

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



Lokální a systémová odpověď v mucholapce podivné (*Dionaea muscipula* Ellis)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jana Jakšová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.
Termín obhajoby práce:	8. 6. 2018

Mamince. Na její věčnou památku.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jana Jakšová
Název práce	Lokální a systémová odpověď v mucholapce podivné (<i>Dionaea muscipula</i> Ellis)
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	<p>Opakovaná mechanická stimulace spouštěcích výčnělků, které vystupují z pokožky uvnitř pasti mucholapky podivné (<i>Dionaea muscipula</i> Ellis) vyvolává elektrické signály (akční potenciály) a spouští jasmonátovou signalizaci a expresi genů trávicích enzymů, které jsou příbuzné s proteiny vyvolanými patogenezí (PR proteiny). Tato sekvence událostí připomíná dobře známou signální dráhu obrany rostlin v odpovědi na útok patogena nebo býložravce. V této studii jsme sledovali elektrickou signalizaci, hromadění jasmonátů a vylučování trávicích enzymů v odpovědi na chycení kořisti, umělou mechanickou stimulaci spouštěcích výčnělků a poranění, abychom ukázali podobnost mezi obranným mechanismem rostlin a masožravostí rostlin. Výsledky ukázaly, že mucholapka podivná nedokáže rozpoznat poranění od mechanické stimulace spouštěcích výčnělků. Obě stimulace vyvolaly stejné akční potenciály, rychlé sklapnutí pasti, hermetické uzavření, akumulaci kyseliny jasmonové (JA) a jejího isoleucinového konjugátu (JA-Ile), sekreci aspartátových a cysteinových proteáz, fosfatáz a chitináz typu I. Zevní podání JA vyvolalo taktéž sekreci trávicích enzymů, což potvrdilo zapojení signalizace kyseliny jasmonové v masožravosti rostlin. Jak ale tedy mucholapka pozná, že se jedná opravdu o živočišnou kořist? Mucholapka rozpozná přítomnost a charakteristiku chemických látek a tomu také přizpůsobuje sekreci trávicích enzymů. Je-li přítomen pouze chitin, exprese trávicích enzymů není tak silná jako v případě proteinu. Mucholapka tedy pomocí chemických senzorů umí dokonale rozlišit, jestli je v pasti přítomná kořist hodná produkce enzymů nebo ne. Akumulace jasmonátů a sekrece enzymů byla zaznamenána pouze v lokální pasti, která byla stimulována, což koreluje se šířením elektrických signálů a absencisystémové odpovědi u mucholapky podivné.</p>
Klíčová slova	Akční potenciál, elektrický signál, kyselina jasmonová (JA), masožravá rostlina, mechanická stimulace, mucholapka podivná, poranění, systémová odpověď, trávicí enzym
Počet stran	76
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification

First name and surname	Jana Jakšová
Title of thesis	Local and systemic response in Venus flytrap (<i>Dionaea muscipula</i> Ellis)
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.
The year of presentation	2018
Abstract	<p>Repeated mechanical stimulation of trigger hairs protruding from the upper trap epidermis in carnivorous plant Venus flytrap (<i>Dionaea muscipula</i>) generates electrical signals (action potentials) and triggers jasmonate signalling and gene expression of digestive enzymes which are related to pathogenesis-related proteins. This sequence of events resembles the well-known plant defence signalling pathway in response to pathogen or herbivore attack. In this study, we monitored electrical signalling, jasmonate accumulation and secretion of digestive enzymes in response to prey capture, mechanical stimulation of trigger hairs and wounding to show similarity between plant-defence mechanisms and botanical carnivory. The results showed that Venus flytrap cannot recognize wounding from mechanical stimulation of trigger hairs. Both induced the same action potentials, rapid trap closure, hermetical trap sealing, accumulation of jasmonic acid (JA) and its isoleucine conjugate(JA-Ile) and secretion of proteases (aspartic and cysteine proteases), phosphatases and type I chitinase. The exogenous application of JA triggered enzyme secretion, confirming involvement of JA signalling in botanical carnivory. But how does Venus flytrap know that there is really an animal prey in its trap? Venus flytrap recognizes the presence and characteristic of chemical signals and adjusts secretion of digestive enzymes towardsthem. If only chitin is present, expression of digestive enzymes is not as strong as in the presence of protein. Thus, Venus flytrap can perfectly differentiate by chemical sensors, if the enzyme production pay off or not. The jasmonate accumulation and enzyme secretion were confined to the local traps, where the stimulus was applied, what correlates with propagation of electrical signals and absence of systemic response in Venus flytrap.</p>
Keywords	Action potential, carnivorous plant, defense, digestive enzyme, electrical signal, jasmonic acid (JA), mechanical stimulation, systemic response, Venus flytrap
Number of pages	76
Number of appendices	1
Language	Czech

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

V Olomouci dne

.....

Jana Jakšová

Poděkování patří všem, kteří mi jakkoli pomohli s mou diplomovou prací. Jmenovitě především mému vedoucímu doc. Mgr. Andreji Pavlovičovi Ph.D. za jeho vždy vstřícný přístup a za to, že mi při zpracování práce nechal volnou ruku. Mé poděkování také patří kolegům a pracovníkům z Katedry biofyziky Univerzity Palackého za poskytnuté rady a příjemnou atmosféru na pracovišti. Dále bych chtěla poděkovat pracovníkům z Laboratoře růstových regulátorů Univerzity Palackého, jmenovitě Mgr. Ivanu Petříkovi za veškerou pomoc a ochotu. A Mgr. Martinu Petráskovi, ať má zase radost.

Obsah

Seznam zkratk	2
1. ÚVOD	9
2. CÍLE PRÁCE	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1 Masožravé rostliny	11
3.2 Mucholapka podivná	11
3.2.1 Morfologie	11
3.2.2 Stavba a funkce pasti	12
3.2.3 Lovící cyklus	13
3.3 Elektrické signály	15
3.3.1 Druhy a vlastnosti elektrických signálů	17
3.3.2 Iontový mechanismus akčního elektrického signálu	18
3.4 Jasmonáty	18
3.4.1 Biosyntéza kyseliny jasmonové	19
3.4.2 JA/JA-Ile metabolismus	20
3.4.3 Mechanismus vnímání a regulace genové exprese jasmonátů	22
3.5 Systémová odpověď	25
3.5.1 Neautonomní buněčná dráha	26
3.5.2 Autonomní buněčná dráha	27
3.6 Obranné mechanismy rostlin proti napadení herbivorními organismy	28
3.6.1 Role jasmonátů při obranných reakcích rostlin	29
3.7 Složení trávicí tekutiny	30
3.7.1 Proteázy	31
3.7.2 Chitinázy	32
3.7.3 Fosfatázy	32
3.7.4 Evoluce trávicích enzymů a jejich regulační mechanismy	33
3.8 Vnímání chemických látek – “ochutnávání” jídla	34
4. MATERIÁL A METODY	36
4.1 Rostlinný materiál	36
4.2 Měření povrchových elektrických potenciálů	36
4.3 Biotest	37
4.4 Kvantifikace fytohormonů	38
4.4.1 Příprava vzorku	38
4.4.2 Parametry UHPLC-MS/MS	40
4.5 Měření enzymových aktivit	41

4.6	SDS-PAGE a Western blotting	42
4.7	Statistická analýza	43
5.	VÝSLEDKY	44
5.1	Elektrická signalizace v odpovědi na chycení kořisti	44
5.2	Jasmonátová signalizace v odpovědi na chycení kořisti	45
5.3	Biotest	47
5.4	Elektrická signalizace v odpovědi na poškození a mechanickou stimulaci	47
5.5	Jasmonátová signalizace v odpovědi na poškození a mechanickou stimulaci	48
5.6	Enzymové aktivity po poškození a mechanické stimulaci	50
5.7	SDS-PAGE a Western blotting po poškození a mechanické stimulaci	50
5.8	Chemická stimulace	53
5.9	Jasmonátová signalizace v odpovědi na chemickou stimulaci	53
5.10	Enzymové aktivity po mechanické a chemické stimulaci	54
5.11	SDS-PAGE a Western blotting po mechanickéchemické stimulaci	56
6.	DISKUZE	58
7.	ZÁVĚR	63
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64
9.	PŘÍLOHY	74

Seznam zkratek

ABA	kyselina abscisová
A _N	rychlost fotosyntézy
AOC	allenoxid cykláza
AOS	allenoxid syntáza
AP	akční potenciál
BSA	albumin z hovězího séra
COI1	CORONATINE INSENSITIVE 1
<i>coi1</i>	<i>coronatine insensitive1 mutant</i>
CYP	cytochrom P450
ČH	čerstvá hmota
dnOPDA	dinor-12-oxo-fytodienová kyselina
EAR	ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR-associated amphiphilic repression motiv
EKG	elektrokardiogram
HLB	hydrofilní lipofilní polymerní sorbent
IAA	indolyl-2-octová kyselina
JA	kyselina jasmonová
JA-Ile	jasmonoyl-L-isoleucin
JAM	JASMONATE ASSOCIATED MYC2-LIKE
JAR	kyselina jasmonová aminokyselina konjugát syntáza
JAR1	kyselina jasmonová aminokyselina konjugát syntáza
JAZ	jasmonate ZIM-domain
JMT	kyselina jasmonová kyrboxymethyl transferáza
LOX	lipoxygenáza
Me-JA	metylester kyseliny jasmonové
MFP1	multifunkční protein 1
MYB	R2R3-tyt transkripčních faktorů
MYC	bHLHzip-tyt transkripčních faktorů
NINJA	novel interactor of JAZ
OPC-4	3-oxo-2-(2'[Z]-pentenyl)-cyclopentan-1-butanová kyselina
OPC-6	3-oxo-2-(2'[Z]-pentenyl)-cyclopentan-1-hexanová kyselina
OPC-8	3-oxo 2-(2'[Z]-pentenyl)-cyclopentan-1-oktanová kyselina

OPDA	12-oxo-fytodienová kyselina
OPR3	OPDA reduktáza 3
PEP	povrchový elektrický potenciál
PR	patogenezi navozující
SA	kyselina salicylová
SFC	Skip1-Cul1-F-box protein
SFC ^{COI1}	Skip, Cullin, F-box (COI1) zahrnující komplex
SP	systemový potenciál
SPE	extrakce pevnou fází
TFs	transkripční faktory
TIR1	auxinový receptor
TPL	TOPLESS
UHPLC-MS/MS	ultra účinná kapalinová chromatografie spojená s tandemovým hmotnostním spektrometrem
VP	variační potenciál

1. ÚVOD

Botanická masožravost je jednou z mnoha cest, kterou se rostliny adaptovaly, aby se vypořádaly s nedostatkem živin v půdě. Masožravé rostliny si vyvinuly speciální listy, nazývané pasti, které slouží k lákání kořisti, jejímu ulovení a strávení. Pasti jsou obvykle méně efektivní ve fotosyntéze, ale extrémně efektivní v získávání živin z chycené kořisti. Tyto živiny mohou později stimulovat fotosyntézu, a tedy i růst celé rostliny nebo její plodnost.

Masožravá rostlina mucholapka podivná (*Dionaea muscipula* Ellis.) si vyvinula svírací čepel z listů s citlivými spouštěcími chloupky, nazývané též „trichomy“. Stimulací těchto výčnělků je generován elektrický signál – akční potenciál. Při vyvolání dvou akčních potenciálů dochází k rychlému uzavření pasti. Reakce mucholapky je extrémně rychlá – aby byl lov úspěšný, musí být rychlejší než úniková odpověď kořisti. Zoufalý pohyb kořisti uvnitř uzavřené pasti ještě více dráždí spouštěcí „trichomy“ a generuje stovky akčních potenciálů, což by mělo být jasnou zprávou pro rostlinu, že je uvnitř pasti živý objekt. Fytohormony ze skupiny zvané jasmonáty se akumulují v pasti a spouští expresi genů trávicích enzymů.

Sekvence událostí po zachycení kořisti připomíná dobře známou signální dráhu obrany rostlin v reakci na napadení patogenem nebo býložravcem. Po poranění generují rostliny elektrické signály a akumulují jasmonáty nejen v lokálních, ale také v distálních (systémových) listech. Ty spouštějí expresi genů souvisejících s patogenezí (pathogenesis-related, PR), které se podobají zaživacím enzymům u masožravých rostlin. Tato podobnost nás vedla k tomu, abychom prozkoumali, zda se botanická masožravost mohla vyvinout z obranných mechanismů rostlin.

Kromě dotykových senzorů mucholapka disponuje také systémem chemických senzorů, který vyhodnocuje kvalitu potravy poskytovanou kořistí. Touto problematikou se zabýval již Charles Robert Darwin, který publikoval první souhrnné dílo o masožravých rostlinách „*Insectivorous plants*“. Obsahuje mnoho jednoduchých pozorování rosnatky okrouhlolisté, mucholapky podivné a několika dalších masožravých rostlin nejen při lapání kořisti, ale také při reakci na nejrůznější chemická činidla. Ačkoliv je mucholapka podivná známá dlouho, molekulární základy jejího masožravého životního stylu nejsou ještě zcela prozkoumány. Zatímco Darwin založil své závěry na pouhém pozorování, dnes máme možnost provádět molekulární analýzy, abychom o tajemství mucholapky získali nové poznatky.

2. CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části této práce je zpracovat literární přehled o lokální a systémové odpovědi v mucholapce podivné. Bude podrobně popsán celý proces, který začíná vysláním elektrického signálu, pokračuje aktivací syntézy jasmonátů a následnou reakcí v lokálním/distálním pletivu, tedy expresí genetické informace a syntézou trávicích enzymů. Elektrická a jasmonátová signalizace u modelové rostliny mucholapky podivné bude porovnána se systémovou signalizací rostlin nemasožravých jako je huseníček či rajče, které využívají jiného typu elektrického potenciálu, než je ten, který je šířen v mucholapce.

V experimentální části pak lze plynule navázat na mou práci bakalářskou a pokračovat v měření mimobuněčných elektrických potenciálů, analýzách jasmonátů a dále se věnovat výzkumu fyziologické odpovědi, což je v případě masožravých rostlin syntéza trávicích enzymů. Pomocí základních proteomických a biochemických metod, mezi něž patří elektroforéza, western blotting a měření enzymatické aktivity v trávicí tekutině. Pomocí dvoupaprskového spektrofotometru bude studována přítomnost a aktivita dvou typických trávicích enzymů dionaesinu (aspartát proteáza), dionainu (cystein proteáza), fosfatáz a chitináz po opakovaném mechanickém poškození pletiva a mechanostimulaci. Základní hypotézou diplomové práce je otázka: Dokážou akumulované jasmonáty v odpovědi na poranění indukovat syntézu trávicích enzymů, tedy typickou masožravou odpověď? Anebo dokáží tento falešný signál rostliny vyhodnotit správně a syntézu trávicích enzymů spustit jen v odpovědi na akumulované jasmonáty po podání živočišné kořisti? Tato studie by měla objasnit dlouho diskutovanou otázku na téma, jak specifická je elektrická signalizace v masožravých rostlinách.

Proces, při kterém jsou vysílány elektrické signály, je časnou odpovědí mucholapky na výskyt kořisti nebo jiného stimulu. Co se ale odehrává v pasti, jakmile mechanická stimulace kořisti ustane, tedy při pozdní reakci mucholapky? Chemické signály mohou udržovat koncentraci kyseliny jasmonové (JA) a jejího isoleucinového konjugátu (JA-Ile) a produkci enzymů zvýšenou i přesto, že vyvolání elektrických potenciálů kořisti ustane. Vnímání chemických látek a tomu, jaké látky nejvíce regulují produkci enzymů, by se měla věnovat druhá část experimentální práce. Tato problematika bude studována taktéž pomocí výše uvedených metod a úkolem na závěr je vyhodnotit a diskutovat obdržené výsledky.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Masožravé rostliny

Masožravé rostliny jsou velmi mnohotvárnou a různorodou skupinou často jen velice vzdáleně příbuzných druhů z odlišných systematických řádů a čeledí. Společné vlastnosti – schopnost lovit, konzumovat živočichy a zužitkovat organické produkty trávení pro získání existenční výhody v podmínkách kritického nedostatku přístupných živin v prostředí – sjednocuje v této skupině druhy z nejrůznějších podnebných a zeměpisných oblastí, lišící se morfologicky i ekologicky. Současná světová flóra obsahuje osm kompletně masožravých čeledí s celkem patnácti rody (Studnička, 1984, 2006). Nejpodivuhodnější ze všech masožravých rostlin je bezpochyby mucholapka podivná (*Dionaea muscipula* Ellis; Darwin, 1875).

3.2 Mucholapka podivná

Mucholapka podivná je jediným druhem rodu mucholapka řazeného do čeledi rosnatkovité (poprvé popsal John Ellis, 1769). Mucholapka byla první rostlinou, u níž byla zjištěna masožravost (Darwin, 1875). Právě u mucholapky bylo také poprvé prokázáno převádění mechanického podráždění pastí v elektrický vzruch, známý dnes i u některých jiných masožravých rostlin (Burdon-Sanderson, 1873). Dále je populární tím, že během evoluce opustila osvědčený a častý způsob lapání kořisti na lepkavé žlázy, popsaný u rosnatek. Stala se jedinou rostlinou chytající suchozemské, pozemní tvory pomocí velmi rychle pohyblivého mechanismu. Kořist při tom bývá mnohem rozměrnější nežli u všech ostatních masožravých rostlin s aktivními lapacími systémy jako u aldrovandky, měchýřnatky a bublinatky, jež jsou specializovány na drobné živočichy vodní, či půdní (zooplankton, zooedafon; Studnička, 2006).

3.2.1 Morfologie

Přízemní růžice o průměru 7 až 14 cm se skládají z asimilačních a současně lapacích listů. Čepele jsou přetvořeny v pohyblivý lapací orgán. Křídlatě rozšířené řapíky tvoří asimilační plochu. Konce řapíků jsou ponořeny v půdě. Jsou ztloustlé a dohromady skládají asi 1 cm velký cibulovitý útvar. Z něho vyrůstá několik slabých, chudě větvených, ale až přes 10 cm hluboko zapuštěných kořenů. Cibulovitý podzemní orgán slouží rostlině jako zásobárna živin, důležitá při častém jarním rašení květenství. Kromě toho pomocí tohoto orgánu

rostlina přežívá extrémní zimy, nahodilá období sucha a požáry vegetace, jež jsou pro její biotopy charakteristické (Studnička, 1984, 2006).

3.2.2 Stavba a funkce pastí

Dvojitě symetrické laloky čepele listu mucholapky jsou spojeny masivním středním žebrem a vytváří tak přibližně 2 cm velkou lapací past (Bailey & McPherson 2012). Každý lalok má na obvodu tuhé špičaté výčnělky, kterých může být 14-21 (Juniper *et al.*, 1989). Ve zcela otevřeném stavu je mezi laloky úhel až 80° (Poppinga *et al.*, 2016). Také celá čepel je tuhá, pevná a pružná. Na vnitřní ploše jsou dva druhy mikroskopických žláz. Při okraji čepele je pásmo s nektarovými žlázami, zapuštěnými v pokožce. Ty slouží k lákání kořisti. Většinu plochy čepele pokrývají mnohobuněčné trávicí žlázy ve tvaru hříbu s krátkou nohou. Trávicí šťáva se vylučuje z hlaviček žláz a vstřebávání produktů trávení probíhá na jejich bázi. Na každé polovině čepele se dále nacházejí většinou tři, u větších listů někdy čtyři citlivé „chlupy“, nazývané též „trichomy“, dlouhé přibližně 2 mm. Slouží jako spoušť pohyblivé pasti. Každý citlivý "chlup" je zakončen mnohobuněčným hrotem se zesílenými buněčnými stěnami (Buchen *et al.*, 1983). Pod ním se nachází ohebná, v jednom místě zaškrcená báze z mechanosenzorických buněk měkkého parenchymatického pletiva, které jsou spojené se sousedními buňkami prostřednictvím několika plasmodesmat s bohatě vyvinutými membránami endoplazmatického retikula, sloužícího jako zásobárna Ca²⁺. Vnitřní prostor plasmodesmat je symetricky polarizovaný a komplexy cisteren endoplazmatického retikula se soustřeďují kolem vakuol obsahujících polyfenoly na bazální a apikální straně každé buňky (Buchen *et al.*, 1983; Juniper *et al.*, 1989). Právě v této prstencové zúžené oblasti při deformaci způsobené zavedením kořisti o hrot vzniká elektrický signál potřebný ke sklapnutí pasti. Tato část brání také ulomení chlupovitého útvaru při sevření čepele. A právě tato část prozrazuje, že přísně morfologicky vzato vlastně nejde o chlup čili trichom. Základem tohoto citlivého orgánu totiž není pouze jediná pokožková buňka, ale celá skupina buněk. Popsaný chlupovitý útvar, je proto ve skutečnosti výčnělkem neboli emergencí. Odborníci pátrali, zda nevznikl vývojovou přeměnou stopkatých žláz (tentakulí) rosnatek, což jsou také výčnělky. U určitých buněk citlivých chlupovitých útvarů mucholapky bylo objeveno zvláštní zesílení stěn, tak zvané Casparyho proužky. Právě to anatomové pokládají za hledaný důkaz. Stejně Casparyho proužky mají totiž i tentakule, pro jejichž funkci mají zvláštní důležitost. U mucholapky jsou však pravděpodobně jen bezvýznamným rudimentem (Studnička, 2006).

3.2.3 Lovící cyklus

Lovící cyklus zahrnuje konstitutivně aktivovaný mechanismus pro rychlé chycení kořisti, po němž následuje dobře organizovaná sekvence aktivace genů odpovědných za těsné uzavření pasti, trávení kořisti a vstřebávání živin. Rozhodnutí o jejich postupné aktivaci jsou založena na „počítání“ stimulací smyslových orgánů (Hedrich & Neher, 2018).

Při dotyku se spouštěcí výčnělky ohýbají hlavně ve zúžené části, což vede k deformaci a stimulaci senzoričkových buněk. Výsledkem je otevření mechanicky citlivých iontových kanálů, depolarizace buněčné membrány a vzniku receptorového potenciálu (Hodick & Sievers, 1988; Sibaoka, 1991; Król *et al.*, 2006; Escalante-Pérez *et al.*, 2011). Během stimulace mohou komplexy endoplazmatického retikula a vakuol působit jako tlakové převodníky s fenolickým obsahem dodávajícím ionty nezbytné pro vyvolání elektrického signálu (Buchen *et al.* 1983, Juniper *et al.* 1989). Napěťově řízené iontové kanály pak zesilují receptorový potenciál a vytvářejí akční potenciál s konstantní amplitudou a rychlostí (Juniper *et al.*, 1989; Volkov *et al.* 2008b; 2014).

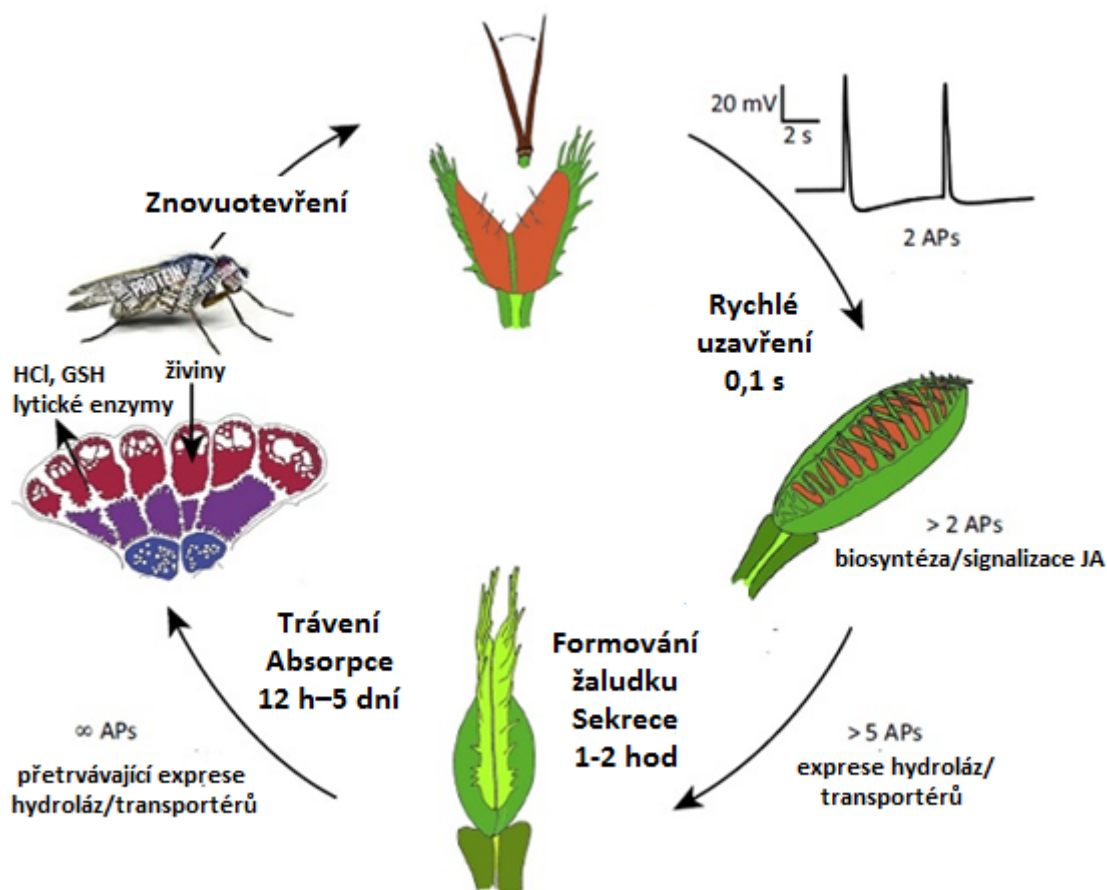
První mechanoelektrická stimulace spouštěcích trichomů vyvolaná hmyzem není smrtelně nebezpečná, pouze nastaví lapací část rostliny do režimu „chystá se chytit“. Při pokojové teplotě není totiž jediný stimul k uzavření pasti dostatečný. Obnova klidového potenciálu po depolarizaci trvá zhruba 20-30 s. V tomto časovém rozmezí je nezbytné druhé podráždění (Brown, 1916). Protože každý stimul vyvolává depolarizaci o stejné velikosti, druhý stimul v tomto časovém období má aditivní charakter. Toto „počítání“ nebo „paměť“ mechanických změn u mucholapky může zabránit jejímu falešnému uzavření, pokud by do pasti spadly listy stromů anebo částice půdy. Je-li dráždění velmi jemné, je třeba zvláště u starších méně aktivních listů nebo při nízkých teplotách i většího počtu podnětů, aby se past sevřela (Volkov *et al.* 2007, 2008a, 2008b, 2008c, 2008d). Jak je vidět na **Obr. 1**, obvodové špičaté výčnělky čepele se při sevření protnou a vytvoří „klec“. Citlivé výčnělky uvnitř pasti jsou přitlačeny k ploše čepele, což umožňuje jejich pružná a dobře ohebná spodní část. Sevření čepele může při optimální teplotě 35 °C proběhnout během 0,5 sekundy. Při jiných teplotách nebo u vícekrát použitých pastí je tento čas delší (Williams & Bennett 1982, Hodick & Sievers 1988).

V tuto chvíli ovšem není past zcela uzavřena. Po rychlém uchycení kořisti dochází ještě k dalšímu, velmi pomalému pohybu. Okraj pasti se začne vyklánět ven a vzniklý ohyb umožní dokonale těsné přilehnutí obou polovin čepele. Při trávení je kořist dokonale sevřena, ale nikoli rozdrcena. Konečné uzavření pasti a tvorba „zeleného žaludku“, která je důležitá pro trávení kořisti závisí na rostlinném hormonu kyselině jasmonové (Escalante-

Pérez *et al.*, 2011; Nakamura *et al.*, 2013; Wasternack & Hause, 2013; Scherzer *et al.*, 2017). JA aktivuje endokrinní systém mucholapky vyvoláním exprese genů a exocytózy hydrolytických enzymů ve velkém počtu vyskytujících se žláz, které pokrývají vnitřní povrch žaludku. V tomto stádiu hydrolázy sekretované do žaludku rozkládají kořist na bloky stavebních živin. Paralelně s tím je ve žlázách zvýšená exprese transportérů pro vstřebávání živin. Čím častěji se kořist dotýká spouštěcích chloupků, tím více je spouštěno AP a je syntetizován hormon JA, tím delší a větší je aktivita endokrinního systému mucholapky. Tímto způsobem počet AP informuje rostlinu o velikosti a obsahu živin v bojující kořisti. Produkty trávení svaloviny a hemolymfy, zejména aminokyseliny a sodné a amonné ionty, stále chemicky dráždí list, takže zůstává sevřen řadu dní. Když přibližně po jednom týdnu dojde k dokončení rozkladu kořisti a absorpci živin, past se znovu otevře a je připravena na vstup do dalšího lovícího cyklu (Bemm *et al.*, 2016; Volkov *et al.*, 2011). Je-li past vydrážděna naprázdno, otevře se již během asi dvou dnů. Pro normální činnost je tedy důležité nejprve mechanické a potom chemické dráždění. Sklapnutí pasti lze ovšem vyprovokovat i jinými podněty, například elektrickým proudem nebo vysokou teplotou. Čepel mucholapky se může naprázdno sevřít údajně až dvanáctkrát. Strávit však může postupně jen 2 až 3 kusy kořisti. Omezená životnost tohoto trávicího orgánu souvisí s opotřebením žláz, i když na rozdíl od četných jiných masožravých rostlin dochází v již vyprázdněných žlázách mucholapky k resyntéze enzymů (Studnička, 2006).

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

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



Obr. 1 Lovící cyklus mucholapky podivné. První mechanoelektrická stimulace spouštěcích trichomů vyvolaná hmyzem nastaví lapací část rostliny do režimu „chystá se chytit“. Akční potenciál vyvolaný jedním dotykem je uložen v pasti, ale není dostatečný k jejímu uzavření. Pro rychlé uzavření pasti a zachycení kořisti je vyžadován druhý AP, který by byl vyvolán během daného časového intervalu (cca do 30 s). Při pokusu o útěk se hmyz opakovaně dotýká mechanosenzorů, čímž opakovaně vyvolává vytváření AP. Tři anebo více AP aktivují signální dráhu JA a lapací orgán se stane hermeticky uzavřeným. Žlázy, které pokrývají vnitřní povrch „žaludku“, začínají exprimovat geny kódující hydrolázové enzymy, které rozkládají kořist na bloky stavebních živin, spolu s expresí genů transportérů pro vstřebávání živin pocházejících z kořisti. V těchto procesech může být mechanicko-elektrická stimulace nahrazena přímým podáním kyseliny jasmonové. Čím častěji jsou spouštěcí výčnělky stimulovány, tím častěji jsou spouštěny AP a je syntetizován dotykový hormon JA, a tím delší a větší je i aktivita endokrinního systému mucholapky. Tímto způsobem počet AP informuje rostlinu o velikosti obsahu živin v bojující kořisti. Obrázek byl upraven a převzat od Hedrich & Neher, 2018.

3.3 Elektrické signály

Skutečnost, že elektrické signály jsou důležité pro zaznamenání hmyzí kořisti na povrchu pasti u některých druhů masožravých rostlin, je známa po staletí (Burdon-Sanderson, 1873; Hodick & Sievers, 1988). Základem tvorby elektrického signálu je membránový potenciál, který se právě při šíření vzruchu v čase mění, čímž může přenášet informace. Membránovým potenciálem se myslí elektrické napětí mezi vnitřní stranou membrány vztažené k vnějšímu povrchu buňky. Vzniká nerovnoměrným rozdělením základních fyziologických iontů mezi vnější a vnitřní částí plazmatické membrány. Je vytvářen dvěma silami, které působí v daném okamžiku na jednotlivý ion; silou chemickou, kdy na základě difúze přechází ionty

z míst o větší koncentraci do míst s nižší koncentrací a silou elektrickou, kdy elektrické pole vytvořené na membráně pohání ionty podle jejich polarity. Souhrnně tyto síly pohánějící solut přes membránu nazýváme gradientem elektrochemického potenciálu. Ve výsledku je pak cytoplasmatická strana nabitá záporně vůči vnější straně membrány, která je nabitá kladně. Číselná hodnota klidového potenciálu membrány je -50 až -200 mV (Alberts *et al.*, 1998). Princip elektrického signálu pak spočívá v tom, že po působení nějakého podnětu, např. mechanického, se otevírají a zavírají iontové kanály umístěné v cytoplasmatické membráně. To při otevření např. vápníkového kanálu, který transportuje vápenaté ionty z vnějšího prostředí do vnitřního, způsobí, že membránový potenciál je méně záporný. Tomuto jevu říkáme depolarizace. Opačným dějem je pak hyperpolarizace, tedy posun hodnoty membránového napětí do zápornějších hodnot. Po skončení depolarizace nastupuje repolarizace, během které se hodnota membránového napětí vrací zpět k výchozí klidové hodnotě. Tuto situaci popisuje Nernstova rovnice:

$$\psi_M = \varphi_i - \varphi_o = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X^z]_o}{[X^z]_i},$$

kde ψ_M = membránový potenciál, φ_i , φ_o = elektrostatický potenciál vně a uvnitř [mV]; R = univerzální plynová konstanta [J mol⁻¹K⁻¹]; T = termodynamická teplota[K]; z = počet nábojů iontu, valence; F = Faradayův náboj; X_z = konkrétní ion včetně jeho valence.

