant Science*: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.625507>.

7. Publikované články (přílohy)



RESEARCH PAPER

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

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

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

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

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

* Correspondence: andrej.pavlovic@upol.cz

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

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

Abstract

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

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

Introduction

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

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

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

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

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

Materials and methods

Plant material and experimental setup

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

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

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



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

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

Extracellular recording of electrical signals

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

Measurements of enzyme activities

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

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

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

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

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

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

SDS-PAGE electrophoresis

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

Proteomic analysis of digestive fluid

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

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

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

Quantification of phytohormones

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

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

Statistical analyses

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

Results

Electrical signaling

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

Insect prey-induced enzyme activity

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

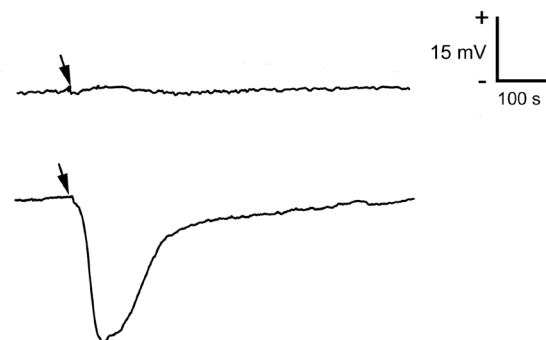


Fig. 2. Extracellular membrane potential in response to prey (*Drosophila melanogaster*) applied on the trap surface (upper trace) and wounding (lower trace) in *Pinguicula* \times *Tina*. Arrows indicate the time point of stimulus application. These representative records are shown from five independent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

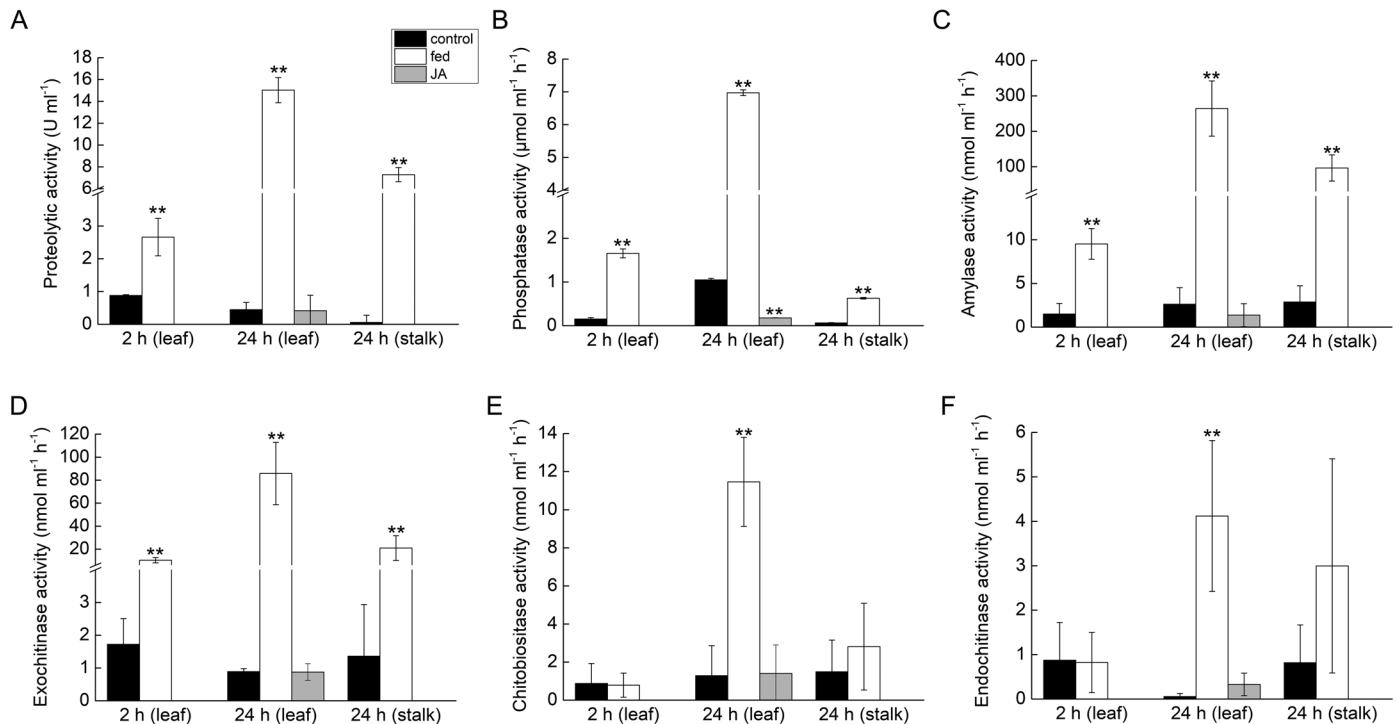


Fig. 3. Enzyme activities in *Pinguicula* × *Tina* in response to insect prey feeding and jasmonic acid (JA) application. Enzyme activities were measured 2 h and 24 h after feeding in leaf exudates, 24 h after feeding in flower stalk exudates, and 24 h after the application of 1 mM JA on the trap surface.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

Composition of digestive fluid

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

Jasmonates are not responsible for induction of enzyme activity

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

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

Rapid efflux of water is responsible for induction of phosphatase activity

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

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

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

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

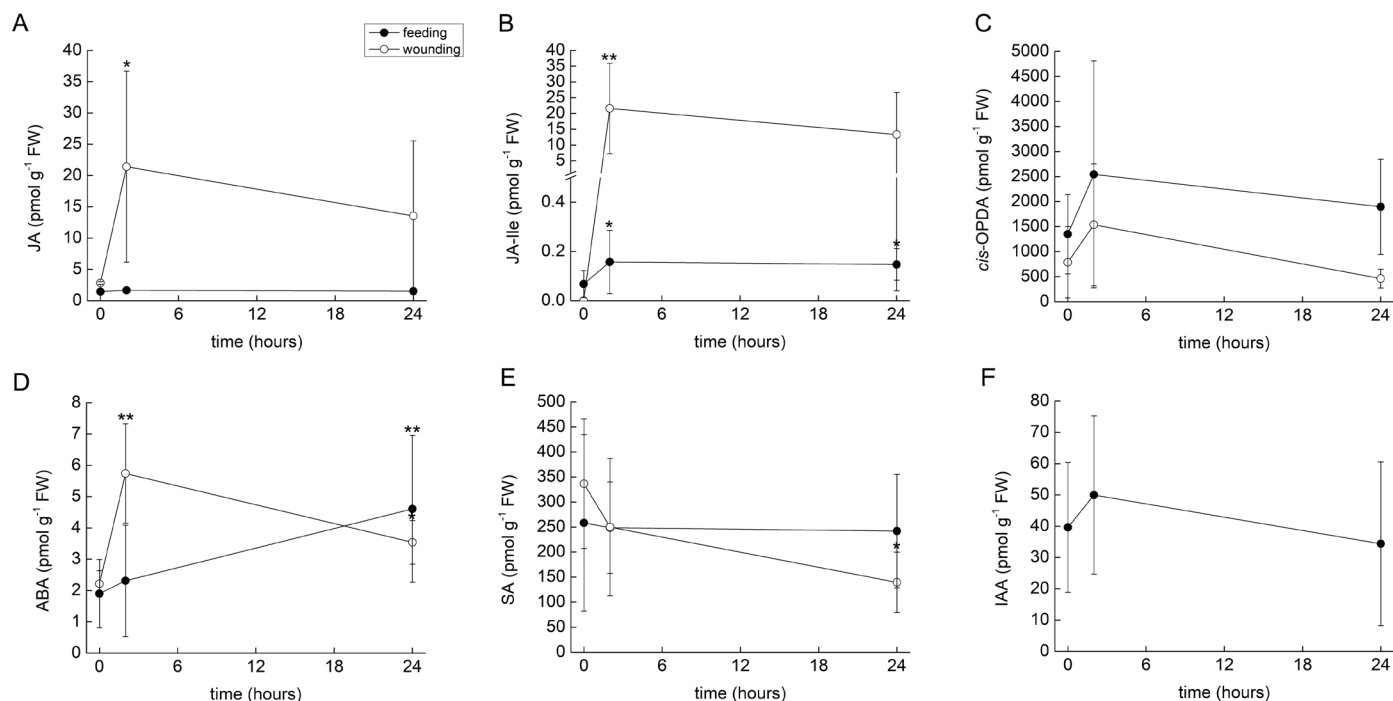


Fig. 4. Tissue levels of phytohormones in *Pinguicula* × *Tina* in response to feeding and wounding. (A) Jasmonic acid (JA). (B) Isoleucine conjugate of jasmonic acid (JA-Ile). (C) *cis*-12-oxophytodienoic acid (*cis*-OPDA). (D) Abscisic acid (ABA). (E) Salicylic acid (SA). (F) Indole-3-acetic acid (IAA).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

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

Discussion

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

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

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

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

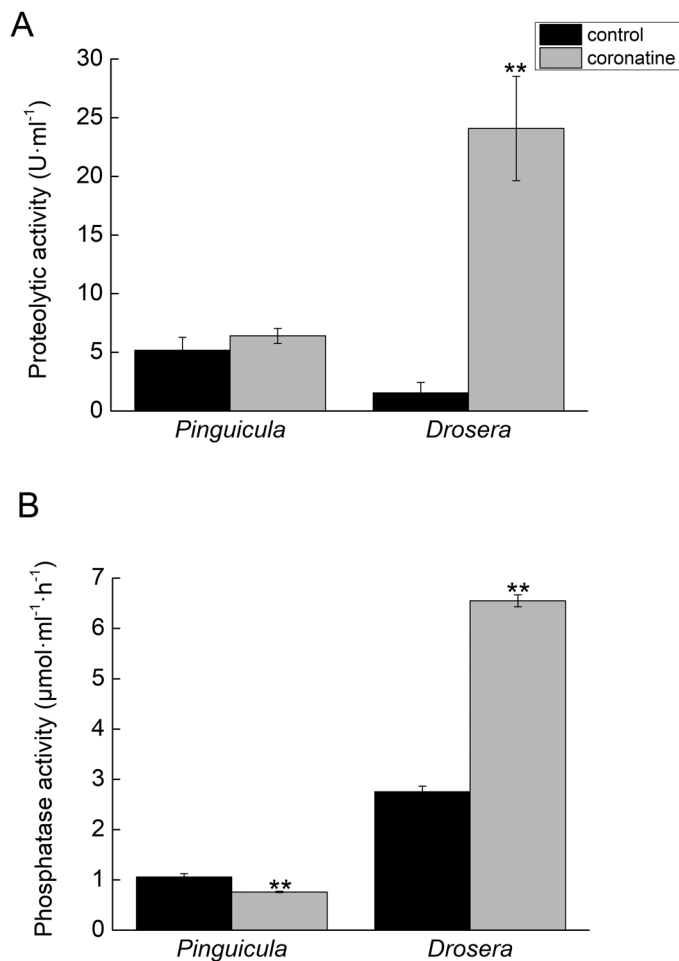


Fig. 5. Effect of application of 100 μM coronatine on enzyme activities in leaf exudates of *Pinguicula* × *Tina* and *Drosera capensis*. (A) Protease activity. (B) Phosphatase activity. Data are mean \pm SD ($n=5$). Significant differences between control and coronatine-treated plants were evaluated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

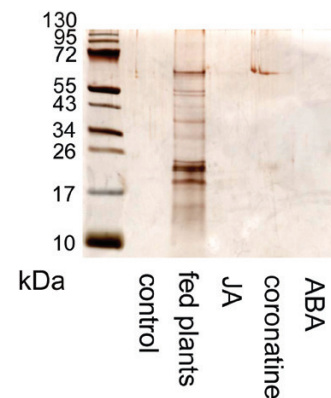


Fig. 6. Silver-stained SDS-PAGE of digestive fluid released in response to different stimuli in *Pinguicula* × *Tina*. The same volume of digestive fluid 24 h after different treatments was electrophoresed and the proteins were separated in 10% (v/v) SDS-polyacrylamide gel and silver stained. ABA, abscisic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

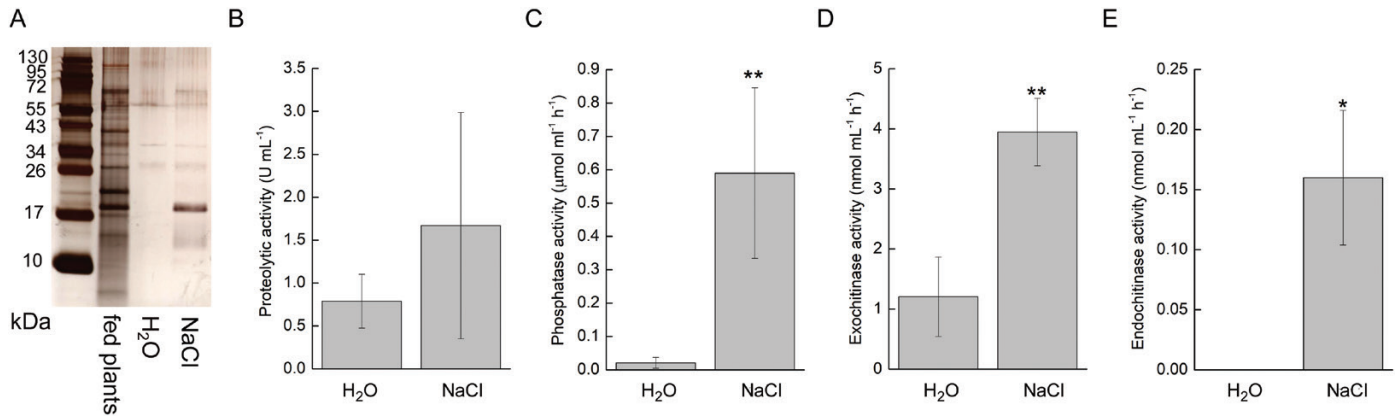


Fig. 7. Silver-stained SDS-PAGE and enzyme activities in the digestive fluid released in response to salt application in *Pinguicula* × *Tina*. (A) Protein profile resolved by SDS-PAGE. The same volume of digestive fluids 15 minutes after H₂O and 5% NaCl application and 24 h after feeding was electrophoresed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

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

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

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

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

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

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

Conclusions

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

Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online.

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

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

Acknowledgements

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

Author contributions

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

References

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Escalante-Pérez M, Krol E, Stange A, Geiger D, Al-Rasheid KA, Hause B, Neher E, Hedrich R. 2011. A special pair of phytohormones controls excitability, slow closure, and external stomach formation in the Venus flytrap. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **108**, 15492–15497.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Heslop-Harrison Y, Knox RB. 1971. A cytochemical study of the leaf-gland enzymes of insectivorous plants of the genus *Pinguicula*. *Planta* **96**, 183–211.
- Ilík P, Hlaváčková V, Krchňák P, Nauš J. 2010. A low-noise multichannel device for the monitoring of systemic electrical signal propagation in plants. *Biologia Plantarum* **54**, 185–190.
- Iriti M, Faoro F. 2008. Abscisic acid is involved in chitosan-induced resistance to tobacco necrosis virus (TNV). *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 1106–1111.
- Iriti M, Valentina Picchi V, Rossoni M, Gomasasca S, Ludwig N, Gargano M, Faoro F. 2009. Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. *Environmental and Experimental Botany* **66**, 493–500.
- Jakšová J, Libiaková M, Bokor B, Petřík I, Novák O, Pavlovič A. 2020. Taste for protein: chemical signal from prey activates jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis). *Plant Physiology and Biochemistry* **146**, 90–97.
- Kim SC, Chen Y, Mirza S, Xu Y, Lee J, Liu P, Zhao Y. 2006. A clean, more efficient method for in-solution digestion of protein mixtures without detergent or urea. *Journal of Proteome Research* **5**, 3446–3452.
- Koller-Peroutka M, Lendl T, Watzka M, Adlassnig W. 2015. Capture of algae promotes growth and propagation in aquatic *Utricularia*. *Annals of Botany* **115**, 227–236.
- Krausko M, Perutka Z, Šebela M, Šamajová O, Šamaj J, Novák O, Pavlovič A. 2017. The role of electrical and jasmonate signalling in the recognition of captured prey in the carnivorous sundew plant *Drosera capensis*. *New Phytologist* **213**, 1818–1835.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Legendre L. 2000. The genus *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae): an overview. *Acta Botanica Gallica* **147**, 77–95.
- Lee L, Zhang Y, Ozar B, Sensen CW, Schriemer DC. 2016. Carnivorous nutrition in pitcher plants (*Nepenthes* spp.) via an unusual complement of endogenous enzymes. *Journal of Proteome Research* **15**, 3108–3117.
- Libiaková M, Floková K, Novák O, Slováková L, Pavlovič A. 2014. Abundance of cysteine endopeptidase dionain in digestive fluid of Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis) is regulated by different stimuli from prey through jasmonates. *PLoS One* **9**, e104424.
- Ma B. 2015. Novor: real-time peptide de novo sequencing software. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **26**, 1885–1894.
- Matušíková I, Salaj J, Moravčíková J, Mlynárová L, Nap JP, Libantová J. 2005. Tentacles of in vitro-grown round-leaf sundew (*Drosera rotundifolia* L.) show induction of chitinase activity upon mimicking the presence of prey. *Planta* **222**, 1020–1027.
- Michalko J, Renner T, Mészáros P, Socha P, Moravčíková J, Blehová A, Libantová J, Polóniová Z, Matušiková I. 2017. Molecular characterization and evolution of carnivorous sundew (*Drosera rotundifolia* L.) class V β -1,3-glucanase. *Planta* **245**, 77–91.
- Muth T, Weilnböck L, Rapp E, Huber CG, Martens L, Vaudel M, Barsnes H. 2014. DeNovoGUI: an open source graphical user interface for *de novo* sequencing of tandem mass spectra. *Journal of Proteome Research* **13**, 1143–1146.
- Nakamura Y, Reichelt M, Mayer VE, Mithöfer A. 2013. Jasmonates trigger prey-induced formation of ‘outer stomach’ in carnivorous sundew plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **280**, 20130228.
- Nishimura E, Kawahara M, Kodaira R, Kume M, Arai N, Nishikawa J, Ohyama T. 2013. S-like ribonuclease gene expression in carnivorous plants. *Planta* **238**, 955–967.
- Pavlovič A, Jakšová J, Novák O. 2017. Triggering a false alarm: wounding mimics prey capture in the carnivorous Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). *New Phytologist* **216**, 927–938.
- Pavlovič A, Libiaková M, Bokor B, Jakšová J, Petřík I, Novák O, Baluška F. 2020. Anaesthesia with diethyl ether impairs jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). *Annals of Botany* **125**, 173–183.
- Pavlovič A, Mithöfer A. 2019. Jasmonate signalling in carnivorous plants: copycat of plant defence mechanisms. *Journal of Experimental Botany* **70**, 3379–3389.
- Pavlovič A, Saganová M. 2015. A novel insight into the cost–benefit model for the evolution of botanical carnivory. *Annals of Botany* **115**, 1075–1092.
- Peroutka M, Adlassnig W, Volgger M, Lendl T, Url WG, Lichtscheidl IK. 2008. *Utricularia*: a vegetarian carnivorous plant? *Plant Ecology* **199**, 153–162.
- Plachno BJ Wolowski K. 2008. Algae commensal community in *Genlisea* traps. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **77**, 77–86.
- Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. 2008. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols* **2**, 1896–1906.
- Rottloff S, Miguel S, Biteau F, *et al.* 2016. Proteome analysis of digestive fluids in *Nepenthes* pitchers. *Annals of Botany* **117**, 479–495.
- Rottloff S, Stieber R, Maischak H, Turini FG, Heubl G, Mithöfer A. 2011. Functional characterization of a class III acid endochitinase from the traps of the carnivorous pitcher plant genus, *Nepenthes*. *Journal of Experimental Botany* **62**, 4639–4647.
- Saganová M, Bokor B, Stolárik T, Pavlovič A. 2018. Regulation of enzyme activities in carnivorous pitcher plants of the genus *Nepenthes*. *Planta* **248**, 451–464.
- Schägger H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* **1**, 16–22.
- Schulze WX, Sanggaard KW, Kreuzer I, *et al.* 2012. The protein composition of the digestive fluid from the Venus flytrap sheds light on prey digestion mechanisms. *Molecular and Cellular Proteomics* **11**, 1306–1319.
- Šebela M, Štosová T, Havlis J, Wielsch N, Thomas H, Zdráhal Z, Shevchenko A. 2006. Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. *Proteomics* **6**, 2959–2963.
- Sheard LB, Tan X, Mao H, *et al.* 2010. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* **468**, 400–405.
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* **1**, 2856–2860.
- Simerský R, Chamrád I, Kania J, Strnad M, Šebela M, Lenobel R. 2017. Chemical proteomic analysis of 6-benzylaminopurine molecular partners in wheat grains. *Plant Cell Reports* **36**, 1561–1570.
- Tabb DL, Ma ZQ, Martin DB, Ham AJ, Chambers MC. 2008. DirecTag: accurate sequence tags from peptide MS/MS through statistical scoring. *Journal of Proteome Research* **7**, 3838–3846.
- Takahashi K, Matsumoto K, Nishi W, Muramatsu M, Kubota K, Shibata C, Athauda SBP. 2009. Comparative studies on the acid proteinase activities in the digestive fluids of *Nepenthes*, *Cephalotus*, *Dionaea*, and *Drosera*. *Carnivorous Plant Newsletter* **38**, 75–82.
- Takahashi K, Nishii W, Shibata C. 2012. The digestive fluid of *Drosera indica* contains a cysteine endopeptidase (“Droserain”) similar to dionain from *Dionaea muscipula*. *Carnivorous Plant Newsletter* **41**, 132–134.
- Thines B, Katsir L, Melotto M, *et al.* 2007. JAZ repressor proteins are targets of the SCF (COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**, 661–665.
- Vassilyev AE, Muravnik LE. 1988a. The ultrastructure of the digestive glands in *Pinguicula vulgaris* L. (Lentibulariaceae) relative to their function. I. The changes during maturation. *Annals of Botany* **62**, 329–341.
- Vassilyev AE, Muravnik LE. 1988b. The ultrastructure of the digestive glands in *Pinguicula vulgaris* L. (Lentibulariaceae) relative to their function. II. The changes on stimulation. *Annals of Botany* **61**, 343–351.
- Yilamujiang A, Reichelt M, Mithöfer A. 2016. Slow food: insect prey and chitin induce phytohormone accumulation and gene expression in carnivorous *Nepenthes* plants. *Annals of Botany* **118**: 369–735.



