

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Iva Marković

**ULOGA SALICILNE KISELINE I JASMONSKE KISELINE U
ODGOVORU BILJAKA KRUMPIRA NA INFEKCIJU
VIROIDOM VRETENASTOG GOMOLJA KRUMPIRA PSTVd**

Doktorski rad

Osijek, 2025.

Ocjena rada u tisku

Doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za kemijsku biologiju Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Snježane Mihaljević. Laboratorijska istraživanja financirana su HRZZ projektom IP-2019-04-9915 „Integrativna analiza signalnih puteva fitohormona uključenih u odgovor biljaka krumpira na infekciju viroidom vretenastoga gomolja krumpira (PotatoSignalHub)“ voditeljice dr. sc. Snježane Mihaljević.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

ULOGA SALICILNE KISELINE I JASMONSKE KISELINE U ODGOVORU BILJAKA KRUMPIRA NA INFEKCIJU VIROIDOM VREtenASTOG GOMOLJA KRUMPIRA PSTVd

Iva Marković

Doktorski rad izrađen u: Laboratoriju za kemijsku biologiju Zavoda za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković Zagreb

Mentorica: dr. sc. Snježana Mihaljević, viši znanstveni suradnik

Kratki sažetak doktorskog rada: Patogenost nekodirajućih viroidnih RNA je posljedica kombiniranih učinaka mehanizma za utišavanje RNA i drugih komponenti imunog odgovora biljke domaćina, uključujući fitohormone i antioksidativne odgovore. Cilj istraživanja je proučiti aktivaciju obrambenog odgovora krumpira (*Solanum tuberosum*) na infekciju viroidom vretenastog gomolja krumpira (PSTVd), s naglaskom na promjene u signalnim putevima jasmonske (JA) i salicilne kiseline (SA). Istraživanja su provedena na biljkama divljeg tipa (wt) te transgeničnim JA-deficijentnim (*StOPR3*-RNAi), JA-neosjetljivim (*StCOI1*-RNAi) i *StNahG* linijama koje nemaju sposobnost nakupljanja SA. Provedeni su i egzogeni tretmani s 1 mM metil jasmonskom kiselinom (MeJA) ili 2,6-dikloro izonikotinska kiselina (INA) da bi se dobio odgovor na pitanje jesu li razlike u osjetljivosti transgeničnih biljaka na PSTVd u odnosu na biljke divljeg tipa, povezane s njihovom nesposobnošću da nakupljaju JA, odnosno SA. Uočene su razlike u dinamici akumulacije viroida i nakupljanja vodikovog peroksida (H_2O_2) i kaloze, te u sadržaju endogenih fitohormona u zaraženim biljkama u usporedbi s kontrolnim (mock) biljkama iste linije. Osim toga, analiziran je učinak infekcije na promjene u obrascima ekspresije gena, dobivenim metodama sekvenciranja RNA (RNA Seq) i lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (RTqPCR). Istraživanje pojašnjava ulogu SA i JA tijekom aktivacije staničnog odgovora na infekciju viroidom PSTVd.

Broj stranica: 205

Broj slika: 50

Broj tablica: 5

Broj literaturnih navoda: 272

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: fitohormoni, jasmonska kiselina, krumpir, obrambeni odgovor, salicilna kiselina, viroid

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. Lidija Kalinić, izvanredna profesorica Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjela za biologiju, predsjednik povjerenstva
2. dr. sc. Snježana Kereša, redovita profesorica u trajnom zvanju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, član
3. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić, redovita profesorica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, član
4. dr. sc. Zorana Katanić, docentica Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjela za biologiju, zamjena člana
5. dr. sc. Ivanka Habuš Jerčić, izvanredna profesorica Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, zamjena člana

Doktorski rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruder Bošković Institute
Doctoral Study of Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Natural sciences
Scientific Field: Biology

THE ROLE OF SALICYLIC ACID AND JASMONIC ACID IN THE RESPONSE OF POTATO PLANTS TO INFECTION WITH POTATO SPINDLE TUBER VIROID PSTVd

Iva Marković

Thesis performed at: Laboratory for Chemical Biology, Department for Molecular Biology, Ruder Bošković Institute Zagreb

Supervisor: Ph.D. Snježana Mihaljević, Senior Research Associate

Short abstract: Pathogenicity of non-coding viroid RNAs is primarily a result of the combined effects of the RNA silencing mechanism and other components of the host plant's immune response, including phytohormones and antioxidant defenses. The aim of this study is to investigate the activation of the defense responses in potato (*Solanum tuberosum*) in response to infection with Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd), with a focus on changes in jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) signaling pathways. The research was conducted on wild-type (wt) plants, as well as transgenic JA-deficient (*StOPR3*-RNAi), JA-insensitive (*StCOI1*-RNAi), and *StNahG* lines, which lack the ability to accumulate SA. Additionally, exogenous treatments with 1 mM methyl jasmonate (MeJA) or 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) were conducted to determine whether differences in the sensitivity of transgenic plants to PSTVd compared to wild-type plants are related to their inability to accumulate JA or SA. Differences were observed in the dynamics of viroid accumulation and the accumulation of hydrogen peroxide (H₂O₂) and callose, as well as in the content of endogenous phytohormones in infected plants compared to control (mock) plants of the same line. In addition, the effect of infection on changes in gene expression patterns, obtained by RNA sequencing (RNA Seq) and real-time polymerase chain reaction (RTqPCR) methods, was analyzed. This research will clarify the role of SA and JA during the activation of the cellular response to PSTVd infection.

Number of pages: 205

Number of figures: 50

Number of tables: 5

Number of references: 272

Original in: Croatian

Key words: defense response, jasmonic acid, phytohormones, potato, salicylic acid, viroid

Date of the thesis defense:

Reviewers:

1. Ph. D. Lidija Kalinić, Associate Professor, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Department of Biology, commission president
2. Ph. D. Snježana Kereša, Full Professor, Faculty of Agriculture University of Zagreb, member
3. Ph. D. Dunja Leljak-Levanić, Full Professor, Faculty of Science University of Zagreb, member
4. Ph. D. Zorana Katanić, Assistant Professor, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Department of Biology, substitute
5. Ph. D. Ivanka Habuš Jerčić, Associate Professor Faculty of Agriculture University of Zagreb, substitute

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Zahvale

Ocjena rada
u tijeku

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Najmanji patogeni, najveći izazovi: Viroidi u biljnoj patologiji	3
1.1.1. Bolest vretenastog gomolja krumpira (PSTVd)	6
1.2. Opći pregled obrambenih mehanizama u biljkama	8
1.3. Uloga fitohormona u obrambenim odgovorima biljaka	10
1.3.1. Uloga salicilne kiseline (SA)	13
1.3.1.1. Egzogen primjena SA i njenih analoga u borbi protiv patogena	17
1.3.1.2. Transgenična linija <i>NahG</i>	19
1.3.2. Uloga jasmonske kiseline (JA)	20
1.3.2.1. Egzogen primjena JA i njenih analoga u borbi protiv patogena	24
1.3.2.2. Transgenične linije <i>opr3</i> i <i>coi1</i>	25
1.3.3. Interakcija fitohormona u obrambenom odgovoru	27
1.4. Uloga ROS u obrambenim odgovorima biljaka	30
1.5. CILJ I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	33
2. MATERIJALI I METODE	34
2.1. Pripremanje viroidnog inokuluma	34
2.2. Propagacija biljaka	34
2.3. Mehanička inokulacija	35
2.4. INA ili MeJA tretman	35
2.5. Uzorkovanje biljnog tkiva za analize	36
2.6. Izolacija ukupne RNA	37
2.7. RNASeq analiza	37
2.8. Izrada početnica za praćenje ekspresije gena	38
2.9. One-step RT-PCR za detekciju viroidne RNA	39
2.10. Sintaza cDNA (reverzna transkripcija)	41
2.11. Umnožavanje cDNA i analiza ekspresije gena metodom RTqPCR	41
2.12. Detekcija nakupljanja H ₂ O ₂ u tkivu listova	42
2.13. Lokalizacija i kvantifikacija kaloze	43
2.14. UHPLC-MS/MS analiza hormona stresa	44
2.14.1. Analiza hormona stresa	44
2.14.2. Analiza brasinosteroida (BR)	46
2.15. Statistička obrada podataka	47
3. REZULTATI	48
3.1. Fiziološki i biokemijski odgovori biljaka krumpira na infekciju PSTVd	48
3.1.1. Razvoj simptoma u SA-deficijentnim biljkama	48
3.1.2. Dinamika nakupljanja viroidne RNA u SA-deficijentnim biljkama	51

3.1.3. Razvoj simptoma u JA-deficijentnim i JA-neosjetljivim biljkama	52
3.1.4. Dinamika nakupljanja viroidne RNA u JA-deficijentnim i JA-neosjetljivim biljkama	56
3.2. Učinci egzogenog tretmana hormonima na simptome i rast biljaka inficiranih viroidom	57
3.2.1. Učinci INA tretmana na razvoj simptoma.....	57
3.2.2. Dinamika nakupljanja viroidne RNA u SA-deficijentnim biljkama tretiranih s INA	60
3.2.3. Učinci MeJA tretmana na razvoj simptoma	61
3.2.4. Dinamika nakupljanja viroidne RNA u JA-deficijentnim i JA-neosjetljivim biljkama s MeJA tretmanom	64
3.3. Nakupljanje H ₂ O ₂ i kaloze u listovima biljaka kao odgovor na infekciju viroidom PSTVd.....	65
3.3.1. Nakupljanje H ₂ O ₂ u <i>NahG</i> i wt biljkama inficiranim viroidom PSTVd.....	65
3.3.2. Nakupljanje H ₂ O ₂ u <i>opr3</i> , <i>coi1</i> i wt biljkama inficiranim viroidom PSTVd.....	66
3.3.3. Nakupljanje kaloze u <i>NahG</i> i wt biljkama inficiranim viroidom PSTVd.....	68
3.3.4. Nakupljanje kaloze u <i>opr3</i> , <i>coi1</i> i wt biljkama inficiranim viroidom PSTVd.....	70
3.3.5. Nakupljanje kaloze u <i>NahG</i> i wt biljkama inficiranim viroidom PSTVd nakon tretmana s INA	72
3.3.6. Nakupljanje kaloze u <i>coi1</i> i wt biljkama inficiranim viroidom PSTVd nakon tretmana s MeJA	74
3.4. Analiza transkriptoma i identifikacija diferencijalno eksprimiranih gena	76
3.4.1. Funkcionalna analiza ontologije gena (GO) za <i>NahG</i> i wt linije.....	76
3.4.2. Funkcionalna analiza ontologije gena (GO) za wt, <i>opr3</i> i <i>coi1</i> linije.....	81
3.4.3. KEGG putevi i MapMan analiza biotskog stresa za <i>NahG</i> i wt komparacije	86
3.4.4. KEGG putevi i MapMan analiza biotskog stresa za <i>opr3</i> , <i>coi1</i> i wt komparacije.....	89
3.5. Promjene u sadržaju fitohormona i ekspresiji gena kao odgovor na infekciju viroidom PSTVd	94
3.5.1. Odgovori fitohormona i gena na infekciju viroidom PSTVd kod <i>NahG</i> biljaka.....	94
3.5.2. Odgovori fitohormona i gena na infekciju viroidom PSTVd kod <i>opr3</i> i <i>coi1</i> biljaka.....	99
3.6. Promjene u ekspresiji gena u biljkama tretiranim s INA ili MeJA prije infekcije viroidom PSTVd	106
3.6.1. Promjene u ekspresiji gena povezanih s fitohormonima, nakon INA tretmana	106
3.6.2. Promjene u ekspresiji gena povezanih s fitohormonima, nakon MeJA tretmana	109
4. RASPRAVA	113
4.1. SA-deficijentne i JA-deficijentne biljke su pojačano osjetljive na infekciju viroida PSTVd	114
4.1. Promjene u transkriptomu listova biljaka krumpira nakon infekcije viroidom PSTVd	118
4.2. Regulacija antioksidacijskih odgovora tijekom infekcije viroidom PSTVd	125
4.3.1. Regulacija antioksidacijskih odgovora u wt i SA-deficijentnim biljkama tijekom infekcije viroidom PSTVd.....	125
4.3.2. Regulacija antioksidacijskih odgovora u JA-deficijentnim i JA-neosjetljivim biljkama tijekom infekcije viroidom PSTVd	129
4.4. Infekcija PSTVd utječe na ekspresiju gena za fitohormone i sadržaj fitohormona.....	132
4.4.1. Salicilna kiselina: koncentracija SA i ekspresija gena u listovima SA- i JA-deficijentnih biljaka..	132
4.4.2. Jasmonska kiselina: koncentracija JA i ekspresija gena u listovima SA- i JA-deficijentnih biljaka	135
4.4.3. Auksin, ABA i BR: koncentracija hormona i ekspresija gena u listovima SA- i JA-deficijentnih biljaka.....	137

4.4.4. PSTVd infekcija mijenja sadržaj fitohormona u gomoljima SA- i JA-deficijentnih biljaka	139
4.5. Učinci egzogenog tretmana INA ili MeJA na obrambene odgovore u interakciji krumpira i PSTVd	141
4.5.1. Učinak INA na ekspresiju gena u wt i SA-deficijentnim linijama krumpira u interakciji krumpir-PSTVd.....	141
4.5.2. Učinak MeJA na ekspresiju gena u wt i JA-deficijentnim i JA-neosjetljivim linijama krumpira u interakciji krumpir-PSTVd.....	144
5. ZAKLJUČCI.....	148
6. LITERATURA.....	151
7. SAŽETAK	182
8. SUMMARY	183
9. PRILOZI	184
10. ŽIVOTOPIS	201
11. POPIS PUBLIKACIJA	204
11.1. Popis objavljenih znanstvenih radova	204
11.2. Popis sažetaka u zbornicima skupova	204
11.3. Popis radova u pripremi/postupku recenzije	205

1. UVOD

Aktivacija obrambenih mehanizama biljaka kao odgovor na invaziju patogena značajna je tema istraživanja u biljnoj biologiji, a to se posebno odnosi na ekonomski važne usjeve poput krumpira. Jedna od najvećih opasnosti za uzgoj krumpira je viroid vretenastog gomolja krumpira (engl. *Potato spindle tuber viroid*, PSTVd), viroidni patogen unutar obitelji Pospiviroidae koji, ovisno o vrsti biljke domaćina i soju viroida, uzrokuje brojne simptome, uključujući zastoj u rastu, klorozu i kovrčanje listova, sterilnost cvjetova, deformaciju gomolja u vidu pucanja i deformacije gomolja, vretenastog oblika gomolja, ili smanjene klijavosti, koja u konačnici dovodi do smanjenog prinosa (Kitabayashi i sur., 2020; Sun & Matsushita, 2024; Więsyk i sur., 2018; Zheng i sur., 2017). Razumijevanje molekularnih odgovora biljaka krumpira na infekciju PSTVd bitno je za razvoj učinkovitih strategija upravljanja zaštite biljaka od patogena. Među različitim signalnim putevima koji se aktiviraju tijekom interakcija biljke i patogena, salicilna kiselina (SA) i jasmonska kiselina (JA) ističu se kao bitni fitohormoni koji moduliraju obrambene reakcije biljaka protiv biotskih stresora (Baebler i sur., 2011; Nath i sur., 2020).

SA ima važnu ulogu u mehanizmu sistemski stečene rezistencije (engl. *systemic acquired resistance*, SAR), koji biljkama omogućuje snažnu obranu od naknadnih napada patogena nakon početne infekcije (Faried i sur., 2017). Akumulacija SA kao odgovor na infekciju PSTVd u nekim biljnim vrstama pokreće kaskadu transkripcijskih promjena koje pojačavaju ekspresiju proteina povezanih s patogeneзом (PR), koji su bitni za borbu protiv virusnih patogena (Faried i sur., 2017; Zheng i sur., 2017). Nasuprot tome, JA prvenstveno je uključena u obranu od biljojednih insekata i nekrotrofnih patogena, a signalizacija posredovana JA često je u interakciji sa SA, što ukazuje na kompleksnu umreženost signalnih puteva hormona (engl. *crosstalk*) koja može utjecati na ishod interakcija biljaka i patogena (Baebler i sur., 2011).

Uloga SA i JA u obrani biljaka posebno je važna budući da viroid može utjecati na te hormonske puteve kako bi osigurao vlastiti opstanak i razmnožavanje unutar domaćina (Bao i sur., 2019; Więsyk i sur., 2018; Y. Zheng i sur., 2017). Na primjer, ekspresija gena uključenih u biosintezu i signaling SA se mijenja nakon infekcije viroidima, kao što je viroid hmelja (engl. *Hop stunt viroid*, HSVd), što ukazuje da viroid može iskoristiti te puteve za smanjenje obrane biljke domaćina (Joubert i sur., 2022; Xia i sur., 2017). Osim toga, interakcija između signalizacije SA i JA može utjecati na ozbiljnost simptoma koje pokazuju biljke krumpira

inficirane sa viroidima i virusima što bi moglo utjecati na prinos ili kvalitetu usjeva (Baebler i sur., 2011; Kochetov i sur., 2021).

Dokazano je da egzogena salicilne kiseline povećava otpornost biljaka rajčice na različite stresore, uključujući one uzrokovane infekcijom egzokortis-viroid agruma (engl. *Citrus Exocortis Viroid*, CEVd) ili virus pjegavosti rajčice (engl. *Tomato Spotted Wilt Virus*, TSWV) (López-Gresa i sur., 2016). Slično tome, tretman SA tijekom uzgoja krumpira poboljšava nicanja biljaka na polju, gustoću biljaka po jedinici površine, i cvjetanje (Contreras-Liza & Vargas-Luna, 2022). To sugerira da bi SA i JA mogli imati ulogu u povećanju otpornosti biljaka krumpira na viroidne infekcije. Razumijevanje točnih molekularnih mehanizama kojima SA i JA posreduju u odgovoru biljaka krumpira na PSTVd je važno za razvoj ciljanih pristupa koji bi mogli smanjiti osjetljivost krumpira na PSTVd kao što je dokazano u slučaju povećane otpornosti krumpira na virus PVY (Baebler i sur., 2011).

Kako bismo istražili mehanizam kojim JA i SA moduliraju regulaciju razvoja simptoma u PSTVd inficiranim biljkama krumpira, koristili smo divlju sortu krumpira cv. Désirée i transgenične linije cv. Désirée koje su deficitarne u biosintezi JA i signaliziranju JA (*StOPR3*-RNAi i *StCOI1*-RNAi) te transgeničnu SA-deficijentnu *NahG* liniju (Halim i sur., 2009). Kombiniranjem analize sekvenciranja RNA (RNASeq), analize hormona i fizioloških analiza, istraženo je da li JA i SA aktiviraju ili potiskuju obrambene odgovore i kako ti fitohormoni tj. njihov nedostatak, mijenjanju ove odgovore u sistemski zaraženim listovima i gomoljima. Analiza transkriptoma provedena na uzorcima listova sakupljenim 5 tjedana nakon inokulacije (wpi), je otkrila značajne promjene u ekspresiji gena povezanih sa stresom i obrambenim odgovorima, fotosintezom, transportom iona i signalizacijom fitohormona. Dinamika odgovora krumpira na PSTVd dalje je praćena u vremenskom intervalu od 4 do 7 wpi, analizom ekspresije gena pomoću RTqPCR i promjenama u koncentracijama endogenih fitohormona pomoću UHPLC-MS/MS.

Kontinuirano istraživanje u ovom području je bitno za razjašnjavanje temeljnih mehanizama patogeneze viroida i za razvoj učinkovitih strategija za povećanje otpornosti usjeva krumpira na takve biotske prijetnje.

1.1. Najmanji patogeni, najveći izazovi: Viroidi u biljnoj patologiji

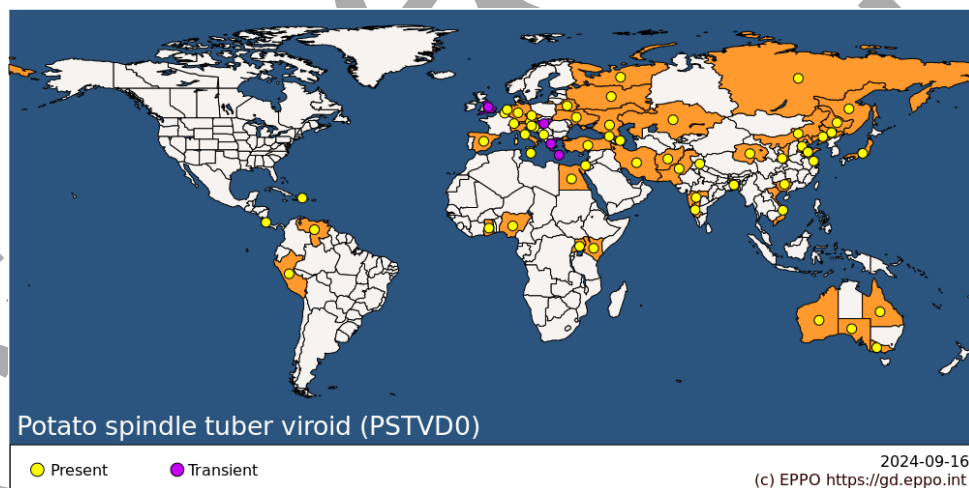
Viroidi su najmanji poznati uzročnici infektivnih bolesti u biljkama. Karakterizirani su genomom koji se sastoji od jednolančane kružne RNA dužine 246-434 nukleotida, vrlo strukturirane, nezaštićene i bez sposobnosti kodiranja proteina. Viroidi se razlikuju od virusa zbog nedostatka proteinskog omotača, a njihova replikacija i patogenost ovise isključivo o staničnim procesima domaćina. Na primjer, viroidi koriste specifične RNA polimeraze, posebno RNA polimerazu II, za prepisivanje svojih RNA predložaka, što se razlikuje od mehanizama koje koriste složeniji virusi (Navarro i sur., 2021a; Owens & Hammond, 2009; Zhang i sur., 2024). Do danas je opisano 30-ak vrsta viroida koji su prema biološkim, strukturnim i biokemijskim svojstvima svrstani u dvije obitelji, Pospiviroidae i Avsunviroidae.

Replikacija viroida odvija se putem asimetričnog kotrljajućeg kruga (engl. *asymmetric rolling-circle mechanism*), koji uključuje nekoliko koraka: sintezu RNA lanaca, cijepanje u molekule jednake duljine i naknadnu cirkularizaciju (Flores i sur., 2009; Srivastava & Prasad, 2020; Wang, 2021). U obitelji Pospiviroidae replikacija se događa u jezgri putem mehanizma asimetričnog kotrljajućeg kruga, dok se članovi obitelji Avsunviroidae repliciraju unutar kloroplasta mehanizmom simetričnog kotrljajućeg kruga (engl. *symmetric rolling-circle mechanism*) (Flores i sur., 2009; Srivastava & Prasad, 2020; Sun & Matsushita, 2024; Wang, 2021).

Da bi dovršili svoj infektivni ciklus, viroidi se moraju kretati kroz biljku kako bi došli do udaljenih organa. Specifične petlje i izbočine u sekundarnoj strukturi viroidne RNA stabilizirane nizovima nekanonskih parova baza, od kojih neki sudjeluju u replikaciji, a drugi u kretanju viroida (Ortolá & Daròs, 2023; Zhong i sur., 2008). Ove specifične strukturne značajke pomažu viroidima da prolaze kroz plazmodezmije, omogućujući prijelaz između stanica i olakšavajući širenje viroida na veće udaljenosti kroz vaskularni sustav biljke (Owens & Verhoeven, 2017; Zhang i sur., 2024).

Nadalje, viroidi pokazuju veliku sposobnost evolucije zbog toga što nemaju proteinski omotač i njihov genom je male veličine. Takva brza evolucija može omogućiti pojavu novih sojeva viroida koji mogu dovesti do izmjena u patogenosti ili preferenciji domaćina (Elena i sur., 2009).

Mnoge bolesti uzrokovane viroidima predstavljaju nuspojavu modernih poljoprivrednih praksi. Promjene u uzgojnim metodama i intenzifikacija poljoprivrednih aktivnosti dovele su do povećanja učestalosti i širenja viroidnih infekcija, što uključuje pojavu novih patogena u različitim regijama svijeta (Zhang i sur., 2013) (Slika 1.). Mnogi danas poznati viroidi imaju ekonomski značajni zbog šteta koje izazivaju na uzgojnim biljkama, kao što su primjerice krumpir, agrumi, rajčice, kokosove palme, avokado i hmelj (Kovalskaya & Hammond, 2014). Makroskopski simptomi infekcije viroidima sličie onima povezanim s bolestima koje uzrokuju mnogi biljni virusi i mogu utjecati na cijelu biljku ili specifične organe poput listova, cvjetova, plodova, korijena i skladišnih organa (Flores i sur., 2021). Pojava simptoma umnogome ovisi o nukleotidnom slijedu viroidnog genoma i molekula RNA biljke domaćina, okolišnim čimbenicima te fazi razvoja biljke u trenutku infekcije, pa je pojavnost simptoma u rasponu od ozbiljnih simptoma do iznimno blagih i asimptomatskih infekcija.



Slika 1. Geografska rasprostranjenost PSTVd u svijetu. Žuti kružići označavaju područja u kojima je PSTVd prisutan, dok ljubičasti kružići označavaju područja u kojima je eliminiran. Preuzeto sa <https://gd.eppo.int/taxon/PSTVD0/datasheet>.

Istraživanja, kako na polju tako i u stakleniku, pokazala su da se PSTVd lako prenosi mehanički, putem kontakta s kontaminiranim alatima za obrezivanje i poljoprivrednim alatima, te putem ljudskih ruku i kontakta između biljaka (Owens & Hammond, 2009). PSTVd se također može širiti vegetativno cijepanjem, reznicama, i razmnožavanjem gomoljima (Gos, 1926). Vegetativno razmnožavanje, osobito u ukrasnim biljkama kao što su *Brugmansia spp.* i

Solanum laxum, predstavlja značajan rizik jer te biljke često ne pokazuju simptome, što povećava mogućnost širenja infekcije (Verhoeven i sur., 2010). Iako se obično ne smatra da se prenosi kukcima, zelena breskvina lisna uš (*Myzus persicae*) može učinkovito prenositi PSTVd ako su biljke krumpira ko-inficirane virusom uvijenosti listova krumpira (engl. *Potato leafroll virus*, PLRV) (Querci i sur., 1997). Prijenos PSTVd posredstvom pčela (*Apis mellifera*), bumbara (*Bombus terrestris*), zapadnoameričkih cvjetnih tripsa (*Frankliniella occidentalis*) ili tabača (*Thrips tabaci*) nije dokazan (Nielsen i sur., 2012).

Brzina i intenzitet pojave simptoma bolesti uzrokovane viroidima značajno ovise o fiziološkim karakteristikama stanice biljke domaćina. Iako se puno zna o molekularnim karakteristikama viroida i njihovom mehanizmu replikacije, još uvijek ima mnogo nepoznanica o komponentama staničnog odgovora na prisustvo viroidne RNA. U dobro proučenim sortama krumpira uočena je otpornost na različite patogene, no do sada nije otkrivena prirodna rezistencija na PSTVd (Naoi i sur., 2022).

Najefikasniji načini kontrole bolesti uzrokovanih viroidima uključuju preventivne mjere kako bi se spriječilo unošenje inficiranog biljnog materijala na polje ili u staklenik. To obuhvaća primjenu stroge higijene, iskorjenjivanje inficiranih biljaka, te nadzor usjeva radi otkrivanja prisutnosti neuobičajenih simptoma. Ključne metode detekcije PSTVd uključuju RT-PCR testove, koji su visoko osjetljivi i specifični, te tehnologije poput sekvenciranja sljedeće generacije (engl. *next-generation sequencing*), koje pružaju dodatne mogućnosti za otkrivanje viroidnih infekcija (Boonham i sur., 2004; Lenarčič i sur., 2013; Visser i sur., 2016; Zhang i sur., 2013).

Osim korištenja zdravog biljnog materijala, različite se kemijske tvari (1-5% natrijevog hipoklorita, 6% vodikovog peroksida, 2% natrijevog hidroksida s 2% formaldehida) koriste za dezinfekciju površina poljoprivrednih alata za rezanje poput noževa, alata za obrezivanje, cijepljenje i drugih uređaja kako bi se eliminiralo širenje viroida putem kontaminiranog alata (Singh i sur., 1989). Biotehnološke metode, uključujući razvoj transgeničnih biljaka otpornijih na viroidne infekcije, još su u fazi istraživanja i nisu komercijalno dostupne za široku primjenu u poljoprivredi (Kovalskaya & Hammond, 2014; Mehetre i sur., 2021).

1.1.1. Bolest vretenastog gomolja krumpira (PSTVd)

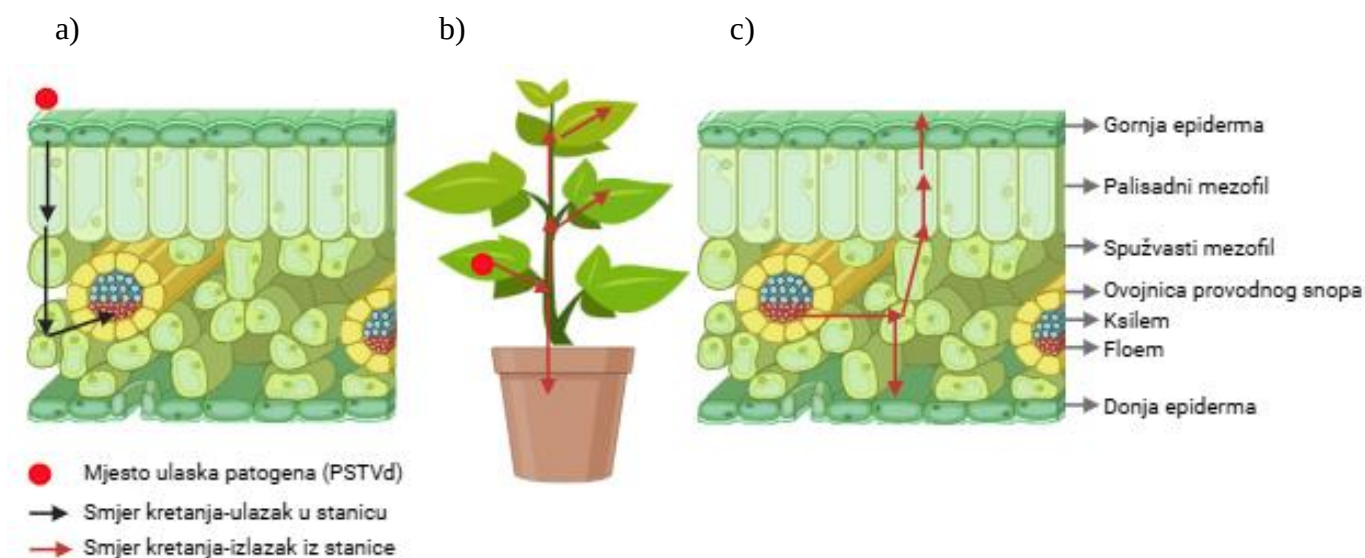
S obzirom na njihovu široku rasprostranjenost diljem svijeta, viroidi imaju sposobnost izazivanja ozbiljnih bolesti u mnogim poljoprivrednim kulturama. Jedna od najčešće uzgajanih sorti konzumnog krumpira u Europi, cv. Désirée, često se koristi kao modelni organizam u istraživanju interakcija između biljaka i patogena (Baebler i sur., 2011). Invazivniji sojevi viroida PSTVd mogu znatno smanjiti prinos usjeva krumpira, često do 40%, prije svega uslijed redukcije veličine i broja gomolja (Kochetov i sur., 2021).

Viroid vretenastog gomolja krumpira (PSTVd) prvi je identificiran i opisan viroid iz obitelji Pospiviroidae. Prvi put je otkriven u sorti krumpira Irish Cobbler (*Solanum tuberosum*) u Sjevernoj Americi, a opisni simptomi bolesti bili su zaostajanje u rastu biljaka i izduženim gomoljima, zbog čega je bolest nazvana „vretenast gomolj“ (engl. *spindle tuber*) (Schultz & Folsom, 1923).

Genom PSTVd sastoji se od 359 nukleotida i formira termodinamički povoljnu štapčastu sekundarnu strukturu u svom prirodnom *in vitro* stanju (Gross H.J., 1978). Ovaj strukturni model oblika štapića potvrđen je mikroskopskim i biofizičkim istraživanjima (Riesner i sur., 1979), kemijskim i enzimatskim kartiranjem (Gast i sur., 1996) i istraživanjima nuklearne magnetske rezonance (Dingley i sur., 2003).

Za razliku od virusa, koji kodiraju vlastite proteine, viroidi moraju izravno ulaziti u interakciju s transkripcijskim faktorima domaćina kako bi obavili sve funkcije potrebne za infekciju, uključujući kretanje (Owens & Verhoeven, 2017; Zhu i sur., 2002). Sistemska infekcija PSTVd uključuje nekoliko bitnih procesa: (1) unos viroida u jezgru, gdje započinje replikacija; (2) izvoz progenitorske RNA iz jezgre; (3) kretanje između stanica; i (4) kretanje prema udaljenim organima, poput gornjih dijelova biljke i korijena, kako bi se uspostavila nova mjesta infekcije (Zhang i sur., 2024) (Slika 2.).

PSTVd koristi floem kao glavni medij za sistemsko kretanje kroz biljku, ulazak i izlazak viroidne RNA iz floema strogo su regulirani interakcijama između viroida i čimbenika biljke domaćina (Owens & Verhoeven, 2017; Zhang i sur., 2024). Ove specifične interakcije između genomske viroidne RNA i faktora domaćina (HF, protein ili RNA), bilo na mjestu replikacije viroida i njegovog nakupljanja u organelu ili u citoplazmi tijekom kretanja viroida, omogućuju preciznu kontrolu širenja viroida unutar biljke, čime se optimizira infekcija bez prevelikih oštećenja domaćina koja bi mogla ugroziti širenje patogena (Zhu i sur., 2002).



Slika 2. Putevi za sistemsko širenje viroida PSTVd u inficiranoj biljci. (a) Prerez inokuliranog lista koji prikazuje prijenos od prvobitno inficirane epidermalne stanice, floemom do udaljenih organa. (b) Shematski prikaz kretanja viroida iz inokuliranog lista do gornjih listova i korijena (c) U sistemski inficiranim listovima viroid izlazi iz floema i širi se u okolne nevaskularne stanice. Slika je izrađena pomoću BioRender.com.

PSTVd može inficirati širok spektar biljnih vrsta, no većina njih ne pokazuje simptome. Asimptomatske PSTVd inficirane biljke često su izvor prijenosa viroida između komercijalno važnih biljaka (Flores i sur., 2021). Vidljivi simptomi uglavnom se uočavaju na članovima obitelji Solanaceae, a intenzitet simptoma varira ovisno o specifičnom soju viroida (Singh, 1973). PSTVd dovodi do smanjenje broja gomolja, kao i njihovu deformaciju koja se očituje u karakterističnoj uvijenosti, po čemu je bolest i dobila ime. Osim toga, uočava se stanjivanje stabljike i deformacija listova, a dolazi i do promjene u boji i pojave nekroze provodnog tkiva, što ukazuje na značajnu fiziološku promjenu izazvanu viroidnom infekcijom (Afanasenkov i sur., 2022).

Viroidne infekcije uzrokuju široke promjene u ekspresiji gena domaćina koji su uključeni u biljne obrambene mehanizme, signalizaciju hormona i staničnu stijenku. Biljke inficirane viroidom PSTVd pokazuju akumulaciju različitih fitohormona kao što su JA, indol-3-octena kiselina (IAA), ali ne dolazi do značajnog porasta SA ili apscisinske kiseline (ABA) (Milanović i sur., 2019a). Osim toga, PSTVd aktivira akumulaciju reaktivnih kisikovih čestica (ROS) te pojačava aktivnost antioksidanasa (Kochetov i sur., 2021). Primjerice, viroidne infekcije uzrokuju promjene u genima povezanim s metabolizmom fitohormona i indukcijom

obrambenih odgovora, kao što su geni za sintezu lignina i formiranje staničnih stijenki (Kitabayashi i sur., 2020; Kochetov i sur., 2021). PSTVd također aktivira nakupljanje ROS, što uzrokuje oksidativni stres. Antioksidativni mehanizmi biljke aktiviraju se kao odgovor na oksidativni stres izazvan infekcijom (Sano, 2021). Viroidne infekcije uzrokuju promjene u procesima poput sinteze staničnih stijenki, metabolizma sekundarnih spojeva i fotosinteze, dok se povećava ekspresija gena uključenih u sintezu i modifikaciju proteina (Joubert i sur., 2022).

1.2. Opći pregled obrambenih mehanizama u biljkama

Biljke su u svom prirodnom okolišu neprestano izložene raznim stresnim čimbenicima, kako abiotiskim tako i biotskim, i stoga su razvile mnogo obrambenih mehanizama kako bi održale svoju vitalnost (Mickelbart i sur., 2015). Ti se mehanizmi mogu općenito kategorizirati u fizičke barijere, kemijsku obranu i signalne puteve koji koordiniraju odgovore na prijetnje. U prirodnim uvjetima, vrijeme i intenzitet stresora mogu varirati, stoga je potrebno da biljke prilagode obrambene odgovore kako bi se minimalizirali štetni učinci na vitalnost biljaka (Kissoudis i sur., 2016). Nakon izlaganja abiotskom i/ili biotskom stresu, aktiviraju se specifični ionski kanali i receptor kinaze koje dalje aktiviraju druge signalne puteve (kaskade), sintezu i nakupljanje ROS, te se akumuliraju i fitohormone, nakon čega dolazi do reprogramiranja genetskih mehanizama kako bi se postigle adekvatne obrambene reakcije uz koje bi se minimalizirala biološka oštećenja uzrokovana stresom (Ben Rejeb i sur., 2014).

Obrambeni mehanizmi biljaka nisu statični, već dinamičan način koevolucije s patogenima i biljojedima. Biljke razvijaju nove imunološke reakcije kako patogeni dolaze do novih strategija za izbjegavanje obrane biljaka. Ovo stalno nadmetanje dovodi do pojave različitih obrambenih strategija kod različitih biljnih vrsta, te na taj način pridonosi njihovom preživljavanju u različitim ekološkim nišama (Chisholm i sur., 2006).

Fizičke barijere su prva linija obrane biljaka. Strukturne komponente biljnih tkiva, kao što su kutikula, stanične stijenke i trihomi, služe za odvrćanje biljojeda i sprječavanje ulaska patogena. Kutikula, voštani sloj koji prekriva epidermu, ne samo da smanjuje gubitak vode, već također djeluje kao prepreka invaziji mikroba. Stanične stijenke, sastavljene od celuloze i drugih polisaharida, osiguravaju krutost i mogu se ojačati kao odgovor na napad patogena taloženjem kaloze i lignina, koji jačaju stijenkiju i inhibiraju prodor patogena (Bigeard i sur.,

2015). Uz ove reakcije, metabolizam fenilpropanoida rezultira stvaranjem lignina i drugih fenolnih spojeva koji ojačavaju biljnu staničnu stijenku protiv potencijalnih invazija patogena. Povećanje sadržaja lignina poboljšava strukturni integritet biljnih tkiva, i tako ih čini otpornijima na biotski stres, uključujući viroidne infekcije. Istraživanja pokazuju da PSTVd inficiran korijen rajčice ima više koncentracije lignina od neinficiranih kontrola, osobito kada je inficiran virulentnijim sojevima viroida (Góra-Sochacka i sur., 2019). Ova pojačana lignifikacija djeluje kao prepreka ne samo širenju patogena, nego pridonosi i cjelokupnoj obrambenoj strategiji biljke.

Biljke su razvile sofisticirane imunološke sustave koji mogu prepoznati prodor patogena i odgovoriti na molekularne obrasce povezane s patogenima (engl. *pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) putem imuniteta izazvanog obrascima (engl. *PAMP-triggered immunity*, PTI). Ovaj početni imunološki odgovor posredovan je receptorima za prepoznavanje uzorka (PRR) koji detektiraju PAMP, što dovodi do aktivacije nizvodnih signalnih kaskada i ekspresije gena povezanih s obranom (Krasileva i sur., 2010). Međutim, neki su patogeni razvili efektorske proteine koji mogu potisnuti PTI. Zauzvrat, biljke su razvile mehanizme koji prepoznaju patogene efektore i potiču aktivaciju efektorski aktiviranog imuniteta (engl. *effector-triggered immunity*, ETI) kao sekundarnu liniju obrane. ETI je često jači i specifičniji te može dovesti do lokalizirane stanične smrti, ubijajući patogene i sprječavajući njegovo daljnje širenje (Riedlmeier i sur., 2017).

Inficirana biljka posjeduje neke značajke urođene imunosti indukcijom niza obrambenih gena. Na primjer, otkriveno je da se ekspresija gena povezanih sa stvaranjem i nakupljanjem ROS, proteina povezanih s patogenezom (PR) i proteinskim kinazama ovisnim o kalciju povećava u biljkama rajčice (*Solanum lycopersicum*) nakon infekcije PSTVd (Kitabayashi i sur., 2020). Aktivacija urođenog imuniteta pomaže biljci da prepozna i odgovori na prisutnost viroida, što dovodi do uspostavljanja obrambenog odgovora koji može ublažiti ozbiljnost simptoma povezanih s infekcijom. Ipak, prekomjerna aktivacija ovih obrambenih mehanizama može uzrokovati određene štetne učinke, poput nekroze, koja dovodi do povećanja ranjivosti i narušavanja zdravlja biljaka (Kitabayashi i sur., 2020).

Osim toga, važan dio transkripcijskih promjena otkrivenih u različitim interakcijama biljka-viroid odnosi se na gene uključene u biosintezu i signalizaciju fitohormona. Signalni putevi koji posreduju obrambenim odgovorima biljaka su složeni i uključuju različite fitohormone,

među kojima SA i JA imaju važnu ulogu u aktivaciji obrambenih mehanizama (Joubert i sur., 2022; Owens i sur., 2012b). Stoga se pretpostavlja da simptomi bolesti mogu biti rezultat viroidom uzrokovanih poremećaja u homeostazi fitohormona u biljci domaćinu. Štoviše, promjene u koncentracijama endogenih fitohormona ili osjetljivost uzrokovana tijekom infekcije patogenom posreduju cijeli niz odgovora biljaka koji mogu odrediti hoće li biljke postati osjetljivije ili otpornije na uljeza (Naoi i sur., 2022).

Sistemska priroda infekcije PSTVd također zahtijeva koordinirani odgovor u cijeloj biljci. Nakon lokalne infekcije, signali se prenose kroz cijelu biljku, što dovodi do sistemske stečene otpornosti (SAR), koja priprema neinficirana tkiva da učinkovitije odgovore na naknadne napade patogena. Ovo sustavno signaliziranje uključuje kretanje signalnih molekula, poput SA, koja je važna za uspostavljanje SAR (Kitabayashi i sur., 2020). Sposobnost biljke da uspostavi sustavni odgovor je važna za njezinu ukupnu otpornost na viroidne infekcije.

1.3. Uloga fitohormona u obrambenim odgovorima biljaka

Fitohormoni imaju središnju ulogu u modulaciji obrambenog odgovora biljke domaćina na patogene (Pieterse i sur., 2012). Fitohormoni pomažu regulirati većinu procesa odgovornih za rast i razvoj organizma, kao i diferencijaciju stanice, tkiva i organa, pomoću kojih biljka reagira na biotski i abiotski stres. Oni pomažu biljkama da postignu fleksibilan odgovor na promjene u okolišu kroz visoko regulirane 'mreže' kemijskih signalnih puteva i imaju važnu ulogu u biljnim obrambenim mehanizmima protiv patogena. Hormoni također služe kao bitni elementi međustanične komunikacije koji pomažu u skladnom djelovanju između različitih dijelova biljke za izbjegavanje stresnih čimbenika (Alazem & Lin, 2015).

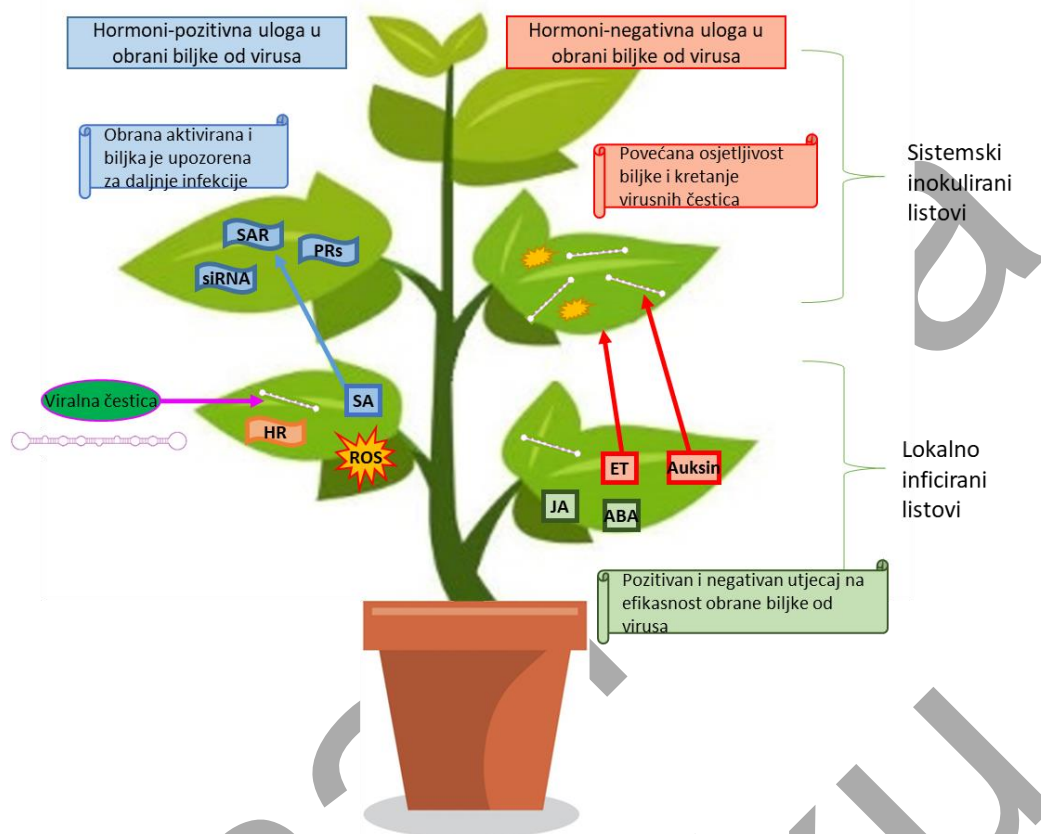
Glavni hormoni uključeni u odgovor biljaka na patogene su SA, JA, etilen (ET) i apscizinska kiselina (ABA). SA je prvenstveno povezana s odgovorima na biotrofne patogene, dok JA i ET reguliraju odgovore na nekrotrofne patogene, a ABA ima složeniju ulogu, često djelujući kao modulator koji inhibira ili pojačava obrambene odgovore ovisno o vrsti patogena i uvjetima okoliša (Alazem & Lin, 2015). Auksin (AUX), brasinosteroidi (BR) i citokinini (CK), hormoni koji su prvenstveno poznati po svojoj ulozi u regulaciji rasta i razvoja biljaka, također su prepoznati kao važni regulatori u biljnim interakcijama s patogenima, posebno tijekom stresnih uvjeta (Alazem & Lin, 2015).

Uloga fitohormona u obrani biljaka od patogena nije ograničena na pojedinačne hormone, već je rezultat složenih mreža međusobnih interakcija koje omogućuju biljci da prilagodi svoje odgovore na specifične izazove iz okoliša. Istraživanje takvih interakcija je bitno za razumijevanje načina na koji biljke moduliraju svoje obrambene mehanizme, osobito kod infekcija viroidima, gdje su promjene u hormonalnoj signalizaciji od posebne važnosti (Alazem & Lin, 2015; Navarro i sur., 2021a) (Slika 3.).

Jedna od važnih značajki fitohormona je njihova međusobna interakcija, uglavnom putem modifikacije ekspresije gena i signalnih puteva hormona, kroz proces poznat kao hormonski *crosstalk* koji biljci omogućuje da prilagodi svoj obrambeni odgovor na uzročnika infekcije, bilo da je riječ o virusu, bakteriji, gljivici ili viroidu. *Crosstalk* fitohormona omogućava biljci da precizno regulira svoju imunološku reakciju na napad patogena i da koristi svoje resurse na ekonomičan način (Huot i sur., 2014).

Tijekom obrambenog odgovora signalni putevi SA i JA međusobno djeluju (sinergistički ili antagonistički), ali i u interakciji sa signalnim putevima drugih fitohormona (Alazem & Lin, 2015). Promjene u sadržaju endogenih fitohormona tijekom infekcije patogenima utječu na niz adaptivnih odgovora u biljkama, što konačno može odrediti osjetljivost ili otpornost biljaka na patogene organizme.

Nakupljanje SA prvenstveno je povezano sa SAR, dugotrajnim obrambenim mehanizmom koji se aktivira nakon lokalne infekcije. SAR karakterizira pojačana ekspresija gena povezanih s patogenezom (PR) i proizvodnjom antimikrobnih spojeva (Carella i sur., 2015). Suprotno tome, sinteza i nakupljanje JA je često povezana s odgovorima na napad biljojeda i ranjavanje biljnog tkiva što aktivira ekspresiju gena uključenih u sintezu obrambenih proteina i sekundarnih metabolita (Vos i sur., 2013). Međudjelovanje ovih signalnih puteva važno je za učinkovit obrambeni odgovor. Na primjer, dok je SA-posredovana signalizacija esencijalna za otpornost na biotrofne patogene, JA-posredovana signalizacija je učinkovitija protiv nekrotrofnih patogena i biljojeda. Ovakvo međudjelovanje omogućuje biljkama da prilagode svoje obrambene strategije na temelju prirode prijetnje s kojom se suočavaju (Vos i sur., 2013).



Slika 3. Opće djelovanje hormona na obranu biljaka od virusa. Prepoznavanje virusnih efektor pokreće obrambene puteve, uključujući nakupljanje SA i male interferirajuće RNA (siRNA), i ROS te indukciju HR (lokalno) i SAR (sistemske). Hormoni u crvenim kvadratima prvenstveno negativno utječu na obranu biljaka od virusa. Hormoni u tamnozelenim kvadratima pozitivno utječu na obranu biljaka od virusa. Jasmonska kiselina (JA) i abscizinska kiselina (ABA) imaju kompleksne učinke na obranu od virusa. JA podržava obranu biljaka u ranim fazama infekcije, ali ako se inducira ili primijeni u kasnijim fazama, smanjuje otpornost biljke. ABA ima višestruku ulogu u obrani biljaka; s jedne strane, povećava taloženje kalusa na plazmodezmijima i ograničava kretanje virusa od stanice do stanice, dok s druge strane antagonizira SA put i smanjuje otpornost na lokalnim mjestima infekcije potiskujući indukciju HR, smanjujući proizvodnju ROS i SA, te slabljenje distalnih SAR i siRNA sustava (adaptirano prema Alazem & Lin, 2015).

Bitno je napomenuti da djelovanje hormona nije odvojeno, već uvelike međusobno povezano tako da njihova ravnoteža i međusobna regulacija određuju karakter odgovora biljaka tijekom izloženosti stresu. Pri tome, JA i SA mogu djelovati antagonistički tijekom virusne infekcije, gdje povećanje jednog hormona potiskuje aktivnost drugog, što se jasno vidi kod interakcija biljaka i viroida. U biljkama poput krumpira (*Solanum tuberosum*), viroidna infekcija može izazvati poremećaj u hormonskoj ravnoteži, što dovodi do simultane indukcije antagonističkih hormona, kao što su JA i SA, što rezultira promjenama u obrambenim mehanizmima biljke (Milanović i sur., 2019a; Więsyk i sur., 2018).

Osim međusobne interakcije, fitohormoni su uključeni i u složene regulacijske mreže koje uključuju ROS, mitogen-aktivirane proteinske kinaze (MAPK) i druge signalne puteve. ROS, posebno vodikov peroksid (H_2O_2), djeluju kao sekundarni signalni posrednici koji amplificiraju hormonske signale i potiču brze stanične odgovore na infekciju patogenima (Lukan & Coll, 2022). SA često djeluje kao glavni regulator količine ROS u stanicama, balansirajući između aktivacije obrambenih reakcija i sprječavanja oksidativnih oštećenja (Alazem & Lin, 2015).

1.3.1. Uloga salicilne kiseline (SA)

SA je jedan od bitnih fitohormona koji ima vitalnu ulogu u regulaciji obrambenih mehanizama biljaka protiv različitih patogena. Ovaj fenolni spoj sintetiziraju biljke kao odgovor na biotski stres, prvenstveno na infekcije biotrofnim patogenima, ali također ima važnu ulogu u abiotskom stresu. SA sudjeluje u signalizaciji koja regulira lokalne i sistemske odgovore biljaka, uključujući imunitet izazvan PAMP (engl. *PAMP-triggered immunity*, PTI) i imunitet izazvan efektorom (engl. *effector-triggered immunity*, ETI), dva bitna oblika imunoloških reakcija koje biljke razvijaju kao odgovor na prisutnost patogena (Peng i sur., 2021).

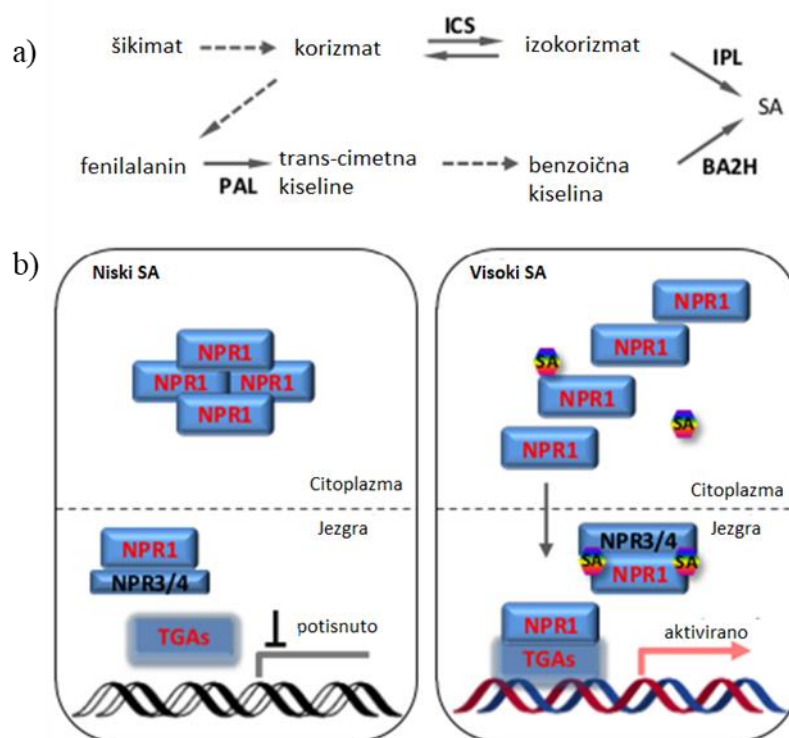
Povijesno gledano, SA je prvi put povezana s obrambenim odgovorima biljaka na viruse tijekom proučavanja interakcije između virusa mozaika duhana (engl. *Tobacco mosaic virus*, TMV) i biljaka duhana. Pokazano je da SA inhibira replikaciju TMV i sprječava njegovo širenje na susjedne stanice, čime potiče razvoj sistemske otpornosti. Transgenične linije duhana koje ne akumuliraju endogenu SA zbog izražavanja bakterijskog gena za salicilat hidrosilazu (*NahG*) pokazuju pojačanu osjetljivost na TMV infekciju i nemogućnost uspostavljanja sistemske otpornosti, što dodatno ukazuje na ulogu SA u obrani protiv virusa (Gaffney i sur., 1993).

Biljke koriste dva neovisna puta za proizvodnju SA: put izokorizmat sintaze (engl. *isochorismate synthase*, ICS) i put fenilalanin amonij-liaze (engl. *phenylalanine ammonia-lyase*, PAL). Put fenilalanin amonij-liaze je jedan od puteva za biosintezu SA, pri čemu fenilalanin služi kao polazišna točka za sintezu trans-cimetne kiseline (t-CA), koja se potom modificira u SA. S druge strane, put izokorizmat sintaze omogućava sintezu SA iz izokorizmata, a posebno je važan u biljkama poput *Arabidopsis thaliana* i duhana (Ding & Ding, 2020). Ova dva puta omogućuju biljkama prilagodljivu sintezu SA ovisno o stresnim

uvjetima, što rezultira akumulacijom SA na mjestu infekcije i daljnjim širenjem signala kroz biljno tkivo (Slika 4.a.).

Studije su pokazale da je *ICS1* lokalno i sustavno inducirana tijekom infekcije patogenom te je izolirano nekoliko transkripcijskih faktora koji reguliraju ekspresiju *ICS1*, uključujući *SARD1* i *CBPg60*, koji se vežu za promotor gena *ICS1* i reguliraju njegovu indukciju. Osim toga, pokazalo se da se *WRKY28*, iz obitelji *WRKY* faktora transkripcije, veže na dva W-box motiva u promotoru *ICS1* i aktivira ekspresiju gena, sugerirajući da bi *WRKY28* mogao biti pozitivan regulator ekspresije *ICS1*. Indukcija *ICS1* dovodi do nakupljanja SA, a SA aktivira *NPR1* (engl. *nonexpresser of pathogenesis-related genes 1*), glavni regulator nizvodne regulacije SA-signalnog puta. Osim aktiviranja gena koji su aktivirani sa SA, *NPR1* također djeluje kao negativni regulator ekspresije gena *ICS1*, čime se zatvara negativna povratna sprega (Li i sur., 2019a).

Transkripcijski koaktivator *NPR1* je važna komponenta u obrambenom signalnom putu SA. *NPR1* regulira ekspresiju nekoliko obrambenih gena, kao što su *PR* geni, a funkcionalnost ovog gena potrebna je za aktivaciju obrambenog mehanizma posredovanog SA. *NPR1* također ima bitnu ulogu u koregulaciji SA s JA i ET i drugim hormonima, a time i međukomunikaciji među odgovorima biljke na različite podražaje patogena (Spoel & Dong, 2024) (Slika 4.b.). SA se nakuplja nakon infekcije patogenom, što rezultira aktivacijom *NPR1* koji se zatim lokalizira u jezgri, gdje stupa u interakciju s transkripcijskim faktorima TGA, što u konačnici dovodi do aktivacije *PR* gena koji reagiraju na SA (Li i sur., 2019a).

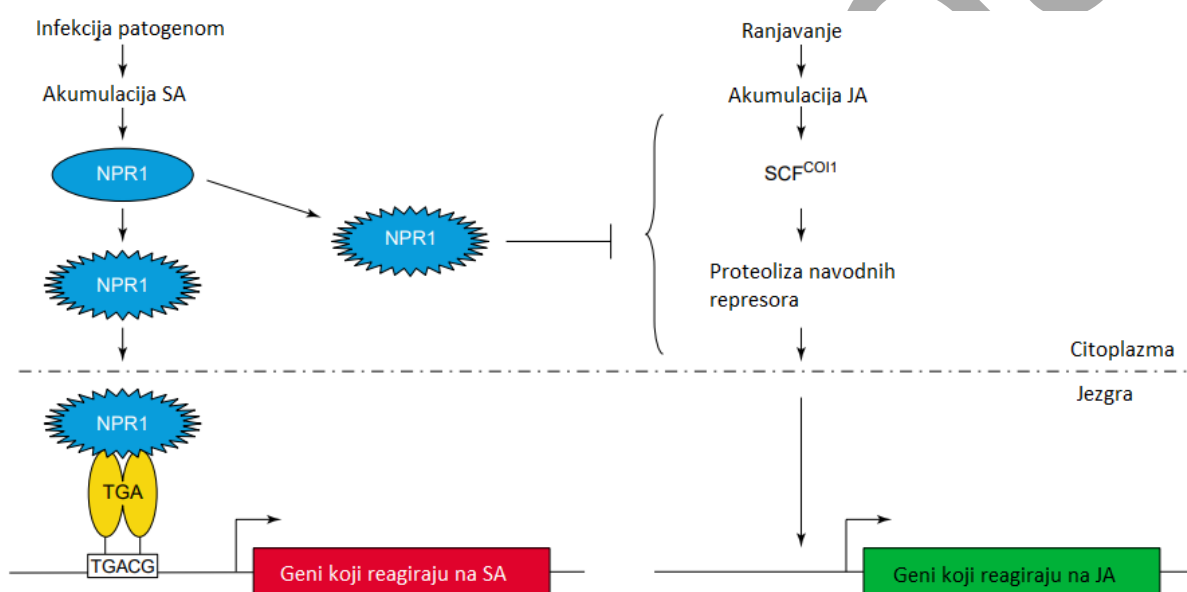


Slika 4. Biosinteza i signalni put salicilne kiseline. (a) Predloženi model za biosintezu SA u *Arabidopsisu*. U gornjem redu prikazan je izokorizmatni put (ICS), dok je u donjem redu prikazan fenilpropanoidni put (PAL). (b) Pojednostavljeni model za SA-signalni put. U stanicama s niskom koncentracijom SA, NPR1 stvara oligomer i ostaje u citoplazmi, NPR3 i NPR4 vežu rezidualni NPR1 u jezgre za sprječavanje funkcije NPR1. U stanicama s visokom koncentracijom SA, NPR1 postaje monomerni i ulazi u jezgu, gdje se SA veže za NPR3 i NPR4 kako bi blokirao njihovu represivnu transkripcijsku aktivnost. NPR1 stupa u interakciju s TGA, što dovodi do aktivacije obrambenih odgovora koji reagiraju na SA. Kratice: BA2H, 2-hidroksilaza benzojeve kiseline; ICS, izokorizmat sintaza; IPL, izokorizmat piruvat liaza; NPR, neekspresor gena povezanih s patogenezom; PAL, fenilalanin amonijliaza; SA, salicilna kiselina; TGA, TGACG-vezujući transkripcijski faktor. Preuzeto i adaptirano iz Li i sur., 2019a.

U citoplazmi, aktivirani NPR1 negativno regulira ekspresiju gena koji odgovaraju na JA, vjerojatno inhibirajući pozitivne regulatore tih gena (JAZ) ili olakšavajući prijenos negativnih regulatora u jezgu (Slika 5.). Supresija gena koji reagiraju na JA može dovesti do supresije gena za biosintezu JA, kao što je LOX2, u konačnici rezultira inhibicijom stvaranja JA (Li i sur., 2019a). Ova interakcija između NPR1 i JA/SA puteva osigurava da biljka ne aktivira antagonističke signalne puteve istovremeno, čime se omogućuje optimalno korištenje energetske resursa (Alazem & Lin, 2015; Pieterse i sur., 2012; Wasternack & Hause, 2013).

Umrežavanje signalnih puteva između JA i SA također uključuje WRKY transkripcijske faktore, posebice WRKY70, koji ima ulogu u inhibiciji JA-signalnog puta kada je SA

dominantna. WRKY70 je pozitivan regulator putanje povezane s SA, ali istodobno djeluje kao negativni regulator obrane posredovane JA. Ova dvosmjerna regulacija omogućuje biljkama da precizno moduliraju svoje odgovore na patogene i druge stresne čimbenike (Alazem & Lin, 2015; Pieterse i sur., 2012).



Slika 5. Predloženi model za NPR1 kao modulator međudjelovanja (engl. *crosstalk*) između SA- i JA-ovisnih obrambenih odgovora. Infekcija nekrotizirajućim patogenom rezultira nakupljanjem SA i aktivacijom NPR1. Aktivirani NPR1 (prikazan kao ovalni oblik zvijezde) se zatim translocira u jezgru gdje stupa u interakciju s transkripcijskim faktorima TGA, što u konačnici dovodi do aktivacije gena koji reaguju na SA. Aktivaciju NPR1 kontroliraju SA-posredovane redoks promjene u stanici. Ozljede, poput onih uzrokovanih hranjenjem insekata, rezultiraju nakupljanje JA. Pretpostavljeni represor ekspresije gena koji reagira na JA, JAZ, tada je ubikvitiniran kompleksom SCF^{CO11} ubikvitin-ligaza koji cilja proteine za razgradnju pomoću proteasoma. Uklanjanje pretpostavljenog represorskog proteina rezultira aktivacijom gena MYC2, a zatim i aktivaciju nizvodnih gena koji reaguju na JA. Inhibicija JA-signalnog puta putem SA regulirana je citosolnom funkcijom NPR1 aktiviranog sa SA, ali njegovo mjesto djelovanja nije poznato. Preuzeto i adaptirano iz Pieterse & Van Loon, 2004.

Biljke prilikom napada biotrofnih patogena načelno sadrže povišene koncentracije salicilne kiseline (SA) u usporedbi s nenapadnutim biljkama. Posljedice ovog napada manifestiraju se kroz različite odgovore s ciljem suzbijanja širenja patogena na mjestu infekcije. Ti odgovori uključuju nakupljanje ROS, poticanje hipersenzitivnog odgovora (HR) koji uključuje formiranje kalusa, disorganizaciju tkiva te promjene u veličini i obliku kloroplasta, degradacije proteina i RNA u jezgri i jezgri (nukleolusu) te programirane stanične smrti (Baebler i sur.,

2014). SA ima bitnu ulogu i u aktivaciji SAR u udaljenim biljnim tkivima, što rezultira smanjenjem učinaka sekundarnih napada (Alazem & Lin, 2015; Lukan & Coll, 2022).

Najvažnija funkcija SA u obrani biljaka je jačanje imuniteta biljaka poticanjem sinteze i nakupljanja proteina patogeneze (PR), koji imaju važnu ulogu u jačanju imuniteta biljaka. PR proteini sastoje se od nekoliko enzima koji su uključeni u razgradnju staničnih stijenki patogena ili zaustavljanje njihove progresije i vrlo su bitni za lokalizirane obrambene reakcije. SA potiče i uspostavljanje SAR, dugotrajnog obrambenog odgovora koji omogućuje biljkama da razviju otpornost u udaljenim tkivima nakon početne lokalne infekcije (Ding & Ding, 2020).

U krumpiru (*Solanum tuberosum*), SA ima jedinstvene obrambene funkcije koje se razlikuju od drugih biljnih vrsta. Poznato je da krumpir, za razliku od duhana i *Arabidopsis*, ima visoke bazalne koncentracije SA, a njegova sinteza u krumpiru kroz PAL put, dok put izokorizmat sintaze relativno malo doprinosi sintezi SA u ovoj biljci (Coquoz i sur., 1998). Nakon izlaganja nekim patogenima, koncentracija SA povećava se u tkivu proksimalno i distalno od infekcije (Navarre & Mayo, 2004; Yu i sur., 1997).

1.3.1.1. Egzogen primjena SA i njenih analoga u borbi protiv patogena

Primjena SA ili njegovih sintetičkih analoga na osjetljive biljne vrste može značajno povećati otpornost biljaka na patogene. Na primjer, tretman SA smanjuje razine proteinskog omotača TMV i virusa krumpira X (PVX) u kompatibilnim interakcijama s biljkom *Nicotiana benthamiana*, što dodatno ukazuje na ulogu SA u povećanju otpornosti na viruse (Lee i sur., 2011). U krumpiru koji izražava *NahG* transgen, zbog čega ne akumulira SA, pokazana je povećana osjetljivost na virusne (Baebler i sur., 2011) i gljivične patogene (Halim i sur., 2007), dok vanjski tretmani SA ili njegovim sintetskim analogom može smanjiti rast patogena i obnoviti otpornost biljaka.

Pokazalo se da sintetski analozi, kao što je 2,6-dikloroizonikotinska kiselina (INA), učinkovito induciraju SAR u biljkama, slično kao SA, ali uz povećanu stabilnost i učinkovitost u različitim uvjetima okoline (Tripathi i sur., 2019).

Sintetski analozi često pokazuju povoljniji farmakokinetički profil u usporedbi s prirodnim SA. Na primjer, objavljeno je da INA ima dulje trajanje djelovanja i dosljedniji odgovor u različitim

biljnim vrstama, kao što su rajčice i citrusi (Li i sur., 2016a). Osim toga, uporaba sintetskih analoga također može smanjiti rizik od fitotoksičnosti povezane s visokim koncentracijama prirodnog SA, budući da se ti spojevi mogu dizajnirati tako da optimiziraju svoju biološku aktivnost uz minimiziranje štetnih učinaka na rast biljaka (Belkadhi i sur., 2014). Osnovna razlika između SA i INA leži u njihovoj kemijskoj strukturi i naknadnoj biološkoj aktivnosti. Dok je SA prirodni fenolni spoj koji ima ulogu u obrani biljaka, INA je sintetski spoj koji oponaša djelovanje SA, ali ga biljke ili patogeni ne metaboliziraju na isti način (Aranega-Bou i sur., 2014). Ova strukturna razlika omogućuje INA-i da „zaobiđe“ putove razgradnje koji ograničavaju učinkovitost SA i aktivira obrambene reakcije u biljkama bez da je degradiraju patogeni koji obično suzbijaju razine SA, čime se osigurava pouzdaniji način jačanja imuniteta biljke protiv bolesti poput HLB-a (Huanglongbing, žuta bolest citrusa) u stablima citrusa (Li i sur., 2016a).

Tretman sa SA i njenim analogima potiče se otpornost biljaka na patogene, aktivirajući obrambene mehanizme poput ekspresije PR proteina, kao što su β -1,3-glukanaze i hitinaze. Ovi geni su bitni za obrambeni odgovor, jer pomažu u razgradnji stanične stijenke patogena te pojačavaju lignifikaciju, što ograničava širenje patogena kroz biljku (El-Gamal i sur., 2007; Tripathi i sur., 2019). Istraživanja su pokazale da INA djeluje kroz aktivaciju signala nizvodno od SA, a u tom procesu bitnu ulogu ima protein NPR1, koji modulira ekspresiju gena povezanih sa SAR. INA je pokazala da inducira istu otpornost kao i patogen, aktivirajući PR gene i povećavajući obrambene kapacitete biljaka bez potrebe za akumulacijom SA (Tripathi i sur., 2019). Poput SA, INA može inhibirati aktivnost katalaze i askorbat peroksidaze (APX) i potaknuti nakupljanje ROS (Faize & Faize, 2018).

U nekoliko istraživanja, primjena INA potaknula je ekspresiju gena povezanih sa SA-signalnim putem, bez značajnog povećanja koncentracije endogene salicilne kiseline, što dodatno naglašava njenu ulogu u primanju obrambenih odgovora (Huang i sur., 2023). U istraživanjima na krumpiru, primjena INA rezultirala je značajnim smanjenjem ozbiljnosti bolesti uzrokovanih gljivičnim patogenima kao što su *Phytophthora infestans* i *Alternaria solani*, gdje je u kombinaciji s askorbinskom kiselinom došlo do dodatnog smanjenja ozbiljnosti bolesti (El-Gamal i sur., 2007). Također, primjena INA u istraživanjima na grahu (*Phaseolus vulgaris*) pokazala je pojačanu otpornost na patogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, smanjujući simptome bolesti i akumulaciju patogena u biljnim tkivima (Martínez-Aguilar i sur., 2016).

INA tretman također potiče „priming“ efekt, gdje se biljke pripremaju za brži i snažniji odgovor na ponovnu (sekundarnu) infekciju patogenima. Ovaj učinak priminga omogućuje biljkama da brže aktiviraju obrambene mehanizme poput sinteze PR proteina i pojačanog stvaranja ROS, čime se ograničava širenje patogena unutar biljke (Hönig i sur., 2023; Martínez-Aguilar i sur., 2016). Priming putem INA tretmana također pojačava taloženje kaloze i lignifikaciju staničnih stijenki, što dodatno ograničava širenje patogena i osigurava otpornost biljaka na širok spektar patogena (Bostock i sur., 2001).

1.3.1.2. Transgenična linija *NahG*

Bakterijski gen za salicilat hidroksilazu izoliran je iz bakterije *Pseudomonas putida*, a kratica *NahG* je izvedena iz „gen za naftalen hidroksilazu“. Ovaj gen kodira enzim odgovoran za pretvorbu salicilne kiseline (SA) u katehol, čime se smanjuju koncentracije SA u biljci (Gaffney i sur., 1993; Morris i sur., 2000; Van Wees & Glazebrook, 2003), što je vrijedan alat za proučavanje fiziološke i obrambene uloge SA u biljkama. Ova transgena modifikacija omogućila je razumijevanje složenih interakcija posredovanih SA u različitim odgovorima na stres kao što su otpornost na bolesti, tolerancija na oksidativni stres, kao i razvojni procesi.

Transgene biljke koje izražavaju *NahG* pokazuju poremećen SAR zbog nemogućnosti nakupljanja SA, što je bitno za aktiviranje obrambenih odgovora protiv biotrofnih patogena (McDowell i sur., 2000; Morris i sur., 2000). Jedno od glavnih otkrića u vezi s *NahG* biljkama je njihova izmijenjena reakcija na biotski stres. Na primjer, istraživanja su pokazala da *NahG* biljke pokazuju pojačanu osjetljivost na patogene, bakterije *P. syringae* i *Botrytis cinerea*. Razgradnja SA u *NahG* biljkama dovodi do promijenjenog obrambenog odgovora, što se očituje smanjenom ekspresijom PR gena, koji su u osnovi geni povezani s patogeneзом, i temeljne komponente u urođenom imunitetu biljke (Van Wees & Glazebrook, 2003). Na primjer, ekspresija *PR1*, dobro poznatog markera vezanog uz obranu posredovanu SA, značajno je niža kod *NahG* biljaka u usporedbi s biljkama divljeg tipa, što ukazuje na važnu ulogu SA u aktiviranju obrambenih mehanizama protiv patogena (López-Gresa i sur., 2016).

Djelovanje SA u modulaciji odgovora organizma na oksidativni stres ilustrirano je u brojnim istraživanjima na *NahG* biljkama. Na primjer, u uvjetima koji pogoduju oksidativnom stresu, divlje biljke *A. thaliana* su akumulirale više oksidirane forme glutationa i imale nekrotične lezije na listovima, dok *NahG* biljke nisu pokazale veća odstupanja u koncentraciji i formi

glutaciona te izgledu listova, u odnosu na u normalne uvjete rasta, što ukazuje na ulogu SA u regulaciji redoks homeostaze (Borsani i sur., 2001).

Istraživanja na *NahG* biljkama su također dala uvid u hormonalne interakcije koje reguliraju rast i razvoj biljaka. Koncentracija drugih fitohormona poput JA kao i AUX mijenjaju se zbog ekspresije *NahG* gena, tj. smanjenog nakupljanja SA. Na primjer, istraživanja su pokazala da nedostatak SA kod *NahG* biljaka može dovesti do povećanih koncentracija AUX, koji utječu na obrasce rasta kao i na razvojne procese (Abreu & Munné-Bosch, 2009) što ukazuje na to da SA nije važan samo u odgovoru na stres, već kontrolira rast i razvoj u različitim uvjetima okoline.

Zbog ovih svojstava, *NahG* transgenične biljke se koriste za proučavanje uloge SA u biljnoj obrani, bilo u okviru pojedinačnih patogena ili složene interakcije s drugim signalnim putevima u biljkama.

1.3.2. Uloga jasmonske kiseline (JA)

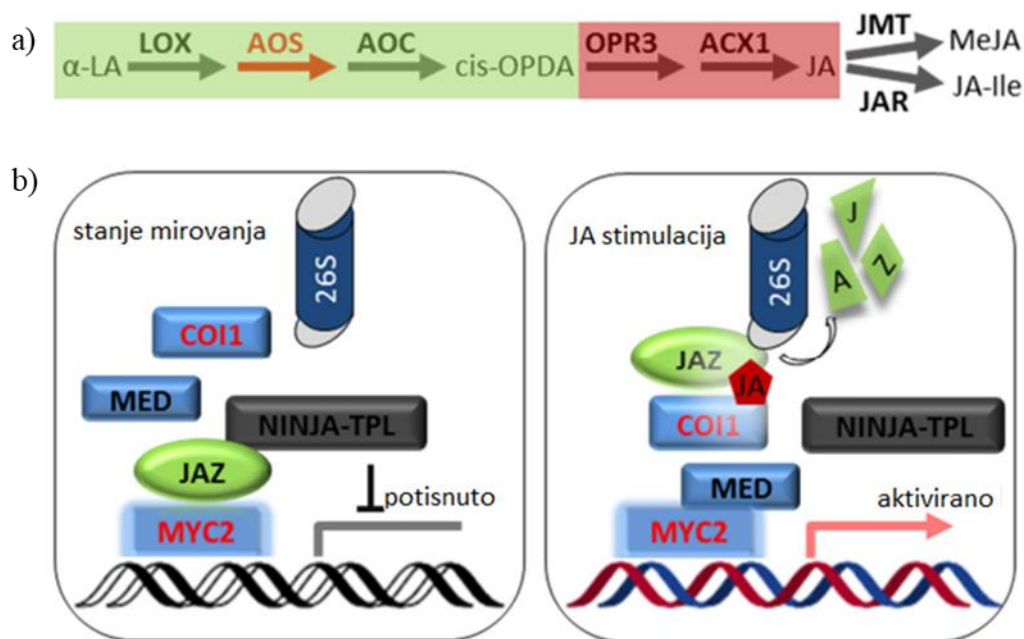
JA je signalna molekula uključena u različite obrambene mehanizme biljaka, posebno one usmjerene protiv nekrotrofnih patogena (Kloek i sur., 2001), biljojeda (León i sur., 2001) i abiotskog stresa (Sugano i sur., 2003). JA je oksilipin, jedna od skupina signalnih molekula izvedenih iz lipida, koje reguliraju brojne aspekte fizioloških procesa uključujući rast, razvoj, reprodukciju i reakcije na stres u biljkama (León i sur., 2001).

Biosinteza JA započinje oksidacijom linolenske kiseline putem lipoksigenaza (LOX) u kloroplastu, što dovodi do stvaranja nestabilnih hidroperoksida koji su prekursori JA. Lipoksigenaza (LOX) ima ulogu u ovoj signalnoj kaskadi, a mutacije u LOX genima često rezultiraju smanjenom sposobnošću biljaka da odgovore na napade patogena i stres (Huang i sur., 2019; Joubert i sur., 2022; León i sur., 2001). Krajnji proizvod niza reakcija kataliziranih lipoksigenazom (LOX), alen oksid sintazom (AOS) i alen oksid ciklazom (AOC) je 12-oksofitodienska kiselina (OPDA). Pretvorba prekursora JA u bioaktivni oblik, poznat kao jasmonska kiselina-izoleucin (JA-Ile), je bitna za aktiviranje specifičnih signalnih puteva odgovornih za induciranje gena koji sudjeluju u obrambenim mehanizmima. Ova konjugacija s aminokiselinom izoleucinom omogućava JA da djeluje kroz interakciju s receptorima SCF/COI1 kompleksom (Li i sur., 2019a; Wasternack, 2014) (Slika 6.a).

Proteini JAZ su supresori JA-induciranog transkripcijskog odgovora. JAZ proteini su važni negativni regulatori transkripcije gena osjetljivih na JA, no oni također djeluju kroz interakcije s brojnim transkripcijskim faktorima uključenim u signalne puteve drugih fitohormona. Zbog toga se JAZ proteini smatraju centralnim regulatorima koji koordiniraju ne samo različite procese nizvodno od JA, već i međudjelovanje JA s drugim fitohormonima, uključujući SA, AUX, gibereline (GA) i ABA (Wasternack & Hause, 2013).

U nedostatku JA, JAZ proteini regrutiraju transkripciju korepresor TPL putem interakcije s premosnim proteinom Novel Interactor of JAZ (NINJA). Nakon stresa, nakupljeni JA-Ile veže se za F-box protein COI1 kako bi se olakšalo stvaranje COI1-JAZs kompleks. COI1 je važna komponenta JA-signalnog puta, djelujući kao receptor za bioaktivni oblik jasmonata, jasmonske kiseline izoleucin (JA-Ile). Ova interakcija pokreće kaskadu događaja koja dovodi do razgradnje JAZ (Jasmonate ZIM-domena) proteina, koji djeluju kao represori gena osjetljivih na JA. COI1 protein je F-box protein koji čini dio SCF (Skp1-Cullin-F-box) E3 ubikvitin ligaznog kompleksa, omogućujući ubikvitinaciju i proteasomalnu razgradnju JAZ proteina, čime se omogućuje ekspresija gena osjetljivih na JA (He i sur., 2012; Li i sur., 2019b; Zhao i sur., 2024).

JA-signalni put nizvodno od COI1-JAZ može se podijeliti u dvije različite grane: granu MYC i granu ERF. MYC grana je uglavnom odgovorna za signalni put JA izazvan ranjavanjem i insektima. Ovu granu kontroliraju osnovni transkripcijski faktori helix-loop-helix leucine zipper MYC2, MYC3 i MYC4. U nedostatku JA, JAZ represori stupaju u interakciju s MYC proteinima i regrutiraju korepresor TPL. Nedavno istraživanje pokazalo je da JAZ interakcija sa MYC proteinom kompetitivno blokira njegovu interakciju s MED25 podjedinicom transkripcije. Aktivacija MYC-grane nakon uklanjanja JAZ dovodi do ekspresije velikog skupa gena koji reagiraju na JA, uključujući gen za sintezu JA LOX2 i JA-signalni represor geni JAZ (Li i sur., 2019a; Zhao i sur., 2024) (Slika 6.b).



Slika 6. Biosinteza jasmonata (JA) i put prijenosa signala. (a) Model za JA put biosinteze. Intermedijer OPDA se sintetizira u kloroplastima. JA se sintetizira u peroksisomima i izvozi se u citoplazmu, gdje se pretvara u druge bioaktivne derivate (tj. JA-Ile). Ključni enzim AOS označen je narančastom bojom. (b) Model za prijenos JA signala putem MYCa u *Arabidopsisu*. U neinduciranim stanicama (lijevo, niska koncentracija JA, stanje mirovanja), MYC2 aktivnost je potisnuta JAZ proteinima koji stupaju u interakciju s NINJA-om kako bi regrutirali transkripcijski represor TPL. U stanici stimuliranoj JA (desno, visoka koncentracija JA, JA stimulacija), JAZ proteini se razgrađuju posredstvom SCF^{COI1} proteosom. MYC2 se oslobađa kako bi stupio u interakciju s transkripcijskim posrednikom kako bi aktivirao ekspresiju gena koji odgovara JA. Kratice: α-LA - α-linolenska kiselina; ACX1 - acil-CoA-oksidadaza 1; AOC - alen oksid ciklaza; AOS - alen oksid sintaza; COI1 - koronatin neosjetljiv 1; JA - jasmonska kiselina; JA-Ile - konjugat jasmonske kiseline i izoleucina, jasmonil-izoleucin; JAR - jasmonate-resistant; JAZ - jasmonat ZIM domena; JMT - JA metil transferaza; LOX - 13-lipoksigenaza; MeJA - metil jasmonat; MED - posrednik; NINJA – novel inhibitor of JAZ; OPDA - 12-oksofitodienska kiselina; OPR3 - OPDA reduktaza 3; TPL - TOPLES. Preuzeto i adaptirano iz Li i sur., 2019a).

