

# Uloga jasmonata u regulaciji antioksidacijskog odgovora tijekom infekcije krumpira (*Solanum tuberosum*) viroidom vretenastog gomolja krumpira

---

Lulić, Nina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:073725>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Nina Lulić

**Uloga jasmonata u regulaciji  
antioksidacijskog odgovora tijekom infekcije  
krumpira (*Solanum tuberosum*) viroidom  
vretenastog gomolja krumpira**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za kemijsku biologiju u Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković (IRB) u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Snježane Mihaljević, više znanstvene suradnice IRB-a, te komentorstvom prof. dr. sc. Željke Vidaković-Cifrek s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (PMF) Sveučilišta u Zagrebu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku PMF-a Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

## ZAHVALE

Želim zahvaliti svima iz Laboratorija za kemijsku biologiju na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković. Prvo svojoj mentorici dr. sc. Snježani Mihaljević na pruženoj prilici, strpljivom usmjeravanju i iznimno stručnom vodstvu. Zatim Ivi Marković i Bernardu Jariću koji su mi zaista uvijek bili spremni pomoći, uz iznimnu pedantnost i strpljenje. Zahvaljujem i svojoj komentorici prof. dr. sc. Željki Vidaković-Cifrek na temeljitosti, stručnim sugestijama i komentarima. Veliko hvala i Lari, Vjeki i Marti, bez kojih bi homogeniziranje uzoraka za analizu sadržaja peroksida bilo puno usamljenije i dugotrajnije.

Želim zahvaliti i svojoj obitelji, prijateljima, cimericama i kolegama na beskrajnom razumijevanju, strpljenju i pomoći. Hvala na druženju, šetnjama i kavama (posebice noni Diani s kojom sam u posljednjih pet godina prošetala čitav Zagreb).

I na kraju, posebno hvala mami i tati koji su mi svojom bezuvjetnom podrškom omogućili da budem tu gdje jesam.

Hvala svima od srca.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Uloga jasmonata u regulaciji antioksidacijskog odgovora tijekom infekcije krumpira (*Solanum tuberosum*) viroidom vretenastog gomolja krumpira

Nina Lulić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Krumpir je jedna od najvažnijih usjevnih biljaka u svijetu. Biotički stres izazvan patogenima može uzrokovati oksidacijski stres u napadnutim biljkama i velike gubitke u prinosu. Istražen je učinak infekcije viroidom PSTVd na nakupljanje  $H_2O_2$  i ekspresiju gena za antioksidacijske enzime, peroksidaze klase III, i marker-gene za biosintezu i signalizaciju posredovanu jasmonskom kiselinom (JA) u listovima biljaka divljeg tipa (WT), u JA-deficijentnim biljkama linije *opr3* i JA-neosjetljivim biljkama linije *coil*. Metodom spektrofotometrije dokazano je pojačano nakupljanje  $H_2O_2$  u inficiranim biljkama WT, slabo nakupljanje  $H_2O_2$  u inficiranim JA-neosjetljivim i smanjeno nakupljanje  $H_2O_2$  u inficiranim JA-deficijentnim biljkama, u 6. tjednu nakon inokulacije. Metodom RTqPCR potvrđena je transkripcijska aktivacija gena za antioksidacijske enzime koja je bila najjača u JA-deficijentnim biljkama, blago pojačana u WT, a smanjena u JA-neosjetljivim biljkama. Tretman metil jasmonatom (MeJA) prije infekcije doveo je do smanjenog nakupljanja  $H_2O_2$  i ekspresije gena za antioksidacijske enzime u zaraženim biljkama WT, a pojačanog nakupljanja  $H_2O_2$  i ranije ekspresije gena u JA-deficijentnim biljkama, što ukazuje na ulogu JA u regulaciji antioksidacijskih odgovora. Međutim, u sve tri ispitane linije krumpira, tretman s MeJA nije značajnije utjecao na smanjenje osjetljivosti na PSTVd.

Ključne riječi: biotički stres,  $H_2O_2$ , metil jasmonat, peroksidaze klase III, PSTVd, viroid  
(49 stranica, 14 slika, 5 tablica, 78 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: dr. sc. Snježana Mihaljević, viša znanstvena suradnica

Komentor: prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Izv. prof. dr. sc. Nenad Malenica

Rad prihvaćen: 07.11.2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

# The role of jasmonates in regulation of antioxidative response during potato spindle tuber viroid infection of potato (*Solanum tuberosum*)

Nina Lulić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Potato is one of the most important crop plants worldwide. Biotic stress caused by pathogen attack can cause oxidative stress in plants and result in great losses in yield. The effect of PSTVd infection of potato plants on the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as well as on the expression of genes encoding antioxidant enzymes, class III peroxidases, and marker genes for jasmonic acid (JA) biosynthesis and signaling was investigated in wild-type (WT) plants, JA-deficient *opr3* plants and JA-insensitive *coil* plants. Spectrophotometric analysis indicated increased accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in infected WT and *coil* plants, and decreased accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in infected *opr3* plants, 6 weeks after inoculation. RTqPCR analysis confirmed that transcriptional activation of genes encoding antioxidant enzymes was strongest in JA-deficient plants, slightly enhanced in WT, and decreased in JA-insensitive plants. Treatment with methyl jasmonate (MeJA) prior to infection led to reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and transcriptional activation of genes for antioxidant enzymes in WT plants, and increased accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and earlier gene expression in JA-deficient plants, which indicates the role of JA in the regulation of antioxidant responses. However, MeJA did not reduce the sensitivity of tested potato lines to PSTVd.

Keywords: biotic stress, class III peroxidases, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, methyl jasmonate, PSTVd, viroid  
(49 pages, 14 figures, 5 tables, 78 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: dr. sc. Snježana Mihaljević, senior research associate

Co-mentor: prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Reviewers:

Prof. Željka Vidaković-Cifrek, PhD

Prof. Martina Šeruga Musić, PhD

Assoc. Prof. Nenad Malenica, PhD

Thesis accepted: 07.11.2024.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Viroidi .....	1
1.2. Imunosni sustav biljaka.....	1
1.3. Reaktivni oblici kisika .....	3
1.4. Peroksidaze klase III .....	6
1.5. Jasmonska kiselina i metil-jasmonat.....	7
1.6. Interakcije ROS i jasmonata u uvjetima stresa .....	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	11
3. MATERIJAL I METODE.....	12
3.1. MATERIJAL .....	12
3.2. METODE.....	12
3.2.1. Kvantifikacija sadržaja vodikova peroksida.....	12
3.2.2. Izolacija RNA iz listova krumpira .....	13
3.2.3. Reverzna transkripcija.....	14
3.2.4. Lančana reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (qPCR).....	15
3.2.5. Statistička analiza.....	17
4. REZULTATI.....	18
4.1. Sadržaj H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> u listovima biljaka krumpira zaraženim viroidom PSTVd, u ovisnosti o pretretmanu s MeJA .....	18
4.2. Analiza ekspresije gena.....	20
4.2.1. Ekspresija gena u biljkama divljeg tipa.....	20
4.2.2. Ekspresija gena u JA-deficijentnoj liniji <i>opr3</i> .....	23
4.2.3. Ekspresija gena u JA-neosjetljivoj liniji <i>coi1</i> .....	27
5. RASPRAVA.....	32
5.1. U biljkama divljeg tipa infekcija s PSTVd uzrokuje nakupljanje H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> u kasnijim fazama infekcije, a tretman s MeJA smanjuje sadržaj H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	32

5.2.	U biljkama divljeg tipa infekcija s PSTVd uzrokuje promjene u ekspresiji gena za peroksidaze .....	34
5.3.	JA-posredovan odgovor je uključen u odgovor biljaka krumpira na infekciju viroidom PSTVd .....	37
5.4.	JA-deficijentne biljke linije <i>opr3</i> inficirane viroidom PSTVd su pod većim oksidacijskim stresom u odnosu na biljke divljeg tipa .....	38
5.5.	JA-neosjetljive biljke linije <i>coil</i> ne pokazuju adekvatan ROS-posredovan odgovor .....	40
6.	ZAKLJUČAK .....	42
7.	LITERATURA.....	43



## KRATICE

APX - askorbat peroksidaza

CAT - katalaza

*COI1* - gen koji kodira protein COI1 (eng. *coronatin-insensitive protein 1*)

DAMP - molekularni obrasci povezani s oštećenjima (eng. *damage-associated molecular patterns*)

DTT - ditionitritol

*EF1* - gen koji kodira protein EF1 (eng. *elongation factor 1*)

ETI - imunost potaknuta efektorima (eng. *effector-triggered immunity*)

HR - hipersenzitivni odgovor (eng. *hypersensitive response*)

INF - biljke krumpira inficirane viroidom PSTVd

JA - jasmonska kiselina

JA-Ile - jasmonoil-izoleucin

*JAR1* - eng. *jasmonic acid resistant1*, gen koji kodira jasmonil-L-izoleucin sintetazu, enzim koji katalizira pretvorbu JA u JA-Ile

JAZ - eng. *jasmonate ZIM-domain* protein, negativan regulator prijenosa signala u kojem sudjeluje JA

JMT - eng. *JA carboxyl methyltransferase*, protein koji sudjeluje u pretvorbi JA u JA-Ile

LiP - lignin peroksidaza

LOX - lipooksigenaza

MAMP - molekularni obrasci povezani s mikrobima (eng. *microbe-associated molecular patterns*)

MAPK - mitogenom-aktivirane proteinske kinaze

MeJA - metil jasmonat

NOX - NADPH-oksidaza vezana uz plazmatsku membranu, poznata i kao RBOH (eng. *respiratory burst oxidase homolog*)

*OPR3* - gen koji kodira protein OPR3 (eng. *12-oxophytodienoate reductase 3*)

PAMP - molekularni obrasci povezani s patogenom (eng. *pathogen-associated molecular patterns*)

POPA - peroksidaza povezana sa suberinom

POX - peroksidaze klase III

POX12 - peroksidaza 12

PR-proteini - proteini povezani s patogenezom (eng. *pathogenesis related*)

PRR - receptori koji prepoznaju strukturne obrasce patogena (eng. *pathogen related receptors*)

PSTVd - viroid vretenastog gomolja krumpira (eng. *potato spindle tuber viroid*)

PTI - imunost potaknuta PAMP (eng. *PAMP-triggered immunity*)

R proteini - proteini za rezistenciju (eng. *resistance R proteins*)

ROS - reaktivni oblici kisika (eng. *reactive oxygen species*)

SA - salicilna kiselina

SAR - sistemska rezistencija (engl. *systemic acquired resistance*)

SOD - superoksid dismutaza

wpi - tjedni nakon inokulacije (eng. *weeks post inoculation*)

## 1. UVOD

### 1.1. Viroidi

Viroidi su najjednostavniji subvirusni biljni patogeni koji se sastoje isključivo od jednolančane cirkularne RNA veličine 250-450 nt, koja ne kodira proteine. Replikacija viroida odvija se pomoću staničnog transkripcijskog sustava biljke domaćina, a infekcija viroidima u biljkama može rezultirati promjenom ekspresije gena. S obzirom na to da je za replikaciju viroida potrebna živa biljna stanica (Navarro i sur. 2012), viroidi spadaju u biotrofne patogene. Viroidi su, prema sekundarnoj strukturi genomske RNA i mjestu replikacije u stanici biljke domaćina, klasificirani u dvije porodice: (1) Avsunviroidae koje karakterizira razgranata sekundarna struktura RNA i koji se repliciraju u kloroplastima, te (2) Pospiviroidae, koje karakterizira štapićast oblik RNA i koji se repliciraju u jezgri biljke domaćina (Katsarou i sur. 2016; Venkataraman i sur. 2021). Viroid vretenastog gomolja krumpira (eng. *Potato spindle tuber viroid*, PSTVd), član porodice Pospiviroidae, je prvi viroid čija je struktura opisana (Venkataraman i sur. 2021). PSTVd je jedan od najznačajnijih patogena krumpira (*Solanum tuberosum*) i drugih važnih usjevnih biljaka, većinom iz porodice Solanaceae. Infekcija je u početnim fazama skoro neprimjetna, no u kasnijim fazama dolazi do sistemske infekcije i pojave simptoma koji uključuju zakržljali rast karakteriziran smanjenom površinom mladih listova i skraćenim internodijima u vršnom dijelu stabljike, uz smanjenje i tipičan vretenast oblik gomolja (Milanović i sur. 2019a). Invazivniji sojevi viroida PSTVd mogu znatno smanjiti prinos usjeva krumpira (Venkataraman i sur. 2021). Do sada nisu poznate sorte krumpira s prirodnom rezistencijom na viroid PSTVd, kao ni kemijska ili biološka sredstva za suzbijanje viroidne infekcije. Razumijevanje odgovora biljke na infekciju viroidima, ali i mehanizama koji određuju osjetljivost domaćina neizostavni su za razvoj novih strategija kontrole bolesti i zaštite biljaka od infekcije viroidima (Kovalskaya i Hammond 2014).

### 1.2. Imunosni sustav biljaka

Biljni imunosni sustav je iznimno kompleksan, a njegova aktivnost regulirana je na više razina i ovisi o vrsti interakcije biljke i patogena. Biljke su razvile više imunosnih mehanizama za obranu od različitih patogena. Bazalni (urođeni) imunosni sustav je prva linija obrane svake stanice u obrani biljke od patogena. Receptori koji prepoznaju strukturne obrasce patogena (eng. *pathogen related receptors*, PRR) su transmembranski proteini biljnih stanica. Oni prepoznaju molekularne obrasce povezane s patogenom (eng. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), molekularne obrasce povezane s mikrobima (eng. *microbe-associated molecular patterns*, MAMPs) ili molekularne obrasce povezane s oštećenjima (eng. *damage-associated molecular patterns*, DAMPs). Pritom dolazi do aktivacije signalnih puteva i početka obrane od

patogena, takozvana imunost potaknuta PAMP ili PTI (eng. *PAMP-triggered immunity*) (Pieterse i sur. 2012).

Neki su patogeni razvili faktore virulencije zvane elicitori, kojima prevladavaju bazalni imunosni odgovor biljaka što povećava infektivnost patogena. Kao odgovor, biljke su razvile dodatnu razinu obrane poznate kao imunost potaknuta efektorima ili ETI (eng. *effector-triggered immunity*). Aktivacijom odgovora ETI, proteini R za rezistenciju (eng. *resistance R proteins*), koji većinom pripadaju porodici NB-LRR proteina, prepoznaju efektorske faktore virulencije (Nürnberg i Lipka 2005) i aktiviraju daljnje obrambene odgovore uključujući oslobađanje antimikrobnih molekula i hidrolitičkih enzima (Nürnberg i Lipka 2005).

PTI i ETI mogu započeti ulaskom  $\text{Ca}^{2+}$  iona u stanicu, nakupljanjem reaktivnih oblika kisika (eng. *reactive oxygen species*, ROS) i endogenih hormona koji djeluju kao signalne molekule, te aktivacijom kaskadnih signalnih puteva posredovanih mitogenom-aktiviranim proteinskim kinazama (MAPK) i promjenom genske ekspresije i sintezom proteina povezanih s patogenezom (eng. *pathogenesis related*, PR-proteini), iako PR-proteini mogu biti prisutni i u zdravim biljkama, ali u niskim koncentracijama. Do sada je opisano 19 kategorija PR-proteina, svaka sa specifičnim svojstvima i aktivnostima uključujući enzimске aktivnosti, poput peroksidaza klase III (POX) koje pripadaju kategoriji PR-9 i aktivne su u ranim fazama infekcije (dos Santos i Franco 2023).

Ovisno o vrsti interakcije između biljke i patogena, razvija se lokalni hipersenzitivni odgovor (eng. *hypersensitive response*, HR) i/ili sistemski odgovor. Uloga HR je sprječavanje širenja patogena indukcijom lokalizirane smrti stanica domaćina, stvaranjem ROS i dušikovog oksida toksičnih za patogene (tzv. oksidacijski prasak), te nakupljanjem kaloze, suberina i lignina kao fizičke barijere širenju patogena (Dodds i Rathjen 2010). U slučaju izostanka HR-odgovora na napad patogena, razvija se sistemska infekcija, a u otpornih biljaka sistemska rezistencija (eng. *systemic acquired resistance*, SAR). SAR je karakteriziran sistemskom ekspresijom PR-gena u distalnim dijelovima biljke koji imaju ulogu zaštite neinficiranih dijelova biljke što rezultira razvojem kratkotrajne ili dugotrajne, pa i trajne otpornosti. Za razliku od HR, SAR ne rezultira staničnom smrću, već promovira preživljenje stanica i biljke domaćina (Fu i Dong 2013). PTI i ETI su karakteristični za odgovor na patogene složenije građe, poput bakterija ili gljiva. S druge strane, postavlja se pitanje na koji način viroidi aktiviraju imunosni odgovor biljke s obzirom na to da viroidi ne proizvode nikakve do sada poznate PAMP ili elicitore koje bi imunosni sustav biljke mogao prepoznati. Prilikom infekcije viroidom PSTVd u rajčici je dokazano da dolazi do aktivacije nekih elemenata PTI i ETI, te se prilikom infekcije aktivirala ekspresija gena za PR-proteine, gena uključenih u metabolizam biljnih hormona, ROS, biogenezu stanične stijenke i transport iona (Zheng i sur. 2017). Stoga je jasno da infekcija viroidom PSTVd uzrokuje aktivaciju imunosnog odgovora, no zbog postojanja odgovora biljaka specifičnih za vrstu i dalje nije razjašnjeno na koji način se to događa (Sano 2021).

### 1.3. Reaktivni oblici kisika

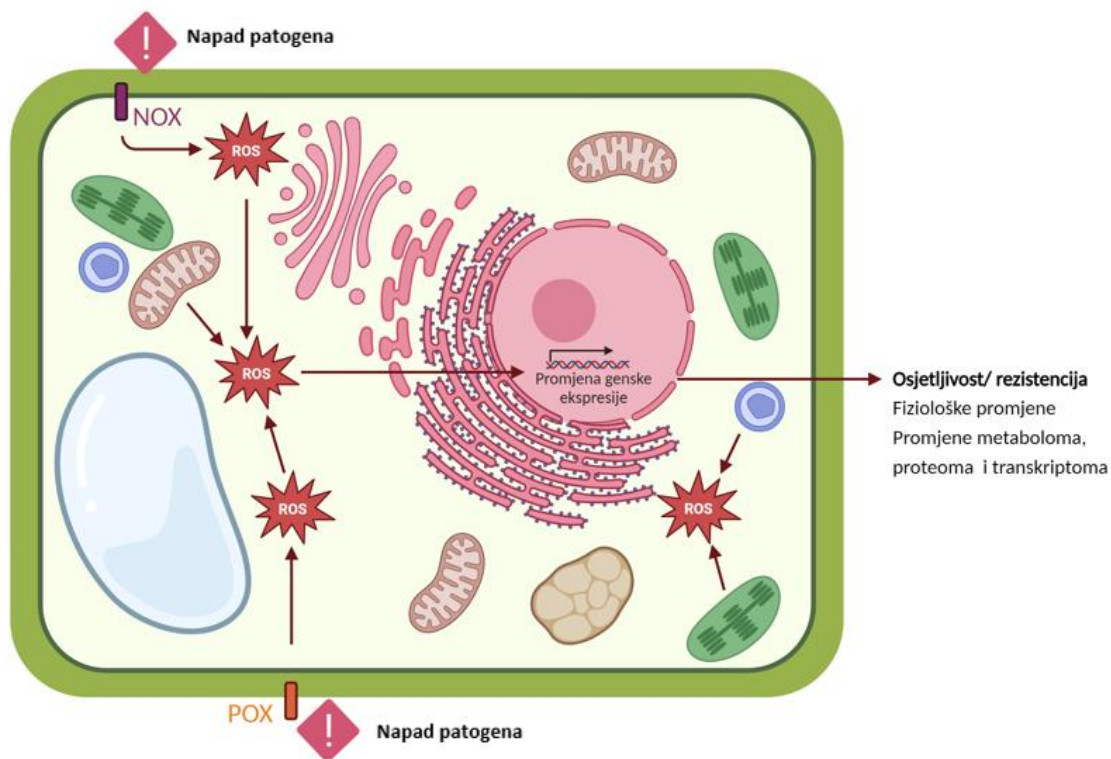
U svim živim organizmima odvijaju se redoks reakcije. Uz njih se vežu ROS, neizostavne signalne molekule uključene u redoks signalizaciju. U ROS se ubrajaju singletni kisik ( $^1\text{O}_2$ ), superoksidni radikal ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i hidroksilni radikal ( $\text{OH}^{\cdot}$ ). ROS djeluju kao signalne molekule aktivirajući kaskadne puteve MAPK i signalne puteve biljnih hormona uključenih u aktivaciju imunskog odgovora (Hasanuzzaman i sur. 2020). Uloga ROS u imunskom odgovoru biljaka je neizostavna. Stvaranje ROS na samom početku infekcije povezano je s obranom biljke i poboljšanim imunskim odgovorom domaćina, a proizvodnja ROS u kasnijim fazama infekcije povezana s povećanom virulencijom nekih patogena i razvojem simptoma (Vuorinen i sur. 2021).

Izvori ROS u stanici uključuju lance prijenosa elektrona kloroplasta i mitohondrija, kao i aktivnosti nekih enzima, poput NADPH oksidaza i POX. NADPH oksidaze, poznate i kao RBOHs (eng. *respiratory burst oxidase homologs*) (Hu i sur. 2020) su proteini vezani za staničnu membranu, i sudjeluju u sintezi ROS prilikom infekcije patogenim organizmima. NADPH oksidaze i POX kataliziraju sintezu  $\text{O}_2^{\cdot-}$  koji naknadno dismutira u  $\text{H}_2\text{O}_2$ , malu molekulu koja je u usporedbi s drugim ROS, dugog poluživota i važna za prijenos signala u brojnim molekularnim, biokemijskim i fiziološkim odgovorima u biljnim stanicama (Almagro i sur. 2009). Poznato je da  $\text{H}_2\text{O}_2$  sudjeluje u aktivaciji MAPK signalnih puteva i da aktivira proteine toplinskog šoka (eng. *heat shock proteins*, HSP), iako nije u potpunosti jasno djeluje li  $\text{H}_2\text{O}_2$  na aktivaciju proteina HSP izravno ili je indukcija HSP uzrokovana razmatanjem proteina zbog suviška  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Smirnoff i Arnaud 2019). Mnogo je mehanizama sinteze  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Najviše ROS se proizvodi aktivnošću lanaca prijenosa elektrona u kloroplastima i mitohondrijima. U zelenim dijelovima biljaka većina ROS nastaje u kloroplastima, dok su u ostalim dijelovima biljaka glavni izvor ROS mitohondriji.

