

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: BBI



**Jan Martinek**

Mechanorecepce u rostlin  
Mechanoreception in plants

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Stanislav Vosolsobě  
Konzultanti: RNDr. Kateřina Schwarzerová Ph.D., RNDr. Jan Petrášek Ph.D.

Praha, 2013

## **Poděkování**

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří mi pomáhali, především svému školiteli Mgr. Stanislavu Vosolsobě, který mi mnoha diskusemi nejen k tématu práce dodával nadšení a inspiraci.

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 16.5.2013

Podpis

## ABSTRAKT

Rostliny jsou sesilní organismy, které si nemohou najít lepší podmínky někde jinde a musí se přizpůsobit prostředí, ve kterém vyrostly. Proto si vyvinuly schopnost vnímat celou řadu environmentálních podnětů, které jim umožňují získat představu o podmínkách v jejich okolí. Jednou ze skupin podnětů, kterým jsou vystaveny, jsou mechanické stimuly spojené například s poryvy větru, kontaktem s překážkami, dotykem herbivorů nebo okolních rostlin. Jistým druhem mechanických stimulů jsou také zvuk a gravitace. Masožravé nebo popínavé rostliny mají vysoce specialisované struktury vytvořené pro vnímání a odpověď na mechanické stimuly, poněkud méně nápadná, ale o to zajímavější a významnější reakce na mechanické podněty existuje i u nesespecializovaných rostlin. Tato práce se pokouší shrnout jak je mechanorecepce u rostlin rozšířena a jaké jsou její adaptivní funkce, od vnímání dotyku opory u úponků, přes aktivaci pastí masožravých rostlin až po přizpůsobení na růst na větrném stanovišti a navigaci kořenů skrz překážky v půdě. V další části práce shrnuje současné poznatky o molekulárních procesech provázejících vnímání mechanických podnětů, transdukci, integraci a odpovědi na mechanické působení a v poslední části práce nabízí možné schéma průběhu mechanorecepce od počátečního stimulu až po změnu fenotypu.

**Klíčová slova:** mechanorecepce, mechanotransdukce, thigmomorfogeneze, rostlinné tropismy, mechanický stres, TCH, ethylen, jasmonáty

## ANNOTATION

Because of their sessile nature, plants are unable to change their location and thus they are forced to adapt as much as possible to the environment they grow in. Plants evolved the ability to sense many environmental cues, which enables them to perceive the conditions in their surroundings. One class of these stimuli are mechanical forces - from wind sways to contact with obstacles, herbivores or other plants - other mechanical stimuli are *e.g.* gravity or sound waves. Carnivorous or climbing plants have structures specialised for perception and rapid response to mechanical stimuli. Intriguingly, there is a less spectacular but maybe even more interesting and important response to mechanical perturbation in non-specialized plants. This thesis tries to summarize ubiquity of mechanoperception in plant kingdom and its adaptive importance for the plant life - from activation of traps, to morphological adaptation for growth at windy sites, tendril coiling in climbing plants and root navigation through obstacles in soil. In the following part, the thesis summarizes the recent knowledge of molecular processes accompanied with mechanoreception, signal transduction and integration, and response to mechanostimulation. In the last part I propose a scheme of mechanosensing workflow from initial mechanical stimulus to phenotypic changes in perturbed plants.

**Key words:** mechanoreception, mechanotransduction, thigmomorphogenesis, plant tropisms, mechanical stress, TCH, ethylene, jasmonates

# OBSAH

1	Úvod.....	1
1.1	Rostliny a jejich vnímání světa.....	1
1.2	Rostliny a jejich vnímání mechanických podnětů.....	2
2	Mechanorecepce.....	2
2.1	Vnitřní mechanické podněty.....	2
2.1.1	Turgor.....	2
2.2	Vnější mechanické podněty.....	3
2.2.1	Dotyk.....	3
2.2.2	Vítr.....	4
2.2.3	Zvuk.....	5
2.2.4	Gravitace.....	6
2.3	Thigmotropismy a thigmonastie.....	7
2.3.1	Masožravé rostliny.....	7
2.3.2	Úponky.....	8
2.3.3	Sklápění listů.....	9
2.4	Thigmomorfogeneze.....	9
3	Příjem signálu.....	11
3.1	Role vápníku.....	11
4	Vnímání signálu.....	13
4.1	Iontové kanály.....	13
4.1.1	Kanály MSL.....	14
4.1.2	Kanály MCA.....	15
4.2	Buněčná stěna.....	17
4.2.1	Integriny u rostlin.....	17
4.2.2	Receptorové kinázy.....	20
4.2.3	Forminy.....	20
4.2.4	Další propojení.....	21
4.3	Geny indukované dotykem.....	21
4.4	Role růstových regulátorů.....	22
4.4.1	Ethylen.....	22
4.4.2	Jasmonáty.....	24
4.4.3	Reaktivní formy kyslíku.....	25
4.5	Akční potenciály.....	25
5	Model mechanorecepce u rostlin.....	27
5.1	Časový průběh mechanorecepce.....	27
5.2	Model fungování mechanorecepce.....	28
6	Závěr.....	31
7	Literatura.....	33

# 1 ÚVOD

## 1.1 Rostliny a jejich vnímání světa

Rostliny jsou sesilní organismy žijící na rozhraní litosféry a atmosféry. Jejich stavba jim neumožňuje lokomoci. Neznamená to ale, že by byly zcela pasivní. Rostliny naopak velice pečlivě sledují charakteristiky okolního prostředí, získané informace integrují a vyhodnocují a adekvátně na ně reagují. Je to velmi důležité právě proto, že nejsou schopny opustit své stanoviště – ze strategií „bojů“ nebo „uteč“ jim zbývá jen ta první. Zatímco živočichové mohou migrovat a své životní prostředí aktivně volit, rostlině nezbývá, než se přizpůsobit tomu, ve kterém vyrostla. Chování u živočichů je vyjádřeno pohybem, u rostlin je charakteristická změna růstu – na rozdíl od živočichů, u kterých jsou odchylky od standardního fenotypu nežádoucí, jsou rostliny velice plastické a pomocí alokace biomasy do různých částí se tvarují tak, aby optimalizovaly svůj fenotyp pro dané prostředí (Weiner, 2004; Trewavas, 2003).

Pro rostliny má proto podrobná znalost prostředí velkou důležitost a existuje celá řada rostlinných smyslů, které poskytují významné informace o okolí. Rostliny jsou schopné vnímat světlo, a to nejen jeho přítomnost a nepřítomnost, ale i intenzitu, směr, vlnovou délku i dobu jeho působení – fotoperiodu. Vnímají teplotu, jsou schopné sledovat gradienty vlhka a živin v půdě, a spolu s vnímáním vektoru gravitace podle toho směřovat své kořeny. Pomocí chemorecepce kořenových exudátů rostlina pozná, zda je v jejím okolí jiná rostlina, ale i to, zda je to cizí nebo příbuzná rostlina nebo zda je to ona sama (Biedrzycki et al., 2010; Gruntman & Novoplansky, 2004). Parazitické druhy využívají tento rostlinný „čich“ k vyhledávání hostitelů. Nad zemí jsou rostliny schopné komunikovat pomocí těkavých látek. Rostliny, které jsou okusované herbivorů, uvolňují do ovzduší jasmonáty. Okolo rostoucí rostliny v reakci na jasmonáty začnou produkovat hořké fenolické látky a jsou tak na útok herbivorů připravené ještě než jsou jím samy napadeny. (Karban et al., 2000).

Informace, které rostliny získají o okolí, se integrují tak, aby odpověď byla optimální vůči všem podnětům. Například kořeny mají tendenci růst gravitropicky, ale pokud narazí na překážku, gravitropismus se potlačí a kořen roste horizontálně, dokud překážku neobejde (Massa & Gilroy, 2003). Podobně může být gravitropismus potlačen informací o zdroji vody nebo živin z jiného směru. Rostliny jsou také schopné sledovat dynamické změny v prostředí a na základě dostupných informací předvídat budoucí vývoj. Je to vidět například na pokusech, kdy se rostliny pěstovaly v prostředí s ostrůvky půdy různě bohatými na živiny. Nejen, že rostliny alokovaly více biomasy do kořenů, které byly v bohatých ostrůvcích, ale zároveň dokázaly poznat, ve kterých ostrůvcích živin přibývá, a tam rostly ještě více než v ostrůvcích, kde bylo sice živin více, ale nepřibývaly, či ubývaly (Shemesh et al., 2010).

## 1.2 Rostliny a jejich vnímání mechanických podnětů

V této práci bych se chtěl zabývat tím, jak rostlina vnímá mechanické působení. Všechny rostliny jsou schopné vnímat nějaké mechanické informace a více nebo méně nápadně na ně reagují. Mechanické podněty mohou přicházet zevnitř i z vnějšku a nést informaci o okolí i o stavu rostliny samotné. V první části své práce bych rád fenomenologicky shrnul speciální i obecné reakce rostlin na mechanické podněty, v druhé části pak současné představy o mechanistické podstatě mechanorecepce na úrovni orgánové, buněčné a molekulární.

## 2 MECHANORECEPCE

Sám dotyk v sobě může nést dost informací o prostředí. Masožravým rostlinám dává signál k aktivaci jejich pastí, úponkům popínavých rostlin k přichycení a citlivce ke sklopení listů. (Braam, 2005) Kromě těchto specializovaných pohybů nazývaných thigmonastie a thigmotropismy reagují na dotyk například i kořeny všech rostlin, které, když narazí na překážku, změni směr růstu a vyhnou se jí (Monshausen & Gilroy, 2009a). Dotyk okolních rostlin nese informaci o sousedech ve vegetaci (De Wit et al., 2012b) nebo přítomnosti patogenů (Gus-Mayer et al., 1998). Rostliny cítí také poryvy větru nebo dopadající kapky deště (Braam & Davis, 1990). V poslední době se objevilo také několik publikací zkoumajících vnímání zvuku a vibrací (Gagliano et al., 2012). Mechanorecepce ale nezahrnuje jen vnější podněty – rostlina potřebuje cítit i vnitřní podněty jako je turgor jejích buněk, protože jeho regulace je nezbytná pro růst i osmoregulaci, nebo vlastní váhu – při rychlém růstu nebo při tvorbě plodů musí rostlina odpovídajícím způsobem zesílit stonek a větve a případně produkovat více podpůrných pletiv, aby se nezhroutila (Ko et al., 2004).

### 2.1 Vnitřní mechanické podněty

#### 2.1.1 Turgor

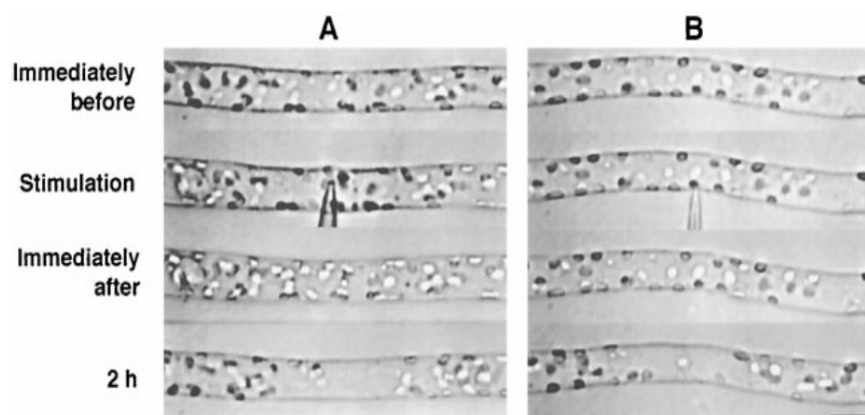
Už na buněčné úrovni je mechanorecepce důležitá pro vnímání osmotického tlaku a udržování turgoru. O tom, že buňka cítí vlastní tlak vyvíjený protoplastem na buněčnou stěnu, respektive, že protoplast vnímá rigiditu buněčné stěny, svědčí četné pokusy s chemickým narušením stěny nebo s genetickými mutacemi znemožňujícími její výrobu. Například pokus s mutantem v genu pro membránově vázanou endo-1,4- $\beta$ -glukanasu ukázal, že tento mutant kompenzuje nedostatek celulosy ve stěně zvýšenou produkcí pektinů (His et al., 2001). Ztrátový mutant v genu pro celulosa-synthasu 3 (*CESA3*) v reakci na snížení obsahu celulosy ve stěně produkoval do stěny více ligninu. Podobně, inhibitor celulosa-synthasy dichlobenil indukuje zvýšenou produkci kalosy (Caño-Delgado et al., 2003). Právě vnímání turgoru by mohlo být vhodným kandidátem na nejstarší formu mechanorecepce, protože ho k osmoregulaci a regulaci růstu potřebují už jednobuněčné rostliny.

## 2.2 Vnější mechanické podněty

Jedná se o mechanické podněty nesoucí informace o okolním prostředí. Reakce na tyto informace mohou být velice rychlé – například sklapování pastí masožravých rostlin. Tyto reakce spojené s pohybem se nazývají thigmotropismy (dotyk vyvolává směrovanou pohybovou odpověď) nebo thigmonastie (odpověď je nesměrovaná). Rostliny schopné těchto reakcí jsou typicky vybaveny specializovanými orgány pro detekci dotyku, jako jsou například citlivé chloupky na listových pastech mucholapky, a zároveň specializovanými motorickými orgány, které zajišťují realizaci reakce. Thigmomorfogeneze označuje naopak reakce pomalé, projevující se jako dlouhodobé změny v růstu v závislosti na mechanickém působení na rostlinu – například strom rostoucí na větrném vršku je nižší a má širší kmen, aby mohl lépe odolávat náporům větru a nezlomil se.

### 2.2.1 Dotyk

Dotyk je definován jako fyzický kontakt dvou pevných předmětů. Ohýbání ve větru nebo dopady kapek vody tedy nelze považovat za dotyk v pravém slova smyslu a rostliny mezi těmito podněty zřejmě opravdu jsou schopné rozlišovat. Úponky popínavých rostlin jsou například velice citlivé a aktivuje je už slabý dotyk, dopady kapek vody ale ovíjení nespustí. (Jaffe & Galston, 1968; Darwin, 1880). Dotyk vnímají rostliny už na buněčné úrovni. Při dráždění buněk gametofytu netíku pomocí mikrokapiláry dochází k aktivní reakci a pohybu jádra směrem k a chloroplastů pryč od místa podráždění (obrázek 1) (Sato et al., 1999). Zdá se, že dotyk může rostlině poskytovat informaci o přítomnosti houbového patogena. Mechanické dráždění buněk petržele wolframovým drátkem o průměru 3-5  $\mu\text{m}$ , tedy průměru shodném s průměrem houbové hyfy, indukovalo nejen zvýšené proudění cytoplasmy a pohyb organel jako v předešlém případě, ale došlo i ke spuštění části rostlinné obranné odpovědi typické při napadení houbou. Přestože buněčná stěna nebyla narušena, pouhé mechanické působení vedlo ke zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku (Gus-Mayer et al., 1998).

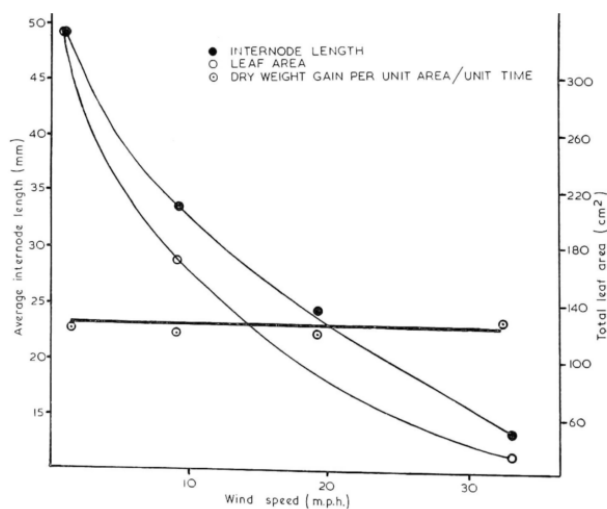


Obrázek 1: protonematální buňky netíku *Adiantum capillus-veneris* při mechanické stimulaci. Dotek kapilárou zvrchu (A) a ze strany (B) vede k pohybu chloroplastů pryč od místa dotyku (Sato et al., 1999)

Dotyk okolních rostlin může nést informaci o hustotě zápoje, ve kterém jedinec roste, a vedle zastínění je tak jednou z metod rozpoznání souseda – konkurenta – v nadzemní části rostliny. Když se listy sousedících rostlinek *Arabidopsis thaliana* dotknou, spustí se u nich hyponastická reakce a jejich řapíky se ohýbají nahoru, aby sousední list přerostly, což je stejná reakce jaká se spouští při zastínění (De Wit et al., 2012a).

## 2.2.2 Vítr

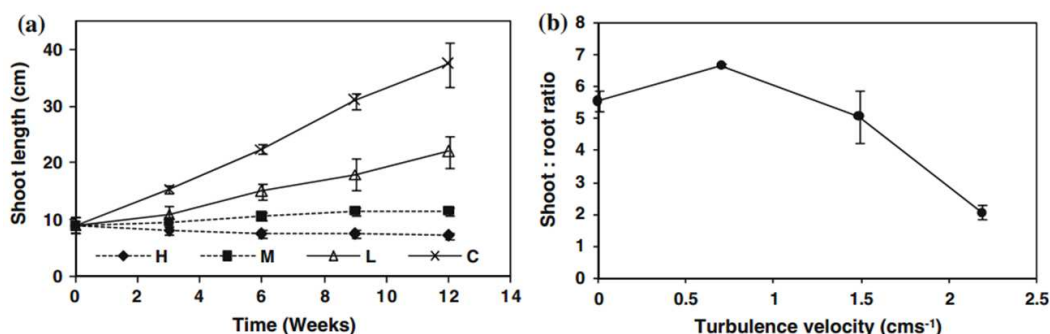
Již Knight (1803) pozoroval, že stromy rostoucí na místech exponovaných větru mají nízký a robustní vzrůst, a že stromy vystavené silným větrům ze severu mají kmeny nikoli kulaté, ale oválné s poměrem 13:11 ve prospěch severo-jihní osy. Rostliny slunečnice pěstované ve větrném tunelu s různou rychlostí větru vytvářely tím kratší internodia a měly tím menší listovou plochu, čím vyšší byla rychlost větru (obrázek 2) (Whitehead, 1962). Obdobně, pokud se na čtyřleté stromky modřínu foukalo silným větrákem, rostly pomaleji a měly silnější kmen, především na bázi, a produkovaly více reakčního dřeva, a navíc, pokud se přivázaly ke kůlu, takže byly vystaveny větru, ale neohýbaly se, vyrostly stromky s vyšším a tenčím kmenem (Larson, 1965). Stromy rostoucí na okraji lesa jsou přizpůsobené větrným poryvům a nelámou se ve vichřici, naopak stromy rostoucí původně uvnitř lesa, odhalené těžbou, jsou k lámání mnohem náchylnější. U huseníčku se slabé, krátkodobé působení větru projevilo neznatelně, dlouhodobé vystavení větru ale vedlo k signifikantně většímu větvení stonků (Pigliucci, 2002). Třešňové stromky také alokují více biomasy do kořenů, pokud jsou vystaveny větru, ve srovnání se stromky pěstovanými v individuálních závětrích. Stromky, které byly v závětrí mechanicky ohýbány, měly podobnou alokaci do kořenů jako stromky ve větru (Coutand et al., 2008). Pro rostlinu je samozřejmě výhodné vnímat povětrnostní podmínky ve svém okolí a přizpůsobit jim svůj růst a právě vnímání větrných poryvů je tak zřejmě původním podnětem vedoucím ke vzniku thigmomorfogeneze u rostlin (Jaffe, 1980). O významu větrných poryvů pro růst rostliny vypovídá i to, že výše zmiňovaná práce o třešních byla zadána s cílem vysvětlit, proč stromky vysazované v plastových krytech proti okusu špatně zakořeňují.