Enzyme activities in two sister-species of carnivorous pitcher plants (*Nepenthes*) with contrasting nutrient sequestration strategies

Ondřej Kocáb^a, Michaela Bačovčinová^b, Boris Bokor^{c,d}, Marek Šebela^e, René Lenobel^e, Caroline R. Schöner^f, Michael G. Schöner^f, Andrej Pavlovič^{a,*}

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

^b Department of Botany, Institute of Biology and Ecology, Šafárik University, Mánesova 23, SK-040 01, Košice, Slovakia

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

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

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

^f Zoological Institute and Museum, University of Greifswald, Loitzer Straße 26, 17489, Greifswald, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Bat
Carnivorous plant
Chitinase
Digestive enzyme
Nepenthes
Nepenthesin
Pitcher plants
Proteinase
Western blot

ABSTRACT

The carnivorous pitcher plants of the genus *Nepenthes* usually attract, capture and digest arthropod prey to obtain mineral nutrients. But few members of the genus have evolved specialized nutrient sequestration strategies to acquire nitrogen from the faeces and urine of mutualistic mammals, which they attract. Because the plants obtain significant amounts of nitrogen in a more available form, we hypothesized that they have relaxed the production of digestive enzymes. If so, species that digest mammal faeces should show fewer digestive enzymes than closely related species that rely on arthropods. We tested this hypothesis by comparing digestive enzymes in 1) *Nepenthes hemsleyana*, whose pitchers serve as roosts for the mutualistic woolly bat *Kerivoula hardwickii*, which also defecate inside the pitchers, and 2) the close relative *Nepenthes rafflesiana*, a typical arthropod capturing species. To investigate the dynamics of aspartic proteases (nepenthesin I and II) and type III and IV chitinases in both species, we conducted qPCR, western blotting, mass spectrometry, and enzyme activity measurements. We found that mRNA in pitcher tissue and enzyme abundance in the digestive fluid is upregulated in both species in response to faeces and insect feeding. Contrary to our initial hypothesis, the final nepenthesin proteolytic activity in the digestive fluid is higher in response to faeces addition than to insect prey irrespective of *Nepenthes* species. This indicates that faeces can mimic arthropod prey triggering the production of digestive enzymes and *N. hemsleyana* retained capacity for production of them.

1. Introduction

To persist in their nutrient-poor habitats, the carnivorous plants of the genus *Nepenthes* evolved to capture arthropod prey using modified leaves, so-called pitchers (Clarke et al., 1997; Pavlovič et al., 2007; Osunkoya et al., 2007). These pitchers act as passive traps that employ combinations of a slippery peristome, epicuticular wax crystals, an anisotropic pitcher surface and/or acidic, viscoelastic digestive fluid to capture and retain arthropod prey (Gaume et al., 2002; Bohn and Federle 2004; Gorb et al., 2004; Gaume and Forterre 2007; Bauer et al., 2008; Bonhomme et al., 2011; Bazile et al., 2015). However, few *Nepenthes* species have evolved to exploit alternative sources of nutrients.

For example, *Nepenthes ampullaria* captures leaf litter from the canopy above thereby obtaining up to 35% of foliar nitrogen. For this purpose, *N. ampullaria* has modified its pitcher morphology in a rather unusual way: The plants produce huge ‘carpets’ with hundreds of pitchers sitting on the soil surface. Unlike in other *Nepenthes* pitchers, the lid does not cover the pitcher’s orifice but points away and thus cannot prevent leaves from falling into the pitcher (Moran et al., 2003; Pavlovič et al., 2011). Completely different examples of alternative nutrient acquisition can be seen in three giant montane pitcher plants from Borneo (*N. lowii*, *N. rajah*, *N. macrophylla*), which capture faeces of small mammals (tree shrews of the species *Tupaia montana*; rats of the species *Rattus baluensis*; Clarke et al., 2009; Chin et al., 2011; Greenwood et al., 2011). The

* Corresponding author.

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

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.01.049>

Received 23 October 2020; Accepted 31 January 2021

Available online 5 February 2021

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



Fig. 1. Studied species in natural habitat in Borneo. (A) *Nepenthes rafflesiana*, (B) *Nepenthes hemsleyana*. Note elongated pitcher of *N. hemsleyana* which provides sufficient space for bat roosting.

pitchers' lids of these *Nepenthes* species produce huge amounts of sweet exudates on which the mammals feed. At the same time they defecate into the pitcher's orifice whose distance to the lid precisely matches the body length of the mammals (Clarke et al., 2009; Chin et al., 2011). A similar interaction can be seen in *N. hemsleyana*, which sequesters up to 95% of nitrogen from the faeces and urine of the small woolly bat *Kerivoula hardwickii*, which roosts inside the plants' aerial pitchers above the digestive fluid (Grafe et al., 2011; Schöner et al., 2017a). The pitchers of *N. hemsleyana* not only match the body size of the mutualistic mammals (Lim et al., 2014); their elongated rear inner pitcher wall also reflects strong species-specific echoes so that the bats can easily locate and identify these pitchers (Schöner et al., 2015a). The plant clearly benefits from faeces by increased growth, chlorophyll content and overall photosynthetic performance (Schöner et al., 2017a) as was found for typical arthropod-digesting species (Capó-Bauçà et al., 2020; Pavlović et al., 2009). No significant costs were found for this interaction (Schöner et al., 2015b), which can be considered as mutualistic (Grafe et al., 2011; Schöner et al., 2017a).

Besides morphological pitcher adaptations to lure and accommodate mutualistic partners, it has been suggested that pitchers also show molecular adaptations for nutrient digestion. Arthropod prey is a rich source of nitrogen bound mainly in protein, chitin and nucleic acids (Pavlović et al., 2016). The carnivorous plants use different types of proteases, chitinases and nucleases to digest these macromolecules (for review see Matusšková et al., 2018). For example, the aspartic proteases nepenthesins I - VI are responsible for protein digestion (Athauda et al., 2004; Hatano and Hamada, 2008, 2012; Lee et al., 2016; Rottloff et al., 2016; Wan Zakaria et al., 2019). Three types of chitinases (type I, III and IV), S-like RNase and endonuclease Endo2 were identified in different *Nepenthes* species (Eilenberg et al., 2006; Stephenson and Hogan, 2006; Rottloff et al., 2011; Ishisaki et al., 2011, 2012; Lee et al., 2016). Bat's excrements (faeces and urine) represent a pre-digested nitrogen rich material excreted mainly as urea. They contain also uric acid, ammonia, creatinine; and faeces of insectivorous species also high content of chitin (Herrera et al., 2006; Kaya et al., 2014) in contrast to insect prey with high protein content (Kouřimská and Adámková, 2016). Although no urease activity was detected in the digestive fluid of *N. hemsleyana*, the plant is clearly able to metabolize isotopically labelled urea by

endogenous ureases expressed in pitcher tissue. Such ureases are expressed in almost all plant taxa as part of arginine metabolism and *N. hemsleyana* ureases have not evolved towards a specialized function but carry out their inherent enzymatic activities (Yilamujiang et al., 2017). This is in huge contrast to typical digestive enzymes in carnivorous plants where functional diversification led to the evolution of enzymes devoted to carnivory (Renner and Specht, 2012; Nishimura et al., 2013; Fukushima et al., 2017; Matusšková et al., 2018). This suggests that for digesting bat faeces, no additional adaptations have been necessary indicating an easy switch to *N. hemsleyana*'s coprophagous lifestyle (Yilamujiang et al., 2017).

On the other hand, it has been hypothesized that several *Nepenthes* species might be on the way to lose their ability of carnivory in favour of coprophagy or detritivory (Fleischmann et al., 2018). First, the number of arthropod items found in *N. ampullaria*, *N. lowii* and *N. hemsleyana* is significantly lower than found in typical arthropod-digesting *Nepenthes* species (Moran, 1996; Adam et al., 1997; Clarke 1997; Bauer et al., 2011; Chin et al., 2014). The slippery peristome of *N. lowii* pitchers is strongly reduced and pitchers lack their waxy layer (Clarke et al., 2009). Lunate cells, which enable an important retention mechanism, are absent in *N. ampullaria* (Gaume et al., 2002; Moran et al., 2010). Nectar glands are also almost absent in *N. ampullaria* and the amount of nectar produced by *N. hemsleyana* is strongly reduced in comparison to *N. rafflesiana* (Moran et al., 2003; Bauer et al., 2011). In *N. hemsleyana*, complex colour contrast patterns and volatiles that appeal to insect senses are lacking (Moran 1996; Clarke et al., 2011). Because the plants have largely transferred capture and pre-digestion of arthropod prey to their mutualism partners (so-called *ecological outsourcing*, Schöner et al., 2017a), it is tempting to assume that in the course of evolution *N. hemsleyana* plants also have reduced enzyme secretion in their digestive fluid, thereby preserving valuable resources. This assumption is supported by the fact that *N. hemsleyana* also shows a reduced level of digestive fluid, an important trait which provides sufficient space for the roosting bats (Lim et al., 2014).

The aim of the present study is to investigate whether ecological outsourcing may reduce enzyme activities in *N. hemsleyana* by comparing two closely related species of pitcher plants: the typical arthropod capturing *N. rafflesiana* and the faeces capturing

N. hemsleyana (formerly described as *N. rafflesiana* var. *elongata* but then raised to species status; Fig. 1; Clarke et al., 2011; Scharmann and Grafe, 2013). As the bat's faeces and urine represent an already pre-digested nitrogen-rich material, we hypothesize that the enzyme activity in *N. hemsleyana* digestive fluid will be reduced compared to *N. rafflesiana*. Thus, we predicted that the costly production of digestive enzymes, mainly proteases, would be relaxed in *N. hemsleyana*. If so, it would be interesting to find out if this trait is fixed or can be flexible adapted to the respective prey (insects vs. faeces). To resolve these questions, we experimentally fed both plant species with insect prey and bat faeces and afterwards investigated enzyme properties of digestive fluid using different techniques.

2. Materials and methods

2.1. Experimental setup

We conducted our experiments with cultivated specimens of *N. rafflesiana* (n = 27) and *N. hemsleyana* (n = 27) in the greenhouse in Greifswald (Germany) from August 17, 2017 to 14 December 2017. We grew the plants on a mixed substrate (sphagnum/bark/leaves/moss) with an average temperature of 25 °C during daytime and 23 °C during night-time and high humidity (80%–100%). The photoperiod was at least 12 h of light per day. All tested plants were up to 80 cm high with 1–2 upper pitchers.

For measuring the induction of gene expression by qPCR, we monitored developing pitchers in all experimental plants. On the day these pitchers first opened their lids, the orifice was manually closed with a wrapping film and cotton wool moistened in distilled water to prevent the entry of insects. As soon as we had six freshly opened pitchers in both species within a time period of seven days, these twelve pitchers were randomly assigned to one of the following feeding treatments: insects and faeces. We measured the volume of the digestive fluid in these pitchers with a measuring cylinder (20 ml) and determined the pH value with pH test stripes (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Average pH value was calculated using online pH calculator (<https://www.wgr-sw.com/pH/>). We then fed the pitchers once with 6 mg FW insects (*Drosophila hydei*) or 6 mg FW faeces (mixture of frozen faeces from *Myotis bechsteinii*, *Myotis nattereri* and *Plecotus auritus*) per 12 ml digestive fluid, which is close to the natural capture rate of *N. hemsleyana* (Schöner et al., 2017a). From the previous study we know NPK content of insect prey; the median N content was 8.19% DW, P content 1.04% DW, and K content 1.05% DW. In the bat faeces, the median N content was 7.51% DW, P content 1.39% DW, and K content 1.57% DW (Schöner et al., 2017a). After 24 h and 48 h we cut off 200 mg of fresh weight from insect- and faeces-fed pitchers of both species. Control samples without any prey were also collected. After sampling, we stored the tissue in an Eppendorf tube, submerged it into liquid nitrogen and stored it at –80 °C.

For mass spectrometry, western blotting and enzyme activity measurements, we again monitored developing pitchers in all experimental plants. We closed freshly opened pitchers as described above and started the experiment as soon as we had three freshly opened pitchers in both species within a time period of seven days. Then we measured the volume of the digestive fluid, the pH and started to feed the six pitchers of the treatments “insects”, “faeces”, and “unfed control”. Again, we fed the pitchers with 6 mg insects or faeces per 12 ml digestive fluid. Before taking samples, the pitchers were slightly shaken to homogenise the fluid. Overall, we took 4 samples (0.5 ml of digestive fluid) per pitcher: before feeding the pitchers the first time, after 2 days, 4 days and 6 days. After each sampling we refilled the pitchers with 0.5 ml distilled water to compensate the fluid loss. Samples were then stored in a freezer at –20 °C.

Table 1

Primer sequences and properties. T_a – annealing temperature.

Primer	Product size (bp)	Primer sequence (5'-3' direction)	T _a (°C)
<i>ACTIN (ACT)</i>	100	Forward: CTCTTAACCCCAAAGCAAACAGG	59
		Reverse: GTGAGAGAACAGCCTGGATG	
<i>18S rRNA</i>	100	Forward: CTTGATTCTATGGGTGGTGGTG	59
		Reverse: GTTAGCAGGCTGAGGTCTC	
<i>NEPENTHESIN I (NEPI)</i>	193	Forward: CCAACTCTGTCAAGCCCTTC	59
		Reverse: CCGAATGTGATATTAGGGATGG	
<i>NEPENTHESIN II (NEPII)</i>	210	Forward: TTCCTTGCGAGAGCCAGTAT	59
		Reverse: CCGAATCCCTGGTTGTCTIT	
<i>CHITINASE III (CHITIII)</i>	213	Forward: GCTCCGGCATAGCAGTCTAC	60
		Reverse: CTTGGTTTTGGCATGAGGTT	
<i>CHITINASE IV (CHITIV)</i>	219	Forward: ATGTCACGCATGAGACTGGA	59
		Reverse: CCACCGTTTGAGGTGAGTTT	

2.2. Real-time PCR

To study induction of gene expression in the digestive zone of the pitchers, four corresponding genes of well-characterized proteins from the pitcher fluid were chosen, namely *NEPENTHESIN I* and *II* (Athauda et al., 2004), *CHITINASE III* (Rottloff et al., 2011; Hatano and Hamada 2012; Ishisaki et al., 2012a), and *CHITINASE IV* (Hatano and Hamada 2008, 2012; Ishisaki et al., 2012b). Total RNA was extracted using Spectrum Plant Total RNA kit (Sigma-Aldrich) and DNase I treated and purified by RNA Clean & Concentrator kit (ZymoResearch, USA) according to the manufacturer's instructions. The integrity of RNA was checked by agarose (1%) gel electrophoresis. The concentration and sample purity were measured by NanoDrop™ 1000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). The synthesis of first strand of cDNA was performed by ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA) using Oligo (dT)₁₅ primers according to the manufacturer's protocol. To determine traces of genomic DNA, negative control of each sample (without reverse transcriptase) was performed. The primers (Table 1) for *NEPENTHESIN I* and *II*, *CHITINASE III* and *IV*, and reference genes *ACTIN* and *18S rRNA* were designated by Primer3plus tool (http://prime3plus.com/web_3.0.0/-prime_r3web_input.htm) from known sequences of *Nepenthes* species. Gradient PCR was used to determine annealing temperature (T_a) of primers (Table 1). Each amplified product was checked by agarose (2%) gel electrophoresis and subsequently sequenced by the Sanger method to verify product specificity at the Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava. The stability of reference genes was evaluated by 2^{-ΔCT} method (Livak and Schmittgen 2001) and BestKeeper tool (<http://www.gene-quantification.info/>) and only *ACTIN* gene was suitable for gene expression analysis (data not shown). For real-time PCR, specific gene sequences were amplified by Maxima SYBRGreen/ROX qPCR Master Mix (ThermoFisher Scientific). Real-time PCR reactions were performed in 96-well plates on Light Cycler II 480 (Roche, Basel, Switzerland) device and the relative changes in gene expression were estimated according to Pfaffl (2001). Melt curve analysis of amplified PCR products was included at each qPCR run. All samples were analysed in three replicates.