U kloroplastima je proizvodnja ROS povezana s fotosustavima I i II, te lancem prijenosa elektrona. Nastanak  $^1\text{O}_2$  povezan je s reakcijama fotosustava II. Kada u stresnim uvjetima dođe do prezasićenosti fotosintetskog aparata, ekscitirani klorofil ne može prenijeti svu apsorbiranu svjetlosnu energiju na P680, tj. za korištenje u lancu prijenosa elektrona. Ovaj energetski suvišak se rasipa u obliku topline, fluorescencije, a uzrokuje i nastajanje tripletnog klorofila. Tripletni klorofil može reagirati s  $\text{O}_2$  i potaknuti nastajanje  $^1\text{O}_2$ . Poluživot  $^1\text{O}_2$  je kratak, no unatoč tome može difundirati izvan kloroplasta i reagirati s unutarstaničnim molekulama te interferirati s normalnim staničnim signalnim putovima. Mehlerovom reakcijom na fotosustavu I nastaje  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , a superoksid dismutaze (SOD), locirane na membranama strome i tilakoida, kataliziraju pretvorbu  $\text{O}_2^{\cdot-}$  u  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Metaloenzimi kataliziraju pretvorbu  $\text{O}_2^{\cdot-}$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  u  $\text{OH}^{\cdot}$  Fentonovom i Haber-Weissovom reakcijom.  $\text{OH}^{\cdot}$  je molekula koja difuzijom ne prelazi veće udaljenosti jer ima kratak poluživot i može reagirati s gotovo bilo kojom molekulom u blizini mjesta nastanka (Hasanuzzaman i sur. 2020).

U mitohondrijima pak  $O_2^{\cdot-}$  nastaje „curenjem“ elektrona s kompleksa I i III lanca prijenosa elektrona. Do toga dolazi zbog nemogućnosti  $O_2$  da primi više od jednog elektrona odjednom. SOD kataliziraju pretvorbu  $O_2^{\cdot-}$  u  $H_2O_2$  (Hasanuzzaman i sur. 2020). Oksidacijski enzimi peroksisoma i glioksisoma, glikolat oksidaza i acil-CoA oksidaza proizvode  $O_2^{\cdot-}$  u procesima fotorespiracije i oksidacije masnih kiselina prilikom klijanja sjemenki, katabolizma poliamina i purina te sinteze nekih hormona.

U apoplastu je flavoprotein NADPH oksidaza (NOX) glavni izvor ROS. NOX aktivnost potiču PAMP, DAMP, hormoni ili izvanstanični ATP. NOX je enzim vezan na membranu koji katalizira prijenos elektrona s NADPH na  $O_2$  uz formaciju  $O_2^{\cdot-}$ .  $O_2^{\cdot-}$  pri niskoj pH vrijednosti apoplasta reagira s  $H^+$  uz nastanak  $HO_2^{\cdot-}$  koji je stabilniji, reaktivniji i lakše prolazi kroz membrane od  $O_2^{\cdot-}$ .  $O_2^{\cdot-}$  i  $HO_2^{\cdot-}$  dismutiraju u  $H_2O_2$  na prethodno opisan način, posredstvom enzima SOD. Ovaj je korak važan prilikom prijenosa signala posredovanog enzimima NOX zbog kratkog poluživota nastalog  $O_2^{\cdot-}$  i permeabilnosti membrane za njega. U apoplastu  $H_2O_2$  može nastati i djelovanjem lipooksigenaza (LOX) i peroksidaza tipa III (POX). Enzimi POX su funkcionalni pri povišenoj pH vrijednosti i primarno su povezani s uklanjanjem suviška  $H_2O_2$ , no ovisno o kemijskom okolišu, mogu ga i proizvoditi. Sudjeluju i u unakrsnom vezanju polimera stanične stijenke te u imunom odgovoru biljaka (Smirnov i Arnaud 2019). Za vrijeme napada patogenim organizmom, u biljci dolazi do prepoznavanja PAMP, DAMP i MAMP, čime se potiče aktivnost NOX/RBOH i POX, što rezultira nastankom ROS. ROS nadalje mogu aktivirati razne signalne puteve, što rezultira lokalnom ili sistemskom aktivacijom obrambenog odgovora modulacijom ekspresije gena (Mittler i sur. 2022; Torres i sur. 2006). Sažet prikaz patogenom inducirane sinteze ROS dan je na Slici 1.



**Slika 1.** Sažet prikaz aktivacije ROS-signalnih puteva u odgovoru na infekciju patogenim organizmima. Napad patogena potiče aktivnost NOX i POX, koje sudjeluju u nastanku ROS. Stanični organeli, poput mitohondrija, kloroplasta i peroksisoma također su uključeni u proizvodnju ROS. Promjena redoks stanja uzrokovana nakupljanjem ROS dovodi do promjene genske ekspresije, a posljedično i do odgovora biljke na biotički stres. NOX - NADPH-oksidadza vezana uz plazmatsku membranu, POX – peroksidaze klase III, ROS – reaktivni oblici kisika. Prilagođeno iz Mittler i sur. (2022) i Torres i sur. (2006). Izrađeno u programu BioRender.

Unatoč iznimnoj važnosti ROS u razvoju biljnog organizma, prevelika koncentracija ovih molekula rezultira oksidacijskim stresom. Do oksidacijskog stresa dolazi kada se poremeti ravnoteža nastanka i uklanjanja ROS u stresnim uvjetima. Pritom dolazi do oštećenja DNA i proteina, do lipidne peroksidacije, i promjena u metaboličkim procesima što za biljku može biti pogubno. Stoga je koncentracija ROS u biljkama strogo regulirana raznim enzimskim i ne-enzimskim mehanizmima antioksidacijskog odgovora. Ne-enzimski mehanizmi uključuju razne molekule od kojih ću istaknuti samo askorbinsku kiselinu, glutation, alkaloida, flavonoide i karotenoide. U enzimске mehanizme ubrajamo enzime katalazu (CAT), askorbat peroksidazu (APX), POX i mnoge druge. CAT je enzim koji uklanja suvišak  $H_2O_2$ . Lokaliziran je u peroksisomima gdje je zbog niskog afiniteta za  $H_2O_2$  prisutan u visokim koncentracijama. APX je također enzim koji sudjeluje u uklanjanju suvišnog  $H_2O_2$  lokaliziran u peroksisomima, ali se izoforme ovog enzima nalaze u svim staničnim odjeljcima (Smirnov i Arnaud 2019).

#### 1.4. Peroksidaze klase III

Peroksidaze klase III (POX) su relativno maleni (30 – 45 kDa) oksidoreduktazni glikoproteini locirani u vakuoli i na staničnoj stijenci biljnih stanica. Specifične su za biljke i kataliziraju redoks reakcije s  $H_2O_2$  kao akceptorom elektrona. Sadrže hem b kao prostetičku skupinu i dva  $Ca^{2+}$  iona sa strukturnom ulogom. U osnovnom oksidacijskom stanju je željezo u molekuli hema prisutno u obliku  $Fe^{3+}$ , a koordinirano je dušikovim ionima molekule hema i proksimalnog histidina na pet mjesta, dok je šesto mjesto slobodno. Velik broj izoformi proteina POX osigurava preciznu regulaciju aktivnosti ovih enzima, uključenih u procese lignifikacije, elongacije stanica, toleranciju stresa i klijanje sjemenki.

Biotički ili abiotički stresni uvjeti induciraju ekspresiju specifičnih izoenzima peroksidaza čija je uloga povećanje tolerancije i obrana biljke. Prilikom napada patogenim organizmima, peroksidaze ograničavaju širenje infekcije stvaranjem strukturnih barijera unakrsnim povezivanjem elemenata stanične stijenke te formacijom lignina i suberina oksidacijom specifičnih prekursorskih molekula. Peroksidaze sudjeluju i u stvaranju toksičnog okoliša za patogene organizme regulacijom sinteze ROS i reaktivnih oblika dušika (eng. *reactive nitrogen species*, RNS). Lignifikacija je proces specifičan za provodna tkiva, a suberinizacija je karakteristična za podzemne dijelove biljke. Proces lignifikacije u staničnoj stijenci posredovan lignin peroksidazom (LiP) uključuje oksidaciju ligninskih monomera (monolignola) uz  $H_2O_2$  kao oksidans. Pritom nastaju radikali monolignola, a međusobnom reakcijom nastalih radikala formira se heteropolimer lignin. Lignifikacija stanica ksilema posebno je važna u obrani od patogenih organizama (Almagro i sur. 2009). Suberinizacija je proces modifikacije stanične stijenke stvaranjem polimera fenolnih spojeva nastalih fenilpropanoidnim putem i alifatskih spojeva nastalih procesom razgradnje masnih kiselina. Ovaj se proces događa prilikom rasta i razvoja kore, sjemenki i podzemnih dijelova, ali i u stresnim uvjetima kada je važan za učvršćivanje stanične stijenke, primjerice radi sprečavanja gubitka vode ili širenja patogena. Peroksidaza povezana sa suberinom (POPA) sudjeluje u polimerizaciji fenolnih monomera (Woolfson i sur. 2022). Osim oksidacijskih reakcija, neke POX poput enzima peroksidaze 12 (POX12) sudjeluju i u reakcijama važnim za regulaciju razine ROS u stanici.

Pretpostavljeni katalitički ciklus POX započinje inaktivnom formom enzima u kojoj je željezo u obliku  $Fe^{3+}$ . U reakciji s enzimom,  $H_2O_2$  se razlaže do molekule vode i atoma kisika. Nastali atom kisika veže se na hem skupinu POX pri čemu nastaje oksidirani iznimno reaktivan oblik ovog enzima nazvan Spoj I i porfirinski kation. U Spoju I željezo je u  $Fe^{4+}$  obliku. Zbog navedenih svojstava, Spoj I ima sposobnost oksidacije jedne molekule supstrata pri čemu se on sam reducira. Reducirani oblik enzima naziva se Spoj II. U njemu je željezo i dalje u  $Fe^{4+}$  obliku, ali je reduciran porfirinski kation. Druga molekula supstrata reducira Spoj II, željezo se vraća u  $Fe^{3+}$  oblik i katalitički ciklus se zatvara. Upravo je reaktivnost i sposobnost Spoja I da stvori radikale važna za prethodno opisan proces lignifikacije i detoksikaciju štetnih molekula. Osim



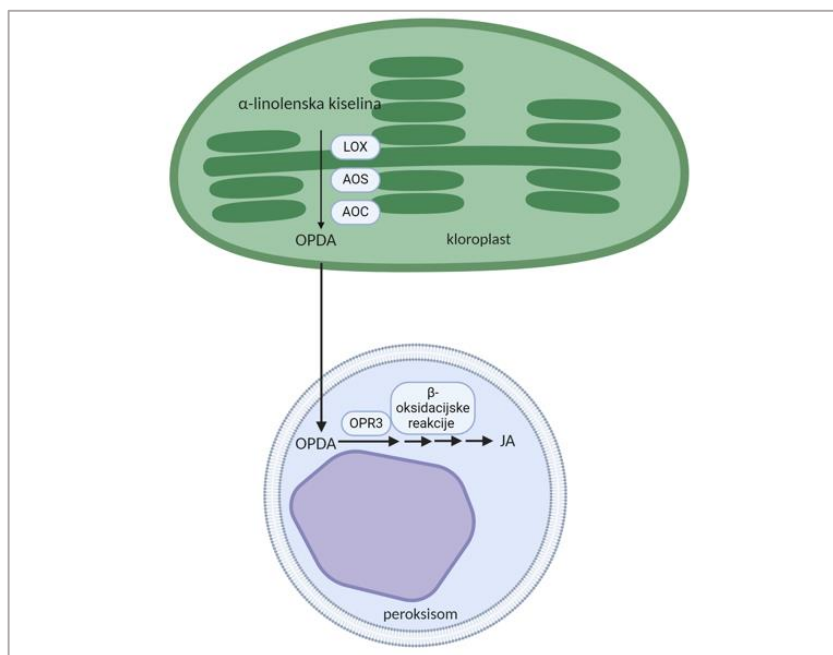
Spojeva I i II, postoji i Spoj III koji je reaktivni intermedijer koji nastaje kada  $O_2^{\cdot-}$  reagira s POX u osnovnom stanju. U prisustvu suviška  $H_2O_2$  Spoj III može Fentonovom reakcijom generirati  $OH^{\cdot}$ . Dva su mehanizma kojima POX kataliziraju nastanak  $O_2^{\cdot-}$ , a posljedično i  $H_2O_2$ . Prvi uključuje disocijaciju  $Fe^{3+}$  i  $O_2^{\cdot-}$  iz Spoja III prilikom katalitičkog ciklusa POX. Disocirani  $O_2^{\cdot-}$  dismutira u  $H_2O_2$ . Drugi mehanizam uključuje oksidaciju pogodne molekule u radikal koji može reagirati s  $O_2$  i stvoriti  $O_2^{\cdot-}$  (Shigeto i Tsutsumi 2016). Dakle, ovisno o kemijskom okolišu, POX mogu generirati  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  ili  $H_2O_2$  dismutacijom  $O_2^{\cdot-}$ .

### 1.5. Jasmonska kiselina i metil-jasmonat

Unatoč tome što su primarno okarakterizirani kao regulatori rasta i razvoja biljaka, hormoni su nezaobilazni dio biljnog imunskog sustava. Hormoni uključeni u obrambene odgovore biljaka su jasmonska kiselina (eng. *jasmonic acid*, JA) i jasmonati, salicilna kiselina (eng. *salicylic acid*, SA), etilen (ET), abscisinska kiselina (eng. *abscisic acid*, ABA), gibberelini, citokinini i auksin. Nijedan hormon nije samostalno zaslužan za obranu biljke nakon infekcije, već prilagodba biljaka na stresne uvjete uvelike ovisi o njihovoj međusobnoj interakciji i aktivaciji nizvodnih signalnih puteva (Pieterse i sur. 2012).

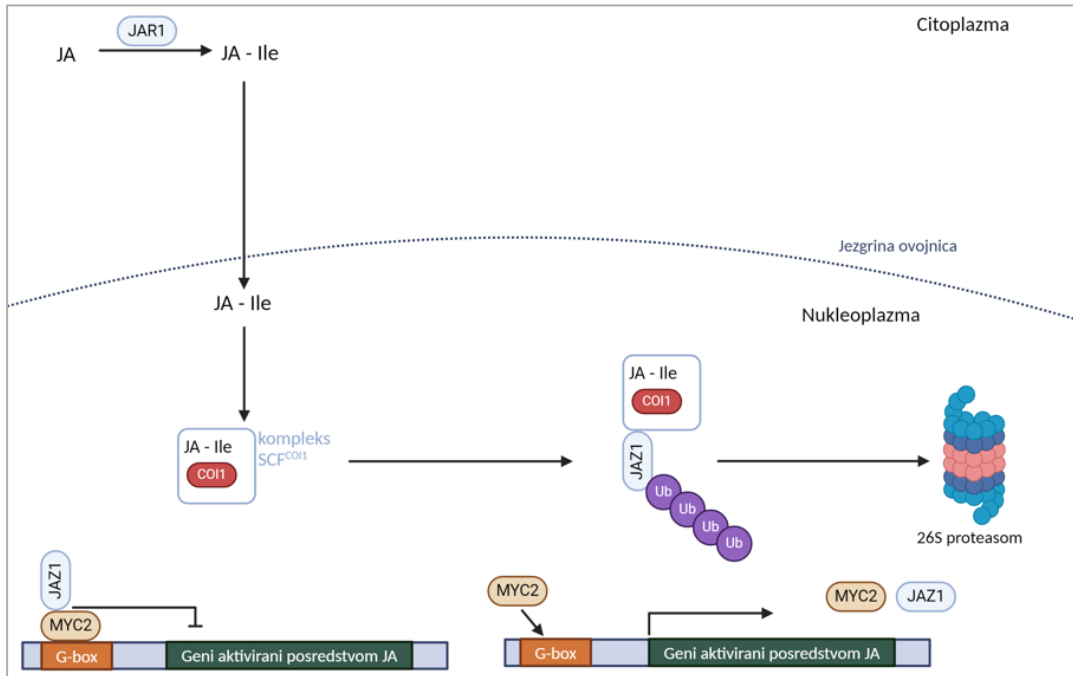
JA i jasmonati, poput metil jasmonata (eng. *methyl jasmonate*, MeJA) su lipidni spojevi koji reguliraju rast, razvoj i starenje biljaka, a u stresnim uvjetima interakcijom s ostalim hormonima i molekulama sudjeluju u aktivaciji obrambenih mehanizama biljaka, uključujući aktivaciju ROS signalnih puteva (Yu i sur. 2019). MeJA je hlapljivi mirisni spoj identificiran iz biljke *Jasminum grandiflorum*, a za razliku od JA, može utjecati na dijelove biljke udaljene od mjesta proizvodnje. Uz JA i ostale jasmonate, MeJA je uključen u važne razvojne procese kao što su klijanje sjemena, razvoj korijena, dozrijevanje plodova, gravitropizam te kretanje i senescenciju listova. Osim toga, JA i MeJA povezani su s regulacijom stresa u biljkama indukcijom ekspresije obrambenih gena, aktivacijom antioksidacijskih enzima, akumulacijom obrambenih molekula poput fenola te regulacijom antioksidacijskog odgovora, fotosinteze i zatvaranja puči (Yu i sur. 2019).

Većina biosinteze JA odvija se u kloroplastima i peroksisomima oktadekanoidnim putem. Proces započinje cijepanjem lipidne okosnice membrane kloroplasta fosfolipazom D. Nastala  $\alpha$ -linolenska kiselina (C18:3) se oksidira 13-lipooksigenazama (LOX) uz nastanak 13-hidroperoksi-linolenske kiseline koja uz alen oksid sintazu i alen oksid ciklazu prelazi u 12-okso-fitodienoinsku kiselinu. LOX6 je enzim povezan s najranijom akumulacijom JA nakon izlaganja biljke stresnim uvjetima (Chauvin i sur. 2013). 12-okso-fitodienoinska kiselina prelazi u peroksisom gdje ju 12-oksofitodienoat reduktaza 3 (OPR3) i 3  $\beta$ -oksidacijske reakcije prevode u JA (Slika 2).



**Slika 2.** Pojednostavljen shematski prikaz biosinteze jasmonske kiseline (JA). α-linolenska kiselina, nastala cijepanjem lipidne okosnice membrane kloroplasta konvertira se u OPDA posredstvom enzima LOX, AOS i AOC. Nastala OPDA prenosi se u peroksisom, gdje se uz pomoć enzima OPR3 i slijedom β-oksidacijskih reakcija konvertira u JA. LOX – lipooksigenaze, AOS – alen oksid sintaza, AOC – alen oksid ciklaza, OPR3 - 12-oksofitodienoat reduktaza 3, OPDA - 12-okso-fitodienoinska kiselina, JA – jasmonska kiselina. Prilagođeno iz Wasternack i Hause (2019). Izrađeno u programu BioRender.

Nastala JA se u citoplazmi može konjugirati s izoleucinom u reakciji kataliziranoj jasmonil-L-izoleucin sintetazom (JAR1) (Wasternack i Song 2017) u biološki aktivan jasmonoil-izoleucin (JA-Ile) koji može proći kroz jezgrinu membranu i u jezgri se vezati na *coronatin-insensitive protein 1* (COI1), ključan regulator signalizacije posredovane JA. Vezanjem JA-Ile s COI1 nastaje kompleks SCF<sup>COI1</sup> koji se veže na protein JAZ (represor signalizacije posredovane JA) i inducira njegovu ubikvitinaciju i proteosomalnu razgradnju. Uklanjanjem represorskog proteina JAZ, aktivira se ekspresija nizvodnih gena u prijenosu signala u kojem sudjeluje JA, koja može biti posredovana transkripcijskim faktorima MYC, ERF i MYB (Slika 3) (Kolupaev i sur. 2023; Wasternack i Hause 2016). MYC2/3/4 su transkripcijski faktori koji koji sadrže bHLH domenu i djeluju i kao aktivatori i kao represori u prijenosu signala u kojem sudjeluje JA, a njihova ekspresija ovisi o sadržaju JA u stanici i ekspresiji kofaktora JAZ na način ovisan o COI1 (Wasternack i Song 2017).



**Slika 3.** Pojednostavljen shematski prikaz aktivacije prijenosa signala posredovanog s JA. Enzim JAR1 u citoplazmi katalizira konjugaciju JA i izoleucina, pri čemu nastaje JA-Ile. JA-Ile prelazi u jezgru gdje se veže na protein COI1 pri čemu nastaje kompleks SCF<sup>COI1</sup>. Kompleks SCF<sup>COI1</sup> inducira proteasomalnu razgradnju represora JAZ1, pri čemu se transkripcijski aktivator MYC2 oslobađa i aktivira transkripciju nizvodnih gena, poput gena MYC i JAZ. JAR1 - jasmonil-L-izoleucin sintetaza, JA - jasmonska kiselina, JA-Ile - jasmonoil-izoleucin, COI1 - *coronatin-insensitive protein 1*, JAZ1 - *jasmonate ZIM-domain*. Prilagođeno iz Wasternack i Song (2017). Izrađeno u programu BioRender.

Dodatne komponente regulacije dobivene su karakterizacijom signalizacije povezane s Ca<sup>2+</sup>, transkripcijskih faktora povezanih s JA i mitogenom-aktiviranih proteinskih kinaza (MAPK). U uročnjaku (*Arabidopsis thaliana*), AtMYC2 različito regulira dvije grane u JA signalnom putu. Jedna od tih grana, koju pozitivno regulira AtMYC2, inducira ekspresiju gena uključenih u odgovor na ranjavanje (mehaničko ili biotsko). Druga grana, koju negativno regulira AtMYC2, potrebna je za ekspresiju obrambenih gena od patogena (Wasternack i Hause 2013).

MeJA nastaje iz JA djelovanjem JA-karboksi-metiltransferaze (JMT) lokalizirane u citoplazmi, a povišena ekspresija gena *JMT* povezana je s otpornošću biljaka na neke patogene. S druge strane, biljka može iskoristiti egzogeno dodani MeJA obradom do bioaktivnog JA-Ile (Tamogami i sur. 2008). Osim toga, u uvjetima biotičkog stresa, egzogeno dodan MeJA inducira sistemsku obranu biljaka (Yu i sur. 2019), a primjena MeJA na biljkama povezana je s inhibicijom umnažanja nekih virusa (García-Marcos i sur. 2013). Stoga je MeJA značajan za istraživanja mehanizama uključenih u toleranciju biljaka na stresne uvjete (Cheong i Choi 2003; Yu i sur. 2019).