Obrázek 2: hodnoty délky internodií a celkové plochy listů v závislosti na rychlosti větru, které byly testované rostliny vystaveny (Whitehead, 1962)



Podobný vliv jako vítr má na vodní rostliny proudění vody. U akvariijní rostliny zákrutichy šroubovité (*Valisneria spiralis*) pěstované při různé intenzitě míchání media byly pozorovány změny jak v rychlosti růstu, která se snižovala se zvyšující se mírou míchání media, tak v poměru prýtu a kořenů, kdy, stejně jako u suchozemských rostlin, alokovala zákruticha více biomasy do kořenů, pokud byla vystavena větším turbulentcím (obrázek 3) (Ellawala et al., 2013).



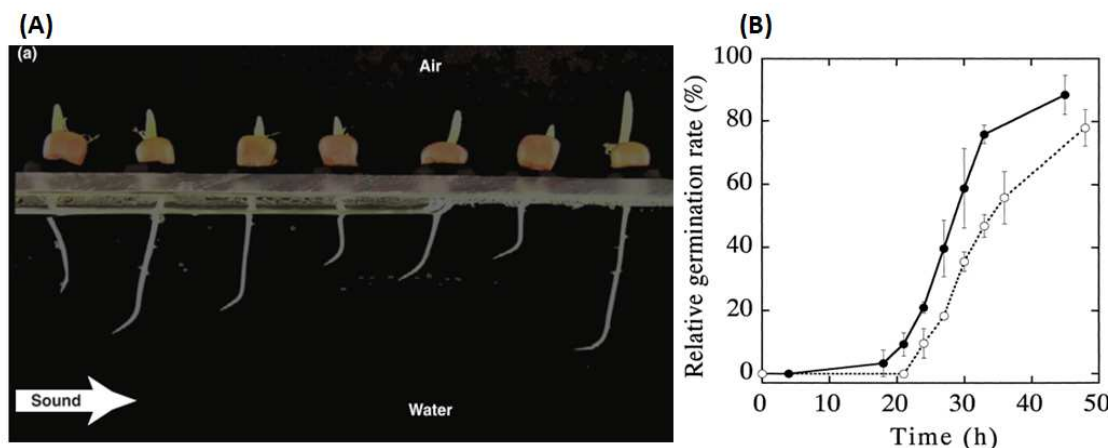
Obrázek 3: (a) - růst zákrutichy (při různé intenzitě turbulentcím v mediu (H=vysoké, M=střední, L=slabé, C=kontrola). (b) - poměr suché hmotnosti prýtu a kořenů u rostlin pěstovaných v různě silných turbulentcím (Ellawala et al., 2013).

### 2.2.3 Zvuk

Jedním z mechanických podnětů, na které rostliny reagují, jsou i zvuk a vibrace. Semínka huseníčku například klíčí více, pokud jsou vystavena vibracím o frekvenci 100 Hz (obrázek 4B) (Uchida, 2002), 50 Hz urychluje klíčení a růst kořenů rýže a okurky (Takahashi et al., 1991). Kalus chryzantémy vystavený zvuku roste rychleji nebo pomaleji než kontrola, podle frekvence a hlasitosti zvuku, kterému je vystaven (Yiyao et al., 2002). Dokonce existuje skupina genů, jejichž exprese se specificky zvyšuje při vystavení zvuku (Jeong et al., 2007). Rostliny vnímají i zvuk a dokonce u nich existuje cosi jako fonotropismus: Kořeny klíčících rostlin kukuřice prorůstající do trubky s vodou, do které je z jedné strany pouštěn zvuk, rostou směrem ke zdroji (obrázek 4A), největší efekt má zvuk s frekvencí okolo 200 Hz. (Gagliano et al., 2012).

Pro příjem zvuku jsou rostliny skvěle disponovány, především jejich kořeny, které rostou v mediu dobře akusticky vodivém a navíc jsou vybaveny kořenovými vlásky, které mohou zvukové vibrace efektivně zachycovat, podobně jako vlasové buňky v Cortiho orgánu lidského ucha. Nadzemní části také skvěle zachycují zvuk (Price, 1988) a stromy se proto dají použít pro odstínění hluku. Adaptivní význam vnímání zvuku není u rostlin příliš zřejmý. Někteří vědci se domnívají, že rostliny by spolu mohly akusticky komunikovat. Pro efektivní komunikaci je třeba nejen přijímat, ale i generovat zvuky. Například stromy vystavené suchu produkují zvuky způsobené kavitací (Zweifel & Zeugin, 2008), což v sobě nese jistou informaci o nebezpečí sucha. Některé struktury, jako například jehlice stromů ve větru rezonují a vytváří typický zvuk – například bory, které šumí po skalínách (Tyl, 1834). Problémem je, že pokud byly nějaké zvuky u rostlin zaznamenány, byly typicky velmi slabé, měřitelné jen citlivými přístroji umístěnými přímo na rostlině, jejich produkce byla spíše náhodná nebo pasivní a těžko ovlivnitelná a zvuky nebyly dostatečně strukturované,

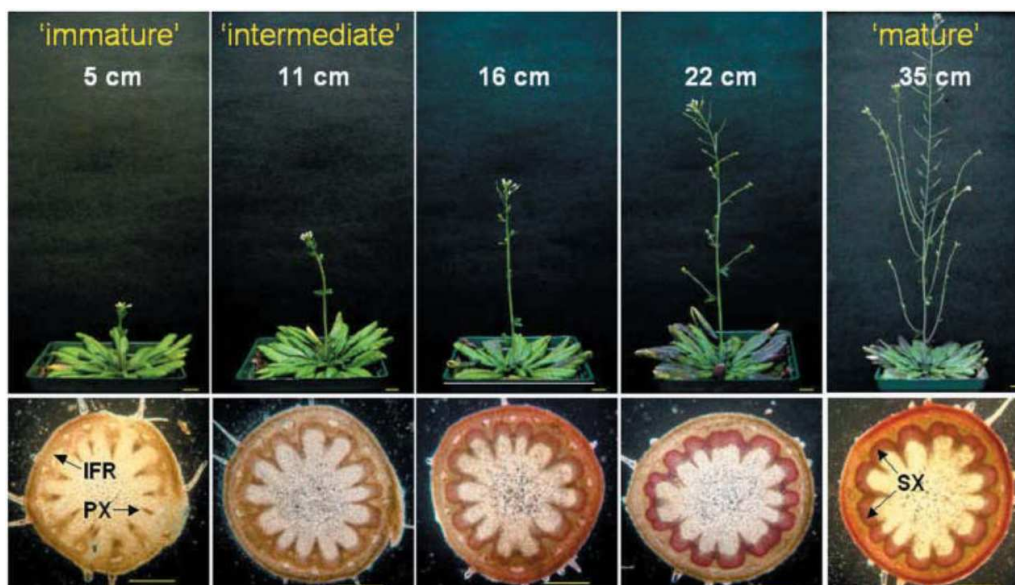
aby mohly nést nějakou komplexnější informaci (Ten Cate, 2012). Ačkoli se zdá, že kořeny kukuřice jsou schopné emitovat strukturované zvukové signály měřitelné i několik centimetrů od zdroje v tekutém mediu (Gagliano et al., 2012), ani toto asi nestačí k efektivní komunikaci. Je dost možné, že pozorované projevy vnímání zvuku jsou jen projevy interference akustických signálů s některými komponenty recepčních drah jiných signálů.



Obrázek 4 : zvuk a vibrace - semena kukuřice která kořeni do trubky s vodou, kde se zleva pouští zvuk o frekvenci 220Hz zjevně rostou směrem za zvukem (A) (Gagliano et al., 2012). Semínka *Arabidopsis thaliana* vystavená vibracím (100Hz / amplituda 0,42mm, plné body) klíčí s vyšší úspěšností než kontrolní semínka (prázdné body) (B) (Uchida, 2002)

## 2.2.4 Gravitate

Gravitate se od ostatních mechanických podnětů liší tím, že působí stále a není nijak lokalizovaná. Gravitace a gravitropismus by samy o sobě vydaly na samostatnou bakalářskou práci, proto se tu budu gravitaci věnovat jen v souvislosti s jinou než gravitropickou reakcí. Gravitate se může projevovat podobně jako dotyk nebo vítr ohýbáním rostlinných orgánů a tedy tahem a tlakem v pletivech rostliny. Naopak, když se rostlina ohýbá, například působením větru nebo dotyku, vede to k jejímu vychýlení v rámci gravitačního pole. Gravirecepce a mechanorecepce jsou tak do značné míry provázané. Například tvorba reakčního dřeva je společným projevem pro působení gravitace nebo větru. Reakční dřevo vzniká na větvích nebo na kmenech šikmo rostoucích stromů. Spodní část větve je stlačována a vrchní natahována. Reakcí je tvorba tlakového dřeva (compression wood) s větším množstvím ligninu na spodní straně a tahového (tension wood) s větším podílem celulosy na svrchní straně. Stejně reagují stromy na převládající větry z jednoho směru. (Wilson & Archer, 1977; Telewski, 2006). Rostliny jsou schopné reagovat na změny své váhy způsobené růstem, tvorbou plodů nebo vnějším zatížením. To ukázali Ko et al. na huseníčku. Když pěstovali huseníček při různé dlouhé fotoperiodě, podařilo se jim získat stejně staré rostliny s podobně tlustými stonky, které měly ale různě vysoká květenství. Barvení příčných řezů stonků těsně nad listovou růžicí se ukázalo, že vyšší stonky produkují více sekundárního xylemu (obrázek 5) (Ko et al., 2004). Konzistentní výsledky získali při umělém zatížení 5 cm vysokých stonků 2,5 gramovým závažím z alobalu, což odpovídá váze 25 cm vysokého stonku. Po třech dnech zatížení, se u nich vytvořil sekundární xylem zatímco u kontroly nikoli.



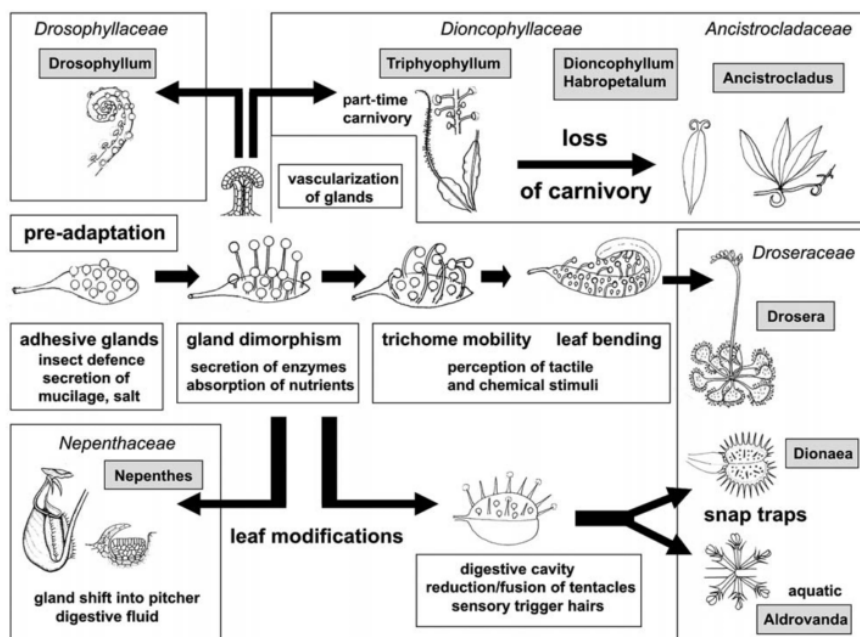
Obrázek 5: všechny rostliny huseníčku byly 8 týdnů staré, ale díky pěstování v různé fotoperiodě měly různě vysoké stonky. Na řezech bázi stonku, barvených fluoroglucinolem, je patrný nárůst sekundárního xylemu. (Ko et al., 2004)

## 2.3 Thigmotropismy a thigmonastie

### 2.3.1 Masožravé rostliny

Masožravost u rostlin je adaptací na život v prostředí chudém na živiny, jako jsou například rašeliniště, kde nízké pH brání rozkladu organické hmoty. Pomocí důmyslných pastí jsou masožravé rostliny schopné lovit drobné organismy, především hmyz a členovce. Ze své kořisti získávají především dusíkaté látky (Adamec, 1997). Nejedná se tedy o zdroj energie. Existuje několik typů pastí, které přímo využívají mechanoreceptci pro své spuštění. Nejznámější jsou sklapovací pasti mucholapky podivné (*Dionaea muscipula*), která po podráždění citlivých chloupků prudce sklapne laloky svých listů a uvězní kořist v těsném sevření (Darwin, 1875; Hooker, 1876). Prakticky stejný mechanismus používá vodní rostlina aldrovandka (*Aldrovanda*), která loví drobné vodní korýše a hmyz (Adamec, 2000). Z molekulárně-fylogenetických studií vyplývá, že aldrovandka a mucholapka jsou sesterské a jejich pasti mají zřejmě společný původ v pastech rosnatek (Cameron et al., 2002; Heubl et al., 2006) (obrázek 6).

Listy rosnatek (*Drosera*) jsou vybaveny tentakulemi produkujícími na vrcholku lepkavý sliz, ze kterého se hmyz po dosednutí už nedostane (Braam, 2005). Po zaznamenání dotyku dojde k pomalému ohybu listu a obalení kořisti tentakulemi ze všech stran (Darwin, 1875). Přechod mezi lepkavými a sklapovacími pastmi má *Drosera glanduligera*, která má - kromě lepkavých tentakulí - na okraji listů mechanosenzitivní tentakule, které na dotyk reagují prudkým ohnutím a jsou schopné hmyz, který na ně šlápne doslova katapultovat přímo doprostřed lepkavých listů (Poppinga et al., 2012).



Obrázek 6: evoluce mechanosensitivních listových pastí v rámci skupiny droseraceae (Heubl et al., 2006)

Bublinatky (*Utricularia*), rostou nezakořeněné ve vodě a loví planktonní organismy, především malé koryše, ale v jejich pastech se často nachází i různé zelené řasy, označení „masožravá“ je u bublinatky tedy poněkud sporné (Peroutka et al., 2008). Jejich pasti fungují na principu podtlakového nasávání. Měchýřek je uzavřen vodotěsným víčkem, a když kořist zavádí o citlivé chloupky kolem jeho ústí, víčko se otevře a kořist je nasáta dovnitř tlakem -17 kPa až -5 kPa. K tomu dochází během pouhých 10 - 15 milisekund (Sydenham & Findlay, 1973). Citlivost na dotyk je u masožravých rostlin obrovská. Například rosnatky jsou schopné zaznamenat váhu jednoho lidského vlasu (Darwin, 1875), což je u 12 cm dlouhého vlasu v průměru 0,62 mg (Legrand et al., 2005). Hmotnost menší mouchy je přitom až 1,5 mg (Martinek, 2013, nepublikovaná data) Příklad masožravé rostliny jako rosnatky a mucholapky jsou schopné odlišit dotyk (definovaný jako fyzický kontakt dvou pevných předmětů) od jiných typů mechanického působení. Zatímco dráždění pevným předmětem spustí pohyb jejich pastí, dopadající kapky vody ani silné foukání to nedovedou (Darwin, 1875). Pro rostlinu je samozřejmě výhodné, aby pasti zbytečně nereagovaly na falešné signály, adaptivní výhoda tohoto přizpůsobení je tedy zřejmá, mechanismus jakým rostliny rozlišují tyto podněty, ale zůstává nejasný (Braam, 2005).

### 2.3.2 Úponky

Další specialisovanou strukturou, která využívá mechanoreceptci jsou úponky. Rostliny díky nim mohou růst do obrovských výšek, aniž by musely investovat do silných dřevnatých stonků. Úponky jsou listy, stonky, nebo dokonce kořeny (Louis et al., 1999) přeměněné na dlouhé tenké filiformní útvary, které jsou schopné ovinout se kolem opory, na kterou narazí. K tomu nedochází náhodně, ale naopak úponky aktivně pátrají ve svém okolí - pomalu krouží v elipsách nebo osmičkách, a když najdou pevný objekt, ovinou se kolem něj (Darwin, 1865). Úponky některých rostlin se chovají thigmonasticky a po dotyku se ovíjí vždy

stejným směrem bez ohledu na místo dotyku, jiné thigmotropicky – určí, ze které strany úponku dotyk přišel, a stáčí se na tu stranu (Jaffe & Galston, 1968). Když se úponkům některých rostlin podaří přichytit, dochází ještě ke zkroucení části úponku mezi jeho koncem a tělem rostliny, čímž dojde ke zkrácení délky úponku a přitažení rostliny k opoře. Naopak, pokud se přichycení nepodaří, často dochází k opětovnému rozmotání úponku (Jaffe & Galston, 1968). Zvláštním přechodem mezi běžnými listy a úponky je například rostlina lilek jasmínokvětý (*Solanum jasminoides*), která je schopna ovíjet řapíky svých listů kolem opory a tak se pnout do výšky (Darwin, 1865). Některé popínavé rostliny, jako například révovitá rostlina *Parthenocissus tricuspidata* mohou růst po zdech a skalách díky specializovaným úponkům, které se neovívají, ale při dotyku s pevným podkladem vytváří přichytné polštářky, které produkují lepivé látky (Bowling & Vaughn, 2008; Darwin, 1880).

### 2.3.3 Sklápění listů

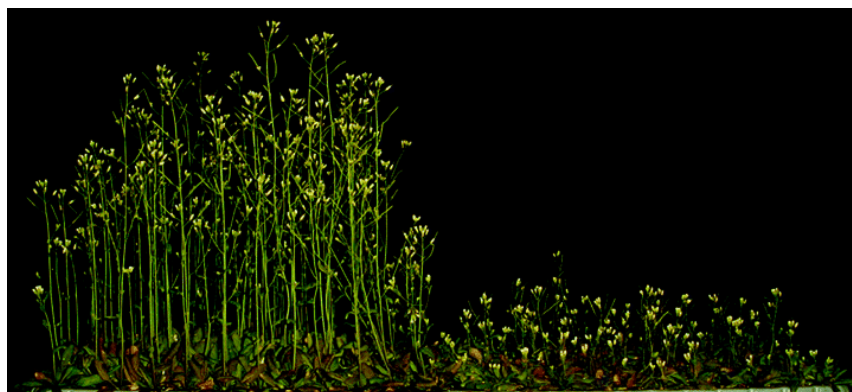
Jednou z nejznámějších thigmonastií je sklápění listů některých rostlin v reakci na dotek. Velmi rychlé je sklápění u citlivky (*Mimosa*) nebo některých druhů šťavelů (*Oxalis*) (Darwin, 1880). Ačkoli je reakce velmi výrazná, její adaptivní význam není zcela jasný. Někteří autoři se domnívají, že by rychlý pohyb listů mohl vystrašit herbivory a to buď sám o sobě, nebo tím, že sklopení listů náhle odhalí trny, které má rostlina na stoncích (Eisner, 1981). Citlivka patří do čeledi bobovitých u, kterých se běžně vyskytuje diurnální sklápění listů a je pravděpodobné, že seismonastická reakce citlivky je odvozena právě od těchto pohybů (Jaffe et al., 2002), protože oba využívají stejný motorový mechanismus, spojený s asymetrickými změnami turgoru v pohybovém orgánu nazývaném pulvinus na bázi listu. Zatímco na jedné straně dochází k zvyšování turgoru, na straně druhé turgor prudce klesá a to vede k ohybu (Darwin, 1880; Allen, 1969). I když se dotkneme jen jednoho lístku, reakce se šíří a může vést až ke sklopení všech listů na rostlině. Signál, který to umožňuje je zřejmě šířící se akční potenciál (Simons, 1981) a na větší vzdálenosti hydraulický signál cestující xylemem (Stahlberg & Cleland, 2006).