Přes membránu živých buněk probíhá současně ale mnoho různých iontů. Proto Nernstův potenciál pro jednotlivé druhy iontů jen zřídka kdy popisuje difúzní potenciál membrány. Vztah membránového potenciálu k distribuci několika iontů přes membránu vyjadřuje Goldmanova rovnice:

$$\Delta E = \frac{RT}{F} \left(\ln \frac{P_{K^+} C_{K^+}^o + P_{Na^+} C_{Na^+}^o + P_{Cl^-} C_{Cl^-}^i}{P_{K^+} C_{K^+}^i + P_{Na^+} C_{Na^+}^i + P_{Cl^-} C_{Cl^-}^o} \right),$$

kde P_{K⁺}, P_{Na⁺}, P_{Cl⁻} reprezentují propustnost membrány pro K⁺, Na⁺ a Cl⁻. Přestože by rovnice měla zahrnovat složku pro všechny ionty procházející membránou, K⁺, Na⁺ a Cl⁻ mají největší membránovou propustnost a také nejvyšší koncentraci v rostlinných buňkách a proto rovnici dominují. Vztah mezi Goldmanovou a Nernstovou rovnicí lze vizualizovat, pokud si představíme membránu, která je propustná pouze pro jeden iont. Stanovme, že tomu tak bude např. pro K⁺, takže jak P_{Cl⁻}, tak P_{Na⁺} by byly nulové. Za těchto podmínek se

Goldmanova rovnice snižuje na rovnici Nernstovu pro K^+ . Přestože biologické membrány nejsou nikdy propustné pouze pro jeden druh iontu, umělé membrány mohou tuto situaci napodobit, čehož se pak využívá pro výrobu pH a jiných iontově selektivních elektrod (Taiz & Zeiger, 2002).

3.3.1 Druhy a vlastnosti elektrických signálů

Jsou známé tři hlavní typy elektrických signálů: akční (AP), variační (VP) a nedávno charakterizovaný systémový potenciál (SP; Fromm & Lautner, 2007; Zimmermann *et al.*, 2009). Všechny tři se v rostlinách uplatňují při signalizaci na dlouhé vzdálenosti. Akční potenciál, který je vizualizován jako pík z důvodu velmi rychlé repolarizace membrány, bývá obecně vyvolán nedestruktivními stimuly, jako je například chlad, dotyk a elektrický puls (Trebacz *et al.*, 2006, Fromm & Lautner, 2007). Řídí se zákonem „vše nebo nic“ (Fromm & Spanswick, 1993), což znamená, že když nějaký stimul překročí určitou prahovou hodnotu, dochází ke generaci elektrického signálu vždy se stejnou amplitudou (Hille, 1992), ta je buď maximální („vše“), anebo žádná („nic“). Po dobu svého šíření udržuje také konstantní rychlost ($8 - 100 \text{ mm s}^{-1}$, dle Volkova až 40 m s^{-1} právě v mucholapce podivné; Volkov, 2007). Poté co je AP vyvolán, se šíří z místa stimulace cestou nejmenšího odporu kontinuou cytoplasmatické membrány v buňkách všemi směry téměř do všech živých orgánů rostliny. Zastaven je v mrtvých (nekrotických) oblastech, protože je nutná metabolická aktivita buněk (Fromm & Lautner, 2007).

Variační potenciál je pomalejší s tvarem vlny („wave-like“ signál), kvůli dlouhé době, při které probíhá repolarizace membrány. Dále se variační potenciál od AP liší tím, že obecně vzniká v odpovědi na destruktivní podněty, jako například řeznou ránu a popálení. Ve srovnání s AP se neřídí zákonem „vše nebo nic“, je charakterizován poklesem amplitudy se vzdáleností od stimulovaného místa a jeho amplituda závisí na intenzitě stimulu (Fromm & Lautner, 2007; Fromm *et al.* 2013). VP mohou také přecházet do buněk, s nimiž nemají cytoplasmatické spojení přes plazmodezmy nebo lýkovou část cévního svazku. Podle jedné z hypotéz se šíří se jako hydraulická vlna v xylému (Farmer *et al.*, 2014). Za normálních podmínek se v xylému nachází díky výparu vody přes průduchy negativní hydrostatický tlak. Ten je poškozením pletiva narušen a vodní sloupec při kontaktu s atmosférickým tlakem vyvolává zpětnou hydraulickou vlnu, která ovlivňuje propustnost mechanosenzitivních kanálů a toky H^+ přes membránu. VP se proto mohou šířit na delší vzdálenosti než AP, ale pomaleji (Stahlerg *et al.*, 2006).

Nedávno byl charakterizován SP (Zimmermann *et al.*, 2009). Jeho amplituda závisí také na intenzitě stimulu a od VP se liší opačnou polaritou (tj. šíří se jako hyperpolarizace

membrány). Jeho existence jako samostatného typu elektrického signálu však vyžaduje další studie.

Někteří autoři používají odlišnou klasifikaci pro elektrickou signalizaci založenou na elektrofyziologii živočichů a uznávají například elektrotonické nebo tříděné potenciály, jejichž amplituda se se vzdáleností exponenciálně snižuje, ale které nejsou způsobeny změnou v hydraulickém tlaku (Volkov *et al.*, 2007). Na všech místech, které obdrží elektrický signál, se hromadí jasmonáty a je aktivována exprese genů zprostředkována jasmonátem (Wildon *et al.*, 1992; Mousavi *et al.*, 2013; Farmer *et al.*, 2014).

3.3.2 Iontový mechanismus akčního elektrického signálu

U mucholapky podivně byl zaznamenán pouze akční potenciál a to jak po stimulaci kořistí, tak po poranění (Pavlovič *et al.*, 2017). Iontový mechanismus AP se u rostlin liší od mechanismu u živočichů ve využitých iontech. Zatímco u živočichů je AP vyvolaný tokem sodných (Na^+) a draselných (K^+) iontů přes membránu, u rostlin jsou za něj zodpovědné toky vápenatých (Ca^{2+}), chloridových (Cl^-) a K^+ iontů. Pokud po působení nějakého podnětu při klidovém potenciálu překročí potenciálový rozdíl určitou prahovou hodnotu, dojde ke vzniku AP. Postupně dochází k otevření kanálů v plasmalemě pro Ca^{2+} a cytoplasmu rostlinné buňky zaplaví ionty Ca^{2+} z intracelulárních a extracelulárních zdrojů (Król *et al.*, 2006). Kationty Ca^{2+} aktivují výtok Cl^- iontů z buňky, což vede k depolarizaci membrány. Následuje repolarizace plazmatické membrány a ustanovení klidového potenciálu, a to tak, že se v cytoplasmatické membráně otevírají napětově řízené kanály pro K^+ . Ty se z cytoplasmy dostávají ven z buňky a aktivně je transportován z buňky také Ca^{2+} . V tonoplastu se otevírají kanály pro Cl^- , které proudí z vakuoly do cytoplasmy (Fromm & Lautner, 2007; Hlaváčková, 2009).

3.4 Jasmonáty

Skutečnost, že elektrické signály jsou důležité pro zaznamenání hmyzí kořisti na povrchu pasti u některých druhů masožravých rostlin, je známa po staletí (Burdon-Sanderson, 1873; Hodick & Sievers, 1988), ale úloha jasmonátů v botanické masožravosti byla objasněna teprve nedávno (Ueda *et al.*, 2010; Escalante-Pérez *et al.*, 2011; Nakamura *et al.*, 2013; Libiaková *et al.*, 2014). Sloučeniny ze skupiny jasmonátů jsou od lipidů odvozené látky. Tyto krátké řetězce alkylcyklopentanonových a alkylcyklopentenonových karboxylátů mají pozoruhodné strukturní a funkční podobnosti s živočišnými prostaglandiny, brzdící zánětlivé reakce. To poukazuje na společný prekurzor, kyselinu linolenovou. Obecný termín jasmonáty se používá pro cyklické biosyntetické prekurzory kyseliny jasmonové a její

metabolity (Wasternack, 2007). První jasmonát, methylester kyseliny jasmonové (MeJA), byl izolován jako aromatická složka esenciálního oleje jasmínu bílého (*Jasminum grandiflorum*) a rozmarýnu lékařského (*Rosmarium officinalis*; Demole *et al.*, 1962; Crabalona, 1967). Kyselina jasmonová byla poprvé izolována v roce 1971 z fytopatogenní houby *Lasiodiplodia theobromae* (Aldridge *et al.*, 1971) a později byla nalezena ve všech vyšších analyzovaných rostlinách (Meyer *et al.*, 1984). Kyselina jasmonová, chemicky 3-oxo-2-(2'-*cis*-pentenyl)cyklopentan-1-octová kyselina, se vyskytuje ve formě čtyř stereoizomerů. Aktivnější je (-)-jasmonát, který však snadno izomeruje na méně aktivní (+)-jasmonát (Wasternack, 2007).

3.4.1 Biosyntéza kyseliny jasmonové

Množství bioaktivní JA je určeno její *de novo* syntézou a následným metabolismem. Téměř všechny geny a enzymy podílející se na její biosyntéze byly zjištěny během posledního desetiletí (Wasternack & Kombrik, 2010). Lokalizace biosyntézy JA se liší v závislosti na aktuálních stresových podmínkách a stupni rostlinného vývoje. Nepoškozené rostliny syntetizují JA zejména v cévních svazcích a mladém pletivu s vysokou metabolickou aktivitou (Creelman & Mullet, 1997; Stenzel *et al.*, 2003). Po poranění vegetativních částí dochází v průběhu několika sekund k významnému zvýšení hladiny JA (Glaser *et al.*, 2008). Biosyntéza JA začíná v chloroplastových membránách obsahující dienové mastné kyseliny, které jsou esterifikovány v galaktolipidy. K vytvoření substrátu biosyntézy JA je zapotřebí přeměna galaktolipidových nenasycených mastných kyselin (C18:2, C16:2) na trienové nenasycené mastné kyseliny (C18:3, C16:3). Kyselina linolenová (C18:3) nebo hexadekan trienová kyselina (C16:3) pak mohou být substráty odpovídající fosfolipázy1.

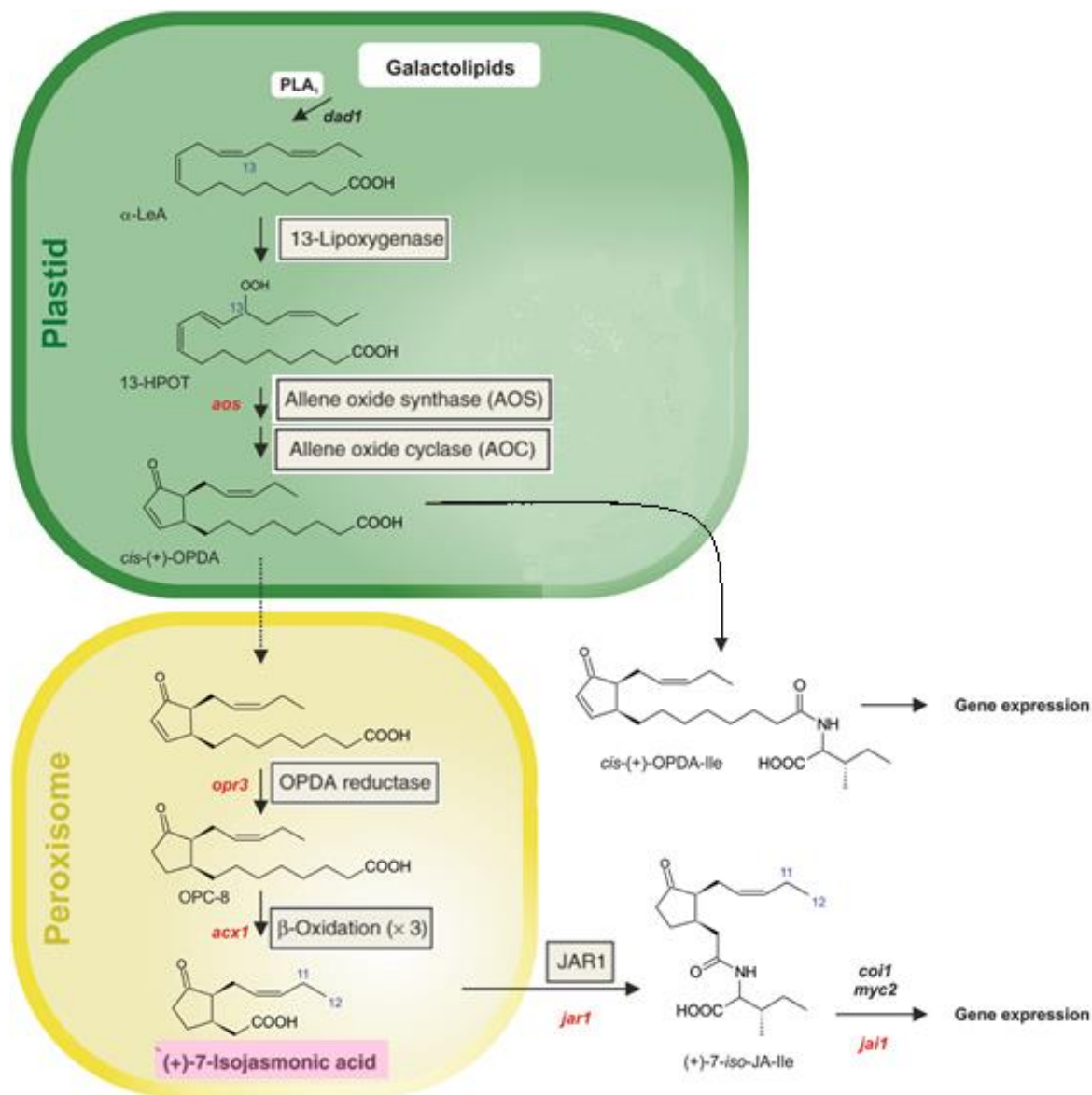
Následné klíčové reakce v oktadekanové dráze vedoucí k prvnímu cyklickému prekurzoru JA probíhají pomocí enzymů umístěných v chloroplastech. Počáteční reakcí je vložení molekulárního kyslíku do kyseliny α -linolenové pomocí chloroplastové 13-lipoxygenázy (13-LOXs, Feussner & Wasternack, 2002). Produkt LOX, 13(S)-hydroperoxyoktadekatrienová kyselina (13-HPOT), je substrátem allenoxid syntázy (AOS), vytvářející kyselinu 12,13(S)-epoxyoktadekatrienovou (12,13-EOT). Allenoxid cykláza (AOC) převádí nestabilní epoxid na kyselinu 12-oxo-fytodienovou (OPDA) – první cyklickou sloučeninu biosyntézy JA. Struktura OPDA má dvě chirální centra umožňující tvorbu dvou izomerů. Nicméně enzymatická reakce AOC přeměňuje vstupující substrát striktně stereochemickým způsobem a vede k 9S, 13S izomeru – *cis*-(+)-12-oxofytodienové kyselině (*cis*-OPDA). Oba cyklopentenony (*cis*-(+) OPDA – produkt C18:3, a *dinor*OPDA

– produkt C16:3) jsou neznámým způsobem převedeny z chloroplastů na peroxizomy (Weber, 2002).

Druhá část biosyntézy JA probíhá v peroxisomech. Přenos OPDA do peroxisomů probíhá pomocí ABC transportéru COMATOSE (CTS1, též známým jako PXA1/PED3) a/nebo záchytem iontů. V prvním kroku jsou přenesené *cis*-(+)-OPDA a dinorOPDA redukovány na odpovídající cyklopentanony – 3-oxo-2-(2'[Z]-pentenyl)-cyclopentan-1-oktanovou kyselinu (OPC8) a 3-oxo-2-(2'[Z]-pentenyl)-cyclopentan-1-hexanovou kyselinu (OPC6) pomocí peroxizomální OPDA reduktázy 3 (OPR3, Schaller, 2001). Postranní řetězec karboxylových kyselin OPC-6 a OPC-8 je zkracován pomocí mechanismu β -oxidace mastných kyselin. Substrátová esterifikace acylkoenzym A syntetázou je podmínkou pro vstup do β -oxidačního cyklu. Oxidační odstranění uhlíků v postranních karboxylových řetězcích je katalyzováno třemi jádry enzymových komplexů – acyl-CoA oxidázou, multifunkčním proteinem 1 (MFP1) a 3-ketoacyl-CoA thiolázou. Konečný produkt, jasmonoyl-CoA je štěpen nedefinovanou thioesterázou a biosyntéza JA se ukončí uvolněním (+)-7-*iso*-JA do cytosolu (Vick & Zimmerman, 1984; shrnuto ve Wasternack, 2009).

3.4.2 JA/JA-Ile metabolismus

Pravděpodobně nejdůležitější metabolickou přeměnou (+)-7-*iso*-JA je její spojení s izoleucinem, které vede k hlavní bioaktivní sloučenině (+)-7-*iso*-jasmonoylisoleucinu (JA-Ile). Tato reakce je vykonána pomocí cytosolové JA aminokyselina konjugát syntázy (JAR1). Aktivita JAR1 závisí na dostupnosti substrátu (+)-7-*iso*-JA v cytoplasmě a reguluje homeostázu bioaktivního hormonu (Staswick & Tiriyaki, 2004). Tento aminokyselinový konjugát může být dále přemístěn do jádra a vnímán SCF^{COII}-JAZ, koreceptorovým komplexem vedoucím k expresi genů reagujících na jasmonáty. Předpokládá se, že biologicky aktivní (+)-7-*iso*-JA-Ile je deaktivován *in vivo* epimerací na (-)-7-*iso*-JA-Ile (Fonseca *et al.*, 2009). Při reakci na poranění byly v huseníčku identifikovány také hydroxylované (12-OH-JA-Ile) a karboxylované (12-COOH-JA-Ile) konjugáty (Glauser *et al.*, 2008). Klonování příslušných enzymů cytochromů P450 (CYP) odhalilo hydroxylaci a karboxylaci jako inaktivační mechanismus jasmonátové signalizace (Koo *et al.*, 2011; Koo & Howe, 2012).



Obr. 2 Oktadekanová a hexadekanová dráha biosyntézy JA. Ihned po uvolnění polynenasycených mastných kyselin – α -linolenové (C18:3) a hexadekatrienové kyseliny – z plastidových galaktolipidů, 13-lipoxygenáza (LOX) zavádí molekulární kyslík za vzniku odpovídajících hydroxyperoxidů. 13(S)-hydroperoxy-oktadekanová kyselina (13-HPOT) je substrátem allenoxid syntázy (AOS), která vytváří nestabilní allenoxid 12,13(S)-EOT, který se dále převede na *cis*-(+)-12-oxo-fytodienovou kyselinu (*cis*-(+)-OPDA) pomocí allenoxid cyklázy (AOC). Analogicky je dnOPDA převedena hexadekanovou dráhou s použitím stejné sady enzymů. Sloučeniny jsou neznámým mechanismem převáděny z chloroplastů. Transport do peroxisomů je zprostředkován ABC transportérem CAMATOSE (PXA1) a možná i záchytem iontů. Obě OPDA jsou redukovány OPDA reduktázou (OPR3) na OPC-8 a OPC-6. Karboxylový postranní řetězec je zkracován β -oxidací mastných kyselin na konečný produkt (+)-7-*iso*-JA. Následná konjugace (+)-7-*iso*-JA s izoleucinem (JAR1) vede k vytvoření nejaktivnější sloučeniny (+)-7-*iso*-JA-Ile, která se dostává do cytosolu. Schéma bylo převzato a upraveno od Wasternack & Song, 2016.

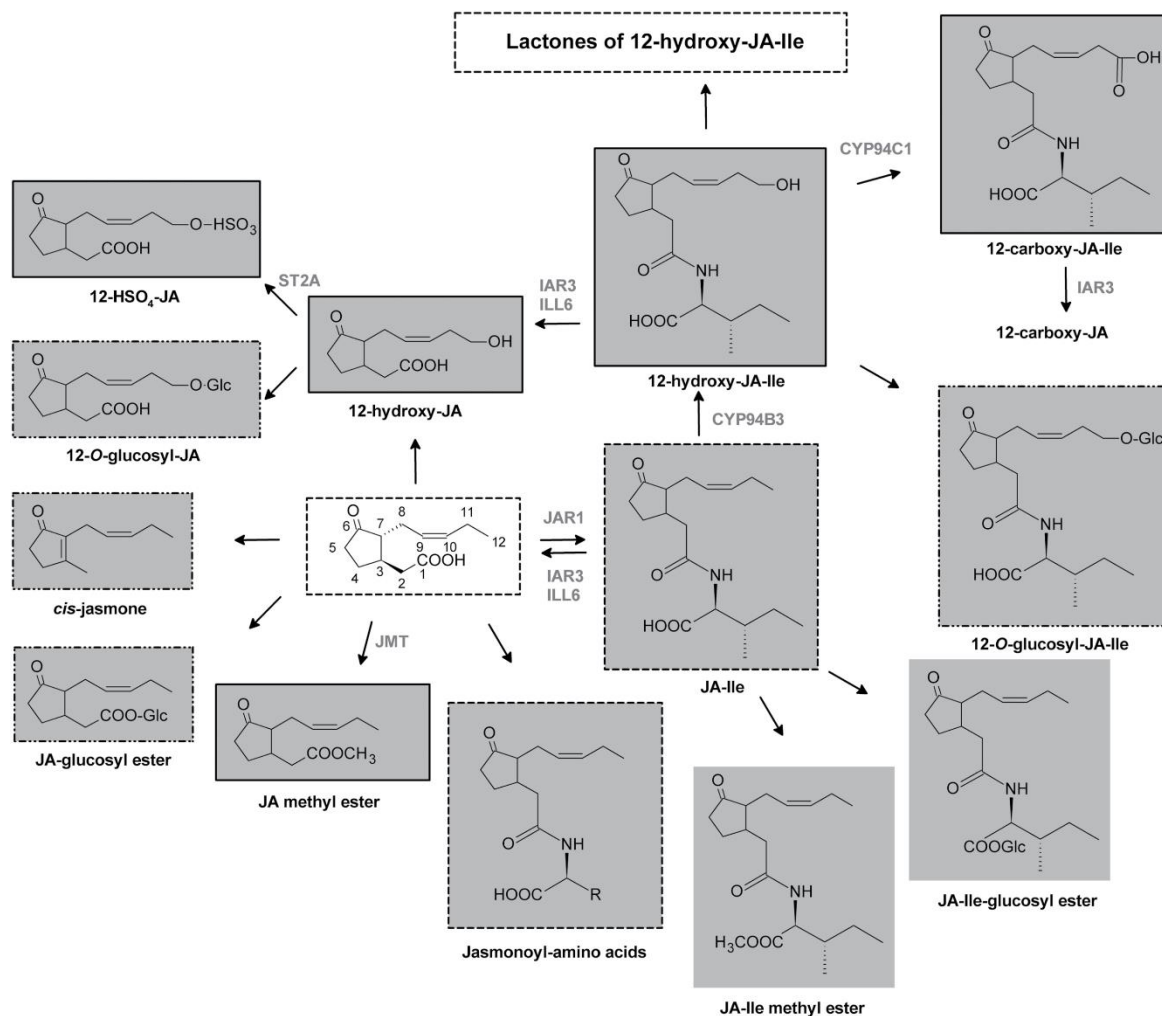
V několika rostlinných druzích se nacházejí další konjugáty JA, převážně s nepolárními aminokyselinami leucinem (Leu), valinem (Val), tyrosinem (Tyr), tryptofanem (Trp) nebo metioninem (Met), a to nejen v reakci na environmentální stres (Knöfel & Sembner, 1995; Tamogami & Kodama, 1997). Metylace JA na karboxylové skupině díky JA karboxymetyltransferázy (JMT) vede k tvorbě těkavého metylesteru (MeJA,

Stitz *et al.*, 2011). Bylo popsáno široké spektrum dalších metabolitů JA zahrnující 11-hydroxy-JA, 12-hydroxy-JA a její 12-glukosylované (12-O-Glc-JA) nebo sulfonylované (12-HSO₄-JA) deriváty s různými fyziologickými funkcemi (Wasternack & Hause, 2013). O intenzivně studovaný derivát 12-OH-JA a 12-HSO₄-JA se myslelo, že inaktivují signalizaci JA (Gidda *et al.*, 2003; Miersch *et al.*, 2008). Nicméně byla zjištěna schopnost 12-OH-JA aktivovat gen hydroxyjasmonátové sulfotransferázy, což odhaluje její potencionální úlohu při kontrole genové exprese (Gidda *et al.*, 2003). JA může být redukována, čímž se získá 9,10-dihydro-JA nebo kyselina kukurbová. Těkavý *cis*-jasmon je produktem dekarboxylace JA, který je uvolňován konstitutivně nebo v odpovědi na požer býložravců pomocí květů a listů několika rostlin (Matthes *et al.*, 2011). Všechny uvedené metabolity JA, JA-Ile a některé další nedávno identifikované sloučeniny jsou shrnuty v **Obr. 3**.

Překvapující strukturní a funkční podobnosti JA-Ile byly pozorovány u koronatinu, což je toxin produkovaný některými patogenními bakteriemi a napodobuje účinky jasmonátu (Weiler *et al.*, 1994; Mithöfer *et al.*, 2004). Charakterizace mutanta huseníčku *coi1*, který je necitlivý ke koronatinu a MeJA vyvolala zvýšený zájem o vysvětlení zapojení neznámého regulačního celku při mechanismu vnímání a transdukci jasmonátového signálu (Feys *et al.*, 1994). Právě pomocí mutanta *coi1* byl později identifikován CORONATINE INSENSITIVE (COI1) jako F-box protein (Xie *et al.*, 1998) a jako člen koreceptorového komplexu Skp1/Cullin/Fbox^{COI1} (SCF^{COI1}) s jasmonate-ZIM-domain (JAZ; Yan *et al.*, 2009; Sheard *et al.*, 2010).

3.4.3 Mechanismus vnímání a regulace genové exprese jasmonátů

Jasmonátový receptor COI1 je F-box protein, který je součástí komplexu SCF^{COI1}; Xie *et al.*, 1998). Multipodjednotkový SCF komplex slouží jako E3 ubiquitin ligáza a nese zodpovědnost za ubiquitinaci cílového proteinu a jeho degradaci ve 26S proteasomu. Analogický je systém vnímání některých dalších rostlinných hormonů jako je etylen (SCF^{EBF1/2}), gibberellin (SCF^{SLY/GID2}) a auxin (SCF^{TIR1}), který je reprezentován SCF komplexy s podobnými moduly, ve kterých je F-box protein variabilní podjednotkou mající vliv na substrátovou specifitu (Santner & Estelle, 2010). COI1 protein je velmi podobný auxinovému receptoru TIR1. Tato podobnost naznačuje princip fungování systému (Woodward & Bartel, 2005).



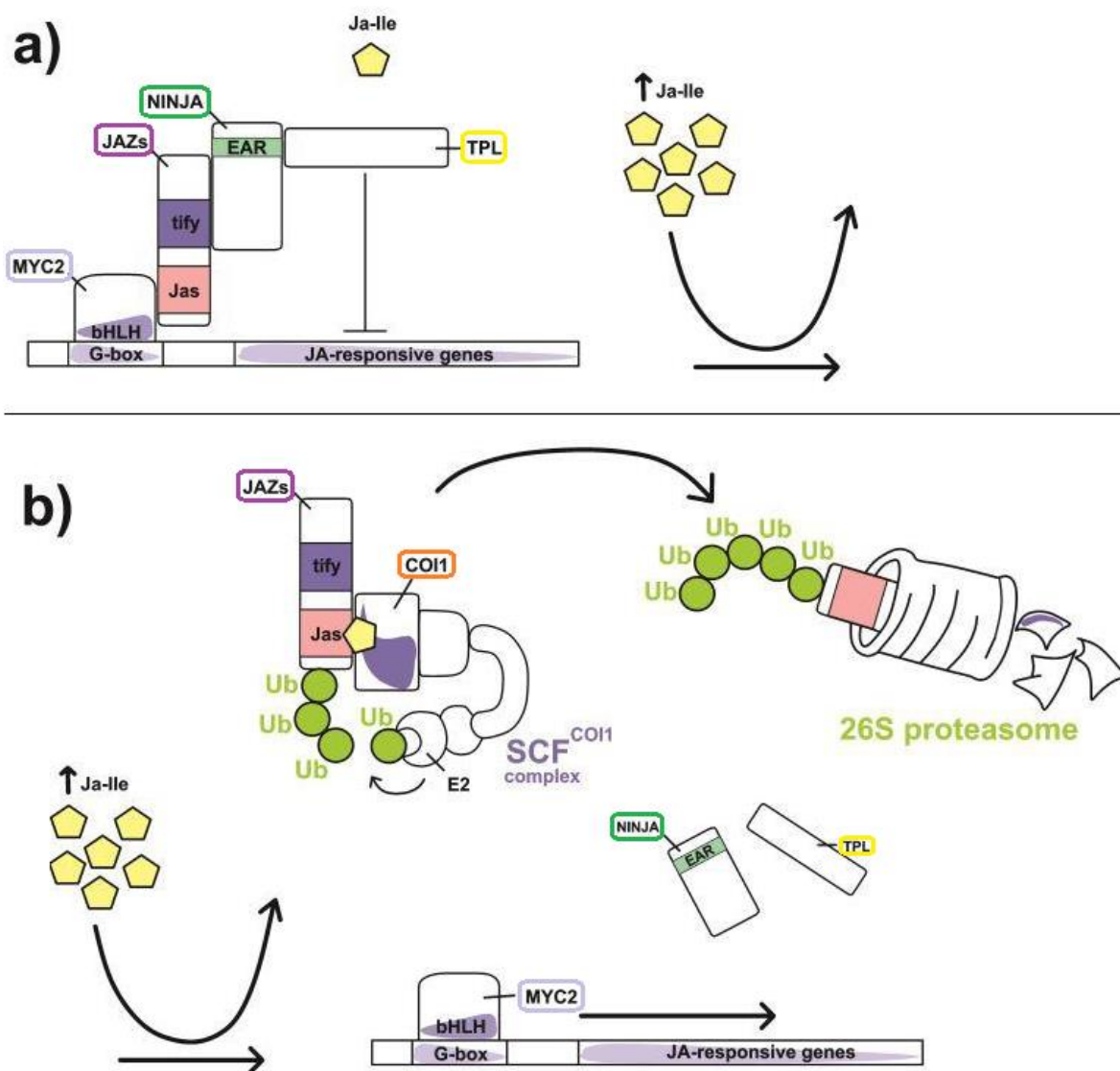
Obr. 3 Metabolická přeměna kyseliny jasmonové. Methylace pomocí JA karboxymetyltrasferázy (JMT) na těkavý JA methyl ester, tvorba JA-glukosyl esteru, dekarboxylace na *cis*-jasmon, hydroxylace CYP94B3 na 12-hydroxy-JA (12-OH-JA), sulfatace 12-OH-JA, O-glukosylace 12-OH-JA, konjugace s aminokyselinami, preferovaně s izoleucinem pomocí jasmonoyl izoleucin syntázy (JAR1) k získání JA-Ile, metylace na JA-Me-Ile, 12-hydroxylace JA-Ile pomocí JA-Ile-12-hydroxylázy, karboxylace CYP94C1 na 12-OH-JA-Ile, O-klykosylace JA-Ile a tvorba JA-Ile glukosyl esteru. JA-Ile může být zpátky přeměněna na JA pomocí amidohydroláz IAR3 a ILL6. Schéma bylo převzato Wasternack & Song, 2016.

Zlom v poznání jasmonátové signalizace nastal při objevení jasmonate-ZIM-domain (JAZ) proteinů a předpokladu, že v signalizaci JA fungují jako represory (Thines *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2007). Interakce JAZ proteinů s komplexem SCF^{COI1} byla zpočátku pozorována v odpovědi na poranění nebo ošetření JA. V huseníčku byla objevena rodina dvanácti genů, které kódují různé proteiny JAZ (Yan *et al.*, 2007; Chung & Howe, 2009). Jelikož u žádného z dvanácti JAZ proteinů v huseníčku nebyla identifikována doména vázající DNA, předpokládalo se, že expresi regulují nepřímo přes jiné transkripční faktory (Kastir *et al.*, 2008). Fungují tedy jako represory interakcí s několika rodinami pozitivně působících transkripčních faktorů (TFs), které spočívají v promotorové oblasti genů odpovídajících na JA (Pauwels & Goossens, 2011).

Vazba JAZ na TFs je zprostředkována Jas doménou v blízkosti C-konce. Tato vysoce konzervativní oblast je nezbytná pro supresivní funkci JAZ a destabilizaci (Melotto *et al.*, 2008). Delece domény Jas způsobila akumulaci JAZ1 v cytoplasmě a také snížila interakci mezi JAZ9 a jejími TF cílené na MYC2, která byla kritická pro jadernou lokalizaci represoru (Withers *et al.*, 2012). Jas doména obsahuje krátký konzervativní motiv LPIARR, který slouží jako degradační signál pro COI1. Tato 21 aminokyselinová smyčka v přítomnosti JA-Ile silně interaguje s COI1, uzavře ligand ve své vazebné kapse, a to vede ke stabilizaci komplexu receptorů COI1 a JAZ1 (Sheard *et al.*, 2010).