Jasmonati, poput JA, djeluju kao pozitivni regulatori vlastite sinteze kroz pozitivnu povratnu petlju. Takva se petlja može objasniti djelovanjem SCF(COI1)-JAZ kompleksa, u kojem COI1 ima središnju ulogu kao glavni regulator JA-signalnog puta (Katsir i sur., 2008). Kompleks SCF/COI1 označava JAZ represorske proteine za uništenje i stoga omogućuje faktorima transkripcije poput MYC2 da aktiviraju gene koji reagiraju na JA i pokreću obrambene odgovore (Devoto & Turner, 2005; Wasternack, 2014). S ovim mehanizmom, biljka može brzo odgovoriti na napad patogena i tako fino regulirati obrazac ekspresije gena za biosintezu i percepciju JA.

JA i njeni derivati također su uključeni u odgovore biljaka na različite abiotičke stresove, poput suše, UV zračenja i ozljeda. Njihova modulacija staničnih procesa kao što je sinteza antioksidativnih enzima i obrambenih proteina čini ih važnom komponentom prilagodbe biljaka na stresne uvjete (Rao i sur., 2000; Sugano i sur., 2003). Aktivacija JA u biljkama može pojačati aktivnosti antioksidativnih enzima poput SOD i APX koji uklanjaju ROS koje nastaju uslijed stresa, čime se smanjuje oksidativno oštećenje tkiva (Mittler i sur., 2004). Također, JA značajno utječe na ekspresiju gena, djelujući sinergistički ili antagonistički u odnosu na druge biljne hormone poput SA, AUX, ET i ABA (Wasternack & Hause, 2013).

U kontekstu viroidnih infekcija, uloga JA još uvijek nije potpuno razjašnjena, ali postoje dokazi o njezinoj značajnoj ulozi u odgovoru biljaka na viroidnu infekciju. Istraživanja na PSTVd inficiranoj rajčici (*Solanum lycopersicum*) pokazala su pojačanu ekspresiju gena uključenih u biosintezu i signalizaciju JA, što sugerira da je ovaj hormon uključen u obrambenim mehanizmima protiv viroida (Więsyk i sur., 2018). Osim toga, prethodno je pokazano da JA ima ulogu u imunološkim odgovorima biljaka protiv virusa (Clarke i sur., 2002; Love i sur., 2005).

Istraživanja su pokazala da infekcija PSTVd u krumpiru dovodi do značajnog nakupljanja JA, dok SA nije bila značajno akumulirana u inficiranim tkivima (Milanović i sur., 2019a). Dodatno, analiza ekspresije gena povezanih s JA-signalnim putem pokazala je da je biosinteza JA bila značajno pojačana u inficiranim biljkama krumpira, što je dodatno potvrđeno povišenom ekspresijom gena poput *LOX*, *OPR3* i *COI1*, koji su bitni za biosintezu i signalizaciju JA. Ovi nalazi naglašavaju važnost JA u regulaciji obrambenih mehanizama krumpira protiv PSTVd (Milanović i sur., 2019b).

Nedavna istraživanja su pokazala da kombinirano djelovanje ET s JA može sinergistički potaknuti ekspresiju obrambenog gena protiv biljojeda i patogena (Zhu i sur., 2023). Osim toga, utvrđeno je da na ekspresiju *PR-1b*, marker gena za SA-signalni put, utječu JA i ET u biljkama krumpira inficiranim *P. infestans* (Alaux i sur., 2020). Ovo ukazuje na to da JA ne samo da aktivira vlastiti skup obrambenih gena, već je također povezan sa SA-signalnim putem kako bi fino podesio odgovor biljke na patogene.

1.3.2.1. Egzogeni primjena JA i njenih analoga u borbi protiv patogena

Metil jasmonska kiselina (MeJA) je hlapljivi mirisni spoj izdvojen iz biljke *Jasminum grandiflorum*, koji za razliku od JA, djeluje na udaljene dijelove biljke. Zajedno s JA i ostalim jasmonatima, MeJA sudjeluje u razvojnim fazama poput klijanja sjemena, razvoja korijena, sazrijevanja plodova, gravitropizma te senescencije listova. Osim toga, JA i MeJA su povezani s regulacijom stresa u biljkama uslijed poticanja ekspresije obrambenih gena, aktivacijom antioksidacijskih enzima, nakupljanjem obrambenih molekula poput fenola te regulacijom antioksidacijskog odgovora, fotosinteze i zatvaranja puči (Yu i sur., 2019).

MeJA nastaje iz JA djelovanjem JA-karboksi-metiltransferaze (JMT) koja se nalazi u citoplazmi, a pojačana ekspresija *JMT* gena povezana je s većom otpornošću biljaka na određene patogene. S druge strane, biljka može iskoristiti egzogeno dodani MeJA tako da ga pretvara u bioaktivni JA-Ile (Tamogami i sur., 2008). Pored toga, u uvjetima biotskog stresa, egzogeno dodan MeJA potiče sistemsku obranu biljaka i povezana je sa smanjenjem umnažanja PVY-PVX virusa (García-Marcos i sur., 2013). Slična istraživanja pokazala su da je ekspresija gena osjetljivih na JA promijenjena u ranim fazama infekcije, npr. kod virusa mozaika cvjetače (engl. *Cauliflower mosaic virus*, CaMV) u *Arabidopsis thaliana* (Love i sur., 2005). Utišavanje AOS (ALLENE OXIDE SYNTHASE), gena za biosintezu JA, pojačava otpornost, a egzogeni primjena MeJA smanjuje lokalnu otpornost na TMV i omogućava sistemski prijenos, što implicira da takav tretman ukida otpornost gena *N* na virus mozaika duhana (Oka i sur., 2013). Ovi rezultati ukazuju na to da uloga JA u obrani biljaka od patogena nije posve razjašnjena i može ovisiti o vrsti patogena te fazi infekcije.

MeJA može modulirati fiziološke procese u biljkama i poboljšati otpornost na abiotičke stresove, poput suše i saliniteta, povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima i nakupljanjem spojeva, kao što su prolin i ugljikohidrati. U MeJA tretiranom kukuruzu dolazi do povećanja sinteze endogenih hormona, poput ABA, te je zabilježeno i smanjenje oksidativnog stresa i poboljšanje antioksidativnih odgovora tijekom suše (Tayyab i sur., 2020).

U pšenici MeJA tretman inducira otpornost na *Fusarium culmorum*, povećavajući aktivnost enzima kao što su peroksidaza i fenilalanin amonijak-lijaza (Akbari-Vafai i sur., 2014). MeJA pomaže kontrolirati gljivicu *Tilletia controversa*, uzročnika patuljastog snijeta, inducirajući obrambene gene, poput PR-10a i katalaze (CAT) (Muhae-Ud-Din i sur., 2020).

Tretman MeJA u *Arabidopsis thaliana* značajno povećava aktivnosti antioksidativnih enzima, uključujući CAT i peroksidazu (POD), čime se smanjuje oksidativni stres (Jung, 2004). U riži MeJA tretman poboljšava otpornost na insekte, poput rižinog vodenog žiška (*Lissorhoptrus oryzophilus*), iako istovremeno smanjuje rast biljke i masu zrna (Bhavanam & Stout, 2021). MeJA tretman također inducira otpornost na *Botryosphaeria dothidea* u kiviju, aktivirajući enzime povezane s fenilpropanoidnim i jasmonatnim putevima, uključujući fenilalanin amonijak-lijazu i peroksidazu, te potiče nakupljanje fenolnih spojeva i flavonoida (Li i sur., 2022a; Pan i sur., 2020).

Kod mungo graha, MeJA tretman potiče otpornost na *Mungbean yellow mosaic India virus* (MYMIV) pojačanjem biokemijskih odgovora povezanih s obrambenim mehanizmima (Chakraborty & Basak, 2019). Također je primijećeno da MeJA može inducirati epigenetičke promjene, poput modifikacija histona, što može ubrzati i pojačati odgovor na budući stres (Bertini i sur., 2018).

1.3.2.2. Transgenične linije *opr3* i *coi1*

Uloga proteina COI1 (Coronatine Insensitive 1) i OPR3 (12-oksophitodienoat reduktaza 3) u signalnim putevima biljaka, posebno u odnosu na JA i njezine derivate, izazvala je značajnu pažnju posljednjih godina.

Proteini COI1 i OPR3 nisu samo uključeni u odgovor na obranu, također sudjeluju u nekoliko različitih razvojnih procesa. Na primjer, pokazano je da COI1 regulira plodnost polena i sekundarni metabolizam biljaka (Wang i sur., 2021a). Odnos između COI1 i drugih signalnih puteva, kao što su oni koji uključuju AUX i GA, dodatno pokazuje složenost hormonske komunikacije u razvoju biljaka (Jia i sur., 2013). Takva komunikacija pomaže u koordinaciji rasta i obrambenih strategija biljaka, omogućujući im prilagodbu promjenjivim okolišnim uvjetima.

Različiti aleli i mutacije koji mogu dodatno utjecati na njihovu aktivnost dodatno naglašavaju složenost funkcija COI1 i OPR3. Na primjer, specifične mutacije u dijelovima gena koji kodiraju protein COI1 mogu modulirati akumulaciju i funkciju imunoloških receptora, čime utječu na imunitet biljaka (He i sur., 2012). Slično tome, identifikacija intragenskih supresorskih mutacija u COI1 ukazuje na različite učinke genetske varijacije na JA-signalni

put i odgovore biljaka na stres (Song i sur., 2021). Ova otkrića naglašavaju da evolucijska dinamika COI1 i OPR3 nije važna samo za razumijevanje obrambenih strategija biljaka, već i za programe uzgoja usmjerene na povećanje otpornosti usjeva na stres.

Istraživanja su pokazala da je COI1 važan za različite odgovore biljaka na okolišni stres, uključujući napade biljojeda i infekcije patogenima. Na primjer, *coi1-1* mutant *Arabidopsis*a potpuno je neosjetljiv na JA odgovore, što ga čini podložnim raznim patogenima i biljojedima (He i sur., 2012). Ova osjetljivost pripisuje se nesposobnosti mutanta da percipira JA i aktivira signalne puteve u kojem sudjeluje JA, koja je važna za aktivaciju obrambenih mehanizama. Nasuprot tome, biljke divljeg tipa mogu pokrenuti učinkovite obrambene odgovore, uključujući proizvodnju sekundarnih metabolita i proteina povezanih s patogeneзом, kao odgovor na JA-signalni put. S druge strane, OPR3 ima ulogu u biosintezi JA jer katalizira konverziju OPDA u JA. Mutanti *A.thaliana* bez OPR3, kao što je *opr3-2*, pokazuju promijenjene odgovore na biotski stres, što ukazuje da je OPR3 nužan za učinkovite obrambene odgovore posredovane JA (Scalschi i sur., 2015).

Interakcija između COI1 i OPR3 osobito je očita u istraživanjima koja ispituju odgovore biljaka na patogene. Na primjer, pokazalo se da *opr3-2* mutant ima povećanu otpornost na nekrotrofnog patogena *B. cinerea*, unatoč nesposobnosti za proizvodnju JA (Scalschi i sur., 2015). Smatra se da je ova otpornost posredovana aktivacijom signalnih puteva ovisnih o COI1, koji ne ovise isključivo o biosintezi JA. Iako je poznato da COI1 obično prepoznaje JA u obliku JA-Ile, postoje dokazi da COI1 može percipirati i druge jasmonate, poput *cis*-OPDA, koji također imaju ulogu u prijenosu signala. Dodatno, postoje i COI1-neovisni signalni putevi koji mogu biti angažirani u obrambenim odgovorima biljke (Wasternack i sur., 2012).

Nadalje, regulacija rasta i obrane putem JA precizno je podešen proces. Signalizacija posredovana COI1 daje prednost obrambenim odgovorima u odnosu na rast, osobito pod stresnim uvjetima. To je vidljivo u kompeticiji između signalnih puteva JA i GA, gdje signalizacija JA može inhibirati puteve GA koji potiču rast, čime biljke premještaju resurse prema obrani, dok koče rast tijekom stresnih uvjeta (Li i sur., 2022a; Yang i sur., 2012).

1.3.3. Interakcija fitohormona u obrambenom odgovoru

Interakcije između fitohormona, bilo da su sinergističke ili antagonističke, su važne za biljne prilagodbe na biotske i abiotske stresove. Sinergija između JA i ET omogućuje biljkama da se učinkovitije brane protiv nekrotrofnih patogena, dok antagonizam između SA i JA osigurava specifične odgovore na biotrofne i nekrotrofne napade. ABA, AUX i drugi fitohormoni također imaju ulogu u modulaciji ovih odgovora, omogućujući biljkama da balansiraju rast i obranu ovisno o uvjetima. Povezivanje signalnih puteva između ovih hormona omogućuje biljkama da dinamički prilagode svoje fiziološke procese u složenim i promjenjivim okolišnim uvjetima (Alazem & Lin, 2015; Pieterse i sur., 2012).

Jedan od najpoznatijih primjera antagonizma između JA i SA može se vidjeti u obrambenim odgovorima na virusne infekcije. Istraživanja na *Nicotiana benthamiana* pokazala su da su oba hormona potrebna za razvoj sistemske otpornosti na virus mozaika duhana (engl. *Tobacco mosaic virus*, TMV). Blokiranje JA biosinteze značajno smanjuje naknadno nakupljanje SA, što ukazuje da JA posredno potiče SA-signalni put u ranijim fazama virusne infekcije (Zhu i sur., 2014). Ovaj pojava se objašnjava potrebom biljke da koordinira svoje odgovore na različite faze infekcije, gdje JA pomaže u ranom obrambenom odgovoru, dok SA preuzima kontrolu u kasnijim fazama kada je potrebno spriječiti daljnje širenje patogena.

Umrežavanje signalnih puteva između JA i SA uključuje WRKY transkripcijske faktore, posebice WRKY70, koji ima ulogu u inhibiciji JA-signalnog puta kada je SA dominantna. WRKY70 je pozitivan regulator SA-signalnog puta, ali istodobno djeluje kao negativan regulator obrane posredovane djelovanjem JA. Ova dvosmjerna regulacija omogućuje biljkama da precizno moduliraju svoje odgovore na patogene i druge stresne čimbenike (Alazem & Lin, 2015; Pieterse i sur., 2012).

Učinak infekcije viroidom PSTVd na signalne puteve JA i SA također se odražava u fiziološkim odgovorima inficiranih biljaka. Na primjer, usporeni rast i izmijenjena morfologija listova uočeni u biljkama inficiranim PSTVd mogu se pripisati poremećaju hormonskih signalnih puteva, uključujući one koji uključuju JA i SA (Lv i sur., 2016). Međudjelovanje ovih hormona je važno za održavanje rasta i razvoja biljke, a svaki poremećaj može dovesti do značajnih fenotipskih promjena.

U istraživanju na biljkama rajčice inficiranim s PSTVd otkriveno je da su oba glavna obrambena hormona, SA i JA, uključena u regulaciji odgovora na viroidnu infekciju. Prema

rezultatima analize transkriptoma rajčice inficirane viroidom PSTVd (Więsyk i sur., 2018), Biljke rajčice inficirane s PSTVd pokazale su aktivaciju prijenosa signala SA i JA. Stoga, pojačana ekspresija gena poput *LOX* i *MYC2* koji su povezani s JA, kao i pojačana ekspresija gena povezanih s SA, sugeriraju da infekcija viroidom može potaknuti složen odgovor koji uključuje oba hormona. Zanimljivo je da je u ovom slučaju, za razliku od krumpira, uloga SA bila jednako važna kao i JA, što može ukazivati na različite mehanizme obrane specifične za vrste biljaka.

Istraživanja pokazuju da infekcija PSTVd može dovesti do značajnih promjena u ekspresiji gena povezanih s metabolizmom i signalizacijom hormona. Na primjer, istraživanje Więsyka i sur.h naglašava da je tijekom infekcije PSTVd više od 140 gena uključenih u metabolizam hormona i signaliziranje pokazalo izmijenjene razine ekspresije, što ukazuje na dubok utjecaj na hormonalnu ravnotežu unutar biljke (Więsyk i sur., 2018). Ovaj poremećaj je posebno važan budući da su i JA i SA važni u orkestriranju obrambenih odgovora biljaka protiv patogena.

Vrijeme aktivacije hormonskih odgovora tijekom infekcije PSTVd također je vrijedno pažnje. Góra-Sochacka i sur. provedli su analizu transkriptoma korijena koja je otkrila globalne promjene izazvane sistemskom infekcijom PSTVd ističući vremensku dinamiku ekspresije gena uključenih u hormonske signalizacije tijekom procesa infekcije (Góra-Sochacka i sur., 2019). To sugerira da bi vrijeme aktivacije puteva JA i SA moglo biti kritično u određivanju ishoda infekcije, bilo da dovodi do tolerancije ili osjetljivosti.

Dok SA i JA često djeluju antagonistički, JA i ET djeluju u sinergiji kako bi koordinirali obrambene mehanizme, posebno protiv nekrotrofnih patogena. Ova sinergija je važna za induciranu sistemsku otpornost (engl. *induced systemic resistance*, ISR), proces kojim biljke aktiviraju obrambene mehanizme u cijelom organizmu nakon lokalne infekcije (Ebrahimi-Zarandi i sur., 2022). JA i ET zajednički reguliraju ekspresiju gena odgovornih za sintezu obrambenih proteina i spojeva koji jačaju stanične stijenke, uključujući kalus i lignin (Thaler i sur., 2012). Primjer ove sinergije može se vidjeti u obrani biljaka *A. thaliana* od gljivičnog patogena *B. cinerea*, gdje oba hormona zajedno aktiviraju ekspresiju gena poput *PDF1.2*, koji kodira proteine za inhibiciju rasta patogena (Pieterse i sur., 2012).

ABA ima ulogu u prilagodbi biljaka na abiotske stresove, poput suše i slanosti, ali također ima složenu ulogu u regulaciji biotskih stresova. ABA često djeluje kao negativan regulator SA-signalnog puta, posebno tijekom infekcija biotrofnim patogenima. Ovo antagonističko

djelovanje između ABA i SA omogućuje biljkama da prilagode svoje odgovore ovisno o prirodi stresa. Na primjer, kod infekcija biljkama *P. syringae*, zabilježeno je da ABA potiskuje SA-signalni put, čime patogen može lakše izbjeći biljne obrambene mehanizme. Iako je ABA važna za zatvaranje puči kako bi se spriječio ulazak patogena, njezina inhibicija SA-signalnog puta može smanjiti sposobnost biljaka da se obrane od patogena koji prodiru kroz otvorene puči (Ton i sur., 2009).

Štoviše, analiza transkriptoma biljaka paprike inficiranih viroidom PSTVd otkrila je da infekcija PSTVd pojačava ekspresiju gena povezanih s proizvodnjom ET, što je usko povezano s JA-signalnim putem (Hadjieva i sur., 2021). Pojačana regulacija gena ACO, odgovornog za biosintezu ET, sugerira da PSTVd može potaknuti reakcije na stres posredovane ET, što bi moglo neizravno utjecati na put JA. Poznato je da ET stupa u interakciju s JA-signalnim putem, često pojačavajući obrambeni odgovor biljke protiv raznih biotskih stresova, uključujući viroidne infekcije (Joubert i sur., 2022). Ova interakcija naglašava složenost hormonskog signaliziranja tijekom infekcije PSTVd, gdje promjena u jednom hormonu može izazvati lančane reakcije u drugim signalnim putevima.

Dodatna istraživanja na *Arabidopsisu* ukazuju na složene međusobne odnose između SA, JA, ET i ABA u regulaciji odgovora na infekcije patogenom. Na primjer, u prisutnosti virusa, poput *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), JA i ET aktiviraju ekspresiju gena uključenih u sistemsku otpornost, dok ABA inhibira SA-signalni put, smanjujući učinkovitost obrambenih odgovora (Thaler i sur., 2012).

AUX se općenito smatra hormonom rasta i razvoja biljaka, ali u novijim istraživanjima došlo se do spoznaje da AUX također može biti uključen u obrambene reakcije, osobito u modificiranju interakcija između biljaka i njihovih patogena. AUX mogu djelovati antagonistički sa SA jer inhibiraju određene SA-signalne puteve, kao što su indukcija ekspresije *PR1* gena, dopuštajući patogenima da kontroliraju hormonsku ravnotežu biljke do točke u kojoj je rast potaknut na uštrb obrambenih odgovora (Kong i sur., 2020).

1.4. Uloga ROS u obrambenim odgovorima biljaka

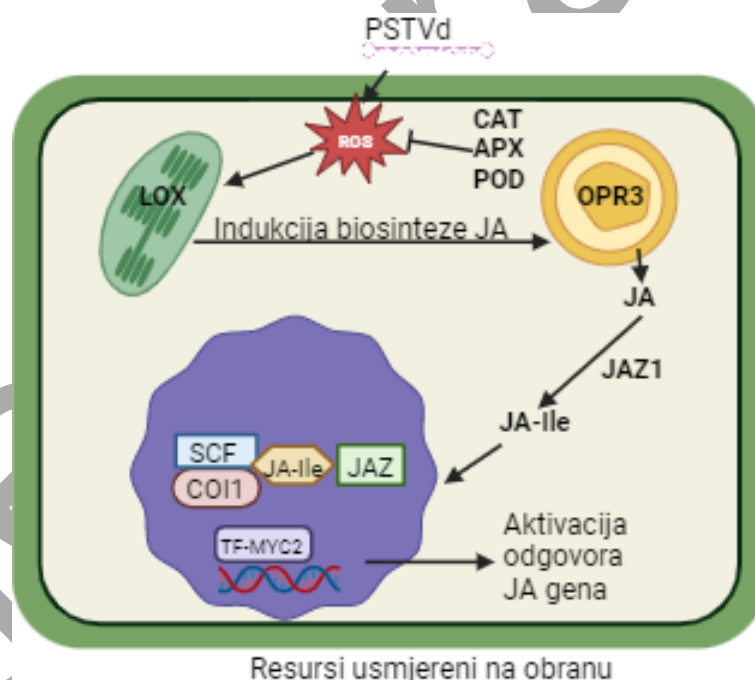
ROS ima višestruku ulogu u obrambenim mehanizmima biljaka, djelujući kao signalne molekule i kao toksični agensi. Ova dualnost ROS kao obrambenog signala i potencijalnog izvora oštećenja stanica ilustrira složenost obrambenih strategija biljaka.

ROS su molekule koje uključuju slobodne radikale poput superoksida (O_2^-), hidroksil radikala ($OH^\bullet$), nereaktivne čestice poput H_2O_2 i singletni kisik (1O_2). U niskim koncentracijama, ROS djeluju kao signalna molekula koja aktivira obrambene mehanizme, dok u višim koncentracijama može uzrokovati staničnu smrt i oštećenja molekula poput proteina, lipida i nukleinskih kiselina (Tripathy & Oelmüller, 2012).

Prepoznavanje molekularnih uzoraka povezanih s patogenom (PAMP) pomoću receptora za prepoznavanje uzorka (PRR) aktivira nizvodne signalne puteve koji kulminiraju proizvodnjom ROS, što je bitno za aktivaciju obrambenih gena i sintezu antimikrobnih spojeva (Jiang i sur., 2022; Sheikh i sur., 2022). Nakon prepoznavanja patogena u biljkama započinje niz oksidativnih reakcija koje dovode do brzog povećanja koncentracije ROS, osobito H_2O_2 i superoksidnih radikala (O_2^-), što je poznato kao oksidativni prasak (Lee i sur., 2011; Li i sur., 2020) često povezan s HR i lokaliziranom staničnom smrću koja ograničava širenje patogena (Xue i sur., 2017). Važnost ROS dodatno je naglašena rezultatima istraživanja koja pokazuju da prijenos signala u kojima sudjeluje ROS može modulirati ekspresiju gena povezanu s obrambenim odgovorima, uključujući aktivaciju gena povezanih s patogenezom (PR) i nakupljanje bioaktivnih sekundarnih metabolita, fitoaleksina (Jiang i sur., 2022).

Kako bi ublažile potencijalnu štetu uzrokovanu prekomjernim ROS, biljke su razvile sofisticirani antioksidativni sustav koji uključuje neenzimske antioksidanse uključujući askorbat-glutationski ciklus, flavonoide i karotenoide, te antioksidativne enzime kao što su SOD, CAT, APX i POD (Soares i sur., 2010). Ovi enzimi djeluju na uklanjanje ROS i održavanje redoks homeostaze, čime štite stanične komponente od oksidativnog oštećenja (Ali i sur., 2024; De Gara i sur., 2003). Na primjer, aktivnost SOD je bitna za pretvaranje superoksidnih radikala u H_2O_2 , koji se zatim može dalje detoksificirati katalazom i peroksidazama. Ravnoteža između proizvodnje i uklanjanja ROS važna je za održavanje homeostaze ROS i zdravlje biljaka, jer i nedovoljne i prekomjerne koncentracije ROS mogu dovesti do poremećenih obrambenih sposobnosti.

Osim toga, poznata je povezanost nakupljanja ROS s aktivacijom prijenosa signala pomoću SA i JA tijekom obrambenog odgovora biljaka. S druge strane, SA i JA mogu biti uključeni u regulaciju ekspresije gena uključenih u proizvodnju ROS i antioksidacijsku obranu (Berens i sur., 2017). Na primjer, aktivacija SA puta povezana je s povećanim nakupljanjem ROS i aktivacijom antioksidacijskih odgovora, što povećava otpornost biljke na različite patogene (Jiang i sur., 2022; Sharma i sur., 2018). Nasuprot tome, JA se često povezuje s regulacijom obrambenih odgovora u obrani od biljojeda i nekrotrofnih patogena, gdje ROS također ima značajnu ulogu pri čemu nakupljanje JA može potaknuti aktivaciju enzima poput peroksidaza i proteaza te sintezu spojeva poput JA koji imaju ulogu u jačanju biljnih obrambenih mehanizama (Goggin & Fischer, 2022; Pitino i sur., 2015). (Slika 7.)



Slika 7. Shema prikazuje molekularni mehanizam obrane biljke na infekciju PSTVd, prikazani su unutarstanični procesi koji se aktiviraju nakon infekcije: infekcija PSTVd uzrokuje povećanje produkcije reaktivnih kisikovih čestica (ROS), koje posljedično aktiviraju ekspresiju gena odgovornih za sintezu antioksidativnih enzima, uključujući katalazu (CAT), askorbat peroksidazu (APX) i peroksidazu (POD). Ovi enzimi imaju ulogu u neutralizaciji oksidativnog stresa uzrokovanog s ROS. Infekcija također inducira biosintezu JA kroz aktivaciju lipooksigenaze (LOX), enzima uključenog u početne korake oksidacije lipida, što vodi do formiranja prekursora JA. Enzim OPR3 katalizira pretvorbu prekursora u JA, koja se dalje može konjugirati s aminokiselinom izoleucinom, tvoreći bioaktivni kompleks JA-Ile. Aktivirani JA-Ile kompleks prepoznaje SCF/COI1 proteazni kompleks, koji degradira reprimirajući protein JAZ. Degradacijom JAZ proteina oslobađaju se transkripcijski faktori, poput TF-MYC2, koji aktiviraju ekspresiju gena uključenih u obrambene odgovore ovisne o JA. Kao rezultat, biosinteza JA i kasnija aktivacija signalnih puteva reguliranih JA vodi do povećane sposobnosti biljke za obranu protiv viroidne infekcije, preusmjeravajući metaboličke resurse prema sustavima obrane. Slika je izrađena pomoću BioRender.com.

SA također djeluje u sinergiji s ROS kako bi aktivirala antioksidativne enzime poput askorbat peroksidaze (APX) i superoksid dismutaze (SOD). Ovi enzimi neutraliziraju štetne učinke oksidativnog stresa uzrokovanog nakupljanjem ROS tijekom infekcije. Aktivacija ovih enzima posebno je važna u kontekstu virusnih i viroidnih infekcija, gdje oksidativni stres ima neizostavnu ulogu u aktivaciji obrambenih odgovora u biljkama (Alazem & Lin, 2015; Kovalskaya & Hammond, 2014).

Kontrola koncentracije ROS tijekom obrambenih odgovora regulirana je preciznim prostorno-vremenskim mehanizmima. Na primjer, tijekom interakcije biljke i patogena, dolazi do bifaznog nakupljanja ROS. Prva faza je brza, kratkotrajna i povezana s prepoznavanjem patogena, dok je druga faza dugotrajnija i povezana s aktivacijom gena uključenih u obranu (Torres i sur., 2006).

Nedavna istraživanja pokazala su da manipulacija koncentracije ROS može biti potencijalna strategija za poboljšanje otpornosti biljaka na bolesti i okolišne stresove. Povećanjem proizvodnje ROS genetskim inženjeringom ili egzogenom primjenom elicitora, istraživači su uspjeli potaknuti urođene obrambene mehanizme biljke (Peters i sur., 2017; Pitino i sur., 2015). Na primjer, pokazano je da primjena MeJA povećava koncentraciju ROS i aktivira antioksidativne enzime, čime se povećava otpornost biljke na različite patogene (Sharma i sur., 2018; Soares i sur., 2010). Ovaj pristup naglašava potencijal ROS kao cilja za biotehnološke intervencije usmjerene na poboljšanje otpornosti usjeva kroz aktivaciju antioksidacijskog odgovora.

1.5. CILJ I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Glavni je cilj istražiti ulogu fitohormona u regulaciji obrambenog odgovora biljke krumpira na infekciju viroidom PSTVd. Specifični ciljevi su:

- 1) analiza dinamike razvitka sistemske infekcije i pojave simptoma kao što su nakupljanje vodikovog peroksida (H_2O_2) i kaloze;
- 2) analiza učinka infekcije na sadržaj endogenih fitohormona, te analiza ekspresije gena uključenih u metabolizam i signalne puteve fitohormona, posebice SA i JA povezanih s odgovorom na stres;
- 3) analiza učinka egzogenog tretmana s 2,6-dikloro izonikotinskom kiselinom (INA), analogom SA, te metil jasmonatom (MeJA) na dinamiku širenja infekcije;
- 4) analiza ekspresije gena uključenih u druge važne regulatorne procese tijekom odgovora na infekciju viroidom PSTVd.

Hipoteze istraživanja:

1. Infekcija viroidom PSTVd uzrokuje oksidativne promjene i promjene u ekspresiji gena čime aktivira mehanizme obrane na biotski stres što dovodi do razvoja simptoma.
2. Transgenične linije krumpira sa smanjenom sposobnošću nakupljanja SA ili JA imaju različit stupanj osjetljivosti na infekciju viroidom u odnosu na wt biljke. Razlika u stupnju osjetljivosti ovisi o koncentraciji endogenih fitohormona i ekspresiji gena.
3. INA ili MeJA egzogeni tretman ublažiti će ili pojačati razvoj simptoma u inficiranim wt biljkama. Nadalje, egzogeni tretman s INA ili MeJA nadomjestit će nedostatak fitohormona u SA- odnosno JA-deficijentnim transgeničnim biljkama i uzrokovati promjene u odgovoru na infekciju viroidom u odnosu na netretirane transgenične biljke.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Pripremanje viroidnog inokuluma

Za pripremu inokuluma izolirana je ukupna biljna RNA iz listova biljaka rajčice prethodno inficiranih dobro karakteriziranim izolatom PSTVd (GenBank pristupni broj KF418768) (Milanović i sur., 2014). Ukupna biljna RNA izolirana je pomoću RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) i kvantificirana pomoću Nanodrop UV/VIS spektrofotometra NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Prisutnost PSTVd viroida potvrđena je metodom RTqPCR u jednom koraku, korištenjem TaqMan kemije i specifičnih početnica i sonda za PSTVd vdRNA (Boonham i sur., 2004), u reakcijskom volumenu od 20 µl, s 1 µl biljne RNA i 10 µl 2x glavne mješavine (Agilent Brilliant III Ultra-Fast RTqPCR). Za kvantitativnu RTqPCR analizu, koncentracija svih uzoraka RNA je ujednačena na 8 ng/µl. Uvjeti za RTqPCR test bili su: 50 °C tijekom 10 min, 95 °C tijekom 3 min i 40 ciklusa od 95 °C tijekom 15 sekundi i 60 °C tijekom 20 sekundi. Kako bi se održala ujednačena razina kvalitete inokuluma u različitim eksperimentima, broj kopija viroidne RNA (vdRNA) određen je za svaki izolat korištenjem RTqPCR metode u skladu s protokolom za apsolutnu kvantifikaciju DNA/RNA (Pabinger i sur., 2014). Ukratko, standardna krivulja dobivena je linearnom regresijskom analizom Ct vrijednosti (prag ciklusa) za niz razrjeđenja poznato pozitivnog uzorka (1 ng viroidne cDNA), u rasponu od 10^{-4} do 10^{-11} početne koncentracije. Izračun broja kopija viroidne cDNA izračunat je u svakom razrjeđenju. Naknadno je na temelju dobivenih Ct vrijednosti za svaki pojedini izolat određen broj kopija vdRNA po µg ukupne biljne RNA. Pripremljeni inokulum zadovoljavajuće kvalitete, s ujednačenim brojem kopija vdRNA ($\sim 8 \times 10^8$ kopija/µg ukupne RNA) pohranjen je na -80 °C do daljnje uporabe.

2.2. Propagacija biljaka

U istraživanju su korišteni različiti genotipovi krumpira (*Solanum tuberosum*) sorte Désirée: biljke divljeg tipa (wt), transgenične biljke *StNahG* koje nemaju sposobnost nakupljanja SA (Halim i sur., 2004) te transgenične biljke s nemogućnosti sinteze JA (*StOPR3-RNAi*), te biljke neosjetljive na JA (*StCOI1-RNAi*). Nodalni segmenti stabljike korišteni su za umnažanje *in vitro* kultura presađivanjem u 1xMS hranjivu podlogu s dodatkom 0,8% agara i 2% saharoze, u intervalu od 30 dana. Četiri tjedna stare *in vitro* regenerirane biljke presađene su u hortikulturni supstrat (Klasmann S1) te uzgajane 2 tjedna u plastičnim čašama promjera 6 cm,

a potom još 2 tjedna u posudama promjera 15-19 cm. Biljke su uzgajane u mješavini hortikulturnog supstrata (Klasmann Potgrond H 90) i perlita (3:1). Nakon presađivanja iz *in vitro* uvjeta u supstrat, biljke su prošle proces aklimatizacije u kojem su prekrivene plastičnom vrećicom ili plastičnim poklopcem kako bi im se omogućilo postupno privikavanje na manju vlažnost zraka u klima komorama. Biljke su uzgajane u klima komorama u sljedećim uvjetima: 60% relativne vlažnosti, $180 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ osvjetljenja, 21°C na svjetlu i 18°C u mraku kroz 16-satni fotoperiod.

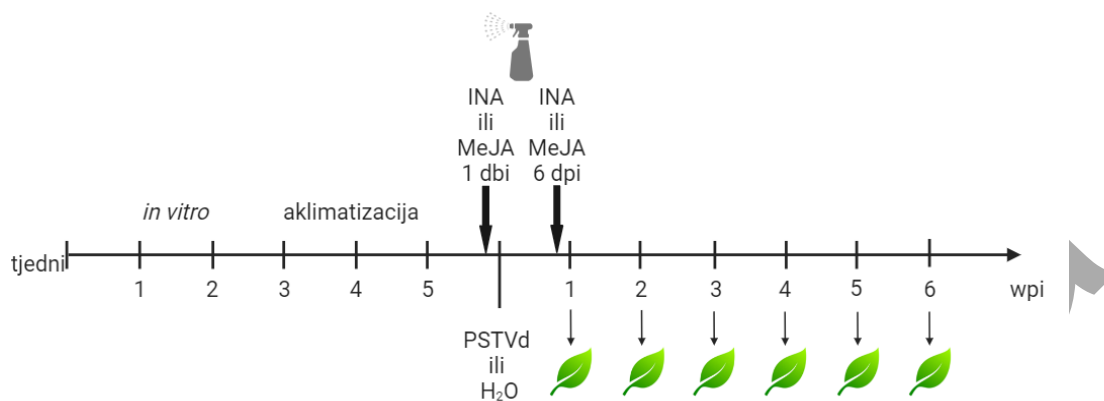
2.3. Mehanička inokulacija

Pokus inokulacije viroida i praćenje razvoja simptoma provoden je na najmanje 30 biljaka po tretmanu (mock i infekcije s PSTVd). Biljke krumpira koje su rasle u mješavini supstrata i perlita 4 tjedna, inokulirane su izolatom viroidne RNA ili H_2O (mock inokulacija, kontrola) kada su dosegle visinu od oko 10-12 cm, odnosno razvile 3 do 4 lista površine $\geq 4 \text{ cm}^2$. Dva potpuno formirana lista poprašina su prahom Filter Agent Celite® 454 (Sigma-Aldrich, USA) i mehanički inficirana s $2 \mu\text{l}$ inokuluma ($\sim 8 \times 10^8$ kopija/ μg ukupne RNA). Nakon 5 min, preostali karborundum i inokulum uklonjeni su ispiranjem deioniziranom vodom. Nakon inokulacije, biljke su rasle u klima-komori pri $23\text{-}24^\circ\text{C}$ na svjetlu i 20°C u mraku, pri relativnoj vlažnosti od 60%, osvjetljenju od $180 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i 16-satnom fotoperiodu.

2.4. INA ili MeJA tretman

Za pokuse sprejanja listova otopinom analogom SA, biljke krumpira prskane su s 1 mM INA (98% 2,6-dikloroizonikotinske kiseline, Aldrich, Dorset, UK) otopljene u destiliranoj H_2O ili samo s destiliranom H_2O (kontrola) u dva navrata: jedan dan prije mehaničke inokulacije (Baebler i sur., 2011) i 6 dana nakon početne inokulacije (López-Gresa i sur., 2016) (Slika 8.) U pokusu je inokulirano 20-25 biljaka po liniji i po tretmanu. Biljke su potom uzorkovane jedan dan nakon drugog prskanja s INA/ H_2O , odnosno 7 dana nakon inokulacije viroidom/ H_2O .

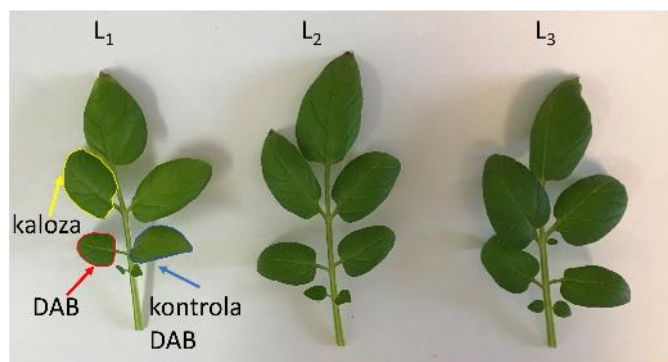
Za pokuse s MeJA tretmanom biljke krumpira prskane su s 1mM MeJA u destiliranoj vodi ili samo s destiliranom H_2O (kontrola) jedan dan prije mehaničke inokulacije, te 6 dana nakon početne inokulacije. Tijek tretmana bio je jednak kao i za INA tretman.



Slika 8. Shematski prikaz dizajna INA ili MeJA tretmana prije i nakon inokulacije viroida PSTVd ili H₂O (mock). Biljke su tretirane sa 1 mM INA, MeJA ili H₂O u dvije vremenske točke: jedan dan prije inokulacije (dbi, engl. *day before inoculation*) te 6 dana nakon inokulacije (dpi, engl. *days post inoculation*). Uzorci su sakupljeni u intervalima od 7 dana (engl. *week post inoculation*, wpi) od 1 do 6 wpi. Slika je izrađena pomoću BioRender.com.

2.5. Uzorkovanje biljnog tkiva za analize

Morfološka mjerenja, fotografiranje i prikupljanje uzoraka za dodatne analize provedena su svakih 7 dana (engl. *week post inoculation*; tjedan nakon inokulacije ili wpi) tijekom 8 tjedana, ili 6 tjedana za INA ili MeJA tretirane biljke. Morfološki parametri praćeni tijekom pokusa bili su: visina biljke, masa sistemski inficiranih listova (L₁-L₃) te masa vršnih listova (VL₃-VL₆). Napravljena je datoteka digitalnih slika za svaku biljku. Pri uzorkovanju su sa svake biljke odvojeno sakupljeni neinokulirani, sistemski listovi neposredno iznad mjesta inokulacije (L₁-L₃) (Slika 9.), te vršni listovi (VL₃-VL₆). Mock i biljke inficirane s PSTVd uzorkovane su istog dana. Dobiveni materijal je odmah zamrznut u tekućem dušiku i držan na -80 °C do daljnje analize (za izolaciju RNA, analizu ekspresije gena, itd.). Uzorci korišteni za mikroskopsku detekciju nakupljanja H₂O₂ i kaloze odmah su stavljeni u otopinu 3,3'-diaminobenzidina (DAB) za detekciju H₂O₂ i 95% EtOH za detekciju kaloze.



Slika 9. Svježe sakupljeni listovi (L₁-L₃) sa mock biljaka divljeg tipa (wt) 6 tjedana nakon inokulacije (6 wpi). Strelicama su naznačene liske korištene za naznačene analize, ostali neoznačeni listići upotrijebljeni su za izolaciju RNA.

2.6. Izolacija ukupne RNA

Prije izolacije RNA sva je oprema sterilizirana, a sve su površine obrisane deterdžentom za uklanjanje RNase (20% SDS, 10 M NaOH, 0,5 M EDTA). Uzorci tkiva iz svježe sakupljenih listova krumpira (*Solanum tuberosum* cv. Désirée) pohranjeni na -80 °C usitnjeni su u fini prah upotrebom hladnog tučka i tarionika i tekućeg dušika. Ukupna RNA izdvojena je iz 0,2 g praha zamrznutog tkiva pomiješanog s 0,8 ml TRI Reagents® (Zymo Research, Irvine, CA, USA) pomoću kompleta Directzol RNA Mini Prep Plus (Zymo Research, Irvine, CA, USA), prema preporukama proizvođača uz manje izmjene. Koncentracija i čistoća RNA (omjeri apsorpcije A260/A280 i A260/A230) procijenjeni su spektrofotometrijski upotrebom Nanodrop UV/VIS spektrofotometra NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Uzorci izdvojene RNA pohranjene su na -80 °C do upotrebe za daljnju analizu.

2.7. RNASeq analiza

Za izradu cDNA biblioteka korišteni su uzorci ukupne RNA iz listova krumpira sakupljeni 5 tjedana nakon inokulacije (wpi). Nakon izolacije pomoću Zymo Direct Plus kompleta za izolaciju RNA uz tretman DNazom (Zymo Research, Irvine, CA, USA) uzorci ukupne RNA dodatno su pročišćeni primjenom Zymo RNA Clean & Concentrator kompleta (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Čistoća i integritet izolirane RNA procijenjena je na temelju

vrijednosti RIN (engl. *RNA integrity number*) pomoću uređaja 2100 Bioanalyzer), te su uzorci s RIN > 7 odabrani za RNASeq analizu.

Ukupno su napravljene 24 knjižnice cDNA, iz uzoraka RNA iz listova triju mock- i triju PSTVd-inokuliranih biljaka za svaku liniju (wt, *NahG*, *opr3* i *coi1*) sakupljenih 5 wpi. Sve knjižnice su pripremljene korištenjem TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina) prema standardnim postupcima servisa Macrogen (Seul, Južna Koreja), dok je sekvenciranje izvršeno na Illumina NovaSeq 6000 platformi s obostranim (engl. *paired-end*) očitanjima sekvenci duljine 100 bp. Kvaliteta očitavanja provjerena je alatom FastQC, a uređeni podaci nakon uklanjanja sekvenci za adaptore, mapirani su na referentni genom, SolTub_3.0 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000226075.1/) pomoću HISAT2 (<https://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>). Transkripti su sastavljeni korištenjem Stringtie, dok su za svaki uzorak izračunati broj očitavanja, FPKM (engl. *Fragment per Kilobase of transcript per Million mapped reads*, fragmenti po kilobazi transkripta po milijun mapiranih očitavanja) i TPM (engl. *Transcripts Per Kilobase Million*, transkripti po kilobazi milijun).

Identifikacija diferencijalno eksprimiranih gena (DEG) i funkcionalna analiza ontologije gena (engl. *gene ontology*, GO) provedena je u servisu Macrogen. Za analizu DEG upotrijebljen je alat DESeq2, dok je za GO funkcionalnu analizu, DEG primijenjen alat gProfiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/orth>). GO termini s prilagođenom (engl. *adjusted*) p-vrijednosti < 0,05 smatrani su značajno obogaćenima. Daljnja funkcionalna analiza DEG s $|\log_2 FC| \geq 2$ i p-vrijednosti $\leq 0,05$ provedena je korištenjem online zbirke baze podataka Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>), uz pomoć R paketa KEGGREST. Za vizualizaciju puteva diferencijalno eksprimiranih gena tijekom infekcije PSTVd korišten je MapMan program (<https://mapman.gabipd.org/mapman>), dok je za konverziju ID gena korišten alat gProfiler alat (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/convert>). Za kreiranje Vennovih dijagrama korišten je R paket VennDiagram.

2.8. Izrada početnica za praćenje ekspresije gena

Početnice za praćenje ekspresije gena u vrsti *Solanum tuberosum* kreirane su na temelju nukleotidnih sekvenci za DEG identifikiranih analizom transkriptoma listova krumpira. Početnice za umnažanje cDNA konstruirane su pomoću programa Primer3Plus (Untergasser i

sur., 2012). Prilikom izrade početnica pazilo se na faktore koji omogućuju efikasno i specifično umnažanje željenog cDNA fragmenta metodom qPCR, uključujući optimalnu duljinu početnica (18 - 25 pb) i temperaturu taljenja (55 - 65 °C, ne više od 2 °C razlike između para početnica). Za provjeru specifičnosti konstruiranih početnica za ciljni gen, svaki par početnica poravnat je s mRNA sekvencama homolognih gena pomoću programa Clustal Omega (Sievers i sur., 2011). Kao referentni gen (engl. *housekeeping gene*) korišten je gen zafaktor elongacije 1 α (*EF α 1*) (Expósito-Rodríguez i sur., 2008). Početnice su sintetizirane u servisu Macrogen Europe B.V. (Amsterdam, Nizozemska).

2.9. One-step RT-PCR za detekciju viroidne RNA

Reakcijska smjesa za duplex One-step RTqPCR za detekciju viroidne RNA sadržavala je ukupnu biljnu RNA ekstrahiranu iz tkiva lista, početnice i probu specifičnu za viroid PSTVd (Boonham i sur., 2004), početnice i probu za biljni gen koji kodira citokrom oksidazu (cox) (Weller i sur., 2000) za praćenje umnažanja i provjeru integriteta uzoraka biljne cDNA, te mješavinu reagensa Brilliant III - Real-Time PCR Master Mix (Agilent).

U reakcijskim pločama s 96 jažica postavljene su TaqMan PCR reakcije, a svaka reakcija od 10 μ l sadržavala je: 2 μ l RNA (koncentracije 20 ng/ μ l), 5 μ l 2 $\times$ qRT-PCR MasterMix (Agilent Brilliant III Ultra-Fast RTqPCR), 0,4 μ l seta početnica PSTVd 231F/296R MIX (10 μ M), 0,15 μ l seta početnica cox F/R MIX (10 μ M), 0,4 μ l PSTVd sonde 251T (FAM) (5 μ M), 0,15 μ l cox probe (HEX) (5 μ M) (Tablica 1.), 0,1 μ l 100 nM DTT i dH₂O u volumenu do 1,3 ul. Testovi su provedeni na Bio-Rad CFX96 PCR instrumentu u stvarnom vremenu (BioRad) u sljedećim uvjetima ciklusa: 10 min na 50 °C, 3 min na 95 °C, 40 ciklusa od 5 min na 95 °C, i 1 min na 60 °C.

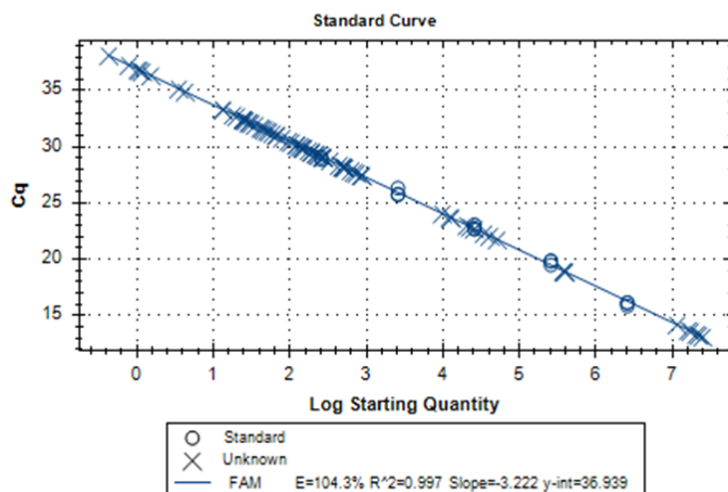
Tablica 1. Početnice korištene za kvantifikaciju PSTVd upotrebom one step RT-qPCR

Naziv početnice/ sonde	Nukleotidna sekvenca 5'-3'	Referenca
PSTVd-F	GCCCCCTTTGCGCTGT	Boonham i sur., 2004
PSTVd-R	AAGCGGTTCTCGGGAGCT T	
PSTVd - Sonda	FAM-5'-CAGTTGTTTCCACCGGTTAGTAGCCGA-3' TAMRA	
COX-F	CGTCGCATTCCAGATTATCCA	Weller i sur., 2000
COX-R	CAACTACGGATATATAAGRRCCRRACCTG	
COX - Sonda	HEX-5'-AGGGCATTCCATCCAGCGTAAGCA-3' TAMRA	

F - Uzvodna početnica

R - Nizvodna početnica

Koncentracija ciljne viroidne RNA određena je na temelju usporedbe rezultata amplifikacijskih krivulja uzoraka s rezultatima standardne krivulje. Standardna krivulja izrađena je korištenjem serijskih razrjeđenja umnožene viroidne ds cDNA (PCR produkta) poznate koncentracije u rasponu od 10^{-3} do 10^{-8} , a njena efikasnost i linearni raspon potvrđeni su visokom korelacijom (R^2) (Slika 10.). Korištenjem jednadžbe regresijske linije standardne krivulje, na temelju C_t vrijednosti (vrijednost praga ciklusa, engl. *threshold cycle*) uzoraka (os y), izračunata je količina viroidne RNA, izražena u pikogramima po mikrolitru iz koje je izračunat broj kopija viroidne RNA. Ovaj pristup omogućuje preciznu kvantifikaciju viroidne RNA u različitim uzorcima, osiguravajući pouzdanost i ponovljivost rezultata.



Slika 10. Standardna krivulja za kvantifikaciju viroidne RNA u RT-qPCR analizi: izrađena na temelju serijskih razrjeđenja standarda poznate koncentracije (u rasponu razrjeđenja od 10^{-3} do 10^{-8}). Slika preuzeta iz programa Bio-Rad CFX Maestro nakon analize.

2.10. Sinteza cDNA (reverzna transkripcija)

Za sintezu cDNA korištena je SuperScript IV reverzna transkriptaza (Thermo Fisher Scientific). Uz nekoliko prilagodbi, proces je izveden prema uputama proizvođača. Početni korak bio je vezanje početnica na RNA matrice. 5 µg uzorka RNA, 1 µl dNTP mješavine (10 mM) i 1 µl Oligo dT (50 µM) pomiješano je s vodom bez nukleaze do 12 µl (ukupni volumen reakcije A). Nakon kratkotrajnog centrifugiranja, smjesa je zagrijavana na 65 °C 5 min, a zatim je ohlađena 1 min na ledu. Reakcijska mješavina za reverznu transkripciju napravljena je u drugom koraku miješanjem 4 µl 5xSSIV pufera, 1 µl DTT (100 mM), 1 µl SuperScript IV reverzne transkriptaze (200 U/µl) i 1 µl inhibitora RNaze (ukupni volumen mješavine B 7 µl. Nakon dodavanja 7 µl mješavine B u 13 µl mješavine A (ukupni volumen RT reakcije 20 µl) u svaki uzorak, oni su centrifugirani. Koristeći Applied Biosystems Gene Amp 2700 PCR System (Applied Biosystems, Massachusetts, SAD), reakcija inkubacije je provedena prema sljedećem protokolu: prvo je inkubirano na 42 °C tijekom 60 min; zatim 10 min na 70 °C ; te je naposljetku držano na 4 °C do daljnjih koraka. Na kraju RT reakcije, molekule cDNA razrijeđene su 50 puta kako bi se postigla konačna koncentracija od 5 ng/µl cDNA. Tako pripremljeni cDNA uzorci pohranjeni su na -20 °C do upotrebe.

2.11. Umnožavanje cDNA i analiza ekspresije gena metodom RTqPCR

Specifičnost i učinkovitost dizajniranih početnica za analizu ekspresije gena ispitana je metodom RTqPCR. Smjesa za svaku RTqPCR reakciju sastojala se od 5 µl SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (2x) i 2,9 µl dvostruko destilirane vode (engl. *double-distilled water*, ddH₂O). Ova otopina nadopunjena je sa 0,1 µl pripremljene mješavine početnica za različite ispitivane gene (30 µmol/l). Zatim, za RTqPCR, 2 µl razrijeđenog uzorka cDNA (5 ng/µl) i 8 µl reakcijske smjese (ukupni volumen reakcije 10 µl) stavljeno je u jažice mikrotitrarske ploče. Tri neovisna ponavljanja reakcije za isti uzorak cDNA kopije svakog uzorka nanese su na ploču. Zatim je korištena FastGene Plate Centrifuge (Nippon Genetics) za centrifugiranje ploče. Za izvođenje svih RTqPCR reakcija korišteni su C1000 Touch Thermal Cycler i CFX96 Real-Time PCR Detection System tvrtke Bio-Rad. Uvjeti ciklusa bili su sljedeći: 30 sekundi početne denaturacije na 95 °C, 40 ciklusa denaturacije na 95 °C po 10 sekundi i 20 sekundi vezanja početnica i elongacije na 60 °C. Zatim je u temperaturnom rasponu od 65 do 95 °C izvedena analiza za generiranje krivulje taljenja.

U sistemski inficiranim listovima mjerena je ekspresija marker gena koji su povezani sa signalnim putevima za biosintezu i signaling JA (LOX - *lipoxygenase*; OPR3 - *12-oxophytodienoate reductase 3*; JAR1 - *jasmonate resistant 1*; COI1 - *coronatine insensitive protein 1*; JAZ1 - *jasmonate zim domain protein 1*; MYC2 - *MYC-like transcription factor 2*), za biosintezu i signaling SA (SARD - *SAR DEFICIENT 1*; ICS - *isochorismate synthase*; PAL - *phenylalanine ammonia-lyase*; NPR1 - *nonexpressor of pathogenesis-related gene 1*; SCMT - *Salicylic acid carboxyl methyltransferase*), za biosintezu i signaling ostalih fitohormona (DWF4 - *citokrom P450 90B1*; ROT3 - *rotundifolia3*; ILR1 - *ILR1-like 1*; ARF8 - *auxin response factor 8*; CYP707A1 - *cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 1*; PYL4 - *pyrabactin resistance-like 4*) regulaciju antioksidacijskog odgovora i MAPK signaling (POD - *cell wall associated extracellular peroxidase*; APX - *ascorbate peroxidase*; CAT - *catalase*; CalS12 - *callose synthase 12*; MPK - *mitogen activated protein kinase*) i odgovora na patogene (PR1 - *pathogenesis related protein 1*; PR2 - *pathogenesis related protein 2*; PRQ - *pathogenesis-related protein Q*). Lista početnica korištenih za RTqPCR analize ekspresije gena nalazi se u Prilogu 1.

Metoda $2^{-\Delta\Delta CT}$ (delta-delta Ct) korištena je za izračun relativne ekspresije specifičnih gena (engl. *fold change*, FC) uz pomoć softvera CFX Maestro v1.1 (Bio-Rad) (Livak & Schmittgen, 2001). Omjer zastupljenosti transkripta pojedinog ciljnog gena u odnosu na referentni gen, elongacijski faktor 1α (*EF α 1*), u inficiranim (PSTVd) biljkama, normaliziran je u odnosu na mock biljke (kontrolni uzorak). Promjena ekspresije specifičnog gena u odnosu na referentni gen, izražena kao FC, što je rezultat $2^{-\Delta\Delta CT}$ (delta-delta Ct) vrijednosti, otkriva promjene u ekspresiji gena u usporedbi s referentnim genom. Vrijednost FC 0 označava da nema promjena, vrijednosti veće od 0 označavaju pojačanu regulaciju, a vrijednosti niže od 0 označavaju smanjenu regulaciju ciljnog gena u usporedbi s referentnim. Rezultat ekspresijskih analiza prikazani su kao promjena u regulaciji ekspresije (fold regulation (FR) = log2 promjene FC).

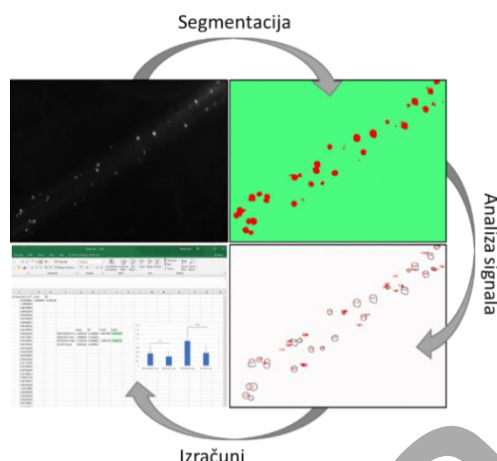
2.12. Detekcija nakupljanja H₂O₂ u tkivu listova

U reakciji s bojom 3,3-diaminobenzidinom (DAB), H₂O₂ stvara talog smeđe boje u biljnim tkivima. Akumulacija H₂O₂, najstabilnije ROS i glavne signalne molekule u aktivaciji antioksidativnog odgovora, analizirana je u svježe sakupljenim sistemskim listovima (L₁-L₃). Listovi su obojeni otopini DAB koja je pripremljena otapanjem 50 mg DAB u 45 ml sterilne

H₂O zakiseljenoj (pH < 3) s nekoliko kapi 0,2 M HCl. Otopinu DAB potrebno je čuvati u tami zbog njezine fotosenzitivnosti. Paralelno je pripremljena 200 mM otopina Na₂HPO₄ otapanjem 1,78 g Na₂HPO₄ u 50 ml vode. Zatim je 2,5 ml te otopine dodano u otopinu DAB zajedno s 25 µl otopine Tween 20. Zatim, dodavanjem 2,5 ml 200 mM Na₂HPO₄ u 47,5 ml sterilne deionizirane vode, pripremljena je 10 mM Na₂HPO₄ otopina koja je korištena za inkubaciju kontrolnih listova. Nakon inkubacije, listovi su pohranjeni u 95%-tnom etanolu kako bi se uklonio klorofil, prema protokolu Daudi i sur. (2012). DAB polimerizirane crvenkasto-smeđe mrlje, koje su nastale na mjestima gdje je došlo do nakupljanja H₂O₂ u lisnom tkivu, promatrane su pod stereo mikroskopom Zeiss Stereo Discovery V20. Akumulacija H₂O₂ definirana je kao ukupni broj piksela u definiranom području digitalne slike analizirane pomoću ImageJ v1.46. Analiza je provedena na tri biološka ponavljanja po uzorku lista svake biljke (mock i inficirane biljke).

2.13. Lokalizacija i kvantifikacija kaloze

Svježe sakupljeni sistemski listovi (L1-L3) pohranjeni su u 95% etanolu kako bi se uklonio klorofil, koji bi inače mogao utjecati na rezultate detekcije i kvantifikacije kaloze na način da izaziva pozadinsku fluorescenciju i smanjuje kontrast između ciljnih struktura i okolnog tkiva, čime bi otežao preciznu analizu. Bojanje anilinskim modrilom, kao i naknadna analiza naslaga kaloze pomoću programa Fiji (Slika 11.), provedene su prema protokolu Mason i sur. (2020) s manjim izmjenama. Listovi odbojani u 95% EtOH rehidrirani su u 67 mM K₂HPO₄ puferskoj otopini i inkubirani u 0,01% otopini anilin plavog u 67 mM K₂HPO₄ puferskoj otopini 12 sati (preko noći). Dva do tri lista po tretmanu promatrana su pod Olympus BX51 fluorescentnim mikroskopom opremljenim Olympus DP70 kamerom, koristeći DAPI filter (ekscitacija 340-380 nm, emisija 435-485 nm). Slike fluorescencije (F) i svijetlog polja (BF) snimljene su pri 10x povećanju i vremenu ekspozicije od 1/55 sekunde. Postupak kvantifikacije uključivao je obrezivanje slike (miču se dijelovi slike koji nisu pogodni za analizu poput presavijenih ili potrganih dijelova lista, vanjskog ruba preparata, i sl.), segmentaciju i analizu signala, a konačna slika je prikazivala analizirane kalozne naslage na obrađenoj (izrezanoj) površini lista. Mjerenja su se temeljila na analizi najmanje 6 slika po uzorku po biljci. Za statističku analizu korišteni su jednosmjerna analiza varijance (One-way ANOVA) i post-hoc Tukey HSD test (p < 0,05).



Slika 11. Koraci u kvantifikaciji kaloze pomoću programa Fiji.

2.14. UHPLC-MS/MS analiza hormona stresa

Analiza profila fitohormona napravljena je u listovima (L_1 - L_3) i gomoljima sistemski inficiranih biljaka i njihovih neinficiranih kontrola za sve ispitane biljne linije krumpira. Uzorci su sakupljeni u 4 vremenske točke (4, 5, 6 i 7 wpi) kroz 2 pokusa i najmanje tri biološke replike po biljci po tretmanu. Analiziran je seta fitohormona uključenih u odgovor na stresa: SA, jasmonati (*cis*-(+)-12-okso-fitodienne kiseline (*cis*-OPDA), JA i jasmonoil-izoleucin (JA-Ile)), ABA i AUX. Usporedno, ali uz primjenu različite metode, analiziran je sadržaj brasinosteroida- kastasterona (CS), bioaktivnu formu BR.

Analiza fitohormona napravljena je u Laboratoriju za regulatore rasta, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany ASCR i Sveučilište Palacký, Olomouc, Republika Češka.

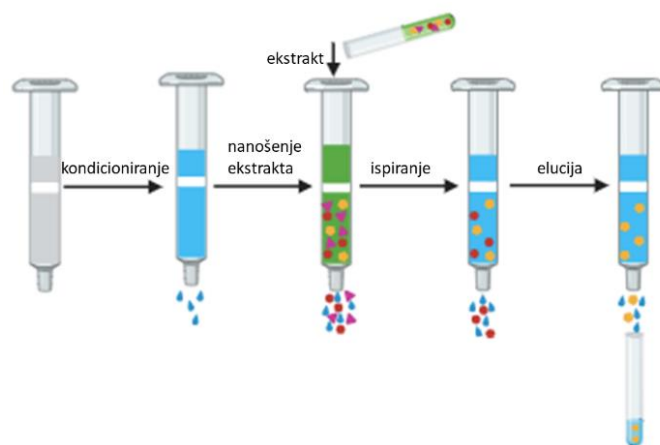
2.14.1. Analiza hormona stresa

Ekstrakti za analizu fitohormona (i metabolita općenito) pripremaju se neposredno prije same analize, kako ne bi došlo do njihove razgradnje. Pripremljeni su ekstrakti iz 380 uzoraka listova te 189 uzoraka gomolja. Od svakog uzorka odvagano je oko 10-12 mg tkiva u čistu, sterilnu tubicu. Odvaga se napravila četiri puta za svaki uzorak-napravljene su dvije tehničke replike za ekstrakciju hormona stresa, i dvije tehničke replike za ekstrakciju BR.

Analiza hormona stresa sastojala se od nekoliko koraka, ekstrakcije, purifikacije te filtracije i prijenosa na inserte. Svi koraci morali su biti odrađeni u hladnim uvjetima pa su korišteni rashladni blokovi, uzorci su nakon odvage pohranjeni na -80 °C, a sve otopine na 4 °C neposredno prije korištenja. Pripremljene su otopine metanola (MeOH) za korake ekstrakcije i purifikacije, uključujući 10% i 80% otopine MeOH. Za pripremu ovih otopina korišten je 100% MeOH (Supelco, gradient grade for liquid chromatography) i deionizirana voda (Milli-Q).

Svježe zamrznuto tkivo listova i gomolja usitnjeno je pomoću tekućeg dušika u tarioniku do finog praha. Uzorci (10-12 mg tkiva) su homogenizirani u kugličnom mlinu (10 min, 27 Hz, Retsch GmbH, Haan, Njemačka) uz dodatak četiri keramičke kuglice (cirkonij oksid, 2 mm) u 1 ml hladnog ekstrakcijskog pufera 10% MeOH te 10 µl internih standarda (za hormone stresa). Interni standardi za hormone stresa uključuju izotopno obilježene oblike hormona, koji omogućuju preciznu kvantifikaciju u analizama. Korišteni standardi uključuju D2-JA-Ile 5 pmol/10µl, D4-SA 20 pmol/10µl, D6-JA, D5-OPDA, D6-ABA, i 13 C6-IAA 10 pmol/10µl, a svi su označeni deuterijem ili izotopima ugljika kako bi se koregirale varijacije u ekstrakciji, pripremi uzoraka i analizi. Ovi standardi služe za praćenje koncentracija hormona stresa poput JA, SA, ABA, IAA i drugih, omogućujući točnu kvantifikaciju u uzorcima. Alikvoti internog standarda pohranjeni su na -20 °C. Po završetku, homogenati su centrifugirani (15 min, 20 000 rpm, 4 °C).

Supernatanti su pročišćeni na SPE (engl. Solid Phase Extraction) MAX kolonama za anionsku izmjenu (1 cc/30 mg Oasis®, Waters, Milford, MA, SAD). SPE pročišćavanje uzoraka obuhvaćalo je iduće korake: 1) kondicioniranje kolone s 2x 1 ml 100% MeOH te 1x 1 ml deionizirane (Milli-Q) H₂O; 2) nanošenje uzorka na kolonu (oko 960 µL); 3) ispiranje kolone s 1x 1 ml 10% MeOH; 4) elucija s 3x 1 ml 80% MeOH. Eluati iz koraka 1 do 3 se odbacuju i nisu uključeni u analizu, dok se eluat iz koraka 4 skupio u označenu staklenu epruvetu (Slika 12.). Uzorci su upareni u vakuum uparivaču na 37 °C i pohranjeni na -20 °C do analiza.



Slika 12. Shema pročišćavanja ekstrakta na SPE kolonama. Slika je izrađena pomoću BioRender.com.

Neposredno prije analize uzorci su pročišćeni filtriranjem na SPE koloni i prenešeni u inserte. Evaporirani uzorak (talog) otopljen je u 40 μ L mobilne faze (20% acetonitril u deioniziranoj (Milli-Q) vodi). Uzorci su zatim sonicirani 5 min te vorteksirani. Nakon toga profiltrirani su kroz Micro-spin® filtere (0,2 μ m, Grace; 3 min pri 8000 rpm) i 10 μ L svakog uzorka je injektirano u RP kolonu (Kinetex C18 100A; 2,1 $\times$ 50 mm, 1,7 μ m; Phenomenex).

Analiza hormona stresa provedena je korištenjem 6550 ESI-Q-TOF (Agilent Technologies, Njemačka) povezanog sa 1260 Infinity UHPLC sustav (Agilent Technologies, Njemačka) prema metodi Floková i sur. (2014) uz manje modifikacije.

2.14.2. Analiza brasinosteroida (BR)

Analiza BR sastojala se od nekoliko koraka, ekstrakcije, purifikacije te filtracije i prijenosa na inserte. Uzorci tkiva su nakon odvage pohranjeni na -80 °C, a sve otopine na 4 °C neposredno prije analize. Pripremljeni su 60% acetonitril (ACN) i interni standardi za BR.

Biljni materijal usitnjen je pomoću tekućeg dušika u tarioniku do finog praha. Uzorci (10-12 mg tkiva) su homogenizirani u kugličnom mlinu (5 min, 27 Hz, Retsch GmbH, Haan, Njemačka) uz dodatak tri keramičke kuglice (cirkonij oksid, 2 mm) u 1 ml hladnog ekstrakcijskog pufera 60% ACN te 25 μ L internih standarda (za BR) koji su stabilni, izotopom označeni interni standardi za BR otopljeni u 100% MeOH. Homogenati su inkubirani u

ultrazvučnoj kupelji 3 min te ekstrahirani preko noći na laboratorijskom rotatoru (17 rpm, 4 °C, Stuart, Staffordshire, UK).

Nakon toga uzorci su centrifugirani (15 min, 20 000 rpm, 4 °C) i supernatanti su prebačeni u čiste sterilne borosilikatne staklene tubice (5 ml). Supernatanti su pročišćeni na SPE (engl. *Solid Phase Extraction*) kolonama (50 mg Discovery®, DPA-6S kolone, Sigma-Aldrich Co. LLC). SPE pročišćavanje uzoraka uključuje kondicioniranje kolone s 1x 1 ml 100% MeOH te 1x 1 ml 60% ACN nakon čega se uzorak nanosi na kolonu (1 ml). Eluat je sakupljen u označenu staklenu epruvetu. Uzorci su upareni u vakuum uparivaču na 37 °C i pohranjeni na -20 °C do analiza.

Analiza BR izvršena je na uređaju Acquity UPLC® System (Waters, Milford, MA, SAD) povezanom na Xevo™ TQ MS trostruko kvadripolni spektrometar masa (Waters MS Technologies, Manchester, UK) i opremljenom s elektronskim ionizatorom (ESI) prema metodi Tarkowská i Strnad (2017) uz manje modifikacije uz dodatak internih standarda koji sadrže izotop za nekoliko različitih BR prema (Oklestkova i sur., 2017).

2.15. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka napravljena je u programu XLSTAT 2016 (Addinsoft, New York, SAD) uz primjenu analize varijance (engl. *analysis of variance* - ANOVA) i Tukey HSD (engl. *honest significant difference*) *post hoc* testa višestrukog uspoređivanja. Statistički značajne razlike prikazane su različitim slovima uz razinu značajnosti od $p < 0,05$.

Studentov t-test korišten je za usporedbu srednjih vrijednosti između tretiranih i kontrolnih skupina nakon prethodne normalizacije podataka. Statistički značajne razlike uz razinu značajnosti od 0,05 ($p < 0,05$) prikazane su zvjezdicama pri čemu *, **, i *** odgovaraju redom p-vrijednostima $0,05 > p > 0,01$; $0,01 > p > 0,001$; i $p < 0,001$.

Svi rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti $\pm$ standardne pogreške (SE) gdje je u opisu slike za svako mjerenje naveden broj ponavljanja.

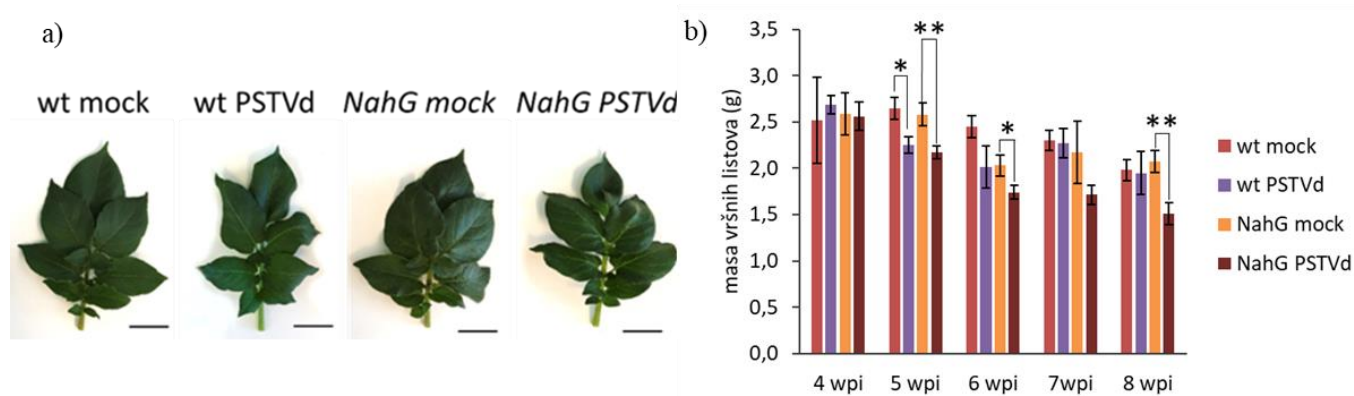
3. REZULTATI

3.1. Fiziološki i biokemijski odgovori biljaka krumpira na infekciju PSTVd

3.1.1. Razvoj simptoma u SA-deficijentnim biljkama

Prvi vidljivi simptomi pojavili su se u 4 wpi na malom broju (4 od 10) *NahG* biljaka i wt biljaka inficiranih viroidom PSTVd. U 5 wpi, na svim inficiranim *NahG* i wt biljkama pojavili su se blagi simptomi, poput smanjene veličine vršnih listova koji rastu prema gore (Slika 13.a). U kasnijoj fazi infekcije (6 do 8 wpi), simptomi poput deformacije, žućenja i opadanja listova bili su izraženiji na *NahG* biljkama u usporedbi s biljkama divljeg tipa (Slika 13.b). Nisu uočeni simptomi kod nezaraženih biljaka inokuliranih viroidom (mock kontrola).

Visina biljaka tijekom svih tjedana bila je slična za mock biljke u obje tretirane linije, dok su inficirane biljke bile viši od mock biljaka u obje linije. U 4 do 8 wpi vidljiva je statistička značajnost u prosječnoj visini biljaka kod wt linije, dok je kod *NahG* linije statistička značajnost u prosječnoj visini biljaka vidljiva u 5 i 6 wpi (Slika 13.c).



Slika 14. Učinak PSTVd na izgled vršnih listova i njihovu masu kod inficiranih i neinficiranih wt i *NahG* biljaka krumpira a) Simptomi infekcije PSTVd na sistemski inficiranim vršnim listovima (VL₅) krumpira i mock listovima wt i *NahG* linije krumpira, 6 wpi Crna crta duga je 3 cm. b) Graf s prikazom dinamike promjene u masi vršnih listova sistemski inficiranih PSTVd i mock listova wt i *NahG* linija krumpira. Masa svježih listova izmjerena je od 4 do 8 wpi. Zvezdice označavaju statističke značajne razlike u usporedbi s pripadajućom kontrolom ($\pm$ SE, n=4-6) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ u Studentovom t-testu).

Na gomoljima PSTVd inficiranih biljaka krumpira vidljive su karakteristične promjene kod obje testirane linije. Gomolji na inficiranim biljkama su nepravilno izduženi te imaju svjetliju boju. Inficirani gomolji su manji veličinom i imaju nižu kvalitetu prinosa (Slika 15. i Tablica 2.).



Slika 15. Razvoj simptoma viroidne bolesti vretenastog gomolja krumpira (PSTVd) na gomoljima wt, i *NahG* biljaka, 7 wpi. Na slikama je vidljivo smanjenje rasta i deformacija gomolja kod zaraženih biljaka. Crna crta duga je 3 cm.

Tablica 2. Prikaz promjene u masi i broju gomolja inficiranih i mock biljaka wt i *NahG* linija krumpira. Masa i broj gomolja izmjerene su od 5 do 8 wpi. Zvezdice označavaju statistički značajne razlike u usporedbi s pripadajućom kontrolom (n=4-6).

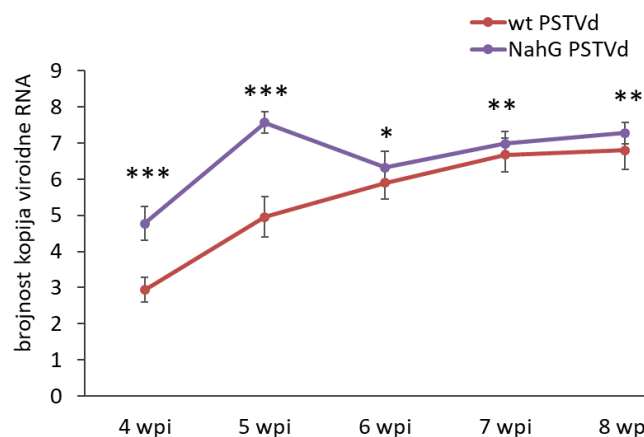
parametar	tretman	tjedni nakon inokulacije (wpi)			
		5	6	7	8
BROJ GOMOLJA	wt mock	5,00	1,00	10,00	14,00
	wt PSTVd	0,00	1,00	10,00	10,00
	<i>NahG</i> mock	6,00	8,00	6,00	15,00
	<i>NahG</i> PSTVd	0,00	5,00	7,00	0,00
UKUPNA MASA GOMOLJA (g)	wt mock	6,29	1,00	17,75	20,16
	wt PSTVd	0,00	1,80	7,39	7.60 *
	<i>NahG</i> mock	5,85	14,30	24,01	23,00
	<i>NahG</i> PSTVd	0,00	1.94*	6.73*	0,00
PROMJER GOMOLJA (cm)	wt mock	2,95	1,00	3,95	4,74
	wt PSTVd	0,00	1,20	3,53	2.62*
	<i>NahG</i> mock	2,43	3,45	4,20	5,93
	<i>NahG</i> PSTVd	0,00	2,30	2,90	0,00

* p < 0,05 u Studentovom t-testu

3.1.2. Dinamika nakupljanja viroidne RNA u SA-deficijentnim biljkama

Dinamika nakupljanja viroidne RNA u sistemski inficiranim listovima (prvi iznad mjesta inokulacije) biljaka divljeg tipa (wt) i *NahG* biljaka, određena 4 do 8 wpi apsolutnom kvantifikacijom pomoću One-step RTqPCR, uz upotrebu specifičnih početnica i sonde za PSTVd i COX gen. Početnice prikazane u Tablici 1. Sve mock inokulirane biljke bile su negativne (Slika 16.).

Značajne razlike u dinamici amplifikacije viroidne RNA zapažene su u 4 i 5 wpi, kada je količina viroidne RNA u *NahG* biljkama bile dvostruko veće nego u biljkama divljeg tipa (Slika 16.). Biljke divljeg tipa (wt), s manjim količinama viroida, pokazivale su manje izražene simptome na listovima.

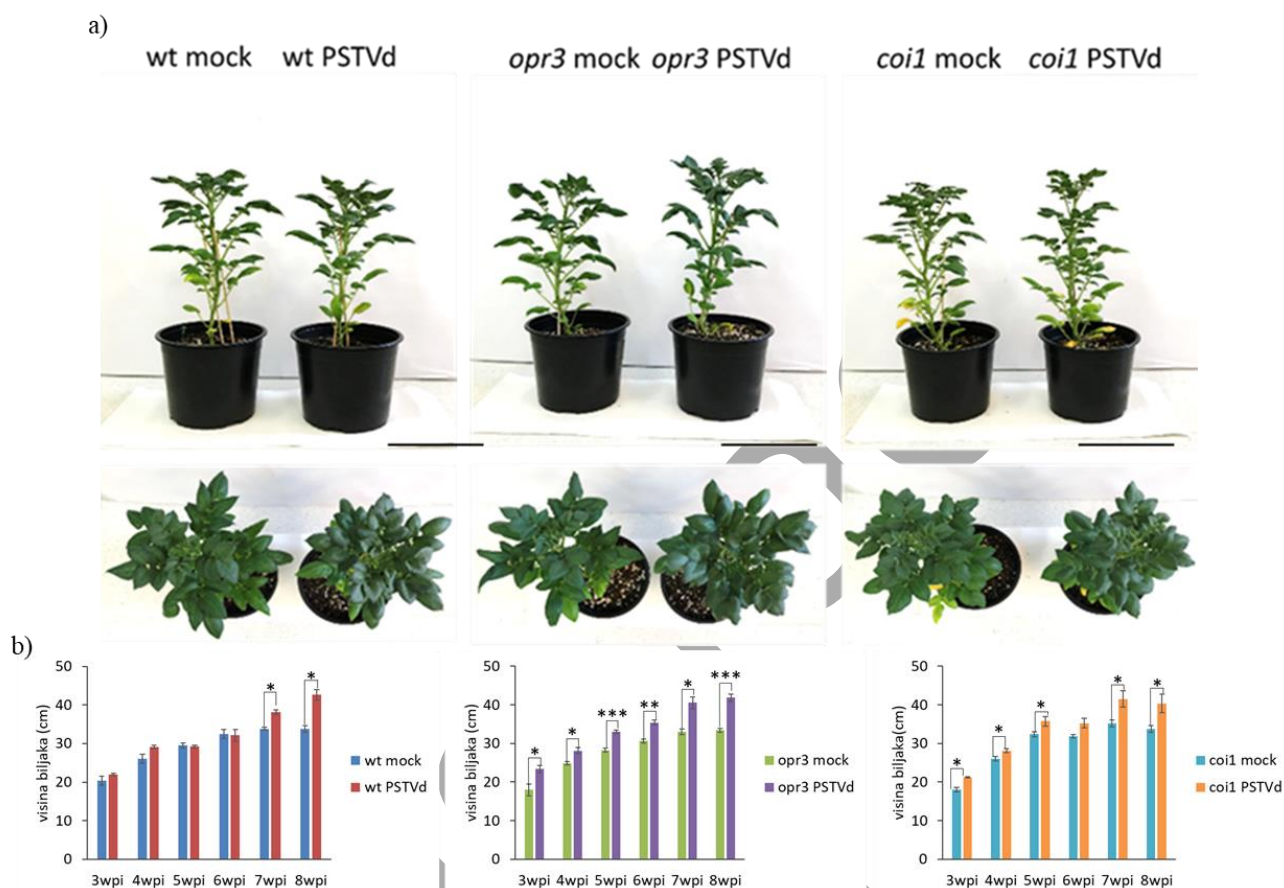


Slika 16. Dinamika akumulacije viroidne RNA u listovima wt i *NahG* linija određena je 4 do 8 wpi pomoću RTqPCR u jednom koraku (One-step RT-qPCR). Vrijednosti pokazuju srednji logaritamski broj kopija viroidne RNA po μg ukupne RNA izolirane iz 6 pojedinačnih biljaka. Sve mock inokulirane biljke bile su negativne. ($\pm\text{SE}$, $n=4-6$, normalizirano na ekspresiju *COX* gena). Zvezdice (*) označavaju statistički značajnu razliku između mock i inficiranih biljaka iste linije temeljene na Studentovom t-testu (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ u Studentovom t-testu).

3.1.3. Razvoj simptoma u JA-deficijentnim i JA-neosjetljivim biljkama

Inficirane biljke linija *opr3*, *coi1* i biljke divljeg tipa (wt) pokazale su blage simptome u 5 wpi, poput izduženja stabljike i smanjene veličine vršnih listova koji rastu prema gore (Slika 17.a).

Visina biljaka od 3 do 8 wpi kod mock biljaka obje tretirane linije bila je jednaka, dok su inficirane biljke imale veću visinu od mock biljaka kod *opr3* i *coi1* linije. U 7 i 8 wpi vidljiva je statistička značajnost kod wt linije, dok je kod *opr3* linije statistička značajnost vidljiva u svim tjednima. Linija *coi1* također pokazuje statističku značajnost u svim tjednima, osim 6 wpi (Slika 17.b).