## 2.4 Thigmomorfogeneze

Thigmomorfogeneze byla poprvé definována v roce 1973 jako obecná, pomalá, morfologická reakce rostlin na mechanické působení (Jaffe, 1973). Již dříve si ale vědci všimli, že mechanická manipulace s rostlinami může ovlivňovat jejich růst. Například rostlinky dýně, u kterých se každý den měřil přírůstek příkládáním pravítka, byly na konci pokusu menší, než zbytek rostlin v souboru (Turgeon & Webb, 1971). Darwin pozoroval, že mechanicky stimulované kořeny zpomalují svůj růst (Darwin, 1880). Na rozdíl od velmi rychlých specializovaných thigmotropických a thigmonastických reakcí zmíněných v předchozích kapitolách, je thigmomorfogeneze fenomén, který se projevuje u naprosté většiny rostlin. Minimálně 46 testovaných rostlin z 19 čeledí reaguje na mechanické dráždění změnou růstu (Jaffe, 1980). Ačkoli se thigmomorfogenetické reakce projevují na dlouhých časových škálách a jsou tudíž méně nápadné, než

rychlé pohyby specialisovaných mechanismů masožravých rostlin, efekt mechanického působení může být skutečně ohromující (obrázek 7).

Thigmomorfogeneze se projevuje nejvýrazněji zpomalením prodlužovacího růstu (obrázek 8) a zvýšení růstu radiálního, což vede k vzniku typického fenotypu - menších a celkově kompaktnějších rostlin než u kontroly, ale v závislosti na druhu se mohou projevit i různé další změny, například v poměru nadzemní a podzemní části, obsahu chlorofylu nebo k nárůstu či naopak snížení odolnosti proti suchu (Biddington, 1986) nebo zvýšení odolnosti proti herbivorům (Cipollini Jr., 1997; Chehab et al., 2012).



Obrázek 7: ukázka thigmomorfogeneze. Rostliny napravo byly dvakrát denně mechanicky stimulovány dotykem (Braam, 2005)

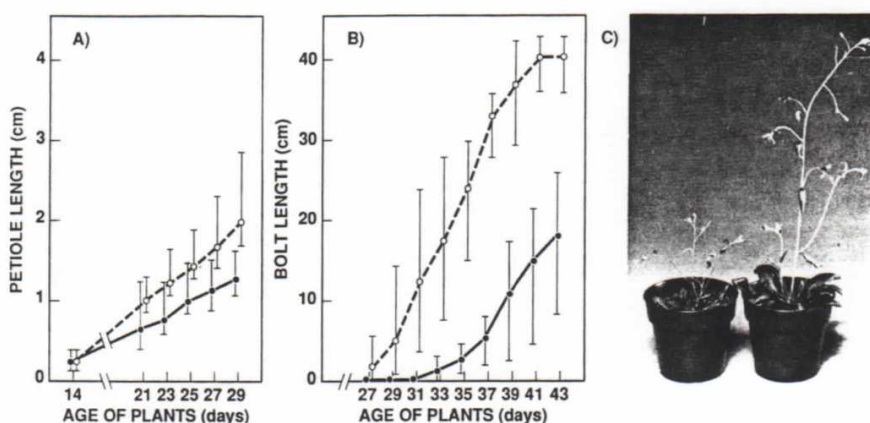
Stonky huseníčku se při dlouhodobém vystavení mechanickému stresu více větví (Pigliucci, 2002) a u citlivky má mechanická stimulace negativní vliv na množství založených květních pupenů (Jaffe, 1973). Mechanické ohýbání mladých jilmů vede nejen k poklesu poměru délky a šířky kmene, ale i k významnému snížení listové plochy (Telewski & Pruyn, 1998). Na rozdíl od nastií a tropismů, které jsou typicky způsobeny změnami objemu motorových orgánů (Jaffe et al., 2002) je thigmomorfogeneze opravdovou změnou morfologie rostliny (Jaffe, 1973).

Je zajímavé, že například u kukuřice vede silné mechanické působení k typické thigmomorfogenetické reakci, ale slabé působení vede naopak k urychlení růstu (Jaffe et al., 1985). Thigmomorfogenetická reakce je jednoznačně závislá na intenzitě mechanického působení, kterému je rostlina vystavena. Když byly rostliny posedu (*Bryonia*) vystaveny pěti dotekům za den, rostly více, než rostliny vystavené dvaceti dotekům, ale méně než kontroly rostoucí zcela bez mechanické stimulace (Jaffe, 1973), u jilmů stimulovaných 5, 10, 20, 40 a 80 ohyby denně se jak délkový přírůstek, tak poměr délky a šířky kmene exponenciálně snižoval v závislosti na množství mechanických podnětů (Telewski & Pruyn, 1998). Thigmomorfogenetická reakce je systematická - pokud je mechanicky drážděna jen část rostliny, změny růstu se projeví v celém jejím těle. To dokládá pokus, kdy byla stimulována jen první internodia fazolového stonku, ale zkrácení internodií a zvětšení průměru stonku se projevilo v celé rostlině. Zároveň, pokud byly dvě fazolové rostliny propojeny roubem na úrovni prvního internodia, došlo při stimulaci jedné rostliny k thigmomorfogenetické reakci i u druhé (Erner et al., 1980). To nasvědčuje existenci mobilního faktoru, který přenáší informaci o mechanic-



kém dráždění po těle rostliny. Tento signál může být po nějakou dobu v buňce uložen, což umožňuje existenci mechanické paměti. Pokud byly semenáčky borovice mechanicky stimulovány v době zimní dormance, thigmomorfogenetická odpověď se u nich dodatečně projevila v létě (Lundqvist, 1996).

Pomocí thigmostimulátoru – válečku, který se mohl pohybovat nahoru a dolů po stonku s definovanou silou – se zjistilo, že thigmomorfogeneze se u fazolu začíná projevovat při 0,3N a při 6N dochází k saturaci. Při detailním zkoumání thigmomorfogeneze na krátké časové škále s podrobným měřítkem se ukázalo, že po stimulaci rostliny fazolu dochází nejprve k dočasnému mírnému zrychlení elongace a teprve následně k jeho zpomalení a následně zastavení na 15 minut (Jaffe, 1976). Při ohnutí stonku rajčete dojde k zastavení elongace během pěti minut a trvá to celou hodinu, než se růst obnoví (Coutand et al., 2000). Dá se tedy říci, že thigmomorfogeneze je poměrně rychlá reakce, přestože její projev je patrný až po delší době při opakovaném dráždění.



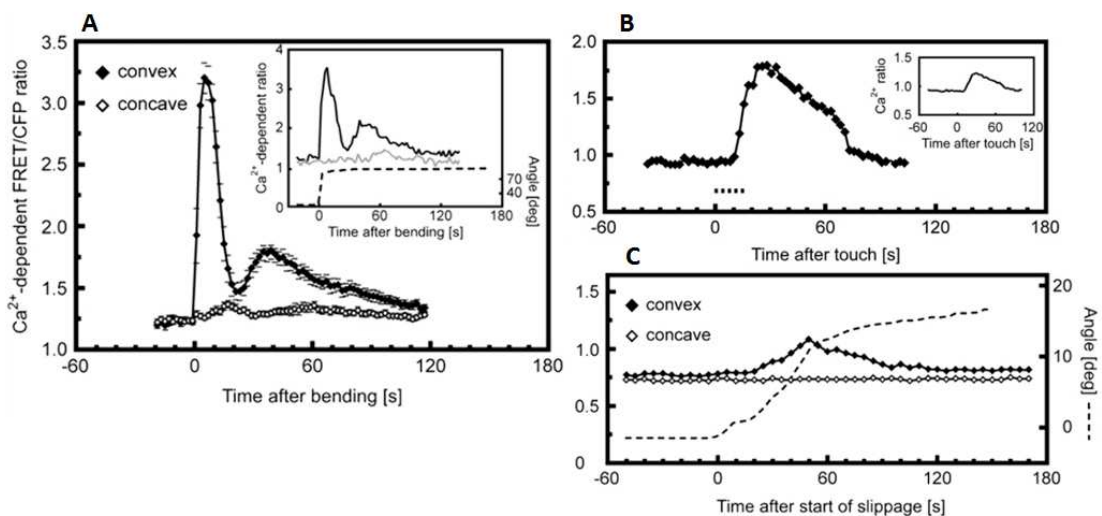
Obrázek 8 - zbrždění růstu u mechanicky stimulovaných rostlin huseničku. Převzato z Braam and Davis, 1990

## 3 PŘÍJEM SIGNÁLU

### 3.1 Role vápníku

Z mnoha experimentů vyplývá, že mechanické působení na rostlinu, ať už je to dotyk nebo jiný mechanický podnět, je spojeno s prudkým přechodným nárůstem koncentrace vápenatých iontů v cytoplasmě (Legue et al., 1997; Fasano et al., 2002; Johnson et al., 1998). Tato reakce je velmi rychlá – k měřitelnému nárůstu koncentrace dochází již během několika vteřin po stimulu, a tak se dá předpokládat, že právě toto je prvotní krok v mechanorecepci (Hofmann, 2009; Knight et al., 1992). Není to nijak překvapivé, protože rostliny používají vápenaté ionty velmi často jako druhého posla v odpovědi na různé environmentální podněty (Rudd & Franklin-Tong, 1999). Koncentrace  $Ca^{2+}$  se v cytoplasmě v klidovém stavu udržuje na velmi nízké úrovni (cca 100nM) díky pumpám, které vápník aktivně čerpají do apoplastu, vakuoly nebo endoplasmatického retikula (Kudla et al.,

2010). Vtok vápenatých iontů je zaznamenán pomocí vazby na kalmodulin a jemu podobné  $\text{Ca}^{2+}$  vázající proteiny, které se vazbou aktivují a spouštějí reakční kaskádu (Luan et al., 2002). Vápníková signalizace je rostlinami využívána při vnímání velkého množství environmentálních podnětů, rostlina je ale zřejmě schopna mezi různými podněty rozlišovat na základě specifického vzoru jaký má vtok vápníku vyvolaný různými stimuly (Monshausen et al., 2009; Trewavas, 1999). Například dotyk vyvolal v kořeni *Arabidopsis* jednofázovou ostrou odpověď s počátkem cca 15s po stimulu a trvající asi 70s, ohnutí vyvolalo dvofázovou odpověď okamžitě po stimulu s prvním ostrým vrcholem cca 5s po ohnutí a druhým nižším cca 40s po ohnutí, s celkovým trváním cca 120s. Když kořen narazil na překážku, koncentrace vápníku se zvedala relativně pozvolně s maximem kolem 50s a na původní úroveň se vrátila asi po 100s (obrázek 9) (Monshausen et al., 2009).



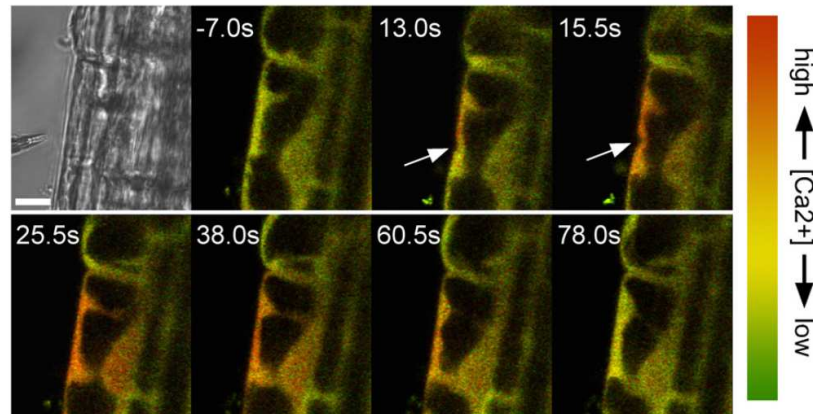
Obrázek 9: změny v koncentraci vápníku vytváří pro různé stimuly typické vzory: A – ohnutí kořene, B – dotyk, C – překážka v růstu (Monshausen et al., 2009).

Ke studiu vápníkových fluktuací po mechanickém působení mohou být použity transgenní rostliny tabáku exprimující v cytoplasmě aequorin (Knight et al., 1992). Aequorin je protein z medúzy *Aequorea victoria*, který po navázání vápenatých iontů emituje modré světlo. Změny v koncentraci cytoplasmatického vápníku jsou pak patrné jako modré záblesky. Díky tomuto systému se podařilo ukázat, že působení větru nebo dotyku, či dokonce vystavení osmotickému stresu vede k prudkým zvýšením koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplasmě (Trewavas & Knight, 1994; Knight et al., 1993). Dalším indikátorem koncentrace vápníku v buňce, který se používá v některých studiích, je Yellow Cameleon (YC) – protein odvozený od GFP, který v závislosti na koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  mění barvu své fluorescence (obrázek 10) (Monshausen et al., 2009; Allen et al., 1999).

Ukázalo se, že koncentrace vápníku v cytoplasmě se zvyšuje úměrně síle, která na pletivo působí, což umožňuje graduální odpověď – poryvy větru odpovídající síle od 1; 3,5; 6,5; 9; 10,5 a 12N vyvolaly u rostlin exprimujících aequorin graduálně se zvyšující intenzitu luminiscence 0, 2, 14, 49, 73 a 100% (Trewavas & Knight, 1994). Zároveň se při opakovaném dráždění v rychlém sledu projevuje



atenuace aequorinových záblesků (obrázek 11), což zřejmě souvisí s vyčerpáním vápníku v zásobních organelách, po určité době dojde k obnově citlivosti, pravděpodobně vlivem  $\text{Ca}^{2+}$  pump, které obnoví zásoby  $\text{Ca}^{2+}$  (Knight et al., 1992). O významu vápníkové signalizace v thigmomorfogenezi svědčí i to, že u semenáčků soji se podařilo částečně blokovat thigmomorfogenetickou reakci přidáním EGTA, která je chelatačním činidlem s vysokou afinitou k vápenatým iontům, stejný efekt mělo přidání inhibitorů kalmodulinu calmidazolium a chlorpromazinu (Jones & Mitchell, 1989).



Obrázek 10: přechodné zvýšení koncentrace vápníku v místě dotyku, v pokožkových buňkách kořene huseničky vizualizované pomocí  $\text{Ca}^{2+}$  senzitivního fluorescenčního proteinu Yellow Cameleon. (Monshausen et al., 2009)

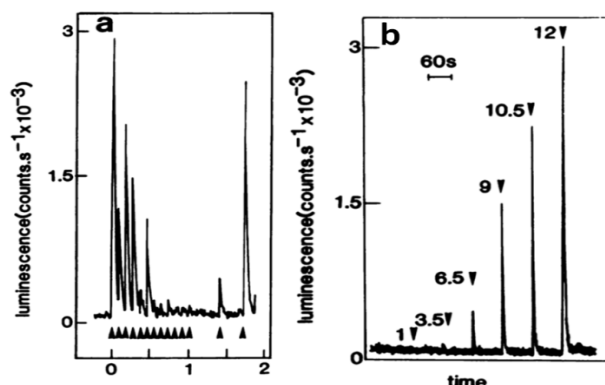
## 4 VNÍMÁNÍ SIGNÁLU

Otázkou je, jak vlastně funguje přenos vnějšího mechanického signálu do buňky a jak jej rostlina vnímá. V současné době existují dvě hlavní teorie. Jenda předpokládá, že za vnímáním mechanických podnětů stojí kanály aktivované tahem (stretch activated ion channels), které se při mechanickém působení otevřou, a následný tok iontů vede k fyziologické reakci. (Ding & Pickard, 1993) Druhá teorie předpokládá fyzické propojení buněčné stěny s plasmatickou membránou a cytoskeletem (Baluška et al., 2003). Mechanický signál by se tak z vnějšku přenášel dovnitř buňky mechanicky a tam by se přeměnil na fyziologický.

### 4.1 Iontové kanály

Iontové kanály aktivované tahem jsou transmembránové proteiny s irisovým pórem (obrázek 12a,b). Protein při laterálním mechanickém napnutí membrány mění konformaci, pór se otevírá a tím umožňuje tok iontů přes membránu. Tahem aktivované kanály jsou podstatou vnímání mechanických signálů u živočichů. Smysly jako hmat a sluch využívají právě neuronů s tahem aktivovanými

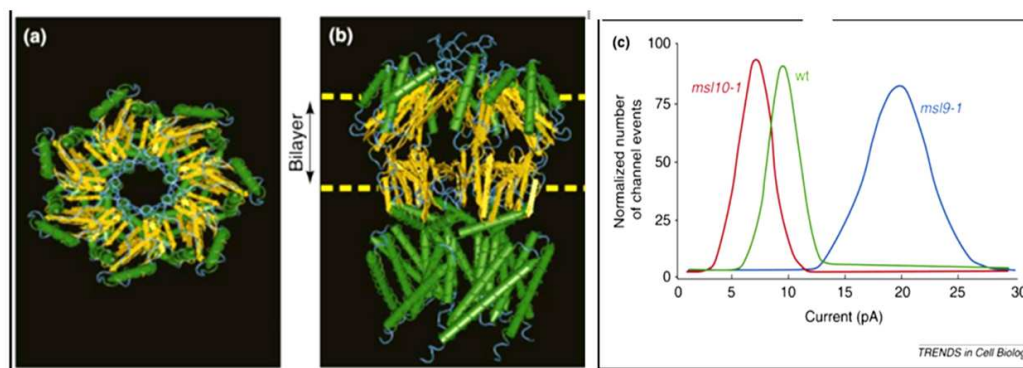
kanály v membráně. Jejich otevření vede k vtoku iontů, depolarizaci membrány a v případě dostatečně silného podnětu ke vzniku akčního potenciálu. (Del Valle et al., 2012).



