



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Marina Drčelić

**MOLEKULARNI MEHANIZMI
PATOGENOSTI I PROTEINSKE
INTERAKCIJE EFEKTORA I
MEMBRANSKIH PROTEINA
FITOPLAZME
'*Candidatus Phytoplasma solani*'**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Marina Drčelić

**MOLECULAR MECHANISMS OF
PATHOGENICITY AND PROTEIN
INTERACTIONS OF
'*Candidatus Phytoplasma solani*'
EFFECTOR AND MEMBRANE
PROTEINS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2026

Ovaj je doktorski rad izrađen u Zavodu za mikrobiologiju, Biološkog odsjeka, Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, pod vodstvom prof. dr. sc. Martine Šeruge Musić, u okviru projekta „Strategije patogenosti fitoplazmi: efektori, faktori virulencije i pokretni genetički elementi“ (HRZZ-IP-2019-04-2469), u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

INFORMACIJE O MENTORICI

Redovita prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić (Osijek, 24. veljače 1974.) završila je diplomski studij molekularne biologije 1998. godine, na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a iste godine je zaposlena u Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka PMF-a. U matičnoj ustanovi magistrirala je 2002. te doktorirala 2007. godine u području prirodnih znanosti, polje biologija pod mentorstvom prof. dr. sc. Mladena Krajačića. Danas, unutar Zavoda za mikrobiologiju, prof. dr. sc. Šeruga Musić nositeljica je ukupno 5 kolegija na prijediplomskom, diplomskom, integriranom prijediplomskom i diplomskom te doktorskom studiju, od kojih se neki odvijaju na engleskom jeziku. Izvodi i seminarsku i praktičnu nastavu za studente, a uvela je i nove kolegije te inovirala sadržaj nekih kolegija Biološkog odsjeka. Za svoj nastavni rad 2019. godine nagrađena je nagradom „Brdo“ za najboljeg profesora Biološkog odsjeka PMF-a. Bila je voditeljica više od 40 diplomskih i završnih radova kao i mentorica trima doktorandicama. Njeno znanstveno i nastavno područje interesa u širem smislu jest mikrobiologija, odnosno molekularna biologija biljnih bakterija i virusa, molekularne interakcije biljka i njihovih patogena, genomika i molekularna epidemiologija fitoplazmi i virusa te ekologija i genomika okolišnih i kliničkih patogena. Do sada je objavila više od 50 znanstvenih radova i poglavlja u knjigama te kao autor ili koautor sudjelovala u više od 90 priopćenja na međunarodnim i domaćim znanstvenim skupovima te je održala 5 pozvanih predavanja. Usavršavala se na brojnim međunarodnim institucijama, a u sklopu programa ERASMUS + i međusveučilišne razmjene sudjelovala je u nastavi i održala predavanja na sveučilištima u više zemalja (Južnoafrička Republika, Brazil, Indonezija, Francuska, Grčka) te je uspostavila brojne međunarodne suradnje sa znanstvenicima iz čitavog svijeta (Tajvan, Velika Britanija, Francuska, Italija, Mađarska, Slovenija, Srbija). Bila je voditeljica nekoliko znanstvenih projekata (3 projekta HRZZ-a, 2 bilateralna projekta MZO) te suradnica na više domaćih i međunarodnih znanstvenih projekata. Članica je uredničkog odbora 2 znanstvena časopisa kao i recenzent brojnih znanstvenih časopisa te recenzent projektnih prijava. Članica je više domaćih i međunarodnih društava i organizacija te je delegat Hrvatskog mikrobiološkog društva u radu međunarodnog tijela *International Committee on Systematics of Prokaryotes*. U radu tijela PMF-a sudjeluje kao koordinatorka/predsjednica ili članica brojnih Povjerenstava, a sudjelovala je i u programima popularizacije znanosti kao što su Sveučilišna smotra, „Noć biologije“ i „Dan i noć PMF-a“.

ZAHVALE

Veliko hvala mentorici prof. dr. sc. Martini Šerugi Musić na sjajnom mentorstvu, iznimnoj profesionalnosti i stručnosti, podršci i konstruktivnim savjetima prilikom izrade i pisanja ove disertacije te svim kolegama Laboratorija i Zavoda koji su doprinijeli ugodnim i prijateljskim trenutcima na Marulićevom trgu 9a.

Zahvaljujem svim kolegama iz Zavoda za molekularnu biologiju, što su mi omogućili korištenje infrastrukture za izvođenje eksperimentalnog dijela ove disertacije te mi pružili toliko znanja, savjeta i iskustva, kao i suradnicima na projektu HRZZ-IP-2019-04-2469 u sklopu kojeg je izrađen ovaj doktorski rad.

Hvala Damianu Nenadiću na foto savjetima, a Buterinima na kvalitetnom društvenom životu.

Janku, Roku i Fani, mojim dragim roditeljima, sestri, dragoj obitelji i prijateljima-najveće hvala na bezuvjetnoj podršci!

**MOLEKULARNI MEHANIZMI PATOGENOSTI I PROTEINSKE INTERAKCIJE
EFEKTORA I MEMBRANSKIH PROTEINA FITOPLAZME
'*Candidatus Phytoplasma solani*'**

MARINA DRČELIĆ

Zavod za mikrobiologiju, Biološki odsjek,
Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102a, 10000 Zagreb

Fitoplazme, bakterije roda '*Candidatus Phytoplasma*', su pleomorfni unutarstanični patogeni širokog kruga domaćina, među kojima su brojne gospodarski važne poljoprivredne kulture u svijetu. Za područje euromediterrana važna je endemska vrsta '*Ca. P. solani*' koju najčešće prenosi cvrčak *Hyalesthes obsoletus* Sign., a uzročnik je većeg broja bolesti kao što su žutica vinove loze (*Bois noir*; BN), bolest stolbur krumpirovki (*Solanaceae*) i crvenilo kukuruza. Zbog nemogućnosti uzgoja fitoplazmi u čistoj kulturi *in vitro*, istraživanja se temelje na molekularnim i bioinformatičkim metodama. Ovim radom provedene su komparativne analize genoma, funkcionalna karakterizacija SAP11-like i SAP54-like efektora u transgeničnim biljkama uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*), analize proteinskih interakcija metodama bimolekulske fluorescencijske komplementacije (BiFC), u sustavu dvaju kvašćevih hibrida (Y2H) te afinitetnom kopurifikacijom i imunodetekcijom proteina. Rezultati su pokazali raznolikost u sastavu efektorskih gena među sojevima '*Ca. P. solani*', ali i postojanje konzerviranih efektora kao što su SAP11-like i SAP54-like. Potvrđeno je da navedeni efektori stupaju u interakciju s biljnim transkripcijskim faktorima i uzrokuju karakteristične promjene u razvoju biljaka, poput deformacije listova, pojačanog grananja te poremećaja u razvoju cvijeta i reproduktivnih organa. U ovom istraživanju, dokazano je i da membranski protein STAMP ostvaruje interakciju s aktinom kukca-vektora *H. obsoletus*, što upućuje na njegovu ulogu u kolonizaciji i prijenosu ove fitoplazme. Dobiveni rezultati predstavljaju nova saznanja o patogenosti i prilagodbama fitoplazme '*Ca. P. solani*' te upućuju na nova rješenja u kontroli rasprostranjivanja ovog patogena.

182 stranice, 94 slike, 41 tablica, 168 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: '*Ca. P. solani*', efektor, protein, interakcije, SAP11-like, SAP54-like, STAMP

Mentor: Martina, Šeruga Musić, prof. dr. sc.

Ocjenjivači: Dijana Škorić, prof. dr.sc.

Nenad Malenica, izv. prof. dr. sc.

Rosemary Vuković, izv. prof. dr. sc.

Ana Bielen, izv. prof. dr. sc.

**MOLECULAR MECHANISMS OF PATHOGENICITY AND PROTEIN
INTERACTIONS OF '*Candidatus Phytoplasma solani*'
EFFECTOR AND MEMBRANE PROTEINS**

MARINA DRČELIĆ

Division of Microbiology, Department of Biology,
Faculty of Science, Horvatovac 102a, 10000 Zagreb

Phytoplasmas ('*Candidatus Phytoplasma*') are pleomorphic endocellular pathogenic bacteria with a broad host range including many economically important crops worldwide. In the Euro-Mediterranean region, the endemic species '*Ca. P. solani*' is of particular importance. It is mainly transmitted by *Hyalesthes obsoletus* Sign., and is associated with many diseases of economically important crops, such as grapevine yellows diseases (*Bois noir*; BN), solanaceous *stolbur* diseases, and maize redness. Phytoplasma cultivation *in vitro* in a pure culture is still unsuccessful, so research on these pathogens relies on molecular and bioinformatic approaches. In this study, comparative genome analyses, functional characterization of the SAP11-like and SAP54-like effectors in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants, protein interaction analyses using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) and the yeast two-hybrid (Y2H), as well as affinity co-purification and protein immunodetection, were performed. The results revealed diversity of effector genes among '*Ca. P. solani*' strains, but the presence of conserved effectors such as SAP11-like and SAP54-like was also recorded. These effectors were shown to interact with plant transcription factors and to induce characteristic developmental alternations, including leaf deformation, enhanced branching, and disturbances in flower and reproductive organ development. Furthermore, the membrane protein STAMP was demonstrated to interact with actin of the insect-vector *H. obsoletus* Sign., indicating its role in phytoplasma colonization and transmission. These findings provide new insights into the pathogenicity and adaptation mechanisms of '*Ca. P. solani*' and support improved disease management and risk assessment of this pathogen.

182 pages, 94 figures, 41 tables, 168 references, original in Croatian

Keywords: '*Ca. P. solani*', effector, protein, interaction, SAP11-like, SAP54-like, STAMP

Supervisor: Dr. Martina, Šeruga Musić, Prof

Reviewers: Dr. Dijana Škorić, Prof.

