

Pseudomonas syringae pv. tomato: Model patogena za utvrđivanje bolesti i fitopatogenih mehanizama kod uročnjaka

Pavlović, Petar

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:641272>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

***Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: Model
patogena za utvrđivanje bolesti i fitopatogenih
mehanizama kod uročnjaka**

DIPLOMSKI RAD

Petar Pavlović

Zagreb, rujan, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Mikrobna biotehnologija

***Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: Model
patogena za utvrđivanje bolesti i fitopatogenih
mehanizama kod uročnjaka**

DIPLOMSKI RAD

Petar Pavlović

Mentor:
Izv.prof.dr.sc. Nataša Hulak

Zagreb, rujan, 2024.
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Petar Pavlović**, JMBAG 0178117569, rođen/a 23.01.2000. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

***Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: Model patogena za utvrđivanje bolesti i fitopatogenih mehanizama kod uročnjaka**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Petra Pavlovića**, JMBAG 0178117569, naslova

***Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: Model patogena za utvrđivanje bolesti i fitopatogenih
mehanizama kod uročnjaka**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Izv.prof.dr.sc. Nataša Hulak mentor

2. Prof.dr.sc. Darko Vončina član

3. Doc.dr.sc. Ivana Rajnović član

Zahvala

Želio bih se zahvaliti svim svojim profesorima, profesoricama i asistentima koji su mi prenosili znanje kroz cijelo moje studiranje, svojoj obitelji i prijateljima koji su mi bili podrška kroz cijelo studiranje, te mojoj mentorici Nataši Hulak koja mi je puno pomogla pri pisanju ovoga diplomskoga rada.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Cilj rada	2
2. Uročnjak (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	3
3. <i>Pseudomonas syringae</i>	7
3.1. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> - fiziologija i epidemiologija	9
3.1.1 Virulencija	10
3.2. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> - patogeneza	13
3.2.1. Mehanizmi patogeneze	13
3.2.1.1. Koronatin i sinteza koronatina	14
3.2.1.2. Sekrecijski sistem tip III	16
3.2.1.3. Efektorski proteini	18
4. Imunitet biljke domaćina u patogenezi	19
4.1. Primarni i sekundarni imunitet biljaka	20
4.2. PAMPs /MAMPs molekule	22
4.3. PAMP-inducirana imunost(PTI)	22
4.4. Zig-zag model	24
5. Uloga hormona stresa u biljaka	26
5.1. Salicilna kiselina	26
5.2. Etilen	28
5.3. Jasmonska kiselina	29
5.3.1. Biosinteza jasmonske kiseline	31
5.4. Apscizinska kiselina	33
5.5. Aminomaslačna kiselina	35
6. Zaključak	36

7. Literatura	37
Životopis.....	42

Sažetak

Diplomskog rada studenta **Petra Pavlovića**, naslova

***Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: Model patogena za utvrđivanje bolesti i fitopatogenih mehanizama kod uročnjaka**

Pseudomonas syringae pv. *tomato* je biljni patogen koji može živjeti kao epifit na površini lista ili unutar apoplasta biljke prilikom čega uzrokuje infekciju i bolest. Najčešći domaćin ovog patogena u prirodnom staništu je rajčica, ali i biljka model uročnjak (*Arabidopsis thaliana*) u laboratoriju. Cilj ovog diplomskog rada je kroz pregled najnovije bibliografije opisati mikrobiološku aktivnost patogena *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, te istražiti i prezentirati mehanizme kojima uzrokuje bolesti u poljoprivredno važnim biljkama, te iznijeti komparativne studije o razvoju simptoma, molekularnoj signalizaciji i obrambenim odgovorima kod uročnjaka. Ova interakcija je od velikog znanstvenog interesa u molekularnom karakteriziranju mehanizama kojima *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* uzrokuje bolest u biljci domaćinu. Dostupnost sofisticiranih molekularnih alata i resursa (sekvencionirani genom) olakšava dubinska istraživanja mehanizama na kojima se temelji ova interakcija biljaka-patogen.

Ključne riječi: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, patogen, rajčica, uročnjak, obrambeni mehanizmi biljke.

Summary

Of the master's thesis – student **Petar Pavlović**, entitled

Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: Pathogen model for disease determination and the phytopathogen mechanisms in *Arabidopsis thaliana

Pseudomonas syringae pv. *tomato* is a plant pathogen that can live as an epiphyte on the surface of the leaf or inside the apoplast of the plant, causing infection and disease. The most common host of this pathogen in its natural habitat is the tomato, but also the model plant, *Arabidopsis thaliana*, in the laboratory. The aim of this thesis is to describe the microbiological activity of the pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* through a review of the latest bibliography, and to investigate and present the mechanisms by which it causes diseases in agriculturally important plants, and to present comparative studies on the development of symptoms, molecular signaling and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. This interaction is of great scientific interest in the molecular characterization of the mechanisms by which *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* causes disease in the host plant. The availability of sophisticated molecular tools and resources (the sequenced genome) facilitates in-depth investigations of the mechanisms underlying this plant-pathogen interaction.

Keywords: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, pathogen, tomato, *Arabidopsis thaliana*, plant defense mechanisms.

1.Uvod

Pseudomonas syringae je gram-negativna bakterija koja pripada rodu *Pseudomonas*, porodici *Pseudomonadaceae*. Te Gammaproteobakterije poznate su po svojoj sposobnosti izazivanja bolesti kod biljaka, uključujući povrće, voće, ukrasno bilje i drugo. Ova bakterija ima veliku sposobnost prilagodbe različitim uvjetima okoliša, te je vrlo rasprostranjena u svijetu. Poznata je i po otpornosti na mnoge antibiotike i dezinficijense (Rohmer *et al.*, 2004; Troisfontaines i Cornelis, 2005).

Bakterije ove vrste su vrlo raznolike i prilagodljive i mogu se naći u raznim staništima kao što su tlo, biljke, voda, te kod ljudi i životinja. Šire se vodom, kišom, vjetrom, te preko insekata. Mogu uzrokovati razne simptome na biljkama kao što su tamne mrlje na listovima, pojava nekroze na stabljici i listovima biljke, te trulež i truljenje zaraženih tkiva što može rezultirati i smrću biljke (Rohmer *et al.*, 2004; Troisfontaines i Cornelis, 2005).

Pseudomonas syringae se dijeli na više sojeva (patovara) od kojih su najpoznatiji *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000 (Pto) i *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Svaki od njih je patovar na specifičnim vrstama biljaka (soj pv. *tomato* napada između ostalog rajčicu, *Solanum lycopersicum* i biljku uročnjaka, a pv. *phaseolicola* napada grah, *Phaseolus vulgaris* L.) (Katagiri *et al.*, 2002).

U ovom radu ćemo se fokusirati isključivo na podvrstu ove bakterije koja napada rajčicu i uročnjak (*Arabidopsis thaliana*). Bakterija *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000 (Pto) uzrokuje bakterijsku pjegavost rajčice, no može uzrokovati bolesti na svim biljkama iz porodice *Solanaceae*. Bakterija Pto se u plod rajčice može prenijeti preko zaraženih sjemenki, kontaminirane vode, kontaminiranog tla i alata za obradu tla, te preko kontakta s drugim zaraženim biljkama. Simptomi ove infekcije su pojava nekroza na stabljikama rajčice, male tamnosmeđe mrlje na listovima, uvijanje i žućenje/nekroza listova te sitne crne mrlje na plodovima rajčice, koje značajno umanjuju njihovu tržišnu vrijednost. Ova bakterija je vrlo značajan i rasprostranjen patogen u poljoprivredi te može uzrokovati velike hranidbene i ekonomske gubitke ukoliko se ne provedu odgovarajuće mjere prevencije i kontrole bolesti. U ovom radu ćemo detaljnije prezentirati kontrolu i prevenciju zaraze biljaka spomenutom bakterijom. Uporaba zdravog sjemena, to jest korištenje provjerenog, certificiranog sjemena za koje smo sigurni da nije zaraženo, redovito čišćenje i dezinfekcija alata i opreme za obradu tla i sadnju, izbjegavanje sadnje biljaka na istome mjestu nekoliko godina zaredom, korištenje nekontaminirane i čiste vode za navodnjavanje biljaka, uklanjanje i uništavanje zaraženih dijelova biljke kako bi se spriječilo širenje bolesti, primjena bakrenih preparata ili drugih baktericida koji mogu pomoći u suzbijanju bolesti, te odabir sorti biljaka koje su otpornije na bakterijske infekcije samo su neki od načina dobre prakse u poljoprivredi koji bi se trebali prakticirati u suzbijanju patogena. Interakcija ove bakterije sa uročnjakom u laboratoriju daje mnogo informacija o tome kako se boriti protiv ove bakterije u poljoprivredi, te kako učinkovitije zaštititi biljke od ovog patogena i bolesti. Ova interakcija je od velikog znanstvenog interesa, jer je odnos detaljno karakteriziran na molekularnoj razini,

a pogoduje i generacijsko praćenje bilo kakvih promjena na genomu uročnjaka, koje je relativno kratkog životnog ciklusa. Lako se uzgaja u laboratorijskim uvjetima, te kako je manjeg rasta lako se njome manipulira. Osjetljiva je na različite patogene, a kako je genom sekvencioniran, čini ju idealnom za proučavanje na molekularnoj razini različitih mehanizama koji se odvijaju prilikom interakcije biljka-patogen.

1.1.Cilj rada

Cilj ovog diplomskog rada je kroz pregled najnovije bibliografije opisati mikrobiološku aktivnost patogena Pto, te istražiti i prezentirati mehanizme kojima uzrokuje bolesti u poljoprivreno važnim biljkama. Cilj nam je također i iznijeti pregledne studije prilikom molekularne signalizacije i obrambenih odgovora kod uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*).

2. Uročnjak (*Arabidopsis thaliana*)

Arabidopsis thaliana (uročnjak) (Slika 2.) je jednogodišnja biljka krstašica (ponekad dvogodišnja) koja obično naraste do visine od 20–25 cm. Listovi formiraju rozetu na bazi biljke, s nekoliko listova također na cvjetnoj stapki. Bazalni listovi su zeleni do blago ljubičasti, dugi 1.5–5 cm i široki 2–10 mm, s rubom koji može biti cijeli ili grubo nazubljen; listovi na stabljici su manji i sjedeći, obično s cijelim rubom. Listovi su prekriveni sitnim, jednostaničnim dlačicama (trihomima). Cvjetovi su promjera 3 mm, organizirani u cvat; njihova struktura tipična je za porodicu *Brassicaceae*. Plod je dug 5–20 mm, koji sadrži 20–30 sjemenki. Korijenov sustav ima jednostavnu strukturu, s jednim primarnim korijenom koji raste vertikalno prema dolje, kasnije stvarajući manje bočne korijene. Uročnjak može završiti svoj ciklus života u šest tjedana. Centralna stabljika koja proizvodi cvjetove počinje rasti nakon otprilike 3 tjedna, a cvjetovi se prirodno oprašuju. U laboratoriju se uročnjak može uzgajati u Petrijevim zdjelicama, in vitro posudicama/staklenkama za uzgoj na Murashige i Skoog (MS) mediju ili hidroponskim sustavima, na fluorescentnim svjetlima (komorama rasta) (Meinke *et al.*,1998).



Slika 2.- Uročnjak (*Arabidopsis thaliana*)

Izvor: <https://identify.plantnet.org/hr/k-world-flora/species/Arabidopsis%20thaliana%20%28L.%29%20Heynh./data> (pristupljeno 10.06.2024.)

Uročnjak je prirodno rasprostranjen u Europi, Aziji i Africi, od Mediterana do Skandinavije te od Španjolske do Grčke. Autohtona je vrsta u tropskim ekosustavima Afrike. Uročnjak je rasprostranjen diljem svijeta, uključujući Sjevernu Ameriku gdje se pojavljuje oko 17. stoljeća. Nastanjuje stjenovita, pjeskovita i kamenita tla. Općenito se smatra korovom zbog svoje rasprostranjene prisutnosti na poljoprivrednim površinama, cestama, željezničkim prugama, zapuštenim područjima i drugim narušenim staništima, iako zbog ograničene konkurentnosti i male veličine nije klasificirana kao opasni korov. Kao i većina vrsta iz porodice *Brassicaceae*, uročnjak je jestiv za ljude i može se konzumirati sirov u salatama ili kuhan (Rutter *et al.*, 2012).

Uročnjak je mala biljka iz porodice gorušica (Slika 2(2).), te je referentna biljka za istraživanje biologije biljaka općenito. Razumijevanje rasta i razvoja biljaka općenito postignuta su istraživanjem molekularne genetike ove jednostavne kritosjemenjače. Genom uročnjaka, veličine 120 megabaza sadrži približno 25,500 gena. Više od 30 megabaza anotirane genomske sekvence već je pohranjeno u GenBank-u zahvaljujući konzorciju laboratorija iz Europe, Japana i Sjedinjenih Američkih Država. Sažetak glavnih otkrića opisanih u revolucionarnom dokumentu, "*The Arabidopsis Genome Initiative*", a analiza sekvence genoma uročnjaka objavljena je u časopisu *Nature* 408, 796-815, u prosincu 2000. godine (*Nature* 408, 796-815, 2000).