## 1.6. Interakcije ROS i jasmonata u uvjetima stresa

Sve je više istraživanja usmjereno na međusobne interakcije biljnih hormona, kao i njihove interakcije s drugim sudionicima imunskog odgovora. Ovo je ključno jer nijedan dio imunskog sustava ne djeluje sam za sebe, već su svi isprepleteni. Pokazano je da JA utječe na akumulaciju ROS što ukazuje na to da ROS djeluju kao medijatori prilikom JA-posredovanih obrambenih odgovora. Indukcijom akumulacije ROS, JA posredno aktivira antioksidacijski sustav što može spriječiti nastanak oštećenja uslijed oksidacijskog stresa i povećati toleranciju na stresne uvjete.

Egzogeni tretman s MeJA prije infekcije povezan je s indukcijom otpornosti na patogene organizme (Demiwal i sur. 2024). Ova stečena otpornost rezultat je modulacije metabolizma ROS posredovanog MeJA. Mehanizam modulacije homeostaze ROS egzogenim MeJA uključuje aktivaciju antioksidacijskih enzima, što rezultira smanjenjem sadržaja ROS poput  $H_2O_2$  (Dai i sur. 2023; Demiwal i sur. 2024).

Utjecaj JA na ROS i antioksidacijske enzime je uzajaman. Veća količina ROS, uključujući  $H_2O_2$ , kao i neke antioksidacijske molekule u biljci, mogu inducirati sintezu JA i MeJA (Kolupaev i sur. 2023) što vodi jačanju obrambenog odgovora. U usporedbi s ostalim ROS,  $H_2O_2$  je stabilniji i može se širiti biljkom kao signalna molekula, pa indukcijom biosinteze JA u distalnim tkivima može potaknuti SAR (Xia i sur. 2015). Osim toga, JA regulira biosintezu raznih bioaktivnih sekundarnih metabolita i u interakciji s ostalim hormonima regulira obranu biljke u uvjetima biotičkog stresa (Chen i sur. 2019). Međudjelovanje JA i ROS u stresnim uvjetima ovisi o eksperimentalnom sustavu kao i o vrsti stresnog uvjeta, te je i dalje predmet istraživanja.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj istraživanja je pojasniti ulogu JA u odgovoru biljaka krumpira (*Solanum tuberosum*) na infekciju viroidom PSTVd. Prvi cilj ovog rada je objasniti doprinos JA regulaciji antioksidacijskog odgovora na infekciju viroidom PSTVd u krumpiru. Kvantifikacijom sadržaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u različitim vremenskim točkama nakon infekcije bit će pokazano kako i kada dolazi do aktivacije antioksidacijskog odgovora u biljkama divljeg tipa, JA-deficijentnim i JA-neosjetljivim biljkama. Drugi cilj je povezati infekciju i nakupljanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> s ekspresijom gena za antioksidacijske enzime i marker-gena uključenih u biosintezu JA i prijenos signala u kojem sudjeluje JA. Treći cilj je utvrditi može li egzogeni tretman s MeJA prije infekcije povećati antioksidacijski kapacitet u inficiranim JA-deficijentnim i JA-neosjetljivim biljkama, u odnosu na biljke divljeg tipa. Bolje razumijevanje uloge JA u odgovoru biljaka krumpira na infekciju viroidom PSTVd može doprinijeti razvoju novih strategija zaštite od ovog patogena.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. MATERIJAL

U eksperimentima sam koristila listove biljaka krumpira (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) triju linija – biljke divljeg tipa (WT), JA-deficijentne biljke *opr3* (linija A3) i JA-neosjetljive biljke *coi1* (linija X5). Biljkama linije A3 je utišan gen *OPR3* uključen u biosintezu JA (Kolupaev i sur. 2023) a biljkama linije X5 utišan je gen *COI1* koji sudjeluje u prijenosu signala u kojem sudjeluje JA. Dio biljaka bio je inficiran viroidom PSTVd (INF), a drugom je dijelu inokulirana voda (M). Osim toga, dio biljaka je pretretiran prskanjem 1 mM MeJA jedan dan prije i šest dana nakon inokulacije viroidne RNA ili vode, a preostale biljke su pretretirane vodom. Uzorci sistemski inficiranih (neozlijeđenih) listova koji se nalaze neposredno iznad inokuliranih listova, sakupljeni su prije pojave simptoma (2. i 4. tjedan nakon inokulacije) i nakon pojave simptoma (6. tjedan nakon inokulacije). Uzorci su pohranjeni i čuvani u označenim aluminijskim folijama u plastičnim vrećicama na -80 °C. Navedeni eksperimenti na biljkama i sakupljanje uzoraka za analizu sadržaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i ekspresije gena u sistemski inficiranim listovima s viroidom PSTVd provedeni su prije početka izrade mog diplomskog rada.

#### 3.2. METODE

##### 3.2.1. Kvantifikacija sadržaja vodikova peroksida

Sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u listovima krumpira određen je spektrofotometrijskom metodom prema Mukherjee i Choudhuri (1983). Listove krumpira usitnila sam u ohlađenom tarioniku uz dodatak tekućeg dušika. Radila sam brzo kako se tkivo ne bi otapalo što bi moglo utjecati na rezultate. U ohlađene mikroeprovete (Eppendorf, Njemačka, *safelock*) volumena 2 ml koje su sadržavale 1 mL acetona, stavila sam 50-100 mg smrvljenog biljnog tkiva i promućkala. Zabilježila sam točnu masu kako bih mogla izračunati molarnu koncentraciju prilikom obrade podataka. Mikroeprovete sam dobro zatvorila da aceton ne bi hlapio i do daljnje upotrebe sam ih držala na ledu. Za svaki uzorak imala sam tri biološke replike. Homogenat u acetonu sam centrifugirala u centrifugi (Eppendorf 5415R, Njemačka) ohlađenoj na 4 °C, 5 min pri 10 000 ×g. Supernatant (1 mL) sam prebacila u čistu mikroeprovetu i dodala 400 µL titanova (IV) sulfata (TiSO<sub>4</sub>, Kemika, Hrvatska) i 500 µL amonijaka (NH<sub>4</sub>OH, Kemika, Hrvatska). Također sam pripremila i dvije slijepa probe dodatkom 1 mL acetona, 400 µL TiSO<sub>4</sub> i 500 µL NH<sub>4</sub>OH u dvije zasebne mikroeprovete. Uzorke i slijepa probe sam centrifugirala u centrifugi ohlađenoj na 4 °C pri 10 000 ×g 10 min. Supernatant sam bacila, a talogu sam dodala 1 mL 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i miješala na tresilici dok se nije odvojio od mikroeprovete. Zatim sam talog otapala 10 minuta na sonikatoru (Sonorex RK 255 H, Bandelin, Njemačka). Dobivenu otopinu sam centrifugirala na 4 °C pri 12 000 ×g 10 min. Uzorke sam nanijela na pločicu s 96 jažica pri čemu sam za svaki uzorak nanijela tri tehničke replike i zatim mjerila apsorbanciju čitačem mikrotitarskih

pločica (Labsystems Multiskan MS, Thermo Scientific, SAD) pri 405 nm. Podatke sam prikupila koristeći program Ascent software for Multiskan, v2.6 (Thermo Scientific, SAD).

Standardnu krivulju za određivanje sadržaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> izradila sam mjerenjem apsorbancije osam uzoraka poznatih koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kemika, Hrvatska) u rasponu od 0,031 mM do 2,0 mM, koje sam tretirala istim postupkom kao i ekstrakte biljnog tkiva. U programu Microsoft Excel sam na temelju dobivene jednadžbe pravca izračunala sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i rezultate izrazila kao molarnu koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u masi svježeg biljnog tkiva (mM/g svježe mase).

### **3.2.2. Izolacija RNA iz listova krumpira**

Za izolaciju ukupne RNA iz listova krumpira koristila sam komercijalni komplet *Direct-zol RNA Miniprep Kit* (ZymoResearch, SAD) prema uputama proizvođača. U ohlađene mikroeprevete volumena 2 ml koje su sadržavale 12 kuglica za lizu, dodala sam 50-100 mg smrvljenog biljnog tkiva i tekući dušik. Uzorke sam tri puta po jednu minutu homogenizirala koristeći homogenizator (Retsch MM 400, Njemačka). U dobiveni homogenat sam dodala 800 µL reagensa TRIzol® i 800 µL 96%-tnog etanola. Uzorke sam temeljito promiješala i prebacila u Zymo-Spin™ IICR kolone u mikroeprevetama za sakupljanje filtrata. Nakon centrifugiranja na 4 °C pri 13 000 ×g 30 s, iz mikroeprevete sam uklonila filtrat, a RNA zaostalu u koloni isprala sam dodatkom 400 µl pufera RNA *Wash Buffer* i centrifugiranjem na 4 °C pri 13 000 ×g 30 s. Zatim sam napravila DNazni pretretman RNA dodatkom 80 µl otopine DNaze I (5 µL DNaze I i 75 µL pufera DNA *Digestion Buffer* iz kompleta, prethodno pomiješanih u zasebnoj mikroepreveti oslobođenoj od RNaza). Nakon 15 min inkubacije na sobnoj temperaturi, kolone sam dvaput isprala dodatkom 400 µL otopine Direct-zol™ RNA *PreWash* i centrifugiranjem na 4 °C pri 13 000 ×g 30 s. Zatim sam dodala 700 µL otopine RNA *Wash Buffer* na kolone i centrifugirala ih na 4 °C pri 13 000 ×g 1 min kako bih uklonila sav pufer. Kolonu s RNA sam prebacila u novu mikroeprevetu oslobođenu od RNaza te eluirala RNA dodatkom 50 µL vode bez DNaza i RNaza (iz kompleta). Čistoću i koncentraciju uzoraka RNA izmjerila sam koristeći uređaj NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, SAD).

### 3.2.3. Reverzna transkripcija

Za reverznu transkripciju (RT) koristila sam reverznu transkriptazu *Superscript IV* (Thermo Scientific, SAD) prema uputama proizvođača. Prvo sam napravila smjesu za pripremanje početnica na RNA koja se sastojala od početnica Oligo(dT)<sub>12-18</sub>, mješavine dNTP, 5 µg prethodno izolirane RNA i H<sub>2</sub>O oslobođene od nukleaza (Smjesa A, Tablica 1). Ukupni volumen Smjese A je iznosio 13 µL za jednu reakciju, kako bi nakon miješanja sa 7 µL Smjese B ukupni volumen RT reakcije iznosio 20 µL. Smjesu A sam promiješala pipetiranjem, centrifugirala na 4 °C pri 10 000 ×g 10 s, inkubirala 5 min na 65 °C u uređaju za PCR Applied Biosystems PCR System 2700 te prebacila (minimalno 60 s) na led do dodavanja Smjese B.

**Tablica 1.** Sastav Smjese A za jednu reakciju RT.

Komponenta	Volumen / µL
početnice 50 µM Oligo(dT) <sub>12-18</sub>	1
10 mM dNTP mix	1
5 µg prethodno izolirane RNA	do 11
H <sub>2</sub> O oslobođena od nukleaza	do 13

U zasebnoj mikroeproveti napravila sam reakcijsku smjesu za RT koja se sastojala od pufera SSIV (*SuperScript™ IV RT Reaction Buffer*), DTT-a, reverzne transkriptaze i inhibitora RNaze (Smjesa B, Tablica 2). Ukupni volumen Smjese B je iznosio 7 µL za jednu RT reakciju. Smjesu B sam promiješala pipetiranjem, centrifugirala na 4 °C pri 10 000 ×g 30 s, dodala u Smjesu A i inkubirala uzorke na 55 °C 10 minuta, a zatim na 80 °C 10 minuta kako bih inaktivirala enzim i zaustavila reakciju RT. Dobivenu cDNA razrijedila sam 50 puta u vodi oslobođenoj od nukleaza kako bih postigla konačnu koncentraciju 5 ng/µL. Razrijeđenu cDNA sam pohranila u zamrzivač na -20 °C do daljnje upotrebe.

**Tablica 2.** Sastav Smjese B volumena 7 µL za jednu reakciju RT.

Komponenta	Volumen / µL
5 × SSIV pufer	4
100 mM DTT	1
RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor	1
<i>SuperScript IV</i> reverzna transkriptaza (200 U/µL)	1



### 3.2.4. Lančana reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (qPCR)

U istraživanju sam analizirala relativnu ekspresiju gena za askorbat peroksidazu 1 (*APX1*), katalazu (*CAT2*), lignin peroksidazu (*LiP*), peroksidazu povezanu sa suberinom (*POPA*), peroksidazu 12 (*POX12*), lipooksigenazu 6 (*LOX6*), jasmonil-L-izoleucin sintetazu (*JAR1*), i *MYC2*, lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (qPCR). Ekspresija gena izražena je kao promjena ekspresije u odnosu na referentni gen Elongacijski faktor 1 (*EFI*) čija uloga je da ispravi razlike u početnoj koncentraciji uzoraka.

Za analizu ekspresije navedenih gena koristila sam specifične početnice navedene u Tablici 3. Pripremila sam reakcijsku smjesu koja se sastojala od otopine *SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad, SAD), uzvodnih i nizvodnih početnica i destilirane vode oslobođene nukleaza (Tablica 4). Ukupni volumen za jednu reakcijsku smjesu iznosio je 10  $\mu$ L. Reakcijsku smjesu sam držala na ledu do upotrebe.

Uzorke cDNA (5 ng/ $\mu$ L) sam prije upotrebe odledila i promiješala na tresilici. Na mikrotitarsku pločicu za qPCR sam nanijela 8  $\mu$ L reakcijske smjese (Tablica 4) i 2  $\mu$ L cDNA uzorka pri čemu sam za svaki uzorak nanijela tri tehničke replike. Pločicu sam centrifugirala koristeći *FastGene Plate Centrifuge* (Nippon Genetics, Njemačka). Reakcije qPCR sam provodila u uređaju *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad, SAD). Program se sastojao od kratke aktivacije polimeraze i početne denaturacije cDNA (30 s na 95 °C), te 40 ciklusa denaturacije cDNA (10 s na 95 °C) i prijanjanja početnica i elongacije (20 s na 60 °C) (Tablica 5). Za analizu krivulje taljenja koristila sam jedan ciklus zagrijavanja brzine 0,1 °C/s uz raspon temperatura od 65 do 95 °C.

Relativnu ekspresiju pojedinog gena odredila sam metodom  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak i Schmittgen 2001) pomoću programa *CFX Maestro v1.1* (Bio-Rad, SAD). Omjer zastupljenosti transkripata ciljnog gena i referentnog gena *EFa1* u inficiranim biljkama normalizirala sam u odnosu na pripadajuću neinficiranu i netretiranu kontrolu. Vrijednost  $2^{-\Delta\Delta CT}$  poznata je i kao faktor promjene ekspresije gena (eng. *fold change* – fc) koji opisuje kako je ekspresija gena od interesa promijenjena u odnosu na referentni gen.

**Tablica 3.** Početnice korištene za RTqPCR analize ekspresije gena.

ID gena (NCBI)	Ime gena	Naziv početnice	Nukleotidna sekvenca 5'-3'	Duljina umnoženog PCR produkta (pb)
102586473	<i>APX1</i>	APX-F*	ACCAATTGGCTGGTGTGTT	147
		APX-R	TCACAAACACGTCCCTCAA	
102577720	<i>CAT2</i>	CAT-F*	TGCCCTTCTATTGTGGTTCC	144
		CAT-R	GATGAGCACACTTTGGAGGA	
102577694	<i>POPA</i>	POD-F*	CAGCAACCAAGGTATAATGTTT	140
		POD-R	CGCGGATGGAGGCAAGTCT	
102588050	<i>LiP</i>	POX-lignin-F**	ACGTAGAGATGTTTCGAGCCG	200
		POX-lignin-R	CACCAGGGCACTCATTTTCC	
102586327	<i>POX12-like</i>	POX12-F**	CACAGAAGCTCAAAGGCCTG	179
		POX12-R	CACACCCCTGAACAAAGCAA	
102583480	<i>LOX6</i>	LOX6-F**	TGTGTCACACCCTTCTTTTCTTC	119
		LOX6-R	AAGTGGAGTGGATCTTGATTGAG	
102578750	<i>JAR1</i>	JAR1-F***	CCATTTCAGTCCCAGAAGATCACG	115
		JAR1-R	TGGAGGCAGCAGCACAGC	
102590233	<i>MYC2</i>	MYC2-F**	CGGCCCAATTCAGCTTCAT	112
		MYC2-R	GACCCTAATTCGAACACGCC	
544055	<i>EFa1</i>	EF1-F****	TACTGGTGGTTTTGAAGCTG	166
		EF1-R	AACTTCCTTCACGATTCATCATA	

\* (Jiang i sur. 2020)

\*\* početnice kreirane u LKB, IRB (neobjavljeno)

\*\*\* (Saubeau i sur. 2016)

\*\*\*\* (Expósito-Rodríguez i sur. 2008)

**Tablica 4.** Sastav jedne reakcijske smjese (10 µL) za analizu relativne ekspresije gena metodom qPCR.

Komponenta	Volumen / µL
<i>SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix</i> (2×)	5,0
Uzvodne početnice (30 µmol/ µL)	0,05
Nizvodne početnice (30 µmol/ µL)	0,05
Destilirana voda oslobođena nukleaza	2,9

**Tablica 5.** Program korišten za analizu relativne ekspresije gena uređajem CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, SAD). Dodatno, za analizu krivulje taljenja koristila sam jedan ciklus zagrijavanja brzine 0,1 °C/s uz raspon temperatura od 65 do 95 °C.

	<b>Temperatura / °C</b>	<b>Vrijeme / s</b>	<b>Broj ciklusa</b>
Aktivacija polimeraze i početna denaturacija cDNA	95	30	1
Denaturacija cDNA	95	10	40
Prijanjanje početnica i elongacija	60	20	

### 3.2.5. Statistička analiza

Rezultate dobivene izolacijom vodikova peroksida iz listova biljaka krumpira sam statistički obradila programom XLSTAT u sklopu programa Microsoft Excel Duncanovim testom višestrukih raspona (eng. *Duncan's Multiple Range Test*, DMRT) i analizom varijance (ANOVA). Za određivanje značajnosti utjecaja pretretmana MeJA na gensku ekspresiju u inficiranim biljkama sam koristila Studentov t-test. Statistički značajnima smatrala sam rezultate pri  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u listovima biljaka krumpira zaraženim viroidom PSTVd, u ovisnosti o pretretmanu s MeJA

Za određivanje učinka infekcije viroidom PSTVd i pretretmana s MeJA na nakupljanje ROS u listovima krumpira, izmjerila sam sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u svježem tkivu listova neinficiranih netretiranih biljaka (M0), inficiranih netretiranih biljaka (INF0), neinficiranih biljaka pretretiranih s MeJA (MT) i inficiranih biljaka pretretiranih s MeJA (INFT) (Slika 4). Sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> izmjeren je u neozlijeđenim listovima koji su se nalazili neposredno iznad inokuliranih listova.

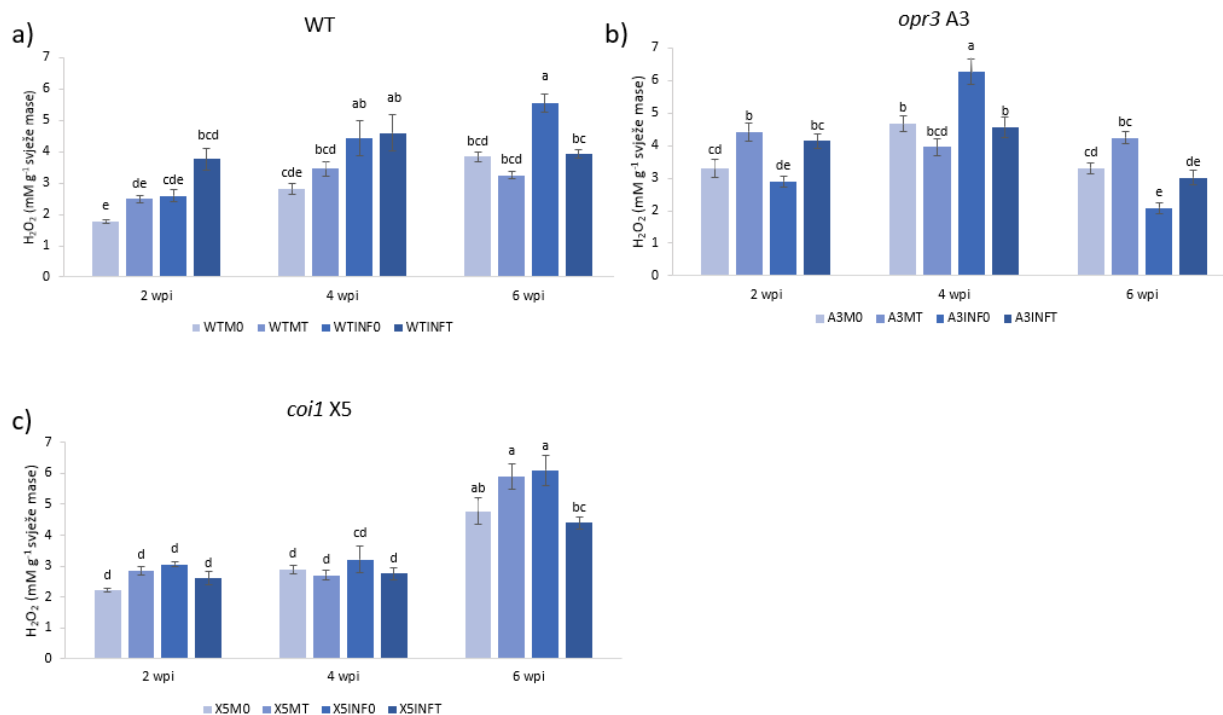
U biljkama divljeg tipa (WT), razina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je porasla nakon infekcije (WTINF0) u odnosu na zdrave biljke (WTM0) u svim promatranim vremenskim točkama: 2, 4 i 6 tjedana nakon inokulacije (eng. *weeks post inoculation*, wpi), pri čemu je navedeni porast bio statistički značajan u 4. i 6. wpi (Slika 4a). Inficirane biljke pretretirane s MeJA (WTINFT) u usporedbi s biljkama WTM0 imale su značajno više H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u 2. i 4. wpi, dok je u 6. wpi sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u ove dvije skupine bio približno jednak. Tretman s MeJA prije infekcije, u biljkama WT (WTINFT) rezultirao je porastom sadržaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u ranoj (2. wpi), a smanjenjem u kasnoj (6. wpi) fazi infekcije, u odnosu na netretirane inficirane biljke (WTINF0). Usporedbom neinficiranih biljaka WT pretretiranih s MeJA (WTMT) s WTM0, uočeno je da je sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> porastao u WTMT u 2. wpi, a smanjio se u 6. wpi, što je slično učinku pretretmana s MeJA na inficirane biljke (usporedba WTINFT s WTINF0).