Dr. Nenad Malenica Assoc. Prof.

Dr. Rosemary Vuković, Assoc. Prof.

Dr. Ana Bielen, Assoc. Prof.

SADRŽAJ

1	UVOD	1
2	LITERATURNI PREGLED	4
2.1	Fitoplazme	4
2.1.1	Opće značajke fitoplazmi	4
2.1.2	Prijenos i rasprostranjivanje fitoplazmi	6
2.1.3	Simptomi fitoplazmatskih zaraza	8
2.1.4	Genomi fitoplazmi	11
2.1.5	Efektori	12
2.1.6	Biljni transkripcijski faktori	13
2.2	' <i>Candidatus Phytoplasma solani</i> '	14
3	MATERIJALI I METODE	17
3.1	Materijali	17
3.1.1	Nukleotidni sljedovi (DNA sekvence)	17
3.1.2	Bakterijski sojevi	20
3.1.3	Sojevi kvasaca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
3.1.4	Eksperimentalne biljne linije	21
3.1.5	Mediji, puferi i otopine	22
3.2	Metode	28
3.2.1	<i>In silico</i> predviđanje i filogenetska analiza efektor fitoplazme ' <i>Ca. P. solani</i> ' 28	
3.2.2	Konstrukcija rekombinantnih plazmida i kloniranje korištenjem sustava <i>In Fusion</i> ®	29
3.2.3	Transformacija elektrokompetentnih bakterija <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 35	
3.2.4	Uzgoj i uvjeti rasta biljnog materijala	36
3.2.5	Transformacija uročnjaka metodom <i>floral dip</i>	37

3.2.6	Bimolekulska fluorescencijska komplementacija (BiFC).....	44
3.2.7	Sustav dvaju kvašćevih hibrida (Y2H).....	47
3.2.8	Kopurifikacija i imunodetekcija proteina.....	50
4	REZULTATI	55
4.1	<i>In silico</i> usporedba i analiza nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova efektor fitoplazme 'Ca. P. solani'	55
4.2	Konstrukcija rekombinantnih plazmida.....	57
4.2.1	Plazmidni konstrukti za izvođenje metode <i>floral dip</i>	59
4.2.2	Plazmidni konstrukti za izvođenje metode BiFC	61
4.2.3	Plazmidni konstrukti za izvođenje metode sustava Y2H.....	65
4.2.4	Plazmidni konstrukti za izvođenje kopurifikacije i imunodetekcije proteina 68	
4.3	Transformacija uročnjaka metodom <i>floral dip</i>	69
4.3.1	Praćenje razvoja i fenotipa transgeničnih linija uročnjaka kroz generacije T0 do T3 69	
4.3.2	Dokazivanje prisutnosti T-DNA i ekspresije gena <i>SAP11-like</i> i <i>SAP54-like</i> u transgeničnim biljkama uročnjaka.....	76
4.3.3	Izolacija i imunodetekcija proteina <i>SAP11-like</i> i <i>SAP54-like</i> iz klijanaca uročnjaka	79
4.3.4	Fenotipska i statistička analiza <i>SAP11-like</i> i <i>SAP54-like</i> homozigotnih transgeničnih uročnjaka	80
4.4	Analiza proteinskih interakcija metodom BiFC.....	91
4.4.1	Interakcija <i>SAP11-like</i> proteina s AtTCP2 i AtTCP4 proteinima.....	91
4.4.2	Interakcija <i>SAP54-like</i> proteina s AtAP1 i AtSEP3 proteinima.....	94
4.4.3	Interakcija ST6 i ST9 proteina s proteinom aktinom kukca.....	97
4.5	Analiza proteinskih interakcija u sustavu Y2H.....	100
4.5.1	Interakcija <i>SAP11-like</i> proteina s AtTCP2 i AtTCP4 proteinima.....	100
4.5.2	Interakcija <i>SAP54-like</i> proteina s AtAP1 i AtSEP3 proteinima.....	102

4.5.3	Interakcije ST6 i ST9 proteina s proteinom aktinom kukca.....	103
4.6	Kopurifikacija proteina i imunodetekcija.....	104
5	RASPRAVA.....	107
5.1	Raznolikost i polimorfizam genoma fitoplazme ' <i>Ca. P. solani</i> '	109
5.2	Fenotipske promijene transgeničnih uročnjaka uzrokovane prekomjernom ekspresijom <i>SAP11-like</i> i <i>SAP54-like</i> efektoru ' <i>Ca. P. solani</i> '	110
5.3	Analiza proteinskih interakcija metodom BiFC.....	113
5.4	Analiza proteinskih interakcija u sustavu Y2H.....	115
5.5	Analiza afinitetne kopurifikacije i imunodetekcije modificiranih proteina ST6(H) i ST9(H).....	117
6	ZAKLJUČCI	119
7	POPIS LITERATURE.....	121
8	ŽIVOTOPIS.....	136
9	PRILOZI	138
Prilog A	Reprezentativni nukleotidni i aminokiselinski sljedovi gena i proteina korišteni u istraživanju	138
Prilog B	Veličine plazmidnih vektora, gena, proteina i proteinskih biljega	150
Prilog C	Početnice.....	151
Prilog D	Mape plazmidnih konstrukata	158
Prilog E	Bakterijski sojevi i njihova otpornost na antibiotike	172
Prilog F	Fenotip T3 generacije klijanaca uročnjaka	173
Prilog G	BiFC analiza: negativne i pozitivna kontrola	174
Prilog H	Lista potencijalnih sekrecijskih proteina sojeva STOL i ST19 ' <i>Ca. P. solani</i> '	177
Prilog I	Analize prisutnosti T-DNA i ekspresije gena <i>SAP11-like</i> i <i>SAP54-like</i> u ekserimentalnim biljkama uročnjaka	179

POPIS KRATICA

'Ca. P.'	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma'
CaPM	' <i>Ca. P. mali</i> '
°C	stupanj Celzija
3-AT	3-amino-1,2,4-triazol
A	adenin
AD	aktivacijska domena (engl. <i>activation domain</i>)
AMP	antigen membranski protein (engl. <i>antigenic membrane protein</i>)
APS	amonijev persulfat (engl. <i>ammonium persulfate</i>)
AY-WB	soj fitoplazme ' <i>Ca. P. asteris</i> ' (engl. <i>Aster Yellows Witches'-Broom phytoplasma</i>)
BD	DNA-vezujuća domena (engl. <i>DNA-binding domain</i>)
BiFC	bimolekulska fluorescencijska komplementacija (engl. <i>bimolecular fluorescence complementation</i>)
BN	žutica vinove loze (fra. <i>bois noir</i>)
bp	bazni parovi (engl. <i>base pairs</i>)
C	citozin
cDNA	komplementarna DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
Cq	broj ciklusa u kvantitativnom PCR-u (engl. <i>quantification cycle</i>)
Ct	prag ciklusa (engl. <i>cycle threshold</i>)
DMF	N,N-dimetilformamid
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	deoksiribonukleozid trifosfati (engl. <i>deoxyribonucleoside triphosphates</i>)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGFP	pojačani zeleni fluorescentni protein (engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i>)
FD	zlatna žutica vinove loze (fra. <i>flavescence dorée</i>)
fw	nizvodna početnica (engl. <i>forward</i>)
g	gravitacijsko ubrzanje (engl. <i>gravity</i>)
G	gvanin
gDNA	genomska DNA
GST	glutation S-transferaza (engl. <i>glutathione S-transferase</i>)
GY	žutice vinove loze (engl. <i>grapevine yellows</i>)
His₆	poli-histidinski biljeg (engl. <i>polyhistidine tag</i>)
HRP	peroksidaza hrena (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
IdpA	imunodominantni membranski protein A (engl. <i>immunodominant membrane protein A</i>)
IMP	imunodominantni membranski protein (engl. <i>immunodominant membrane protein</i>)
IPTG	izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid (engl. <i>isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>)
kbp	kilobazni parovi(engl. <i>kilobase pairs</i>)
LB	hranjivi medij Luria–Bertani za uzgoj bakterija
MLO	mikoplazmama slični organizam (engl. <i>mycoplasma-like organism</i>)
mRNA	glasnička RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)

POPIS KRATICA

MS	hranjivi medij Murashige i Skoog za uzgoj biljaka (engl. <i>Murashige and Skoog medium</i>)
ntc	negativna kontrola (engl. <i>no template control</i>)
ORF	otvoreni okvir čitanja (engl. <i>open reading frame</i>)
OY	soj fitoplazme 'Ca. P. asteris' (engl. <i>Onion Yellows</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PMSF	fenilmetilsulfonyl fluorid (engl. <i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i>)
PMU	potencijalno mobilna jedinica (engl. <i>potential mobile unit</i>)
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
rpm	okretaji u minuti (engl. <i>revolutions per min</i>)
rRNA	ribosomska RNA
rv	uzvodna početnica (reverse)
SAP	sekrecijski proteini fitoplazme 'Ca. P. asteris', soja AY-WB
SD	sintetski medij za selekciju kvasaca (engl. <i>synthetic dropout medium</i>)
SDS	natrijev dodecil sulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SE	standardna poreška (engl. <i>standard error, SE</i>)
SOC	bakterijski hranjivi medij (engl. <i>super optimal broth with catabolite repression</i>)
ssDNA	jednolančana DNA (engl. <i>single-stranded DNA</i>)
ST6	genotip STAMP6
ST9	genotip STAMP9
STAMP	<i>stolbur</i> antigenski membranski protein (engl. <i>stolbur phytoplasma antigenic membrane protein</i>)
T	timin
TAIR	baza podataka o uročnjaku (engl. <i>The Arabidopsis Information Resource</i>)
TCSPC	(engl. <i>time-correlated single photon counting</i>)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TNA	ukupne nukleinske kiseline (engl. <i>total nucleic acid</i>)
UV	ultraljubičasto zračenje, valna duljina 10–400 nm (engl. <i>ultraviolet</i>)
v/v	volumen po volumenu
VmpA	varijabilni membranski protein (engl. <i>variable membrane protein</i>)
w/v	masa po volumenu (engl. <i>weight per volume</i>)
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid (engl. <i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside</i>)
Y2H	sustav dvaju kvašćevih hibrida (engl. <i>yeast two hybrid; Y2H</i>)
YFP	žuti fluorescentni protein (engl. <i>yellow fluorescent protein</i>)
YNB	bazni medij s dušikom za uzgoj kvasaca (engl. <i>yeast nitrogen base</i>)
YPD	hranjivi medij za uzgoj kvasca (engl. <i>yeast extract peptone dextrose</i>)