Jedno od velikih postignuća u povijesti znanosti je znanstveno istraživačka zajednica uročnjaka učinila javno dostupnim, što je omogućilo da uročnjak postane biljka model za proučavanje biologije biljaka i analizu složenih organizama općenito (Meinke *et al.*, 1998).

Uročnjak predstavlja modelni sustav za proučavanje biologije biljaka, već i za komparativnu genomiku. Sekvencioniranje dviju blisko povezanih vrsta, *Arabidopsis lyrata* i *Brassica rapa*, nadopunjen je genomskim usporedbama između spomenutih vrsta i *Arabidopsis thaliane* i akumuliranim mutacijama. Genomika je nadopunjena dodatnim interspecifičnim analizama nekodirajućih sekvenci, polimorfizmima, transpozona te repetitivnih elemenata koji se nalaze u heterokromatinkoj regiji DNA. Dinamika genoma uročnjaka prolazi kroz procese pseudogenizacije ili subfunkcionalizacije što je znanstveno neophodno (Rutter *et al.*, 2012).



Slika 2(2).- Sadnice uročnjaka uzgojene u laboratoriju

Izvor: <https://www.sciencephoto.com/media/442529/view/arabidopsis-seedlings-in-lab> (pristupljeno 12.06.2024.)

Botaničari i biolozi počeli su istraživati uročnjak u ranim 1900-ima, a prvi sustavni opisi mutanata izvedeni su oko 1945. godine. Danas se uročnjak široko koristi za proučavanje biljnih znanosti, uključujući genetiku, evoluciju, populacijsku genetiku i razvoj biljaka. Iako biljka ima malu direktnu važnost za poljoprivredu, uročnjak je kao modelni organizam revolucionirao naše razumijevanje genetske, stanične i molekularne biologije cvjetnica, jer dijeli identičnost većine svojih gena sa genima koji posjeduju agrikulturalno važne biljke. Prvi modificirani fenotip u uročnjaka dokumentirao je A. Braun 1873. godine od strane, gdje je opisao dvostruki cvjetni fenotip (Rutter *et al.*, 2012).

Zbog svoje male veličine genoma od otprilike 157 milijuna baznih parova i diploidne prirode, uročnjak je izuzetno koristan za genetičko mapiranje i sekvenciranje. Ima pet kromosoma, što ga čini jednom od biljaka s najmanjim genomom. Ranije se smatralo da ima najmanji genom među cvjetnicama, no taj se naslov sada pripisuje biljkama poput *Genlisea tuberosa* (Meinke *et al.*, 1998).

Genom uročnjaka sadrži otprilike 27,600 gena koji kodiraju za proteine i oko 6,500 gena koji ne kodiraju za proteine. Baza podataka iz proteomike uročnjaka navodi oko 39.342 proteina (Rutter *et al.*, 2012).

Upravo zbog veličine genoma, jednostavnog uzgoja u laboratorijskim uvjetima, čine uročnjak idealnom biljkom za ciljana znanstvena istraživanja, koja dalje mogu pomoći u boljem razumijevanju i prevenciji bolesti i infekcija na biljkama. Genetski modificirani oblici uročnjaka završavaju svoj životni ciklus u otprilike 6 tjedana, od klijanja do sazrijevanja sjemena (Slika 2(3)). Njena kompaktna veličina olakšava uzgoj u malim prostorima i donosi

obilje sjemenki. Također, njezina mogućnost samooprašivanja korisna je u genetičkim eksperimentima. S obzirom da jedna biljka može proizvesti nekoliko tisuća sjemenki, sve ove karakteristike čine *Arabidopsis thaliana* (uročnjaka) visoko cijenjenim genetičkim modelom u istraživanjima (Meinke *et al.*, 1998).

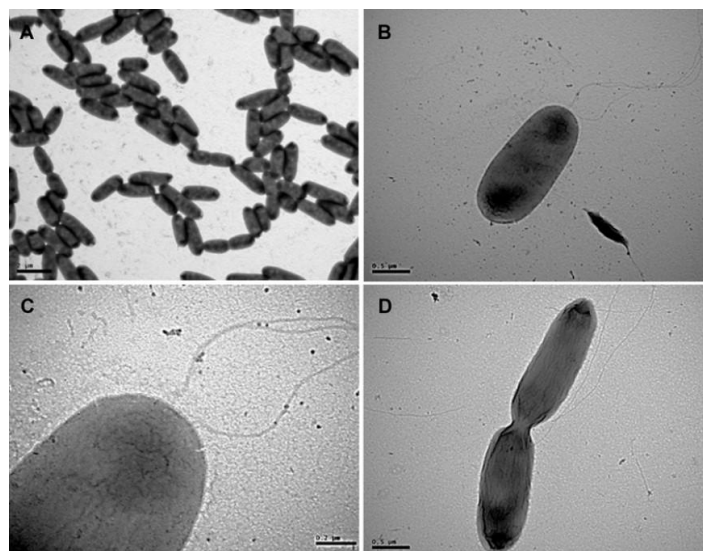


Slika 2(3).- Komušina sa sjemenkama *Arabidopsis thaliana*

Izvor: Mentor- N.Hulak

3. *Pseudomonas syringae*

Pseudomonas syringae (Slika 3.) je štapićasta, Gram-negativna bakterija s polarnim bičevima (Slika 4). Ovaj patogen, može inficirati širok spektar biljnih vrsta i postoji više od 50 različitih patovara. Pripada rodu *Pseudomonas* te razredu gama proteobakterija. Rod *Pseudomonas* je jedan od najzastupljenijih bakterijskih rodova u svijetu, uz *Bacillus* i *Chlostridium*. Ovaj bakterijski patogen uzrokuje bolesti kultiviranih biljaka i može rezultirati značajnim gubitcima u poljoprivrednoj proizvodnji. Zbog svoje sposobnosti da uzrokuje bolest kod *Arabidopsis thaliana* (uročnjaka), predstavlja izvrstan model za proučavanje interakcije prilikom infektivnih procesa. Ova bakterija ima nekoliko karakterističnih značajki, uključujući hemibiotrofnost i polarne bičeve, te uzrokuje različite simptome infekcije kod biljaka. Može živjeti na površini biljke, ili unutar apoplasta u biljci. Apostat je prostor unutar biljne stanice koji se sastoji od staničnih stijenki, intercelularnih prostora i vodljivih elemenata kao što je prostor floema i ksilema. Infekcija *Pseudomonas syringae* općenito započinje na površini listova gdje bakterije mogu živjeti epifitski. One prelaze iz vanjskog okruženja u međustanični prostor kroz različite vrste otvora na listovima, poznate kao stome (puči) ili jednostavno kroz rane na površini lista. Nakon što uđu u biljku, *Pseudomonas syringae* obično se smješta u apoplast, prostor između biljnih stanica gdje može rasti. U tom prostoru, patogen preko različitih molekularnih mehanizama biljke osigurava potrebne nutrijente za svoj opstanak i rast. Ključni mehanizam koji koristi je sustav sekrecije tipa III (T3SS). Putem ovog sustava, bakterija ubrizgava efektorske proteine izravno u citosol stanica domaćina koje okružuju mjesto infekcije. Ti efektori su specijalizirani proteini koji mijenjaju molekularno ponašanje ciljanih stanica, što olakšava širenje infekcije kroz biljku (Hulak *et al.*, 2016) o čemu ćemo više pisati u narednim poglavljima (Zumaquero *et al.*, 2010; Collmer *et al.*, 1997).



Slika 3. – *Pseudomonas syringae* pod elektronskim mikroskopom

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Morphological-characteristics-of-Pseudomonas-syringae-pv-syringae-isolates-observed_fig1_367968657 (pristupljeno 13.09.2024.)

Bakterija *Pseudomonas syringae* ima mnogo podvrsta, koje su vezane za biljku domaćina koje inficiraju. Do sada je opisano barem 50 podvrsta ovog patogena, od kojih su najpoznatiji *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pto), pv. *phaseolicola*, pv. *actinidiae* te pv. *lachrymans*.

Sumirane karakteristike vrste *Pseudomonas syringae* su slijedeće; to su pokretne, ravno ili blago zakrivljene štapićaste bakterije (sadrže jednu ili više polarnih flagela), mnoge vrste nemaju granule polihidroksibutarata, aerobne su bakterije gdje je kisik terminalni akceptor elektrona, ali u nekim slučajevima nitrati alternativni akceptori elektrona, većina vrsta ne može rasti u kiselima uvjetima, po načinu ishrane su fakultativni kemolitotrofi, imaju veliku metaboličku raznolikost, imaju veliku rasprostranjenost u prirodi, mogu biti patogeni ljudi, životinja i biljaka (Gomila *et al.*, 2017).

Klasifikacija <i>Pseudomonas syringae</i>	
Carstvo	Procaryotae
Razdjel	Proteobacteria
Razred	Gama proteobacteria
Red	Pseudomonadales
Porodica	Pseudomonadaceae
Rod	<i>Pseudomonas</i>
Vrsta	<i>Pseudomonas syringae</i>
Podvrsta	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>

Tablica 1.- Klasifikacija bakterije *Pseudomonas syringae* kroz 8 kategorija

3.1. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* - fiziologija i epidemiologija

Pseudomonas syringae pv. *tomato* (Pto) je podvrsta iz roda *Pseudomonas*, koja je patogen na rajčici (*Solanum Lycopersicum Mill*) (Imran et al., 2022).

Mehanizmi kojima ova bakterija uzrokuje bolesti detaljno su opisani u laboratorijskim uvjetima na uročnjaku (*Arabidopsis thaliana*) (Slike 3.1.1.(2,3,4 i 5) o čemu ćemo u narednim poglavljima više pisati. Od početka 1980-ih godina, različiti sojevi gram-negativnog bakterijskog patogena *Pseudomonas syringae* koriste se kao modeli za proučavanje interakcija između biljaka i patogena. Godine 1991., otkriveno je da soj Pto, inficira uročnjak, što je okarakteriziralo ovu infekciju kao modelom u proučavanju interakcije patogena i domaćina. Intenzivna istraživanja tijekom sljedećih dvadeset godina razjasnila su molekularne mehanizme kojima ovaj soj uzrokuje bolest u biljaka. Genomska analiza utvrdila je da Pto posjeduje širok spektar potencijalnih faktora virulencije, uključujući proteinske efekte koji se izlučuju putem sustava sekrecije tip III (T3SS) (Alfano et al., 1997).

Proučavanje patogeneze ove bakterije ne samo da je pridonijelo konceptualnim napredcima u razumijevanju kako bakterijski patogen koristi efekte tip III za suzbijanje biljnih imunoloških odgovora i poticanje osjetljivosti na bolest, već je također omogućilo otkriće imunološke uloge biljnih hormona u biljkama. Koncepti izvedeni iz istraživanja patogeneze ove bakterije mogu biti korisni za razumijevanje mehanizama patogeneze i drugih sličnih biljnih patogena (Fang-Xin et al., 2013).

Pto uzrokuje mnoge promjene na biljci i plodu rajčice. Najčešće spomenuta bolest je bakterijska pjegavost rajčice (Slika 3.1.), no može uzrokovati bolesti na svim biljkama iz porodice *Solanaceae*. Bakterija se u plod rajčice može prenijeti preko zaraženih sjemenki, kontaminirane vode, kontaminiranog tla i alata za obradu tla, te preko kontakta s drugim zaraženim biljkama. Simptomi ove infekcije su pojava nekroza na stabljikama rajčice, male tamnosmeđe mrlje na listovima, uvijanje i žućenje listova te sitne crne mrlje na plodovima rajčice (Slika 3.1.), koje značajno umanjuju njihovu tržišnu vrijednost (Preston et al., 2000).



Slika 3.1. – Plod rajčice zaražen patogenom *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Izvor: <https://news.cornell.edu/stories/2016/09/collaboration-identify-new-disease-resistance-tomato>

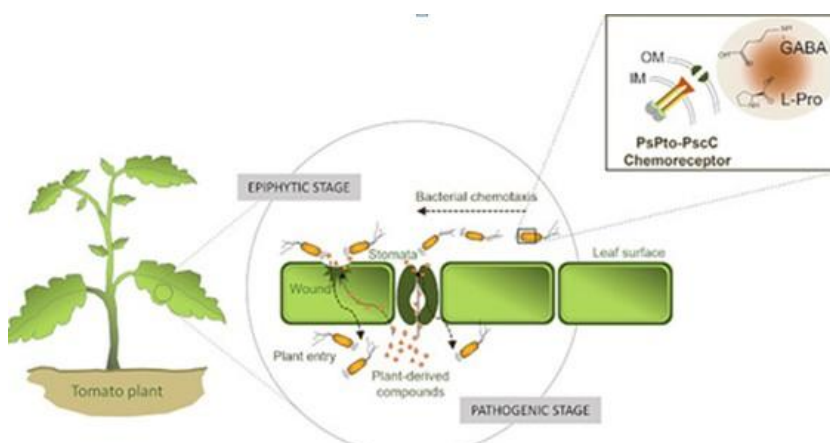
(pristupljeno 07.06.2024.)