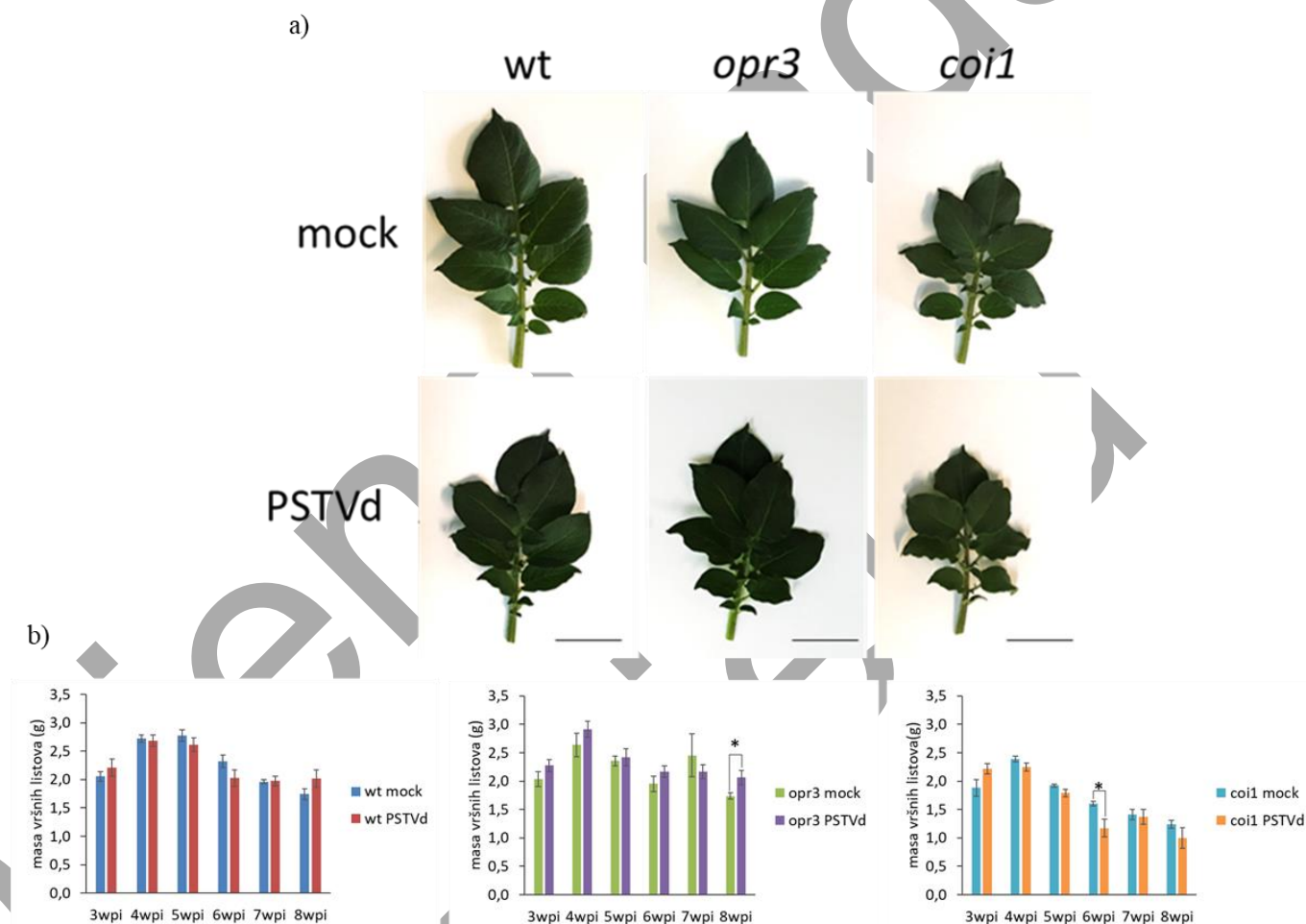
Slika 17. Učinak PSTVd na izgled i rast inficiranih i neinficiranih wt, *opr3*, *coi1* biljaka krumpira. a) Prikaz simptoma na mock i PSTVd inficiranim biljkama krumpira wt, JA-deficijentnih (*opr3*) i JA-neosjetljivih (*coi1*) linija u 5 wpi. Crna crta duga je 15 cm. b) Učinak infekcije PSTVd na visinu kod mock i inficiranih biljaka krumpira wt, *opr3* i *coi1* linija krumpira. Visina biljaka izmjerena je od 3 do 8 wpi ($\pm$ SE, $n=4-6$). Zvezdice označavaju statistički značajne razlike u usporedbi s pripadajućom kontrolom (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ u Studentovom t-testu).

Listovi wt biljaka inficiranih s PSTVd biljaka pokazali su izražene simptome viroidne infekcije, poput smanjenja veličine i promjene u boji, kao i transgenične linije *opr3* i *coi1*. Ovi simptomi, uključujući formiranje šiljastih vrhova listova, kovrčanje (uvijanje) lista te tamniju boju listova, jasno su vidljivi na sistemski inficiranim vršnim listovima (VL₅) biljaka krumpira (Slika 18.a).

Osim vizualnih simptoma, mjerena je i masa vršnih listova u razdoblju od 3 do 8 tjedana, pri čemu su rezultati pokazali opadanje mase listova u svim linijama biljaka, neovisno o mock ili infekciji PSTVd. Iako je opadanje mase listova uočeno u svim linijama, listovi inficiranih *coi1* biljaka bili su manji od listova neinficiranih kontrola kroz sve tjedne, a statistički značajna razlika u masi inficiranih i neinficiranih listova uočena je u 6 wpi, dok je kod *opr3*

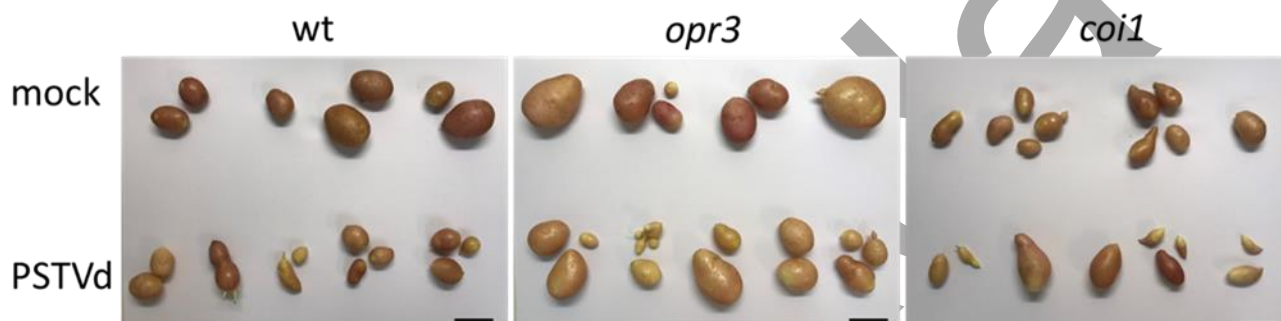
transgeničnih biljaka značajna razlika prisutna tek u 8 wpi gdje je masa inficiranih listova veća od neinficiranih kontrola (Slika 18.b).

Kod wt biljaka, infekcija PSTVd uzrokuje postupno smanjenje mase vršnih listova, osobito u kasnijim fazama infekcije (6 i 7 wpi), što je u skladu s vidljivim morfološkim promjenama i smanjenjem veličine listova.



Slika 18. Učinak PSTVd na izgled vršnih listova i njihovu masu kod inficiranih i neinficiranih wt, *opr3* i *coi1* biljaka krumpira a) Simptomi infekcije PSTVd na sistemski inficiranim vršnim listovima (VL_s) krumpira i mock listovima krumpira wt, *opr3* i *coi1* linija krumpira, 6 wpi ($\pm$ SE, n=4-6). Crna crta duga je 3 cm. b) Graf s prikazom dinamike promjene u masi vršnih listova sistemski inficiranih PSTVd i mock listova wt, *opr3* i *coi1* linija krumpira. Masa svježih listova izmjerena je od 3 do 8 wpi. Zvezdica označava statistički značajnu razliku u usporedbi s pripadajućom kontrolom (* $p < 0,05$ u Studentovom t-testu).

Na gomoljima PSTVd inficiranih biljaka krumpira vidljive su karakteristične promjene u obliku kod svih testiranih linija. Gomolji su nepravilno izduženi te imaju svijetliju boju. Inficirani gomolji su manji veličinom (Slika 19. i Tablica 3.).



Slika 19. Razvoj simptoma viroidne bolesti vretenastog gomolja krumpira (PSTVd) na gomoljima wt, *opr3* i *coi1* biljaka, 8 wpi. Na slikama je vidljivo smanjenje rasta i deformacija gomolja kod zaraženih biljaka. Crna crta duga je 3 cm.

Tablica 3. Prikaz promjene u masi i broju gomolja inficiranih i mock wt, *opr3* i *coi1* linija krumpira. Masa i broj gomolja izmjerene su od 4 do 8 wpi. Zvezdice označavaju statistički značajne razlike u usporedbi s pripadajućom kontrolom (4-6).

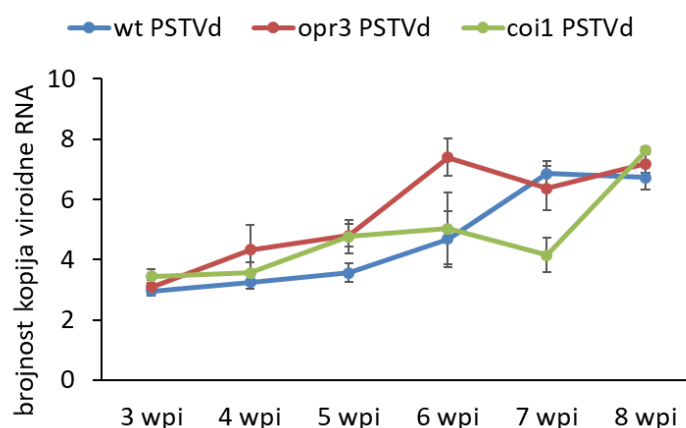
parametar	tretman	tjedni nakon inokulacije (wpi)			
		5	6	7	8
BROJ GOMOLJA	wt mock	3,00	3,00	7,00	7,00
	wt PSTVd	0,00	6,00	5,00	11,00
	<i>opr3</i> mock	2,00	6,00	6,00	7,00
	<i>opr3</i> PSTVd	0,00	4,00	9,00	11,00
	<i>coi1</i> mock	0,00	0,00	7,00	9,00
	<i>coi1</i> PSTVd	0,00	6,00	15,00	9,00
UKUPNA MASA GOMOLJA (g)	wt mock	1,85	3,82	8,43	12,27
	wt PSTVd	0,00	4,03	8,80	6,19
	<i>opr3</i> mock	3,40	4,71	11,82	18,56
	<i>opr3</i> PSTVd	0,00	3,24	11,26	14,93
	<i>coi1</i> mock	0,00	0,00	6,29	7,81
	<i>coi1</i> PSTVd	0,00	4,40	9,97*	7,04
PROMJER GOMOLJA (cm)	wt mock	1,33	1,23	1,46	1,74
	wt PSTVd	0,00	1,26	1,58	1,31
	<i>opr3</i> mock	1,10	1,30	1,56	1,98
	<i>opr3</i> PSTVd	0,00	1,32	1,50	1,62
	<i>coi1</i> mock	0,00	0,00	1,36	1,18
	<i>coi1</i> PSTVd	0,00	0,93	1,24	1,40

* $p < 0,05$ u Studentovom t-testu

3.1.4. Dinamika nakupljanja viroidne RNA u JA-deficijentnim i JA-neosjetljivim biljkama

Kvantifikacija viroidne RNA u JA-deficijentnim i wt biljkama inficiranim viroidom provedena je kako bi se utvrdila dinamika nakupljanja viroidne RNA. Analiza je napravljena na sistemski inficiranim listovima (prvi list iznad mjesta inokulacije) od 3 do 8 wpi upotrebom specifičnih početnica i sonde za PSTVd i *cox* gen (Tablica 1.), koristeći One-step RT-qPCR metodu. Sve mock inokulirane biljke bile su negativne (Slika 20.). Nakupljanje viroidne RNA u L₁₋₂ listovima biljaka krumpira može detektirati u 5 wpi, kada transgenične biljke počinju pokazivati povišene koncentracije viroidne RNA u odnosu na wt biljke.

wt biljke inficirane s PSTVd pokazuju postupnu akumulaciju viroidne RNA s najvećim porastom u 7 i 8 wpi, što ukazuje na progresiju infekcije i akumulaciju viroida unutar biljnog tkiva. S druge strane, *opr3* biljke inficirane s PSTVd pokazuju bržu akumulaciju viroidne RNA u ranijim fazama infekcije (4 do 6 wpi) u usporedbi s wt biljkama, no količina viroidne RNA između ove dvije linije se ujednačuje u kasnijim fazama. Kod *coi1* biljaka inficiranih s PSTVd, akumulacija viroidne RNA manja je nego kod *opr3* linije, ali veća nego kod wt linije, pri čemu je najniža količina viroidne RNA zabilježena u 7 wpi. U kasnijim fazama došlo je do plato faze u nakupljanju viroida u sistemski zaraženim listovima te se viroid nastavio širiti prema mlađim, vršnim listovima.



Slika 20. Dinamika akumulacije viroidne RNA u wt, *opr3* i *coi1* liniji određena je 3 do 8 wpi pomoću RTqPCR u jednom koraku (One-step RT-qPCR). Vrijednosti pokazuju srednji logaritamski broj kopija viroidne RNA po μg ukupne RNA izolirane iz 6 pojedinačnih biljaka. Sve mock inokulirane biljke bile su negativne. ($\pm\text{SE}$, $n=4$, normalizirano na ekspresiju *COX* gena).

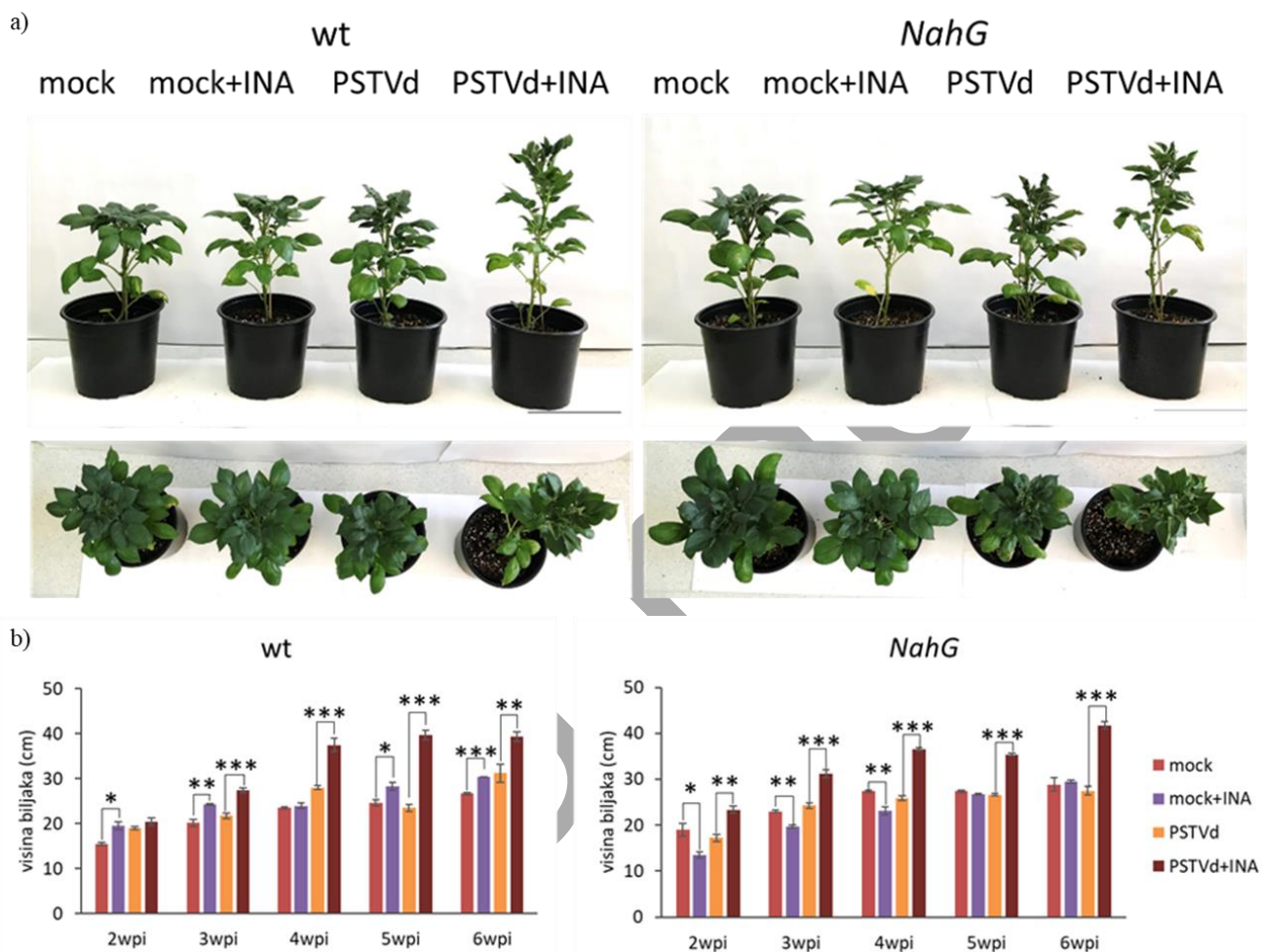
3.2. Učinci egzogenog tretmana hormonima na simptome i rast biljaka inficiranih viroidom

3.2.1. Učinci INA tretmana na razvoj simptoma

Da bi dobili odgovor na pitanje o tome je li pojačana osjetljivost *NahG* biljaka na PSTVd u vezi s njihovom nesposobnosti da akumuliraju SA, biljke smo tretirali s 1 mM otopinom INA, sintetskim analogom SA. INA tretman imao je pozitivan učinak na rast biljaka, posebice na razlike u visini inficiranih biljaka (PSTVd) u odnosu na tretirane inficirane biljke (PSTVd+INA). INA tretirane biljke imale su svjetlije listove, dok su netretirane inficirane *NahG* biljke prve počele razvijati simptome u obliku kloroze donjih listova te tamnijih vršnih listova.

Simptomi su se pojavili u 4 wpi i bili su manje izraženi na listovima biljaka tretiranih INA u usporedbi s netretiranim biljkama inficiranim s PSTVd. U 5 wpi, pozitivan učinak INA bio je jasno vidljiv (Slika 21.a); lisne ploče bile su značajno veće i manje uvijene na INA-tretiranim *NahG* biljkama u usporedbi s netretiranim biljkama. Nakon 6 wpi, razlika u intenzitetu simptoma između INA-tretiranih i netretiranih *NahG* biljaka se smanjila.

Visina biljaka mjerena je od 2 do 6 wpi (Slika 21.b). Najveća prosječna visina zabilježena je kod PSTVd+INA biljaka, dok je najveća statistička značajnost utjecaja tretmana INA na rast inficiranih biljaka u odnosu na netretirane inficirane biljke zabilježena kod PSTVd i PSTVd+INA biljaka u obje (Slika 21.b).



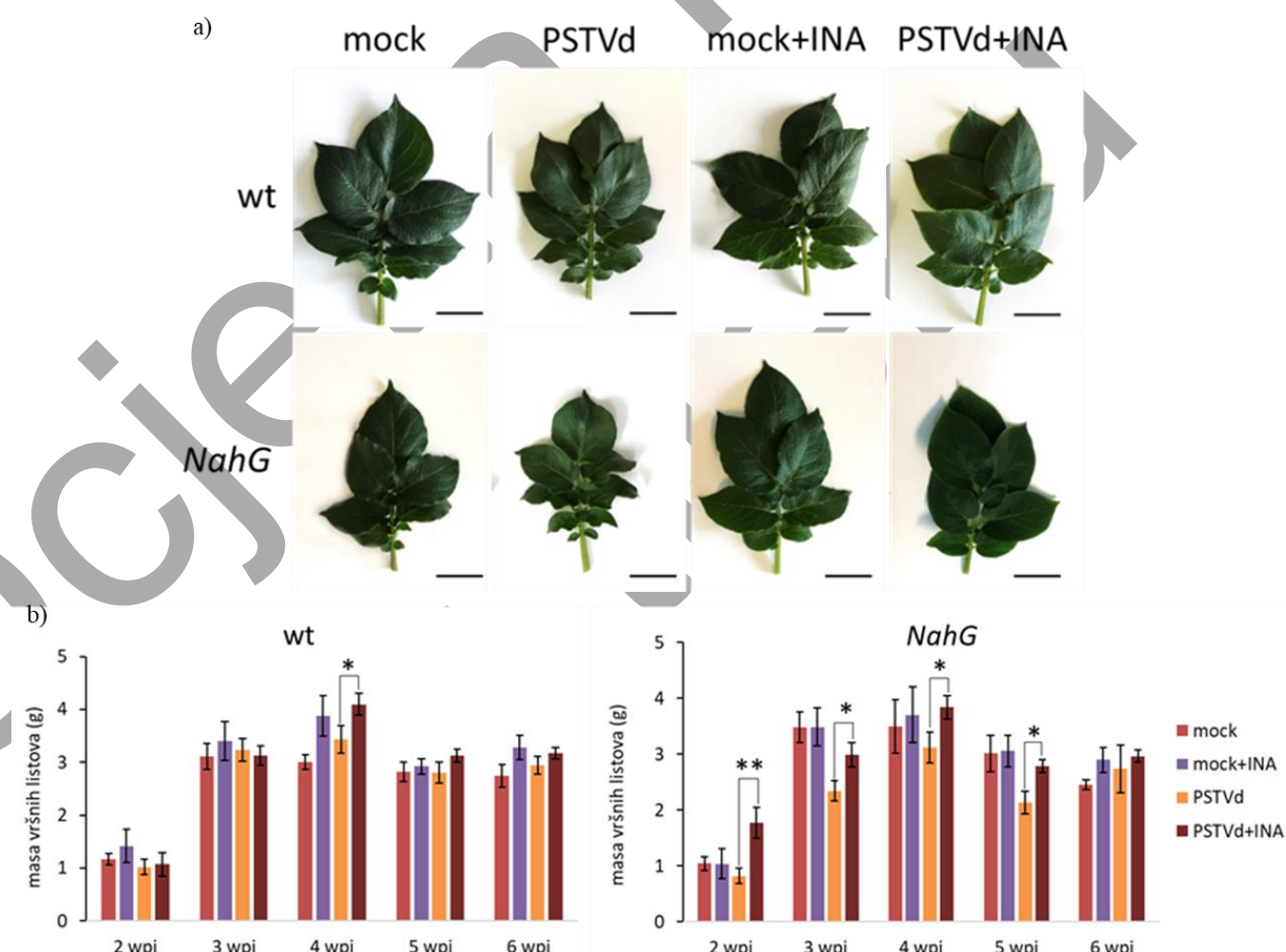
Slika 21. Učinak INA na izgled i rast inficiranih i neinficiranih *NahG* i wt biljaka krumpira. a) Prve dvije slike lijevo prikazuju cijele wt biljke krumpira, nakon čega s desne strane slijede analogni prikazi *NahG* biljaka krumpira u 6 wpi ($\pm$ SE, $n=4-6$). Crna crta duga je 15 cm. b) Utjecaj infekcije PSTVd te INA tretmana na dinamiku promjene visine kod kontrolnih biljaka (mock), kontrolnih tretiranih biljaka (mock+INA), biljaka inficiranih s PSTVd (PSTVd) te tretiranih biljaka inficiranih s PSTVd (PSTVd+INA) biljaka divljeg tipa (wt) i transgeničnih *NahG* linija krumpira. Visina biljaka izmjerena je od 2 do 6 wpi. Zvezdice označavaju statistički značajne razlike u usporedbi s pripadajućom kontrolom (mock vs mock+INA, te PSTVd vs PSTVd+INA) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ u Studentovom t-testu).

Simptomi infekcije PSTVd na sistemski inficiranim i mock vršnim listovima (VL₆) krumpira wt i *NahG* INA tretiranih linija prikazani su na Slici 22.a. Kod PSTVd inficiranih biljaka uočeni su karakteristični simptomi poput šiljastih vrhova listova i uvijenosti lisne plojke. Međutim, kod INA tretiranih biljaka inficiranih s PSTVd ti simptomi su bili značajno smanjeni.

Uz vizualnu procjenu simptoma, mjerili smo masu vršnih listova od 2 do 6 wpi, kako bi kvantitativno procijenili utjecaj INA tretmana na rast listova u inficiranih i neinficiranih

biljaka. Rezultati pokazuju da tretman INA povećava masu listova kod inficiranih wt biljaka, što je vidljivo iz razlike između PSTVd i PSTVd+INA tretmana gdje je masa PSTVd inficiranih listova bila značajno manja u odnosu na masu PSTVd inficiranih netretiranih listova u 4wpi (Slika 22.b).

Veličina listova na inficiranim *NahG* biljkama bez tretmana je manja u odnosu na listove inficiranih *NahG* biljaka s INA (Slika 22.a). Statistički značajne razlike u masi listova uočene su u 2 i 4 wpi u tretiranih inficiranih u odnosu na netretirane inficirane *NahG* biljke (Slika 22.b). Statistička značajnost kod mase vršnih listova zabilježena je u usporedbi inficiranih biljaka (PSTVd) s inficiranim tretiranim biljkama (PSTVd+INA) kod obje linije (Slika 22.b).

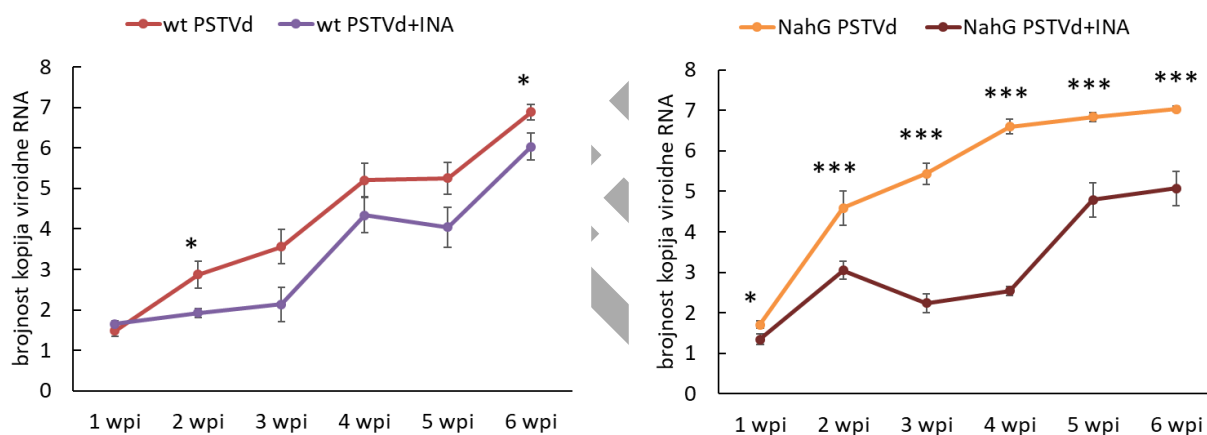


Slika 22. Opis slike na sljedećoj stranici.

Slika 22. Učinak INA na izgled vršnih listova i njihovu masu kod inficiranih i neinficiranih *NahG* i wt biljaka krumpira. a) Simptomi infekcije PSTVd na sistemski inficiranim vršnim listovima (VL₆) krumpira i mock listovima krumpira wt i *NahG* linija krumpira sa ili bez tretmana s INA u 6 wpi ($\pm$ SE, n=4-6). Crna crta duga je 3 cm. b) Graf s prikazom dinamike promjene u masi vršnih listova sistemski inficiranih PSTVd i mock listova wt i *NahG* linija krumpira. Masa svježih listova izmjerena je od 2 do 6 wpi. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti ($\pm$ SE; $n \geq 6$ po tretmanu i vremenskoj točki) iz dva eksperimenta. Zvezdice označavaju statistički značajne razlike u usporedbi s pripadajućom kontrolom (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ u Studentovom t-testu).

3.2.2. Dinamika nakupljanja viroidne RNA u SA-deficijentnim biljkama tretiranih s INA

Rezultati One-step RTqPCR analize pokazali su da je akumulacija viroidne RNA bila značajno smanjena u INA-tretiranim u usporedbi s netretiranim *NahG* biljkama (2 do 6 wpi). *NahG* INA tretirane biljke u 3 i 4 wpi sadržavale su tri puta manje viroidne RNA nego netretirane *NahG* biljke, što je odgovaralo manje izraženim simptomima. Pozitivan učinak INA također je bio uočen u odgovoru biljaka divljeg tipa na PSTVd, ali u manjoj mjeri; sporije nakupljanje viroidne RNA najizraženije je u 2 i 3 wpi (Slika 23.).



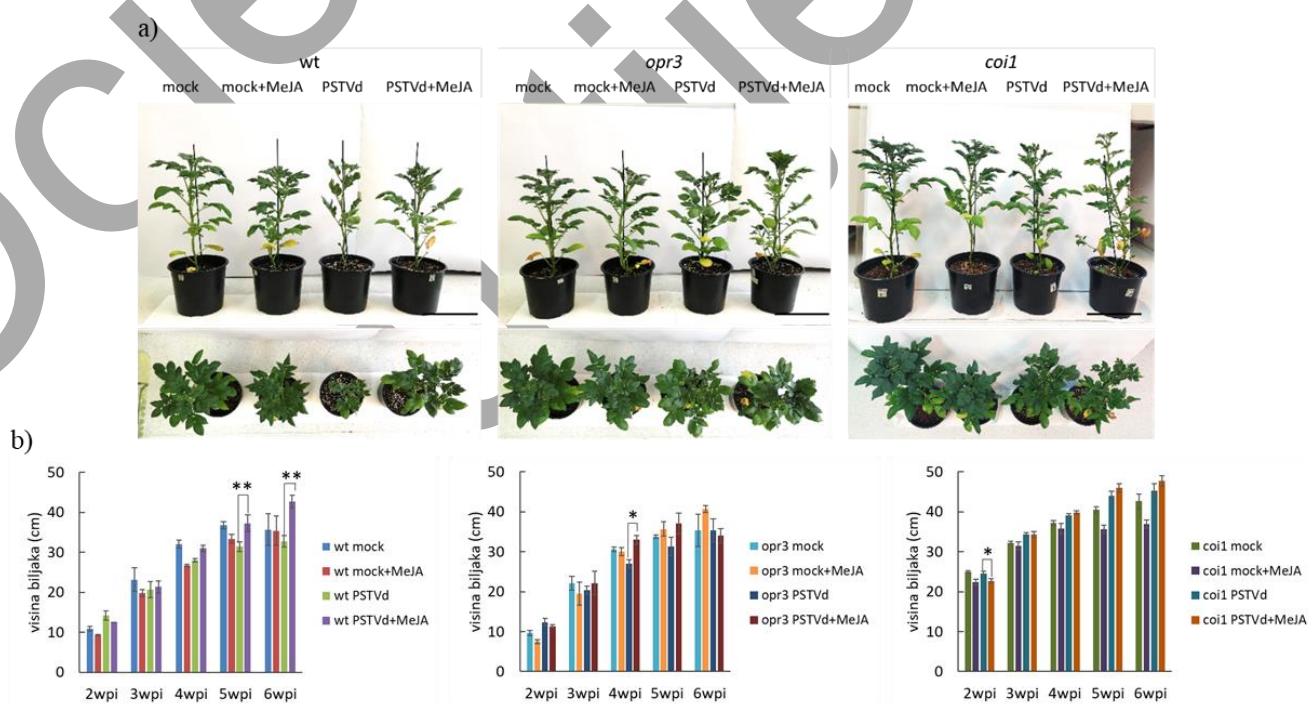
Slika 23. Dinamika akumulacije viroidne RNA tijekom INA tretmana u wt i *NahG* liniji određena je 1 do 6 wpi pomoću RTqPCR u jednom koraku (One-step RT-qPCR). Vrijednosti pokazuju srednji logaritamski broj kopija viroidne RNA po μ g ukupne RNA izolirane iz 6 pojedinačnih biljaka. Sve mock inokulirane biljke bile su negativne. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti dva eksperimenta ($\pm$ SE; $n \geq 6$ po tretmanu i vremenskoj točki) iz dva eksperimenta ($\pm$ SE, n=12, normalizirano na ekspresiju COX gena). Zvezdice označavaju statistički značajne razlike u usporedbi s pripadajućom kontrolom (netretiranim inficiranim biljkama) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ u Studentovom t-testu).

3.2.3. Učinci MeJA tretmana na razvoj simptoma

Egzogeni tretmani s 1 mM MeJA provedeni su kako bi se istražile razlike u osjetljivosti transgeničnih biljaka (*StOPR3*-RNAi i *StCOI1*-RNAi) na PSTVd u usporedbi s biljkama divljeg tipa, povezane s njihovom nesposobnošću da nakupljaju JA ili prenose JA-posredovane signale. MeJA tretirane biljke su pokazivale svjetlije listove, dok su netretirane *coi1* biljke inficirane s PSTVd prve počele razvijati simptome, uključujući klorozu donjih listova i tamnije vršne listove, što je ukazivalo na napredovanje infekcije.

Slika 24.a prikazuje wt, *opr3* i *coi1* biljke tretirane sa ili bez MeJA i inficirane s PSTVd. MeJA tretman značajno je utjecao na prosječnu visinu biljaka, osobito kod wt i *opr3* linija, gdje je MeJA tretman donekle kompenzirao smanjenje rasta uzrokovano viroidnom infekcijom. Tretman s MeJA imao je slab učinak na JA-neosjetljive *coi1* biljke (Slika 24.a i b).

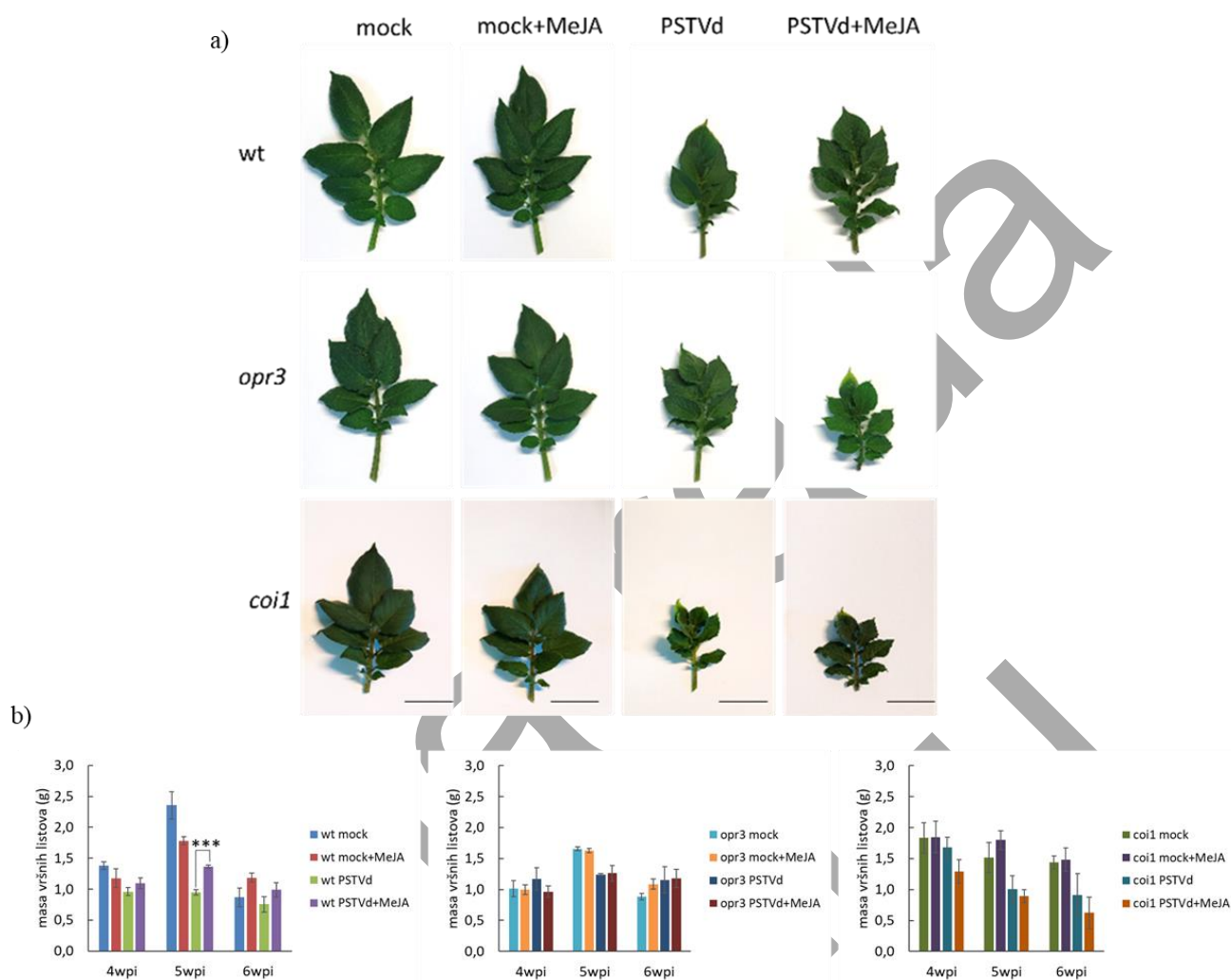
Najpovoljniji učinak MeJA tretmana zabilježen je kod wt biljaka. Inficirane wt biljke, koje nisu bile tretirane s MeJA, bile su niske, sa šiljastim vrhovima listova dignutim prema gore, te su pokazivale izražena klorotična i nekrotična područja. Međutim, PSTVd inficirane MeJA tretirane biljke divljeg tipa pokazale su značajno smanjenje simptoma, uključujući veći rast, šire lisne plojke i manje dignute listove (Slika 24.a i b).



Slika 24. Opis slike na slijedećoj stranici.

Slika 24. Učinak MeJA na izgled i rast inficiranih i neinficiranih wt, *opr3* i *coi1* biljaka krumpira. a) Prve dvije slike lijevo prikazuju cijele wt biljke krumpira, nakon čega u sredini slijede analogni prikazi *opr3* biljaka, te s desne strane slijede analogni prikazi *coi1* biljaka krumpira u 6 wpi ($\pm$ SE, n=4-6). Crna crta duga je 15 cm. b) Utjecaj infekcije PSTVd te MeJA tretmana na dinamiku promjene visine kod kontrolnih biljaka (mock), kontrolnih tretiranih biljaka (mock+MeJA), biljke inficirane s PSTVd (PSTVd) te tretirane biljke inficirane s PSTVd (PSTVd+MeJA) biljaka divljeg tipa (wt) i transgeničnih *opr3* i *coi1* linija krumpira. Visina biljaka izmjerena je od 2 do 6 wpi. Zvezdice označavaju statistički značajne razlike u usporedbi s pripadajućom kontrolom (mock vs mock+MeJA, te PSTVd vs PSTVd+MeJA) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ u Studentovom t-testu).

Simptomi infekcije PSTVd na sistemski inficiranim vršnim listovima (VL₆) krumpira i mock listovima krumpira wt i transgeničnih *opr3* i *coi1* linija MeJA tretiranih vidljivi su u 6 wpi (Slika 25.a). U biljkama inficiranim s PSTVd uočeni su listovi sa šiljastim vrhom i smanjenom lisnom plojkom, dok su ti simptomi ublaženi kod PSTVd+MeJA. Listovi *opr3* biljaka ne pokazuju značajnu razliku u izgledu i promjeni mase kod PSTVd i PSTVd+MeJA biljaka, dok je kod *coi1* biljaka vidljivo smanjenje mase vršnih listova, ali ono nije statistički značajno (Slika 25.b) Mock biljke sa i bez tretmana s MeJA ne pokazuju značajniju razliku u veličini i obliku listova (Slika 25.a i 25.b.). Prikazi na slikama u skladu su s dobivenim rezultatima mjerenja mase vršnih listova od 2 do 6 wpi, a iz rezultata se može uočiti statistička značajnost u 5 i 6 wpi u biljkama divljeg tipa (Slika 25.b.).

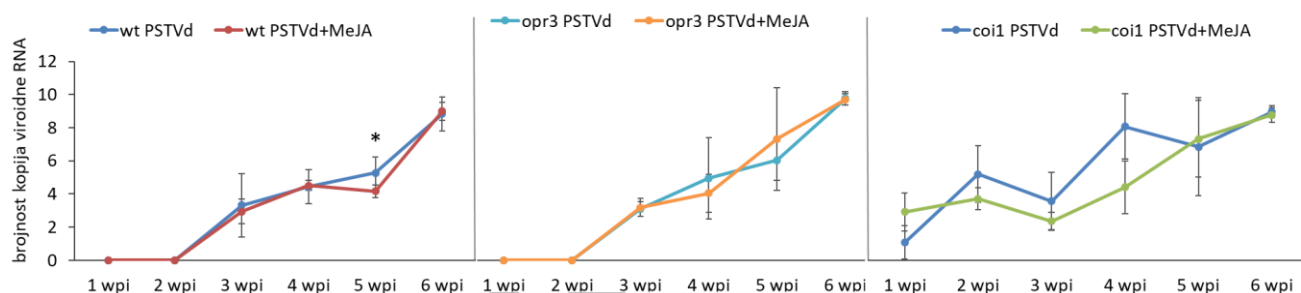


Slika 25. Učinak tretmana s MeJA na izgled vršnih listova i njihovu masu kod inficiranih i neinficiranih wt, *opr3* i *coi1* biljaka krumpira. a) Simptomi infekcije PSTVd na sistemski inficiranim vršnim listovima (VL₆) krumpira i mock listovima krumpira wt, *opr3* i *coi1* linija krumpira sa ili bez MeJA tretmana u 6 wpi ($\pm$ SE, $n=4-6$). Crna crta duga je 3 cm. b) Graf s prikazom dinamike promjene u masi vršnih listova sistemski inficiranih PSTVd i mock listova wt i NahG linija krumpira. Masa svježih listova izmjerena je od 2 do 6 wpi. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti dva eksperimenta ($\pm$ SE; $n \geq 6$ po tretmanu i vremenskoj točki) iz dva eksperimenta. Zvezdice označavaju statističke značajne razlike u usporedbi s pripadajućom kontrolom (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ u Studentovom t-testu).

3.2.4. Dinamika nakupljanja viroidne RNA u JA-deficijentnim i JA-neosjetljivim biljkama s MeJA tretmanom

Učinak MeJA na nakupljanje viroidne RNA u inficiranim wt biljkama bio je manji u odnosu na transgenične linije, sa sporijim nakupljanjem viroidne RNA u inficiranim wt biljkama zabilježenim u 5 wpi (Slika 26.).

Kod *opr3* linije količina viroidne RNA ne pokazuje značajne razlike između tretiranih i netretiranih biljaka, dok s druge strane MeJA tretman značajno smanjuje količinu viroidne RNA u liniji *coi1* od 2 do 4 wpi (Slika 26.).

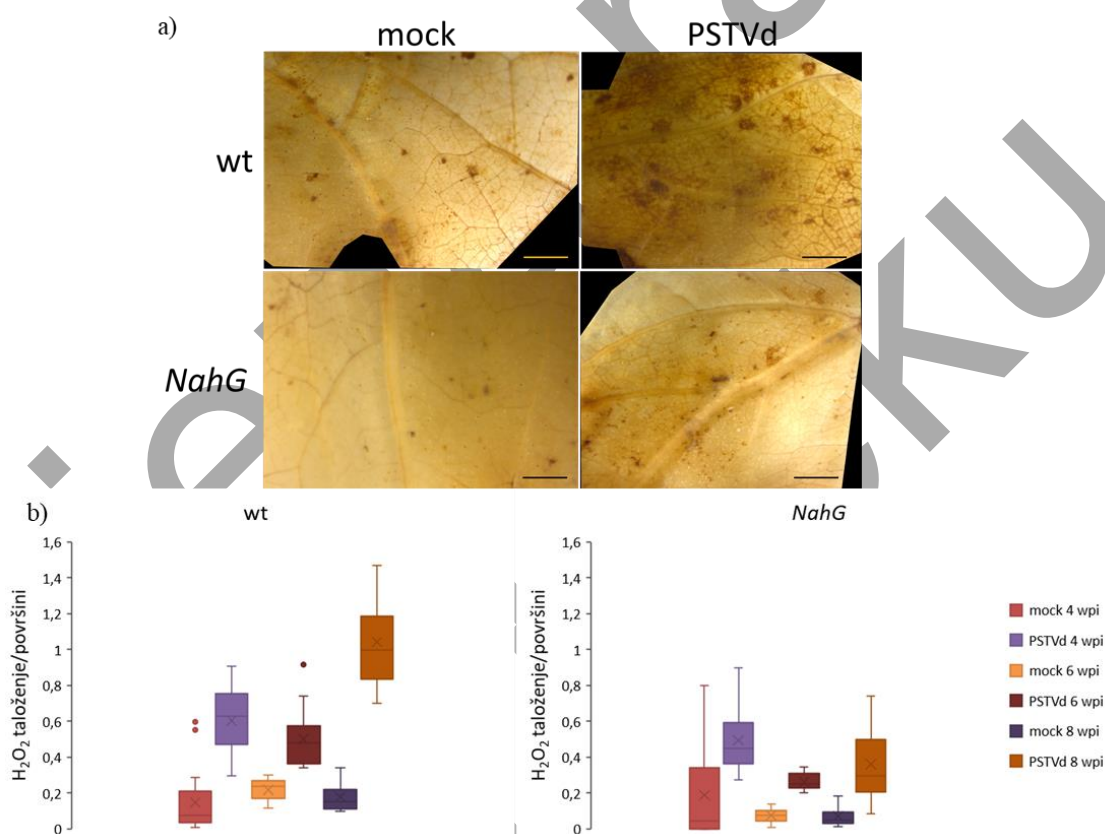


Slika 26. Dinamika akumulacije viroidne RNA tijekom MeJA tretmana u wt, *opr3* i *coi1* liniji određena je 1 do 6 wpi pomoću RTqPCR u jednom koraku (One-step RT-qPCR). Vrijednosti pokazuju srednji logaritamski broj kopija viroidne RNA po μg ukupne RNA izolirane iz 6 pojedinačnih biljaka. Sve mock inokulirane biljke bile su negativne. Podaci su predstavljeni kao srednja vrijednost dva eksperimenta ($\pm\text{SE}$, $n=12$, normalizirano na ekspresiju COX gena). Zvezdice označavaju statistički značajne razlike u usporedbi s pripadajućom kontrolom (netretiranim inficiranim biljkama) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ u Studentovom t-testu).

3.3. Nakupljanje H_2O_2 i kaloze u listovima biljaka kao odgovor na infekciju viroidom PSTVd

3.3.1. Nakupljanje H_2O_2 u *NahG* i wt biljkama inficiranim viroidom PSTVd

Proizvodnja ROS važan je dio odgovora biljaka na patogene (Hernández i sur., 2016). Nakupljanje H_2O_2 u listovima vizualizirano je bojanjem pomoću DAB (Slika 27.a). *NahG* biljke inficirane s PSTVd akumulirale su znatno više H_2O_2 u usporedbi s kontrolnim *NahG* biljkama. U usporedbi s divljim tipom biljaka, *NahG* linija je pokazala smanjenu akumulaciju H_2O_2 u odgovoru na infekciju PSTVd kroz sve tjedne kako pokazuju rezultati obrade digitalnih slika prikazani na Slici 27.b, što ukazuje na veću osjetljivost *NahG* biljaka.



Slika 27. Nakupljanje i lokalizacija H_2O_2 u sistemskim listovima wt i *NahG* biljaka krumpira inficiranih s PSTVd. a) Lokalizacija H_2O_2 ispitana je mikroskopski pomoću Zeiss Stereo Discovery V20 stereo mikroskopa opremljenog kamerom pri povećanju od 9,4x nakon bojenja s 3,3'-diaminobenzidinom (DAB). Na slikama su prikazi 6wpi. Crna crta duga je 2 mm. b) Akumulacija H_2O_2 u sistemskim listovima wt i *NahG* biljaka definirana je kao ukupni broj piksela u definiranom području digitalne slike analizirane korištenjem ImageJ v1.46, Fiji. Analiza je provedena na dva lista po biljci pri čemu je od svakog lista snimljeno 4 do 6 slika (mock i PSTVd inficirane biljke). Kutijasti dijagram (engl. *box plot*) prikazuje raspodjelu i raspon podataka iz dva eksperimenta te graf prikazuje medijan, interkvartilni raspon (Q1-Q3) te raspon podataka kroz brkove (engl. *whiskers*), dok su *outlier* (ekstremna odstupanja) prikazani kao točke izvan brkova. Središnja linija unutar kutije predstavlja medijan, dok kutija obuhvaća 50% podataka.

U listovima wt i *NahG* biljaka inficiranih s PSTVd, RTqPCR analiza ekspresije gena povezanih s antioksidacijskim odgovorom (*POD*, *CAT*, *APX*, *CalS12*) pokazuju blagi trend porasta ekspresije gena u 4 do 6 wpi, dok je u 7 wpi prisutan blagi pad ekspresije navedenih gena. Kod *NahG* biljaka tijekom 4 wpi porast ekspresije gena nešto je jači nego kod wt biljaka (Slika 45., Prilog 6.).

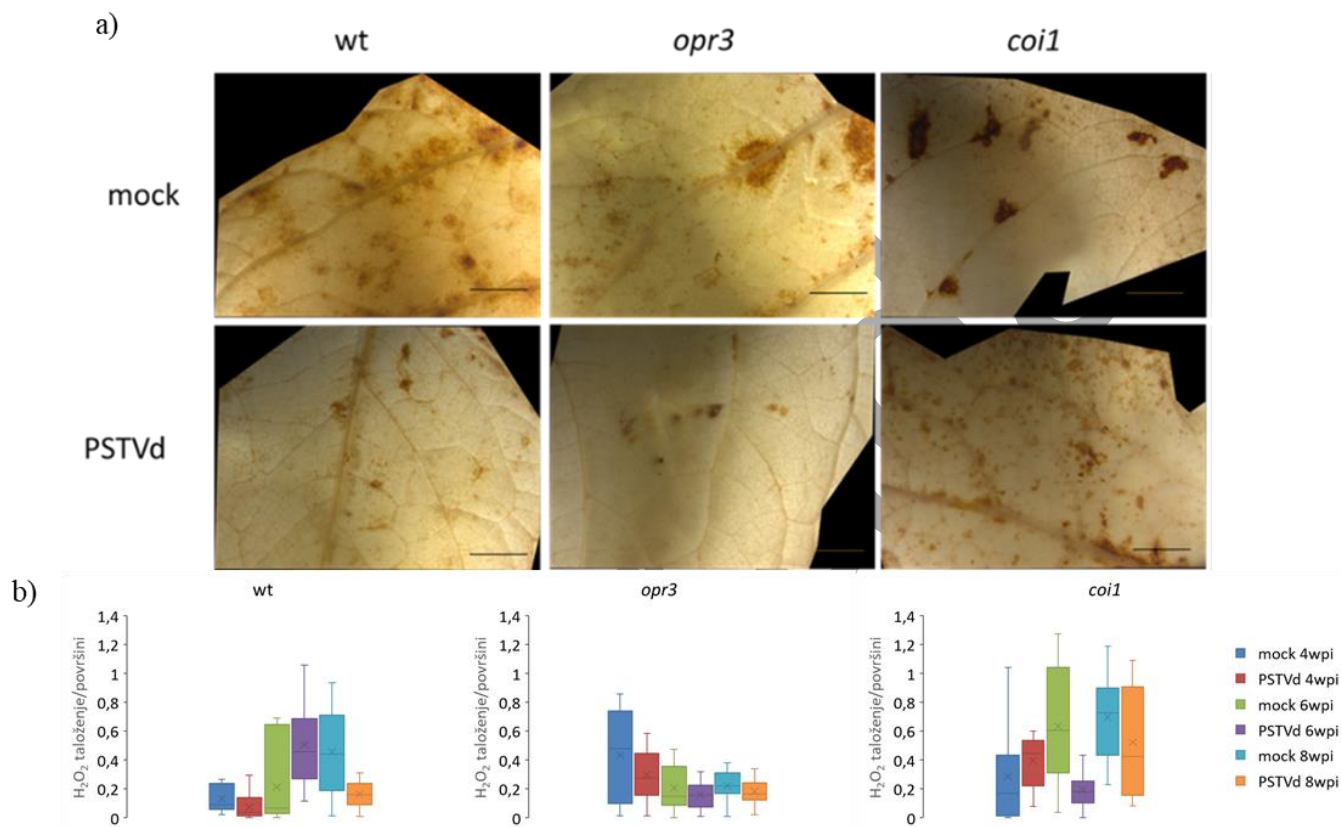
3.3.2. Nakupljanje H₂O₂ u *opr3*, *coi1* i wt biljkama inficiranim viroidom PSTVd

Uloga JA u regulaciji sadržaja H₂O₂ kod PSTVd inficiranih biljaka ispitana je bojenjem s diaminobenzidinom (DAB) u sistemski inficiranim listovima wt, *opr3* i *coi1* biljaka 4, 6 i 8 wpi (Slika 28. a, b).

U ovim pokusima akumulacija H₂O₂ kod wt biljaka varira kroz tjedne, s najvećim taloženjem primijećenim u 6 wpi kod inficiranih wt biljke u odnosu na pripadajuću mock kontrolu. U ostalim tjednima vidljivo je veće taloženje H₂O₂ kod mock biljaka (Slika 28.b.)

S druge strane, *opr3* linija, koja je deficitarna u biosintezi JA, pokazuje slabije nakupljanje H₂O₂ tijekom razvoja infekcije. Kroz sve tjedne koncentracija H₂O₂ u uzorcima je veća kod mock biljaka, nego kod PSTVd inficiranih (Slika 28.b.).

Međutim, zanimljivo je primijetiti da su koncentracije H₂O₂ bile više u JA-otpornim *coi1* biljkama nego u JA-deficijentnim *opr3* ili wt biljkama, te da su u 6 wpi pokazivale veće taloženje kod mock biljaka nego kod PSTVd inficiranih (Slika 28.b.).



Slika 28. Nakupljanje i lokalizacija H₂O₂ u sistemskim listovima wt, *opr3* i *coi1* biljaka krumpira inficiranih s PSTVd. a) Lokalizacija H₂O₂ ispitana je mikroskopski pomoću Zeiss Stereo Discovery V20 stereo mikroskopa opremljenog kamerom pri povećanju od 9,4x nakon bojenja s 3,3'-diaminobenzidinom (DAB). Na slikama su prikazi 6 wpi. Crna crta duga je 2 mm. b) Akumulacija H₂O₂ u sistemskim listovima wt, *opr3* i *coi1* biljaka krumpira inficiranih s PSTVd definirana je kao ukupni broj piksela u definiranom području digitalne slike analizirane korištenjem ImageJ v1.46, Fiji. Analiza je provedena na dva lista po biljci pri čemu je od svakog lista snimljeno 4 do 6 slika (mock i PSTVd inficirane biljke). Kutijasti dijagram (engl. box plot) prikazuje raspodjelu i raspon podataka iz dva eksperimenta te graf prikazuje medijan, interkvartilni raspon (Q1-Q3) te raspon podataka kroz brkove (engl. whiskers), dok su outlier (ekstremna odstupanja) prikazani kao točke izvan brkova. Središnja linija unutar kutije predstavlja medijan, dok kutija obuhvaća 50% podataka.

Transkripcijska aktivnost gena povezanih s H₂O₂ bila je niska u listovima inficiranih biljaka sve tri testirane linije u ranoj fazi infekcije (4 do 5 wpi), prema RTqPCR analizi. Osim toga, *opr3* i *coi1* transgenične linije pokazale su smanjenu ekspresiju gena za peroksidazu povezanu sa suberizacijom (*POD*) u usporedbi s divljim tipom biljkama, što sugerira da bi JA mogao biti uključen u regulaciju suberinizacije u PSTVd izazvanim odgovorima. Ekspresija gena za katalazu *CAT*, smanjena je u 4 i 5 wpi, ali pojačana od 6 do 7 wpi u transgenčnim biljkama deficitarnim u JA, kao i u biljkama divljeg tipa (Slika 48., Prilog 9.).

Gen za peroksidazu *POX12* kod linije *opr3* pokazuje značajan porast ekspresije kroz sve tjedne, dok je kod *coi1* prisutan značajniji pad ekspresije tog gena. Linija divljeg tipa pokazuje značajniji porast ekspresije u 4 wpi, te lagani pad u idućim tjednima. Nakon infekcije, ekspresija gena za lignin-formirajuću anionsku peroksidazu (*LiP*) pojačana je u listovima inficiranih *opr3* i *coi1* biljaka od 5 do 7 wpi, a smanjena u wt biljkama, u usporedbi s korespondirajućim kontrolama (Slika 48., Prilog 9.).

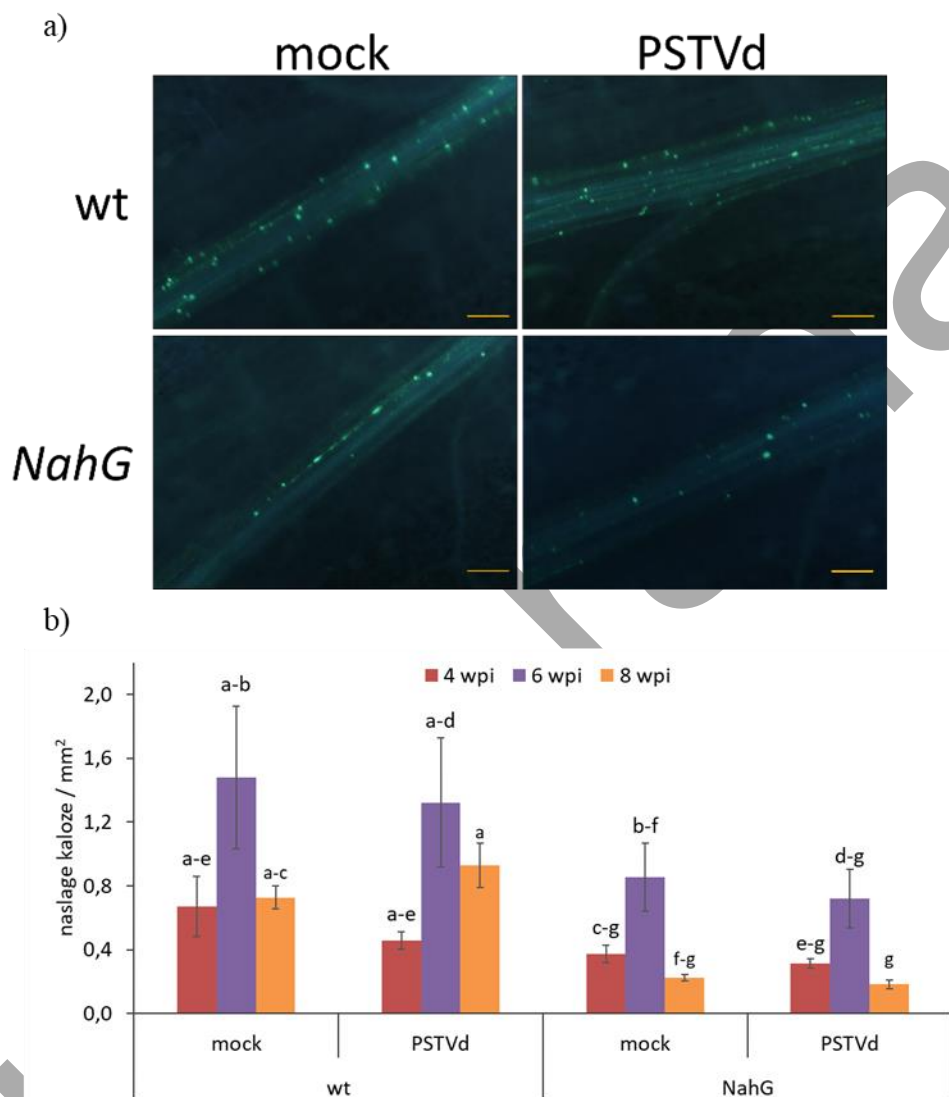
3.3.3. Nakupljanje kaloze u *NahG* i wt biljkama inficiranim viroidom PSTVd

Nakupljanje kaloze u sistemskim listovima biljaka divljeg tipa i SA-deficijentnih *NahG* mock i biljaka inficiranih s PSTVd promatrano je u tkivu obojanom bojom anilin blue pod fluorescentnim mikroskopom pomoću DAPI filtra (Slika 29.a).

Na slikama možemo primijetiti fluorescentne zelene točke koje predstavljaju naslage kaloze, obrambenog polisaharida koji se nakuplja u biljci kao odgovor na stres ili infekciju (Slika 29.a). Nakupljanje kaloze predstavlja važan indikator obrambenog odgovora biljaka na biotske stresore, uključujući viroidne infekcije (Luna i sur., 2011).

Rezultati pokazuju da su, nakon infekcije PSTVd obje skupine biljaka, wt i *NahG*, pokazivale slične obrasce nakupljanja kaloze tijekom 4 do 6 wpi. Međutim, tijekom svih tjedana, taloženje kaloze bilo je značajno veće u listovima biljaka divljeg tipa nego u *NahG* biljkama (Slika 29.b).

Kod wt mock biljaka, nakupljanje kaloze je blago i postepeno raste od 4 do 8 wpi, s najvišim koncentracijama kaloze u 6 wpi, dok kod wt PSTVd inficiranih biljaka primjećujemo veću akumulaciju kaloze, osobito u 6 wpi, što ukazuje na snažnu aktivaciju obrambenih mehanizama kao odgovor na viroidnu infekciju. Kod *NahG* mock biljaka, nakupljanje kaloze je također blago, ali u *NahG* biljkama inficiranim s PSTVd vidljivo je manje nakupljanje kaloze u usporedbi s wt biljkama inficiranim s PSTVd. Najveće naslage zabilježene su u 6 wpi.



Slika 29. Nakupljanje i lokalizacija kaloze u listovima wt i *NahG* biljaka krumpira mock i inficiranih s PSTVd. a) Lokalizacija kaloze ispitana je mikroskopski pod fluorescentnim mikroskopom pomoću DAPI filtra nakon bojenja anilin modrilom. Na slikama su prikazi 4 wpi. Žuta crta duga je 100 μm . b) Analiza naslaga kaloze u sistemskim listovima mock i biljaka inficiranih s PSTVd ispitana je pod fluorescentnim mikroskopom nakon 4, 6 i 8 wpi. Slike su analizirane pomoću ImageJ v1.46, Fiji tako što je kvantificiran intenzitet taloženja kaloze kao broj fluorescentnih piksela koji odgovaraju kalozi u odnosu na ukupni broj piksela po slici. Analiza je provedena na dva lista po biljci pri čemu je od svakog lista snimljeno najmanje 6 slika po uzorku po biljci po tretmanu (mock i inficirane biljke). Srednje vrijednosti označene istim slovom nemaju statistički značajne razlike pri $p < 0,05$, prema Tukeyevom testu.

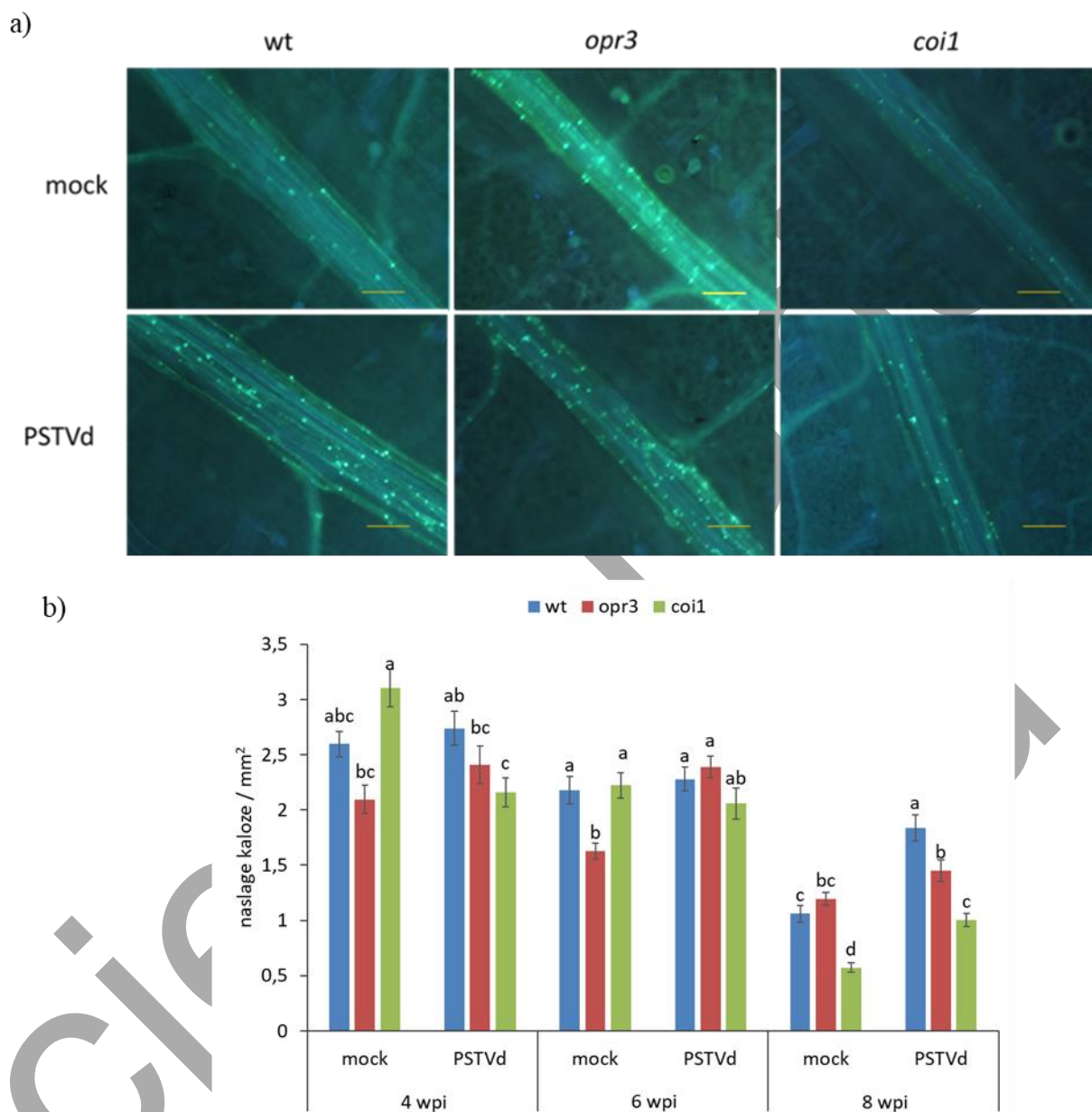
3.3.4. Nakupljanje kaloze u *opr3*, *coi1* i wt biljkama inficiranim viroidom PSTVd

Fluorescentni signali jasno prikazuje naslage kaloze u vaskularnim elementima biljaka, pri čemu se različit intenzitet taloženja primjećuju ovisno o liniji biljaka. PSTVd inficirane i mock tretirane biljke pokazuju značajne razlike u količini nakupljene kaloze. Akumulacija kaloze bila je prisutna kod svih linija, a najizraženija u kasnim fazama infekcije (Slika 30.a). Kod wt biljaka uočena je značajna akumulacija kaloze, dok su *opr3* linija, deficitarna u biosintezi JA, i *coi1*, deficitarna u JA-signalnom putu, pokazale smanjene naslage kaloze, osobito nakon infekcije PSTVd.

Akumulacija kaloze bila je slabija u inficiranim *coi1* biljkama u usporedbi s *opr3* i wt biljkama, međutim, smanjena akumulacija kaloze u *coi1* nije utjecala na dinamiku sistemskog širenja viroida (Slika 20.).

Na slici 30.b nalazi se prikaz naslaga kaloze u wt, *opr3*, i *coi1* linijama u 4, 6, i 8 wpi. U wt PSTVd inficiranim biljkama, naslage kaloze opadaju s vremenom, s najvećim taloženjem opaženim u 4 wpi, a najmanjim u 8 wpi. Kod *opr3* taloženje kaloze pokazuje stabilniji obrazac, ali je općenito niže nego kod wt biljaka. Naslage kaloze kod *coi1* su također niže u odnosu na wt i *opr3* liniju i ne pokazuju značajne promjene kroz vrijeme.

Nakon infekcije, ekspresija *CalS12* gena pojačana je u *opr3* i *coi1* biljkama, a smanjena u biljkama divljeg tipa 5 i 7 wpi (Slika 48., Prilog 9.).



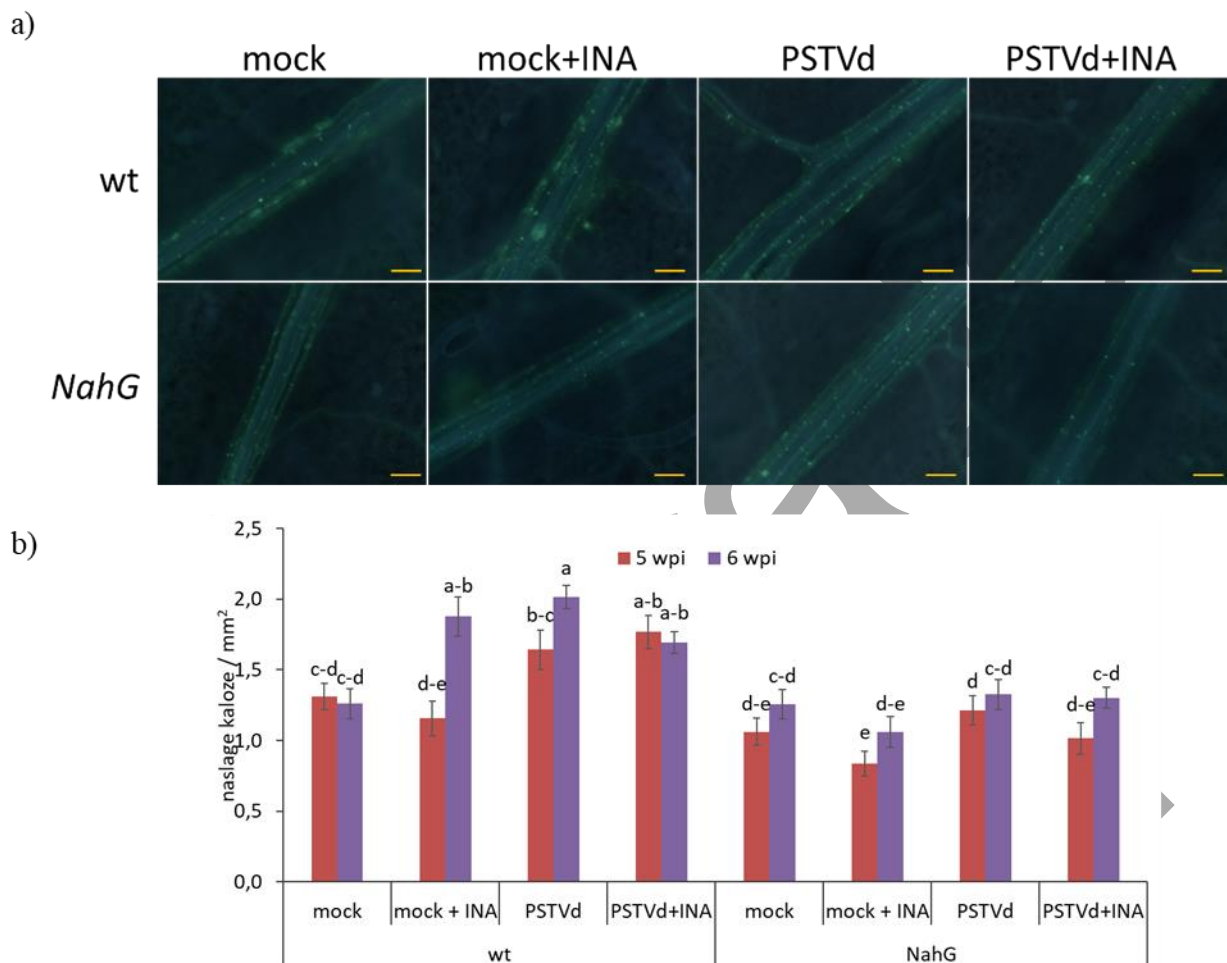
Slika 30. Nakupljanje i lokalizacija kaloze u listovima wt, *opr3* i *coi1* biljaka krumpira mock i inficiranih s PSTVd. a) Lokalizacija kaloze ispitana je mikroskopski pod fluorescentnim mikroskopom pomoću DAPI filtra nakon bojenja anilin modrilom. Na slikama su prikazi 8 wpi. Žuta crta duga je 100 μm . b) Analiza naslaga kaloze u sistemskim listovima mock i i biljaka inficiranih s PSTVd ispitana je pod fluorescentnim mikroskopom nakon 4, 6 i 8 wpi. Slike su analizirane pomoću ImageJ v1.46, Fiji tako što je kvantificiran intenzitet taloženja kaloze kao broj fluorescentnih piksela koji odgovaraju kalozi u odnosu na ukupni broj piksela po slici. Analiza je provedena na najmanje 6 slika po uzorku po biljci po tretmanu (mock i inficirane biljke). Srednje vrijednosti označene istim slovom nemaju statistički značajne razlike pri $p < 0,05$, prema Tukeyevom testu.

3.3.5. Nakupljanje kaloze u *NahG* i wt biljkama inficiranim viroidom PSTVd nakon tretmana s INA

Nakupljanje kaloze u sistemskim listovima biljaka krumpira nakon INA tretmana promatrano je tijekom 5 i 6 wpi (Slika 31.a). I wt i *NahG* biljke pokazale su slične obrasce nakupljanja kaloze, s povećanjem kaloze nakon infekcije PSTVd i INA tretmana. Međutim, u promatranim biljkama kroz oba tjedna, nakupljanje kaloze bilo je značajno veće u wt biljkama u usporedbi s *NahG* biljkama, neovisno o vrsti tretmana. (Slika 31.a, b).

Kod wt mock biljaka uočeno je blago nakupljanje kaloze, dok wt biljke inficirane s PSTVd pokazuju značajno veće nakupljanje kaloze kao odgovor na viroidnu infekciju. INA tretman dodatno povećava nakupljanje kaloze, osobito kod PSTVd inficiranih biljaka, što se očituje kroz intenzivniji fluorescentni sjaj, posebno izražen kod wt PSTVd+INA biljaka.

U slučaju *NahG* biljaka nakupljanje kaloze je generalno manje izraženo u usporedbi s wt biljkama. Infekcija PSTVd kod *NahG* biljaka uzrokuje blago povećanje nakupljanja kaloze, no INA tretman nije imao značajan učinak na pojačanje ovog odgovora.

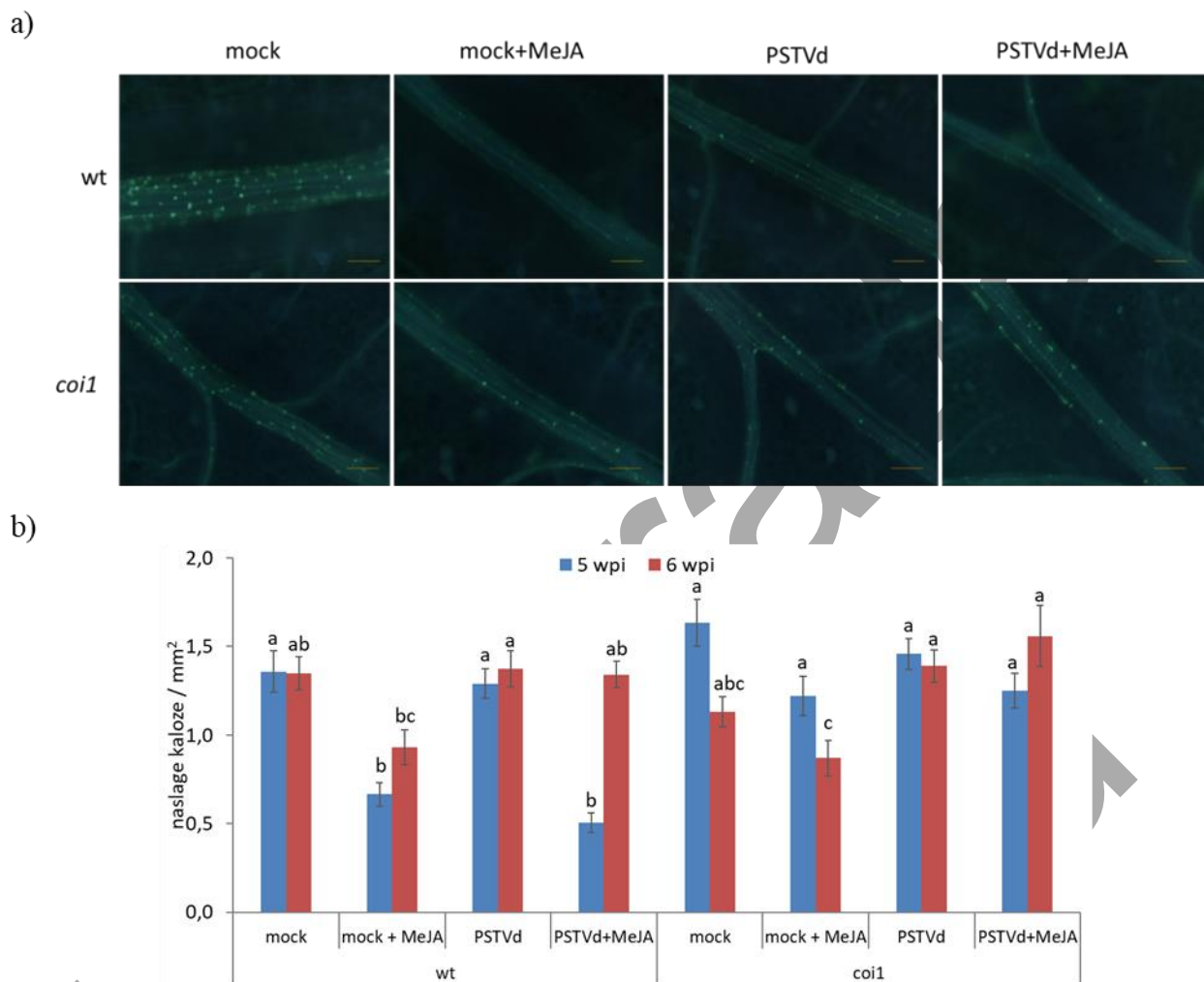


Slika 31. Nakupljanje i lokalizacija kaloze u listovima wt i *NahG* biljaka krumpira tretiranih s INA i inficiranih s PSTVd a) Lokalizacija kaloze ispitana je mikroskopski pod fluorescentnim mikroskopom pomoću DAPI filtra nakon bojenja anilin modrilom. Na slikama su prikazi 5 wpi. Žuta crta duga je 100 μm . b) Analiza naslaga kaloze u sistemskim listovima mock i biljaka inficiranih s PSTVd ispitana je pod fluorescentnim mikroskopom nakon 5 i 6 wpi. Slike su analizirane pomoću ImageJ v1.46, Fiji tako što je kvantificiran intenzitet taloženja kaloze kao broj fluorescentnih piksela koji odgovaraju kalozi u odnosu na ukupni broj piksela po slici. Analiza je provedena na najmanje 6 slika po uzorku po biljci po tretmanu (mock i inficirane biljke). Srednje vrijednosti označene istim slovom nemaju statistički značajne razlike pri $p < 0,05$, prema Tukeyevom testu.

3.3.6. Nakupljanje kaloze u *coi1* i wt biljkama inficiranim viroidom PSTVd nakon tretmana s MeJA

Nakupljanje kaloze u sistemskim listovima krumpira analizirano je nakon MeJA tretmana u inficiranim i neinficiranim biljkama wt i *coi1* linija tijekom 5 i 6 wpi (Slika 32.a). U ovom istraživanju, nakon MeJA tretmana i infekcije s PSTVd, obje linije, wt i *coi1*, pokazale su slične obrasce nakupljanja kaloze od 5 do 6 wpi. Međutim, taloženje kaloze bilo je značajno veće u listovima biljaka divljeg tipa u usporedbi s *coi1* biljkama za sve tretmane, uključujući mock i infekcije PSTVd.

Inficirane i neinficirane wt biljke tretirane s MeJA pokazuju smanjenje naslage kaloze u usporedbi s netretiranim biljkama, osobito u 5 wpi. Kod *coi1* transgeničnih biljaka, MeJA tretman nema značajan učinak na taloženje kaloze u inficiranim biljkama. Porast koncentracije kaloze nakon MeJA tretmana zabilježen je kod obje linije u 6 wpi u usporedbi s 5 wpi, (Slika 32.a, b). Nakupljanje kaloze u PSTVd inficiranim *opr3* biljkama tretiranim s MeJA nije analizirano zbog nedostatka materijala za provođenje eksperimenta.



Slika 32. Nakupljanje i lokalizacija kaloze u listovima wt i *coi1* biljaka krumpira tretiranih s MeJA i inficiranih s PSTVd a) Lokalizacija kaloze ispitana je mikroskopski pod fluorescentnim mikroskopom pomoću DAPI filtra nakon bojenja anilin modrilom. Na slikama su prikazi 5 wpi. Žuta crta duga je 100 μm . b) Analiza naslaga kaloze u sistemskim listovima biljaka inficiranih s PSTVd ispitana je pod fluorescentnim mikroskopom nakon 5 i 6 wpi. Slike su analizirane pomoću ImageJ v1.46, Fiji tako što je kvantificiran intenzitet taloženja kaloze kao broj fluorescentnih piksela koji odgovaraju kalozi u odnosu na ukupni broj piksela po slici. Analiza je provedena na najmanje 6 slika po uzorku po biljci po tretmanu (mock i inficirane biljke). Srednje vrijednosti označene istim slovom nemaju statistički značajne razlike pri $p < 0,05$, prema Tukeyevom testu.

3.4. Analiza transkriptoma i identifikacija diferencijalno eksprimiranih gena

Kako bi se dodatno istražio doprinos SA, JA i drugih fitohormona sistemskom odgovoru na PSTVd, promjene transkriptoma u listovima divljeg tipa i biljaka krumpira *NahG*, *opr3* i *coi1* analizirane su 5 tjedana nakon inokulacije s PSTVd korištenjem RNASeq. Ukupno su napravljene 24 knjižnice cDNA, iz uzoraka RNA iz listova triju mock- i triju PSTVd-inokuliranih biljaka za svaku liniju (wt, *NahG*, *opr3* i *coi1*) sakupljenih 5 wpi.

Visoki udio (89,76%) očitavanja transkripta pronađenih u zaraženim i kontrolnim biljkama mogao bi se pripisati referentnom genomu krumpira SolTub_3.0. Infekcija PSTVd pokrenula je diferencijalnu ekspresiju 20 493 uobičajenih gena na odabranu graničnu vrijednost ($|\log_2fc| \geq 1$, $p < 0,05$) u svim genotipovima. Dok je na graničnoj vrijednosti od ($|\log_2fc| \geq 2$, $p < 0,05$), popis DEG smanjem i sastoji se od 6250 gena, uključujući 1203 DEG u divljem tipu, 1325 DEG u *NahG*, 1070 DEG u *opr3* i 2652 DEG u *coi1* kao odgovor na PSTVd.