1 UVOD

Fitoplazme, bakterije roda '*Candidatus Phytoplasma*' (razred *Mollicutes*) su nekultivabilni, pleomorfni unutarstanični patogeni. Karakterizira ih jednostanična membrana i mali genomi veličine 530-1350 kb (Bai i ostali, 2006; Gundersen i ostali, 1996; Marcone i ostali, 1999). Složeni životni ciklus ovih bakterija obuhvaća obavezno parazitiranje u kukcima i u biljnim domaćinima (Hogenhout *i sur.*, 2008.; Namba, 2019.). U prirodi se prenose putem kukaca-vektora koji se hrane biljnim sokovima floemskog provodnog sustava. Iz probavnog sustava kukca-vektora, fitoplazme prelaze bazalnu laminu, prodiru u hemolimfu iz koje se mogu transportirati u žlijezde slinovnice. Zajedno sa slinom putem usnog aparata kukca prilikom sljedećeg hranjenja fitoplazme mogu prodrijeti u tkivo floema druge biljke (Hogenhout i Loria, 2008.).

U biljnim domaćinima, simptomi zaraze fitoplazmama mogu se manifestirati kao dramatične promjene u razvoju biljke. To uključuju promjene u sintezi pigmenata (žućenje) i poremećaje u pigmentaciji cvijeta (virescencija), često s reverzijom ovih generativnih organa u lisnate strukture (filodija) što dovodi do sterilnosti biljke, proliferacije bočnih ogranaka (vještica metla) i mnogih drugih promjena fenotipa, koje opisujemo kao simptome bolesti, a koje nerijetko vode ka sušenju i potpunom propadanju biljke (Marcone, 2014.).

Kao i kod većine patogenih bakterija, površinski i membranski proteini fitoplazmi smatraju se važnim faktorima virulencije te imaju značajnu ulogu u interakcijama s domaćinskim stanicama, osobito u početnim stadijima zaraze. Istraživanja fitoplazmatskih membranskih proteina provedena su samo za dvije vrste fitoplazmi ('*Ca. P. asteris*' i *flavescence dorée*). Utvrđene su interakcije fitoplazmatskog antigenskog membranskog proteina Amp, imunodominantnog membranskog proteina Imp, odnosno varijabilnog membranskog proteina VmpA s mikrofilamentima kukaca, čime je potvrđena njihova uloga u prijenosu fitoplazmi na biljke putem kukaca-vektora (Arricau-Bouvery *i sur.*, 2018.; Oshima *i sur.*, 2004.; Suzuki *i sur.*, 2006.). Uz površinske i membranske proteine fitoplazmi, potencijalni faktori virulencije ovih patogena su i efektori, male molekule koje se putem Sec-ovisnog transportnog sustava prenose izravno u citoplazmu domaćinske stanice. U stanici domaćina se selektivno vežu na proteine ili u nekim slučajevima indirektno utječu na miRNA. Na taj način reguliraju biološku aktivnost, primjerice, aktivnost enzima, gensku ekspresiju ili utječu na signalne putove, imunosni i fiziološki odgovor biljke na patogena, čime modificiraju simptome zaraze i interakcije biljaka s kukcima-vektorima. (Hoshi *i sur.*, 2009.; Huang *i sur.*, 2021.; Janik *i sur.*, 2017.; MacLean *i sur.*, 2014.; Maejima *i sur.*, 2014a.; Sugio *i sur.*, 2011a., 2011b.).

Sposobnost fitoplazmi za zarazu i umnažanje u vrlo različitim domaćinskim stanicama, upućuje na evoluciju mehanizama koji ovim bakterijama omogućuju moduliranje staničnih procesa u oba eukariotska domaćina iako pripadaju različitim carstvima (Hogenhout i Loria, 2008.).

Kasnih 90-tih godina prošlog stoljeća, objavljeni su prvi molekularni dokazi za prisutnost fitoplazmi u Hrvatskoj (Škorić *i sur.*, 1998.). U zaraženoj vinovoj lozi (*Vitis vinifera* L.), potvrđena je fitoplazma *stolbur* ili *bois noir* (BN) (Škorić *i sur.*, 1998.), koja je kasnije formalno opisana i uvrštena u fitoplazmatsku taksonomiju kao vrsta '*Ca. P. solani*' (Quaglino *i sur.*, 2013.). Metagenomički pristup te napredak tehnologija sekvenciranja omogućili su uspješno sastavljanje nekolicine potpunih genoma fitoplazmi i genomskih skica, među kojima i genom fitoplazme '*Ca. P. solani*', jedne od najzastupljenijih fitoplazmatskih vrsta u Republici Hrvatskoj (Seruga Music *i sur.*, 2019.). Sekvenciranjem i detaljnim komparativnim analizama genoma soja SA-1 fitoplazme '*Ca. P. solani*', pomoću bioinformatičkih alata identificirano je 38 gena potencijalnih efektora. Utvrđena su tri potencijalna efektora jedinstvena za vrstu '*Ca. P. solani*', dok je za 5 potencijalnih efektora utvrđeno da su specifični za soj SA-1 (Seruga Music *i sur.*, 2019.). Podložnost rekombinaciji te učestali horizontalni prijenos karakterističnih genetičkih elemenata (engl. *potential mobile units*, PMU), koji često nose gene efektora, potpomaže prilagodbi fitoplazmi na različite domaćinske vrste. No, mehanizmi regulacije i prijenosa PMU još uvijek nisu razjašnjeni (Seruga Music *i sur.*, 2019.). Glavnim prijenosnikom '*Ca. P. solani*' smatra se kukac-vektor *Hyalesthes obsoletus* Signoret, 1865 (Hemiptera: Cixiidae). Polifagni cvrčak *H. obsoletus* unosi fitoplazme u organizam hraneći se floemskim sokom biljaka zaraženih fitoplazmom '*Ca. P. solani*'. U genomu fitoplazme '*Ca. P. solani*' pronađen je i jedinstveni varijabilni gen *stamp*, koji kodira antigenski membranski protein-STAMP (Fabre *i sur.*, 2011b.). Velika sličnost proteina STAMP i proteina Amp '*Ca. P. asteris*', za kojeg je poznata interakcija s proteinom aktinom iz kukaca (Galetto *i sur.*, 2011.; Suzuki *i sur.*, 2006.), ukazuje na mogućnost interakcije membranskog proteina STAMP fitoplazme '*Ca. P. solani*' s proteinima mikrofilamenata kukaca-vektora *H. obsoletus*, o čemu još uvijek u literaturi nema podataka.

S ciljem otkrivanja strategija i mehanizama patogenosti '*Ca. P. solani*', istraživanje je podijeljeno u sljedeće tematske cjeline:

- Analiza raznolikosti i polimorfizma genoma fitoplazme '*Ca. P. solani*', polazeći od hipoteze da su efektori prema svojoj raznolikosti i polimorfizmu genoma fitoplazme '*Ca. P. solani*' specifični za pojedine sojeve unutar vrste.

- Analiza ekspresije potencijalnih efektor a i njihovih interakcija s biljnim domaćinom, temeljena na hipotezi da efektori stupaju u interakciju s proteinima biljnog domaćina te mijenjaju njegov fenotip.
- Analiza interakcija fitoplazmatskog membranskog proteina STAMP s proteinom kukaca-vektora, temeljena na hipotezi da fitoplazmatski membranski protein STAMP ostvaruje interakciju s aktinom kukca-vektora, a specifičnost interakcije ovisi o genotipu soja fitoplazme.

Materijali uključuju nove izolate genomske DNA iz indikatorske biljne vrste madagaskarskog zimzelena (*Catharanthus roseus* L. G. Don) zaražene dvama različitim sojevima 'Ca. P. solani', ranije genotipizirane uzorke DNA iz kukaca-vektora *H. obsoletus*, vinove loze i ostalih biljnih vrsta iz DNA kolekcije Zavoda za mikrobiologiju Sveučilišta u Zagrebu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Istraživanje također uključuje različite sojeve bakterija *Escherichia coli* i *Agrobacterium tumefaciens*, kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, te biljne vrste *Nicotiana benthamiana* L. i *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

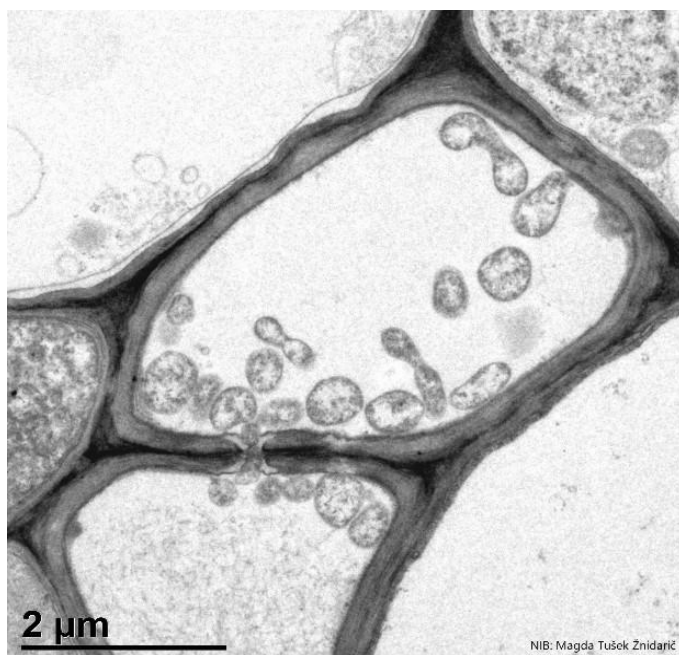
Metodologija korištena u svrhu ostvarivanja ciljeva ovog rada uključuje primjenu i optimizaciju relevantnih laboratorijskih metoda: izolacije DNA i RNA, lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*; PCR), kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu (engl. *quantitative real-time PCR*, RT-qPCR), molekularnih kloniranja, transformacije bakterija i kvasaca, transformacije biljaka agroinfiltracijom i metodom uranjanja cvjetova (engl. *floral dip*), izolacije i elektroforeze proteina, metode kopurifikacije proteina (engl. *pull-down*), analizu proteina metodom *Western blot*, metode bimolekulske fluorescencijske komplementacije (engl. *bimolecular fluorescence complementation*; BiFC), metode dvaju kvašćevih hibrida (engl. *yeast-two-hybrid assay*, Y2H) te upotrebu bioinformatičkih oruđa i računalnih programa.