3.1.1 Virulencija

Filosfera, površina lišća biljaka, predstavlja dinamično i izazovno stanište za bakterijske zajednice zbog promjenjivih okolišnih uvjeta i raznolike dostupnosti hranjivih tvari. Ovi uvjeti stvaraju selektivno okruženje u kojem bakterije s boljom sposobnošću suočavanja s nepovoljnim uvjetima i pronalaznja hranjivih tvari imaju veću mogućnost preživljavanja. Mnogi bakterijski patogeni koriste filosferu kao izvor hranjivih tvari koje se oslobađaju iz unutrašnjosti biljke putem ispiranja, gutacije, rana na oštećenim listovima ili kroz stomate. Stomate su također glavni ulazni punktovi za mnoge fitopatogene bakterije u apoplast biljke. Jednom kad uđu u apoplast, započinje patogena faza. Stoga, razvoj bolesti ovisi o sposobnosti bakterija da prežive i prilagode se u filosferi, kao i da učinkovito uđu u apoplast biljke. Kemotaksija igra ključnu ulogu u oba procesa, omogućujući bakterijama da osjete i odgovore na signale iz biljaka i okoline. (Santamaria-Hernando *et al.*, 2022.)

Kemotaksija je proces kojim mikroorganizmi, uključujući bakterije, usmjeravaju svoje kretanje prema ili od specifičnih kemijskih podražaja u okolišu. To znači da se bakterije mogu kretati prema povoljnim kemijskim tvarima, poput hranjivih tvari, ili udaljavati od nepovoljnih ili toksičnih tvari. (Slika 3.1.1.)

Bakterije koriste kemotaksiju kako bi preživjele i napredovale u različitim okolišima. Kemijski podražaji se prepoznaju pomoću receptora na površini bakterijske stanice. Ovi receptori detektiraju koncentraciju kemijskih spojeva u okolišu i šalju signale unutrašnjim dijelovima bakterije, koji zatim koordiniraju kretanje flagela (bičeva) kako bi se usmjerile u odgovarajućem smjeru. Kretanje može biti prema višoj koncentraciji korisne tvari (pozitivna kemotaksija) ili prema nižoj koncentraciji štetne tvari (negativna kemotaksija). U kontekstu infekcije biljaka, kemotaksija olakšava pristup bakterijama do apoplasta kroz stomate ili rane i ključna je za osiguravanje učinkovite infekcije. Relevantnost kemotaksije također se ogleda u činjenici da oko 90% fitopatogenih bakterija posjeduje gene za kemosenzoriku, dok se takvi geni nalaze u samo 47% ukupnih bakterija. Osim toga, fitopatogene bakterije u prosjeku imaju 27 gena za kemoreceptore, što je znatno iznad bakterijskog prosjeka od 13 gena. (Santamaria-Hernando *et al.*, 2022.)



Slika 3.1.1. – Ulazak bakterije u biljku pomoću kemotaksije

Izvor:

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fbsppjournals.onlinelibrary.wiley.com%2Fdoi%2Ffull%2F10.1111%2Fmpp.13238&psig=AOvVaw2PoXuC_SlegRCP1nGNAaHm7&ust=1726744902027000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBQQjRqFwoTCIDospWwzlgDFQAAAAAdAAAAABAE

(pristupljeno 20.09.2024.)



Slika 3.1.1.(2)- *Arabidopsis thaliana* 24 sata nakon zaraze patogenom *Pseudomonas syringae*
Izvor: Mentor- N.Hulak



Slika 3.1.1.(3)- *Arabidopsis thaliana* 48 sata nakon zaraze patogenom *Pseudomonas syringae*
Izvor: Mentor-N.Hulak



Slika 3.1.1.(4)- *Arabidopsis thaliana* 72 sata nakon zaraze patogenom *Pseudomonas syringae*
Izvor: Mentor-N.Hulak



Slika 3.1.1.(5)- *Arabidopsis thaliana* 96 sata nakon zaraze patogenom *Pseudomonas syringae*
Izvor: Mentor-N.Hulak

3.2. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* - patogeneza

Infekcija uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) bakterijom *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pto) široko se koristi za proučavanje biljnih imunoloških odgovora i bakterijske patogeneze. Proučavanje virulentnih faktora ove bakterije također se pokazalo korisnim u otkrivanju i razjašnjavanju temeljnih mehanizama u biologiji biljaka. Posebno je zanimljivo što ova bakterija proizvodi fitotoksin koronatin, koji ima veoma sličnu strukturu aktivnog oblika biljnog hormona jasmonata, zaduženog za obranu organizma od bolesti (Yao *et al.*, 2013).

Od ranih 1980-ih, razni sojevi gram-negativnog bakterijskog patogena *Pseudomonas syringae* služili su kao modeli za proučavanje interakcija između biljaka i bakterija. Godine 1991. otkriveno je da soj Pto može zaraziti ne samo svoju prirodnu domaćinsku biljku, rajčicu, već i modelnu biljku uročnjak (*Arabidopsis thaliana*) u laboratorijskim uvjetima. Ovo otkriće pokrenulo je opsežna istraživanja tijekom sljedećih dvadeset godina kako bi se bolje razumjeli molekularni mehanizmi koji omogućuju ovom soju da uzrokuje bolesti u biljkama. Genomska analiza pokazala je prisutnost velikog broja potencijalnih čimbenika virulencije, uključujući proteinske efekte koji se izlučuju putem tipa III sekrecijskog sustava, kao i poliketidni fitotoksin koronatin, koji strukturno imitira biljni hormon jasmonat. Istraživanje patogeneze ovog patogena donijelo je nekoliko važnih otkrića, uključujući način na koji bakterija koristi efekte tipa III za suzbijanje biljnih imunoloških odgovora i povećanje osjetljivosti na bolesti. Također, ovo istraživanje dovelo je do otkrića imunološke uloge stomata i ključnih komponenti signalizacije putem jasmonata u biljkama. (Xin *et al.*, 2013).

U daljnjem tekstu ćemo navesti glavne mehanizme kojima ova bakterija uzrokuje bolesti kod rajčice i uročnjaka, te ćemo također istražiti i glavne odgovore imuniteta koje uročnjak i biljke općenito daju u borbi protiv ove bakterije.

3.2.1. Mehanizmi patogeneze

Pseudomonas syringae je patogena bakterija na velikom broju biljnih vrsta. Za infekciju domaćina i napredovanje bolesti, sojevi ove bakterije koriste tip III sekretirane efekte i druge faktore virulencije, uključujući male sekretirane molekule kao što je poliketidni fitotoksin koronatin, koji oponaša i inhibira djelovanje biljnog hormona jasmonata. (Dudnik *et al.*, 2014).

3.2.1.1. Koronatin i sinteza koronatina

Koronatin (KO) (Slika 3.2.1.1.) je fitotoksin koji proizvodi bakterija *Pseudomonas syringae*. To je molekula koja ima ključnu ulogu u patogenezi ove bakterije, jer omogućuje bakteriji da kolonizira i uspješno izazove bolesti u biljkama domaćinima. Ko u biljkama izaziva odgovor imuniteta koji se događa kada biljke bivaju napadnute insektima, te se mehanizam obrane biljke lažno odvodi u drugom smjeru i negativno regulira mehanizme obrane imuniteta u biljke zadužene za obranu od bakterija i gljiva. (Geng *et al.*, 2012). KO je strukturno sličan jasmonatima, biljnim hormonima koji reguliraju različite aspekte rasta biljaka, razvoja i obrambenih odgovora.

KO imitira djelovanje jasmonata, posebice jasmonske kiseline, koja je uključena u regulaciju gena odgovornih za obrambene reakcije biljaka. Na taj način KO ometa normalne obrambene mehanizme biljaka, uključujući sintezu proteina koji su važni za otpornost na patogene (Mittal *et al.*, 2015).

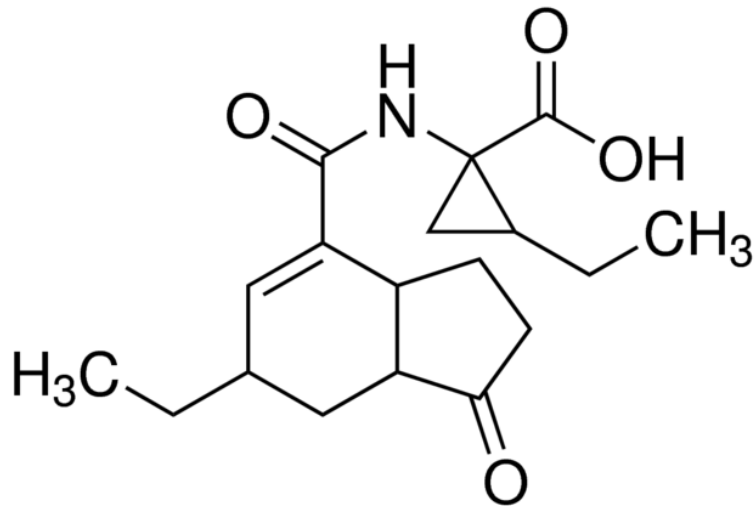
Supresijom obrane biljaka, odnosno djelovanjem na jasmonatne signalne putove, KO potiskuje obrambene odgovore biljaka. To uključuje smanjenje proizvodnje salicilne kiseline, koja je ključna za obranu protiv mnogih patogena, uključujući bakterije, gljivice i viruse (Geng *et al.*, 2012).

KO uzrokuje nekrotične lezije na biljkama, koje služe kao ulazna točka za bakteriju i omogućuju širenje infekcije. Te lezije su rezultat stanične smrti izazvane disruptivnim djelovanjem KO na stanične procese (Mittal *et al.*, 2015).

KO uzrokuje fenotipske promjene na biljkama gdje dolazi do kovrčanja listova, stvaranja tumora i hipersenzitivne reakcije. Te promjene dodatno oslabljuju biljku i omogućuju lakše širenje patogena (Mittal *et al.*, 2015).

Prilikom istraživanja uloge koju ima fitotoksina KO u virulenciji bakterije Pto u biljci *Arabidopsis thaliana* (uročnjaku) uočeni su vrlo jasni simptomi bolesti, umnažanje bakterija u biljci te indukcija gena povezanih s obranom kod uročnjaka. U istraživanju objavljenom 2015. godine biljke uročnjaka su se inokulirale sa sojem Pto koji nije producirao KO (Δ COR-), te sojem koji je bio *wild type* (producira KO). Dokazano je da sojevi koji proizvode KO uzrokuju teže i izraženije simptome bolesti te se umnažaju za 10^4 - 10^6 CFU/ml nakon inokulacije infiltracijom ili umakanjem metodom „*dippinga*“. S druge strane, soj koji nije proizvodio KO, nije uzrokovao simptome bolesti i umnažao se samo za 10^1 - 10^2 CFU/ml metodom „*dippinga*“, dok je uzrokovao blage simptome i umnažao se za 10^6 CFU/ml nakon infiltracije tijekom 4-dnevnog eksperimentalnog perioda. Slični rezultati dobiveni su i na rajčici (Mittal, Davis, 2015). Ovi rezultati ukazuju da je proizvodnja KO ključna za uspješnu infekciju biljke uročnjaka od patogena Pto. Također sugeriraju da KO može odigrati važnu ulogu tijekom ranih faza infekcije suprimirajući aktivaciju gena povezanih s obranom u biljci

domaćinu. KO je važan virulentni faktor jer pridonosi većoj patogenosti Pto, te time Pto zaobilazi obrambene mehanizme biljke domaćina, izazove bolest i kolonizira biljno tkivo. Razumijevanje kako KO i slični fitotoksinidjeluju pomaže u razvoju strategija za sprečavanje biljnih bolesti uzrokovanih ovim patogenom (Mittal *et al.*, 2015.).



Slika 3.2.1.1.- Struktura koronatina

Izvor: <https://www.scientificlabs.ie/product/bioreagents/C8115-1MG> (pristupljeno 20.06.2024)

Sinteza koronatina

Pseudomonas syringae proizvodi KO putem složenog biosintetskog puta koji uključuje dva glavna klastera gena, a to su koronafinska kiselina i koronaminska kiselina. Geni za biosintezu tih kiselina nalaze se u klasterima na bakterijskom kromosomu. Enzimi kodirani genima u koronafinskom i koronaminskom klasteru pretvaraju prekursorske molekule u koronafinsku i koronaminsku kiselinu kroz niz enzimatskih modifikacija, poput amidacije i hidroksilacije. Nakon sinteze te dvije kiseline se spajaju u kompletnu molekulu KO, što je također katalizirano specifičnim enzimima (Geng X. *et al.*, 2012).

Ekspresija gena za biosintezu KO regulirana je proteinima poput HrpL, sigma faktora koji aktivira transkripciju gena povezanih s virulencijom, uključujući gene za biosintezu KO. HrpL je sigma faktor specifičan za bakterije roda *Pseudomonas*, od ključne važnosti za regulaciju gena povezanih s virulencijom. Sigma faktori su podjedinice RNA polimeraze koje prepoznaju promotorske sekvence na DNK, inicirajući tako transkripciju određenih gena (Brooks *et al.*, 2004). U *Pseudomonas syringae*, HrpL regulira ekspresiju gena koji kodiraju komponente tipa III sekretijskog sustava (T3SS), ključne za isporuku efektorskih proteina u biljne stanice domaćina. T3SS omogućuje bakterijama suzbijanje obrambenih mehanizama biljaka i poticanje patogeneze. HrpL aktivira transkripciju ciljnih gena prepoznavanjem specifičnih promotorskih sekvenci, poznatih kao hrp box, smještenih uzvodno od gena uključenih u TTSS

i druge virulentne faktore, uključujući biosintezu fitotoksina poput KO. Na taj način HrpL usklađuje ekspresiju ključnih gena koji omogućuju *Pseudomonas syringae* uspješnu infekciju biljaka domaćina (Geng X. *et al.*, 2012).