2.3. Enzyme activity measurements

Proteolytic activity of pitcher fluid was determined by incubating 150 μL of a sample with 150 μL of 2% (w/v) bovine serum albumin

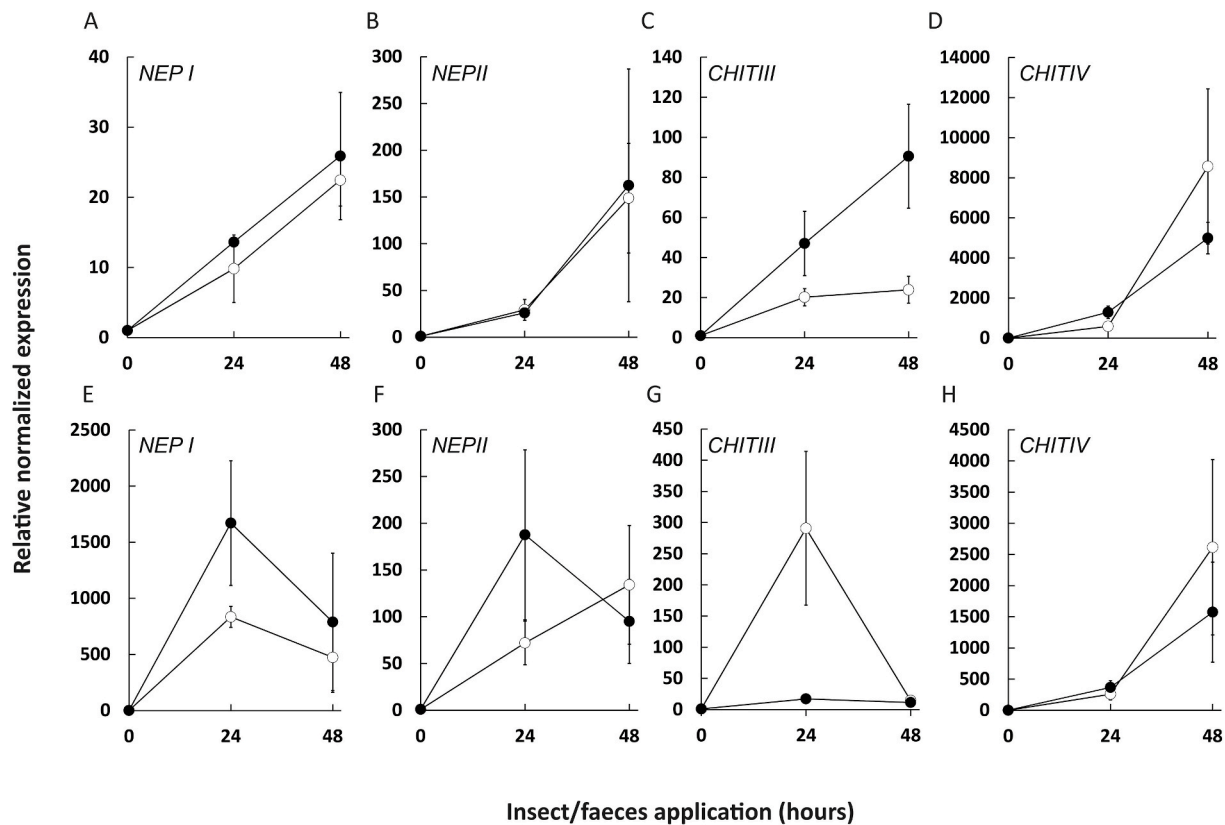


Fig. 2. Gene expression analyses in response to addition of insect prey and faeces into the pitcher of *Nepenthes*. *Nepenthes rafflesiana* (A–D) and *N. hemsleyana* (E–H). Gene expression before prey/faeces addition (0 h) was set as 1.0. Closed circles – insect, Open circles – faeces, There were no statistically significant differences between insect and faeces fed plants (Paired Student t-test). Mean expression \pm SE, n = 3.

(BSA) in 200 mM glycine-HCl (pH 3.0) at 37 °C for 2 h. The reaction was stopped by the addition of 450 μ L of 5% (w/v) trichloroacetic acid. Samples were incubated on ice for 10 min, and centrifuged at 20,000 g for 10 min at 4 °C. The amount of released non-TCA-precipitable peptides was used as a measure of proteolytic activity, which was determined by comparing the absorbance of the supernatant at 280 nm to a blank sample with a Specord 250 Plus double-beam spectrophotometer (Analytik Jena, Germany). One unit of proteolytic activity is defined as an increase of 0.001 per min in the absorbance at 280 nm (Matusíková et al., 2005). For inhibitory studies, prior incubation 3 μ L of 150 μ M pepstatin was added to 150 μ L of digestive fluid, 147 μ L of 2% (w/v) BSA was added, incubated, and measured as described above.

Chitinase activities were measured using a fluorimetric chitinase assay kit (Sigma Aldrich). We used 4-methylumbelliferyl β -D-N,N'-triacetylchitotriose for detection of endochitinase activity according to manufacturer's instructions. Ten μ L of sample was incubated with 90 μ L of substrate working solution at 37 °C and after 1 h stopped by 200 μ L of sodium carbonate. The fluorescence of liberated 4-methylumbelliferone was measured in pH > 7 using a microplate reader SynergyMx (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) with excitation at 360 nm and emission at 450 nm. The results are the mean of six biological replicates.

2.4. SDS- PAGE and western blotting

For detection and quantification of nepenthesins and type III and IV chitinase, polyclonal antibodies against these proteins were raised in rabbits by Genscript (Piscataway, NJ, USA). For detection of nepenthesin the following amino acid sequences (epitope) were synthesized: (NH₂-) SAIMDTGSDLIWTQC (-CONH₂) (based on sequences BAD07474.1, BAD07474.1, AFV26025.1, AFV26024.1 from *N. gracilis* and *N. mirabilis*). The epitope encodes active side of the enzyme which is

highly conserved across species and does not distinguish between nepenthesins I and II. For detection of type III and IV chitinases, the following amino acid sequences (epitopes) were synthesized: (NH₂-) CWSKYDNGYSSAIKD (-CONH₂) (ABF74624.1 from *N. rafflesiana*) and (NH₂-) CNGGNPSAVDDRVGY (Y (-CONH₂) (BAF98919.1 from *N. alata*), respectively. They were coupled to a carrier protein (keyhole limpet haemocyanin, KLH) and each injected into two rabbits. The terminal cysteine of the peptide was used for conjugation. The rabbit serum was analysed for the presence of antigen-specific antibodies using an ELISA test (Saganová et al., 2018).

The digestive fluid collected for the enzyme assays was subjected to western blotting. 100 μ L of the samples were heated and denatured for 10 min at 70 °C and mixed with modified Laemmli sample buffer to a final concentration of 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 1% β -mercaptoethanol, 12.5 mM EDTA, and 0.02% bromophenol blue. The same volume (20 μ L) of digestive fluid was electrophoresed in 10% (v/v) SDS-polyacrylamide gel (Schägger, 2006). The proteins in the gels were either visualized by silver staining (ProteoSilver; Sigma Aldrich) or transferred from the gel to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad) using a Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). After blocking in TBS-T containing 5% BSA overnight, the membranes were incubated with the primary antibody (dilution 1:500–1:1000) for 1 h at room temperature, and after washing, the membrane was incubated with the secondary antibody (dilution 1:10000): the goat antirabbit IgG (H + L)-horseradish peroxidase conjugate (Bio-Rad). Blots were visualized and chemiluminescence was quantified by an Amersham Imager 600 gel scanner (GE HealthCare Life Sciences, Tokyo, Japan). The results are the mean of six biological replicates.

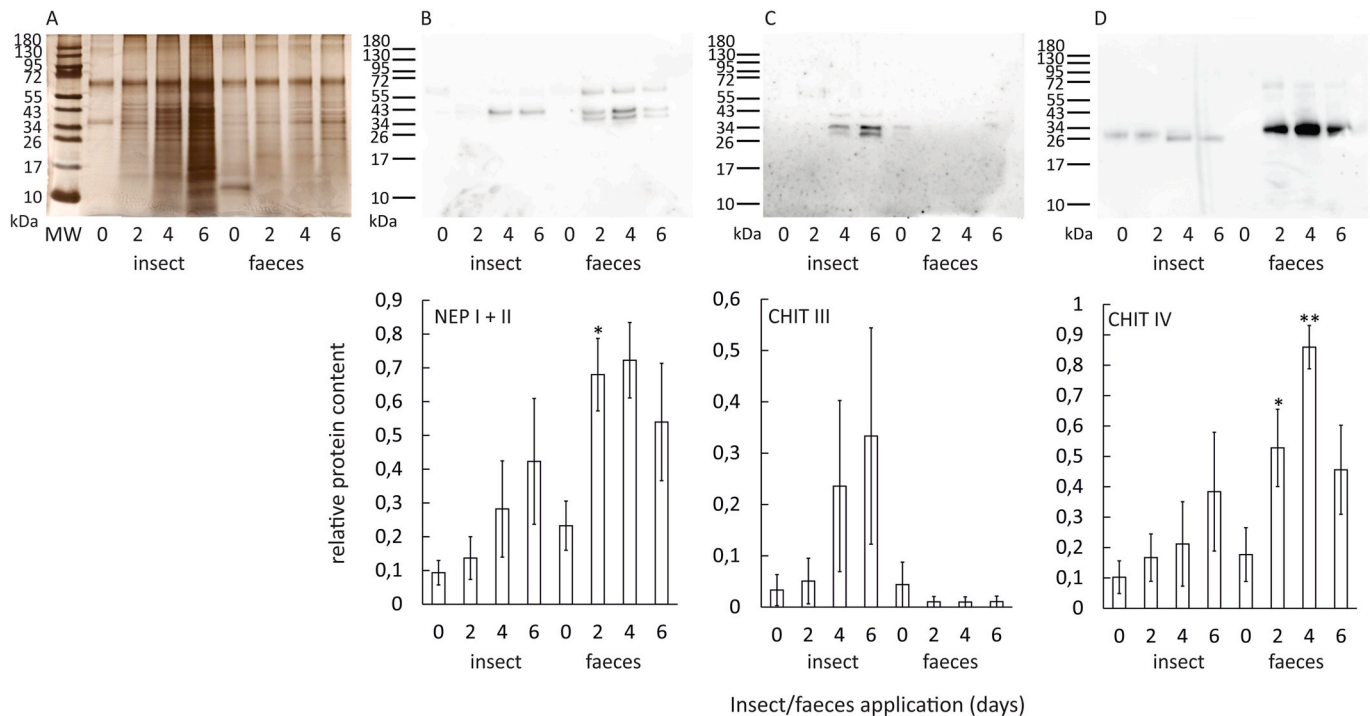


Fig. 3. Abundance of digestive enzymes in the digestive fluid of *Nepenthes rafflesiana* in response to feeding on insect prey and faeces detected by western blots using specific antibodies. The digestive fluid was collected and the proteins were separated in 10% (v/v) SDS polyacrylamide gel and subjected to western blot analysis. (A) Silver-stained SDS-PAGE of the digestive fluid in response to different stimuli. (B) Western blot analysis of aspartic protease nepenthesin. (C) Western blot analysis of type III chitinase. (D) Western blot analysis of type IV chitinase. MW, molecular weight. The same volume of digestive fluid was loaded and electrophoresed. The most representative blots, the closest to the average values from six plants are shown. Chemiluminescence signal was quantified and is shown below each representative blot. Statistically significant differences within the same day between insect and faeces treated pitchers were analysed by paired Student's t-test, and are denoted as * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$. Means \pm SE, $n = 6$.

2.5. Mass spectrometry

The digestive fluid from control (day 0) and fed pitchers (samples collected after 2, 4 and 6 days were pooled together) were used for analyses. An aliquot of the digestive fluid (500 μ l) was dried out using a vacuum centrifuge. Then 50 μ l of 50 mM NH_4HCO_3 and 15 μ l of 8 M urea were added to the residue and the tube content was sonicated for 5 min. Subsequently, proteins were reduced by adding 4 μ l of 55 mM dithiothreitol and incubation at 60 $^\circ\text{C}$ for 30 min. This was followed by adding 4 μ l of 330 mM iodoacetamide and incubation at laboratory temperature (in the dark) for 20 min. Excess alkylating reagent was quenched by 8 μ l of 55 mM dithiothreitol followed by adding 118 μ l of 50 mM NH_4HCO_3 . Protein digestion was initiated by 1 μ l of dimethylated SOLu-trypsin (Sigma-Aldrich, Germany) and proceeded at 37 $^\circ\text{C}$ overnight. The digest was dried out using a vacuum centrifuge, recovered in 10 μ l of 0.1% trifluoroacetic acid and desalted using ZipTip-C₁₈ reversed phase pipette tips (Merck Millipore, Ireland) according to the recommended protocol. The desalted peptide sample was recovered in 10 μ l of 0.1% trifluoroacetic acid and subjected to an LC-ESI-MS/MS analysis on Q-TOF instrument performed according to a previous protocol (Chamrád et al., 2014). MGF formatted MS/MS data files were processed for homology-based database searches by PEAKS X (Bioinformatic Solutions, Canada). Available Nepenthaceae protein sequences (downloaded from <https://www.uniprot.org/> on January 5, 2021) were used as a target database.

2.6. Statistical analysis

Paired *t*-tests (pairs from the same sample date) were used to investigate intraspecific significant differences between treatments (insect prey vs. bat faeces) or interspecific differences between species fed either on insect prey or bat faeces. Interspecific comparison was done

only for enzyme assays.

3. Results

3.1. Gene expression analyses

The abundance of mRNA encoding important digestive enzymes (nepenthesin I and II, type III and IV chitinases) was clearly upregulated in both species (*N. rafflesiana* and *N. hemsleyana*) in response to both substrates (faeces vs. insect) in the course of 48 h (Fig. 2A–H). Interspecific comparison in this type of analyses is unreliable, because expression data of treated samples are relative to the control sample (calibrator, hour 0) in each species separately. But intraspecific comparison revealed no significant differences in response to faeces vs. insect feeding. The data showed very high variability in gene expression. Slightly higher expression of type III chitinase was found in *N. rafflesiana* fed on insect prey ($P = 0.07$). On the contrary *N. hemsleyana* had somewhat higher expression of type III chitinase in response to faeces addition ($P = 0.09$).

3.2. Abundance of digestive enzymes in digestive fluid

The concentration of digestive enzymes in digestive fluid increased in response to insect and faeces feeding in both species. This is clearly documented by the intensity of silver staining and western blots of selected digestive enzymes (Figs. 3 and 4). Again, interspecific comparison in this type of experiments was omitted (antibody may bound to the given protein sequence with different affinity in two species). Therefore, samples from one species were loaded in the same gels which enabled us to do intraspecific comparison (insect vs. faeces).

In *N. rafflesiana*, the abundance of nepenthesins (expected molecular size at 51 kDa and 45 kDa for nepenthesin I and II, respectively, Athauda

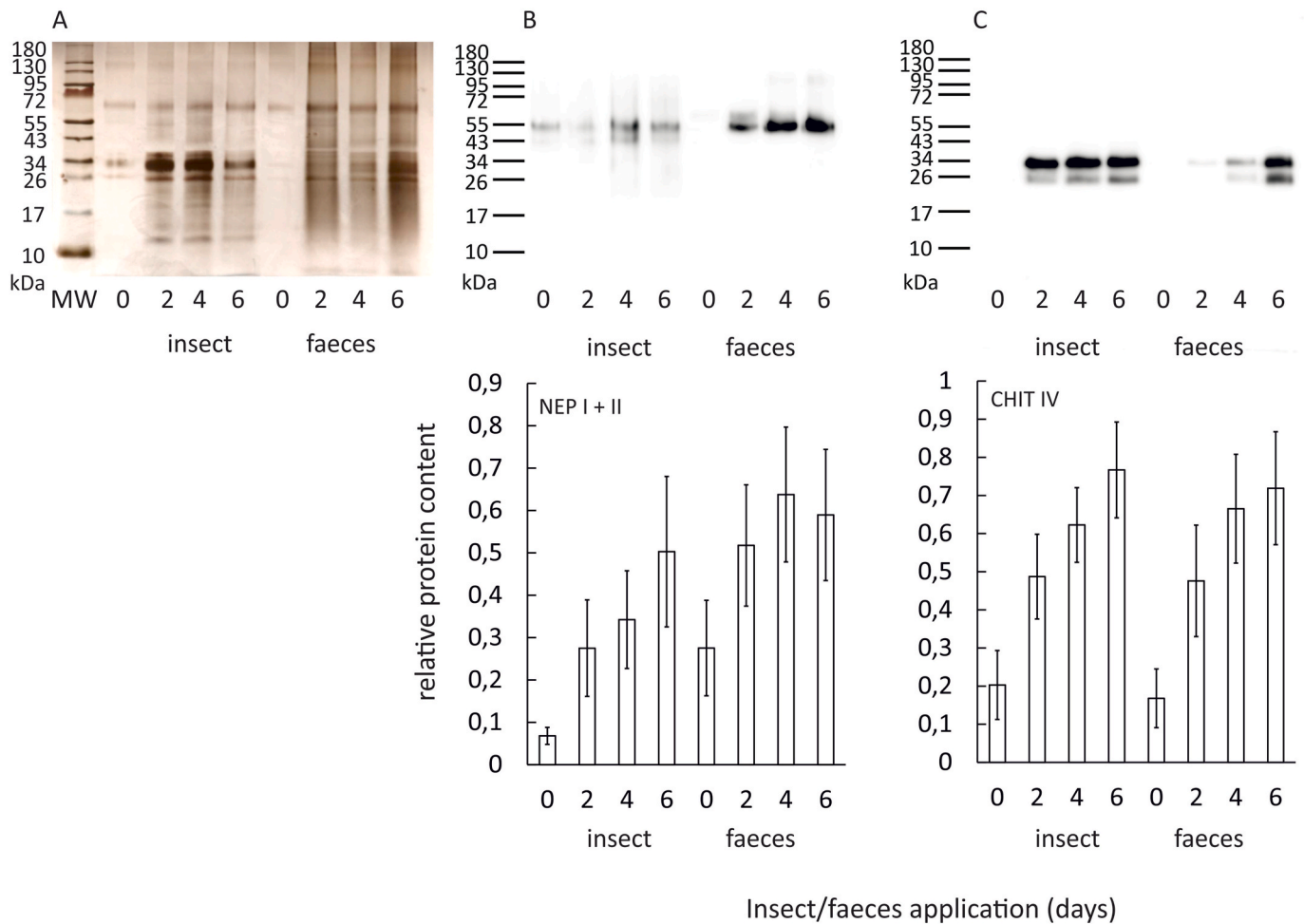


Fig. 4. Abundance of digestive enzymes in the digestive fluid of *Nepenthes hemsleyana* in response to feeding on insect prey and faeces detected by western blots using specific antibodies. The digestive fluid was collected and the proteins were separated in 10% (v/v) SDS polyacrylamide gel and subjected to western blot analysis. (A) Silver-stained SDS-PAGE of the digestive fluid in response to different stimuli. (B) Western blot analysis of aspartic protease nepenthesin. (C) Western blot analysis of type IV chitinase. MW, molecular weight. The same volume of digestive fluid was loaded and electrophoresed. The most representative blots, the closest to the average values from six plants are shown. Chemiluminescence signal was quantified and is shown below each representative blot. There were no significant differences within the same day between insect and faeces treated pitchers (paired Student's t-test), Means \pm SE, n = 6.

et al., 2004) in digestive fluid was significantly higher on the second day after faeces addition in comparison to insect feeding. Our antibody does not recognize different isoforms of the nepenthesin, so the signal represents the pool of nepenthesins in digestive fluid. Immunodetection of type III chitinase (expected molecular size 31.1 kDa, Rottloff et al., 2011) was successful only in three out of six samples. The higher abundance was detected in response to insect addition, but the

differences were not significant. Type IV chitinase (expected molecular size 29 kDa, Ishisaki et al., 2012b) was immunodetected in all samples with significantly higher abundance in response to faeces than insect addition on 2nd and 4th day (Fig. 3).