Obrázek 11: koncentrace Ca<sup>2+</sup> v buňce vyjádřena luminiscencí aequorinu. (a) atenuace citlivosti při opakovaném dráždění a obnovení po určité regenerační době, (b) míra luminiscence odpovídá síle stimulace – zde luminiscence při různé síle podnětu od 1 do 12 N. dle (Knight et al., 1992)

#### 4.1.1 Kanály MSL

U Rostlin se v genomu nenašly žádné homology živočišných tahem aktivovaných kanálů, ale v roce 1988 byly pomocí patch clamp analýzy poprvé objeveny tahem aktivované kanály v protoplastech tabáku (Falke et al., 1988). U *Arabidopsis* bylo objeveno 10 mechanosenzitivních proteinů (Haswell et al., 2008) označovaných jako MSL - tedy MSC like proteiny, což znamená mechanosenzitivní channel of small conductance like. Ty jsou dobře charakterizované u *E.coli*, kde slouží jako ochranná pojistka při náhlé změně osmotického tlaku okolního media - pokud dojde k prudkému poklesu osmolarity media, otevřou se MSL, umožní výtok osmoticky aktivních látek ven, a tím zabrání prasknutí buňky (Martinac & Buechner, 1987). Dosud bylo objeveno 6 homologů bakteriálních MSC v genomu rýže. MSL se dělí na dvě skupiny. MSL skupiny I mají lokalizační sekvence, které je tapetují do organel, jako jsou mitochondrie a chloroplasty, MSL skupiny II jsou lokalizované v plasmatické membráně.



Obrázek 12: model tahem aktivovaného iontového kanálu z vrchu (a) a ze strany (b). výsledky patch clamp analýzy na ztrátových mutantech *msl10-1* a *msl9-1* napovídají, že MSL9 a MSL10 mohou tvořit heteromerní kanál (Monshausen & Gilroy, 2009b)

Z deseti MSL u *Arabidopsis* jsou MSL1-3 ve skupině I a MSL4-10 ve skupině II (Kurusu et al., 2013). MSL2 a 3 jsou lokalizovány v plastidech, kde mají funkci v zajišťování morfologie a správného dělení plastidu - stejně tak funguje jejich ortolog v *Chlamydomonas* (Haswell & Meyerowitz, 2006). MSL9 a MSL10 jsou exprimované v kořenech v překrývajícím se ale ne shodném vzoru, fúze s GFP ukázala, že MSL9 a MSL10 se exprimují polarisovaně na apikální a bazální straně buněk a v Hechtových provazcích. Při patch clamp analýze na protoplastech z kořenů *Arabidopsis* se dokázala mechanosenzitivita MSL kanálů, při pokusech se ztrátovými mutanty *msl9-1* a *msl10-1* vyšlo najevo, že každý z mutantů se chová jinak, a ani jeden nemá kanál stejné konduktance jako divoký typ, zdá se, že MSL9 a MSL10 vytváří dohromady heteromerní kanál (obrázek 12c) (Haswell et al., 2008). I u dvojitého ztrátového mutantu *msl9/10* se při patch clamp analýze objevovaly vzruchy při mechanickém působení. Ty zmizely až po odstranění dalších MSL kanálů – MSL4, MSL5 a MSL6 (Haswell et al., 2008). Mechanosenzitivní kanály s podobnými elektrofysiologickými charakteristikami, jako má MSL9 a MSL10 v kořenech, se podařilo nalézt i v mesofylových buňkách *Arabidopsis* (Qi et al., 2004).

Předchozí výzkum sice odhalil, že na membráně *Arabidopsis* se vyskytují kanály s mechanosenzitivní aktivitou, jejich vliv v mechanoreceptci je ale sporný – ani pětinašobný ztrátový mutant v genech MSL4, MSL5, MSL6, MSL9, a MSL10, který už nevykazoval žádné měřitelné elektrofysiologické změny při změnách tlaku, neměl žádný fenotyp a nedal se rozeznat od divokého typu, ani když se pěstoval na různě osmoticky aktivních médiích, a za různých mechanických nebo hydratačních stresů. Navíc se z elektrofysiologických studií zdá, že MSL9 a MSL10 přenášejí spíše chloridové než vápenaté ionty (Haswell et al., 2008; Peyronnet, 2008). Zdá se tedy, že rostliny musí mít ještě jiný systém pro vápníkovou signalizaci mechanických podnětů (Haswell et al., 2008). Je možné, že MSL9 a MSL10 fungují například tak, že způsobují depolarizaci buněčné membrány, což vede k otevření vápníkových kanálů (Peyronnet, 2008).

### 4.1.2 Kanály MCA

dalším kandidátem na molekulární mechanosensor, jsou proteiny MCA. Protein MCA1 byl objeven při výzkumu kvasinkového mutantu MID1 (Nakagawa et al., 2007). Tomu chybí mechanosenzitivní kanál pro vápenaté ionty. Když se do kvasinkového mutantu přidala cDNA z *Arabidopsis*, mutace se komplementovala (MCA1 znamená „MID1 complementing activity 1“). Protein MCA1 měl jen 10% shodu a 40% podobnost s původním kvasinkovým proteinem. MCA proteiny nejsou přítomny u živočichů, hub, protist ani u řas, ale jsou přítomny u všech rostlin od mechů přes kapradiny po semené rostliny, což naznačuje, že u vyšších rostlin mají významnou funkci (Kurusu et al., 2013). U *Arabidopsis* se nachází dva paralogy – MCA1 a MCA2 (Nakagawa et al., 2007), které mají částečně odlišnou expresi v různých orgánech a zřejmě se liší i svou funkcí (Yamanaka et al., 2010). Přes svou funkci v přenosu vápníku nejsou MCA homologní s žádným jiným známým kanálem nebo

přenašečem (Kurusu et al., 2013). Analýza domén ukázala, že část proteinu na N-konci, která obsahuje konzervovanou transmembránovou část, je nezbytná a zároveň dostačující k přenosu vápenatých iontů přes membránu, mutace vysoce konzervovaného Asp<sup>21</sup> na Asn<sup>21</sup> vede u MCA1 k úplné a u MCA2 k částečné ztrátě přenosové aktivity. MCA1 i MCA2 tvoří v membráně tetramery s pórem propustným pro Ca<sup>2+</sup> vznikajícím mezi transmembránovými doménami. (Nakano et al., 2011). Díky expresi fúzního proteinu NtMCA1-GFP v buňkách tabákové suspenze buněčné linie BY-2 se ukázala lokalizace na plasmatické membráně a v Hechtových provazcích (Kurusu et al., 2012). MCA1 a MCA2 nejen, že komplementují *mid1* mutaci u kvasinek, ale u huseníčku se zvýšenou expresí MCA1 dochází k zvýšené kumulaci Ca<sup>2+</sup> v kořenech ve srovnání s divokým typem a se ztrátovým mutantem. Byly provedeny pokusy se Ztrátovým mutantem (*mca1-null*) a mutantem s vyšší expresí (*MCA1ox*), kteří zároveň exprimovali aequorin a byli vystaveni hypoosmotickému stresu a ukázalo se, že nárůst koncentrace Ca<sup>2+</sup> v cytoplasmě byl znatelně vyšší u *MCA1ox* než u divokého typu a *mca1-null*. To naznačuje že MCA1 je zapojen do vápníkové signalizace při změně napětí membrány (Nakagawa et al., 2007). Exprese MCA1 z huseníčku způsobila v buňkách vaječnicků čínských křečků (buněčná linie CHO) i v oocytech drápatky (*Xenopus laevis*) zvýšený vtok vápenatých iontů při mechanickém napínání membrány (Nakagawa et al., 2007; Furuichi et al., 2012).

Pro ověření toho, zda mají MCA vliv na vnímání dotyku u kořenů, byla vyvinuta metoda, při které se nechají semenáčky huseníčku růst 0,8% agarovým médiem pod kterým je vrstva 1,6% agarového media. Zatímco divoký typ se dokázal na změnu tvrdosti agaru přizpůsobit a prorostl jím, ztrátovému mutantovi se to nepodařilo. Přidání MCA1 do *mca1-null* komplementovalo mutaci a tyto rostlinky byly schopné prorůstat stejně jako divoký typ (Nakagawa et al., 2007). ztrátový mutant v genu MCA2 vystavený stejnému pokusu prorůstal bez problémů stejně jako divoký typ, na rozdíl od ztrátového mutantu v obou MCA genech, zřejmě proto, že MCA2 se na rozdíl od MCA1 neexprimuje v kořenové špičce. To napovídá rozdílné funkci MCA1 a MCA2 u rostlin (Yamanaka et al., 2010). O vlivu MCA1 v mechanoreceptci svědčí i to, že jeden z dotykem indukovaných genů, kalmodulinu podobný protein TCH3, je nadprodukován v *MCA1ox* mutantovi, jako by rostlina neustále vnímala dotyk (Nakagawa et al., 2007).

Je škoda, že s mutanty v MCA genech nebyly vyzkoušeny klasické dotykové thigmomorfogenetické pokusy jaké prováděl na řadě rostlin např. Jaffe (1973), protože přes zajímavé výsledky na buněčné úrovni při osmotickém stresu stále nevíme, jestli se jedná o receptory stojící za thigmomorfogenezí.

MSL kanály i MCA jsou lokalizovány na plasmatické membráně. Z některých studií ale vyplývá, že zvýšení cytoplasmatického Ca<sup>2+</sup> vychází z vnitřních zásob v organelách jako je endoplasmatické retikulum, nebo vakuola. Pro zablokování tahem aktivovaných iontových kanálů na plasmatické membráně se používají ionty Gd<sup>3+</sup> a La<sup>3+</sup>, u rostlin ale tyto inhibitory nedokázaly zabránit zvyšování koncentrace Ca<sup>2+</sup> v cytoplasmě po vystavení poryvům větru, což naznačuje, že vápenaté ionty po-

cháží z vnitřních zásob (Knight et al., 1992) tomu by odpovídalo i úspěšné zablokování nárůstu  $\text{Ca}^{2+}$  při použití malých koncentrací rutheniové červeně  $[\text{Ru}_3\text{O}_2(\text{CH}_3)_{14}]\text{Cl}_6$ , o níž se věří, že inhibuje uvolňování vápenatých iontů z endoplasmatického retikula (Trewavas & Knight, 1994; Fisahn, 2004). Je možné i to, že výtok  $\text{Ca}^{2+}$  z mechanosensitivních kanálů na endoplasmatickém retikulu způsobí otevření vápníkem aktivovaných vápníkových kanálů na plasmatické membráně, nebo naopak (Chehab et al., 2009).

## 4.2 Buněčná stěna

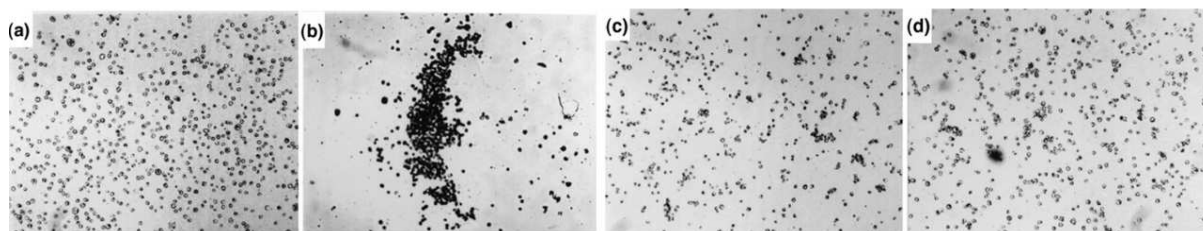
Druhá teorie předpokládá, že v mechanorecepci hraje roli propojení buněčné stěny s plasmatickou membránou a cytoskeletem, neboli Cytoskeleton Plasma Membrane Cell Wall continuum (CPMCW) (Baluška et al., 2003). První, na co působí dotykový signál, je právě buněčná stěna. Vzhledem k tomu, že turgor protoplastu je 2-10 ale i 50 atmosfér, je protoplast na buněčnou stěnu velmi těsně přitisknut. To na jednu stranu dovoluje velmi dobrý přenos mechanické informace, protože každý pohyb se hned přenáší na membránu, na druhou stranu může být tlak tak silný, že naopak vnější podnět nezpůsobí dostatečnou deformaci buňky, která by vedle ke spuštění signalizace.

### 4.2.1 Integriny u rostlin

Interakci mezi extracelulární matrix a vnitřkem buňky zajišťují u živočichů membránové proteiny integriny, které se vážou extracelulární doménou na glykoproteiny, které tvoří matrix, jako jsou fibronectin, vitronectin, laminin a další a intracelulární částí komunikují např. s cytoskeletem. Glykoproteiny ECM obsahují ve své aminokyselinové sekvenci úseky RGD (**Arg-Gly-Asp**) a pro integriny je typické, že právě tuto sekvenci vážou, jsou proto označovány jako proteiny vázající RGD (RGD binding proteins). V genomu *Arabidopsis* se nenašly žádné sekvenční homology integrinů, přesto ale některé studie ukazují, že v rostlinné cytoplasmatické membráně se nachází proteiny s obdobnou funkcí. Canut et al., (1998) zjistili, že přidání syntetického heptapeptidu obsahujícího RGD sekvenci (Tyr-Gly-**Arg-Gly-Asp**-Ser-Pro) vedlo u plasmolysovaných buněk pokožky cibule a plasmolysovaných buněk suspenzní kultury huseníčku k zániku Hechtových provazců a odpoutání protoplastu od stěny (obrázek 14A,B). Kontrolní heptapeptid se zrcadlově obrácenou RGD skupinou (Tyr-Gly-**Asp-Gly-Arg**-Ser-Pro) neměl na buňky žádný efekt. O přítomnosti proteinů vázajících RGD v plasmalemě svědčí i další Canutův pokus s protoplasty huseníčku. Do suspenze protoplastů se přidal syntetický protein ProNectinF, který obsahuje 13 RGD sekvencí. Protoplasty v jeho přítomnosti koagulovaly do shluků a přidáním heptapeptidu s RGD došlo k opětovnému rozrušení vazeb mezi protoplasty (obrázek 13).

Některé studie zjistily, že fluorescenčně značené polyklonální protilátky proti živočišným integrinům se vážaly na plasmatickou membránu huseníčkových protoplastů (Faik et al., 1998) a v genomu huseníčku se našly proteiny obsahující některé konzervované integrinové domény (Chabannes & Carrie, 1999). Jejich jinak nízká sekvenční podobnost s opravdovými živočišnými integriny ale na-

značuje, že se nejspíše jedná o proteiny ze skupiny signálních receptorů, které mají odlišnou strukturu, ale sdílí s integriny schopnost vázat RGD ligandy (Jaffe et al., 2002).



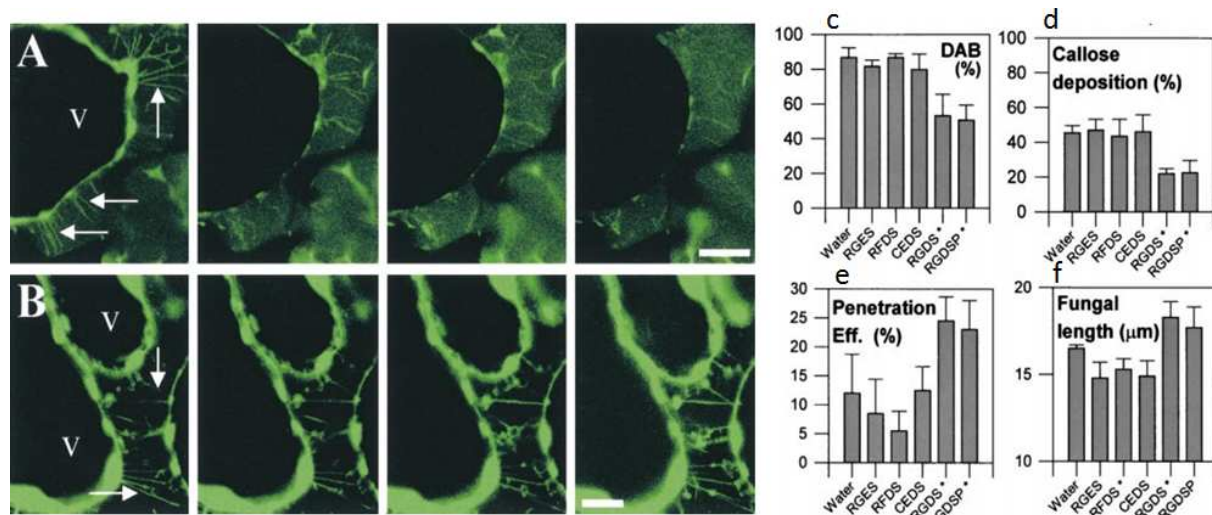
Obrázek 13: protoplasty huseníčku. Bez přidaných látek (a), s proteinem ProNectinF(3,5 μM), který obsahuje 13 RGD sekvencí (b) s přidáním 3,5 μM BSA jako kontrola (c) a po přidání YGRGDSP peptidu k protoplastům s proteinem ProNectinF - situaci z obrázku b (Canut et al., 1998)

Lü et al. (2012) objevili v genomu huseníčku pomocí imunologického screeningu s protilátkou proti integrinu protein označený AT14A. Jedná se o transmembránový protein, který má několik úseků své aminokyselinové sekvence shodných s integriny. Autoři netestovali jeho schopnost vázat RGD sekvence, nicméně pokusy ukázaly, že by mohl skutečně fungovat jako střední člen v kontinuu cytoskeletu, plasmatické membrány a buněčné stěny, jelikož protoplasty ztrátového mutanta *At14a-1* se v hyperosmotickém prostředí více odlepovaly od buněčné stěny (Lü et al., 2012).

Buňky chryzantémy zalité v agarovém mediu, ve kterém byl vytvářen jednosměrný tlak, rostly a dělily se převážně ve směru kolmém k ose působení tlaku. Přidání peptidu obsahujícího RGD tento efekt výrazně zeslabovalo, peptid obsahující kontrolní sekvenci DGR žádnou změnu nevyvolal. Podobný efekt mělo přidání kolchicinu (v koncentraci 5mM), který rozrušuje mikrotubulární cytoskelet, naopak přidání cytochalasinu B (o koncentraci 50 μg/ml), který rozrušuje aktinový cytoskelet, nevyvolalo žádnou změnu (Zhou et al., 2007). Zdá se, že nejen propojení stěny a membrány, ale i připojení na mikrotubulární cytoskelet je důležité pro mechanorepci, na druhou stranu samotné rozrušení kortikálních mikrotubulů jistě ovlivní schopnost polarizace buňky a možná se nejedná o ztrátu schopnosti vnímat mechanické působení, ale o ztrátu schopnosti odpovědět na něj.

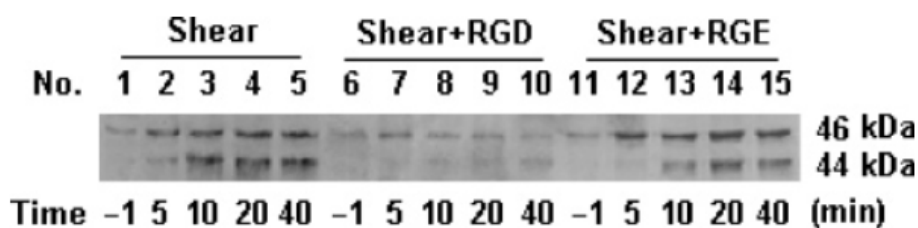
Ošetření pomocí peptidů obsahujících RGD sekvenci vedlo u hrachu (*Pisum sativum*) a vigny čínské (*Vigna unguiculata*) ke snížení odolnosti proti houbové infekci, zatímco ošetření kontrolními peptidy které neobsahovaly RGD sekvenci nemělo tento efekt. Ošetření RGD způsobovalo, že rostliny produkovaly méně peroxidu vodíku a kalosy v místě napadení a houby lépe penetrovaly do pokožkových buněk (obrázek 14c-f) (Mellersh & Heath, 2001). Obrana proti houbové infekci je přitom prokazatelně spojena s vnímáním mechanického dotyku houbové hyfy a dá se vyvolat například dotyky wolframového drátku odpovídající tloušťky, jako má hyfa (Gus-Mayer et al., 1998). Tyto výsledky naznačují, že proteiny vázající RGD sekvence mají význam v mechanorepci u rostlin.