Infekcija viroidom u JA-deficijentnim biljkama linije *opr3* (A3INF0) smanjila je razinu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u 2., i posebice 6. wpi, a povećala u 4. wpi, u usporedbi s neinficiranim biljkama (A3M0) (Slika 4b). Inficirane biljke pretretirane s MeJA (A3INFT) imale su povećan sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u odnosu na A3M0 u 2. wpi, a u 4. i 6. wpi sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u A3INFT i A3M0 bio je jednak. Pretretman s MeJA u inficiranim JA-deficijentnim biljkama uzrokovao je nakupljanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u 2. i 6. wpi, a smanjenje sadržaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u 4. wpi, u odnosu na netretirane inficirane JA-deficijentne biljke (usporedba A3INFT s A3INF0), što je uočeno i u neinficiranim biljkama tretiranim s MeJA (usporedba A3MT s A3M0).

Infekcija i pretretman s MeJA u JA-neosjetljivoj biljnoj liniji X5 s utišanim genom *COII* nisu imali statistički značajan utjecaj na sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u 2. i 4. wpi, iako se mogao uočiti blagi porast sadržaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nakon infekcije (usporedba X5INF0 s X5M0) i smanjenje sadržaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u inficiranim biljkama pretretiranim s MeJA (usporedba X5INFT s X5INF0) (Slika 4c). Slično je uočeno i u 6. wpi, uz statistički značajnu razliku. Rezultati sugeriraju da unatoč slaboj osjetljivosti biljaka *coi1* na JA, egzogeno dodan MeJA izaziva smanjenje sadržaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u inficiranim biljkama *coi1*, posebice u kasnoj fazi infekcije.

Ukratko, rezultati ukazuju na to da infekcija viroidom ima specifičan učinak na nakupljanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u ovisnosti o endogenom sadržaju JA i funkcionalnosti JA-posredovanog signalnog puta (Slika 4). Inficirane JA-

deficijentne i JA-neosjetljive biljke imale su veći sadržaj  $H_2O_2$  u 4. odnosno 6. wpi, u odnosu na inficirane biljke WT. Pretretman s MeJA izazvao je porast sadržaja  $H_2O_2$  u ranoj fazi infekcije WT i JA-deficijentnih biljaka, te smanjenje sadržaja  $H_2O_2$  u WT i JA-neosjetljivim biljkama u kasnoj fazi infekcije, što ukazuje i na različit učinak MeJA u različitim fazama infekcije.



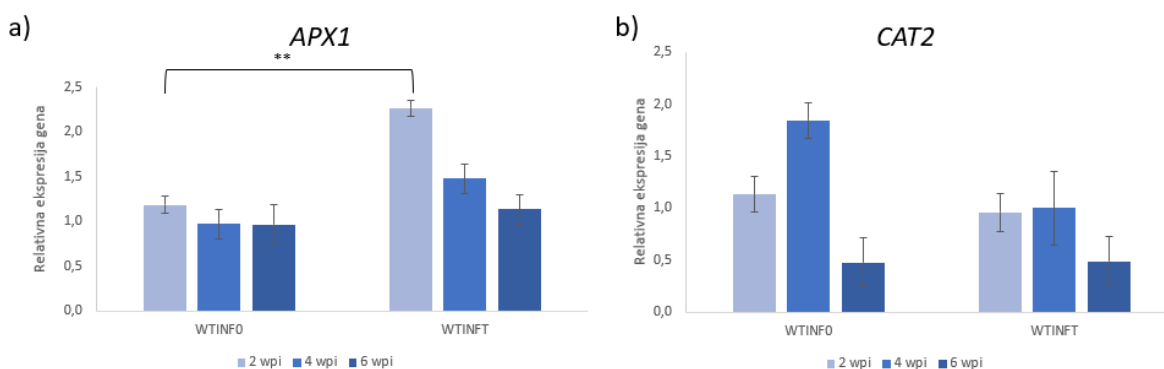
**Slika 4.** Učinak MeJA na nakupljanje  $H_2O_2$  u biljkama krumpira inficiranim viroidom PSTVd. Sadržaj  $H_2O_2$  u listovima krumpira divljeg tipa (WT) (a), *opr3* biljkama (linija A3) (b) i *coi1* biljkama (linija X5) (c) određen je 2., 4. i 6. tjedan nakon inokulacije viroidom PSTVd ili  $H_2O$  (*mock*-kontrolne biljke). Prije inokulacije, dio biljaka je tretiran s 1 mM MeJA, a dio s  $H_2O$ . Prikazane su srednje vrijednosti tri do četiri biološke replike  $\pm$  standardna pogreška (SE). Statistički značajne razlike prikazane su različitim slovima prema Tukey testu ( $p < 0,05$ ). wpi – tjedan nakon inokulacije (eng. *weeks post inoculation*), M – neinficirane biljke (*mock*-kontrolne biljke), INF – biljke inficirane viroidom PSTVd, 0 – netretirane biljke, T – biljke pretretirane MeJA.

## 4.2. Analiza ekspresije gena

### 4.2.1. Ekspresija gena u biljkama divljeg tipa

U biljkama divljeg tipa inficiranim viroidom PSTVd (WTINFO), ekspresija gena za askorbat peroksidazu (*APX1*) bila je blago pojačana u 2. wpi u odnosu na zdrave biljke divljeg tipa (WTM0), dok je u 4. i 6. wpi ekspresija *APX1* bila približno jednaka u inficiranim i neinficiranim biljkama (Slika 14a). Pretretman s MeJA u inficiranim biljkama WT (WTINFT) pojačao je ekspresiju *APX1* u 2. wpi, nakon čega je ekspresija gena *APX1* opala u 4. i 6. wpi, iako je i dalje bila pojačana u odnosu na WTM0 (Slika 14a), a slično je uočeno i usporedbom WTINFT s WTINFO (Slika 5a). Rezultati sugeriraju pojačanu antioksidacijsku aktivnost u WTINFT u odnosu na WTINFO u 2. i 4. wpi. Pretretman s MeJA u neinficiranim biljkama WT (WTMT) u odnosu na WTM0 je pojačao ekspresiju *APX1* samo u drugom tjednu nakon inokulacije (Slika 14a).

Ekspresija gena za katalazu (*CAT2*) u WTINFO je bila jednaka u 2. wpi, pojačana u 4. wpi, a smanjena u 6. wpi u odnosu na WTM0 (Slika 14a). Tretman s MeJA prije infekcije je smanjio ekspresiju gena *CAT2* u inficiranim biljkama u 4. wpi, a nije imao značajniji učinak na ekspresiju *CAT2* u 2. i 6. wpi (usporedba WTINFT s WTINFO) (Slika 5b). Pretretman zdravih biljaka s MeJA (WTMT) bio je povezan s pojačanom ekspresijom *CAT2* u odnosu na WTM0 u 2. wpi (Slika 14a). Različiti obrasci ekspresije gena *CAT2* u inficiranim i neinficiranim biljkama tretiranim s MeJA (usporedba WTINFT s WTINFO i WTMT s WTM0, Slika 14a) ukazuju na to da JA sudjeluje u regulaciji ekspresije gena *CAT2* tijekom infekcije.

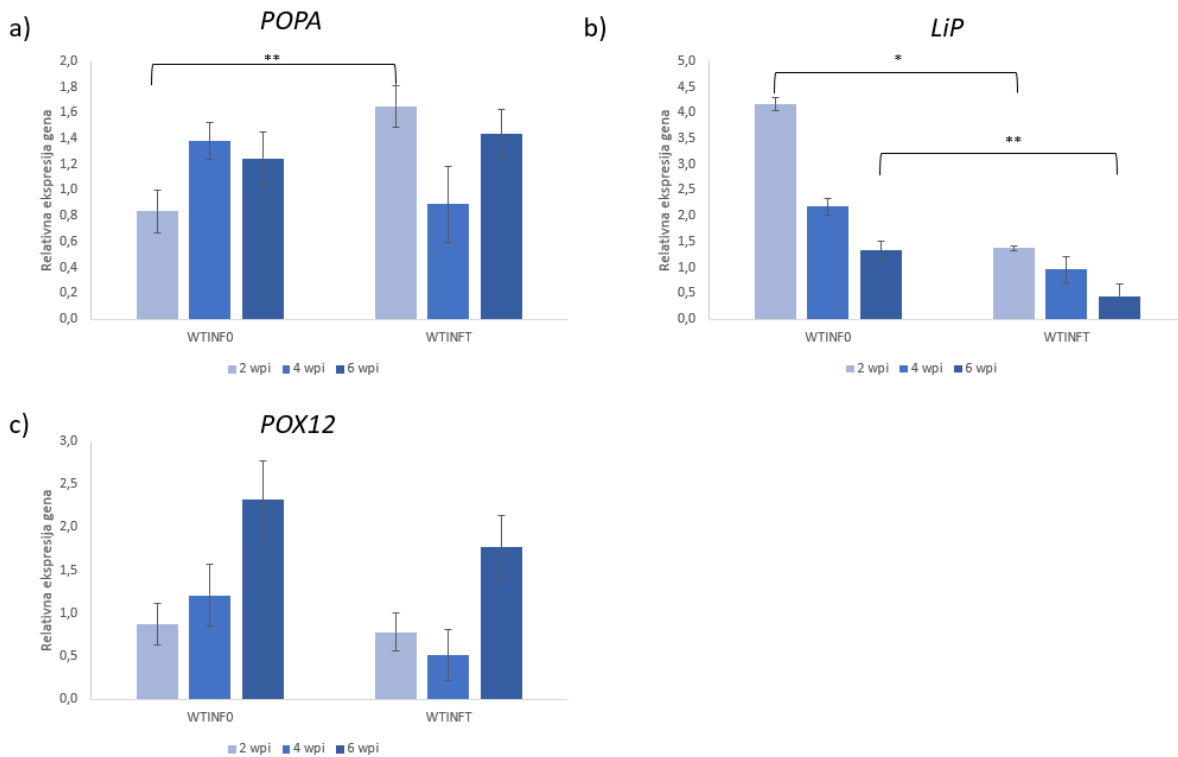


**Slika 5.** Relativna ekspresija gena za antioksidacijske enzime *APX1* (a) i *CAT2* (b) u listovima krumpira divljeg tipa (WT). Relativna ekspresija gena određena je 2., 4. i 6. tjedan nakon inokulacije viroidom PSTVd. Prije inokulacije, dio biljaka je tretiran s 1 mM MeJA, a dio s H<sub>2</sub>O. Relativna ekspresija gena izračunata je metodom  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ . Vrijednosti za relativnu ekspresiju gena normalizirane su prema referentnom genu *EF1a* i pripadajućoj kontroli *mock* kojoj je umjesto viroidne RNA inokulirana voda. Prikazane su srednje vrijednosti fc (engl. *fold change*) tri biološke replike ( $\pm$ SE). wpi – tjedan nakon inokulacije (eng. *weeks post inoculation*), M – neinficirane biljke (*mock*-kontrolne biljke), INF – biljke inficirane viroidom PSTVd, 0 – netretirane, MeJA – pretretirane metil jasmonatom. \* označava razinu statističke značajnosti dobivenu t-testom (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Ekspresija gena za peroksidazu povezanu sa suberinom (*POPA*) nakon infekcije biljaka WT bila je nešto smanjena u 2. wpi, a pojačana u 4. i 6. wpi, u odnosu na biljke WTM0 (Slika 6a). Suprotno tome, biljke WTINFT su pojačano ekspimirale *POPA* u 2. i 6. wpi, a slabije u 4. wpi, u odnosu na biljke WTM0. Tretman s MeJA prije infekcije je u inficiranim biljkama uzrokovao pojačanu ekspresiju *POPA* u 2. wpi uz smanjenje u 4. wpi, dok u 6. wpi pretretman s MeJA nije imao utjecaj na ekspresiju gena *POPA* (usporedba WTINFT s WTINFO, Slika 6a). U neinficiranim biljkama pretretman s MeJA nije imao utjecaj na ekspresiju gena *POPA* (usporedba WTMT s WTM0) (Slika 14a).

Infekcija viroidom inducirala je pojačanu ekspresiju gena *LiP* u biljkama WT u svim ispitanim vremenskim točkama (usporedba WTINFO s WTM0), a ekspresija gena *LiP* bila je najjača u ranoj fazi infekcije i opadala je s vremenom (Slika 6b). Slična promjena u profilu ekspresije *LiP* je uočena u WTINFT u odnosu na biljke WTM0, iako je ekspresija *LiP* bila jača u biljkama WTINFO nego u WTINFT, što ukazuje na to da pretretman s MeJA smanjuje ekspresiju gena *LiP* u biljkama krumpira divljeg tipa inficiranim viroidom PSTVd. Slično biljkama WTINFT, biljke WTMT su u početnim fazama infekcije (2. i 4. wpi) imale pojačanu, a u 6. wpi smanjenu ekspresiju gena *LiP*, u odnosu na biljke WTM0 (Slika 14a).

Ekspresija gena za peroksidazu 12 (*POX12*) u inficiranim biljkama WT rasla je s vremenom bez obzira na pretretman s MeJA, ali je relativna ekspresija bila nešto jača u WTINFO nego u WTINFT, u odnosu na WTM0 (Slika 6c). Aktivacija gena *POX12* u inficiranim biljkama WT u skladu je s povećanjem sadržaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u kasnijim tjednima infekcije (4. i 6. wpi) (usporedba WTINFO s WTM0, Slika 4a). Pretretman s MeJA je u inficiranim i neinficiranim biljkama WT rezultirao smanjenjem ekspresije gena *POX12*, u odnosu na WTM0 (usporedba WTINFT s WTINFO, Slika 6c i WTMT s WTM0, Slika 14a).



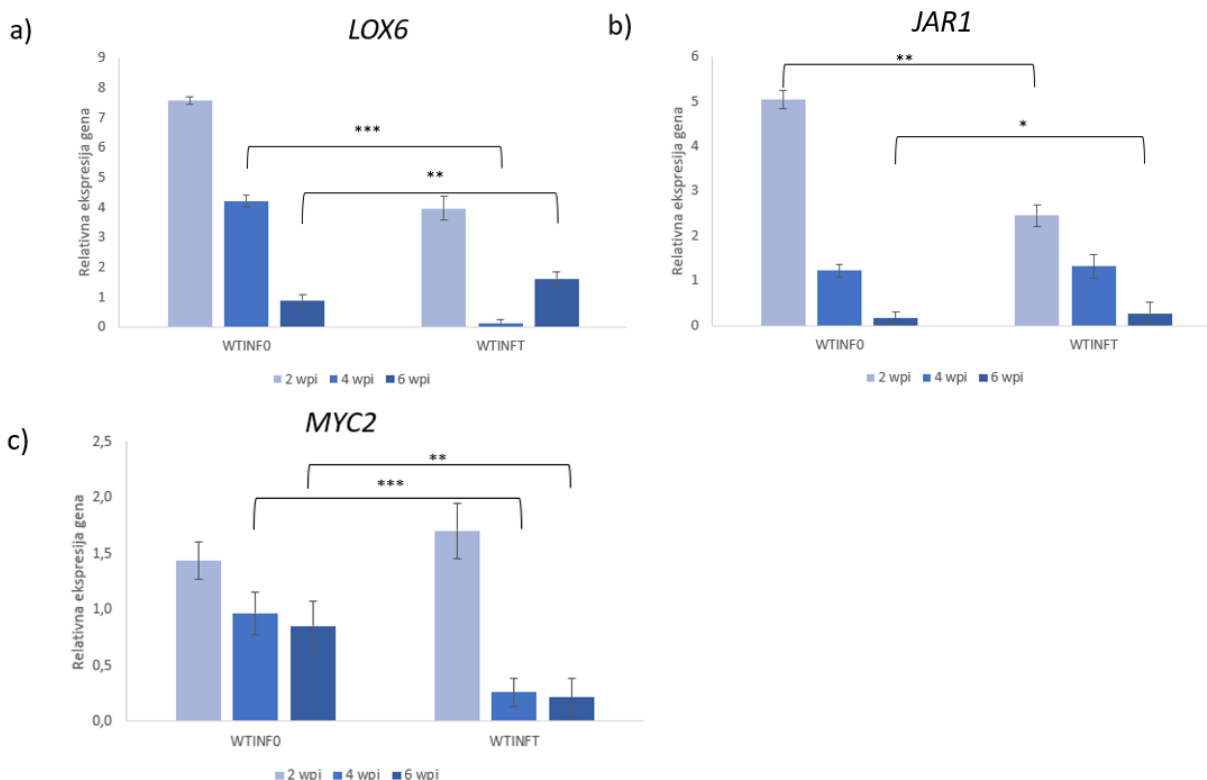
**Slika 6.** Relativna ekspresija gena za peroksidaze klase III: *POPA* (a) *LiP* (b) i *POX12* (c) u listovima krumpira divljeg tipa (WT). Relativna ekspresija gena određena je 2., 4. i 6. tjedan nakon inokulacije viroidom PSTVd. Prije inokulacije, dio biljaka je tretiran s 1 mM MeJA, a dio s H<sub>2</sub>O. Relativna ekspresija gena izračunata je metodom  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ . Vrijednosti za relativnu ekspresiju gena normalizirane su prema referentnom genu *EF1a* i pripadajućoj kontroli *mock* kojoj je umjesto viroidne RNA inokulirana voda. Prikazane su srednje vrijednosti fc (engl. *fold change*) tri biološke replike ( $\pm$ SE). Opis kratica kao na Slici 5.

Gen za lipooksigenazu 6 (*LOX6*), koja je uključena u početne korake biosinteze JA, bio je najjače eksprimiran u 2. wpi u WTINFO nakon čega ekspresija opala u 4. i 6. wpi (Slika 7a). Ekspresija gena *LOX6* u biljkama WTINFT je bila pojačana u odnosu na WTM0 u 2. i 6. wpi. Inficirane biljke pretretirane s MeJA imale su slabiju ekspresiju gena *LOX6* u 2. i 4. wpi, ali ne u 6. wpi (WTINFT u odnosu na WTINFO, Slika 7a). Pretretman s MeJA u zdravim biljkama uzrokovao je pojačanu ekspresiju gena *LOX6* u 2. wpi i smanjenu ekspresiju u 4. i 6. wpi, u odnosu na WTM0 (Slika 14a).

Ekspresija gena *JASMONATE RESISTANT 1 (JAR1)* za jasmonil-L-izoleucin sintetazu koja konvertira JA u JA-Ile, bila je najjača u početnim fazama infekcije i opadala je s vremenom u odnosu na WTM0 (Slika 7b). Slično tome, pad ekspresije *JAR1* uočen je i u WTINFT u odnosu na WTM0. Ipak, WTINFT je imao upola slabiju ekspresiju gena *JAR1* u odnosu na WTINFO u 2. wpi (Slika 7b), što sugerira da pretretman s MeJA ima negativan učinak na ekspresiju gena *JAR1* u ranoj fazi infekcije biljaka WT.



Slično kao *LOX6* i *JAR1*, gen *MYC2* je bio jače eksprimiran u početnoj fazi infekcije (2. wpi), neovisno o pretretmanu s MeJA (Slika 7c). Međutim, u 4. i 6. wpi, ekspresija *MYC2* bila je znatno slabija u WTINFT u odnosu na biljke WTM0 i WTINFO (Slika 7c). Pretretman s MeJA uzrokovao je smanjenu ekspresiju gena *MYC2* i u neinficiranim biljkama (usporedba WTMT s WTM0) u 4. i 6. wpi (Slika 14a).



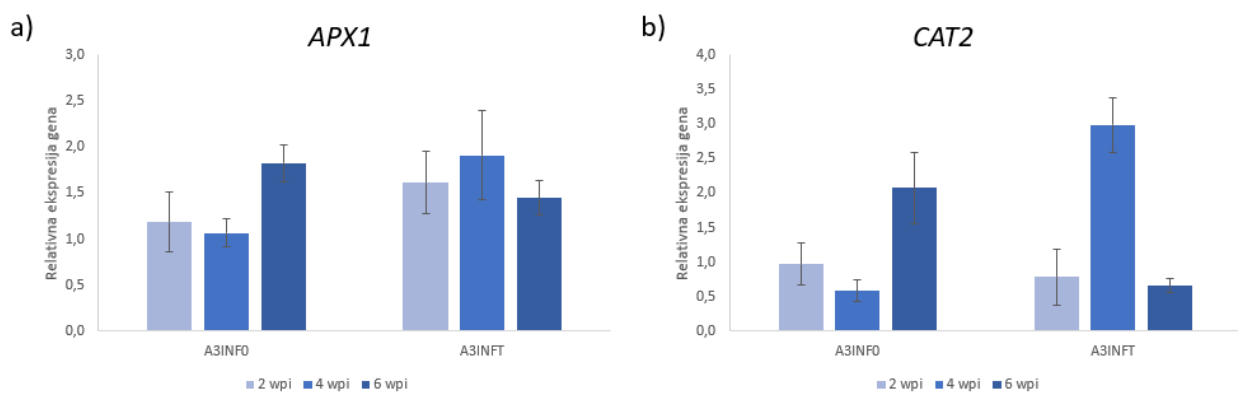
**Slika 7.** Relativna ekspresija gena za enzime uključene u biosintezu JA - *LOX6* (a) i *JAR1* (b), te prijenos signala u kojem sudjeluje JA - *MYC2* (c) u listovima krumpira divljeg tipa (WT). Relativna ekspresija gena određena je 2., 4. i 6. tjedan nakon inokulacije viroidom PSTVd. Prije inokulacije, dio biljaka je tretiran s 1 mM MeJA, a dio s H<sub>2</sub>O. Relativna ekspresija gena izračunata je metodom  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Vrijednosti za relativnu ekspresiju gena normalizirane su prema referentnom genu *EF1a* i pripadajućoj kontroli *mock* kojoj je umjesto viroidne RNA inokulirana voda. Prikazane su srednje vrijednosti fc (engl. *fold change*) tri biološke replike ( $\pm$ SE). Opis kratica kao na Slici 5.

#### 4.2.2. Ekspresija gena u JA-deficijentnoj liniji *opr3*

U JA-deficijentnim biljkama *opr3* (linija A3), ekspresija gena *APX1* bila je pojačana u inficiranim biljkama (A3INF0) u odnosu na zdrave biljke (A3M0) u 6. wpi. U inficiranim biljkama pretretiranim s MeJA (A3INFT), ekspresija gena *APX1* bila je jača nego u biljkama A3M0 u svim promatranim vremenskim točkama. Pretretman s MeJA pojačao je ekspresiju *APX1* u tretiranim u odnosu na netretirane inficirane JA-deficijentne biljke u 2. i 4. wpi, no bez statističke značajnosti (A3INFT u usporedbi s A3INF0, Slika 8a,

14b). Pretretman s MeJA blago je pojačao ekspresiju *APX1* u zdravim biljkama linije A3 u 2. wpi (usporedba A3MT s A3M0, Slika 14b).