In *N. hemsleyana*, the concentration of nepenthesins was slightly but not significantly higher in response to faeces addition. The amount of type IV chitinase in digestive fluid was more or less the same in response

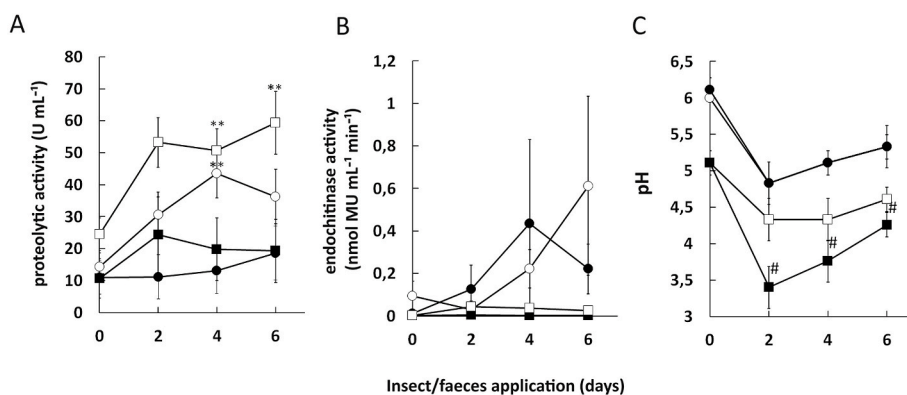


Fig. 5. The digestive enzyme activity and pH in response to addition of insect prey and faeces into the pitcher of *Nepenthes rafflesiana* and *Nepenthes hemsleyana*. (A) Proteolytic activity, (B) Endochitinase activity, (C) pH. Closed circles – insect fed *N. rafflesiana*, open circles – faeces fed *N. rafflesiana*, closed square – insect fed *N. hemsleyana*, open square – faeces fed *N. hemsleyana*. Significant interspecific differences between species within the same treatment (either fed on insect or faeces) are denoted as P < 0.05 (#). Significant intraspecific differences between treatments within the same species are denoted as P < 0.01 (**). Means \pm SE, n = 3 (pH), n = 6 (enzyme activities).

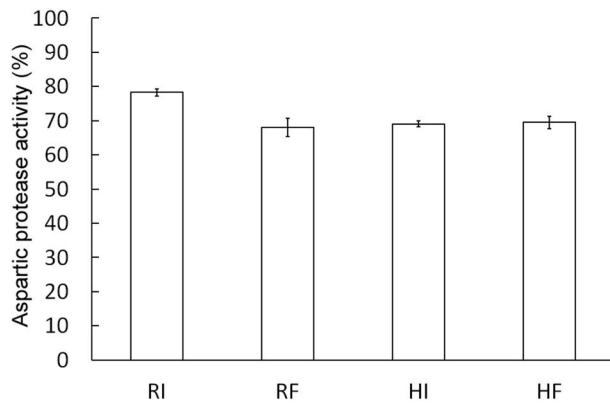


Fig. 6. Aspartic protease activity as a percentage of total proteolytic activity estimated by using pepstatin inhibitor (1,5 μ M final concentration). RI – insect fed *N. rafflesiana*, RF – faeces fed *N. rafflesiana*, HI – insect fed *N. hemsleyana*, HF – faeces fed *N. hemsleyana*. Means \pm S.E., n = 5.

to insect and faeces feeding. We were not able to immunodetect type III chitinase in any sample. This may be caused by a different sequence of target enzyme for our antibody, or the enzyme was not secreted at all (Fig. 4).

3.3. Enzyme activities

The measurements of enzyme activities enable us to do not only intraspecific but also interspecific comparisons. Proteolytic activity in the digestive fluid was significantly higher after addition of faeces than insects. Thus, bat faeces are a better inductor of proteolytic activity than insect prey irrespective of the two focal *Nepenthes* species and their adaptation to different nutritional strategies (Fig. 5A). After addition of pepstatin, a well-known inhibitor of aspartic proteases, only 20–30% of proteolytic activity was detected (Fig. 6), indicating that aspartic proteases are the major proteases responsible for activities depicted in Fig. 5A. Interestingly, *N. hemsleyana* showed only very weak endochitinase activity in comparison to *N. rafflesiana* irrespective of substrate added (faeces vs. insect) but due to high variability of data obtained, the significance was not obvious (Fig. 5B). Overall, *N. hemsleyana* had a higher potential to acidify its digestive fluid than *N. rafflesiana*. Particularly, the insect-fed *N. hemsleyana* plants were able to acidify their digestive fluid significantly stronger than insect-fed *N. rafflesiana* plants (Fig. 5C).

3.4. Mass-spectrometry

To verify the presence of nepenthesins and chitinases in digestive fluid, we analysed the composition of digestive fluid by LC-ESI-MS/MS. We found nepenthesins I, II and chitinase IV in both *Nepenthes* species in addition to other digestive enzymes described previously in *Nepenthes* (purple acid phosphatase, peroxidase, β -1,3-glucanase, carboxypeptidase, GDSL lipase, maturase, RNase, lipid transfer protein, Table 2). We did not identify chitinase III despite the fact that the enzyme was originally described from *N. rafflesiana* (Rottloff et al., 2011). Unfortunately, the contamination of the samples by keratin precluded a deeper survey and label free quantification and the list of proteins identified is not exhaustive.

4. Discussion

In this study, we investigated whether the production of digestive enzymes is relaxed in the carnivorous pitcher plant *N. hemsleyana*, which has partially transferred prey capture and digestion to its mutualistic bat partner. For comparison, we chose the closely related but purely insectivorous pitcher plant species *N. rafflesiana* (Fig. 1). Contrary to our expectation, we can conclude that both species induced expression of digestive enzymes (Fig. 2), which were secreted into the digestive fluid (Figs. 3 and 4), where they showed activity (Fig. 5) in response to insect as well as faeces. The most interesting result is that faeces induced proteolytic activity even better than arthropod prey irrespective of the species and their different nutrient sequestration specialization (Fig. 5A). Moreover, *N. hemsleyana* acidified its digestive fluid even stronger than *N. rafflesiana* in our experiments, indicating that acid proteinase nepenthesins work here at more optimal low pH (Athauda et al., 2004; Saganová et al., 2018). The ability to acidify the digestive fluid in *N. hemsleyana* to values close to pH 2.3 has also been found in an earlier study (Bazile et al., 2015). On the contrary, the other species with alternative nutrient sequestration strategies, *N. ampullaria* kept the pH value higher (Clarke et al., 1997; Moran et al., 2010), out of the range of optimal nepenthesin activity (Saganová et al., 2018). For chitinases the results are less obvious but with a trend towards higher chitinase activity in *N. rafflesiana* than in *N. hemsleyana* (Fig. 5C). The chitinase activity against oligomeric substrates we used here was ascribed to type IV chitinase from *N. alata* (Ishisaki et al., 2012b). Type III chitinase from *N. alata* digests rather longer chitin polymers (Rottloff et al., 2011; Ishisaki et al., 2012a). However, we cannot exclude the possibility that part of the chitinase activity came from the microorganisms living in the digestive fluid (Chan et al., 2016; Sickel et al., 2016). Chitinase activity

Table 2

Proteins identified in digestive fluid of *N. rafflesiana* and *N. hemsleyana*. The proteins were identified by more (at least two) MS/MS sequenced peptides.

Enzyme	Accession No.	Organism	Sample RC	Sample RI	Sample RF	Sample HC	Sample HI	Sample HF
Chitinase IV	A9ZMK1_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	yes	–	yes	yes	yes
Aspartic protease	A0A1L7NZU0_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	–	–	yes	yes	–
Aspartic protease (nepenthesin I)	NEP1_NEPGR	<i>N. gracilis</i>	yes	yes	yes ^a	yes	–	yes
Nepenthesin II	A0A193PDP6_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	–	–	yes	–	yes
Nepenthesin II	A0A0S3TFL4_9CARY	<i>N. rajah</i>	–	yes	yes ^b	–	–	–
C-terminal peptidase	A0A1L7NZU4_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	–	–	yes	yes	yes
C-terminal peptidase	A0A1L7NZU1_NEPAL	<i>N. alata</i>	yes ^c	yes	–	yes	–	yes
Peroxidase	A0A140GMM6_NEPMI	<i>N. mirabilis</i>	yes ^c	–	–	–	yes	yes
Purple acid phosphatase	A0A1L7N7T7_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	–	–	yes	–	–
Nepenthesin I	A0A1L7NZU6_NEPAL	<i>N. alata</i>	yes	–	–	yes ^c	–	–
Beta-1 3-glucanase	I7H3Q8_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	yes	–	–	–	yes ^c
Carboxypeptidase	A0A140GML6_NEPMI	<i>N. mirabilis</i>	–	–	–	yes ^c	–	yes ^c
GDSL lipase	A0A1L7N7T8_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	–	–	yes ^c	–	–
Maturase	A0A385Y4W5_9CARY	<i>N. x ventrata</i>	yes ^c	–	–	–	–	–
Non-specific LTP-like	A0A224ANY4_NEPAL	<i>N. alata</i>	yes	–	–	yes ^c	yes ^c	–
RNase2	A0A1L7NZU5_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	yes ^c	–	–	–	–

Samples: C - control non-fed plants, I - fed on insects, F - fed on faeces, H - *N. hemsleyana*, R - *N. rafflesiana*.

^a assigned to A9ZMF9_NEPAL Aspartic proteinase nepenthesin I from *N. alata*.

^b assigned to A0A140GML5_NEPMI Nepenthesin 2-like from *N. mirabilis*.

^c identified by only a single sequenced peptide in this sample.

in digestive fluid of *N. hemsleyana* may be still valuable due to its antifungal activity and because faeces of insectivorous bats contain high amount of chitin (Rottloff et al., 2011; Kaya et al., 2014).

Why did *N. hemsleyana* retain enzyme capacity for prey digestion, if the mutualistic bat partner provides a pre-digested nitrogen-rich material excreted mainly as urea? A possible explanation is that *N. hemsleyana* does not exclusively rely on its mutualistic partner (Grafe et al., 2011). In fact, *N. hemsleyana* still captures some arthropods, although up to ten times less than *N. rafflesiana* (Moran, 1996; Gaume and Di Giusto, 2009). For this purpose, *N. hemsleyana* still produces a reduced amount of sugars for prey attraction, retained a functionally slippery peristome for prey capture, and has a waxy layer and acidic, viscoelastic digestive fluid for prey retention (Bauer et al., 2011; Bazile et al., 2015). This dual strategy is important when *N. hemsleyana* plants grow in habitats where the bats do not occur and where arthropods are the only source of additional nutrients (Schöner et al., 2013). Even at sites where *N. hemsleyana* and *K. hardwickii* co-occur, the incidence of plant occupancy was only 28.7% over a study period 6.5 weeks (Grafe et al., 2011), despite the fact that the bats clearly preferred *N. hemsleyana* pitchers over furled leaves (alternative roosting site for *K. hardwickii*) indicating that *N. hemsleyana* provides roosts of high quality (Schöner et al., 2013, 2017b). This indicates that without the ability to digest arthropods, over 70% of *N. hemsleyana* plants would have been without additional nutrients. The bats occupied only *N. hemsleyana* pitchers with sufficient space for roosting, while plants up to 1.2 m height whose pitchers were too small had to rely on arthropods (Schöner et al., 2013; Lim et al., 2014). Our study is in accordance with the finding that *N. hemsleyana* plants can benefit from arthropod prey but need longer time to recover from nutrient stress than in response to faeces. The nutrients from faeces are likely assimilated more efficiently as they have already been pre-digested from the bats (Schöner et al., 2017a). Also, the sister-species *N. rafflesiana* benefits from faeces and arthropod prey, indicating that no special adaptations are needed for the digestion of bat faeces (Schöner et al., 2017a; Yilamujiang et al., 2017).

And finally, why do both species of pitcher plants activate digestive process even better in response to faeces than to arthropods (Fig. 4A)? Besides urea, the bats faeces contain ammonia and chitin (Herera et al., 2006; Kaya et al., 2014). Both substances can activate digestive process if they are added separately to *Nepenthes* pitchers (Yilamujiang et al., 2016; Saganová et al., 2018) and ammonium is the form of nitrogen which is finally taken up by ammonium transporters (AMT1) which is expressed in digestive glands (Schulze et al., 1999). Ammonium induces a pH decrease of the digestive fluid by proton excretion from the pitcher tissue (Higashi et al., 1993; An et al., 2001). Thus, bat faeces apparently mimic arthropod prey as we have shown for *N. rafflesiana* causing an increased expression of digestive enzymes in response to faeces, despite *N. rafflesiana* does not get in contact with bat faeces in nature. Because *N. hemsleyana* does not exclusively rely on bats, the ability of protein and chitin digestion was retained during evolution. Only species which strongly depend on each other may be subject to strong selective pressure that affect each other's morphology, physiology and behaviour. Although the pitcher morphology of *N. hemsleyana* has been strongly evolved toward bat attraction and roosting (Schöner et al., 2015a), it retained ability to capture also insect and the digestive physiology has not been affected, what enables the plant to survive in times when the bats may be rare and to increase the plants' distribution. Similar situation was recently described in *N. ampullaria*, which has evolved unique pitcher morphology to capture leaf litter from the canopy above, but the digestive physiology has not been strongly affected (Zulkapli et al., 2021).

5. Conclusions

In conclusion, our study showed that *N. hemsleyana* has not significantly relaxed enzyme production due to its mutualistic interaction with bats and even the typical carnivorous species *N. rafflesiana* responds to

faeces feeding by increased production of digestive enzymes, indicating that faeces rather mimic arthropod prey and even trigger enzyme production better than arthropods do. This indicates that both species have conserved mechanisms to regulate digestive enzymes.

Author's contribution

OK measured enzyme activity, did Western blots and wrote the manuscript, MB and BB did qPCR, MŠ and RL did MS analyses, CRS and MGS setup the experiments and collected samples, AP provided material and financial support, analyzed data and wrote the manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the Research and Development Operational Programme funded by the ERDF (grant no. ITMS 26240220086) from European Union, DFG-project SCHO 1740/1-1 (Convergent multispecies interactions in coprophagous pitcher plant species) from Germany and Internal grant of Palacký University in Olomouc IGA_PrF_2020_028 from Czech Republic.