2 LITERATURNI PREGLED

2.1 Fitoplazme

2.1.1 Opće značajke fitoplazmi

Dokaz da su neke biljne bolesti povezane s prokariotima koji koloniziraju floemski provodni sustav zaraženih biljaka, prvi put su iznijeli Doi i suradnici 1967. godine; u Japanu. Razvoj elektronske mikroskopije omogućio im je otkrivanje „mikoplazmama sličnih organizma“ (engl. *mycoplasma-like organism*; MLO) u stanicama floema murvi (*Morus sp. L.*), koje su imale izražene simptome patuljastog rasta i žutice (Doi i sur., 1967.; Ishiie, 1965.). Uz aholeoplazme, mikoplazme, ureaplazme i spiroplazme, MLO-i su tada ubrojeni u razred *Mollicutes* (lat. *mollis* - meko, *cutis* - koža) (Lim i Sears, 1989.); evolucijski odvojen od Gram-pozitivnih bakterija iz koljena Firmicutes (Hogenhout i sur., 2008.). Poput ostalih pripadnika razreda *Mollicutes*, ovu veliku skupinu biljnih unutarstaničnih patogena karakterizira nedostatak stanične stijenke. To im omogućuje pleomorfnost i osjetljivost na osmotske promjene (Edward i Freundt, 1967.; Sears i Kirkpatrick, 1994.) (**Slika 1**).



Slika 1. Elektronska mikrofotografija fitoplazmi '*Ca. P. mali*' u sitastim stanicama floema jabuke (*Malus domestica*).

Izvor: dr. sc. Magda Tušek Žnidarič, <https://www.gov.si/novice/2020-07-17-fitoplazme-kot-krivec-za-nastanek-carovnistih-metel/>; 7. siječanj 2026.

Na temelju filogenetskih analiza, godine 1993., Međunarodna organizacija za mikoplazmologiju (engl. *International Organization for Mycoplasmaology*; IOM) promijenila je naziv MLO u trivijalni naziv „fitoplazme“ (grč. *phyto*-biljka; grč. *plasma*-, „bilo što oblikovano“) i klasificirala ove bakterije u novi rod '*Candidatus* (*Ca.*) *Phytoplasma* (*P.*)', prema pravilima zasnovanim na sekvencama 16S ribosomske DNA (16S rDNA) za opisivanje prokariotskih organizama kao novih taksona (Firrao *i sur.*, 2004.; Jung *i sur.*, 2003.; Marcone, 2014.; Sears i Kirkpatrick, 1994.) (**Tablica 1**). Identificirano je i klasificirano više od 52 vrste '*Ca. P.*', koje su svrstane u 40 ribosomskih skupina i brojne podskupine (Rao i Bertaccini, 2026.). Fitoplazme do danas još nisu uspješno uzgojene u čistoj kulturi na hranjivim podlogama, što znatno otežava istraživanja ovih patogena. Upotrebom pojma '*Candidatus*', prilikom imenovanja fitoplazmatskih vrsta, naglašava se nepotpun opis svojstava ovih mikroorganizama zbog nemogućnost njihove kultivacije *in vitro* (Murray i Schleifer, 1994.; Murray i Stackebrandt, 1995.).

Tablica 1. Klasifikacija fitoplazmi.

Izvor: <https://gd.eppo.int/taxon/PHYPPMA>; 7. siječanj 2026.

Domena	Bacteria
Carstvo	Monera
Koljeno	<i>Mycoplasmata</i> (ranije <i>Tenericutes</i>)
Razred	<i>Mollicutes</i>
Red	<i>Acholeplasmatales</i>
Porodica	<i>Acholeplasmataceae</i>
Rod	' <i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma</i> '

Veličina fitoplazmatskih stanica varira od 200 do 800 nm u promjeru (Doi *i sur.*, 1967.; Lee *i sur.*, 2000.). U usporedbi s drugim prokariotima, fitoplazme imaju male i izrazito reducirane genome, što ih svrstava među bakterije s najmanjim poznatim genomima. Ovi uzročnici mnogih biljnih bolesti na globalnoj razini utječu na izrazite ekonomske gubitke u poljoprivredi i gospodarstvu. (Lee *i sur.*, 2000.; Marcone, 2014.; Strauss, 2009.).

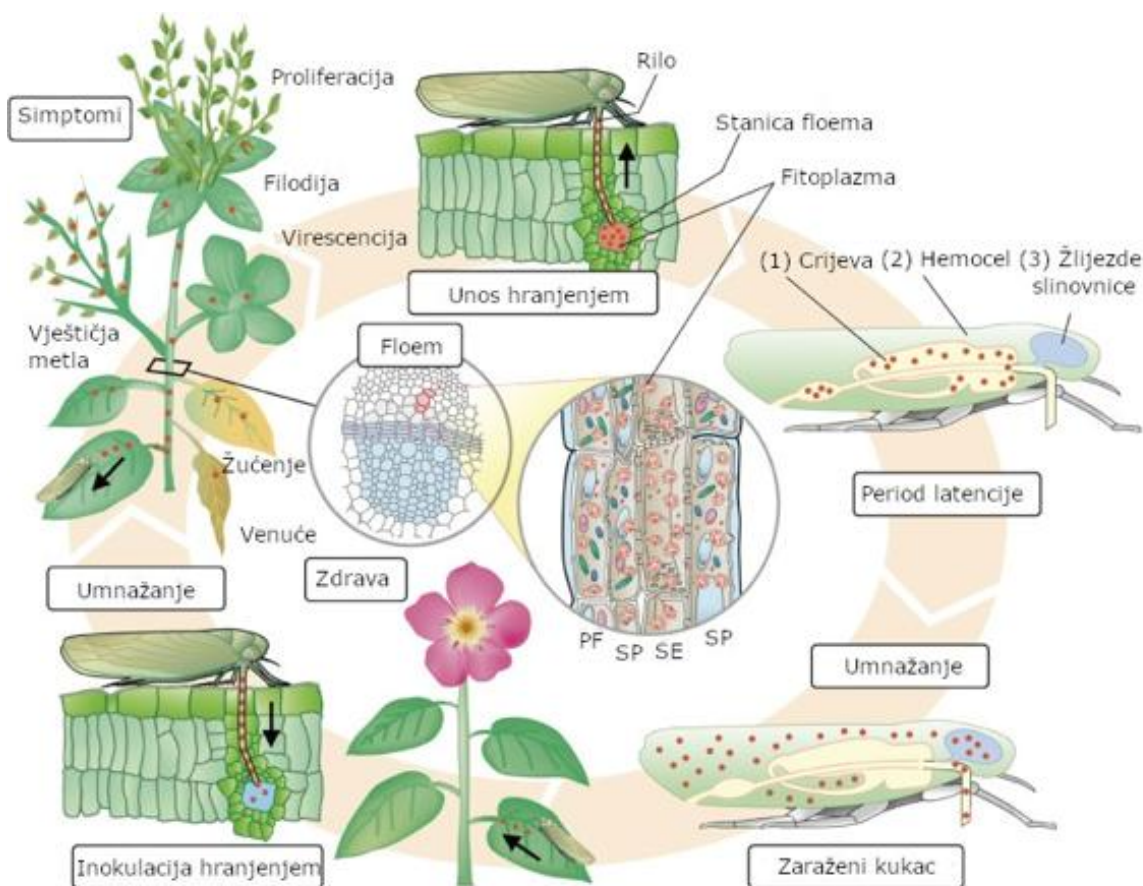
2.1.2 Prijenos i rasprostranjivanje fitoplazmi

U prirodi se prijenos fitoplazmi među biljnim domaćinima najčešće odvija putem kukaca-vektora. Rasprostranjivanje fitoplazmi ovisi o razvoju mehanizama infekcije i razmnožavanja u biljkama i kukcima-vektorima te o broju različitih vrsta domaćinskih organizama u životnom ciklusu ovih patogena (Hogenhout i Loria, 2008.; Weintraub i Beanland, 2006.).