Strukturní a funkční rozmanitosti proteinů JAZ mohou být zvýšeny alternativním sestřihem primárního transkriptu. Různě dlouhé izoformy JAZ10 (JAZ10.1, JAZ10.3) z huseníčku byly různě citlivé k poranění a ošetření JA (Yan *et al.*, 2007). Další možná regulační flexibilita je dosažena homo- nebo heterodimerizací většiny JAZ proteinů. JAZ-JAZ interakce je zprostředkována konzervovaným funkčním motivem TIFY, 27-aminokyselinovou ZIM doménou, která se nachází v centrální části represorů (Chini *et al.*, 2009b; Chung & Howe, 2009). ZIM doména je také vazebným místem dalšího adaptatorového proteinu NINJA (novel interactor of JAZ), který obsahuje ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR-associated amphiphilic repression motif (EAR) v jeho N-terminální doméně, aby umožnil interakci s korepresorem TOPLESS (TLP) zahrnující s TLP související proteiny (Pauwels *et al.*, 2010). Přímá stabilizace komplexu TF (MYC2)-JAZ v nepřítomnosti NINJA je možná v případě přítomnosti JAZ5, JAZ6, JAZ7 a JAZ8, obsahující vlastní EAR motiv na N-konci (Pauwels & Goossens, 2011; Shyu *et al.*, 2012). Nedávno byly identifikovány nové represory, jako například JAV1 a JAMs. JAV1 potlačuje TF stejně jako JAZs, zatímco JAMs soutěží s TFs jako třeba MYC2 o promotorové vazebné místo (Wasternack, 2014).

Konečnými cíli JAZ proteinů je několik spojených basic-helix-loop-helix (bHLH) TFs a R2R3 typ MYB faktorů. Jejich zapojení bylo popsáno v řadě fytohormonálních signalizačních cest (Song *et al.*, 2011; Kazan & Manners, 2013). Nejdůležitější roli při expresi genů odpovídajících na JA má však MYC2. Tento takzvaný „hlavní regulátor“ aktivuje počáteční transkripci genů vyvolanou JA a vykazuje při tom dvojí regulační roli: MYC2 působí pozitivně na expresi genů odpovídajících na poranění, ale potlačuje geny obrany proti patogenům (Chini *et al.*, 2009a; Pauwels *et al.*, 2009; Lorenzo *et al.*, 2004). MYC2 patří k rostlinným bHLH proteinům, obsahující HLH doménu na karboxylovém konci. Dva amfipatické alfa-helixy spojené smyčkou umožňují homo- nebo heterodimerizaci MYC2 s jinými bHLH TFs jako je MYC3 a MYC4, které mohou přispět ke změně JA signalizace (Fernández-Calvo *et al.*, 2011).



Obr. 4 Mechanismus vnímání a regulace genové exprese jasmonátů. Při nízké hladině JA (a) bHLH transkripční faktory MYC2 je zastaven interakcí s Jas doménou JAZ proteinů. Represe je stabilizována ko-represorem TOPLESS (TPL), který je ohraničen EAR motivem adaptorového proteinu NINJA, který interaguje s tify (ZIM) doménou JAZs. Při působení vnějšího podnětu (např. poranění) je biosyntéza JA podporována a akumuluje se (+)-7-iso-JA-Ile. Tato sloučenina je vázána na aktivní místo E3 ubiquitin ligázy koreceptorového komplexu SCF^{COI1}–JAZ. Rozpoznání (+)-7-iso-JA-Ile koreceptorovým komplexem umožňuje interakci COI1 s JAZ proteiny prostřednictvím jejich domény Jas. Represor JAZ je polyubikvitinován a následně degradován 26S proteasomem. Uvolnění transkripčního faktoru MYC2 z JAZ zprostředkované represe vede k aktivaci exprese genů odpovídajících na JA. Schéma převzato a upraveno z Floková *et al.*, 2014, vytvořeno dle Wasternack & Hause (2013).

3.5 Systémová odpověď

Bylo navrženo, že události vedoucí k akumulaci jasmonátů ve vzdálené části rostliny od místa poranění (systémová odpověď) mohou být zprostředkovány dvěma hlavními mechanismy: autonomní a neautonomní buněčnou drahou. Tyto dva obecné modely vysvětlují, jak jsou komponenty jasmonátové dráhy prostorově uspořádány mezi poškozenými a nepoškozenými listy. Oba modely předpovídají systémové zvýšení

koncentrace JA/JA-Ile a následné vnímání JA-Ile receptorovým komplexem SCF^{COI1}/JAZ (**Obr. 2**). Modely se liší v několika klíčových bodech, včetně zdroje systémové JA/JA-Ile (tj. transportovaných nebo *de novo* syntetizovaných), požadavku na syntézu JA při tvorbě mobilního signálu a samozřejmě identitou mobilního signálu. Obě cesty mohou fungovat synergicky a optimalizovat tak prostorovou a časovou expresi obranných reakcí (Koo & Howe, 2009; Huber & Bauerle, 2016).

3.5.1 Neautonomní buněčná dráha

V prvním modelu JA produkovaná v místě poškození slouží jako mobilní signál pro aktivaci reakcí v systémových tkáních. Transport jasmonátů mezi buňkami je typický pro čeled' lilkovitých rostlin (*Solanaceae*; Schilmiller & Howe, 2005; Wasternack *et al.*, 2006) a byl podložen například experimenty využívající isotopické značení látek, kde se ukázalo, že JA/MeJA může být transportována floémem a xylémem (Zhang & Baldwin, 1997; Thorpe *et al.*, 2007). Zevně aplikovaná JA u huseníčku ale nevyvolala systémovou expresi reportérových genů ve vzdálených listech poškozené rostliny (Kubigsteltig *et al.*, 1999). Výsledky z těchto a dalších experimentů s aplikací JA jsou proto údajně nekonzistentní a nejsou dostatečné k vyvození role vnitřní JA v odpovědi na poranění (Koo & Howe, 2009).

Funkce JA jako mobilního signálu v odpovědi na poranění byla ale potvrzena také imunocytochemickými studiemi, které ukazují, že se v buňkách sítkovic rajčete nacházejí enzymy biosyntetické dráhy JA (Hause *et al.*, 2000, 2003). U huseníčku byly po poranění v hlavní žile listové žilnatiny nalezeny různé deriváty JA (Glauser *et al.*, 2008) a bylo také prokázáno, že řapíkaté výměšky obsahují JA (Truman *et al.*, 2007; Chaturvedi *et al.*, 2008).

Funkční důkaz toho, že je JA součástí přenosu signálů na dlouhé vzdálenosti pro expresi proteinázových inhibitorů (PI) dokázaly roubovací experimenty s rajčaty. Roub mezi divokým typem a rostlinami s nedostatkem COI1 ukázal, že pohotová reakce není nutná pro tvorbu systémového signálu v poškozených listech, ale je spíše nezbytná pro rozpoznání signálu v nepoškozených systémových listech (Li *et al.*, 2002). Experimenty provedené s mutanty v syntéze JA prokázaly poškozením vyvolanou expresi PI závisí na produkci JA v tkáních podnože, ale nikoliv ve vzdálených listech odrůd (Li *et al.*, 2002, 2005; Lee & Howe, 2003). Nejjednodušší interpretací těchto výsledků je to, že JA nebo jiný produkt oktadekanoidní dráhy je součástí přenosového signálu poškození pro systémovou expresi PI (Schilmiller & Howe, 2005; Wasternack *et al.*, 2006).

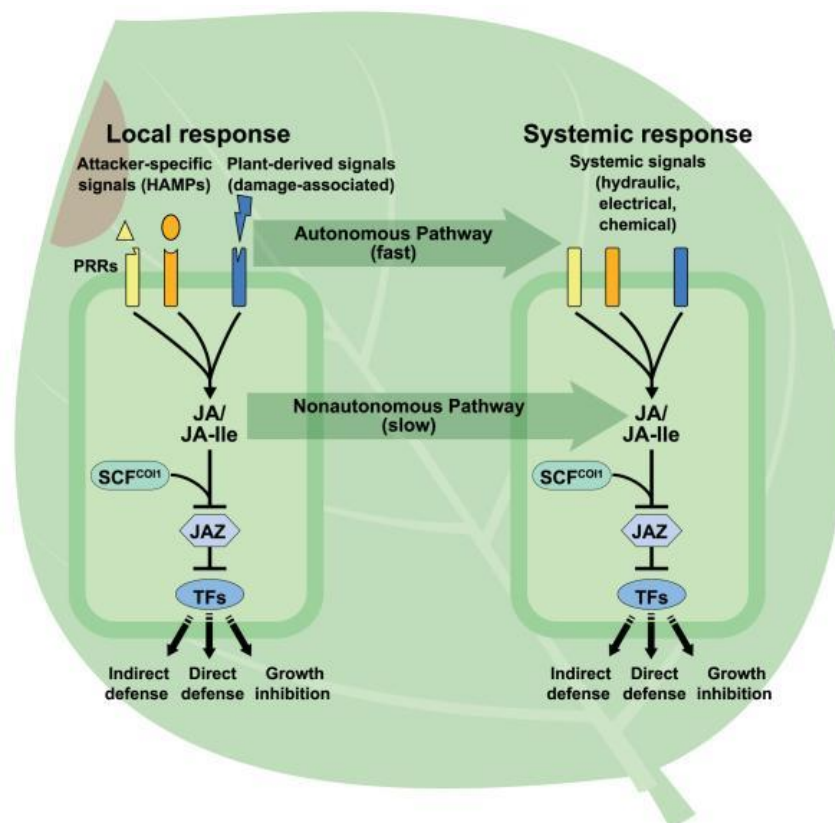
3.5.2 Autonomní buněčná dráha

Autonomní buněčná dráha využívá k transportu rychlý elektrický, hydraulický nebo chemický signál, který spouští syntézu JA v distálních částech rostliny. Tato cesta je typická pro modelovou rostlinu huseníček (Glauser *et al.*, 2008; Koo *et al.*, 2009; Koo & Howe, 2009; Mousavi *et al.*, 2013; Farmer *et al.*, 2014; Gaupels *et al.*, 2017). Nedávné studie v huseníčku poukazují na účast JA jako buněčný autonomní poškozením vyvolaný signál pro rychlé systémové změny v genové expresi. Mechanické poškození pletiva způsobené listům růžice huseníčku vedlo k velkému (~10násobnému) a rychlému (do 2 minut) zvýšení koncentrace JA a JA-Ile v nepoškozených listech růžice (Glauser *et al.*, 2008; Koo *et al.*, 2009). Systémové zvýšení JA-Ile předcházelo nástupu exprese časných, na JA odpovídajících genů, které byly zaznamenány v systémových listech 15 minut po poranění. Jak předpovídal předkládaný model jasmonátové signalizace, tyto rychlé změny v genové expresi prostorově a časově korelovaly s degradací JAZ proteinů (Koo *et al.*, 2009).

Rychlost signálu po poranění, který je odpovědný za spuštění *de novo* syntézy JA/JA-Ile v systémových listech, byla odhadnuta na méně než $2 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ (Glauser *et al.*, 2008; Koo *et al.*, 2009). Tato rychlost pohybu je nejméně 20krát rychlejší než odhadovaná rychlost floémem nesoucího signálu u rajčat. Významný soubor literatury zahrnuje elektrické potenciály a/nebo hydraulické síly jako pro různé poškozením vyvolané rychlé systémové reakce (Wildon *et al.*, 1992; Malone, 1993; Herde *et al.*, 1996; Stankovic & Davies, 1996, 1998; Davies *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 2009).

Nedávná studie však důležitost elektrické signalizace v komunikaci na delší vzdálenosti prokázala. Mousavim a kolektivem autorů byly identifikovány dva proteiny iontových kanálů pro Ca^{2+} , které jsou příbuzné s glutamátovými receptory živočichů. Právě tyto dva proteiny jsou rozhodující pro tvorbu elektrické vlny vyvolanou poškozením listu, a která je přenášena do ostatních orgánů rostliny. Jako model pro výzkum interakce mezi rostlinou a býložravcem byl použit huseníček a housenka blýskavky (*Spodoptera littoralis*). Housenka byla položena na jeden list. Jestliže se housenka volně pohybovala po listu, povrchové elektrické potenciály se neměnily. Jakmile ale začala list požírat, byly blízko tohoto místa vyvolány elektrické signály, které se následně šířily do sousedních listů rychlostí $9 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$. Elektrický signál se přenášel do těch listů, které byly přímo spojeny cévními svazky, které vedou vodu a organické sloučeniny. Ve všech místech, kde dorazil elektrický signál, byla v odpovědi na poranění spuštěna syntéza jasmonátů, která zprostředkovala expresigenů, především inhibitorů proteáz, zapojených do obranných reakcí rostliny. Podobné reakce vyvolalo i mechanické poškození. Není tedy nutná přítomnost

býložravce. V mutantní rostlině, ve které chyběl receptor pro jasmonáty, byly elektrické signály sice propagovány, ale nebyla vyvolána žádná obranná odpověď. Mutantní rostliny, ve kterých chyběly glutamátové receptory, neuměly generovat ani elektrickou vlnu a tím pádem nespustily ani jasmonátovou signalizaci. Tato pozorování jasně demonstrují, že generace a propagace elektrických signálů hraje rozhodující roli při iniciaci obranné reakce ve vzdálených místech od místa útoku býložravců (Mousavi *et al.*, 2013).



Obr. 5 Role JA v odpovědi na poškození rostlinného pletiva. Lokální reakce: poškození tkání má za následek produkci rostlin nebo útoku odvozených chemických nebo fyzikálních signálů, které jsou rozpoznávány receptory na povrchu buňky (pattern recognition receptors). Mechanismem, který je z velké části neznámý, toto rozpoznání aktivuje *de novo* syntézu JA a JA-Ile. JA-Ile je aktivním signálem pro SCF^{COI1}/26 proteasomem zprostředkovanou degradaci proteinů JAZ, které potlačují transkripční faktory (TF) a se podílejí na expresi vlastností spojených s poškozením. Systémová odpověď: systémová obranná reakce vyvolaná poškozením je zprostředkována dvěma odlišnými cestami, které obě zahrnují JA. V neautonomní buněčné dráze je JA nebo její derivát, který vznikl v poškozeném listu, přemístěn do distálních/vzdálených míst (např. nepoškozený list), kde vyvolává reakce v cílových buňkách. V autonomní buněčné dráze poškozením vyvolaný mobilní signál (elektrický, hydraulický, chemický) aktivuje syntézu JA/JA-Ile a následnou reakci v distálním pletivu. Tyto dvě cesty mohou pracovat synergicky a optimalizovat tak časově i prostorově vyjádření odpovědi vyvolanou různými formami poranění tkáně (Koo & Howe, 2009).

3.6 Obranné mechanismy rostlin proti napadení herbivorními organismy

Rostliny jsou přisedlé organismy, které jsou ukotveny k zemi prostřednictvím kořenového systému. Jsou tak vystaveny stálému nebezpečí poškození svých orgánů mnoha druhy živočichů, zejména z početných skupin fytofágního hmyzu, ale i pastvou evolučně

vyspělejších býložravců. Aby proti býložravcům mohli bojovat, vyvinuly si široké spektrum obranných strategií (Chen, 2008).

Tyto strategie mohou být rozděleny do dvou kategorií: konstitutivní obrany a indukovatelné obrany. Konstitutivní obrany jsou takové obranné mechanismy, které jsou vždy přítomny v rostlinách. Jsou aktivované již před napadením, ale po napadení může dojít k jejich zesílení. Zahrnují fyzikální a chemické bariéry, které jsou často pro dané rostlinné druhy specifické. Mohou to být např. ostré trny či trichomy, vysoký obsah sklerenchymatických pletiv, velké množství sekundárních metabolitů (terpeny, fenolické látky, látky obsahující dusíkaté alkaloidy, kyanogenní glykosidy, glukosinoláty), které působí odpudivě až toxicky na herbivorní živočichy (Chen, 2008).

Některé rostliny však neinvestují do speciálních obranných struktur nebo metabolitů a spoléhají se na indukovatelnou obranu, která je iniciována až po napadení pletiv rostliny býložravcem a skládá se ze tří základních částí: zjištění o napadení, přenos signálu a tvorba obranných chemických látek (Dangl & McDowell, 2006; Ferry *et al.*, 2004; Kessler & Baldwin, 2002; Walling, 2000). V zásadě indukovatelné obrany vyžadují menší investici do rostlinných zdrojů oproti konstitutivní obraně, ale musí být aktivovány rychle, aby byly účinné (Chen, 2008). To vyžaduje odpovídající senzorický systém a rychlou komunikaci mezi rostlinnými orgány. Rostliny tak vytváří složité signální sítě, které propojují signály vyvolané poškozením s příslušnými změnami v metabolismu, růstu a vývoji. Lokální poranění aktivuje obranné mechanismy v celé rostlině, a to jak přímo v poškozené tkáni (lokální reakce), tak i v nepoškozeném pletivu (systémová odpověď). To ovšem vyžaduje přenos signálu, ke kterému může být využita jak chemická cesta pomocí sloučenin typu fytohormonů, tak i změny elektrického potenciálu. V odpovědi na napadení hmyzem, nemasožravé rostliny nevyužívají ostrého (rychlého) AP, jako je ten, který je šířen v mucholapce. Místo toho vytvářejí pomalou elektrickou vlnu, která je překládána do biosyntézy JA, která hraje v tomhle procesu nepostradatelnou roli (Mousavi *et al.*, 2013; Wasternack & Hause, 2013). Jasmonáty vyvíjejí své účinky regulací širokého spektra procesů, zahrnující syntézu toxických sekundárních metabolitů (Pauwels *et al.*, 2009; De Geyter *et al.*, 2012), a produkci morfologických bariér (Yoshida *et al.*, 2009).

3.6.1 Role jasmonátů při obranných reakcích rostlin

Zatímco ABA je převážně zapojena při reakci na abiotický stres, JA, SA a ethanol představují klíčové regulátory v signalizaci při biotickém stresu. První záznam o tom, že JA hraje při stresové signalizaci důležitou úlohu, byl dán její schopností aktivovat expresi genů vyvolaných poraněním kódující PIs u rajčete (Farmer & Ryan, 1990). Transkriptomické

údaje o genech regulovaných JA prokázaly její zapojení do různých obranných reakcí i do funkce při úpravě rostlinného metabolismu. Bylo zjištěno, že exprese přibližně 80 % genů v huseníčku, reagující na mechanické poškození nebo poškození býložravým hmyzem je zcela nebo částečně pod kontrolou jasmonátové signální dráhy (Reymond *et al.*, 2004). Mezi geny, které zprostředkovávají přímou obranu proti býložravému hmyzu, se nacházelo několik proteinů vázajících sacharidy (lektiny) a nespočet genů podílejících se na syntéze obranných glukosinolátů, alkaloidů nebo fenolických sekundárních metabolitů. Ostatní geny se podílely na signalizaci JA (TFs), biosyntéze JA (LOX2, AOS, OPR3, JAR1) a syntéze obranných aldehydů tvořených hydroperoxid lyázovou dráhou (shrnul Wasternack & Hause, 2013).

Poškození způsobené býložravci vyvolává oxidační stres a následnou akumulaci transkriptů, které se podílejí na syntéze buněčných protektantů, jako jsou glutathion S-transferázy, thioredoxin a cytochrom b5. Útok býložravců také vyvolává mobilizaci a izolaci zásobních rezerv - v odpovědi na požer býložravců bylo akumulováno několik transkriptů genů, které se podílejí na přemísťování rezerv (VEGETATIVE STORAGE PROTEIN2 – VSP2, HEXOSE TRANSPORTER, β -FROCTOSIDASE, INVERTASE, GALACTINOL SYNTHASE, Reymond *et al.*, 2004).

Několik genů vyvolaných poraněním je exprimováno distálně od místa poranění. Takové systémové reakce předem zařídí imunitu proti dalšímu útoku býložravců úpravou genové exprese v systémových tkáních. Mezi signály, které jsou zapojeny v systémové odpovědi na poškození patří například reaktivní formy kyslíku, těkavé sloučeniny, oligosacharidy, elektrické potenciály nebo některé rostlinné hormony (Koo *et al.*, 2009; Koo & Howe, 2009). *De novo* biosyntéza ve vzdáleném nepoškozeném listu huseníčku byla pozorována jako nezbytná pro šíření systémové odpovědi (Koo *et al.*, 2009).

3.7 Složení trávicí tekutiny

Jasmonáty regulují také aktivitu trávicích enzymů masožravých rostlin (Libiaková *et al.*, 2014). Specializované mnohobuněčné sekreční žlázy produkují tekutinu, která dusí, zabíjí, tráví kořist a poskytuje řešení pro asimilaci uvolňovaných živin. Brzy po zachycení kořisti vylučují zažívací žlázy různé deriváty naftochinonu, jako je plumbagin nebo droseron. Tyto metabolity přicházejí do styku s elektrontransportními flavinovými enzymy zahrnující NAD(P)H-dehydrogenázy nebo oxidázy (diaforázy) na buněčné membráně kořisti a vytvářejí tak reaktivní formy kyslíku, které ji předurčují pro protelytickou degradaci. Jsou zde pravděpodobně zapojeny i peroxidázy (Galek *et al.*, 1990; Chia *et al.*, 2004; Eilenberg *et al.*, 2010). Aby se zabránilo škodlivým účinkům oxidace, pasti aktivně odstraňují

produkty oxidace pomocí speciálních mechanismů (pomocí „oxidative scavengers“). Případné apoptóze vyvolané reaktivními formami kyslíku předcházejí syntézou inhibitorů programované buněčné smrti (Bemm *et al.*, 2016).

Proteiny sekretované u různých druhů masožravých rostlin se liší podle chemické povahy kořisti (Matusíková *et al.*, 2005; Pavlovič *et al.*, 2014) a ontogeneze pasti (Biteau *et al.*, 2013). Strukturální studie ukázaly, že endokrinní systém pasti mucholapky se skládá ze tří vrstev buněk s různou funkční morfologií, kde vnější dvě vrstvy produkují hydrolázy, které jsou uvolněny až v odpovědi na podněty pocházející z chycené kořisti (Bemm *et al.*, 2016). Proteiny v trávicí tekutině mucholapky byly studovány za použití vysoce výkonných technik (Schulze *et al.*, 2012; Bemm *et al.*, 2016) a bylo zjištěno devět různých enzymů – peroxidázy, nukleázy, fosfatázy, fosfolipázy, glukonázy, chitinázy a proteolytické enzymy zahrnující čtyři cystein proteázy, dvě aspartát proteázy a serin karboxypeptidázy (Schulze *et al.*, 2012), které kořist za několik dní (cca 7-10) rozloží, takže z ní zbude jen částečně rozložený tvrdý chitinový skelet (Studnička, 1984).

3.7.1 Proteázy

Proteázy (také proteinázy či peptidázy) jsou skupinou enzymů, která štěpí proteiny a patří do třídy hydroláz. V pasti byla opakovaně popsána hydrolýza peptidické vazby aminokyselin jak ve vnitřní části peptidových řetězců (endopeptidázami), tak i na terminálních koncích proteinů (exopeptidázami; Juniper *et al.* 1989). Endopeptidázy se dále dělí podle katalytických skupin přítomných v místě, kde proteázy na bílkovinu působí do šesti skupin – cysteinové, serinové, threoninové proteázy, metalloproteázy, glutamátové, a aspartátové proteázy. Takahashi a kolektiv autorů popsal aspartát proteázu v trávicí tekutině mucholapky podivné a rosnatky kapské. Podle starší nomenklatury byly popsány jako dionaeasin a droserasin (Takahashi *et al.* 2009, 2012). Schulze a kolektiv získali kompletní aminokyselinovou sekvenci dvou dionaeasinů (dionaeasin-1 a dionaeasin-2). Oba dionaeasiny obsahují residua v aktivním místě, signální sekvenci, propeptid a NAP (nepenthesin-type AP) specifickou inzerci podobnou nepenthesinu (Schulze *et al.*, 2012). Hlavní endopeptidáza vyskytující se v trávicí tekutině mucholapky se ale liší. Robins a Juniper správně tušili, že je to enzym podobný papainu (Robins & Juniper 1980a,b), o třicet let později Takahashi a kolektiv získali částečnou aminokyselinovou sekvenci, která je homologní s cystein peptidázami v papainové rodině peptidáz. Po této papainové skupině endopeptidáza v mucholapce dostala název dionain (Takahashi *et al.*, 2011). Schulze a kolektiv získali úplnou aminokyselinovou sekvenci čtyř dionainů nazvanými dionain 1-4 (Schulze *et al.*, 2012). Cysteinové peptidázy mají společný katalytický mechanismus

zahrnující nukleofilní cystein thiol v katalytické trojici nebo dvojici. Aktivita dionainu je inhibována inhibitorem cysteinových peptidáz E-64 a optimální aktivita je dosažena při pH 5,4–6,0 (Risør *et al.* 2016). Cystein proteázy často působí společně s aspartát proteázami. Aspartát proteázy působí spíše v silně kyselých podmínkách a cystein proteázy v méně kyselých podmínkách. Jak se pH trávicí tekutiny mění v průběhu trávení, různé enzymy dosahují optimální aktivity při různém pH (Fukushima *et al.*, 2017).

3.7.2 Chitinázy

Chitinázy rozkládají na chitin bohatý exoskelet nejčastější kořisti masožravých rostlin – členovců. Uvolňují vázaný dusík a umožňují dalším enzymům proniknout k vnitřním tkáním a degradovat je. Výskyt chitinázy u mucholapky je podivuhodný, neboť její funkci obvykle v masožravých rostlinách obstarávají symbiotické bakterie. Rodiny chitinázových genů jsou organizovány do pěti tříd, které jsou založené na sekvenční podobnosti a základní homologii. Třídy I, II a IV (rodina GH19) sdílejí homologní katalytickou doménu, zatímco třídy III a V (rodina GH18) jsou více podobné houbovým a bakteriálním chitinázám a mají dodatečnou lysozymovou aktivitu (Grover, 2012). Chitinázy třídy I jsou dále děleny do dvou podtříd: podtřída Ia s prodlouženým karboxylovým koncem, které cílí chitinázy do rostlinné vakuoly a podtřída Ib bez prodlouženého karboxylového konce a chitináza se tak stává extracelulární (Neuhaus *et al.*, 1991).

Od osmdesátých let bylo identifikováno a do jisté míry charakterizováno deset chitináz v trávicí tekutině láčkovek a mucholapce. V mucholapce stimulace kořisti způsobuje sekreci VF-1 chitinázy. Tato chitináza je během prvních tří dnů trávení kořisti v mucholapce nejhojnější (Paszota *et al.*, 2014; Bemm *et al.*, 2016). Funkčnost tohoto enzymu v proteolyticky agresivním prostředí je usnadněná vysokým obsahem prolinů v oblastech s otevřenou smyčkou a mnoha glykosylovanými místy. Strukturálně patří VF-1 chitináza do skupiny chitináz třídy I, která hraje roli v obranných mechanismech rostlin proti patogenům v nemasožravých rostlinách. Pravděpodobně je podporována dvěma jinými chitinázami, které jsou méně hojné a mohou mít různé, ale doplňkové chitinolytické aktivity (Schulze *et al.*, 2012).

3.7.3 Fosfatázy

Fosfatázy (fosfomonoestery) jsou běžnými rostlinnými enzymy s nízkou substrátovou specificitou, které katalyzují hydrolýzu fosfátových esterů. Jsou produkovány ve významném množství, aby mobilizovaly fosfáty z mrtvých těl kořisti (Juniper *et al.*, 1989). Fosfatázy byly nalezeny v mnoha druzích masožravých rostlin. Płachno a kolektiv využíval

fluorescenčního značení pro studium fosfatázové aktivity v zažívacích žlázách čtyřiceti sedmi druhů masožravých rostlin, většinou v čeledi bublinatkovité (*Lentibulariaceae*). Produkce fosfatázy u všech typů žláz po celé pasti se objevila jako společná vlastnost u genlisei a vodní bublinatky. Fosfatázy jsou nejhojnějším vždy přítomným enzymem v pastech bublinatky (Sirová *et al.*, 2003, Płachno *et al.*, 2006) a podílejí se na hydrolýze kořisti, transportu iontů a čerpání vody z pasti (Płachno *et al.*, 2006). Fosfatázová aktivita byla dále objevena v různých typech žláзовých a epidermálních buněk aldrovandky, rosnatky, láčkovky, rosnolistu a také mucholapky (Płachno *et al.*, 2006, 2009, Pavlovič *et al.* 2014). Konstantně vysoká aktivita fosfatázy, která se vyskytuje v pastech různých taxonů masožravých rostlin, je v souladu s vysokou účinností vychytávání fosforu (Adamec 2002, Płachno *et al.*, 2009, Pavlovič *et al.*, 2014). Molekulární studie fosfatáz jsou vzácné. Za použití transkriptomové anotace (Schulze *et al.*, 2012) a pomocí proteomických metod s využitím analýzy jak jednotlivých peptidů, tak i komplexních proteinových směsí (Bemm *et al.* 2016) byla kyselá fosfatáza nalezena u mucholapky.

3.7.4 Evoluce trávicích enzymů a jejich regulační mechanismy

Mnoho chitináz, glukanáz, RNáz a PR-1 proteinů jsou silně strukturálně a funkčně homologní se skupinou běžných enzymů ochrany rostlin, které se podílejí na patogenezi (Buch *et al.*, 2014). Koopecte je evoluční mechanismus, který usnadňuje vznik nových funkcí. Vyskytují se důkazy, které naznačují, že obranné mechanismy rostlin využívané proti byložravcům a patogenům byly kooptovány, aby fungovaly při trávení kořisti (Schulze *et al.*, 2012).

Rostliny používají řadu obranných chemikálií a bílkovin, aby se chránili před mikrobiálními patogeny, býložravým hmyzem a dalšími stresory životního prostředí. Patří mezi ně s PR proteiny, které jsou indukované v odpovědi na *microbe associated molecular patterns* (mikroby asociované molekulární vzory) nebo hmyzí býložravostí a ty, které jsou konstitutivně exprimovány v tkáních citlivých na napadení (Savatin *et al.*, 2014). Kromě poskytování ochranných rolí se zdá, že PR proteiny jsou důležitými hráči také při trávení kořisti masožravými rostlinami (Renner & Specht 2013). V minulém desetiletí byly identifikovány různé PR-proteiny v proteomu trávicí tekutiny láčkovek a transkriptomu mucholapek a získané z genomu také dalších masožravých hvozdíkotvarých (*Caryophyllales*; Hatano & Hamada 2008, 2012, Renner & Specht 2012, Schulze *et al.*, 2012; Böhm *et al.*, 2016; Butts *et al.* 2016). Do největších detailů byly z pohledu evoluce prozkoumány chitinázy, glukanázy a proteázy. Byly zkoumány, aby se zjistilo, jakou roli hraje koopecte v jejich funkční diverzifikaci. Vedle podobnosti proteinů byla pravděpodobně

kooptována signalizační cesta vedoucí k masožravosti ze signalizačních cest pro obranu rostlin. V mechanismech obrany rostlin jsou zaznamenány změny v membránových potenciálech nebo modulace toku iontů na plasmatické membráně jednou z nejčastějších reakcí na biotické a abiotické stresy a pozdější prvky signalizační transdukce jsou reprezentovány sítí fytohormonů, hlavně jasmonátů (Maffei *et al.*, 2007; Wasternack & Hause, 2013).

3.8 Vnímání chemických látek – “ochutnávání” jídla

Když si Darwin poprvé v roce 1860 všiml rosnatky okrouhlolisté, věřil tomu, že její listy absorbují výživné látky z hmyzu, který ulovily. Zdálo se mu tedy jako dobrý nápad, udělat nějaké předběžné pokusy s několika běžnými tekutinami, které zahrnovaly nebo nezahrnovaly dusík. Mezi nedusíkaté látky patřil například cukr, škrob a olivový olej, mezi dusíkaté mléko, moč, bílek, za studena připravený výluh ze syrového masa a sliny. Mezi látky, které zařadil do skupiny těch, které byly zcela stráveny listy rosnatky patřil například bílek, kousky zlehka opečeného masa nebo fibrin. Vše to jsou látky složené z velké části z proteinů nebo představující samotný protein. Totéž Darwin provedl s mucholapkou a vystavil i její otevřené pasti všemožným druhům zdrojů živin a všiml si, že se lapací orgán mucholapky pomalu uzavírá a následně dochází k sekreci trávicích šťáv. Z tohoto jevu dospěl k závěru, že kromě dotykových senzorů má mucholapka také systém chemických senzorů, který vyhodnocuje kvalitu potravy poskytovanou kořistí.

Chitinové schránky hmyzu, který pasti mucholapky a rosnatky přirozeně chytají se nezdají být nijak zkorodované. Darwin položil malé čtvercové kousky blanitého křídla a krovky brouka rodu drabčíkovití (*Staphylinus*) na pár listů rosnatky kapské, jejichž smotané listy znovu roztáhl, a kousky křídla a krovky pečlivě prozkoumal pod mikroskopem. Jejich úhly byly stejně ostré jako předtím a nijak se nelišily od křídel a krovek, které předtím umístil do vody. Krovka však zřejmě vypustila nějakou výživnou látku, protože list rosnatky zůstal po čtyři dny semknutý, zatímco listy s kousky blanitého křídla se znovu rozevřely další den. Darwin také zkoumal exkrementy zvířat pojídajících hmyz a všiml si, že i jejich žaludeční šťávy nepůsobí na chitinózní schránky hmyzu (Darwin, 1985).