References

- Adam, J.H., 1997. Prey spectra of Bornean *Nepenthes* species (Nepenthaceae) in relation to their habitat. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 20, 121–134.
- An, C.I., Fukusaki, E., Kobayashi, A., 2001. Plasma-membrane H⁺-ATPases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco. *Planta* 212, 547–555.
- Athauda, S.B.P., Matsumoto, K., Rajapakse, S., Kuribayashi, M., Kojima, M., Kubomura-Yoshida, N., Iwamatsu, A., Shibata, C., Inoue, H., Takahashi, K., 2004. Enzymic and structural characterization of nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases. *Biochem. J.* 381, 295–306.
- Bauer, U., Bohn, H.F., Federle, W., 2008. Harmless nectar source or deadly trap: *Nepenthes* pitchers are activated by rain, condensation and nectar. *P. Roy. Soc. B.* 275, 259–265.
- Bauer, U., Grafe, T.U., Federle, W., 2011. Evidence for alternative trapping strategies in two forms of the pitcher plant, *Nepenthes rafflesiana*. *J. Exp. Bot.* 62, 3683–3692.
- Bazile, V., Le Moguédec, G., Marshall, D.J., Gaume, L., 2015. Fluid physico-chemical properties influence capture and diet in *Nepenthes* pitcher plants. *Ann. Bot.* 115, 705–716.
- Bohn, H.F., Federle, W., 2004. Insect aquaplaning: *Nepenthes* pitcher plants capture prey with the peristome, a fully wettable water-lubricated anisotropic surface. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 14138–14143.
- Bonhomme, V., Pelloux-Prayer, H., Jousset, E., Forterre, Y., Labat, J.J., Gaume, L., 2011. Slippery or sticky? Functional diversity in the trapping strategy of *Nepenthes* carnivorous plants. *New Phytol.* 191, 545–554.
- Capó-Bauçà, S., Font-Carrascosa, M., Ribas-Carbó, M., Pavlović, A., Galmés, J., 2020. Biochemical and mesophyll diffusional limits to photosynthesis are determined by prey and root nutrient uptake in the carnivorous pitcher plant *Nepenthes × ventrata*. *Ann. Bot.* 126, 25–37.
- Chamrád, I., Simerský, R., Běrešová, L., Strnad, M., Šebela, M., Lenobel, R., 2014. Proteomic identification of a candidate sequence of wheat cytokinin-binding protein 1. *J. Plant Growth Regul.* 33, 896–902.
- Chan, X.-Y., Hong, K.-W., Yin, W.-F., Chan, K.-G., 2016. Microbiome and biocatalytic bacteria in monkey cup (*Nepenthes* pitcher) digestive fluid. *Sci. Rep.* 6, 20016.
- Chin, L., Moran, J.A., Clarke, C., 2011. Trap geometry in three giant montane pitcher plant species from Borneo is a function of tree shrew body size. *New Phytol.* 186, 461–470.
- Chin, L., Chung, A.Y.C., Clarke, C., 2014. Interspecific variation in prey capture behavior by co-occurring *Nepenthes* pitcher plants. Evidence for resource partitioning or sampling-scheme artifacts? *Plant Signal. Behav.* 9, e27930.
- Clarke, C.M., 1997. *Nepenthes* of Borneo. Natural History Publication, Kota Kinabalu, Malaysia.
- Clarke, C.M., Bauer, U., Lee, C.C., Tuen, A.A., Rembold, K., Moran, J.A., 2009. Tree shrew lavatories: a novel nitrogen sequestration strategy in a tropical pitcher plant. *Biol. Lett.* 5, 632–635.
- Clarke, C., Moran, J.A., Lee, C.C., 2011. *Nepenthes baramensis* (Nepenthaceae) – a new species from north-western Borneo. *Blumea* 56, 229–233.
- Eilenberg, H., Pnini-Cohen, S., Schuster, S., Movtchan, A., Zilberstein, A., 2006. Isolation and characterization of chitinase genes from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *J. Exp. Bot.* 57, 2775–2784.
- Fleischmann, A., Schlauer, J., Smith, S.A., Givnish, T., 2018. Evolution of carnivory in angiosperms. In: Ellison, A.M., Adamec, L. (Eds.), *Carnivorous Plants: Physiology, Ecology, and Evolution*. Oxford University Press, pp. 22–42.

- Fukushima, K., Fang, X., Alvarez-Ponce, D., Cai, H., Carretero-Paulet, L., Chen, C., Chang, T.H., Farr, K.M., Fujita, T., Hiwatashi, Y., et al., 2017. Genome of the pitcher plant *Cephalotus* reveals genetic changes associated with carnivory. *Nat. Ecol. Evol.* 1, 0059.
- Gaume, L., Di Giusto, B., 2009. Adaptive significance and ontogenetic variability of the waxy zone in *Nepenthes rafflesiana*. *Ann. Bot.* 104, 1281–1291.
- Gaume, L., Forterre, Y., 2007. A viscoelastic deadly fluid in carnivorous pitcher plants. *PLoS One* 2, e1185.
- Gaume, L., Gorb, S., Rowe, N., 2002. Function of epidermal surfaces in the trapping efficiency of *Nepenthes alata* pitchers. *New Phytol.* 156, 479–489.
- Gorb, E., Kastner, V., Peressadko, A., Arzt, E., Gaume, L., Rowe, N., Gorb, S., 2004. Structure and properties of the glandular surface in the digestive zone of the pitcher in the carnivorous plant *Nepenthes ventrata* and its role in insect trapping and retention. *J. Exp. Biol.* 207, 2947–2963.
- Grafe, T.U., Schöner, C.R., Kerth, G., Junaidi, A., Schöner, M.G., 2011. A novel resource-service mutualism between bats and pitcher plants. *Biol. Lett.* 7, 436–439.
- Greenwood, M., Clarke, C., Lee, C.C., Gunsalam, A., Clarke, R.H., 2011. A unique resource mutualism between the giant Bornean pitcher plant, *Nepenthes rajah*, and members of a small mammal community. *PLoS One* 6, e21114.
- Hatano, N., Hamada, T., 2008. Proteome analysis of pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *J. Proteome Res.* 7, 809–816.
- Hatano, N., Hamada, T., 2012. Proteomic analysis of secreted protein induced by a component of prey in pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *J. Proteomics* 75, 4844–4852.
- Herrera, M.L.G., Ramirez, P.N., Miron, M.L., 2006. Ammonia excretion increased and urea excretion decreased in urine of a new world nectarivorous bat with decreased nitrogen intake. *Physiol. Biochem. Zool.* 79, 801–809.
- Higashi, S., Nakashima, A., Ozaki, H., Abe, M., 1993. Analysis of feeding mechanism in pitcher of *Nepenthes hybrida*. *J. Plant Res.* 106, 47–54.
- Ishisaki, K., Arai, S., Hamada, T., Honda, Y., 2012a. Biochemical characterization of a recombinant plant class III chitinase from the pitcher of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Carbohydr. Res.* 361, 170–174.
- Ishisaki, K., Honda, Y., Taniguchi, H., Hatano, N., Hamada, T., 2012b. Heterogonous expression and characterization of a plant class IV chitinase from the pitcher of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Glycobiology* 22, 345–351.
- Kaya, M., Seyyar, O., Baran, T., Turkes, T., 2014. Bat guano as new and attractive chitin and chitosan source. *Front. Zool.* 11, 59.
- Kourimská, L., Adámková, A., 2016. Nutritional and sensory quality of edible insects. *NFS J* 4, 22–26.
- Lee, L., Zhang, Y., Ozar, B., Sensen, C.W., Schriemer, D.C., 2016. Carnivorous nutrition in pitcher plants (*Nepenthes* spp.) via an unusual complement of endogenous enzymes. *J. Proteome Res.* 15, 3108–3117.
- Lim, Y.S., Schöner, C.R., Schöner, M.G., Kerth, G., Thornham, D.G., Scharmann, M., Grafe, T.U., 2014. How a pitcher plant facilitates roosting of mutualistic woolly bats. *Evol. Ecol. Res.* 16, 581–591.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402–408.
- Matušíková, I., Pavlovič, A., Renner, T., 2018. Biochemistry of prey digestion and nutrient absorption. In: Ellison, A., Adamec, L. (Eds.), *Carnivorous Plants: Physiology, Ecology, and Evolution*. Oxford University Press, pp. 207–220.
- Matušíková, I., Salaj, J., Moravčíková, J., Mlynárová, L., Nap, J.P., Libantová, J., 2005. Tentacles of in vitro-grown round-leaf sundew (*Drosera rotundifolia* L.) show induction of chitinase activity upon mimicking the presence of prey. *Planta* 222, 1020–1027.
- Moran, J.A., 1996. Pitcher dimorphism, prey composition and the mechanisms of prey attraction in the pitcher plant *Nepenthes rafflesiana* in Borneo. *J. Ecol.* 84, 515–525.
- Moran, J.A., Clarke, C.M., Hawkins, B.J., 2003. From carnivore to detritivore? Isotopic evidence for leaf litter utilization by the tropical pitcher plant *Nepenthes ampullaria*. *Int. J. Plant Sci.* 164, 635–639.
- Moran, J.A., Hawkins, B.J., Gowen, B.E., Robbins, S.L., 2010. Ion fluxes across the pitcher walls of three Bornean *Nepenthes* pitcher plant species: flux rates and gland distribution patterns reflect nitrogen sequestration strategies. *J. Exp. Bot.* 61, 1365–1374.
- Nishimura, E., Kawahara, M., Kodaira, R., Kume, M., Arai, N., Nishikawa, J., Ohyama, T., 2013. S-like ribonuclease gene expression in carnivorous plants. *Planta* 238, 955–967.
- Osunkoya, O.O., Daud, S.D., Di-Giusto, B., Wimmer, F.L., Holige, T.M., 2007. Construction costs and physico-chemical properties of the assimilatory organs of *Nepenthes* species in Northern Borneo. *Ann. Bot.* 99, 895–906.
- Pavlovič, A., Krausko, M., Adamec, L., 2016. A carnivorous sundew plant prefers protein over chitin as a source of nitrogen from its traps. *Plant Physiol. Biochem.* 104, 11–16.
- Pavlovič, A., Masarovičová, E., Hudák, J., 2007. Carnivorous syndrome in Asian pitcher plants of the genus *Nepenthes*. *Ann. Bot.* 100, 527–536.
- Pavlovič, A., Singerová, L., Demko, V., Hudák, J., 2009. Feeding enhances photosynthetic efficiency in the carnivorous pitcher plant *Nepenthes talangensis*. *Ann. Bot.* 104, 307–314.
- Pavlovič, A., Slovák, L., Santrůček, J., 2011. Nutritional benefit from leaf litter utilization in the pitcher plant *Nepenthes ampullaria*. *Plant Cell Environ.* 34, 1865–1873.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 2003–2007.
- Renner, T., Specht, C.D., 2012. Molecular and functional evolution of class I chitinases for plant carnivory in the Caryophyllales. *Mol. Biol. Evol.* 10, 2971–2985.
- Rottloff, S., Stieber, R., Maischak, H., Turini, F.G., Heubl, G., Mithöfer, A., 2011. Functional characterization of a class III acid chitinase from the traps of the carnivorous pitcher plant genus *Nepenthes*. *J. Exp. Bot.* 62, 4639–4647.
- Rottloff, S., Miguel, S., Bateau, F., Nisse, E., Hammann, P., Kuhn, L., Chicher, J., Bazile, V., Gaume, L., Mignard, B., Hehn, A., Bourquard, F., 2016. Proteome analysis of digestive fluids in *Nepenthes* pitchers. *Ann. Bot.* 117, 479–495.
- Saganová, M., Bokor, B., Stolarik, T., Pavlovič, A., 2018. Regulation of enzyme activities in carnivorous pitcher plants of the genus *Nepenthes*. *Planta* 248, 451–464.
- Schägger, H., 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* 1, 16–22.
- Scharmann, C., Grafe, U., 2013. Reinstatement of *Nepenthes hemsleyana* (Nepenthaceae), an endemic pitcher plant from Borneo, with a discussion of associated *Nepenthes* taxa. *Blumea* 58, 8–12.
- Schöner, C.R., Schöner, M.G., Grafe, T.U., Clarke, C.M., Dombrowski, L., Tan, M.C., Kerth, G., 2017a. Ecological outsourcing: a pitcher plant benefits from transferring pre-digestion of prey to a bat mutualist. *J. Ecol.* 105, 400–411.
- Schöner, C.R., Schöner, M.G., Kerth, G., Grafe, T.U., 2013. Supply determines demand: influence of partner quality and quantity on the interactions between bats and pitcher plants. *Oecologia* 173, 191–202.
- Schöner, C.R., Schöner, M.G., Kerth, G., Suhaini, S.N., Grafe, T.U., 2015b. Low costs reinforce the mutualism between bats and pitcher plants. *Zool. Anz.* 258, 1–5.
- Schöner, M.G., Schöner, C.R., Ermisch, R., Puechmaille, S.J., Grafe, T.U., Tan, M.C., Kerth, G., 2017b. Stabilization of a bat-pitcher plant mutualism. *Sci. Rep.* 7, 13170.
- Schöner, M.G., Schöner, C.R., Simon, R., Grafe, T.U., Puechmaille, S.J., Ji, L.L., Kerth, G., 2015a. Bats are acoustically attracted to mutualistic carnivorous plants. *Curr. Biol.* 25, 1911–1916.
- Schulze, W., Frommer, W.B., Ward, J.M., 1999. Transporters for ammonium, amino acids and peptides are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes*. *Plant J.* 17, 637–646.
- Sickel, W., Grafe, T.U., Meuche, I., Steffan-Dewenter, I., Keller, A., 2016. Bacterial diversity and community structure in two Bornean *Nepenthes* species with differences in nitrogen acquisition strategies. *Microb. Ecol.* 71, 938–953.
- Stephenson, P., Hogan, J., 2006. Cloning and characterization of a ribonuclease, a cysteine proteinase, and an aspartic proteinase from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes ventricosa* Blanco. *Int. J. Plant Sci.* 167, 239–248.
- Wan Zakaria, W.N.A., Aizat, W.M., Goh, H.H., Mohd Noor, N., 2019. Protein replenishment in pitcher fluids of *Nepenthes* × *ventrata* revealed by quantitative proteomics (SWATH-MS) informed by transcriptomics. *J. Plant Res.* 132, 681–694.
- Yilamujiang, A., Reichelt, M., Mithöfer, A., 2016. Slow food: insect prey and chitin induce phytohormone accumulation and gene expression in carnivorous *Nepenthes* plants. *Ann. Bot.* 118, 369–735.
- Yilamujiang, A., Zhu, A., Ligabue-Braun, R., Bartram, S., Witte, C.P., Hedrich, R., Hasebe, M., Schöner, C.R., Schöner, M.G., Kerth, G., Carlini, C.R., Mithöfer, A., 2017. Cophagous features in carnivorous *Nepenthes* plants: a task for ureases. *Sci. Rep.* 7, 11647.
- Zulkapli, M.M., Ghani, N.S.A., Ting, T.Y., Aizat, W.M., Goh, H.-H., 2021. Transcriptomic and proteomic analyses of *Nepenthes ampullaria* and *Nepenthes rafflesiana* reveal parental molecular expression in the pitchers of their hybrid, *Nepenthes* × *hookeriana*. *Front. Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.625507>.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra biofyziky



Autoreferát

***Regulace enzymatických aktivit
masožravých rostlin***

Uchazeč:	Mgr. Ondřej Kocáb
Studijní program:	P1701 Fyzika
Studijní obor:	Biofyzika
Forma studia:	prezenční
Rok zahájení:	2017
Školitel:	Doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.
Místo konání obhajoby:	Šlechtitelů 27, Olomouc

Obsah

Abstrakt.....	3
Abstract.....	3
Seznam zkratk.....	4
1. Úvod.....	5
2. Výsledky.....	7
2.1. Regulace enzymatických aktivit tučnic.....	7
2.2. Vliv potravních strategií láčkovek na aktivitu enzymů.....	16
3. Závěr.....	21
4. Seznam publikací.....	22

Abstrakt

Pro správnou funkci pastí masožravých rostlin je klíčová jasmonátová signální dráha, která iniciuje tvorbu enzymů sloužící k trávení zachycené kořisti. Zastoupení trávících enzymů a způsob regulace karnivorie se může lišit dle způsobu života konkrétního druhu masožravé rostliny. Tato disertační práce se věnuje dvěma souvisejícím tématům.

První téma se zaměřuje na doposud nezkoumanou regulaci enzymatických aktivit u tučnic (*Pinguicula*) z řádu Lamiales. Druhá část práce se zabývá enzymatickými aktivitami v trávící tekutině láčkovky *Nepenthes hemsleyana*, u které panovalo podezření z částečné ztráty karnivorie v důsledku mutualistického (oboustranně výhodná symbióza) vztahu s konkrétním druhem netopýrů (*Kerivoula hardwickii*).

Ukázalo se, že enzymatická aktivita tučnic nejsou řízeny jasmonátovou signální dráhou a že karnivorie u *Nepenthes hemsleyana* zůstává i přes mutualistický stav zachována.

Abstract

Jasmonate signalling pathway plays a key-role in enzyme synthetization of carnivorous plants traps, which are responsible for digesting of trapped prey. The type of digestive enzymes and carnivory-regulating pathway can be different due to lifestyle of carnivorous plant species. This thesis contains two related themes.

The first of them is focused on the unknown mechanism of enzymatic activity regulation in butterwort (*Pinguicula*) from order Lamiales. The second part of this work looks closer on enzymatic activity in digestive fluid of *Nepenthes hemsleyana*, which was suspected to have a partial loss of carnivory due to its mutualistic (mutually beneficial symbiosis) relationship with a specific kind of bats (*Kerivoula hardwickii*).

Our results show no jasmonate signalling pathway effect in butterwort enzymatic activities and no effect of *Nepenthes hemsleyana* mutualism on carnivory of this plant.

Seznam zkratk

(řazeno abecedně)

12-OH-JA – kyselina 12-hydroxyjasmonátová

ABA – kyselina abscisová

cis-OPDA – kyselina *cis*-(+)-12-oxofytodienová

COI1 – CORONATINE INSENSITIVE

IAA – kyselina indol-3-octová

JA – kyselina jasmonová

JA-Ile – konjugát isoleucinu s kyselinou jasmonovou

JAZ – JASMONATE ZIM-DOMAIN

SA – kyselina salicylová

1. Úvod

Masožravé rostliny se vyskytují v slunných, vlhkých oblastech s půdou chudou na živiny. V rámci adaptace na tyto podmínky se u nich vyvinuly speciální rostlinné orgány – pasti. Ty slouží k aktivnímu lákání, polapení a strávení kořisti (nejčastěji hmyzu). Díky tomu jsou schopny získávat živiny z kořisti a získávají tak v daném prostředí výhodu oproti klasickým (nemasožravým) rostlinám. Masožravé rostliny jsou typickým případem konvergentní evoluce; vyvinuly se pod obdobnými selekčními tlaky u vzájemně vzdáleně příbuzných rostlin na různých koutech planety Země, a to nezávisle na sobě (obrázek č.1).

Pasti rostlin můžeme rozdělit do 5 typů: adhezní (přilepení hmyzu na lepkavý povrch), gravitační (kořist spadne do viskózní tekutiny působením gravitace), mechanické (sklapanutí čepelí pasti na základě elektrochemické stimulace), hypotenzní (nasátí kořisti na základě podtlaku; typické pro vodní rostliny) a detektivní (kořist může vstoupit dovnitř, ale nedokáže vylézt zpět).

I samotná kořist či způsob jejího zisku je rozmanitý. Většina masožravých rostlin je orientována na lov hmyzu, avšak některé druhy naopak s konkrétním druhem hmyzu mají mutualistický vztah (mutualismus = oboustranně výhodný symbiotický vztah). Takovým příkladem může být láčkovka dvojstruhatá (*Nepenthes bicalcarata*) a mravenci *Camponotus schmitzi*; mravenci pomáhají s chytáním a údržbou láček, odměnou jim je nektar produkovaný láčkou.

Další rostliny se přiklonily k získávání energie z detritu (rostlinného opadu). Láčkovka soudečková (*Nepenthes ampullaria*) se svou morfologií a fyziologií zaměřila na tento „vegetariánský“ způsob života. Rostlinná hmota však není k výživě rostliny postačující (obsah dusíku v listech je 10krát nižší než v případě hmyzu) a schopnost masožravosti tak zůstala zachována. Vzhledem k méně kyselému pH rostlině v trávení pomáhají i spříznění rozkladači (bakterie, houby).