3.4.1. Funkcionalna analiza ontologije gena (GO) za *NahG* i wt linije

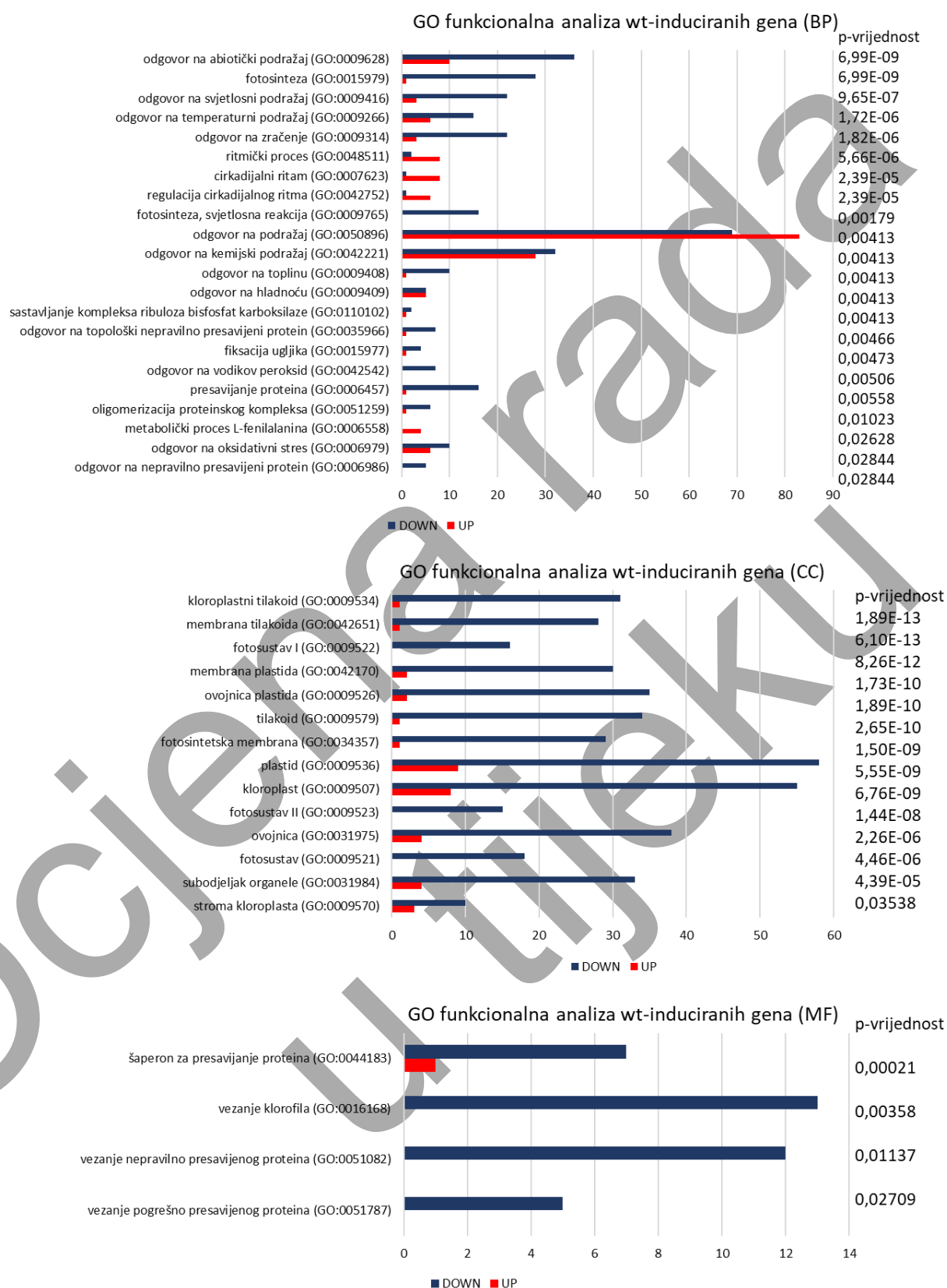
Analiza transkriptoma listova krumpira inokuliranih viroidom PSTVd provedena je kako bi se razjasnili složeni mehanizmi regulacije ekspresije gena uključenih u metabolizam fitohormona i prijenos signala u kojem sudjeluju fitohormoni tijekom odgovora na sistemsku infekciju ovim patogenom.

GO funkcionalna analiza DEG ($|\log_2FC| \geq 2$, $p < 0,05$) u usporedbi „wt PSTVd vs. wt mock kontrola“ pokazala je značajan broj gena u terminima vezanim uz biološke procese (engl. *biological processes*, BP) kao što su odgovor na kemijski i abiotički podražaj, fotosintezu, te odgovor na zračenje. Dodatno, značajno su obogaćeni BP termini kao što su odgovor na temperaturni podražaj (toplinski stres), te odgovor na oksidativni stres i H₂O₂ (Slika 33.a, Prilog 2.). Najobogaćeniji GO termini vezani uz stanične komponente (engl. *cellular components*, CC) biljaka divljeg tipa bili su povezani s fotosintetskim aparatima, uključujući plastidne membrane, tilakoide i kloroplaste, dok su geni vezani uz molekularne funkcije (engl. *molecular function*, MF) zastupljeni u terminima kao što su vezanje klorofila i vezanje nepravilno presavijenih proteina (Slika 33.a, Prilog 2.).

U usporedbi „*NahG* PSTVd vs. *NahG* mock kontrola“, detektiran je značajan broj gena u BP terminima kao što su transport iona i odgovor na gljivice (Slika 33.b, Prilog 2.). Većina gena u CC terminima bilo je vezano uz plazmatske membrane, integralne komponente membrane te membrane (Slika 33. b, Prilog 2.), dok u MF terminima sa statistički značajnom razlikom nije bilo te stoga nisu prikazani.

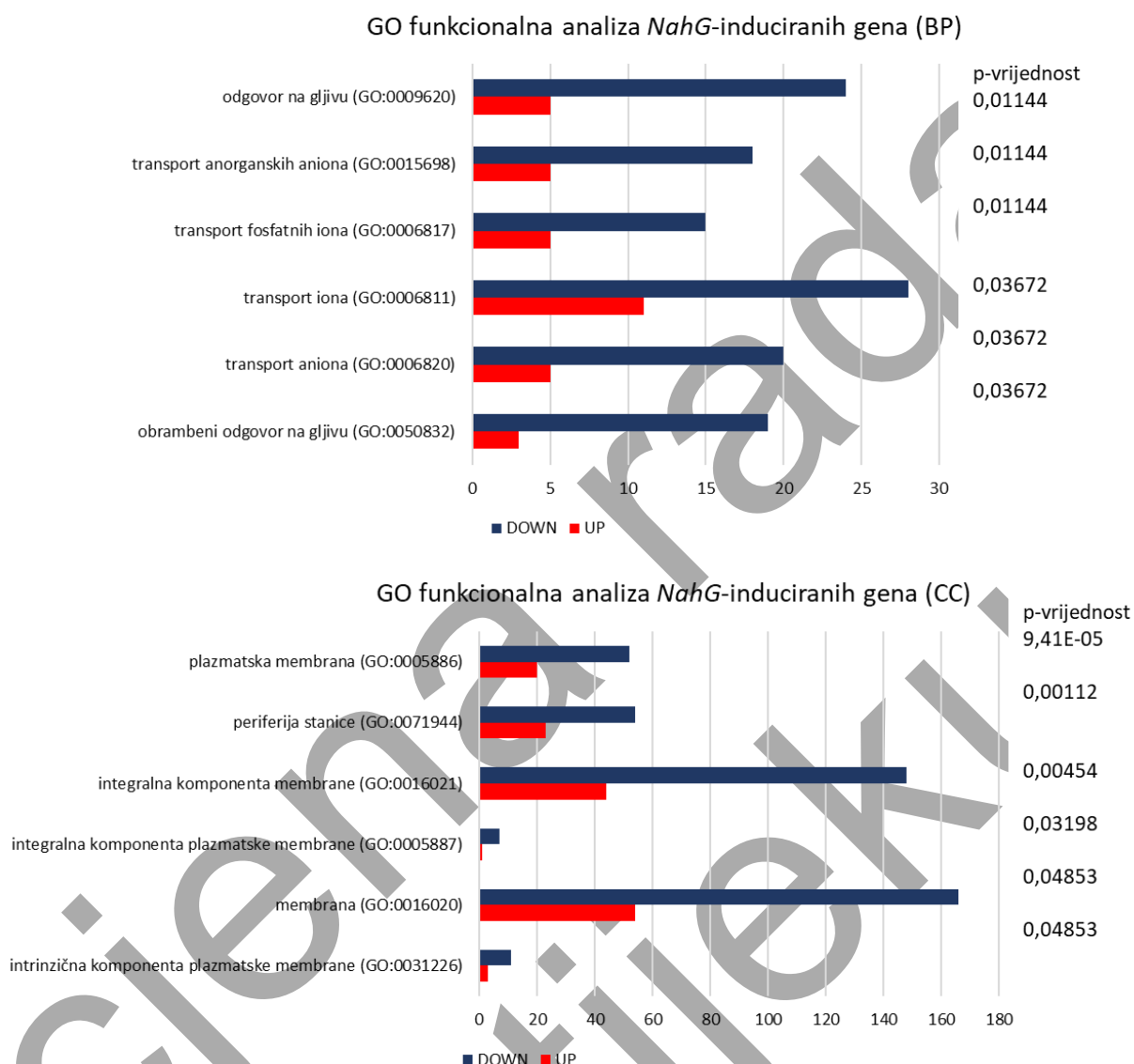
Geni za obje linije u svim navedenim terminima uglavnom su bili smanjeno eksprimirani, s iznimkom nekoliko BP termina u wt liniji kao što su odgovor na podražaj, ritmički procesi te cirkadijalni ritam i njegovu regulaciju (Slika 33.a.). Sveukupno, zapažen je znatno manji broj obogaćenih GO termina u *NahG* biljkama u usporedbi s biljkama divljeg tipa nakon infekcije PSTVd.

a)



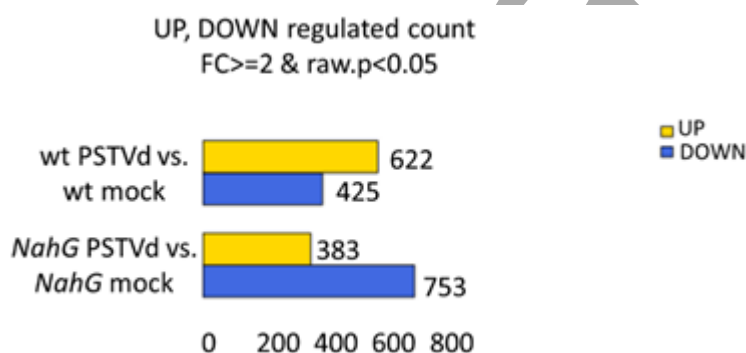
Slika 33. Opis slike na sljedećoj stranici.

b)



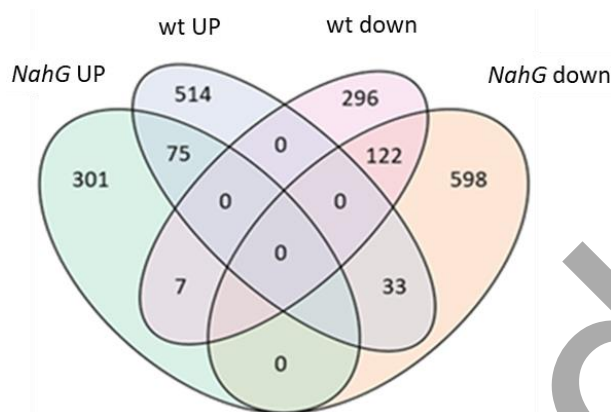
Slika 33. Funkcionalna klasifikacija genske ontologije (GO) svih DEG između biljaka inficiranih s PSTVd i kontrolnih (mock) biljaka. (a) GO funkcionalna analiza DEG u wt liniji nakon infekcije s PSTVd, te (b) GO funkcionalna analiza DEG u *NahG* liniji nakon infekcije s PSTVd. Glavni GO termini (oni s najviše DEG) pripadaju kategorijama biološkog procesa (engl. *biological process*, BP), stanične komponente (engl. *cellular component*, CC) i molekularna funkcija (engl. *molecular function*, MF). GeneRatio (x-os) izračunava se kao omjer između broja gena prisutnih u GO izrazu i ukupnog broja gena u kategoriji. U Prilogu 1. nalazi se tablica sa engleskim nazivima termina te brojem pojačanih (engl. *up*) i smanjenih (engl. *down*) eksprimiranih gena, kao i korigiranim p-vrijednostima.

Prikaz dijagrama diferencijalne analize ekspresije gena u usporedbi wt PSTVd inficiranih u odnosu na wt mock kontrolu i *NahG* PSTVd inficiranih u odnosu na *NahG* mock kontrolu za skupove podataka RNA-seq (Slika 34.). Ukupno je identificirano 1047 DEG ($p < 0,05$) između wt PSTVd inficiranih biljaka i wt mock kontrolnih uzoraka, od toga 622 gena s pojačanom ekspresijom i 425 gena sa smanjenom ekspresijom. Ukupno 1136 DEG ($p < 0,05$) između *NahG* PSTVd inficiranih biljaka i *NahG* mock kontrolnih uzoraka, od toga 383 gena s pojačanom ekspresijom i 753 gena sa smanjenom ekspresijom, što pokazuje značajno smanjenje broja aktiviranih gena u usporedbi s wt biljkama.



Slika 34. Prikaz DEG u biljkama divljeg tipa te transgeničnoj liniji *NahG* inficiranoj PSTVd u usporedbi s odgovarajućom kontrolom (mock biljke). Žuti stupci predstavljaju pojačano eksprimirane DEG, a plavi predstavljaju smanjeno eksprimirane DEG ($|\log_2FC| \geq 2$, $p < 0,05$), dok su njihovi brojevi naznačeni.

Međusobna usporedba DEG ($|\log_2FC| \geq 2$, $p < 0,05$) između biljaka divljeg tipa i *NahG* PSTVd inficiranih biljaka otkrila je da su ova dva genotipa dijelila 237 gena (12,17%, od ukupno 1946 DEG) u usporedbi, dok je 810 DEG (41,62%) pokazalo specifično promijenjenu ekspresiju u biljkama divljeg tipa, a 899 DEG (46,19%) imalo specifično promijenjenu ekspresiju u *NahG* biljkama (Slika 35.).



Slika 35. Vennov dijagram prikazuje broj diferencijalno eksprimiranih gene ($|\log_2FC| \geq 2$, $p < 0,05$), specifičnih i zajedničkih za wt i *NahG* liniju u odgovoru na infekciju viroidom PSTVd. Venn diagram napravljen je u programu R pomoću paketa VennDiagram. *NahG* UP – pojačano eksprimirani geni u komparaciji *NahG*_PSTVd vs *NahG*_mock; wt UP- pojačano eksprimirani geni u komparaciji wt_PSTVd vs wt_mock; wt down- smanjeno eksprimirani geni u komparaciji wt_PSTVd vs wt_mock; *NahG* down – smanjeno eksprimirani geni u komparaciji *NahG*_PSTVd vs *NahG*_mock.

3.4.2. Funkcionalna analiza ontologije gena (GO) za wt, *opr3* i *coi1* linije

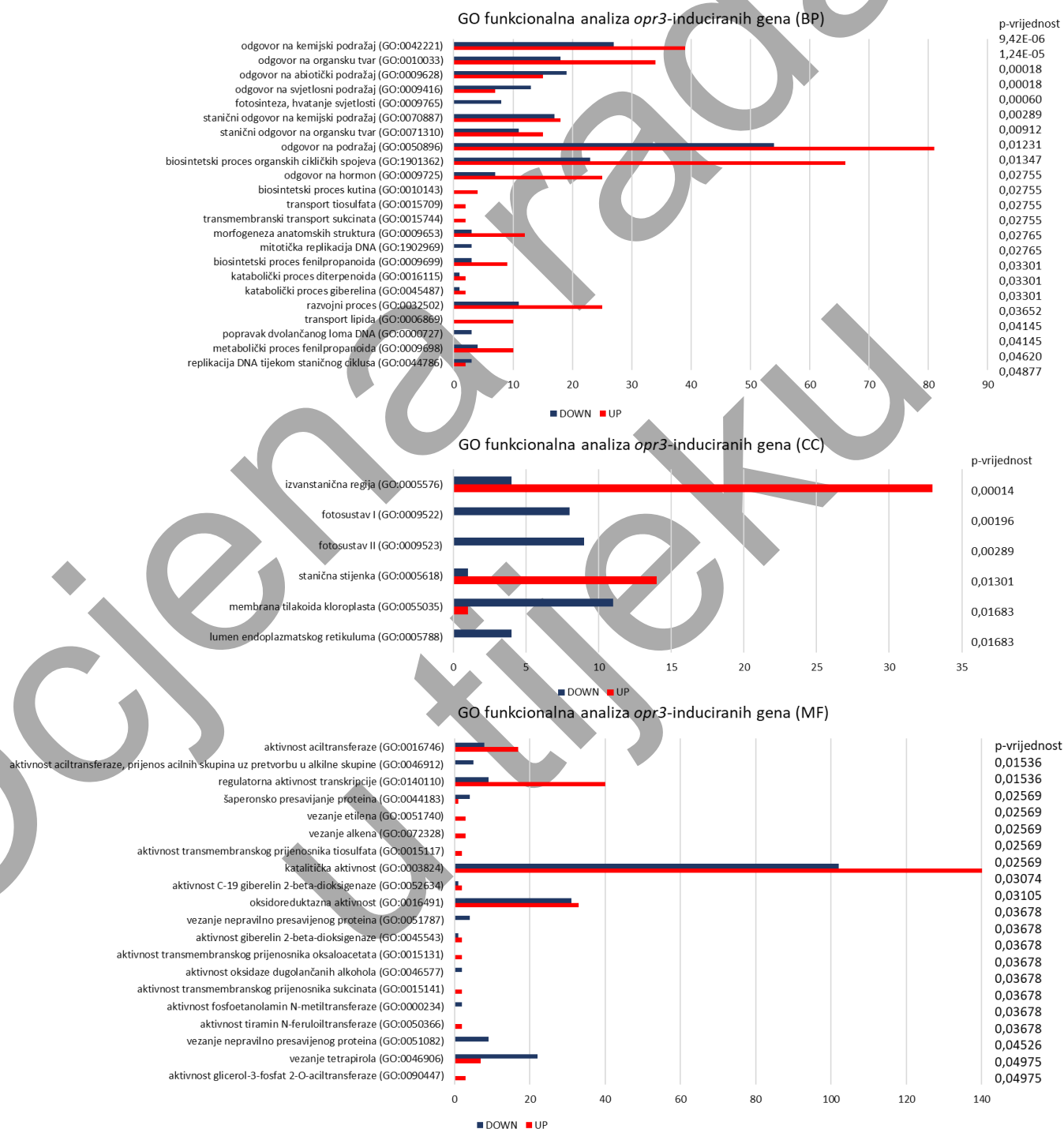
Usporedba rezultata GO funkcionalne analize za tri tipa biljaka (wt, *opr3* i *coi1*) nakon infekcije PSTVd otkrile su promjene u biološkim procesima, staničnim komponentama i molekularnim funkcijama, čime je dobiven uvid u način na koji nedostatak u JA biosintezi (*opr3*) i JA signalizaciji (*coi1*) utječe na obrambene odgovore na PSTVd u krumpiru.

GO funkcionalna analiza DEG ($|\log_2FC| \geq 2$, $p < 0,05$) detektiranih u usporedbi „*opr3* PSTVd vs. *opr3* mock kontrola“ pokazala je značajan broj gena u terminima vezanim uz BP koji su pojačano eksprimirani, kao što su odgovor na podražaj, razvojne procese te odgovor na hormon (Slika 36.a, Prilog 3.). Najobogaćeniji GO termini vezani uz CC *opr3* biljaka koji su bili pojačano eksprimirani povezani su s izvanstaničnom regijom te staničnom stijenkom, dok su smanjeno eksprimirani geni u CC terminima bili povezani s fotosustavom I i II. Kod *opr3* biljaka unutar MF zabilježeni su pojačano eksprimirani geni kod promjena u katalitičkoj aktivnosti, regulatornoj aktivnosti transkripcije te aktivnosti acetiltransferaze.

Transgenična linija *coi1*, deficitarna u JA signalizaciji, također je, kao i wt linija biljaka, pokazala aktivaciju fotosintetskih procesa i odgovora na svjetlost, kao i odgovora na podražaj (kemijski i abiotički) koji su smanjeno eksprimirani, ali su prisutni brojni geni u terminima povezanim s metabolički procesi, uključujući poliaminske metaboličke procese i negativnu regulaciju ET-signalnog puta koji su uglavnom pojačano eksprimirani. Termini unutar CC

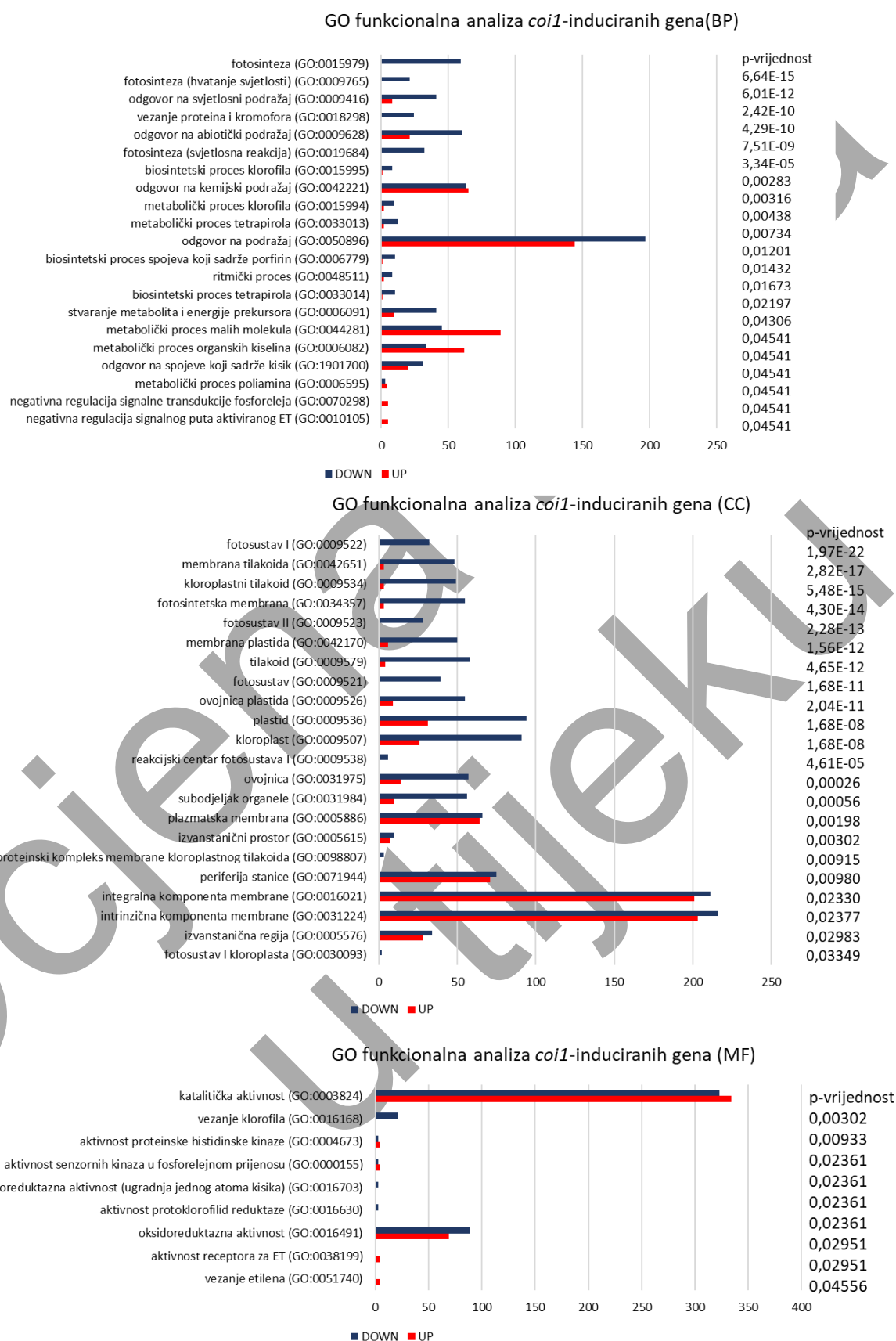
povezani s fotosustavom I, te kloroplastnim strukturama (kao što su membrana tilakoida, kloroplastni tilakoid i fotosintetska membrana) bili su smanjeno eksprimirani. Najizraženije MF obogaćene smanjeno eksprimiranim DEG uključivale su termine za vezanje klorofila i kinazne aktivnosti (katalitička i oksidoreduktivna aktivnost) (Slika 36.b, Prilog 3.).

a)



Slika 36. Opis slike na stranici 83.

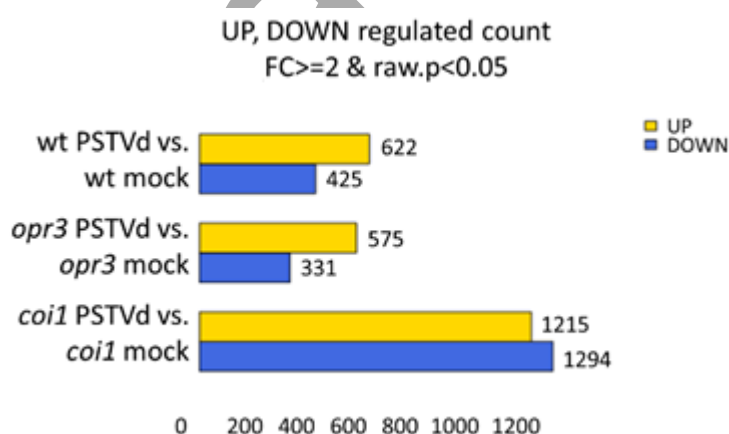
b)



Slika 36. Opis slike na sljedećoj stranici.

Slika 36. Funkcionalna klasifikacija genske ontologije (GO) svih DEG između biljaka inficiranih s PSTVd i kontrolnih (mock) biljaka. (a) GO funkcionalna analiza DEG u *opr3* liniji nakon infekcije s PSTVd, te (b) GO funkcionalna analiza DEG u *coi1* liniji nakon infekcije s PSTVd. Glavni GO termini (oni s najviše DEG) pripadaju kategorijama biološkog procesa (engl. *biological process*, BP), stanične komponente (engl. *cellular component*, CC) i molekularna funkcija (engl. *molecular function*, MF). GeneRatio (x-os) izračunava se kao omjer između broja gena prisutnih u GO izrazu i ukupnog broja gena u kategoriji. U Prilogu 2. nalazi se tablica sa engleskim nazivima termina te brojem pojačanih (engl. *up*) i smanjeno (engl. *down*) eksprimiranih gena, kao i korigiranim p-vrijednostima.

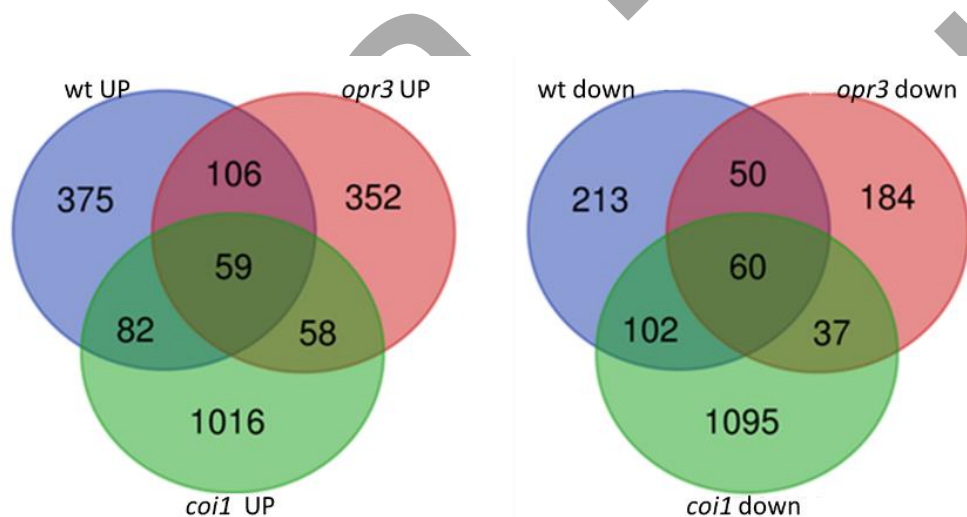
Prikaz dijagrama diferencijalne analize ekspresije gena pokazala je značajno više DEG u *coi1* liniji, u odnosu na wt i *opr3* (Slika 37.). Ukupno je identificirano 906 DEG ($p < 0,05$) između *opr3* PSTVd inficiranih biljaka i *opr3* mock kontrolnih uzoraka, od toga 575 gena s pojačanom ekspresijom i 331 gena sa smanjenom ekspresijom. Nadalje, identificirano je ukupno 2509 DEG ($p < 0,05$) između *coi1* PSTVd inficiranih biljaka i *coi1* mock kontrolnih uzoraka, od toga 1215 gena s pojačanom ekspresijom i 1294 gena sa smanjenom ekspresijom.



Slika 37. Prikaz DEG u biljkama divljeg tipa te transgeničnim linijama krumpira *opr3* i *coi1* inficiranim PSTVd u usporedbi s odgovarajućom kontrolom (mock biljke). Žuti stupci predstavljaju pojačano eksprimirane DEG, a plavi predstavljaju smanjeno eksprimirane DEG ($|\log_2 FC| \geq 2$, $p < 0,05$), dok su njihovi brojevi naznačeni.

Međusobna usporedba DEG ($|\log_2 FC| \geq 2$, $p < 0,05$) između biljaka divljeg tipa, *opr3* i *coi1* biljaka dodatno je analizirana, pri čemu su identificirani zajednički i specifično eksprimirani geni za svaku liniju. Identificirano je 59 pojačano i 60 smanjeno eksprimiranih zajedničkih gena (3,14%, 119 DEG od 3789 ukupnih DEG), a rezultati su prikazani Vennovim dijagramima (Slika 38.).

Navedena tri genotipa kod pojačano eksprimiranih gena dijele 59 DEG (2,88%), dok je 375 DEG (18,31%) pokazalo specifično promijenjenu ekspresiju u biljkama divljeg tipa, 352 DEG (17,19%) imala su specifično promijenjenu ekspresiju u *opr3* biljkama, te 1016 DEG (49,61%) imala su specifično promijenjenu ekspresiju u *coi1* biljkama. Broj pojačano eksprimiranih DEG dijeljenih između wt i *opr3* linije je 106 (5,18%), između wt i *coi1* je 82 (4,01%), dok je između *opr3* i *coi1* 58 (2,83%) (Slika 35.). U smanjeno eksprimiranim genima navedena tri genotipa dijele 60 DEG (3,45%), dok je 213 DEG (12,23%) pokazalo specifično promijenjenu ekspresiju u biljkama divljeg tipa, 184 DEG (10,57%) imala su specifično promijenjenu ekspresiju u *opr3* biljkama, te 1095 DEG (62,89%) imala su specifično promijenjenu ekspresiju u *coi1* biljkama. Broj DEG smanjene ekspresije dijeljenih između wt i *opr3* linije je 50 (2,87%), između wt i *coi1* je 102 (5,86%), dok je između *opr3* i *coi1* 37 (2,13%) (Slika 38.)



Slika 38. Vennovi dijagrami prikazuju broj diferencijalno eksprimiranih gena ($|\log_2FC| \geq 2$, $p < 0.05$), specifičnih i zajedničkih za wt, *opr3* i *coi1* liniju u odgovoru na infekciju viroidom PSTVd. Slika lijevo prikazuje pojačano eksprimirane DEG, dok slika desno prikazuje smanjeno eksprimirane DEG kod sve 3 linije. Venn diagram napravljen je u programu R pomoću paketa VennDiagram. wt UP – pojačano eksprimirani geni u komparaciji wt_PSTVd vs wt_mock; *opr3* UP – pojačano eksprimirani geni u komparaciji *opr3*_PSTVd vs *opr3*_mock; *coi1* UP – pojačano eksprimirani geni u komparaciji *coi1*_PSTVd vs *coi1*_mock; wt down – smanjeno eksprimirani geni u komparaciji wt_PSTVd vs wt_mock; *opr3* down – smanjeno eksprimirani geni u komparaciji *opr3*_PSTVd vs *opr3*_mock; *coi1* down – smanjeno eksprimirani geni u komparaciji *coi1*_PSTVd vs *coi1*_mock.

3.4.3. KEGG putevi i MapMan analiza biotskog stresa za *NahG* i wt komparacije

KEGG analiza provedena je kako bi se dodatno razjasnile funkcionalne razlike između gena specifičnih za genotip i zajedničkih DEG u biljkama divljeg tipa i *NahG* PSTVd inficiranim biljkama (Tablica 4.).

Nakon provedene KEGG funkcionalne analize, dobili smo detaljniji uvid u funkciju zajedničkih i specifično eksprimiranih DEG, odnosno njihovu zastupljenost u važnim metaboličkim putevima. KEGG analizom 149 specifično pojačano eksprimiranih DEG ($fc > 2$) u wt liniji anotirano je u 49 funkcionalnih puteva. U Tablici 4. prikazano je 5 puteva s najviše DEG, koji uključuju 72 specifično pojačano eksprimirana gena u signalnim putevima biljaka divljeg tipa. Ovi putevi uključuju MAPK signalni put, signalnu transdukciju fitohormona i interakciju biljka-patogen. Pojačano eksprimirani geni kod wt biljaka obogaćeni su za signalne puteve povezane s obrambenim odgovorom, uključujući biosintezu fenilpropanoida.

S druge strane, KEGG analizom 130 specifično smanjeno eksprimiranih DEG ($fc > 2$) u wt liniji anotirano je u 50 funkcionalnih puteva. U Tablici 4. prikazano je 5 puteva s najviše DEG, koji uključuju identificirano je 45 specifično smanjeno eksprimiranih gena u PSTVd inficiranim biljkama divljeg tipa. Ovi putevi uključuju fotosintezu, procesiranje proteina, biosintezu flavonoida i fiksaciju ugljika (Tablica 4.). Smanjeno eksprimirani geni uključuju proteine povezane s fotosintezom i flavonoidnom biosintezom.

Nadalje, KEGG analizom 88 specifično pojačano eksprimiranih DEG ($fc > 2$) u *NahG* liniji anotirano je u 55 funkcionalnih puteva. U Tablici 4. prikazano je 5 puteva s najviše DEG, koji uključuju 20 specifično pojačano eksprimiranih gena u signalnim putevima *NahG* biljaka koji uključuju biosintezu zeatina, metabolizam škroba i saharoze te biosintezu kutina, suberina i voska (Tablica 4.).

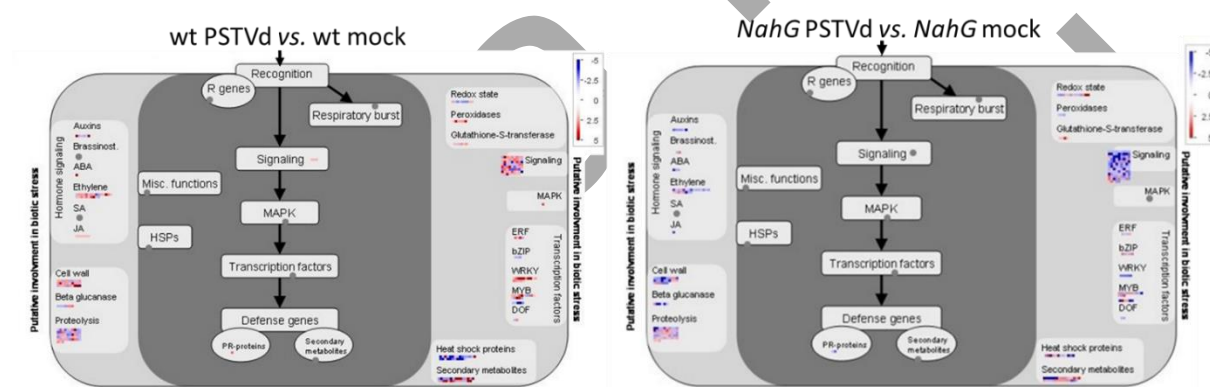
Nasuprot tome, KEGG analizom 107 specifično smanjeno eksprimiranih DEG ($fc > 2$) u *NahG* liniji anotirano je u 54 funkcionalna puta. U Tablici 4. prikazano je 5 puteva s najviše DEG, koji uključuju 31 specifično smanjeno eksprimirani gen u *NahG* PSTVd inficiranim biljkama pripisuje se signalnim putevima povezanim s interakcijom biljka-patogen, signalnom transdukcijom fitohormona, biosintezom fenilpropanoida i MAPK signalnim putem (Tablica 4.).

Zajednički (engl. *common*) pojačano eksprimirani DEG kod wt i *NahG* biljaka u ovom istraživanju zastupljeni su u 7 funkcionalnih puteva sa 10 DEG. U Tablici 4. prikazano je 5 puteva s najviše DEG, koji su povezani s putevima prijenosa signala fitohormona, te metabolizma amino šećera i nukleotida, kao i taurina i hipotaurina. Zajednički smanjeno eksprimirani DEG raspoređeni u 19 puteva sa 24 DEG, od kojih je u Tablici 4. prikazano 5 puteva s najviše DEG povezanih s putevima interakcije biljka-patogen te biosinteze terpenoida.

Tablica 4. KEGG analiza genotip-specifičnih i zajedničkih gena pojačano ili smanjeno eksprimiranih u biljkama wt i *NahG* linijama, nakon infekcije s viroidom PSTVd. Prikazano je 5 funkcionalnih puteva s najvećim brojem pripadajućih DEG ($|\log_2FC| \geq 2$). Analiza KEGG provedena je u program R pomoću paketa KEGGREST.

	Kod signalnog puta	KEGG signalni put	Svi DEG	Broj gena u signalnom putu	p-vrijednost
Specifični wt up	sot04016	MAPK signaling pathway-plant	149	19	0,0017
	sot04075	Plant hormone signal transduction		16	0,0002
	sot04626	Plant-pathogen interaction		14	0,3518
	sot00940	Phenylpropanoid biosynthesis		12	0,6134
	sot00360	Phenylalanine metabolism		11	0,1747
Specifični <i>NahG</i> up	sot00908	Zeatin biosynthesis	88	6	0,3103
	sot00500	Starch and sucrose metabolism		5	0,6636
	sot00073	Cutin, suberine and wax biosynthesis		3	0,0433
	sot00710	Carbon fixation in photosynthetic organisms		3	0,4801
	sot04016	MAPK signaling pathway-plant		3	0,6784
Specifični wt down	sot00196	Photosynthesis-antenna proteins	130	16	0,9912
	sot04141	Protein processing endoplasmic reticulum		13	0,0125
	sot00941	Flavonoid biosynthesis		6	0,9411
	sot00710	Carbon fixation in photosynthetic organisms		5	0,1688
	sot00195	Photosynthesis		5	0,8378
Specifični <i>NahG</i> down	sot04626	Plant-pathogen interaction	107	10	0,5393
	sot04075	Plant hormone signal transduction		7	0,5794
	sot00940	Phenylpropanoid biosynthesis		5	0,6726
	sot00999	Biosynthesis of various plant secondary metabolites		5	0,7541
	sot04016	MAPK signaling pathway-plant		4	0,8654
Zajednički up	sot04075	Plant hormone signal transduction	10	3	0,5459
	sot00520	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism		2	0,9657
	sot00430	Taurine and hypotaurine metabolism		1	0,2800
	sot00500	Starch and sucrose metabolism		1	0,2000
	sot04016	MAPK signaling pathway - plant		1	0,4800
Zajednički down	sot04626	Plant-pathogen interaction	24	3	0,4238
	sot00900	Terpenoid backbone biosynthesis		2	0,2947
	sot00910	Nitrogen metabolism		2	0,0131
	sot04712	Circadian rhythm - plant		2	0,7355
	sot00196	Photosynthesis - antenna proteins		1	0,9600

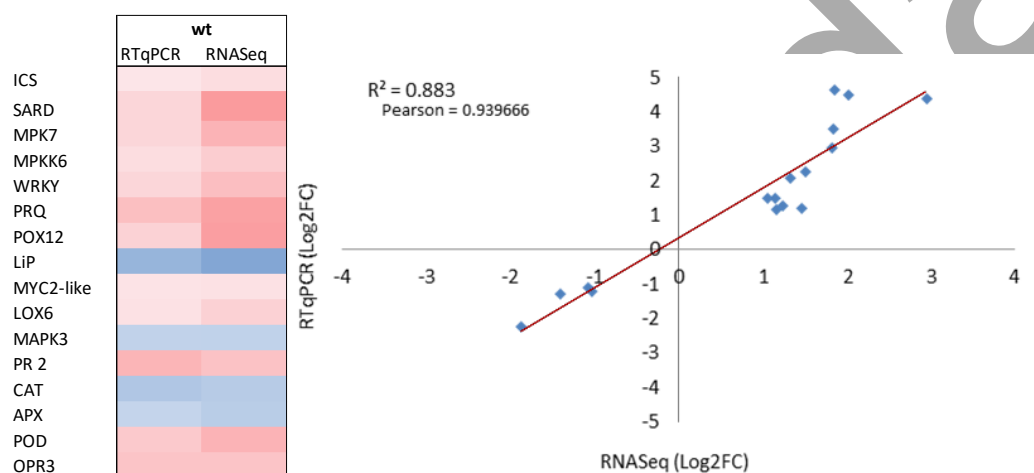
S obzirom na to da fitohormoni imaju važnu ulogu u odgovoru biljaka na patogene (Alazem & Lin, 2015), dodatno smo analizirali doprinos hormona povezanih gena obrambenom odgovoru na PSTVd tako što smo sve DEG ($|\log_2FC| \geq 2$, $p < 0,05$) podvrgnuli funkcionalnoj MapMan klasifikaciji. Diferencijalno eksprimirani geni (DEG) u wt i *NahG* linijama klasificirani su u kategorije povezane s biotskim stresom (MapMan biotic stress overview) (Slika 39.). Općenito, podaci su pokazali da je većina prikazanih DEG u *NahG* liniji smanjeno eksprimirana, dok je kod wt linije pojačano eksprimirana. Najveće razlike između wt i *NahG* linija u broju DEG nalaze se u procesima kao što su signaling, transkripcijski faktori (WRKY, MYB, bZIP), signaling hormona, posebice ET, AUX, JA, te u procesu vezanom uz staničnu stijenku (engl. *cell wall*).



Slika 39. Vizualizacija DEG ($|\log_2FC| \geq 2$) uključenih u odgovor na biotski stres, prema program MapMan. Prikazani su DEG u wt i *NahG* biljkama nakon infekcije PSTVd. Odgovor biljke na napad patogena uključuje nekoliko koraka: prepoznavanje signala patogena pomoću pripadajućih receptora (engl. *R genes*, R geni); aktivacija transkripcije kaskade imunološkog sustava biljke, uključujući promjene u oksidativnom stresu; prijenos signala koji vodi do proizvodnje obrambenih molekula, uključujući PR-proteine, sekundarne metabolite i proteine toplinskog šoka. Kvadratići predstavljaju gene, označeni crvenom bojom za aktivaciju (pojačano eksprimirani), a plavom bojom za inhibiciju (smanjeno eksprimirani). Tamnosivi kružići označavaju da nijedan izraženi gen nije mogao biti pridružen odgovarajućoj podjeli. ABA, abscizinska kiselina; MAPK, mitogen-aktivirana protein kinaza; SA, salicilna kiselina; JA, jasmonska kiselina; HSPs, proteini toplinskog šoka.

RTqPCR analizom potvrđeni su RNASeq rezultati. Rezultati su pokazali da su obrasci ekspresije 16 odabranih DEG dobro korelirali s RNASeq rezultatima. Na grafu je prikazan Pearsonov koeficijent korelacije (P) koji mjeri snagu i smjer linearne korelacije između ekspresije gena dobivene RTqPCR metodom i RNASeq analizom, a on je iznosio 0,93 (Slika

40.). R^2 , koeficijent determinacije, prikazuje koliko varijacije u podacima može biti objašnjeno linearnošću između tih dviju metoda. Viši Pearsonov koeficijent i R^2 ukazuju na snažnu korelaciju između metoda, što potvrđuje pouzdanost RNASeq podataka u ovom istraživanju.



Slika 40. Validacija rezultata RNASeq analize pomoću metode RTqPCR. Trend ekspresije 16 DEG u RNASeq podacima i rezultatima dobivenim metodom RTqPCR iz wt inficiranih vs wt mock komparacija. X-os prikazuje rezultat RTqPCR analize, a y-os predstavlja relativnu razinu ekspresije DEG dobivene RNASeq analizom. P - Pearsonov koeficijent korelacije; R^2 - koeficijent determinacije

3.4.4. KEGG putevi i MapMan analiza biotskog stresa za *opr3*, *coi1* i wt komparacije

Kako bi se dodatno razjasnile funkcionalne razlike između gena specifičnih za genotip i zajedničkih DEG u biljkama divljeg tipa, *opr3* i *coi1* PSTVd inficiranim biljkama provedena je KEGG analiza (Tablica 5.).

Nakon provedene KEGG funkcionalne analize, dobili smo detaljniji uvid u zajedničke i specifično eksprimirane DEG odnosno njihovu zastupljenost u važnim metaboličkim putevima. KEGG analizom 113 specifično pojačano eksprimiranih DEG ($fc > 2$) u wt liniji anotirano je u 42 funkcionalna puta. U Tablici 5. prikazano je 5 puteva s najviše DEG, koji uključuju 49 specifično pojačano eksprimiranih gena u signalnim putevima biljaka divljeg tipa, povezanih putevima koji uključuju interakciju biljka-patogen, metabolizam i biosintezu fenilalanina, MAPK signalni put te prijenos signala fitohormona. S druge strane, KEGG analizom 96 specifično smanjeno eksprimiranih DEG ($fc > 2$) u wt liniji anotirano je u 54

funkcionalna puta. U Tablici 5. prikazano je 5 puteva s najviše DEG, koji uključuju 24 specifično smanjeno eksprimiranih gena u PSTVd inficiranim biljkama divljeg tipa povezanih s putevima koji uključuju procesiranje proteina u endoplazmatskom retikulumu, interakciju biljka-patogen, endocitozu, biosintezu fenilpropanoida i flavonoida (Tablica 5.).

Također KEGG analizom 89 specifično pojačano eksprimiranih DEG ($fc > 2$) u *opr3* liniji anotirano je u 42 funkcionalna puta. U Tablici 5. prikazano je 5 puteva s najviše DEG, koji uključuju 32 specifično pojačano eksprimiranih gena u signalnim putevima *opr3* biljaka od kojih su najobogaćeniji bili prijenos signala fitohormona, MAPK signalni put, interakcija biljka-patogen, biosinteza kutina, suberina i voska, te metabolizam glicerolipida. Osim toga, KEGG analizom 96 specifično smanjeno eksprimiranih DEG ($fc > 2$) u *opr3* liniji anotirano je u 50 funkcionalnih puteva. U Tablici 5. prikazano je 5 puteva s najviše DEG, koji uključuju 25 specifično smanjeno eksprimiranih gena u *opr3* PSTVd inficiranim biljkama od kojih su najobogaćeniji bili uključeni u procesiranje proteina u endoplazmatskom retikulumu, biosintezu fenilpropanoida, razgradnju valina, leucina i izoleucina, interakciju biljka-patogen, te MAPK signalni put (Tablica 5.).

Nadalje, KEGG analizom 403 specifično pojačano eksprimirana DEG ($fc > 2$) u *coi1* liniji anotirano je u 94 funkcionalna puta. U Tablici 5. prikazano je 5 puteva s najviše DEG, koji uključuju 83 specifično pojačano eksprimirana gena otkrivena su u signalnim putevima *coi1* biljaka, od kojih su najobogaćeniji bili oni za metabolizam cisteina i metionina, MAPK signalni put, prijenos signala fitohormona, razgradnju valina, leucina i izoleucina, te biosintezu fenilpropanoidnog puta. Osim toga, KEGG analizom 341 specifično smanjeno eksprimiranih DEG ($fc > 2$) u *coi1* liniji anotirano je u 92 funkcionalna puta. U Tablici 5. prikazano je 5 puteva s najviše DEG, koji uključuju 66 specifično smanjeno eksprimiran gen u *coi1* PSTVd inficiranim biljkama u putevima za fotosintezu, prijenos signala biljnim hormonima, oksidativnu fosforilaciju, biosintezu raznih sekundarnih metabolita biljke, oksidativna fosforilacija te fotosinteza-proteini antenskog kompleksa (Tablica 5.).

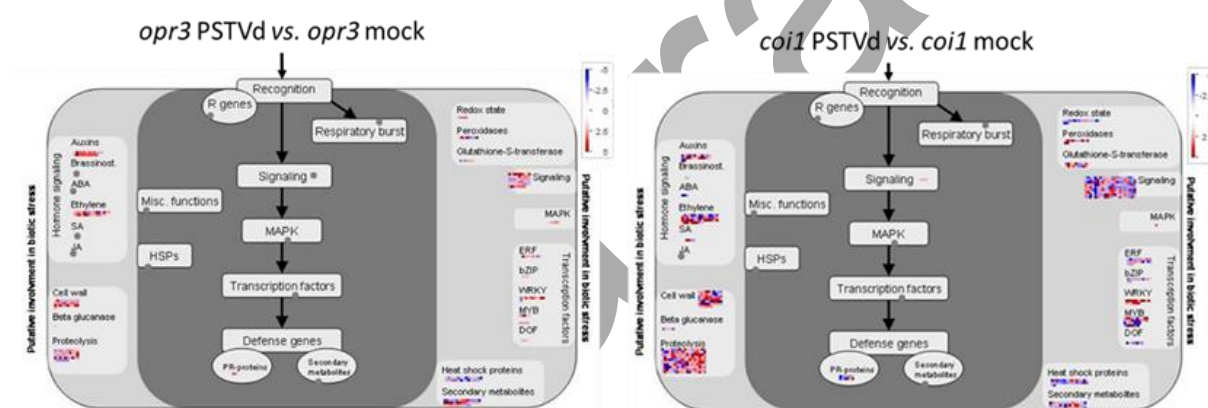
KEGG analizom 15 zajednička (engl. *common*) pojačano eksprimiranih DEG ($fc > 2$) za wt, *opr3* i *coi1* anotirano je u 6 funkcionalnih puteva. U Tablici 5. prikazano je 5 puteva s najviše DEG koji su povezani s MAPK signalnim putevima, putevima prijenosa signala fitohormona, te metabolizma škroba i saharoze. KEGG analizom 33 zajednička (engl. *common*) smanjeno eksprimirana DEG ($fc > 2$) za wt, *opr3* i *coi1* anotirano je u 16 funkcionalnih puteva, od kojih

je 5 puteva s najviše DEG prikazano u Tablici 5. uključujući fotosintezu, glikolizu i glukoneogenezu te metabolizma piruvata.

Tablica 5. KEGG analiza genotip-specifičnih i zajedničkih gena pojačano ili smanjeno eksprimiranih u biljkama wt, *opr3* i *coi1* linije, nakon infekcije s viroidom PSTVd. Prikazano je 5 funkcionalnih puteva s najvećim brojem pripadajućih DEG ($|\log_2FC| \geq 2$). Analiza KEGG provedena je u program R pomoću paketa KEGGREST.

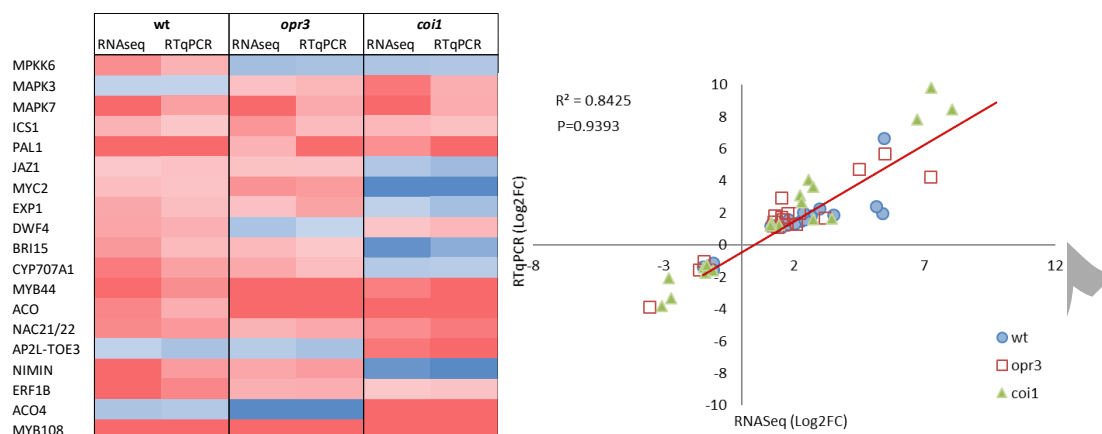
	Kod signalnog puta	KEGG signalni put	Svi DEG	Broj gena u signalnom putu	p-vrijednost
Specifični wt up	sot04626	Plant-pathogen interaction	113	12	0,1798
	sot00360	Phenylalanine metabolism		11	0,1116
	sot00940	Phenylpropanoid biosynthesis		10	0,3292
	sot04016	MAPK signaling pathway		9	0,0012
	sot04075	Plant hormone signal transduction		7	0,0004
Specifični <i>opr3</i> up	sot04075	Plant hormone signal transduction	89	9	0,4709
	sot04016	MAPK signaling pathway - plant		6	0,1573
	sot04626	Plant-pathogen interaction		6	0,6323
	sot00073	Cutin, suberine and wax biosynthesis		6	0,7138
	sot00561	Glycerolipid metabolism		5	0,3322
Specifični <i>coi1</i> up	sot00270	Cysteine and methionine metabolism	401	21	0,2593
	sot04016	MAPK signaling pathway - plant		20	0,1052
	sot04075	Plant hormone signal transduction		16	0,0144
	sot00280	Valine, leucine and isoleucine degradation		13	0,8157
	sot00940	Phenylpropanoid biosynthesis		13	0,9350
Specifični wt down	sot04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	96	7	0,0483
	sot04626	Plant-pathogen interaction		5	0,4751
	sot04144	Endocytosis		4	0,0697
	sot00940	Phenylpropanoid biosynthesis		4	0,9247
	sot00941	Flavonoid biosynthesis		4	0,9506
Specifični <i>opr3</i> down	sot04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	96	7	0,3806
	sot00940	Phenylpropanoid biosynthesis		6	0,8360
	sot00280	Valine, leucine and isoleucine degradation		4	0,1149
	sot04626	Plant-pathogen interaction		4	0,3609
	sot04016	MAPK signaling pathway		4	0,8177
Specifični <i>coi1</i> down	sot00195	Photosynthesis	341	19	0,9995
	sot04075	Plant hormone signal transduction		13	0,1456
	sot00190	Oxidative phosphorylation		12	0,9995
	sot00999	Biosynthesis of various plant secondary metabolites		11	0,0167
	sot00196	Photosynthesis - antenna proteins		11	0,1081
Zajednički up	sot04016	MAPK signaling pathway - plant	15	6	0,2297
	sot04075	Plant hormone signal transduction		4	0,6356
	sot00500	Starch and sucrose metabolism		2	0,7808
	sot00904	Diterpenoid biosynthesis		1	0,6487
	sot00940	Phenylpropanoid biosynthesis		1	0,9468
Zajednički down	sot00196	Photosynthesis - antenna proteins	33	15	0,9994
	sot00010	Glycolysis / Gluconeogenesis		2	0,0188
	sot00620	Pyruvate metabolism		2	0,2616
	sot04712	Circadian rhythm - plant		2	0,3327
	sot00030	Pentose phosphate pathway		1	0,0666

Dodatno smo analizirali doprinos hormona povezanih gena obrambenom odgovoru na PSTVd tako da smo sve DEG ($|\log_2FC| \geq 2$, $p < 0,05$) podvrgnuli funkcionalnoj MapMan klasifikaciji u kategoriji biotskog stresa (Slika 41.). Iz dobivenih podataka vidljivo je da linija *coi1* ima najveći broj DEG u svakoj kategoriji, pri čemu su većina gena značajno pojačano ili smanjeno eksprimirani. Najveće razlike u broju DEG primijećene su u procesima signalizacije, proteolize i hormonske signalizacije, osobito ET. Linija *opr3* pokazuje najblažu aktivaciju DEG u odnosu na sve tri testirane linije.



Slika 41. Vizualizacija DEG ($|\log_2FC| \geq 2$) uključenih u odgovor na biotski stres, prema program MapMan. Prikazani su DEG u wt, *opr3* i *coi1* biljkama nakon infekcije viroidom PSTVd. Odgovor biljke na napad patogena uključuje nekoliko koraka: prepoznavanje signala patogena pomoću pripadajućih receptora (engl. *R genes*, R geni); aktivacija transkripcije kaskade imunološkog sustava biljke, uključujući promjene u oksidativnom stresu; prijenos signala koji vodi do proizvodnje obrambenih molekula, uključujući PR-proteine, sekundarne metabolite i proteine toplinskog šoka. Kvadratići predstavljaju gene, označeni crvenom bojom za aktivaciju (pojačano eksprimirani), a plavom bojom za inhibiciju (smanjeno eksprimirani). Tamnosivi kružići označavaju da nijedan izraženi gen nije mogao biti pridružen odgovarajućoj podjeli. ABA, abscizinska kiselina; MAPK, mitogen-aktivirana protein kinaza; SA, salicilna kiselina; JA, jasmonska kiselina; HSPs, proteini toplinskog šoka.

Dodatno, provedena je RTqPCR analiza DEG kako bi potvrdili rezultate RNASeq analize. Komparativna analiza rezultata RNA-seq i RT-qPCR za wt, *opr3* i *coi1* biljke pokazala je da obrasci ekspresije 19 odabranih DEG dobro koreliraju s rezultatima RNASeq. Na grafu je prikazan Pearsonov koeficijent (P) korelacije koji mjeri snagu i smjer linearne korelacije između ekspresije gena dobivene RTqPCR metodom i RNASeq analizom, a on je iznosio 0,939 (Slika 42.). Viši Pearsonov koeficijent i R^2 ukazuju na snažnu korelaciju između metoda, što potvrđuje pouzdanost RNASeq podataka u ovom istraživanju.



Slika 42. Validacija rezultata RNASeq analize pomoću metode RTqPCR. Trend ekspresije 19 DEG u RNASeq podacima i rezultatima dobivenim metodom RTqPCR iz komparacija *wt* inficiranih vs *wt* mock, *opr3* inficiranih vs *opr3* mock i *coi1* inficiranih vs *coi1* mock. X-os prikazuje rezultat RTqPCR analize, a y-os predstavlja relativnu razinu ekspresije DEG dobivene RNASeq analizom. P- Pearsonov koeficijent korelacije; R²- koeficijent determinacije.

3.5. Promjene u sadržaju fitohormona i ekspresiji gena kao odgovor na infekciju viroidom PSTVd

3.5.1. Odgovori fitohormona i gena na infekciju viroidom PSTVd kod *NahG* biljaka

Kako bismo bolje razumjeli dinamiku nakupljanja hormona u kontekstu sistemske infekcije PSTVd u krumpiru, provedeno je ciljano profiliranje 6 stresom povezanih fitohormona (SA, ABA, AUX, *cis*-OPDA, JA-Ile i CS) 4, 5, 6 i 7 wpi pomoću UHPLC-MS/MS. Uz to, promjene u ekspresiji odabranih diferencijalno izraženih gena (DEG) uključenih u biosintezu i metabolizam fitohormona praćene su metodom RT-qPCR. Ekspresija gena analizirana je samo u uzorcima listova jer su oni primarno mjesto aktivacije PTI i sinteze hormona. U ranoj fazi razvoja gomolja bilo je teško isključiti učinak rasta i razvitka od učinka infekcije na nakupljanje hormona.

Kasna faza infekcije (6 do 7 wpi) karakterizirana je značajnom akumulacijom JA, jasmonil-izoleucin (JA-Ile) i njegovog prekursora *cis*-OPDA u uzorcima listova oba ispitivana genotipa (wt i *NahG*) (Slika 31). Značajnija razlika u koncentraciji JA vidljiva je kod *NahG* biljaka u 6 wpi, nakon čega koncentracija u mock uzorcima opada, dok u inficiranim raste u 7 wpi. Primijetili smo da *NahG* biljke imaju višu bazalnu koncentraciju *cis*-OPDA u usporedbi s biljkama divljeg tipa. U skladu s time, aktivacija gena uključenih u biosintezu jasmonata i metabolizam jasmonata (*LOX6*, *OPR3* i *JAR1*) zabilježena je u listovima oba genotipa tijekom 6 wpi u inficiranim biljkama (Slika 45., Prilog 6.). Uz to, pojačana ekspresija gena *COI1*, glavnog regulatora JA-signalnog puta, zabilježena je u listovima biljaka divljeg tipa, ali ne i u *NahG* biljkama nakon infekcije PSTVd, što sugerira aktivaciju JA-signalnog puta. U uzorcima gomolja (Slika 44., Prilog 5.) kod wt biljaka uočena je povećana akumulacija JA u 7 i 8 wpi, te je uočena razlika u odnosu na uzorke listova u kasnijim tjednima uzorkovanja gdje je vidljiva veća koncentracija JA u *NahG* biljkama inficiranim s PSTVd (Slika 4.). Koncentracije JA-Ile i *cis*-OPDA bile su podjednake u oba tipa uzoraka (listovima i gomoljima) (Slika 43., Slika 44.).

Promjene u sadržaju SA u listovima između inficiranih i kontrolnih biljaka divljeg tipa 4 do 6 wpi nisu bile značajne. Međutim, nakon 7 wpi, sadržaj SA u inficiranim biljkama divljeg tipa je smanjen (Slika 43., Prilog 4.). Svi testirani geni povezani sa SA bili su smanjeno eksprimirani u listovima biljaka inficiranih s PSTVd u usporedbi s listovima kontrolnih biljaka divljeg tipa u 4 wpi. Aktivacija gena za biosintezu SA *ICS*, *PAL9* i *SCMT*, gen za SA karboksil

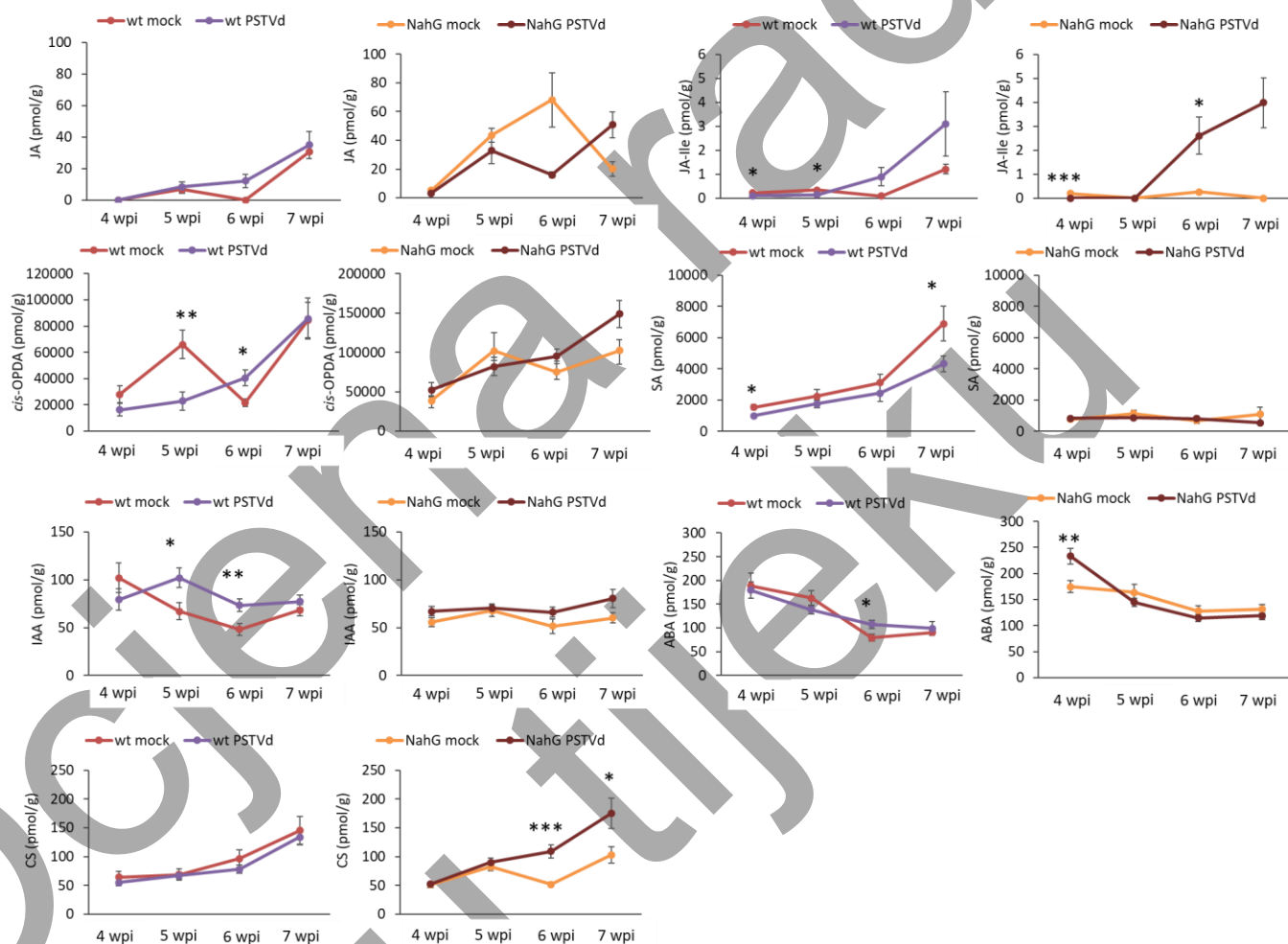
metiltransferazu koja je uključena u sintezu MeSA, zabilježena je u 5 i 6 wpi, dok je aktivacija gena koji kodira NPR1, glavnog regulatora SA-posredovane obrane biljaka, zabilježena u 7 wpi u inficiranim biljkama divljeg tipa. U inficiranim *NahG* biljkama, pojačana ekspresija gena *ICS*, *PAL9*, *SCMT* i *NPR1* bila je prisutna u 4 do 6 wpi, dosegnuvši maksimum u 6 wpi. Infekcija PSTVd nije utjecala na sadržaj SA u *NahG* biljkama (Slika 45., Prilog 6.). Kod gomolja je u 7 i 8 wpi uočena razlika između wt i *NahG* mock i biljaka inficiranih s PSTVd wt i *NahG* biljaka, gdje je u 7 wpi uočena povećana akumulacija u biljkama inficiranim s PSTVd, dok je u 8 wpi obrnuta situacija i povećana je akumulacija kod mock biljaka (Slika 44., Prilog 5.).

Koncentracija endogene IAA porasla je u listovima PSTVd inficiranih biljaka divljeg tipa u odnosu na kontrolne biljke tijekom 5 do 6 wpi. Međutim, kasnije, u 7 wpi, koncentracije IAA su se izjednačile (Slika 43., Prilog 4.). U *NahG* biljkama nije bilo značajne razlike u koncentraciji IAA u listovima biljaka inficiranih s PSTVd i kontrolnih biljaka (Slika 43., Prilog 4.) Ekspresija gena *ILR1*, koji kodira enzim IAA-amino-kiselinsku hidrolazu, značajno je pojačana u listovima biljkama divljeg tipa tijekom 4 do 5 wpi, dok je u *NahG* biljkama porast ekspresije zabilježen između 5 i 7 wpi (Slika 45., Prilog 6.). Također, pojačana ekspresija gena za faktor odgovora na auksin *ARF8* tijekom 4 do 6 wpi ukazuje na aktivaciju AUX signalizacije u oba genotipa nakon infekcije PSTVd. U uzorcima gomolja wt i posebno *NahG* linije, zabilježen je porast sadržaja IAA u gomoljima biljaka inficiranih s PSTVd tijekom 7 wpi, dok su se kasnije, u 8 wpi, koncentracije IAA izjednačile (Slika 44., Prilog 5.).

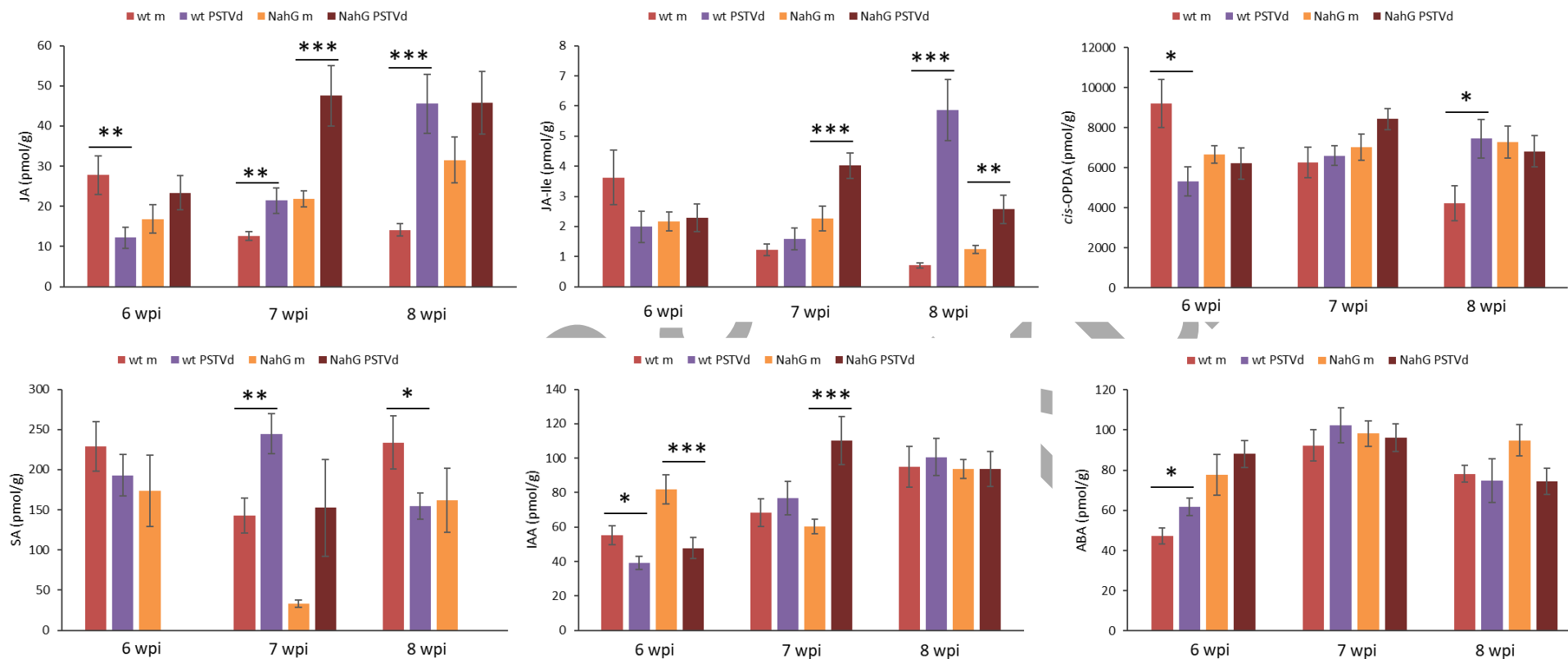
Akumulacija ABA bila je približno jednaka u listovima PSTVd inficiranih biljaka u usporedbi s kontrolnim biljkama oba genotipa, osim manje razlike u 6 wpi kod wt biljaka, te 4 wpi kod *NahG* biljaka gdje su PSTVd inficirane biljke pokazale veću statistički značajnu akumulaciju (Slika 43., Prilog 4.). Pored toga, ekspresija gena povezanih s ABA signalizacijom, uključujući *CYP707A1* (ABA hidroksilaza) i *PYL4* (ABA receptor), bila je smanjena u listovima inficiranih biljaka divljeg tipa, dok je u *NahG* biljkama bila blago povišena (Slika 45., Prilog 6.). Idući trend akumulacije ABA bio je prisutan i u gomoljima istih testiranih biljaka (Slika 44., Prilog 5.).

Nakupljanje CS, glavnog bioaktivnog brasinosteroida, u listovima wt biljaka nije pokazalo značajne razlike između biljaka inficiranih s PSTVd i kontrolnih biljaka. S druge strane, linija *NahG* je pokazala statistički značajno povećanje akumulacije CS u 6 i 7 wpi u biljkama

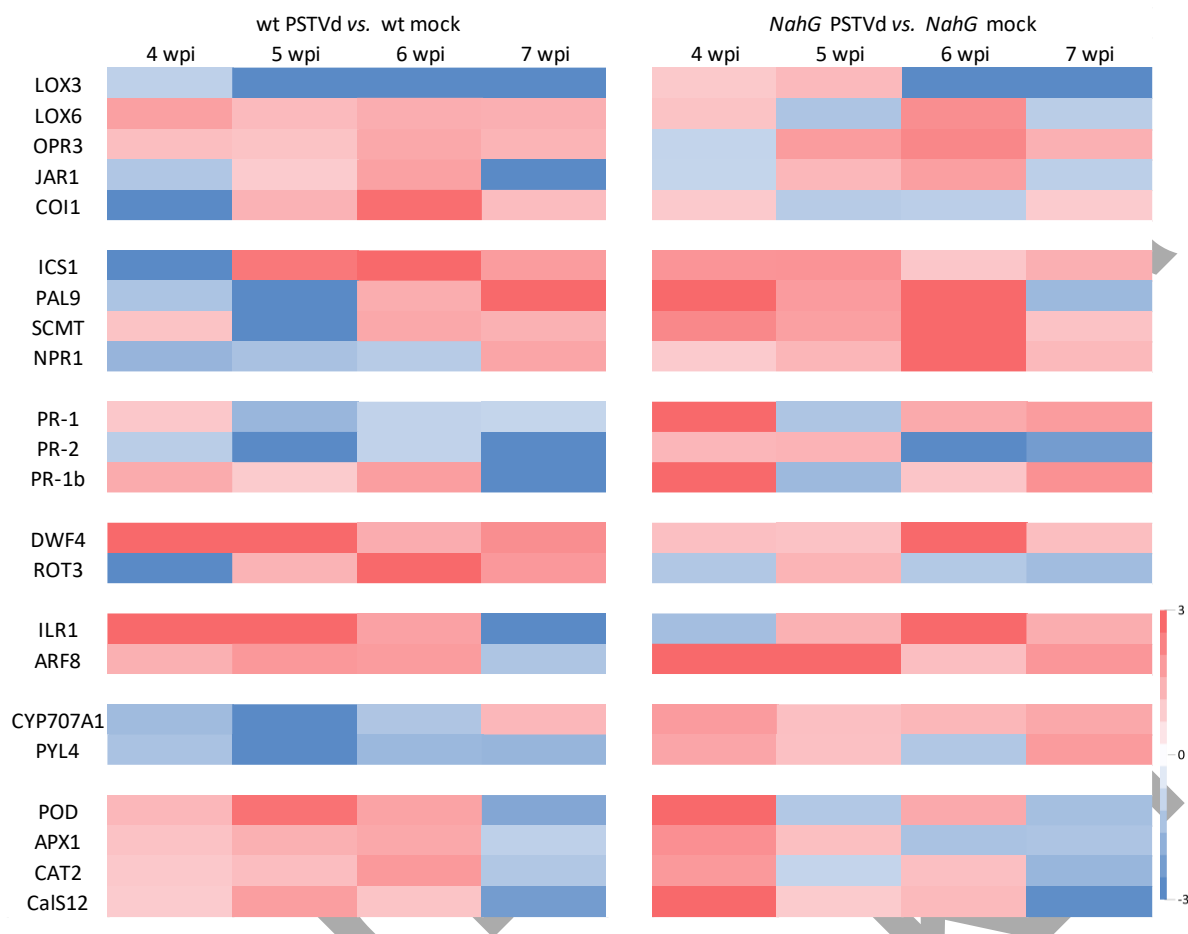
inficiranim s PSTVd. Također je zabilježena pojačana ekspresija gena *DWF4* (citokrom P450 90B1), ranog gena biosinteze BR, u vremenskom periodu od 4 do 7 wpi, dok je indukcija gena *ROT3* (rotundifolia 3, CYP90D1), koji regulira produkciju CS, zabilježena od 5 do 7 wpi u inficiranim biljkama divljeg tipa. U *NahG* biljkama, *DWF4* je bio povišen 6 wpi, dok je *ROT3* bio uglavnom smanjen u odnosu na kontrolne *NahG* biljke (Slika 43., Prilog 4.).



Slika 43. Koncentracija endogenih hormona salicilne kiseline (SA), apscizinske kiseline (ABA), indol-3-octene kiseline (IAA), cis-(+)-12-okso-fitodienske kiseline (*cis*-OPDA), jasmonoil-izoleucina (JA-Ile) i kastasterona (CS) u L₁-L₃ listovima biljaka krumpira nakon infekcije PSTVd. Sadržaj fitohormona analiziran je u listovima mock- i PSTVd-inokuliranih wt i *NahG* biljaka krumpira u razdoblju od 4 do 7 wpi korištenjem LC-MS/MS. Prikazane su srednje vrijednosti dva eksperimenta ($\pm$ SE; n = 6-8 po vremenskoj točki). Zvezdice označavaju statistički značajne razlike u usporedbi s pripadajućom kontrolom (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 u Studentovom t-testu). Statistički podaci o rezultatima dati su u Prilogu 4.



Slika 44. Koncentracija endogenih hormona salicilne kiseline (SA), apscizinske kiseline (ABA), indol-3-oktene kiseline (IAA), cis-(+)-12-okso-fitodienske kiseline (cis-OPDA), jasmonske kiseline (JA) i jasmonoil-izoleucina (JA-Ile) u gomoljima biljaka krumpira nakon infekcije PSTVd. Vrijednosti kastasterona (CS) nisu prikazane na grafu jer su sve vrijednosti LOD. Sadržaj fitohormona analiziran je u listovima mock- i PSTVd-inokuliranih wt i *NahG* biljaka krumpira u razdoblju od 4 do 7 wpi korištenjem LC-MS/MS. Prikazane su srednje vrijednosti dva eksperimenta ($\pm$ SE; $n = 6-8$ po vremenskoj točki). Zvezdice označavaju statistički značajne razlike u usporedbi s pripadajućom kontrolom (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ u Studentovom t-testu). Statistički podaci o rezultatima dati su u Prilogu 5.



Slika 45. Profili ekspresije biljnih gena uključenih u biosintezu i signalizaciju hormona osjetljivih na Infekciju PSTVd, kao i u procese povezane s obrambenim odgovorima i uklanjanjem ROS, analizirani su u sistemski inficiranim listovima (L₁-L₃) wt i *NahG* linija krumpira. Toplinske karte (engl. *heatmaps*) prikazuju relativnu ekspresiju gena analiziranu od 4 do 7 wpi sa two-step RTqPCR. Vrijednosti pokazuju srednje log₂ fold change (n=9) normaliziranu na ekspresiju referentnog gena *EFa1* i izračunatu u odnosu na odgovarajuću kontrolu (mock-inokulirane biljke). Statistički podaci o rezultatima dati su u Prilogu 6.

LOX3 - *lipoxygenase 3*; LOX6 - *lipoxygenase 6, chloroplastic-like*; OPR3 - *12-oxophytodienoate reductase 3*; JAR1 - *probable indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.5*; COI1 - *coronatine insensitive protein 1*; MYC2 - *MYC transcription factor 2*; ICS - *isochorismate synthase, chloroplastic-like*; PAL9 - *phenylalanine ammonia-lyase 9*; SCMT - *Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase*; NPR1 - *nonexpressor of PR genes 1*; PR1 - *pathogenesis-related protein 1*; PR2 - *pathogenesis-related protein 2*; PR1b - *pathogenesis-related protein 1b*; DWF4 - *dwarf4*; ROT3 - *rotundifolia3*; ILR1 - *IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 3*; ARF8 - *auxin response factor 8-like*; CYP707A1 - *Cytochrome P450, Family 707, Subfamily A, Polypeptide 1*; PYL4 - *Pyrabactin Resistance-Like 4*; POD - *peroxidase*; APX1 - *ascorbate peroxidase*; CAT - *catalase*; CalS12 - *callose synthase 12*.

3.5.2. Odgovori fitohormona i gena na infekciju viroidom PSTVd kod *opr3* i *coi1* biljaka

Kasna faza infekcije (6 do 7 wpi) karakterizirana je akumulacijom *cis*-OPDA, prekursora JA, u listovima sva tri ispitivana genotipa (*wt*, *opr3*, *coi1*) (Slike 34). *coi1* biljke pokazuju nešto nižu akumulaciju *cis*-OPDA od *wt* i *opr3* linija. Rezultati za sadržaj JA u listovima nisu prikazani jer su vrijednosti bile ispod razine detekcije (engl. *limit of detection*, LOD). Koncentracije *cis*-OPDA kod gomolja imaju sličan obrazac onoj u uzorcima listova (Slika 46., Prilog 7.). Dok je koncentracija JA u listovima bila ispod razine očitavanja za sve linije, u uzorcima gomoljima imamo rezultat za *wt* i *coi1* liniju, gdje se veća koncentracija JA pojavljuje u uzorcima gomolja kod *wt* linije u oba tretmana, te raste u inficiranim uzorcima (Slika 47., Prilog 8.). Koncentracija JA kod *opr3* linije bila je LOD, a kod JA-Ile uočavamo najniže koncentracije za sve tri linije u uzorcima gomolja (Slika 47., Prilog 8.).

Transkripcijska aktivacija gena uključenih u biosintezu jasmonata i metabolizam jasmonata (*LOX3*, *LOX6*, *OPR3* i *JAR1*) bila je najizraženija u listovima inficiranih biljaka *coi1* od 5 do 7 wpi, dok je kod *opr3* vidljiva smanjena ekspresija od 4 do 6 wpi u odnosu na *wt* i *coi1* liniju. Gen *LOX6* pokazuje pojačanu ekspresiju u sve tri testirane linije. Uz to, pojačana ekspresija gena *COI1*, jednog od glavnih regulatora JA-signalnog puta, zabilježena je u *coi1* biljkama, nešto slabije u biljkama divljeg tipa, dok je kod *opr3* biljaka pokazala blago smanjenu ekspresiju nakon infekcije PSTVd (Slika 48., Prilog 9.). Pojačana ekspresija *MYC2* gena uočena je kod *wt* i *opr3* biljaka, pri čemu je značajnije pojačanje prisutno kod *opr3* biljaka, dok biljke *coi1* pokazuju smanjenu ekspresiju. Gen *JAZ1* pokazuje sličan obrazac ekspresije u *wt* i *opr3* biljkama, dok je u biljke *coi1* izražen u manjoj mjeri (Slika 48., Prilog 9.).

Vidljiva je pojačana ekspresija *MYC2* gena kod *wt* i *opr3* biljaka sa snažnijim pojačanjem prisutnim kod *opr3* linije, dok *coi1* biljke pokazuju smanjenu ekspresiju. Gen *JAZ1* ima sličan obrazac ekspresije u *wt* i *opr3* biljkama, dok je u *coi1* biljkama slabije eksprimiran.