Je tedy mucholapka schopna cítit a zpracovat chitin? Velká část lyticko-enzymového koktejlu, který je vylučován do „zeleného žaludku“ se skládá z chitináz (Sculze *et al.*, 2012). K otestování toho, zda je mucholapka schopna cítit a reagovat na chitin, Bemm a kolektiv studovali stimulačně indukovanou žláзовou expresi hlavní chitinázy (VF-1; Paszota *et al.*, 2014). Exprese VF-1 chitinázy byla nejprve sledována v pastech, které byly stimulovány

mechanicky. Po začátku stimulace během jedné hodiny byla pozorována transkripční aktivace hydrolázových genů. Po několika hodinách druhá mechanická stimulace vyvolala 400krát vyšší expresi VF-1 chitinázy. Pokud byl druhou stimulací chitin, exprese VF-1 chitinázy byla zvýšena až na 2000násobek. To naznačuje, že i v závislosti na historii chemického stimulu, následující chemický stimul jako je chitin synergicky upravuje proces sekrece na daný převládající stimul. Proto si mucholapka nejen zapamatuje přicházející signály, ale také je neustále integruje, aby dokázala perfektně přizpůsobit trávení kořisti a přijímání živin (Bemm *et al.* 2016).

Regulace produkce enzymů je pod kontrolou transkripce a je úměrná počtu AP, ale jakmile rostlina zaregistruje chemickou složku z kořisti, produkce enzymů se zvyšuje (Libiaková *et al.*, 2014; Bemm *et al.*, 2016; Böhm *et al.*, 2016; Krausko *et al.*, 2017). Chemické signály mohou udržovat koncentraci JA a JA-Ile a produkci enzymů zvýšenou i přesto, že mechanická stimulace kořisti ustane (Libiaková *et al.*, 2014). Tento typ signalizace rozpozná, že se opravdu jedná o živočišnou kořist. Aplikace chitinu nebo amonných solí aktivovala jasmonátovou signální dráhu a expresi trávicích enzymů pravděpodobně prostřednictvím LysM receptoru nebo depolarizací membránového potenciálu v trávicích žlázách. Chemické signály ze zachycené kořisti jsou mnohem lepším induktorem enzymových aktivit, než je samotná mechanická stimulace (Matušíková *et al.*, 2005; Libiaková *et al.*, 2014; Bemm *et al.*, 2016; Jopčík *et al.*, 2017; Krausko *et al.*, 2017).

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Rostlinný materiál

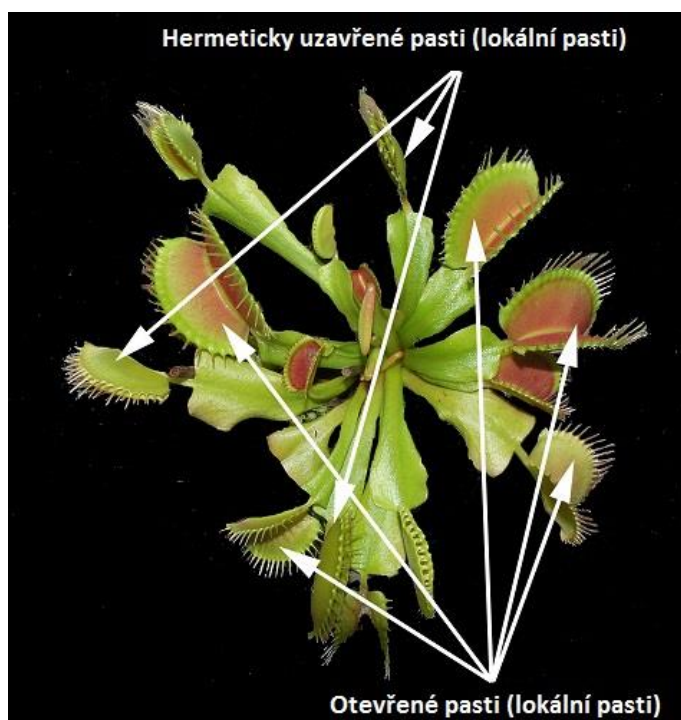
Při této studii byly použity rostliny mucholapky podivné (*Dionaea muscipula* Ellis), která je původním druhem subtropických mokřadů na východním pobřeží Spojených států amerických v Severní a Jižní Karolíně. Experimentální rostliny byly pěstovány za standartních skleníkových podmínek na oddělení biofyziky Univerzity Palackého v Olomouci (Česká republika). Byly umístěny v rašelině v klasických plastových květináčích na podmisce, která byla plněna destilovanou vodou do výšky 1-2 cm. Denní teploty kolísaly mezi 20–35 °C, relativní vlhkost vzduchu se pohybovala od 50% do 100% a maximum denní ozáření dosáhlo 1500 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fotosynteticky aktivního záření. Všechny pokusy byly provedeny na zdravých, středně velkých mladých listech.

4.2 Měření povrchových elektrických potenciálů

Povrchové elektrické potenciály (PEP) byly zaznamenány neinvazivním zařízením, vyrobeným na Katedře biofyziky Univerzity Palackého v Olomouci, které bylo umístěno uvnitř Faradayovy klecedle Ilík *et al.* (2010). Měření probíhalo za standartních laboratorních podmínek (pokojová teplota 23 ± 1 °C a relativní vlhkost vzduchu $50 \pm 5\%$). Elektrické signály byly měřeny na dvou plně vyvinutých pastech pomocí dvou nepolarizovatelných elektrod s Ag/AgCl povrchem (Scanlab systems, Praha, Česká republika), které byly fixovány v plastových 1 ml špičkách v držácích na zkumavky. Na elektrody byla nanesena kapka zvlhčujícího vodivého EKG gelu, který je běžně využíván při elektrokardiografii a teprve poté byly připojeny k horní nebo dolní, vnější straně pasti. Měření PEP bylo prováděno za použití různorodých stimulačních podnětů, přičemž stimul byl aplikován na některou z monitorovaných pastí, kterou považujeme za lokální a ostatní pasti byly sledovány pro systémovou odpověď (systémové pasti, **Obr. 6**). Při prvním pokusu byla lokální past krmena hmyzem a po dobu několika hodin byly měřeny elektrické signály jak v lokální, tak systémové pasti. Protože se ale živá kořist chová uvnitř pasti nepředvídatelně a neřízeně a neposkytuje periodické elektrické signály, které by mohly být přímo srovnatelné s poraněním, a navíc hmyzí kořist může kontaminovat trávicí tekutinu cizími bílkovinami, byl proveden druhý, již řízený experiment. V tomto experimentu byla lokální past uzavřena a poté uvnitř 40krát mechanicky stimulována pomocí špičky na pipetu o objemu 200 μl , (jejíž nejužší část byla roztavena teplem a zakulacena a následně vytvrzena při pokojové teplotě, aby se zabránilo poškrábání vnitřního povrchu pasti a nedošlo tak k reakci na

poškození) každé 3 minuty po dobu 2 hodin. V dalším experimentu byl vnější povrch uzavřené pasti 40krát každé 3 minuty píchán jehlou.

Referenční elektroda byla umístěna do podmisky s vodou. Elektrody byly napojeny na dvou nezávislých kanálech zesilovače (vyroben na Katedře biofyziky Univerzity Palackého; zisk 1-1000, šum 2-3 μV , vlnový rozsah [-3 dB] 15 Hz, čas odezvy 10 μs , vstupní odpor $10^{12} \Omega$). Signály ze zesilovače byly převedeny analogově-digitálním převodníkem (osm analogových vstupů, 12bitový převodník, $\pm 10 \text{ V}$, PCA-7228AL, dodává TEDIA, Plzeň, Česká republika), data byla shromažďována každých 6 ms a zobrazována na monitoru počítače. Citlivost zařízení byla 13 μV . Přibližně hodinu a půl před každým měřením byly navlhčené elektrody ekvilibrovány na měřených listech, aby došlo k ustálení hodnot. (Hlaváčková *et al.*, 2006). Poté bylo spuštěno měření PEP. Pro každý typ experimentu bylo provedeno alespoň 5 měření. Data byla zpracována v Originu (Origin 8.5.1., OriginLab corporation, Northampton, MA, USA).



Obr. 6 Experimentální uspořádání. Zaznačeny jsou lokální a systémové pasti mucholapky podivné.

4.3 Biotest

Zajímalo nás, zda je past více citlivá, jestliže jsou sousední pasti na téže individuální rostlině krmeny živočišnou kořistí. V anglické literatuře se tento proces v rostlinách označuje jako *priming*. Proto byly dvě nebo tři pasti na jednotlivých rostlinách krmeny moučnými červy (*Tenebrio molitor*) apo 24 hodinách, kdy byla vylučována trávicí tekutina, byly zbývající sousední, otevřené, nekrmené pasti (systémové, **Obr. 6**) testovány na citlivost počítáním množstvím dotyků citlivých výčnělků potřebných k rychlému uzavření pasti. Doba mezi

jednotlivými dotyky byla 10 sekund. Zbylé rostliny bez jakýchkoli trávených červů v pastech byly použity jako kontrola. V každé skupině bylo použito 16 rostlin s několika testovanými pastmi (tři až sedm).

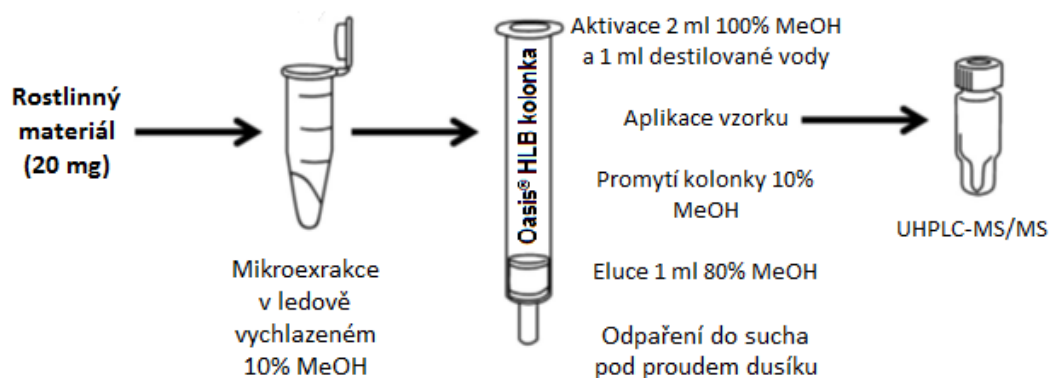
4.4 Kvantifikace fytohormonů

U mnoha rostlinných druhů nejsou všechny listy přímo propojeny cévními svazky jako je tomu například u růžice huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*; Mousavi *et al.*, 2013). Mucholapka podivná má růžici s pěti až deseti listy, které vyrůstají z krátkého, cibuli připomínajícího podzemního stonku. Jak bylo ukázáno experimenty, ve kterých bylo využíváno izotopického značení látek (Fasbender *et al.*, 2017) anebo vnějšího nanesení koronatinu (Escalante-Pérez *et al.*, 2011), listy pravděpodobně cévními svazky propojeny jsou. Aby se předešlo nejistotě o možné nepřítomnosti cévního propojení, tři nebo čtyři pasti jedné rostliny mucholapky byly krmeny hmyzem v různých časových bodech, aby byla zesílena možná systémová odpověď a krmené pasti byly sklizeny po 1, 18, 24 a 168 hodinách od zachycení kořisti. Ve stejnou dobu byly sklizeny i zbývající čtyři plně vyvinuté, nekrmené pasti (systémové) na téže růžici listů jedné rostliny (**Obr. 6**). Ve druhém experimentu byly dvě nebo tři pasti každé 3 minuty celkem 40krát mechanicky stimulovány zakulacenou špičkou pipety nebo v různých místech propichovány jehlou. Po dvou hodinách stimulace byly tyto pasti a pasti na stejné listové růžici sklizeny. Abychom prozkoumali, která látka nejvíce navozuje typickou masožravou odpověď, byly v dalším experimentu celkem do deseti pastí na různých rostlinách aplikovány 2 mg albuminu z hovězího séra (BSA) a do dalších deseti 2 mg chitinu. Do dalších 10 pastí nebyla přidána žádná chemikálie. Poté byly pasti uzavřeny a mechanicky stimulovány zakulacenou špičkou, obdobně jako v předchozím experimentu, tedy každé 3 minuty celkem 40krát. Stimulované pasti byly sklizeny po 48 hodinách. Jako kontrola byly sklizeny pasti na rostlinách, které nebyly ani krmeny, ani poškozovány či mechanicky stimulovány. Vzhledem k tomu, že po poranění listové tkáně dochází k rychlému zvýšení koncentrace jasmonátů (do 2 minut, Glauser *et al.*, 2008), byla použita rychlá metoda sběru vzorků, kdy okamžitě po odstřížení (do 10 sekund) byly pasti zmrazeny v kapalném dusíku a uskladněny při teplotě -80 °C až do analýzy.

4.4.1 Příprava vzorku

Vzorky zamražených listů byly postupně homogenizovány s použitím kapalného dusíku, třecí misky a tloučku. Rostlinný materiál byl rozvážen do 2ml plastových mikrozkuhavek (Eppendorf, Německo) na analytických vahách Ohaus (Sartorius, Gettingen, Německo) po přibližně přesně 20 mg. Při navážení byl vždy vytvořen duplikát mající přibližně přesně

stejnou hmotnost jako originál. Jako extrakční roztok byl k rostlinnému materiálu přidán 1 ml ledově vychlazeného 10% methanolu, čtyři kovové kuličky a za účelem stanovení analytu po purifikačním postupu bylo přidáno 10 μ l stabilních izotopově značených interních standardů – [$^2\text{H}_6$]-(\pm)-JA, [$^2\text{H}_6$]-(+)-ABA, [$^{13}\text{C}_6$]-IAA a [$^2\text{H}_4$]-SA (20 pmol/vzorek), [$^2\text{H}_2$]-(-)-JA-Ile (0,1 pmol/vzorek; OlChemIn Ltd., Olomouc, Česká republika) a [$^2\text{H}_5$]-OPDA (10 pmol/vzorek; (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Tyto standardy byly rozpuštěny v 50% acetonitrilu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Na každých 11 vzorků byl připraven jeden srovnávací vzorek, obsahující pouze extrakční roztok, interní standardy a čtyři kovové kuličky. Vzorky byly dále homogenizovány pomocí MM 301 vibračního oscilačního mlýnu (Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Německo) při frekvenci 27 Hz po dobu 5 minut. Poté byly sonikovány tři minuty v ultrazvukové lázni (transsonic T310, Elma GmbH & Co KG, Singen, Německo) předem vychlazené na 4 °C pomocí zásobníku s ledem. Následně byly vzorky extrahovány za použití laboratorního rotátoru Stuart SB3 (BibbyScientific Ltd., Staffordshire, UK) po dobu 30 minut v lednici při teplotě 4 °C. Po odstředění v centrifuze (15 min, 20 000 rpm, 4 °C, Beckman Avanti TM 30, Německo) byly získané supernatanty přeneseny do čistých skleněných zkumavek a pelet byl re-extrahován za stejných podmínek (přidání 1 ml 10% methanolu, protřepání na vortexu (Velp Scintifica, Usmate, Itálie), 15 minut centrifugace při 20 000 g). Sekundární supernatant byl přidán k primárnímu. Smíchané supernatanty byly purifikovány pomocí extrakce na pevné fázi (hydrofilní lipofilní polymerní sorbent, HLB, Oasis[®] HLB kolonky/ 30 mg sorbent/ objem 1 ml, Waters Co., Milford, MA, USA). SPE sorbent byl aktivován 2 ml 100% methanolu a 1 ml redestilované vody. Po nanesení 2 ml vzorku byly kolony promyty 1 ml 10% methanolu a následně byly analyty eluovány 3 ml 80% methanolu. K namíchání extrakčního a elučního činidla (10% a 80% methanolu) byl použit 100% methanol (*gradient grade*, Merck, Darmstadt, Německo). Eluát byl odpařen pod proudem dusíku k suchu při maximální teplotě 30 °C za použití TurboVap LV dusíkové odparky (Biotage, Hengoed, Velká Británie) do sucha a poté rozpuštěn ve 40 μ l 15% acetonitrilu v 10 mM kyselině mravenčí (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).



Obr. 7 Popis přípravy vzorku pro analýzu fytohormonů za použití jednokrokového SPE protokolu. Rostlinný materiál (20 mg ČM) byl extrahován za pomoci 10% vodného roztoku methanolu se stabilními isotopicky značenými standardy. Extrakty byly purifikovány pomocí HLB sorbentu. Všechny získané frakce, které obsahovaly neutrální a kyselé sloučeniny, byly odpařeny do sucha pod proudem dusíku a poté rozpuštěny ve 40 μ l 15 % acetonitrilu v 10 mM kyselině mravenčí a 10 μ l bylo vstříknuto do systému UHPLC-MS/MS (Schéma převzato a upraveno z: Floková *et al.*, 2014).

4.4.2 Parametry UHPLC-MS/MS

Byla provedena kvantitativní analýza předdefinovaných stresem indukovaných fytohormonů: *cis*-(+)-OPDA, *trans*-OPDA, OPC-4, OPC-6, (-)-JA, MeJA, 9,10-dh-JA, Σ 11-OH-JA/12-OH-JA, JA-Ile, JA-Val, JA-Phe, JA-Trp, SA, ABA a IAA dle Floková *et al.*, 2014. Všechny tyto látky byly analyzovány Acquity UPLC[®] systémem (Waters, Milford, MA, USA) spojeným s kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem Xevo[™]TQ MS (Waters MS Technologie, Manchester, UK) a z každého vzorku bylo vstříknuto 10 μ l do RP kolony (Acquity UPLC[®] CSH[™] C18; 2,1 \times 100 mm; 1,7 μ m; Waters, Irsko) o průtokové rychlosti 0,4 ml/min. Analyt byl separován gradientovou elucí za použití acetonitrilu (A) a 10 mM kyseliny mravenčí (B). Celkový čas analýzy byl 14 minut a probíhala následovně: 0-1 min izokratická eluce (15% A; v/v); následoval lineární gradient: 1-7 min do 60% A; 7-9 min do 80% A, 9-10 min do 100% A; poté 10-11 min izokratická eluce (100% A; v/v). Nakonec proběhlo minutové promytí (10-11 min) 100% A a (12-14 min) ekvibrace kolony v počátečních podmínkách (15% A/85% B). Eluát byl zaveden do iontového zdroje tandemového hmotnostního spektrometru, kde probíhala ionizace elektrosprejem v negativním módu.

Analýza probíhala za následujících podmínek: na kapiláru bylo přivedeno napětí 3 kV, na vstupní štěrbinu 23-30 V, průtok zmlžovacího plynu dusíku byl 1000 l/hod a průtok plynu na vstupní štěrbině byl 150 l/hod. Fytohormony byly rozlišeny v režimu monitorování více reakcí s využitím následujících přechodů hmoty: 215.2 > 58.8, 326.2 > 151.1, 181.2 > 134.1, 141.1 > 96.8, 269.2 > 159.1, 209.2 > 58.8, 324.3 > 151.2, 293.3 > 275.3, 176.3 > 130.2, 137.1 > 92.8, 263.2 > 153.1 pro [²H₆]-(\pm)-JA, [²H₂]-(-)-JA-Ile, [¹³C₆]-IAA, [²H₄]-SA, [²H₆]-

(+)-*cis,trans*-ABA, (-)-JA, (-)-JAIle, *cis*-(+)-OPDA, IAA, SA a ABA v tomto pořadí látek, které byly ve výsledku zanalyzovány a kvantifikovány. Kvantifikace byla provedena metodou izotopického zředování, kdy kalibrační body připraveny z autentických standardů (-)-JA, (±)-11-OH-JA, (±)-12-OH-JA, (±)-JA-Me, (±)-9,10-dh-JA, (±)-OPC-4, (±)-OPC-6, *trans*-OPDA, *cis*-(+)-OPDA, (-)-JA-L-Ile, (-)-JA-L-Val, (-)-JA-L-Phe, (-)-JA-L-Trp, (+)-*cis,trans*-ABA, IAA, SA; OlChemIn Ltd. (Olomouc, Česká republika), *Cis*-(+)-12-OPDA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a vyneseny do kalibračních křivek s dobrými korelačními koeficienty (0.9963–0.9999). Ovládání přístroje, pořizování a zpracování dat bylo provedeno pomocí softwaru MassLynx™ (verze 4.1, Waters, Milford, MA, USA).

4.5 Měření enzymových aktivit

V odpovědi na mechanickou stimulaci, poškození pletiva, nanesení 20 μ l 2mM (±)-JA (dále jen JA), chitinu a albuminu z hovězího séra (BSA) byla mezi laloky pasti vylučována trávicí tekutina, která po 48 hodinách od stimulace byla sesbírána pomocí pipety. K měření aktivity kyselých fosfatáz byl využit chromogenní substrát 4-nitrofenyl fosfát (Sigma-Aldrich). Substrát byl připraven v 50 mM acetátovém pufru (pH 5,0) a jeho výsledná koncentrace byla 5 mM. Do 525 μ l 50 mM acetátového pufru (pH 5,0) bylo přidáno 25 μ l nasbírané trávicí tekutiny a smícháno se 400 μ l substrátu. Referenční vzorek byl připraven smícháním 400 μ l substrátu s 550 μ l acetátového pufru. Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při 25 °C v termobloku (Bio TDB-100, BioSan, Lotyšsko). Pro zastavení reakce bylo ke vzorkům přidáno 160 μ l 1 M hydroxidu sodného. Pomocí dvoupaprskového spektrofotometru (Specord 250 Plus, Analytik Jena, Německo) byla měřena absorbance při 410 nm.

Proteolytická aktivita výměšků mucholapky byla určena inkubací 25 μ l vzorku se 125 μ l 200 mM glycin-HCl pufru (pH 3,0) a 150 μ l 2%BSA ve 200 mM glycin-HCl pufru (pH 3,0) v termobloku (Bio TDB-100, BioSan, Lotyšsko) při 37 °C po dobu jedné hodiny. Reakce byla zastavena přidáním 450 μ l 5% trichloroctové kyseliny. Poté byly vzorky 10 minut inkubovány na ledu a centrifugovány (15 min, 20 000 rpm, 4 °C, Sartorius 3-30K, Sigma, Německo). Proteolytická aktivita byla stanovena porovnáním absorbancí supernatantu a slepého vzorku při 280 nm za použití dvoupaprskového spektrofotometru (Specord 250 Plus, Analytik Jena, Německo). Jako míra proteolytické aktivity bylo použito množství uvolněných peptidů do roztoku, které nebylo vysráženo kyselinou trichloroctovou. Jedna jednotka proteolytické aktivity je definována jako nárůst absorbance o 0,001 za 1 minutu při 280 nm (Matušíková *et al.* 2005).

Chitinázová aktivita byla měřena dvěma způsoby: spektrofotometricky a spektrofluorometricky. Při experimentu zkoumající odpověď na mechanickou stimulaci a poškození byla využita chitinázová testovací souprava (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA) s 4-nitrofenyl β -D-N,N',N''-triacetylchitotriosou jako substrátem. K 180 μ l substrátu o koncentraci 0,2 mg ml⁻¹ bylo přidáno 20 μ l nashromážděné trávicí tekutiny. Smíšené vzorky byly inkubovány na termobloku (Bio TDB-100, BioSan, Lotyšsko) při 37 °C a po třech hodinách byla reakce zastavena přidáním 400 μ l uhličitanu sodného. Dvoupaprskovým spektrofotometrem (Specord 250 Plus, Analytik Jena, Německo) byla změřena absorbance při 405 nm. Kalibrační křivka byla stanovena pomocí 4-nitrofenolu.

Při experimentu zkoumající odpověď na chemické látky byla pro zaznamenání chitináz použita citlivější fluorometrická testovací souprava (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA) s využitím stejného substrátu jako v předchozím testu. Dle instrukčního manuálu daným výrobcem byly do 96 jamkové neprůsvitné mikrotitrační desky přidány všechny komponenty, které byly poté inkubovány 1 hodinu při 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním 200 μ l uhličitanu sodného. Pomocí multidetekčního readeru (SynergyMx, Biotek, Německo) byla měřena fluorescence při excitační vlnové délce 360 nm a emisní vlnové délce 450 nm.

4.6 SDS-PAGE a Western blotting

Pro detekci a kvantifikaci cystein proteasy (dionain), aspartát proteasy (dionaesin) a chitinasy typu I byly proti těmto proteinům vytvořeny polyklonální protilátkyv králíkovi firmami Agrisera (Vännäs, Švédsko) a Genscript (Piscataway, NJ, USA). Byly syntetizovány následující sekvence aminokyselin (epitopů): cystein proteáza, (NH₂-) CAFQYVVNNQGIDTE (-CONH₂) (Agrisera, Vännäs, Sweden). Pro detekci aspartát proteázy a chitinázy typu I byly syntetizovány následující aminokyselinové sekvence (epitopy): (NH₂-) SAIMDTGSDLIWTQC (-CONH₂) a (NH₂-) CTSHETTGGWATAPD(-CONH₂) v tomto pořadí (Piscataway, NJ, USA). Všechny sekvence byly navázány na nosný protein (keyhole limpet haemocyanin, KLH) a injekcí podán dvěma králíkům. Pro konjugaci byl použit terminální cystein peptidů. Králičí sérum bylo analyzováno na přítomnost antigen-specifických protilátek pomocí ELISA testu.

Po 48 hodinách od začátku trávení byla trávicí tekutina též posbírána na analýzu přítomnosti trávicích enzymů pomocí metody Western blotting. Vzorky byly smíchány v poměru 4:1 s vzorkovacím pufrem dle Laemmli modifikovaným na finální koncentraci 50 mM tris-HCl (pH 6,8), 2% dodecylsírán sodný, 10% glycerol, 1% β -merkaptoethanol, 12,5 mM EDTA a 0,02% bromfenolovou modř. Vzorky byly zahřívány a denaturovány 30

min při 70 °C v termobloku (Bio TDB-100, BioSan, Lotyšsko) a následně separovány pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy v tricinovém systému (Tricin-SDS-PAGE) dle Schäggera (2006). Na gel bylo nanášeno 25 µl vzorku a 3 µl markeru molekulových hmotností (PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Litva). Elektroforetické dělení proteinů probíhalo elektroforetické sestavě (Mini-PROTEAN® Tetra System, Bio-Rad, USA) v elektrodovém tlumivém roztoku při konstantním napětí 130 V přibližně 80 minut (Power/Pac 1000, Bio-Rad, USA). Proteiny v gelu byly vizualizovány buď barvením stříbrem (ProteoSilver; Sigma Aldrich) nebo byly převedeny z gelu na nitrocelulózovou membránu (velikost pórů 0,45 µm, Bio-Rad, USA) prostřednictvím blotovacího zařízení (Trans-Blot SD Cell, Bio-Rad, USA) při velikosti konstantního proudu 50 mA/1 membránu. Tento přenos trval 70 minut. Následně byly membrány inkubovány v blotovacím roztoku v lednici při 4 °C a poté inkubovány při pokojové teplotě 1 hodinu s vhodně naředěnou králičí primární protilátkou (aspartát proteasa 1:1000, cystein proteasa 1:1000, chitinasa 1:250). Primární protilátka byla vymývána kývavým pohybem na výkyvné třepačce (Wavetec, Švýcarsko) při 15 rpm 50 minut (5 x 10 minut) v TBS-T a 10 minut v TBS. Po promytí byla membrána inkubována se sekundární protilátkou: kozí anti-králičí IgG (H + L) s navázanou křenovou peroxidasou (Bio-Rad). Sekundární protilátka byla vymývána 50 minut (5 x 10 minut) v TBS-T a 10 minut v TBS. Komplexy proteinů s navázanou primární a sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidázou byly zviditelněny pomocí chemiluminiscenčního HRP substrátu (Immobilon™ Western-Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore, USA). Chemiluminiscenční signál byl zachycen a kvantifikován gel skenerem Amersham Imager 600 (GE HealthCare Life Sciences, Tokyo, Japonsko).

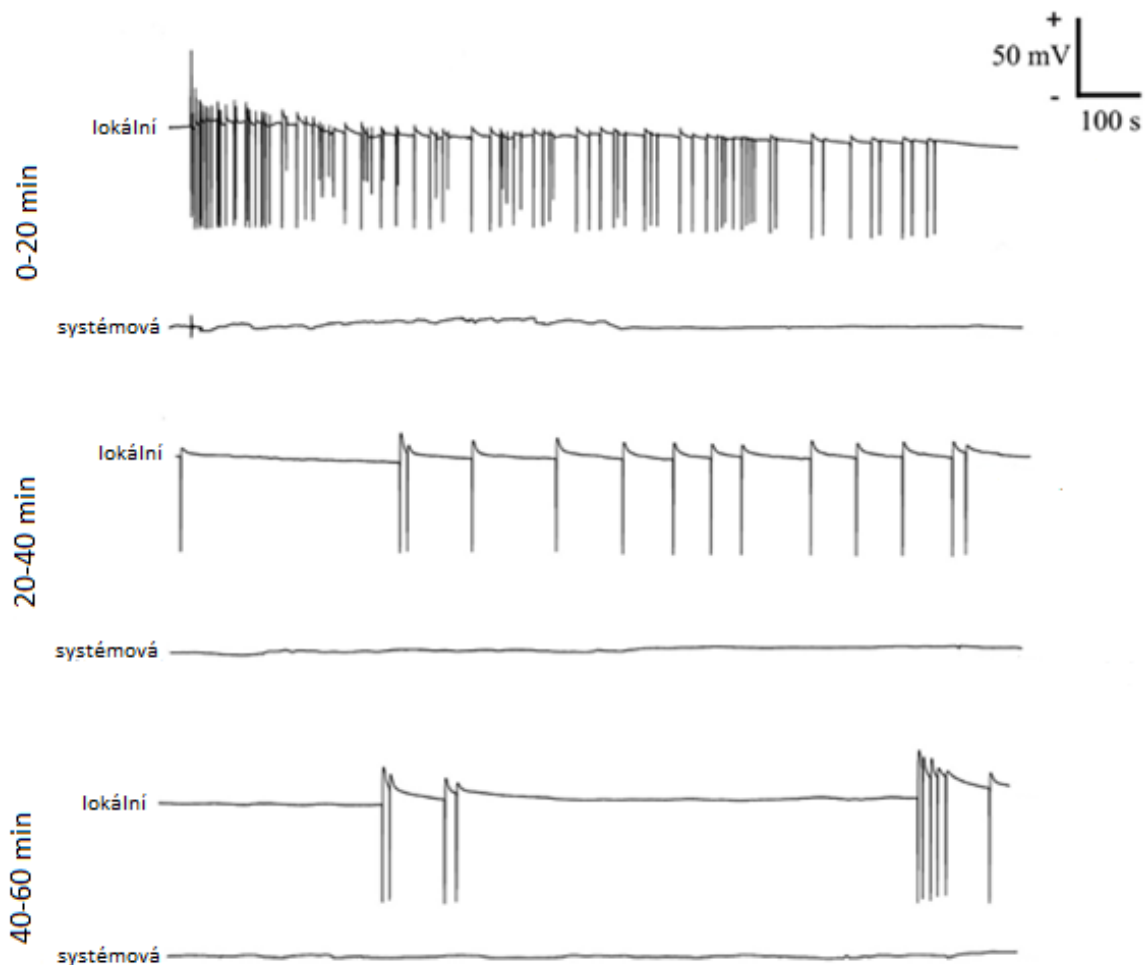
4.7 Statistická analýza

Výsledky analýzy rostlinných hormonů jsou prezentovány jako průměrné hodnoty ± SD. Významné rozdíly mezi různými variantami a kontrolou byly vyhodnoceny pomocí t-testu v programu Microsoft Excel 2016. Výsledky enzymatických aktivit a kvantifikace western blotů jsou prezentovány jako průměrné hodnoty ± SE. Významné rozdíly mezi různými variantami byly vyhodnoceny jednocestnou metodou ANOVA, po níž následoval Tukeyův test (Origin 2015, Northampton, MA, USA).