Obrázek 14: ztráta Hechtových provazců v plasmolysovaných buňkách po přidání peptidu s RGD sekvencí (A) ve srovnání s kontrolním peptidem (B) obrázky zleva ukazují stav před aplikací a 1, 3 a 5 minut po aplikaci peptidů (Canut et al, 1998). Grafy ukazují průběh houbové infekce v přítomnosti různých peptidů obsahujících a neobsahujících RGD sekvencí: (c) množství produkce peroxidu vodíku do stěny, (d) deposice kalosy do stěny po napadení, (e) míra penetrace houbové hyfy, (f) délka houbových hyf (dle Mellersh and Heath, 2001)

Vliv RGD peptidů na vyvolání thigmomorfogenetické reakce na úrovni celých rostlin nebyl dosud testován (například s použitím rostlin exprimujících peptidy obsahující RGD pod inducibilním promotorem), nicméně na buněčné úrovni se již poznatky o vlivu RGD na přenos mechanické informace využívají v biotechnologické praxi. Suspenzní kultura buněk tisu (*Taxus cuspidata*) pěstovaná pro komerční produkci taxolu ve velkém bioreaktoru trpí při promíchávání mechanickým stresem, což je hlavní překážka při zvětšování objemů suspenzí kultur rostlinných buněk. Ukázalo se, že přidání syntetického RGD peptidu výrazně snižuje produkci reaktivních forem kyslíku, akumulaci fenolických látek, alkalizaci media a míru fosforylace MAPK kaskád (obrázek 15), což jsou typicky projevy obranné odpovědi proti střížnému stresu v kultuře tisových buněk a ukazuje to, že RGD vázající proteiny mají významnou roli ve vnímání mechanického stresu (Gao et al., 2007).



Obrázek 15: Vliv RGD peptidu na MAP kinase-like aktivitu. Buňky tisu byly vystaveny střížnému stresu mícháním po doby 1 min a následně ponechány v klidu. Extrahované proteiny byly analyzovány pomocí western blotu s protilátkou proti fosforylovaným formám savčích ERK (extracellular-signal-regulated kinase), což je skupina MAP kinas (Mitogen-activated protein kinase) (Gao et al., 2007).

Molekulární identita RGD vázajících proteinů zůstává neznámá, až na několik potenciálních kandidátů jako je At14a (Lü et al., 2012) nebo LecRK-I.9 (At5g60300) (Gouget et al., 2006). Literatura také neuvádí, které proteiny buněčné stěny vlastně obsahují RGD sekvence, namátkovým prohledáváním sekvencí některých stěnových proteinů ve veřejných databázích jsem žádné kandidáty neodhalil.

## 4.2.2 Receptorové kinázy

WAK, (wall associated kinases), jsou skupinou proteinů, které představují dobré kandidáty na přenašeče signálu mezi stěnou a cytoplasmou. Jsou to transmembránové proteiny a mají extracelulární doménu, která je ukotvena do stěny, a intracelulární doménu, která má kinasovou aktivitu. Pokusy s enzymy štěpícími různé složky buněčné stěny ukázaly, že WAK se vážou extracelulární doménou na pektiny, protože pouze pektinázy vedly k odpojení WAK od stěny (Anderson et al., 2001). Zároveň se ukázalo, že WAK1 je schopna vázat GRP3 - strukturní protein buněčné stěny bohatý na glycin (Ringli, 2010). Prohledávání sekvenčních databází vedlo k objevení rodiny 22 proteinů podobných WAK, označených jako WAKL (WAK-Like) (Verica & He, 2002), které podobně jako WAK kódují transmembránové proteiny s cytoplasmatickou Ser/Thr kinasovou doménou a extracelulární doménou komunikující se stěnou.

Lectinové receptorové kinázy (LecRKs) jsou skupinou receptorových kináz které mají na extracelulární části lectinovou doménu schopnou vázat cukerné řetězce stěnových polysacharidů. Kromě toho minimálně některé LecRK umí vázat i stěnové proteiny a pomocí peptidů obsahujících sekvenci RGD je možné je při plasmolýze od stěny odpoutat (Gouget et al., 2006).

Pokusy s buňkami tisu rostoucími v míchaném mediu ukázaly, že při zvýšené mechanické zátěži dochází k vyšší fosforylaci MAPK (Gao et al., 2007). Vzhledem k tomu, že přidání RGD peptidu tuto reakci dramaticky snížilo (obrázek 15), dá se předpokládat, že tuto fosforylaci měla na svědomí nějaká z RGD vázajících WAK, například výše zmíněná LecRK (Gouget et al., 2006). Takovéto mechanicky spouštěné kinázové kaskády mohou být jednou z cest ke změnám genové exprese, ke kterým po mechanické stimulaci dochází.

## 4.2.3 Forminy

V genomu *Arabidopsis* bylo objeveno několik genů, které kódují forminy. Ty u živočichů modulují aktinový cytoskelet. V predikované proteinové sekvenci většiny z nich byly překvapivě nalezeny možné transmembránové domény, což je zásadní rozdíl oproti živočišným forminům. Forminy by tak u rostlin mohli hrát roli spojky mezi membránou a aktinovým cytoskeletem. Na předpokládané extracelulární části proteinu je u forminů AtFH2, 6 a 8 na prolin bohatá oblast podobná extensinu, která by mohla hypoteticky ukotvovat tyto forminy v buněčné stěně (Cvrčková, 2000). Intracelulární domény FH1 a FH2 jsou schopné nejen iniciovat skládání aktinových vláken, ale zdá se, že forminy jsou schopné pomocí těchto domén také interagovat s dalšími proteiny, například s aktin vázajícím profilinem (Deeks et al., 2005), což zesiluje jejich schopnost propojovat membránu a cytoskelet. Rostlinný formin AtFH4 z *Arabidopsis* obsahuje kromě domén FH1 a FH2, které interagují s aktinem, ještě nově objevenou doménu GOE, která je schopna vázat se na mikrotubuly. Protože obsahuje i transmembránovou doménu, je tento protein silným kandidátem na spojku mezi membránami a aktinovým a zároveň mikrotubulárním cytoskeletem (Deeks et al., 2010). Pozorování tohoto forminu značeného GFP ukázalo, že AtFH4 se vyskytuje v buňce na místech kontaktu me-



zi mesofylovými buňkami, tedy v místě kde typicky dochází k přenosu pnutí při mechanické zátěži pletiva (Deeks et al., 2005). Díky takovýmto propojením by mohl být mechanický stres přenášen přímo na cytoskelet a po něm cestovat do nitra buňky. Fluorescenčně značený AtFH4 byl pozorován v kolokalizaci s endoplasmatickým retikulem (Deeks et al., 2010), a tak tvoří jeden z možných spojů cytoskeletu nejen s plasmatickou membránou ale i s tímto membránovým kompartmentem. Význam takového spoje v mechanoreceptci je nasnadě – mechanický podnět putuje přes cytoskelet na membránu ER a tím dochází k otevření mechanosensitivních kanálů a výtoku  $\text{Ca}^{2+}$  z vnitřních zdrojů.

Ačkoli mají forminy všechny předpoklady k tomu, aby byly významným prvkem v mechanoreceptci, nenašel jsem žádné studie, které by jejich význam experimentálně ověřovaly.

#### **4.2.4 Další propojení**

Arabinogalaktanové proteiny (AGP) nejsou na rozdíl od předchozích transmembránové proteiny. Jsou sekretovány do stěny, kde mohou interagovat s pektiny, mají ale i GPI (glykosylphosphatidylinositol) kotvu, která jim umožňuje komunikaci s membránou. AGP by také mohly interagovat s WAK, protože se v membráně vyskytují kolokalizovaně ve stejných doménách (Gens et al., 2000). To jim umožňuje potenciálně přenášet mechanické signály. Kromě toho je exprese AGP zvýšena po dotyku (Lee et al., 2005). Celulosa synthasy jsou transmembránové proteiny syntetizující celulosu do buněčné stěny. Tím přirozeně propojují buněčnou stěnu a plasmatickou membránu. Pohyb celulosa synthasy v membráně je řízen podle rozložení kortikálních mikrotubulů, interakce s cytoskeletem je ale spíše nepřímá a je otázkou zda mohou být efektivními přenašeči signálu (Bringmann et al., 2012). Další možnou spojkou je rostlinný myosin VIII, který se samozřejmě váže k aktinovému cytoskeletu, kromě toho ale zřejmě také interaguje s kalosynthasou, čímž je připojen ke stěně (Baluška et al., 2003).

Význam spojek mezi stěnou membránou a cytoskeletem pro vnímání mechanických podnětů je založen na teorii tensegrity vnitřního prostředí buňky (Ingber, 1997). Ta předpokládá, že jednotlivé buněčné struktury jsou propojené a deformace jedné vede k deformaci dalších. Tak může mechanický signál otevírat kanály na plasmatické i vakuolární membráně. Teorie dokonce předpokládá přenos mechanického signálu přímo na DNA, jejíž deformace by odkrývaly regulační místa a umožňovaly nasedání transkripčních faktorů. Mnoho z výše zmíněných proteinů je potenciálně významných v mechanoreceptci právě proto, že toto propojení svou strukturou a lokalizací umožňují. Experimentální ověření jejich významu však u většiny dosud není k dispozici.

### **4.3 Geny indukované dotykem**

První objev genů, které zvyšují svou expresi po mechanickém stimulu, byl učiněn šťastnou náhodou. Při výzkumu genové regulace po aplikaci giberelinů se zvedala exprese pěti genů i u rostlin klopených roztoky auxinu, cytokininů, kyseliny abscisové a dokonce i u kontrolních rostlin, klopených čistou vodou. Ukázalo

se, že je to reakce na dopadající kapky a tyto geny jsou indukované mechanickými podněty. Dostaly označení *TCH1 – TCH4* (Braam & Davis, 1990). Ukázalo se, že *TCH* reagují na zranění, dotyk, zalití, dopadající kapky a vítr a překvapivě i na přenos ze světla do tmy, naopak opatrné zvedání a pohyb nebo hudba nevyvolaly žádnou reakci. Expze se zvyšovala v závislosti na množství – u 2, 5 a 10x ohnutých listů se množství mRNA postupně zvyšovalo, především u *TCH3* (Braam & Davis, 1990). *TCH1* je rostlinný kalmodulin *TCH2* a *TCH3* jsou kalmodulinu podobné vápník vázající proteiny (*CML24* a *CML12*) a *TCH4* kóduje celulasu *XTH* (xyloglucosyl endotransglukosylase/hydrolase) (Chehab et al., 2009). Pomocí microarray analýzy byl proveden test změn expze 22810 genů přítomných na genovém čipu Affimetrix (Lee et al., 2005). Ukázalo se, že 589 genů huseníčku se po dotyku exprimuje více a 171 se exprimuje méně. Nejvíce se zvyšovala expze vápník vázajících proteinů a proteinů modifikujících stěnu, dále proteinů spojených s reakcí na poranění a obranou před patogeny a genů kódujících kinázy a transkripční faktory. Méně se naopak exprimovaly proteiny spojené s obecným metabolismem, (Lee et al., 2005). Zajímavé je, že 53% genů, které mění expzi po dotyku, mění expzi i po zatemnění, a naopak, 67% genů indukovaných zatemněním, se exprimuje i při dotyku. Jaké je spojení mezi vnímáním dotyku a tmy není jasné. Naopak méně překvapivý je výzkum Kimbrough et al., (2004), který v microarray analýze provedené na kořenech huseníčku ukázal, že 96% genů indukovaných dotykem mění expzi při gravitropickém stimulu, což naznačuje možnou existenci společné recepční dráhy v mechanoreceptci a gravireceptci. Podnět ke zvýšení expze *TCH* genů je pravděpodobně přenášen přes kinasové kaskády, protože inhibitor proteinkinasy staurosporin blokuje syntézu *TCH3* (Wright et al., 2002). Ty mohou být odstartovány například aktivitou *WAK*, nebo přes kalmoduliny aktivované změnami koncentrace  $Ca^{2+}$  po dotyku.

Je pravděpodobné, že primární růstová odpověď při thigmomorfogenezi není závislá na změnách genové expze, ale je řízena čistě fyziologickými a chemickými prostředky. Změny v expzi dotykem indukovaných genů jsou patrné nejdříve během 10-15 minut (Braam & Davis, 1990), zatímco k zastavení růstu po mechanickém dráždění dochází u některých rostlin takřka okamžitě (Jaffe, 1980). Dotykem indukované geny mohou řídit pozdější projevy thigmomorfogeneze jako je zvýšení odolnosti proti patogenům nebo změna alokace biomasy mezi kořeny a prýtem.

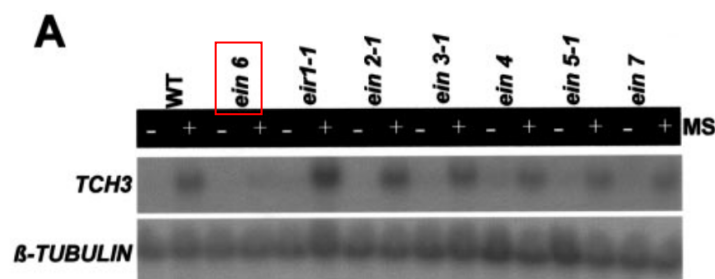
## 4.4 Role růstových regulátorů

### 4.4.1 Ethylen

Ethylen byl dlouho považován za silného kandidáta na modulaci thigmomorfogenetické odpovědi. U mechanicky podrážděných rostlin se totiž zvyšovala jeho syntéza a uvolňování do okolí a zvyšovala se expze *ACC synthasy* – jednoho z klíčových enzymů biosyntézy ethylenu (Biro & Jaffe, 1984) Exogenní přidání ethylenu zároveň vedlo u rostlin k odpovědi podobné jako je ta thigmomorfogenetická, protože ethylen brzdí prodlužovací růst a zároveň urychluje růst radiální (Biro & Jaffe, 1984)

Výzkum provedený na mutantech necitlivých k ethylenu (*ein2-1* a *etr1-3*) (Johnson et al., 1998) však význam ethyleny výrazně zpochybnil. ETR1 je histidinová kináza, která zřejmě slouží jako receptor ethyleny, funkce EIN2 není jednoznačně určena, ale ztrátový mutant na ethylen neodpovídá (Bisson et al., 2009). Mutanti *ein2-1* i *etr1-3* byli vystaveni poryvům větru (30 minut denně na ně bylo foukáno větrákem), dotyku a vibracím (tácy s rostlinami byly postavené na subwoofer s frekvencí 50Hz a hlasitostí 90dB). Oproti očekávání reagovali mutanti ve všech ohledech stejně jako divoký typ a projevovali stejné thigmomorfogenetické změny. Zároveň docházelo i u mutantů k zvýšení regulace *TCH* genů jako u divokého typu (Johnson et al., 1998). Jiní výzkumníci (Wright et al., 2002) udělali velký test – mutanti necitliví k ethyleny - *eir1-1*, *ein2-1*, *ein3-1*, *ein4*, *ein5-5*, *ein6*, *ein7*, *hls1-1* a *etr1-1*, mutanti se zvýšenou produkcí ethyleny *eto1-1*, *eto2* a *eto3*, a *ctr1-1* mutant, který neustále signalizuje zvýšení hladiny ethyleny, byli vystaveni mechanickému působení a zkoumala se exprese *TCH3* genu, což je dotykem indukovaný gen kódující kalmodulinu podobný protein (Braam & Davis, 1990). U kontrol, kterých se nedotýkali, se *TCH3* neexprimoval, a ani u mutantu *ctr1-1*, který ethylen vnímá konstitutivně, a u mutantů se zvýšenou produkcí ethyleny nebyla exprese zvýšena. U všech mutantů bylo patrné mechanicky indukované zvýšení exprese *TCH3*, stejně jako u divokého typu. Pouze ztrátový mutant v negenotypovaném genu *EIN6* (*Arabidopsis.org*) tvořil výjimku, když ani po mechanické stimulaci nebyla exprese *TCH3* zvýšena (obrázek 16). Z toho se dá vyvozovat, že ethylen není významný v primární odpovědi na mechanickou stimulaci. Bohužel, autoři zkoumali celou problematiku pouze na úrovni regulace exprese jednoho z *TCH* genů a neuvádí, jestli se u mechanicky stimulovaných ethylenových mutantů nevyskytly nějaké odchylky od obvyklé thigmomorfogenetické reakce.

Biosyntéza ethyleny v rostlinách vychází z methioninu, který se přeměňuje na S-adenosylmethionin (SAM) a ten na 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu (ACC), která se následně štěpí na ethylen. Inhibitory cykloleucin a tripolyfosfát, které blokují syntézu v kroku přeměny methioninu na SAM, neměly žádný efekt na thigmomorfogenezi, inhibitor AVG (aminoethoxyvinylglycine), který blokuje přeměnu SAM na ACC nebo inhibitory EDTA (ethylenediaminetetraacetate) a chlorid kobaltnatý, které blokují přeměnu ACC na ethylen inhibovaly pouze radiální růst, ale neměly žádný efekt na změny elongace ke kterým při thigmomorfogenezi dochází (Biro & Jaffe, 1984). Ethylen tedy v thigmomorfogenezi možná indukuje radiální růst, ale zastavení elongace neovlivňuje.



Obrázek 16 - vliv mechanostimulace na zvýšení exprese *TCH3* u ethylen insensitivních mutantů. Je vidět, že u všech mutantů je stejně jako u WT zvýšena exprese *TCH3* po aplikaci mechanického stimulu, výjimku tvoří mutant *ein6*, který po dotyku nezvyšuje expresi *TCH3*. Upraveno dle (Wright et al., 2002)

Zvýšení produkce ethyleny nastává často až několik hodin po mechanickém působení (Telewski & Jaffe, 1986; Biro & Jaffe, 1984), tedy v době kdy už dávno došlo k vápníkové signalizaci, proběhla i regulace exprese dotykem indukovaných genů a zastavil se růst, jedná se tedy o jeden z nejpozdějších projevů prováděných thigmomorfogenezi. Už z tohoto důvodu lze usuzovat, že role ethyleny bude spíše v nějaké sekundární odpovědi. Tělavost ethyleny přímo vybízí k představě, že produkovaný do okolí by také mohl sloužit jako signál pro okolní rostliny, podobně, jako tělavé jasmonáty, kterými rostlina signalizuje okolním rostlinám přítomnost herbivora (Farmer & Ryan, 1990; Karban et al., 2000; Heil & Ton, 2008). Nemuselo by jít ani o tak altruistickou signalizaci – vzhledem k tomu, že stimulovaná rostlina méně roste, mohla by být snadno zastíněna. Ethylen vyvolává podobnou reakci – zpomalení elongace – mohlo by se jednat o pokus mechanicky stimulované rostliny zbrzdit růst konkurentů podobně, jako je zbržděn její růst.