U ovom pokusu, promjene u sadržaju SA u uzorcima listova biljaka inficiranih s PSTVd i kontrolnih biljaka divljeg tipa zabilježene su u 5 wpi, dok u ostalim tjednima nije uočena veća razlika. Statistički značajna razlika u nakupljanju SA u inficiranim vs. mock listovima linije *coi1* uočena je u 7 wpi. Kod linije *opr3* vidljiva je statistički značajna razlika u 5 wpi. Nakon toga, u 6 i 7 wpi dolazi do porasta koncentracije SA u inficiranim i kontrolnim uzorcima, ali bez značajne razlike među njima (Slika 46., Prilog 7.). Kod uzoraka gomolja *wt* i *coi1* linija

imaju vrlo sličan trend kao i kod uzoraka listova, dok *opr3* linija pokazuje značajniji porast SA u inficiranim uzorcima gomolja u 8 wpi (Slika 47., Prilog 8.). Većina testiranih gena povezanih sa SA bili su smanjeno eksprimirani u listovima inficiranih u usporedbi s kontrolnim biljkama divljeg tipa u 4 wpi, uz iznimku *ICS* gena koji je pokazao blago pojačanje ekspresije. Aktivacija gena za biosintezu SA *ICS*, *PAL9* i *SCMT*, zabilježena je u 5 i 6 wpi, dok je aktivacija gena koji kodira NPR1, glavnog regulatora SA-posredovane obrane biljaka, zabilježena u 7 wpi u inficiranim biljkama divljeg tipa. U inficiranim *opr3* biljkama, pojačana ekspresija gena *ICS*, *PAL1*, *NPR3* i *SARD1* bila je prisutna u 5 do 7 wpi, doseguvši maksimum u 6 do 7 wpi (Slika 48., Prilog 9.).

SA i JA signalni put su važni u obrani biljke od patogena. Mnogi primjeri MAPK kinaza, koje su uključene više ili manje izravno u JA, SA ili i JA i SA signalizaciju, pokazuju važnost ove suradnje za biljke kao odgovor na ranjavanje (Jagodzik i sur., 2018). Nakon infekcije vidljiva je pojačana ekspresija gena za *MAPK* gene u listovima kod sve tri linije u 7 wpi. Snažnija pojačana ekspresija vidljiva je kod *opr3* linije u 6 i 7 wpi za sve *MAPK* gene. U divljim tipovima PSTVd inficiranih biljaka, blago smanjena ekspresija gena za *MPK4* i *MPK3* zabilježena je u 4, 5 i 6 wpi (Slika 48., Prilog 9.), dok su geni za *MKK6* i *MPK7* bili pojačano eksprimirani od 4 do 6 wpi. Linija *opr3* pokazuje blagu smanjenu ekspresiju u 4 wpi za *MPK4*, *MPK3* i *MPK7*, dok linija *coi1* pokazuje blagu smanjenu ekspresiju u 4 wpi za *MKK6*, *MPK4* i *MPK3*.

Proteini vezani uz patogenezu (PR) smatraju se ključnim molekularnim markeri za pojačanu obranu biljaka zbog indukcije SAR-a (Vlot i sur., 2009). Geni koji kodiraju PR proteine pokazuju brzo nakupljanje nakon PTI i ETI, te im je ekspresija često regulirana SA i JA. Aktivacija ekspresije *PR-1b* zabilježena je u svim tjednima u listovima wt biljaka. Kod linije *opr3* prisutna je snažnija aktivacija gena u prvim tjednima, dok je linija *coi1* pokazala smanjenu ekspresiju u 4 i 5 wpi. *PR-2* (β -1,3-glukanaza) i *PR-Q* gena bili su jače eksprimirani kod *opr3* i *coi1* linije nego u biljkama divljeg tipa (Slika 48., Prilog 9.).

Endogena koncentracija IAA nije bila značajno različita u listovima biljaka divljeg tipa i linije *opr3*. Podjednaka koncentracija IAA izmjerena je kroz sve testirane tjedne i kod inficiranih i kod kontrolnih biljaka. U liniji *coi1*, koncentracija IAA je visoka do 4 wpi, nakon čega slijedi pad od 5 do 7 wpi. Nema značajnih razlika između inficiranih i kontrolnih biljaka, osim u 7 wpi kada je zabilježena je statistički značajna razlika, pri čemu su inficirane biljke imale manju

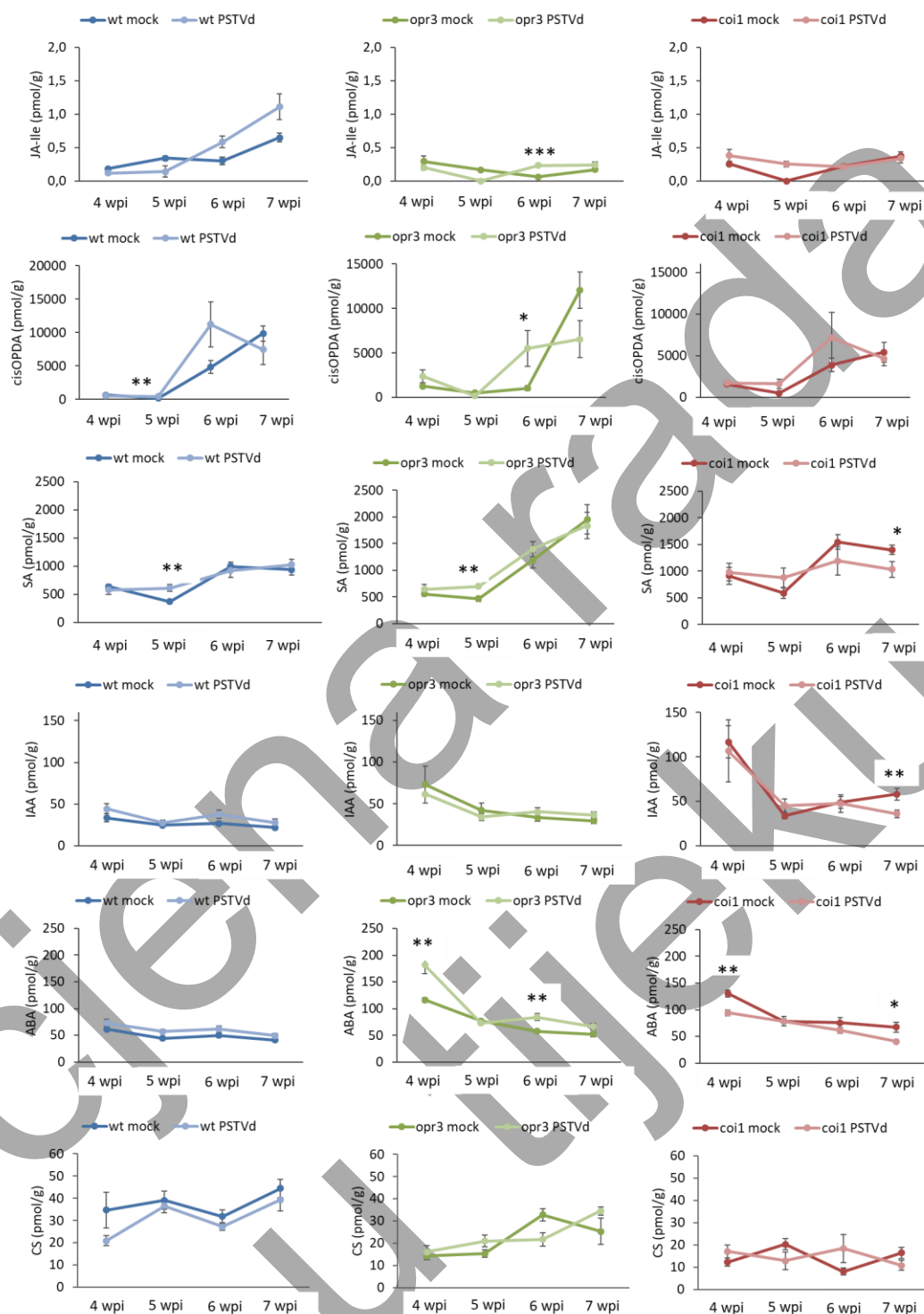
koncentraciju IAA u odnosu na kontrolne uzorke (Slika 46., Prilog 7.). Za uzorke gomolja, linije *opr3* i *coi1* pokazuju isti trend nakupljanja hormona kao i uzorci listova, dok wt linija ima veću količinu IAA u uzorcima gomolja (Slika 46., Prilog 7.), dok je u uzorcima listova situacija je obrnuta.

Ekspresija gena *ILR1*, koji kodira enzim IAA-amino-kiselinsku hidrolazu, blago je pojačana u biljkama divljeg tipa od 4 do 6 wpi, dok je u kod *opr3* i *coi1* linije vidljivo značajnije pojačanje ekspresije gena *ILR1* kroz sve testirane tjedne (Slika 48., Prilog 9.). Blago pojačana ekspresija gena za faktor odgovora na AUX *ARF8* tijekom 4 do 6 wpi ukazuje na aktivaciju AUX signalizacije u divljem tipu nakon infekcije PSTVd, dok je kod linija *opr3* i *coi1* prisutna smanjena ekspresija gena *ARF8* u gotovo svim tjednima, s iznimkom 5 wpi kod *coi1* linije (Slika 48., Prilog 9.).

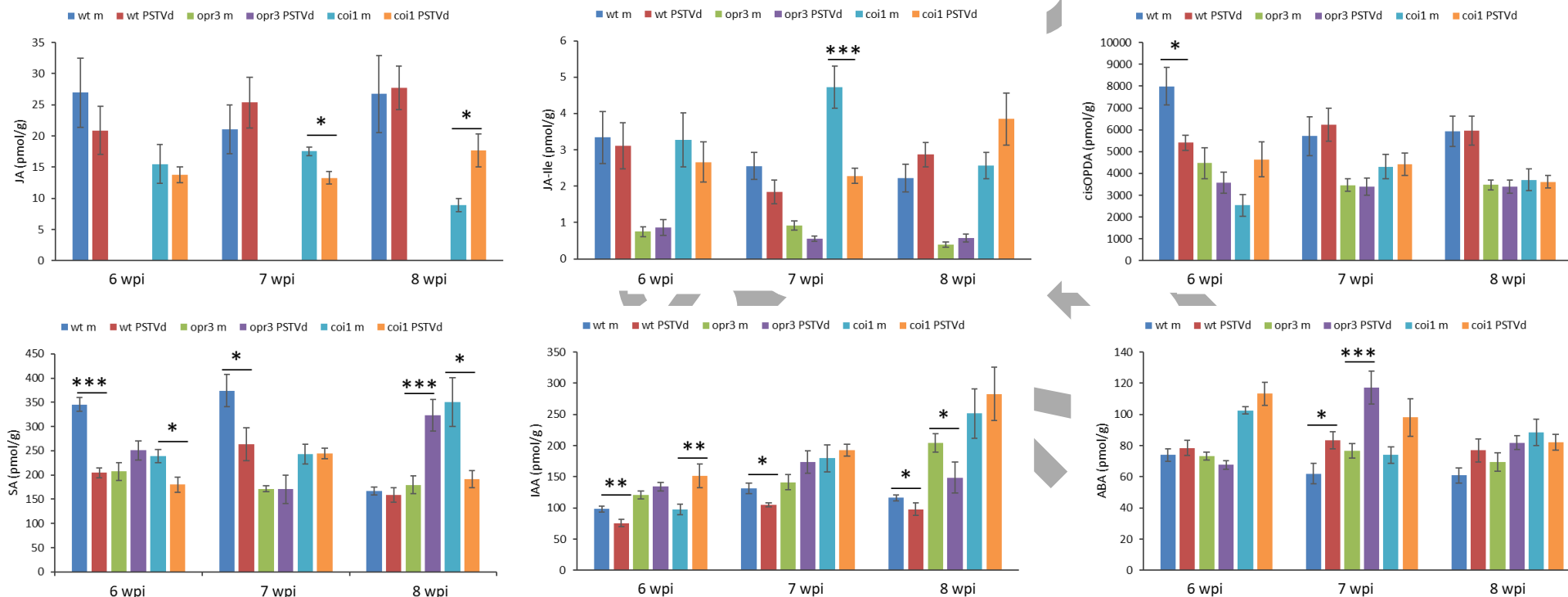
Akumulacija ABA bila je podjednaka u uzorcima listova PSTVd inficiranih biljaka u usporedbi s kontrolnim biljkama divljeg tipa, s manjim statistički značajnim razlikama u 5 i 6 wpi. U liniji *opr3* uočeno je nakupljanje ABA u biljkama inficiranim s PSTVd, posebno u 4. i 6. tjednu, gdje je prisutna statistički značajna razlika. S druge strane, linija *coi1* pokazala je veću koncentraciju ABA i statistički značajnu razliku između inficiranih i kontrolnih biljaka u 4. i 7. tjednu. U obje linije koncentracija ABA je u padu nakon 4 wpi (Slika 46., prilog 7.). Vezano uz to, ekspresija gena povezanih s ABA signalizacijom, uključujući *CYP707A1* (ABA hidroksilaza) i *PYL4* (ABA receptor), bila je blago pojačano eksprimirana u 4 i 5 wpi, dok je u 6 i 7 wpi bila blago smanjeno eksprimirana u listovima inficiranih biljaka divljeg tipa. Za gen *PYL4* imamo suprotne podatke kod *opr3* i *coi1* linija, kod *opr3* linije u 4 do 6 wpi imamo blago smanjenu ekspresiju, da bi u 7 wpi imali blago pojačanu ekspresiju, dok je kod linije *coi1* vidljiv suprotan učinak. Također, *CYP707A1* je blago pojačano eksprimiran kod *opr3* linije u 5 do 7 wpi, dok je kod *coi1* linije blago pojačano eksprimiran samo u 7 wpi (Slika 48., Prilog 9.). Akumulacija ABA u uzorcima gomolja bila je vrlo slična onoj u listovima (Slika 47., Prilog 8.)

Akumulacija CS bila je slična u listovima sve tri testirane linije, pri čemu je kod wt linije koncentracija bila minimalno veća u kontrolnim biljkama. Za linije *opr3* i *coi1*, zabilježeni su promjenjivi vrhovi koncentracija u inficiranim i kontrolnim biljkama, ovisno o tjednu (Slika 46., Prilog 7.). Također je zabilježena pojačana ekspresija gena *DWF4* (citokrom P450 90B1), ranog gena biosinteze BR, te indukcija gena *ROT3* (rotundifolia 3, CYP90D1), koji regulira

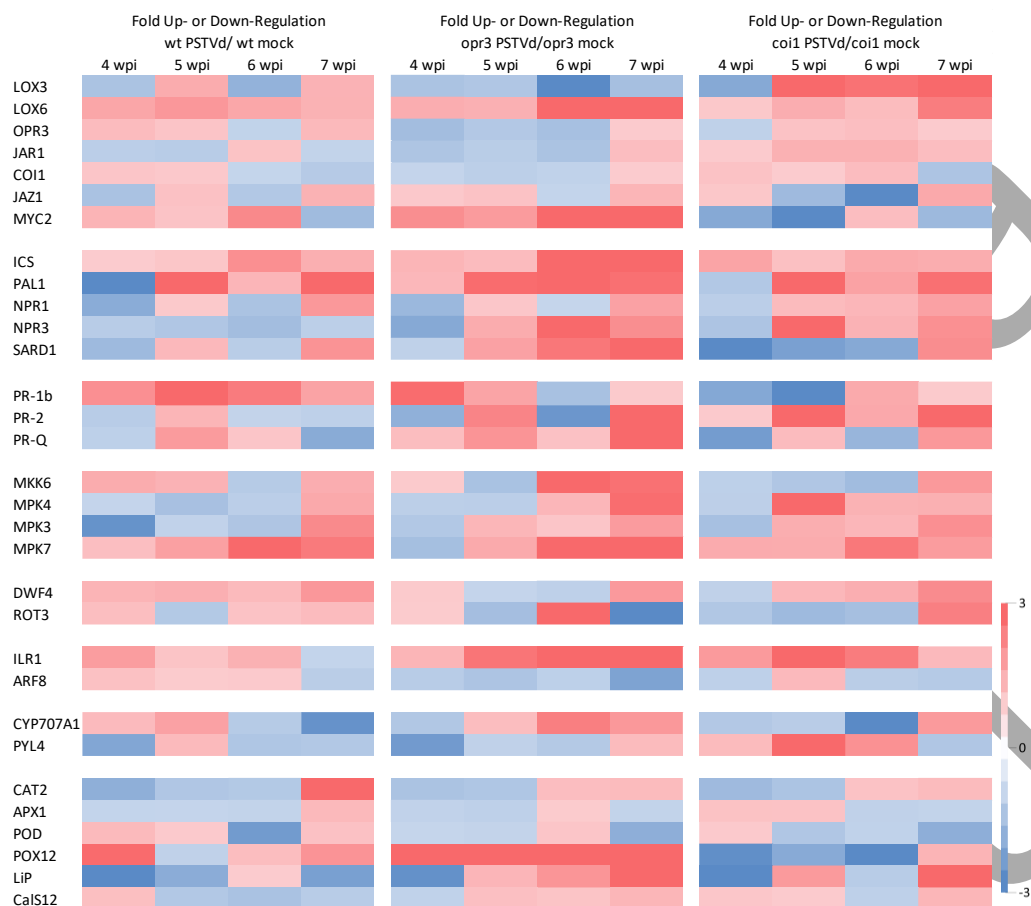
produkciju CS, zabilježena u periodu 4 do 7 wpi, u inficiranim biljkama divljeg tipa. U *opr3* biljkama, *DWF4* je bio blago smanjeno eksprimiran u 5 i 6 wpi, dok je ROT3 pokazivao pojačanu ekspresiju u 4 i 6 wpi, a smanjenu ekspresiju u 5 i 7 wpi. Linija *coi1* pokazuje up regulaciju u 5 do 7 wpi za gen *DWF4*, te smanjenu ekspresiju za gen *ROT3* u 4 do 6 wpi (Slika 48., Prilog 9.). Rezultati za sadržaj CS u gomoljima nisu prikazani jer su vrijednosti bile ispod razine detekcije (engl. *limit of detection*, LOD) (Prilog 8.).



Slika 46. Koncentracija endogenih hormona salicilne kiseline (SA), apscizinske kiseline (ABA), indol-3-octene kiseline (IAA), cis-(+)-12-okso-fitodienske kiseline (cis-OPDA), jasmonoil-izoleucina (JA-Ile) i kastasterona (CS) u L₁-L₃ listovima krumpira nakon infekcije PSTVd. Sadržaj fitohormona analiziran je u listovima mock- i PSTVd-inokuliranih wt, *opr3* i *coi1* biljaka krumpira u razoblju od 4 do 7 wpi pomoću LC-MS/MS. Prikazane su srednje vrijednosti ($\pm$ SE; n = 6-8 po vremenskoj točki) dva eksperimenta. Zvezdice označavaju statistički značajne razlike u usporedbi s pripadajućom kontrolom (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 u Studentovom t-testu). Statistički podaci o rezultatima dati su u Prilogu 7.



Slika 47. Koncentracije endogenih hormona salicilne kiseline (SA), apscizinske kiseline (ABA), indol-3-octene kiseline (IAA), cis-(+)-12-okso-fitodienske kiseline (cis-OPDA), jasmonske kiseline (JA) i jasmonoil-izoleucina (JA-Ile) u gomoljima biljaka krumpira nakon infekcije PSTVd. Vrijednosti kastasterona (CS) nisu prikazane na grafu jer su sve vrijednosti LOD (vidljivo u Prilogu 8.). Sadržaj fitohormona analiziran je u listovima mock- i PSTVd-inokuliranih wt, *opr3* i *coi1* biljaka krumpira od 4 do 7 wpi pomoću LC-MS/MS. Prikazane su srednje vrijednosti ($\pm$ SE; $n = 6-8$ po vremenskoj točki) dva eksperimenta. Zvezdice označavaju statistički značajne razlike u usporedbi s pripadajućom kontrolom (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ u Studentovom t-testu). Statistički podaci o rezultatima dati su u Prilogu 8.



Slika 48. Profili ekspresije biljnih gena uključenih u biosintezu i signalizaciju hormona osjetljivih na Infekciju PSTVd, kao i u procese povezane s obrambenim odgovorima i uklanjanjem ROS, analizirani su u sistemski inficiranim listovima (L_1 - L_3) wt, *opr3* i *coi1* linija krumpira. Toplinske karte (engl. *heatmaps*) prikazuju relativnu ekspresiju gena analiziranu 4, 5, 6 i 7 wpi sa two-step RTqPCR. Vrijednosti pokazuju srednje log2 fold change ($n=9$) normaliziranu na ekspresiju referentnog gena *EFa1* i izračunatu u odnosu na odgovarajuću kontrolu (mock-inokulirane biljke). Statistički podaci o rezultatima nalaze su u Prilogu 9.

LOX3 - *lipoxygenase 3*; LOX6 - *lipoxygenase 6, chloroplastic-like*; OPR3 - *12-oxophytodienoate reductase 3*; JAR1 - *probable indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.5*; COI1 - *coronatine insensitive protein 1*; MYC2 - *MYC Transcription Factor 2*; ICS - *isochorismate synthase, chloroplastic-like*; PAL1 - *Phenylalanine Ammonia-Lyase 1*; NPR1 - *regulatory protein NPR1*; NPR3 - *regulatory protein NPR3*; SARD1 - *SA-Activated Protein 1*; PR-1b - *pathogenesis-related protein 1b*; PR-2 - *pathogenesis-related protein 2*; PRQ - *pathogenesis-related protein Q*; MKK6 - *mitogen-activated protein kinase kinase 6*; MPK4 - *mitogen-activated protein kinase 4*; MPK3 - *mitogen-activated protein kinase 3*; MPK7 - *mitogen-activated protein kinase 7*; DWF4 - *cytochrome P450 90B1*; ROT3 - *3-epi-6-deoxocathasterone 23-monooxygenase*; ILR1 - *IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 3*; ARF8 - *auxin response factor 8-like*; CYP707A1 - *ABA 8'-hydroxylase CYP707A1*; PYL4 - *abscisic acid receptor PYL4-like*; CAT2 - *catalase*; APX1 - *ascorbate peroxidase*; POD - *peroxidase*; POX12 - *peroxidase 12*; LiP - *lignin peroxidase*; CalS12 - *callose synthase 12*.

3.6. Promjene u ekspresiji gena u biljkama tretiranim s INA ili MeJA prije infekcije viroidom PSTVd

3.6.1. Promjene u ekspresiji gena povezanih s fitohormonima, nakon INA tretmana

Da bismo razumjeli kako INA utječe na sustavne obrambene odgovore na Infekciju PSTVd u krumpiru, pratili smo ekspresiju odabranih gena uključenih u MAPK signalne kaskade, odgovore PR proteina, procese uklanjanja ROS i modificiranja staničnog zida te biosintezu i signalizaciju hormona SA, JA, AUX i BR. Ekspresijski profili odabranih gena mjerili smo u donjim sistemski inficiranim i neinficiranim listovima u fazi prije pojave simptoma (2 wpi) i tijekom početka razvoja simptoma (4 i 6 wpi) pomoću RT-qPCR (Slika 49., Prilog 10.).

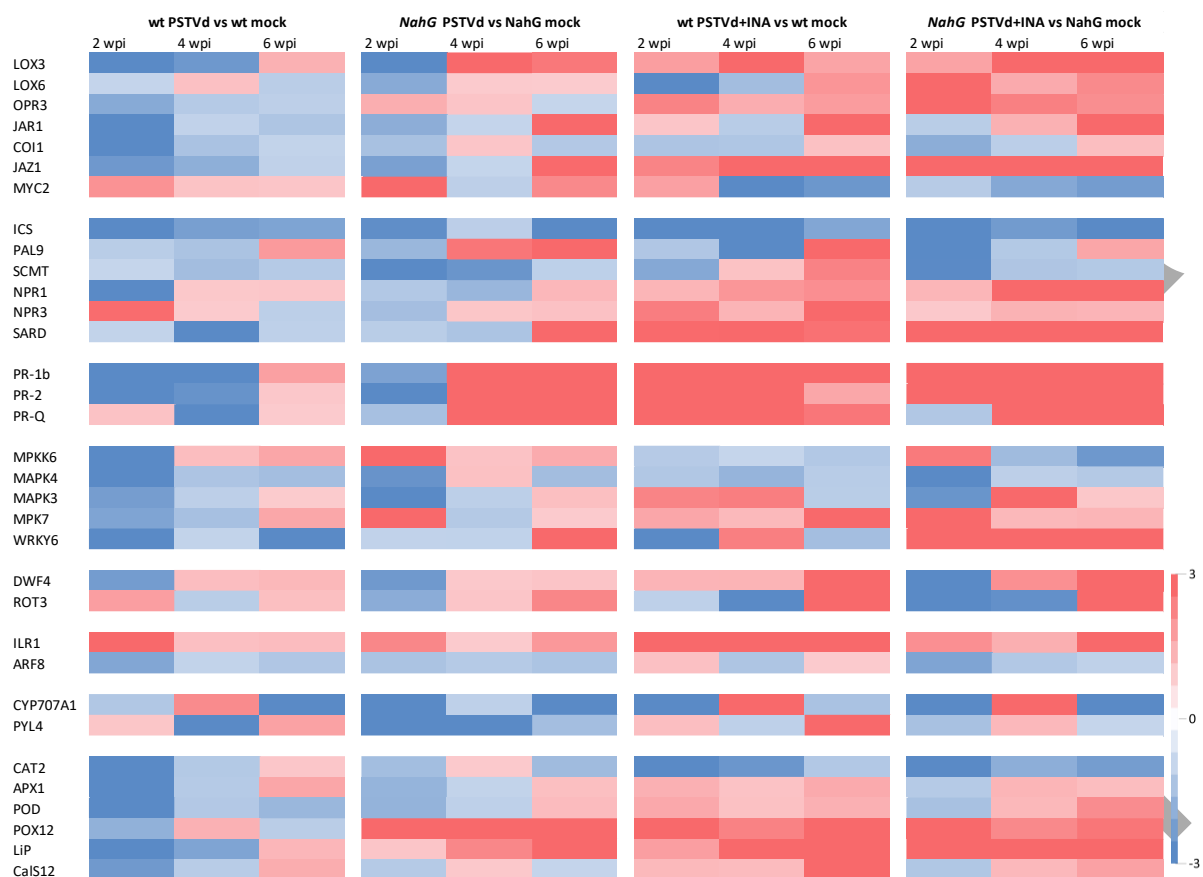
U eksperimentu s INA tretmanom u divljem tipu biljaka inficiranih s PSTVd ekspresija gena za biosintezu JA (*LOX6*, *OPR3* i *JAR1*) i signalizaciju JA (*COI1* i *JAZ1*) bila je smanjena eksprimirana, dok je gen za *MYC2*, glavni pozitivni regulator putanje signalizacije JA, bio pojačano eksprimiran od 2 do 6 wpi (Slika 49.). U netretiranim *NahG* biljkama inficiranim s PSTVd, aktivacija *OPR3*, *JAR1*, *JAZ1* i *MYC2* zabilježena je u 6 wpi (Slika 49.). INA tretman povećao je ekspresiju *JAZ1*, ali smanjio ekspresiju *MYC2* u inficiranim biljkama oba ispitivana genotipa. Osim toga, INA tretman, praćen infekcijom PSTVd, rezultirao je snažnom aktivacijom gena za biosintezu JA u *NahG* biljkama, ali ne i u divljim tipovima biljaka (Slika 49., Prilog 10.).

Geni za biosintezu SA, *ICS*, *SCMT* i *PAL9*, zajedno s genom *SARD1* koji je regulator biosinteze SA, uglavnom su bili smanjeno eksprimirani u razdoblju od 2 do 6 wpi, dok su *NPR3* i *NPR1* pokazali ublago pojačanu ekspresiju (Slika 49., Prilog 10.). U *NahG* biljkama otkrivena je snažna aktivacija *SARD1*, uz blagu aktivaciju *NPR1*, *NPR3* i *PAL9* u 6 wpi, što je bilo u skladu s nakupljanjem viroidne RNA i izražavanjem simptoma (Slika 20.). INA tretman doveo je do aktivacije većine ispitivanih SA-relevantnih gena, osim *SCMT* u *NahG* biljkama i *ICS* u oba tipa PSTVd inficiranih biljaka (Slika 49., Prilog 10.). Rezultati ukazuju na to da INA tretman potiče snažnu aktivaciju gena uključenih u biosintezu i signaling SA u wt i *NahG* biljkama, 2 do 6 tjedana nakon inokulacije viroidom. Suprotno tome, u netretiranim wt i *NahG* biljkama do aktivacije SA-povezanih gena dolazi tek u 6 wpi. Nadalje, uočena je jača aktivacija SA-povezanih gena u *NahG* biljkama u odnosu na biljke divljeg tipa.

U netretiranim wt biljkama inficiranim s PSTVd opažena je blaga aktivacija gena za MAP kinazu 6 (*MKK6*), *MPK7* i *MPK3* u 6 wpi, dok su geni za *MPK4* i *WRKY6* bili smanjeno eksprimirani od 2 do 6 wpi (Slika 49., Prilog 10.). U netretiranim *NahG* biljkama inficiranim s PSTVd, *MPK7* i *MKK6* bili su snažno pojačano eksprimirani u 2 wpi, a zatim je njihova ekspresija smanjena u 4 i 6 wpi. Osim toga, *MPK4* je bio privremeno aktiviran u 4 wpi, dok su *MPK3* i posebno *WRKY6* bili pojačano eksprimirani u 6 wpi. INA tretman doveo je do ranije (2 wpi) i jače aktivacije *MPK3*, *MPK7* i *WRKY6*, dok je ekspresija *MKK6* i *MPK4* smanjena u inficiranim biljkama oba ispitivana genotipa (Slika 49., Prilog 10.). Nadalje, provedena je analiza ekspresije gena za *PR-1b*, *PR-2* i *PR-Q* (hitinaza PR-3 klase) i svi su pokazali pojačanu ekspresiju nakon INA tretmana i naknadne infekcije PSTVd u oba ispitivana genotipa.

Analiza ekspresije gena odgovornih za uklanjanje ROS u netretiranim divljim tipovima PSTVd inficiranih krumpira pokazala je da su geni za katalazu (*CAT2*), askorbat peroksidazu (*APX1*), klasu III peroksidaza *POX12* i lignin peroksidazu (*LiP*) bili aktivirani od 4 do 6 wpi, dok je gen za *POD* bio smanjeno eksprimiran od 2 do 6 wpi (Slika 49., Prilog 10.). Suprotno tome, rana aktivacija (2 wpi) *POX12* i *LiP* zabilježena je u netretiranim inficiranim *NahG* biljkama. INA tretman, praćen infekcijom PSTVd, povećao je ekspresiju *POX12*, *LiP* i *POD*, dok je ekspresija *CAT2* bila smanjeno eksprimirana u oba tipa biljaka nakon 2 do 6 wpi (Slika 49., Prilog 10.). Osim toga, privremena aktivacija *APX1* zabilježena je u 2 wpi u *NahG* biljkama, ali ne i u divljim tipovima biljaka.

Primjena INA također je povećala ekspresiju gena povezanih s AUX, kao što su *ILR1* i *ABP19* (proteini koji vežu AUX), gena za ekspansin *EXP* te gena povezanih s BR kao što su *DWF4*, *ROT3* i *BRI1*, u 4, 6 wpi (Slika 49., Prilog 10.), što ukazuje na aktivaciju AUX i BR signalizacijskih odgovora u INA-tretiranim inficiranim biljkama oba ispitivana genotipa.



Slika 49. Profili ekspresije biljnih gena uključenih u biosintezu i signalizaciju hormona osjetljivih na Infekciju PSTVd, kao i u procese povezane s obrambenim odgovorima i uklanjanjem ROS, analizirani su u sistemski inficiranim listovima (L_1 - L_3) wt i *NahG* linija krumpira, u ovisnosti o INA tretmanu. Toplinske karte (engl. *heatmaps*) prikazuju relativnu ekspresiju gena analiziranu 4, 5, 6 i 7 wpi sa two-step RTqPCR u sistemski inficiranim (L_1 - L_3) listovima koji su prethodno INA tretirani ili tretirani samo s H_2O , analizirani na 2, 4 i 6 wpi. Količina transkripta normalizirana je u odnosu na ekspresiju *EFa1* i odgovarajuću kontrolnu vrijednost (mock). Statistički podaci o rezultatima dati su u Prilogu 10.

LOX3 - lipoxygenase 3; LOX6 - lipoxygenase 6, chloroplastic-like; OPR3 - 12-oxophytodienoate reductase 3; JAR1 - Jasmonate Resistant 1; COI1 - coronatine insensitive protein 1; MYC2 - MYC Transcription Factor 2; ICS - isochorismate synthase, chloroplastic-like; PAL9 - Phenylalanine Ammonia-Lyase 9; SCMT - Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase; NPR1 - nonexpressor of PR genes 1; NPR3 - nonexpressor of PR genes 3; SARD1 - Suppressor of SA-Dependent Defense 1; PR1b - pathogenesis-related protein 1b; PR2 - pathogenesis-related protein 2; PRQ - pathogenesis-related protein Q; MKK6 - mitogen-activated protein kinase kinase 6; MPK4 - mitogen-activated protein kinase 4; MPK3 - mitogen-activated protein kinase 3; MPK7 - mitogen-activated protein kinase 7; WRKY6 - WRKY transcriptional factor 6; DWF4 - dwarf4; ROT3- Rotundifolia 3; ILR1 - IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 3; ARF8 - auxin response factor 8-like; CYP707A1 - Cytochrome P450, Family 707, Subfamily A, Polypeptide 1; PYL4 - Pyrabactin Resistance-Like 4; CAT2 - catalase; APX1 - ascorbate peroxidase; POD - peroxidase; POX12 - peroxidase 12; LiP - lignin peroxidase; CalS12 - callose synthase 12.

3.6.2. Promjene u ekspresiji gena povezanih s fitohormonima, nakon MeJA tretmana

U eksperimentu s MeJA tretmanom ekspresija gena za biosintezu JA (*LOX3*, *LOX6*, *OPR3* i *JAR1*) i signalizaciju JA (*COI1*, *JAZ1*) u divljim tipovima PSTVd inficiranih biljaka bila je pojačano eksprimirana od 2 do 4 wpi, dok je gen za *MYC2*, glavni pozitivni regulator putanje signalizacije JA (Song i sur., 2022), bio pojačano eksprimiran u 2 wpi. Tijekom 6 wpi svi geni bili su smanjeno eksprimirani. U *opr3* biljkama inficiranim s PSTVd, zabilježena je značajna aktivacija svih gena povezanih sa JA u 6 wpi. Kod *opr3* linije nije zabilježena ekspresija gena *OPR3*. Linija *coi1* uglavnom je smanjeno eksprimirana, posebno kroz 6 wpi, dok je pojačana ekspresija vidljiva kroz 2 wpi za *LOX3* i *LOX6*, te kroz 2 do 4 wpi za *COI1* i *JAZ1*, te za *MYC2* kroz 4 do 6 wpi (Slika 50., Prilog 11.). Tretman s MeJA smanjio je ekspresiju gena povezanih s JA kroz sve tri linije što je najvidljivije kod wt biljaka u 2 wpi. Kod *opr3* linije snažna pojačana ekspresija očituje se u 4 wpi, dok je u netretiranim biljkama primjetna tek u 6 wpi.

Geni uključeni u regulaciju biosinteze SA, kao što su *ICS*, *PAL9* i *SARD1*, uglavnom su bili pojačano eksprimirani, npr. 4 wpi u biljkama divljeg tipa, te posebno pojačano eksprimirani u 6 wpi kod *opr3* linije biljaka. Genotip *coi1* pokazao je uglavnom smanjenu ekspresiju kroz tjedne s izuzetkom gena *PAL9* i *SARD1* u 6 wpi, te blago pojačanu ekspresiju za *ICS* i *SARD* u 4 wpi. Gen *NPR1* pokazao je blago pojačanu ekspresiju u biljkama divljeg tipa i *opr3* linije, dok je kod *coi1* linije dobiven rezultat suprotan onome kod *opr3* linije, a to je smanjena ekspresija kod 2 i 4 wpi, te blago pojačana ekspresija u 4 wpi (Slika 50., Prilog 11.).

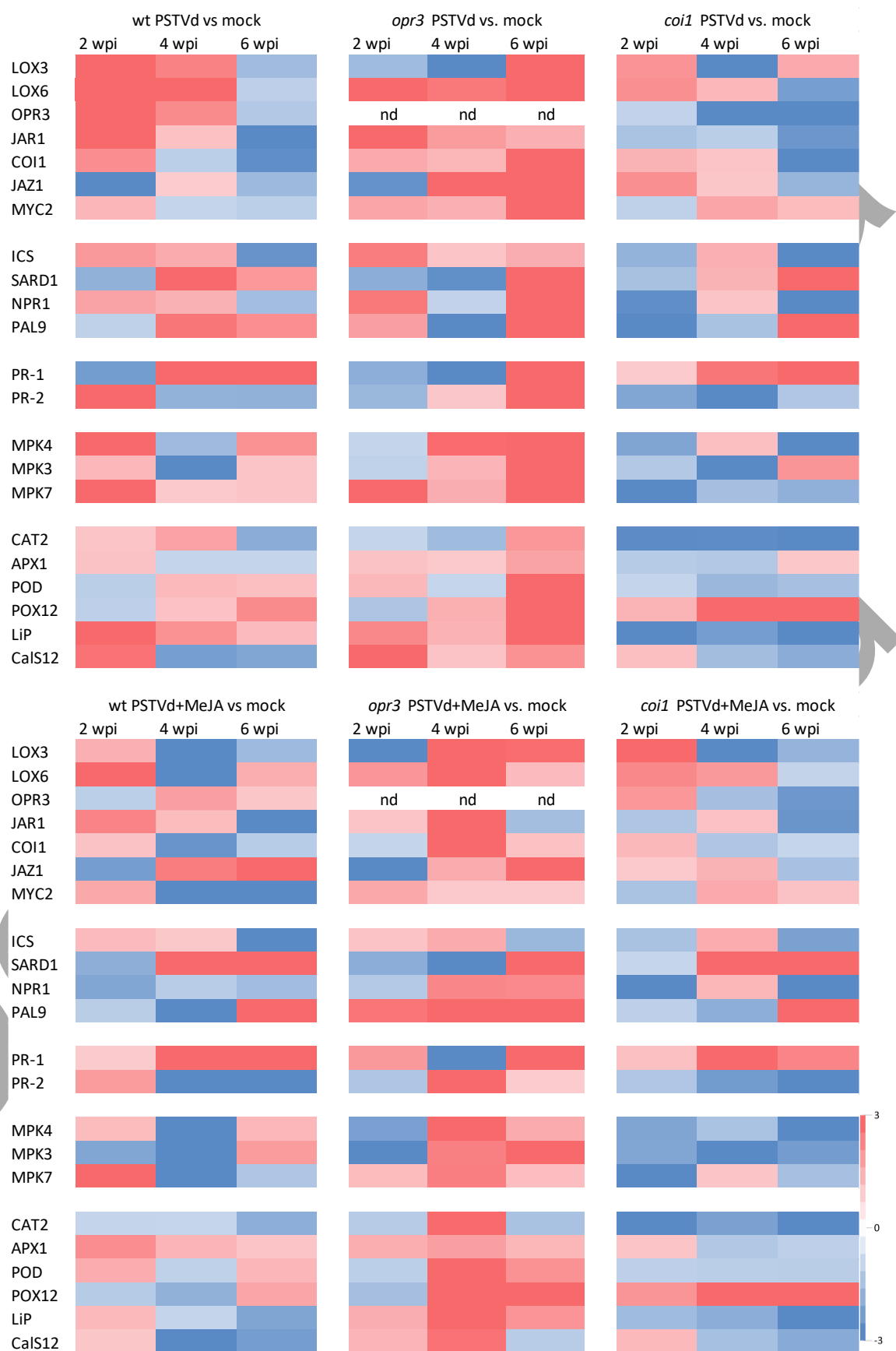
Nadalje, u netretiranim inficiranim biljkama divljeg tipa blaga aktivacija gena za *MPK4*, *MPK3* i *MPK7* zabilježena je u gotovo svim tjednima nakon inokulacije (wpi) kod wt i *opr3* biljaka, dok su kod *coi1* linije svi ti geni smanjeno eksprimirani u svim tjednima (Slika 50., Prilog 11.), MeJA tretman nije doveo do značajnije promjene u aktivaciji gena.

Analiza ekspresije gena za *PR-1* i *PR-2* pokazala je jednaku ekspresiju nakon MeJA tretmana i naknadne infekcije PSTVd u svim ispitanim genotipovima. Gen *PR-1* bio je značajnije eksprimiran u svim linijama kroz sve tjedne, dok je *PR-2* kod *coi1* i wt linije smanjeno eksprimiran, a kod *opr3* u 4 do 6 wpi pojačano eksprimiran (Slika 50., Prilog 11.).

Analiza ekspresije gena za enzime uključene u uklanjanje ROS u netretiranim *coi1* linijama PSTVd inficiranih krumpira pokazala je da su geni *CAT2*, *APX1*, i *POD* bili smanjeno eksprimirani u svim tjednima. Za iste gene wt linija biljaka pokazivala je blago pojačanu

ekspresiju u 2 wpi, dok je *opr3* linija u 6 wpi pokazala značajnu pojačanu ekspresiju tih gena (Slika 50., Prilog 11.).

Geni *POX12* i *LiP* bili su aktivirani od 4 do 6 wpi u wt i *opr3* biljkama, dok je *coi1* linija pokazala značajnu pojačanu ekspresiju *POX12* gena u svim tjednima, te značajnu smanjenu ekspresiju *LiP* gena kroz sve tjedne. MeJA tretman, praćen infekcijom PSTVd, smanjio je ekspresiju *POD*, *POX12* i *LiP* u biljkama divljeg tipa, dok je ekspresija *CAT2* bila smanjeno eksprimirana u svim tipovima biljaka u periodu od 2 do 6 wpi (Slika 50., Prilog 11.). Osim toga, blaga aktivacija *APX1* zabilježena je u 2 do 6 wpi u wt i *opr3* tretiranim biljkama, ali ne i u *coi1* tretiranih biljaka. Kod *opr3* MeJA linije u 4 wpi došlo je do značajne pojačane ekspresije svih gena povezanih sa uklanjanjem ROS, dok je veća pojačana ekspresija istih tih gena u 6 wpi zabilježena kod *opr3* biljaka bez tretmana (Slika 50., Prilog 11.).



Slika 50. Opis slike na sljedećoj stranici.

Slika 50. Profili ekspresije biljnih gena uključenih u biosintezu i signalizaciju hormona osjetljivih na Infekciju PSTVd, kao i u procese povezane s obrambenim odgovorima i uklanjanjem ROS, analizirani su u sistemski inficiranim listovima (L₁-L₃) u wt, *opr3* i *coi1* linijama krumpira nakon infekcije viroidom PSTVd u ovisnosti o MeJA tretmanu, u odnosu na mock kontrole. Toplinske karte (engl. *heatmaps*) prikazuju relativnu ekspresiju gena analiziranu 4, 5, 6 i 7 wpi sa two-step RTqPCR u sistemski inficiranim (L₁-L₃) listovima koji su prethodno tretirani s MeJA ili H₂O, analizirani na 2, 4 i 6 wpi. Količina transkripta normalizirana je u odnosu na ekspresiju *Efa1* i odgovarajuću kontrolnu vrijednost (mock). Fold change izračunava se metodom $2^{-\Delta\Delta CT}$ (delta-delta Ct). Vrijednosti pokazuju srednju log2 fold change ($\pm$ SE, n=9). Statistički podaci o rezultatima dati su u Prilogu 11.

LOX3 - lipoxygenase 3; LOX6 - lipoxygenase 6, chloroplastic-like; OPR3 - 12-oxophytodienoate reductase 3; JAR1 - probable indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.5; COI1 - coronatine insensitive protein 1; MYC2 - MYC Transcription Factor 2; ICS - isochorismate synthase, chloroplastic-like; SARD1 - SA-Activated Protein 1; NPR1 - regulatory protein NPR1; PAL9 - Phenylalanine Ammonia-Lyase 9; PR1 - pathogenesis-related protein 1; PR2 - pathogenesis-related protein 2; MPK4 - mitogen-activated protein kinase 4; MPK3 - mitogen-activated protein kinase 3; MPK7 - mitogen-activated protein kinase 7; CAT2 - catalase; APX1 - ascorbate peroxidase; POD - peroxidase; POX12 - peroxidase 12; LiP - lignin peroxidase; CalS12 - callose synthase 12; MPK - mitogen activated protein kinase) i odgovora na patogene (PR1 - pathogenesis related protein 1; PR2 - pathogenesis related protein 2; PRQ - pathogenesis-related protein Q) (Prilog 1.)

4. RASPRAVA

Obzirom na nekodirajuću prirodu viroidnog genoma, sve viroidne funkcije, uključujući patogenost, posredovane su isključivo RNA sekvencom i strukturnim signalima (Kovalskaya & Hammond, 2014). U osjetljivim biljkama, PSTVd može značajno poremetiti metabolizam domaćina i globalnu ekspresiju gena. Infekcija PSTVd biljaka rajčice (*Solanum lycopersicum*) dovodi do promjene u ekspresiji mnogobrojnih gena povezanih s imunitetom biljke, uključujući gene čiji su produkti uključeni u antioksidativni odgovor, metabolizam proteina, komponente stanične stijenke i kloroplasta, PR gene i druge (Itaya i sur., 2002). Osim navedenih, transkripcijske promjene inficirane rajčice uključuju i opsežne promjene u biosintezi, metabolizmu i signalnim putevima fitohormona, uključujući hormone koji sudjeluju u biljnom obrambenom odgovoru kao što su SA i JA (Owens i sur., 2012b). Podaci ukazuju na snažan utjecaj infekcije viroida na signalne puteve fitohormona, ali područje nije posve istraženo (Joubert i sur., 2022; Zhao & Li, 2021).

Ova studija pruža detaljnu analizu dinamike odgovora krumpira na infekciju viroidom PSTVd, koristeći različite pristupe kao što su analiza transkriptoma mRNA i fitohormona, s ciljem sticanja dubljeg uvida u fitohormonske odgovore na ovu infekciju. Fokus je na razumijevanju uloge fitohormona u regulaciji biljne obrane, u progresiji bolesti i manifestaciji simptoma. S ciljem dobivanja dubljeg uvida u kompleksne interakcije, provedeni su eksperimenti u različitim vremenskim intervalima, tijekom kojih se pratila dinamika razvoja bolesti, akumulacija viroidne RNA, promjene u endogenim koncentracijama fitohormona (SA, cis-OPDA, JA, JA-Ile, ABA, IAA, CS), te analiza ekspresije gena u krumpiru nakon infekcije PSTVd-om.

Integrirana analiza transkriptoma i fitohormonskih profila u kontrolnim i transgeničnim biljkama krumpira omogućila je dublje razumijevanje složenih interakcija između različitih fitohormonskih puteva unutar obrambene mreže signalizacije biljaka. Osim toga, rezultati ove studije pružaju važan uvid u biološke uloge JA i SA u interakcijama između krumpira i viroida PSTVd, čime se doprinosi boljem razumijevanju njihovih uloga u biljnoj imunosti i progresiji bolesti.

4.1. SA-deficijentne i JA-deficijentne biljke su pojačano osjetljive na infekciju viroida PSTVd

Rezultati ove studije ukazuju na to da postoje različite promjene između biljnih linija s aktivnim SA- i JA-signalnim putevima, poput divljeg tipa (wt), i linija kod kojih je ta signalizacija inhibirana, kao što su SA-deficijentne (*NahG*), te JA-deficijentne (*opr3*) i JA-neosjetljive (*coi1*) biljke. Kroz analize ekspresije gena i akumulacije fitohormona, zabilježene su specifične promjene u regulatornim mrežama i obrambenim odgovorima, uključujući različite reakcije u biosintezi hormona, aktivaciji PR proteina i MAPK signalnim kaskadama, što ukazuje na ulogu tih signalizacijskih puteva u biljnoj obrani. Interakcija između ovih hormona je važna za određivanje težine simptoma opaženih kod inficiranih biljaka (Prol i sur., 2021; Zheng i sur., 2017).

U ovom istraživanju uočena je razlika u dinamici nakupljanja viroidne RNA među testiranim linijama (s različitim sadržajem endogene SA i JA). PSTVd inficirane biljke divljeg tipa pokazuju postupno povećanje akumulacije viroidne RNA s najvećim porastom u 7 i 8 wpi, što ukazuje na progresiju infekcije i akumulaciju viroida unutar biljnog tkiva. Ovaj rezultat ukazuje na to da viroidna infekcija postaje sve intenzivnija s vremenom, osobito u kasnijim fazama (Flores i sur., 2017; Owens i sur., 2012a). *NahG* linija, deficijentna u SA-signalnom putu, pokazuju ubranu akumulaciju RNA u ranijim fazama (u 4 i 5 wpi), dvostruko veću nego u biljkama divljeg tipa, što ukazuje na veću osjetljivost biljaka s manjkom SA i naglašava važnost SA u suzbijanju rane faze infekcije od raznih patogena (Baebler i sur., 2014; López-Gresa i sur., 2019). Na primjer, *NahG* biljke krumpira zbog ugrožene sposobnosti nakupljanja SA imaju smanjenu otpornost na učinkovit obrambeni odgovor na virus PVY (Baebler i sur., 2014). Slično tome, intaktni SA-signalni put važan je za obranu krumpira od nekrotrofne gljivice *Alternaria solani*, pri čemu wt biljke pokazuju učinkovitu otpornost u usporedbi s *NahG* biljkama, kojima nedostaje funkcionalni SA-signalni put (Brouwer i sur., 2020). Isto tako, *NahG* biljke zaražene CEVd pokazuju značajne promjene u svom metabolomu, što ukazuje na ugrožen obrambeni odgovor u usporedbi s biljkama divljeg tipa (López-Gresa i sur., 2019).

S druge strane, rezultati ove studije ukazuju na to da PSTVd inficirane JA-deficijentne *opr3* i *coi1* linije, deficijentne u JA-signalnom putu, pokazuju brži porast akumulacije viroidne RNA u ranijim fazama infekcije (5 i 6 wpi) u usporedbi s wt biljkama, no razlika u količini viroidne RNA se gubi u kasnijim fazama. Rezultati sugeriraju da su JA-deficijentne *opr3* transgenične

biljke podložnije bržem širenju viroidne RNA u ranijim fazama infekcije, što ukazuje na važnost JA u kontroli širenja infekcije (Pieterse i sur., 2012). Prethodno istraživanje na rajčici pokazalo je da je utišavanje *OPR3* gena rezultiralo povećanom osjetljivošću na *B. cinerea*, podržavajući ideju da je netaknuti put JA važan za učinkovitu obranu od nekrotrofnih patogena (Scalschi i sur., 2015). Studije su pokazale da *coi1* transgenične biljke, neosjetljive na JA, pokazuju povećanu osjetljivost na različite patogene. U prethodnom istraživanju pokazano je da je mutacija u alelu *coi1-40* u *Arabidopsisu* povećala osjetljivost na signale patogena, sugerirajući da neosjetljivost na JA ugrožava obrambene sposobnosti biljke (Dobón i sur., 2013). Osim toga, biljake krumpira s nemogućnošću sinteze JA (*opr3*) pokazuju povećanu osjetljivost na patogenu bakteriju *Erwinia cartovora*, budući da ne uspijevaju aktivirati potrebne obrambene mehanizme koji su inducirani JA-signalnim putem (Halim i sur., 2009; Montesano i sur., 2005). Biljke krumpira neosjetljive na JA (*coi1*) pokazuju poremećene odgovore slične onima kod *opr3* biljaka, ali kroz drugačiji mehanizam. Poremećaj u biosintezi i signalizaciji JA dovodi do nemogućnosti aktiviranja obrambenih gena kao odgovor na napad biljojeda ili patogena što rezultira povećanom osjetljivošću na patogene (Halim i sur., 2009).

Infekcija PSTVd povezana je s pojavom različitih simptoma bolesti, a oni uključuju zastoje u rastu, epinastiju lista i klorozu, koji zajedno doprinose smanjenju visine biljke. Imunološki odgovori aktivirani tijekom infekcije PSTVd mogu dovesti do inhibicije rasta, budući da biljka preraspoređuje raspoložive resurse za borbu protiv patogena, a ne za poticanje rasta (Zheng i sur., 2017). Prijašnja istraživanja na viroidom (PSTVd i CEVd) inficiranim biljkama rajčice i patlidžana pokazuju značajno smanjenje visine u usporedbi s kontrolnim biljkama, osobito u kasnijim tjednima (7 i 8 wpi) (Owens & Hammond, 2009; Prol i sur., 2021). Ovi simptomi vjerojatno su povezani s poremećajem hormonalnih puteva i obrambenih reakcija (Baebler i sur., 2014; Owens & Hammond, 2009; Prol i sur., 2021). Istraživanja na rajčici su pokazala da infekcija PSTVd dovodi do značajnih promjena u ekspresiji gena uključenih u metabolizam i signalizaciju hormona, posebno onih povezanih s JA, GA i BR signalnim putevima (Więsyk i sur., 2018). Ekspresija gena povezanih s biosintezom GA često je smanjena tijekom infekcije PSTVd, što dovodi do smanjenog rasta i visine inficiranih biljaka (Mishra i sur., 2018). To je osobito vidljivo u istraživanjima u kojima inficirane biljke pokazuju izrazito smanjenje duljine izdanaka i internodija, kao i promjene u morfologiji lista (Katsarou i sur., 2016).

U mojim istraživanjima infekcija PSTVd značajno utječe na rast i razvoj biljaka krumpira, što je osobito izraženo između 5 i 8 wpi gdje su biljke s nižim količinama viroida, pokazivale

manju promjenu visine u odnosu na svoju kontrolu, što sugerira da je učinak infekcije na fenotip usko povezan s količinama viroidne RNA. Jedan od simptoma infekcije u biljkama bilo je smanjenje mase listova, karakteristično formiranje listova s ušiljenim vrhovima, te uvijenost lisne plojke, osobito u vršnih listova, što je u ovom istraživanju najizraženije između 5 i 6 wpi. Vidljive su promjene u listovima biljaka koji pokazuju promjene u veličini, boji i obliku, što dodatno ukazuje da viroidna infekcija ometa fiziološke procese biljke, a slično je opaženo u prijašnjim istraživanjima na *A. thaliana*, rajčici i patlidžanu (Navarro i sur., 2008; Owens & Hammond, 2009; Prol i sur., 2021).

Simptomi su jači u *NahG* inficiranim u odnosu na wt inficirane biljke. Biljke wt rastu unatoč infekciji, dok je zastoj u rastu *NahG* inficiranim biljkama jasno vidljiv (u odnosu na pripadajuće kontrole), što ukazuje na veću osjetljivost *NahG* biljaka na PSTVd. Masa vršnih listova smanjena je 8 tjedana nakon infekcije, više u *NahG* nego u wt (u odnosu na njihove pripadajuće kontrole). Nakon pojave prvih simptoma *NahG* biljake brže propadaju zbog općenito slabije otpornosti uzrokovane nemogućnošću nakupljanja SA. Ova razlika u fenotipu sugerira da je SA-signalni put važan za manifestaciju simptoma viroidne infekcije, uključujući smanjenje rasta i promjene u strukturi listova (Baebler i sur., 2011, 2014; Prol i sur., 2021). Osim toga, kod INA tretiranih wt i *NahG* biljaka inficiranih s PSTVd u ovom istraživanju ti simptomi su bili značajno smanjeni, što ukazuje na potencijalni zaštitni učinak INA tretmana na smanjenje fenotipskih simptoma viroidne infekcije pokazan u prethodnim istraživanjima (El-Gamal i sur., 2007; Martínez-Aguilar i sur., 2016). Ovi rezultati naglašavaju važnost SA u regulaciji biljnih odgovora na viroidnu infekciju i rast te ukazuje na to da INA može djelomično ublažiti negativne učinke viroidne infekcije na rast biljaka (Ding & Ding, 2020).

Kod transgeničnih biljaka s utišanim genom za *OPR3* i s utišanim genom za *COI1*, infekcija viroidom PSTVd nije zaustavila rast stabljike biljaka, kao ni u biljkama divljeg tipa. Slično tome, u inficiranim *opr3* i wt biljkama nije bilo zastoja u rastu vršnih listova, sudeći prema vrijednostima za svježu masu vršnih listova izmjerenu do 8 wpi. Ovi rezultati ukazuju na to da utišavanje gena *OPR3* nema značajniji učinak na razvoj simptoma PSTVd u inficiranim biljkama krumpira. Jedan od primarnih razloga za nedostatak značajnog učinka na simptome PSTVd u biljkama s utišanim *OPR3* je postojanje alternativnih puteva za biosintezu JA. Istraživanja su pokazala da se OPDA (12-oksofitodienska kiselina), prekursor JA, može pretvoriti u JA i kroz alternativni put koji zaobilazi *OPR3*. Ovaj alternativni put uključuje β -oksidaciju i djelovanje drugih OPR izoenzima, kao što su *OPR1* i *OPR2*, koji mogu djelomično

nadoknaditi gubitak funkcije OPR3 (Chini i sur., 2023; Koo i sur., 2006). Posljedično, čak i u nedostatku OPR3, biljke još uvijek mogu proizvoditi dovoljne razine JA kroz ove alternativne rute, čime održavaju svoju sposobnost postavljanja obrambenog odgovora protiv PSTVd. Osim toga, ne može se zanemariti uloga OPDA u obrambenim odgovorima biljaka. Pokazalo se da sama OPDA ima signalne sposobnosti koje mogu aktivirati obrambene odgovore neovisno o JA. Na primjer, istraživanje je pokazalo da OPDA može inducirati ekspresiju gena reguliranih i nereguliranih JA, sugerirajući da bi mogao imati ulogu u posredovanju odgovora biljaka na različite stresove, uključujući napad patogena (Zhang & Turner, 2008). To ukazuje da čak i u nedostatku funkcionalnog OPR3, prisutnost OPDA još uvijek može olakšati određenu razinu obrambenog odgovora protiv PSTVd. U ovoj studiji nakupljanje *cis*-OPDA dokazano je u *opr3* i *coi1* biljkama krumpira nakon infekcije s PSTVd, što će biti diskutirano kasnije.

Međutim, u inficiranim *coi1* biljkama uočen je značajan zastoj u rastu vršnih listova, u odnosu na listove inficiranih biljaka divljeg tipa, na što ukazuje pad vrijednostima za svježiu masu vršnih listova. Poremećaj u signalingu JA može uzrokovati poremećaja u signalingu drugih hormona, što može rezultirati promjenama razvoju simptoma pa tako u nedostatku funkcionalnog COI1, ravnoteža se pomiče prema SA, koji može potisnuti JA-posredovanu inhibiciju rasta i obrambene odgovore, što u konačnici dovodi do promjena u razvoju simptoma tijekom infekcije patogenom (Kloek i sur., 2001). Osim toga, studije su pokazale da JA-signalni put daje prednost obrani nad rastom, što dovodi do zastoja u rastu kao odgovor na stres (Yang i sur., 2012). Ovo je posebno važno u kontekstu infekcije patogenom, gdje biljka raspoređuje resurse na obrambene mehanizme, a ne na rast. Budući da je *coi1* neosjetljiv na JA, možda neće uspjeti pokrenuti odgovarajuće odgovore inhibicije rasta koji bi se tipično dogodili u biljkama divljeg tipa pod napadom patogena, što rezultira drugačijim fenotipom rasta (Yang i sur., 2012).

Nakon infekcije s PSTVd u svim testiranim linijama uočene su promjene na gomoljima, koje uključuju smanjenje njihove veličine i broja, izduženi rast te promjenu boje kore gomolja. Ove promjene sugeriraju utjecaj eksperimentalnih uvjeta, odnosno infekcije PSTVd, na razvoj gomolja. Međutim, kako bi se postigao značajniji razvoj i manifestacija promjena na gomoljima, potrebno je provesti istraživanje u vremenskom periodu dužem od 8 tjedana, što bi omogućilo preciznije praćenje dugoročnih efekata i bolje razumijevanje dinamike njihovog rasta.

4.1. Promjene u transkriptomu listova biljaka krumpira nakon infekcije viroidom PSTVd

Funkcionalna analiza diferencijalno izraženih gena (DEG) omogućila je detekciju gena povezanih s obranom i fitohormonima u signalnim putanjama koji se aktiviraju kao odgovor na infekciju PSTVd, ovisnim ili neovisnim o SA ili JA. Fiziološke promjene u biljkama tijekom patogenih infekcija nisu ograničene samo na vidljive simptome. Istraživanja su pokazala da su metabolički putovi uključeni u proizvodnju i raspodjelu energije također pogođeni. Infekcija dovodi do značajnih promjena u transkriptomu biljke, što je važno za razumijevanje temeljnih mehanizama razvoja simptoma bolesti (Zheng i sur., 2017).

Funkcionalna GO karakterizacija DEG koji odgovaraju na infekciju PSTVd u biljkama krumpira divljeg tipa identificirala je DEG značajno zastupljene u BP terminima, kao što su fotosinteza, odgovor na svjetlost, temperaturni stres te presavijanje proteina. Unutar navedenih GO termina, prevladavali su smanjeno eksprimirani geni što znači da je infekcija PSTVd kod wt biljaka utišala gene potrebne za funkciju navedenih bioloških procesa (BP). Ranije studije su pokazale da viroidne infekcije dovode do smanjene funkcije kloroplasta i gena povezanih s fotosintezom u biljkama rajčice (Więsyk i sur., 2018). Ova regulacija je vjerojatno strateški odgovor biljke da sačuva energiju, preusmjeravajući je prema imunološkim odgovorima, a ne prema procesima rasta. PSTVd može komunicirati s faktorima domaćina koji utječu na njegovu replikaciju, što neizravno utječe na fotosintetsku učinkovitost biljke (Jiang i sur., 2018). Slično, ekspresija gena uključenih u fotosintezu i primarni metabolizam često je smanjena u biljkama inficiranim virusima, što dovodi do smanjene učinkovitosti fotosinteze i, posljedično, smanjenog rasta (Di Carli i sur., 2010). Ova smanjena regulacija može rezultirati smanjenom masom listova i smanjenom visinom biljke, budući da biljke ne mogu učinkovito pretvoriti sunčevu svjetlost u energiju zbog stresa izazvanog virusnom infekcijom. Fiziološko obrazloženje iza toga je da aktiviranje obrambenih odgovora može biti energetski skupo, pa stoga smanjenje fotosintetske aktivnosti može pomoći biljci da učinkovitije upravlja svojim energetskim rezervama tijekom infekcije viroidima (Joubert i sur., 2022).

Dodatno, funkcionalna GO karakterizacija pokazala je značajno obogaćenje procesa povezanih s odgovorom na ROS i sastavljanjem proteinskih kompleksa, koji su većinom bili smanjeno eksprimirani u inficiranim u odnosu na neinficirane biljke, što ukazuje na uključenost odgovora na oksidativni stres u obrambenim mehanizmima biljke (Zhang i sur., 2016). Analiza staničnih

komponenti otkrila je obogaćenje termina, sa uglavnom smanjeno eksprimiranim genima, povezanih s plastidima, tilakoidima i kloroplastima, dodatno naglašavajući važnost fotosintetskog aparata u posredovanju obrambenih odgovora protiv infekcije viroidima (Naoi i sur., 2020). Viroidna infekcija može modificirati strukturu ili sintezu kloroplasta, koji utječu na učinkovitost fotosinteze. Postoje mnoge studije koje pokazuju da infekcija virusom potiskuje fotosintezu u domaćinu (Li i sur., 2016b). Organski spojevi i energija potrebni za rast biljaka dolaze od fotosinteze, a ograničavanje fotosinteze može potisnuti rast i razvoj, što može biti jedan od uzroka smanjenog rasta uočenog u inokuliranim biljkama krumpira. Ovo je u skladu s prijašnjim istraživanjem na biljkama krastavaca inficiranih s viroidom HSVd, kod kojih je uočen smanjen rast (Xia i sur., 2017).

Funkcionalna GO analiza *NahG* PSTVd inficiranih biljaka krumpira pokazala je promijenjeni izraz brojnih gena povezanih s procesima prijenosa iona i strukturom stanične membrane, pri čemu je uočena smanjena ekspresija svih tih termina, što bi moglo biti povezano s akumulacijom anorganskih iona unutar stanica, generiranjem ROS i razvojem osjetljivijih imunoloških odgovora. Uključenost prijenosa iona u obrambene mehanizme biljaka dobro je utvrđena, budući da ima ulogu u održavanju stanične homeostaze i olakšavanju signalnih puteva koji aktiviraju obrambene odgovore (Miller i sur., 2015; Owens & Hammond, 2009). Konkretno, regulacija ionskih kanala i transportera povezana je sa sposobnošću biljke da odgovori na biotske stresore, uključujući viroide (Kasai i sur., 2013; Navarro i sur., 2021b). Nadalje, povećana aktivacija procesa popravka DNA i transkripcije mRNA u *NahG* biljkama može implicirati odgovor na genotoksični stres izazvan infekcijom PSTVd. Ovo naglašava višestruku prirodu odgovora biljaka na viroidne infekcije pri čemu se inducira nekoliko puteva kako bi se smanjila šteta i obnovila stanična homeostaza. Takva interakcija s primarnim i sekundarnim metabolizmom, u kombinaciji s indukcijom različitih puteva koji reagiraju na stres, naglašava složenost obrambenih mehanizama biljaka protiv PSTVd i sličnih patogena (López-Gresa i sur., 2016). Zanimljivo je primijetiti da je slična funkcionalna raspodjela gena zapažena između smanjeno eksprimiranih *NahG*-specifičnih i pojačano eksprimiranih wt-specifičnih gena, što naglašava ključne razlike u aktivaciji obrambenih odgovora između ovih dvaju genotipa, uvjetovane njihovim različitim bazalnim koncentracijama SA signalizacije.

Funkcionalnom GO analizom u *opr3* liniji biljaka krumpira inficiranih s PSTVd uočene su značajne promjene u diferencijalno eksprimiranim genima (DEG) povezanim s morfogeneza anatomске strukture, posebno onima povezanim s promjenama u staničnoj stijenci, gdje je

većina DEG bila pojačano eksprimirana, te tilakoidnoj membrani kloroplasta, gdje je većina DEG bila smanjeno eksprimirana. Aktivacija procesa vezanih uz stanične stijenke i ekstracelularne strukture sugerira da *opr3* više ovisi o fizičkim barijerama kao obrambenom mehanizmu. Istraživanje na mutantu *opr3-1* otkriva da nedostatak JA u tim biljkama dovodi do promjena u obrambenim odgovorima, što sugerira da transgene biljke *opr3* mogu kompenzirati smanjenu kemijsku obranu jačanjem fizičkih barijera (Qi i sur., 2020). GO funkcionalna analiza induciranih gena u BP terminima pokazala je pojačanu ekspresiju u većini termina, a istaknuti su odgovor na hormon i odgovor na podražaj. Na primjer, pojačano eksprimirana katalitička i aciltransferazna aktivnost ukazuju na promjene u biosintezi sekundarnih metabolita, što je važan dio obrane kada JA biosinteza nije aktivna (Stintzi & Browse, 2000). Uloga JA u razvoju biljaka i odgovorima na stres dobro je prikazana, što ukazuje na to da su signalni putevi JA presudni za regulaciju različitih fizioloških procesa, uključujući one povezane sa staničnom arhitekturom i integritetom (Baebler i sur., 2011; Navarro i sur., 2021b).

Funkcionalna GO analiza biljaka linije *coi1* također pokazuje promjene u DEG vezanim uz fotosintezu, stanične komponente povezane uz fotosintetske aparate, kao što su plastidi, tilakoidi i fotosintetske membrane, dok je u domeni molekularnih funkcija većina pripadala vezanju klorofila. Ovo zapažanje u kojemu je većina povezanih termina smanjeno eksprimirana u skladu je s nalazima iz različitih transkriptomskih istraživanja, koja su dosljedno izvijestila o smanjenoj fotosintetskoj aktivnosti u biljkama inficiranim viroidima (Owens i sur., 2012b; Suzuki i sur., 2019). Kloroplasti kao mjesta fiksacije ugljika, proizvodnje ROS i sinteze fitohormona povezanih s obranom, imaju ulogu u imunološkom odgovoru biljke (Bittner i sur., 2022). Oštećen razvoj kloroplasta mogao bi stoga dovesti do neravnoteže u regulaciji biljne imunosti, ali i do simptoma poput kloroze listova i usporenog rasta. Uz njih uočavamo i povećanu aktivaciju intrizičnih i integralnih komponenti membrane, kao i periferiju stanice i plazmatsku membranu kod kojih je veći broj smanjeno eksprimiranih DEG. Najizraženije molekularne funkcije obogaćene DEG uključivale su termine za vezanje klorofila i kinazne aktivnosti (katalitička i oksidoreduktivna aktivnost), što implicira promjene u signalnim putevima povezanim s fosforilacijom proteina. Međudjelovanje između aktivnosti kinaze i vezanja klorofila također sugerira složenu regulatornu mrežu gdje su fotosintetska učinkovitost i signalizacija stresa međusobno povezani. Na primjer, fosforilacija proteina uključenih u sintezu i razgradnju klorofila može modulirati sposobnost biljke da se prilagodi različitim svjetlosnim uvjetima i stresu (Nolan i sur., 2017). Ovo naglašava značaj fosforilacije proteina kao regulatornog mehanizma koji integrira signale iz okoliša s metaboličkim odgovorima.

Nakon provedene KEGG funkcionalne analize, dobili smo detaljniji uvid u zajedničke i specifično eksprimirane DEG odnosno njihovu zastupljenost u važnim metaboličkim putevima. KEGG analizom pojačano eksprimiranih DEG ($fc > 2$) specifičnih za wt liniju anotirano je 149 gena u 49 funkcionalnih puteva. U ovom radu prikazano je 72 specifično pojačano eksprimirana gena u signalnim putevima biljaka divljeg tipa, povezanih s 5 najobogaćenijih KEGG puteva. Ovi putevi uključuju MAPK signalni put, signalnu transdukciju fitohormona i interakciju biljka-patogen, što ukazuje na aktivaciju PTI odgovora posredovanih hormonima u biljkama divljeg tipa nakon infekcije PSTVd (Navarro i sur., 2021a). Pojačano eksprimirani geni kod wt biljaka obogaćeni su za signalne puteve povezane s obrambenim odgovorom, uključujući biosintezu fenilpropanoida, što ukazuje na snažnu aktivaciju imunoloških procesa u cilju borbe protiv viroidne infekcije. Fenilpropanoidi su bioaktivni sekundarni metaboliti koje biosintetiziraju biljke iz esencijalna aminokiselina fenilalanin katalizirana enzimom PAL (fenilalanin amonijak-liaza), koji je dio šikimatnog puta. Biosinteza fenilpropanoida pridonosi jačanju imunološkog odgovora u biljkama stvaranjem različitih spojeva koji imaju ulogu u obrambenim mehanizmima. Put se aktivira kada patogeni probiju staničnu stijenku biljke, što dovodi do proizvodnje antimikrobnih spojeva i signalnih molekula koje jačaju imunitet biljke. Ti spojevi uključuju lignin, koji povećava čvrstoću staničnih stijena i djeluje kao fizička barijera protiv patogena, te flavonoide i kumarin, koji imaju antimikrobna svojstva. Također, salicilna kiselina regulira aktivaciju obrambenih odgovora, doprinosi sistemskoj otpornosti i mobilizira zaštitu prema neinficiranim dijelovima biljke (Yadav i sur. 2020).

S druge strane, KEGG analizom wt-specifičnih smanjeno eksprimiranih DEG ($fc > 2$) u wt liniji anotirano je 130 gena u 50 funkcionalnih puteva. U ovom radu prikazano je 45 specifično smanjeno eksprimiranih gena u PSTVd inficiranim biljkama divljeg tipa u 5 puteva s najviše DEG, koji uključuju fotosintezu, procesiranje proteina, biosintezu flavonoida i fiksaciju ugljika. Ova obogaćenja sugeriraju suzbijanje bazalnog metabolizma, pri čemu biljke smanjuju energiju za rast i razvoj kako bi preusmjerile resurse prema obrambenim mehanizmima. Dobiveni rezultati KEGG analize za wt biljke u skladu su s rezultatima GO analize i MapMan analize, što ukazuje na konzistentnost u identificiranim biološkim procesima i molekularnim putevima.

Također, KEGG analizom 88 specifično pojačano eksprimiranih DEG ($fc > 2$) u *NahG* liniji anotirano je u 55 funkcionalnih puteva. U ovom radu prikazano je 5 puteva s najviše DEG, koji

uključuju 20 specifično pojačano eksprimiranih gena u signalnim putevima *NahG* biljaka. Najobogaćeniji putevi uključuju biosintezu zeatina, metabolizam škroba i saharoze te biosintezu kutina, suberina i voska. Ovo obogaćenje ukazuje na to da *NahG* biljke, koje imaju inhibiran SA-signalni put, prioritet daju strukturalnim promjenama i metabolizmu ugljikohidrata, a ne aktivaciji obrambenih signalnih puteva poput wt biljaka.

Nasuprot tome, KEGG analizom 107 specifično smanjeno eksprimiranih DEG ($fc > 2$) u *NahG* liniji anotirano je u 54 funkcionalna puta, a u ovom radu prikazano je 5 puteva s najviše DEG, koji uključuju 31 specifično smanjeno eksprimirani gen, a pripisuju se signalnim putevima povezanim s interakcijom biljka-patogen, signalnom transdukcijom fitohormona, biosintezom fenilpropanoida i MAPK signalnim putem, što ukazuje na smanjenu aktivaciju obrambenih procesa. Dobiveni rezultati KEGG analize za *NahG* biljke u skladu su s rezultatima GO analize i MapMan, pri čemu je u svim analizama uočena povećan broj smanjeno eksprimiranih gena koji se pojavljuju unutar istih signalnih puteva i funkcionalnih skupina. Ovi putevi i funkcije uglavnom su povezani s interakcijom biljke i patogena, prijenosom signala biljnih hormona te biosintezom sekundarnih biljnih metabolita.

Mali postotak zajedničkih DEG (12,17%, 237 DEG od ukupno 1946 DEG) od kojih je 75 pojačano eksprimirano (4,39%), a 122 smanjeno eksprimirano (7,13%) ukazuje na značajne razlike u transkriptomskim odgovorima između divljeg tipa i SA-deficijentnih *NahG* biljaka, što se može pripisati razlikama u bazalnim koncentracijama SA i nefunkcionalnom imunološkom odgovoru kod SA-deficijentnih biljaka (Aviña-Padilla i sur., 2018; Baebler i sur., 2011; Więsyk i sur., 2018). KEGG analizom dobiveni su zajednički pojačano i smanjeno eksprimirani (engl. *common*) DEG kod wt i *NahG* biljaka, neovisni o sadržaju SA (u slučaju komparacije *NahG* vs wt) pa se promjena u njihovoj ekspresiji može pripisati općem učinku infekcije na stanične procese kao što su putevi prijenosa signala fitohormona, te metabolizma amino šećera i nukleotida, kao i taurina i hipotaurina kod pojačano eksprimiranih, dok su smanjeno eksprimirani putevi povezani s interakcijama biljka-patogen, biosintezom terpenoida te fotosintezom. Diferencijalna ekspresija ovih gena naglašava složenu interakciju između infekcije viroidima i signalnih puteva imunološkog odgovora biljaka.

Nadalje, usporedba diferencijalno eksprimiranih gena (DEG) između biljaka divljeg tipa, *opr3* i *coi1* PSTVd inficiranih biljaka otkrila je da ova tri genotipa dijele vrlo mali postotak zajedničkih gena (3,14%, 119 DEG od 3789 ukupnih DEG), od kojih je 59 pojačano

ekspimirano (2,88%), a 60 smanjeno ekspimirano (3,45%). Jednako niski postotci vidljivi su i između wt i *opr3* linije (4,12%) te između wt i *coi1* linije (4,85%). To također ukazuje na značajne razlike u transkriptomskim odgovorima između divljeg tipa i JA-deficijentnih (*opr3*), odnosno JA-neosjetljivih (*coi1*) linija, što je najvjerojatnije uzrokovano razlikama u bazalnim koncentracijama JA i poremećaju u prijenosu signala u kojima posreduje JA. Ovo je u skladu s prethodnim nalazima o ulozi JA-signalnog puta u aktivaciji obrambenih odgovora u biljkama, osobito u kontekstu patogenih i viroidnih infekcija (Góra-Sochacka i sur., 2019; Suzuki i sur., 2019).

KEGG analizom 113 specifično pojačano ekspimiranih DEG ($fc > 2$) u wt liniji, u odnosu na *opr3* i *coi1* linije, anotirano je u 42 funkcionalna puta. U ovom radu prikazano je 49 specifično pojačano ekspimiranih gena u signalnim putevima biljaka divljeg tipa, povezanih s 5 najobogaćenijih KEGG puteva, uključujući interakciju biljka-patogen, metabolizam i biosintezu fenilalanina, MAPK signalni put te prienos signala fitohormona. S druge strane, KEGG analizom 96 specifično smanjeno ekspimiranih DEG ($fc > 2$) u wt liniji, u odnosu na *opr3* i *coi1* linije, anotirano je u 54 funkcionalna puta. U ovom radu prikazano je 5 puteva s najviše DEG, koji uključuju 24 specifično smanjeno ekspimiranih gena u PSTVd inficiranim biljkama divljeg tipa obogaćeno je u 5 najobogaćenijih KEGG puteva, uključujući procesiranje proteina u endoplazmatskom retikulumu, interakciju biljka-patogen, endocitozu, biosintezu fenilpropanoida i flavonoida. Rezultati KEGG analize za wt biljke pokazuju usklađenost s rezultatima GO analize i MapMan analize.

Također, KEGG analizom 89 specifično pojačano ekspimiranih DEG ($fc > 2$) u *opr3* liniji, u odnosu na wt i *coi1* linije, anotirano je u 42 funkcionalna puta. U ovom radu prikazano je 5 puteva s najviše DEG, koji uključuju 32 specifično pojačano ekspimirana gena u signalnim putevima *opr3* biljaka, povezanih s 5 najobogaćenijih metaboličkih puteva, od kojih su najobogaćeniji bili prienos signala fitohormona, MAPK signalni put, interakcija biljka-patogen, biosinteza kutina, suberina i voska, te metabolizam glicerolipida. Osim toga, KEGG analizom 96 specifično smanjeno ekspimiranih DEG ($fc > 2$) u *opr3* liniji anotirano je u 50 funkcionalnih puteva. U ovom radu prikazano je 5 puteva s najviše DEG, koji uključuju 25 specifično smanjenih ekspimiranih gena u *opr3* PSTVd inficiranim biljkama pripisano je 5 najobogaćenijih KEGG puteva, uključujući procesiranje proteina u endoplazmatskom retikulumu, biosintezu fenilpropanoida, razgradnju valina, leucina i izoleucina, interakciju biljka-patogen, te MAPK signalni put. Rezultati KEGG analize za *opr3* biljke pokazuju

usklađenost s rezultatima GO analize i MapMan analize, što sugerira dosljednost u identificiranim biološkim procesima i molekularnim putevima.

Nadalje, KEGG analizom 403 specifično pojačano eksprimirana DEG ($fc > 2$) u *coi1* liniji, u odnosu na wt i *opr3* linije, anotirano je u 94 funkcionalna puta. U ovom radu prikazano je 5 puteva s najviše DEG, koji uključuju 83 specifično pojačano eksprimirana gena otkrivena su u signalnim putevima *coi1* biljaka, povezano s 5 najobogaćenijih metaboličkih puteva, od kojih su najobogaćeniji bili oni za metabolizam cisteina i metionina, MAPK signalni put, prijenost signala fitohormona, razgradnju valina, leucina i izoleucina, te biosintezu fenilpropanoidnog puta. Osim toga, KEGG analizom 341 specifično smanjeno eksprimirana DEG ($fc > 2$) u *coi1* liniji anotirano je u 92 funkcionalna puta. U ovom radu prikazano je 5 puteva s najviše DEG, koji uključuju 66 specifično smanjenih eksprimiranih gena u *coi1* PSTVd inficiranim biljkama pripisano je 5 najobogaćenijih KEGG puteva, uključujući fotosintezu, prijenos signala biljnim hormonima, oksidativnu fosforilaciju, biosintezu raznih sekundarnih metabolita biljke, oksidativna fosforilacija te fotosinteza-proteini antenskog kompleksa. Rezultati KEGG analize za *coi1* biljke pokazuju usklađenost s rezultatima GO analize i MapMan analize, pri čemu bih istaknula rezultat o većem broju smanjeno eksprimiranih DEG unutar signalnih puteva povezanih s fotosintezom, u *coi1* u usporedbi s wt ili *opr3* linijom nakon infekcije s PSTVd, što ukazuje na važnost JA signalinga u regulaciji ovih procesa.

Usporedba zajedničkih DEG među wt, *opr3* i *coi1* linijama otkrila je vrlo mali postotak zajedničkih gena, što sugerira značajne razlike u njihovim transkriptomskim odgovorima na infekciju PSTVd. Ove razlike mogu biti rezultat varijacija u bazalnim koncentracijama JA i poremećenim imunološkim odgovorima u JA-deficijentnim i JA-neosjetljivim linijama. KEGG analizom 15 zajedničkih (engl. *common*) pojačano eksprimiranih DEG ($fc > 2$) anotirano je u 6 funkcionalnih puteva, a najviše pojačano eksprimiranih zajedničkih (engl. *common*) DEG kod wt, *opr3* i *coi1* biljaka u ovom istraživanju povezano je s MAPK signalnim putevima, putevima prijenosa signala fitohormona, te metabolizma škroba i saharoze, dok je KEGG analizom 33 zajednička (engl. *common*) smanjeno eksprimirana DEG ($fc > 2$) anotirano je u 16 funkcionalna puta, a najviše smanjeno eksprimiranih zajedničkih DEG povezano s putevima fotosinteze, glikolize i glukoneogeneze te metabolizma piruvata.

Ovi rezultati ukazuju na to da različite biljne linije, ovisno o njihovoj osjetljivosti na JA i SA, imaju različite transkriptomске odgovore na infekciju PSTVd, s različitim aktivacijama obrambenih putova i metaboličkih procesa. Razlike u transkriptomskim odgovorima također sugeriraju da JA- i SA-signalni putevi imaju ulogu u regulaciji obrambenih odgovora biljaka, osobito u kontekstu patogenih i viroidnih infekcija.

4.2. Regulacija antioksidacijskih odgovora tijekom infekcije viroidom PSTVd

ROS djeluju kao signalne molekule koje imaju ulogu u aktivaciji obrambenih gena u odgovoru na patogene infekcije (Torres i sur., 2006). Pored njihove primarne uloge u obrambenim reakcijama, ROS također sudjeluju u interakciji s drugim signalnim putevima, uključujući biljne hormone poput SA i JA, kao i MAPK signalnim kaskadama (Martin i sur., 2022). Osim toga, nakupljanje ROS uslijed infekcije patogenom dovodi do promjena u metabolizmu specifičnih obrambenih spojeva uključujući kalozu koja je važna za jačanje stanične stijenke i ograničavanje širenja patogena (Wang i sur., 2021b). Slično ukazuju rezultati GO funkcionalne analize prikazane u ovom radu, gdje su termini poput 'odgovor na oksidativni stres', 'odgovor na vodikov peroksid', 'odgovor na spojeve koji sadrže kisik', i 'oksidoreduktazna aktivnost' obogaćeni DEG. Kao jedna od glavnih ROS ističe se H_2O_2 . Nakupljanje H_2O_2 tijekom infekcije PSTVd paprike pokazalo se kao okidač za aktivaciju signalnih puteva koji vode do pojačanih obrambenih odgovora, uključujući sintezu kaloze, polisaharida koji jača stanične stijenke i ograničava kretanje patogena kroz kanale plazmodezmija (Hadjieva i sur., 2021). Regulacija ovih mehanizama usko je povezana sa signalnim putevima fitohormona, osobito onima kojima posreduju SA i JA (Yi i sur., 2014).