Některé rostliny však mají díky svému životnímu stylu prvky hmyzožravosti (atraktivita, odklopení víčka, viskozita trávící tekutiny, vosková zóna, aj.) výrazně redukované. Jedním z příkladů je mutualistický vztah mezi láčkovkou Lowovou (*Nepenthes lowii*) a savcem tanou horskou (*Tupaia montana*). Savec se chodí krmit na cukernatém nektaru v horní části víčka, přičemž často vylučuje svoje exkrementy do nitra láčky. Rostlina poté využívá výkalů a moči jakožto předtrávené potraviny, a dusík

je tak mnohem lépe přístupný. Uvádí se, že 57 – 100 % dusíku v listech této rostliny pochází z výkalů těchto malých horských savců.

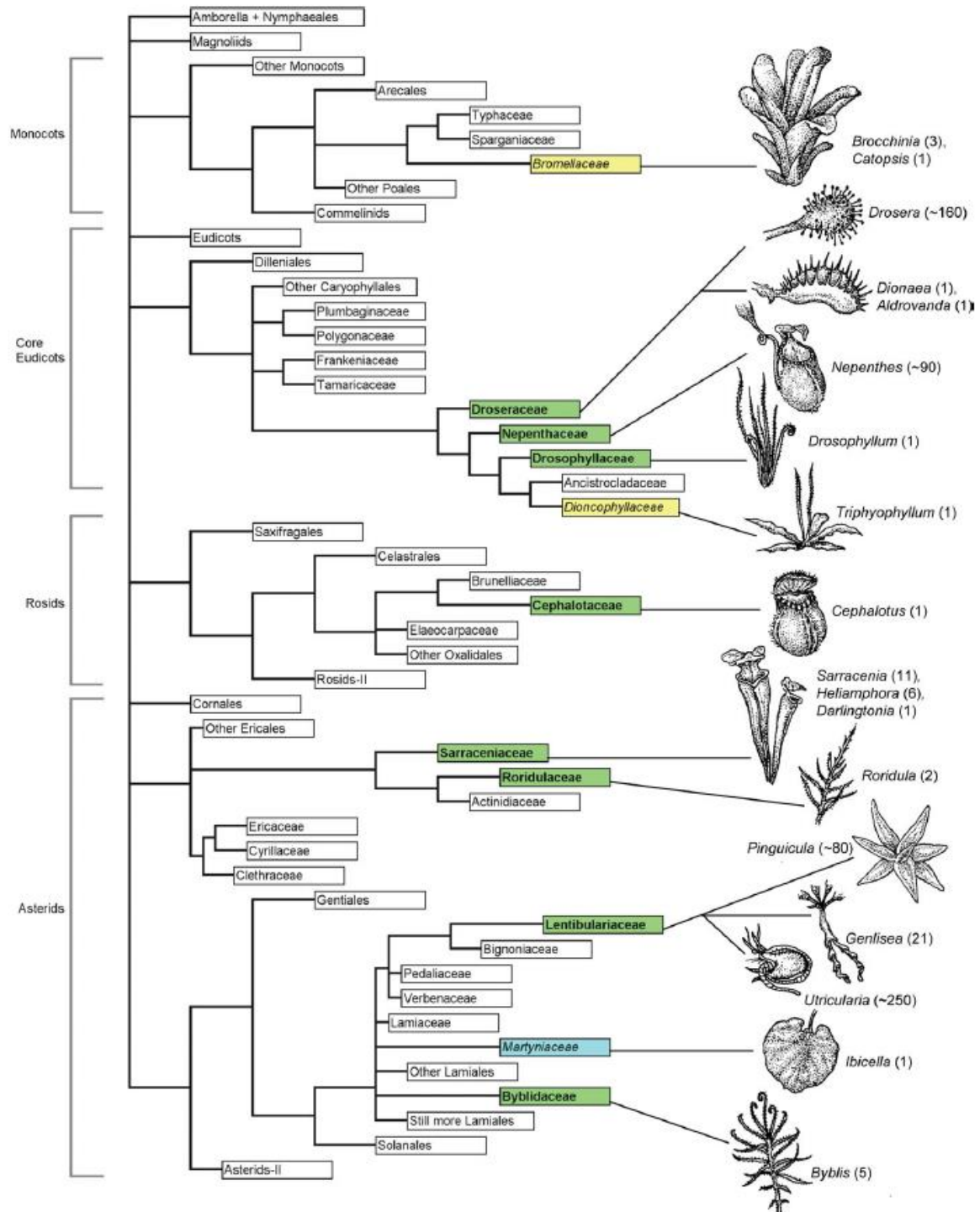
Samotné vstřebávání a obecně trávení zachycené kořisti je řízeno především rostlinnými hormony zvanými jasmonáty. Ty se obecně uplatňují při obraně rostlin vůči poranění a patogenům. V případě masožravých rostlin navíc také zodpovídají za řízení masožravých procesů, například produkci enzymů. Jasmonáty jsou chemicky krátké řetězce alkylcyklopentenonových a alkylcyklopentanonových karboxylátů, s výchozí biosyntézou v kyselině linolenové. Pod výraz „jasmonáty“ je zahrnována kyselina jasmonová (JA) se svými deriváty, například konjugát isoleucinu s kyselinou jasmonovou (JA-Ile), kyselina *cis*-(+)-12-oxofytodienová (*cis*-OPDA) či kyselina 12-hydroxyjasmonátová (12-OH-JA).

Mechanismus působení jasmonátů spočívá v navázání konkrétního ligandu a receptoru, což aktivuje signální dráhu odpovídající expresi a biosyntéze daného proteinu. V masožravých rostlinách je z hlediska molekulárních procesů objasněn pouze mechanismus regulace skrze JA-Ile. Je-li tato molekula aktivována, naváže se na signální receptor CORONATINE INSENSITIVE (COI1). Ten zprostředkovává degradaci represorů JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ). Jejich odstranění má za následek zpřístupnění a aktivaci exprese u dříve reprimovaných genů.

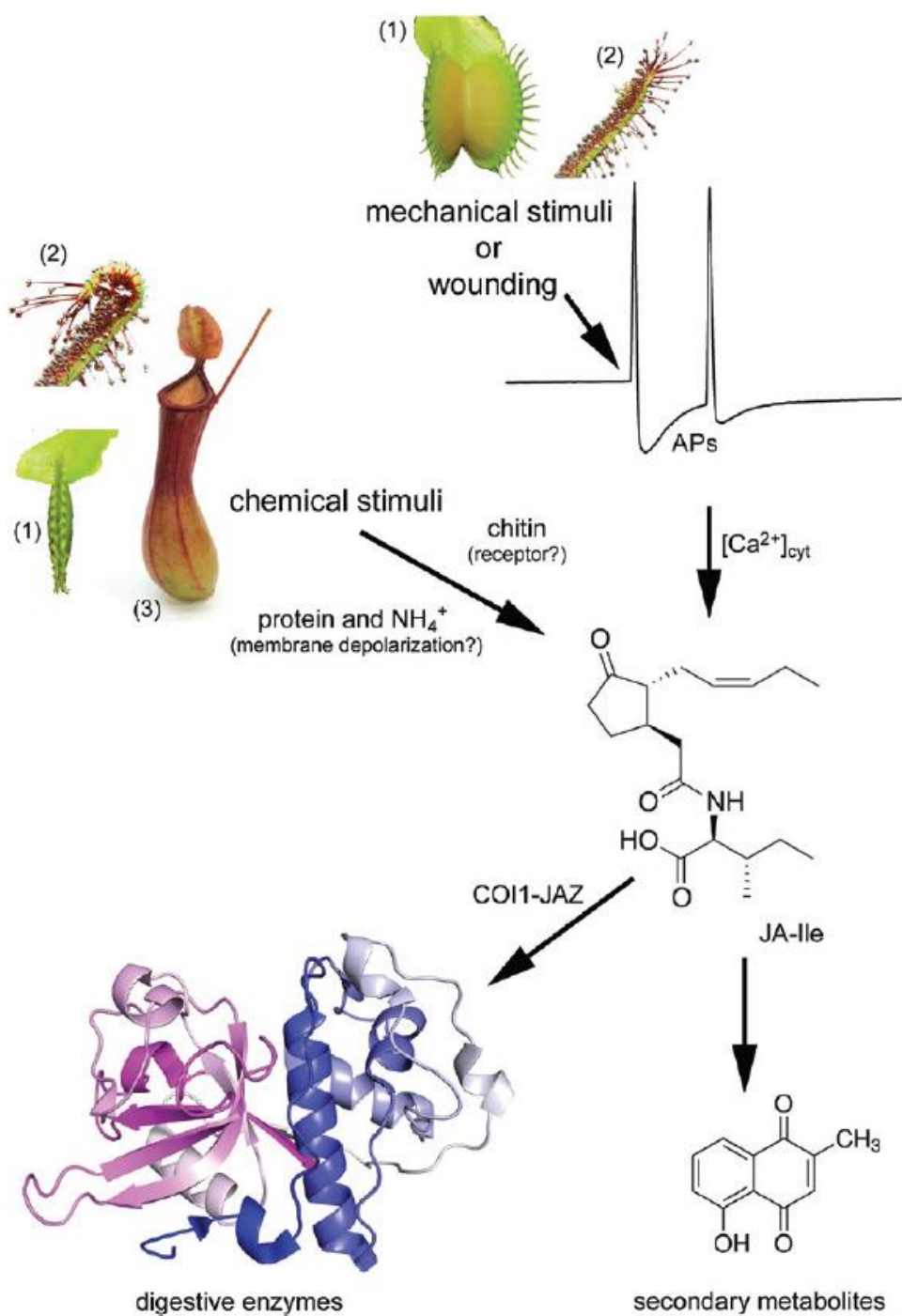
Aktivace masožravosti pomocí jasmonátové signální dráhy se odvíjí od typu masožravé rostliny. Můžeme ji indukovat mechanickým podnětem (tvorba akčního potenciálu po doteku) či chemickými podněty (proteiny, chitin, NH_4^+) (viz obrázek č.2). Jejím důsledkem je mimo jiné produkce trávících šťáv, obsahující koktejl trávících enzymů. Ty se mohou napříč spektrem masožravých rostlin lišit; v některých určitý druh enzymu nenajdeme, u dalších se zase může vyskytovat enzym zcela specifický. Většina enzymů je převzatá z obranných mechanismů rostlin, kde hrají roli při obraně proti patogenezí.

Mezi trávící enzymy masožravých rostlin patří chitinázy (I, III a IV; slouží ke štěpení chitinu), proteázy (cystein proteáza, aspartát proteáza, prolyl endopeptidáza, serin karboxypeptidáza), ribonukleázy, glukonázy a další. Uvedené enzymy se mohou v konkrétních masožravých rostlinách lišit – typickým případem je aspartát proteáza, nazývaná v trávící tekutině láčkovek (*Nepenthes*) jako Nepenthesin (I, II, III, IV, V, VI). Ten se od běžných aspartát proteáz liší například vyšší rezistencí vůči vysoké teplotě či nízkému pH. Obdobně existují například i Dionaeasin, Droserasin, či Cephalotusin (odvozeno od příslušného názvu masožravé rostliny – *Dionaea*, *Drosera*, *Cephalotus*).

Výskyt konkrétních enzymů a způsob regulace jejich aktivity se odvíjí od konkrétního druhu masožravé rostliny a jejího zdroje potravy.



Obrázek č. 1: *Fylogenetický strom znázorňující pozici rodů masožravých rostlin vůči jiným rodům. Jde o ukázkou konvergentní evoluce, kdy byl stejný typ pastí vyvinut u mnoha rodů nezávisle na sobě bez genetické příbuznosti; případně naopak divergentní evoluce s různými druhy pastí v rámci jedné čeledi. Výlučně masožravé čeledi masožravých rostlin jsou zvýrazněny zeleně, v případě zastoupení masožravosti jedním či dvěma členy čeledi žlutě (Dioncophyllaceae, Bromeliaceae) a podezřením na masožravost u jednoho z členů čeledi je vyznačeno modře (Martyniaceae). (Obrázek převzat z Ellison a Gotelli, 2009.)*



Obrázek č. 2: Grafické znázornění působení stimulů jasmonátové signální dráhy. Mechanická stimulace (či poškození rostliny) vede k vzniku akčních potenciálů, jimiž je spuštěna molekulární signalizace. Obdobně je již zachycenou kořistí vyvolávána chemická stimulace (proteiny, chitin, NH_4^+), vedoucí ke spuštění signální dráhy. Chemicky řízená jasmonátová signální dráha je využívána také v láčkovkách. Výsledným efektem jasmonátů je regulace enzymatické aktivity či tvorba sekundárních metabolitů. (Obrázek převzat z Pavlovič a Mithöfer, 2019.)

2. Výsledky

Mé studium regulace enzymatických masožravých rostlin lze rozdělit do dvou samostatných oddílů. První z těchto oddílů se zabývá doposud nepříliš probádanou masožravostí tučnic (*Pinguicula*). Druhý má ve středu svého zájmu láčkovku (*Nepenthes*), která si vyvinula mutualistický vztah s jedním druhem netopýrů, díky čemuž přešla na koprofágní výživu. Oba zkoumané okruhy jsou blíže rozebrány v následujících samostatných podkapitolách.

2.1. Regulace enzymatických aktivit tučnic

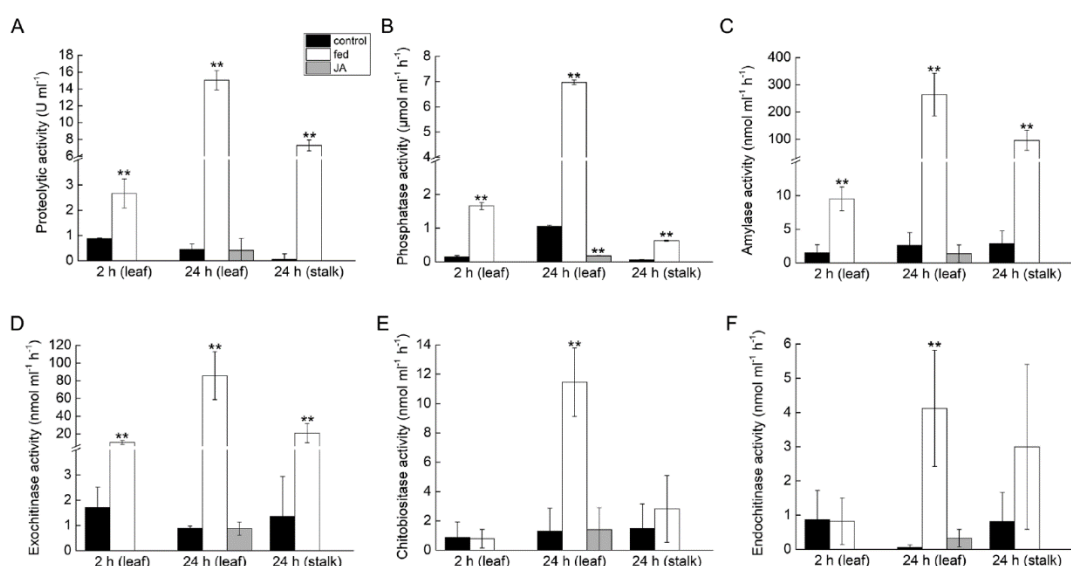
Při většině současných experimentů s masožravými rostlinami je využíváno rostlin z řádu hvozdíkatých (Caryophyllales), kam patří láčkovky (*Nepenthes*), rosnatky (*Drosera*) a mucholapky (*Dioanea*). Existuje však i celá řada dalších masožravých rostlin, které již roku 1875 popsal Charles Darwin ve své knize *Insectivorous plants*. Mezi tyto rostliny patří i z hlediska enzymatických aktivit nepříliš probádané tučnice (*Pinguicula*) z řádu hluchavkotvarých (Lamiales). Kořist chytají na své lepkavé listy (obrázek č.3).



Obrázek č. 3: Tučnice *Pinguicula x Tina*, která se stala předmětem našeho bádání. (A) Vzhled rostliny. (B) Květná stopka nesoucí květ, pokrytý trávícími žlázami. (C) List pokrytý stopkatými žlázkami s lepem (stalked glands) a přisedlých žláz (sessile glands).

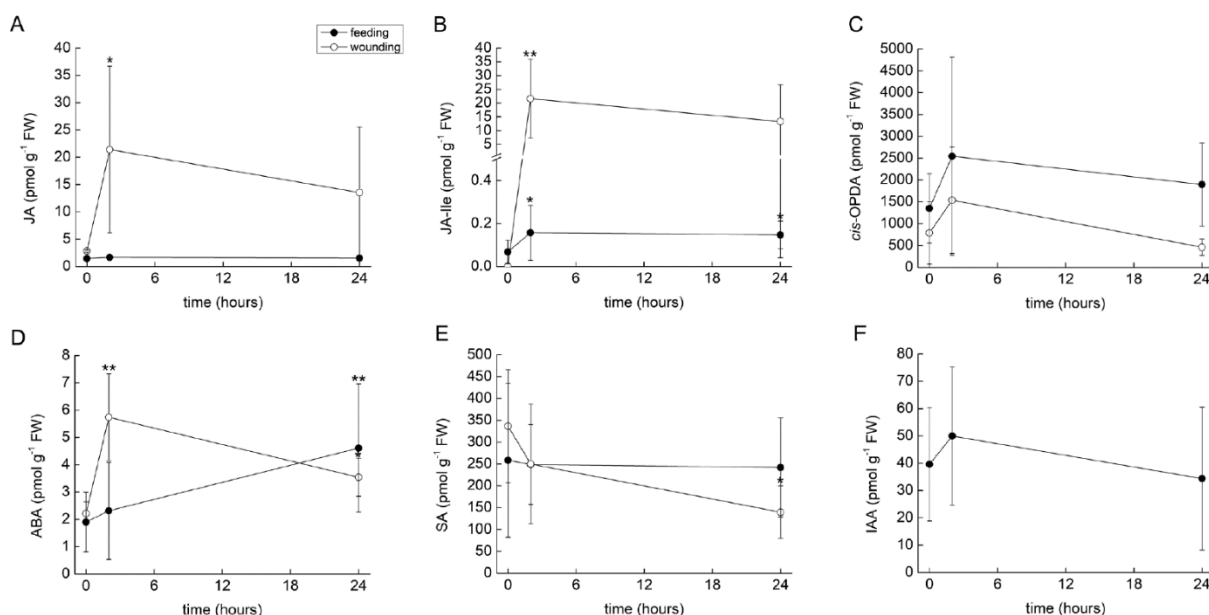
Vycházeli jsme z předpokladu, že tučnice budou mít regulaci enzymatické aktivity řízenou skrze jasmonátovou signální dráhu, jak je to běžné u rostlin hvozdíkatých. Během prvního experimentu jsem měřil aktivitu proteáz, fosfatáz, amyláz, exochitináz,

chitobiosidáz a endochitináz v exudátu (trávicích výměšcích) krmených a nekrmených listů rostliny (po 2 a 24 hodinách). Dle očekávání jsme po nakrmení rostliny zaznamenali nárůst v enzymatické aktivitě. Stejný experiment jsme provedli i se stopkou květu, u které se tímto způsobem také prokázala masožravost; v rámci masožravých rostlin jde o raritu, protože není známa žádná jiná rostlina, která by nelapala hmyz pastmi (pasti evolučně vznikly morfologickou i funkční přeměnou listů). Další zajímavostí (známou již ze starších článků) je přítomnost enzymu amyláza, která nebyla u jiného druhu masožravých rostlin doposud pozorována. (Amyláza je enzym nacházející se běžně ve slinách savců a slouží ke štěpení škrobu. Její přítomnost v trávicích šťávách tučnice může značit možnost záchytu a trávení pylových zrn.)