#### 4.4.2 Jasmonáty

Jasmonáty jsou rostlinné růstové regulátory odvozené od mastných kyselin. Jejich biosyntéza vychází z kyseliny  $\alpha$ -linolenové, ta je enzymem lipoxygenasou (LOX) přeměněna na 13-hydroxyperoxylinolenovou kyselinu, ta allene oxid synthasou (AOS) na 12,13-epoxylinolenovou kyselinu, ta allene oxid cyklasou (AOC) na 12-oxophytodinovou kyselinu (OPDA) a ta se reduktasou mění na kyselinu jasmonovou (JA). Jasmonáty jsou významné regulátory odpovědi na poranění a napadení patogenem, není proto překvapivé, že hrají roli i v mechanoreceptci. U mechanicky stimulovaných rostlin dochází ke zvýšení produkce jasmonátů. Například, u vojtěšky (*Medicago*) se kumulují jasmonáty po opakovaném dotýkání stonků (Tretner et al., 2008). Jasmonáty a jejich prekursor OPDA se akumulují v aktivovaných úponcích posedu (*Bryonia*) a jsou schopny při exogenním dodání spustit jejich svjení (Chehab et al., 2009). Ztrátoví mutanti *Arabidopsis* v genu pro AOS jsou necitliví k mechanickému působení a na rozdíl od kontrol nereagují thigmomorfogeneticky, naopak mutant se zvýšenou expresí, který má konstitutivní jasmonátovou signalizaci, vykazuje thigmomorfogenetickou reakci i u kontrolních rostlin (Chehab et al., 2012). To ukazuje na významnou roli jasmonátů v příjmu nebo reakci na mechanické působení. Signálem spouštějícím produkci jasmonátů je zřejmě zvýšení koncentrace  $Ca^{2+}$  protože inhibitor vápníkových kanálů (rutheniová červeň) blokuje akumulaci jasmonátů v poraněných rostlinách (Fisahn, 2004). Zvýšení koncentrace  $Ca^{2+}$  vede k aktivaci fosfolipasy D (PLD), která začne z membránových fosfolipidů odštěpovat kyselinu  $\alpha$ -linolenovou, prekursor produkce JA. Bylo také pozorováno zvýšení exprese enzymů LOX a AOS v reakci na mechanické působení (Lee et al., 2005; Tretner et al., 2008). Jasmonáty se šíří do všech částí rostliny a mohou tak vyvolávat systemickou odpověď. Jasmonáty se váží na SCF komplex, který ubiquitínuje proteiny JAZ, inhibitory transkripčních faktorů MYC2. JAZ jsou pak degradovány v proteasomu a MYC2 spouští transkripci genů řízených jasmonáty (Wasternack & Hause, 2013). Tyto změny genové exprese pak spouští řadu reakcí, například produkci inhibitorů proteinas, což jsou enzymy, které zajišťují trávení rostlinné biomasy u hmyzích herbivorů, a dalších obranných opatření (Farmer & Ryan, 1990). Alokace zdrojů z růstu do obrany může být jedním z důvodů zpomalení růstu u thigmomorfogenetických rostlin. Jasmonáty navíc zpomalují růst tím, že obecně brzdí buněčné dělení (Zhang &

Turner, 2008), ale mohou hrát roli i ve zvýšení radiálního růstu, protože v kambiu *Arabidopsis* buněčné dělení naopak podporují (Sehr et al., 2010).

### 4.4.3 Reaktivní formy kyslíku

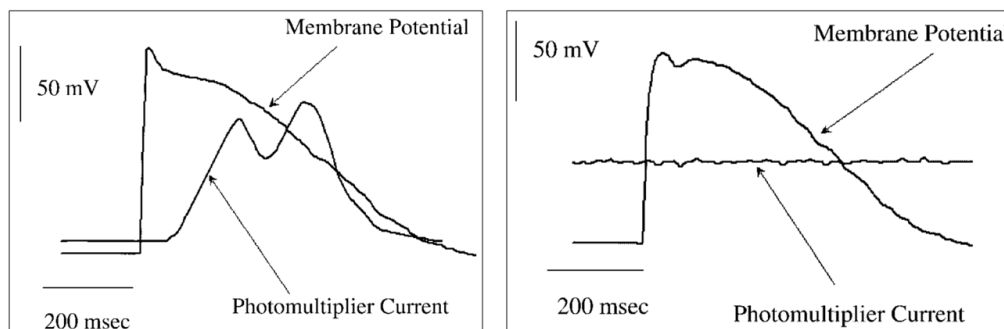
U rostlin vystavených mechanickému stresu dochází k produkci reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS) do apoplastu (Gao et al., 2007). Mezi reaktivní formy kyslíku patří například superoxid ( $O_2^-$ ) a peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ). ROS jsou typicky spojeny s reakcí na poranění a s imunitní reakcí proti patogenům (Jones & Dangl, 2006). Kyslíkové radikály poškozují patogen, zároveň především peroxid vodíku slouží jako mobilní signál, který přenáší informaci o napadení do celé rostliny. ROS navíc způsobují zesíťování některých na prolin bohatých proteinů v buněčné stěně, čímž zvyšují její rigiditu (O'Brien et al., 2012). Právě tato funkce ROS by mohla souviset se zpomalením elongace při thigmomorfogenezi. Peroxid vodíku je pak dobrým kandidátem na signál zvyšující obranu proti patogenům, která je u thigmomorfogenetických rostlin často pozorována (Biddington, 1986; Cipollini Jr., 1997). ROS jsou zřejmě produkovány činností RBOH (respiratory burst oxidase homologue), homolog lidské NADPH oxidázy, která katalyzuje přeměnu  $O_2$  na  $O_2^-$ . Jedná se o membránový enzym se šesti transmembránovými podjednotkami, který obsahuje na cytoplasmatické části EF-hand motiv vázající vápník (Sagi & Fluhr, 2006). Studie, kterou provedli Monshausen et al. (2009) ukazuje, že inhibitory vápníkových kanálů blokují produkci ROS v kořenech *Arabidopsis*. Zároveň ukázali, že mutant s nefunkční RBOH neprodukuje ROS po mechanickém dráždění. To napovídá, že ROS jsou produkovány NADPH oxidázou, spouštěnou vápníkovými pulsy.

## 4.5 Akční potenciály

Akční potenciály (AP) jsou krátké elektrické pulsy tvořené proudy iontů přes membránu, které jsou schopné se rychle šířit mezi buňkami i na velké vzdálenosti. Na rostlinách byly akční potenciály popsány především u aktivně lovcích masožravých rostlin, jako jsou mucholapka (*Dionaea*) a aldrovandka (*Aldrovanda*) nebo u citlivky (*Mimosa*). Už v roce 1873 popsal Sanderson akční potenciály probíhající u mucholapky při mechanickém podráždění a dokonce změřil, že mezi podnětem a AP je 0,25 – 0,3 sekundy prodleva a mezi jednotlivými vzruchy je 10-20 sekund dlouhá refrakční perioda. U specializovaných rostlin jsou akční potenciály skvělým řešením jak velmi rychle přenést podnět k motorickým orgánům a umožňují takřka okamžitou reakci. U mucholapky se akční potenciál šíří rychlostí 20-30 mm/s (Fromm & Lautner, 2007), u citlivky lze jejich šíření přímo sledovat podle postupného sklápění lístků, ke kterým už doputoval. Kromě toho byly akční potenciály zaznamenány i u nesespecializovaných rostlin v reakci na různé environmentální podněty jako je poranění ale i netraumatické mechanické dráždění, jak ukázala měření například u fazolu (Jaffe, 1980). Proto se zdá, že by mohly hrát roli transdukci signálu o mechanickém podnětu i při thigmomorfogenezi.

Vznik akčního potenciálu v neuronech živočichů je spojen s vtokem  $Na^+$  při depolarizaci a výtokem  $K^+$  při repolarizaci. Pokusy prováděné především na gigantických buňkách zelených řas parožnatka (*Chara*)

a skleněnka (*Nitella*) naznačují, že u rostlinných AP hrají roli toky  $K^+$ ,  $Cl^-$  a  $Ca^{2+}$  (Hedrich & Becker, 1994). Předpokládalo se, že primárním impulsem pro vznik AP je vtok vápenatých iontů, který následně aktivuje iontové kanály pro  $K^+$  a  $Cl^-$ , čímž se spustí depolarizace membrány. Této posloupnosti fungování kanálů ale odporovaly výsledky některých pokusů (Thiel et al., 1997). Měření s vysokým časovým rozlišením výrazně pomohly při hledání odpovědi. Fisahn (2004) visualisoval změny v koncentraci vápníku v rostlinách bramboru pomocí exprese aequorinu. Následně měřil s frekvencí 1 kHz luminiscenci vznikající při navázání  $Ca^{2+}$  na aequorin a změny membránového potenciálu po teplotním podráždění. Tato měření odhalila, že akční potenciál předchází zvýšení hladiny  $Ca^{2+}$  asi o 50 ms. Zároveň se ukázalo, že blokování vápníkových kanálů rutheniovou červení nemá vliv na průběh akčního potenciálu (obrázek 17). Tyto indicie napovídají, že u vzniku akčního potenciálu budou mechanosenzitivní  $Cl^-$  nebo  $K^+$  kanály a teprve následná depolarizace membrány vede ke vtoku vápenatých iontů skrze napětově řízené kanály. Zde se nabízí MSL kanály, o kterých se soudí, že možná přenáší spíše  $Cl^-$  než  $Ca^{2+}$  (Haswell et al., 2008; Peyronnet, 2008).



Obrázek 17: akční potenciály a fluktuace  $Ca^{2+}$ : na obrázku vlevo je vidět, že koncentrace vápenatých iontů se zvyšuje se zpožděním asi 50 ms po spuštění akčního potenciálu. Na pravém obrázku je vidět, že zablokování vápníkových kanálů rutheniovou červení nemá vliv na vznik akčních potenciálů (Fisahn, 2004).

Akční potenciály se mohou šířit z buňky do buňky, a pokud dosáhnou floemu, mohou se velmi efektivně šířit do celé rostliny, protože mezi buňkami floemu jsou vodivá propojení v podobě sítěk a zároveň jsou cévní svazky částečně izolovány pochvami cévních svazků (Brenner et al., 2006). Akční potenciály u rostlin jsou jednoduché depolarizace a těžko mohou nést komplexní informaci o signálu, který je způsobil, k šíření nespecifického vzruchu po rostlině ale stačí (Pyatygin et al., 2011). K jejich vzniku dochází podle principu vše nebo nic - při přesažení prahové depolarizace dochází ke skokové změně membránového potenciálu a vzniká šířící se akční potenciál projevující se jako depolarizační puls putující z buňky od buňky (Stahlberg & Cleland, 2006). Rychlost jejich šíření a amplituda není ovlivněna silou ani typem podnětu. Akční potenciály způsobují pohyby vápenatých iontů přes membránu, což samo o sobě stačí k efektivnímu převodu signálu na chemickou úroveň (Pyatygin et al., 2011).

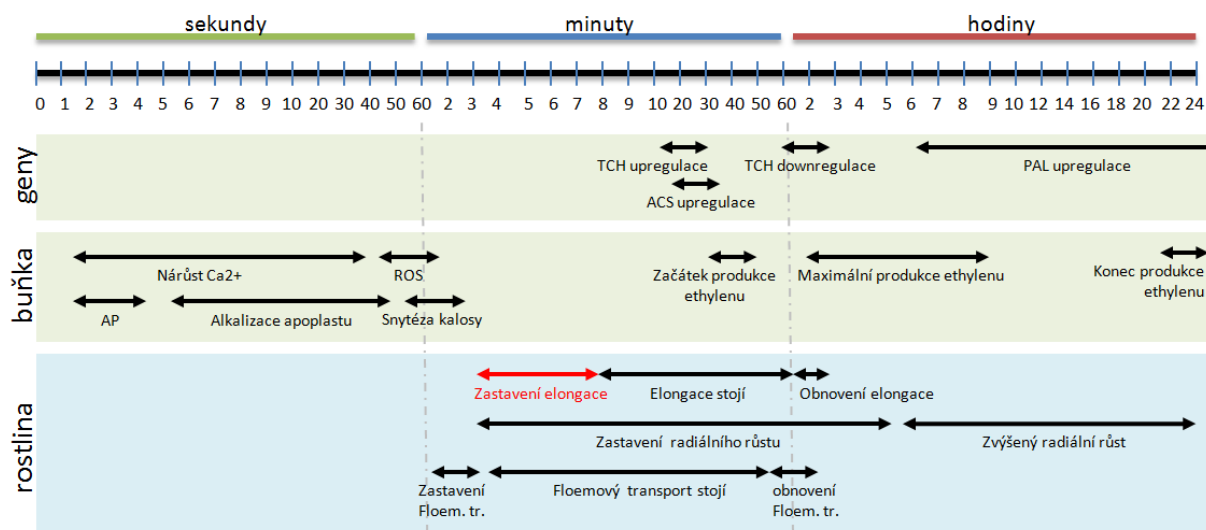
Kromě klasických akčních potenciálů se (pouze u vyšších rostlin) vyskytují ještě jiné elektrické vzruchy, označované jako SWP (slow wave potential) podle výrazně pomalejší repolarizace. Ty jsou typicky spojeny s mechanickým podrážděním. Pravděpodobně jsou vyvolány změnami hydraulického tlaku, které se po mechanickém působení šíří xylemem. Díky tomu že jejich šíření je čistě mechanické, mohou procházet

i mrtvými pletivy. Na rozdíl od AP, které jsou vždy stejné, je jejich amplituda závislá na velikosti hydraulického tlaku v xylemu, mění se tedy podle intenzity podnětu vzdálenosti od místa působení. (Stahlberg & Cleland, 2006).

## 5 MODEL MECHANORECEPCE U ROSTLIN

### 5.1 Časový průběh mechanorecepce

V prvních vteřinách po mechanickém podnětu dochází ke vzniku akčních potenciálů, které se mohou šířit z buňky do buňky a na delší vzdálenost floemem (Jaffe, 1980; Pyatygin et al., 2011). Následuje přechodné zvýšení cytoplasmatické koncentrace  $Ca^{2+}$ , které má v závislosti na povaze podnětu různou dynamiku (Monshausen et al., 2009), s maximem mezi 2-40 vteřinami. Následně, přibližně 1 minutu po stimulu dochází ke zvýšené produkci peroxidu vodíku a reaktivních forem kyslíku, dochází také k toku protonů přes plasmatickou membránu a tudíž k alkalizaci apoplastu a acidifikaci cytoplasmy (Gao et al., 2007). V době mezi první a druhou minutou také dochází k zastavení floemového transportu (Jaeger & Goeschl, 1988), následovanému zastavením elongace a radiálního růstu v době mezi třetí a osmou minutou (Jaffe, 1976; Coutand & Moulia, 2000). Mezi 10 a 30 minutami dochází k zvýšení exprese dotykem indukovaných genů (TCH) a ACS (ACC synthase) a enzymů syntézy jasmonátů (Lee et al., 2005), po 30 minutách se také začíná zvyšovat produkce ethylenu (Jaffe, 1980) a obnovovat floemový transport spolu s prodlužovacím růstem (Jaffe, 1976; Coutand & Moulia, 2000). Po jedné hodině od mechanického stimulu se exprese TCH genů vrací na původní úroveň, elongace je obnovena. Po dvou hodinách dosahuje produkce ethylenu u fazolu svého maxima (Jaffe, 1980), u některých druhů k tomu však dochází až po devíti hodinách (Telewski & Jaffe, 1986). Po pěti hodinách dochází k obnově radiálního růstu a po předchozím klidu dochází naopak ke zrychlení dělení buněk kambia. Po šesti hodinách se zvyšuje syntéza ligninu způsobená zvýšenou expresí PAL (phenyl amonia lyase) (Jaegher et al., 1985), která je zvýšena až dalších několik desítek hodin. Po 24 hodinách se vrací produkce ethylenu na bazální úroveň. (Wyatt & Kiss, 2013)



Obrázek 18: časové schéma dějů, ke kterým dochází po mechanické stimulaci

## 5.2 Model fungování mechanorecepce

Toto časové schéma (obrázek 18) naznačuje, že minimálně prvotní růstová reakce, kterou je zastavení elongace a radiálního růstu musí být s nejvyšší pravděpodobností spojena s fyziologickými jevy, jako jsou šířící se akční potenciály a toky iontů skrze kanály. Akční potenciály vzniklé depolarizací membrány zřejmě díky mechanosenzitivním kanálům pro Cl<sup>-</sup> a K<sup>+</sup> vedou k otevření napětím řízených kanálů pro Ca<sup>2+</sup>, případně ke vtoku Ca<sup>2+</sup> může docházet specifickými, tahem aktivovanými kanály pro Ca<sup>2+</sup>, např. MCA.

V mnoha případech bylo pozorováno, že mechanické dráždění je spojeno s alkalizací apoplastu, ať už v kořenech *Arabidopsis*, nebo v tkáňových kulturách pěstovaných in vitro (Gao et al., 2007; Monshausen et al., 2009). Pokusy na kořenech *Arabidopsis* ukázaly, že k alkalizaci apoplastu dochází vlivem transienčních změn v koncentraci Ca<sup>2+</sup> v buňce, ke kterému při mechanické stimulaci dochází, a pokud se pomocí inhibitorů zablokovaly vápníkové kanály, nedošlo ani ke změně pH po stimulu (Monshausen et al., 2009). Mechanismus alkalizace zřejmě spočívá v tom, že Ca<sup>2+</sup> přes proteinkinasy inhibuje H<sup>+</sup> ATPasu, protože inhibitor H<sup>+</sup> ATPasy DCC (N,N'-dicyclohexylcarbodiimide) a inhibitor proteinkinasy H7 (1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine, Dihydrochloride) blokuje alkalizaci (Vodeneev et al., 2006).

Dalším průvodním jevem je produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) do apoplastu. (Coutand, 2010; Monshausen et al., 2009; Gao et al., 2007). NADPH oxidáza je aktivovaná zvýšením koncentrace Ca<sup>2+</sup> a produkuje superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Ten je následně stěnovou pH dependentní peroxidasou, která je aktivována alkalizací apoplastu, přeměňován na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sagi & Fluhr, 2006). ROS pak jednak zesilují vlivem prolinem bohaté proteiny buněčné stěny, jednak se šíří rostlinou, přes aquaporiny vstupují zpět do buněk a tak vyvolávají systémovou odpověď řízením změn genové exprese (O'Brien et al., 2012).