4.3.1. Regulacija antioksidacijskih odgovora u wt i SA-deficijentnim biljkama tijekom infekcije viroidom PSTVd

U divljem tipu biljaka (wt), infekcija PSTVd uzrokuje značajan porast nakupljanja H_2O_2 , što se najviše očituje tijekom kasnije faze infekcije. Ovi rezultati ukazuju na snažan oksidativni odgovor wt biljaka kao dio njihovih obrambenih mehanizama. Nakupljanje H_2O_2 u wt PSTVd

biljkama odražava prirodnu aktivaciju ROS odgovora, važnog za ograničavanje širenja infekcije (Hernández i sur., 2016).

SA-deficijentna *NahG* linija nakuplja manje H_2O_2 u listovima tijekom infekcije u usporedbi s wt biljkama, sudeći prema rezultatima analize digitalne slike uzoraka obojenih s DAB. Suprotno tome, rezultati analize sadržaja H_2O_2 dobiveni spektrofotometrijskom analizom pokazuju da *NahG* PSTVd inficirane linije krumpira akumuliraju veće koncentracije H_2O_2 u usporedbi s neinficiranim *NahG* kao i inficiranim wt biljkama (Kumek, 2023). Rezultati variraju ovisno o metodi detekcije i broju analiziranih uzoraka, a uvriježeno je da je spektrofotometrija više kvantitativna metoda.

Jače nakupljanje H_2O_2 u *NahG* biljaka krumpira inficiranih viroidom PSTVd, ukazuje na njihovu povećanu osjetljivost na viroidnu infekciju. Ta pojava je povezana sa smanjenom sposobnošću regulacije hormonskih odgovora i kontrole oksidativnog stresa u *NahG* biljkama. Slično rezultatima moje studije, jače nakupljanje H_2O_2 izmjereno je kod *NahG* biljaka krumpira inficiranih virusom PVX, u usporedbi s wt biljkama (Sánchez i sur., 2010). Ovi rezultati podržavaju hipotezu da endogena koncentracija SA ima zaštitnu ulogu u biljci domaćinu, sprječavajući oksidativna oštećenja izazvana pretjeranim nakupljanjem ROS. Važno je napomenuti da krumpir divljeg tipa ima izrazito visoke bazalne koncentracije SA, u usporedbi s vrstama kao što su *Arabidopsis thaliana* i duhan, dok patogenima inducirana infekcija uzrokuje tek blagi porast koncentracije SA (Baebler i sur., 2014). U tom kontekstu, nakupljanje H_2O_2 i indukcija antioksidacijskih odgovora mogla bi imati važnu ulogu u aktivaciji obrambenih odgovora na PSTVd u biljkama krumpira.

Egzogeni tretman s INA povećao je akumulaciju H_2O_2 u biljnom tkivu linija wt inficiranih viroidom PSTVd, što može biti rezultat pretjerane reakcije na primijenjenu koncentraciju INA (1 mmol/l), budući da SA i njezini derivati mogu inducirati oksidativne procese (Kumek, 2023). Suprotno tome, u *NahG* liniji, INA tretman smanjio je akumulaciju H_2O_2 , što sugerira da endogeni SA ima ulogu u regulaciji odgovora biljaka na infekciju (Kumek, 2023). Ovi rezultati podržavaju ranija istraživanja koja ukazuju na poboljšanu otpornost biljaka s deficijencijom endogenog SA na patogene kada se tretiraju sintetskim analogima SA (Baebler i sur. 2011; López-Gresa i sur. 2016). Dakle, dobiveni rezultati upućuju da SA ima važnu ulogu u modulaciji oksidativnog odgovora biljaka na infekciju viroidom PSTVd.

Relativna ekspresija gena za katalazu (*CAT*) kod wt i *NahG* linija pokazala je blagu aktivaciju u početnim tjednima infekcije, dok u kasnijim tjednima infekcije (6 wpi) vidimo smanjenje aktivacije u obje linije. Dok je relativna ekspresija gena za katalazu (*CAT*) u listovima inficiranih biljaka wt i *NahG* linija u pokusu s INA tretmanom, bila smanjena tijekom cijelog trajanja eksperimenta. Značajan negativan učinak INA tretmana na ekspresiju *CAT* gena u skladu je s prethodnim istraživanjima, koja su pokazala da SA i njezin sintetski analog INA mogu inhibirati ekspresiju katalaze u biljkama poput *Arabidopsis thaliana*, rajčice i krastavca (Dalakouras i sur., 2010; Lamb & Dixon, 1997).

Peroksidaze klase III, uključujući *POX12* i *LiP*, poznate su po ulozi u jačanju obrambenog odgovora biljaka putem regulacije proizvodnje ROS ili fenolnih radikala, koji djeluju kao antimikrobni agensi i signalni posrednici, te kroz stvaranje strukturnih barijera, poput lignina i suberina (Almagro i sur., 2009). U ranim fazama infekcije PSTVd bez INA, biljke divljeg tipa pokazale su blagi porast ekspresije gena *POX12*, dok su kasnije faze infekcije karakterizirane indukcijom gena za askorbat peroksidazu (*APX*) i lignin peroksidazu (*LiP*). Budući da su peroksidaze važni enzimi u metabolizmu H_2O_2 , imaju važnu ulogu u obrambenim mehanizmima biljaka kao odgovor na oksidativni stres uzrokovan biotskim i abiotiskim čimbenicima (Góra-Sochacka i sur., 2019; Mansoor i sur., 2022). Njihova ekspresija često je inducirana kao dio odgovora biljke na patogene, uključujući viruse i viroide, što je u skladu s istraživanjima koja su uključivala infekciju krumpira virusom PVY (Baebler i sur., 2014) i interakciju *Citrus medica* s viroidom CEVd (Naoi i sur., 2020; Rizza i sur., 2012). Rezultati ove studije pokazali su snažnu inhibiciju ekspresije svih ispitanih gena za peroksidaze u *NahG* biljkama u ranoj fazi infekcije s PSTVd. U kasnijim fazama infekcije zabilježena je indukcija gena *POX12* i *LiP*, što je slično opažanjima iz istraživanja o interakciji *NahG* biljaka krumpira s virusom PVY (Baebler i sur., 2014).

U ovom istraživanju infekcija PSTVd bez INA tretmana dovela je do smanjenja ekspresije svih testiranih MAPK gena u početnim fazama infekcije PSTVd kod biljaka divljeg tipa, dok je kod *NahG* linije vidljiva aktivacija MPKK6 i MPK7. U kasnijim fazama infekcije dolazi do blage aktivacije *MAPK3*, *MPK7* i *MPKK6* kod obje linije. Tretman s INA inducirao je aktivaciju *MAPK3*, *MAPK7* i *MKK6*, a istovremeno inhibirao ekspresiju gena *MAPK4* u biljkama divljeg tipa i *NahG* linijama, što ukazuje na SA-ovisnu aktivaciju MAPK kao odgovor na infekciju PSTVd. Ekspresija *MAPK3* porasla je tijekom kasnijih faza infekcije u wt i *NahG* biljkama, što je u skladu s istraživanjima koja sugeriraju da je *MAPK3* induciran u obrambenim

odgovorima biljaka na patogene (Zhang & Zhang, 2022) te se smatra pozitivnim regulatorom obrambenih odgovora posredovanih SA (Jagodzick i sur., 2018). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da tretman s INA i PSTVd također pojačava ekspresiju *MAPK3* u wt biljkama krumpira (više ili jednako kao) u odnosu na infekciju bez INA tretmana. Ovi rezultati su u skladu s tvrdnjom da SA aktivira *MAPK3* u duhanu tijekom SA tretmana (Zhang & Klessig, 1997). Aktivnost *Arabidopsis AtMPK3* i *ZmMPK3* kukuruza osjetljiva je na nekoliko signalnih molekula, uključujući SA ili JA (Wang i sur., 2010; Smekalova i sur., 2013). Pojačana ekspresija gena za MAP kinaze, poput *MAPK3*, *MAPK7* i *MKK6*, te kalmodulinskih proteina u biljkama krumpira divljeg tipa inficiranim s PSTVd, u skladu je s rezultatima na rajčicama inficiranim s PSTVd, što upućuje na SA-ovisnu aktivaciju MAPK i Ca^{2+} signalnih puteva (Góra-Sochacka i sur., 2019).

Osim toga, rezultati ove studije pokazali su smanjenu ekspresiju *MAPK4* u biljkama divljeg tipa, bez obzira na INA tretman, a u prethodnim radovima pokazalo se da je kaskada MPK4 negativni regulator SAR i SA signalizacije u *Arabidopsisu* (Petersen i sur., 2000.). Oksidativni stres izazvan egzogenim H_2O_2 također može aktivirati *MAPK3*, *MAPK4* i *MAPK7* u *Arabidopsisu*, sugerirajući da ROS djeluje uzvodno od ovih kaskada MAPK (Dóczy i sur., 2007; Šamajová i sur., 2013). U našem istraživanju, pojačana ekspresija *MAPK7* i *MKK6* koindicira s nakupljanjem H_2O_2 u biljkama zaraženim PSTVd, što sugerira da bi H_2O_2 mogao biti jedna od signalnih molekula koje aktiviraju *MAPK7* i *MKK6* kao odgovor na infekciju PSTVd. Ovi rezultati zajedno ukazuju na to da SA-signalni put ima ulogu u modulaciji ROS i MAPK signalinga tijekom odgovora biljaka krumpira na PSTVd, slično primjerima za interakcije drugih biljaka i viroida (Huang i sur., 2019; Lukan & Coll, 2022). Rezultati ove studije su u skladu s ranijim istraživanjima koja su istaknula ulogu ROS i MAPK signalnih puteva u obrambenim reakcijama biljaka na patogene (Itaya i sur., 2007; Lian i sur., 2018). Prepoznavanje PAMP pomoću odgovarajućih receptora pokreće PTI i dodatne obrambene mehanizme, uključujući aktivaciju signalizacije u kojoj sudjeluju ROS i kalcijevi ioni (Ca^{2+}), akumulaciju SA, aktivaciju MAPK kaskada te pojačanu ekspresiju gena povezanih s obranom (Navarro i sur., 2021b).

Kaloza, polisaharid koji se taloži na kritičnim mjestima u staničnim stijenkama, pomaže u jačanju barijera i smanjenju širenja patogena kroz plazmodezmije (Flores, 2016; Hüeckelhoven, 2008). U *A. thaliana*, zatvaranje plazmodezmata izazvano mehaničkom stimulacijom ili infekcijom patogena povezano je s poticanjem taloženja kaloze pomoću H_2O_2 putem aktivacije

gena za kaloza sintazu *CalS8* (Cui i sur., 2016). Kod wt biljaka inficiranih s PSTVd uočena je veća akumulacija kaloze u odnosu na wt mock biljke, osobito u 6 wpi, što upućuje na aktivaciju obrambenih mehanizama kao odgovor na viroidnu infekciju. Ovo pojačano taloženje kaloze u inficiranim wt biljkama može se povezati s aktivacijom SA-signalnog puta i nakupljanjem H_2O_2 nakon infekcije. Kod *NahG* biljaka inficiranih s PSTVd vidljivo je manje nakupljanje kaloze u usporedbi s wt biljkama inficiranim s PSTVd. Ovaj rezultat pokazuje da biljke kojima nedostaje SA-signalni put imaju smanjenu obrambenu reakciju, što dodatno ukazuje na to da taloženje kaloze ovisi o SA (Nishimura i sur., 2003). INA tretman dodatno povećava nakupljanje kaloze i ekspresiju *CalS12*, osobito kod PSTVd inficiranih biljaka. Sinergijski učinak INA tretmana i viroidne infekcije naglašava ulogu SA-signalnog puta u odgovoru na infekciju. *NahG* biljke pokazuju značajno smanjenje taloženja kaloze u usporedbi s wt biljkama, čak i nakon INA tretmana. Ovaj rezultat jasno ukazuje na ulogu SA-signalnog puta u nakupljanju kaloze kao mehanizma obrane (German i sur., 2023; Pieterse i sur., 2012; Wang i sur., 2021b; Dong i sur., 2008). U mojem istraživanju pojačana ekspresija gena koji kodira kaloza sintazu *CalS12* i nakupljanje kaloze u biljkama divljeg tipa zaraženim PSTVd ukazuju na aktivaciju kasnih obrambenih odgovora povezanih s remodeliranjem stanične stijenke. Nakupljanje kaloze i lignina može imati pozitivan učinak na usporavanje nakupljanja viroida, iako ne može spriječiti sustavno širenje viroidne bolesti (Flores, 2016).

4.3.2. Regulacija antioksidacijskih odgovora u JA-deficijentim i JA-neosjetljivim biljkama tijekom infekcije viroidom PSTVd

Ranija istraživanja pokazala su da infekcija PSTVd u krumpiru dovodi do povećane akumulacije H_2O_2 i aktivaciju gena povezanih s regulacijom ROS u kasnijim fazama infekcije (Milanović i sur., 2019b). Ova pojava podudara se s akumulacijom JA i pojavom simptoma u biljkama divljeg tipa, sugerirajući da JA može imati ulogu u regulaciji ROS tijekom odgovora na infekciju PSTVd. Rezultati prikazani u ovom doktorskom radu pokazuju smanjenu akumulaciju H_2O_2 u *opr3* (JA-deficijentnim) biljkama 6 i 8 wpi, što dodatno ukazuje na važnost JA u regulaciji ROS, osobito u kasnijim fazama infekcije (Zheng i sur., 2017).

Istraživanje na biljkama krumpira pokazalo je da transgene linije s poremećajem u biosintezi JA pokazuju smanjene razine H_2O_2 nakon izlaganja patogenu. Istraživanje je pokazalo da je JA važan za aktivaciju imunološkog odgovora, uključujući ROS, koji ima ulogu u signalizaciji

i obrambenim mehanizmima (Nietzschmann i sur., 2019). Ovo dodatno podupire tvrdnju da je biosinteza JA esencijalna za stvaranje H_2O_2 potrebnog za učinkovitu obranu biljaka.

Međutim, zanimljivo je primijetiti da su u JA-neosjetljivim *coi1* biljkama koncentracije H_2O_2 bile više nego u JA-deficijentnim *opr3* ili wt biljkama u 8 wpi. U istraživanju na *coi1* biljkama *A. thaliana* izloženim abiotikom stresu došlo je do nakupljanja više H_2O_2 u odnosu na wt biljke (Yuan i sur., 2017). Ovaj rezultat ukazuje na to da JA-signalni put može modulirati koncentracije H_2O_2 tijekom kasne faze infekcije, a inhibicija JA-signalnog puta kod *coi1* linija može dovesti do poremećene regulacije oksidativnog odgovora (Li i sur., 2022a).

Aktivnost enzima koje kodiraju geni povezani s H_2O_2 bila je niska u sve tri testirane linije tijekom početnih faza infekcije (4-5 wpi). Ekspresija gena *CAT*, smanjena je tijekom 4 i 5 wpi, ali je pojačana tijekom 6 i 7 wpi u JA-transgenim biljkama, kao i u divljim biljkama. Ekspresija gena za peroksidazu povezanu sa suberizacijom (POD) je bila slabija kod *opr3* i *coi1* transgene linije nego kod divljeg tipa, što sugerira da je JA uključen u regulaciju odgovora povezanih s POD (npr. proizvodnja suberina). Ekspresija klase III lignin-formirajućih anionskih peroksidaza (*LiP*) bila je povišena u *opr3* i *coi1* biljkama u razdoblju od 5. do 7. tjedna nakon infekcije, u usporedbi s biljkama divljeg tipa, što sugerira da je JA uključen u regulaciju odgovora povezanih s *LiP* i procesima biosinteze i razgradnje lignina.

Gen *POX12* u liniji *opr3* pokazuje značajan porast ekspresije tijekom svih tjedana, dok u liniji *coi1* dolazi do izraženog smanjenja ekspresije tog gena, što sugerira da signaliziranje JA ima ulogu u regulaciji aktivnosti *POX12* u odgovoru na infekciju PSTVd. U liniji divljeg tipa zabilježen je izraženiji porast ekspresije *POX12* u 4 wpi, dok u sljedećim tjednima dolazi do postupnog smanjenja ekspresije. Rezultati mog istraživanja pokazuju da nedostatak SA ili JA potiče nakupljanje H_2O_2 , a u prethodnom istraživanju na kukuruzu pokazano je da nedostatak JA ili SA znatno povećava ekspresiju *POX12* u odnosu na wt (Hemetsberger i sur., 2012). U tom istraživanju akumulacija H_2O_2 koinducira s pojačanom ekspresijom *POX12* u kukuruzu na mjestu ulaska mutiranog elicitora proteina. Suprotno tome, nativni elicitor suprimira ekspresiju *POX12* i tako sprječava HR (Hemetsberger i sur., 2012). Općenito, rezultati sugeriraju da su akumulacija JA i signaliziranje JA uključeni u regulaciju enzima koji formiraju ROS i enzima koji razgrađuju ROS u odgovoru na PSTVd infekciju u krumpiru.

Nakupljanje kaloze bilo je smanjeno kod *opr3* linija u usporedbi s wt biljkama, što ukazuje da je biosinteza JA važna za poboljšanje sinteze kaloze i, posljedično, otpornosti biljaka na napade

patogena (Li i sur., 2023). Ovo je vidljivo u istraživanju koje uključuje transgene biljke rajčice gdje je utišavanje gena *OPR3*, važne komponente u putu biosinteze JA, rezultiralo povećanom osjetljivošću na nekrotrofni patogen *B. cinerea*. Nalazi upućuju na to da nakupljanje JA sudjeluje u aktiviranju obrambenih odgovora, budući da su transgenim biljke pokazivale smanjenu sposobnost taloženja kaloze. Zanimljivo je da tretman OPDA, ali ne i JA, obnavlja bazalnu otpornost na *B. cinerea* i inducira taloženje kaloze u transgenim biljkama *SiOPR3-1* i *SiOPR3-2*. To sugerira da bi, osim JA, i *cis*-OPDA mogla imati ulogu u regulaciji nakupljanja kaloze u biljkama krumpira inficiranim s PSTVd.

Nadalje, taloženje kaloze kod *coi1* biljaka bilo je znatno smanjeno u usporedbi s *opr3* i wt biljkama jer ove biljke ne mogu transducirati JA signal zbog nedostatka funkcionalnog COI1 receptora, što ukazuje na to da je funkcionalan JA-signalni put esencijalan za adekvatnu aktivaciju ovog obrambenog mehanizma (Thaler i sur., 2012). MeJA tretman nije imao veliki utjecaj na nakupljanje kaloze kod *coi1* linija krumpira zaraženih s PSTVd (ova studija), što je u skladu s rezultatima istraživanja na *A. thaliana* gdje predtretman s MeJA ima relativno slabi učinak na oksidativni odgovor izazvan sa flg22, fragmentom bakterijskog flagelina (Yi i sur., 2014).

Ekspresija *CalS12* gena pojačana je u *opr3* i *coi1* biljkama, dok je smanjena u biljkama divljeg tipa 5 i 7 wpi. Ovo opažanje sugerira da akumulacija JA ili signaliziranje JA nisu potrebni za aktivaciju ekspresije gena *CalS12* u biljkama inficiranim PSTVd viroidom. Rezultati ovog istraživanja na biljkama krumpira tretiranim s INA pokazali su da nakon tretmana dolazi do pojačanja ekspresije *CalS12* gena što sugerira ovisnost o SA-signalnom putu. No, u regulaciji biosinteze kaloze sudjeluje više *CalS* gena, na primjer u soji (*Glycine max*) je pronađeno 24 *CalS* gena uključenih u regulaciju biosinteze kaloze. Od njih 24, *CalS17* i *CalS19* pokazali su jaču ekspresiju u odgovoru na solni stres, ukazujući na njihovu važnost u otpornosti na stres (Zaynab i sur., 2024). Stoga bi rezultati sveukupnih *CalS* gena unutar biljke krumpira mogli dati širu sliku o regulaciji biosinteze kaloze tijekom infekcije s PSTVd. U rezultatima RNASeq analize provedene u ovom istraživanju identificirano je 10 gena povezanih sa sintezom kaloze. Većina tih gena pokazala je pojačanu ekspresiju u *opr3* liniji, dok je u *coi1* liniji primjećen suprotan učinak, s većinom gena koji su smanjeno eksprimirani. Stoga, dobiveni rezultati upućuju da su uključeni mehanizmi regulacije nakupljanja kaloze povezani s JA, ali i s drugim JA-neovisnim mehanizmima, poput SA i ROS signalizacije, u obrani krumpira od PSTVd.

4.4. Infekcija PSTVd utječe na ekspresiju gena za fitohormone i sadržaj fitohormona

U prethodnim radovima istraženi su fiziološki i biokemijski aspekte infekcije viroidom PSTVd u različitim biljnim vrstama, kao što su krumpir, rajčica, petunija i *Solanum laxum* (Milanović i sur., 2014, 2019a, 2019b). Rezultati tih istraživanja na krumpiru pokazali su da viroid PSTVd aktivira značajne promjene u endogenim koncentracijama JA, brasinosteroida (CS) i auksina (IAA) u krumpiru cv. Désirée, osam tjedana nakon inokulacije. Ove promjene bile su povezane s pojačanom ekspresijom gena koji su uključeni u biosintezu i signalizaciju JA, što sugerira važnu ulogu ovih fitohormona u odgovoru biljke na infekciju (Milanović i sur., 2019b). Međutim, nije potpuno razjašnjena dinamika tih promjena tijekom razvoja infekcije. Stoga su eksperimenti za ovu studiju dizajnirani s ciljem da se pratiti dinamika progresije bolesti kroz različite faze infekcije i uspoređi promjene u hormonskom statusu s viroidnim napadom i ekspresije gena u krumpiru nakon infekcije s PSTVd. Dobiveni rezultati mogu doprinijeti boljem razumijevanju molekularnih mehanizama koji podupiru odgovor krumpira na ovu specifičnu infekciju.

Rezultati analiza provedenih u ovoj studiji, u širokom vremenskom rasponu od 2 do 8 tjedana daju uvid u dinamiku promjene u ekspresiji gena i sadržaju hormona, obuhvaćajući faze infekcije prije i poslije pojave simptoma. Komparacija rezultata analize hormona i ekspresije gena uključenih u regulaciju hormonskih puteva omogućila je bolje razumijevanje fiziološke uloge nakupljanja hormona tijekom odgovora na infekciju viroidom PSTVd. Istraživanje Zheng (2017) otkrilo je značajne promjene u koncentracijama ovih hormona u PSTVd inficiranim biljkama rajčice što ukazuje na promjene signalizacije hormona i regulaciju odgovora biljke na stres uzrokovan viroidom (Zheng i sur., 2017). Promjene u ekspresiji gena povezanih s fitohormonima i njihovim koncentracijama mogu biti izravno ili neizravno povezane s razvojem simptoma bolesti i prilagodbom biljaka na viroidnu infekciju u rajčici (Więsyk i sur., 2018).

4.4.1. Salicilna kiselina: koncentracija SA i ekspresija gena u listovima SA- i JA-deficijentnih biljaka

Razina SA nije se značajno promijenila u biljkama divljeg tipa nakon infekcije PSTVd, što je u skladu s prethodno objavljenim rezultatima (Milanović i sur., 2019b). Podaci o transkriptomu

iz interakcija drugih biljaka domaćina i viroida pokazuju da regulacija gena za biosintezu i signaling SA uvelike ovisi o specifičnoj interakciji biljka-viroid (Owens i sur., 2012b; Więsyk i sur., 2018; Xia i sur., 2017). U ovom istraživanju *NahG* biljke pokazuju smanjene koncentracije SA u odnosu na wt biljke, no nisu vidljive značajnije razlike između *NahG* biljaka inficiranih s PSTVd i mock (kontrolnih) biljaka. Istraživanja su pokazala da su normalne koncentracije SA ključne za koordinaciju obrambenih mehanizama u biljkama divljeg tipa, dok smanjene koncentracije SA u *NahG* biljkama rezultiraju povećanom osjetljivošću na infekciju patogena PVY i oslabljenom obrambenom sposobnošću (Baebler i sur., 2014).

Geni uključeni u biosintezu i signalizaciju SA uglavnom su bili potisnuti u ranim fazama infekcije PSTVd u biljkama divljeg tipa krumpira, dok je kod *NahG* linije vidljiva je pojačana ekspresija gena povezanih sa biosintezom i signalizacijom SA kroz sve tjedne. Promjena u ekspresiji gena uključenih u biosintezu i signalizaciju SA dogodila se u 5 i 6 wpi, kada je otkrivena slaba aktivacija *ICS* i jaku aktivaciju gena *PAL* i PR-proteina. Osim toga, ekspresija *NPR1* i *NPR3* gena bila je blago pojačana, što ukazuje na aktivaciju SA-signalnog puta kao odgovor na PSTVd infekciju u oba testirana genotipa. Vrijeme aktivacije ekspresije gena u skladu je s nakupljanjem viroidne RNA i pojavom simptoma.

Sadržaj SA u biljkama podliježe i pozitivnoj i negativnoj povratnoj sprezi (Peng i sur., 2021; Spoel & Dong, 2024). *NPR1* djeluje ne samo nizvodno od SA kako bi aktivirao SAR, već i uzvodno od SA kako bi potisnuo ekspresiju *ICS1* i tako inhibirao biosintezu SA (Zhang i sur., 2010). Rezultati ovog istraživanja sugeriraju da pojačana ekspresija *NPR1* može biti uključena u regulaciju razina SA u krumpiru nakon infekcije PSTVd.

Tijekom istraživanja zabilježena je specifična pojačana ekspresija gena PR obitelji, uključujući *PR-1b*, *PR-2* i *PR-Q*, kod svih testiranih linija nakon infekcije PSTVd, što ukazuje na aktivaciju PTI obrambenog odgovora. Putevi prijenosa signala u kojima sudjeluje SA potiču ekspresiju *PR* gena, zbog čega su PR geni široko korišteni za praćenje SA-induciranih imunoloških odgovora i SAR (Makarova i sur., 2018). Aktivacija ekspresije *PR-2* (β -1,3-glukanaza) i *PR-1b* gena dogodila se ranije i snažnije u *NahG* nego u biljkama divljeg tipa. Ovi rezultati su u skladu s nalazima drugih istraživanja (Joubert i sur., 2022; Owens i sur., 2012b). Promijenjeni profil ekspresije gena za SA signalizaciju u *NahG* biljkama mogao bi biti važan za raniju i snažniju aktivaciju *PR-2* i *PR-1b* gena. Manjak SA signalinga nadoknadi se putem drugih signalnih puteva, kao što su JA ili ET, što može dovesti do brže ekspresije odgovora na stres.

Ovi rezultati sugeriraju da *NahG* biljke mogu koristiti alternativne mehanizme signalizacije kako bi održale efikasan odgovor na patogene, čak i u odsutnosti SA.

Nakon infekcije krumpira virusom PVY, aktivacija ekspresije gena *NPR1*, glavnog regulatora SA signalizacije vjerojatno je inducirana posredstvom ET signalnog modula i EIN3, negativnog regulatora biosinteze SA (Peng i sur., 2021; Ramšak i sur., 2018). Rezultati mog istraživanja sugeriraju da aktivacija ET signalnog puta može biti uključena u regulaciju biosinteze SA i signalnih odgovora na infekciju viroidom PSTVd u krumpiru, na što ukazuje pojačana ekspresija gena (kao što su *ERF1*, *ERF5*, *ACO*). Aktivacija signalnog puta ET primijećena je u nekoliko interakcija biljke i viroida, ali nedostaju podaci o sadržaju ET u zaraženim biljkama (Joubert i sur., 2022). Da bi se saznalo više o ulozi ET u odgovoru na PSTVd u krumpiru potrebno je analizirati sadržaj ET.

Moje istraživanje pokazalo je da smanjene koncentracije SA u *NahG* biljkama rezultiraju povećanom osjetljivošću na infekciju s PSTVd. Slično tome, istraživanje na biljkama krumpira inficiranim virusom PVY pokazalo je da je došlo do promjena u biosintezi fitohormona i proizvodnji specifičnih metabolita što je istaknulo ulogu normalne koncentracije SA u biljkama divljeg tipa krumpira, koje su od presudne važnosti za koordinaciju obrambenih mehanizama protiv virusa PVY (Baebler i sur., 2014).

S druge strane, koncentracije SA u JA-transgenim biljkama *opr3* i *coi1* više su nego u biljkama divljeg tipa kod mock i biljaka inficiranih s PSTVd. JA i SA često djeluju antagonistički u oblikovanju odgovora biljaka na različite oblike stresa (Adkar-Purushothama & Perreault, 2019). U slučaju da je biosinteza ili signalizacija JA poremećena, povećanje koncentracije SA pomoglo bi biljci da razvije obrambeni mehanizam koji se ne oslanja samo na put JA. Viša koncentracija SA u ovim transgeničnim biljkama može odražavati kompenzaciju za nedostatak JA, čime se pojačava imunološki odgovor protiv patogena (Góra-Sochacka i sur., 2019). Na primjer, pokazano je da blokiranje JA-signalnog puta može dovesti do povećanja SA signalizacije u duhanu (Zhu i sur., 2014), a također je istaknuto da postoji povezanost između koncentracija ovih dvaju hormona tijekom obrambenih odgovora na patogene u *Arabidopsisu* (Clarke i sur., 2000).

Ekspresija *PR-2* i *PR-Q* gena bila je snažnija kod *opr3* i *coi1* linija nego u biljkama divljeg tipa što može biti vezano sa aktivacijom SA signalnog puta u tim linijama. Neki PR proteini, uključujući *PR-2* i *PR-3* (endohitinaze) aktiviraju se posredstvom JA, pri ozljeđivanju ili

odgovoru na nekrotrofne patogene (Jain & Khurana, 2018). Dodatno, pojačana ekspresija *NPR1*, koji je središnji regulator SA signalizacije, ukazuje na pojačani imunološki odgovor *opr3* i *coi1* linija.

4.4.2. Jasmonska kiselina: koncentracija JA i ekspresija gena u listovima SA- i JA-deficijentnih biljaka

Jasmonati, kao klasa oksigeniranih lipidnih fitohormona, imaju ulogu u regulaciji biljnih razvojnih procesa i obrambenih reakcija (Wasternack & Song, 2017). Moja istraživanja su pokazala da se JA-Ile nakuplja u wt i *NahG* biljkama u kasnijoj fazi infekcije viroidom PSTVd, što ukazuje na ulogu JA u odgovoru na patogene. Dok kod *opr3* i *coi1* linija nije zabilježena značajnija promjena i koncentracije JA-Ile su niske jer bez funkcionalne JA signalizacije biljkama nedostaje mehanizam za aktivaciju obrambenih odgovora koji uključuju JA-Ile. Iz rezultata se može zaključiti da nakupljanje JA-Ile može biti povezano s manjom osjetljivosti na stres na temelju rezultata vdRNA, jer biljke s normalnim JA odgovorom (wt i *NahG*) akumuliraju JA-Ile, dok biljke koje nemaju funkcionalan JA put (*opr3* i *coi1*) ne pokazuju to nakupljanje. Ovo sugerira da JA signalizacija, a samim time i JA-Ile, ima ključnu ulogu u regulaciji otpornosti biljaka. Koncentracije *cis*-OPDA kod wt, *NahG* i *coi1* linija su podjednake te prikazuju blagi rast kod PSTVd inficiranih biljaka, dok linija *opr3* prikazuje značajniji rast u odnosu na ostale, posebno u 6 i 7 wpi.

Biljke divljeg tipa obično pokazuju snažno povećanje razine JA i JA-Ile nakon infekcije patogenima, što je bitno za aktiviranje obrambenih gena i putova. Na primjer, nakon infekcije s *P. syringae*, wt biljke pokazuju značajnu regulaciju gena za biosintezu JA, što dovodi do povećanih razina JA i JA-Ile, koji su važni za postizanje učinkovitog obrambenog odgovora (Sheard i sur., 2010). Brza akumulacija jasmonata u biljkama divljeg tipa (wt) uvelike se razlikuje od transgeničnih biljaka, kod kojih je ova regulacija poremećena zbog genetskih modifikacija koje utječu na biosintezu jasmonata ili signalne putove povezane s jasmonatom. U prethodnim istraživanjima na liniji neosjetljivoj na JA-Ile, *coi1*, pokazuje promijenjene razine ovih jasmonata tijekom infekcije *Arabidopsis* biljaka patogenom *P. syringae*, kao što su smanjena ekspresija obrambenih gena i povećana osjetljivost na patogene, unatoč tome što su prisutne niske razine JA i JA-Ile (Kloek i sur., 2001). U istraživanjima na *NahG Arabidopsis* biljkama pokazano je da je međudjelovanje između JA i SA bitno za uravnoteženje obrambenih reakcija biljaka (Spoel i sur., 2003). U *NahG* biljkama nedostatak SA može rezultirati

prekomjernom aktivacijom JA-signalnog puta, što potencijalno može rezultirati promijenjenim koncentracijama JA i JA-Ile tijekom napada patogena.

Moje istraživanje pokazalo je da infekcija PSTVd inducira ekspresiju gena za biosintezu jasmonata (JA), kao što su *LOX*, *OPR3* i *JAR1* što prethodi nakupljanju *cis*-OPDA i JA-Ile u listovima biljaka krumpira divljeg tipa, SA-deficijentnim *NahG* biljkama te JA-neosjetljivim *coi1* biljkama. Regulacija biosinteze JA u biljkama krumpira linije *opr3* bila je poremećena, vidljiva je smanjena ekspresija za te navedne gene, što ukazuje na oslabljenu biosintezu jasmonata (Pieterse i sur., 2012). Slična istraživanja pokazala su da infekcija biljaka krumpira i *S. laxum* viroidom PSTVd izaziva aktivaciju gena uključenih u biosintezu JA, uz nakupljanje JA u kasnijoj fazi infekcije (Milanović i sur. 2019a, 2019b). Pojačanje ekspresije gena za biosintezu JA-Ile u ovim biljkama povezano je s povećanjem razine JA-Ile. U istraživanju na *Arabidopsis* biljkama tretiranih s NaCl razine JA-Ile u korijenu povećale su se približno sedam puta, što je bilo povezano i sa indukcijom gena u signalnom putu JA i JA-Ile (Thurrow i sur., 2020).

Pojačana ekspresija gena za transkripcijski faktor MYC2, koji je glavni regulator JA-signalnog puta i ima ulogu u regulaciju fizioloških biljnih procesa i specijalizirane sinteze metabolita (Luo i sur., 2023) kao i određenih JA-ovisnih gena povezanih s obranom, sugerira aktivaciju JA-signalnog puta nakon infekcije PSTVd kod wt i posebno kod *opr3* biljaka. Izrazito pojačana ekspresija MYC2 gena u 6 wpi kod linije *opr3* može biti povezana s pojačanom ekspresijom gena za peroksidazu (POX12). Na primjer, pojačana ekspresija MYC2 u biljci čaja *Camellia sinensis* cv. Shuchazao nakon osmotskog stresa rezultirala je povećanjem sadržaja JA i peroksidazne aktivnosti (Zhu i sur., 2024). Kod *coi1* biljkaka vidimo smanjenu ekspresiju gena MYC2, što je očekivano. U normalnim uvjetima, COI1 posreduje u razgradnji JAZ proteina, koji djeluju kao represori MYC2, a kada je COI1 nefunkcionalan, JAZ proteini ostaju stabilni i nastavljaju potiskivati MYC2, sprječavajući njegovu ekspresiju i aktivaciju nizvodnih gena uključenih u JA-posredovane odgovore (Devoto i sur., 2005; Luo i sur., 2023). Podaci o transkriptomima drugih biljaka zaraženih viroidima pokazali su da infekcija ovim nekodirajućim patogenima utječe na ekspresiju gena koji su uključeni u biosintezu i prijenos signala u kojem sudjeluje JA, a da je regulacija ovih gena ovisna o interakciji viroida i domaćina (Joubert i sur., 2022). Tako je utišavanje gena *LOX* uočeno u biljkama rajčice inficiranim s PSTVd (Więsyk i sur., 2018) (Więsyk i sur., 2018), a ekspresija gena *JAR1* je

bila pojačana u osjetljivom kultivaru rajčice, a utišana u tolerantnom kultivaru (Owens i sur., 2012b; Więsyk i sur., 2018).

Promjena u JA signalizaciji ima značajan utjecaj na osjetljivost biljaka na PSTVd. Biljke koje nemaju funkcionalan JA signalni put, poput *opr3* i *coi1* mutanata, pokazuju smanjene razine JA i JA-Ile, što dovodi do slabijeg obrambenog odgovora i povećane osjetljivosti na PSTVd infekciju vidljivu kroz rezultate vdRNA, u odnosu na biljke divljeg tipa. Ovi nalazi podupiru hipotezu da JA signalizacija, uključujući JA-Ile, igra ključnu ulogu u regulaciji otpornosti biljaka na viroidne patogene. Osim toga, ekspresija *PR-2* i *PR-Q* gena bila je snažnija u *opr3* i *coi1* linijama nego u biljkama divljeg tipa, što sugerira da postoji aktivacija obrambenih odgovora u tim linijama, neovisna o JA. JA signalizacija funkcionalno aktivira PR proteine koji imaju antimikrobno djelovanje, a koji mogu izravno inhibirati rast patogena ili potaknuti otpornost biljaka na naknadne infekcije (Ali i sur., 2018). Konkretno, JA signalizacija inducira ekspresiju nekoliko PR proteina, uključujući *PR-1*, *PR-2* i *PR-5*, koji su ključni za obranu biljaka protiv različitih patogena (Ali i sur., 2018). Ovi nalazi podupiru važnost JA signalizacije u regulaciji ekspresije gena koji su ključni za bazalnu obranu biljaka, uključujući zaštitu od viroidnih i drugih patogena.

4.4.3. Auksini, ABA i BR: koncentracija hormona i ekspresija gena u listovima SA- i JA-deficijentnih biljaka

Aux/IAA proteini imaju ulogu u auksinskoj signalizaciji kao negativni regulatori ekspresije gena, pri čemu njihova stabilnost ovisi o koncentraciji AUX. Pri niskim razinama AUX, ovi proteini inhibiraju ekspresiju gena koji reagiraju na AUX putem interakcije s ARF - faktorima odgovora na AUX (Tiwari i sur., 2001). Na primjer, ARF8, član obitelji ARF faktora, regulira učinke AUX na rast i razvoj biljaka, pri čemu je njegova ekspresija pod strogom kontrolom razina AUX, a aktivnost ovisi o interakcijama s Aux/IAA proteinima koji potiskuju auksinsku signalizaciju (Tiwari i sur., 2001). Moje istraživanje pokazalo je da je pojačana ekspresija *ILR1* i *ARF8* gena u korelaciji s privremenim nakupljanjem IAA u 5 do 6 wpi kod wt i *NahG* biljaka, što ukazuje na pojačan metabolizam AUX i prijenos signala u kojima sudjeluje AUX u odgovoru na infekciju PSTVd. Kod linija *opr3* i *coi1* uočena je smanjena ekspresija *ARF8* gena, dok je ekspresija *ILR1* gena pojačana kroz sve tjedne što ukazuje na to da utišavanje JA puta može dovesti do promjena u homeostazi auksina, što može naknadno utjecati na ekspresiju *ARF8*. Na primjer, ako je JA-signalni put ugrožen, povratni mehanizmi koji reguliraju

biosintezu i transport AUX mogu se promijeniti, što potencijalno dovodi do smanjene razine AUX i, posljedično, smanjene ekspresije *ARF8*. Protein COI1 kritična je komponenta JA-signalnog puta, a njegov nedostatak u *coi1* biljkama može dovesti do značajnih promjena u ekspresiji gena uključenih u JA i AUX signalizaciju. Na primjer, COI1-ovisni JA-signaling regulira ekspresiju različitih gena uključenih u sintezu sekundarnih metabolita i obrambene odgovore, što može neizravno utjecati na ekspresiju *ARF8* i drugih gena povezanih s AUX (Devoto i sur., 2005). Ovo sugerira da je međuigra (*crosstalk*) između JA i auksinske signalizacije složena i može dovesti do različitih obrazaca ekspresije *ARF8* u mutantima *coi1* u usporedbi s biljkama divljeg tipa.

U inficiranim *opr3* biljkama MapMan analizom uočeni su pojačano eksprimirani geni povezanim s AUX, dok je kod ostalih testiranih linija ekspresija gena povezanih s AUX smanjena. JA i AUX pokazuju antagonističke funkcije tijekom obrane biljaka (Pieterse i sur., 2012). U normalnim uvjetima, JA inhibira signalizaciju AUX kao dio obrambenog odgovora na patogene, međutim, u *opr3* biljkama, gdje je signalizacija JA oslabljena, dolazi do pojačane aktivacije puteva povezanih s AUX. To može dovesti do povećane osjetljivosti biljaka na patogene jer visoke razine AUX potiču rast stanica, što olakšava invaziju patogena, a smanjuje sposobnost biljke da aktivira obrambene odgovore posredovane JA (Mazonni-Putman i sur., 2021). S druge strane, smanjena signalizacija AUX može usporiti rast i razvoj biljke, potencijalno smanjujući mogućnost patogenog napada, ali i negativno utjecati na vitalnost biljke, uključujući usporavanje oporavka od infekcije (Mazonni-Putman i sur., 2021). Stoga, ravnoteža između JA i AUX signalizacije može biti ključna za pravilnu reakciju biljke na stres uzrokovan infekcijama poput PSTVd.

ABA ima dvojaku ulogu u obrani biljaka protiv virusa, pokazujući i pozitivne i negativne učinke (Alazem & Lin, 2015). Analiza u ovom istraživanju je pokazala diferencijalnu ekspresiju gena koji su regulirani s ABA, uključujući *CYP707A1* (gen koji kodira ABA hidroksilazu, i uključen je u inaktivaciju hormona ABA) (Yasuda i sur., 2025) i *PYL4* (gen koji kodira PYR1-like 4 protein, receptor za ABA). Nakupljanje ABA, kao i ekspresija gena uključenih u ABA signaling su pojačani u linijama *NahG*, *opr3* i *coi1* u odnosu na wt što ukazuje da su biljke bez SA i JA osjetljivije i više izložene stresu, u odnosu na wt biljke. Iako promjene u sadržaju ABA nisu bile statistički značajno različite u inficiranim biljkama u usporedbi s kontrolnim biljkama, uočeno je privremeno nakupljanje ABA u *NahG*, *opr3* i *coi1*

biljkama tijekom 4 wpi, što bi moglo biti povezano s njihovom većom osjetljivošću na različite oblike stresa.

BR su sterolni fitohormoni koji potiču otpornost ili toleranciju biljaka na različite viruse, neovisno o signalizaciji putem SA (Alazem & Lin, 2015). U ovom istraživanju otkriveno je da infekcija viroidom PSTVd aktivira ekspresiju gena za biosintezu BR, poput gena *DWF4*, u biljkama divljeg tipa, *NahG* te *coi1* biljaka. Nadalje, ekspresija gena *ROT3* je pojačana kod wt biljaka u kasnijim fazama što je u skladu s povećanjem nakupljanja CS u biljkama divljeg tipa (ova studija) kao i prethodno provedenim istraživanjima na biljkama krumpira inficiranim s PSTVd (Milanović i sur., 2019b). Kod *NahG* biljaka imamo slabiju aktivaciju *ROT3* gena, no nakupljanje CS je značajnije kod *NahG* biljaka u odnosu na biljke divjeg tipa. U pokusu s JA-transgeničnim biljkama pojačana ekspresija gena *ROT3* dovela je do nešto značajnijeg nakupljanja CS kod wt biljaka, za razliku od *opr3* i *coi1* transgeničnih linija kod kojih vidimo nižu koncentraciju CS i slabiju ekspresiju gena *ROT3*. Ova dinamika ukazuje na složene interakcije između različitih signalnih puteva, uključujući BR puteve koji su povezani s regulacijom razvoja biljke i otpornosti na stres (Vriet i sur., 2012).

BR povećavaju toleranciju biljaka na patogene poticanjem proizvodnje ROS i aktivacijom antioksidativnog sustava (Deng i sur., 2016). BR, kao i JA, potiču sintezu prekursora lignina i fenolnih kiselina, što doprinosi jačanju stanične stijenke i obrambenih mehanizama (Han i sur., 2023). U ovom istraživanju otkrili smo da je kod JA-deficijentnih i JA-neosjetljivih biljaka smanjena akumulacija BR, odnosno CS, praćena i smanjenom proizvodnjom H_2O_2 , dok je povećano nakupljanje CS u *NahG* biljkama inficiranim s PSTVd praćeno povećanom proizvodnjom H_2O_2 , što sugerira da bi aktivacija BR signalizacijskog puta mogla biti alternativni obrambeni mehanizam kod SA-deficijentnih biljaka krumpira tijekom viroidne infekcije (Zhang i sur., 2015).

4.4.4. PSTVd infekcija mijenja sadržaj fitohormona u gomoljima SA- i JA-deficijentnih biljaka

U ovom istraživanju uočene su promjene na gomoljima u vidu njihovog oblika, boje i mase. Gomolji svih linija biljaka inficirani s PSTVd su bili manji, izduženijeg oblika i svijetlije boje, u odnosu na odgovarajuću kontrolu, odnosno neinficiranu biljku. Osim toga, zabilježena je značajna razlika u ukupnoj masi gomolja, naročito u kasnijim fazama (7 i 8 wpi). U prethodnim

istraživanjima opisani su simptomi na gomoljima krumpira zaraženim PSTVd-om, uključujući promjenu oblika od zaobljenog do izduženog, bez značajnih promjena u veličini u usporedbi s nezaraženim biljkama. Ovaj učinak postaje izraženiji u kasnijim fazama infekcije, kada su primijećene dublje 'oči' i kvržice na gomoljima (Katsarou i sur., 2016). Osim toga, zaraženi gomolji su pokazivali svjetliju smeđu boju pokožice u odnosu na kontrolne biljke (Katsarou i sur., 2016), kao što je vidljivo i u ovom istraživanju.

Koncentracije JA i JA-Ile u gomoljima biljaka divljeg tipa (wt) u ovom istraživanju su niže nego u listovima, no opet su značajno povišene u prisutnosti PSTVd, što ukazuje na sustavno povećanje sadržaja endogene JA u gomoljima inficiranih biljaka, u odnosu na kontrolne biljke, što je u skladu s prethodnim istraživanjima na biljkama krumpira inficiranim s PSTVd (Milanović i sur. 2019b). Osim toga, značajno povećanje koncentracije JA i JA-Ile vidljivo je u 7 i 8 wpi za PSTVd inficirane biljke *NahG* linije. Koncentracija SA u gomoljima su značajno povišene u inficiranim u odnosu na kontrolne wt biljke, što sugerira da nakupljanje SA ima važnu ulogu u obrani, ne samo u nadzemnim dijelovima biljke nego i u podzemnim organima (Vlot i sur., 2009). Transgenične linije *opr3* i *coi1* pokazuju slične trendove u gomoljima kao u listovima, s nižom bazalnom koncentracijom JA i njenih derivata (JA-Ile i *cis*-OPDA) i SA, te slabijim nakupljanjem ovih hormona nakon infekcije s PSTVd, što ukazuje na veću osjetljivost tih biljaka na stres u nedostatku funkcionalnog JA-signalnog puta (Devoto & Turner, 2005).

Analiza sadržaja fitohormona u tkivu gomolja krumpira u razdoblju od 4 do 8 wpi u ovom istraživanju pokazala je varijacije u rezultatima koje su vjerojatno povezane s prirodnim procesima rasta gomolja, jer fitohormoni imaju i ulogu u regulaciji osnovnih razvojnih procesa, kao što su tuberizacija i rast gomolja. U početnim fazama infekcije, promjene u razini fitohormona mogu biti rezultat fizioloških procesa vezanih uz rast gomolja, dok su specifični učinci PSTVd-a na sadržaj fitohormona postali izraženiji tek u kasnijim fazama infekcije. Moguće rješenje za bolje razumijevanje tih promjena bilo bi provođenje analize u kasnijim fazama razvoja, kada su gomolji zreliji, čime bi se smanjila statistička varijabilnost. Takva analiza mogla bi pružiti bolji uvid u biološku ulogu nakupljanja fitohormona tijekom razvoja simptoma vretenastog gomolja, specifičnih za PSTVd infekciju.

4.5. Učinci egzogenog tretmana INA ili MeJA na obrambene odgovore u interakciji krumpira i PSTVd

4.5.1. Učinak INA na ekspresiju gena u wt i SA-deficijentnim linijama krumpira u interakciji krumpir-PSTVd

Egzogeni tretmani salicilnom kiselinom (SA) i njenim derivatima poznati su po svojoj sposobnosti da induciraju lokalnu i sistemsku senzibilizaciju biljnih stanica, čime se ubrzava i pojačava induciranje obrambenih odgovora protiv patogena što u konačnici rezultira povećanom otpornošću biljaka na abiotiski i biotski stres u usporedbi s nesenzibiliziranim biljkama (Martínez-Aguilar i sur., 2016). INA, kao stabilan analog SA, učinkovito aktivira obrambene mehanizme biljke, smanjujući replikaciju viroida i time olakšavajući kontrolu infekcije (López-Gresa i sur., 2016; Urban i sur., 2022).

U provedenom istraživanju, dio ispitivanih biljaka bio je tretiran s egzogenom INA, što je provedeno u dva navrata: jedan dan prije inokulacije i 6 dana nakon PSTVd inokulacije. Vrijeme primjene egzogenog tretmana je važno pa tako primjena SA prije inokulacije može pojačati otpornost biljaka na predstojeći stres (Baebler i sur., 2011), dok se tretman nakon inokulacije pokazao dobar za sprječavanje replikacije patogena i njihovog širenja unutar domaćina (López-Gresa i sur., 2016). Dvokratni tretman primjenjen je s ciljem postizanja pojačane učinkovitosti INA kod indukcije SAR-a.

Ovo istraživanje pokazalo je da je INA tretman imao pozitivan učinak na rast biljaka, posebice na razlike u visini tretiranih inficiranih *NahG* biljaka u odnosu na netretirane inficirane *NahG* biljke. Biljke tretirane s INA imale su svjetlije listove, dok su netretirane inficirane *NahG* biljke prve počele razvijati simptome (klorotične donje listove, tamnije vrhove listova). Također, uočeno je da je prosječna svježa masa vrhova listova veća u tretiranih nego u netretiranih biljaka (mock i inficiranih).

Osim toga, INA tretman je usporio nakupljanje viroidne RNA i odgoditi razvoj simptoma u *NahG* biljkama krumpira inficiranim s PSTVd. Rezultati ovog istraživanja snažno upućuju na to da je velika osjetljivost *NahG* biljaka krumpira posljedica nedostatka SA, budući da se može oslabiti tretmanom INA-om. Osim toga, tretman INA-om također je usporio nakupljanje viroida u divljem tipu krumpira, ali u manjoj mjeri nego u *NahG* biljkama, što sugerira da INA ima sposobnost zaštite krumpira od PSTVd. Međutim, zaštitni učinak INA se s vremenom

smanjivao. Slično tome, tretman BTH-om privremeno je smanjio širenje CEVd-a u biljkama *NahG* rajčice, ali nije spriječio daljnje širenje sistemske infekcije (López-Gresa i sur., 2016).

Aktivacija gena povezanih s biosintezom SA (*ICS*, *PAL9*) bila je smanjeno eksprimirana kod svih linija. INA djeluje na mjestu signalizacije posredovane SA nizvodno od biosinteze SA. Kod *Arabidopsisa*, indukcija otpornosti na bolesti pomoću INA zahtijeva signalni put posredovan SA i *NPR1*, ali ne i JA ili ET (Xue i sur., 2017; Yun i sur., 2024). Pokazali smo da tretman INA-om povećava ekspresiju gena uključenih u SA-signalni put i nizvodne obrambene odgovore. Rezultati ekspresije gena dobiveni u ovom istraživanju ukazuju na to da INA tretman potiče snažnu aktivaciju gena uključenih u signaling SA (*SCMT*, *NPR1*, *NPR3*, *SARD*) u wt i *NahG* biljkama, 2 do 6 tjedana nakon inokulacije viroidom. Suprotno tome, u netretiranim wt i *NahG* biljkama do aktivacije SA-povezanih gena dolazi tek u 6 wpi.

Sistemska otpornost potaknuta s INA pokazala je pojačanu ekspresiju gena PR proteina i povezanih obrambenih odgovora u različitim biljnim vrstama (Dann i sur., 1996; Bostock i sur., 2001). INA učinkovito oponaša učinke SA, potičući ekspresiju gena povezanih s obranom, poput PR proteina (β -1,3-glukanaza i hitinaza). Ekspresija *PR* gena u ovom istraživanju u svim INA tretiranim inficiranim linijama pokazala je jaču aktivaciju u odnosu na netretirane inficirane linije. Netretirane inficirane biljake wt linije pokazuju slabiju aktivaciju PR proteina u 6 wpi, dok inficirane *NahG* linija ima snažniju aktivaciju gena vezanih uz PR proteine već u 4 wpi. Rezultati ukazuju na to da SA ima važnu ulogu u regulaciji ekspresiji *PR* gena i odgovora biljaka krumpira na patogen PSTVd.

INA je također povećala ekspresiju nekih gena povezanih s AUX i BR, pojačala ekspresiju JA biosintetskih gena, što je u skladu s učincima egzogenog tretmana SA na biljke krumpira (Zheng i sur., 2020). S druge strane, INA je povećala ekspresiju gena za biosintezu JA (*LOX3*, *LOX6*, *OPR3*) i JA signalizaciju (*JAR1*, *COI1*, *JAZ1*), na što ukazuje pojačano regulirana ekspresija gena *JAZ1* i smanjena ekspresija *MYC2* u biljkama zaraženim PSTVd oba testirana genotipa krumpira. SA-inducirani *NPR1* ne samo da orkestrira imunološki odgovor kroz aktivaciju gena reguliranih s SA gena, već također djeluje kao korepresor gena reguliranih s JA, kao što je *MYC2*, što utječe na modulaciju ekspresije nizvodnih JA-induciranih gena/proteina (Nomoto i sur., 2021).

Ekspresija većine gena koji kodiraju peroksidaze bila je promijenjena u wt i *NahG* linijama nakon INA tretmana. INA tretman povećava ekspresiju gena za peroksidaze u inficiranim i

neinficiranim wt biljkama, što je u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja koja su pokazala indukciju POD gena tretmanima SA (Almagro i sur., 2009; Baebler i sur., 2014). Ovi rezultati ukazuju da su peroksidaze bitne komponente imunološkog odgovora krumpira na infekciju PSTVd, a njihova ekspresija usko je povezana s koncentracijom endogene SA. Istraživanjem se uočila aktivacija *LiP* u wt i *NahG* biljkama tretiranih INA. Ove peroksidaze imaju ulogu u sintezi lignina, gdje H_2O_2 -posredovane reakcije formiraju križne veze između lignina, suberina i drugih komponenti stanične stijenke, stvarajući fizičku barijeru protiv patogena (Baebler i sur., 2014; Li i sur., 2022b; Pandey i sur., 2017).

Porast ekspresije peroksidaza je dio bazalnog odgovora i rezultati ukazuju na pozitivan učinak egzogenog tretmana INA na modulaciju ekspresije peroksidaza i odgovoru na oksidativni stres infekcije PSTVd. Pojačana ekspresija gena peroksidaza rezultirala je smanjenjem sadržaja H_2O_2 u INA-tretiranim u usporedbi s netretiranim inficiranim *NahG* biljkama, 2 i 6 wpi, što ukazuje na antioksidativni učinak INA na inficirane *NahG* biljke. Suprotno tome, pojačana ekspresija gena peroksidaza u INA-tretiranim divljim tipovima biljaka korelira s privremenim povećanjem sadržaja H_2O_2 (2 do 4 wpi).

Proteini MAPK imaju ulogu u prijenosu signalnih informacija vezanih uz obrambeni odgovor biljaka na patogene (Jagodzick i sur., 2018; Sun & Zhang, 2022). U wt i *NahG* ispitanim linijama ekspresija *MAPK3* i *MPK7* je porasla nakon INA tretmana, dok je ekspresija *MPKK6* i *MAPK4* smanjena u odnosu na netretirane linije. Ekspresija *MAPK3* inducirana je INA tretmanom u liniji biljaka divljeg tipa, što je u skladu s istraživanjem koje pokazuje da SA može aktivirati *MAPK3* (Zhang & Klessig, 1997).

Pojačana ekspresija WRKY transkripcijskih faktora, poput *WRKY6*, dodatno ukazuje na uključenost ovih signalnih puteva u posredovanje obrambenih odgovora biljaka (Naoi i sur., 2020). Kod *Arabidopsisa*, *WRKY6* pozitivno regulira aktivnost promotora *PR-1* gena, povezanog sa senescencijom i obrambenim odgovorom na patogene, vjerojatno posredstvom NPR1 (Lv i sur., 2016; Robatzek & Somssich, 2002). Ovi podaci su usklađeni s prethodnim istraživanjima koja su pokazala značajnu pojačanu ekspresiju *WRKY* gena povezanih sa SA- i JA- signalnim putevima u rajčici inficiranoj s PSTVd (Suzuki i sur., 2019; Więsyk i sur., 2018) te CBCVd-inficiranom hmelju (Nath i sur., 2019). Aktivacija *WRKY6* putem INA i SA može dodatno pojačati obrambene odgovore biljaka na infekcije te smanjiti osjetljivost.

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju sugeriraju da INA-posredovana aktivacija SA i MAPK signalizacije, ROS-a i PR proteinskog odgovora, te INA-posredovana represija JA-signalnog puta doprinosi povećanju tolerancije krumpira na PSTVd.

4.5.2. Učinak MeJA na ekspresiju gena u wt i JA-deficijentnim i JA-neosjetljivim linijama krumpira u interakciji krumpir-PSTVd

Primjena egzogenog MeJA ispitana je kako bismo dobili odgovor na pitanje o tome je li povećana osjetljivost transgeničnih biljaka (*opr3* i *coi1*) na PSTVd povezana s njihovom nesposobnošću da nakupljaju JA. Egzogeni tretman s MeJA proveden je u dva navrata: jedan dan prije inokulacije i 6 dana nakon PSTVd inokulacije. Istraživanja drugih autora ukazuju na to da MeJA tretiranje biljaka jedan dan prije inokulacije može inducirati lokalnu i sistemsku senzibilizaciju biljnih stanica, pojačavajući njihovu spremnost za odgovor na napade patogena (Zhang i sur., 2023). Slično, primjena MeJA 6 dana nakon inokulacije pokazala je povećanje nakupljanja spojeva povezanih s obranom, dodatno jačajući obrambene mehanizme biljke (Dorado i sur., 2025).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su MeJA tretirane biljke općenito pokazivale manje izražene simptome infekcije, ali wt PSTVd inficirane MeJA tretirane biljke pokazale su značajno smanjenje simptoma, uključujući veći rast, šire lisne plojke i manje dignute listove, što ukazuje na pozitivno djelotvoran učinak MeJA tretmana na suzbijanje simptoma infekcije. MeJA tretman nije doveo do značajnog poboljšanja u rastu stabljike i listova inficiranih biljaka *opr3* i *coi1* linije, što je očekivano jer *coi1* biljke nisu osjetljive na JA (svojevrсна negativna kontrola u pokusu). Nadalje, istraživanje je pokazalo da MeJA tretman gotovo da nije imao učinak na akumulaciju viroidne RNA u inficiranim wt i *opr3* biljkama. Iznenadujuće, MeJA tretman je smanjio nakupljanje viroida u tretiranim u odnosu na netretirane inficirane *coi1* biljke od 2 do 5 wpi, iako ne statistički značajno, što ukazuje na to da *coi1* biljke nisu sasvim neosjetljive na jasmonate. Ovaj rezultat podržava hipotezu da JA signalizacija ima ulogu u regulaciji odgovora na infekciju viroidima.

Nakon MeJA tretmana, u ranoj fazi infekcije PSTVd u biljkama divljeg tipa, zabilježena je smanjena ekspresija gena uključenih u biosintezu (*LOX3*, *LOX6*, *OPR3*) i signalizaciju (*JAR1*, *COI1*, *JAZ1*, *MYC2*) JA, u odnosu na inficirane biljke bez tretmana. Slično, istraživanje s JA tretmanom na biljkama krumpira inficiranim patogenom *P. infestans*, dovelo je do aktivacije

gena uključenih u prijenos signala posredovan s JA 12 sati nakon tretmana, a sam tretman je rezultirao boljom tolerancijom biljaka na infekciju (Yang i sur., 2022). Kod *opr3* linije biljaka, MeJA tretman djelomično nadoknađuje nedostatak endogene biosinteze jasmonata, budući da egzogena JA inducira gene poput *JAR1* i *COI1*, što rezultira aktivacijom JA signalizacije koja se dogodila ranije (4 wpi) nego u biljkama bez tretmana (6 wpi). 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. Biljke linije *coi1* pokazuju smanjenu ekspresiju većine gena povezanih s JA, posebno u kasnijim tjednima. Rezultati kod *coi1* biljaka su slični onima dobivenim bez MeJA tretmana iz čega bi se mogao izvući zaključak da MeJA tretman nema učinak na biljke linije *coi1*.

Predtretman s MeJA često je povezan s aktivacijom obrambenih puteva, što dovodi do sinteze zaštitnih spojeva koji pomažu smanjiti replikaciju patogena i poboljšati kontrolu infekcije u usporedbi s nesenzibiliziranim biljkama (Li i sur., 2018; Nahar i sur., 2011). Ekspresija PR-gena nije značajno smanjena u MeJA tretiranim PSTVd inficiranim biljkama u odnosu na netretirane inficirane biljke. Ekspresija *PR-1* i *PR-2* gena izgleda nije regulirana s JA, međutim, JA može modulirati ekspresiju nekih drugih *PR* gena kao npr. peroksidaze.

Sposobnost MeJA da pojača obrambene odgovore biljaka dobro je prikazana u istraživanjima koja pokazuju da može dovesti do povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima, poput katalaze i askorbat peroksidaze, koji su vitalni za detoksikaciju ROS generiranih tijekom napada patogena (Yang i sur., 2012). U ovom istraživanju, egzogeni MeJA tretman potisnuo je ekspresiju gena *CAT2* kod *wt* i *coi1*, ali je inducirao ekspresiju gena *APX1* u *wt* i *opr3* PSTVd inficiranim biljkama krumpira u odnosu na netretirane inficirane biljke. Prethodno istraživanje na biljkama krumpira pokazalo je da u prisutnosti patogena *Phytophthora infestans* primjena MeJA tretmana pojačava antioksidativni kapacitet, odnosno aktivnost CAT (Yang i sur., 2022). Također, primjena MeJA je povezana s povećanom aktivnošću CAT, kao i APX, u biljkama rajčice nakon infekcije nematodama, u odnosu na netretirane biljke (Bali i sur., 2020). U istraživanju na rajčici inficiranoj gljivicom *Fusarium oxysporum*, biljke divljeg tipa imale su pojačanu, a JA-neosjetljive biljke (*coi1*) slabiju ekspresiju gena za antioksidacijske enzime, uključujući gen *APX* (Kadam & Barvkar, 2024).

Rezultati ukazuju na to da je tretman s MeJA kratkotrajno umanjio nedostatak JA u *opr3* liniji i potaknuo raniju aktivaciju gena za peroksidaze. Ranija aktivacija ekspresije gena uključenih

u metabolizam H_2O_2 koincidirala je sa smanjenjem sadržaja H_2O_2 u tretiranim inficiranim *opr3* biljkama (Lulić, 2024). Rezultati ove studije potvrdili su uključenost JA u odgovor na PSTVd i regulaciju statusa H_2O_2 tijekom odgovora biljaka krumpira na infekciju viroidom PSTVd. (Li i sur., 2022a; Teng i sur., 2023).

U inficiranim *coi1* biljkama, ekspresija *POD* i *LiP* gena blago se povećava nakon MeJA tretmana. U wt biljkama, MeJA tretman dovodi do smanjene ekspresije *POD* i *LiP* u odnosu na nentretirane biljke. Primjena MeJA u biljkama krumpira inficiranim gljivicom *P. infestans* rezultirala je transkripcijskom aktivacijom gena *POD* u početnoj fazi infekcije i pojačanom otpornosti krumpira (Yang i sur., 2022), što je također u skladu s rezultatima ovog istraživanja.

POX12 pripada klasi III peroksidaza iz superobitelji biljnih hem-ovisnih peroksidaza. Zabilježeno je da su peroksidaze klase III uključene u odgovor biljaka na napad patogena i u proizvodnji ROS-a tijekom početne faze oksidativne reakcije (Hemetsberger i sur., 2012). MeJA tretman uzrokovao je smanjenu ekspresiju gena *POX12* u kasnoj fazi infekcije u wt biljkama. U *opr3* i *coi1* linijama nije vidljiva značajnija promjena u ekspresiji *POX12*. 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). Bez obzira na statusu endogene JA i prijenosa signala u kojem sudjeluje JA, aktivacija *POX12* također je stimulirana u PSTVd inficiranim, što upućuje na zaključak da infekcija viroidom aktivira ekspresiju gena *POX12* neovisno o putu prijenosa signala u kojem sudjeluje JA. MeJA predtretman stoga nije imao učinak na promjenu ekspresije *POX12* u *coi1* PSTVd inficiranim biljkama.

Tretman s MeJA potaknuo je raniju aktivaciju gena za MAPK u PSTVd inficiranim *opr3* biljkama u odnosu na netretirane PSTVd inficirane *opr3* biljke. Ekspresija *MAPK* gena u PSTVd inficiranim wt biljkama bila je utišana nakon MeJA tretmana što ukazuje na moguću povezanost MeJA (JA) i MAPK signalnih puteva, s naglaskom na negativnu regulaciju MAPK signalnih puteva posredovanu JA. U tretiranim PSTVd inficiranim *coi1* biljkama ekspresija *MAPK* gena ostala je uglavnom nepromijenjena, s izuzetkom prolazne aktivacije MAPK3 i MAPK4 (ne u isto vrijeme) kod netretiranih biljaka, što sugerira da *coi1* biljke nisu u potpunosti neosjetljive na MeJA. Jedan od razloga izostanka potpune neosjetljivosti biljaka *coi1* na MeJA moglo bi biti nepotpuno utišavanje gena *COI1* jer u krumpiru ima više alela (Halim i sur., 2009).

Analizirani su i geni uključeni u biosintezu (*ICS* i *PAL9*) i signalizaciju SA (*NPR1* i *SARD1*). Nakon MeJA tretmana, kod wt PSTVd inficiranih biljaka ekspresija *ICS*, *NPR1* i *PAL9* gena je smanjeno eksprimirana u odnosu na netretirane biljke, dok *SARD1* ima identičnu ekspresiju kod oba tretmana. Kod *opr3* MeJA tretiranih biljaka uočavamo raniju pojačanu ekspresiju *SARD1*, *NPR1* i *PAL9*, dok u *coi1* biljakama ekspresija gena uključenih u SA-signalni put i biosintezu ostaje nepromijenjena. Rezultati upućuju na to nakon tretmana s MeJA biljke prilagođavaju (smanjuju) ekspresiju gena za biosintezu JA i tako reguliraju ukupno dostupne jasmonate u tkivu listova, što može pozitivno utjecati na pojačavanje prijenosa signala u kojima sudjeluje SA. Rezultati ukazuju na to da MeJA tretman nije doveo do značajnijih promjena u regulaciji SA-gena.

5. ZAKLJUČCI

Interakcija između PSTVd viroida i biljaka domaćina predstavlja dinamičan i složen proces koji duboko utječe na fiziologiju, genetiku i obrambene mehanizme biljaka. Infekcija PSTVd uzrokuje značajne promjene u biljkama krumpira, uključujući oksidativni stres, akumulaciju H_2O_2 i kaloze te promjene u ekspresiji gena uključenih u obrambene reakcije. Ovi mehanizmi ukazuju na aktivaciju bazalnog odgovora na biotski stres kod krumpira.

Utvrđen je mali postotak zajedničkih diferencijalno eksprimiranih gena (DEG) između divljeg tipa i SA-deficijentnih *NahG* biljaka, kao i između biljaka divljeg tipa, *opr3* i *coi1*. Navedeni rezultati ukazuju na specifičnost transkriptomskih odgovora u kontekstu PSTVd infekcije, povezano s regulacijom SA i JA.

Funkcionalne GO i KEGG analize pokazale su utišanu ekspresiju gena povezanih s fotosintezom i procesima povezanim s tilakoidima i kloroplastima, a pojačanu ekspresiju gena uključenih u procese povezane s odgovorom na hormone, aktivaciju procesa popravka DNA i transkripcije mRNA, te katalitičkom i aciltransferaznom aktivnošću u inficiranim u odnosu na neinficirane biljke. Ovi procesi povezani su s interakcijama između biljke i patogena, prijenosom hormona te biosintezom sekundarnih metabolita koji igraju ključnu ulogu u obrambenom odgovoru biljke.

Transgenične linije deficijentne u SA (*NahG*) i JA (*opr3* i *coi1*) pokazale su različit stupanj osjetljivosti na PSTVd infekciju u odnosu na biljke divljeg tipa (wt). *NahG* linija je pokazala izraženije simptome i veću akumulaciju viroidne RNA, što ukazuje na važnost SA u obrambenom odgovoru. Nasuprot tome, *opr3* i *coi1* linije, deficijentne ili neosjetljive na JA, pokazuju brži porast akumulacije viroidne RNA u ranijim fazama infekcije, no ne dolazi do pojave izraženijih simptoma.

PSTVd infekcija u biljkama divljeg tipa (wt) izaziva značajan porast nakupljanja H_2O_2 , što ukazuje na snažan obrambeni mehanizam. Linije *opr3* i *coi1*, koje imaju smanjenu akumulaciju ROS, pokazuju sporiji razvoj simptoma u odnosu na wt biljke, što sugerira ulogu JA signalizacije u regulaciji enzima koji stvaraju i razgrađuju ROS.

U ranim fazama infekcije, wt biljke pokazuju porast ekspresije gena *POX12*, dok kasnije dolazi do indukcije gena *APX* i *LiP*, što upućuje na pokušaj jačanja staničnih stijenki i ograničavanja

širenja patogena. *NahG* biljke imaju smanjenu ekspresiju gena za peroksidaze, što dodatno ukazuje na ulogu ROS u obrambenom odgovoru na PSTVd infekciju.

Tijekom PSTVd infekcije, u wt i *NahG* biljkama dolazi do diferencijalne ekspresije gena koji kodiraju MAPK, uz pojačanu ekspresiju MAP kinaza i kalmodulinskih proteina u divljem tipu, što sugerira SA-ovisnu aktivaciju MAPK i Ca^{2+} signalnih puteva, ključnih za obrambene reakcije biljaka.

Kod *NahG* PSTVd-inficiranih biljaka zabilježeno je smanjeno nakupljanje kaloze u odnosu na wt biljke, što sugerira da nedostatak SA signalizacije oslabljuje obrambeni odgovor. INA tretman povećava nakupljanje kaloze, dok *NahG* biljke i dalje pokazuju smanjenje taloženja, ukazujući na ulogu SA signalizacije u regulaciji taloženja kaloze kao zaštite.

Nakupljanje kaloze bilo je smanjeno u *opr3* i *coi1* liniji u usporedbi s wt biljkama, što sugerira da JA signalizacija ima ulogu u sintezi kaloze. Tretman s MeJA nije imao značajan utjecaj na kalozu kod *coi1* linije.

Nakon PSTVd infekcije, razine SA i njegovih derivata nisu se značajno mijenjale, ali dolazi do aktivacije SA signaling u kasnoj fazi infekcije, usporedno s nakupljanjem viroidne RNA i pojavom simptoma. U *opr3* i *coi1* inficiranim i neinficiranim biljkama, koncentracije SA bile su više u nego u biljkama divljeg tipa, što sugerira kompenzacijsku aktivaciju SA signalizacije u nedostatku JA.

PSTVd infekcija izaziva nakupljanje JA-Ile u kasnijim fazama u biljkama divljeg tipa (wt) i *NahG*, dok u *opr3* i *coi1* linijama koncentracija JA-Ile ostaje niska. PSTVd infekcija inducira ekspresiju gena za biosintezu jasmonata, no kod *opr3* biljaka ta ekspresija je smanjena, što ukazuje na oslabljenu biosintezu jasmonata. Pojačana ekspresija MYC2 sugerira aktivaciju JA signalizacije u wt i *opr3* biljkama, dok je kod *coi1* smanjena zbog nefunkcionalnog COI1 receptora.

Pojačana ekspresija *ARF8* i *ILR1* gena u biljkama divljeg tipa sugerira pojačan metabolizam i signalizaciju AUX u odgovoru na PSTVd infekciju. U *opr3* i *coi1* linijama, smanjena ekspresija *ARF8* i povišena ekspresija *ILR1* ukazuju na to da inhibicija JA puta utječe na homeostazu auksina i ekspresiju *ARF8*.

Ekspresija ABA signalizacije bila je pojačana u linijama *NahG*, *opr3* i *coi1* u odnosu na wt, što sugerira da biljke bez SA i JA signalizacije imaju veću osjetljivost na stres.

Infekcija PSTVd viroidom aktivira ekspresiju gena za biosintezu BR, što dovodi do značajnog nakupljanja kastasterona (CS) u SA-deficijentnim *NahG* biljkama, ali ne u wt biljkama. U JA-transgeničnim *opr3* i *coi1* biljkama, ekspresija *ROT3* gena i nakupljanje CS je slabije nego u wt biljkama, nakon infekcije viroidom.

INA tretman ublažio je simptome i smanjio akumulaciju viroidne RNA u inficiranim *NahG* i wt biljkama.

Tretman INA-om povećava ekspresiju gena uključenih u SA signalizaciju, obrambene odgovore i PR proteine, te gena povezanim s AUX, BR i biosintezom JA. Također, potiče ekspresiju gena za peroksidaze, a učinak je jači na *NahG* liniju, što ukazuje na pozitivan učinak INA tretmana u modifikaciji odgovora na oksidativni stres tijekom PSTVd infekcije.

MeJA tretman nije značajno poboljšao rast stabljike i listova u inficiranim *opr3* i *coi1* biljkama, a nije imao značajan učinak na akumulaciju viroidne RNA u wt, *opr3* i *coi1* biljkama.

Nakon MeJA tretmana, u ranoj fazi infekcije, došlo je do smanjene ekspresije gena povezanih s biosintezom i signalizacijom JA u wt biljkama u odnosu na netretirane biljke. U *opr3* biljkama, MeJA je djelomično nadoknadio nedostatak biosinteze JA, te je došlo do ranije aktivacije JA signalizacije, u odnosu na biljke bez tretmana. Kod *coi1* biljaka, MeJA tretman nije imao značajan učinak.

Ovi rezultati ukazuju na ulogu fitohormona SA i JA u obrambenom odgovoru krumpira na viroidne infekcije, te sugeriraju potencijalnu primjenu egzogenih tretmana za poboljšanje otpornosti biljaka na patogene. Podaci ističu važnost ravnoteže između signala posredovanih SA i JA u odgovoru na PSTVd infekciju, a tretmani poput INA i MeJA mogu pomoći u smanjenju simptoma i kontroli infekcije.