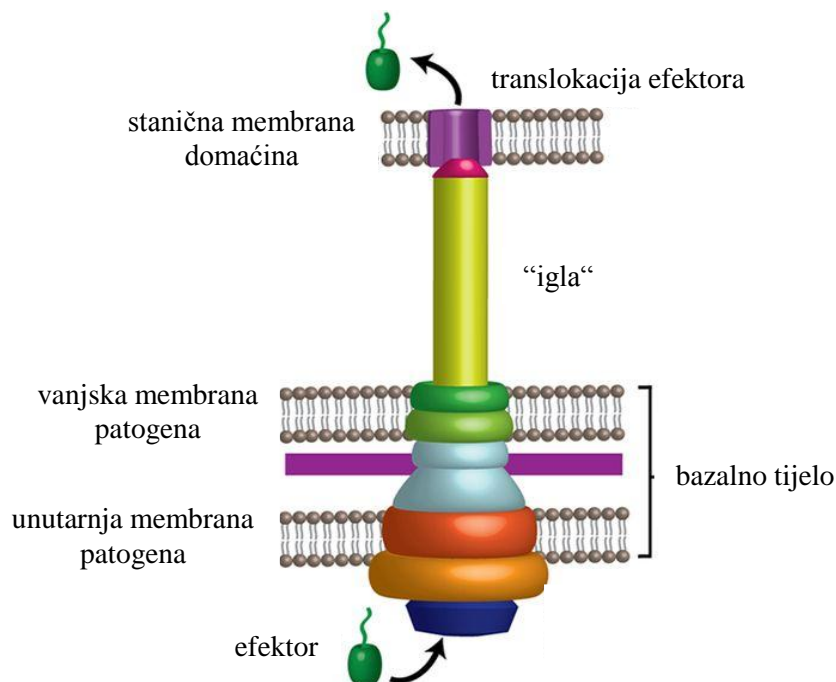
3.2.1.2. Sekrecijski sistem tip III

Sekrecijski sistem tip III (T3SS) (Slika 3.2.1.2.) je sofisticirani mehanizam koji koriste mnoge gram-negativne bakterije, uključujući patogene kao što su *Pseudomonas syringae*, *Salmonella*, *Shigella* i *Escherichia coli* za transport specifičnih proteina (efektora) iz bakterijske stanice direktno u stanice domaćina. Ovi proteini, poznati kao efektori, igraju ključnu ulogu u uspostavljanju i održavanju infekcije. T3SS se sastoji od nekoliko podjedinica, koje se pak sastoje od približno 20 bakterijskih proteina koji formiraju strukturu sličnu igli. Ova struktura prolazi kroz unutarnju i vanjsku membranu bakterije, a produžetak ove strukture omogućuje bakteriji da direktno isporuči efektore u citoplazmu stanice domaćina. T3SS je važan za virulenciju mnogih bakterijskih patogena jer omogućuje preciznu isporuku efektor koji manipuliraju biološkim procesima domaćina na načine koji pogoduju bakterijskoj infekciji i razvoju bolesti. Najvažniji su efektorski proteini koji se prenose kroz T3SS u stanice domaćina, gdje preuzimaju različite funkcije, uključujući suzbijanje imunološkog odgovora domaćina, manipuliranje signalnim putevima, induciranje stanične smrti, i omogućavanje bakterijskog rasta (Cunnac *et al.*, 2009).

Sposobnost *Pseudomonas syringae* da uzrokuje bolesti u biljkama ovisi o injektiranju više efektorskih proteina u stanice biljaka putem T3SS. Genomski omogućene bioinformatičke/eksperimentalne metode sveobuhvatno su identificirale repertoare efektor i srodnih T3SS supstrata za Pto i tri druga sekvencirana soja. Repertoari efektor su raznoliki i unutarnje redundantni. Uvidi u funkcije efektor dobivaju se kroz konstrukciju mutanata koji nemaju jedan ili više gena za efektore, što može smanjiti njihov rast u biljci, te kroz testove za sposobnost pojedinih efektor da suzbiju urođenu imunološku obranu biljke, manipuliraju signaliziranjem hormona, izazivaju staničnu smrt i/ili pokazuju biokemijske aktivnosti na proteinskim metama biljaka (Zumaquero *et al.*, 2010).

Kao što je već spomenuto, T3SS je ključan za učinkovito uspostavljanje infekcije. Radi se o vrlo sofisticiranoj strukturi, sastavljenoj od otprilike 20 različitih proteina, koji omogućuju sekreciju kroz obje membrane bakterije u citoplazmu eukariota. Važnost ovog sustava je toliko velika da mutacije koje ometaju njegovu funkciju značajno utječu na sposobnost patogenoze. Poznato je da su geni koji kodiraju komponente T3SS grupirani u klastere. Dok se u nekim drugim vrstama mogu naći na plazmidima specifičnim za patogene bakterije, to nije slučaj kod nepatogenih sojeva. U slučaju Pto, kao i kod nekih drugih vrsta čini se da je genski klaster za T3SS stečen horizontalnim prijenosom i nalazi se isključivo na kromosomu. Ovi geni kodiraju tri grupe funkcionalnih proteina: strukturne proteine, efektorske proteine, koji se unose u stanicu domaćina kako bi potaknuli infekciju suzbijanjem obrane biljke, i

šaperone, koji štite efektore od agregacije i degradacije te ih usmjeravaju prema sekrecijskom aparatu. U nekim sojevima *Pseudomonas syringae* postoje dodatni kodirani proteini koji se izlučuju na način ovisan o T3SS i pomažu efektorima da se translociraju preko stanične membrane biljke. Postoji nekoliko grupa gena koji kodiraju efektore T3SS, s 31 potvrđenim i još 19 predviđenih. Ovi efectori su opisani kao "Hop" proteini (proteini vanjske patogenosti i HR-a) ili "AVR" proteini (avirulentnost), i oni su ključni za uspješnu infekciju, kao što je dokazano za njih 28. Kombinacija svih T3SS efektorata je ključna za prevladavanje obrane domaćina, rast ili izazivanje simptoma u biljkama, iako se pojedinačna uloga efektorata u patogenezi još uvijek utvrđuje i iscrpno istražuje, te se mutanti pojedinih bakterijskih efektorata uspješno koriste u istraživanju, zbog sinergije sa ostatkom patogene mašinerije prilikom infekcije, proces utvrđivanja direktne uloge pojedinog efektorata je dugotrajan (Cunnac *et al.*, 2009; Hulak *et al.*, 2015.).



Slika 3.2.1.2.- Translokacija proteina efektorata u stanicu domaćina putem T3SS

Izvor: <https://j.b.asm.org/content/197/4/672> (pristupljeno 13.09.2024.)

3.2.1.3. Efektorski proteini

Efektorski proteini su specijalizirani proteini koje patogene bakterije, poput *Pseudomonas syringae*, koriste za manipulaciju staničnim procesima domaćina kako bi omogućile infekciju i preživljavanje bakterije. Ovi proteini se često isporučuju direktno u stanice domaćina putem sekrecijskog sustava tip III.

Efektorski proteini su ključni za patogenost jer omogućuju bakterijama da preuzmu kontrolu stanica domaćina i uspostave uspješnu infekciju. Bez efektoriskih proteina, bakterijski rast bi bio zaustavljen pomoću obrambenih mehanizama domaćina.

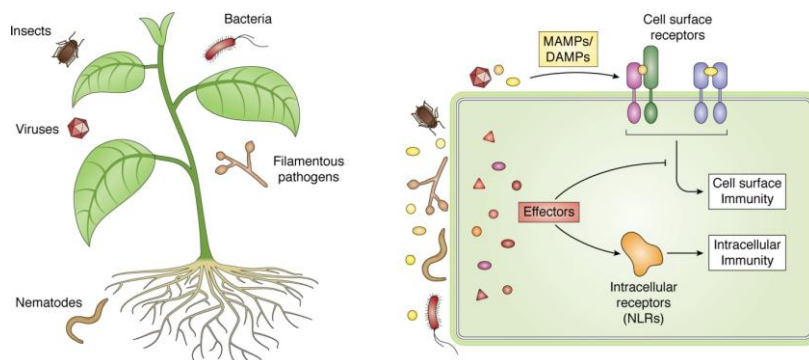
Ključne karakteristike i funkcije efektoriskih proteina uključuju:

1. Suzbijanje imunološkog odgovora biljke, kako bi inhibirali ili izbjegli obrambene reakcije biljke koje bi mogle uništiti bakteriju i spriječiti infekciju
2. Manipulacija signalnim putevima mijenjajući stanične procese kako bi pogodovali bakterijskoj infekciji i rastu
3. Indukcija stanične smrti pomoću nekih efektoriskih proteina koji mogu izazvati programiranu staničnu smrt u stanicama domaćina, što može pomoći bakteriji u širenju na nova tkiva ili izbjegavanju imunološkog nadzora
4. Biokemijska aktivnost pomoću kojih mogu direktno modificirati proteine, lipide, ili druge molekule unutar stanice domaćina, mijenjajući njihovu funkciju
5. Omogućavanje bakterijskog rasta pomoću kojih mogu prilagoditi okoliš stanice domaćina kako bi olakšali pristup hranjivim tvarima ili stvorili uvjete pogodne za bakterijski rast.

(Hoom *et al.*, 2008.)

4. Imunitet biljke domaćina u patogenezi

Biljke su podložne bolestima, a njihova sposobnost odgovora na infekcije uzrokovane patogenima i štetnicima ključna je za njihovo preživljavanje. U poljoprivredi, bolesti biljaka uzrokuju gubitke prinosa i mogu imati razorne posljedice kako za mala gospodarstva, tako i za industrijaliziranu poljoprivredu, što utječe na opskrbe hranidbenih lanaca, ali i diktira tržišnu vrijednost proizvoda (Anderson *et al.*, 2010). Mnogi mikroorganizmi koji su u interakciji sa biljkama su patogeni te mogu imati negativan učinak na rast i razvoj biljaka. Kako bi se uspješnije nosile sa prisutnošću takvih mikroorganizama biljke su razvile vrlo učinkovite obrambene mehanizme (Slika 4.). Biljke imaju nekoliko razina imunološke obrane protiv patogena. Prva razina mehanizama obrane vrlo je učinkovita, ne specifična i detektira molekule koje su zajedničke mnogim vrstama mikroorganizama, uključujući i nepatogene te razne insekte. Druga razina mehanizama obrane je specifična i odgovara na virulentne molekule patogena (efektore), bilo izravno ili putem njihovog djelovanja na mete unutar biljke. Imunološki sustav biljaka, zajedno s patogenim molekulama na koje djeluje, predstavlja složenu molekularnu interakciju u staničnoj biologiji i dinamičnu ko-evoluciju. Imunološki sustav biljaka od velikog je znanstvenog interesa budući ima važnu ulogu za prijeko potrebno unapređivanje poljoprivrednih usjeva (Jones i Dangl, 2006). Imunološki sustav biljaka nalikuje u mnogočemu imunološkim sustavom životinja. No, budući da biljkama nedostaje adaptivni imunološki sustav, one se oslanjaju isključivo na urođeni ili nativni imunitet za prepoznavanje mikrobnih patogena i štetnika. Biljni imunitet može se konceptualno podijeliti na imunitet na površini stanica, prilikom čega je mikroorganizam epifitičan i unutar stanični imunitet (apoplast biljke), gdje mikroorganizam u većini slučajeva bude patogen (Slika 5.). Oba načina interakcije sa mikroorganizmima alarmira imunitet, prilikom čega može doći i do preklapanja između prvog (nativnog) i drugog (sekundarnog) imuniteta. Važno je naglasiti da oba imuniteta djeluju sinergijski u svrhu što bolje i uspješnije obrane (Bentham *et al.*, 2020).



Slika 4.- Prikaz aktivacije receptora za imunitet biljaka

Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7606695/> (pristupljeno 25.06.2024.)

4.1. Primarni i sekundarni imunitet biljaka

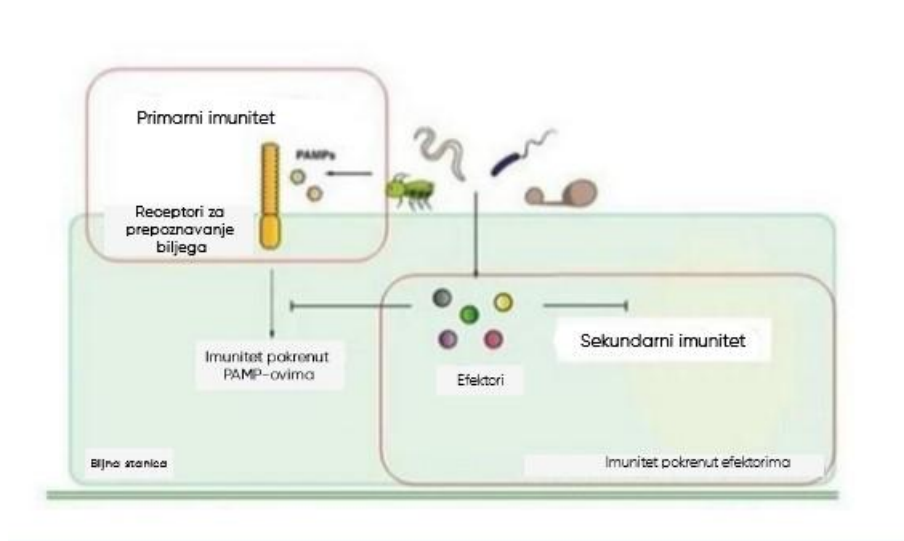
Primarni imunitet biljaka (Slika 4.1.), poznat i kao prvi krak urođenog imuniteta, je obrambeni mehanizam biljaka koji prepoznaje i reagira na opće patogene obrasce koji su zajednički mnogim mikroorganizmima, uključujući i nepatogene mikroorganizme te insekte. Ovaj oblik imuniteta uključuje prepoznavanje mikrobioloških molekula specifičnih za patogene (eng. PAMPs - pathogen-associated molecular patterns), kao što su flagelin ili lipopolisaharidi, preko receptora koji su prisutni na površini biljnih stanica. Kada se PAMP prepoznaju, aktivira se obrambeni odgovor biljke, koji uključuje proizvodnju antimikrobnih spojeva, jačanje staničnih stijenki i druge reakcije koje pomažu u sprječavanju daljnjeg širenja infekcije (Ngou *et al.*, 2022).