5. VÝSLEDKY

5.1 Elektrická signalizace v odpovědi na chycení kořisti

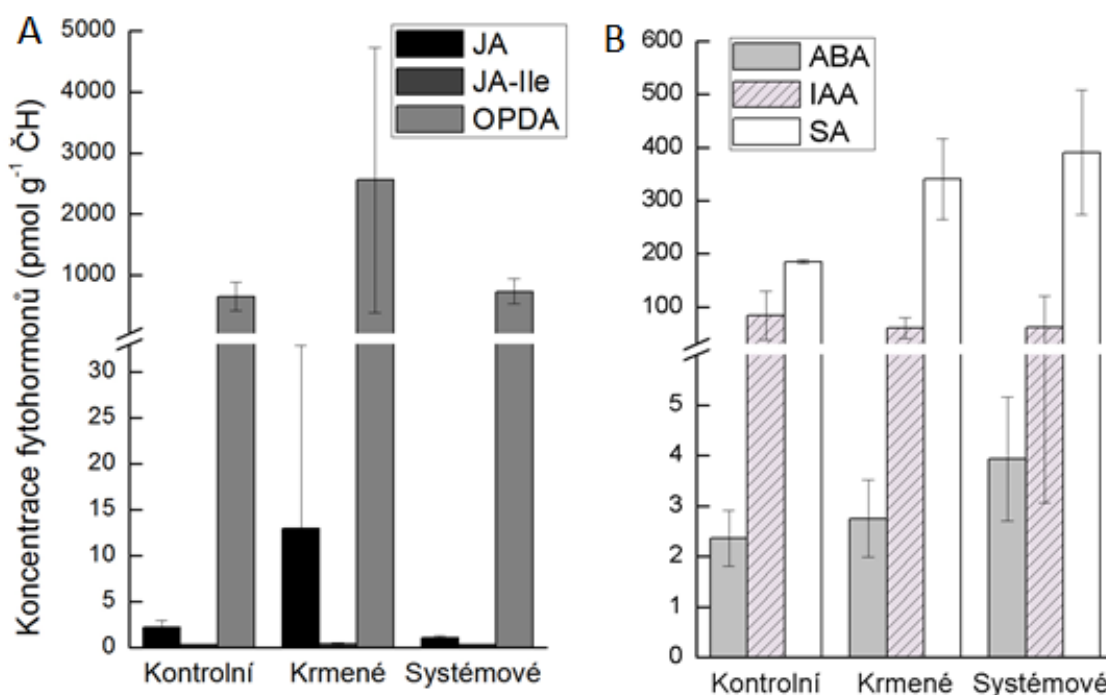
Za účelem sledování elektrické a jasmonátové signalizace v odpovědi na ulovení kořisti, byla na vnitřní povrch pasti umístěna moucha. Stimulací spouštěcích trichomů byl vyvolán elektrický signál (akční potenciál). Při vyvolání dvou akčních potenciálů došlo k rychlému uzavření pasti. Zoufalým pohybem kořisti uvnitř uzavřené pasti byly ještě více drážděny spouštěcí trichomy a vyvolány stovky akčních potenciálů. Několik minut po ulovení kořisti jsou akční potenciály velmi často vyvolány, ale později mnohem méně (**Obr. 8**) a po 4-5 hodinách elektrická aktivita obvykle ustane. APs se nešíří do spodní fotosyntetické části listu, jen někdy jsou zaznamenány malé disturbance membránového potenciálu. Zároveň byla zaznamenávána elektrická aktivita v systémových pastech, ale žádné APs nebyly detekovány. Tento pokus byl opakován několikrát se stejnými výsledky.



Obr. 8 Lokální a systémová elektrická signalizace v mucholapce podivné v odpovědi na chycení kořisti. Záznam akčních potenciálů měřených na vnějším povrchu laloku pasti mucholapky podivné v průběhu chycení kořisti (mouchy; horní stopa) a na systémové pasti (spodní stopa) v průběhu první hodiny.

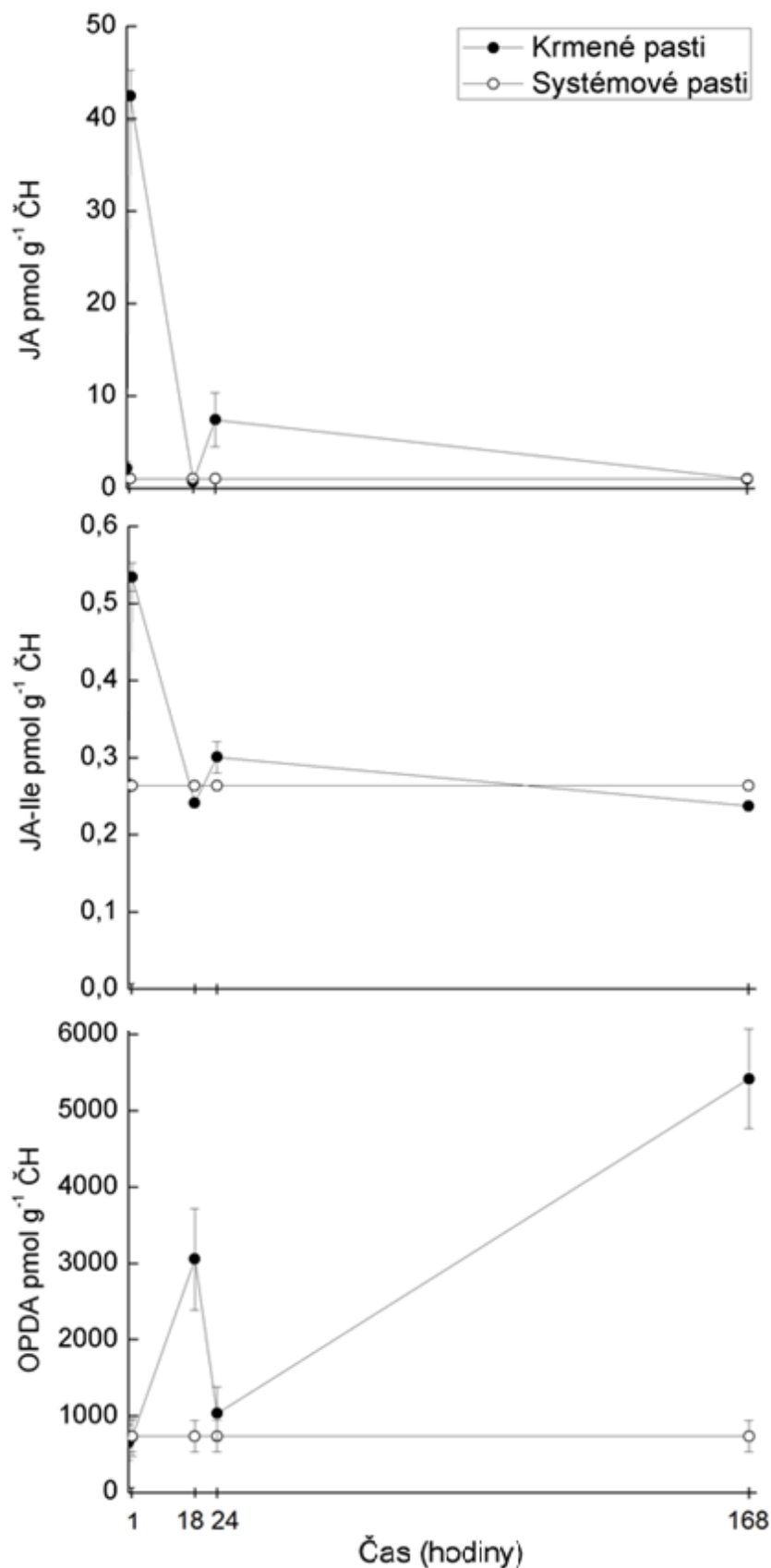
5.2 Jasmonátová signalizace v odpovědi na chycení kořisti

V pletivech pastí byly analyzovány koncentrace fytohormonů na stejné rostlině, která ulovila živočišnou kořist po 1, 18, 24 a 168 h aby byly stanoveny různé časové body trávení k monitorování systémové odezvy. Kvůli obrovskému rozdílu v akumulaci jasmonátů v krmených pastech v různých časových bodech během trávicího období (1-168 hodin) nebyla zřejmá statistická významnost, avšak průměrné koncentrace JA, JA-Ile a *cis*-OPDA byly zvýšeny 12-, 1.3- a 4násobně oproti nekrmeným pastem (**Obr. 9**). Žádná ze systémových pastí neakumulovala signifikantní množství jasmonátů; nízké průměrné hodnoty byly porovnatelné s hodnotami v kontrolních pastech (**Obr. 9**).



Obr. 9 Průměrná koncentrace fytohormonů během období trávení (1 hodina až 1 týden po zachycení kořisti) v lokálních a systémových pastech. A) Kyselina jasmonová a její metabolity, B) ostatní hormony, které jsou spojeny s obecnou stresovou reakcí. Zobrazené výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SD, $n = 4$. JA, kyselina jasmonová; JA-Ile, isoleucinový konjugát s kyselinou jasmonovou; OPDA, *cis*-12-oxofytodienová kyselina; ABA, kyselina abscisová; IAA, kyselina indol-3-octová; SA, kyselina salicylová.

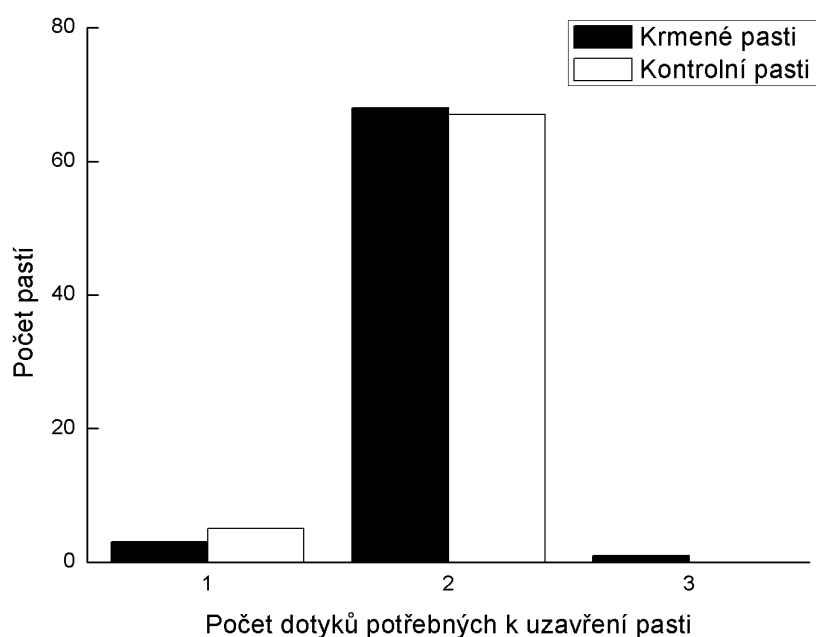
Kinetika akumulace jasmonátů ukázala, že vysoká koncentrace JA a JA-Ile se převážně nahromadily v lokálních pastech v rané fázi odezvy (po první hodině, kdy rozsáhlá mechanická stimulace z kořisti vyvolala stovku APs (**Obr. 10**) a poté poklesla. V kontrastu s tím byla vysoká koncentrace *cis*-OPDA akumulována v pozdější fázi trávicího cyklu (**Obr. 10**).



Obr. 10 Kinetika akumulace jasmonátů v odpovědi na chycení kořisti. (A) Kyselina jasmonová (JA), (B) konjugát kyseliny jasmonové s izoleucinem (JA-Ile), (C) *cis*-12-oxo-fytodienová kyselina (OPDA). Lokální pasti (černý kruh) a systémové pasti (bílý kruh) před (čas 0) a po (1, 18, 24 a 168 hodin) chycení kořisti. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty \pm SD, $n = 2-4$.

5.3 Biotest

Na základě měření elektrických signálů a koncentrace jasmonátů v pastech, které trávily kořist různě dlouhou dobu a k tomu systémových pastech, můžeme říci, že ulovení kořisti nijak neovlivňuje okolní pasti na téže rostlině. Nezměnila se ani citlivost systémových pastí. Okolní pasti se neuzavřely a stejně jako u pastí nekrmených (kontrolních) první dotyk vyvolal typický akční potenciál, který nevyvolává uzavření pasti. K uzavření pasti stačily klasicky dva dotyky, což dokazuje, že masožravost je lokální signalizace a ostatní pasti nejsou nijak informovány o přítomnosti kořisti a nevykazují zvýšenou citlivost svých pastí (**Obr. 11**).

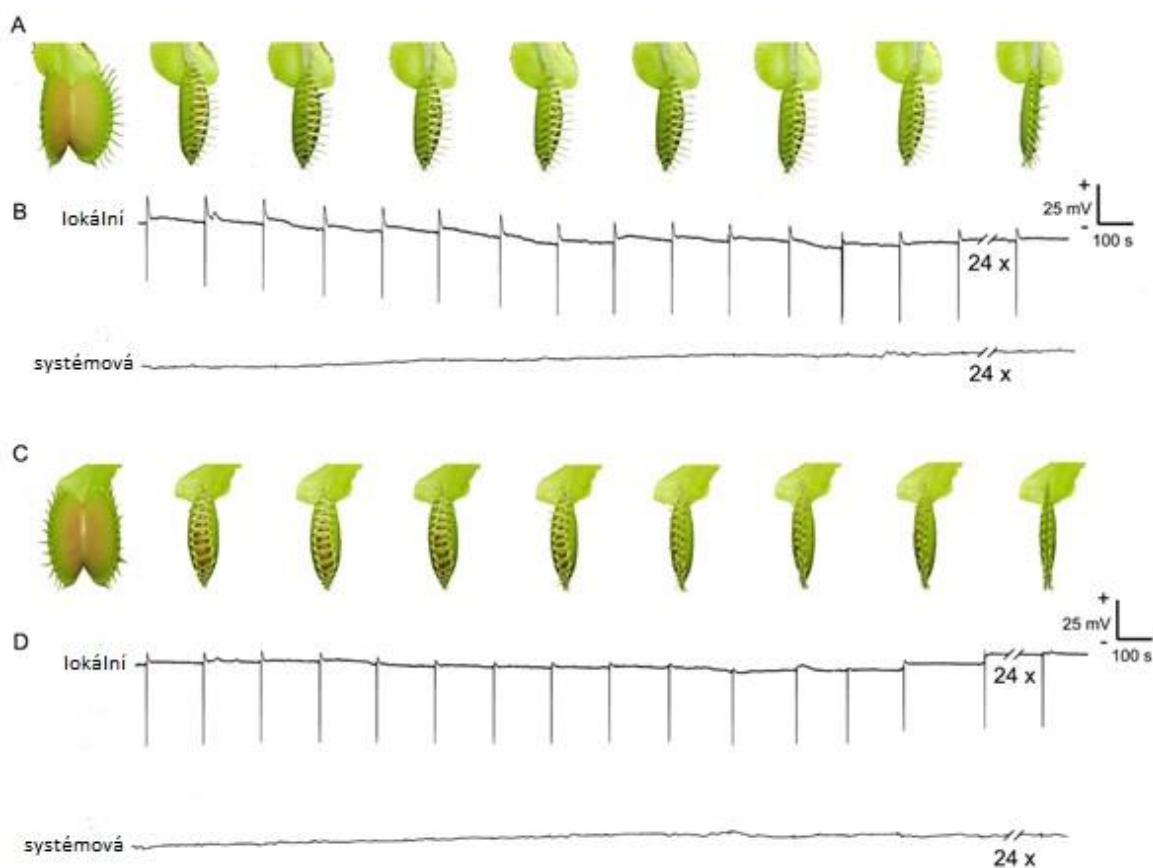


Obr. 11 Citlivost pasti vyjádřena jako počet dotykůspouštěcího výčnělku uvnitř pasti mucholapky podivné potřebný k uzavření pasti po 24 hodinách trávení kořisti, $n = 72$.

5.4 Elektrická signalizace v odpovědi na poškození a mechanickou stimulaci

Jelikož je pohyb živé kořisti uvnitř pasti nepředvídatelný a hmyzí kořist by mohla kontaminovat past cizími živočišnými proteiny, byla živá kořist nahrazena mechanickou stimulací spouštěcího výčnělku. To nám umožnilo provádět experiment za řízených podmínek, což je výhodnější, protože mucholapka umí počítat množství APs (Böhm *et al.*, 2016). Dotknutí se spouštěcího výčnělku dvakrát během 20 sekund vyvolalo rychlé uzavření pasti (**Obr. 12 b**). Po uzavření pasti nám další mechanická stimulace pomocí zakulacené špičky od pipety umožnila pravidelné dráždění každé 3 minuty. Při každém podráždění byly vyvolány typické AP, které během dvou hodin navodily hermetické uzavření pasti a sekreci trávicí tekutiny (**Obr. 12a,b**).

Abychom prozkoumali také odpověď mucholapky na poranění, byla lokální past nejprve propíchnuta jehlou dvakrát během 20 sekund, což vyvolalo rychlé uzavření pasti. Lokální past byla poté dále propichována ve stejných časových intervalech jako u mechanické stimulace, což překvapivě vyvolalo stejné AP jako ty, které byly vyvolány jako odpověď na mechanickou stimulaci. Taktéž následně došlo k hermetickému uzavření a sekreci trávicí tekutiny (**Obr. 12 c, d**). V obou případech nebyly zaznamenány žádné AP v systémových pastech (**Obr. 12 b, d**).

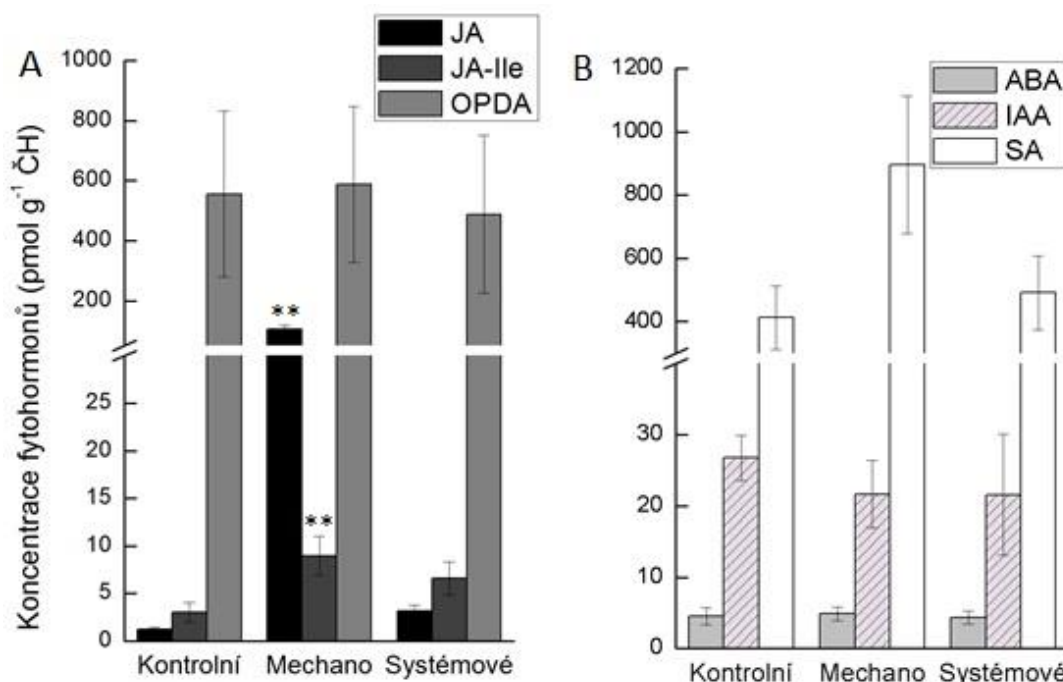


Obr. 12 Kontrolovaná mechanická stimulace a poranění pletiva pasti mucholapky podivné. (A) Vyvolání hermetického uzavření a zužování pasti v odpovědi na mechanickou stimulaci. (B) Záznam akčních potenciálů na povrchu pasti v odpovědi na mechanickou stimulaci.

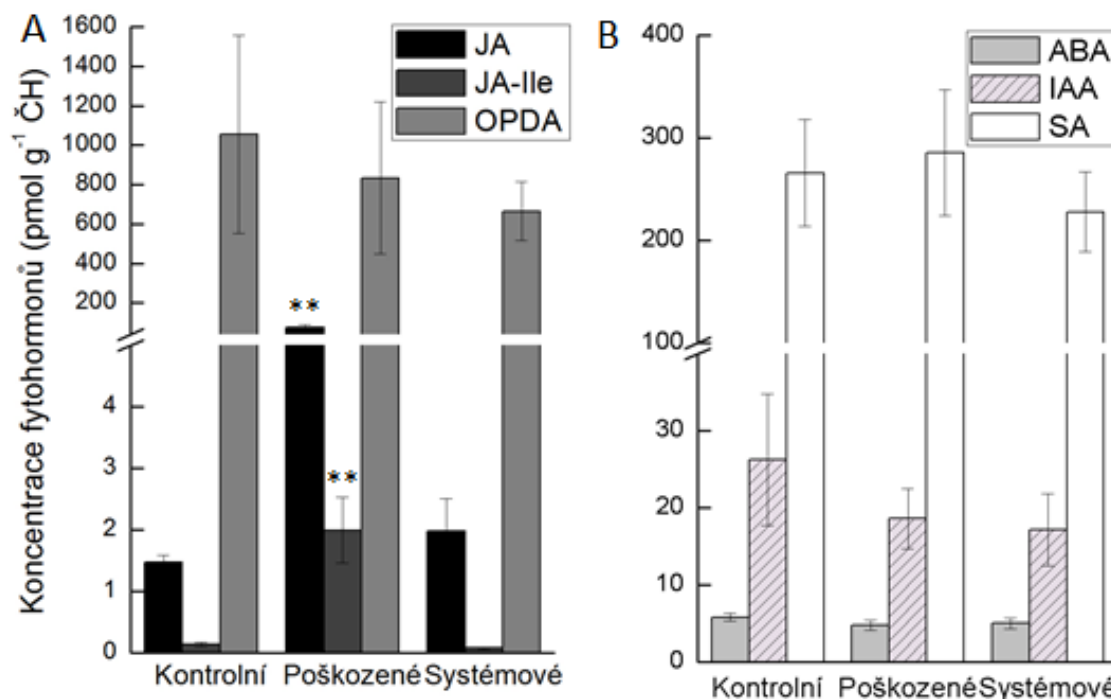
5.5 Jasmonátová signalizace v odpovědi na poškození a mechanickou stimulaci

Po dvou hodinách stimulace byly lokální a systémové pasti odebrány na analýzu fytohormonů a v porovnání s kontrolou bylo zjištěno 183-násobné zvýšení koncentrace JA a 302-násobné zvýšení JA-Ile v lokálních, mechanicky stimulovaných pastech, nikoliv však v systémových pastech (**Obr. 13a**). Poranění také zvýšilo koncentraci JA (51-násobné zvýšení) a JA-Ile (14-násobné zvýšení) v lokálních, ale ne v systémových pastech (**Obr.**

14a). Koncentrace cis-OPDA, ABA, IAA a SA se během 2 hodin výrazně nezměnila (Obr. 13b, 14b).



Obr. 13 Koncentrace fytohormonů v lokálních a systémových pastech po 2 hodinách mechanické stimulace. A) Kyselina jasmonová a její metabolity, B) ostatní hormony, které jsou spojeny s obecnou stresovou reakcí. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty \pm SD, $n = 4-8$. Významné rozdíly v hodnotě P oproti kontrole <0.01 jsou označeny ** (studentůvt-test). JA, kyselina jasmonová; JA-Ile, isoleucinový konjugát s kyselinou jasmonovou; OPDA, *cis*-12-oxofytodienová kyselina; ABA, kyselina abscisová; IAA, kyselina indol-3-octová; SA, kyselina salicylová.



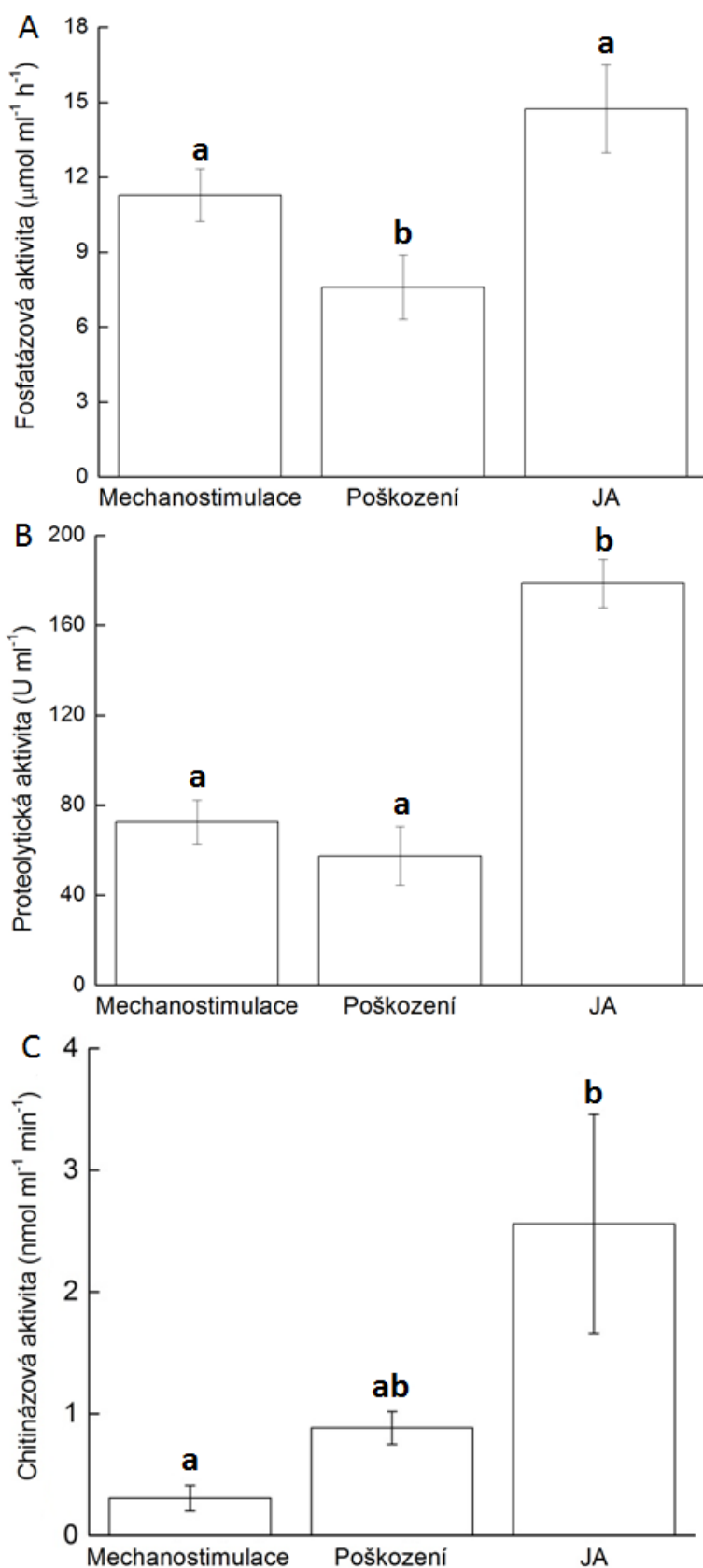
Obr. 14 Koncentrace fytohormonů v lokálních a systémových pastech po 2 hodinách poškozování. A) Kyselina jasmonová a její metabolity, B) ostatní hormony, které jsou spojeny s obecnou stresovou reakcí. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty \pm SD, $n = 4-8$. Významné rozdíly v hodnotě P oproti kontrole <0.01 jsou označeny ** (studentůvt-test). JA, kyselina jasmonová; JA-Ile, isoleucinový konjugát s kyselinou jasmonovou; OPDA, *cis*-12-oxofytodienová kyselina; ABA, kyselina abscisová; IAA, kyselina indol-3-octová; SA, kyselina salicylová.

5.6 Enzymové aktivity po poškození a mechanické stimulaci

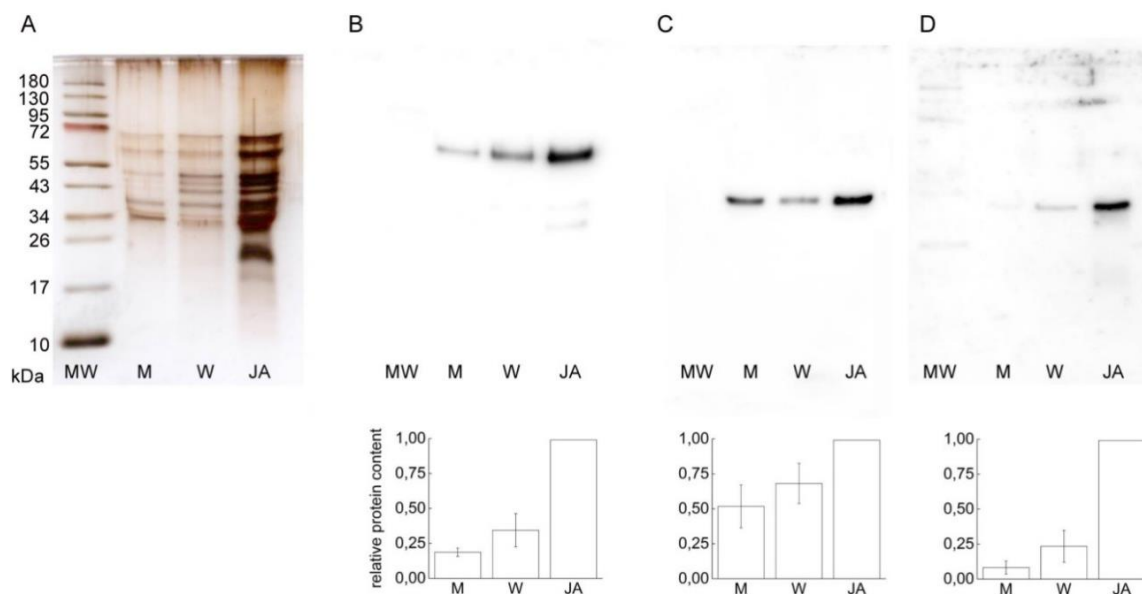
Jelikož poškození a mechanická stimulace vyvolala nahromadění jasmonátů v lokálních pastech, byla jako pozitivní kontrola použita JA nanosená na vnitřní povrch pasti. Po nanesení 20 μ l 2 mM JA se do 24 hodin pasti hermeticky zavřely a byla spuštěna sekrece trávicí tekutiny. Když bylo vyloučeno dostatečné množství (po 48 hodinách), trávicí tekutina byla odebrána pro stanovení enzymových aktivit a SDS-PAGE. Systémové pasti zůstaly otevřené a nevytvářely žádnou trávicí tekutinu. Ve všech případech vykazovala trávicí tekutina odebraná z lokálních pastí fosfatázovou, endochitinázovou a proteolytickou aktivitu. Mechanická stimulace vyvolala fosfatázovou aktivitu, která byla srovnatelná s aktivitou vyvolanou nanesením JA. V poškozených pastech byla fosfatázová aktivita mírně nižší (**Obr. 15a**). Proteolytická aktivita se mezi mechanickou stimulací a poškozením významně nelišila, ale po ovlivnění JA byla silně zvýšená (**Obr. 15b**). Endochitinázová aktivita byla také nejvyšší po nanesení JA na vnitřní povrch pasti (**Obr. 15c**).

5.7 SDS-PAGE a Western blotting po poškození a mechanické stimulaci

Aby se semi-kvantifikovalo množství enzymů zodpovědných za tyto aktivity v trávicí tekutině, bylo vždy stejné množství trávicí tekutiny elektroforeticky rozděleno. Pomocí SDS-PAGE bylo v mucholapce odhaleno vylučování stejných proteinových profilů v odpovědi na mechanickou stimulaci a poškození, a velmi podobného proteinového profilu v odpovědi na nanesení JA. Intenzitou zbarvení stříbrem bylo ukázáno, že nejvyšší vylučování proteinů byla vyvolána po ovlivnění JA (**Obr. 16a**). Imunoanalytickou metodou Western blotting byla v tekutině potvrzena přítomnost následujících dominantně se vyskytujících trávicích enzymů: aspartát proteázy dionaeasinu (**Obr. 16b**), cystein proteázy dionaeinu (**Obr. 16c**) a VF-1 chitinázy (**Obr. 16d**). V souladu s výsledky enzymové aktivity bylo množství enzymů srovnatelné mezi mechanicky stimulovanými a poraněnými pastmi, ale vyšší v odpovědi na nanesení JA. Na základě zde prezentovaných výsledků je zřejmé, že poranění může napodobovat mechanickou stimulaci hmyzí kořisti, a to prostřednictvím elektrické a jasmonátové signalizace a že reakce je vždy lokální a ne systémová.



Obr. 15 Enzymová aktivita měřená po 48 hodinách od mechanické stimulace, mechanického poškození a po exogenní aplikaci 2 mM kyseliny jasmonové v lokálních pastech. Systémové pasti se neuzavřely a nevytvářely žádnou trávicí tekutinu, proto je jejich enzymová aktivita rovna nule. (A) Fosfatázová, (B) proteolytická, (C) endochitinázová aktivita. Různá písmena označují významné rozdíly v hodnotě $P < 0.05$ (ANOVA, Tukey's-test). Zobrazeny jsou průměrné hodnoty \pm SE, $n = 4$ (pro chitinázové activity)-8 (pro fosfatázové a proteolytické aktivity).

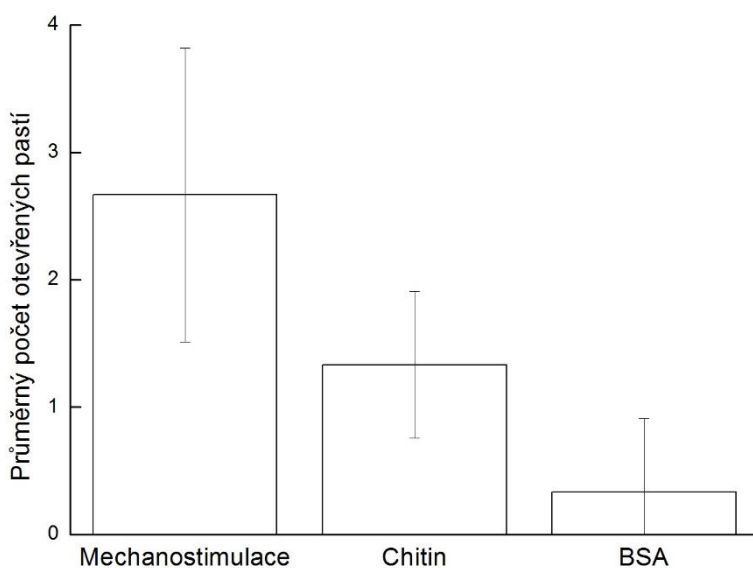


Obr. 16 Proteinový profil a imunodetekce aspartát proteázy (dionaeasin), cystein proteázy (dionain) a VF-1 chitinázy v trávicí tekutině mucholapky podivné. Trávicí tekutina byla sbírána 48 hodin po mechanické stimulaci a proteiny byly separovány v 10% (v/v) SDS-polyakrylamidovém gelu a analyzovány pomocí Western blotu. A) Stříbrem barvený SDS-PAGE trávicí tekutiny v odpovědi na různé stimuly. B) Analýza pomocí Western blotu s použitím specifické protilátky proti aspartát proteáze(dionaeasinu), C) cystein proteáze dionainu, D) chitináze v odpovědi na různé stimuly. MW = molekulová hmotnost; M = mechanostimulace; W = poškození; JA = 2 mM kyselina jasmonová. Do každé jamky bylo naneseno stejné množství trávicí tekutiny (8 μ l). Uvedené Western bloty jsou reprezentativní ze tří nezávislých experimentů. Signál byl kvantifikován pomocí chemiluminiscence. Průměrná hodnota \pm SE, $n = 3$.