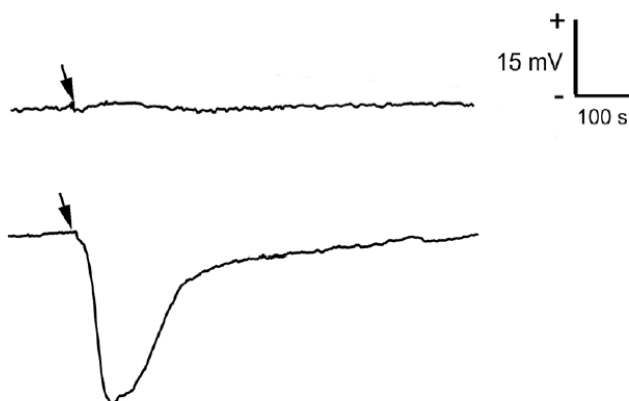
Obrázek č. 4: Grafy enzymatických aktivit (A) proteáz, (B) fosfatáz, (C) amyláz, (D) exochitináz, (E) chitobiosidáz, (F) endochitináz. U každé z nich je zobrazena enzymatická aktivita listů (po 2 a 24 hodinách) a stopky květu (po 24 hodinách). Aktivita u kontrolních rostlin je označena černě, u krmených rostlin bíle a u rostlin s aplikací 1 mM JA šedě. Uvedená data jsou průměrem \pm SD ($n = 5-6$); signifikantní rozdíly mezi kontrolou a krmenými rostlinami (popř. kontrolou a rostlinami ovlivněnými JA) byly znázorněny pomocí Studentova t -testu (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$.

Po aplikaci JA na list jsme však nenaměřili žádnou (či velmi nízkou) enzymatickou aktivitu (obrázek č. 4). Je třeba podotknout, že u lépe probádaných masožravých rostlin toto vede k obdobné reakci jako při nakrmení hmyzem. Aby se ukázalo, zda je hladina jasmonátu ve zkoumaných listech zvýšená, část z nich jsme nakrmili a část poranili; biochemickými metodami poté byly stanoveny hladiny vybraných fytohormonů. Překvapivě se ukázalo, že po nakrmení (oproti poranění) zůstávají hodnoty jasmonátů JA, JA-Ile a *cis*-OPDA velmi nízké (obrázek č.5).



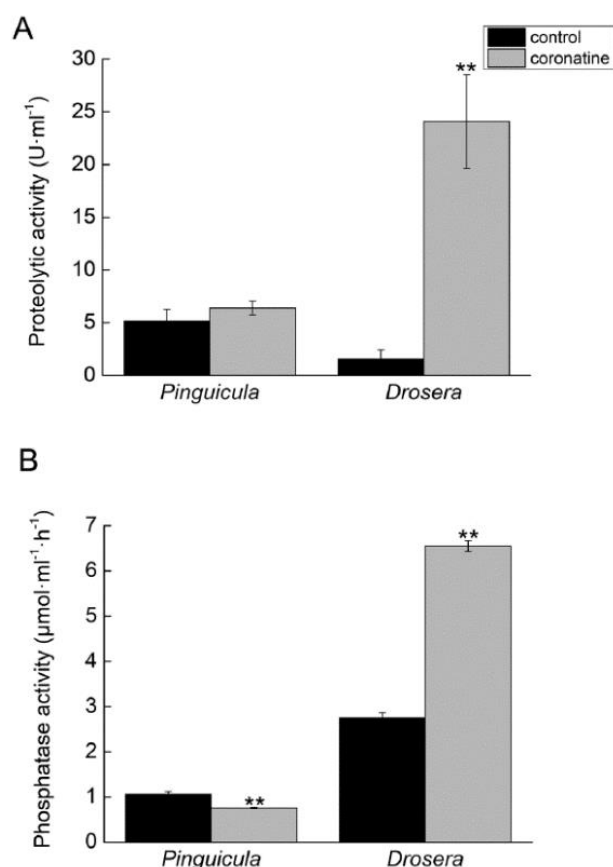
Obrázek č. 5: Grafy zobrazující hladinu fytohormonů JA (A), JA-Ile (B), cis-OPDA (C), ABA (D), SA (E), IAA (F) v listech tučnic v čase (0, 2 a 24 hodin). Černě je vyznačena aplikace kořisti, bíle zranění jehlou (10x – 15x). Data pro IAA po poranění rostliny nebyla vyobrazena z důvodu selhání analýzy. Uvedená data jsou průměr \pm SD ($n = 5 - 15$); signifikantní rozdíly mezi kontrolou (čas 0) a ovlivněnými rostlinami (krmení, poranění) byly znázorněny pomocí Studentova *t*-testu (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$.

Zdálo se tedy, že tučnice po nakrmení nevykazují zvýšenou hladinu jasmonátů, jak je běžné. Bylo tedy provedeno několik experimentů k potvrzení tohoto závěru. Byl změřen záznam extracelulárního elektrického signálu na listů tučnice při poranění a po nakrmení. Je známo, že akumulaci jasmonátu často indikuje právě elektrický signál. Ukázalo se, že na poranění rostlina reaguje typickým variačním potenciálem, zatímco při nakrmení se takto neděje (tím byla vyloučena iniciace jasmonátové signalizace na základě elektrického signálu, jak je známo u rodů *Dionaea* a *Drosera*) (obrázek č. 6).



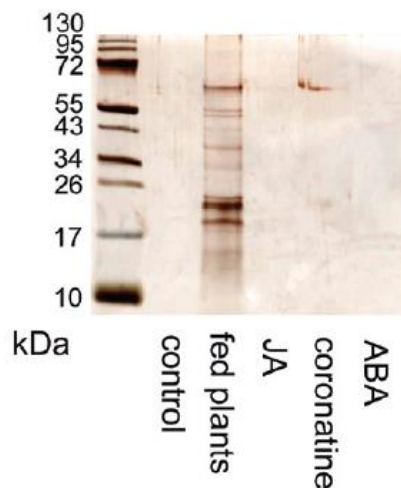
Obrázek č. 6: Záznam extracelulárního elektrického signálu listů tučnice po aplikaci kořisti (nahore) a po poranění listu jehlou (dole). Šipky označují začátek aplikace příslušného vnějšího stimulu (kořist, poranění). Uvedené záznamy jsou reprezentativní a pocházejí z pěti nezávislých měření.

Dále byla změřena fosfatázová a proteolytická aktivita exudátu u tučnice a rosnatky, obě ovlivněné koronatinem (bakteriální nápodoba JA-IIe). Rosnatka po aplikaci koronatinu vizuálně prokázala typickou reakci, a i její enzymatické aktivity výrazně vzrostly. V případě tučnic však opět enzymatická aktivita zůstala na úrovni kontrolních trávicí tekutiny (obrázek č.7). Z toho plyne že rosnatky i tučnice zřejmě mají zcela jinou dráhu regulace enzymatické aktivity.



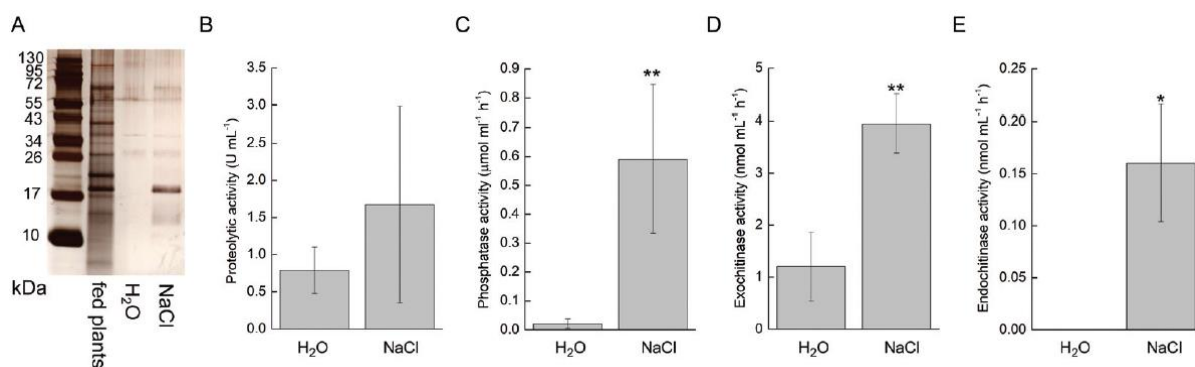
Obrázek č. 7: Grafy zobrazující proteolytické (A) a fosfatázové aktivity (B) u tučnice a rosnatky po zevní aplikaci koronatinu. Černě jsou vyznačeny kontrolní rostliny, šedě rostliny vystavené působení koronatinu. Uvedená data jsou průměrem ± SD ($n = 5$); signifikantní rozdíly mezi kontrolami a rostlinami ovlivněnými koronatinem byly znázorněny pomocí Studentova *t*-testu (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$.

Jako finální test jsme provedli elektroforetickou separaci, kde byla porovnána přítomnost enzymů v kontrole a exudátu z listů po aplikaci kořisti, JA, koronatinu či kyseliny abscisové (ABA). Po obarvení gelu stříbrem se zcela zřetelně ukázalo, že pouze nakrmení rostlin vykazovalo přítomnost trávicích enzymů (obrázek č. 8).



Obrázek č. 8: SDS-PAGE trávicích tekutin obarvených stříbrem. Do jamek byl napipetován stejný objem tekutiny získané 24 hodin po aplikaci kořisti, JA, koronatinu či ABA.

Po těchto zjištěních jsme se obrátili zpět ke starším pracím předchozích badatelů, kde jsou zmíněny dvě hypotézy fungování trávicích žláz tučnic. První z nich předpokládá, že enzymy mohou být již předsyntetizovány a uloženy ve vakuolách a po záchytu kořisti jsou tyto enzymy pouze vypláchnuty na povrch. Tato teorie nicméně předpokládá kompletní autolýzu buněk. Druhá teorie předpokládá, že po zachycení kořisti jsou enzymy syntetizovány *de novo* a trávicí žlázy si zachovávají svou integritu. K vnesení světla do tohoto rozporu byl proveden experiment, kdy jsme aplikovali na listy hypertonický roztok 5% NaCl (jako kontrola posloužila destilovaná voda). Ukázalo se, že některé enzymy mají signifikantně význačný nárůst (fosfatázy, endochitinázy, exochitinázy) avšak další nebyly pro tento případ detekovány vůbec (amylázy, chitobiosidázy). To značí, že některé enzymy nepochybně předsyntetizovány jsou (např. fosfatáza, která se často akumuluje v buněčných stěnách žláz mnohých masožravých rostlin) (obrázek. č. 9). Nelze to však potvrdit i pro ostatní enzymy (viz biochemická analýza zkoumaného exudátu, viz tabulka č. 1), které mohou být syntetizovány nově až po záchytu kořisti. Dráhu vedoucí k expresi těchto enzymů se nepodařilo odhalit.



Obrázek č. 9: Grafy enzymatických aktivit listů tučnic po aplikaci hypertonického roztoku 5% NaCl (jako kontrola sloužila destilovaná voda). Zobrazeny jsou detekované aktivity proteáz (B), fosfatáz (C), exochitináz (D) a endochitináz (E). Aktivity pro amylázy a chitobiosidázy nebyly detekovány. S výsledky koresponduje i SDS-PAGE pro trávicí enzymy z exudátů odebraných z listů po aplikaci příslušných stimulantů – po aplikaci hypertonického roztoku se objevuje jasný pás v oblasti přibližně 20 kDa. Uvedená data jsou průměrem \pm SD ($n = 3 - 6$); signifikantní rozdíly mezi vzorky ovlivněnými H₂O a 5% roztokem NaCl byly znázorněny pomocí Studentova *t*-testu (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$.

Tabulka č. 1: Proteiny v trávicí šťávě tučnice (získány 24 hodin po nakrmení), které byly identifikovány analýzou skrze hmotnostní spektrometrii.

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

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

2.2 Vliv potravních strategií láčkovek na aktivitu enzymů

Jak bylo zmíněno v předchozí podkapitole, láčkovky (*Nepenthes*) patří do řádu hvozdíkatých (Caryophyllales). Kořist chytají do nálevkovitých útvarů zvaných láčky, které ve spodní části obsahují viskózní trávicí kapalinu a v pletivu trávicí žlázy pro vylučování enzymů a příjem živin z kořisti. Hmyz samotný obvykle sklouzne z lepkavého obústí láčky (peristom) a spadne do kapaliny. V úniku kořisti brání viskozita kapaliny a vosková zóna v horní části láčky (zastoupení obou těchto faktorů se může lišit dle specializace na létavý či pozemní hmyz; toto obvykle souvisí s nadmořskou výškou výskytu rostliny). Aby nebyla trávicí kapalina ředěna dešťovou vodou, nachází se nad ústím láčky víčko.

Morfologie i fungování láčky se může mezi různými druhy láčkovek výrazně lišit; zejména pokud u nich došlo k částečnému či úplnému odklonu od hmyzožravosti. Obecně se zdá, že s užší specializací na nové druhy „kořisti“ se vytrácejí charakteristické znaky typické pro masožravé rostliny.

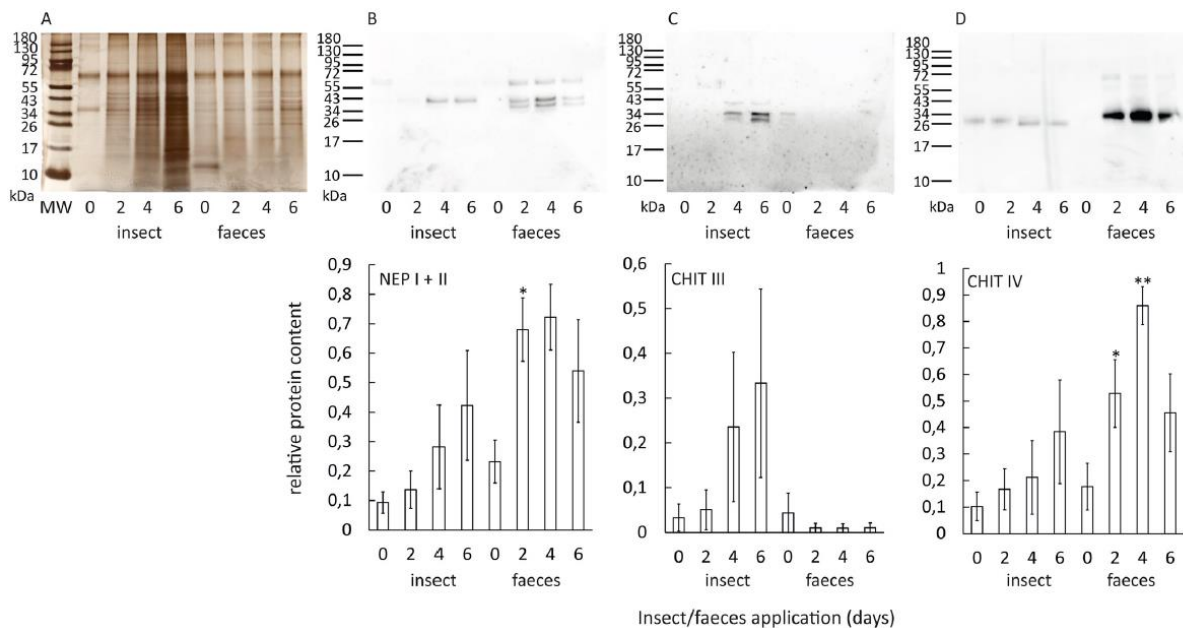


Obrázek č. 10: Obrázek dvojice studovaných láčkovek v jejich přirozeném prostředí (Borneo). (A) Láčkovka *Rafflesova* (*Nepenthes rafflesiana*). (B) *Nepenthes hemsleyana*, jejíž prodloužená láčka poskytuje dostatečný denní úkryt pro netopýry druhu *Kerivoula hardwickii*.

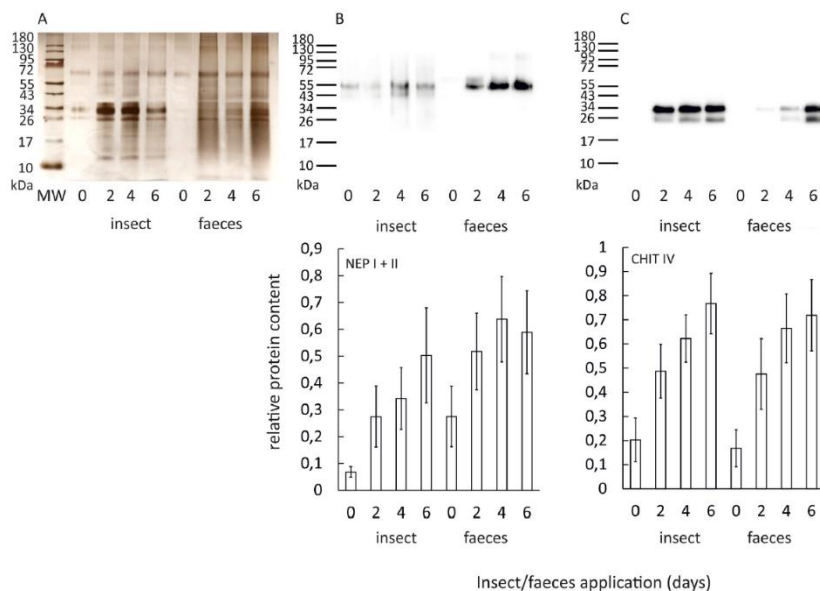
V pralesích Bornea se vyskytuje láčkovka *Nepenthes hemsleyana*, která si vybudovala mutualistický vztah s drobnými vlněnými netopýry *Kerivoula hardwickii*. Zatímco tyto hmyzožraví netopýři používají láčky rostlin jako denní nocležiště, uvolňují do láčky moč a výkaly, které se pro rostlinu stávají vydatným zdrojem dusíku. Na základě tohoto odklonu od masožravosti by se tedy dala očekávat určitá redukce charakteristicky masožravých znaků, včetně zastoupení enzymů a jejich regulace. Abychom tuto teorii potvrdili či vyvrátili, provedli jsme sérii experimentů, kde zkoumáme míru zastoupení a aktivit vybraných enzymů (Nepenthesin I a II, chitinázy III a IV) v trávících šťávách rostliny. Pro srovnání nám posloužila hmyzožravá láčkovka Rafflesova (*Nepenthes rafflesiana*), která je současně i geneticky nejbližším příbuzným *Nepenthes hemsleyana* (obrázek č. 10).