Sekundarni imunitet biljke, poznat i kao efektorski-inducirana obrana imuniteta (eng. Effector-triggered immunity, ETI), predstavlja drugu liniju obrane biljaka protiv patogena. Za razliku od primarnog imuniteta, koji prepoznaje patogene na generalnoj razini, sekundarni imunitet prepoznaje specifične molekule koje patogeni koriste za potiskivanje obrambenih mehanizama biljke prilikom infekcije. Te specifične molekule koje čine glavnu interakciju patogen-biljka u sekundarnom imunitetu čine efektori i R-proteini (eng. Resistance proteins). Efektori su molekule koje patogeni izlučuju kako bi potisnuli primarni biljni imunološki odgovor te kako bi omogućili snažniju i specifičnu infekciju unutar biljke, a R-proteini su specifični proteini unutar biljke domaćina koji prepoznaju prisutnost određenog bakterijskog efektor, te uspješno zaustavljaju njegovo djelovanje unutar biljke (Piasecka *et al.*, 2015).

Sekundarni biljni metaboliti igraju ključne uloge u interakcijama između biljaka i mnogih drugih organizama. Opsežna istraživanja na uročnjaku značajno su unaprijedila naše razumijevanje molekularnih mehanizama koji upravljaju biosintezom i aktivacijom obrambenih sekundarnih metabolita potaknutih prisutstvom patogena.

Unatoč dokazanom značaju sekundarnih metabolita u biljnoj reakciji na patogene mikroorganizme, precizni mehanizmi koji čine osnovu njihovog doprinosa biljnom imunitetu još uvijek su slabo razumljivi, budući je ova interakcija vrlo dinamičan proces koji evoluirala (Jones i Dangl, 2006).

Iako su mnogi sekundarni metaboliti poznati po svojoj antimikrobnoj aktivnosti *in vitro*, često se pretpostavlja da ovi spojevi djeluju kao *in planta* antibiotici u obrani biljaka. Međutim, istraživanja sugeriraju da neki od ovih spojeva mogu imati alternativne uloge, uključujući kontrolu nekoliko imunoloških odgovora koji su evolucijski očuvani u biljnom kraljevstvu, kao što su taloženje kaloze, zatvaranje puči i stoma, te programirana stanična smrt (Piasecka *et al.*, 2015).



Slika 4.1.- Način aktivacije primarnog i sekundarnog imuniteta biljke
Izvor: Original

4.1.1. R geni

R geni (eng. Resistance genes) su geni u biljkama koji kodiraju za proteine koji su ključni za otpornost na patogene, poput bakterija, gljiva i virusa. Ovi geni igraju važnu ulogu u imunitetu biljke jer omogućuju biljkama da prepoznaju prisutnost patogena i pokrenu specifične obrambene mehanizme. Prepoznaju specifične molekule patogena ili njihove efektore (McDowell *et al.*, 2003).

Nakon prepoznavanja patogenog efektor, R geni aktiviraju niz događaja u biljci koji uključuju brzu proizvodnju antimikrobnih tvari, kao što su fitoalexini ili antimikrobni peptidi, te aktivaciju signalnih putova koji dovode do hipersenzitivnog odgovora ili sustavo stečene rezistencije.

Često su prisutni u višestrukim kopijama u biljnom genomu, a njihova raznolikost doprinosi varijabilnosti u biljnoj otpornosti na različite patogene sojeve. Polimorfizam R gena u populaciji biljaka omogućava prilagodbu na lokalne patogene i evolucijski pritisak.

R geni su ključni element u razumijevanju biljnog imunološkog sustava i igraju važnu ulogu u razvoju biljnih sorti s poboljšanom otpornošću na bolesti putem selekcijskih i biotehnoloških pristupa (McDowell *et al.*, 2003).

4.2. PAMPs /MAMPs molekule

PAMP (eng. Pathogen-Associated Molecular Patterns)/MAMP (eng. Microbe-Associated Molecular Patterns) su evolucijski očuvani molekularni obrasci karakteristični za mikroorganizme kao što su bakterije, virusi, gljivice i paraziti. Stanice urođenog imunološkog sustava prepoznaju PAMPs pomoću receptora za prepoznavanje (eng. PRR- Pattern recognition receptors), uključujući Toll-like receptore (TLR), NOD receptore (NLR) i RIG receptore (RLR).

Primjeri PAMP molekula su: lipopolisaharidi iz vanjske membrane gram-negativnih bakterija, dvostruko lančana RNA virusa, protein bakterijskih bičeva-flagelin, te peptidoglikan iz stanične stijenke gram pozitivnih bakterija.

Kada PRR prepoznaju PAMPs, aktivira se imunološki odgovor koji uključuje upalne procese i druge obrambene mehanizme za neutralizaciju i uklanjanje patogena. PAMPs igraju ključnu ulogu u pokretanju imunološkog odgovora i održavanju homeostaze organizma. (Tang *et al.*, 2012.)

Kada se PRR-ovi vežu na PAMPs, pokreću unutarstanične signalne odgovore. Ove molekule koordiniraju rani odgovor domaćina na infekciju i nužne su za kasniju aktivaciju i oblikovanje adaptivnog imuniteta. Kako bi se spriječila imunopatologija, sustav je strogo reguliran endogenim molekulama koje ograničavaju intenzitet i trajanje upalnog odgovora. Patogeni mikroorganizmi razvili su sofisticirane strategije za izbjegavanje obrane domaćina, ometajući molekule uključene u upalne signale (Mogensen, 2009).

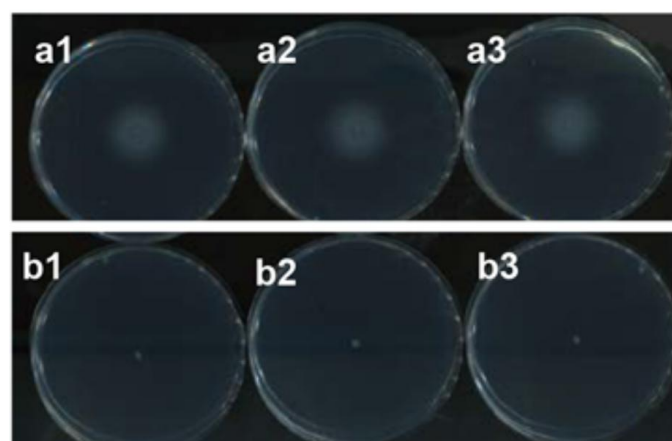
4.3. PAMP-inducirana imunost(PTI)

PAMP-inducirana imunost (PTI) počinje kada biljke prepoznaju PAMP putem receptora za prepoznavanje (PRR) . PAMPs su molekule povezane s raznim patogenima, a biljke s odgovarajućim PRR-ovima mogu otkriti prisutnost patogena pri vrlo niskim koncentracijama (Newman, 2013). Najpoznatiji PAMP-PRR sustav uključuje prepoznavanje dijela bakterijskog flagelina, koji služi za izgradnju flagela kojim se Pto pokreće (Slika 4.3.). Flagelin ili flg22 je epitop sačinjen od 22 aminokiseline. Ovaj konzervirani dio flagelina je ključan za bakterijski flagelin, što upućuje na to da su biljke razvile sustav za prepoznavanje širokog spektra patogena, smanjujući mogućnost da bakterije izbjegnu detekciju mutacijom PAMP-a. Ostali konzervirani PAMP i MAMP koje biljke prepoznaju uključuju hitin, osnovni građivni element staničnih stijenki gljiva, molekulu za kvorum-senzing iz patogena *Xanthomonas oryzae* koji napada rižu, glukan iz *Phytophthora megasperma* i bakterijski Tu-elongacijski faktor (Anderson *et al.*, 2010).

PTI inducira brojne obrambene reakcije, uključujući molekularne, morfološke i fiziološke promjene. Rane promjene, koje se događaju u roku od nekoliko sekundi do minuta, uključuju

protok iona preko plazma membrane, oksidativni stres, aktivaciju mitogen-aktiviranih proteina kinaza i fosforilaciju proteina. Slijedi značajna transkripcijska reprogramacija unutar prvog sata PTI, koja uključuje do 3% transkriptoma u *uročnjaku*. Postoji snažan dokaz za značajno preklapanje odgovora na različite PAMP, pri čemu molekula obrambenog signala salicilna kiselina igra važnu ulogu. Kasnije promjene uključuju taloženje kaloze, koja služi kao fizička barijera na mjestima infekcije, i zatvaranje stoma. Stome, koje su glavni ulaz za mnoge biljne patogene, kod *Arabidopsis thaliane* zatvaraju se unutar jednog sata kao odgovor na PAMP (Mogensen, 2009). Evolucija PTI dogodila se rano, budući da FLS2 homolozi postoje u svim sekvenciranim višim biljkama. Funkcionalna konzervacija FLS2 dokazana je ekspresijom gena FLS2 iz riže u mutantu *Arabidopsis thaliana fls2*, što upućuje da su povezani signalni putevi također konzervirani. Međutim, daljnja evolucija PTI vidljiva je u prepoznavanju EF-Tu (elongation factor) pomoću receptorske kinaze (RLK) proteina EFR, koja se javlja samo u *Brassicaceae* (kupusnjačama).

Mnogi bakterijski efektori, uključujući flg22, HrpZ i EF-Tu, mogu koristiti isti nizvodni signalni put koji uključuje MAP kinaza kaskadu i RLK BAK1. Iako PTI induciran gljivičnim PAMP-om hitinom koristi barem neke različite nizvodne komponente, jer je neovisan o BAK1, aktivnost MAP kinaza je još uvijek zabilježena 10 minuta nakon tretmana hitinom. Gimenez-Ibanez i suradnici su otkrili da PTI interakcija bakterijskog patogena *Pto* također uključuje put neovisan o BAK1 i ovisi o CERK1 iz hitinske PTI putanje. Ovi rezultati sugeriraju da su biljke razvile sposobnost prepoznavanja raznih signala povezanih s patogenima s određenim stupnjem redundantnosti, tako da jedan patogen može pokrenuti nekoliko neovisnih ili povezanih PTI putanja. Situacija u kojoj jedan patogen može aktivirati nekoliko PTI putanja, svaka s nizom obrambenih odgovora, može doprinijeti širokoj učinkovitosti PTI. U nekim slučajevima, svaka PTI signalna putanja može se konvergirati kako bi aktivirala uglavnom konzervirani obrambeni odgovor. (Anderson *et al.*, 2010).



Slika 4.3.- Test motiliteta (kretanja). Bakterijski sojevi su inkubirani 2 dana na 23°C na mekom agaru, King's B koji sadrži 10 mM MgCl₂ ploču. Slika prikazuje 3 neovisne biološke replike za svaki soj (*Pto* DC3000; a1, a2, a3 i Δ fliC; b1, b2, b3)

Izvor: Hulak N.- diplomski rad

4.4. Zig-zag model

Zig-zag model (Slika 4.4.) je konceptualni okvir koji opisuje interakciju između biljaka i patogena, te kako biljke razvijaju svoj imunološki odgovor kada su napadnute patogenom. Ovaj model objašnjava kako se biljke bore protiv patogena kroz dvije glavne faze: PTI (PAMP-triggered immunity) i ETI (effector-triggered immunity). Godine 2006., Jones i Dangl su predložili ovaj jednostavan model interakcije između biljaka i patogena, te ga nazvali 'zigzag' modelom. Prva grana obrane prepoznaje konzervirane molekule koje dijele mnoge vrste mikroorganizama (molekularni obrasci povezani s patogenima ili mikroorganizmima, PAMPs ili MAMPs), te se iz tog razloga naziva PAMP inducirani imunitet (PTI). Druga grana prepoznaje i odgovara na virulencijske faktore nazvane efektorima, koji u modelu služe za suzbijanje PTI-a. Ova grana se naziva imunitet induciran efektorima (ETI). Predloženi model je imao velik znanstveni odjek u patologiji biljaka te se pokazao kao vrlo dobar model za razumijevanje interakcija između biljaka i patogena (Jones i Dangl, 2006).