Infekcija viroidom PSTVd pojačala je ekspresiju gena *CAT2* samo u 6. wpi (usporedba A3INF0 s A3M0, Slika 8b), što je u skladu s rezultatima analize sadržaja  $H_2O_2$  prema kojima je u šestom tjednu sadržaj  $H_2O_2$  bio značajno manji u biljkama A3INF0 nego u A3M0 (Slika 4b). U biljkama A3INFT, ekspresija gena *CAT2* je bila jača u 4. wpi u odnosu na A3M0. Pretretman s MeJA je blago pojačao relativnu ekspresiju gena *CAT2* u 4. wpi, a smanjio u 6. wpi u A3INFT u odnosu na A3INF0, normalizirano prema A3M0 (Slika 8b). Pretretman s MeJA pojačao je ekspresiju *CAT2* u zdravim biljkama A3 u 2. wpi (usporedba A3MT s A3M0, Slika 14b), slično kao i ekspresiju gena *APX1*.

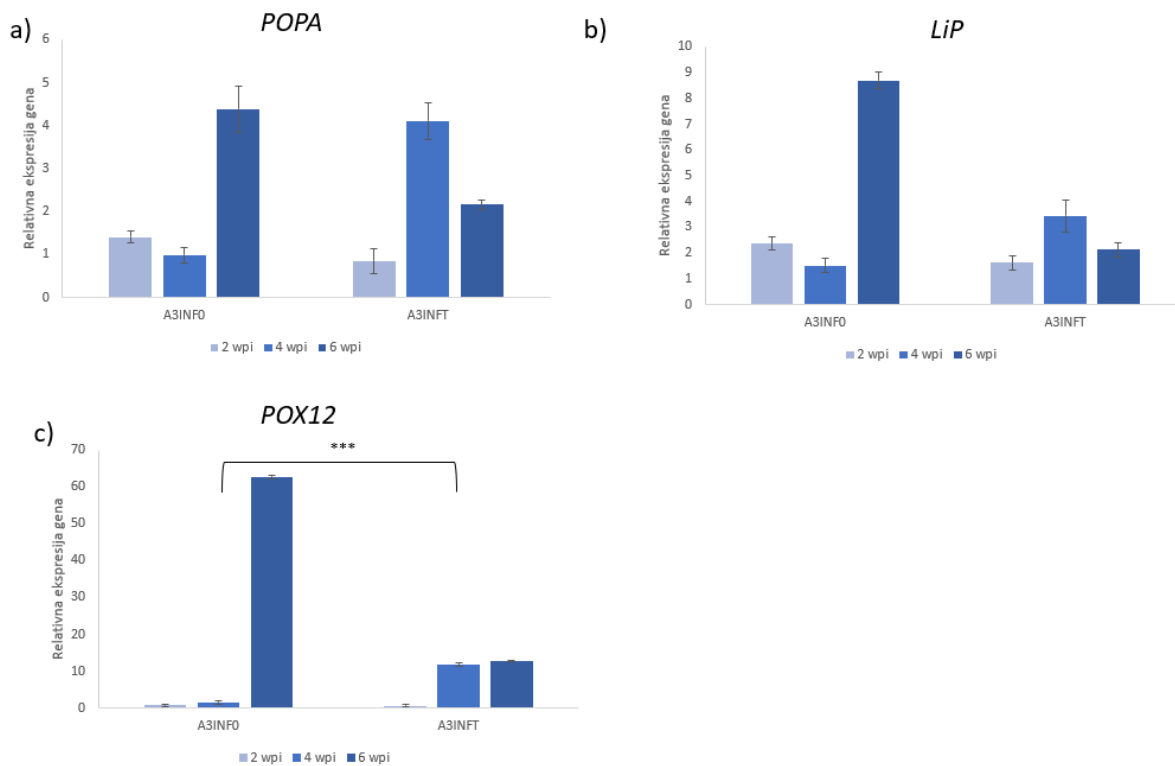


**Slika 8.** Relativna ekspresija gena za antioksidacijske enzime: *APX1* (a) *CAT2* (b) u listovima krumpira JA-deficijentnih *opr3* biljaka (linija A3). Relativna ekspresija gena određena je 2., 4. i 6. tjedan nakon inokulacije viroidom PSTVd. Prije inokulacije, dio biljaka je tretiran s 1 mM MeJA, a dio s  $H_2O$ . Relativna ekspresija gena izračunata je metodom  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ . Vrijednosti za relativnu ekspresiju gena normalizirane su prema referentnom genu *EF1 $\alpha$*  i pripadajućoj kontroli *mock* kojoj je umjesto viroidne RNA inokulirana voda. Prikazane su srednje vrijednosti fc (engl. *fold change*) tri biološke replike ( $\pm$ SE). Opis kratica kao na Slici 5.

Infekcija viroidom pojačala je ekspresiju gena *POPA* i *LiP* u A3INF0 u odnosu na A3M0 u 6. wpi (Slika 9a, b), što sugerira aktivaciju procesa suberinizacije i lignifikacije u kasnijim fazama infekcije u JA-deficijentnim biljkama. Pretretman s MeJA potaknuo je ekspresiju gena *POPA* i *LiP* u u inficiranim JA-deficijentnim biljkama u 4. wpi, a smanjio u 6. wpi. Izgleda da je pretretman s MeJA povezan s ranijom aktivacijom ekspresije gena *POPA* i *LiP* u tretiranim u odnosu na netretirane inficirane biljke A3 (usporedba A3INFT s A3INF0, Slika 9a, b). Pretretman s MeJA u neinficiranim biljkama A3 inducirao je pojačanu ekspresiju gena *POPA* već u 2. wpi, a gena *LiP* u 6. wpi, što ukazuje na pozitivan učinak MeJA na aktivaciju gena *POPA* i *LiP* u JA-deficijentnim biljkama (usporedba A3MT s A3M0, Slika 14b).

Nadalje, infekcija s PSTVd u JA-deficijentnim *opr3* biljkama rezultirala je pojačanom ekspresijom gena *POX12* u kasnijim fazama infekcije (6. wpi) (usporedba A3INF0 s A3M0, Slika 9c), što je u skladu s

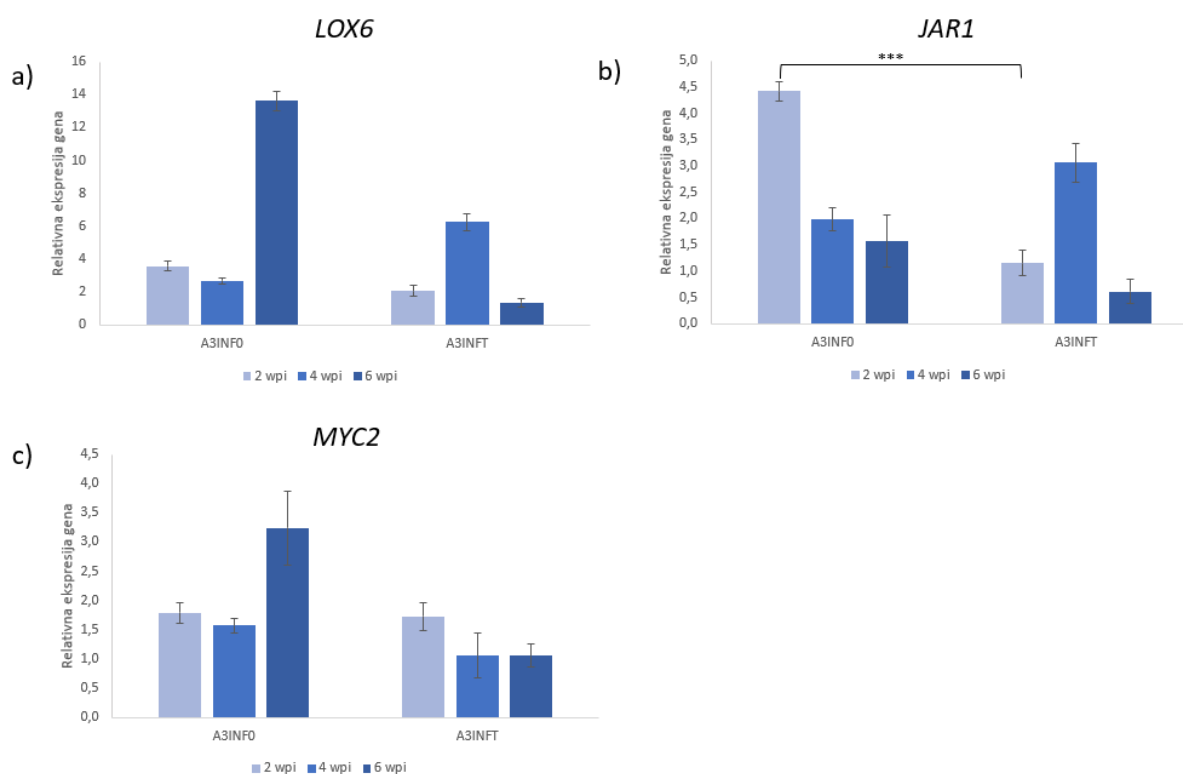
pojačanom ekspresijom ostalih ispitanih *POX* gena (*POPA* i *LiP*) (Slika 14b). Pretretman s MeJA u inficiranim JA-deficijentnim biljkama rezultirao je ranijom (4. wpi) aktivacijom gena *POX12* (usporedba A3INFT s A3INF0, Slika 9c, 14b). Osim toga, pretretman s MeJA u neinficiranim biljkama linije A3 (A3MT) potaknuo je raniju (2. wpi) ekspresiju gena *POX12* u odnosu na A3M0 (Slika 14b), što sugerira bitno različitu dinamiku ekspresije gena *POX12* u ovisnosti o infekciji s PSTVd.



**Slika 9.** Relativna ekspresija gena za peroksidaze klase III: *POPA* (a) *LiP* (b) i *POX12* (c) u listovima krumpira JA-deficijentnih *opr3* biljaka (linija A3). Relativna ekspresija gena određena je 2., 4. i 6. tjedan nakon inokulacije viroidom PSTVd. Prije inokulacije, dio biljaka je tretiran s 1 mM MeJA, a dio s H<sub>2</sub>O. Relativna ekspresija gena izračunata je metodom  $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ . Vrijednosti za relativnu ekspresiju gena normalizirane su prema referentnom genu *EF1 $\alpha$*  i pripadajućoj kontroli *mock* kojoj je umjesto viroidne RNA inokulirana voda. Prikazane su srednje vrijednosti fc (engl. *fold change*) tri biološke replike ( $\pm$ SE). Opis kratica kao na Slici 5.

Gen *LOX6* je bio jače ekspimiran u tretiranim i netretiranim inficiranim JA-deficijentnim biljkama (A3INF0 i A3INFT) u odnosu na A3M0, u svim promatranim vremenskim točkama (Slika 10a). Ekspresija gena *LOX6* u A3INF0 bila je najviša u 6. wpi, a u A3INFT u 4. wpi, što sugerira da pretretman s MeJA potiče raniju aktivaciju gena *LOX6* u inficiranim JA-deficijentnim biljkama. Međutim, intenzitet ekspresije *LOX6* bio je slabiji u pretretiranim inficiranim u odnosu na netretirane inficirane biljke A3 (usporedba A3INFT s A3INF0, Slika 10a). K tome, sâm pretretman s MeJA je blago povećao ekspresiju *LOX6* u neinficiranim biljkama A3 samo u 2. wpi (usporedba A3MT s A3M0, Slika 14b), što ide u prilog pretpostavci da infekcija značajno pridonosi aktivaciji ekspresije *LOX6* u 4. i 6. wpi.

Gen *JAR1* je bio jače eksprimiran u inficiranim JA-deficijentnim *opr3* biljkama (A3INF0) u odnosu na neinficirane biljke A3M0, u svim promatranim vremenskim točkama, a najjače u 2. wpi (Slika 10b). S vremenom je ekspresija gena *JAR1* u biljkama A3INF0 bila sve slabija, iako veća u odnosu na biljke A3M0. Egzogeni tretman s MeJA smanjio je ekspresiju *JAR1* u inficiranim biljkama *opr3* u odnosu na netretirane inficirane biljke (usporedba A3INFT s A3INF0) u 2. i 6. wpi, a pojačao ekspresiju u 4. wpi (Slika 10b, 14b). Inficirane JA-deficijentne biljke pojačano su eksprimirale gen *MYC2* u svim promatranim vremenskim točkama u odnosu na A3M0, a najjače u 6. wpi (usporedba A3INF0 s A3M0, Slika 14b). Inficirane biljke linije *opr3* pretretirane s MeJA su u početnoj fazi infekcije imale jednaku ekspresiju gena *MYC2* kao i netretirane inficirane biljke *opr3*, dok je u kasnijim fazama infekcije (4. i 6. wpi) ekspresija *MYC2* bila slabija u biljkama A3INFT u odnosu na A3INF0 (Slika 10c).

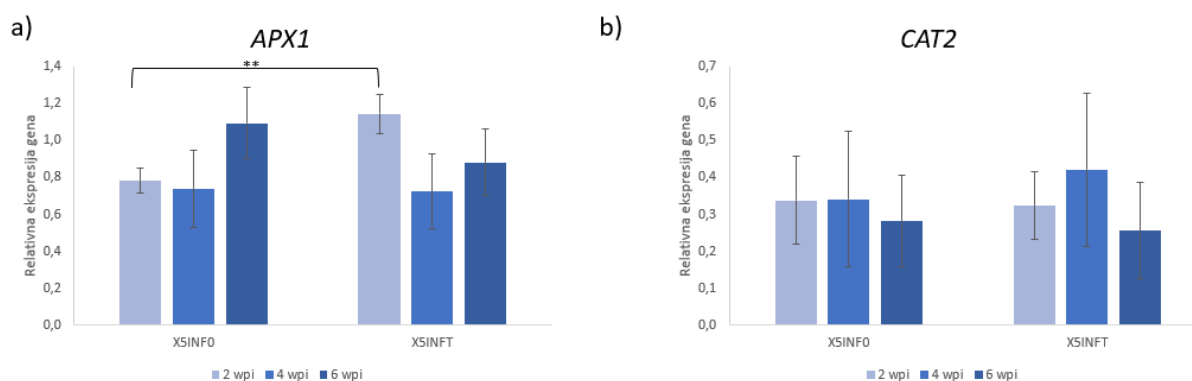


**Slika 10.** Relativna ekspresija gena za enzime uključene u biosintezu JA - *LOX6* (a) i *JAR1* (b), te prijenos signala u kojem sudjeluje JA - *MYC2* (c) u listovima krumpira JA-deficijentnih *opr3* biljaka (linija A3). Relativna ekspresija gena određena je 2., 4. i 6. tjedan nakon inokulacije viroidom PSTVd. Prije inokulacije, dio biljaka je tretiran s 1 mM MeJA, a dio s H<sub>2</sub>O. Relativna ekspresija gena izračunata je metodom  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ . Vrijednosti za relativnu ekspresiju gena normalizirane su prema referentnom genu *EF1a* i pripadajućoj kontroli *mock* kojoj je umjesto viroidne RNA inokulirana voda. Prikazane su srednje vrijednosti fc (eng. *fold change*) tri biološke replike ( $\pm$ SE). Opis kratica kao na Slici 5.

### 4.2.3. Ekspresija gena u JA-neosjetljivoj liniji *coi1*

Infekcija s PSTVd je u JA-neosjetljivim biljkama *coi1* (linija X5) rezultirala slabijom ekspresijom gena *APX1* u odnosu na zdrave biljke (X5M0) u 2. i 4. wpi, dok je u 6. wpi ekspresija *APX1* bila skoro jednaka u inficiranim i neinficiranim biljkama (usporedba X5INF0 s X5M0, Slika 14c). Pretretman s MeJA u inficiranim biljkama *coi1* (X5INF0) uzrokovao je blagi porast ekspresije gena *APX1* u odnosu na X5INF0 samo u 2. wpi (Slika 11a).

Gen *CAT2* je u biljkama X5INF0 bio jednoliko eksprimiran u svim vremenskim točkama, ali slabije u odnosu na biljke X5M0 (Slika 14c). Ekspresija gena *CAT2* se u inficiranim biljkama nije promijenila nakon egzogenog pretretmana s MeJA (usporedba X5INF0 s X5INF0, Slika 11b).

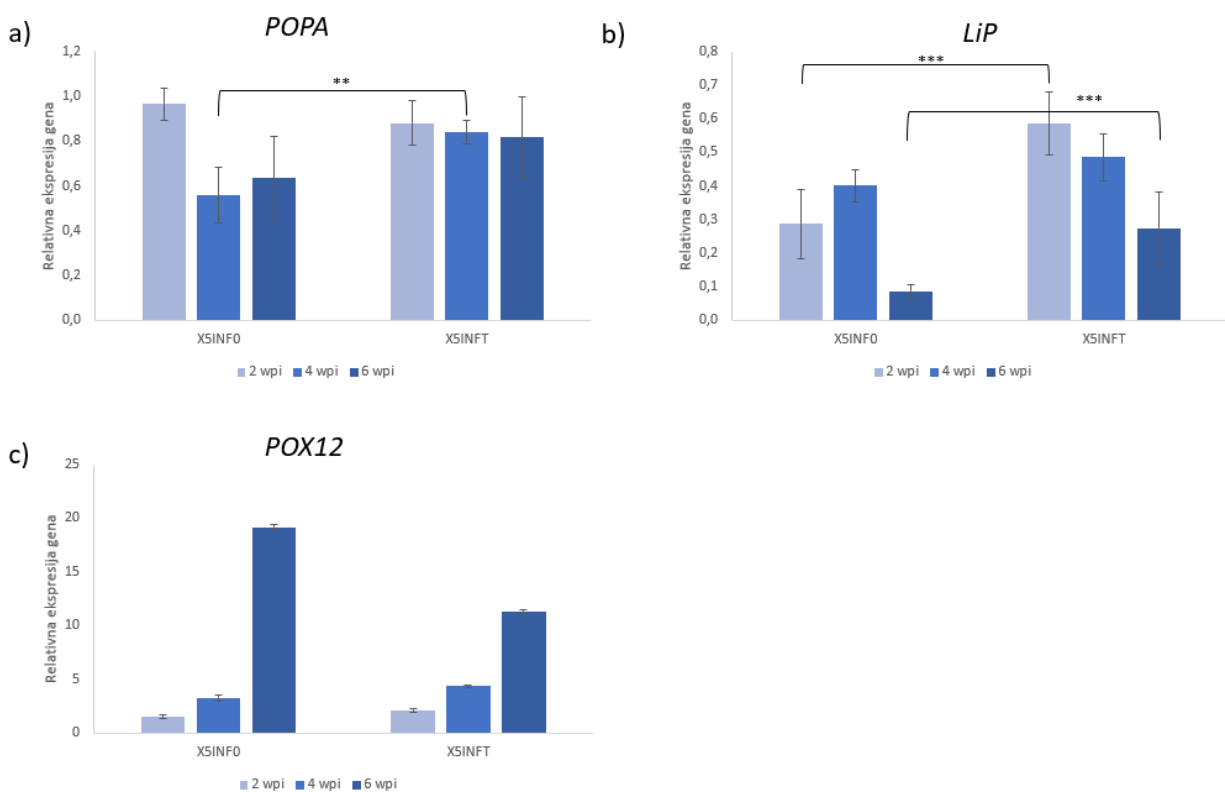


**Slika 11.** Relativna ekspresija gena za antioksidacijske enzime: *APX1* (a) *CAT2* (b) u listovima krumpira JA-neosjetljivih *coi1* biljaka (linija X5). Relativna ekspresija gena određena je 2., 4. i 6. tjedan nakon inokulacije viroidom PSTVd. Prije inokulacije, dio biljaka je tretiran s 1 mM MeJA, a dio s H<sub>2</sub>O. Relativna ekspresija gena izračunata je metodom  $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ . Vrijednosti za relativnu ekspresiju gena normalizirane su prema referentnom genu *EF1 $\alpha$*  i pripadajućoj kontroli *mock* kojoj je umjesto viroidne RNA inokulirana voda. Prikazane su srednje vrijednosti fc (engl. *fold change*) tri biološke replike ( $\pm$ SE). Opis kratica kao na Slici 5.

Ekspresija gena *POPA* je bila slabija u X5INF0 u odnosu na X5M0 u svim promatranim vremenskim točkama, posebice u 4. i 6. wpi (Slika 14c). Nakon pretretmana s MeJA, ekspresija gena *POPA* blago je pojačana u inficiranim biljkama u 4. i 6. wpi (usporedba X5INF0 s X5INF0, Slika 12a), ali je i dalje bila slabija nego u biljkama X5M0.

Gen *LiP* je bio slabije eksprimiran u inficiranim u odnosu na neinficirane biljke *coi1* (usporedba X5INF0 s X5M0, Slika 14c). Inficirane biljke pretretirane s MeJA su imale pojačanu ekspresiju gena *LiP* (usporedba X5INF0 s X5INF0, Slika 12b), no ona je i dalje bila slabija od ekspresije *LiP* u X5M0 biljkama. Ekspresija *LiP* u X5MT bila je jača u odnosu na X5M0 samo u 6. wpi (Slika 14c), što sugerira da infekcija viroidom oslabljuje ekspresiju *LiP* u biljkama *coi1*.

Ekspresija gena *POX12* bila je najjača u inficiranim biljkama *coi1* u 6. wpi, neovisno o pretretmanu s MeJA (Slika 14c). Zanimljivo, sadržaj  $H_2O_2$  je također veći u 6. wpi u odnosu na 2. i 4. wpi u biljkama X5INF0 (Slika 4c). Ekspresija *POX12* u tretiranim i netretiranim inficiranim biljkama *coi1* bila je jednaka u 2. i 4. wpi, ali je smanjenje ekspresije *POX12* uočeno u 6. wpi u X5INFT u odnosu na X5INF0 (Slika 12c). U tretiranim neinficiranim biljkama *coi1* nije bilo promjene u ekspresiji gena *POX12* (usporedba X5MT s X5M0, Slika 14c), što sugerira da je gen *POX12* uključen u odgovor na infekciju, neovisno o tretmanu s MeJA. Također, rezultati upućuju na to da je aktivacija gena *POX12* izazvana infekcijom jača u JA-neosjetljivim biljkama nego u biljkama WT, u odnosu na njihove odgovarajuće kontrole (Slika 14a, c).