Do sada, svi determinirani kukci-vektori fitoplazmi spadaju u rod Hemiptera, pri čemu najviše prijenosnika spada u porodice Cicadellidae, Cixiidae i Psyllidae (Weintraub i Beanland, 2006.). Prijenos fitoplazmi započinje hranjenjem kukca-vektora na zaraženoj biljci. U zaraženim biljkama fitoplazme su uglavnom lokalizirane u citoplazmi provodnog sustava sitastih stanica floema. Sitaste stanice floema žive su stanice bez jezgri s malim brojem organela poput ribosoma i malih vakuola. Plazmodezmijima su povezane sa susjednim stanicama pratilicama koje imaju jezgru i koje ih opskrbljuju hranjivim tvarima. Sitaste stanice floema međusobno su povezane sitastim pločama kroz čije pore se odvija prijenos biljnog soka bogatog hranjivim tvarima, šećerima, ali i fitoplazmama. (Doi *i sur.*, 1967.; Sugio *i sur.*, 2011b.). Kukac rilom probija biljno tkivo te iz floema siše sok koji sadrži i fitoplazme. One kroz probavni sustav naposljetku dopijevaju u hemolimfu, što im omogućuje lokalizaciju u svim organima i organskim sustavima životinje kroz koje hemolimfa cirkulira (Webb *i sur.*, 1999.) (**Slika 2**). Koncentracija fitoplazmi u organizmu kukca ovisi o duljini perioda hranjenja kukca na zaraženoj biljci, kao i njegova infektivnost koja je veća u kukaca koji se dulje hrane. Zaraznost kukca počinje po završetku latentnog perioda, različitog za različite vrste kukaca-vektora (Christensen *i sur.*, 2005.; Webb *i sur.*, 1999.) (**Slika 2**).

Poznato je da veliku ulogu u interakciji fitoplazmi i kukaca-vektora imaju membranski proteini izloženi na površini stanice patogena, no, podaci o mehanizmima interakcija između fitoplazmi i specifičnih kukaca-vektora koji mogu prenijeti određene fitoplazme, do sada nisu u potpunosti razjašnjeni.

(Barbara *i sur.*, 2002.; Berg *i sur.*, 1999.; Blomquist *i sur.*, 2001.; Suzuki *i sur.*, 2006.; Yu *i sur.*, 1998.).



Slika 2. Životni ciklus fitoplazmi. Tijekom hranjenja kukac putem rila unosi fitoplazme iz biljnog floema, nakon čega fitoplazme dopijevaju u crijeva kukca (hranjenje akvizicijom). Kako bi se mogle prenijeti na biljke, fitoplazme u organizmu kukca moraju savladati tri barijere: crijeva, hemocel i žlijezde slinovnice. Kukac prenosi fitoplazme spontanom inokulacijom, prilikom hranjenja floemskim sokom zdrave biljke. Nakon toga, fitoplazme se umnažaju i uspostavljaju sistemsku zarazu, uzrokujući mnoge jedinstvene biljne simptome. PF: parenhimska stanica floema, SP: stanica pratilica, SE: sitasti element floema (sitaste stanice povezane sitastom pločom). Preuzeto i prilagođeno iz Namba, 2019.

Osim putem kukaca-vektora, unos fitoplazmi u domaćinsku biljku može se odviti vegetativnim razmnožavanjem ili naciepljivanjem zaražene plemke na podlogu u antropogenim sustavima. Potvrđena je i mogućnost prijenosa fitoplazmi provodnim sustavom parazitskih biljaka poput viline kose (*Cuscuta sp.*) koje su u parazitskom odnosu istovremeno sa zaraženom i nezaraženom domaćinskom biljkom (Chang i Chen, 2024.; Dale i Kim, 1969.).

Rjeđi način prijenosa fitoplazmi jest anastomozom korijenja, odnosno stvaranjem mostova između provodnih sustava korijenja susjednih drvenastih biljaka (Vindimian i sur., 2002.).

Prisustvo fitoplazmatske DNA dokazano je i u biljnom sjemenju, no nema dokaza o mehanizmu prijenosa fitoplazme putem sjemena. U prilog tomu, ide i činjenica da ne postoji anatomska povezanost sjemena i floemskog provodnog sustava biljaka (Satta i sur., 2019.). Primjerice, fitoplazmatski geni su pronađeni u embrijima plodova zaraženih kokosovih (*Cocos nucifera* L.) (Cordova i sur., 2003.) i areka palmi (*Areca catechu* L.) (Lu i sur., 2024.), a u

sjemenkama sandalovine (*Santalum album* L.) fitoplazme su detektirane pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (Kirdat *i sur.*, 2022.).

2.1.3 Simptomi fitoplazmatskih zaraza

U Japanu su tijekom razdoblja Edo (1603.-1868. godine) zabilježeni podaci o raznim morfološkim promjenama u biljkama poput žutica, patuljastog rasta i pojave abnormalno razgranatog rasta poznatog pod terminom vještičja metla (engl. *witches' broom*, WB) (Okuda, 1972.). Danas se ti simptomi povezuju s fitoplazmama kao potencijalnim uzročnicima. Simptomi žutice u biljkama porodice glavočika (*Asteraceae*) (engl. *aster yellows*, AY) česta su manifestacija fitoplazmoza. Termin AY opisan je 1926. godine, prije samog otkrića fitoplazmi kao njihovih uzročnika, na primjeru žutice kineskog zvjezdana (*Callistephus chinensis* Nees.) (Kunkel, 1926.). Prema posljednjim podacima, opisano je 80-ak simptoma fitoplazmoza, a po svojim karakteristikama mogu se svrstati u nekoliko grupa koje obuhvaćaju slične promijene poput deformacije cvijeta (npr. virescencija, filodija, sitni cvjetovi) (**Slika 3**), abnormalnosti cvatnje (npr. višestruka cvatnja, cvjetovi nalik cvjetači) (**Slika 4**), promjene boje i oblika lista (npr. žućenje, crvenilo, blijedenje, ljubičaste ili crvene žile, kovrčanje, uvijanje, nazubljenost, nabiranje) (**Slika 5**), kržljanja (patuljast rast, kržljanje stabljika ili cvjetova) (**Slika 6**), grananja (proliferacija izboja, vještičja metla) (**Slika 7A**) i propadanja (venue) (**Slika 7B**) (Wei *i sur.*, 2024.).



A



B

Slika 3. Simptomi zaraze biljaka fitoplazmom. A) virescencija i filodija (*C. roseus*); B) filodija (*Chicorium endivia* L.).

Izvor: Marina Drčelić, privatna arhiva.



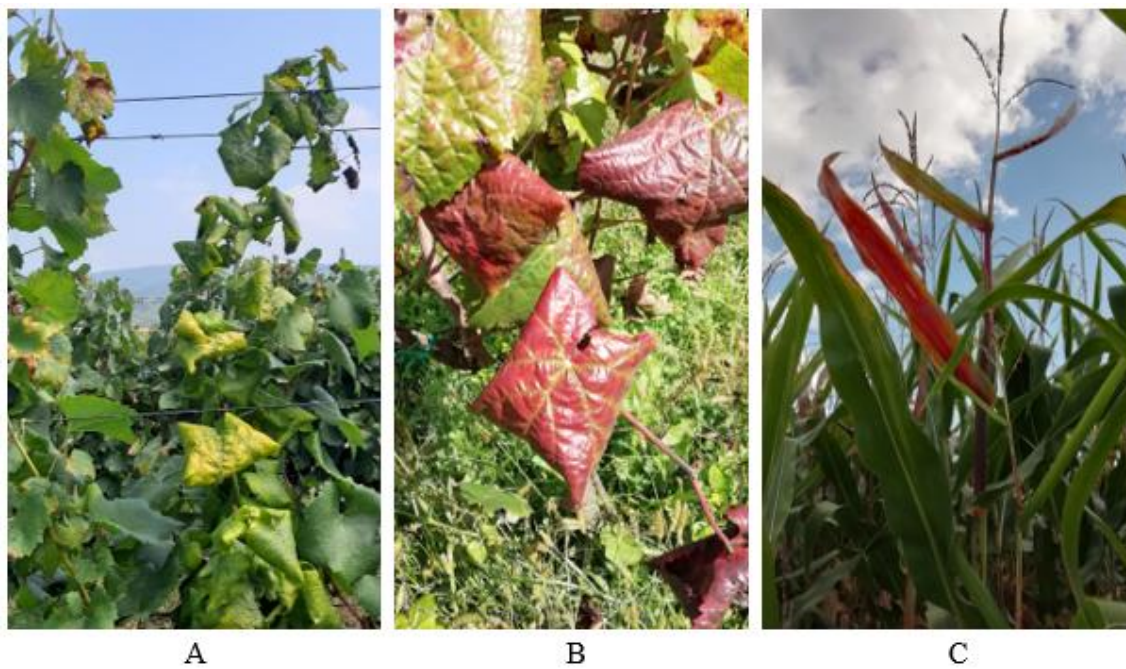
A



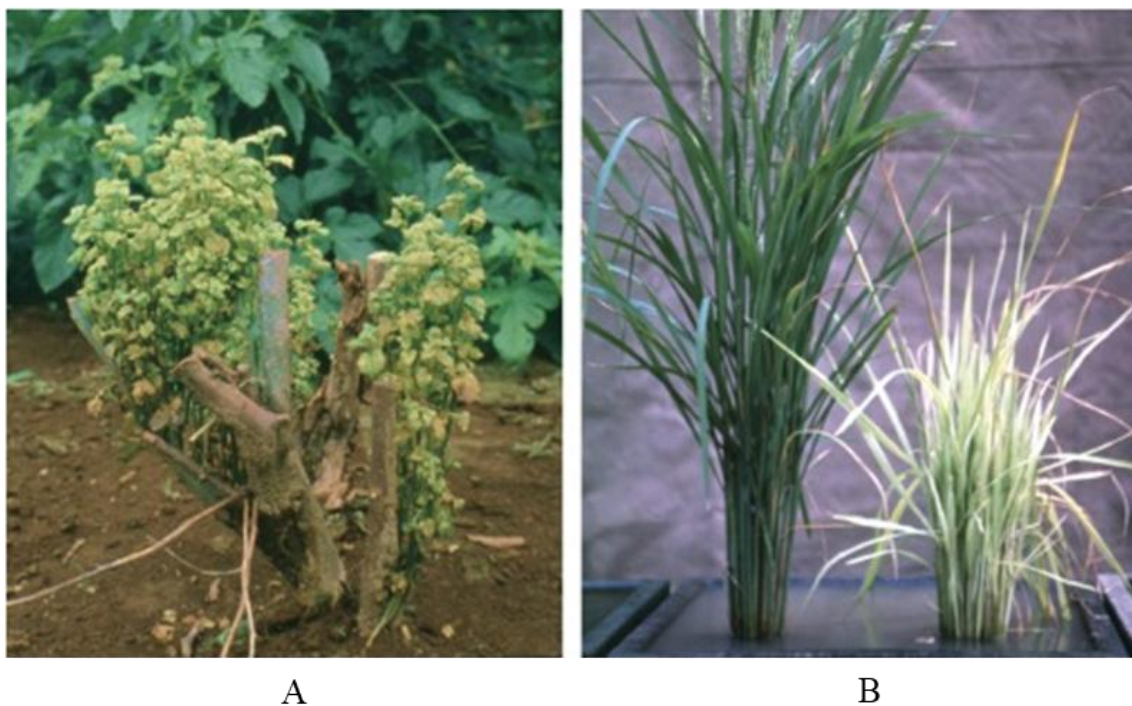
B

Slika 4. Simptomi zaraze biljaka fitoplazmom. A) višestruka cvatnja (*Echinacea purpurea* L.); B) cvjetovi nalik cvjetači (*E. purpurea* L.).