U prvoj fazi, PAMPs (ili MAMPs) budu prepoznati od strane PRR-ova (Pattern Recognition Receptor), što rezultira imunitetom pokrenutim PAMPs (PTI) koji može zaustaviti daljnju kolonizaciju patogenima. U fazi 2, uspješni patogeni zatim koriste efektore koji doprinose većoj virulentnosti patogena. Efektori mogu ometati PTI, oni ju prijeu, što rezultira osjetljivošću pokrenutom efektorima (ETS). U fazi 3, određeni efektor je 'specifično prepoznat' od strane jednog od NB-LRR proteina.

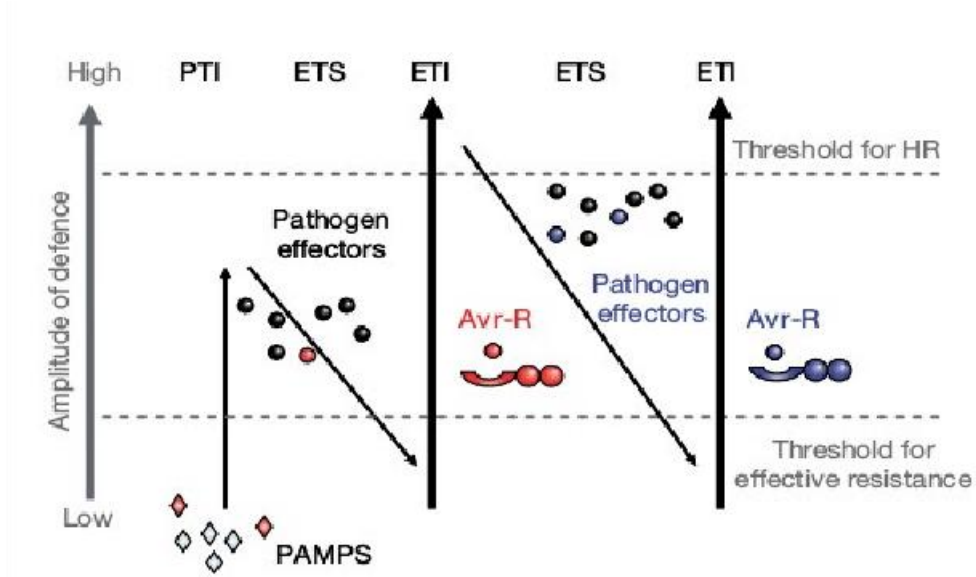
NB-LRR proteini prepoznaju efektore i pokreću Effector Triggered Immunity ili ETI. Prepoznavanje je ili neizravno, ili kroz izravno NB-LRR prepoznavanje efektor. ETI je ubrzan i jači od PTI odgovora, što rezultira otpornošću na bolesti i, obično, hipersenzitivnim odgovorom što rezultira sa smrti stanice (HR) na mjestu infekcije, što se smatra kao uspješnom obranom biljke. U fazi 4, prirodna selekcija tjera patogene da izbjegavaju ETI ili odbacivanjem ili diverzifikacijom prepoznatog gena efektor, ili stjecanjem dodatnih efektor koji suzbijaju ETI. I time se priča nastavlja.

Većina molekularnih procesa opisanih u zigzag modelu vjerojatno se događa tijekom jedne interakcije biljke s jednim ili više biotrofičnih patogena.

Međutim, faza 4 u originalnom opisu modela (gubitak i/ili dobivanje efektor) događa se u zigzag modelu eksplicitno kao rezultat selekcijskog pritiska, koji djeluje na razini populacije i tijekom dužih vremenskih razdoblja, ko-evolucije.

Zigzag model očito nije bio namijenjen predstavljanju uređenog niza događaja tijekom jednog događaja infekcije niti opisivanju procesa koji se događaju tijekom infekcije na način da bude interpretativni okvir za izravni eksperiment u tom kontekstu (Pritchard, Birch, 2014). Ipak je Zigzag model izrazito široko prihvaćen model koji čak točno aproksimira evolucijski

redosljed razvoja komponenti biljnog imunološkog sustava. On dobro ilustrira općenitu prirodu nekih tipova molekularnih interakcija između biljaka i mikroorganizama, ali ne pruža kvantitativne ili prediktivne informacije (Jones i Dangl, 2006).



Slika 4.4.- Zig-zag model objašnjen od strane Jonesa i Dangla

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/A-zig-zag-model-illustrates-the-quantitative-output-of-the-plant-immune-system-5_fig1_287996237 (pristupljeno 18.07.2024.)

5. Uloga hormona stresa u biljaka

U posljednjih 25 godina intenzivno se istraživala uloga koju imaju biljni hormoni u otpornosti biljaka na patogene. Biljni hormoni imaju jednu od najvažnijih uloga u borbi biljaka protiv patogena i imunitetu biljaka.

Točnije, imaju ključnu ulogu u regulaciji razvojnih procesa i signalnih mreža koje sudjeluju u reakcijama biljaka na razne biotičke i abiotičke stresove. Identifikacija ključnih komponenti i razumijevanju uloge salicilne kiseline, jasmonata i etilena u reakcijama biljaka na biotičke stresove unaprijedila je znanstvena istraživanja te je dala uvid u molekularne mehanizme koje oni imaju. Istraživanja ističu da i drugi hormoni poput abscizinske kiseline, auksina, giberelinske kiseline, citokinina, brasinosteroida i peptidnih hormona također igraju ulogu u signalnim putovima obrane biljaka, ali je njihova uloga u obrani manje poznata (Bari *et al.*, 2009).

5.1. Salicilna kiselina

Salicilna kiselina (SA) (Slika 5.1.(2)), je biljni hormon koji ima ključnu ulogu u poticanju obrane biljaka protiv raznih biotičkih i abiotičkih stresova (Slika 5.1.) putem morfoloških, fizioloških i biokemijskih mehanizama. SA signalizira u biljci domaćinu otpornost na hemibiotrofne ili biotrofne patogene kakav je i Pto. U nekoliko istraživanja nastojao se procijeniti biokemijski odgovor biljaka na različite koncentracije SA. Biljke brzo reagiraju na salicilnu kiselinu pri koncentraciji od 1.5 mM. Biljke tretirane SA pri koncentraciji od 2 mM pokazuju fitotoksične simptome.

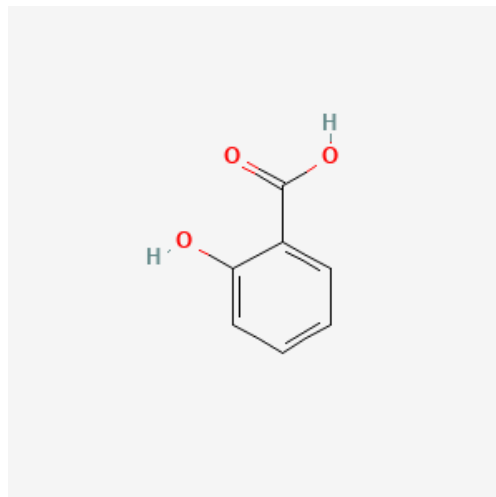


Slika 5.1.- Biljka u laboratoriju mijenja boju pod utjecajem stresa nedostatka hranjiva

Izvor: Jin-Zheng ang *et al.*, 2022.

Rezultati ističu da je SA pri koncentraciji od 1.5 mM sigurna za biljke i može se koristiti za poticanje obrambenih mehanizama. Egzogeno primjena SA mijenja različite fiziološke, biokemijske i molekularne procese u biljkama, uključujući aktivnosti antioksidativnih enzima (Jin-Zheng Wang *et al.*, 2022).

SA regulira vlastiti signalni put i sudjeluje u međusobnoj komunikaciji s drugim signalnim putevima koji su zaduženi za otpornost biljaka. Utječe na rast biljaka pod stresom kroz unos hranjivih tvari, regulaciju stoma i fotosintezu. Regulira aktivnosti različitih enzima, uključujući peroksidazu, polifenol oksidazu, superoksid dismutazu i fenilalanin amonijak liazu, koji su ključni za induciranu obranu biljaka protiv biotičkih i abiotičkih stresova. Peroksidaze čine važnu grupu obrambenih enzima koji štite biljke od različitih stresova. Polifenol oksidaze također igraju ključnu ulogu u obrani biljaka. Fenolni spojevi biljaka su najzastupljenija i najvažnija grupa obrambenih spojeva koji posreduju obranu biljaka (War *et al.*, 2011).

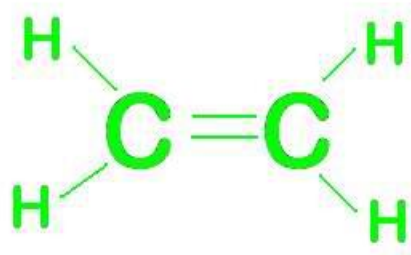


Slika 5.1.(2)-Strukturna formula salicilne kiseline

Izvor: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Salicylic-Acid> (pristupljeno 22.06.2024.)

5.2. Etilen

Etilen (ET) (Slika 5.2.) je ključni biljni hormon koji regulira različite aspekte rasta i razvoja biljaka tijekom cijelog životnog ciklusa biljke, od klijanja do senescencije. Osim toga, ovaj hormon je ključan za regulaciju odgovora na stres i pružanje otpornosti na stres. Stresni uvjeti rezultiraju povećanim razinama ET u biljaka. ET koji se proizvodi pod utjecajem stresa djeluje kao signal koji pokreće prilagodljive odgovore i također utječe na druge hormonalne signalne puteve. Zbog svojih mnogobrojnih učinaka na fenotip biljaka, povećane razine ET mogu izazvati kontradiktorne učinke, poput inhibicije rasta i kasnijeg cvjetanja, osim željenog odgovora na stres. Stoga je precizna kontrola razine ET u stanicama ključni aspekt biljne fiziologije (Ravanbakhsh *et al.*, 2018).



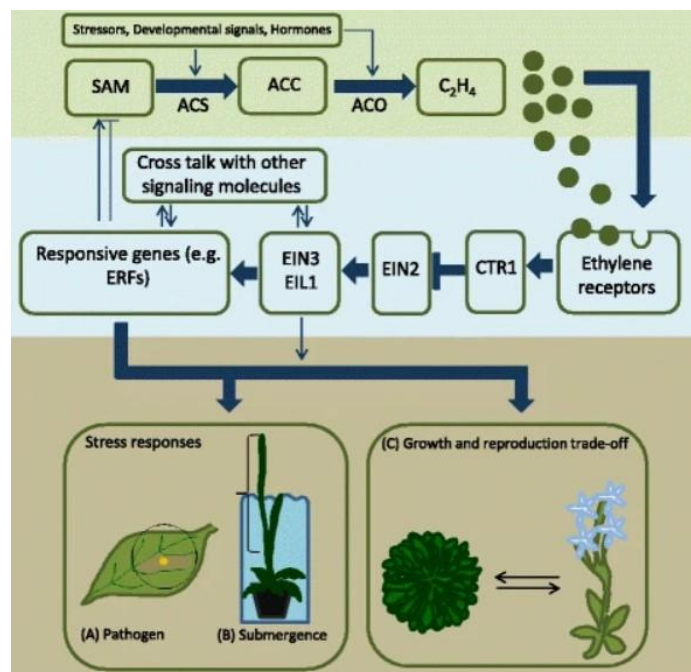
Slika 5.2.- Strukturna formula etilena

Izvor: <https://www.znanje.org/i/i25/05iv02/05iv0211fl/index6.htm> (pristupljeno 22.06.2024.)

Sinteza ET u biljkama (Slika 5.2.(2)) započinje važnim korakom: enzim ACC sintaza (ACS) katalizira pretvorbu 1-aminociklopropan-1-karboksilne kiseline (ACC) u etilen (vidi Sliku 20). Nakon što biljka detektira stres, ACS posreduje u sintezi ACC-a, prekursora etilena, koji se zatim transformira u etilen uz pomoć enzima ACC oksidaze (ACO) (Ravanbakhsh *et al.*, 2018).

ET se veže na svoje receptore što potiče izražavanje gena koji su nizvodno u signalnom putu. U odsutnosti etilena, receptori etilena aktiviraju CTR1, koji djeluje kao negativni regulator etilen signalizacije. ET veže receptore, čime inaktivira CTR1 i uklanja inhibiciju EIN2, pozitivnog regulatora ET signalizacije. Nizvodno od EIN2, djeluju transkripcijski faktori EIN3 (etilen-insenzitivan 3) i njegov homolog EIL1 (etilen-insenzitivan 3-sličan 1), koji su ključni posrednici transkripcijskih odgovora na ET. Ti transkripcijski faktori potiču ekspresiju faktora transkripcije koji su osjetljivi na etilen (ERF), što dovodi do etilenom posredovanih stresnih odgovora u biljkama.

Aktivacija ET uključuje i aktivaciju imuniteta biljke, metaboličke i morfološke prilagodbe na poplave, sušu, salinitet, te pomaže biljci da se adaptira na život na tlima sa puno teških metala (Ravanbakhsh *et al.*, 2018).



Slika 5.2.(2)-Sinteza etilena u biljkama

Izvor: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-018-0436-1/figures/1>
(pristupljeno 22.06.2024.)