V prvé řadě jsme skrze SDS-PAGE zkoumali zastoupení výše uvedených enzymů v trávící tekutině odebrané z láček obou typů rostlin (obrázky č. 11 a 12). K dispozici jsme měli vzorky před nakrmením a dále 2, 4 a 6 dní po nakrmení. Zdroje krmiva byly dvojí – buď hmyz nebo výkaly. Po elektroforetické separaci se ukázalo, že navzdory našim předpokladům obě rostliny reagují sekrecí enzymů na oba užití typy zdrojů živin. Pro *Nepenthes hemsleyana* jsme ovšem nezaznamenali přítomnost chitinázy III; je možné, že její aminokyselinová sekvence se liší od naší použité protilátky při Western blottingu nebo že v trávící tekutině této rostliny jednoduše chybí. Z trávících tekutin jsme u obou rostlin po separaci provedli také obarvení gelů stříbrem, což odhalilo přítomnost velkého množství proteinů.

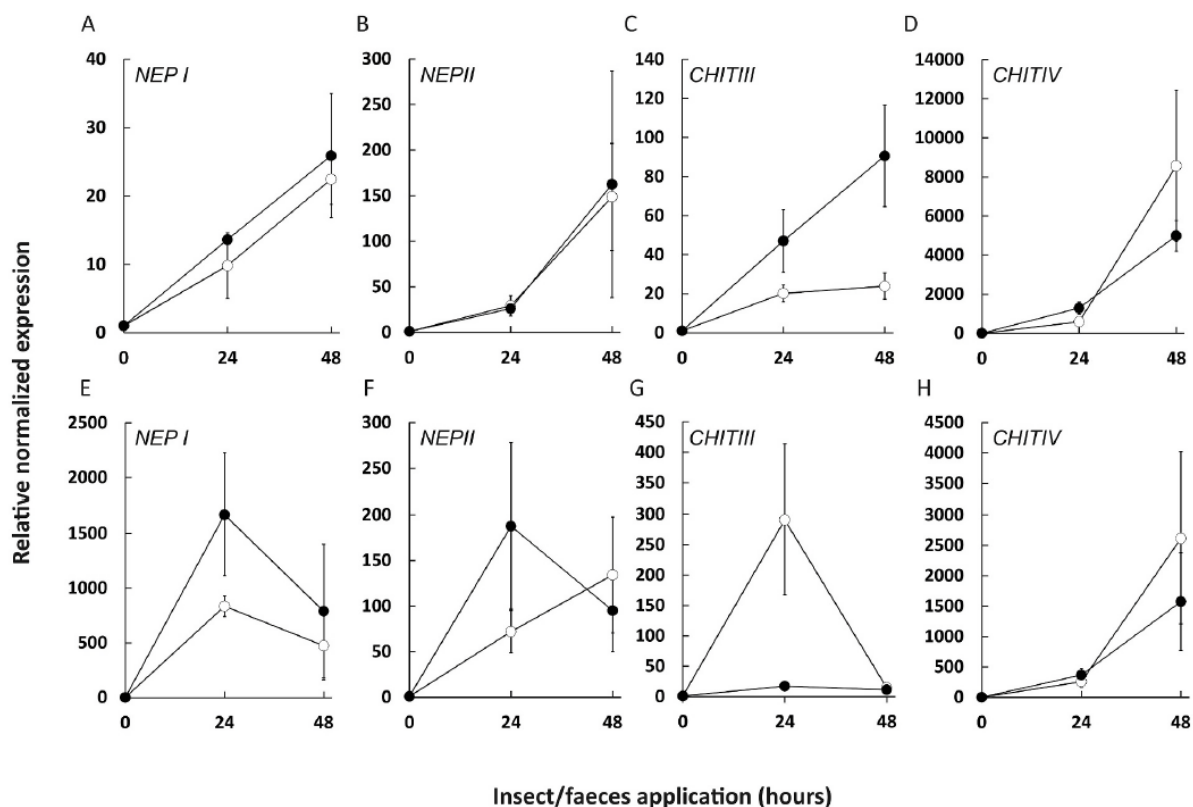
Dalším krokem byl průzkum genetické exprese všech čtyř řešených enzymů pro obě rostliny a na ně aplikovaných typů krmiva. Tento výzkum byl proveden během mého pracovního výjezdu do laboratoří Katedry molekulární biologie a Katedry fyziologie rostlin na Přírodovědecké fakultě Univerzity Komenského v Bratislavě (Slovensko). I tyto výsledky potvrdily, že došlo k výrazné expresi trávících enzymů po aplikaci hmyzu i výkalů o obou zkoumaných rostlin (obrázek č. 13).



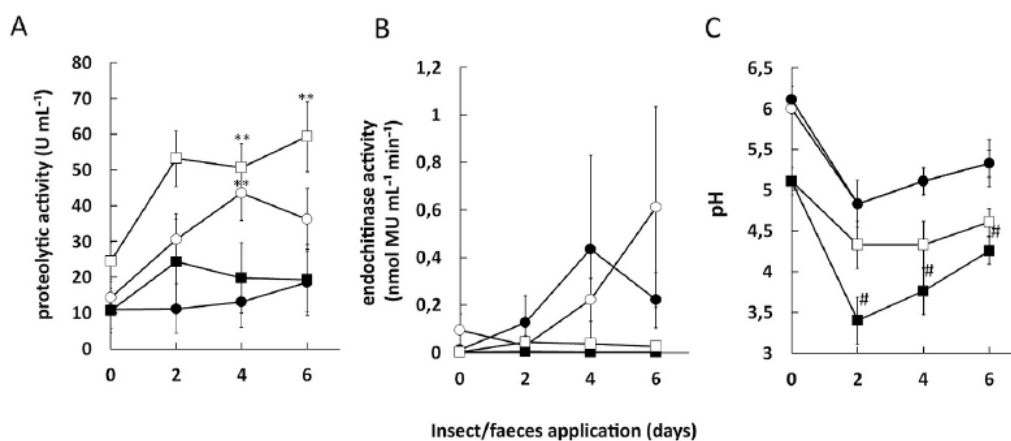
Obrázek č. 11: Shrnutí analýzy skrze SDS-PAGE vybraných enzymů z *Nepenthes rafflesiana* po krmení hmyzem či výkaly. Čísla 0, 2, 4 a 6 označují den odběru trávicí tekutiny od započetí experimentu. (A) Elektroforetický gel s rozseparovanými proteiny obarvený stříbrem. (B) Western blotting pro detekci nepenthesinů (zde míněn nepenthesin I a II dohromady). (C) Western blotting pro detekci chitinázy III. (D) Western blotting pro detekci chitinázy IV. Pod každým Western blottingem je uváděná kvantifikace chemiluminiscenčního signálu. Uvedená data jsou průměrem \pm SE ($n = 6$); signifikantní rozdíly mezi odezvou láček na hmyz a výkaly byly znázorněny pomocí párového Studentova t -testu (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$.



Obrázek č. 12: Shrnutí analýzy skrze SDS-PAGE vybraných enzymů z *Nepenthes hemsleyana* po krmení hmyzem či výkaly. Čísla 0, 2, 4 a 6 označují den odběru trávicí tekutiny od započetí experimentu. (A) Elektroforetický gel s rozseparovanými proteiny obarvený stříbrem. (B) Western blotting pro detekci nepenthesinů (zde míněn nepenthesin I a II dohromady). (C) Western blotting pro detekci chitinázy IV. Pod každým Western blottingem je uváděná kvantifikace chemiluminiscenčního signálu. Uvedená data jsou průměrem \pm SE ($n = 6$); signifikantní rozdíly mezi odezvou láček na hmyz a výkaly byly znázorněny pomocí párového Studentova t -testu (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$.



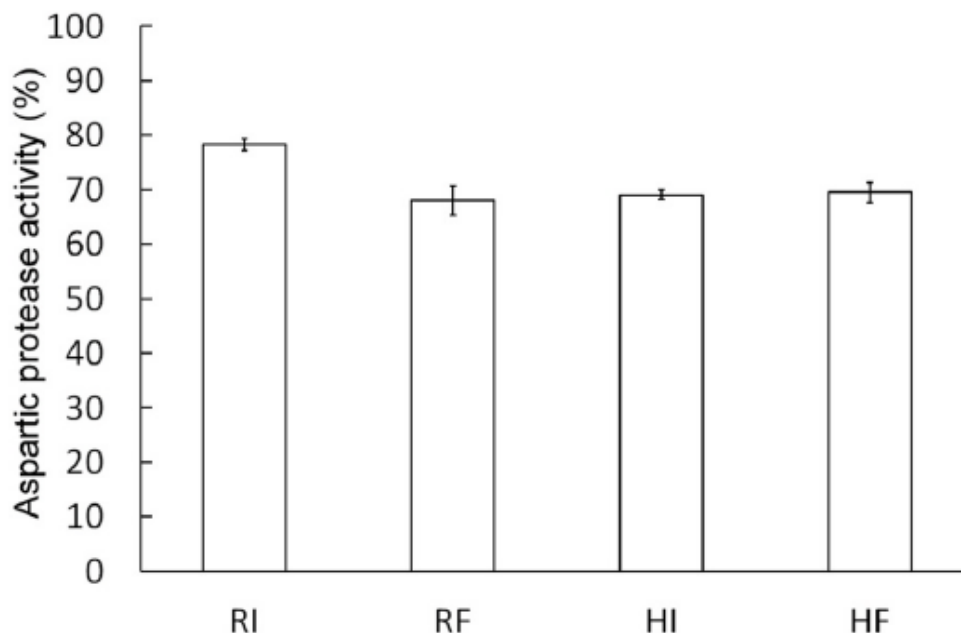
Obrázek č. 13: Grafy ukazující expresi genů *nepenthesin I* (A, E), *nepenthesin II* (B, C), *chitináza III* (C, G) a *chitináza IV* (D, H) u rostlin *Nepenthes rafflesiana* (A až D) a *Nepenthes hemsleyana* (E až F). Genová exprese před přidavkem kořisti (0 h) je nastavena jako 1. Aplikace hmyzu je označena černě, aplikace výkalů bíle. Uvedená data jsou průměrem \pm SE ($n = 3$); v tomto případě nebyly v rámci Studentova t-testu zjištěny žádné statisticky významné rozdíly.



Obrázek č. 14: Enzymatické aktivity proteáz (A), endochitináz (B) a změna pH v trávicí tekutině (C) po odběru vzorku ve dni 0, 2, 4 a 6. Bílé čtverečky označují *Nepenthes hemsleyana* krmnou výkal, černé čtverečky *Nepenthes hemsleyana* krmnou hmyzem, bílé kruhy *Nepenthes rafflesiana* krmnou výkal, černé kruhy *Nepenthes rafflesiana* krmnou hmyzem. Uvedená data jsou průměrem \pm SE ($n = 6$), využito bylo Studentova t-testu. Signifikantní mezidruhové rozdíly jsou značeny (#), $P < 0,05$; signifikantní vnitrodruhové rozdíly jsou značeny (**), $P < 0,01$.

Pro lepší mezidruhové srovnání jsme učinili analýzu proteolytických a endochitinázových aktivit (obrázek č. 14). Ukázalo se, že proteolytická aktivita má po přidavku výkalů výrazně větší odezvu než v případě hmyzu, a to bez ohledu na druh rostliny. V trávící tekutině *Nepenthes hemsleyana* zůstaly zachovány i chitinázové aktivity, ať už z důvodů antipatogenní ochrany či štěpení nestrávených pozůstatků chitinu v netopýřím trusu. Nakonec jsme ještě proměřili pH trávící tekutiny z obou ovlivňovaných typů láček; to mimo jiné ukázalo, že *Nepenthes hemsleyana* okyseluje svou trávící tekutinu výrazně více než *Nepenthes rafflesiana* (obrázek č. 14).

Jelikož se předchozí výsledky zdály indikovat, že *Nepenthes hemsleyana* si zachovává enzymatickou kapacitu i pro trávení hmyzu, provedli jsme experiment s inhibítorem proteáz (pepstatin). Na základě toho určili procentuální zastoupení aspartát proteáz v celkové aktivitě trávících šťáv (obrázek č. 15). Ukázalo se, že aktivita aspartát proteáz je u obou rostlin skutečně srovnatelná, bez ohledu na typ potravy. Pro úplnost přikládám i obdržená biochemická data pro přehled složení zkoumaných typů vzorků (tabulka č. 2).



Obrázek č. 15: Graf ukazující procentuální zastoupení aspartát proteázy (70 až 80 %) v celkové proteolytické aktivitě trávících šťáv. Jsou zde uvedeny hodnoty pro *Nepenthes rafflesiana* krmnou hmyzem (RI) a výkaly (RF), dále pro *Nepenthes hemsleyana* krmnou hmyzem (HI) a výkaly (HF). Uvedená data jsou průměrem \pm SE ($n = 5$).

Tabulka č. 2: Proteiny identifikované v *Nepenthes rafflesiana* a *Nepenthes hemsleyana* hmotnostní spektroskopií.

Enzyme	Accession No.	Organism	Sample RC	Sample RI	Sample RF	Sample HC	Sample HI	Sample HF
Chitinase IV	A9ZMK1_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	yes	–	yes	yes	yes
Aspartic protease	A0A1L7NZU0_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	–	–	yes	yes	–
Aspartic protease (nepenthesin I)	NEP1_NEPGR	<i>N. gracilis</i>	yes	yes	yes ^a	yes	–	yes
Nepenthesin II	A0A193PDP6_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	–	–	yes	–	yes
Nepenthesin II	A0A0S3TFL4_9CARY	<i>N. rajah</i>	–	yes	yes ^b	–	–	–
C-terminal peptidase	A0A1L7NZU4_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	–	–	yes	yes	yes
C-terminal peptidase	A0A1L7NZU1_NEPAL	<i>N. alata</i>	yes ^c	yes	–	yes	–	yes
Peroxidase	A0A140GMM6_NEPMI	<i>N. mirabilis</i>	yes ^c	–	–	–	yes	yes
Purple acid phosphatase	A0A1L7NZT7_NEPAL	<i>N. alata</i>	yes ^c	–	–	yes	–	–
Nepenthesin I	A0A1L7NZU6_NEPAL	<i>N. alata</i>	yes	–	–	yes ^c	–	–
Beta-1 3-glucanase	I7H3Q8_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	yes	–	–	–	yes ^c
Carboxypeptidase	A0A140GML6_NEPMI	<i>N. mirabilis</i>	–	–	–	yes ^c	–	yes ^c
GDSL lipase	A0A1L7NZT8_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	–	–	yes ^c	–	–
Maturase	A0A385Y4W5_9CARY	<i>N. x ventrata</i>	yes ^c	–	–	–	–	–
Non-specific LTP-like	A0A224ANY4_NEPAL	<i>N. alata</i>	yes	–	–	yes ^c	yes ^c	–
RNase2	A0A1L7NZU5_NEPAL	<i>N. alata</i>	–	yes ^c	–	–	–	–

Samples: C - control non-fed plants, I - fed on insects, F - fed on faeces, H - *N. hemsleyana*, R - *N. rafflesiana*.

^a assigned to A9ZMF9_NEPAL Aspartic proteinase nepenthesin I from *N. alata*.

^b assigned to A0A140GML5_NEPMI Nepenthesin 2-like from *N. mirabilis*.

^c identified by only a single sequenced peptide in this sample.

3. Závěr

Má práce se pod souhrnným tématem regulace enzymatických aktivit v masožravých rostlinách zabývala dvěma podtématy. V prvním z nich jsem zkoumal regulaci enzymatických aktivit v tučnicích, druhý okruh mapoval potenciální enzymatické změny v láčkovce, která se díky svému mutualistickému vztahu s netopýry přeorientovala na koprofágní výživu.

Ačkoli naše výsledky z oblasti regulační dráhy masožravosti v tučnicích jsou převážně negativní, ve lze je považovat za přínosný výsledek. Ukázalo se totiž, že rod *Pinguicula* (z řádu Lamiales) má zřejmě produkci enzymů regulovanou jiným způsobem, než je známo u lépe prozkoumaných masožravých rostlin z řádu Caryophyllales. Ačkoli tedy na listech a stopce květu tučnice trávící enzymy produkují (pro aspartát proteázu jsme zde navrhli název pinguiculasin a pro cystein proteázu pinguiculain), bude třeba dalšího výzkumu k odhalení specifických cest regulace (nezdá se, že by v tomto případě jasmonáty sehrály při regulaci sebemenší roli).

Výzkum trávící tekutiny z láčkovky *Nepenthes hemsleyana* překvapivě prokázal nezměněnou enzymatickou aktivitu navzdory svému mutualismu s netopýry. Jelikož na trus netopýrů velmi dobře reagovala i *Nepenthes rafflesiana*, dá se z výsledků experimentů soudit, že netopýří výkaly jsou obstojnou nápodobou hmyzí kořisti. Pro trávení láčkovky tedy nepředstavují větší problém a v jejich důsledku nevznikají v trávících procesech či enzymatické regulaci žádné výraznější změny.

Obě témata řeší problematiku regulace enzymatických aktivit v masožravých rostlinách a v tomto ohledu jsme dospěli k přínosným výsledkům, rozvíjejícím naše poznání v této oblasti. Navazující práce se mohou vydat rozličnými směry, ať už jde o výzkum masožravosti v řádu Lamiales (či jiných nepříliš zkoumaných řádech masožravých rostlin) či výzkumu mutualistických interakcí dalších masožravých rostlin s okolními organismy.

4. Seznam publikací

Níže jsou uvedeny mé publikace k datu 24. května 2021.

Kocáb O, Jakšová J, Novák O, Petřík I, Lenobel R, Chamrád I, Pavlovič A (2020). Jasmonate-independent regulation of digestive enzyme activity in the carnivorous butterwort *Pinguicula x Tina*. *Journal of Experimental Botany* 71: 3749-3758.

Kocáb O, Bačovčinová M, Bokor B, Šebela M, Lenobel R, Schöner CR, Schöner MG, Pavlovič A (2021). Enzyme activities in two sister-species of carnivorous pitcher plants (*Nepenthes*) with contrasting nutrient sequestration strategies. *Plant Physiology and Biochemistry* 161: 113-121.