Preuzeto i prilagođeno iz <https://awkwardbotany.com/tag/phytoplasma/>; 5. siječanj 2026.



Slika 5. Simptomi zaraze biljaka fitoplazmom. A) žućenje i uvrtnje listova (*V. vinifera*); B) crvenjenje i uvrtnje listova (*V. vinifera*); C) crvenjenje žila listova (*Zea mays* L.).
Izvor: Marina Drčelić, privatna arhiva.



Slika 6. Simptomi zaraze biljaka fitoplazmom. A) patuljast rast (*Morus sp.*); B) patuljasti rast i blijedenje (*Oryza sp.*).
Preuzeto i prilagođeno iz Namba, 2019.



Slika 7. Simptomi zaraze biljaka fitoplazmom. A) vješticija metla (*Paulownia elongata* L.); B) propadanje (*Cocos nucifera* L.).
Preuzeto i prilagođeno iz Namba, 2019.

2.1.4 Genomi fitoplazmi

Nemogućnost uzgoja fitoplazmi u čistoj kulturi ograničava istraživanja ovih mikroorganizama. Identifikacija i klasifikacija fitoplazmi temelje se na metagenomskom pristupu i tehnikama sekvenciranja genoma poput *Illumina* i *Oxford Nanopore Technologies* (ONT) (Dermastia *i sur.*, 2025.; Wei i Zhao, 2022.). Do sada je sastavljeno oko 20 potpunih genoma i više od 200 skica genoma (engl. *genome sketch*) fitoplazmi (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=33926>, 15. ožujak 2025.). Genomi fitoplazmi su raznoliki i vrlo brzo evoluiraju (Hogenhout i Šeruga Musić, 2009.). Zahvaljujući obligatnom parazitiranju u domaćinskim stanicama, česta evolucijska prilagodba patogenih bakterija, pa tako i fitoplazmi, je reducirani genom (Oshima *i sur.*, 2004., 2013.). Fitoplazme ne posjeduju gene za opće metaboličke putove, poput gena za pentoza-fosfatni put, putove popravaka nukleotida, metabolizam ureje, za biosintezu fenilalanina, D-glutamina, D-glutamata, D-arginina, D-ornitina, D-alanina i D-glutaciona (Tran-Nguyen *i sur.*, 2008.). Osnovne metabolite preuzimaju iz stanica domaćina putem relativno velikog broja transportnih sustava, u odnosu na maleni genom (Bai *i sur.*, 2006.; Kube *i sur.*, 2008.). U većine fitoplazmi, genom je organiziran u jedan prstenasti kromosom, dok je linearna organizacija genoma rjeđe zastupljena, kao naprimjer genom fitoplazme '*Ca. P. mali*' (Kube *i sur.*, 2008.). Opisani su i ekstrakromosomski elementi poput plazmida (Firrao *i sur.*, 2007.; Kube *i sur.*, 2008.; Nishigawa *i sur.*, 2001.; Oshima *i sur.*, 2001.). Veličina genoma je 530 kb do 1.35 Mb, a udio G + C baznih parova je nizak (21-28%) (Oshima *i sur.*, 2013.).

Karakteristični ponavljajući sljedovi nukleotida, odnosno genetički elementi slični transpozonomima (engl. *potential mobile units*, PMUs) doprinose genomskoj varijabilnosti

fitoplazmi. Često sadrže gene uključene u replikaciju DNA i transpoziciju, kao što su *dnaB*, *dnaG*, *ssb*, *hflB*, *himS*, *fliA*, *tmk*, *dam*, *uvrB* i *tra5*, kao i potencijalne efektorske gene. Smatra se da ovi pokretni genetički elementi, veličine do 20 kbp, imaju važnu evolucijsku ulogu u prilagodbi fitoplazmi na različite domaćine (Bai *i sur.*, 2006.; Oshima *i sur.*, 2004.; Toruño *i sur.*, 2010.).

2.1.5 Efektori

Biljni patogeni, uključujući fitoplazme, izlučuju proteine i druge male specifične molekule kojima nadilaze obrambene mehanizme i biokemijske odgovore biljaka, kako bi osigurali uspješnu kolonizaciju biljnog tkiva (Van Der Hoorn i Kamoun, 2008.; Kamoun, 2006.; Sugio *i sur.*, 2014.). Sve sekrecijske molekule pomoću kojih mikrobnii patogeni ostvaruju kolonizaciju i virulentni potencijal objedinjene su pojmom efektori (Hogenhout *i sur.*, 2009.). Prema tome, efektori se mogu definirati kao produkti gena parazita čiji se fenotipski učinci manifestiraju izvan stanice u kojoj se parazit nalazi, djelujući na organizam domaćina (Dawkins, 1999.). Efektori su većinom proteini, iako mogu biti i sekundarni metaboliti, mali organski spojevi, peptidi ili male RNA (Dangl i Jones, 2001.; Todd *i sur.*, 2022.; Zhang *i sur.*, 2022.). Mogu djelovati kao faktori virulencije ili toksini, ali i avirulentni faktori ili elicitori. (Hogenhout *i sur.*, 2009.; Hoshi *i sur.*, 2009.; Huitema *i sur.*, 2004.; Kamoun, 2006., 2007.). U biljnih patogena, često jedan efektor ima više ciljnih molekula domaćinskih organizama s kojima može stupiti u interakciju (Van Der Hoorn i Kamoun, 2008.).

Za razliku od Gram-negativnih bakterija, koje većinom koriste vrlo složen sekrecijski sustav (sekrecijski sustav tipa 3, engl. *type 3 secretion system*, T3SS) za otpuštanje efektorskih molekula u domaćinske stanice, fitoplazme koje su unutarstanični patogeni, nemaju tako složen sekrecijski sustav. One otpuštaju efektore izravno u citoplazmu sitastih stanica domaćinskih biljaka, putem Sec-ovisnog puta translokacije proteina. Efektori se zatim premještaju iz floema u druge biljne stanice simplastičnim transportom, gdje mogu stupiti u interakciju s jednim ili više različitih domaćinskih proteina ili u nekim slučajevima indirektno djelovati na miRNA i time utjecati na signalne puteve i fiziologiju domaćina (Hogenhout *i sur.*, 2008.; Lu *i sur.*, 2014.; Win *i sur.*, 2012.). Do sada je detaljnije istraženo svega 20 fitoplazmatskih efektor, dok su stotine potencijalnih efektor fitoplazmi, njihovih mehanizama djelovanja i interakcija s domaćinom još uvijek neistražene (Carreón-Anguiano *i sur.*, 2023.). Najviše literaturnih podataka obuhvaća podatke o efektorima sojeva AY-WB i OY fitoplazme '*Ca. P. asteris*', među kojima su istraživani efektori SAP11, SAP54 (Bai *i sur.*, 2008.; Minato *i sur.*, 2014.) i homolozi SAP efektor vrsta poput '*Ca. P. mali*' (Bai i ostali,

2022; Janik i ostali, 2017; Strohmayer i ostali, 2021). Među ostalim značajnim efektorima opisani su TENGU i PHYLL1 efektori skupine *phyllogen*, koji se ističu izraženom genskom raznolikosti (Iwabuchi *i sur.*, 2020.; Minato *i sur.*, 2014.). To upućuje na važnu ulogu polimorfizma efektorskih gena u evoluciji i diferencijaciji fitoplazmatskih sojeva.

2.1.6 Biljni transkripcijski faktori

Biljni transkripcijski faktori su modularni proteini čija je glavna uloga regulacija ekspresije gena koji sudjeluju u biljnom razvoju, metabolizmu i odgovoru na stres (Strader *i sur.*, 2022.; Yang *i sur.*, 2012.). DNA-vezujuća domena biljnih transkripcijskih faktora specifično prepoznaje i veže regulatorne sljedove nukleotida u molekuli DNA, čime omogućuje ciljanu regulaciju ekspresije gena. Uz DNA-vezujuću domenu, transkripcijski faktori sadrže i transkripcijsko-regulatorne domene koje posreduju u aktivaciji ili represiji transkripcije, kao i dodatne domene odgovorne za interakcije s drugim proteinima i regulatornim molekulama. Takva modularna organizacija omogućuje preciznu kontrolu ekspresije ciljnih gena te pridonosi funkcionalnoj raznolikosti transkripcijskih faktora (Chowdhary *i sur.*, 2022.). Jedan transkripcijski faktor može imati više specifičnih domena kojima se može vezati za druge transkripcijske faktore ili signalne molekule (Chen i Rajewsky, 2007.). Prema strukturi DNA-vezujuće domene, transkripcijski se faktori dijele u nekoliko strukturnih skupina, među kojima su motivi: zavojnica-okret-zavojnica (engl. *helix-turn-helix*), triptofanski klaster (engl. *tryptophan cluster*), β -ukosnice izložene α/β -skelom (engl. *β -hairpin exposed by an α/β -scaffold*), α -heliks izložen β -strukturama (engl. *α -helices exposed by beta-structures*), cinkom koordinirane DNA-vezne domene (engl. *zinc-coordinating DNA-binding domains*) i drugi (Blanc-Mathieu *i sur.*, 2022.).