5.3. Jasmonska kiselina

Jedan od mehanizama kojima se biljke mogu braniti od biotičkih i abiotičkih stresova je i pomoću biljnog hormona jasmonata (JA) (Slika 5.3.). Hormon JA je vrlo važan i u obrani biljaka od bolesti koje uzrokuje *Pseudomonas syringae*, ali i drugi patogeni. Jasmonatna kiselina se ipak najčešće asocira sa nekrotrofnim patogenima budući se sintetizira prilikom njihova napada. JA i njegovi derivati su hormoni na bazi lipida koji imaju ključnu ulogu u regulaciji mnogih procesa u biljkama, uključujući rast, fotosintezu i reproduktivni razvoj. Neki derivati JA kao hlapljivi organski spojevi, omogućuju biljkama međusobnu komunikaciju, te tako mogu upozoriti biljke protiv zajedničkih prijetnji.

JA također reguliraju procese poput sazrijevanja peluda i odgovora na ozljede kod biljke modela *Arabidopsis thaliana* (uročnjaka). Međutim, postoje značajne razlike između predloženih signalnih puteva kojima se jasmonati aktiviraju kod rajčice i uročnjaka, te još nije razjašnjeno jesu li te razlike povezane sa mehanizmima obrane ili se radi o nečem drugom. Mutanti uročnjaka sa impedimentima u biosintezi ili percepciji JA pokazuju manjak obrambenih odgovora i sterilnost, dok mutanti rajčice sa impedimentima u biosintezi ili percepciji JA imaju oslabljen obrambeni sustav, ali su fertilni. Također, sistemska indukcija JA u rajčici odvija se putem dobro karakteriziranog signalnog puta sistema, dok kod

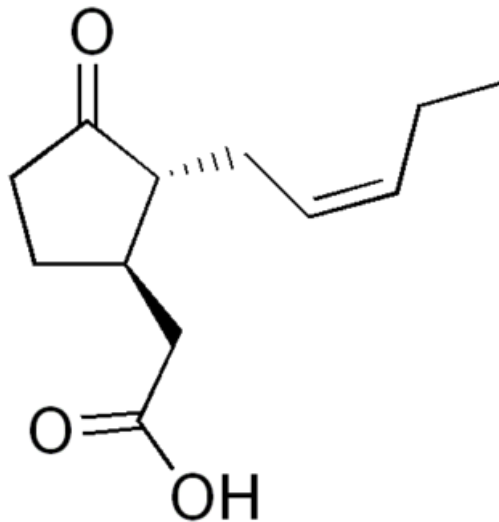
uročnjaka nema dokaza za postojanje ekvivalentnog puta, iako se sistemska signalizacija može dokazati (Turner *et al.*, 2002).

Signalni put JA uključuje nekoliko vrsta prijenosa signala:

- percepciju primarnog signala ozljede ili stresa i prijenos signala lokalno i sistemski
- percepciju signala i indukciju biosinteze JA
- percepciju JA i indukciju odgovora
- te integraciju signalizacije JA s izlaznim signalnim putevima SA i ET.

Signalizacija JA može biti inducirana različitim abiotičkim stresovima, uključujući osmotski stres, ozljede, sušu i izloženost hitinima, oligosaharidima, oligogalakturonidima, te ekstraktima kvasca. Kod uročnjaka, biosinteza JA je također regulirana signalima iz razvijajućih prašnika, gdje je JA nužan za razvoj peluda. Međutim, još uvijek nije jasno kako se ovi stresovi ili razvojni signali percipiraju. Jedan pristup u istraživanju bio je identificirati najraniji odgovor na stres, koji bi mogao biti ključna komponenta u putu percepcije stresa i prijenosa signala (Turner *et al.*, 2002).

Kod rajčice, kada su listovi oštećeni biljojedima ili jednostavnim mehaničkim ozljedama, JA signalizacija i ekspresija obrambenih gena sustavno se aktivira unutar nekoliko sati.



Slika 5.3.- Strukturna formula jasmonata

Izvor: <https://www.wikiwand.com/sl/Jasmonat> (pristupljeno 27.06.2024.)

5.3.1. Biosinteza jasmonske kiseline

Lipidni biljni hormon jasmonat (JA) igra ključnu ulogu u regulaciji rasta i razvoja biljaka, sekundarnom metabolizmu, obrani od napada insekata i patogena, te toleranciji na abiotičke stresove poput ranjavanja, UV zračenja, suše, te prekomjernog zaslanjivanja tla. Od svog prvog otkrića 1962. godine, a posebno od 1980-ih, brojna istraživanja su proširila naše razumijevanje fizioloških funkcija, biosinteze, distribucije, metabolizma, percepcije, signalizacije i međudjelovanja JA u biljci. Biljke reagiraju na promjenjive okolišne uvjete i unutarnje signale kroz složenu organizaciju biosinteze (Slika 5.3.1.(2)) i inaktivacije JA. Jasmonati se sintetiziraju iz α -linolenske kiseline (α -LeA) koja se nalazi u membranama kloroplasta, kroz oksidativne procese unutar različitih grana lipooksigenaznog puta. Kao rezultat toga, JA su dio obitelji oksilipina (Wasternack *et al.*, 2017).

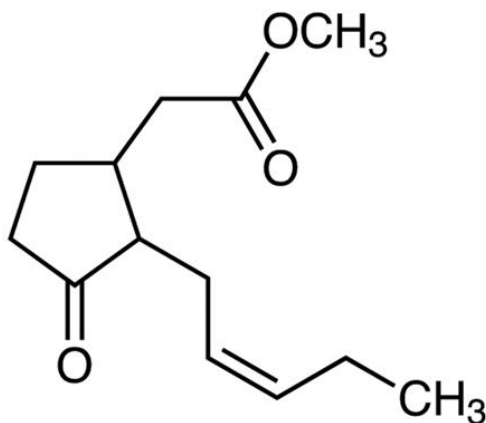
Jedan od prvih izoliranih spojeva JA bio je metil ester jasmonat (Slika 5.3.1.), otkriven kao mirisna komponenta cvjetova jasmína (*Jasminium grandiflorum*). Tek dva desetljeća kasnije opisani su prvi fiziološki procesi uzrokovani JA ili metil ester jasmonatom, kao što su poticanje senescencije i inhibicija rasta. Krajem 1980-ih i početkom 1990-ih, četiri istraživačke skupine pružile su prve dokaze o promjenama ekspresije gena uzrokovanim jasmonatom:

-Jasmonat-inducirani proteini, koji su se obilno akumulirali tijekom razgradnje osnovnih proteina, otkriveni su u listovima ječma

-indukcija vegetativnih skladišnih proteina zabilježena je nakon ranjavanja listova soje

-brza akumulacija alkaloida otkrivena je u biljnih staničnim kulturama nakon elicitacije, što je dovelo do povećanja endogenog jasmonata

-akumulacija inhibitora proteinaza u rajčici nakon ranjavanja od strane herbivora, zajedno s međubiljnom komunikacijom putem metil ester jasmonata, postala je najistaknutiji primjer promjene ekspresije gena uzrokovane aktivacijom JA (Wasternack *et al.*, 2017).

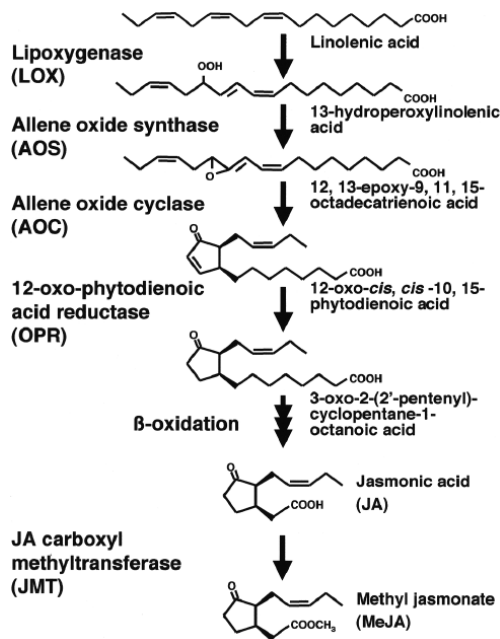


Slika 5.3.1.- Strukturna formula metil ester jasmonata

Izvor: <https://geno-chem.com/es/producto/methyl-jasmonate-mixture-of-isomers/> (pristupljeno 27.06.2024.)

Nakon početne identifikacije metil estera jasmonata kao mirisa jasmína, te jasmonata u kulturi gljive *Lasiodiplodia theobromae*, nekoliko JA spojeva otkriveno je u kopnenim biljkama. Visoke razine JA pronađene su u plodovima. Daljnja istraživanja otkrila su prisutnost JA u svim organima koji sadrže plastide. Osnovna razina JA brzo raste nakon ranjavanja ili drugih okolišnih poticaja. Biosintetski put JA iz α -linolenske kiseline esterificirane u membranama kloroplasta ustanovljen je 1980-ih godina. U početku je proučavana sekvenca koja uključuje LOX, hidroperoksid ciklazu, reduktazu i β -oksidaciju karboksilne bočne lance. Kasnije je pokazano da je korak hidroperoksid ciklaze zapravo dvostupanjska reakcija membrane-asocirane alen oksid sintaze, čiji visoko nestabilni produkt ciklizira alen oksid ciklaza u OPDA. OPDA je oksilipinski spoj koji igra ključnu ulogu u biosintetičkom putu JA. OPDA se formira u kloroplastima biljaka tijekom oksidativne konverzije α -linolenske kiseline putem lipooksigenaznog (LOX) puta. Nakon formiranja, OPDA se transportira u peroksisome, gdje se reducira i dalje metabolizira kroz niz enzimskih reakcija, uključujući β -oksidaciju, kako bi se proizveo JA. OPDA je važan preteča JA i ima vlastite biološke aktivnosti koje uključuju ulogu u obrambenim odgovorima biljaka na stres.

Svi enzimi odgovorni za stvaranje OPDA nalaze se u kloroplastima. Druga polovica biosinteze jasmonata odvija se u peroksisomima. U peroksisomima, OPDA se reducira pomoću OPDA reduktaze, nakon čega slijede enzimi β -oksidacije: acil-CoA-oksidaža (ACX), multifunkcionalni proteini (MFP) i L-3-ketoacil-CoA-tiolaža (KAT), uz aktivaciju u ko-estere pomoću masne kiseline CoA-sintetaze i 4-kumarol (Wasternack *et al.*, 2017).



Slika 5.3.1.(2)- Biosinteza jasmonata

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Pathway-for-the-biosynthesis-of-jasmonates_fig1_31464647

(pristupljeno 28.06.2024.)

5.4. Apscizinska kiselina

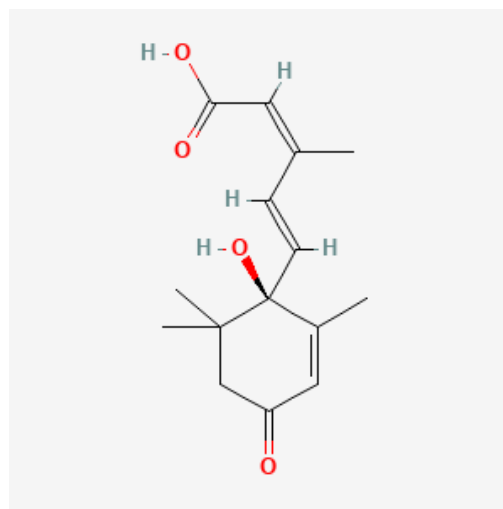
Apscizinska kiselina (ABA) (Slika 5.4.) je biljni hormon koji ima veliku ulogu u razvoju i regulaciji biljnog organizma. Njena uloga u biljnom organizmu je veoma dobro i detaljno istražena zadnjih godina. Ime je dobila po pojmu apscizija, što znači otpadanje cvjetova, plodova i listova, te se u početku smatralo da ABA ima negativan učinak na biljku. Njena glavna uloga je regulacija dormantnosti i klijanje sjemena. Jedna od najvažnijih funkcija je također i poticanje starenja te poticanje odgovora biljaka na stresne uvjete. Vrlo važna funkcije ABA-e je kontrola zatvaranja i otvaranja puči na listovima čime se regulira turgor i transpiracija. (Pavlović I., 2017.)

ABA ima različite učinke na rast i razvoj biljaka, koji ovise o koncentraciji i specifičnim uvjetima. Inhibira rast sjemenki i hipokotila kod mnogih biljaka u koncentracijama od 10^5 do 10^7 M, dok u niskim koncentracijama potiče rast izdanaka rajčice.

ABA također ima dva važna učinka na rast korijena. Pri niskim koncentracijama stimulira rast vrhova korijena biljaka, dok pri visokim koncentracijama inhibira njihov rast. Oba svojstva sugeriraju da može djelovati i kao kočnica i kao akcelerator rasta, ovisno o njejoj koncentraciji.

ABA potiče klijanje pupoljaka i sudjeluje u procesu dormancije. Kada se primijeni na jednu stranu vrhova korijena, uzrokuje zakrivljenost korijena, što ukazuje na njenu ulogu u gravitropizmu. Također, inducira promjenu morfologije listova vodenih biljaka iz uronjenog tipa u plutajući tip.

ABA općenito inhibira indukciju cvjetnih pupova, iako potiče cvjetanje kod nekih biljaka kratkog dana. Primjena ABA-e prije izlaganja niskim temperaturama povećava otpornost biljaka na hladnoću ili smrzavanje. Inducira ili inhibira više od 70 proteina i gena (Murofushi *et al.*, 1999).