6. LITERATURA

- Abreu, M. E., & Munné-Bosch, S. (2009). Salicylic acid deficiency in *NahG* transgenic lines and *sid2* mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 60(4):1261–1271. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern363>
- Adkar-Purushothama, C. R., & Perreault, J. P. (2019). Suppression of RNA-dependent RNA polymerase 6 favors the accumulation of potato spindle tuber viroid in *Nicotiana benthamiana*. *Viruses*, 11(4):345. <https://doi.org/10.3390/v11040345>
- Adkar-Purushothama, C. R., Zhang, Z., Li, S., & Sano, T. (2015). Analysis and application of viroid-specific small RNAs generated by viroid-inducing RNA silencing. *Methods in Molecular Biology*, 1236:135–169. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1743-3_12
- Afanasenko, O. S., Lashina, N. M., Mironenko, N. V., Kyrova, E. I., Rogozina, E. V., Zubko, N. G., & Khiutti, A. V. (2022). Evaluation of responses of potato cultivars to potato spindle tuber viroid and to mixed viroid/viral infection. *Agronomy*, 12(12):2916. <https://doi.org/10.3390/agronomy12122916>
- Akbari-Vafaii, A., Ketabchi, S., & Moradshahi, A. (2014). Effect of methyl jasmonate (MeJA) on biochemical responses of wheat seedlings infected by *Fusarium culmorum*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(15):1893–1904. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.861638>
- Alaux, P. L., Naveau, F., Declerck, S., & Cranenbrouck, S. (2020). Common mycorrhizal network induced ja/et genes expression in healthy potato plants connected to potato plants infected by *Phytophthora infestans*. *Frontiers in Plant Science*, 11:602. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00602>
- Alazem, M., & Lin, N. S. (2015). Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. *Molecular Plant Pathology*, 16 (5):529–540. <https://doi.org/10.1111/mpp.12204>
- Ali, S., Ganai, B. A., Kamili, A. N., Bhat, A. A., Mir, Z. A., Bhat, J. A., Tyagi, A., Islam S.T., Mushtaq, M., Yadav, P., Rawat, S., Grover, A. (2018). Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*, 212-213:29–37. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.008>
- Ali, S., Tyagi, A., & Mir, Z. A. (2024). Plant Immunity: At the Crossroads of Pathogen Perception and Defense Response. *Plants (Basel)*, 13(11):1434. <https://doi.org/10.3390/plants13111434>

- 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. *Journal of Experimental Botany*, 60(2):377–390. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern277>
- Andrade, A., Vigliocco, A., Alemano, S., Miersch, O., Botella, M. A., & Abdala, G. (2005). Endogenous jasmonates and octadecanoids in hypersensitive tomato mutants during germination and seedling development in response to abiotic stress. *Seed Science Research*, 15(4):309–318. <https://doi.org/10.1079/ssr2005219>
- Aranega-Bou, P., de la O Leyva, M., Finiti, I., García-Agustín, P., & González-Bosch, C. (2014). Priming of plant resistance by natural compounds. Hexanoic acid as a model. *Frontiers in Plant Science*, 5:488. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00488>
- Aviña-Padilla, K., Rivera-Bustamante, R., Kovalskaya, N. Y., & Hammond, R. W. (2018). Pospiviroid infection of tomato regulates the expression of genes involved in flower and fruit development. *Viruses*, 10(10):516. <https://doi.org/10.3390/v10100516>
- Baebler, Š., Stare, K., Kovač, M., Blejec, A., Prezelj, N., Stare, T., Kogovšek, P., Pompe-Novak, M., Rosahl, S., Ravnikar, M., & Gruden, K. (2011). Dynamics of responses in compatible potato - Potato virus Y interaction are modulated by salicylic acid. *PLoS ONE*, 6(12):e29009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029009>
- Baebler, Š., Witek, K., Petek, M., Stare, K., Tušek-Žnidarič, M., Pompe-Novak, M., Renaut, J., Szajko, K., Strzelczyk-Zyta, D., Marczewski, W., Morgiewicz, K., Gruden, K., & Hennig, J. (2014). Salicylic acid is an indispensable component of the Ny-1 resistance-gene-mediated response against Potato virus Y infection in potato. *Journal of Experimental Botany*, 65(4):1095–1109. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert447>
- 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(1):98. <https://doi.org/10.3390/biom10010098>
- Bao, S., Owens, R. A., Sun, Q., Song, H., Liu, Y., Eamens, A. L., Feng, H., Tian, H., Wang, M. B., & Zhang, R. (2019). Silencing of transcription factor encoding gene *StTCP23* by small RNAs derived from the virulence modulating region of potato spindle tuber viroid is associated with symptom development in potato. *PLoS Pathogens*, 15(12):e1008110. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008110>

- Belkadhi, A., De Haro, A., Soengas, P., Obregon, S., Cartea, M. E., Chaibi, W., & Djebali, W. (2014). Salicylic acid increases tolerance to oxidative stress induced by hydrogen peroxide accumulation in leaves of cadmium-exposed flax (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Plant Interactions*, 9(1):647–654. <https://doi.org/10.1080/17429145.2014.890751>
- Ben Rejeb, I., Pastor, V., & Mauch-Mani, B. (2014). Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: Molecular mechanisms. *Plants (Basel)*, 3(4):458–475. <https://doi.org/10.3390/plants3040458>
- Berens, M. L., Berry, H. M., Mine, A., Argueso, C. T., & Tsuda, K. (2017). Evolution of hormone signaling networks in plant defense. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1):401–425. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516>
- Bertini, L., Proietti, S., Focaracci, F., Sabatini, B., & Caruso, C. (2018). Epigenetic control of defense genes following MeJA-induced priming in rice (*O. sativa*). *Journal of Plant Physiology*, 228:166–177. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.06.007>
- Bhavanam, S., & Stout, M. (2021). Seed treatment with jasmonic acid and methyl jasmonate induces resistance to insects but reduces plant growth and yield in rice, *Oryza sativa*. *Frontiers in Plant Science*, 12:691768. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.691768>
- Bigeard, J., Colcombet, J., & Hirt, H. (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant*, 8(4):521–539. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>
- Bittner, A., Cieřla, A., Gruden, K., Lukan, T., Mahmud, S., Teige, M., Vothknecht, U. C., & Wurzinger, B. (2022). Organelles and phytohormones: a network of interactions in plant stress responses. *Journal of Experimental Botany*, 73(21):7165–7181. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac384>
- Boonham, N., González Pérez, L., Mendez, M. S., Lilia Peralta, E., Blockley, A., Walsh, K., Barker, I., & Mumford, R. A. (2004). Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Potato spindle tuber viroid. *Journal of Virological Methods*, 116(2):139–146. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.11.005>
- Borsani, O., Valpuesta, V., & Botella, M. A. (2001). Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by nacl and osmotic stress in *arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*, 126(3):1024–1030. <https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1024>

- Bostock, R. M., Karban, R., Thaler, J. S., Weyman, P. D., & Gilchrist, D. (2001). Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores. *European Journal of Plant Pathology*, 107:103–111. <https://doi.org/10.1023/A:1008703904253>
- Brouwer, S. M., Odilbekov, F., Burra, D. D., Lenman, M., Hedley, P. E., Grenville-Briggs, L., Alexandersson, E., Liljeroth, E., & Andreasson, E. (2020). Intact salicylic acid signalling is required for potato defence against the necrotrophic fungus *Alternaria solani*. *Plant Molecular Biology*, 104(1–2):1–19. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-01019-6>
- Carella, P., Wilson, D. C., & Cameron, R. K. (2015). Some things get better with age: Differences in salicylic acid accumulation and defense signaling in young and mature *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 5:775. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00775>
- Chakraborty, N., & Basak, J. (2019). Exogenous application of methyl jasmonate induces defense response and develops tolerance against mungbean yellow mosaic India virus in *Vigna mungo*. *Functional Plant Biology*, 46(1):69–81. <https://doi.org/10.1071/FP18168>
- Chini, A., Monte, I., Zamarreño, A. M., García-Mina, J. M., & Solano, R. (2023). Evolution of the jasmonate ligands and their biosynthetic pathways. *New Phytologist*, 238(5):2236–2246. <https://doi.org/10.1111/nph.18891>
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4):803–814. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008>
- Clarke, J. D., Volko, S. M., Ledford, H., Ausubel, F. M., & Dong, X. (2000). roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in cpr-induced resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 12(11):2175–2190. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2175>
- Clarke, S. F., Guy, P. L., Burritt, D. J., & Jameson, P. E. (2002). Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment. *Physiologia Plantarum*, 114(2):157–164. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1140201.x>
- Contreras-Liza, S., & Vargas-Luna, L. (2022). Use of acetylsalicylic acid and agronomic performance of potatoes in Lima region. *CABI Agriculture and Bioscience*, 3:19. <https://doi.org/10.1186/s43170-022-00088-5>
- Coquoz, J.-L., Buchala, A., & Métraux, J.-P. (1998). The Biosynthesis of Salicylic Acid in Potato. *Plants (Basel)*, 117(3):1095-101. <https://doi.org/10.1104/pp.117.3.1095>

- Cui, W., & Lee, J.-Y. (2016). *Arabidopsis* callose synthases CalS1/8 regulate plasmodesmal permeability during stress. *Nature Plants*, 2(5):16034. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.34>
- Dalakouras, A., Moser, M., Krczal, G., & Wassenegger, M. (2010). A chimeric satellite transgene sequence is inefficiently targeted by viroid-induced DNA methylation in tobacco. *Plant Molecular Biology*, 73(4):439–447. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9631-6>
- Dann, E. K., Meuwly, P., Métraux, J.-P., & Deverall, B. J. (1996). The effect of pathogen inoculation or chemical treatment on activities of chitinase and β -1,3-glucanase and accumulation of salicylic acid in leaves of green bean, *Phaseolus vulgaris* L. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49(5):307–319. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1996.0056>
- Daudi, A., O'Brien, J. A., & Author, B. P. (2012). Detection of hydrogen peroxide by DAB staining in *Arabidopsis* leaves. *Bio-Protocol* 2(18):e263. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.263>.
- De Gara, L., De Pinto, M. C., & Tommasi, F. (2003). The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(10):863–870. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(03\)00135-9](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(03)00135-9)
- Deng, X. G., Zhu, T., Peng, X. J., Xi, D. H., Guo, H., Yin, Y., Zhang, D. W., & Lin, H. H. (2016). Role of brassinosteroid signaling in modulating Tobacco mosaic virus resistance in *Nicotiana benthamiana*. *Scientific Reports*, 6(1): 20579. <https://doi.org/10.1038/srep20579>
- Devoto, A., Ellis, C., Magusin, A., Chang, H. S., Chilcott, C., Zhu, T., & Turner, J. G. (2005). Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Molecular Biology*, 58(4):497–513. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-7306-5>
- Devoto, A., & Turner, J. G. (2005). Jasmonate-regulated *Arabidopsis* stress signalling network. *Physiologia Plantarum* 123(2):161–172. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2004.00418.x>
- Di Carli, M., Villani, M. E., Bianco, L., Lombardi, R., Perrotta, G., Benvenuto, E., & Donini, M. (2010). Proteomic analysis of the plant-virus interaction in cucumber mosaic virus (CMV) resistant transgenic tomato. *Journal of Proteome Research*, 9(11):5684–5697. <https://doi.org/10.1021/pr100487x>
- Dingley, A. J., Steger, G., Esters, B., Riesner, D., & Grzesiek, S. (2003). Structural characterization of the 69 nucleotide potato spindle tuber viroid left-terminal domain by NMR and thermodynamic

- analysis. *Journal of Molecular Biology*, 334(4):751–767.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.10.015>
- Ding, P., & Ding, Y. (2020). Stories of Salicylic Acid: A Plant Defense Hormone. *Trends in Plant Science*, 25(6):549–565. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.01.004>
- Dobón, A., Wulff, B. B. H., Canet, J. V., Fort, P., & Tornero, P. (2013). An allele of *Arabidopsis* COI1 with hypo- and hypermorphic phenotypes in plant growth, defence and fertility. *PLoS ONE*, 8(1): e55115. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055115>
- Dóczi, R., Brader, G., Pettkó-Szandtner, A., Rajh, I., Djamei, A., Pitzschke, A., Teige, M., & Hirt, H. (2007). The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *Plant Cell*, 19(10):3266–3279. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.050039>
- Dong, X., Hong, Z., Chatterjee, J., Kim, S., & Verma, D. P. S. (2008). Expression of callose synthase genes and its connection with Npr1 signaling pathway during pathogen infection. *Planta*, 229(1):87–98. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0812-3>
- Dorado, F. J., Matsiakh, I., Camisón, Á., Olaizola, J., Romeralo, C., Martín, J. A., Witzell, J., & Solla, A. (2025). Methyl jasmonate spray for the protection of broad-leaf trees against oomycete and fungal pathogens. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 132(2):64. <https://doi.org/10.1007/s41348-025-01061-w>
- Ebrahimi-Zarandi, M., Saberi Riseh, R., & Tarkka, M. T. (2022). Actinobacteria as effective biocontrol agents against plant pathogens, an overview on their role in eliciting plant defense. *Microorganisms*, 10(9):1739. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091739>
- Elena, S. F., Gómez, G., & Daròs, J. A. (2009). Evolutionary constraints to viroid evolution. *Viruses*, 1(2):241–254. <https://doi.org/10.3390/v1020241>
- El-Gamal, G., Abd-El-Kareem, F., Fotouh, Y., & El-Mougy, S. (2007). Induction of systemic resistance in potato plants against late and early blight diseases using chemical inducers under greenhouse and field conditions. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3(2):73–81.
- 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 Biology*, 8(1):131. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-131>

- Faize, L., & Faize, M. (2018). Functional analogues of salicylic acid and their use in crop protection. *Agronomy*, 8(1):5. <https://doi.org/10.3390/agronomy8010005>
- Fariied, H. N., Ayyub, C. M., Amjad, M., Ahmed, R., Wattoo, F. M., Butt, M., Bashir, M., Shaheen, M. R., & Waqas, M. A. (2017). Salicylic acid confers salt tolerance in potato plants by improving water relations, gaseous exchange, antioxidant activities and osmoregulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(6):1868–1875. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7989>
- Floková, K., Tarkowská, D., Miersch, O., Strnad, M., Wasternack, C., & Novák, O. (2014). UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry*, 105:147–157. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.05.015>
- Flores, R. (2016). Callose deposition in plasmodesmata and viroid invasion of the shoot apical meristem. *Frontiers in Microbiology* 7:52. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00052>
- Flores, R., Di Serio, F., Navarro, B., Duran-Vila, N., & Owens, R. A. (2021). Viroids And Viroid Diseases Of Plants. In Hurst C.J. (ed), *Studies in Viral Ecology* (Chapter 7, 231–273). Hoboken, New Jersey, Wiley– Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781119608370.ch7>
- Flores, R., Di Serio, F., Navarro, B., & Owens, R. A. (2017). Viroid Pathogenesis. In Hadidi A., Flores R., Randles J. W., Palukaitis P. (eds), *Viroids and Satellites* (Chapter 9, 93–103). Academic Press, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00009-7>
- Flores, R., Gas, M. E., Molina-Serrano, D., Nohales, M. Á., Carbonell, A., Gago, S., De la Peña, M., & Daròs, J. A. (2009). Viroid replication: Rolling-circles, enzymes and ribozymes. *Viruses*, 1(2):317–334. <https://doi.org/10.3390/v1020317>
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., & Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261(5122):754–756. <https://doi.org/10.1126/science.261.5122.754>
- García-Marcos, A., Pacheco, R., Manzano, A., Aguilar, E., & Tenllado, F. (2013). Oxylinpin 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 . *Journal of Virology*, 87(10):5769–5783. <https://doi.org/10.1128/jvi.03573-12>
- Gast, F.-U., Kempe, D., Spieker, R. L., & Sä, H. L. (1996). Secondary structure probing of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) and sequence comparison with other small pathogenic RNA replicons provides evidence for central non-canonical base-pairs, large A-rich loops, and a

- terminal branch. *Journal of Molecular Biology*, 262(5):652–670.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0543>.
- German, L., Yeshvekar, R., & Benitez-Alfonso, Y. (2023). Callose metabolism and the regulation of cell walls and plasmodesmata during plant mutualistic and pathogenic interactions. *Plant Cell and Environment*, 46,(2):391–404. <https://doi.org/10.1111/pce.14510>
- Goggin, F. L., & Fischer, H. D. (2022). Reactive oxygen species in plant interactions with aphids. *Frontiers in Plant Science*, 12:811105. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.811105>
- Góra-Sochacka, A., Wiesyk, A., Fogtmann, A., Lirski, M., & Zagórski-Ostoja, W. (2019). Root transcriptomic analysis reveals global changes induced by systemic infection of *Solanum lycopersicum* with mild and severe variants of potato spindle tuber viroid. *Viruses*, 11(11):992. <https://doi.org/10.3390/v11110992>
- Gos, R. (1926). Transmission of potato spindle tuber disease by cutting knives and seed piece contact. *Phytopathology*, 16:299–304.
- Gross H.J., D. H. , L. C. , J. P. , R. M. , A. H. , S. H. L. (1978). Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature*, 273(5659):203–208.
<https://doi.org/10.1038/273203a0>.
- Hadjieva, N., Apostolova, E., Baev, V., Yahubyan, G., & Gozmanova, M. (2021). Transcriptome analysis reveals dynamic cultivar-dependent patterns of gene expression in potato spindle tuber viroid-infected pepper. *Plants (Basel)*, 10(12):2687. <https://doi.org/10.3390/plants10122687>
- 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(2):230–242. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03688.x>
- Halim, V. A., Eschen-Lippold, L., Altmann, S., Birschwilks, M., Scheel, D., & Rosahl, S. (2007). Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(11):1346–1352.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-20-11-1346>
- Halim, V. A., Hunger, A., Macioszek, V., Landgraf, P., Nürnberger, T., Scheel, D., & Rosahl, S. (2004). The oligopeptide elicitor Pep-13 induces salicylic acid-dependent and -independent defense reactions in potato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64(6):311–318.
<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2004.10.003>

- Han, C., Wang, L., Lyu, J., Shi, W., Yao, L., Fan, M., & Bai, M. Y. (2023). Brassinosteroid signaling and molecular crosstalk with nutrients in plants. *Journal of Genetics and Genomics*, 50(8):541–553. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2023.03.004>
- Hemetsberger, C., Herrberger, C., Zechmann, B., Hillmer, M., & Doehlemann, G. (2012). The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS Pathogens*, 8(5):e1002684. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002684>
- Hernández, J. A., Gullner, G., Clemente-Moreno, M. J., Künstler, A., Juhász, C., Díaz-Vivancos, P., & Király, L. (2016). Oxidative stress and antioxidative responses in plant–virus interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 94:134–148. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2015.09.001>
- He, Y., Chung, E. H., Hubert, D. A., Tornero, P., & Dangl, J. L. (2012). Specific missense alleles of the *Arabidopsis* jasmonic acid co-receptor COI1 regulate innate immune receptor accumulation and function. *PLoS Genetics*, 8(10):e1003018. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003018>
- Hönig, M., Roeber, V. M., Schmülling, T., & Cortleven, A. (2023). Chemical priming of plant defense responses to pathogen attacks. *Frontiers in Plant Science*, 14:1146577. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1146577>
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D. X., Yi, M., & Zhao, Y. (2019). Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 10:800. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800>
- Huang, M., Wu, Z., Li, J., Ding, Y., Chen, S., & Li, X. (2023). Plant protection against viruses: An integrated review of plant immunity agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5):4453. <https://doi.org/10.3390/ijms24054453>
- Hückelhoven, R. (2008). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology*, 45:101–127. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094325>
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L., & Yang He, S. (2014). Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant Advance Access*, 7:1267–1287. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu049>
- Itaya, A., Matsuda, Y., Gonzales, R. A., Nelson, R. S., & Ding, B. (2002). Potato spindle tuber viroid strains of different pathogenicity induces and suppresses expression of common and unique

- genes in infected tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(10):990–999.
<https://doi.org/10.1094/mpmi.2002.15.10.990>
- Itaya, A., Zhong, X., Bundschuh, R., Qi, Y., Wang, Y., Takeda, R., Harris, A. R., Molina, C., Nelson, R. S., & Ding, B. (2007). A structured viroid RNA serves as a substrate for dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RNA-induced silencing complex-mediated degradation. *Journal of Virology*, 81(6):2980–2994. <https://doi.org/10.1128/jvi.02339-06>
- Jagodzick, P., Tajdel-Zielinska, M., Ciesla, A., Marczak, M., & Ludwikow, A. (2018). Mitogen-activated protein kinase cascades in plant hormone signaling. *Frontiers in Plant Science*, 9:1387. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01387>
- Jain, D., & Khurana, J. P. (2018). Role of pathogenesis-related (PR) proteins in plant defense mechanism. In: Singh, A. & Singh, I. (ed), *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction* (Chapter 12, 265–281), Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_12
- Jia, C., Zhang, L., Liu, L., Wang, J., Li, C., & Wang, Q. (2013). Multiple phytohormone signalling pathways modulate susceptibility of tomato plants to *Alternaria alt*. *Journal of Experimental Botany*, 64(2):637–650. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers360>
- 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 Chemistry*, 309:125608. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125608>
- Jiang, J., Smith, H. N., Ren, D., Dissanayaka Mudiyanse, S. D., Dawe, A. L., Wang, L., & Wang, Y. (2018). Potato spindle tuber viroid modulates its replication through a direct interaction with a splicing regulator. *Journal of Virology*, 92(20):e01004-18. <https://doi.org/10.1128/jvi.01004-18>
- Jiang, M., Yu, N., Zhang, Y., Liu, L., Li, Z., Wang, C., Cheng, S., Cao, L., & Liu, Q. (2022). Deletion of diterpenoid biosynthetic genes CYP76M7 and CYP76M8 induces cell death and enhances bacterial blight resistance in indica rice ‘9311’. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13):7234. <https://doi.org/10.3390/ijms23137234>

- Joubert, M., van den Berg, N., Theron, J., & Swart, V. (2022). Transcriptomics advancement in the complex response of plants to viroid infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14):7677. <https://doi.org/10.3390/ijms23147677>
- Jung, S. (2004). Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(3):225–231. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.01.001>
- Kadam, S. B., & Barvkar, V. T. (2024). COI1 dependent jasmonic acid signalling positively modulates ROS scavenging system in transgenic hairy root culture of tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 206:108229. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108229>
- Kasai, A., Sano, T., & Harada, T. (2013). Scion on a stock producing siRNAs of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) attenuates accumulation of the viroid. *PLoS ONE*, 8(2):e57736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057736>
- 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):ee0150711. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150711>
- Katsir, L., Schillmiller, A. L., Staswick, P. E., Yang He, S., & Howe, G. A. (2008). COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(19):7100–7105. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802332105>
- Kissoudis, C., Sunarti, S., Van De Wiel, C., Visser, R. G. F., Van Der Linden, C. G., & Bai, Y. (2016). Responses to combined abiotic and biotic stress in tomato are governed by stress intensity and resistance mechanism. *Journal of Experimental Botany*, 67(17):5119–5132. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw285>
- Kitabayashi, S., Tsushima, D., Adkar-Purushothama, C. R., & Sano, T. (2020). Identification and molecular mechanisms of key nucleotides causing attenuation in pathogenicity of Dahlia isolate of potato spindle tuber viroid. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19):1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21197352>
- Kloek, A. P., Verbsky, M. L., Sharma, S. B., Schoelz, J. E., Vogel, J., Klessig, D. F., & Kunkel, B. N. (2001). Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-

- insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *The Plant Journal*, 26(5):509–522. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01050.x>
- Kochetov, A. V., Pronozin, A. Y., Shatskaya, N. V., Afonnikov, D. A., & Afanasenko, O. S. (2021). Potato spindle tuber viroid. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*, 25(3):269–275. <https://doi.org/10.18699/VJ21.030>
- Kong, X., Zhang, C., Zheng, H., Sun, M., Zhang, F., Zhang, M., Cui, F., Lv, D., Liu, L., Guo, S., Zhang, Y., Yuan, X., Zhao, S., Tian, H., & Ding, Z. (2020). Antagonistic interaction between auxin and SA signaling pathways regulates bacterial infection through lateral root in *Arabidopsis*. *Cell Reports*, 32(8): 108060. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108060>
- Koo, A. J. K., Hoo, S. C., Kobayashi, Y., & Howe, G. A. (2006). Identification of a peroxisomal acyl-activating enzyme involved in the biosynthesis of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(44):33511–33520. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607854200>
- Kovalskaya, N., & Hammond, R. W. (2014). Molecular biology of viroid-host interactions and disease control strategies. *Plant Science*, 228:48–60. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.05.006>
- Krasileva, K. V., Dahlbeck, D., & Staskawicz, B. J. (2010). Activation of an *Arabidopsis* resistance protein is specified by the in planta association of its leucine-rich repeat domain with the cognate oomycete effector. *Plant Cell*, 22(7):2444–2458. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075358>
- Kumek, L. (2023). Uloga reaktivnih kisikovih oblika u odgovoru krumpira (*Solanum tuberosum*) na infekciju viroidom vretenastog gomolja krumpira (PSTVd). Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:452434>
- Kuźnicki, D., Meller, B., Arasimowicz-Jelonek, M., Braszewska-Zalewska, A., Drozda, A., & Floryszak-Wieczorek, J. (2019). BABA-induced DNA methylome adjustment to intergenerational defense priming in potato to *Phytophthora infestans*. *Frontiers in Plant Science*, 10:650. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00650>
- Lamb, C., & Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48(1):251–275. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.251>

- Lee, W. S., Fu, S. F., Verchot-Lubicz, J., & Carr, J. P. (2011). Genetic modification of alternative respiration in *Nicotiana benthamiana* affects basal and salicylic acid-induced resistance to potato virus X. *BMC Plant Biology*, 11(1):41. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-41>
- Lenarčič, R., Morisset, D., Mehle, N., & Ravnikar, M. (2013). Fast real-time detection of Potato spindle tuber viroid by RT-LAMP. *Plant Pathology*, 62(5):1147–1156. <https://doi.org/10.1111/ppa.12017>
- León, J., Rojo, E., & Sánchez-Serrano, J. J. (2001). Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 52(354):1–9. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.354.1>
- Lian, K., Gao, F., Sun, T., van Wersch, R., Ao, K., Kong, Q., Nitta, Y., Wu, D., Krysan, P., & Zhang, Y. (2018). MKK6 functions in two parallel MAP kinase cascades in immune signaling. *Plant Physiology*, 178(3):1284–1295. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00592>
- Li, C., Shen, Q., Cai, X., Lai, D., Wu, L., Han, Z., Zhao, T., Chen, D., & Si, J. (2021). JA signal-mediated immunity of *Dendrobium catenatum* to necrotrophic Southern Blight pathogen. *BMC Plant Biology*, 21(1):360. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03134-y>
- Li, C., Xu, M., Cai, X., Han, Z., Si, J., & Chen, D. (2022a). Jasmonate signaling pathway modulates plant defense, growth, and their trade-offs. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7):3945. <https://doi.org/10.3390/ijms23073945>
- Li, J., Trivedi, P., & Wang, N. (2016a). Field evaluation of plant defense inducers for the control of citrus huanglongbing. *Phytopathology*, 106(1):37–46. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-15-0196-R>
- Li, M., Zhou, J., Du, J., Li, X., Sun, Y., Wang, Z., Lin, Y., Zhang, Y., Wang, Y., He, W., Wang, X., Chen, Q., Zhang, Y., Luo, Y., & Tang, H. (2022b). Comparative physiological and transcriptomic analyses of improved heat stress tolerance in celery (*Apium graveolens* L.) caused by exogenous melatonin. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19):11382. <https://doi.org/10.3390/ijms231911382>
- Li, N., Han, X., Feng, D., Yuan, D., & Huang, L. J. (2019a). Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/Jasmonate in plant defense: Do we understand what they are whispering? *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3):671. <https://doi.org/10.3390/ijms20030671>

- Li, N., Lin, Z., Yu, P., Zeng, Y., Du, S., & Huang, L. J. (2023). The multifarious role of callose and callose synthase in plant development and environment interactions. *Frontiers in Plant Science* 14:1183402. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1183402>
- Li, N., Uhrig, J. F., Thurow, C., Huang, L. J., & Gatz, C. (2019b). Reconstitution of the Jasmonate signaling pathway in plant protoplasts. *Cells*, 8(12):1532. <https://doi.org/10.3390/cells8121532>
- Li, Q., Qin, X., Qi, J., Dou, W., Dunand, C., Chen, S., & He, Y. (2020). CsPrx25, a class III peroxidase in *Citrus sinensis*, confers resistance to citrus bacterial canker through the maintenance of ROS homeostasis and cell wall lignification. *Horticulture Research*, 7(1):192. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00415-9>
- Li, R., Llorca, L. C., Schuman, M. C., Wang, Y., Wang, L., Joo, Y., Wang, M., Vassão, D. G., & Baldwin, I. T. (2018). ZEITLUPE in the roots of wild tobacco regulates jasmonate-mediated nicotine biosynthesis and resistance to a generalist herbivore. *Plant Physiology*, 177(2):833–846. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00315>
- Li, Y., Cui, H., Cui, X., & Wang, A. (2016b). The altered photosynthetic machinery during compatible virus infection. *Current Opinion in Virology*, 17:19–24. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.11.002>
- 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(4):402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- López-Gresa, M. P., Lisón, P., Yenush, L., Conejero, V., Rodrigo, I., & Bellés, J. M. (2016). Salicylic acid is involved in the basal resistance of tomato plants to *Citrus exocortis* viroid and tomato spotted wilt virus. *PLoS ONE*, 11(11):e0166938. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166938>
- López-Gresa, M. P., Payá, C., Rodrigo, I., Bellés, J. M., Barceló, S., Choi, Y. H., Verpoorte, R., & Lisón, P. (2019). Effect of benzothiadiazole on the metabolome of tomato plants infected by *Citrus exocortis* viroid. *Viruses*, 11(5), 437. <https://doi.org/10.3390/v11050437>
- Love, A. J., Yun, B. W., Laval, V., Loake, G. J., & Milner, J. J. (2005). Cauliflower mosaic virus, a compatible pathogen of *Arabidopsis*, engages three distinct defense-signaling pathways and activates rapid systemic generation of reactive oxygen species. *Plant Physiology*, 139(2):935–948. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066803>

- Lukan, T., & Coll, A. (2022). Intertwined roles of reactive oxygen species and salicylic acid signaling are crucial for the plant response to biotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10):5568. <https://doi.org/10.3390/ijms23105568>
- Lulić, N. (2024). Uloga jasmonata u regulaciji antioksidacijskog odgovora tijekom infekcije krumpira (*Solanum tuberosum*) viroidom vretenastog gomolja krumpira. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:073725>
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., & Ton, J. (2011). Callose Deposition: A Multifaceted Plant Defense Response, 24(2):183-93. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-10-0149>.
- Luo, L., Wang, Y., Qiu, L., Han, X., Zhu, Y., Liu, L., Man, M., Li, F., Ren, M., & Xing, Y. (2023). MYC2: a master switch for plant physiological processes and specialized metabolite synthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4):3511. <https://doi.org/10.3390/ijms24043511>
- Lv, D. Q., Liu, S. W., Zhao, J. H., Zhou, B. J., Wang, S. P., Guo, H. S., & Fang, Y. Y. (2016). Replication of a pathogenic non-coding RNA increases DNA methylation in plants associated with a bromodomain-containing viroid-binding protein. *Scientific Reports*, 6(1):35751. <https://doi.org/10.1038/srep35751>
- Makarova, S., Makhotenko, A., Spechenkova, N., Love, A. J., Kalinina, N. O., & Taliansky, M. (2018). Interactive responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants to heat stress and infection with Potato virus Y. *Frontiers in Microbiology*, 9:2582. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02582>
- Mansoor, S., Wani, O. A., Lone, J. K., Manhas, S., Kour, N., Alam, P., Ahmad, A., & Ahmad, P. (2022). Reactive oxygen species in plants: from source to sink. *Antioxidants*, 11(2):225. <https://doi.org/10.3390/antiox11020225>
- Martínez-Aguilar, K., Ramírez-Carrasco, G., Hernández-Chávez, J. L., Barraza, A., & Alvarez-Venegas, R. (2016). Use of BABA and INA as activators of a primed state in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Frontiers in Plant Science*, 7:653. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00653>
- Martin, R. E., Postiglione, A. E., & Muday, G. K. (2022). Reactive oxygen species function as signaling molecules in controlling plant development and hormonal responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 69:102293. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2022.102293>

- Mason, K. N., Ekanayake, G., & Heese, A. (2020). Staining and automated image quantification of callose in *Arabidopsis* cotyledons and leaves. *Methods in Cell Biology*, 160:181–199. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2020.05.005>
- Mazzoni-Putman, S. M., Brumos, J., Zhao, C., Alonso, J. M., & Stepanova, A. N. (2021). Auxin interactions with other hormones in plant development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(10):a039990. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a039990>
- McDowell, J. M., Cuzick, A., Can, C., Beynon, J., Dangl, J. L., & Holub, E. B. (2000). Downy mildew (*Peronospora parasitica*) resistance genes in *Arabidopsis* vary in functional requirements for NDR1, EDS1, NPR1 and salicylic acid accumulation. *Plant Journal*, 22(6):523–529. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00771.x>
- Mehetre, G. T., Leo, V. V., Singh, G., Sorokan, A., Maksimov, I., Yadav, K., Upadhyaya, K., Hashem, A., Alsaleh, A. N., Dawoud, T. M., Almaary, K. S., & Singh, B. P. (2021). Current developments and challenges in plant viral diagnostics: a systematic review. *Viruses*, 13(3):412 <https://doi.org/10.3390/v13030412>
- Mickelbart, M. V., Hasegawa, P. M., & Bailey-Serres, J. (2015). Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nature Reviews Genetics*, 16(4):237–251. <https://doi.org/10.1038/nrg3901>
- Milanović, J., Kajić, V., & Mihaljević, S. (2014). Occurrence and molecular variability of Potato spindle tuber viroid and Tomato apical stunt viroid in ornamental plants in Croatia. *European Journal of Plant Pathology*, 139(4):785–788. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0432-7>
- Milanović, J., Oklestkova, J., Novák, O., & Mihaljević, S. (2019a). Effects of Potato spindle tuber viroid infection on phytohormone and antioxidant responses in symptomless *Solanum laxum* plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(1):325–332. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9842-7>
- Milanović, J., Oklestkova, J., Majdandžić, A., Novák, O., & Mihaljević, S. (2019b). Organ-specific differences in endogenous phytohormone and antioxidative responses in potato upon PSTVd infection. *Journal of Plant Physiology*, 232:107–114. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.10.027>
- Miller, M., Song, Q., Shi, X., Juenger, T. E., & Chen, Z. J. (2015). Natural variation in timing of stress-responsive gene expression predicts heterosis in intraspecific hybrids of *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 6:7453. <https://doi.org/10.1038/ncomms8453>

- Mishra, A. K., Kumar, A., Mishra, D., Nath, V. S., Jakše, J., Kocábek, T., Killi, U. K., Morina, F., & Matoušek, J. (2018). Genome-wide transcriptomic analysis reveals insights into the response to citrus bark cracking viroid (CBCVD) in hop (*Humulus lupulus* L.). *Viruses*, 10(10):570. <https://doi.org/10.3390/v10100570>
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10):490–498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- Montesano, M., Brader, G., Ponce De León, I., & Palva, E. T. (2005). Multiple defence signals induced by *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* elicitors in potato. *Molecular Plant Pathology*, 6(5):541–549. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00305.x>
- Morris, K., Mackerness, S. A. H., Page, T., Fred John, C., Murphy, A. M., Carr, J. P., & Buchanan-Wollaston, V. (2000). Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant Journal*, 23(5):677–685. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00836.x>
- Motallebi, P., Tonti, S., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H., Pisi, A., Nipoti, P., Hashemi, M., & Prodi, A. (2017). Induction of basal resistance by methyl jasmonate against *Fusarium culmorum* in bread wheat. *Cereal Research Communications*, 45(2):248–259. <https://doi.org/10.1556/0806.45.2017.008>
- Muhae-Ud-Din, G., Chen, D., Liu, T., Chen, W., & Gao, L. (2020). Methyljasmonate and salicylic acid contribute to the control of *Tilletia controversa* Kühn, causal agent of wheat dwarf bunt. *Scientific Reports*, 10(1):19175. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76210-2>
- Nahar, K., Kyndt, T., de Vleeschauwer, D., Höfte, M., & Gheysen, G. (2011). The jasmonate pathway is a key player in systemically induced defense against root knot nematodes in rice. *Plant Physiology*, 157(1):305–316. <https://doi.org/10.1104/pp.111.177576>
- Naoi, T., Kitabayashi, S., Kasai, A., Sugawara, K., Adkar-Purushothama, C. R., Senda, M., Hataya, T., & Sano, T. (2020). Suppression of RNA-dependent RNA polymerase 6 in tomatoes allows potato spindle tuber viroid to invade basal part but not apical part including pluripotent stem cells of shoot apical meristem. *PLoS ONE*, 15(7):e0236481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236481>
- Naoi, T., Li, S., & Sano, T. (2022). Resistance and Tolerance to Viroid Infection. Preprints. <https://doi.org/10.20944/preprints202211.0169.v1>

- Nath, V. S., Mishra, A. K., Kumar, A., Matoušek, J., & Jakše, J. (2019). Revisiting the role of transcription factors in coordinating the defense response against citrus bark cracking viroid infection in commercial hop (*Humulus lupulus* L.). *Viruses*, 11(5):419. <https://doi.org/10.3390/v11050419>
- Nath, V. S., Shrestha, A., Awasthi, P., Mishra, A. K., Kocábek, T., Matoušek, J., Sečnik, A., Jakše, J., Radišek, S., & Hallan, V. (2020). Mapping the gene expression spectrum of mediator subunits in response to viroid infection in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7):2498. <https://doi.org/10.3390/ijms21072498>
- Navarre, D. A., & Mayo, D. (2004). Differential characteristics of salicylic acid-mediated signaling in potato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64(4):179–188. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2004.09.001>
- Navarro, B., Flores, R., & Serio, F. Di. (2021a). Advances in viroid-host interactions. *Annual Review of Virology*, 8:305. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919>
- Navarro, B., Gisel, A., Serra, P., Chiumenti, M., Serio, F. Di, & Flores, R. (2021b). Degradome analysis of tomato and *Nicotiana benthamiana* plants infected with potato spindle tuber viroid. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7):3725. <https://doi.org/10.3390/ijms22073725>
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N. P., & Jones, J. D. G. (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current Biology*, 18(9):650–655. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.03.060>
- Nielsen, S. L., Enkegaard, A., Nicolaisen, M., Kryger, P., Marn, M. V., Pleško, I. M., Kahrer, A., & Gottsberger, R. A. (2012). No transmission of Potato spindle tuber viroid shown in experiments with thrips (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*), honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). *European Journal of Plant Pathology*, 133(3):505–509. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-9937-0>
- Nietzschmann, L., Gorzolka, K., Smolka, U., Matern, A., Eschen-Lippold, L., Scheel, D., & Rosahl, S. (2019). Early Pep-13-induced immune responses are SERK3A/B-dependent in potato. *Scientific Reports*, 9(1):18380. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54944-y>
- Nishimura, M. T., Stein, M., Hou, B. H., Vogel, J. P., Edwards, H., & Somerville, S. C. (2003). Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science*, 301(5635):969–972. <https://doi.org/10.1126/science.1086716>

- Nolan, T. M., Brennan, B., Yang, M., Chen, J., Zhang, M., Li, Z., Wang, X., Bassham, D. C., Walley, J., & Yin, Y. (2017). Selective autophagy of BES1 mediated by DSK2 balances plant growth and survival. *Developmental Cell*, 41(1):33-46.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.03.013>
- Nomoto, M., Skelly, M. J., Itaya, T., Mori, T., Suzuki, T., Matsushita, T., Tokizawa, M., Kuwata, K., Mori, H., Yamamoto, Y. Y., Higashiyama, T., Tsukagoshi, H., Spoel, S. H., & Tada, Y. (2021). Suppression of MYC transcription activators by the immune cofactor NPR1 fine-tunes plant immune responses. *Cell Reports*, 37(11):110125. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110125>
- Oka, K., Kobayashi, M., Mitsuhashi, I., & Seo, S. (2013). Jasmonic acid negatively regulates resistance to Tobacco mosaic virus in tobacco. *Plant and Cell Physiology*, 54(12):1999–2010. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct137>
- Oklestkova, J., Tarkowská, D., Eyer, L., Elbert, T., Marek, A., Smržová, Z., Novák, O., Fránek, M., Zhabinskii, V. N., & Strnad, M. (2017). Immunoaffinity chromatography combined with tandem mass spectrometry: A new tool for the selective capture and analysis of brassinosteroid plant hormones. *Talanta*, 170:432–440. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.044>
- Ortolá, B., & Daròs, J. A. (2023). Viroids: non-coding circular RNAs able to autonomously replicate and infect higher plants. *Biology*, 12(2):172. <https://doi.org/10.3390/biology12020172>
- Owens, R. A., & Hammond, R. W. (2009). Viroid pathogenicity: One process, many faces. *Viruses*, 1(2):298–316. <https://doi.org/10.3390/v1020298>
- Owens, R. A., Sano, T., & Duran-Vila, N. (2012a). Plant viroids: Isolation, characterization/detection, and analysis. *Methods in Molecular Biology*, 894:253–271. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-882-5_17
- Owens, R. A., Tech, K. B., Shao, J. Y., Sano, T., & Jacyn Baker, C. (2012b). Global analysis of tomato gene expression during Potato spindle tuber viroid infection reveals a complex array of changes affecting hormone signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*, 25(4):582–598. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Owens, R. A., & Verhoeven, J. T. J. (2017). Potato spindle tuber viroid. In Hadidi A., Flores R., Randles J. W., Palukaitis P. (ed), *Viroids and Satellites* (Chapter 14, 149–158). Academic Press, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00014-0>

- Pabinger, S., Rödiger, S., Kriegner, A., Vierlinger, K., & Weinhäusel, A. (2014). A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. *Biomolecular Detection and Quantification*, 1(1):23–33. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2014.08.002>
- Palacıoğlu, G. (2024). Chitosan, methyl jasmonate, and silicon induce resistance to angular leaf spot in common bean, caused by *Pseudocercospora griseola*, with expression of defense-related genes and enzyme activities. *Plants (Basel)*, 13(20):2915. <https://doi.org/10.3390/plants13202915>
- Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., & Dwivedi, U. N. (2017). A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 6(1):308. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000308>
- Pan, L., Zhao, X., Chen, M., Fu, Y., Xiang, M., & Chen, J. (2020). Effect of exogenous methyl jasmonate treatment on disease resistance of postharvest kiwifruit. *Food Chemistry*, 305:125483. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125483>
- Peng, Y., Yang, J., Li, X., & Zhang, Y. (2021). Salicylic acid: biosynthesis and signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 72:761–791. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-081320-092855>
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H. B., Lacy, M., Austin, M. J., Parker, J. E., Sharm, S. B., Klessig, D. F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A. B., & Mundy, J. (2000). *Arabidopsis* MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*, 103(7):1111–1120. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00213-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00213-0)
- Peters, L. P., Carvalho, G., Vilhena, M. B., Creste, S., Azevedo, R. A., & Monteiro-Vitorello, C. B. (2017). Functional analysis of oxidative burst in sugarcane smut-resistant and -susceptible genotypes. *Planta*, 245(4):749–764. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2642-z>
- Pieterse, C. M. J., Van Der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28:489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Pieterse, C. M. J., & Van Loon, L. C. (2004). NPR1: The spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4):456–464. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.006>

- Pitino, M., Armstrong, C. M., & Duan, Y. (2015). Rapid screening for citrus canker resistance employing pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity responses. *Horticulture Research*, 2(1):15042. <https://doi.org/10.1038/hortres.2015.42>
- Pozo, M. J., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. J. (2004). Jasmonates - Signals in plant-microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23(3):211–222. <https://doi.org/10.1007/s00344-004-0031-5>
- Prol, F. V., Márquez-Molins, J., Rodrigo, I., López-Gresa, M. P., Bellés, J. M., Gómez, G., Pallás, V., & Lisón, P. (2021). Symptom severity, infection progression and plant responses in *Solanum* plants caused by three pospiviroids vary with the inoculation procedure. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12):6189. <https://doi.org/10.3390/ijms22126189>
- Qi, J., Zhao, X., & Li, Z. (2020). ITRAQ-based quantitative proteomic analysis of the *Arabidopsis* mutant *opr3-1* in response to exogenous MeJA. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2):571. <https://doi.org/10.3390/ijms21020571>
- Querci, M., Owens, R. A., Bartolini, I., Lazarte, V., & Salazar, L. F. (1997). Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *Journal of General Virology*, 78(6):1207–1211. www.microbiologyresearch.org
- Ramšak, Ž., Coll, A., Stare, T., Tzfadia, O., Baebler, Š., Van de Peer, Y., & Gruden, K. (2018). Network modeling unravels mechanisms of crosstalk between ethylene and salicylate signaling in potato. *Plant Physiology*, 178(1):488–499. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00450>
- Rao, M. V., Lee, H.-I., Creelman, R. A., Mullet, J. E., & Davis, K. R. (2000). Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *The Plant Cell*, 12:1633–1646. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.9.1633>
- Riedlmeier, M., Ghirardo, A., Wenig, M., Knappe, C., Koch, K., Georgii, E., Dey, S., Parker, J. E., Schnitzler, J. P., & Vlot, A. C. (2017). Monoterpenes support systemic acquired resistance within and between plants. *Plant Cell*, 29(6):1440–1459. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00898>
- Riesner, D., Henco, K., Rokohl, U., Klotz, G., Kleinschmidt, A. K., Domdey, H., Jank, P., Gross, H. J., & Sängler, H. L. (1979). Structure and structure formation of viroids. *Journal of Molecular Biology*, 133:85–115. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(79\)90252-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(79)90252-3)
- Rizza, S., Conesa, A., Juarez, J., Catara, A., Navarro, L., Duran-Vila, N., & Ancillo, G. (2012). Microarray analysis of etrog citron (*Citrus medica* L.) reveals changes in chloroplast, cell wall,

- peroxidase and symporter activities in response to viroid infection. *Molecular Plant Pathology*, 13(8):852–864. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00794.x>
- Robatzek, S., & Somssich, I. E. (2002). Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes and Development*, 16(9):1139–1149. <https://doi.org/10.1101/gad.222702>
- Sánchez, G., Gerhardt, N., Siciliano, F., Vojnov, A., Malcuit, I., & Marano, M. R. (2010). Salicylic acid is involved in the Nb-mediated defense responses to Potato virus X in *Solanum tuberosum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*, 23(4):394–405. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-4-0394>
- Sano, T. (2021). Progress in 50 years of viroid research — Molecular structure, pathogenicity, and host adaptation. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 97(7):371–401. <https://doi.org/10.2183/pjab.97.020>
- 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 Pathology*, 65(2):342–352. <https://doi.org/10.1111/ppa.12420>
- Scalschi, L., Sanmartín, M., Camañes, G., Troncho, P., Sánchez-Serrano, J. J., García-Agustín, P., & Vicedo, B. (2015). Silencing of OPR3 in tomato reveals the role of OPDA in callose deposition during the activation of defense responses against *Botrytis cinerea*. *Plant Journal*, 81(2):304–315. <https://doi.org/10.1111/tpj.12728>
- Schultz, E., & Folsom, D. (1923). Transmission, variation, and control of certain degeneration diseases of Irish potatoes. *Journal of Agricultural Research*, 25:43.
- Sharma, A., Kumar, V., Yuan, H., Kanwar, M. K., Bhardwaj, R., Thukral, A. K., & Zheng, B. (2018). Jasmonic acid seed treatment stimulates insecticide detoxification in *Brassica juncea* L. *Frontiers in Plant Science*, 9:1609. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01609>
- Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R., Kobayashi, Y., Hsu, F. F., Sharon, M., Browse, J., He, S. Y., Rizo, J., Howe, G. A., & Zheng, N. (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, 468(7322):400–407. <https://doi.org/10.1038/nature09430>

- Sheikh, A. H., Nawaz, K., Tabassum, N., Trapp, M., Alhoraibi, H., Rayapuram, N., & Hirt, H. (2022). Linker histone H1 regulates defense priming and immunity in plants. *Nucleic Acids Research*, 51(9):4252–4265. <https://doi.org/10.1101/2022.04.11.487821>
- Shu, P., Li, Z., Min, D., Zhang, X., Ai, W., Li, J., Zhou, J., Li, Z., Li, F., & Li, X. (2020). CRISPR/Cas9-mediated SIMYC2 mutagenesis adverse to tomato plant growth and MeJA-induced fruit resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(20):5529–5538. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08069>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(1):539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Singh, R. P. (1973). Experimental host range of the potato spindle tuber ‘virus’. *American Potato Journal*, 50:111–123. <https://doi.org/doi.org/10.1007/BF02857207>
- Singh, R. P., Boucher, A., & Somerville, T. H. (1989). Evaluation of chemicals for disinfection of laboratory equipment exposed to Potato spindle tuber viroid. *American Potato Journal*, 66:239–245. <https://doi.org/doi.org/10.1007/BF02853447>
- Soares, A. M. D. S., de Souza, T. F., Jacinto, T., & Machado, O. L. T. (2010). Effect of methyl jasmonate on antioxidative enzyme activities and on the contents of ROS and H₂O₂ in *Ricinus communis* leaves. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22(3):151–158. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202010000300001>
- Song, C., Cao, Y., Dai, J., Li, G., Manzoor, M. A., Chen, C., & Deng, H. (2022). The multifaceted roles of MYC2 in plants: toward transcriptional reprogramming and stress tolerance by jasmonate signaling. *Frontiers in Plant Science*, 13:868874. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.868874>
- Song, S., Liu, B., Zhai, J., Zhang, Y., Wang, K., & Qi, T. (2021). The intragenic suppressor mutation Leu59Phe compensates for the effect of detrimental mutations in the jasmonate receptor COI1. *Plant Journal*, 108(3):690–704. <https://doi.org/10.1111/tpj.15464>
- Spoel, S. H., & Dong, X. (2024). Salicylic acid in plant immunity and beyond. *Plant Cell*, 36(5):1451–1464. <https://doi.org/10.1093/plcell/koad329>

- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M. C., Korzelius, J. P., Van Pelt, J. A., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J. P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L. C., Dong, X., & Pieterse, C. M. J. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*, 15(3):760–770. <https://doi.org/10.1105/tpc.009159>
- Srivastava, S., & Prasad, V. (2020). Viroids: small entities with a mean punch. In Awasthi, L.P. (ed), *Applied Plant Virology: Advances, Detection, and Antiviral Strategies*. (Chapter 16, 209–226). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818654-1.00016-5>
- Stintzi, A., & Browse, J. (2000). The Arabidopsis male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(19):10625–10630. <https://doi.org/10.1073/pnas.190264497>
- Sugano, S., Kaminaka, H., Rybka, Z., Catala, R., Salinas, J., Matsui, K., Ohme-Takagi, M., & Takatsuji, H. (2003). Stress-responsive zinc finger gene ZPT2-3 plays a role in drought tolerance in petunia. *Plant Journal*, 36(6):830–841. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01924.x>
- Sun, J., & Matsushita, Y. (2024). Predicting symptom severity in PSTVd-infected tomato plants using the PSTVd genome sequence. *Molecular Plant Pathology*, 25(7):e13469. <https://doi.org/10.1111/mpp.13469>
- Sun, T., & Zhang, Y. (2022). MAP kinase cascades in plant development and immune signaling. *EMBO reports*, 23(2):e53817. <https://doi.org/10.15252/embr.202153817>
- Suzuki, T., Ikeda, S., Kasai, A., Taneda, A., Fujibayashi, M., Sugawara, K., Okuta, M., Maeda, H., & Sano, T. (2019). RNAI-mediated down-regulation of dicer-like 2 and 4 changes the response of ‘moneymaker’ tomato to potato spindle tuber viroid infection from tolerance to lethal systemic necrosis, accompanied by up-regulation of mir398, 398a-3p and production of excessive amount of reactive oxygen species. *Viruses*, 11(4):344. <https://doi.org/10.3390/v11040344>
- Šamajová, O., Plíhal, O., Al-Yousif, M., Hirt, H., & Šamaj, J. (2013). Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances*, 31(1):118–128. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.12.002>
- 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376(4):723–727. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.09.069>

- Tayyab, N., Naz, R., Yasmin, H., Nosheen, A., Keyani, R., Sajjad, M., Hassan, M. N., & Roberts, T. H. (2020). Combined seed and foliar pre-treatments with exogenous methyl jasmonate and salicylic acid mitigate drought-induced stress in maize. *PLoS ONE*, 15(5):e0232269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232269>
- Teng, D., Jing, W., Lv, B., Huang, X., Zhao, D., Kou, J., Liu, X., Dhillon, K. H., & Zhang, Y. (2023). Two jasmonic acid carboxyl methyltransferases in *Gossypium hirsutum* involved in MeJA biosynthesis may contribute to plant defense. *Frontiers in Plant Science*, 14:1249226. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1249226>
- Thaler, J. S., Humphrey, P. T., & Whiteman, N. K. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science*, 17(5):260–270. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.010>
- Thurrow, C., Krischke, M., Mueller, M. J., & Gatz, C. (2020). Induction of jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile)-dependent JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) genes in NaCl-treated *Arabidopsis thaliana* roots can occur at very low JA-Ile levels and in the absence of the JA/JA-Ile transporter JAT1/AtABCG16. *Plants (Basel)*, 9(12):1635. <https://doi.org/10.3390/plants9121635>
- Tiwari, S. B., Wang, X.-J., Hagen, G., & Guilfoyle, T. J. (2001). AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *The Plant Cell*, 13(12):2809–2822. <https://doi.org/10.1105/tpc.010289>
- Ton, J., Flors, V., & Mauch-Mani, B. (2009). The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science*, 14(6):310–317. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.03.006>
- Torres, M. A., Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*, 141(2):373–378. American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079467>
- Tripathi, D., Raikhy, G., & Kumar, D. (2019). Chemical elicitors of systemic acquired resistance - Salicylic acid and its functional analogs. *Current Plant Biology*, 17:48–59. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2019.03.002>
- Tripathy, B. C., & Oelmüller, R. (2012). Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 7(12):1621–1633. <https://doi.org/10.4161/psb.22455>

- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15):e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Urban, L., Lauri, F., Ben Hdech, D., & Aarrouf, J. (2022). Prospects for increasing the efficacy of plant resistance inducers stimulating salicylic acid. *Agronomy*, 12(12):3151. <https://doi.org/10.3390/agronomy12123151>
- Van Wees, S. C. M., & Glazebrook, J. (2003). Loss of non-host resistance of *Arabidopsis NahG* to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* is due to degradation products of salicylic acid. *Plant Journal*, 33(4):733–742. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01665.x>
- Verhoeven, J. T. J., Jansen, C. C. C., Botermans, M., & Roenhorst, J. W. (2010). Epidemiological evidence that vegetatively propagated, solanaceous plant species act as sources of Potato spindle tuber viroid inoculum for tomato. *Plant Pathology*, 59(1):3–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02173.x>
- Visser, M., Bester, R., Burger, J. T., & Maree, H. J. (2016). Next-generation sequencing for virus detection: Covering all the bases. *Virology Journal*, 13(1):85. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0539-x>
- Vlot, A.C., Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47:177–206. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
- Vos, I. A., Pieterse, C. M. J., & Van Wees, S. C. M. (2013). Costs and benefits of hormone-regulated plant defences. *Plant Pathology*, 62(S1):43–55. <https://doi.org/10.1111/ppa.12105>
- Vriet, C., Russinova, E., & Reuzeau, C. (2012). Boosting crop yields with plant steroids. *Plant Cell*, 24(3):842–857. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.094912>
- Wang, Y. (2021). Current view and perspectives in viroid replication. *Current Opinion in Virology*, 47:32–37. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.12.004>.
- Wang, Y., Mostafa, S., Zeng, W., & Jin, B. (2021a). Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16):8568. <https://doi.org/10.3390/ijms22168568>

- Wang, Y., Li, X., Fan, B., Zhu, C., & Chen, Z. (2021b). Regulation and function of defense-related callose deposition in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5):1–15.
<https://doi.org/10.3390/ijms22052393>
- Wasternack, C. (2014). JASMONATES IN PLANT GROWTH AND STRESS RESPONSES. In: Tran, L.S., Pal, S. (eds) *Phytohormones: A Window to Metabolism, Signaling and Biotechnological Applications* (221–263), Springer, New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0491-4_8
- Wasternack, C., Goetz, S., Hellwege, A., Forner, S., Strnad, M., & Hause, B. (2012). Another JA/COI1-independent role of OPDA detected in tomato embryo development. *Plant Signaling and Behavior*, 7(10):1349-1353. <https://doi.org/10.4161/psb.21551>
- Wasternack, C., & Hause, B. (2013). Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 111(6):1021–1058. <https://doi.org/10.1093/aob/mct067>
- Wasternack, C., & Song, S. (2017). Jasmonates: Biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *Journal of Experimental Botany*, 68(6):1303–1321.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erw443>
- Weller, S. A., Elphinstone, J. G., Smith, N. C., Boonham, N., & Stead, D. E. (2000). Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7):2853–2858.
<https://doi.org/10.1128/AEM.66.7.2853-2858.2000>
- Więsyk, A., Iwanicka-Nowicka, R., Fogtman, A., Zagórski-Ostoja, 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(5):257.
<https://doi.org/10.3390/v10050257>
- Xia, C., Li, S., Hou, W., Fan, Z., Xiao, H., Lu, M., Sano, T., & Zhang, Z. (2017). Global transcriptomic changes induced by infection of cucumber (*Cucumis sativus* L.) with mild and severe variants of hop stunt viroid. *Frontiers in Microbiology*, 8:2427.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02427>
- Xue, R., Wu, X., Wang, Y., Zhuang, Y., Chen, J., Wu, J., Ge, W., Wang, L., Wang, S., & Blair, M. W. (2017). Hairy root transgene expression analysis of a secretory peroxidase (PvPOX1) from

- common bean infected by *Fusarium wilt*. *Plant Science*, 260:1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.03.011>
- Yadav, V., Wang, Z., Wei, C., Amo, A., Ahmed, B., Yang, X., & Zhang, X. (2020). Phenylpropanoid pathway engineering: an emerging approach towards plant defense. *Pathogens*, 9(4):312.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9040312>
- Yang, D. L., Yao, J., Mei, C. S., Tong, X. H., Zeng, L. J., Li, Q., Xiao, L. T., Sun, T. P., Li, J., Deng, X. W., Lee, C. M., Thomashow, M. F., Yang, Y., He, Z., & He, S. Y. (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(19):1192–1200. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201616109>
- 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. *Horticultural Plant Journal*, 8(4):511–526.
<https://doi.org/10.1016/j.hpj.2022.04.003>
- Yasuda, S., Shinozawa, A., Hirase, T., Weng, Y., Ishizaki, H., Suzuki, R., Ueda, S., Sk, R., Yotsui, I., Toyota, M., Okamoto, M., & Saijo, Y. (2025). Humidity-driven ABA depletion determines plant-pathogen competition for leaf water. *bioRxiv* 2025.01.04.631318
<https://doi.org/10.1101/2025.01.04.631318>
- Yi, S. Y., Shirasu, K., Moon, J. S., Lee, S. G., & Kwon, S. Y. (2014). The activated SA and JA signaling pathways have an influence on flg22-triggered oxidative burst and callose deposition. *PLoS ONE*, 9(2):e88951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088951>
- Yuan, L. B., Dai, Y. S., Xie, L. J., Yu, L. J., Zhou, Y., Lai, Y. X., Yang, Y. C., Xu, L., Chen, Q. F., & Xiao, S. (2017). Jasmonate regulates plant responses to postsubmergence reoxygenation through transcriptional activation of antioxidant synthesis. *Plant Physiology*, 173(3):1864–1880.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.01803>
- Yu, D., Liu, Y., Fan, B., Klessig, D. F., & Chen, Z. (1997). Is the high basal level of salicylic acid Important for disease resistance in potato? *Plant Physiology*, 115(2):343-349.
<https://doi.org/10.1104/pp.115.2.343>
- Yu, X., Zhang, W., Zhang, Y., Zhang, X., Lang, D., & Zhang, X. (2018). The roles of methyl jasmonate to stress in plants. *Functional Plant Biology*, 46(3):197-212.
<https://doi.org/10.1071/fp18106>

- Yun, S. H., Khan, I. U., Noh, B., & Noh, Y. S. (2024). Genomic overview of INA-induced NPR1 targeting and transcriptional cascades in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research*, 52(7):3572–3588. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae019>
- Zaynab, M., Al-Yahyai, R., Xu, Z.-S., Yad, H. A., Sadler, M., Hussain, A., Aloufi, A. S., Sharif, Y., & Li, S. (2024). Genome-wide analysis and expression profiling of CalS genes in *Glycine max* revealed their role in development and salt stress. *Journal of King Saud University*, 36(2):103049. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.103049>
- Zhang, D. W., Deng, X. G., Fu, F. Q., & Lin, H. H. (2015). Induction of plant virus defense response by brassinosteroids and brassinosteroid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 241(4):875–885. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2218-8>
- Zhang, M., Koh, J., Liu, L., Shao, Z., Liu, H., Hu, S., Zhu, N., Dufresne, C. P., Chen, S., & Wang, Q. (2016). Critical Role of COI1-Dependent Jasmonate Pathway in AAL toxin induced PCD in Tomato Revealed by Comparative Proteomics. *Scientific Reports*, 6(1):28451. <https://doi.org/10.1038/srep28451>
- Zhang, M., & Zhang, S. (2022). Mitogen-activated protein kinase cascades in plant signaling. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64(2):301–341. <https://doi.org/10.1111/jipb.13215>
- Zhang, S., & Klessig, D. F. (1997). Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *The Plant Cell*, 9(5):809–824. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.5.809>
- Zhang, S., Miao, W., Liu, Y., Jiang, J., Chen, S., Chen, F., & Guan, Z. (2023). Jasmonate signaling drives defense responses against *Alternaria alternata* in chrysanthemum. *BMC Genomics*, 24(1):553. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09671-0>
- Zhang, Y., Nie, Y., Wang, L., & Wu, J. (2024). Viroid replication, movement, and the host factors involved. *Microorganisms*, 12(3):565. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030565>
- Zhang, Y., & Turner, J. G. (2008). Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *PLoS ONE*, 3(11):e3699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003699>
- Zhang, Y., Xu, S., Ding, P., Wang, D., Cheng, Y. T., He, J., Gao, M., Xu, F., Li, Y., Zhu, Z., Li, X., & Zhang, Y. (2010). Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(42):18220–18225. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005225107>

- Zhang, Y., Yin, J., Jiang, D., Xin, Y., Ding, F., Deng, Z., Wang, G., Ma, X., Li, F., Li, G., Li, M., Li, S., & Zhu, S. (2013). A universal oligonucleotide microarray with a minimal number of probes for the detection and identification of viroids at the genus level. *PLoS ONE*, 8(5):e64474. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064474>
- Zhao, S., & Li, Y. (2021). Current understanding of the interplays between host hormones and plant viral infections. *PLoS Pathogens*, 17(2):e1009242. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009242>
- Zhao, X., He, Y., Liu, Y., Wang, Z., & Zhao, J. (2024). JAZ proteins: Key regulators of plant growth and stress response. *Crop Journal*, 12(6):1505-1516. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2024.11.001>
- Zheng, J., Yang, Y., Guo, X., Jin, L., Xiong, X., Yang, X., & Li, G. (2020). Exogenous SA initiated defense response and multi-signaling pathway in tetraploid potato SD20. *Horticultural Plant Journal*, 6(2):99–110. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2020.01.003>
- 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. *Journal of Virology*, 91(11):e00247-17. <https://doi.org/10.1128/jvi.00247-17>
- Zhong, X., Archual, A. J., Amin, A. A., & Ding, B. (2008). A genomic map of viroid RNA motifs critical for replication and systemic trafficking. *Plant Cell*, 20(1):35–47. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056606>
- Zhu, C., Yi, X., Yang, M., Liu, Y., Yao, Y., Zi, S., Chen, B., & Xiao, G. (2023). Comparative Transcriptome Analysis of Defense Response of Potato to *Phthorimaea operculella* Infestation. *Plants (Basel)*, 12(17):3092. <https://doi.org/10.3390/plants12173092>
- Zhu, F., Xi, D. H., Yuan, S., Xu, F., Zhang, D. W., & Lin, H. H. (2014). Salicylic acid and jasmonic acid are essential for systemic resistance against tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(6):567–577. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-13-0349-R>
- Zhu, J., Chen, H., Liu, L., Xia, X., Yan, X., Mi, X., Liu, S., & Wei, C. (2024). JA-mediated MYC2/LOX/AOS feedback loop regulates osmotic stress response in tea plant. *Horticultural Plant Journal*, 10(3):931-946. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2022.10.014>

Zhu, Y., Qi, Y., Xun, Y., Owens, R., & Ding, B. (2002). Movement of potato spindle tuber viroid reveals regulatory points of phloem-mediated RNA traffic. *Plant Physiology*, 130(1):138–146.
<https://doi.org/10.1104/pp.006403>

Ocjena rada
u tileku

7. SAŽETAK

Viroid vretenastog gomolja krumpira (PSTVd) uzrokuje značajne promjene u biljkama krumpira, uključujući morfološke promjene, pojavu oksidativnog stresa te promjene u signalizaciji fitohormona. U ovom doktorskom radu istražen je utjecaj infekcije PSTVd na divlji tip (wt) i transgenične linije krumpira deficitarne za salicilnu kiselinu (*NahG*), deficitarne za JA (*opr3*) te neosjetljive na JA (*coi1*). Cilj istraživanja bio je istražiti ulogu SA i JA u biljnom odgovoru na viroidnu infekciju te utvrditi kako tretmani s analogom SA (INA) i metil jasmonskom kiselinom (MeJA) utječu na simptome i akumulaciju viroidne RNA.

Rezultati su pokazali da nedostatak SA u *NahG* biljkama povećava osjetljivost na infekciju PSTVd, što se očitovalo u jačim simptomima i većoj akumulaciji viroidne RNA u odnosu na wt biljke. INA tretman značajno je smanjio simptome infekcije, smanjio akumulaciju viroidne RNA i oksidativni stres, što ukazuje na ulogu SA u otpornosti biljaka na viroidne infekcije. S druge strane, JA-transgenične biljke, *opr3* i *coi1*, pokazale su manju akumulaciju ROS i sporiji razvoj simptoma, dok je MeJA tretman smanjio simptome i akumulaciju viroidne RNA.

Ekspresija gena povezanih sa SA i JA signalizacijom pokazala je razlike između wt i transgeničnih linija, pri čemu su SA- i JA-signalni putevi važni za aktivaciju obrambenih odgovora na PSTVd. Osim toga, akumulacija ROS i kaloze također je bila regulirana fitohormonima, naglašavajući važnost ovih signalnih puteva u obrani biljaka od viroidnih patogena.

Ovi rezultati ističu važnost kombinacije SA- i JA-signalnih puteva u odgovoru krumpira na viroidne infekcije te sugeriraju da tretmani fitohormonima mogu pružiti strategiju za ublažavanje simptoma i smanjenje širenja infekcije. Ovo istraživanje doprinosi razumijevanju molekularnih mehanizama obrane biljaka te nudi potencijalne smjernice za razvoj otpornijih kultivara krumpira.

8. SUMMARY

Potato spindle tuber viroid (PSTVd) causes significant changes in potato plants, including morphological alterations, oxidative stress, and hormone signaling disruptions. In this dissertation, the impact of PSTVd infection on wild-type (wt) and transgenic potato lines deficient in salicylic acid (*NahG*), jasmonic acid (*opr3*) and plants that are insensitive to jasmonic acid (*coi1*). The objective was to explore the roles of salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) in the plant response to viroid infection and determine how treatments with an SA analogue (INA) and methyl jasmonate (MeJA) influence symptoms and viroid RNA accumulation.

The results showed that SA deficiency in *NahG* plants increased susceptibility to PSTVd infection, resulting in more severe symptoms and higher viroid RNA accumulation compared to wt plants. INA treatment significantly reduced infection symptoms, lowered viroid RNA accumulation, and mitigated oxidative stress, highlighting the crucial role of SA in plant resistance to viroid infection. On the other hand, JA-transgenic plants, *opr3* and *coi1*, exhibited reduced ROS accumulation and slower symptom development, while MeJA treatment alleviated symptoms and reduced viroid RNA accumulation.

Gene expression analyses revealed differences between wt and transgenic lines, indicating that SA and JA signaling pathways are essential for activating defense responses to PSTVd. Additionally, ROS and callose accumulation were regulated by phytohormones, emphasizing the importance of these signaling pathways in plant defense against viroid pathogens.

These findings accentuate the significance of SA and JA signaling in potato's response to viroid infection and suggest that hormone treatments can offer strategies to mitigate symptoms and limit the spread of infection. This study contributes to the understanding of molecular defense mechanisms in plants and offers potential guidelines for developing more resistant potato cultivars.

9. PRILOZI

Prilog 1. Lista početnica korištenih za RTqPCR analize ekspresije gena

ID gena (NCBI)	Ime gena	Naziv početnice	Nukleotidna sekvenca 5'-3'	Duljina umnoženog PCR produkta (pb)
102577714	LOX3	LOX3-F ^a	GCAGAAAGCCAACAAAAGCA	159
		LOX3-R ^a	CGGGGATAAGGAAGTGAACA	
102583480	LOX6	LOX6-F	TGTGTCACACCCTTCTTTCTTC	119
		LOX6-R	AAGTGGAGTGGATCTTGATTGAG	
102586989	OPR3	OPR3-F ^b	CCAGGGATTTCACAAAGGA	206
		OPR3-R ^b	TGAGTTCCATCAGGCATCAG	
102578750	JAR1	JAR1-F ^a	CCATTTCAGTCCCAGAAGATCACG	115
		JAR1-R ^a	TGGAGGCAGCAGCACAGC	
102584101	COI1	COI1-F ^a	TTGTGTTTGGATTCGGTTTT	152
		COI1-R ^a	ATCTGCCACCACCTCTTGC	
102580049	JAZ1	JAZ1-F ^a	TTCATCATCGTCATCGTCGT	235
		JAZ1-R ^a	GGGGTTTTGTTTGTGGCTA	
102590233	MYC2	MYC2-F	CGGCCCAATTCAGCTTCAT	112
		MYC2-R	GACCCTAATTCGAACACGCC	
102589572	ICS	ICS-F	ATGTGCATCAACGGAGCTTC	185
		ICS-R	TGGGCTGTTGCATCAAATCG	
102596017	PAL9	PAL9-F	TGCTGATGATCCCTGCAGTTCA	204
		PAL9-R	GGGTTGCCACTTTCAAGCATAG	
102596891	PAL1	PAL1-F ^a	GCTTCAAGGCTACTCTGGCATTAG	111
		PAL1-R ^a	CCTGAGGCAGTGACCGTTCC	
102590256	SCMT	SCMT-F	AGAGGTAGCAAGGGAAAACGG	142
		SCMT-R	GTGAGCCAGCATTGATTCTTGG	
102592156	NPR1	NPR1-F ^c	GGTGCACCGATGCATTTTGT	146
		NPR1-R ^c	AATAGGCGAGCACACTGACC	
102601928	NPR3	NPR3-F	ACTTCATTCTGTACAGCAAGC	72
		NPR3-R	GTGGAAGAAAGCTGCAGTCTG	
102604313	SARD1	SARD1-F	GCGTAATTGCTTGTTGTTTGATG	72

		SARD1-R	ACTTTTTGCCCTCTCTTTATGG	
102577780	PR-1b	PR1b-F ^d	TGGTGATTTCACGGGGAGGGCA	100
		PR1b-R ^d	TCCGCACACTTGTCGCTTGCA	
102577780	PR-1	PR1-F ^a	GGGAGAAGCCAAACTACAACATG	116
		PR1-R ^a	ACGAGCCCGACCACAACC	
102577444	PR-2	PR2-F ^a	GATGGAACGAACAGGAGGAG	150
		PR2-R ^a	GGCTTTCTCGGACTACCTTC	
102605428	PRQ	PRQ-F	GCTTGACTACGCGCTGTTTA	192
		PRQ-R	TCAATGGACGTCAATTGCC	
102594623	MKK6	MKK6-F	TAGCAGTCCACCACCTTCTG	180
		MKK6-R	AGGCTACTGACAAGGATGCT	
102584056	MAPK4	MAPK4-F ^b	TTTGGTCAGTGGGTTGCATA	222
		MAPK4-R ^b	GGGGAGATGAATTTGGGAAT	
102585585	MAPK3	MAPK3-F ^d	CAGCAACCAAGGTATAATGTTT	90
		MAPK3-R ^d	CTGTCATATTCTCGTTCTCTAGG	
102592852	MAPK7	MAPK7-F	CGGTAGCTGTCGTGTTCTTG	192
		MAPK7-R	GGGGTTCACGCAATCAAAT	
102577893	WRKY6	WRKY6-F	AACAGAGCAATCGAAGGGTT	196
		WRKY6-R	CAACCGGCGTAGTGATGATG	
102603786	DWF4	DWF4-F ^b	TTGGCTCTTGAAACAGGAT	167
		DWF4-R ^b	TGGAGCAGAAACCACTCCTT	
102598106	ROT3	ROT3-F ^b	TGGACCCTGGAGAAGAATTG	239
		ROT3-R ^b	CCCATCAGCATTCCTAAGA	
102582416	ILR1	ILR1-F ^b	AAATGGTTGACTGGGAGCAC	254
		ILR1-R ^b	CAAAGGAAAGTTGGGATGGA	
102597643	ARF8	ARF8-F ^b	ACAGATGTTCCGGATCGAAG	264
		ARF8-R ^b	AGTCCGGACATGAAATCTCG	
102602772	PYL4	PYL4-F	CGAGTCTGTTCAAAGTTTGCTTG	97
		PYL4-R	GATGACCTCAATCCCCCAATTC	
102577541	CYP707A1	CYP707A1-F	GACAACAAGCATCGCACGAG	98
		CYP707A1-R	TGCCTGGTTGTGCTTTTTGG	
102577694	POD	POD-F ^e	CAGCAACCAAGGTATAATGTTT	140

		POD-R ^e	CGCGGATGGAGGCAAGTCT	
102586473	APX1	APX1-F ^e	ACCAATTGGCTGGTGTGTT	147
		APX1-R ^e	TCACAAACACGTCCCTCAAA	
102577720	CAT2	CAT2-F ^e	TGCCCTTCTATTGTGGTTCC	144
		CAT2-R ^e	GATGAGCACACTTTGGAGGA	
102594698	CalS12	CalS12-F	CGAGGAGGCACTGAAAATGAGGAAC	195
		CalS12-R	CGGATTTTCAGGGGGTTGGCT	
102586327	POX12	POX12-F	CACAGAAGCTCAAAGGCCTG	179
		POX12-R	CACACCCCTGAACAAAGCAA	
102588050	LiP	LiP-F ^f	ACGTAGAGATGTTTCGAGCCG	200
		LiP-R ^f	CACCAGGGCACTCATTTTCC	
102594698	CalS12	CalS12-F	CGAGGAGGCACTGAAAATGAGGAAC	195
		CalS12-R	CGGATTTTCAGGGGGTTGGCT	
102577640	EFα1	EFα1-F ^g	TACTGGTGGTTTTGAAGCTG	166
		EFα1-R ^g	AACTTCCTTCACGATTCATCATA	

F - Uzvodna početnica

R - Nizvodna početnica

a (Saubeau i sur., 2016)

b (Milanović i sur., 2019b)

c (Kužnicki i sur., 2019)

d (Alaux i sur., 2020)

e (Jiang i sur., 2020)

f (Adkar-Purushothama i sur., 2015)

g (Expósito-Rodríguez i sur., 2008)

Prilog 2. Funkcionalna klasifikacija genske ontologije (GO) svih DEG između biljaka inficiranih s PSTVd i kontrolnih mock inokuliranih biljaka (a) divljeg tipa (wt), te transgeničnih biljaka (b) *NahG* inficiranim PSTVd: glavni GO termini (oni s najviše DEG) pripadaju kategorijama biološkog procesa (engl. *biological process*, BP), stanične komponente (engl. *cellular component*, CC) i molekularna funkcija (engl. *molecular function*, MF). GeneRatio (x-os) izračunava se kao omjer između broja gena prisutnih u GO izrazu i ukupnog broja gena u kategoriji. Tablični prikaz rezultata prikazanih na Slici 33.

a)

	ID termina	Naziv GO termina (engleski)	p-vrijednost	broj UP-reguliranih gena	broj DOWN-reguliranih gena
wt					
Biological Process	GO:0015979	photosynthesis	6.98716E-09	1	28
Biological Process	GO:0009628	response to abiotic stimulus	6.98716E-09	10	36
Biological Process	GO:0009416	response to light stimulus	9.65356E-07	3	22
Biological Process	GO:0009266	response to temperature stimulus	1.71753E-06	6	15
Biological Process	GO:0009314	response to radiation	1.81760E-06	3	22
Biological Process	GO:0048511	rhythmic process	5.66444E-06	8	2
Biological Process	GO:0042752	regulation of circadian rhythm	2.39033E-05	6	1
Biological Process	GO:0007623	circadian rhythm	2.39033E-05	8	1
Biological Process	GO:0009765	photosynthesis, light harvesting	1.78911E-03	0	16
Biological Process	GO:0110102	ribulose biphosphate carboxylase complex assembly	4.13332E-03	1	2
Biological Process	GO:0009409	response to cold	4.13332E-03	5	5
Biological Process	GO:0009408	response to heat	4.13332E-03	1	10
Biological Process	GO:0042221	response to chemical	4.13332E-03	28	32
Biological Process	GO:0050896	response to stimulus	4.13332E-03	83	69
Biological Process	GO:0035966	response to topologically incorrect protein	4.66487E-03	1	7
Biological Process	GO:0015977	carbon fixation	4.73258E-03	1	4
Biological Process	GO:0042542	response to hydrogen peroxide	5.05557E-03	0	7
Biological Process	GO:0006457	protein folding	5.58238E-03	1	16
Biological Process	GO:0051259	protein complex oligomerization	1.02258E-02	1	6
Biological Process	GO:0006558	L-phenylalanine metabolic process	2.62835E-02	4	0
Biological Process	GO:0006986	response to unfolded protein	2.84398E-02	0	5
Biological Process	GO:0006979	response to oxidative stress	2.84398E-02	6	10
Cellular Component	GO:0009534	chloroplast thylakoid	1.89100E-13	1	31
Cellular Component	GO:0042651	thylakoid membrane	6.10405E-13	1	28
Cellular Component	GO:0009522	photosystem I	8.26278E-12	0	16
Cellular Component	GO:0042170	plastid membrane	1.73464E-10	2	30
Cellular Component	GO:0009526	plastid envelope	1.89146E-10	2	35
Cellular Component	GO:0009579	thylakoid	2.64748E-10	1	34
Cellular Component	GO:0034357	photosynthetic membrane	1.50328E-09	1	29
Cellular Component	GO:0009536	plastid	5.55493E-09	9	58
Cellular Component	GO:0009507	chloroplast	6.76086E-09	8	55
Cellular Component	GO:0009523	photosystem II	1.43713E-08	0	15
Cellular Component	GO:0031975	envelope	2.25560E-06	4	38
Cellular Component	GO:0009521	photosystem	4.45554E-06	0	18
Cellular Component	GO:0031984	organelle subcompartment	4.38837E-05	4	33
Cellular Component	GO:0009570	chloroplast stroma	3.53801E-02	3	10
Molecular Function	GO:0044183	protein folding chaperone	2.11535E-04	1	7
Molecular Function	GO:0016168	chlorophyll binding	3.58092E-03	0	13
Molecular Function	GO:0051082	unfolded protein binding	1.13651E-02	0	12
Molecular Function	GO:0051787	misfolded protein binding	2.70901E-02	0	5

b)

NahG	ID termina	Naziv GO termina (engleski)	p-vrijednost	broj UP-reguliranih gena	broj DOWN-reguliranih gena
Biological Process	GO:0006817	phosphate ion transport	0.01144	5	15
Biological Process	GO:0015698	inorganic anion transport	0.01144	5	18
Biological Process	GO:0009620	response to fungus	0.01144	5	24
Biological Process	GO:0050832	defense response to fungus	0.03672	3	19
Biological Process	GO:0006820	anion transport	0.03672	5	20
Biological Process	GO:0006811	ion transport	0.03672	11	28
Cellular Component	GO:0005886	plasma membrane	0.00009	20	52
Cellular Component	GO:0071944	cell periphery	0.00112	23	54
Cellular Component	GO:0016021	integral component of membrane	0.00454	44	148
Cellular Component	GO:0005887	integral component of plasma membrane	0.03198	1	7
Cellular Component	GO:0031226	intrinsic component of plasma membrane	0.04853	3	11
Cellular Component	GO:0016020	membrane	0.04853	54	166

Prilog 3. Funkcionalna klasifikacija genske ontologije (GO) svih DEG između biljaka inficiranih s PSTVd i kontrolnih mock inokuliranih transgeničnih biljaka (a) *opr3*, (b) *coi1* inficiranim PSTVd: glavni GO termini (oni s najviše DEG) pripadaju kategorijama biološkog procesa (engl. *biological process*, BP), stanične komponente (engl. *cellular component*, CC) i molekularna funkcija (engl. *molecular function*, MF). GeneRatio (x-os) izračunava se kao omjer između broja gena prisutnih u GO izrazu i ukupnog broja gena u kategoriji. Tablični prikaz rezultata prikazanih na Slici 36.

a)

<i>opr3</i>	ID termina	Naziv GO termina (engleski)	p-vrijednost	broj UP-reguliranih gena	broj DOWN-reguliranih gena
Biological Process	GO:0042221	response to chemical	9.41657E-06	39	27
Biological Process	GO:0010033	response to organic substance	1.24446E-05	34	18
Biological Process	GO:0009628	response to abiotic stimulus	1.74609E-04	15	19
Biological Process	GO:0009416	response to light stimulus	1.84100E-04	7	13
Biological Process	GO:0009765	photosynthesis, light harvesting	6.04101E-04	0	8
Biological Process	GO:0070887	cellular response to chemical stimulus	2.89088E-03	18	17
Biological Process	GO:0071310	cellular response to organic substance	9.12038E-03	15	11
Biological Process	GO:0050896	response to stimulus	1.23060E-02	81	54
Biological Process	GO:1901362	organic cyclic compound biosynthetic process	1.34708E-02	66	23
Biological Process	GO:0015744	succinate transport	2.75469E-02	2	0
Biological Process	GO:0015709	thiosulfate transport	2.75469E-02	2	0
Biological Process	GO:0010143	cutin biosynthetic process	2.75469E-02	4	0
Biological Process	GO:0009725	response to hormone	2.75469E-02	25	7
Biological Process	GO:1902969	mitotic DNA replication	2.76558E-02	0	3
Biological Process	GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	2.76558E-02	12	3
Biological Process	GO:0045487	gibberellin catabolic process	3.30049E-02	2	1
Biological Process	GO:0016115	terpenoid catabolic process	3.30049E-02	2	1
Biological Process	GO:0009699	phenylpropanoid biosynthetic process	3.30049E-02	9	3
Biological Process	GO:0032502	developmental process	3.65210E-02	25	11
Biological Process	GO:000727	double-strand break repair via break-induced replication	4.14535E-02	0	3
Biological Process	GO:0006869	lipid transport	4.14535E-02	10	0
Biological Process	GO:0009698	phenylpropanoid metabolic process	4.61971E-02	10	4
Biological Process	GO:0044786	cell cycle DNA replication	4.87685E-02	2	3
Cellular Component	GO:0005576	extracellular region	1.40005E-04	33	4
Cellular Component	GO:0009522	photosystem I	1.95682E-03	0	8
Cellular Component	GO:0009523	photosystem II	2.89047E-03	0	9
Cellular Component	GO:0005618	cell wall	1.30025E-02	14	1
Cellular Component	GO:0005788	endoplasmic reticulum lumen	1.68342E-02	0	4
Cellular Component	GO:005035	chloroplast thylakoid membrane	1.68342E-02	1	11
Molecular Function	GO:0046912	acyltransferase activity, acyl groups converted into alkyl on transfer	1.53564E-02	0	5
Molecular Function	GO:0016746	acyltransferase activity	1.53564E-02	17	8
Molecular Function	GO:0015117	thiosulfate transmembrane transporter activity	2.56898E-02	2	0
Molecular Function	GO:0072328	alkene binding	2.56898E-02	3	0
Molecular Function	GO:0051740	ethylene binding	2.56898E-02	3	0
Molecular Function	GO:0044183	protein folding chaperone	2.56898E-02	1	4
Molecular Function	GO:0140110	transcription regulator activity	2.56898E-02	40	9
Molecular Function	GO:0003824	catalytic activity	3.07376E-02	141	102
Molecular Function	GO:0052634	C-19 gibberellin 2-beta-dioxygenase activity	3.10473E-02	2	1
Molecular Function	GO:0050366	tyramine N-feruloyltransferase activity	3.67787E-02	2	0
Molecular Function	GO:0000234	phosphoethanolamine N-methyltransferase activity	3.67787E-02	0	2
Molecular Function	GO:0015141	succinate transmembrane transporter activity	3.67787E-02	2	0
Molecular Function	GO:0046577	long-chain-alcohol oxidase activity	3.67787E-02	0	2
Molecular Function	GO:0015131	oxaloacetate transmembrane transporter activity	3.67787E-02	2	0
Molecular Function	GO:0045543	gibberellin 2-beta-dioxygenase activity	3.67787E-02	2	1
Molecular Function	GO:0051787	misfolded protein binding	3.67787E-02	0	4
Molecular Function	GO:0016491	oxidoreductase activity	3.67787E-02	33	31
Molecular Function	GO:0051082	unfolded protein binding	4.52608E-02	0	9
Molecular Function	GO:0090447	glycerol-3-phosphate 2-O-acyltransferase activity	4.97532E-02	3	0
Molecular Function	GO:0046906	tetrapyrrole binding	4.97532E-02	7	22

b)

<i>coi1</i>	ID termina	Naziv GO termina (engleski)	p-vrijednost	broj UP-reguliranih gena	broj DOWN-reguliranih gena
Biological Process	GO:0015979	photosynthesis	6.63958E-15	0	59
Biological Process	GO:0009765	photosynthesis, light harvesting	6.01304E-12	0	21
Biological Process	GO:0009416	response to light stimulus	2.42321E-10	8	41
Biological Process	GO:0018298	protein-chromophore linkage	4.29129E-10	0	24
Biological Process	GO:0009628	response to abiotic stimulus	7.51323E-09	21	60
Biological Process	GO:0019684	photosynthesis, light reaction	3.34392E-05	0	32
Biological Process	GO:0015995	chlorophyll biosynthetic process	2.82468E-03	1	8
Biological Process	GO:0042221	response to chemical	3.15461E-03	65	63
Biological Process	GO:0015994	chlorophyll biosynthetic process	4.37469E-03	2	9
Biological Process	GO:0033013	tetrapyrrole metabolic process	7.33623E-03	2	12
Biological Process	GO:0050896	response to stimulus	1.20082E-02	144	197
Biological Process	GO:0006779	porphyrin-containing compound biosynthetic process	1.43221E-02	1	10
Biological Process	GO:0048511	rhythmic process	1.67251E-02	2	8
Biological Process	GO:0033014	tetrapyrrole biosynthetic process	2.19696E-02	1	10
Biological Process	GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	4.30563E-02	9	41
Biological Process	GO:0010105	negative regulation of ethylene-activated signalling pathway	4.54121E-02	5	0
Biological Process	GO:0070298	negative regulation of phosphorelay signal transduction system	4.54121E-02	5	0
Biological Process	GO:0006595	polyamine metabolic process	4.54121E-02	4	3
Biological Process	GO:1901700	response to oxygen-containing compound	4.54121E-02	20	31
Biological Process	GO:0006082	organic acid metabolic process	4.54121E-02	62	33
Biological Process	GO:0044281	small molecule metabolic process	4.54121E-02	89	45
Cellular Component	GO:0009522	photosystem I	1.97357E-22	0	32
Cellular Component	GO:0042651	thylakoid membrane	2.82051E-17	3	48
Cellular Component	GO:0009534	chloroplast thylakoid	5.47942E-15	3	49
Cellular Component	GO:0034357	photosynthetic membrane	4.29550E-14	3	55
Cellular Component	GO:0009523	photosystem II	2.27762E-13	0	28
Cellular Component	GO:0042170	plastid membrane	1.56024E-12	6	50
Cellular Component	GO:0009579	thylakoid	4.64860E-12	4	58
Cellular Component	GO:0009521	photosystem	1.68367E-11	0	39
Cellular Component	GO:0009526	plastid envelope	2.03800E-11	9	55
Cellular Component	GO:0009507	chloroplast	1.67756E-08	26	91
Cellular Component	GO:0009536	plastid	1.67756E-08	31	94
Cellular Component	GO:0009538	photosystem I reaction center	4.60927E-05	0	6
Cellular Component	GO:0031975	envelope	2.57980E-04	14	57
Cellular Component	GO:0031984	organelle subcompartment	5.56423E-04	10	56
Cellular Component	GO:0005886	plasma membrane	1.98042E-03	64	66
Cellular Component	GO:0005615	extracellular space	3.01875E-03	7	10
Cellular Component	GO:0098807	chloroplast thylakoid membrane protein complex	9.15149E-03	0	3
Cellular Component	GO:0071944	cell periphery	9.79746E-03	71	75
Cellular Component	GO:0016021	integral component of membrane	2.32993E-02	201	211
Cellular Component	GO:0031224	intrinsic component of membrane	2.37717E-02	203	216
Cellular Component	GO:0005576	extracellular region	2.98326E-02	28	34
Cellular Component	GO:0030093	chloroplast photosystem I	3.34883E-02	0	2
Molecular Function	GO:0003824	catalytic activity	3.02073E-03	334	323
Molecular Function	GO:0016168	chlorophyll binding	9.32829E-03	0	21
Molecular Function	GO:0016630	protochlorophyllid reductase activity	2.36120E-02	0	3
Molecular Function	GO:0016703	oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation	2.36120E-02	1	3
Molecular Function	GO:0001555	phosphorelay sensor kinase activity	2.36120E-02	4	3
Molecular Function	GO:0004673	protein histidine kinase activity	2.36120E-02	4	3
Molecular Function	GO:0038199	ethylene receptor activity	2.95074E-02	4	0
Molecular Function	GO:0016491	oxidoreductase activity	2.95074E-02	69	89
Molecular Function	GO:0051740	ethylene binding	4.55638E-02	4	0

Prilog 4. Promjene u koncentraciji endogenih hormona u mock i PSTVd-inokuliranim listovima divljih (wt) i transgeničnih biljaka *NahG* krumpira (statistička analiza rezultata prikazanih na Slici 43.). Fitohormoni su kvantificirani 4 do 7 wpi, pomoću UHPLC-MS/MS. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti ($\pm$ SE; n=6-8 po vremenskoj točki) iz dva eksperimenta. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između tretmana ($p < 0,05$, prema Tukeyevom testu). LOD-engl. *limit of detection*, granica detekcije.