Analizom genoma uročnjaka identificirano je približno 1500 gena koji kodiraju različite transkripcijske faktore (Blanc-Mathieu *i sur.*, 2022.).

Među identificiranim transkripcijskim faktorima nalaze se i proteini porodice TEOSINTE BRANCHED 1/CYCLOIDEA/PROLIFERATING CELL FACTOR (TCP). Karakteristični su za biljke (Martín-Trillo i Cubas, 2010.), a zahvaljujući konzerviranoj TCP domeni imaju mogućnost stupanja u interakciju s DNA ili drugim proteinima (Cubas *i sur.*, 1999.). TCP proteini se klasificiraju u dva razreda na temelju razlike u nukleotidnom slijedu TCP domene (Cubas *i sur.*, 1999.; Lan i Qin, 2020.; Navaud *i sur.*, 2007.). Razred I obuhvaća trinaest različitih TCP proteina, dok se razred II dijeli na TB1/CYC-like i CINCINNATA (CIN)-like TCP skupine. U skupinu TB1/CYC-like spadaju TCP1, TCP12 i TCP18, dok se u skupinu

CIN-TCP ubrajaju proteini TCP2, TCP3, TCP4, TCP5, TCP10, TCP13, TCP17 i TCP24 (Cubas i ostali, 1999; Martín-Trillo & Cubas, 2010).

Proteini TCP razreda II imaju izrazito redundantne funkcije te sudjeluju u regulaciji razvojne plastičnosti biljaka i različitim procesima: razvoju lišća (Crawford *i sur.*, 1996.; Efroni *i sur.*, 2008., 2013.; Koyama *i sur.*, 2007., 2010.), grananju izdanaka (González-Grandío *i sur.*, 2013.), morfogenezi cvijeta (Huang i Irish, 2015.), formiranju trihoma (Lan *i sur.*, 2021.; Vadde *i sur.*, 2019.), termomorfogenezi i fotomorfogenezi (Dong *i sur.*, 2019.; Zhou *i sur.*, 2019.).

Transkripcijski faktori MADS-box porodice domena značajni su za razvoj cvijeta. U razvoju cvijeta uročnjaka, važnu ulogu imaju homeotični geni koji kodiraju transkripcijske faktore MADS-box porodice domena, među kojima se ističu gen klase E, *SEPALLATA3* (*SEP3*) i gen klase A, *APETALA1* (*AP1*). Transkripcijski faktor AP1 uključen je u uspostavu identiteta cvjetnog meristema te potiskuje ekspresiju gena povezanih s vremenom cvatnje, uključujući *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*), *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1* (*SOC1*) i *AGAMOUS-LIKE 24* (*AGL24*). Navedeni geni sudjeluju u prijelazu iz vegetativne u reproduktivnu fazu razvoja te u uspostavi i regulaciji cvjetnog meristema. Potiskivanjem ekspresije gena koji određuju vrijeme cvjetanja, AP1 sprječava razvoj ektopičnih sekundarnih cvjetova (Liu *i sur.*, 2007.). Protein SEP3 djeluje kao središnji regulator razvoja cvjetnih organa stvaranjem transkripcijskih kompleksa s drugim MADS-box proteinima, čime omogućuje pravilno određivanje identiteta cvjetnih organa i razvoj cvijeta (Alvarez-Buylla *i sur.*, 2010.; Gregis *i sur.*, 2008.; Immink *i sur.*, 2012.). Osim toga, transkripcijski faktori SEP3 i AP1 sudjeluju u regulaciji ekspresije gena klase B, *APETALA3* (*AP3*) i *PISTILLATA* (*PI*), putem stvaranja MADS-box regulatornih kompleksa. Ovi geni ključni su za razvoj latica i prašnika te za određivanje identiteta cvjetnih organa (Ng i Yanofsky, 2001.; Wu *i sur.*, 2012.).

2.2 'Candidatus Phytoplasma solani'

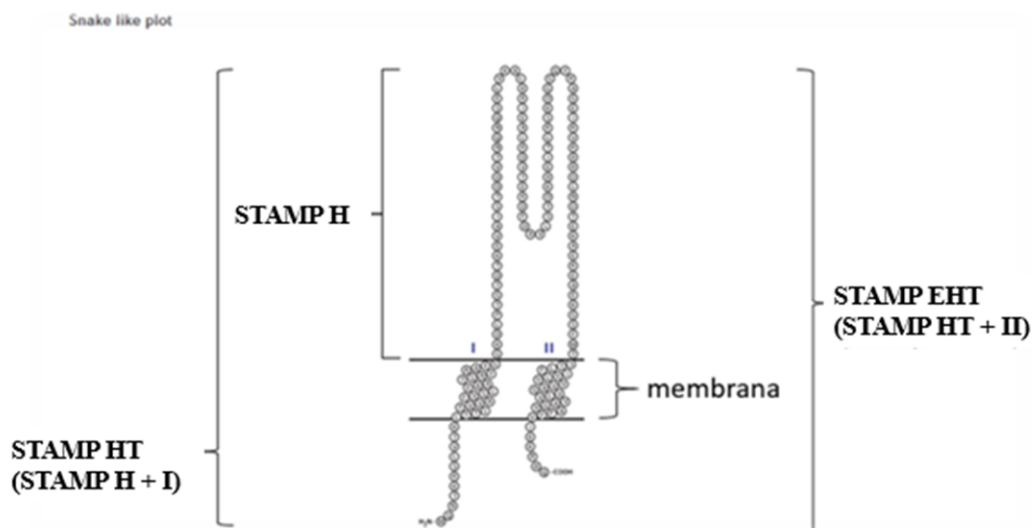
Do 2004. godine fitoplazma '*Ca. P. solani*' nazivana je BN ili *stolbur* fitoplazma (Firrao *i sur.*, 2004.), a 2013. godine formalno je opisana kao vrsta i taksonomski svrstana u 16SrXII grupu, prema slijedu nukleotida u genu za *16S rRNA*, zajedno s fitoplazmama '*Ca. P. australiense*', '*Ca. P. japonicum*' i '*Ca. P. fragariae*'. Iako, vrste unutar ove skupine dijele sličnost >97.5% genskog sadržaja, sve se razlikuju po molekularnim specifičnostima i ekološkoj niši (Quaglino *i sur.*, 2013.).

Fitoplazma '*Ca. P. solani*' karakteristična je i endemična za euromediterranski bazen. Njeni deskriptivni nazivi kolokvijalno se i danas koriste u literaturi na temelju najpoznatijih bolesti

koje uzrokuje, a to su BN vinove loze te *stolbur* u divljih i kultiviranih zeljastih i drvenastih biljaka. Bolesti uzrokovane zarazom fitoplazmom '*Ca. P. solani*' zabilježene su u nekoliko stotina ekonomski važnih biljnih vrsta uključujući šećernu repu, rajčicu, krumpir, papriku, celer, peršin, mrkvu, grašak i kukuruz (EFSA Panel on Plant Health, 2014.). Simptomi poput žućenja, crvenila, patuljastog rasta, deformacija, degenerativnih promjena i propadanja biljaka povezani su sa zarazom ovom fitoplazmom (Quaglino *i sur.*, 2013.).

U Republici Hrvatskoj su prvi molekularni dokazi prisutnosti fitoplazme objavljeni krajem 1990-ih godina u vinovoj lozi zaraženoj uzročnikom *stolbur-a* (Škorić *i sur.*, 1998.), koji je danas znan kao '*Ca. P. solani*'. Ujedno, ova fitoplazma predstavlja najzastupljeniju fitoplazmatsku vrstu na teritoriju Republike Hrvatske.

Veličina kromosoma među sojevima '*Ca. P. solani*' izrazito je varijabilna (860-1350 kb), a uključuje i najveći do sada objavljen fitoplazmatski kromosom (Marcone *i sur.*, 1999.). Potpuno je sekvenciran samo jedan genom, soja GOE, iz vektora *Pentastiridius leporinus* (Toth *i sur.*, 2025.) koji nije karakterističan predstavnik ove vrste, a postoje skice genoma sojeva: 284/09 iz duhana i 231/09 iz peršina (Mitrović *i sur.*, 2014.), te soja SA-1 sekvenciranog iz madagaskarskog zimzelena zaraženog fitoplazmom iz vinove loze (Seruga Music *i sur.*, 2019.). Skica genoma SA-1 pokriva oko 81% ukupne procijenjene veličine genoma (821322 bp u 19 kontiga). Za ovaj soj su izvedene detaljne analize skice genoma i usporedbe sa sekvenciranim genomima drugih vrsta fitoplazmi te je identificirano 38 potencijalnih efektor, od koji se 20 nalazi se u regijama PMU. Homolog efekorskog gena *SAP11* pronađen je u do sada potpuno sekvenciranom fitoplazmatskom genomu GOE i u skici genoma SA-1. Efektorski gen *SAP54-like* nije bioinformatički identificiran sekvenciranjem, sastavljanjem i anotacijom skice genoma, ali je u konačnici umnožen iz soja SA-1 (Seruga Music *i sur.*, 2019.). Uz efektorske proteine značajne za '*Ca. P. solani*', važnu ulogu u virulenciji imaju i antigenski membranski antigenski proteini (Galetto *i sur.*, 2011.; Suzuki *i sur.*, 2006.). Kako fitoplazme nemaju staničnu stijenku, membranski proteini su izloženi na površini ovih mikroorganizama te su samim time u izravnom kontaktu s okolinom. Za vrstu '*Ca. P. solani*' karakterističan je antigenski transmembranski protein STAMP (engl. *stolbur phytoplasma antigenic protein*) koji potencijalno stupa u interakciju s proteinima kukaca-vektora (Fabre *i sur.*, 2011a., 2011b.). Gen *stamp* kodira antigenski transmembranski protein STAMP (16 kDa), sačinjen od 157 aminokiselina, koji sadrži pretpostavljen signalni peptid i hidrofobnu α -zavojnicu na C-terminalnom kraju (**Slika 8**).