Slika 5.4.- Struktura apscizinske kiseline

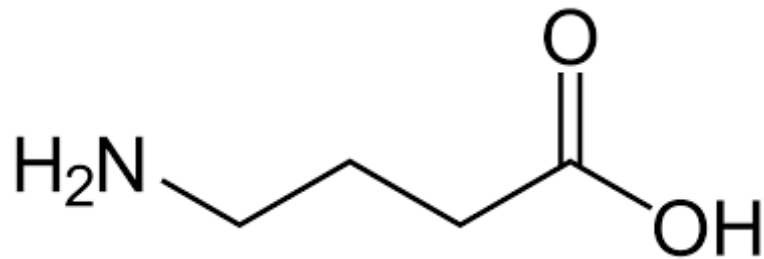
Izvor: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Abscisic-acid> (pristupljeno 06.07.2024.)

ABA je seskviterpenoid po svojoj kemijskoj strukturi i sintetizira se iz karotenoida zeaksantina. Kao i kod većine biljnih hormona, lokalna koncentracija regulirana je procesima biosinteze, inaktivacije (degradacijom ili konjugacijom), kompartmentalizacije i transporta. Katabolizam je glavni mehanizam kojim se održava homeostaza apscizinske kiseline.

ABA također može biti esterificirana i prisutna kao ABA-glukozil ester. Isprva se smatralo da je ABA-glukozil ester nepovratni katabolički oblik ove kiseline, no novija istraživanja sugeriraju da on služi kao transportni ili skladišni oblik u vakuolama i apoplastu. Kada biljka dehidrira, ABA-glukozil ester se premješta u endoplazmatski retikulum, gdje se djelovanjem β -glukozidaze oslobađa apscizinska kiselina, koja tada inducira odgovor na stres (Pavlović I., 2017).

5.5. Aminomaslačna kiselina

Aminomaslačna kiselina (AM) (Slika 5.5.) poznata je po tome što povećava otpornost uročnjaka na bakterijskog patogena *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na način da pojačava signalizaciju obrane posredstvom salicilne kiseline, posebno ekspresiju gena. Uz to, AM je pokazala sposobnost inhibicije na koronatin, koji je poznat po tome da potiče virulentnost bakterija imitirajući jasmonsku kiselinu. AM je specifično suprimirala odgovor jasmonata induciran koronatom, bez utjecaja na druge jasmonatne odgovore u biljkama. Ova supresija bila je uglavnom neovisna o salicilnoj kiselini, što sugerira da nije rezultat negativne međusobne komunikacije između salicilnih i jasmonatnih signalnih puteva (Tsai *et al.*, 2011).



Slika 5.5.- Strukturna formula aminomaslačne kiseline

Izvor: https://hr.wikipedia.org/wiki/Gama-aminomasla%C4%8Dna_kiselina (pristupljeno 28.06.2024.)

6. Zaključak

Pseudomonas syringae pv. *tomato* koristi napredne mehanizme za inficiranje biljaka, uključujući sekretijski sustav tip III koji omogućava prijenos efektorskih proteina iz bakterije u biljku domaćina. Ovi proteini igraju ključnu ulogu u sputavanju obrambenih mehanizama biljke uročnjaka, omogućujući bakteriji uspješnu kolonizaciju i izazivanje simptoma bolesti. Fitotoksin koronatin dodatno povećavaju patogenost bakterije, pridonoseći razvoju simptoma poput nekroze i pjega na listovima na potpuno zaseban, ali sinergijski način od onog izazvanim efektorima.

Biljni hormoni poput salicilne kiseline, etilena, jasmonata i abscizinske kiseline imaju ključnu ulogu u aktiviranju obrambenih mehanizama biljaka, omogućujući im prepoznavanje i obranu od patogena.

Uročnjak zbog svoje genetičke jednostavnosti i brzog životnog ciklusa i rasta, pruža idealan sustav za proučavanje interakcija između biljaka i patogena. Rezultati dobiveni na ovom modelu mogu se primijeniti na druge agrikulturno važne biljke, što svakako doprinosi razvoju učinkovitijih metoda za kontrolu biljnih bolesti.

Interakcija između biljaka i patogena naglašava važnost integriranog pristupa u borbi protiv biljnih bolesti. Korištenje najnovijih molekularnih tehnika i alata neophodno je u detaljnim analizama patogeneze, što otvara nove smjerove istraživanja u području mikrobne biotehnologije. Ishodi navedenih istraživanja imaju primjenu u razvoju novih biotehnoških rješenja za povećanje otpornosti biljaka, što je od velike važnosti za održivu poljoprivredu, zaštitu usjeva i sigurnost hrane.

7. Literatura

1. Abualia R., Lacombe B. (2018) - Membrane transport in plants, <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/jasmonate> -pristupljeno 29.05.2024.
2. Alfano JR, Collmer A. (1997) - The type III (hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, avr proteins, and death - knjiga
3. Anderson J.P., Gleason C.A., Foley R.C., Thrall P.H., Burdon J.B., and Singh K.B. (2010.) - Plants versus pathogens: An evolutionary arms race. *Functional Plant Biology* 37, 499-512.
4. Bari R., Jones J. (2008) - Role of plant hormones in plant defence responses, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19083153/> -pristupljeno 30.05.2024.
5. Bentham A., Mukhi N., Banfield M. (2020) - A molecular roadmap to the plant immune system, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7606695/> -pristupljeno 28.05.2024.
6. Block A., Alfano J.R.,(2011) - *Current Opinion in Microbiology* <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/pseudomonas-syringae> - pristupljeno 21.06.2024
7. Brooks D.M., Hernández-Guzmán G., Kloek A.P., Alarcón-Chaidez F., Sreedharan A., Rangaswamy V., Peñaloza-Vázquez A., Bender C.L., Kunkel B.N. (2004) - Identification and characterization of a well-defined series of coronatine biosynthetic mutants of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 - knjiga
8. Cunnac S., Lindeberg M., Collmer A. (2009) - *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19168384/> -pristupljeno 02.06.2024.
9. Dangl, J.L., and Jones, J.D.G. (2001) - Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411 826–833.
10. Dudnik A. (2014) - Functional analysis of syrbactin synthetase-like gene clusters in *Photobacterium luminescens* and *Rhizobium* sp. and the role of syrbactins in *Pseudomonas syringae* strains colonizing grass species, doktorska disertacija https://www.zora.uzh.ch/id/eprint/101438/1/ADudnik_Thesis.pdf -pristupljeno 25.06.2024.

11. Dudnik A., Dudler R. (2014) - Virulence determinants of *Pseudomonas syringae* strains isolated from grasses in the context of a small type III effector repertoire
<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-014-0304-5>
-pristup 26.06.2024.
12. Edkins A.L., Boshoff A. (2021) - General structural and functional features of molecular chaperones, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34569020/> -pristupljeno 29.06.2024.
13. Geng X., Cheng J. (2012) - The coronatine toxin of *Pseudomonas syringae* is a multifunctional suppressor of Arabidopsis defense
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3531865/> -pristup 07.07.2024.
14. Gomila M., Busquets A., Mulet M., Lalucat J., Garcia-Valdes E. (2017) - Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis,
<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2017.02422/full>
-pristupljeno 14.04.2024.
15. Hulak N. & González Plaza J.J. (2015). Plant-Pathogen Interactions: A Brief Insight into a Complicated Story. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 80 (4), 217-222.
16. Imran M, Abo-Elyousr KAM, Mousa MA, Saad MM (2022) - A study on the synergetic effect of *Bacillus amyloliquefaciens* and dipotassium phosphate on *Alternaria solani* causing early blight disease of tomato - knjiga
17. Imran M, Abo-Elyousr KAM, Mousa MA, Saad MM (2022) - Screening and biocontrol evaluation of indigenous native *Trichoderma* spp against early blight disease and their field assessment to alleviate natural infection egyptian - knjiga
18. Jin-Zheng Wang (2022)- Reciprocity between a retrograde signal and a putative metalloprotease reconfigures plastidial metabolic and structural states - knjiga
19. Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006) - The plant immune system. *Nature* 444 323–329.
20. Katagiri, F., Thilmony, R., and Yang, S. (2002) - The Arabidopsis Thaliana *Pseudomonas Syringae* Interaction. *The Arabidopsis Book*, 1–35
21. McDowell J., Woffenden B. (2003.) - Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12679066/>
-pristupljeno 19.07.2024.

22. Meinke D.W., Cherry J.M., Koornneef M. (1998.) - *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9784120/> -pristupljeno 11.05.2024.
23. Mittal S., Davis K.R. (2015) - Role of the phytotoxin coronatine in the infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. tomato, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7539639/> -pristupljeno 29.06.2024.
24. Mogensen T. (2009) - Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2668232/> -pristupljeno 16.07.2024.
25. Murofushi N., Ueda J. (1999) - Miscellaneous natural products including marine natural products, pheromones, plant hormones, and aspects of ecology <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/abscisic-acid> -pristupljeno 07.07.2024.
26. Nature 408, 796-815 (2000.) - Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*
27. Newman M.A., Sundelin T. (2013) - MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3655273/> - pristupljeno 18.07.2024.
28. Ngou B., Ding P. (2022) - Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9048904/> -pristupljeno 20.07.2024.
29. Pavlović I. (2017) - Uloga auksina i hormona stresa u odgovoru kupusnjača (*Brassicaceae*) na povišeni salinitet
30. Preston, G.M. (2000) - *Pseudomonas syringae* pv. tomato: the right pathogen, of the right plant, at the right time. Molecular Plant Pathology - knjiga
31. Pritchard L., Birch P. (2014) - The zigzag model of plant–microbe interactions: is it time to move on? <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mpp.12210> -pristupljeno 18.07.2024.
32. Piasecka A., Bednarek P. (2015) - Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25659829/> - pristupljeno 19.07.2024.

33. Ravanbakhsh M., Sasidharan R., Voeselek L. (2018) - Microbial modulation of plant ethylene signaling: ecological and evolutionary consequences, <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-018-0436-1> -pristupljeno 18.06.2024.
34. Rohmer, L., Guttman, D. S., and Dangl, J. L. (2004) - Diverse evolutionary mechanisms shape the type III effector virulence factor repertoire in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Genetics* 167, 1341–1360
35. Rutter M., Van Woert P. (2012) - Birth, death and subfunctionalization in the Arabidopsis genome, <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/arabidopsis-thaliana> -pristupljeno 28.06.2024.
36. Santamaria-Hernando S., Lopez-Maroto A. (2022) - *Pseudomonas syringae* pv. tomato infection of tomato plants is mediated by GABA and I-pro chemoperception, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9452764/> -pristupljeno 24.06.2024.
37. Scalschi L., Llorens E., Garcia-Agustin P., Vicedo B. (2020) - Role of jasmonic acid pathway in tomato plant-*Pseudomonas syringae* interaction, <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/2/136> -pristupljeno 16.06.2024.
38. Tang D., Kang R. (2012) - PAMPs and DAMPs: signals that spur autophagy and immunity <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22889221/> -pristupljeno 17.07.2024.
39. Troisfontaines, P., and Cornelis, G. R. (2005) - Type III secretion: More Systems Than You Think. *Physiology* 20, 326–339.
40. Tsai C.H., Singh P., Chen C.W. (2011) - Priming for enhanced defence responses by specific inhibition of the Arabidopsis response to coronatine, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21265899/> -pristupljeno 30.04.2024.
41. Turner J.G., Ellis C., Devoto A. (2002)- The Jasmonate Signal Pathway, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC151253/> -pristupljeno 28.05.2024.
42. Van der Hoorn R. A., Kamoun S. (2008) - From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant cell*, 20(8), 2009–2017.
43. War A., Paulraj M., War M. (2011) - Role of salicylic acid in induction of plant defense system in plants, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3329353/> -pristupljeno 25.06.2024.

44. Wasternack C., Song S. (2017) - Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription, <https://academic.oup.com/jxb/article/68/6/1303/2666430> -pristupljeno 01.06.2024.
45. Xin X., He S. (2013.) - *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23725467/> -pristupljeno 24.05.2024.
46. Yang He S., Xin X. (2013) - *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23725467/> -pristupljeno 13.05.2024.
47. Yao J., Withers J., Yang He S. (2013) - *Pseudomonas syringae* infection assays in Arabidopsis, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23615988/> -pristupljeno 07.05.2024.
48. Zumaquero A, Macho AP, Rufián JS, Beuzón CR (2010) - Analysis of the Role of the Type III Effector Inventory of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448a in Interaction with the Plant - knjiga

Životopis

Petar Pavlović rođen je 23. siječnja 2000.godine u gradu Zagrebu. Završio je osnovnu školu Jurja Dobrile u Rovinju, te matematičku gimnaziju u srednjoj školi Zvane Črnje Rovinj. Maturirao je 2018.godine te je iste godine upisao preddiplomski studij Agroekologije na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. Završio je preddiplomski studij Agroekologije na Agronomskom fakultetu u Zagrebu 2021. godine, te je upisao diplomski studij Mikrobne biotehnologije te iste godine. Bavio se tenisom od 2006. do 2018. godine, te povremeno i rukometom. Od jezika se služi engleskim i talijanskim. Radio je sezonski 6 godina u firmi Valalta Rovinj, te je kroz studij obavljao razne studentske poslove.

PRILOG- Popis kratica

Kratica	Značenje
Pto	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
SA	Salicilna kiselina
JA	Jasmonatna kiselina
ABA	Apscizinska kiselina
ET	Etilen
AM	Aminomaslačna kiselina
KO	Koronatin
T3SS	Sekrecijski sustav tip III