			ABA			IAA			SA			cís- OPDA			JA-Ile			CS		
linija	tretman	wpi	srednja vrijednost	±	SE	srednja vrijednost	±	SE	srednja vrijednost	±	SE	srednja vrijednost	±	SE	srednja vrijednost	±	SE	srednja vrijednost	±	SE
wt	mock	4	188.62	±	26.67 ^b	102.11	±	15.33 ^a	1547.92	±	172.59 ^{def}	28009.75	±	6587.47 ^{ef}	0.22	±	0.03 ^c	64.39	±	10.17 ^{de}
		5	162.97	±	15.75 ^{bcd}	67.07	±	8.84 ^{bcd}	2239.78	±	429.30 ^{bcd}	66058.31	±	10655.24 ^{bcde}	0.34	±	0.04 ^c	68.63	±	9.73 ^{de}
		6	79.16	±	6.85 ^g	48.10	±	6.27 ^d	3112.00	±	535.87 ^b	21597.01	±	2902.85 ^{ef}	0.10	±	0.02 ^c	96.31	±	15.75 ^{cde}
		7	90.26	±	6.84 ^{fg}	68.23	±	5.67 ^{bcd}	6891.23	±	1117.57 ^a	84457.50	±	13497.21 ^{bcd}	1.22	±	0.19 ^{bc}	145.25	±	24.07 ^{ab}
	PSTVd	4	179.49	±	17.35 ^{bc}	79.13	±	11.19 ^{ab}	993.29	±	90.69 ^{ef}	16259.23	±	4929.64 ^f	0.10	±	0.02 ^c	54.99	±	6.17 ^e
		5	137.86	±	8.29 ^{cdef}	102.10	±	10.10 ^a	1763.74	±	252.16 ^{cde}	22834.40	±	6927.63 ^{ef}	0.14	±	0.02 ^c	67.02	±	5.83 ^{de}
		6	107.34	±	8.10 ^{efg}	73.36	±	6.40 ^{bcd}	2455.05	±	543.53 ^{bc}	40503.95	±	6040.95 ^{def}	0.90	±	0.39 ^{bc}	77.95	±	7.16 ^{de}
		7	99.23	±	14.49 ^{fg}	77.40	±	6.76 ^{bc}	4319.91	±	510.81 ^a	85745.50	±	15690.97 ^{bcd}	3.11	±	1.34 ^{ab}	133.75	±	12.85 ^{abc}
NahG	mock	4	174.58	±	11.50 ^{bc}	55.90	±	4.66 ^{bcd}	766.91	±	120.92 ^{ef}	38496.72	±	6695.71 ^{def}	0.20	±	0.02 ^c	51.05	±	4.72 ^e
		5	163.37	±	15.96 ^{bcd}	67.63	±	5.99 ^{bcd}	1131.20	±	216.32 ^{ef}	101931.68	±	22730.72 ^b	<LOD			82.36	±	6.44 ^{de}
		6	128.12	±	9.35 ^{def}	51.47	±	7.39 ^{cd}	695.56	±	198.34 ^f	75022.09	±	13588.55 ^{bcd}	0.26	±	0.04 ^c	51.74	±	4.09 ^e
		7	131.59	±	8.39 ^{def}	60.11	±	5.28 ^{bcd}	1093.40	±	460.92 ^{ef}	102154.76	±	13713.43 ^b	<LOD			103.28	±	14.19 ^{bcd}
	PSTVd	4	233.39	±	15.23 ^a	67.00	±	4.94 ^{bcd}	833.87	±	126.40 ^{ef}	52417.88	±	8958.89 ^{cdef}	<LOD			52.07	±	3.64 ^e
		5	144.75	±	7.84 ^{cde}	70.30	±	4.18 ^{bcd}	877.66	±	106.46 ^{ef}	82025.81	±	11941.06 ^{bcd}	<LOD			89.94	±	7.76 ^{cde}
		6	114.36	±	6.97 ^{efg}	65.97	±	5.30 ^{bcd}	812.36	±	185.92 ^{ef}	95201.17	±	9104.02 ^{bc}	2.61	±	0.77 ^{abc}	109.33	±	11.48 ^{bcd}
		7	118.94	±	7.46 ^{efg}	80.54	±	9.54 ^{ab}	553.61	±	69.56 ^f	148718.54	±	17233.24 ^a	3.99	±	1.03 ^a	175.57	±	26.53 ^a

Prilog 5. Promjene u koncentraciji endogenih hormona u mock i PSTVd-inokuliranim gomoljima divljih (wt) i transgeničnih biljaka *NahG* krumpira (statistička analiza rezultata prikazanih na Slici 44.). Fitohormoni su kvantificirani 4 do 7 wpi, pomoću UHPLC-MS/MS. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti ($\pm$ SE; n=6-8 po vremenskoj točki) iz dva eksperimenta. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između tretmana ($p < 0,05$, prema Tukeyevom testu). LOD-engl. *limit of detection*, granica detekcije.

			ABA			IAA			SA			cis-OPDA			JA			JA-Ile			CS		
linija	tretman	wpi	srednja vrijednost	$\pm$	SE	srednja vrijednost	$\pm$	SE	srednja vrijednost	$\pm$	SE	srednja vrijednost	$\pm$	SE	srednja vrijednost	$\pm$	SE	srednja vrijednost	$\pm$	SE	srednja vrijednost	$\pm$	SE
wt	mock	6	47.30 $\pm$	3.90 ^b		55.20 $\pm$	5.50 ^{bc}		229.10 $\pm$	30.90 ^{ab}		9221.90 $\pm$	1198.70 ^a		27.80 $\pm$	4.80 ^{ab}		3.60 $\pm$	0.90 ^a		LOD	$\pm$ LOD	
		7	92.40 $\pm$	7.70 ^{ab}		68.30 $\pm$	8.00 ^{bc}		143.20 $\pm$	21.70 ^{cd}		6266.90 $\pm$	762.40 ^{ab}		12.60 $\pm$	1.00 ^b		1.20 $\pm$	0.20 ^a		LOD	$\pm$ LOD	
		8	78.10 $\pm$	4.20 ^{ab}		95.00 $\pm$	11.80 ^{ab}		233.80 $\pm$	33.40 ^{ab}		4231.00 $\pm$	885.50 ^b		14.20 $\pm$	1.50 ^b		0.70 $\pm$	0.10 ^a		LOD	$\pm$ LOD	
	INF	6	61.70 $\pm$	4.50 ^{ab}		39.10 $\pm$	3.90 ^c		193.00 $\pm$	26.10 ^{abc}		5326.70 $\pm$	728.20 ^{ab}		12.20 $\pm$	2.70 ^b		2.00 $\pm$	0.50 ^a		LOD	$\pm$ LOD	
		7	102.40 $\pm$	8.70 ^a		76.70 $\pm$	9.90 ^{abc}		244.50 $\pm$	24.90 ^a		6593.80 $\pm$	488.70 ^{ab}		21.40 $\pm$	3.10 ^b		1.60 $\pm$	0.40 ^a		LOD	$\pm$ LOD	
		8	74.80 $\pm$	10.80 ^{ab}		100.60 $\pm$	10.80 ^{ab}		154.20 $\pm$	16.20 ^{bcd}		7449.10 $\pm$	965.00 ^{ab}		45.50 $\pm$	7.30 ^{ab}		5.90 $\pm$	1.00 ^a		LOD	$\pm$ LOD	
<i>NahG</i>	mock	6	77.60 $\pm$	10.20 ^{ab}		81.70 $\pm$	8.50 ^{abc}		174.00 $\pm$	44.40 ^d		6666.40 $\pm$	428.00 ^{ab}		16.80	3.50 ^b		2.20 $\pm$	0.30 ^a		LOD	$\pm$ LOD	
		7	98.20 $\pm$	6.50 ^a		60.40 $\pm$	4.20 ^{bc}		33.10 $\pm$	4.50 ^d		7024.90 $\pm$	651.00 ^{ab}		21.90 $\pm$	1.90 ^b		2.30 $\pm$	0.40 ^a		LOD	$\pm$ LOD	
		8	94.80 $\pm$	7.90 ^{ab}		93.70 $\pm$	5.60 ^{ab}		162.10 $\pm$	40.00 ^{cd}		7280.20 $\pm$	812.20 ^{ab}		31.50 $\pm$	5.80 ^{ab}		1.20 $\pm$	0.10 ^a		LOD	$\pm$ LOD	
	INF	6	88.10 $\pm$	6.80 ^{ab}		47.70 $\pm$	6.20 ^{bc}		LOD $\pm$	LOD ^d		6220.30 $\pm$	785.70 ^{ab}		23.40	4.20 ^b		2.30 $\pm$	0.50 ^a		LOD	$\pm$ LOD	
		7	96.10 $\pm$	6.90 ^a		110.20 $\pm$	13.90 ^a		152.40 $\pm$	60.50 ^d		8436.00 $\pm$	535.00 ^{ab}		47.60 $\pm$	7.50 ^a		4.00 $\pm$	0.40 ^a		LOD	$\pm$ LOD	
		8	74.40 $\pm$	6.60 ^{ab}		93.80 $\pm$	10.20 ^{ab}		LOD $\pm$	LOD ^d		6822.90 $\pm$	793.90 ^{ab}		45.80 $\pm$	7.80 ^a		2.60 $\pm$	0.50 ^a		LOD	$\pm$ LOD	

Prilog 6. Profili ekspresije gena uključenih u metabolizam fitohormona u divljem tipu i transgeničnim *NahG* biljkama krumpira inficiranim PSTVd (statistička analiza rezultata prikazanih na Slici 45.). Metodom two-step RTqPCR analizirana je ekspresija gena 4 do 7 wpi. Vrijednosti pokazuju srednju log2 fold change ($\pm$ SE, n=9).

		wt PSTVd vs. wt mock								
Signalni put	Simbol gena	ID gena	4 wpi		5 wpi		6 wpi		7 wpi	
			FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE
JA	LOX3	102577714	-1.13	± 0.39	-19.91	± 0.22	-5.57	± 0.36	-34.24	± 0.51
	LOX6	102583480	1.89	± 0.19	1.35	± 0.14	1.61	± 0.18	1.58	± 0.35
	OPR3	102586989	1.28	± 3.35	1.18	± 0.20	1.72	± 0.13	1.48	± 0.45
	JAR1	102578750	-1.40	± 0.07	1.00	± 0.11	1.88	± 0.11	-3.90	± 0.18
	COI1	102584101	-7.03	± 1.86	1.51	± 0.18	2.91	± 0.20	1.32	± 0.18
SA	ICS1	102589572	-3.62	± 3.31	2.71	± 0.20	10.27	± 0.18	1.97	± 0.29
	SCMT	102590256	1.18	± 0.26	-4.61	± 0.42	1.73	± 0.18	1.55	± 0.26
	NPR1	102592156	-1.87	± 0.07	-1.53	± 0.15	-1.27	± 0.12	1.79	± 0.29
	PAL9	102596017	-1.47	± 0.32	-6.26	± 0.21	1.63	± 0.14	5.04	± 0.24
PRs	PR1	102577780	1.09	± 0.22	-1.82	± 0.16	-1.08	± 0.49	-1.03	± 0.38
	PR2	102577444	-1.21	± 0.29	-6.05	± 0.17	-1.08	± 0.44	-39.74	± 0.53
	PR1b	102577780	1.66	± 0.28	1.02	± 0.23	1.94	± 0.54	-3.85	± 0.60
BR	DWF4	102603786	13.17	± 2.77	3.02	± 0.31	1.64	± 0.21	2.26	± 0.20
	ROT3	102598106	-24.22	± 2.08	1.51	± 0.23	4.53	± 0.20	2.05	± 0.58
AUX	ILR1	102605112	11.12	± 2.89	3.92	± 0.35	1.86	± 0.15	-4.86	± 0.57
	ARF8	102597704	1.57	± 0.30	2.05	± 0.22	1.97	± 0.19	-1.44	± 0.41
ABA	CYP707A1	102577541	-1.70	± 0.37	-4.40	± 0.37	-1.42	± 0.23	1.41	± 0.25
	PYL4	102602772	-1.51	± 0.30	-3.08	± 0.18	-1.79	± 0.24	-1.87	± 0.36
Antioksidativni odgovor	POD	102577694	1.41	± 0.31	2.82	± 0.13	1.83	± 0.36	-2.24	± 0.44
	APX1	102586473	1.19	± 0.16	1.56	± 0.13	1.73	± 0.34	-1.14	± 0.34
	CAT2	102577720	1.07	± 0.31	1.29	± 0.18	2.03	± 0.36	-1.37	± 0.47
	CalS12	102594698	1.00	± 0.17	1.93	± 0.15	1.16	± 0.35	-2.50	± 0.45

		NahG PSTVd vs. NahG mock								
Signalni put	Simbol gena	ID gena	4 wpi		5 wpi		6 wpi		7 wpi	
			FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE
JA	LOX3	102577714	1.05	± 0.44	1.38	± 0.23	-10.03	± 0.42	-4.60	± 0.44
	LOX6	102583480	1.18	± 0.18	-1.45	± 0.09	2.26	± 0.13	-1.21	± 0.17
	OPR3	102586989	-1.04	± 0.22	1.97	± 0.20	2.40	± 0.26	1.56	± 0.13
	JAR1	102578750	-1.02	± 0.11	1.42	± 0.12	1.91	± 0.14	-1.17	± 0.12
	COI1	102584101	1.05	± 0.20	-1.27	± 0.12	-1.19	± 0.26	1.01	± 0.17
SA	ICS1	102589572	2.13	± 0.21	2.15	± 0.19	1.11	± 0.34	1.57	± 0.26
	SCMT	102590256	2.38	± 0.68	1.89	± 0.19	3.52	± 0.12	1.19	± 0.11
	NPR1	102592156	1.03	± 0.07	1.44	± 0.11	3.32	± 0.08	1.38	± 0.17
	PAL9	102596017	3.13	± 0.33	1.98	± 0.16	7.96	± 0.16	-1.76	± 0.17
PRs	PR1	102577780	4.84	± 0.20	-1.43	± 0.30	1.68	± 0.36	1.98	± 0.55
	PR2	102577444	1.44	± 0.36	1.50	± 0.38	-3.16	± 0.27	-2.50	± 0.56
	PR1b	102577780	5.16	± 0.22	-1.76	± 0.37	1.13	± 0.35	2.20	± 0.49
BR	DWF4	102603786	1.25	± 0.38	1.20	± 0.16	5.80	± 0.26	1.28	± 0.20
	ROT3	102598106	-1.39	± 0.21	1.48	± 0.19	-1.33	± 0.33	-1.67	± 0.18
AUX	ILR1	102605112	-1.62	± 0.31	1.55	± 0.09	4.91	± 0.14	1.62	± 0.16
	ARF8	102597704	5.53	± 0.90	13.28	± 0.46	1.28	± 0.42	2.09	± 0.25
ABA	CYP707A1	102577541	1.98	± 0.71	1.25	± 0.87	1.42	± 0.31	1.73	± 0.13
	PYL4	102602772	1.78	± 0.79	1.23	± 0.17	-1.37	± 0.31	1.99	± 0.28
Antioksidativni odgovor	POD	102577694	3.12	± 0.19	-1.36	± 0.33	1.70	± 0.30	-1.60	± 0.46
	APX1	102586473	2.23	± 0.25	1.27	± 0.24	-1.50	± 0.26	-1.46	± 0.39
	CAT2	102577720	2.04	± 0.18	-1.03	± 0.30	1.25	± 0.36	-1.84	± 0.42
	CalS12	102594698	3.84	± 0.21	1.02	± 0.29	1.36	± 0.32	-2.89	± 0.37

Prilog 7. Promjene u koncentraciji endogenih hormona u mock i PSTVd-inokuliranim listovima divljih (wt) i transgeničnih biljaka *opr3* i *coi1* krumpira (statistička analiza rezultata prikazanih na Slici 46.). Fitohormoni su kvantificirani 4 do 7 wpi, pomoću UHPLC-MS/MS. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti ($\pm$ SE; n=6-8 po vremenskoj točki) iz dva eksperimenta. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između tretmana ($p < 0,05$, prema Tukeyevom testu).

			ABA			IAA			SA			cis- OPDA			JA-Ile			CS		
linija	tretman	wpi	srednja vrijednost	±	SE	srednja vrijednost	±	SE	srednja vrijednost	±	SE	srednja vrijednost	±	SE	srednja vrijednost	±	SE	srednja vrijednost	±	SE
wt	mock	4	61.56 ±	2.05	^{bcd}	33.37 ±	4.83	^{de}	636.55 ±	37.82	^{efg}	804.33 ±	153.79	^e	0.16 ±	0.01	^{bc}	34.71 ±	7.98	^{abc}
		5	40.58 ±	4.10	^{cd}	24.63 ±	2.40	^e	814.79 ±	158.41	^g	2101.17 ±	732.12	^e	0.08 ±	0.01	^{bc}	39.12 ±	4.03	^{ab}
		6	74.65 ±	14.12	^b	26.82 ±	2.32	^e	698.48 ±	98.44	^{efg}	4885.61 ±	1358.56	^e	0.30 ±	0.05	^{bc}	31.78 ±	3.03	^{abcde}
		7	48.06 ±	3.86	^{bcd}	21.88 ±	1.69	^e	2242.71 ±	565.25	^g	12060.68 ±	1571.49	^{cde}	0.38 ±	0.07	^{bc}	44.51 ±	4.09	^a
	INF	4	73.07 ±	6.50	^{bc}	44.25 ±	5.91	^{cde}	700.97 ±	137.97	^{bcddefg}	1068.69 ±	415.84	^e	0.14 ±	0.02	^{bc}	20.92 ±	2.22	^{defgh}
		5	36.61 ±	4.91	^d	27.32 ±	3.36	^e	1038.63 ±	182.44	^{efg}	5547.07 ±	1747.93	^{de}	0.33 ±	0.11	^{bc}	36.57 ±	3.22	^{abc}
		6	80.19 ±	6.09	^b	37.71 ±	5.07	^{cde}	920.10 ±	116.67	^{cdefg}	8929.87 ±	3213.69	^e	0.46 ±	0.13	^{bc}	27.22 ±	1.78	^{bcddef}
		7	55.07 ±	6.92	^{bcd}	27.89 ±	4.15	^e	3151.06 ±	568.53	^{fg}	19731.99 ±	4444.86	^{cde}	0.36 ±	0.06	^{bc}	39.34 ±	5.00	^a
opr3	mock	4	48.44 ±	3.06	^{bcd}	73.11 ±	21.94	^b	385.36 ±	40.14	^{ab}	208.78 ±	55.56	^e	LOD			14.32 ±	1.67	^{ghi}
		5	59.28 ±	11.57	^{bcd}	42.39 ±	8.30	^{cde}	1711.83 ±	356.71	^{bcddefg}	56975.01 ±	21920.53	^{ab}	0.26 ±	0.06	^{bc}	15.31 ±	1.77	^{fghi}
		6	66.15 ±	10.65	^{bcd}	33.42 ±	4.71	^{de}	1026.12 ±	166.73	^{defg}	1210.32 ±	331.67	^e	0.06 ±	0.01	^c	32.77 ±	2.66	^{abcd}
		7	64.20 ±	9.99	^b	29.60 ±	3.16	^e	2492.24 ±	448.85	^{efg}	18458.46 ±	7937.76	^{bc}	0.23 ±	0.02	^{bc}	25.29 ±	5.96	^{cdefg}
	INF	4	48.04 ±	4.96	^{bcd}	61.67 ±	11.11	^{bc}	550.63 ±	87.28	^{abc}	198.99 ±	64.16	^e	LOD			16.08 ±	2.77	^{fghi}
		5	70.63 ±	12.58	^{bc}	34.03 ±	4.39	^{de}	1939.55 ±	256.51	^{defg}	45397.00 ±	11348.38	^a	0.74 ±	0.32	^b	20.98 ±	2.59	^{defgh}
		6	73.32 ±	7.57	^{bc}	40.30 ±	4.58	^{cde}	1324.71 ±	222.38	^{cdefg}	5371.64 ±	2101.79	^e	0.23 ±	0.02	^{bc}	21.70 ±	3.15	^{defgh}
		7	84.07 ±	8.77	^b	36.59 ±	3.48	^{de}	1456.76 ±	212.19	^{cdefg}	5515.35 ±	2031.89	^e	0.31 ±	0.04	^{bc}	34.49 ±	1.86	^{abc}
coi1	mock	4	52.54 ±	6.92	^{bcd}	116.86 ±	18.01	^a	757.88 ±	92.92	^a	411.84 ±	93.25	^e	LOD			12.26 ±	1.80	^{hi}
		5	65.11 ±	10.18	^{bcd}	33.58 ±	3.57	^{de}	2107.61 ±	610.90	^{defg}	23167.45 ±	5358.5	^{cd}	0.61 ±	0.13	^{bc}	20.27 ±	2.49	^{efghi}
		6	66.55 ±	6.21	^{bcd}	48.76 ±	6.63	^{bcd}	1809.12 ±	420.79	^{abcde}	5245.12 ±	1682.63	^{de}	0.22 ±	0.03	^{bc}	8.00 ±	1.56	ⁱ
		7	60.83 ±	8.67	^{bcd}	58.16 ±	6.63	^{bcd}	847.27 ±	130.81	^{abcd}	1699.13 ±	677.99	^e	1.52 ±	0.68	^a	16.49 ±	2.51	^{fghi}
	INF	4	54.93 ±	2.70	^{bcd}	106.41 ±	34.92	^a	849.71 ±	165.81	^a	1823.87 ±	465.08	^e	0.28 ±	0.03	^{bc}	17.09 ±	2.95	^{fghi}
		5	157.92 ±	14.88	^a	45.35 ±	7.36	^{cde}	782.59 ±	126.21	^{abcdef}	927.62 ±	164.8	^e	0.19 ±	0.05	^{bc}	12.90 ±	3.95	^{ghi}
		6	65.81 ±	7.70	^{bcd}	47.65 ±	9.86	^{cde}	1468.47 ±	288.97	^{cdefg}	4161.82 ±	1917.99	^{de}	0.16 ±	0.03	^{bc}	18.45 ±	6.29	^{fghi}
		7	58.08 ±	6.58	^{bcd}	36.11 ±	4.23	^{cde}	1070.02 ±	154.87	^{defg}	1848.23 ±	358.09	^e	0.41 ±	0.11	^{bc}	10.78 ±	2.27	^{hi}

Prilog 8. Promjene u koncentraciji endogenih hormona u mock i PSTVd-inokuliranim gomoljima divljih (wt) i transgeničnih biljaka *opr3* i *coi1* krumpira (statistička analiza rezultata prikazanih na Slici 47.). Fitohormoni su kvantificirani 4 do 7 wpi, pomoću UHPLC-MS/MS. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti ($\pm$ SE; n=6-8 po vremenskoj točki) iz dva eksperimenta. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između tretmana (p < 0,05, prema Tukeyevom testu).

linija	tretman	wpi	ABA			IAA			SA			cis-OPDA			JA			JA-Ile			CS		
			srednja vrijednost	$\pm$	SE	srednja vrijednost	$\pm$	SE	srednja vrijednost	$\pm$	SE	srednja vrijednost	$\pm$	SE	srednja vrijednost	$\pm$	SE	srednja vrijednost	$\pm$	SE	srednja vrijednost	$\pm$	SE
wt	mock	6	73.90 $\pm$		3.80 ^{bc}	98.30 $\pm$		4.70 ^{de}	345.70 $\pm$		14.10 ^{ab}	7990.80 $\pm$		869.30 ^a	27.00 $\pm$		5.60 ^a	3.30 $\pm$		0.70 ^{de}	LOD	$\pm$	LOD
		7	62.10 $\pm$		6.40 ^c	131.70 $\pm$		8.50 ^{cde}	374.00 $\pm$		33.40 ^a	5703.80 $\pm$		887.20 ^{abcd}	21.10 $\pm$		3.90 ^{abc}	2.60 $\pm$		0.40 ^{de}	LOD	$\pm$	LOD
		8	60.90 $\pm$		4.90 ^c	116.10 $\pm$		4.30 ^{cde}	166.80 $\pm$		8.50 ^b	5920.00 $\pm$		698.30 ^{abc}	26.70 $\pm$		6.20 ^a	2.20 $\pm$		0.40 ^e	LOD	$\pm$	LOD
	INF	6	78.50 $\pm$		4.90 ^{bc}	75.50 $\pm$		5.90 ^e	204.50 $\pm$		10.50 ^b	5403.30 $\pm$		340.70 ^{abcde}	20.90 $\pm$		3.80 ^{abc}	3.10 $\pm$		0.60 ^{de}	LOD	$\pm$	LOD
		7	83.50 $\pm$		5.40 ^{bc}	104.90 $\pm$		3.50 ^{de}	263.20 $\pm$		34.00 ^{ab}	6230.20 $\pm$		749.70 ^{ab}	25.40 $\pm$		4.10 ^{ab}	1.80 $\pm$		0.30 ^e	LOD	$\pm$	LOD
		8	77.00 $\pm$		7.40 ^{bc}	97.70 $\pm$		10.10 ^{de}	159.00 $\pm$		14.50 ^b	5954.70 $\pm$		666.70 ^{abc}	27.70 $\pm$		3.50 ^a	2.90 $\pm$		0.30 ^{de}	LOD	$\pm$	LOD
opr3	mock	6	73.40 $\pm$		2.60 ^{bc}	121.20 $\pm$		6.40 ^{cde}	207.20 $\pm$		18.60 ^b	4466.80 $\pm$		699.60 ^e	LOD $\pm$		LOD	0.70 $\pm$		0.10 ^{abc}	LOD	$\pm$	LOD
		7	76.80 $\pm$		4.60 ^{bc}	141.20 $\pm$		12.00 ^{cde}	171.50 $\pm$		6.30 ^b	3455.20 $\pm$		290.00 ^{bcde}	LOD $\pm$		LOD	0.90 $\pm$		0.10 ^a	LOD	$\pm$	LOD
		8	69.30 $\pm$		5.90 ^{bc}	203.90 $\pm$		14.80 ^{abc}	179.70 $\pm$		18.00 ^b	3474.00 $\pm$		229.50 ^{bcde}	LOD $\pm$		LOD	0.40 $\pm$		0.10 ^{abcd}	LOD	$\pm$	LOD
	INF	6	67.70 $\pm$		2.80 ^{bc}	134.00 $\pm$		7.40 ^{cde}	251.20 $\pm$		19.70 ^{ab}	3570.60 $\pm$		474.10 ^{bcde}	LOD $\pm$		LOD	0.90 $\pm$		0.20 ^{ab}	LOD	$\pm$	LOD
		7	117.30 $\pm$		10.50 ^a	173.40 $\pm$		17.70 ^{bcd}	170.50 $\pm$		29.30 ^b	3388.40 $\pm$		386.40 ^{bcde}	LOD $\pm$		LOD	0.60 $\pm$		0.10 ^{bcde}	LOD	$\pm$	LOD
		8	81.80 $\pm$		4.50 ^{bc}	148.30 $\pm$		24.80 ^{cde}	323.80 $\pm$		32.70 ^a	3384.00 $\pm$		309.00 ^{bcde}	LOD $\pm$		LOD	0.60 $\pm$		0.10 ^{bcde}	LOD	$\pm$	LOD
coi1	mock	6	102.60 $\pm$		2.20 ^{ab}	97.10 $\pm$		8.50 ^{de}	239.50 $\pm$		13.50 ^{ab}	2530.30 $\pm$		501.10 ^{bcde}	15.50 $\pm$		3.10 ^{abc}	3.30 $\pm$		0.70 ^{de}	LOD	$\pm$	LOD
		7	73.90 $\pm$		5.30 ^{bc}	179.60 $\pm$		21.90 ^{bcd}	242.50 $\pm$		20.50 ^{ab}	4311.20 $\pm$		566.90 ^e	17.60 $\pm$		0.70 ^{abc}	4.70 $\pm$		0.60 ^{cde}	LOD	$\pm$	LOD
		8	88.60 $\pm$		8.40 ^{abc}	251.40 $\pm$		39.80 ^{ab}	350.60 $\pm$		50.00 ^a	3696.70 $\pm$		495.10 ^{cde}	8.90 $\pm$		1.00 ^c	2.60 $\pm$		0.40 ^{de}	LOD	$\pm$	LOD
	INF	6	113.30 $\pm$		7.40 ^a	151.70 $\pm$		18.90 ^{cde}	180.00 $\pm$		15.50 ^b	4636.80 $\pm$		797.80 ^{bcde}	13.80 $\pm$		1.30 ^{abc}	2.70 $\pm$		0.60 ^{de}	LOD	$\pm$	LOD
		7	98.10 $\pm$		12.00 ^{ab}	192.40 $\pm$		9.50 ^{abc}	244.50 $\pm$		11.30 ^{ab}	4417.30 $\pm$		512.30 ^{de}	13.30 $\pm$		1.00 ^{bc}	2.30 $\pm$		0.20 ^e	LOD	$\pm$	LOD
		8	82.10 $\pm$		5.00 ^{bc}	282.90 $\pm$		42.60 ^a	191.40 $\pm$		18.10 ^b	3613.30 $\pm$		295.90 ^{de}	17.70 $\pm$		2.60 ^{abc}	3.80 $\pm$		0.70 ^{cde}	LOD	$\pm$	LOD

Prilog 9. Profili ekspresije gena uključenih u metabolizam fitohormona u divljem tipu i transgeničnim *opr3* i *coi1* biljkama krumpira inficiranim PSTVd (statistička analiza rezultata prikazanih na Slici 48.). Metodom two-step RTqPCR analizirana je ekspresija gena 4 do 7 wpi. Vrijednosti pokazuju srednju log2 fold change ($\pm$ SE, n=9).

			wt PSTVd vs. wt mock								opr3 PSTVd vs. opr3 mock								coi1 PSTVd vs. coi1 mock							
			4 wpi		5 wpi		6 wpi		7 wpi		4 wpi		5 wpi		6 wpi		7 wpi		4 wpi		5 wpi		6 wpi		7 wpi	
Signalni put	Simbol gena	ID gena	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE
JA	LOX3	102577714	-1.50	± 0.41	1.65	± 0.25	-1.94	± 0.46	1.52	± 0.41	-1.48	± 0.53	-1.40	± 0.43	-3.14	± 0.40	-1.58	± 0.48	-2.18	± 0.53	20.76	± 0.19	2.83	± 0.49	6.20	± 0.32
	LOX6	102583480	1.77	± 0.16	2.06	± 0.11	1.75	± 0.16	1.53	± 0.09	1.61	± 0.10	1.55	± 0.08	6.57	± 0.13	5.56	± 0.13	1.08	± 0.11	1.62	± 0.11	1.32	± 0.13	2.61	± 0.15
	OPR3	102586989	1.33	± 0.11	1.15	± 0.11	-1.08	± 0.05	1.39	± 0.11	-1.63	± 0.11	-1.34	± 0.22	-1.56	± 0.28	1.03	± 0.13	-1.12	± 0.13	1.19	± 0.08	1.27	± 0.09	1.03	± 0.08
	JAR1	102578750	-1.19	± 0.08	-1.25	± 0.09	1.18	± 0.08	-1.07	± 0.14	-1.43	± 0.08	-1.23	± 0.10	-1.48	± 0.27	1.30	± 0.17	1.02	± 0.07	1.55	± 0.14	1.55	± 0.21	1.30	± 0.08
	COI1	102584101	1.13	± 0.08	1.07	± 0.08	-1.02	± 0.06	-1.29	± 0.20	-1.03	± 0.06	-1.18	± 0.09	-1.10	± 0.18	1.01	± 0.16	1.19	± 0.11	1.00	± 0.16	1.31	± 0.10	-1.46	± 0.16
	JAZ1	102580049	-1.52	± 0.09	1.21	± 0.21	-1.37	± 0.30	1.53	± 0.53	1.07	± 0.10	1.19	± 0.13	-1.05	± 0.19	1.46	± 0.15	1.10	± 0.18	-1.72	± 0.11	-4.11	± 0.48	1.71	± 0.11
	MYC2	102590233	1.49	± 0.09	1.17	± 0.22	2.36	± 0.29	-1.69	± 0.27	2.25	± 0.20	1.99	± 0.16	5.56	± 0.16	3.41	± 0.14	-2.17	± 0.26	-3.81	± 0.13	1.30	± 0.27	-1.75	± 0.20
SA	ICS1	102589572	1.01	± 0.12	1.12	± 0.19	2.23	± 0.23	1.58	± 0.22	1.46	± 0.17	1.33	± 0.20	9.78	± 0.15	3.24	± 0.14	1.81	± 0.22	1.24	± 0.21	1.69	± 0.21	1.63	± 0.18
	PAL1	102596891	-3.08	± 0.08	6.66	± 0.35	1.45	± 0.45	3.46	± 0.41	1.42	± 0.22	2.96	± 0.34	3.46	± 0.66	2.88	± 0.25	-1.36	± 0.19	3.09	± 0.14	1.85	± 0.94	2.88	± 0.35
	NPR1	102592156	-2.10	± 0.08	1.06	± 0.13	-1.48	± 0.11	2.05	± 0.25	-1.79	± 0.14	1.11	± 0.19	-1.00	± 0.27	1.86	± 0.19	-1.20	± 0.09	1.34	± 0.09	1.44	± 0.13	1.86	± 0.10
	NPR3	102601928	-1.25	± 0.06	-1.41	± 0.15	-1.64	± 0.14	-1.18	± 0.10	-2.18	± 0.13	1.65	± 0.08	4.67	± 0.12	2.26	± 0.16	-1.46	± 0.14	3.12	± 0.07	1.52	± 0.13	2.22	± 0.20
	SARD1	102604313	-1.72	± 0.17	1.39	± 0.21	-1.23	± 0.32	2.15	± 0.28	-1.12	± 0.14	1.86	± 0.11	2.73	± 0.12	5.12	± 0.20	-3.90	± 0.09	-2.40	± 0.13	-2.17	± 0.36	2.28	± 0.24
PR	PR-1b	102577780	2.23	± 0.08	4.46	± 0.40	2.63	± 0.49	1.83	± 0.46	2.95	± 0.16	1.81	± 0.30	-1.54	± 0.23	1.04	± 0.12	-2.20	± 0.77	-3.07	± 0.39	1.69	± 0.55	1.04	± 0.37
	PR-2	102577444	-1.25	± 0.34	1.46	± 0.09	-1.05	± 0.31	-1.14	± 0.20	-1.99	± 0.38	2.45	± 0.30	-2.66	± 0.42	4.56	± 0.34	1.05	± 0.49	27.66	± 0.24	1.72	± 0.38	4.56	± 0.20
	PR-Q	102605428	-1.16	± 0.15	2.00	± 0.36	1.13	± 0.43	-2.13	± 0.21	1.30	± 0.52	2.13	± 0.11	1.21	± 0.28	3.25	± 0.36	-2.51	± 0.89	1.33	± 0.45	-1.85	± 0.32	2.05	± 0.43
MAPK	MPK6	102594623	1.65	± 0.30	1.51	± 0.20	-1.29	± 0.15	1.62	± 0.10	1.04	± 0.11	-1.52	± 0.14	3.46	± 0.12	2.85	± 0.10	-1.15	± 0.09	-1.40	± 0.14	-1.68	± 0.15	2.03	± 0.20
	MPK4	102584056	-1.04	± 0.07	-1.56	± 0.13	-1.20	± 0.06	1.71	± 0.21	-1.17	± 0.04	-1.20	± 0.08	1.44	± 0.42	2.92	± 0.11	-1.16	± 0.07	3.12	± 0.05	1.53	± 0.04	1.57	± 0.09
	MPK3	102585585	-2.76	± 0.14	-1.08	± 0.20	-1.42	± 0.21	2.34	± 0.25	-1.35	± 0.10	1.44	± 0.25	1.13	± 0.28	1.98	± 0.14	-1.57	± 0.12	1.60	± 0.16	1.43	± 0.58	2.23	± 0.09
	MPK7	102592852	1.27	± 0.19	1.89	± 0.17	3.30	± 0.17	2.66	± 0.10	-1.60	± 0.17	1.69	± 0.15	6.47	± 0.21	4.17	± 0.13	1.66	± 0.11	1.65	± 0.09	2.71	± 0.17	1.98	± 0.20
BR	DWF4	102603786	1.49	± 0.06	1.58	± 0.13	1.37	± 0.18	2.07	± 0.24	1.03	± 0.09	-1.03	± 0.17	-1.14	± 0.26	2.03	± 0.26	-1.11	± 0.10	1.42	± 0.08	1.59	± 0.20	2.31	± 0.14
	ROT3	102598106	1.28	± 0.29	-1.34	± 0.27	1.19	± 0.56	1.33	± 0.60	1.02	± 0.20	-1.61	± 0.12	3.32	± 0.63	-5.15	± 0.31	-1.37	± 0.18	-1.72	± 0.32	-1.58	± 0.42	2.55	± 0.31
AUX	ILR1	102605112	1.95	± 0.26	1.16	± 0.19	1.55	± 0.17	-1.04	± 0.26	1.46	± 0.29	2.76	± 0.25	4.49	± 0.14	3.04	± 0.10	2.02	± 0.13	3.85	± 0.27	2.62	± 0.07	1.37	± 0.20
	ARF8	102597704	1.22	± 0.10	1.02	± 0.20	1.05	± 0.38	-1.22	± 0.46	-1.24	± 0.07	-1.46	± 0.17	-1.15	± 0.43	-2.33	± 0.89	-1.14	± 0.11	1.37	± 0.17	-1.22	± 0.09	-1.30	± 0.14
ABA	CYP707A1	102577541	1.35	± 0.21	1.86	± 0.26	-1.29	± 0.26	-2.76	± 0.51	-1.37	± 0.18	1.30	± 0.31	2.56	± 0.33	2.05	± 0.08	-1.35	± 0.20	-1.24	± 0.29	-4.07	± 0.71	2.01	± 0.19
	PYL4	102602772	-2.25	± 0.34	1.36	± 0.18	-1.41	± 0.28	-1.36	± 0.35	-2.55	± 0.20	-1.11	± 0.24	-1.32	± 0.21	1.34	± 0.30	1.35	± 0.24	4.34	± 0.39	2.19	± 0.34	-1.40	± 0.50
Antioksidativni odgovor	CAT2	102577720	-2.01	± 0.09	-1.41	± 0.07	-1.34	± 0.10	3.05	± 0.14	-1.48	± 0.09	-1.42	± 0.17	1.29	± 0.28	1.34	± 0.10	-1.71	± 0.14	-1.47	± 0.11	1.19	± 0.17	1.34	± 0.14
	APX1	102586473	-1.04	± 0.05	-1.03	± 0.09	-1.06	± 0.14	1.38	± 0.09	-1.09	± 0.07	-1.15	± 0.10	1.02	± 0.06	-1.07	± 0.09	1.20	± 0.11	1.19	± 0.04	-1.11	± 0.09	-1.07	± 0.06
	POD	102577694	1.36	± 0.04	1.05	± 0.06	-2.55	± 0.41	1.21	± 0.22	-1.02	± 0.09	-1.05	± 0.09	1.13	± 0.12	-2.03	± 0.18	1.05	± 0.13	-1.40	± 0.16	-1.10	± 0.08	-2.03	± 0.10
	POX12	102586327	2.97	± 0.09	-1.11	± 0.09	1.31	± 0.12	2.14	± 0.30	4.93	± 0.35	6.38	± 0.31	5.22	± 0.18	7.92	± 0.21	-2.86	± 0.07	-2.15	± 0.11	-8.49	± 0.28	1.49	± 0.27
	LIP	102588050	-6.84	± 0.09	-2.09	± 0.07	1.01	± 0.13	-2.41	± 0.23	-2.81	± 0.16	1.45	± 0.19	2.11	± 0.19	6.91	± 0.18	-3.96	± 0.09	2.02	± 0.13	-1.24	± 0.11	6.12	± 0.20
	CalS12	102594698	1.26	± 0.05	-1.36	± 0.18	-1.52	± 0.07	-1.25	± 0.32	-1.09	± 0.07	1.25	± 0.08	1.16	± 0.40	1.45	± 0.22	1.11	± 0.07	1.03	± 0.07	-1.14	± 0.11	1.45	± 0.10

Prilog 10. Učinak INA na profil ekspresije gena uključenih u metabolizam fitohormona u divljem tipu i transgeničnim *NahG* biljkama krumpira inficiranim PSTVd (statistička analiza rezultata prikazanih na Slici 49.). Relativna ekspresija gena analizirana je u biljkama inficiranim s PSTVd ili zdravim biljkama prethodno tretiranim s INA ili H₂O u 2, 4 i 6 tjednu nakon infekcije (wpi). Količina transkripta normalizirana je u odnosu na ekspresiju EF α 1 i odgovarajuću zdravu kontrolu tretiranu H₂O (mock). Vrijednosti prikazuju srednju log₂ promjenu u ekspresiji ($\pm$ SE, n=9).

			wt PSTVd vs. wt mock						wt PSTVd INA vs. wt mock 0						NahG PSTVd vs NahG mock						NahG PSTVd T vs NahG mock 0					
			2 wpi		4 wpi		6 wpi		2 wpi		4 wpi		6 wpi		2 wpi		4 wpi		6 wpi		2 wpi		4 wpi		6 wpi	
Signalni put	Simbol gena	ID gena	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE	FR	± SE
JA	LOX3	102577714	-11.66	± 1.42	-2.63	± 0.41	1.54	± 0.75	1.94	± 0.42	4.24	± 0.36	1.81	± 0.77	-3.81	± 0.19	5.19	± 0.14	2.70	± 0.29	1.84	± 0.25	11.09	± 0.21	3.32	± 0.26
	LOX6	102583480	-1.03	± 0.18	1.23	± 0.19	-1.22	± 0.14	-3.57	± 0.17	-1.64	± 0.21	2.12	± 0.14	-2.14	± 0.21	1.03	± 0.13	1.00	± 0.07	6.40	± 0.21	1.68	± 0.13	2.34	± 0.16
	OPR3	102586989	-2.15	± 1.40	-1.30	± 0.06	-1.16	± 0.12	2.48	± 0.10	1.62	± 0.10	1.97	± 0.11	1.60	± 0.10	1.15	± 0.14	-1.01	± 0.11	4.03	± 0.33	2.54	± 0.13	2.25	± 0.12
	JAR1	102578750	-3.17	± 1.39	-1.08	± 0.06	-1.43	± 0.12	1.12	± 0.12	-1.25	± 0.05	11.69	± 0.19	-2.06	± 0.52	-1.03	± 0.09	3.24	± 0.14	-1.23	± 0.55	1.54	± 0.15	8.40	± 0.22
	COI1	102584101	-5.56	± 1.41	-1.51	± 0.14	-1.07	± 0.14	-1.46	± 0.08	-1.41	± 0.04	1.22	± 0.08	-1.54	± 0.13	1.13	± 0.11	-1.35	± 0.07	-2.07	± 0.11	-1.19	± 0.09	1.28	± 0.11
	JAZ1	102580049	-2.61	± 1.46	-2.03	± 0.24	-1.11	± 0.17	2.46	± 0.25	6.76	± 0.35	14.88	± 0.22	-2.40	± 0.60	-1.02	± 0.43	2.98	± 0.11	3.46	± 0.57	13.20	± 0.33	8.00	± 0.23
	MYC2	102590233	2.18	± 0.05	1.18	± 0.12	1.13	± 0.19	1.88	± 0.10	-3.65	± 0.11	-2.65	± 0.09	9.73	± 1.73	-1.16	± 0.07	2.36	± 0.23	-1.27	± 0.09	-2.19	± 0.09	-2.51	± 0.22
SA	ICS	102589572	-3.55	± 0.20	-2.44	± 0.24	-2.32	± 0.22	-21.19	± 0.11	-7.06	± 0.15	-2.25	± 0.15	-2.88	± 0.21	-1.18	± 0.26	-3.98	± 0.11	-10.32	± 0.23	-2.54	± 0.26	-3.97	± 0.16
	PAL9	102596017	-1.22	± 0.18	-1.49	± 0.15	2.01	± 0.22	-1.40	± 0.17	-3.30	± 0.13	6.15	± 0.19	-1.81	± 0.29	2.75	± 0.19	4.93	± 0.18	-6.98	± 0.15	-1.34	± 0.24	1.77	± 0.22
	SCMT	102590256	-1.01	± 0.09	-1.64	± 0.10	-1.30	± 0.23	-2.19	± 0.12	1.20	± 0.12	2.49	± 0.18	-3.92	± 0.15	-2.69	± 0.00	-1.15	± 0.48	-2.98	± 0.14	-1.42	± 0.18	-1.33	± 0.14
	NPR1	102592156	-3.73	± 1.41	1.08	± 0.17	1.11	± 0.06	1.47	± 0.11	2.09	± 0.06	2.25	± 0.07	-1.35	± 0.12	-1.82	± 0.07	1.41	± 0.04	1.45	± 0.16	3.06	± 0.12	3.52	± 0.13
	NPR3	102601928	2.95	± 0.07	1.03	± 0.06	-1.17	± 0.18	2.59	± 0.10	1.48	± 0.11	4.31	± 0.07	-1.61	± 0.13	1.12	± 0.06	1.21	± 0.10	1.07	± 0.15	1.53	± 0.06	1.47	± 0.07
	SARD1	102604313	-1.06	± 0.21	-17.47	± 0.36	-1.14	± 0.32	2.99	± 0.29	7.53	± 0.49	2.84	± 0.26	-1.23	± 2.57	-1.47	± 0.41	11.10	± 0.18	7.38	± 0.14	50.96	± 0.18	18.06	± 0.30
	PR-1b	102577780	-4.70	± 1.40	-3.04	± 0.35	1.89	± 0.18	3.50	± 0.15	7.09	± 0.34	11.75	± 0.22	-2.34	± 0.14	3.67	± 0.40	22.03	± 0.16	4.56	± 0.16	18.97	± 0.32	29.85	± 0.17
PR	PR-2	102605560	-5.56	± 1.34	-2.74	± 0.41	1.09	± 0.13	11.44	± 0.21	6.34	± 0.32	1.75	± 0.48	-7.17	± 0.34	6.23	± 0.63	9.85	± 0.23	15.21	± 0.34	39.32	± 0.43	3.03	± 0.24
	PR-Q	102605428	1.18	± 0.23	-3.02	± 0.68	1.03	± 0.39	12.74	± 0.16	4.19	± 0.63	2.74	± 0.32	-1.57	± 0.21	3.33	± 0.66	12.72	± 0.18	5.39	± 0.12	16.37	± 0.47	9.43	± 0.23
MAPK	MPKK6	102594623	-4.43	± 1.57	1.31	± 0.09	1.76	± 0.21	-1.29	± 0.29	-1.01	± 0.09	-1.36	± 0.14	3.80	± 1.48	1.19	± 0.07	1.65	± 0.07	2.66	± 1.49	-1.69	± 0.07	-2.63	± 0.12
	MAPK4	102584056	-3.80	± 1.40	-1.46	± 0.06	-1.62	± 0.08	-1.37	± 0.11	-1.89	± 0.10	-1.25	± 0.09	-2.74	± 0.57	1.22	± 0.10	-1.64	± 0.07	-4.36	± 0.54	-1.16	± 0.10	-1.33	± 0.16
	MAPK3	102585585	-2.48	± 1.39	-1.16	± 0.14	1.01	± 0.24	2.47	± 0.11	2.58	± 0.15	-1.23	± 0.25	-4.58	± 0.53	-1.18	± 0.10	1.26	± 0.10	-2.71	± 0.53	3.00	± 0.10	1.10	± 0.07
	MAPK7	102592852	-2.30	± 1.50	-1.56	± 0.14	1.75	± 0.18	1.76	± 0.17	1.38	± 0.10	3.00	± 0.15	4.15	± 1.43	-1.32	± 0.09	1.03	± 0.09	4.47	± 1.43	1.40	± 0.10	1.47	± 0.14
	WRKY6	102577893	-5.28	± 0.20	-1.07	± 0.25	-3.66	± 0.30	-5.77	± 0.11	2.56	± 0.29	-1.62	± 0.15	-1.08	± 0.11	-1.09	± 0.13	9.49	± 0.13	56.36	± 0.11	73.67	± 0.12	24.83	± 0.18
BR	DWF4	102603786	-2.52	± 1.41	1.30	± 0.07	1.40	± 0.20	1.47	± 0.18	1.48	± 0.06	3.56	± 0.24	-2.59	± 0.29	1.07	± 0.16	1.15	± 0.12	-3.88	± 0.28	2.22	± 0.14	3.83	± 0.20
	ROT3	102598106	1.92	± 0.22	-1.22	± 0.17	1.26	± 0.28	-1.13	± 0.16	-3.24	± 0.16	3.25	± 0.21	-2.09	± 0.34	1.13	± 0.20	2.42	± 0.27	-8.94	± 0.36	-2.83	± 0.18	3.91	± 0.29
AUX	ILR1	102605112	8.82	± 0.12	1.25	± 0.22	1.31	± 0.18	6.72	± 0.14	4.02	± 0.21	7.67	± 0.41	2.40	± 0.28	1.03	± 0.28	2.05	± 0.30	2.23	± 0.31	1.59	± 0.21	8.90	± 0.36
	ARF8	102597704	-2.25	± 1.41	-1.06	± 0.06	-1.40	± 0.08	1.23	± 0.15	-1.43	± 0.06	1.03	± 0.09	-1.49	± 0.52	-1.30	± 0.06	-1.47	± 0.06	-2.30	± 0.56	-1.36	± 0.10	-1.13	± 0.12
ABA	CYP707A1	102577541	-1.37	± 0.35	2.32	± 0.15	-3.94	± 0.20	-5.06	± 0.10	4.64	± 0.24	-1.50	± 0.10	-5.51	± 0.20	-1.14	± 0.31	-4.28	± 0.10	-3.27	± 0.18	3.24	± 0.31	-4.28	± 0.10
	PYL4	102602772	1.12	± 0.17	-3.03	± 0.12	1.85	± 0.18	1.27	± 0.19	-1.13	± 0.10	5.29	± 0.14	-3.31	± 0.16	-4.11	± 0.20	-1.61	± 0.24	-1.54	± 0.13	1.39	± 0.12	-1.01	± 0.14
Antioksidacijski odgovor	CAT2	102577720	-7.91	± 1.43	-1.34	± 0.08	1.11	± 0.11	-3.21	± 0.06	-2.67	± 0.09	-1.36	± 0.14	-1.63	± 0.53	1.05	± 0.11	-1.69	± 0.09	-4.08	± 0.54	-2.05	± 0.13	-2.49	± 0.18
	APX1	102586473	-5.67	± 1.42	-1.30	± 0.03	1.77	± 0.09	1.55	± 0.09	1.18	± 0.04	1.68	± 0.07	-1.89	± 0.53	-1.07	± 0.09	1.26	± 0.07	-1.31	± 0.53	1.46	± 0.09	1.30	± 0.07
	POD	102577694	-3.48	± 1.42	-1.34	± 0.09	-1.81	± 0.17	1.71	± 0.06	1.22	± 0.08	1.56	± 0.12	-1.91	± 0.54	-1.15	± 0.09	1.34	± 0.11	-1.55	± 0.54	1.40	± 0.10	2.29	± 0.22
	POX12	102586327	-1.96	± 1.39	1.53	± 0.15	-1.22	± 0.34	6.83	± 0.24	2.50	± 0.15	4.65	± 0.24	4.60	± 1.48	4.08	± 0.15	8.63	± 0.15	6.03	± 1.48	2.35	± 0.18	2.75	± 0.38
	LIP	102588050	-13.55	± 1.46	-2.31	± 0.22	1.44	± 0.33	1.92	± 0.30	3.08	± 0.17	9.47	± 0.33	1.12	± 1.45	2.39	± 0.42	7.24	± 0.13	4.71	± 1.44	13.75	± 0.48	17.96	± 0.18
	CalS12	102594698	-2.59	± 1.42	-1.26	± 0.08	1.63	± 0.09	1.07	± 0.19	1.32	± 0.07	2.02	± 0.09	-1.30	± 0.15	1.07	± 0.09	-1.03	± 0.05	-1.39	± 0.18	1.39	± 0.14	1.86	± 0.13

Prilog 11. Učinak MeJA na profil ekspresije gena uključenih u metabolizam fitohormona u divljem tipu i transgeničnim *opr3* i *coi1* biljkama krumpira inficiranim PSTVd (statistička analiza rezultata prikazanih na Slici 50.). Relativna ekspresija gena analizirana je u biljkama inficiranim s PSTVd ili zdravim biljkama prethodno tretiranim s MeJA ili H₂O u 2, 4 i 6 tjednu nakon infekcije (wpi). Količina transkripta normalizirana je u odnosu na ekspresiju EF α 1 i odgovarajuću zdravu kontrolu tretiranu H₂O (mock). Vrijednosti prikazuju srednju log₂ promjenu u ekspresiji ($\pm$ SE, n=9).

			wt PSTVd vs. wt mock								
			2 wpi			4 wpi			6 wpi		
Signalni put	Simbol gena	ID gena	FR	±	SE	FR	±	SE	FR	±	SE
JA	LOX3	102577714	8.55	±	0.25	2.50	±	0.28	-1.70	±	0.15
	LOX6	102583480	7.56	±	0.12	4.20	±	0.20	-1.13	±	0.21
	OPR3	102586989	4.35	±	0.17	2.32	±	0.22	-1.35	±	0.32
	JAR1	102578750	5.03	±	0.20	1.22	±	0.15	-5.93	±	0.19
	COI1	102584101	2.28	±	0.16	-1.17	±	0.17	-2.87	±	0.18
	JAZ1	102580049	-3.02	±	0.23	1.00	±	0.65	-1.75	±	0.23
	MYC2	102590233	1.44	±	0.17	-1.03	±	0.19	-1.17	±	0.23
SA	ICS	102589572	3.21	±	0.14	-1.72	±	0.26	2.18	±	0.25
	SARD1	102604313	1.41	±	0.20	-5.19	±	0.23	1.16	±	0.19
	NPR1	102592156	12.58	±	0.20	1.06	±	0.17	1.16	±	0.23
	PAL9	102596017	-1.96	±	0.17	4.77	±	0.24	2.06	±	0.17
PR	PR-1	102577780	2.03	±	0.24	1.66	±	0.20	-2.74	±	0.20
	PR-2	102605560	1.82	±	0.16	1.53	±	0.21	-1.65	±	0.23
MAPK	MAPK4	102584056	-2.52	±	0.16	41.55	±	0.18	8.34	±	0.24
	MAPK3	102585585	6.68	±	0.16	-1.94	±	0.25	-1.95	±	0.18
	MAPK7	102592852	-1.12	±	0.17	2.75	±	0.29	2.25	±	0.22
Antioksidacijski odgovor	CAT2	102577720	1.13	±	0.17	1.84	±	0.17	-2.10	±	0.23
	APX1	102586473	1.19	±	0.09	-1.03	±	0.17	-1.03	±	0.22
	POD	102577694	-1.20	±	0.17	1.38	±	0.14	1.25	±	0.21
	POX12	102586327	-1.15	±	0.24	1.21	±	0.36	2.32	±	0.46
	LIP	102588050	4.16	±	0.13	2.18	±	0.16	1.33	±	0.17
	CalS12	102594698	2.80	±	0.19	-2.45	±	0.27	-2.25	±	0.18

			opr3 PSTVd vs opr3 mock								
			2 wpi			4 wpi			6 wpi		
Signalni put	Simbol gena	ID gena	FR	±	SE	FR	±	SE	FR	±	SE
JA	LOX3	102577714	-1.71	±	0.24	-3.69	±	0.26	4.27	±	0.55
	LOX6	102583480	3.57	±	0.30	2.69	±	0.18	13.64	±	0.60
	OPR3	102586989	N/A	±	N/A	N/A	±	N/A	N/A	±	N/A
	JAR1	102578750	4.42	±	0.19	1.98	±	0.22	1.57	±	0.49
	COI1	102584101	1.68	±	0.25	1.45	±	0.21	3.18	±	0.56
	JAZ1	102580049	-2.79	±	0.33	10.41	±	0.42	17.57	±	0.54
	MYC2	102590233	1.79	±	0.18	1.57	±	0.12	3.24	±	0.63
SA	ICS	102589572	-1.10	±	0.26	1.47	±	0.35	9.26	±	0.68
	SARD1	102604313	-1.05	±	0.12	2.97	±	0.26	8.35	±	0.66
	NPR1	102592156	3.68	±	0.30	1.62	±	0.16	7.02	±	0.67
	PAL9	102596017	-2.06	±	0.20	-2.86	±	0.47	21.08	±	0.64
PR	PR-1	102577780	2.62	±	0.34	1.15	±	0.33	1.62	±	0.57
	PR-2	102605560	2.68	±	0.23	-1.09	±	0.24	9.85	±	0.65
MAPK	MAPK4	102584056	-2.04	±	0.18	-10.36	±	0.41	36.41	±	0.30
	MAPK3	102585585	-1.80	±	0.23	1.10	±	0.25	4.05	±	0.51
	MAPK7	102592852	1.91	±	0.24	-4.69	±	0.46	5.60	±	0.24
Antioksidacijski odgovor	CAT2	102577720	-1.03	±	0.31	-1.71	±	0.16	2.07	±	0.51
	APX1	102586473	1.19	±	0.33	1.07	±	0.15	1.83	±	0.20
	POD	102577694	1.40	±	0.14	-1.01	±	0.18	4.38	±	0.53
	POX12	102586327	-1.46	±	0.21	1.58	±	0.52	62.77	±	0.56
	LIP	102588050	2.37	±	0.26	1.51	±	0.28	8.70	±	0.33
	CalS12	102594698	3.21	±	0.20	1.18	±	0.18	2.17	±	0.64

			coi1 PSTVd vs coi1 mock								
			2 wpi			4 wpi			6 wpi		
Signalni put	Simbol gena	ID gena	FR	±	SE	FR	±	SE	FR	±	SE
JA	LOX3	102577714	2.14	±	0.21	-6.57	±	0.21	1.68	±	0.23
	LOX6	102583480	2.24	±	0.17	1.43	±	0.16	-2.47	±	0.34
	OPR3	102586989	-1.08	±	0.30	-6.48	±	0.22	-3.50	±	0.58
	JAR1	102578750	-1.50	±	0.08	-1.19	±	0.20	-2.63	±	0.29
	COI1	102584101	1.51	±	0.18	1.13	±	0.19	-5.98	±	0.31
	JAZ1	102580049	2.24	±	0.32	1.12	±	0.19	-1.87	±	0.16
	MYC2	102590233	-1.13	±	0.16	1.79	±	0.27	1.32	±	0.19
SA	ICS	102589572	-1.35	±	0.14	-4.76	±	0.14	2.12	±	0.33
	SARD1	102604313	-2.28	±	0.21	1.25	±	0.30	-4.22	±	0.22
	NPR1	102592156	-5.21	±	0.18	-1.58	±	0.22	-1.99	±	0.24
	PAL9	102596017	-1.54	±	0.12	1.51	±	0.29	4.32	±	0.14
PR	PR-1	102577780	-1.91	±	0.14	1.58	±	0.16	-10.36	±	0.31
	PR-2	102605560	-2.88	±	0.19	1.13	±	0.33	-4.07	±	0.15
MAPK	MAPK4	102584056	1.04	±	0.10	2.74	±	0.19	5.41	±	0.24
	MAPK3	102585585	-2.24	±	0.23	-3.08	±	0.20	-1.41	±	0.28
	MAPK7	102592852	-3.24	±	0.27	-1.52	±	0.17	5.88	±	0.36
Antioksidacijski odgovor	CAT2	102577720	-2.96	±	0.12	-2.93	±	0.18	-3.54	±	0.13
	APX1	102586473	-1.28	±	0.07	-1.35	±	0.21	1.10	±	0.19
	POD	102577694	-1.03	±	0.07	-1.79	±	0.12	-1.57	±	0.19
	POX12	102586327	1.48	±	0.18	3.26	±	0.25	19.15	±	0.24
	LIP	102588050	-3.49	±	0.12	-2.49	±	0.34	-11.68	±	0.17
	CalS12	102594698	1.27	±	0.10	-1.63	±	0.11	-2.08	±	0.14

			wt PSTVd+MeJA vs. wt mock 0								
			2 wpi			4 wpi			6 wpi		
Signalni put	Simbol gena	ID gena	FR	±	SE	FR	±	SE	FR	±	SE
JA	LOX3	102577714	1.57	±	0.45	-4.30	±	1.62	-1.74	±	0.20
	LOX6	102583480	3.97	±	0.40	-7.67	±	1.53	1.61	±	0.23
	OPR3	102586989	-1.17	±	0.22	1.91	±	0.50	1.12	±	0.36
	JAR1	102578750	2.45	±	0.24	1.32	±	0.27	-3.65	±	0.24
	COI1	102584101	1.18	±	0.16	-2.72	±	1.43	-1.26	±	0.22
	JAZ1	102580049	-2.50	±	0.22	2.62	±	0.44	3.24	±	0.21
	MYC2	102590233	1.70	±	0.25	-11.00	±	1.31	-4.66	±	0.17
SA	ICS	102589572	-2.24	±	0.19	-4.86	±	0.25	1.99	±	0.14
	SARD1	102604313	1.33	±	0.13	-3.37	±	0.47	1.42	±	0.26
	NPR1	102592156	9.63	±	0.31	-13.74	±	1.45	-1.43	±	0.19
	PAL9	102596017	-2.03	±	0.40	3.16	±	1.32	4.37	±	0.14
PR	PR-1	102577780	1.35	±	0.22	1.08	±	0.37	-3.14	±	0.22
	PR-2	102605560	-2.25	±	0.28	-1.25	±	0.48	-1.68	±	0.22
MAPK	MAPK4	102584056	1.03	±	0.29	35.40	±	1.20	12.15	±	0.24
	MAPK3	102585585	2.00	±	0.15	-3.86	±	1.76	-4.74	±	0.17
	MAPK7	102592852	-1.21	±	0.36	-4.68	±	1.67	3.07	±	0.24
Antioksidacijski odgovor	CAT2	102577720	-1.04	±	0.18	-1.00	±	0.35	-2.04	±	0.24
	APX1	102586473	2.27	±	0.09	1.48	±	0.16	1.14	±	0.17
	POD	102577694	1.65	±	0.16	-1.12	±	0.29	1.43	±	0.20
	POX12	102586327	-1.28	±	0.22	-1.96	±	1.35	1.77	±	0.38
	LIP	102588050	1.37	±	0.05	-1.04	±	1.20	-2.27	±	0.24
	CalS12	102594698	1.12	±	0.18	-3.17	±	0.26	-2.49	±	0.18

			opr3 PSTVd+MeJA vs opr3 mock 0								
			2 wpi			4 wpi			6 wpi		
Signalni put	Simbol gena	ID gena	FR	±	SE	FR	±	SE	FR	±	SE
JA	LOX3	102577714	-7.31	±	0.24	5.79	±	1.09	2.93	±	0.24
	LOX6	102583480	2.08	±	0.35	6.26	±	0.49	1.35	±	0.25
	OPR3	102586989	N/A	±	N/A	N/A	±	N/A	N/A	±	N/A
	JAR1	102578750	1.15	±	0.24	3.07	±	0.37	-1.63	±	0.23
	COI1	102584101	-1.04	±	0.33	5.49	±	0.37	1.22	±	0.17
	JAZ1	102580049	-3.52	±	0.38	1.66	±	0.44	6.82	±	0.32
	MYC2	102590233	1.73	±	0.24	1.06	±	0.39	1.06	±	0.20
SA	ICS	102589572	-3.63	±	0.25	2.54	±	0.80	6.86	±	0.24
	SARD1	102604313	-2.40	±	0.19	3.94	±	0.43	1.66	±	0.30
	NPR1	102592156	1.32	±	0.35	2.57	±	0.35	1.29	±	0.22
	PAL9	102596017	-2.06	±	0.52	-6.19	±	0.46	7.37	±	0.20
PR	PR-1	102577780	1.17	±	0.36	1.66	±	0.32	-1.80	±	0.25
	PR-2	102605560	-1.32	±	0.27	2.42	±	0.52	2.35	±	0.18
MAPK	MAPK4	102584056	2.04	±	0.40	-5.70	±	0.32	33.43	±	0.25
	MAPK3	102585585	-1.44	±	0.33	3.22	±	0.52	1.02	±	0.16
	MAPK7	102592852	2.77	±	0.23	7.96	±	0.85	3.25	±	0.24
Antioksidacijski odgovor	CAT2	102577720	-1.27	±	0.40	2.99	±	0.40	-1.52	±	0.10
	APX1	102586473	1.61	±	0.34	1.91	±	0.49	1.45	±	0.18
	POD	102577694	-1.18	±	0.29	4.11	±	0.43	2.17	±	0.11
	POX12	102586327	-1.59	±	0.24	11.86	±	0.43	12.67	±	0.21
	LIP	102588050	1.62	±	0.26	3.44	±	0.60	2.13	±	0.29
	CalS12	102594698	1.45	±	0.25	2.82	±	0.41	-1.24	±	0.12

			coi1 PSTVd+MeJA vs coi1 mock 0								
			2 wpi			4 wpi			6 wpi		
Signalni put	Simbol gena	ID gena	FR	±	SE	FR	±	SE	FR	±	SE
JA	LOX3	102577714	4.02	±	0.20	-7.76	±	0.23	-1.88	±	0.18
	LOX6	102583480	2.38	±	0.14	2.04	±	0.14	-1.06	±	0.16
	OPR3	102586989	2.07	±	0.36	-1.59	±	0.22	-2.61	±	0.51
	JAR1	102578750	1.44	±	0.10	1.21	±	0.21	-2.69	±	0.14
	COI1	102584101	1.40								

POPIS KRATICA

ABA	engl. <i>abscisic acid</i> , apscizinska kiselina
ACN	engl. <i>acetonitrile</i> , acetonitril
ANOVA	engl. <i>analysis of variance</i> , analiza varijance
APX	engl. <i>ascorbate peroxidase</i> , askorbat peroksidaza
ARF8	engl. <i>auxin response factor 8-like</i>
AUX	engl. <i>auxin</i> , auksin
BR	engl. <i>brassinosteroid</i> , brasinosteroidi
CalS12	engl. <i>callose synthase 12</i>
CAT	engl. <i>catalase</i> , katalaza
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i> , komplementarna DNA
cis-OPDA	engl. <i>cis-12-oxophytodienoic acid</i> , cis-12-oksifitodienoinska kiselina
CK	engl. <i>cytokinin</i> , citokinini
COX	engl. <i>cytochrome oxidase</i> , citokrom oksidaza
CS	engl. <i>castasterone</i> , kastasteron
Ct	engl. <i>threshold cycle values</i> , vrijednosti ciklusa praga
COI1	engl. <i>coronatine insensitive 1</i>
CYP707A1	engl. <i>ABA 8'-hydroxylase CYP707A1</i>
DAB	engl. <i>3, 3'-diaminobenzidine</i> , 3,3'-diaminobenzidin
DEG	engl. <i>differentially expressed genes</i> , diferencijalno eksprimirani geni
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , deoksiribonukleinska kiselina
dNTP	engl. <i>deoxynucleotide triphosphates</i> , deoksiribonukleotidni trifosfati

DWF4	engl. <i>cytochrome P450 90B1</i>
EFa1	engl. <i>elongation factor alpha 1</i> , faktor elongacije 1 α
ETI	engl. <i>effector-triggered immunity</i> , imunitet aktiviran efektorom
FC	engl. <i>fold change</i> , faktor promjene nabora
FPKM	engl. <i>Fragment per Kilobase of transcript per Million mapped reads</i> , fragmenti po kilobazi transkripta po milijun mapiranih očitavanja
GA	engl. <i>gibberellic acid</i> , giberelinska kiselina
H₂O₂	engl. <i>hydrogen peroxide</i> , vodikov peroksid
HR	engl. <i>hypersensitive response</i> , hipersenzitivni (preosjetljiv) odgovor
IAA	engl. <i>indole-3-acetic acid</i> , indol-3-octena kiselina
ICS	engl. <i>Isochorismate Synthase 1</i>
ILR1	engl. <i>ILR1-Like 1</i> , IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 4
INA	engl. <i>2,6-dichloro-isonicotinic acid</i> , 2,6-dikloro izonikotinska kiselina
JA	engl. <i>jasmonic acid</i> , jasmonska kiselina
Ja-Ile	engl. <i>jasmonoyl-isoleucine</i> , jasmonoil-izoleucin
JAR1	engl. <i>Jasmonic Acid Resistance 1</i>
JAZ1	engl. <i>Jasmonate-Zim Domain Protein 1</i>
KEGG	engl. <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LiP	engl. <i>lignin peroxidase</i> , POX-lignin-like
LOX3	engl. <i>lipoxygenase 3</i>
LOX6	engl. <i>lipoxygenase 6</i>
MAPK	engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPK3	engl. <i>mitogen-activated protein kinase 3</i>

MAPK4	engl. <i>mitogen-activated protein kinase 4</i>
MKK6	engl. <i>mitogen-activated protein kinase kinase 6</i>
MAPK7	engl. <i>mitogen-activated protein kinase 7</i>
MeJA	engl. <i>methyl jasmonate</i> , metil jasmonat
miRNA	engl. <i>microRNA</i> , mikro RNA
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i> , glasnička RNA
MYC2	engl. <i>MYC Transcription Factor 2</i>
NPR1	engl. <i>nonexpressor of PR genes 1</i>
NPR3	engl. <i>nonexpressor of PR genes 3</i>
OPR3	engl. <i>12-Oxophytodienoate Reductase 3</i>
PAL1	engl. <i>Phenylalanine Ammonia-Lyase 1</i>
PAL9	engl. <i>Phenylalanine Ammonia-Lyase 9</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , lančana reakcija polimeraze
PAL	engl. <i>phenylalanine ammonia-lyase</i> , fenilalanin amonijliaze
pb	parova baza
POD	engl. <i>cell-wall-associated extracellular peroxidases</i>
POX12	engl. <i>peroxidase 12</i> , peroksidaza 12
PR-1	engl. <i>Pathogenesis-Related Protein 1</i>
PR-1b	engl. <i>Pathogenesis-Related Protein 1b</i>
PR-2	engl. <i>Pathogenesis-Related Protein 2</i>
PR-Q	engl. <i>Pathogenesis-Related Protein Q</i>
PSTVd	engl. <i>potato spindle tuber viroid</i> , viroid vretenastog gomolja krumpira
PTI	engl. <i>PAMP-triggered immunity</i> , imunitet pokrenut patogenim molekulama
PYL4	engl. <i>Pyrabactin Resistance-Like 4</i> , abscisic acid receptor <i>PYL4-like</i>

qPCR	engl. <i>quantitative PCR</i> , kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> , ribonukleinska kiselina
RNase	engl. <i>ribonuclease</i> , ribonukleaze
ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i> , reaktivne kisikove čestice
ROT3	engl. <i>ROTUNDIFOLIA3, 3-epi-6-deoxocathasterone 23-monooxygenase</i>
RT	engl. <i>reverse transcription</i> , reverzna transkripcija
RT-qPCR	engl. <i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i> , kvantitativna lančana reakcija polimeraze uz povratnu transkripciju
SA	engl. <i>salicylic acid</i> , salicilna kiselina
SAR	engl. <i>systemic acquired resistance</i> , sistemski stečena otpornost
SARD1	engl. <i>Suppressor of SA-Dependent Defense, SA-Activated Protein 1</i>
SCMT	engl. <i>Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase</i>
siRNA	engl. <i>small interfering RNA</i> , mala interferirajuća RNA
SOD	engl. <i>superoxide dismutase</i> , superoksid dismutaza
SPE	engl. <i>Solid Phase Extraction</i>
TPM	engl. <i>Transcripts Per Kilobase Million</i> , transkripti po kilobazi milijun
vd-sRNA	engl. <i>viroid-derived small RNA</i> , mala RNA izvedena iz viroida
WRKY6	engl. <i>WRKY Transcription Factor 6</i> , WRKY transkripcijski faktor 6

10. ŽIVOTOPIS

Nakon završene Katoličke Klasične gimnazije s pravom javnosti u Požegi, upisala sam preddiplomski studij biologije na Odjelu za biologiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Godine 2017. sam i završila prethodno navedeni studij te stekla akademski naziv sveučilišne prvostupnice (baccalaurea) biologije i te iste godine na Odjelu za biologiju upisala diplomski znanstveni studij biologije. Diplomirala sam na Odjelu za biologiju 2019. godine te stekla akademski naziv magistra biologije (mag.biol.). Tijekom studiranja bila sam član nekoliko studentskih udruga. Također, tijekom 2019. godine u sklopu ERASMUS+ programa mobilnosti odradila sam stručnu praksu na Institutu za imunologiju i mikrobiologiju Medicinskog fakulteta u Ljubljani gdje sam u periodu od 3 mjeseca izradila eksperimentalni dio diplomskog rada kojemu je cilj bio istražiti molekularni i klinički značaj humanog papiloma virusa 159 (HPV1259).

Sredinom prosinca 2020. godine zaposlila sam se na Institutu Ruđer Bošković (Zavod za molekularnu biologiju, Laboratorij za kemijsku biologiju) kao asistentica/doktorandica na HRZZ istraživačkom projektu „Integrativna analiza signalnih puteva fitohormona uključenih u odgovor biljaka krumpira na infekciju viroidom vretenastoga gomolja krumpira“ pod vodstvom dr. sc. Snježane Mihaljević. U akademskoj godini 2020./2021. upisala sam doktorski studij Molekularne bioznanosti na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Tijekom 2022. godine u sklopu ERASMUS+ programa mobilnosti provela sam 2 mjeseca u Laboratoriju za regulatore rasta, Sveučilište Palacký, Olomouc, Republika Češka, a u sklopu DAAD-MZO bilaterale provela sam 2 tjedna na stručnom usavršavanju u Leibniz-Institut Für Pflanzenbiochemie (IPB) (Institutu za biljnu biokemiju), Halle (Saale), Njemačka. U srpnju 2023. godine obranila sam temu doktorskog rada pod naslovom: „Uloga salicilne kiseline i jasmonske kiseline u odgovoru biljaka krumpira na infekciju viroidom vretenastog gomolja krumpira PSTVd“, pod mentorstvom dr. sc. Snježane Mihaljević.

Sudjelovala sam na nekoliko znanstvenih skupova, među kojima bih izdvojila 7. Hrvatski mikrobiološki kongres koji se održao u Sv. Martinu na Muri (Hrvatska) 2022. godine, na kojem sam imala poster izlaganje i bila dobitnica stipendije Hrvatskog društva biljnih biologa. Također, sudjelovala sam na 14. Hrvatskom biološkom kongresu s međunarodnim sudjelovanjem u Puli (Hrvatska) 2022. godine, gdje sam osvojila drugo mjesto za najbolje izlaganje u kategoriji postera. Osim toga, prisustvovala sam The 2023 Jasmonate Meetingu u

Halle (Saale) (Njemačka) 2023. godine, gdje sam također izlagala poster i bila dobitnica stipendije za putovanje.

Usavršavanje tijekom doktorskog studija:

1) sudjelovanje na radionici „Excellent Lab book for an Excellent Career“ u organizaciji HDBMB, održanoj 17-18. prosinca 2020. u on-line formatu

2) sudjelovanje na radionici „Rješavanje sukoba i Mobbing“ u organizaciji Bura savjetovanja, održanoj 28. lipnja 2021. i 01. srpnja 2021. u on-line formatu

3) sudjelovanje na nekoliko tečajeva u organizaciji Sveučilišnog računskog centra u Zagrebu (Srce), sve u on-line formatu:

3a) Wordionica ili kako oblikovati seminarski rad (R101), održanoj 04. studenog 2021.

3b) Exceliranje ili kako izraditi tablice, grafikone i formule (R201), održanoj 08. studenog 2021.

3c) PowerPointiranje ili kako izraditi moćne prezentacije (R301), održanoj 16. studenog 2021.

3d) GIMP ili kako besplatno fotošopirati slike (R401), održanoj 29. studenog 2021.

3e) Upoznavanje sa sintaksom jezika R i njegova primjena u osnovnoj statističkoj i grafičkoj analizi podataka (S721), održanoj u periodu od 22. studenog 2021. do 30. studenog 2021.

4) sudjelovanje na tečaju „ACS on Campus-Croatia“ u organizaciji American Chemical Society održanoj 16. ožujka 2022. u on-line formatu

5) odslušano on-line predavanje Elsevier pod naslovom: „ScienceDirect - overview and key features“ održano 09. studenog 2022.

6) odslušano on-line predavanje Elsevier pod naslovom: „Academic Integrity - Plagiarism and how to avoid it“ održano 10. studenog 2022.

7) odslušano on-line predavanje Elsevier pod naslovom: „How to write and publish an article. Elsevier Author Workshop“ održano 22. studenog 2022.

8) odslušano on-line predavanje Elsevier pod naslovom: „How to find a journal wisely. Elsevier Author Workshop“ održano 23. studenog 2022.

9) odslušano on-line predavanje Elsevier pod naslovom „Generative AI: New policies, opportunities, and risks) “ održano 05. prosinca 2022.

10) sudjelovanje na radionici održanoj uživo na Institutu Ruđer Bošković 27. ožujka 2023. pod nazivom „Zašto ići putem inovacija i komercijalizacije“.

11) pasivno sudjelovanje (bez izlaganja) na kongresu 7th Faculty of Science PhD Student Symposium održanom od 21. do 22. travnja 2023. na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu.

12) sudjelovanje na radionici održanoj uživo na Institutu Ruđer Bošković 17. svibnja 2023. pod naslovom „Supercomputing in the Natural Sciences“.

13) sudjelovanje on-line na događanju „Mental Health in Academia: The Hot Potato“ održanom 05. rujna 2024. u Zagrebu.

14) pasivno sudjelovanje (bez izlaganja) na Simpoziju Hrvatskog društva za biljnu biologiju 2024 održanom 29. studenog 2024. na Odjelu za prehrambenu tehnologiju Sveučilišta Sjever u Koprivnici.

15) sudjelovanje na radionici održanoj uživo na Institutu Ruđer Bošković 10. do 11. veljače 2025. u sklopu Zimske škole otvorene znanosti pod naslovom „Otvoreni pristup“.

SUDJELOVANJA U POPULARIZACIJA ZNANOSTI:

1) Sudjelovanje u organizaciji STEM games 2021. kao dio tima „Problem solving excercises“- dizajniranje zadataka za Science arenu.

2) Sudjelovanje u aktivnostima i suradnja u organizaciji Tjedna karijera Sveučilišta u Osijeku koji je održan od 9.-13. svibnja 2022. - održano predavanje za studente diplomskog studija Biologija.

Članica sam Hrvatskog društva za biljnu biologiju (HDBB) te Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (HDBMB).

11. POPIS PUBLIKACIJA

11.1. Popis objavljenih znanstvenih radova

Marković, Iva; Hošnjak, Lea; Seme, Katja; Poljak, Mario. Molecular characterization of human papillomavirus type 159 (HPV159) // *Viruses*, 13 (2021), 8; 1668, 13. doi: 10.3390/v13081668

11.2. Popis sažetaka u zbornicima skupova

Jarić, Bernard; **Marković, Iva**; Milanović, Jasna; Mihaljević, Snježana. Profiling of microRNAs and their potential targets in potato leaves in response to PSTVd infection and exogenous SA treatment // Symposium of the Croatian Society for Plant Biology 2024. Koprivnica, Hrvatska, 29.11.2024-29.11.2024

Jarić, Bernard; **Marković, Iva**; Milanović, Jasna; Mihaljević, Snježana. Investigation of miRNA modulation during infection with potato spindle tuber viroid (PSTVd) upon treatment with 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) // *Power of Viruses 2024: Book of abstracts* / Tabain, Irena; Jagušić, Maja; Ivančić Jelečki, Jelena, Vilibić Čavlek, Tatjana et al. (ur.). Zagreb: Hrvatsko mikrobiološko društvo, 2024. str. 75-75

Jarić, Bernard; **Marković, Iva**; Milanović, Jasna; Mihaljević, Snježana. MicroRNA expression profiles in PSTVd infected potato: impact of INA treatment // 8th Faculty of Science PhD Student Symposium: Book of Abstracts / Posarić, Laura; Gmižić, Daria; Ostojić, Tea i sur. (ur.). Zagreb: Faculty of Science, University of Zagreb, Zagreb, Croatia, 2024. str. 72-72

Marković, Iva; Lulić, Nina; Frljin, Marta; Jarić, Bernard; Mihaljević, Snježana. ROS i 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

Marković, Iva; Jarić, Bernard; Milanović, Jasna; Habuš Jerčić, Ivanka; Kereša, Snježana; Široká, Jitka; Oklešťková, Jana; Novák, Ondřej; Mihaljević, Snježana. Transcriptome analysis reveals importance of jasmonic acid in potato (*Solanum tuberosum*) during infection with potato spindle tuber viroid // The 2023 Jasmonate meeting, Halle (Saale), Njemačka, 29.08.2023-01.09.2023

Marković, Iva; Jarić, Bernard; Jagić, Mateja; Leljak Levanić, Dunja; Milanović, Jasna; Oklešťková, Jana; Široká, Jitka; Novák, Ondřej; Mihaljević, Snježana. Transcriptomic approach reveals salicylic acid-dependent expression of host genes in potato-viroid interaction // Joint Event on Plant Science and Agriculture: Book of Abstracts. Valencia: Magnus Group LLC, 2023. str. 82-83

Marković, Iva; Jagić, Mateja; Milanović, Jasna; Habuš Jerčić, Ivanka; Kereša, Snježana; Leljak Levanić, Dunja; Mihaljević, Snježana. Profil ekspresije marker gena uključenih u obrambeni odgovor posredovan jasmonskom kiselinom, u interakciji viroida vretenastog gomolja krumpira (PSTVD) i krumpira // 14. Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem: zbornik sažetaka / Caput Mihalić, Katarina; Mičetić Stanković, Vlatka; Urlić, Inga i sur. (ur.). Zagreb, 2022. str. 275-276

Marković, Iva; Milanović, Jasna; Jagić, Mateja; Leljak-Levanić, Dunja; Mihaljević, Snježana. Salicylic acid contributes to basal defense of *Solanum tuberosum* against potato spindle tuber viroid (PSTVd) // 7th Croatian Congress of Microbiology: Programme and abstracts / Petrić Sviličić, Ines (ur.). Zagreb: Hrvatsko mikrobiološko društvo, 2022. str. 87-87

Marković, Iva; Kumek, Lucija; Vojvodić, Jelena; Mihaljević, Snježana. Antioxidative response of SA-deficient and wild type potato plants (*Solanum tuberosum* L.) to infection with potato spindle tuber viroid // Knjiga sažetaka-6. simpozij studenata doktorskih studija PMF-a. Zagreb, 2022. str. 210-211

11.3. Popis radova u pripremi/postupku recenzije

Marković, Iva; Jarić, Bernard; Okleštková, Jana; Široká, Jitka; Majsec, Kristina; Jagić, Mateja; Leljak Levanić, Dunja; Milanović, Jasna; Ziegler, Jörg; Novák, Ondřej; Rosahl, Sabine; Mihaljević, Snježana. Transcriptome, metabolome and phytohormone analysis reveals that salicylic acid is required for the basal defense response of potato plants to Potato spindle tuber viroid.

Marković, Iva; Jarić, Bernard; Okleštková, Jana; Široká, Jitka; Jagić, Mateja; Milanović, Jasna; Kereša, Snježana; Habuš Jerčić, Ivanka; Novák, Ondřej; Mihaljević, Snježana. Transcriptome and hormone analysis provides insights into JA-mediated regulation of cellular responses and symptom development in potato during Potato spindle tuber viroid infection.