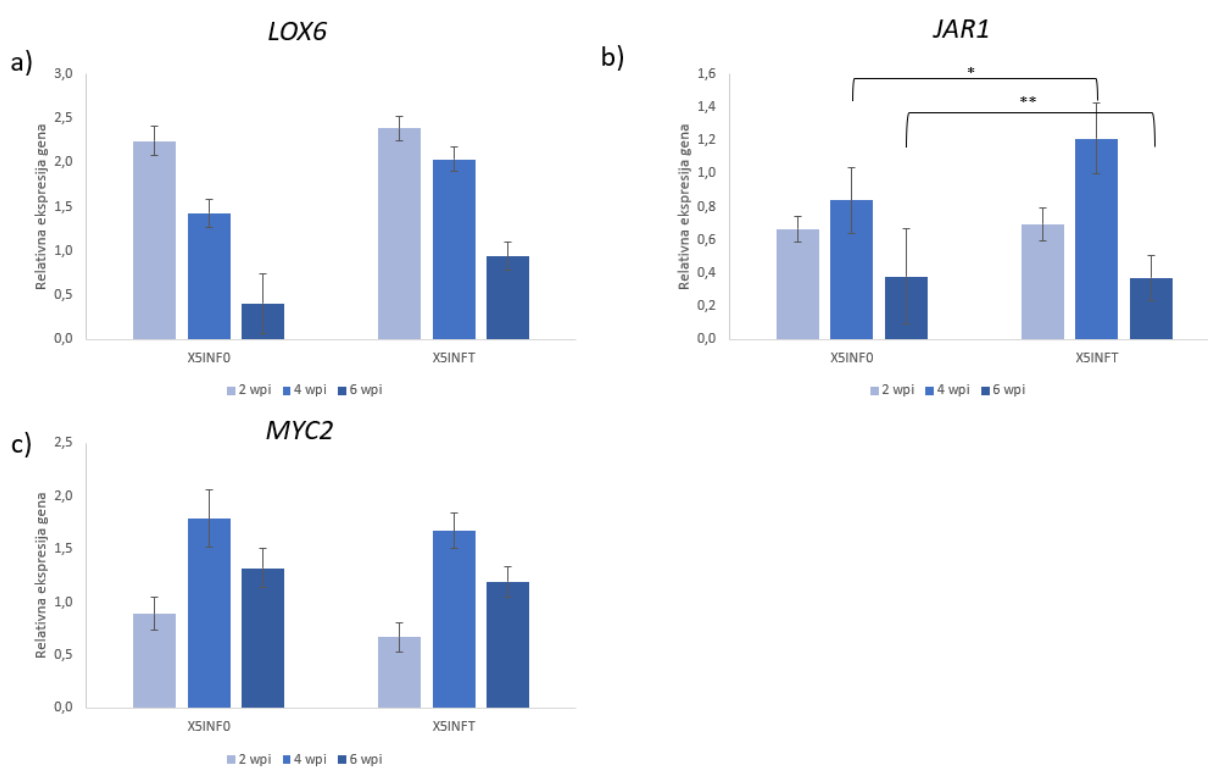


**Slika 12.** Relativna ekspresija gena za peroksidaze klase III: *POPA* (a) *LiP* (b) i *POX12* (c) u listovima krumpira JA-neosjetljivih *coi1* biljaka (linija X5). Relativna ekspresija gena određena je 2., 4. i 6. tjedan nakon inokulacije viroidom PSTVd. Prije inokulacije, dio biljaka je tretiran s 1 mM MeJA, a dio s  $H_2O$ . Relativna ekspresija gena izračunata je metodom  $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ . Vrijednosti za relativnu ekspresiju gena normalizirane su prema referentnom genu *EF1a* i pripadajućoj kontroli *mock* kojoj je umjesto viroidne RNA inokulirana voda. Prikazane su srednje vrijednosti fc (engl. *fold change*) tri biološke replike ( $\pm$ SE). Opis kratica kao na Slici 5.

Inficirane biljke *coi1* su jače ekspimirale gen *LOX6* u 2. i 4. wpi, ali slabije u 6. wpi u odnosu na neinficirane biljke (usporedba X5INF0 s X5M0 i X5INFT s X5M0, Slika 14c). Pretretman s MeJA je blago pojačao ekspresiju gena *LOX6* u inficiranim biljkama linije *coi1* (usporedba X5INFT s X5INF0, Slika 13a). Slično

je uočeno i u tretiranim neinficiranim biljkama X5MT, koje su također pojačano eksprimirale *LOX6* u odnosu na netretirane neinficirane biljke (usporedba X5MT s X5M0, Slika 14c). Međutim, ekspresija gena *LOX6* u X5MT je jačala s vremenom, što je suprotno od rane aktivacije ekspresije *LOX6* u inficiranim biljkama X5INF0 i X5INF1. Ovi rezultati ukazuju na to da infekcija doprinosi pojačanoj ekspresiji gena *LOX6* u biljkama *coil*, neovisno o pretretmanu s MeJA. Sličan obrazac ekspresije uočen je i za gen *JAR1* u biljkama *coil* (Slika 14c).

U JA-neosjetljivim biljkama linije *coil*, pojačana ekspresija gena *MYC2* uočena je u 4. i 6. wpi (usporedba X5INF0 s X5M0, Slika 14c). Pretretman s MeJA nije imao značajan utjecaj na ekspresiju gena *MYC2* u inficiranim JA-neosjetljivim biljkama (usporedba X5INF1 s X5INF0, Slika 13c).



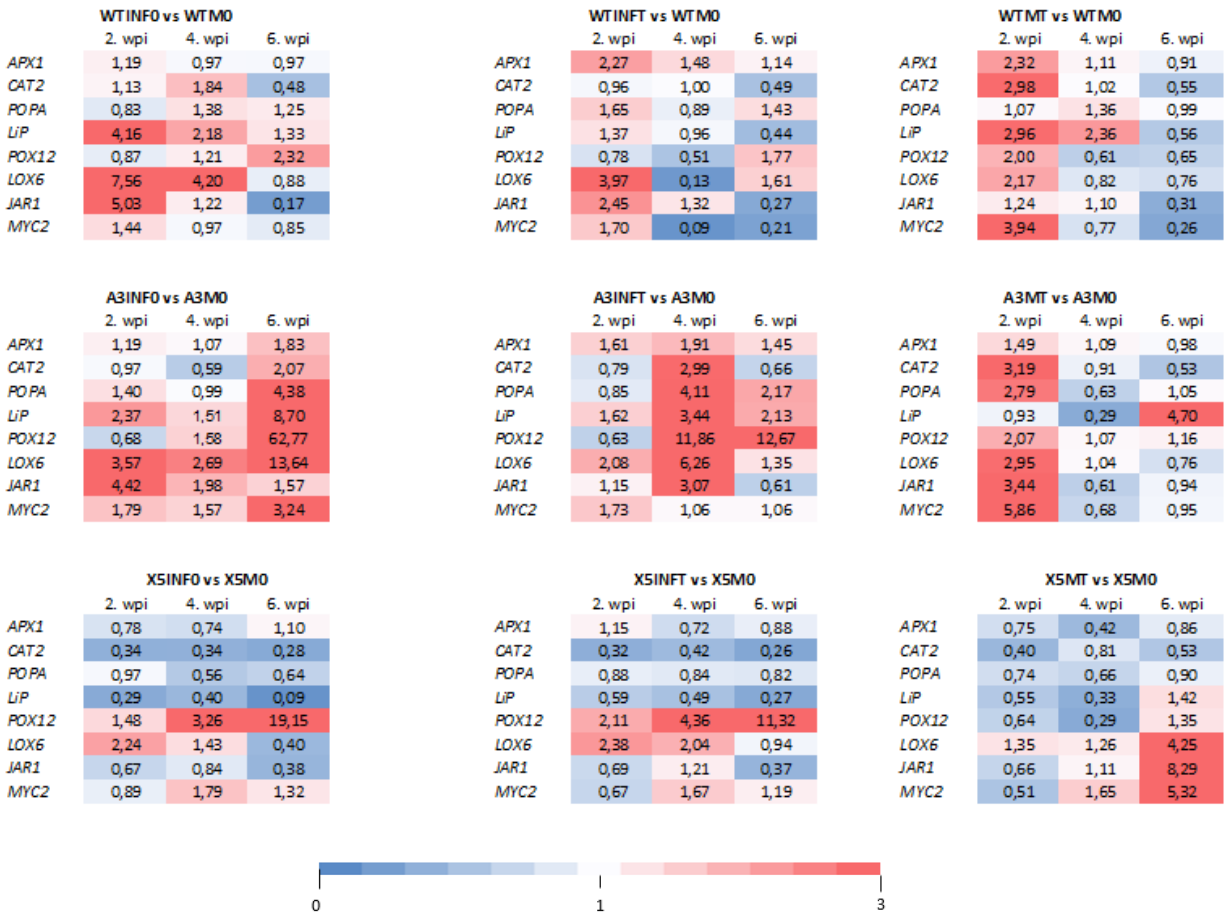
**Slika 13.** Relativna ekspresija gena za enzime uključene u biosintezu JA - *LOX6* (a) i *JAR1* (b), te prijenos signala u kojem sudjeluje JA - *MYC2* (c) u listovima krumpira JA-neosjetljivih *coil* biljaka (linija X5). Relativna ekspresija gena određena je 2., 4. i 6. tjedan nakon inokulacije viroidom PSTVd. Prije inokulacije, dio biljaka je tretiran s 1 mM MeJA, a dio s H<sub>2</sub>O. Relativna ekspresija gena izračunata je metodom  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ . Vrijednosti za relativnu ekspresiju gena normalizirane su prema referentnom genu *EF1a* i pripadajućoj kontroli *mock* kojoj je umjesto viroidne RNA inokulirana voda. Prikazane su srednje vrijednosti fc (engl. fold change) tri biološke replike ( $\pm$ SE). Opis kratica kao na Slici 5.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da inficirane JA-neosjetljive biljke linije *coil* u usporedbi s neinficiranim biljkama slabije eksprimiraju gene za antioksidacijske enzime APX1 i CAT2 te peroksidaze klase III (POPA

i LiP). Suprotno tome, inficirane u odnosu na neinficirane biljke linije *coi1* pojačano eksprimiraju gen *POX12*. Ekspresija gena za biosintezu JA (*LOX6*) i prijenos signala posredovan JA (*MYC2*) je bila blago pojačana u inficiranim u odnosu na neinficirane biljke *coi1*.

Sažet prikaz promjene ekspresije gena u sve tri linije u ovisnosti o infekciji s PSTVd i pretretmanu s MeJA dan je u Slici 14. Rezultati ukazuju na to da infekcija viroidom PSTVd u biljkama WT rezultira aktivacijom antioksidacijskog odgovora u kojem sudjeluje JA. U JA-deficijentnim biljkama linije *opr3*, infekcija aktivira antioksidacijski odgovor, kao i pojačanu ekspresiju gena *POX* i gena uključenih u biosintezu JA i prijenos signala u kojem sudjeluje JA. Nakon pretretmana s MeJA, ekspresija svih promatranih gena je ranije aktivirana, u tretiranim inficiranim u odnosu na netretirane inficirane biljke linije *opr3*. U inficiranim JA-neosjetljivim biljkama *coi1*, ekspresija gena za antioksidacijske enzime i gena povezanih s odgovorom na JA je u većini slučajeva bila smanjena.





**Slika 14.** Učinak MeJA na relativnu ekspresiju gena *APX1*, *CAT2*, *POPA*, *LiP*, *POX12*, *LOX6*, *JAR1* i *MYC2* u listovima krumpira: divlji tip (WT) (a) *opr3* (linija A3) (b) i *coil* (linija X5) (c). Relativna ekspresija gena određena je 2., 4. i 6. tjedan nakon inokulacije viroidom PSTVd ili H<sub>2</sub>O (*mock*-kontrolne biljke). Prije inokulacije, dio biljaka je tretiran s 1 mM MeJA, a dio s H<sub>2</sub>O. Relativna ekspresija gena izračunata je metodom 2<sup>(-ΔΔC<sub>t</sub>)</sup> pomoću programa CFX Maestro v1.1 (Bio-Rad, SAD). Vrijednosti za relativnu ekspresiju gena normalizirane su prema referentnom genu *EF1a* i pripadajućoj kontroli *mock*. Prikazane su srednje vrijednosti fc (engl. *fold change*) tri biološke replike (±SE). Opis kratica kao na Slici 5.

## 5. RASPRAVA

Infekcija viroidima povezana je s nakupljanjem ROS i aktivacijom gena uključenih u obranu biljke, uključujući PR-proteine i peroksidaze (Zheng i sur. 2017). Osim toga, infekcija viroidima uzrokuje promjene u biosintezi i metabolizmu nekih biljnih hormona, uključujući JA (Joubert i sur. 2022). Uloga JA u odgovoru na infekciju patogenim organizmom je višestruka. JA sudjeluje u regulaciji ekspresije gena za biosintezu i metabolizam obrambenih sekundarnih metabolita, kao i gena uključenih u proizvodnju ali i eliminaciju ROS, što rezultira promjenom redoks stanja u biljci i odgovorom biljke na stresne uvjete (Du i sur. 2021). U ranijem istraživanju interakcije krumpira i viroida PSTVd pokazano je da inficirane biljke s razvijenim simptomima nakupljaju veće količine JA i  $H_2O_2$  u odnosu na zdrave biljke (Milanović i sur. 2019a), što ukazuje na mogućnost da JA sudjeluje u regulaciji nakupljanja  $H_2O_2$  u odgovoru na infekciju s PSTVd. U ovom radu istražila sam učinak infekcije viroidom PSTVd na dinamiku promjene u sadržaju  $H_2O_2$  i ekspresiji gena za antioksidacijske enzime u sistemski inficiranim listovima krumpira, u ovisnosti o endogenom sadržaju JA i egzogenom tretmanu s MeJA. Analize su napravljene u tri vremenske točke (2., 4. i 6. wpi).

### 5.1. U biljkama divljeg tipa infekcija s PSTVd uzrokuje nakupljanje $H_2O_2$ u kasnijim fazama infekcije, a tretman s MeJA smanjuje sadržaj $H_2O_2$

Funkcija  $H_2O_2$  u biotičkom stresu ovisi o vrsti patogena i biljke domaćina, ali uspješan imunosni odgovor biljaka na infekciju biotrofnim patogenima uključuje nakupljanje  $H_2O_2$  (Almagro i sur. 2009). Proizvedeni  $H_2O_2$  može imati razne funkcije u biljci, uključujući izravno antimikrobno djelovanje ili signalnu ulogu pri čemu se induciraju antioksidacijski i ostali obrambeni odgovori (Jermy 2012). U ovom istraživanju, infekcija viroidom PSTVd u biljkama divljeg tipa (WT) izazvala je nakupljanje  $H_2O_2$  u listovima u 2., 4. i 6. wpi, što ukazuje na to da infekcija viroidom PSTVd u biljkama krumpira izaziva oksidacijski stres.

Ovi rezultati u skladu su s rezultatima ranijeg istraživanja interakcije krumpira i viroida PSTVd (Milanović i sur. 2019a). Rezultati mog istraživanja u skladu su i s rezultatima istraživanja utjecaja infekcije viroidima na nakupljanje  $H_2O_2$  u drugim biljnim vrstama. Infekcija rajčice viroidom PSTVd rezultirala je aktivacijom gena uključenih u biosintezu  $H_2O_2$  (Zheng i sur. 2017). U istraživanju koje su proveli Więsyk i sur. (2018) uočeno je da u rajčici ROS, čije je nakupljanje uzrokovano infekcijom viroidom PSTVd, mogu uzrokovati oštećenja klorofila i kloroplasta. Moguće je da je povećan sadržaj ROS u sistemski inficiranim listovima krumpira zaraženog s PSTVd povezan s razvojem simptoma kao što su razgradnja klorofila i žućenje listova, s obzirom na to da su kloroplasti važna mjesta sinteze  $H_2O_2$  (Hasanuzzaman i sur. 2020), no analiza klorofila nije provedena u ovom istraživanju.

Dinamika nakupljanja  $H_2O_2$  u stresnim uvjetima ovisi o eksperimentalnom sustavu kao i o vrsti patogena. U istraživanju koje su proveli Sánchez-Rojo i sur. (2011), infekcija krumpira fitoplazmama uzrokovala je nakupljanje  $H_2O_2$  u početnim fazama infekcije, što je rezultiralo boljom tolerancijom infekcije. Istraživanjem učinka infekcije Y virusa krumpira (eng. *Potato virus Y*, PVY) na biljke krumpira, uočeno je da je ekspresija gena uključenih u antioksidacijske aktivnosti bila smanjena u početnim fazama infekcije i povećala se u kasnijim fazama što ukazuje na to da se u krumpiru za vrijeme virusne infekcije ROS nakupljaju u početnim fazama infekcije, a u kasnijim fazama se uklanjaju aktivacijom antioksidacijskih enzima (Kogovšek i sur. 2016). Navedeno je u skladu s rezultatima mog istraživanja, iako je porast  $H_2O_2$  u listovima krumpira inficiranog s PSTVd mjerljiv u tjednima, a ne u danima kao što je slučaj u krumpiru inficiranom virusima i fitoplazmama. Treba napomenuti da je dinamika širenja navedenih patogena u krumpiru bitno različita, što se odražava na vrijeme aktivacije obrambenih odgovora.

Poznato je da su jasmonati usko povezani s aktivacijom signalnih puteva u kojima sudjeluju ROS (Yu i sur. 2019). Utjecajem na reprogramiranje genske ekspresije i nakupljanje antioksidacijskih molekula, MeJA sudjeluje u regulaciji nakupljanja ROS i omogućava prilagodbu biljaka na stresne uvjete uključujući i obranu od patogenih organizama. Pretretman s 1 mM MeJA je u biljkama krumpira WT inficiranim s PSTVd povećao sadržaj  $H_2O_2$  u 2. wpi, a smanjio sadržaj  $H_2O_2$  u 6. wpi što ukazuje na to da primijenjena koncentracija MeJA u kratkom vremenskom periodu nakon tretmana povećava, ali dugoročno (6. wpi) smanjuje oksidacijski stres i aktivira antioksidacijski odgovor u inficiranim biljkama krumpira u odnosu na netretirane inficirane biljke. Sam tretman s MeJA nije imao učinak na sadržaj  $H_2O_2$  u neinficiranim biljkama krumpira, što ukazuje na potencijal MeJA da regulira antioksidacijski odgovor u krumpiru inficiranom viroidom PSTVd. Slično, Hönig i sur. (2023) su pokazali da su biljke rajčice inficirane patogenom *Rhizoctonia solani* imale smanjenu proizvodnju ROS, ako su bile tretirane s MeJA. Nadalje, u rajčici je pretretman s MeJA uzrokovao promjene u regulaciji proizvodnje ROS i smanjio lezije truleži uzrokovane nekrotrofnim patogenom *Botrytis cinerea* što je rezultiralo boljom tolerancijom biljaka na infekciju nakon primjene MeJA (Yu i sur. 2019). Osim toga, tretman s MeJA je povezan i sa smanjenjem sadržaja  $H_2O_2$  u biljkama rajčice inficiranim nematodama (Bali i sur. 2018) kao i u klijancima *A. thaliana* izloženim stresu ozljeđivanjem ili herbicidom (Denness i sur. 2011). Suprotno tome, infekcija biljaka jabuke hemibiotrofnim gljivičnim patogenom *Venturia inaequalis* rezultirala je nakupljanjem ROS, a tretman s MeJA je smanjio ekspresiju gena *CAT* i pojačao nakupljanje  $H_2O_2$  u inficiranim u odnosu na neinficirane biljke jabuke, što je u konačnici povećalo otpornost jabuke na infekciju (Demiwal i sur. 2024). Ovo ide u prilog tezi da funkcija  $H_2O_2$  u odgovoru na stres ovisi o vrsti patogena i biljke domaćina (Mapuranga i sur. 2022).

## 5.2. U biljkama divljeg tipa infekcija s PSTVd uzrokuje promjene u ekspresiji gena za peroksidaze

Nakupljanje  $H_2O_2$  i ostalih ROS u biljkama uzrokovano infekcijom patogenim organizmima može rezultirati značajnim oštećenjima pogubnim za biljku. Kako bi spriječile oštećenja uzrokovana nakupljanjem ROS, biljke aktiviraju razne enzimske i ne-enzimske mehanizme uključene u uklanjanje suviška ROS (Smirnoff i Arnaud 2019). Antioksidacijski enzimi poput APX i CAT imaju brojne i međusobno isprepletene puteve djelovanja koji ovise o vanjskim signalima i biljnim hormonima (Mittler i sur. 2004). U ovom istraživanju je infekcija viroidom PSTVd u biljkama krumpira WT rezultirala privremenom aktivacijom gena *CAT2* u 4. wpi, nakon čega je u 6. wpi došlo do smanjenja njegove ekspresije u odnosu na neinficirane biljke. Ekspresija gena *APX1* ostala je približno nepromijenjena nakon infekcije. Navedeni rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjima u kojima je pokazano da infekcija krumpira viroidom PSTVd nije značajnije utjecala na aktivnost enzima APX, ali je smanjila aktivnost CAT (Milanović i sur. 2019a). Slično tome, infekcija biljke *Solanum laxum* viroidom PSTVd tek je blago pojačala aktivnost enzima APX, dok je aktivnost CAT ostala nepromijenjena (Milanović i sur. 2019b). Analiza diferencijalne ekspresije gena nakon infekcije rajčice X virusom krumpira (eng. *Potato virus X*, PVX) i raznim sojevima PVY, pokazala je da su geni *CAT* i *APX* uglavnom slabije ekspimirani u biljkama zaraženim virusima u odnosu na zdrave biljke (Liang i sur. 2016). Suprotno tome, infekcija S virusom krumpira (PVS0) uzrokovala je pojačanu ekspresiju *CAT* u biljkama krumpira (Kirgizova i sur. 2023), dok je infekcija mozaičnim virusom krastavca (eng. *Cucumber mosaic virus*, CMV) ili žutim mozaičnim virusom tikvice (eng. *Zucchini yellow mosaic virus* ZYMV) uzrokovala pojačanu aktivnost enzima APX i CAT u biljkama krastavca (*Cucumis sativus*) i bundeve (*Cucurbita pepo*) (Riedle-Bauer 2000).