5.8 Chemická stimulace

Některé látky jako například roztok chloridu amonného a dihydrogenfosforečnanu draselného (chloridové, amonné a draselné ionty) dokážou vyvolat zužování pasti samy o sobě bez předchozí mechanické stimulace (Libiaková *et al.*, 2014). Samostatné podání chemické látky ale nevyvolává žádné elektrické signály (Affolter & Olivo, 1975). Jelikož by podání BSA a především málo rozpustného chitinu v pevné formě, jako jsme použili v tomto experimentu, nevyvolalo požadující rychlé zúžení pasti, spojili jsme toto podání s mechanostimulací pomocí zakulacené špičky na pipetu.

Průměrný počet pastí, které se po 48 hodinách od stimulace znova otevřely, odráží expresi genů trávicích proteinů v tomto čase. Ukazuje, že mechanická stimulace a vyvolání tak desítky AP zapříčiní, že u některých pastí dochází k otevření pasti již do 48 hodin. Expresie genů trávicích proteinů v této době tedy není tak silná, jako ve spojení s chemickou stimulací, kdy je past udržena uzavřená a zúžená po delší čas. Větší vliv na udržení uzavření pasti a s ní spojenou tvorbu trávicích enzymů měl BSA než chitin (**Obr. 17**).

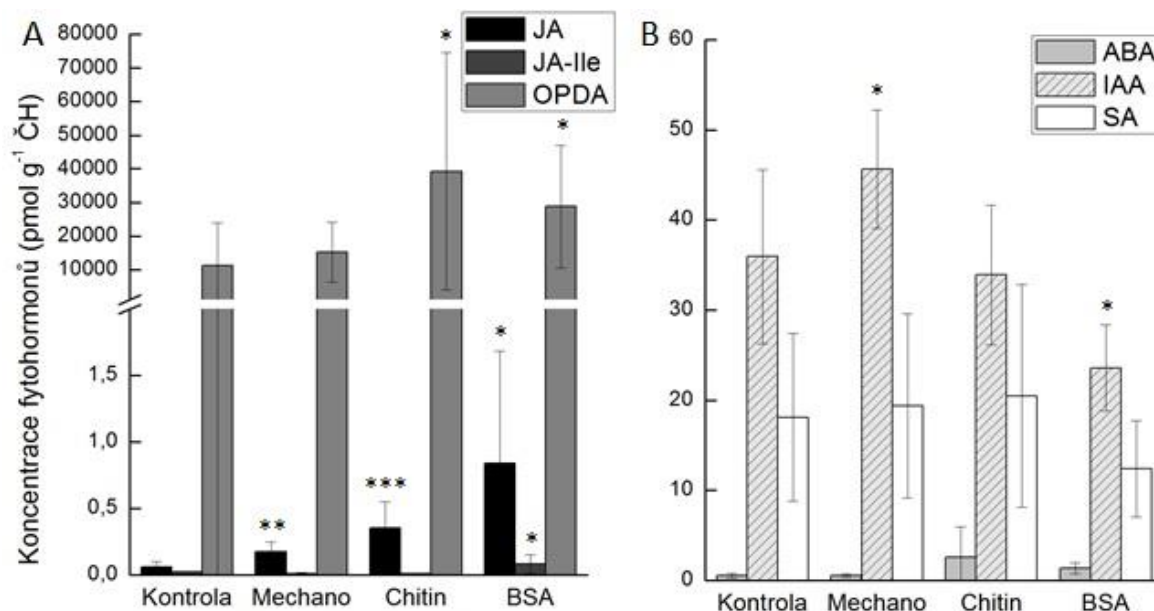


Obr. 17 Průměrný počet znova otevřených pastí z deseti možných odrážející genovou expresi trávicích proteinů po 48 hodinách od různých stimulů (mechanostimulace; mechanostimulace + chitin; mechanostimulace + BSA). V těchto pastech se nevyskytovala žádná trávicí tekutina, $n=3$.

5.9 Jasmonátová signalizace v odpovědi na chemickou stimulaci

Po 48 hodinách od stimulace byly lokální pasti odebrány na analýzu fytohormonů. Kinetika akumulace jasmonátů v odpovědi na chycení kořisti ukazuje, že v této době, tedy při pozdní reakci mucholapky, má hlavní roli *cis*-OPDA (**Obr. 10**). U spojení mechanostimulace s chemickou stimulací bylo zjištěno významné zvýšení koncentrace *cis*-OPDA oproti kontrole jak u použití chitinu (2,5-násobné), tak u BSA (3,5-násobné zvýšení). Chemická stimulace zvýšila koncentraci i JA (6-násobné zvýšení po podání chitinu a 14-násobné

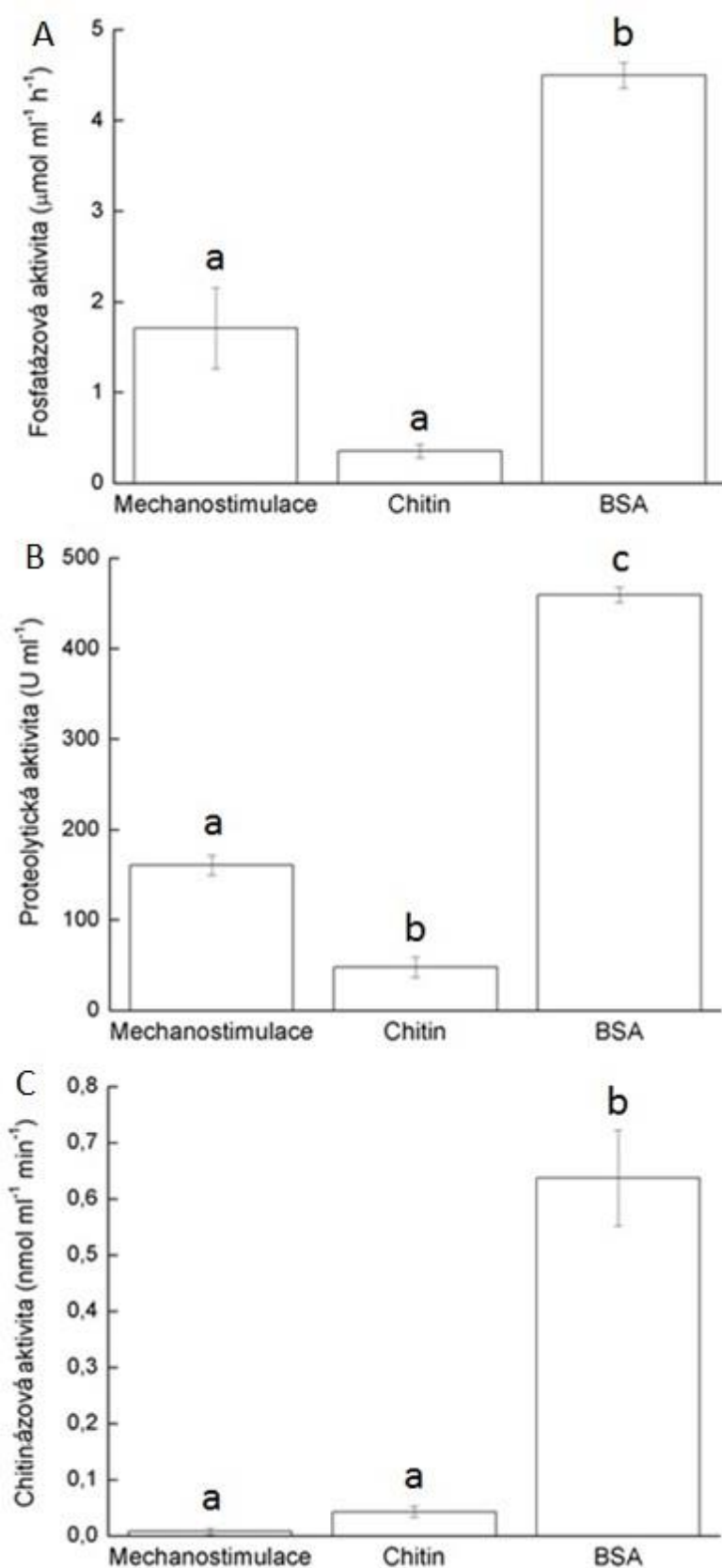
zvýšení po podání BSA) a JA-Ile (2-násobné zvýšení po podání chitinu a 4-násobné zvýšení po podání BSA; **Obr. 18a**). Koncentrace ABA a SA se během 48 hodin po působení mechanické a chemické stimulace výrazně nezměnila. U IAA byl zaznamenán statisticky významný nárůst po mechanostimulaci a pokles po podání BSA (**Obr. 18b**).



Obr. 18 Koncentrace fytohormonů v lokálních a systémových pastech po 48 hodinách stimulace od mechanické a chemické stimulace. Kyselina jasmonová a její metabolity, B) ostatní hormony, které jsou spojeny s obecnou stresovou reakcí. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty \pm SD, $n = 5$. Významné rozdíly jsou označeny *, **, *** a odpovídají hodnotě $0,05 > P > 0,01$; $0,01 > P > 0,001$; a $P < 0,001$ v tomto pořadí. (studentůvt-test). JA, kyselina jasmonová; JA-Ile, isoleucinový konjugát s kyselinou jasmonovou; OPDA, *cis*-12-oxofytodienová kyselina; ABA, kyselina abscisová; IAA, kyselina indol-3-octová; SA, kyselina salicylová.

5.10 Enzymové aktivity po mechanické a chemické stimulaci

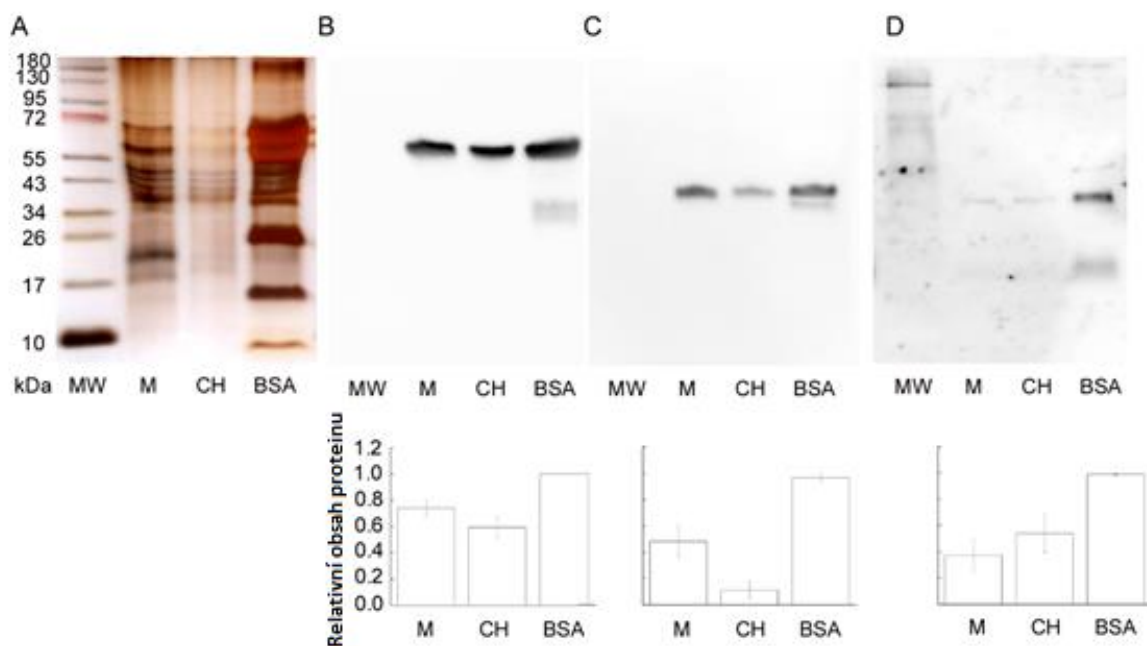
Po 48 hodinách od stimulace byla ze zavřených pastí odebrána trávicí tekutina pro stanovení enzymových aktivit a SDS-PAGE. Ve všech případech vykazovala trávicí tekutina fosfatázovou, proteolytickou a endochitinázovou aktivitu a ve všech případech tyto aktivity výrazně stimuloval BSA. Chitin na fosfatázové a proteolytické aktivity neměl výrazný aditivní efekt nebo je dokonce inhiboval. Po podání chitinu byly chitinázové aktivity v porovnání s pouhou mechanostimulací mírně vyšší (**Obr. 19**).



Obř. 19 Měření aktivity enzymů v trávicí tekutině po 48 hodinách od mechanické stimulace a podání chitinu a hovězího sérového albuminu v pastech mucholapky podivné. Systémové pasti neprodukovaly žádnou trávicí tekutinu, proto je jejich enzymatická aktivita nulová A) Fosfatázová B) proteolytická C) chitinázová aktivita. Různá písmena označují významné rozdíly v hodnotě $P < 0.05$ (ANOVA, Tukey's-test). Zobrazeny jsou průměrné hodnoty \pm SE, $n = 4$ (pro fosfatázové), 6 (pro proteolytické aktivity) a 9-10 pro chitinázové aktivity.

5.11 SDS-PAGE a Western blotting po mechanickéchemické stimulaci

Aby se semi-kvantifikovalo množství enzymů zodpovědných za tyto aktivity v trávicí tekutině, bylo vždy stejné množství tekutiny elektroforeticky rozděleno. Pomocí SDS-PAGE bylo v mucholapce odhaleno vylučování podobných proteinových profilů v odpovědi na mechanickou stimulaci a chitin, a stejného proteinového profilu v odpovědi na nanesení BSA. Intenzitou zabarvení stříbrem bylo ukázáno, že nejvyšší vylučování proteinů bylo vyvoláno po nanesení BSA (**Obr. 20a**). Metodou Western blotting byla v tekutině potvrzena přítomnost následujících dominantně se vyskytujících trávicích enzymů: aspartát proteázy dionaeasinu (**Obr. 20b**), cystein proteázy dionaeinu (**Obr. 20c**) a VF-1 chitinázy (**Obr. 20d**). V souladu s výsledky enzymové aktivity bylo množství chitinázy srovnatelné mezi samostatnou mechanostimulací a chemostimulací chitinem, ale výrazně vyšší v odpovědi na nanesení BSA (**Obr. 20d**). Množství proteáz po různých stimulacích nebylo srovnatelné. Obě proteázy byly ale nejvíce vylučovány po podání BSA a nejméně po podání chitinu (**Obr. 20b,c**). Na základě zde prezentovaných výsledků je zřejmé, že mucholapka rozpozná přítomnost a charakteristiku chemických látek a tomu také přizpůsobuje sekreci trávicích enzymů. Je-li přítomen pouze chitin, exprese trávicích proteinů není tak silná jako v případě proteinu. Mucholapka tedy pomocí chemických senzorů umí dokonale rozlišit, jestli je v pasti přítomná kořist vhodná produkce enzymů nebo ne.



Obr. 20 Proteinový profil a imunodetekce aspartát proteázy (dionaeasin), cystein proteázy (dionain) a VF-1 chitinázy v trávicí tekutině mucholapky podivné. Trávicí tekutina byla sbírána 48 hodin po mechanické a chemické stimulaci a proteiny byly separovány v 10% SDS-polyakrylamidovém gelu a analyzovány pomocí Western blotu. A) Stříbrem barvený SDS-PAGE trávicí tekutiny v odpovědi na různé stimuly. B) Analýza pomocí Western blotu s použitím specifické protilátky proti aspartát proteáze(dionaeasinu), C) cystein proteáze dionainu, D) chitináze v odpovědi na různé stimuly. MW = molekulová hmotnost; CH = chitin; M = mechanostimulace; P = hovězí sérový albumin. Do každé jamky bylo naneseno stejné množství trávicí tekutiny (25 μ l). Uvedené Western bloty jsou reprezentativní ze tří nezávislých experimentů. Signál byl kvantifikován pomocí chemiluminiscence. Průměry \pm SE, $n = 3$.

6. DISKUZE

Masožravá rostlina mucholapka podivná může po strávení kořisti a absorpci živin zvýšit rychlost fotosyntézy (A_N) a snížit i růst celé rostliny. Na druhou stranu ale elektrická signalizace, která je spojována s chycením kořisti a zvýšením potřebné energie na její trávení, má za následek snížení A_N a zvýšení mitochondriálního dýchání (Pavlovič *et al.*, 2010; Kruse *et al.*, 2014; Libiaková *et al.*, 2014, Pavlovič & Saganová, 2015, Fasbender *et al.*, 2017). Mucholapka podivná si však vyvinula několik kontrolních mechanismů, aby optimalizovala tento přínos snížením souvisejících nákladů. Zaprvé je při pokojové teplotě zapotřebí alespoň dvou dotyků spouštěcích výčnělků uvnitř pasti, a tedy vyvolání dvou AP k jejímu uzavření (Brown, 1916). Jeden dotyk k uzavření pasti nestačí, čímž rostlina předchází nechtěnému uzavření v případě dopadu kapky deště, semen nebo lístků stromů. Zadruhé, pokud past sklopne, malé mezery mezi špičatými výčnělky na obvodu pasti umožňují únik malé kořisti. Tento druhý kontrolní bod pomáhá šetřit energii, protože malá kořist by neposkytovala dostatečné množství živin, které by kompenzovaly náklady spojené se zadržením kořisti a jejím trávením v pasti. V takovém případě se past znovu otevře (Libiaková *et al.*, 2014). Po zachycení větší kořisti je dalším kontrolním mechanismem opakovaná mechanická stimulace spouštěcích výčnělků. Kořist bojující o život vyvolává stovky AP (**Obr. 8**), což způsobuje, že se past zužuje a vylučuje trávicí tekutinu (Affolter & Olivo, 1975; Lichtner & Williams, 1977). Pro aktivaci signální dráhy kyseliny jasmonové jsou zapotřebí nejméně dva AP, k vyvolání významné exprese trávicích enzymů pak pět AP. Zdá se, že mucholapka může kontrolovat množství trávicích enzymů vylučovaných žláзовými buňkami prostřednictvím počtu AP aktivujících jasmonátovou signální dráhu (Böhm *et al.*, 2016). Předpokládá se, že mucholapka na rozdíl od rosnatek a láčkovek, spoléhá více na 12-oxo-fytodienovou kyselinu než na JA nebo JA-Ile (Escalante-Pérez *et al.*, 2011), ale námi byla zaznamenána akumulace JA a JA-Ile ve stimulovaných pastech stejně jako v práci Libiaková *et al.*, 2014. Nedávné zjištění, že chycení kořisti vyvolalo transkripci genu JASMONIC ACID RESISTANT1 (JAR1), který převádí JA na jeho fyziologicky aktivní formu JA-Ile (Bemm *et al.*, 2016), podporuje naše zjištění, že v mucholapce podivné je JA-Ile bioaktivní sama o sobě. To je také podpořeno skutečností, že sekrece trávicí tekutiny začala během hodiny, kdy byla koncentrace JA i JA-Ile zvýšena díky intenzivní elektrické aktivitě a koncentrace *cis*-OPDA byla srovnatelná s koncentrací v kontrolních rostlinách (**Obr. 8, 10, 13, 14**). Koncentrace *cis*-OPDA byla zvýšena pouze v pozdějších fázích trávení (**Obr. 10**; Escalante-Pérez *et al.*, 2011; Libiaková *et al.*, 2014).

Zvýšená koncentrace *cis*-OPDA může poskytovat rezervu pro syntézu JA (Koo *et al.*, 2009), ale signalizační úloha *cis*-OPDA ve fázi trávení nemůže být vyloučena. Zvýšené koncentrace JA a JA-Ile během prvních dvou hodin po zachycení kořisti byly rovněž zaznamenány u rosnatkovitých rostlin (Mithöfer *et al.*, 2014; Krausko *et al.*, 2017).

Navzdory výše popsanému sofistikovanému systému rozpoznání kořisti tato studie ukazuje, že masožravé rostliny mohou být snadno oklamány poraněním, typickým aktivátorem obranné reakce rostlin. V mucholapce podivné poškození vyvolalo rychlé uzavření pasti, hermetické uzavření a vylučování trávicí tekutiny obsahující různé enzymy, které spolu utvářejí typickou masožravou odpověď (**Obr. 12c,d, 15, 16**). V nedávné době byla objevena stejná reakce u rosnatky kapské (*Drosera capensis*), ale byly zpozorovány i některé rozdíly (Krausko *et al.*, 2017). V odpovědi na poranění, rosnatky kapské vytvářejí odlišné elektrické signály než ty, které jsou vytvářeny v odpovědi na mechanickou stimulaci. Tento poraněním vyvolaný signál je pravděpodobně složen z různých typů (AP, variačního potenciálu – VP a systémového potenciálu – SP) a nejen že se šíří do všech sousedních pastí a tentakulí, ale také aktivují sekreci trávicích enzymů ve vzdálených pastech, tedy typickou masožravou odpověď. Je docela překvapující, že mucholapka vytvářela AP místo VP, o kterých se předpokládalo, že jsou tvořeny v odpovědi na podněty způsobující poškození (Fromm & Lautner, 2007). Je známo, že AP vyvolán mechanickou stimulací neproniká ani do fotosyntetické části listu mucholapky podivné, takže tyto dvě části jsou pravděpodobně elektricky nezávislé. Ve fotosyntetické části listu byly zaznamenány pouze gradientní potenciály, které mají velmi nízkou amplitudu (Volkov *et al.*, 2007). Naše studie také prokázala, že AP vyvolané poraněním jsou v mucholapce omezené pouze na lokální pasti (**Obr. 12d**). Takové omezené šíření typických AP, v kontrastu s VP, bylo také zaznamenáno u citlivky stydlivé (*Mimosa pudica*; Fromm & Lautner, 2007). Escalante-Pérez a kolektiv ale tvrdí, že v mucholapce podivné existuje systémová odpověď, a to na základě experimentu, ve kterém zevně aplikovali 1 mM koronatin (strukturní napodobeninu JA-Ile) na lokální pasti. Během 3-24 hodin byly zjištěny zvýšené koncentrace OPDA v systémových listech a tvrdili, že úspěšné zachycení jednoho hmyzu vede k tvorbě OPDA, které se systémově donáší do ostatních pastí (neautonomní buněčná dráha). Takovou umělou stimulací byla vyvolána sekrece trávicí tekutiny ve všech sousedních pastech (Escalante-Pérez *et al.*, 2011). Toto chování ale nikdy nebylo pozorováno přirozeně, což naznačuje, že přirozené chycení kořisti je spíše lokální než systémová odpověď. Koo & Howe takovéto experimenty s aplikací jasmonátu kritizovali a považovali je za nedostatečné pro odvození role vnitřních jasmonátů v odpovědi na poranění. Na základě našich studií lze u mucholapky po zachycení kořisti šíření elektrických signálů (autonomní buněčnou dráhou) a jasmonátů

(neautonomní buněčnou dráhou) do sousedních pastí vyloučit (Koo & Howe, 2009). Totéž platí pro rosnatku kapskou (Krausko *et al.*, 2017). Skutečnost, že masožravá odpověď je vždy lokální je silně podpořena také výsledky Nakamury a kolektivu a Krauska a kolektivu, kterými bylo zjištěno, že akumulace jasmonátů je prostorově omezená pouze na ohybový segment pasti rosnatky kapské se zachycenou kořistí a že pouze tento segment generuje elektrické signály a trávicí enzymy (Nakamura *et al.*, 2013; Krausko *et al.*, 2017). Naše výsledky jsou shodné s Mousavim a kolektivem, kterými byla v místech vzdálených od poranění prokázána zásadní úloha elektrické signalizace při zahájení obranné reakce (Mousavi *et al.*, 2013). Ve studii Krauska a kolektivu byla objevena velmi úzká korelace mezi šířením elektrického signálu, akumulací jasmonátů a vylučováním trávicích enzymů u rosnatky kapské (Krausko *et al.*, 2017), čímž byl potvrzen obecný předpoklad významu elektrické signalizace na dlouhé vzdálenosti při systémové odpovědi (Mousavi *et al.*, 2013). Na základě výsledků u mucholapky a rosnatky můžeme usoudit, že masožravost je vždy lokální reakcí, která se zdá býti rozumná – bylo by docela nákladné produkovat trávicí enzymy ve všech pastech na rostlině, které nezachytily kořist.

Chycení kořisti a trávení je obvykle řízeno dvěma typy stimulů: mechanickými a chemickými. Mechanické stimuly spouštěcích výčnělků jsou důležité hlavně v prvních hodinách po chycení kořisti a jsou zodpovědné za rychlé zužování pasti a uvolňování trávicí tekutiny (Libiaková *et al.* 2014). Tento typ stimulace je spojen s tvorbou AP a zvýšením koncentrace cytosolické Ca^{2+} (Krol *et al.*, 2006; Escalante-Pérez *et al.*, 2011). Jakmile ulovená kořist uhyne, chemické stimuly uvolňovány při rozkladu kořisti udržují past ve zúžené fázi, která je doprovázena sekrecí enzymů (Lichtner & Williams, 1977). Affolter a Olivo jasně dokázali, že na povrchu pasti mucholapky po smrti hmyzu nebyly zaznamenány žádné AP, kterých se předtím spustila stovka (Affolter & Olivo, 1975). Což ukazujeme také v naší studii (**Obr. 8**). U pasivní pasti špirlice nachové (*Sarracenia purpurea*) po mechanické stimulaci nebylo pozorováno vylučování enzymů. Ani láčkovky (*Nepenthes*) nejsou pravděpodobně v odpovědi na chycení kořisti schopné šířit elektrické signály. U těchto pasivních pastí je ale nesmírně důležité pro vyvolání masožravé odpovědi skrz jasmonátovou signalizaci vnímání chemických látek (Buch *et al.*, 2015; Yilamujiang *et al.*, 2016). Chemické stimuly ve formě albuminu z hovězího séra (BSA) nebo NH_4^+ u nich významně zvýšily fosfatázovou a proteolytickou aktivitu (Gallie & Chang, 1997). Nedávno bylo u láčkovek popsáno i vyvolání endochitinázové aktivity chitinem (Eilenberg *et al.*, 2006; Rottloff *et al.*, 2011; Mithöfer 2011; Hatano & Hamada, 2012). U rosnatky v odpovědi na mechanické dráždění lepivé tentakuly proteolytické, chitinázové a fosfatázové aktivity v trávicí tekutině buď nebyly zvýšené, nebo byly zvýšené pouze mírně. Použití chemických

podnětů (živá kořist, želatina nebo chitin) enzymové aktivity významně zvýšilo (Pavlovič *et al.*, 2014; Matušíková *et al.*, 2005). V mucholapce podivné pouhá mechanická stimulace s následnou elektrickou aktivitou způsobila sekreci trávicí tekutiny, která ale nebyla dostačující k vyvolání úplné proteolytické kapacity. Aplikace chitinu nebo amonných solí aktivovala jasmonátovou signální dráhu a expresi trávicích enzymů pravděpodobně prostřednictvím LysM receptoru nebo depolarizací membránového potenciálu v trávicích žlázách. Koncentrace *cis*-OPDA byla zvýšená jak po mechanostimulaci, tak po chemostimulaci [P(K), N(Cl)], ale koncentrace JA a JA-Ile byly dlouhodobě zvýšeny hlavně po chemostimulaci (Libiaková *et al.* 2011). Nishimurou a kolektivem bylo v mucholapce v odpovědi na aplikaci BSA objeveno vyvolání transkripce genů S-typu RNasy (Nishimura *et al.*, 2013). Bemm a kolektiv studovali stimulačně indukovanou žlázovou expresi hlavní VF-1 chitinázy. Exprese VF-1 chitinázy byla nejprve sledována v pastech, které byly stimulovány mechanicky. Po začátku stimulace během jedné hodiny byla pozorována transkripční aktivace hydrolázových genů. Po několika hodinách druhá mechanická stimulace vyvolala 400krát vyšší expresi VF-1 chitinázy. Pokud byl druhou stimulací chitin, exprese VF-1 chitinázy byla zvýšena až na 2000násobek (Bemm *et al.*, 2016). Jakmile je tedy ucítěna chemická složka z kořisti, produkce enzymů se zvyšuje (Libiaková *et al.*, 2014; Bemm *et al.*, 2016; Böhm *et al.*, 2016; Krausko *et al.*, 2017). Tyto studie zároveň ukázaly, že vylučování enzymů u masožravých rostlin je v odpovědi na podněty z kořisti přesně regulováno na úrovni transkripce a že pomocí chemické signalizace masožravá rostlina rozpozná, že se v její pasti vyskytuje živočišná kořist, což je podloženo i naší studií. Exprese genů trávicích proteinů v době trávení po samotné mechanické stimulaci není tak silná, jako ve spojení s chemickou stimulací, kdy je past udržena uzavřená a zúžená po delší čas. Větší vliv na udržení uzavření pasti a s ní spojenou tvorbu trávicích enzymů měl BSA než chitin (**Obr. 17**). Na základě našich výsledků je také zřejmé, že mucholapka rozpozná přítomnost a charakteristiku chemických látek a tomu také přizpůsobuje sekreci trávicích enzymů. Je-li přítomen pouze chitin, exprese trávicích proteinů není tak silná jako v případě nanesení BSA (**Obr. 19, 20**). Mucholapka tedy pomocí chemických sensorů umí dokonale rozlišit, jestli je v pasti přítomná kořist vhodná pro produkci enzymů nebo ne.

Dlouhodobou otázkou v elektrofyziologii je specifická elektrická signalizace, pro kterou podle některých autorů existují důkazy (Fromm *et al.*, 2013). Například skupina Fromma zaznamenala, že různé na stimulu závislé elektrické signály způsobují specifické reakce v metabolismu vaječníku ibišku (*Hibiscus*, Fromm *et al.*, 1995). Nicméně u rajčat poranění, teplo nebo elektrický proud vedou ke stejné odpovědi – k aktivaci exprese genu *Pin2* (Peña-Cortés *et al.*, 1995; Herde *et al.*, 1999). Podle skupiny vědců kolem Pyatygina

existují dobré důkazy pro to, že AP ve vyšších rostlinách jsou nespecifickými bioelektrickými signály, které jsou nezávislé na původu stimulu, takže nenesou žádnou stimulačně specifickou informaci, ale nesou signál z poškozeného pletiva do nepoškozené části rostliny (Pyating *et al.*, 2008). Z kvalitativního pohledu jsou naše výsledky v souladu s tímto stanoviskem, a dokonce i elektrická signalizace v rosnatce, která v reakci na poranění a dotyk generuje různé elektrické signály vyvolává stejnou ohybovou odpověď pasti a sekreci enzymů (Krausko *et al.*, 2017). Z kvantitativního hlediska je však počet AP v masožravých rostlinách důležitý pro regulaci intenzity masožravé odpovědi. U mucholapky podivné nebo rosnatky kapské jeden nebo dva dotyky spouštěcího výčnělku nebo poranění nejsou dostatečné k vyvolání sekrece trávicí tekutiny a enzymů (osobní pozorování) a počet AP reguluje ohýbání pasti u rosnatky (Williams & Pickard, 1972) a transkripce genů podílejících se na trávení kořisti a příjmu živin v mucholapce (Böhm *et al.*, 2016).

Skutečnost, že masožravé rostliny nemohou rozlišit poranění a mechanickou stimulaci jejich kořisti, je výsledkem jejich evoluční historie a exaptace, tj. evolučního posunu ve funkci rysu, což naznačuje, že tyto rostliny pravděpodobně využívají stejného vnímání a signalizační cesty a neumí rozlišit mezi přítomností kořisti nebo býložravce. V nedávné době Mithöferem a kolektivem bylo ukázáno, že kombinace poranění a orálního sekretu z larvy *Spodoptera littoralis* aplikované na rosnatku měly ještě silnější účinek na jasmonátovou signalizaci než samotné poranění (Mithöfer *et al.*, 2014). Chemické podněty ze zachycené kořisti jsou také mnohem lepšími induktory enzymových aktivit než samotná mechanická stimulace (Matusíková *et al.*, 2005; Libiaková *et al.*, 2014; Bemm *et al.*, 2016; Jopčíket *et al.*, 2017; Krausko *et al.*, 2017). V současné době se obecně věří, že botanická masožravost byly vyvinuta z obranných mechanismů rostlin, což podporuje i skutečnost, že mnoho proteinů, které jsou vylučovány v odpovědi na zachycení kořisti souvisí s patogenezí (Hatano & Hamada, 2008; Renner & Specht, 2012; Schulze *et al.*, 2012; Bemm *et al.*, 2016; Fukushima *et al.*, 2017; Krausko *et al.*, 2017). Vyšší rostliny v odpovědi na útok patogena nebo okus hmyzu exprimují od patogeneze odvozené (PR) proteiny a mnoho z těchto proteinů má hydrolytickou aktivitu, která bývá využívána masožravými rostlinami (Schulze *et al.*, 2012). Je lákavé předpokládat, že časné vyvíjející se nedokonalé pasti byly často poškozovány škrábáním a žvýkáním kořistí, jak je tomu někdy i dnes (např. vosy mohou často okusovat past při jejich snaze uniknout), což mohlo určovat směr evoluce masožravosti rostlin. Nedávná studie ukázala, že existují jistá omezení v evolučním směřování botanické masožravosti (Fukushima *et al.*, 2017), zůstává tak otázka, jak se jasmonátová signalizační cesta rozšířila mezi různými liniemi masožravých rostlin.