Už malé změny v pH vedou ke změnám v chování enzymů, jako jsou expansiny, což jsou proteiny spojené s tzv. kyselým prodlužovacím růstem, které fungují tak, že rozvolňují vazbu mezi celulosovými a hemice-

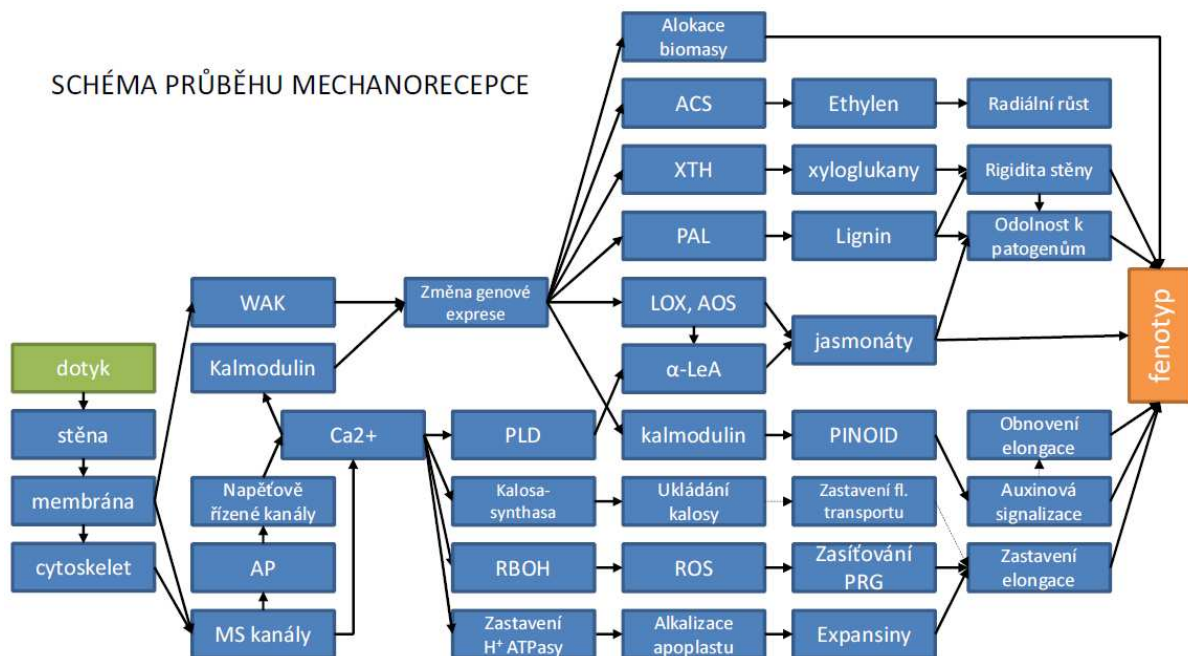


lulosovými mikrofibrilami. Díky tomu může docházet ke zvětšování objemu buňky, protože protoplast již není ve své expanzi tolik omezován rigidní stěnou. V pokusu s koleoptilemi pšenice vedlo snížení pH z 6,8 na 4,5 k okamžitému zrychlení prodlužovacího růstu (Gao et al., 2008). Dá se předpokládat, že alkalizace apoplastu, ke které dochází v důsledku mechanického působení, bude mít na aktivitu expansinů opačný efekt. Změny apoplastického pH směrem k vyšším hodnotám by tak mohly být podstatou zastavení prodlužovacího růstu při thigmomorfogenezi (Coutand, 2010). Pokud rostlina po každém mechanickém stimulu přestane někdy i na desítky minut růst, může to stačit k výslednému zkrácenému fenotypu oproti kontrole, která rostla neustále.

Další možnou příčinou zastavení růstu, je blokování floemového transportu, ke kterému dochází už 1-2 minuty po stimulaci a obnovuje se 20 minut až 3 hodiny po stimulaci (Jaeger & Goeschl, 1988). Zastavení floemového transportu by rostlině přineslo užitek, pokud by mechanický podnět byl spojen s poraněním, protože by nedocházelo ke ztrátě fotosyntátů. Mechanismus zastavení transportu by mohl souviset s ukládáním kalosy v cévních svazcích, pozorovaném během několika minut po stimulu (Jaffe & Telewski, 1984). Syntéza kalosy pravděpodobně může být spouštěna vtoky  $Ca^{2+}$  do buňky. Enzym 1,3- $\beta$ -glucan syntasa, což je transmembránový enzym, který na extracelulární straně syntetizuje kalosu, má totiž na intracelulární straně doménu vázající  $Ca^{2+}$ , což stimuluje její aktivitu (Fredrikson & Larsson, 1989).

Z časového schématu také vyplývá, že pokusy, zda ethylen hraje roli v indukci exprese *TCH* (Johnson et al., 1998; Wright et al., 2002), jsou zbytečné, protože k zvýšení hladin mRNA *TCH* genů dochází během 10-30 minut po dotyku, zatímco ethylen se začíná syntetizovat 30 minut po dotyku a maximum má až po několika hodinách. Podnět k zvýšení exprese *TCH* genů je pravděpodobně přenášen přes kinasové kaskády, protože staurosporin blokuje expresi *TCH3* (Wright et al., 2002). Takové signální kaskády mohou být spouštěny mechanicky aktivovanými WAK, jak naznačují pokusy Gao et al. (2007), nebo je mohou spouštět vápník vázající proteiny, jako CaM, které se aktivují zvýšením  $Ca^{2+}$  po dotyku. Ethylen tak zřejmě v regulaci *TCH* genů nehraje roli. Naopak, jeden z dotykem indukovaných genů je ACC syntasa (ACS), která syntetizuje 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu, metabolický meziprodukt syntézy ethylenu (Biro & Jaffe, 1984). Časové schéma produkce ethylenu je v souladu s představou ethylenu jako důvodu zvýšení radiálního růstu, která vyplývá z inhibitorových pokusů zmíněných výše (Biro & Jaffe, 1984). *TCH3* v přítomnosti vápníku inhibuje aktivity Ser/Thr kinázy PINOID (PID), která fosforylací dává pokyn k exocytose auxinových přenašečů PIN na plasmalemu. Pozorování, že interakce *TCH3* s PID je zcela závislá na  $Ca^{2+}$ , a že inhibitory vápníkových kanálů a kalmodulinu zvyšují aktivitu PID, nasvědčuje tomu, že *TCH3* je negativním regulátorem PID (Galva et al., 2003). *TCH* tak inhibicí PID způsobuje stažení PIN z plasmalemy na endosomální membránu a tudíž kumulaci auxinu v buňkách. To může vést k různým změnám růstu a diferenciaci. Časové schéma napovídá, že jedním z důsledků by mohlo být i obnovení prodlužovacího růstu. *TCH4* kóduje XTH22, což xyloglucosyl transferasa/hydrogenasa, která rozvolňuje buněčnou stěnu, což má jistě efekt na růst rostliny. Upregulace PAL (phenyl amonia lyase) vede k vyšší syntéze ligninu a tím dochází nejen ke zpevnění rostlinného těla a zvýšení odolnosti proti mechanickým

podnětům jako je vítr, ale může to být i jeden z důvodů zvýšené odolnosti thigmomorfogenetických rostlin vůči herbivorům (Cipollini Jr., 1997). Kromě toho se po dotyku zvyšuje exprese některých genů biosyntetické dráhy jasmonátů, jako je LOX a AOS. Dráha syntézy jasmonátů je ale zřejmě aktivována již před změnou exprese zvýšením koncentrace vápenatých iontů v cytoplasmě, které aktivuje fosfolipasu D. Ta začne z fosfolipidů odštěpovat  $\alpha$ -linolenovou kyselinu, která je základem syntézy jasmonátů. Jasmonáty pak spouští řadu procesů typicky spojených s reakcí na poranění nebo patogeny. Jsou tak zřejmě zodpovědné za zvýšení odolnosti k patogenům, zároveň zpomalují růst tím, že brzdí buněčné dělení a tím, že alokují zdroje pro růst do obrany. Kromě těchto několika výše opsaných genů odhalily microarray analýzy stovky dalších, které mění míru své exprese v reakci na dotyk (Lee et al., 2005). Jejich role v thigmomorfogenezi není známa, ale pravděpodobně budou hrát roli v komplexních změnách jako je alokace biomasy z prýtu do kořenů nebo zvýšení odolnosti proti patogenům a suchu.



Obrázek 19: schéma průběhu mechanorecepce - dotyk se přenáší ze stěny na membránu a odtud buď přímo nebo přes cytoskelet na mechanosenzitivní vápníkové kanály na plasmalemě nebo na organelách jako ER nebo vakuola. To vede přímo k otevření mechanosenzitivních (MS) kanálů pro  $Ca^{2+}$  nebo k otevření jiných iontových kanálů, které způsobí depolarizaci membrány a vznik akčních potenciálů (AP), což vede k otevření napětově řízených vápníkových kanálů. Výsledkem je prudké zvýšení koncentrace  $Ca^{2+}$  v cytoplasmě.  $Ca^{2+}$  aktivuje kalosa-synthasu, která začne ukládat kalosu ve floemu a tím zastaví floemový transport. Zároveň dochází po zvýšení koncentrace  $Ca^{2+}$  zřejmě přes aktivaci proteinkinasy k zastavení funkce  $H^+$  ATPasy, což způsobí alkalizaci apoplastu a tím zablokování aktivity expansinů. Dalším důsledkem zvýšení  $Ca^{2+}$  je aktivace NADPH oxidasy (RBOH) a produkce ROS, které způsobují zesíťování stěnových proteinů. Dohromady to vede k zastavení prodlužovacího a radiálního růstu.  $Ca^{2+}$  také aktivují fosfolipasu D (PLD), která štěpí fosfolipidy a produkuje prekursor syntézy jasmonátů, kyselinu  $\alpha$ -linolenovou ( $\alpha$ -LeA).  $Ca^{2+}$  se váže na kalmodulin a jemu podobné proteiny, které se tím aktivují a předávají signál na další proteiny a spouští signální kaskády. Podobný význam mohou mít mechanicky aktivované WAK. Tím dochází ke změnám genové exprese. Zvýšení exprese PAL vede k syntéze ligninu, díky zvýšení exprese ACS dochází ke zvýšení produkce ethylenu, LOX a AOS zvyšují produkci jasmonátů. Kalmodulin (TCH3) ovládá auxinovou signalizaci pomocí regulace proteinkinasy PINOID. XTH rozvolňuje buněčnou stěnu. Ethylen způsobuje zvýšení radiálního růstu. Tak vzniká typický thigmomorfogenetický fenotyp popsáný v kapitole thigmomorfogeneze. Změny exprese stovek dalších genů objevených při microarray analýze zřejmě ovlivňují další změny, jako změna alokace biomasy mezi kořeny a prýtem nebo v odolnosti proti patogenům.

Thigmomorfogenetické studie jsou typicky prováděné v nepřírodných podmínkách skleníků a kultivačních komor, kde kontrolní rostliny nejsou vystaveny vůbec žádnému mechanickému působení. V přírodních podmínkách jsou mechanické podněty tak běžné, že by bylo skoro možno považovat za kontroly stimulované rostliny, zatímco pro nestimulované rostliny může být ztráta veškerých mechanických podnětů skoro stejně zvláštní situace jako pro jejich kolegyně na oběžné dráze ztráta gravitačního působení (Wyatt & Kiss, 2013). To vyvolává otázku, do jaké míry je thigmomorfogeneze experimentální artefakt. Pokud by rostliny v přírodě zastavily růst až na hodinu po každém mechanickém podnětu, jak ukázaly některé pokusy (Jaffe, 1980; Coutand et al., 2000), rostlina by prakticky nemohla vůbec růst. Takto přehnaná reakce by jí samozřejmě nepřinášela žádnou adaptivní výhodu, naopak by jí velmi škodila. Rostliny tedy musí nějakým způsobem rozeznat běžné mechanické podněty, na které nemá smysl reagovat a silnější, kterým je třeba se přizpůsobit. To, že síla odpovědi je závislá na síle signálu, je dobře zdokumentováno (Jaffe, 1973; Telewski & Pruyne, 1998; Knight et al., 1992), kromě toho ale musí docházet k jakési kalibraci rostliny na bazální úroveň stimulace, při které se růst nezastavuje. Ta je ve skleníku nulová a tak se růst zastavuje i po podnětech, na které by zřejmě rostlina v přírodních podmínkách nereagovala. Tímto mechanismem by mohla být např. zvýšená exprese genů pro kalmodulin a jemu podobné proteiny, což by zároveň řešilo, proč se zvyšuje jejich exprese desítky minut po vtocích vápníku, na které by mohly reagovat. CaM a CML proteiny mají 1-6 domén, které vážou vápenaté ionty, označované jako EF hand domény. Aby fungovaly, musí být obsazeny všechny EF domény. Tím, že se zvýší množství CaM a CML v cytoplasmě, dojde ke „zředění“ vápenatých iontů. Rostlina tak už na další mechanické stimuly nereaguje tak silně. Zároveň by si o vápenaté ionty konkurovaly např. i s kalosa-synthasou, RBOH, PLD a dalšími vápníkem ovlivňovanými proteiny, které odpovídají na vtoky  $Ca^{2+}$  po podráždění a tím snižovaly jejich aktivitu.

## 6 ZÁVĚR

Mechanorecepce u rostlin se zkoumá již přes 200 let (Knight, 1803) a fenomenologicky byla relativně dobře prozkoumána již na konci 19. Století (Darwin, 1865; Sanderson, 1872; Darwin, 1875; Hooker, 1876; Darwin, 1880), přesto dodnes úplně nerozumíme jejímu fungování. Přes rozvoj molekulární biologie, bioinformatiky, biochemie fyziologie a přes dnešní technologické možnosti, je obraz molekulární podstaty vnímání, přenosu, integrace, vyhodnocení a odpovědi na mechanické podněty stále velmi mlhavý. Ve srovnání s jinými rostlinnými smysly, jako jsou například fotorecepce a gravirecepce jsou naše znalosti o mechanoreceptci opravdu skromné, a bohužel ani intenzita výzkumu těchto oborů se nedá srovnávat.

V této práci jsem se pokusil shrnout současné publikované poznatky do obrysů konkrétního modelu průběhu mechanorecepce, v některých místech jde však spíše o spekulace. Mezi nejpálčivější otázky patří například identita primárního mechanosensoru. Po mechanickém podnětu dochází k vtoku  $Ca^{2+}$  do buňky ale neví se ani, jestli vytéká z vnitřních organel nebo z apoplastu. Ačkoli byly objeveny mechanosensitivní ka-

nály v plasmatické membráně, jejich mutace nemá vliv na fenotyp ani mechanorecepci. Neví se, jakou roli hrají proteiny vázající RGD sekvence v přenosu signálu, na jaké struktury ve stěně se vlastně vážou, ani jestli a jak jsou spojeny s vápníkovou signalizací. Tuší se, že v převodu vápníkové signalizace k buněčné odpovědi hrají roli kalmoduliny, a že pro dotykem indukované změny genové exprese jsou potřebné fungující proteinkinasy, ale konkrétní signální kaskády nejsou známy. Než pochopíme, jak rostliny vnímají svět kolem sebe na takové úrovni, na jaké to chápeme u živočichů, musí být tyto a mnohé další otázky zodpovězeny a mnohé další položeny.

## 7 LITERATURA

- Adamec** (1997). Mineral nutrition of carnivorous plants: a review. *The Botanical Review* **63**: 273–299.
- Adamec** (2000). Rootless aquatic plant *Aldrovanda vesiculosa*: physiological polarity, mineral nutrition, and importance of carnivory. *Biologia Plantarum* **43**: 113–119.
- Allen** (1969). Mechanism of the Seismonastic Reaction in *Mimosa pudica*. *Plant physiology* **44**: 1101–1107.
- Allen, Kwak, Chu** (1999). Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant Journal* **19**: 735–747.
- Anderson, Wagner, Perret, He, He, Kohorn** (2001). WAKs: cell wall-associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix. *Plant molecular biology* **47**: 197–206.
- Baluška, Šamaj, Wojtaszek** (2003). Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. Emerging links revisited. *Plant physiology* **133**: 482–491.
- Biddington** (1986). The effects of mechanically-induced stress in plants—a review. *Plant Growth Regulation* **4**: 103–123.
- Biedrzycki, Jilany, Dudley, Bais** (2010). Root exudates mediate kin recognition in plants. *Communicative & integrative biology* **3**: 28–35.
- Biro, Jaffe** (1984). Thigmomorphogenesis: ethylene evolution and its role in the changes observed in mechanically perturbed bean plants. *Physiologia Plantarum* **62**: 289–296.
- Bisson, Bleckmann, Allekotte, Groth** (2009). EIN2, the central regulator of ethylene signalling, is localized at the ER membrane where it interacts with the ethylene receptor ETR1. *The Biochemical journal* **424**: 1–6.
- Bowling, Vaughn** (2008). Structural and immunocytochemical characterization of the adhesive tendrils of Virginia creeper (*Parthenocissus quinquefolia* [L.] Planch.). *Protoplasma* **232**: 153–163.
- Braam** (2005). In touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytologist* **165**: 373–389.
- Braam, Davis** (1990). Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell* **60**: 357–364.
- Brenner, Stahlberg, Mancuso, Vivanco, Baluska, Van Volkenburgh** (2006). Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling. *Trends in plant science* **11**: 413–419.
- Bringmann, Landrein, Schudoma, Hamant, Hauser, Persson** (2012). Cracking the elusive alignment hypothesis: the microtubule-cellulose synthase nexus unraveled. *Trends in plant science* **17**: 666–674.
- Cameron, Wurdack, Jobson** (2002). Molecular evidence for the common origin of snap-traps among carnivorous plants. *American journal of botany* **89**: 1503–1509.
- Caño-Delgado, Penfield, Smith, Catley, Bevan** (2003). Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **34**: 351–362.
- Canut, Carrasco, Galaud, Cassan, Bouyssou, Vita, Ferrara, Pont-Lezica** (1998). High affinity RGD-binding sites at the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* links the cell wall. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **16**: 63–71.
- Ten Cate** (2012). Acoustic communication in plants: do the woods really sing? *Behavioral Ecology*.
- Cipollini Jr.** (1997). Wind-induced mechanical stimulation increases pest resistance in common bean. *Oecologia* **111**: 84–90.
- Coutand** (2010). Mechanosensing and thigmomorphogenesis, a physiological and biomechanical point of view. *Plant Science* **179**: 168–182.
- Coutand, Dupraz, Jaouen, Ploquin, Adam** (2008). Mechanical stimuli regulate the allocation of biomass in trees: demonstration with young *Prunus avium* trees. *Annals of botany* **101**: 1421–1432.
- Coutand, Julien, Moulia, Mauget, Guitard** (2000). Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: global mechanical analysis. *Journal of experimental botany* **51**: 1813–1824.