Pretretman s MeJA je oslabio ekspresiju gena *CAT2*, a pojačao ekspresiju gena *APX1* u biljkama krumpira inficiranim s PSTVd u odnosu na netretirane inficirane biljke u 2. i 4. wpi, vjerojatno zbog povećanog sadržaja  $H_2O_2$ . Tome ide u prilog i rezultat pojačane ekspresije gena *APX1* u zdravim biljkama krumpira tretiranim s MeJA (u 2. i 4. wpi) kada je sadržaj  $H_2O_2$  bio veći u odnosu na netretirane biljke. Istraživanja utjecaja primjene MeJA na ekspresiju gena za antioksidacijske enzime u krumpiru su oskudna, no uočeno je da je pretretman s MeJA povećao antioksidacijski kapacitet (pojačao aktivnost CAT) u krumpiru inficiranom patogenom *Phytophthora infestans* (Yang i sur. 2022). Poznato je i da tretman s MeJA u uvjetima infekcije u rajčici može aktivirati antioksidacijski sustav i smanjiti štetu uzrokovanu oksidacijskim stresom (Hernández-Carranza i sur. 2023). Također, primjena MeJA je povezana s povećanom aktivnošću CAT i APX u biljkama rajčice nakon infekcije nematodama, u odnosu na netretirane biljke (Bali i sur. 2020). Primjena MeJA na zdrave biljke *A. thaliana* i *Solanum melongena* također je inducirala ekspresiju gena *CAT* (Jung 2004; Sudhamoy 2010). Iako pojačana transkripcija ne podrazumijeva i aktivnost samog enzima,

smatram da je i promjena u aktivnosti enzima u uvjetima infekcije i tretmana s MeJA iz drugih istraživanja i eksperimentalnih sustava korisna za usporedbu u ovom istraživanju, u nedostatku istraživanja koji se fokusiraju isključivo na gensku ekspresiju. Navedena literatura, u skladu s mojim rezultatima sugerira da infekcija patogenim organizmima i pretretman s MeJA rezultiraju diferencijalnom ekspresijom gena *APX* i *CAT* u raznim eksperimentalnim sustavima.

Antioksidacijski enzimi APX1 i CAT2 nisu jedini koji mogu utjecati na sadržaj  $H_2O_2$  u biljkama za vrijeme infekcije. POX, poput LiP, POPA i POX12, mogu biti uključene u stvaranje i uklanjanje  $H_2O_2$ , ovisno o kemijskom okolišu (Smirnoff i Arnaud 2019). LiP je peroksidaza klase III uključena u biosintezu lignina koja za svoju aktivnost koristi  $H_2O_2$  kao oksidans. Ligninski polimeri učvršćuju biljno tkivo što ih čini važnima u strukturi ksilemskih i provodnih tkiva (Almagro i sur. 2009), ali lignifikacija nije ograničena samo na funkciju učvršćivanja. Može biti potaknuta i napadom patogenim organizmima pri čemu ima ulogu u zaštiti biljke (Denness i sur. 2011). Ekspresija gena *LiP* je nakon infekcije biljaka WT viroidom PSTVd bila pojačana (posebno u početnoj fazi infekcije), pa je indikativno da LiP sudjeluje u ranom odgovoru biljaka krumpira na infekciju patogenom PSTVd. Ekspresija *LiP* je pojačana nakon infekcije patogenima u nekim drugim biljnim vrstama i povezuje se s boljom tolerancijom biotičkih stresnih uvjeta. Primjerice, infekcija biljaka pšenice gljivičnim hemibiotrofnim patogenom *Fusarium graminearum* pojačala je ekspresiju gena uključenih u biosintezu lignina (Bi i sur. 2011), kao i infekcija biljaka *A. thaliana* biotrofnim patogenom *Xanthomonas campestris* (Denness i sur. 2011). Slično, infekcija biljaka paprike hemibiotrofnom patogenom gljivom *Verticillium dahliae* bila je popraćena nakupljanjem lignina (Pomar i sur. 2004).

Učinak egzogeno dodanog MeJA na proces lignifikacije ovisi o biljnoj vrsti, tipu stresa ali i primijenjenoj koncentraciji MeJA. Odnos JA i ROS u regulaciji procesa lignifikacije tijekom odgovora na stres detaljno je opisan u istraživanju na klijancima *A. thaliana* (Denness i sur. 2011). U navedenom istraživanju proces lignifikacije prilikom odgovora na ozljeđivanje ili herbicid bio je slabiji u mutantima *A. thaliana* neosjetljivim na ROS, a jači u mutantima s manjim sadržajem JA-Ile, što sugerira da  $H_2O_2$  funkcionira kao pozitivan, a JA kao negativan regulator procesa lignifikacije izazvane stresom. Osim toga, u mutantima neosjetljivim na ROS, uočen je porast sadržaja JA-Ile, što dodatno ukazuje na negativnu povratnu spregu između  $H_2O_2$  i JA u regulaciji biosinteze lignina. Međutim, uočeno je da različite koncentracije MeJA imaju različit učinak na sadržaj  $H_2O_2$  i depoziciju lignina. Tako je pretretman s 1 mM MeJA izazvao ekotopično nakupljanje  $H_2O_2$  i pojačano nakupljanje lignina 12 sati nakon tretmana, dok je pretretman s 0.1 mM MeJA smanjio nakupljanje  $H_2O_2$  i biosintezu lignina (Denness i sur. 2011). U mom istraživanju, pretretman s 1 mM MeJA privremeno je izazvao pojačano nakupljanje  $H_2O_2$ , ali je dugoročno uzrokovao smanjeno nakupljanje  $H_2O_2$  i smanjenu ekspresiju gena *LiP* u biljkama krumpira inficiranim s PSTVd. Rezultati mog

istraživanja su dakle u skladu s tezom da je ekspresija gena uključenih u regulaciju lignifikacije tijekom odgovora na stres negativno reguliran s JA, a pozitivno reguliran s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Enzim POPA sudjeluje u biosintezi suberina i koristi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kao oksidans prilikom stvaranja polimera, slično kao i LiP za biosintezu lignina (Woolfson i sur. 2022). Suberin je, kao i lignin, kompleksni biopolimer koji se ugrađuje u staničnu stijenku biljke nakon ranjavanja ili infekcije biljaka patogenom (Razem i Bernards 2002) pri čemu tvori zaštitnu barijeru u epidermalnim i peridermalnim stjenkama stanica viših biljaka. Suberinizacija je uglavnom ograničena na podzemne dijelove biljke (gomolje), endodermu i stanice kore biljaka, ali se može naći i u drugim dijelovima biljke (Almagro i sur. 2009). U ovom istraživanju je ekspresija gena *POPA* u biljkama WT inficiranim viroidom PSTVd bila blago pojačana u kasnijim fazama infekcije u odnosu na neinficirane biljke, što ukazuje na to da je *POPA* uključena u odgovor na infekciju biljaka krumpira viroidom PSTVd. Pojačana ekspresija *POPA* u inficiranim biljkama WT koicidirala je s nakupljanjem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Rezultati mog istraživanja su u skladu s rezultatima prethodnog istraživanja u kojem je infekcija krumpira viroidom PSTVd aktivirala ekspresiju gena za POPA (poznatu i kao POD) (Milanović i sur. 2019a). Pretretman s 1 mM MeJA također je inducirao raniju aktivaciju gena *POPA* u inficiranim biljkama krumpira, vjerojatno posredno putem poticanja nakupljanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Denness i sur. 2011). U drugom istraživanju primjena MeJA u biljkama krumpira inficiranim gljivicom *P. infestans* rezultirala je transkripcijskom aktivacijom gena *POPA* u početnoj fazi infekcije i pojačanom otpornosti krumpira (Yang i sur. 2020), što je također u skladu s rezultatima mog istraživanja. Promjene u sadržaju suberina i lignina i njihovu ulogu u odgovoru krumpira na infekciju viroidom PSTVd treba dalje istražiti.

U ovom istraživanju je ekspresija gena *POX12* u biljkama WT inficiranim viroidom PSTVd bila pojačana u kasnoj fazi infekcije (6. wpi), usporedno s porastom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, što ukazuje na to da je *POX12*, kao i *POPA*, uključena u kasni odgovor biljaka krumpira na infekciju viroidom PSTVd, vjerojatno u vezi s nakupljanjem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pretretman s MeJA uzrokovao je smanjenu ekspresiju gena *POX12* u kasnoj fazi infekcije u biljkama WT, usporedno sa smanjenjem sadržaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Navedeno ukazuje na to da je smanjenje sadržaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nakon tretmana s MeJA vjerojatno povezano s negativnom regulacijom ekspresije *POX12* u krumpiru inficiranom s PSTVd. Od oskudnih literaturnih podataka dostupnih o enzimu *POX12*, izdvojila bih primjere uloge *POX12* specifičnih za biljnu vrstu u odgovoru na patogene. Cai i sur. (2023) su svojim istraživanjima na topoli pokazali da je infekcija hemibiotrofnim gljivičnim patogenom *Botryosphaeria dothidea* inhibirala ekspresiju gena *POX12*, a rezultat je bio povećanje sadržaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i veća otpornost biljke, što ukazuje na to da u topoli *POX12* ima ulogu uklanjanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. S druge strane, u kukuruzu inficiranom gljivičnim patogenom *Ustilago maydis*, *POX12* sudjeluje u proizvodnji ROS (Jermy 2012).

Većina podataka iz literature ne odnosi se specifično na promjene u ekspresiji i aktivnosti *POPA*, *LiP* i *POX12*, već generalno na ukupne mjerljive *POX*. Izdvojila bih da su rezultati drugih grupa pokazali da nakon infekcije raznih sorti krumpira virusom PVS0 dolazi do aktivacije *POX* (Kirgizova i sur. 2023).

Istraživanja i na drugim eksperimentalnim sustavima pokazala su povećanu POX aktivnost u biljkama krastavca i bundeve inficiranim virusima CMV ili ZYMV (Riedle-Bauer 2000). Inokulacija bakterije *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* u suspenzije stanica osjetljive sorte krumpira rezultirala je pojačanom *de novo* sintezom POX i njihovom pojačanom aktivnosti (Graskova i sur. 2004). Dakle, slično mom istraživanju, istraživanja drugih grupa ukazuju na to da je nakon infekcije sinteza i aktivnost POX pojačana u biljkama krumpira i da je uključena u obrambeni mehanizam biljaka. Egzogeno primijenjen MeJA na biljkama krumpira inficiranim patogenom *P. infestans* povezan je s aktivacijom ukupnih POX i pojačanom otpornošću biljaka krumpira na navedenu infekciju (Yang i sur. 2022). Osim toga, tretman s MeJA je povećao aktivnost POX u zdravim biljkama *A. thaliana* (Jung 2004), i u biljkama rajčice inficiranim biotrofnim nematodama (Bali i sur. 2020). Rezultati mog istraživanja pokazali su da je učinak MeJA na ekspresiju gena za pojedine peroksidaze klase III u biljkama WT različit te da doprinos svake peroksidaze u odgovoru krumpira na infekciju PSTVd treba pojedinačno ispitati.

### **5.3. JA-posredovan odgovor je uključen u odgovor biljaka krumpira na infekciju viroidom PSTVd**

Radi boljeg uvida u povezanost biosinteze JA i prijenosa signala u kojem sudjeluje JA s aktivacijom ekspresije gena za peroksidaze, provela sam i analizu ekspresije marker gena za biosintezu JA (*LOX6* i *JAR1*) i prijenos signala u kojem sudjeluje JA (*MYC2*). Regulacija biosinteze JA određena je pozitivnom povratnom spregom, dostupnošću supstrata i specifičnošću tkiva (Wasternack i Hause 2013). Svi geni koji kodiraju enzime uključene u biosintezu JA su JA-inducibilni (Wasternack 2007). U biljkama WT inficiranim viroidom PSTVd, ekspresija gena *LOX6* i *JAR1* je najjača u početnoj fazi infekcije nakon čega opada u 4. i 6. wpi. Geni *LOX* su uključeni u regulaciju biosinteze JA pri čemu reagiraju na JA-Ile, ali i na napad patogena (Wasternack i Hause 2013, Chauvin i sur. 2013). Nakupljanje JA potiče transkripcijsku aktivnost gena *JAR1* koji je uključen u posljednji korak sinteze JA-Ile (Staswick i sur. 2002). Nakupljanje JA/JA-Ile zatim potiče proteasomalnu degradaciju negativnog transkripcijskog regulatora JAZ, što omogućuje pozitivnom transkripcijskom regulatoru MYC2 da aktivira gene za biosintezu JA i prijenos signala u kojem sudjeluje JA, uključujući gene *MYC* i *JAZ* (Wasternack i Song 2017). Pojačana ekspresija gena *LOX6*, *JAR1* i *MYC2* ukazuje na aktivaciju biosinteze JA i prijenosa signala u kojem sudjeluje JA u ranoj fazi infekcije biljaka krumpira divljeg tipa viroidom PSTVd. Mjerenjem nakupljanja JA-Ile u listovima krumpira inficiranog viroidom PSTVd uočeno je da do nakupljanja JA-Ile u listovima krumpira inficiranog viroidom PSTVd dolazi u kasnoj fazi infekcije (6.-8. wpi), ali sadržaj JA-Ile nije mjeren u vrlo ranoj fazi infekcije (2. wpi) (neobjavljeni rezultati). U regulaciji ekspresija gena *LOX* i *MYC* tijekom odgovora na infekciju viroidom, osim JA sudjeluju i druge signalni putevi, uključujući MAPK i biljni hormoni etilen i salicilna kiselina (Wasternack i Hause 2013). U *A. thaliana*, MKK3 (eng. MAP KINASE

3) i MAPK6 su aktivirane posredstvom JA što dovodi do negativne regulacije ekspresije *MYC2* i gena uključenih u biosintezu JA (Takahashi i sur. 2007). U drugim istraživanjima, infekcija biljaka krumpira i *S. laxum* viroidom PSTVd rezultirala je aktivacijom gena uključenih u biosintezu JA i nakupljanjem JA u kasnoj fazi infekcije (Milanović i sur. 2019a, 2019b). Također, istraživanja genske ekspresije za vrijeme infekcije rajčice viroidom PSTVd ukazala su na promjenu ekspresije gena uključenih u biosintezu i metabolizam hormona, uključujući i JA (Owens i sur. 2012). Podaci o transkriptomima biljaka zaraženih viroidima pokazuju da infekcija ovim nekodirajućim patogenima utječe na ekspresiju gena uključenih u biosintezu i prijenos signala u kojem sudjeluje JA (Joubert i sur. 2022), a da je regulacija signalnih puteva u kojima sudjeluje JA ovisna o interakciji viroida i domaćina. Tako je transkripcijska aktivacija gena *LOX* uočena u biljkama hmelja inficiranim viroidom HSVd i HLVD (Kappagantu i sur. 2017), a utišavanje u biljkama hmelja inficiranim viroidom HLVD i CBCVD (Pokorn i sur. 2017) i biljkama rajčice inficiranim s PSTVd (Więsyk i sur. 2018). Ekspresija gena *JAR1* je bila pojačana u osjetljivom kultivaru rajčice, a utišana u tolerantnom kultivaru (Owens i sur. 2012; Więsyk i sur. 2018). Iako u navedenim istraživanjima nije analiziran sadržaj endogene JA, rezultati ukazuju na uključenost JA u odgovoru na infekciju u raznim interakcijama biljaka i viroida.

Egzogeni pretretman s MeJA je u ovom istraživanju povezan sa smanjenjem ekspresije gena *LOX6*, *JAR1* i *MYC2* u 2. wpi u odnosu na netretirane inficirane biljke WT. Egzogeno dodanu MeJA biljke mogu pretvoriti u JA i JA-Ile (Tamogami i sur. 2008), što vjerojatno dovodi do povećanja endogene razine JA-Ile u inficiranim biljkama krumpira, ali navedeno bi trebalo eksperimentalno dokazati. MeJA je hlapiv spoj podložan razgradnji zbog čega neposredan učinak MeJA tretmana na ekspresiju *LOX6*, *JAR1* i *MYC2* slabi u 4. i 6. wpi. Učinak egzogenog tretmana s MeJA na druge biljne vrste inficirane viroidima do sada nije istražen. Tretman s JA u biljkama krumpira inficiranim patogenom *P. infestans*, uzrokovao je aktivaciju gena *LOX* i *MYC2* i ostalih gena uključenih u prijenos signala posredovan s JA 12 sati nakon tretmana, a tretman je rezultirao boljom tolerancijom biljaka na infekciju (Yang i sur. 2022). Rezultati mog istraživanja ukazuju na to da učinak MeJA na ekspresiju gena varira ovisno o vremenu proteklom nakon primjene MeJA te da dugoročno pretretman s MeJA negativno utječe na ekspresiju gena uključenih u prijenos signala posredovan s JA tijekom odgovora biljaka krumpira divljeg tipa na infekciju viroidom PSTVd.

#### **5.4. JA-deficijentne biljke linije *opr3* inficirane viroidom PSTVd su pod većim oksidacijskim stresom u odnosu na biljke divljeg tipa**

U JA-deficijentnim biljkama krumpira, infekcija viroidom PSTVd je rezultirala ranijim nakupljanjem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u odnosu na biljke WT (4. umjesto 6. wpi), nakon čega je uslijedilo smanjenje sadržaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u kasnijoj fazi infekcije (6. wpi). Nedostatak endogene JA, dakle, potiče raniju indukciju oksidacijskog stresa u JA-deficijentnim biljkama u odnosu na biljke WT. Uz to, bazalna razina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je bila viša u JA-deficijentnim u



odnosu na biljke WT, što ukazuje na veću osjetljivost JA-deficijentnih biljaka. Kao odgovor na nakupljanje  $H_2O_2$  u 4. wpi, u JA-deficijentnim biljkama dolazi do aktivacije svih gena uključenih u antioksidacijski odgovor (*APX1*, *CAT2*, *POPA*, *LiP* i *POX12*), što može biti povezano sa smanjenjem ukupnog sadržaja  $H_2O_2$  u 6. wpi. Ovi rezultati ukazuju na važnost normalne razine endogene JA u regulaciji antioksidacijskog odgovora biljke krumpira na infekciju s PSTVd.

Nakupljanje  $H_2O_2$  u 2. i 6. wpi, uz prolazno smanjenje sadržaja  $H_2O_2$  u 4. wpi u inficiranim biljkama linije A3 tretiranim s MeJA, u odnosu na netretirane inficirane JA-deficijentne biljke, sugerira da tretman s MeJA prije infekcije dodatno povećava oksidacijski stres u JA-deficijentnim biljkama inficiranim viroidom PSTVd. Pretretman s MeJA inducirao je i raniju ekspresiju gena uključenih u antioksidacijski odgovor u odnosu na ekspresiju u netretiranim inficiranim biljkama (u 4. wpi u odnosu na 6. wpi), što ukazuje na to da JA sudjeluje u regulaciji aktivacije antioksidacijskog odgovora. Pojačana aktivacija *LiP* u JA-deficijentnim biljkama u skladu je s istraživanjem koje ukazuje na to da je ekspresija gena uključenih u lignifikaciju negativno regulirana s JA u klijancima *A. thaliana* (Denness i sur. 2011).

Očekivano, regulacija biosinteze JA u biljkama krumpira linije *opr3* je bila poremećena. Relativna ekspresija gena *LOX6*, *JAR1* i *MYC2* bila je snažno aktivirana u inficiranim u odnosu na neinficirane JA-deficijentne biljke, tijekom cijelog trajanja eksperimenta, a najviše u 6. wpi, iako je razina endogene JA-Ile i njenog prekursora *cis*-OPDA bila niska (neobjavljeni rezultati). Kako je već spomenuto, u regulaciju ekspresije gena *LOX* i *MYC*, osim JA, mogu biti uključeni i drugi signalni putevi, primjerice MAPK, ROS, te drugi biljni hormoni (Takahashi i sur. 2007; Wasternack i Hause 2013). Izrazito pojačana ekspresija gena *MYC2* u 6. wpi mogla bi biti povezana s pojačanom ekspresijom gena za peroksidaze u netretiranim inficiranim biljkama linije *opr3*. Na primjer, pojačana ekspresija *CsMYC2* u biljci *A. thaliana* povećala sadržaj JA i peroksidaznu aktivnost. Također, proteini MYC2/3/4 mogu potaknuti ekspresiju gena uključenih u katabolizam klorofila i starenje, te tako ubrzati žućenje lišća (Du i sur. 2017; Zhu i sur. 2015). Slično tome, overekspresija gena *OsMYC2* značajno je pospješila razgradnju klorofila u riži (Uji i sur. 2017). Nakupljanje  $H_2O_2$  i razgradnja klorofila su procesi povezani s razvojem simptoma kloroze listova, pa bi porast ekspresije *MYC2* u netretiranim inficiranim biljkama krumpira *opr3* mogao biti povezan s razvojem simptoma infekcije viroidom.

Pretretman s MeJA smanjio je ekspresiju *LOX6* i *JAR1* te gena za antioksidacijske enzime, a povećao sadržaj  $H_2O_2$  u tretiranim u odnosu na netretirane inficirane biljke linije *opr3*. Međutim, privremeno povećanje ekspresije gena *LOX6* i *JAR1* uočeno je u 4. wpi, kao i pojačana ekspresija gena za antioksidacijske enzime te smanjenje sadržaja  $H_2O_2$  u tretiranim u odnosu na netretirane inficirane biljke linije *opr3*. Pri tome je u 4. wpi uočena i smanjena ekspresija *MYC2*, što sugerira uključenost nekih drugih signalnih puteva u regulaciju antioksidacijskih odgovora posredovanu s MeJA.

## 5.5. JA-neosjetljive biljke linije *coil* ne pokazuju adekvatan ROS-posredovan odgovor

U JA-neosjetljivim biljkama *coil* u prva četiri tjedna nakon infekcije nije bila vidljiva promjena u sadržaju  $H_2O_2$  u odnosu na zdrave *coil* biljke, ali i u odnosu na inficirane biljke WT. Ipak, u 6. wpi dolazi do nakupljanja  $H_2O_2$  u inficiranim biljkama *coil* u odnosu na zdrave biljke, na temelju čega se može zaključiti da zbog poremećaja u prijenosu signala u kojem sudjeluje JA biljke pokazuju zakašnjeni ROS-posredovan odgovor na infekciju. Osim toga, u inficiranim JA-neosjetljivim biljkama uočen je i izostanak odgovora na pretretman s MeJA u prva četiri tjedna. Pretretman s MeJA je imao pozitivan učinak na smanjenje nakupljanja  $H_2O_2$  u kasnoj fazi infekcije u biljkama neosjetljivim na JA, što ukazuje na to da biljke *coil* nisu u potpunosti neosjetljive na dodatak MeJA. COI1 je signalni protein važan za kontrolu nakupljanja ROS posredovanu s JA (Kolupaev i sur. 2023) jer regulacijom aktivnosti proteina MYC modulira ekspresiju gena za antioksidacijske enzime i NOX/RBOH uključene u proizvodnju ROS (Kadam i Barvkar 2024). Stoga je bilo očekivano da nakon tretmana s MeJA sadržaj  $H_2O_2$  ostane nepromijenjen u *coil* liniji s nefunkcionalnim prijenosom signala u kojem sudjeluje JA. Jedan od razloga izostanka potpune neosjetljivosti biljaka *coil* na MeJA moglo bi biti nepotpuno utišavanje gena *COI1* (u krumpiru postoji više alela), a moguće je i da je došlo do aktivacije mehanizama nakupljanja  $H_2O_2$  neovisnih o JA (Halim i sur. 2009).