7. ZÁVĚR

V mé bakalářské práci, na kterou tato diplomová práce plynule navazuje jsem se zabývala elektrickou signalizací a uváděla jsem, že elektrické signály sehrávají v rostlinách skutečně významnou roli a jsou pro rostliny nezbytné. Uplatňují se například při obranných reakcích rostlin a stimulují sekreci trávicí tekutiny v mucholapce podivné a rosnatce kapské. V obou případech jsou do procesů zapojeny rostlinné hormony jasmonáty, jejichž akumulaci spouští právě elektrické signály. Na konci bakalářské práce byla v souvislosti s masožravými rostlinami formulována hypotéza: Dokážou akumulované jasmonáty v odpovědi na poranění indukovat syntézu trávicích enzymů, tedy typickou masožravou odpověď? Anebo dokáží tento falešný signál rostliny vyhodnotit správně a syntézu trávicích enzymů spustit jen v odpovědi na akumulované jasmonáty po podání živočišné kořisti?

Testovali jsme rostliny mucholapky podivné, abychom zjistili, zda mohou rozlišit poranění, typický aktivátor obranných mechanismů rostlin, a mechanickou stimulaci, typický aktivátor masožravosti. Na základě dosažených výsledků můžeme říci, že elektrická signalizace v masožravých rostlinách není specifická. Lidské mozky dokáží dekódovat elektrické signály přicházející z receptorů a můžeme tak zjistit, zda naše pokožka byla pohlazena nebo zraněna. Ale totéž se netýká mucholapky. Zranění spouští stejný akční potenciál jako návštěva potencionálního jídla. Jak poranění, tak chycení kořisti způsobují akumulaci kyseliny jasmonové a spouští sekreci stejných enzymů. Jsme přesvědčeni, že toto chování je výsledkem evoluční historie, kdy se nová vlastnost systému nevyvíjí *de novo*, ale již z existující signální dráhy (tzv. Teorie exaptce).

Hypotéza byla dále rozšířena o otázku: Co se ale odehrává v pasti, jakmile mechanická stimulace kořisti ustane, tedy při pozdní reakci mucholapky? Jak mucholapka pozná, že se jedná opravdu o živočišnou kořist, když ani nerozezná, zdali je poškozována nebo mechanicky stimulována opravdovou kořistí? Na základě zde prezentovaných výsledků je zřejmé, že mucholapka rozpozná přítomnost a charakteristiku chemických látek a tomu také přizpůsobuje sekreci trávicích enzymů. Je-li přítomen pouze chitin, exprese trávicích proteinů není tak silná jako v případě nanesení proteinu. Mucholapka tedy pomocí chemických senzorů, kterými disponuje, umí dokonale rozlišit, jestli je v pasti přítomná kořist nebo ne. Ve výsledku elektrické signály, jasmonáty a schopnost rozeznat chemické látky spolu utváří dokonalý proces.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adamec L.** 2002. Leaf absorption of mineral nutrients in carnivorous plants stimulates root nutrient uptake. *New Phytologist* **155**, 89–100.
- Affolter JM, Olivo RF.** 1975 Action potentials in Venus's-flytraps: long term observations following the capture of prey. *The American Midland Naturalist* **93**, 443–445.
- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Walter P.** 1998. *Základy buněčné biologie*. EspPero Publishing, Ústí nad Labem. ISBN: 80-902906-2-0.
- Aldridge DC, Galt S, Giles D, Turner WB.** 1971. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *Journal of the Chemical Society C: Organic* **0**, 1623-1627.
- Bailey T, McPherson S.** 2012. *Dionaea. The Venus's Flytrap*. Redfern Natural History Productions, Poole, Dorset, U.K.
- Bemm F, Becker D, Larisch C, et al.** 2016. Venus flytrap carnivorous lifestyle builds on herbivore defense strategies. *Genome Research* **26**, 812–825.
- Biteau F, Nisse E, Miguel S, et al.** 2013. A simple SDS–PAGE protein pattern from pitcher secretions as a new tool to distinguish *Nepenthes* species (Nepenthaceae). *American Journal of Botany* **100**, 2478–2484.
- 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.
- Brown WH.** 1916. The mechanism of movement and the duration of the effect of stimulation in the leaves of *Dionaea*. *American Journal of Botany* **3**, 68–90.
- Buch F, Kaman WE, Bikker FJ, Yilamujiang A, Mithöfer A.** 2015. Nepenthesin protease activity indicates digestive fluid dynamics in carnivorous *Nepenthes* plants. *PLoS One* **10**, e0118853.
- Buch F, Pauchet Y, Rott M, Mithofer A.** 2014. Characterization and heterologous expression of a PR–1 protein from traps of the carnivorous plant *Nepenthes mirabilis*. *Phytochemistry* **100**, 43–50.
- Buchen B, Hensel D, Sievers A.** 1983. Polarity in mechanoreceptor cells of trigger hairs of *Dionaea muscipula* Ellis. *Planta* **158**, 458–68.
- Burdon-Sanderson JS.** 1873. Note on the electrical phenomena which accompany stimulation of the leaf of *Dionaea muscipula*. *Proceedings of the Royal Society of London* **21**, 495–496.
- Butts CT, Bierma JC, Martin RW.** 2016. Novel proteases from the genome of the carnivorous plant *Drosera capensis*: Structural prediction and comparative analysis. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **84**, 1517–1533.
- Chaturvedi R, Krothapalli K, Makandar R, Nandi A, Sparks AA, Roth MR, Welti R, Shah J.** 2008. Plastid omega3-fatty acid desaturase-dependent accumulation of a systemic acquired resistance inducing activity in petiole exudates of *Arabidopsis thaliana* is independent of jasmonic acid. *Plant Journal* **54**, 106–117.
- Chen MS.** 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. *Insect science* **15**(2), 101-114.
- Chia TF, Aung HH, Osipov AN, Goh NK, Chia LS.** 2004. Carnivorous pitcher plant uses free radicals in the digestion of prey. *Redox Report* **9**, 255–261.
- Chini A, Boter M, Solano R.** 2009a. Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module. *FEBS Journal* **276**, 4682-4692.

- Chini A, Fonseca S, Chico JM, Fernández-Calvo P, Solano R.** 2009b. The ZIM domain mediates homo- and heterodimeric interactions between *Arabidopsis* JAZ proteins. *Plant Journal* **59**, 77-87.
- Chung HS, Howe GA.** 2009. A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signalling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 131-145.
- Crabalona L.** 1982. Presence of levorotatory methyl jasmonate, methyl cis-2-(2-penten-1-yl)-3-oxocyclopentenyl acetate, in the essential oil of Tunisian rosemary. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **264**, 2074-2076.
- Creelman RA, Mullet JE.** 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 4114-4119.
- Dangl JL, McDowell JM.** 2006. Two modes of pathogen recognition by plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 8575-8576.
- Davies E, Vian A, Vian C, Stankovic B.** 1997. Rapid systemic up-regulation of genes after heat-wounding and electrical stimulation. *Acta Physiologia Plantarum* **19**, 571-576.
- De Geyter N, Gholami A, Goormachtig S, Goossens A.** 2012. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science* **17**, 349-359.
- Demole E, Lederer E, Mercier D.** 1962. Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helvetica Chimica Acta* **45**, 675-685.
- Dziubinska H, Trebacz K, Zawadzki T.** 2001. Transmission route for action potentials and variation potentials in *Helianthus annuus* L. *Plant Physiology* **158**, 1167-72.
- Eilenberg H, Pnini-Cohen S, Rahamim Y, et al.** 2010. Induced production of antifungal naphthoquinones in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *Journal of Experimental Botany* **61**, 911-922.
- Eilenberg H, Pnini-Cohen S, Schuster S, Movtchan A, Zilberstein A.** 2006. Isolation and characterization of chitinase genes from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *Journal of Experimental Botany* **57**, 2775-2784.
- Escalante-Pérez M, Krol E, Stange A, Geiger D, Al-Rasheid KA, Hause B, Neher E, Hedrich R.** 2011. A special pair of phytohormones controls excitability, slow closure, and external stomach formation in the Venus flytrap. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **108**, 15492-15497.
- Farmer EE, Gasperini D, Acosta IF.** 2014 The squeeze cell hypothesis for the activation of jasmonate synthesis in response to wounding. *New Phytologist* **204**(2), 282-288.
- Farmer EE, Ryan CA.** 1990. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **87**, 7713-7716.
- Fasbender L, Maurer D, Kreuzwieser J. et al.** 2017. The carnivorous Venus flytrap uses prey-derived amino acid carbon to fuel respiration. *New Phytologist* **214**(2), 597-606.
- Fernández-Calvo P, Chini A, Fernández-Berberio G, et al.** 2011. The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* **23**, 701-715.
- Ferry N, Edwards MG, Gatehouse JA, Gatehouse AMR.** 2004. Plant-insect interactions: Molecular approaches to insect resistance. *Current Opinion in Biotechnology* **15**, 155-161.

- Feussner I, Wasternack C.** 2002. The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 275-297.
- Feys B, Benedetti CE, Penfold CN, Turner JG.** 1994. Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* **6**, 751-759.
- Floková K, Tarkowská D, Miersch O, Strnad M, Wasternack C, Novák O.** 2014. UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry* **105**, 147-157.
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R.** 2009. (+)-7-iso-Jasmonyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* **5**, 344-350.
- Fromm J, Hajirezaei M, Wilke I.** 1995. The biochemical response of electrical signalling in reproductive system of *Hibiscus* plants. *Plant Physiology* **109**, 375-384.
- Fromm J, Hajirezaei MR, Becker VK, Lautner S.** 2013. Electrical signaling along the phloem and its physiological responses in the maize leaf. *Frontiers in Plant Science* **4**, article 239.
- Fromm J, Lautner S.** 2007. Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant, Cell and Environment* **30**, 249-257.
- Fromm J, Spanswick R.** 1993. Characteristics of action potentials in willow (*Salix viminalis* L.) *Journal of Experimental Botany* **44**, 1119-1125.
- Fukushima K, Fang X, Alvarez-Ponce D, et al.** 2017. Genome of the pitcher plant *Cephalotus* reveals genetic changes associated with carnivore. *Nature Ecology & Evolution* **1**, article number 0059.
- Galek H, Osswald WF, Elstner EF.** 1990. Oxidative protein modification as predigestive mechanism of the carnivorous plant *Dionaea muscipula*: a hypothesis based on in vitro experiments. *Free Radical Biology and Medicine* **9**, 427-434.
- Gallie DR, Chang SC.** 1997. Signal transduction in the carnivorous plant *Sarracenia purpurea*. *Plant Physiology* **115**, 1461-1471.
- Gaupels F, Durner J, Kogel K-H.** (2017). Production, amplification and systemic propagation of redox messengers in plants? The phloem can do it all! *New Phytologist* **214**(2), 554-560.
- Gidda S, Miersch O, Levitin A, Schmidt J, Wasternack C, Varin L.** 2003. Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 17895-17900.
- Glauser G, Grata E, Dubugnon L, et al.** (2008) Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 16400-16407.
- Grover A.** 2012. Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences* **31**, 57-73.
- Hatano N, Hamada T.** 2008. Proteome analysis of pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Journal of Proteome Research* **7**, 809-816.
- Hatano N, Hamada T.** 2012. Proteomic analysis of secreted protein induced by a component of prey in pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Journal of Proteomics Research* **75**, 4844-4852.
- Hause B, Hause G, Kutter C, Miersch O, Wasternack C.** 2003. Enzymes of jasmonate biosynthesis occur in tomato sieve elements. *Plant Cell Physiology* **44**, 643-648.

- Hause B, Stenzel I, Miersch O, Maucher H, Kramell R, Ziegler J, Wasternack C.** 2000. Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. *Plant Journal* **24**, 113–126.
- Hedrich R, Neher E.** 2018. Venus Flytrap: How an Excitable, Carnivorous Plant Works. *Trends in plant science*.
- Herde O, Atzorn R, Fisahn J, Wasternack C, Willmitzer L, Pena-Cortes H.** 1996. Localized wounding by heat initiates the accumulation of proteinase inhibitor II in abscisic acid-deficient plants by triggering jasmonic acid biosynthesis. *Plant Physiology* **112**, 853–860.
- Herde O, Peña-Cortés H, Wasternack C, Willmitzer L, Fisahn J.** 1999. Electrical signaling and Pin2 gene expression on different abiotic stimuli depend on a distinct threshold level of endogenous abscisic acid in several abscisic acid-deficient tomato mutants. *Plant Physiology* **119**, 213–218.
- Hille B.** 1992. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, MA, USA.
- Hlaváčková V.** 2009. Physical and chemical signals and their action in systemic response of plants to local wounding. In: R. T. Devane (ed.), *New Plant Physiology Research*, 43-95, Nova Science Publishers.
- Hodick D, Sievers A.** 1988. The action potential of *Dionaea muscipula* Ellis. *Planta* **174**, 8–18.
- Huber AE, Bauerle TL.** 2016. Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: the gap in knowledge. *Journal of Experimental Botany* **67**, 2063-2079
- Ilík P, Hlaváčková V, Krchňák P, Nauš J.** 2010. A low-noise multi-channel device for the monitoring of systemic electrical signal propagation in plants. *Biologia Plantarum* **54**, 185–190.
- Jopčík M, Moravčíková J, Matušíková I, Bauer M, Rajnivec M, Libantová J.** 2017. Structural and functional characterization of a class I endochitinase of the carnivorous sundew (*Drosera rotundifolia* L.). *Planta* **245**, 313–327.
- Juniper BE, Robins RJ, Joel DM.** 1989. *The Carnivorous Plants*, Academic Press Ltd, London.
- Katsir L, Schillmiller AL, Staswick PE, He SY, Howe GA.** 2008. COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**(19), 7100-7105.
- Kazan K, Manners JM.** 2013. MYC2: the master in action. *Molecular Plant* **6**, 686-703.
- Kessler A, Baldwin IT.** 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* **291**, 2141-2144.
- Knöfel HD, Sembdner G.** 1995. Jasmonates from Pinus pollen. *Phytochemistry* **38**, 569-571.
- Koo AJK, Cooke TF, Howe GA.** 2011. Cytochrome P450 CYP94B3 mediates catabolism and inactivation of the plant hormone jasmonoyl-L-isoleucine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **108**, 9298-9303.
- Koo AJK, Gao X, Jones AD, Howe GA.** 2009. A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **59**, 974–986.
- Koo AJK, Howe G A.** 2009. The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* **70**, 1571-1580.
- Koo AJK, Howe GA.** 2012. Catabolism and deactivation of the lipid-derived hormone jasmonoyl-isoleucine. *Frontiers in Plant Science* **3**, 19.
- Krausko M, Perutka Z, Šebela M, Šamajová O, Šamaj O, Novák O, Pavlovič A.** 2017. The role of electrical and jasmonate signalling in the recognition of captured prey in the carnivorous sundew plant *Drosera capensis*. *New Phytologist* **213**, 1818–1835.

- Krol E, Dziubinska H, Stolarz M, Trebacz K.** 2006. Effects of ion channel inhibitors on cold- and electrically-induced action potentials in *Dionaea muscipula*. *Biologia Plantarum* **50**, 411–16.
- Kruse J, Gao P, Honsel A, et al.** 2014. Strategy of nitrogen acquisition and utilization by carnivorous *Dionaea muscipula*. *Oecologia* **174**, 839–851.
- Kubigsteltig I, Laudert D, Weiler EW.** 1999. Structure and regulation of the *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase gene. *Planta* **208**, 463–471.
- Lee GI, Howe GA.** 2003. The tomato mutant *spr1* is defective in systemin perception and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant Journal* **33**, 567–576.
- Li C, Schillmiller AL, Liu G, Lee GI, Jayanty S, Sageman C, Vrebalov J, Giovannoni JJ, Yagi K, Kobayashi Y, Howe GA.** 2005. Role of ω -oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signalling in tomato. *Plant Cell* **17**, 971–986.
- Li L, Li C, Lee GI, Howe GA.** 2002. Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 6416–6421.
- Libiaková M, Floková K, Novák O, Slovákova E, Pavlovič A.** 2014. Abundance of cysteine endopeptidase Dionain in digestive fluid of Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis) is regulated by different stimuli from prey through jasmonates. *PLoS One* **9**, e104424.
- Lichtner FT, Williams SE.** 1977. Prey capture and factors controlling trap narrowing in *Dionaea* (Droseraceae). *American Journal of Botany* **64**, 881–886.
- Lorenzo O, Chico JM, Sanchez-Serrano JJ, Solano R.** 2004. JASMONATEINSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 1938-1950.
- Maffei ME, Mithofer A, Boland W.** 2007. Before gene expression: early events in plant–insect interaction. *Trends in Plant Science* **12**, 310–316.
- Malone M.** 1993. Hydraulic signals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **341**, 33–39.
- Matthes M, Bruce T, Chamberlain K, Pickett J, Napier J.** 2011. Emerging roles in plant defense for cis-jasmone-induced cytochrome P450 CYP81D11. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 563-565.
- Matušiková I, Salaj J, Moravčíková J, Mlynárová L, Nap JP, Libantová J.** 2005. Tentacles of in vitro-grown round-leaf sundew (*Drosera rotundifolia* L.) show induction of chitinase activity upon mimicking the presence of prey. *Planta* **222**, 1020–1027.
- Melotto M, Mecey C, Niu Y, Chung HS, Katsir L, Yao J, Zeng W, Thines B, Staswick P, Browse J, Howe GA, He SY.** 2008. A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of *Arabidopsis* JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *Plant Journal* **55**, 979-988.
- Meyer A, Miersch O, Büttner C, Dathe W, Sembner G.** 1984. Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *Journal of Growth Regulation* **3**, 1-8.
- Miersch O, Kramell R, Parthier B, Wasternack C.** 1999. Structure-activity relations of substituted, deleted or stereospecifically altered jasmonic acid in gene expression of barley leaves. *Phytochemistry* **50**, 353-361.
- Miersch O, Neumerkel J, Dippe M, Stenzel I, Wasternack C.** 2008. Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signalling. *New Phytologist* **177**, 114-127.
- Mithöfer A, Maitrejean M, Boland W.** 2004. Structural and biological diversity of cyclic octadecanoids, jasmonates and mimetics. *Journal of Plant Growth Regulation* **23**, 170-178.

- Mithöfer A, Reichelt M, Nakamura Y.** 2014. Wound and insect-induced jasmonate accumulation in carnivorous *Drosera capensis*: two sides of the same coin. *Plant Biology* **5**, 982–987.
- Mithöfer A.** 2011. Carnivorous pitcher plants: insight in an old topic. *Phytochemistry* **72**, 1678–1682.
- Mousavi SAR, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S, Farmer EE.** 2013. Glutamate receptor-like genes mediate leaf-to-leaf wound signals. *Nature* **500**, 422–426.
- Nakamura Y, 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.
- Neuhaus JM, Sticher L, Meins F, Boller T.** 1991. A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 10362–10366.
- Nishimura E, Kawahara M, Kodaira R, et al.** 2013. S-like ribonuclease gene expression in carnivorous plants. *Planta* **238**, 955–967.
- Paszota P, Escalante-Perez M, Thomsen LR, et al.** 2014. Secreted major Venus flytrap chitinase enables digestion of Arthropod prey. *Biochimica et Biophysica Acta* **1844**, 374–383.
- Pauwels L, Barbero GF, Geerinck J, et al.** 2010. NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464**, 788–791.
- Pauwels L, Goossens A.** 2011. The JAZ proteins: A crucial interface in jasmonate signaling cascade. *Plant Cell* **23**, 3089–3100.
- Pauwels L, Inzé D, Goossens A.** 2009. Jasmonate-inducible gene: what does it mean? *Trends in Plant Science* **14**, 87–91.
- Pavlovič A, Demko V, Hudák J.** 2010. Trap closure and prey retention in Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis.) temporarily reduces photosynthesis and stimulates respiration. *Annals of Botany* **105**, 37–44.
- Pavlovič A, Jakšová J, Novák O.** 2017. Triggering a false alarm: wounding mimics prey capture in the carnivorous Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). *New Phytologist* **216**(3), 927–938.
- Pavlovič A, Krausko M, Libiaková M, Adamec L.** 2014. Feeding on prey increases photosynthetic efficiency in the carnivorous sundew *Drosera capensis*. *Annals of Botany* **113**, 69–78.
- Pavlovič A, Saganová M.** 2015. A novel insight into the cost–benefit model for the evolution of botanical carnivory. *Annals of Botany* **115**, 1075–1092.
- Peña-Cortés H, Fisahn J, Willmitzer L.** 1995. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **92**, 4106–4113.
- Plachno BJ, Adamec L, Huet H.** 2009. Mineral nutrient uptake from prey and glandular phosphatase activity as a dual test of carnivory in semi-desert plants with glandular leaves suspected of carnivory. *Annals of Botany* **104**, 649–654.
- Plachno BJ, Adamec L, Lichtscheidl IK, et al.** 2006. Fluorescence labelling of phosphatase activity in digestive glands of carnivorous plants. *Plant Biology* **8**, 813–20.
- Poppinga S, Weisskopf C, Westermeier AS, Masselter T, Speck T.** 2016. Fastest predators in the plant kingdom: Functional morphology and biomechanics of suction traps found in the largest genus of carnivorous plants. *Annals of Botany PLANTS* **8**, plv140.
- Pyatygin SS, Opritov VA, Vodeneev VA.** 2008. Signaling role of action potential in higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* **55**, 285–291.

- Renner T, Specht CD.** 2012. Molecular and functional evolution of class I chitinases for plant carnivory in the Caryophyllales. *Molecular Biology and Evolution* **29**, 2971-2985.
- Renner T, Specht CD.** 2013. Inside the trap: gland morphologies, digestive enzymes, and the evolution of plant carnivory in the Caryophyllales. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 436–442.
- Reymond P, Bodenhausen N, Van Poecke RM, Krishnamurthy V, Dicke M, Farmer EE.** 2004. A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *Plant Cell* **16**, 3132-3147.
- Risor MW, Thomsen LR, Sanggaard KW, et al.** 2016. Enzymatic and structural characterization of the major endopeptidase in the Venus flytrap digestion fluid. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 2271–2287.
- Robins RJ, Juniper BE.** 1980a. The secretory cycle of *Dionaea muscipula* Ellis. IV. The enzymology of the secretion. *New Phytologist* **86**, 401–412.
- Robins RJ, Juniper BE.** 1980b. The secretory cycle of *Dionaea muscipula* Ellis. II. Storage and synthesis of the secretory proteins. *New Phytol* **86**, 297–311.
- 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.
- Santner A, Estelle M.** 2010. The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *Plant Journal* **61**, 1029-1040.
- Savatin DV, Gramegna G, Modesti V, Cervone F.** 2014. Wounding in the plant tissue: the defence of a dangerous passage. *Frontiers in Plant Science* **5**, 470.
- Schaller F.** 2001. Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *Journal of Experimental Botany* **52**, 11-23.
- Scherzer S, Shabala L, Hedrich B, et al.** 2017. Insect haptoelectrical stimulation of Venus flytrap triggers exocytosis in gland cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, 4822–4827.
- Schillmiller AL, Howe GA.** 2005. Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 369–377.
- Schulze WX, Sanggaard KW, Kreuzer I, et al.** 2012. The protein composition of the digestive fluid from the Venus flytrap sheds light on prey digestion mechanisms. *Molecular and Cellular Proteomics* **11**, 1306–1319.
- Sheard LB, Tan X, Mao H, et al.** 2010. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* **468**: 400-405.
- Shyu C, Figueroa P, Depew CL, Coole TF, Sheard LB, Moreno JE, Katsir L, Zheng N, Browse J, Howe GA.** 2012. JAZ8 lacks a canonical degron and has an EAR motif that mediates transcriptional repression of jasmonate responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 536-550.
- Sibaoka T.** 1991. Rapid plant movements triggered by action potentials. *Botanical Magazine*, **104**, 73–95.
- Sirova D, Adamec L, Vrba J.** 2003. Enzymatic activities in traps of four aquatic species of the carnivorous genus *Utricularia*. *New Phytologist* **159**, 669–675.
- Song S, Qi T, Huang H, Ren Q, Wu D, Chang C, Peng W, Liu Y, Peng J, Xie D.** 2011. The jasmonate-ZIM domain proteins interact with R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**, 1000-1013.

- Stahlberg R, Cleland RE, Van Volkenburgh E.** 2006. Slow wave potentials – a propagating electrical signal unique to higher plants. In *Communication in Plants – Neuronal Aspects of Plant Life* (eds F. Baluska, S. Mancuso & D. Volkmann), pp. 291–308. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, Germany.
- Stankovic B, Davies E.** 1996. Both action potentials and variation potentials induce proteinase inhibitor gene expression in tomato. *FEBS Letters* **390**, 275–279.
- Staswick PE, Tiryaki I.** 2004. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 2117–2127.
- Stenzel I, Hause B, Maucher H, Pitzschke A, Miersch O, Ziegler J, Ryan CA, Wasternack C.** 2003. Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato – amplification in wound signalling. *Plant Journal* **33**, 577–589.
- Stütz M, Gase K, Baldwin IT, Gaquerel E.** 2011. Ectopic expression of AtJMT in *Nicotiana attenuata*: Creating a metabolic sink has tissue-specific consequences for the jasmonate metabolic network and silences downstream gene expression. *Plant Physiology* **157**, 341–354.
- Studnička M.** 1984. *Masožravé rostliny* Academia, nakladatelství Československé akademie věd, Praha. ISBN: 21-112-84.
- Studnička M.** 2006. *Masožravé rostliny, objekt badatelů, dobrodruhů a snůlků*. Academia, Praha. ISBN: 80-200-1404-7.
- Taiz L, Zeiger E.** 2002. *Plant Physiology*, 6th edition, Sinauer Associates, Massachusetts.
- Takahashi K, Matsumoto K, Nishii W, Muramatsu M, Kubota K.** 2009. Comparative studies on the acid proteinase activities in the digestive fluid 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.
- Takahashi K, Suzuki T, Nishii W, et al.** 2011. A cysteine endopeptidase (“dionain”) is involved in the digestive fluid of *Dionaea muscipula* (Venus’s fly-trap). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **75**, 346–348.
- Tamogami S, Kodama O.** 1997. Quantification of amino acid conjugates of jasmonic acid in rice leaves by high-performance liquid chromatography turboionspray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **822**, 310–315.
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J.** 2007. JAZ repressor proteins are targets of the SCF (COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**, 661–665.
- Thorpe MR, Ferrieri AP, Herth MM, Ferrieri RA.** 2007. C-11-imaging: methyl jasmonate moves in both phloem and xylem, promotes transport of jasmonate, and of photoassimilate even after proton transport is decoupled. *Planta* **226**, 541–551.
- Trebacz K, Dziubinska H, Krol E.** 2006. Electrical signals in long-distance communication in plants. In *Communication in Plants – Neuronal Aspects of Plant Life* (eds F. Baluska, S. Mancuso & D. Volkmann), pp. 277–290. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, Germany.
- Truman W, Bennett MH, Kubigsteltig I, Turnbull C, Grant M.** 2007. *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 1075–1080.

- Ueda M, Tokunaga T, Okada M, Nakamura Y, Takada N, Suzuki R, Kondo K.** 2010. Trap-closing chemical factors of the Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis). *ChemBioChem* **11**, 2378–2383.
- Vick B, Zimmerman DC.** 1984. Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiology* **75**, 458–461.
- Volkov AG, Adesina T, Jovanov E.** 2007. Closing of Venus flytrap by electrical stimulation of motor cell. *Plant Signaling and Behavior* **2**, 139–145.
- Volkov AG, Adesina T, Jovanov E.** 2008a. Charge induced closing of *Dionaea muscipula* Ellis trap. *Bioelectrochemistry* **74**, 16–21.
- Volkov AG, Adesina T, Markin VS, Jovanov E.** 2008b. Kinetics and mechanism of *Dionaea muscipula* trap closing. *Plant Physiology* **146**, 694–702.
- Volkov AG, Carrell H, Adesina T, Markin VS, Jovanov E.** 2008c. Plant electrical memory. *Plant Signaling & Behavior* **3**, 490–92.
- Volkov AG, Coopwood KJ, Markin VS.** 2008d. Inhibition of the *Dionaea muscipula* Ellis trap closure by ion and water channels blockers and uncouplers. *Plant Science* **175**, 642–49.
- Volkov AG, Pinnock MR, Lowe DC, Ma'Resha SG, Markin VS.** 2011. Complete hunting cycle of *Dionaea muscipula*: consecutive steps and their electrical properties. *Journal of plant physiology*, *168*(2), 109–120
- Walling LL.** 2000. The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**, 195–216.
- Wasternack C, Hause B.** 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany* **111**, 1024–1058.
- Wasternack C, Kombrink E.** 2010. Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chemical Biology* **15**, 63–77.
- Wasternack C, Song S.** 2016. Jasmonates: Biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *Journal of Experimental Botany* **68**(6), 1303–1321.
- Wasternack C, Stenzel I, Hause B, Hause G, Kutter C, Maucher H, Neumerkel J, Feussner I, Miersch O.** 2006. The wound response in tomato – Role of jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology* **163**, 297–306.
- Wasternack C.** 2007. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* **100**, 681–697.
- Wasternack C.** 2009. Jasmonates in stress, growth, and development, in Hirt, H. (Ed.) *Plant stress biology – From genomics to system biology*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 91–118.
- Wasternack C.** 2014. Perception, signaling and cross-talk of jasmonates and the seminal contributions of the Daoxin Xie's lab and the Chuanyou Li's lab. *Plant Cell Reports* **33**(5), 707–718.
- Weber H.** 2002. Fatty acid-derived signals in plants. *Trends in Plant Science* **7**, 217–224.
- Weiler EW, Kutchan TM, Gorba T, Brodschelm W, Niesel U, Bublitz F.** 1994. The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants. *FEBS Letters* **345**, 9–13.
- Wildon DC, Thain JF, Minchin PEH, Gubb IR, Reilly AJ, Skipper YD, Doherty HM, Donnell PJO, Bowles DJ.** 1992. Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plants. *Nature* **360**, 62–65.

- Williams SE, Bennett AB.** 1982. Leaf closure in the Venus Flytrap: an acid growth response. *Science* **218**, 1120–22.
- Williams SE, Pickard BG.** 1972. Properties of action potentials in *Drosera* tentacles. *Planta* **103**, 222–240.
- Withers J, Yao J, Mecey C, Howe GA, Melotto M, He SY.** 2012. Transcription factor-dependent nuclear localization of a transcriptional repressor in jasmonate hormone signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 20148-20153.
- Woodward AW, Bartel B.** 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* **95**, 707-735.
- Xie DX, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M, Turner JG.** 1998. COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**, 1091- 1094.
- Xie S, Wang F, Chen Z.** 2012. Determination of endogenous jasmonic acid in plant samples by liquid chromatography-electrochemical detection based on derivatization with dopamine. *Analyst* **138**, 1226–1231.
- Yan J, Zhang C, Gu M, et al.** 2009. The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 Protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell* **21**, 2220-2236.
- Yan Y, Stolz S, Chetelat A, et al.** 2007. A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *The Plant Cell* **19**, 2470–2483.
- Yilamujiang A, Reichelt M, Mithöfer A.** 2016. Slow food: insect prey and chitin induce phytohormone accumulation and gene expression in carnivorous *Nepenthes* plants. *Annals of Botany* **118**, 369–375.
- Yoshida Y, Sano R, Wada T, Takabayashi J, Okada K.** 2009. Jasmonic acid control of GLABRA3 links inducible defense and trichome patterning in *Arabidopsis*. *Development* **136**, 1039–1048.
- Zhang ZP, Baldwin IT.** 1997. Transport of [2-C-14]-jasmonic acid from leaves to roots mimics wound-induced changes in endogenous jasmonic acid pools in *Nicotiana sylvestris*. *Planta* **203**, 436–441.
- Zimmermann MR, Maischak H, Mithöfer A, Boland W, Felle HH.** 2009. System potentials, a novel electrical long-distance apoplastic signal in plants, induced by wounding. *Plant Physiology* **149**, 1593–1600.
- Zimmermann MR, Mithöfer A, Will T, Felle HH, Furch AC.** 2016. Herbivore-triggered electrophysiological reactions: Candidates for systemic signals in higher plants and the challenge of their identification. *Plant Physiology* **170**, 2407–2419.

9. PŘÍLOHY

Publikace:

Pavlovič A, Jakšová J, Novák O. 2017. Triggering a false alarm: wounding mimics prey capture in the carnivorous Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). *New Phytologist* **216**(3), 927-938.