- Coutand, Moulia** (2000). Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: local strain sensing and spatial integration of the signal. *Journal of experimental botany* **51**: 1825–1842.
- Cvrčková** (2000). Are plant formins integral membrane proteins. *Genome Biology* **1**: 1–7.
- Darwin** (1875). insectivorous plants. (darwin-online.org.uk)
- Darwin** (1865). On the movements and habits of climbing plants. *Journal of the Linnean Society of London, Botany*: 1–107.
- Darwin** (1880). The power of movement in plants. (darwin-online.org.uk)
- Deeks, Cvrčková, Machesky, Mikitová, Ketelaar, Žárský, Davies, Hussey** (2005). *Arabidopsis* group Ie formins localize to specific cell membrane domains, interact with actin-binding proteins and cause defects in cell expansion upon aberrant expression. *The New phytologist* **168**: 529–540.
- Deeks, Fendrych, Smertenko, Bell, Oparka, Cvrčková, Žárský, Hussey** (2010). The plant formin AtFH4 interacts with both actin and microtubules, and contains a newly identified microtubule-binding domain. *Journal of cell science* **123**: 1209–1215.
- Ding, Pickard** (1993). Mechanosensory calcium-selective cation channels in epidermal cells. *The Plant journal* **3**: 83–110.
- Eisner** (1981). Leaf folding in a sensitive plant: A defensive thorn-exposure mechanism? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**: 402–404.
- Ellawala, Asaeda, Kawamura** (2013). Water movement induced variations in growth regulation and metabolism of freshwater macrophyte *Vallisneria spiralis* L. in early growth stages. *Hydrobiologia* **709**: 173–182.
- Erner, Biro, Jaffe** (1980). Thigmomorphogenesis: Evidence for a translocatable thigmomorphogenetic factor induced by mechanical perturbation of beans (*Phaseolus vulgaris*). *Physiologia Plantarum* **50**: 21–25.
- Faik, Labouré, Gulino, Mandaron, Falconet** (1998). A plant surface protein sharing structural properties with animal integrins. *European journal of biochemistry* **253**: 552–559.
- Falke, Edwards, Pickard, Misler** (1988). A stretch-activated anion channel in tobacco protoplasts. *FEBS Letters* **237**: 141–144.
- Farmer, Ryan** (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 7713–7716.
- Fasano, Massa, Gilroy** (2002). Ionic signaling in plant responses to gravity and touch. *Journal of plant growth regulation* **21**: 71–88.
- Fisahn** (2004). Analysis of the Transient Increase in Cytosolic Ca<sup>2+</sup> during the Action Potential of Higher Plants with High Temporal Resolution: Requirement of Ca<sup>2+</sup> Transients for Induction of Jasmonic Acid Biosynthesis and PINII Gene Expression. *Plant and Cell Physiology* **45**: 456–459.
- Fredrikson, Larsson** (1989). Activation of 1, 3-β-glucan synthase by Ca<sup>2+</sup>, spermine and cellobiose.—Localization of activator sites using inside-out plasma membrane vesicles. *Physiologia Plantarum* **77**: 196–201.
- Fromm, Lautner** (2007). Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant, Cell and Environment*: 249–257.
- Furuichi, Iida, Sokabe, Tatsumi** (2012). Expression of *Arabidopsis* MCA1 enhanced mechanosensitive channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane. *Plant signaling & behavior* **7**: 1022–1026.
- Gagliano, Mancuso, Robert** (2012). Towards understanding plant bioacoustics. *Trends in plant science*: 2–4.
- Galva, Hooykaas, Offringa** (2003). PINOID-Mediated Signaling Involves Calcium-Binding Proteins. *plant physiology* **132**: 1623–1630.
- Gao, Gong, Yuan** (2007). RGD-dependent mechanotransduction of suspension cultured *Taxus* cell in response to shear stress. *Biotechnology progress* **23**: 673–679.
- Gao, Zhao, Li, Guo, Xing, Wang** (2008). Expansins and coleoptile elongation in wheat. *Protoplasma* **233**: 73–81.
- Gens, Fujiki, Pickard** (2000). Arabinogalactan protein and wall-associated kinase in a plasmalemmal reticulum with specialized vertices. *Protoplasma* **212**: 115–134.
- Gouget, Senchou, Govers, Sanson, Barre, Rouge, Pont-lezica** (2006). Lectin Receptor Kinases Participate

- in Protein-Protein Interactions to Mediate Plasma Membrane-Cell Wall. *plant physiology* **140**: 81–90.
- Gruntman, Novoplansky** (2004). Physiologically mediated self/non-self discrimination in roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 3863–3867.
- Gus-Mayer, Naton, Hahlbrock, Schmelzer** (1998). Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 8398–8403.
- Haswell, Meyerowitz** (2006). MscS-like Proteins Control Plastid Size and Shape in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* **16**: 1–11.
- Haswell, Peyronnet, Barbier-Brygoo, Meyerowitz, Frachisse** (2008). Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the *Arabidopsis* root. *Current biology* **18**: 730–734.
- Hedrich, Becker** (1994). Green circuits--the potential of plant specific ion channels. *Plant molecular biology* **26**: 1637–1650.
- Heil, Ton** (2008). Long-distance signalling in plant defence. *Trends in plant science* **13**: 264–272.
- Heubl, Bringmann, Meimberg** (2006). Molecular phylogeny and character evolution of carnivorous plant families in *Caryophyllales* - revisited. *Plant biology* **8**: 821–830.
- His, Driouich, Nicol, Jauneau, Höfte** (2001). Altered pectin composition in primary cell walls of korrgan , a dwarf mutant of *Arabidopsis* deficient in a membrane-bound endo-1,4- $\beta$ -glucanase. *Planta* **212**: 348–358.
- Hofmann** (2009). Early signaling events in mechanosensing. *The Plant cell* **21**: 2191.
- Hooker** (1876). on the leaf of *Dionaea muscipula*. *Proceedings of the Royal Society of London*: 411–434.
- Chabannes, Carrie** (1999). A family of *Arabidopsis* plasma membrane receptors presenting animal L-integrin domains. *Biochimica et Biophysica Acta* **1435**: 61–70.
- Chehab, Eich, Braam** (2009). Thigmomorphogenesis: a complex plant response to mechano-stimulation. *Journal of experimental botany* **60**: 43–56.
- Chehab, Yao, Henderson, Kim, Braam** (2012). *Arabidopsis* touch-induced morphogenesis is jasmonate mediated and protects against pests. *Current biology* **22**: 701–706.
- Christensen, Dagenais, Chory, Weigel** (2000). Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID. *Cell* **100**: 469–478.
- Ingber** (1997). Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annual Review of Physiology* **59**: 575–599.
- Jaeger, Goeschl** (1988). Short-term responses of phloem transport to mechanical perturbation. *Physiologia Plantarum* **72**: 588–594.
- Jaegher, Boyer, Gaspar** (1985). Thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica*: Changes in soluble and wall peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase activity, cellulose, lignin content and monomeric constituents. *Plant Growth Regulation* **3**: 133–148.
- Jaffe** (1980). Morphogenetic responses of plants to mechanical stimuli or stress. *BioScience-American Institute of Biological Sciences* **30**: 239–243.
- Jaffe** (1976). Thigmomorphogenesis: A Detailed Characterization of the Response of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to Mechanical Stimulation. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **77**: 453–437.
- Jaffe** (1973). Thigmomorphogenesis: The response of plant growth and development to mechanical stimulation. *Planta* **114**: 143–157.
- Jaffe, Galston** (1968). The physiology of tendrils. *Annual Review of Plant Physiology* **19**: 417–434.
- Jaffe, Leopold, Staples** (2002). Thigmo responses in plants and fungi. *American Journal of Botany* **89**: 375–382.
- Jaffe, Telewski** (1984). Thigmomorphogenesis: callose and ethylene in the hardening of mechanically stressed plants. *Recent advances in phytochemistry* **18**: 79–95.
- Jaffe, Wakefield, Telewski, Gulley, Biro** (1985). Computer-assisted image analysis of plant growth, thigmomorphogenesis and gravitropism. *Plant physiology* **77**: 722–730.
- Jeong, Shim, Lee, Kwon, Kim, Lee, Byun, Park** (2007). Plant gene responses to frequency-specific sound signals. *Molecular Breeding* **21**: 217–226.
- Johnson, Sistrunk, Polisensky, Braam** (1998). *Arabidopsis thaliana* responses to mechanical stimulation do not require ETR1 or EIN2. *Plant physiology* **116**: 643–649.
- Jones, Dangl** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.

- Jones, Mitchell** (1989). Calcium ion involvement in growth inhibition of mechanically stressed soybean (*Glycine max*) seedlings. *Physiologia Plantarum* **76**: 598–602.
- Karban, Baldwin, Baxter, Laue** (2000). Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. *Oecologia* **125**: 66–71.
- Kimbrough, Salinas-Mondragon, Boss, Brown, Sederoff** (2004). The fast and transient transcriptional network of gravity and mechanical stimulation in the *Arabidopsis* root apex. *Plant physiology* **136**: 2790–2805.
- Knight** (1803). Account of some experiments on the descent of the sap in trees. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **93**: 277–289.
- Knight, Read, Campbell, Trewavas** (1993). Imaging calcium dynamics in living plants using semi-synthetic recombinant aequorins. *The Journal of cell biology* **121**: 83–90.
- Knight, Smith, Trewavas** (1992). Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 4967–4971.
- Ko, Han, Park, Yang** (2004). Plant body weight-induced secondary growth in *Arabidopsis* and its transcription phenotype revealed by whole-transcriptome profiling. *Plant physiology* **135**: 1069–1083.
- Kudla, Batistic, Hashimoto** (2010). Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *The Plant cell* **22**: 541–563.
- Kurusu, Kuchitsu, Nakano, Nakayama, Iida** (2013). Plant mechanosensing and Ca<sup>2+</sup> transport. *Trends in plant science*: 1–7.
- Kurusu, Yamanaka, Nakano, Takiguchi, Ogasawara, Hayashi, Iida, Hanamata, Shinozaki, Iida, Kuchitsu** (2012). Involvement of the putative Ca<sup>2+</sup>-permeable mechanosensitive channels, NtMCA1 and NtMCA2, in Ca<sup>2+</sup> uptake, Ca<sup>2+</sup>-dependent cell proliferation and mechanical stress-induced gene expression in tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 cells. *Journal of plant research* **125**: 555–568.
- Larson** (1965). Stem form of young *Larix* as influenced by wind and pruning. *Forest Science* **11**: 412–424.
- Lee, Polisensky, Braam** (2005). Genome-wide identification of touch-and darkness-regulated *Arabidopsis* genes: a focus on calmodulin-like and XTH genes. *New Phytologist* **165**: 429–444.
- Legrand, Passos, Mergler, Chan** (2005). Biomonitoring of mercury exposure with single human hair strand. *Environmental science & technology* **39**: 4594–4598.
- Legue, Blancaflor, Wymer, Perbal, Fantin, Gilroy** (1997). Cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> in *Arabidopsis* roots changes in response to touch but not gravity. *Plant physiology* **114**: 789–800.
- Louis, Fls, Judd** (1999). Comparative vegetative anatomy and systematics of Vanilla (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **131**: 353–382.
- Lü, Wang, Zhang, Wang, Liang, Zhang** (2012). AT14A mediates the cell wall-plasma membrane-cytoskeleton continuum in *Arabidopsis thaliana* cells. *Journal of experimental botany* **63**: 4061–4069.
- Luan, Kudla, Rodriguez-Concepcion, Yalovsky, Gruissem** (2002). Calmodulins and Calcineurin B-like Proteins: Calcium Sensors for Specific Signal Response Coupling in Plants. *The Plant cell* **14**: 389–400.
- Lundqvist** (1996). Stem Diameter Growth of Scots Pine Trees after Increased Mechanical Load in the Crown during Dormancy and (or) Growth. *Annals of Botany* **77**: 59–62.
- Martinac, Buechner** (1987). Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 2297–2301.
- Massa, Gilroy** (2003). Touch modulates gravity sensing to regulate the growth of primary roots of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **33**: 435–445.
- Mellersh, Heath** (2001). Plasma membrane–cell wall adhesion is required for expression of plant defense responses during fungal penetration. *The Plant Cell* **13**: 413–424.
- Monshausen, Bibikova, Weisenseel, Gilroy** (2009). Ca<sup>2+</sup> regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in *Arabidopsis* roots. *The Plant cell* **21**: 2341–2356.
- Monshausen, Gilroy** (2009). Feeling green: mechanosensing in plants. *Trends in cell biology* **19**: 228–235.
- Nakagawa, Katagiri, Shinozaki, Qi, Tatsumi, Furuichi, Kishigami, Sokabe, Kojima, Sato, Kato, Tabata, Iida, Terashima, Nakano, Ikeda, Yamanaka,**



- Iida** (2007). *Arabidopsis* plasma membrane protein crucial for Ca<sup>2+</sup> influx and touch sensing in roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 3639–3644.
- Nakano, Iida, Nyunoya, Iida** (2011). Determination of structural regions important for Ca<sup>2+</sup> uptake activity in *Arabidopsis* MCA1 and MCA2 expressed in yeast. *Plant & cell physiology* **52**: 1915–1930.
- O'Brien, Daudi, Butt, Bolwell** (2012). Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* **236**: 765–779.
- Peroutka, Adlassnig, Volgger, Lendl, Url, Lichtscheidl** (2008). *Utricularia*: a vegetarian carnivorous plant? *Plant Ecology* **199**: 153–162.
- Peyronnet** (2008). AtMSL9 and AtMSL10: Sensors of plasma membrane tension in *Arabidopsis* roots. *Plant signaling & behavior* **3**: 726–729.
- Pigliucci** (2002). Touchy and bushy: phenotypic plasticity and integration in response to wind stimulation in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Plant Sciences* **163**: 399–408.
- Poppinga, Hartmeyer, Seidel, Masselter, Hartmeyer, Speck** (2012). Catapulting tentacles in a sticky carnivorous plant. *PLoS one* **7**: e45735.
- Price** (1988). Sound attenuation through trees: Measurements and models. *The Journal of the Acoustical Society of America* **84**: 1836–1845.
- Pyatygin, Opritov, Vodeneev** (2011). Signaling role of action potential in higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* **55**: 285–291.
- Qi, Kishigami, Nakagawa, Iida, Sokabe** (2004). A mechanosensitive anion channel in *Arabidopsis thaliana* mesophyll cells. *Plant & cell physiology* **45**: 1704–1708.
- Ringli** (2010). Monitoring the outside: cell wall-sensing mechanisms. *Plant physiology* **153**: 1445–1452.
- Rudd, Franklin-Tong** (1999). Calcium signaling in plants. *Cellular and molecular life sciences* **55**: 214–232.
- Sagi, Fluhr** (2006). Production of Reactive Oxygen Species by Plant. *Plant physiology* **141**: 336–340.
- Sanderson** (1872). Note on the electrical phenomena which accompany irritation of the leaf of *Dionaea muscipula*. *Proceedings of the Royal Society of London* **XXI**: 495–496.
- Sato, Kadota, Wada** (1999). Mechanically induced avoidance response of chloroplasts in fern protonemal cells. *Plant physiology* **121**: 37–44.
- Sehr, Agusti, Lehner, Farmer, Schwarz, Greb** (2010). Analysis of secondary growth in the *Arabidopsis* shoot reveals a positive role of jasmonate signalling in cambium formation. *The Plant journal* **63**: 811–822.
- Shemesh, Ovadia, Novoplansky** (2010). Anticipating future conditions via trajectory sensitivity. *Plant signaling & behavior* **5**: 1501–1503.
- Simons** (1981). The role of electricity in plant movements. *New Phytologist* **87**: 11–37.
- Stahlberg, Cleland** (2006). Slow Wave Potentials – a Propagating Electrical Signal Unique to Higher Plants. Potentials 291-308
- Sydenham, Findlay** (1973). The rapid movement of the bladder of *Utricularia* sp. *Australian Journal of Biological Sciences* **26**: 1115–1126.
- Takahashi, Suge, Kato** (1991). Growth Promotion by Vibration at 50 Hz in Rice and Cucumber Seedlings. *Plant Cell Physiology* **32**: 729–732.
- Telewski** (2006). A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *American journal of botany* **93**: 1466–1476.
- Telewski, Jaffe** (1986). Thigmomorphogenesis: the role of ethylene in the response of *Pinus taeda* and *Abies fraseri* to mechanical perturbation. *Physiologia plantarum* **66**: 227–233.
- Telewski, Pruyn** (1998). Thigmomorphogenesis: a dose response to flexing in *Ulmus americana* seedlings. *Tree physiology* **18**: 65–68.
- Thiel, Homann, Plieth** (1997). Ion channel activity during the action potential in Chara: new insights with new techniques. *Journal of experimental botany* **48**: 609–622.
- Tretner, Huth, Hause** (2008). Mechanostimulation of *Medicago truncatula* leads to enhanced levels of jasmonic acid. *Journal of experimental botany* **59**: 2847–2856.
- Trewavas** (2003). Aspects of plant intelligence. *Annals of botany* **92**: 1–20.
- Trewavas** (1999). Le calcium, c'est la vie: calcium makes waves. *Plant Physiology* **120**: 1–6.

- Trewavas, Knight** (1994). Mechanical signalling, calcium and plant form. *Plant molecular biology* **26**: 1329–1341.
- Turgeon, Webb** (1971). Growth Inhibition by Mechanical Stress. *Science* **174**: 961–962.
- Tyl** (1834). Fidlovačka aneb Žádný hněv a žádná rvačka.
- Uchida** (2002). Effects of Mechanical Vibration on Seed Germination of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant and Cell Physiology* **43**: 647–651.
- Del Valle, Cobo, Cobo, Vega** (2012). Mechanosensory neurons, cutaneous mechanoreceptors, and putative mechanoproteins. *Microscopy research and technique* **75**: 1033–1043.
- Verica, He** (2002). The Cell Wall-Associated Kinase (WAK) and WAK-Like Kinase Gene Family. *Plant physiology* **129**: 455–459.
- Vodenev, Opritov, Pyatygin** (2006). Reversible changes of extracellular pH during action potential generation in a higher plant *Cucurbita pepo*. *Russian Journal of Plant Physiology* **53**: 481–487.
- Wasternack, Hause** (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*: 1–38.
- Weiner** (2004). Allocation, plasticity and allometry in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **6**: 207–215.
- Whitehead** (1962). Experimental studies of the effect of wind on plant growth and anatomy. *New Phytologist* **61**: 59–62.
- Wilson, Archer** (1977). Reaction Wood: Induction and Mechanical Action. *Annual Review of Plant Physiology* **28**: 23–43.
- De Wit, Kegge, Evers, Vergeer-van Eijk, Gankema, Voeselek, Pierik** (2012). Plant neighbor detection through touching leaf tips precedes phytochrome signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 14705–14710.
- Wright, Knight, Knight** (2002). Mechanically stimulated TCH3 gene expression in *Arabidopsis* involves protein phosphorylation and EIN6 downstream of calcium. *Plant physiology* **128**: 1402–1409.
- Wyatt, Kiss** (2013). Plant tropisms: from Darwin to the International Space Station. *American journal of botany* **100**: 1–3.
- Yamanaka, Nakagawa, Mori, Nakano, Imamura, Kataoka, Terashima, Iida, Kojima, Katagiri, Shinozaki, Iida** (2010). MCA1 and MCA2 that mediate Ca<sup>2+</sup> uptake have distinct and overlapping roles in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **152**: 1284–1296.
- Yiyao, Wang, Xuefeng, Chuanren, Sakanishi** (2002). Effects of sound field on the growth of *Chrysanthemum callus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **24**: 321–326.
- Zhang, Turner** (2008). Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *PLoS one* **3**: e3699.
- Zhou, Wang, Li, Wang, Zhu** (2007). Responses of *Chrysanthemum* Cells to Mechanical Stimulation Require Intact Microtubules and Plasma Membrane–Cell Wall Adhesion. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**: 55–68.
- Zweifel, Zeugin** (2008). Ultrasonic acoustic emissions in drought-stressed trees - more than signals from cavitation? *The New phytologist* **179**: 1070–1079.