Izostanak promjene u sadržaju  $H_2O_2$  odrazio se i na ekspresiju gena za antioksidacijske enzime, *APX1* i *CAT2*, čija je ekspresija smanjena u inficiranim biljkama u odnosu na zdrave biljke *coil*, ali i u odnosu na inficirane biljke WT, i ne mijenja se pretretmanom s MeJA, što ukazuje na to da je za aktivaciju antioksidacijskog odgovora potreban funkcionalan prijenos signala u kojem sudjeluje JA. Slično, u inficiranim biljkama *coil* je smanjena ekspresija gena *POPA* i *LiP*, u odnosu na zdrave biljke, uz blagi porast nakon pretretmana s MeJA. Suprotno tome, u biljkama WT se nakon infekcije povećava ekspresija *POPA* i *LiP* što upućuje na to da je za njihovu aktivaciju potreban funkcionalan prijenos signala u kojem sudjeluje JA. U istraživanju utjecaja infekcije hemibiotrofnom gljivicom *Fusarium oxysporum* na biljke rajčice, biljke divljeg tipa imale su pojačanu, a JA-neosjetljive biljke *coil* slabiju ekspresiju gena za antioksidacijske enzime, uključujući gen *APX* (Kadam i Barvkar 2024). Pretretman zdravih biljaka rajčice *coil* s MeJA smanjio je ekspresiju gena *APX* u odnosu na biljke s normalnom *COI1* ekspresijom, što je uočeno i u mom istraživanju.

Za razliku od navedenih gena, ekspresija gena *POX12* je bila jača u 4. i 6. wpi u inficiranim JA-neosjetljivim biljkama linije *coil* u odnosu na zdrave biljke, što je koicidiralo s nakupljanjem  $H_2O_2$ , slično kao i u inficiranim biljkama WT. Dakle, neovisno o statusu endogene JA i funkcionalnosti prijenosa signala u kojem sudjeluje JA, u biljkama inficiranim s PSTVd dolazi do aktivacije gena *POX12*, što upućuje na zaključak da infekcija viroidom aktivira ekspresiju gena *POX12* neovisno o putu prijenosa signala u kojem

sudjeluje JA. Sukladno tome, pretretman s MeJA nije imao učinak na promjenu ekspresije *POX12* u biljkama *coi1* inficiranim s PSTVd.

Infekcija s PSTVd u biljkama *coi1*, slično biljkama WT, aktivira ekspresiju gena *LOX6*, ali ne i *JAR1* što je u skladu s niskom razinom endogene JA-Ile u ranoj fazi infekcije (neobjavljeni rezultati). Ipak, u inficiranim biljkama *coi1* uočen je blagi porast ekspresije *MYC2* u 4. i 6. wpi u odnosu na zdrave biljke *coi1*, što ukazuje na postupno nakupljanje JA-Ile, ali i moguću aktivaciju *MYC2* nekim drugim signalnim putem.

Unatoč značajnim razlikama u nakupljanju  $H_2O_2$  i promjenama u ekspresiji gena, JA-deficijentne i JA-neosjetljive biljke imaju približno jednak stupanj osjetljivosti na zarazu viroidom PSTVd kao i biljke krumpira WT (neobjavljeni rezultati). Također, pretretman s MeJA ne mijenja značajno dinamiku nakupljanja viroidne RNA u sve tri ispitane linije krumpira (neobjavljeni rezultati), što ukazuje na veliku sposobnost prilagodbe biljaka u odgovoru na stres, ali i vjerojatnu uključenost drugih signalnih puteva, osim JA, u regulaciju odgovora na infekciju viroidom PSTVd.

## 6. ZAKLJUČAK

Ovo je prvo istraživanje o dinamici oksidacijskog stresa i promjene ekspresije gena za antioksidacijske enzime tijekom infekcije krumpira i PSTVd, u ovisnosti o sadržaju endogene JA i funkcionalnosti prijenosa signala u kojem sudjeluje JA. Dobiveni rezultati ukazuju na to da infekcija viroidom PSTVd i tretman inficiranih biljaka s MeJA potiču oksidacijski stres u biljkama krumpira divljeg tipa. U biljkama linije *opr3*, sa smanjenim sadržajem endogene JA, oksidacijski stres je bio jači u odnosu na biljke WT. Pretretman s MeJA u inficiranim JA-deficijentnim biljkama bio je povezan s jačanjem oksidacijskog stresa i ranijom aktivacijom gena za antioksidacijske enzime, što ukazuje na važnost normalne razine endogene JA u regulaciji antioksidacijskog odgovora biljaka krumpira tijekom infekcije viroidom PSTVd. Inficirane biljke linije *coi1* neosjetljive na JA pokazale su male promjene u sadržaju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i aktivaciji gena za antioksidacijske enzime. Tretman s MeJA u biljkama neosjetljivim na JA očekivano nije imao značajan učinak na ekspresiju gena, što dodatno ukazuje na važnost JA i prijenosa signala u kojem sudjeluje JA u odgovoru na infekciju s PSTVd.

## 7. LITERATURA

- Almagro L., Gómez Ros L. V., Belchi-Navarro S., Bru R., Ros Barceló A., Pedreño M.A. (2009): Class III peroxidases in plant defence reactions. *J Exp Bot* 60: 377–390.
- Bali S., Kaur P., Jamwal V.L., Gandhi S.G., Sharma A., Ohri P., Bhardwaj R., Ali M.A., Ahmad P. (2020): Seed priming with jasmonic acid counteracts root knot nematode infection in tomato by modulating the activity and expression of antioxidative enzymes. *Biomolecules* 10: 98.
- Bali S., Kaur P., Sharma A., Ohri P., Bhardwaj R., Alyemini M.N., Wijaya L., Ahmad P. (2018): Jasmonic acid-induced tolerance to root-knot nematodes in tomato plants through altered photosynthetic and antioxidative defense mechanisms. *Protoplasma* 255: 471–484.
- Bi C., Chen F., Jackson L., Gill B.S., Li W. (2011): Expression of lignin biosynthetic genes in wheat during development and upon infection by fungal pathogens. *Plant Mol Biol Report* 29: 149–161.
- Cai G., Zhang Y., Huang L., Wang N. (2023): Uncovering the Role of PdePrx12 Peroxidase in Enhancing Disease Resistance in Poplar Trees. *J Fungi* 9(4): 410.
- Chauvin A., Caldelari D., Wolfender J.L., Farmer E.E. (2013): Four 13-lipoxygenases contribute to rapid jasmonate synthesis in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves: A role for lipoxygenase 6 in responses to long-distance wound signals. *New Phytol* 197: 566–575.
- Chen X., Wang D.-D., Fang X., Chen X.-Y., Mao Y.-B. (2019): Plant Specialized Metabolism Regulated by Jasmonate Signaling. *Plant Cell Physiol* 60: 2638–2647.
- Cheong J.J., Choi Y. Do (2003): Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *TiG* 19: 409–413.
- Dai P., Zhai M., Wang A., Ma H., Lyu D. (2023): Exogenous methyl jasmonate enhanced the antioxidant capacity of *Malus baccata* by stimulating jasmonate signalling under suboptimal low root-zone temperature. *Sci Hortic* 321: 112292.
- Demiwal P., Nabi S.U., Mir J.I., Verma M.K., Yadav S.R., Roy P., Sircar D. (2024): Methyl jasmonate improves resistance in scab-susceptible Red Delicious apple by altering ROS homeostasis and enhancing phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiol Biochem* 207: 108371.
- Denness L., McKenna J.F., Segonzac C., Wormit A., Madhou P., Bennett M., Mansfield J., Zipfel C., Hamann T. (2011): Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species- and jasmonic acid-dependent process in arabidopsis. *Plant Physiol* 156: 1364–1374.

- Dodds P.N., Rathjen J.P. (2010): Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11: 539–548.
- Du C., Shen F., Li Y., Zhao Z., Xu X., Jiang J., Li J. (2021): Effects of salicylic acid, jasmonic acid and reactive oxygen species on the resistance of *Solanum peruvianum* to *Meloidogyne incognita*. *Sci Hort* 275: 109649.
- Du M., Zhao J., Tzeng D.T.W., Liu Y., Deng L., Yang T., Zhai Q., Wu F., Huang Z., Zhou M., Wang Q., Chen Q., Zhong S., Li C.B., Li C. (2017): MYC2 orchestrates a hierarchical transcriptional cascade that regulates jasmonate-mediated plant immunity in tomato. *Plant Cell* 29: 1883–1906.
- Expósito-Rodríguez M., Borges A.A., Borges-Pérez A., Pérez J.A. (2008): Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol* 8: 131.
- Fu Z.Q., Dong X. (2013): Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. *Annu Rev Plant Biol* 64: 839–863.
- García-Marcos A., Pacheco R., Manzano A., Aguilar E., Tenllado F. (2013): Oxylin biosynthesis genes positively regulate programmed cell death during compatible infections with the synergistic pair *Potato Virus X-Potato Virus Y* and *Tomato Spotted Wilt Virus*. *J Virol* 87: 5769–5783.
- Graskova I.A., Borovskii G.B., Kolesnichenko A. V., Voinikov V.K. (2004): peroxidase as a component of the signaling pathway in potato cells during ring rot infection. *Russ J Plant Physiol* 51: 621–626.
- Halim V.A., Altmann S., Ellinger D., Eschen-Lippold L., Miersch O., Scheel D., Rosahl S. (2009): PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid. *Plant Journal* 57: 230–242.
- Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M.B., Zulfiqar F., Raza A., Mohsin S.M., Mahmud J. Al, Fujita M., Fotopoulos V. (2020): Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants* 9: 1–52.
- Hernández-Carranza P., Avila-Sosa R., Vera-López O., Navarro-Cruz A.R., Ruíz-Espinosa H., Ruiz-López I.I., Ochoa-Velasco C.E. (2023): Uncovering the role of hormones in enhancing antioxidant defense systems in stressed tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *Plants* 12: 3648.
- Hönig M., Roeber V.M., Schmölling T., Cortleven A. (2023): Chemical priming of plant defense responses to pathogen attacks. *Front Plant Sci* 14: 1146577.

- Hu C.-H., Wang P.-Q., Zhang P.-P., Nie X.-M., Li B.-B., Tai L., Liu W.-T., Li W.-Q., Chen K.-M. (2020): NADPH oxidases: the vital performers and center hubs during plant growth and signaling. *Cells* 9: 437.
- Jermey A. (2012): Fungal pathogenesis: Ustilago gives plants a Pep talk. *Nat Rev Microbiol* 10: 444–445.
- Jiang H., Wang Y., Li C., Wang B., Ma L., Ren Y., Bi Y., Li Y., Xue H., Prusky D. (2020): The effect of benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (BTH) treatment on regulation of reactive oxygen species metabolism involved in wound healing of potato tubers during postharvest. *Food Chem* 309: 125608.
- Jones J.D.G., Dangl J.L. (2006): The plant immune system. *Nature* 444: 323–329.
- Joubert M., Berg N. van den, Theron J., Swart V. (2022): Transcriptomics Advancement in the Complex Response of Plants to Viroid Infection. *Int J Mol Sci* 23: 7677.
- Jung S. (2004): Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. *Plant Physiol Biochem* 42: 225–231.
- Kadam S.B., Barvkar V.T. (2024): COI1 dependent jasmonic acid signalling positively modulates ROS scavenging system in transgenic hairy root culture of tomato. *PPB* 206: 108229.
- Kappagantu M., Bullock J.M., Nelson M.E., Eastwell K.C. (2017): Hop stunt viroid: Effect on host (*Humulus lupulus*) transcriptome and its interactions with hop powdery mildew (*Podosphaera macularis*). *MPMI* 30: 842–851.
- Katsarou K., Wu Y., Zhang R., Bonar N., Morris J., Hedley P.E., Bryan G.J., Kalantidis K., Hornyik C. (2016): Insight on genes affecting tuber development in potato upon potato spindle tuber viroid (PSTVd) infection. *PLoS One* 11(3): e0150711.
- Kirgizova I. V., Kalashnikova E.A., Turpanova R.M., Gadzhimuradova A.M., Silaev D. V (2023): Levels of physiological activity of antioxidant enzymes in potatoes (*S. tuberosum* L.) when infected PVS virus. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 1154: 012033.
- Kogovšek P., Pompe-Novak M., Petek M., Fragner L., Weckwerth W., Gruden K. (2016): Primary metabolism, phenylpropanoids and antioxidant pathways are regulated in potato as a response to *Potato virus Y* Infection. *PLoS One* 11(1): e0146135.
- Kolupaev Y.E., Yastreb T.O., Dmitriev A.P. (2023): Signal Mediators in the Implementation of Jasmonic Acid's Protective Effect on Plants under Abiotic Stresses. *Plants* 12(14): 2631.

- Kovalskaya N., Hammond R.W. (2014): Molecular biology of viroid–host interactions and disease control strategies. *Plant Science* 228: 48–60.
- Liang Z., Dickison V., Singh M., Xiong X., Nie X. (2016): Studies of tomato plants in response to infections with PVX and different PVY isolates reveal a remarkable PVX-PVY<sup>NTN</sup> synergism and diverse expression profiles of genes involved in different pathways. *Eur J Plant Pathol* 144: 55–71.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25: 402–408.
- Mapuranga J., Zhang N., Zhang L., Chang J., Yang W. (2022): Infection strategies and pathogenicity of biotrophic plant fungal pathogens. *Front Microbiol* 13: 799396.
- Milanović J., Oklestkova J., Majdandžić A., Novák O., Mihaljević S. (2019a): Organ-specific differences in endogenous phytohormone and antioxidative responses in potato upon PSTVd infection. *J Plant Physiol* 232: 107–114.
- Milanović J., Oklestkova J., Novák O., Mihaljević S. (2019b): Effects of *Potato Spindle Tuber Viroid* infection on phytohormone and antioxidant responses in symptomless *Solanum laxum* plants. *J Plant Growth Regul* 38: 325–332.
- Mittler, R., Zandalinas, S. I., Fichman, Y., & van Breusegem, F. (2022). Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 23(10): 663–679.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem F. Van (2004): Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9: 490–498.
- Mukherjee S.P., Choudhuri M.A. (1983): Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiol Plant* 58: 166–170.
- Navarro B., Gisel A., Rodio M.E., Delgado S., Flores R., Serio F. Di (2012): Viroids: How to infect a host and cause disease without encoding proteins. *Biochimie* 94: 1474–1480.
- Nürnberg T., Lipka V. (2005): Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol Plant Pathol* 6: 335–345.
- Owens R.A., Tech K.B., Shao J.Y., Sano T., Baker C.J. (2012): Global analysis of tomato gene expression during *potato spindle tuber viroid* infection reveals a complex array of changes affecting hormone signaling. *MPMI* 25: 582–598.



- Pieterse C.M.J., Does D. Van Der, Zamioudis C., Leon-Reyes A., Wees S.C.M. Van (2012): Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 489–521.
- Pokorn T., Radišek S., Javornik B., Štajner N., Jakše J. (2017): Development of hop transcriptome to support research into host-viroid interactions. *PLoS One* 12: e0184528.
- Pomar F., Novo M., Bernal M.A., Merino F., Barceló A.R. (2004): Changes in stem lignins (monomer composition and crosslinking) and peroxidase are related with the maintenance of leaf photosynthetic integrity during *Verticillium* wilt in *Capsicum annuum*. *New Phytol* 163: 111–123.
- Razem F.A., Bernardis M.A. (2002): Hydrogen peroxide is required for poly(phenolic) domain formation during wound-induced suberization. *J Agric Food Chem* 50: 1009–1015.
- Riedle-Bauer M. (2000): Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections of plants. *J Phytopathol* 148: 297–302.
- Sánchez-Rojo S., López-Delgado H.A., Mora-Herrera M.E., Almeyda-León H.I., Zavaleta-Mancera H.A., Espinosa-Victoria D. (2011): Salicylic acid protects potato plants from Phytoplasma-associated stress and improves tuber photosynthate assimilation. *AJPR* 88: 175–183.
- Sano T. (2021): Progress in 50 years of viroid research—Molecular structure, pathogenicity, and host adaptation. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 97(7): 371-401.
- Santos C. dos, Franco O.L. (2023): Pathogenesis-related proteins (PRs) with enzyme activity activating plant defense responses. *Plants* 12(11): 2226.
- Saubeau G., Perrin F., Marnet N., Andrivon D., Val F. (2016): Hormone signalling pathways are differentially involved in quantitative resistance of potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol* 65: 342–352.
- Shigeto J., Tsutsumi Y. (2016): Diverse functions and reactions of class III peroxidases. *New Phytol* 209: 1395–1402.
- Smirnov N., Arnaud D. (2019): Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytol* 221: 1197–1214.
- Staswick P.E., Tiryaki I., Rowe M.L. (2002): Jasmonate response locus *JAR1* and several related Arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* 14: 1405–1415.

- Sudhamoy M. (2010): Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. *Afr J Biotechnol* 9: 8038–8047.
- Takahashi F., Yoshida R., Ichimura K., Mizoguchi T., Seo S., Yonezawa M., Maruyama K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2007): The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3–MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 805–818.
- Tamogami S., Rakwal R., Agrawal G.K. (2008): Interplant communication: Airborne methyl jasmonate is essentially converted into JA and JA-Ile activating jasmonate signaling pathway and VOCs emission. *Biochem Biophys Res Commun* 376: 723–727.
- Torres, M. A., Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. In *Plant Physiol.* ASPB 141(2): 373-378.
- Uji Y., Akimitsu K., Gomi K. (2017): Identification of OsMYC2-regulated senescence-associated genes in rice. *Planta* 245: 1241–1246.
- Venkataraman S., Badar U., Shoeb E., Hashim G., Abouhaidar M., Hefferon K. (2021): An inside look into biological miniatures: Molecular mechanisms of viroids. *Int J Mol Sci* 22: 1–25.
- Vuorinen K., Zamora O., Vaahtera L., Overmyer K., Brosche M. (2021): Dissecting contrasts in cell death, hormone, and defense signaling in response to botrytis cinerea and reactive oxygen species. *MPMI* 34: 75–87.
- Wasternack C. (2007): Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* 100: 681–697.
- Wasternack C., Hause B. (2013): Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann Bot* 111: 1021–1058.
- Wasternack C., Hause B. (2016): OPDA-Ile - a new JA-Ile-independent signal? *Plant Signal Behav* 11: e1253646.
- Wasternack, C., & Hause, B. (2019). The missing link in jasmonic acid biosynthesis. *Nat. Plants*, 5(8): 776–777.
- Wasternack C., Song S. (2017): Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *J Exp Bot* 68: 1303–1321.

- Więsyk A., Iwanicka-Nowicka R., Fogtman A., Zagórski-Ostojka W., Góra-Sochacka A. (2018): Time-course microarray analysis reveals differences between transcriptional changes in tomato leaves triggered by mild and severe variants of *Potato Spindle Tuber Viroid*. *Viruses* 10: 257.
- Woolfson K.N., Esfandiari M., Bernardis M.A. (2022): Suberin biosynthesis, assembly, and regulation. *Plants* 11(4): 555.
- Xia X.-J., Zhou Y.-H., Shi K., Zhou J., Foyer C.H., Yu J.-Q. (2015): Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *J Exp Bot* 66: 2839–2856.
- Yang Y., Jiang R., Wang H., Tian Z., Xie C. (2020): *StPOPA*, encoding an anionic peroxidase, enhances potato resistance against *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Breed* 40: 16.
- Yang Y., Yang X., Guo X., Hu X., Dong D., Li G., Xiong X. (2022): Exogenously applied methyl jasmonate induces early defense related genes in response to *Phytophthora infestans* infection in potato plants. *Hortic Plant J* 8: 511–526.
- Yu X., Zhang W., Zhang Y., Zhang X., Lang D., Zhang X. (2019): The roles of methyl jasmonate to stress in plants. *Plant Biol* 46: 197–212.
- Zheng Y., Wang Y., Ding B., Fei Z. (2017): Comprehensive transcriptome analyses reveal that potato spindle tuber viroid triggers genome-wide changes in alternative splicing, inducible trans-acting activity of phased secondary small interfering rnas, and immune responses. *J Virol* 91(11).
- Zhu X., Chen J., Xie Z., Gao J., Ren G., Gao S., Zhou X., Kuai B. (2015): Jasmonic acid promotes degreening via *MYC 2/3/4* and *ANAC 019/055/072*-mediated regulation of major chlorophyll catabolic genes. *TPJ* 84: 597–610.

## **ŽIVOTOPIS**

Rođena sam u Splitu gdje sam završila osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje i trenutno sam studentica Diplomskog studija molekularna biologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Prethodno sam završila I. gimnaziju u Splitu, klasični smjer, koju sam pohađala od 2015. do 2019. godine. Po završetku srednjoškolskog obrazovanja upisala sam Prijediplomski studij molekularna biologija, kojeg sam pohađala od 2019. do 2022. godine. Od radnog i volonterskog iskustva izdvojila bih volonterski rad za vrijeme manifestacije Noći muzeja 2020. godine, Laboratorijsku stručnu praksu u *Herbarium croaticum* 2021. godine, kao i volonterski rad u udruzi BIOTEKA 2022. godine. Početkom 2022. godine započela sam Laboratorijsku stručnu praksu na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za kemijsku biologiju gdje sam odradila i eksperimentalni dio ovog diplomskog rada. Sredinom 2023. godine sam se zaposlila kao student u odjelu farmakovigilancije, gdje i dalje radim. U travnju 2024. godine sudjelovala sam na 8. Simpoziju studenata doktorskih studija PMF-a Sveučilišta u Zagrebu. Hrvatski mi je materinji jezik, tečno se služim engleskim jezikom i mogu se služiti talijanskim jezikom. Imam B kategoriju vozačke dozvole.

### **Objavljene publikacije**

Marković, Iva; Lulić, Nina; Frlin, Marta; Jarić, Bernard; Mihaljević, Snježana ROS & JA signaling in response to viroid PSTVd infection in potato // 8th Faculty of Science PhD Student Symposium: Book of Abstracts. Zagreb: Faculty of Science, University of Zagreb, Zagreb, Croatia, 2024. str. 77-77