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

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

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

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

Received: 14 March 2017
Accepted: 14 July 2017

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

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

Introduction

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

Summary

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

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

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

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

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

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

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

Materials and Methods

Plant material and culture conditions

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

Measurements of electrical signals

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

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

Quantification of phytohormones

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

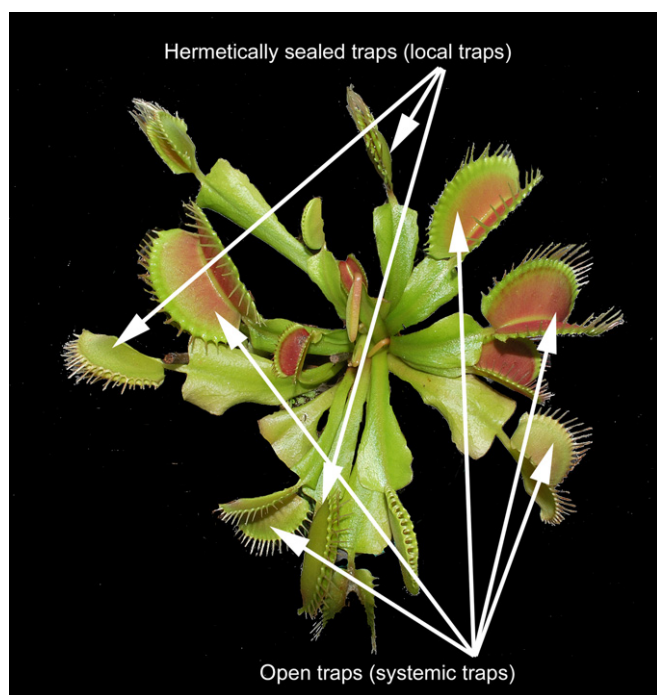


Fig. 1 Experimental setup. The local and systemic traps of the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*) are denoted.

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

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

Biotest

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

Measurements of enzyme activities

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

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

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

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

SDS-PAGE and Western blots

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

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

Statistical analyses

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

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

Results

Electrical and jasmonate signalling in response to insect capture

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

Wounding mimics the mechanical stimulation by insect prey

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

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

Enzyme activities

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

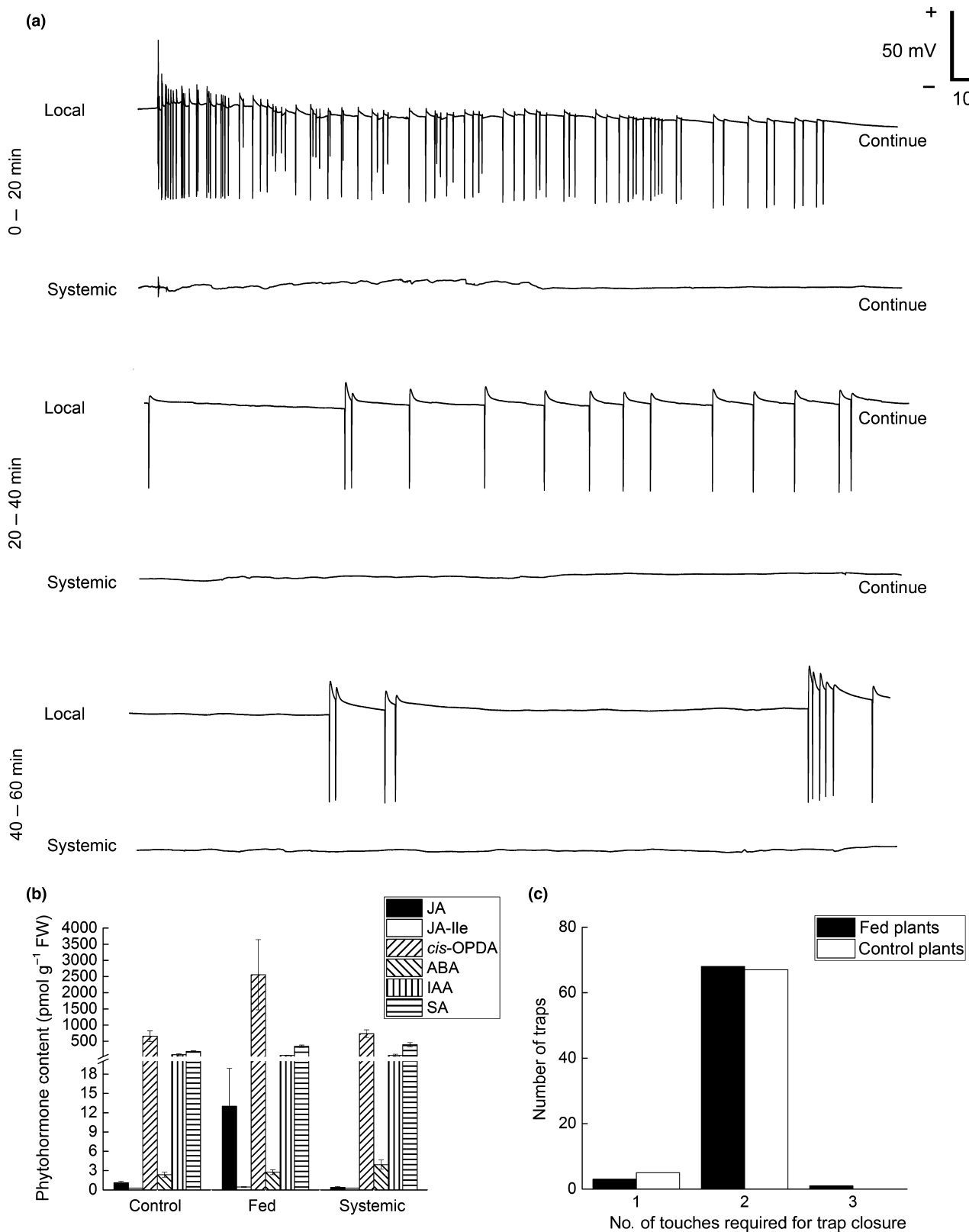


Fig. 2 Local and systemic electrical signalling in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*) in response to prey capture. (a) Extracellular recording of action potentials from the surface of a Venus flytrap lobe during prey (fly) capture (upper trace) and in systemic trap (lower trace) during the first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

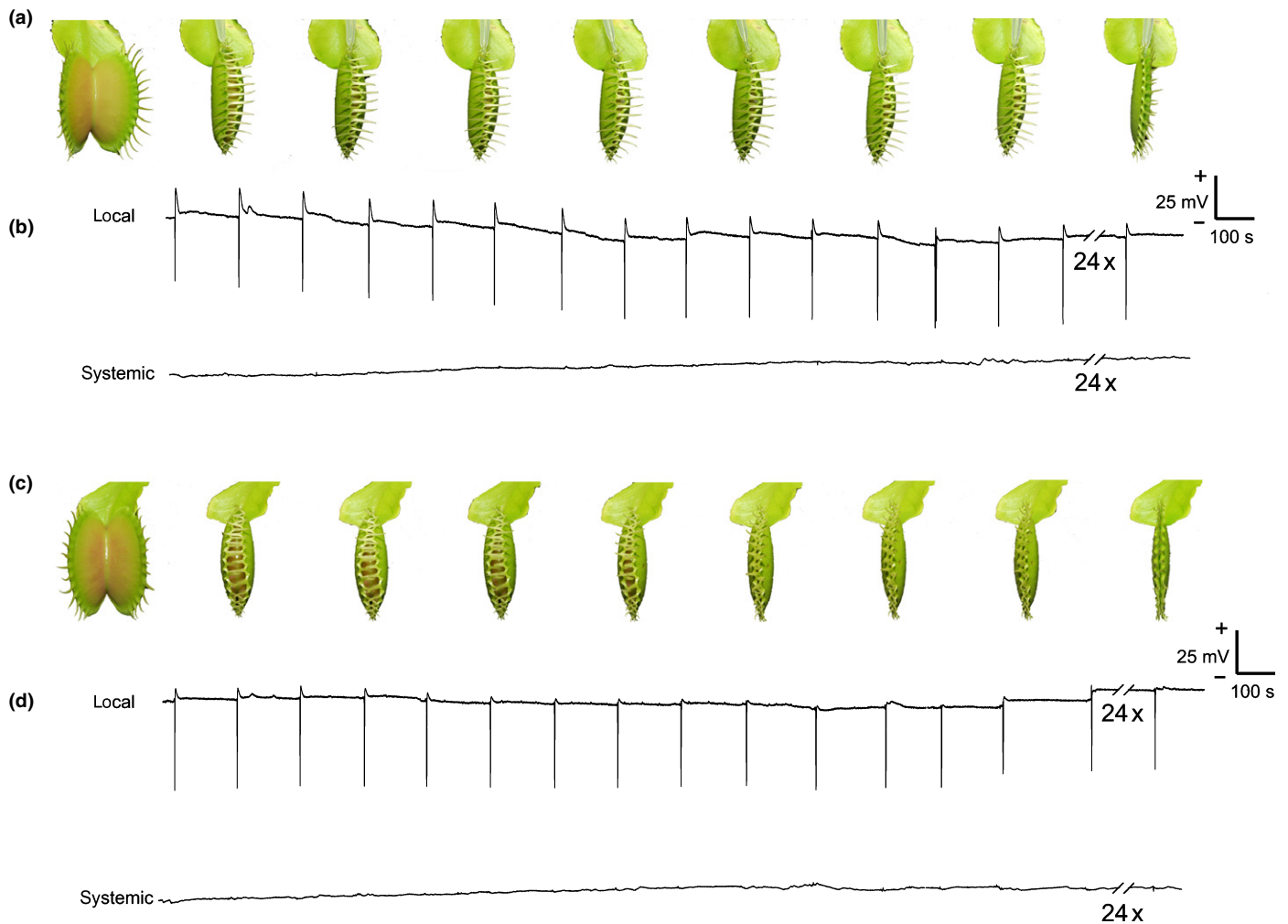


Fig. 3 Controlled mechanical stimulation and wounding of trap tissue in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). (a) Induction of trap narrowing in response to mechanical stimulation. (b) Extracellular recording of action potentials in response to mechanical stimulation in local and systemic traps. (c)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

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

Discussion

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

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

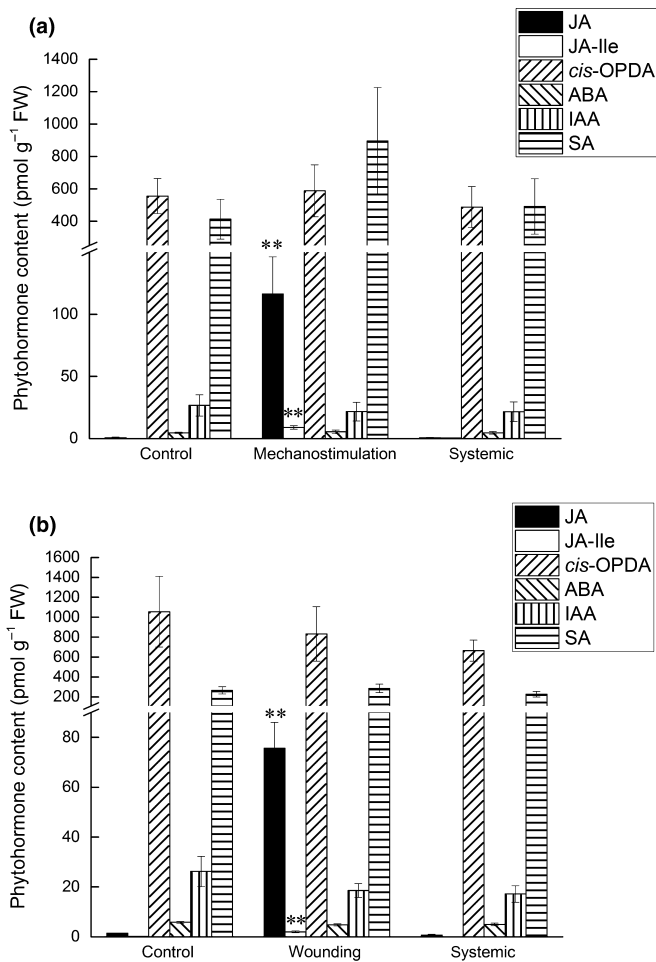


Fig. 4 Phytohormone accumulation in local and systemic traps 2 h after the initiation of stimulation in the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). (a) Mechanical stimulation and (b) wounding. Means \pm SE, $n = 4-8$. Significant differences are indicated (ANOVA, Tukey's test): **, $P < 0.01$. JA, jasmonic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

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

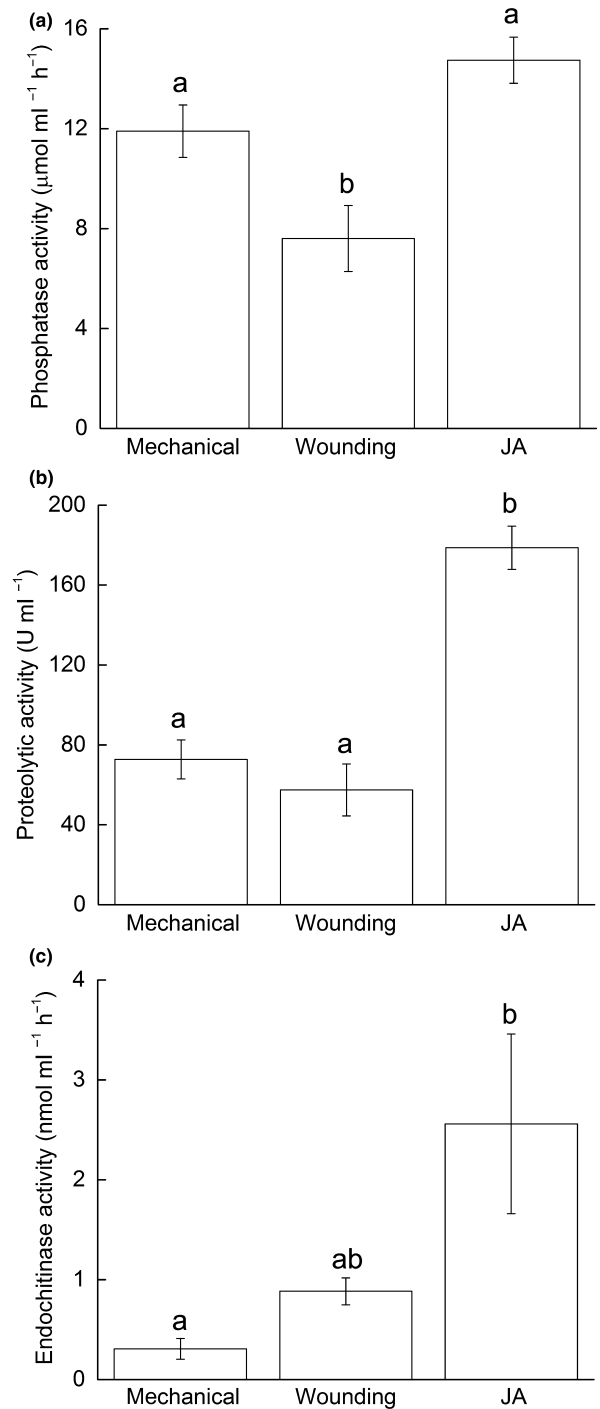


Fig. 5 Measurements of enzyme activity in digestive fluid 48 h after mechanical stimulation, wounding and exogenous application of 2 mM jasmonic acid (JA) in local traps of the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). Systemic traps did not snap shut or produce any digestive fluid, so their enzyme activity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

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

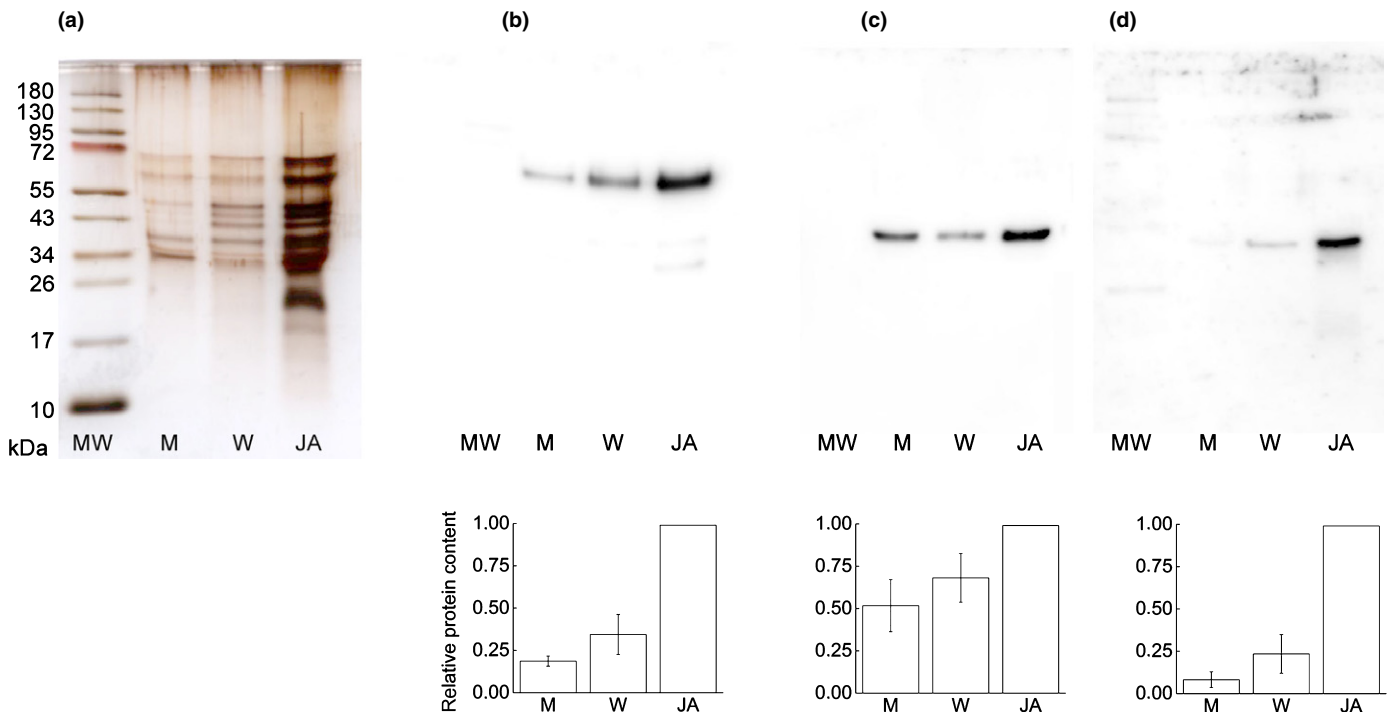


Fig. 6 Protein profile and immunodetection of aspartic protease (dionaeasin), cysteine protease (dionain) and VF-1 chitinase in the digestive fluid of the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). The digestive fluid was collected 48 h after induction, and the proteins were separated in 10% (v/v) SDS-polyacrylamide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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgements

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

Author contributions

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

References

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

- Blechert S, Bockelmann C, Fülllein M, Schrader TV, Stelmach B, Niesel U, Weiler EW. 1999. Structure-activity analyses reveal the existence of two separate groups of active octadecanoids in elicitation of the tendril-coiling response of *Bryonia dioica* Jacq. *Planta* 207: 470–479.
- Böhm J, Scherzer S, Krol E, Kreuzer I, Meyer K, Lorey C, Mueller TD, Shabala L, Monte I, Solano R *et al.* 2016a. The Venus flytrap *Dionaea muscipula* counts prey-induced action potentials to induce sodium uptake. *Current Biology* 26: 286–295.
- Böhm J, Scherzer S, Shabala S, Krol E, Neher E, Mueller TD, Hedrich R. 2016b. Venus Flytrap HKT1-type channel provides for prey sodium uptake into carnivorous plant without conflicting with electrical excitability. *Molecular Plant* 9: 428–436.
- Brown WH. 1916. The mechanism of movement and the duration of the effect of stimulation in the leaves of *Dionaea*. *American Journal of Botany* 3: 68–90.
- Buch F, Kaman WE, Bikker FJ, Yilamujiang A, Mithöfer A. 2015. Nepenthesis protease activity indicates digestive fluid dynamics in carnivorous *Nepenthes* plants. *PLoS ONE* 10: e0118853.
- Burdon-Sanderson JS. 1873. Note on the electrical phenomena which accompany stimulation of the leaf of *Dionaea muscipula*. *Proceedings of the Royal Society of London* 21: 495–496.
- Cosgrove DJ, Hedrich R. 1991. Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in the plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* 186: 143–153.
- De Geyter N, Gholami A, Goormachtig S, Goossens A. 2012. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science* 17: 349–359.
- Escalante-Pérez M, Krol E, Stange A, Geiger D, Al-Rasheid KA, Hause B, Neher E, Hedrich R. 2011. A special pair of phytohormones controls excitability, slow closure, and external stomach formation in the Venus flytrap. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 108: 15492–15497.
- Farmer EE, Gasperini D, Acosta I. 2014. The squeeze cell hypothesis for the activation of jasmonate synthesis in response to wounding. *New Phytologist* 204: 282–288.
- Fasbender L, Maurer D, Kreuzwieser J, Kreuzer I, Schulze WX, Kruse J, Becker D, Alfarraj S, Hedrich R, Werner C *et al.* 2017. The carnivorous Venus flytrap uses prey-derived amino acid carbon to fuel respiration. *New Phytologist* 214: 597–606.
- Floková K, Tarkowská D, Miersch O, Strnad M, Wasternack C, Novák O. 2014. UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry* 105: 147–157.
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R. 2009. (+)-7-iso-Jasmonyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* 5: 344–350.
- Fromm J, Hajirezaei M-R, Becker VK, Lautner S. 2013. Electrical signaling along the phloem and its physiological responses in the maize leaf. *Frontiers in Plant Science* 4: article 239.
- Fromm J, Hajirezaei M, Wilke I. 1995. The biochemical response of electrical signalling in reproductive system of *Hibiscus* plants. *Plant Physiology* 109: 375–384.
- Fromm J, Lautner S. 2007. Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant, Cell & Environment* 30: 249–257.
- Frost CJ, Mescher MC, Carlson JE, De Moraes CM. 2008. Plant defense priming against herbivores: getting ready for a different battle. *Plant Physiology* 146: 818–824.
- Fukushima K, Fang X, Alvarez-Ponce D, Cai H, Carretero-Paulet L, Chen C, Chang T-H, Farr KM, Fujita T, Hiwatashi Y *et al.* 2017. Genome of the pitcher plant *Cephalotus* reveals genetic changes associated with carnivore. *Nature Ecology & Evolution* 1: e0059.
- Gaupels F, Durner J, Kogel K-H. 2017. Production, amplification and systemic propagation of redox messengers in plants? The phloem can do it all!. *New Phytologist* 214: 554–560.
- Glauser G, Grata E, Dubugnon L, Rudaz S, Farmer EE, Wolfender J-L. 2008. Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding. *Journal of Biological Chemistry* 283: 16400–16407.
- Hatano N, Hamada T. 2008. Proteome analysis of pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Journal of Proteome Research* 7: 809–816.
- Herde O, Peña-Cortés H, Wasternack C, Willmitzer L, Fisahn J. 1999. Electrical signaling and *Pin2* gene expression on different abiotic stimuli depend on a distinct threshold level of endogenous abscisic acid in several abscisic acid-deficient tomato mutants. *Plant Physiology* 119: 213–218.
- Hodick D, Sievers A. 1988. The action potential of *Dionaea muscipula* Ellis. *Planta* 174: 8–18.
- Huber AE, Bauerle TL. 2016. Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: the gap in knowledge. *Journal of Experimental Botany* 67: 2063–2079.
- Ilík P, Hlaváčková V, Krchňák P, Naus J. 2010. A low-noise multi-channel device for the monitoring of systemic electrical signal propagation in plants. *Biologia Plantarum* 54: 185–190.
- Jopčík M, Moravčíková J, Matusíková I, Bauer M, Rajnínec M, Libantová J. 2017. Structural and functional characterization of a class I endochitinase of the carnivorous sundew (*Drosera rotundifolia* L.). *Planta* 245: 313–327.
- Koo AJK, Gao X, Jones AD, Howe GA. 2009. A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 59: 974–986.
- Koo AJK, Howe GA. 2009. The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* 70: 1571–1580.
- Krausko M, Perutka Z, Šebela M, Šamajová O, Šamaj O, Novák O, Pavlovič A. 2017. The role of electrical and jasmonate signalling in the recognition of captured prey in the carnivorous sundew plant *Drosera capensis*. *New Phytologist* 213: 1818–1835.
- Kruse J, Gao P, Honsel A, Kreuzwieser J, Burzlaff T, Alfarraj S, Hedrich R, Rennenberg H. 2014. Strategy of nitrogen acquisition and utilization by carnivorous *Dionaea muscipula*. *Oecologia* 174: 839–851.
- Libíková M, Floková K, Novák O, Slovákova L, Pavlovič A. 2014. Abundance of cysteine endopeptidase Dionain in digestive fluid of Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis) is regulated by different stimuli from prey through jasmonates. *PLoS ONE* 9: e104424.
- Lichtner FT, Williams SE. 1977. Prey capture and factors controlling trap narrowing in *Dionaea* (Droseraceae). *American Journal of Botany* 64: 881–886.
- Maffei ME, Mithöfer A, Boland W. 2007. Before gene expression: early events in plant–insect interaction. *Trends in Plant Science* 12: 310–316.
- Malone M. 1996. Rapid, long-distance signal transmission in higher plants. *Advances in Botanical Research* 22: 163–228.
- Mancuso S. 1999. Hydraulic and electrical transmission of wound-induced signals in *Vitis vinifera*. *Australian Journal of Plant Physiology* 26: 55–61.
- Matusíková I, Salaj J, Moravčíková J, Mlynárová L, Nap JP, Libantová J. 2005. Tentacles of *in vitro*-grown round-leaf sundew (*Drosera rotundifolia* L.) show induction of chitinase activity upon mimicking the presence of prey. *Planta* 222: 1020–1027.
- Mithöfer A. 2011. Carnivorous pitcher plants: insights in an old topic. *Phytochemistry* 72: 1678–1682.
- Mithöfer A, Reichelt M, Nakamura Y. 2014. Wound and insect-induced jasmonate accumulation in carnivorous *Drosera capensis*: two sides of the same coin. *Plant Biology* 5: 982–987.
- Mousavi SAR, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S, Farmer EE. 2013. Glutamate receptor-like genes mediate leaf-to-leaf wound signals. *Nature* 500: 422–426.
- Nakamura Y, Mithöfer A, Kombrink E, Boland W, Hamamoto S, Uozumi N, Tohma K, Ueda M. 2011. 12-Hydroxyjasmonic acid glucoside is a COI1-JAZ-independent activator of leaf-closing movement in *Samanea saman*. *Plant Physiology* 155: 1226–1236.
- Nakamura Y, Reichelt M, Mayer VE, Mithöfer A. 2013. Jasmonates trigger prey-induced formation of ‘outer stomach’ in carnivorous sundew plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: 20130228.
- Nishimura E, Jumyo S, Arai N, Kanna K, Kume M, Nishikawa J, Tanase J, Ohyama T. 2014. Structural and functional characteristics of S-like ribonucleases from carnivorous plants. *Planta* 240: 147–159.
- Paszota P, Escalante-Perez M, Thomsen LR, Risør MW, Dembski A, Sanglas L, Nielsen TA, Karring H, Thøgersen IB, Hedrich R *et al.* 2014. Secreted major Venus flytrap chitinase enables digestion of Arthropod prey. *Biochimica et Biophysica Acta* 1844: 374–383.

- Pauwels L, Inzé D, Goossens A. 2009. Jasmonate-inducible gene: what does it mean? *Trends in Plant Science* 14: 87–91.
- Pavlović A, Demko V, Hudák J. 2010. Trap closure and prey retention in Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis.) temporarily reduces photosynthesis and stimulates respiration. *Annals of Botany* 105: 37–44.
- Pavlović A, Saganová M. 2015. A novel insight into the cost–benefit model for the evolution of botanical carnivory. *Annals of Botany* 115: 1075–1092.
- Peña-Cortés H, Fisahn J, Willmitzer L. 1995. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 92: 4106–4113.
- Pyatygin SS, Opritov VA, Vodeneev VA. 2008. Signaling role of action potential in higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 55: 285–291.
- Renner T, Specht CD. 2012. Molecular and functional evolution of class I chitinases for plant carnivory in the Caryophyllales. *Molecular Biology and Evolution* 29: 2971–2985.
- Rottloff S, Stieber R, Maischak H, Turini FG, Heubl G, Mithöfer A. 2011. Functional characterization of a class III acid endochitinase from the traps of the carnivorous pitcher plant genus, *Nepenthes*. *Journal of Experimental Botany* 62: 4639–4647.
- Schägger H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* 1: 16–22.
- Scherzer S, Böhm J, Krol E, Shabala L, Kreuzer I, Larisch C, Bemm F, Al-Rasheid KA, Shabala S, Rennenberg H *et al.* 2015. Calcium sensor kinase activates potassium uptake systems in gland cells of Venus flytraps. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 112: 7309–7314.
- Scherzer S, Krol E, Kreuzer I, Kruse J, Karl F, von Rüden M, Escalante-Perez M, Müller T, Rennenberg H, Al-Rasheid KAS *et al.* 2013. The *Dionaea muscipula* ammonium channel DmAMT1 provides NH₄⁺ uptake associated with Venus flytrap's prey digestion. *Current Biology* 23: 1649–1657.
- Schilmiller AL, Howe GA. 2005. Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 369–377.
- Schulze WX, Sanggaard KW, Kreuzer I, Knudsen AD, Bemm F, Thøgersen IB, Bräutigam A, Thomsen LR, Schliesky S, Dyrland TF *et al.* 2012. The protein composition of the digestive fluid from the Venus flytrap sheds light on prey digestion mechanisms. *Molecular and Cellular Proteomics* 11: 1306–1319.
- Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu F-F, Sharon M, Browse J *et al.* 2010. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI-JAZ co-receptor. *Nature* 468: 400–407.
- Stelmach BA, Müller A, Hennig P, Laudert D, Andert L, Weiler EW. 1998. Quantitation of the octadecanoid 12-oxo-phytodienoic acid, a signalling compound in plant mechanotransduction. *Phytochemistry* 47: 539–546.
- Stintzi A, Weber H, Reymond P, Browse J, Farmer E. 2001. Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentanones. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98: 12837–12842.
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J. 2007. JAZ repressor proteins are targets of the SCF (COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* 448: 661–665.
- Ueda M, Tokunaga T, Okada M, Nakamura Y, Takada N, Suzuki R, Kondo K. 2010. Trap-closing chemical factors of the Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis). *ChemBioChem* 11: 2378–2383.
- Volkov AG, Adesina T, Jovanov E. 2007. Closing of Venus flytrap by electrical stimulation of motor cell. *Plant Signaling and Behavior* 2: 139–145.
- Volkov AG, Adesina T, Jovanov E. 2008. Charge induced closing of *Dionaea muscipula* Ellis trap. *Bioelectrochemistry* 74: 16–21.
- Volkov AG, Nyasani EK, Tuckett C, Scott JM, Jackson MZ, Greeman EA, Greenidge AS, Cohen DO, Volkova MI, Shtessel YB. 2017. Electrotonic potentials in *Aloe vera* L.: effect of intercellular and external electrodes arrangement. *Bioelectrochemistry* 113: 60–68.
- Volkov AG, Vilfranc CL, Murphy VA, Mitchell C, Volkova MI, O'Neal L, Markin VS. 2013. Electrotonic and action potentials in the Venus flytrap. *Journal of Plant Physiology* 170: 838–846.
- Wasternack C, Hause B. 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany* 111: 1024–1058.
- Wasternack C, Stenzel I, Hause B, Hause G, Kutter C, Maucher H, Neumerkel J, Feussner I, Miersch O. 2006. The wound response in tomato – role of jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology* 163: 297–306.
- Wildon DC, Thain JF, Minchin PEH, Gubb IR, Reilly AJ, Skipper YD, Doherty HM, Donnell PJO, Bowles DJ. 1992. Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plants. *Nature* 360: 62–65.
- Williams SE, Pickard BG. 1972. Properties of action potentials in *Drosera* tentacles. *Planta* 103: 222–240.
- Yan Y, Stolz S, Chetelat A, Reymond P, Pagni M, Dubugnon L, Farmer EE. 2007. A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *The Plant Cell* 19: 2470–2483.
- Yilamujiang A, Reichelt M, Mithöfer A. 2016. Slow food: insect prey and chitin induce phytohormone accumulation and gene expression in carnivorous *Nepenthes* plants. *Annals of Botany* 118: 369–375.
- Yoshida Y, Sano R, Wada T, Takabayashi J, Okada K. 2009. Jasmonic acid control of GLABRA3 links inducible defense and trichome patterning in *Arabidopsis*. *Development* 136: 1039–1048.
- Zhang Y, Turner JG. 2008. Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *PLoS ONE* 3: e3699.
- Zimmermann MR, Maischak H, Mithöfer A, Boland W, Felle HH. 2009. System potentials, a novel electrical long-distance apoplastic signal in plants, induced by wounding. *Plant Physiology* 149: 1593–1600.
- Zimmermann MR, Mithöfer A, Will T, Felle HH, Furch AC. 2016. Herbivore-triggered electrophysiological reactions: candidates for systemic signals in higher plants and the challenge of their identification. *Plant Physiology* 170: 2407–2419.

Supporting Information

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

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

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

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

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

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

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