Slika 8. SOUSI: predviđeni shematski prikaz topologije proteina STAMP. Stamp H: hidrofilna regija. Stamp HT: Stamp H i transmembranska regija I. Stamp EHT: Stamp HT i transmembranska regija II.
Izvor: <https://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/mobile/>; 17. ožujak 2026.

Jedinstven je za vrstu, ali i iznimno varijabilan među sojevima fitoplazme '*Ca. P. solani*', što ukazuje na pozitivni diversifikacijski selekcijski pritisak (Fabre *i sur.*, 2011b.). Prema podacima multigeneske analize (engl. *multilocus sequence typing*; MLST) te filogenetskoj analizi metodom susjednog sparivanja, u Republici Hrvatskoj je identificirano najmanje deset različitih *stamp* genotipova, dok je ukupno identificirano 57 različitih varijanti ovog gena (Plavec *i sur.*, 2024.). Istraživanja su pokazala da dijeli 26-40% identičnosti s proteinom AMP u '*Ca. P. asteris*' te 40% identičnosti s homolognim proteinom fitoplazme '*Ca. P. japonicum*', za koji je poznato da stupa u interakciju s mikrofilamentima aktina kukaca-vektora (Fabre i ostali, 2011; Galetto i ostali, 2011; Suzuki i ostali, 2006).

Najvažniji prirodni vektor '*Ca. P. solani*' je cvrčak *H. obsoletus* Sign. (porodica: Cixiidae). Za *H. obsoletus* nije utvrđena sposobnost prijenosa drugih fitoplazmi, što upućuje na visoku specifičnost ovog vektora prema '*Ca. P. solani*', potencijalnu koevoluciju s ovom fitoplazmom i pri tom ju izdvaja od drugih fitoplazmatskih vrsta (Langer & Maixner, 2004). Životni ciklus *H. obsoletus* odvija se na malom broju biljnih vrsta, dok se hranjenje cvrčka floemskim sokom odvija na velikom broju različitih biljaka čime se pospješuje rasprostranjivanje '*Ca. P. solani*' u prirodi (Imo *i sur.*, 2013.). Uz *H. obsoletus*, novija istraživanja su pokazala da su i kukci *Reptalus panzeri*, *R. artemisiae* (Cvrković *i sur.*, 2013.; Jović i Toševski, 2024.) i *Anaceratagallia ribauti* (Riedle-Bauer *i sur.*, 2008.) vektori '*Ca. P. solani*'.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Nukleotidni sljedovi (DNA sekvence)

3.1.1.1 Fitoplazmatski geni

Za *in silico* usporedbu i analizu nukleotidnih sljedova efektor fitoplazme '*Ca. P. solani*' korištena je skica genoma SA-1 (pristupni broj: MPBG01000000) te skice genoma dva različita soja '*Ca. P. solani*' (STOL, pristupni broj: JBFPNQ000000000; ST19 JBFSHS000000000) prethodno sekvenciranih, sastavljenih i anotiranih u sklopu projekta HRZZ-IP-2019-04-2469.

Za istraživanja interakcija fitoplazmatskih i biljnih proteina korišteni su nukleotidni sljedovi gena efektor fitoplazmi:

SAP11-like (prethodno objavljeni nukleotidni slijed *SAP11-like_SA-1_PSSA1_v1c1150*, pristupni broj: MPBG01000000.1 (Seruga Music i sur., 2019.)) i *SAP54-like* (*SAP54-like_STOL_ph74_0110*, pristupni broj: JBFPNQ000000000.1), iz izolata genomske DNA (gDNA) fitoplazme '*Ca. P. solani*' iz indikatorske biljne vrste madagaskarskog zimzelena (*C. roseus*) zaražene dvama različitim sojevima '*Ca. P. solani*' (**Prilog A.1**).

Za istraživanja interakcija fitoplazmatskih proteina i proteina kukaca korišteni su nukleotidni sljedovi fitoplazmatskog gena za transmembranski protein STAMP: genotip ST6 prethodno izoliran iz vinove loze zaražene fitoplazmom '*Ca. P. solani*', i genotip ST9, izoliran iz kukca-vektora *H. obsoletus* zaraženog fitoplazmom, kao i dijelovi nukleotidnih sljedova ST6 i ST9 koji kodiraju isključivo hidrofilnu regiju proteina STAMP, označeni kao ST6(H) i ST9(H) (**Prilog A.1**).

3.1.1.2 Biljni geni

Za istraživanje interakcija s fitoplazmatskim proteinskim efektorima u biljnom sustavu i sustavu Y2H korišteni su nukleotidni sljedovi geni uročnjaka *AtTCP2* (TAIR pristupni broj: AT4G18390), *AtTCP4* (TAIR pristupni broj: AT3G15030) umnoženi standardnom PCR reakcijom iz plazmidnih konstrukata pDESTGADT7:*AtTCP2* i pDESTGADT7:*AtTCP4* (ustupljeno iz kolekcije prof. Saskije Hogenhout, John Innes Center, Norwich, UK) te *AtAP1* (TAIR pristupni broj: AT1G69120) i *AtSEP3* (TAIR pristupni broj: AT1G24260) umnoženi standardnom PCR reakcijom iz plazmidnih konstrukata pDONR207:*AtAP1* i pDONR207:*AtSEP3* (ustupljeno iz kolekcije prof. Saskije Hogenhout, John Innes Center, Norwich, UK) (**Prilog A.2**).

3.1.1.3 Gen *act3* kukca *H. obsoletus*

Za istraživanje interakcija s fitoplazmatskim proteinima, korišten je nukleotidni slijed gena *act3* koji kodira protein aktin (**Prilog A.3**). Gen je prethodno umnožen metodom RT-PCR, pomoću specifično dizajniranih početnica (ustupljeno, prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić) iz ranije genotipizirane DNA kukca-vektora *H. obsoletus* ulovljenog na vinovoj lozi zaraženoj fitoplazmom 'Ca. P. solani' u Sv. Ivanu Žabnom, u sklopu projekta HRZZ-IP-2019-04-2469.

3.1.1.4 Plazmidni vektori i konstrukti

U ovom radu, bilo je potrebno osmisliti i sastaviti plazmidne konstrukte s genima s optimiziranim kodonima iz odgovarajućih plazmida pogodnih za ekspresiju te analizu interakcija proteina u biljnom (**Tablica 2, Tablica 3**) i u sustavu Y2H (***Plazmidni** konstrukti su konstruirani iz osnovnih plazmida pSPYNE-BPM1 (Rendulić, 2018) i pSPYCE-BPM1 (Rendulić, 2018.).

Za pozitivnu kontrolu interakcije u biljnom sustavu korišten je plazmidni konstrukti pB7WGF2.0-EGFP-DMS3, dok su za negativnu kontrolu agroinfiltracije korišteni plazmidni konstrukti pSPYNE:ST6, pSPYNE:ST9 i pSPCYE:aktin samostalno bez odgovarajućeg partnerskog plazmidnog konstrukta.

Tablica 4) te u bakterijskom sustavu (**Tablica 5**).

Tablica 2. Plazmidni konstrukti korišteni za transformaciju uročnjaka metodom floral dip*

Ime konstrukta	Bakterijski selektivni marker	Biljni selektivni marker	Namjena
pGWB529:SAP11-like	spektinomycin	higromicin B	Ekspresija SAP11-like gena u biljnom sustavu
pGWB529:SAP54-like			Ekspresija SAP54-like gena u biljnom sustavu

*Plazmidni konstrukti su konstruirani iz osnovnog plazmida pGWB529-ami6bpm (ustupljeno prof. dr. sc. Bauer, neobjavljeno).

Tablica 3. Plazmidni konstrukti korišteni za izvođenje metode BiFC*

pSPYNE konstrukt (YFP N-terminalni fragment)	pSPYCE konstrukt (YFP C-terminalni fragment)	Istraživana interakcija
pSPYNE:SAP11- <i>like</i>	pSPYCE:AtTCP2	SAP11- <i>like</i> -AtTCP2
	pSPYCE:AtTCP4	SAP11- <i>like</i> -AtTCP4
pSPYNE:SAP54- <i>like</i>	pSPYCE:AtAP1	SAP54- <i>like</i> -AtAP1
	pSPYCE:AtSEP3	SAP54- <i>like</i> -AtSEP3
pSPYNE:ST6	pSPYCE:aktin	ST6-aktin
pSPYNE:ST9		ST9-aktin

*Plazmidni konstrukti su konstruirani iz osnovnih plazmida pSPYNE-BPM1(Rendulić, 2018) i pSPYCE-BPM1 (Rendulić, 2018.).

Za pozitivnu kontrolu interakcije u biljnom sustavu korišten je plazmidni konstrukti pB7WGF2.0-EGFP-DMS3, dok su za negativnu kontrolu agroinfiltracije korišteni plazmidni konstrukti pSPYNE:ST6, pSPYNE:ST9 i pSPCYE:aktin samostalno bez odgovarajućeg partnerskog plazmidnog konstrukta.

Tablica 4. Plazmidni konstrukti korišteni pri izvođenju metode sustava Y2H**

pGBT9 konstrukti (-BD)	pGAD424 konstrukti (-AD)	Istraživana interakcija
pGBT9:SAP11- <i>like</i>	pGAD424:AtTCP2	SAP11- <i>like</i> -AtTCP2
	pGAD424:AtTCP4	SAP11- <i>like</i> -AtTCP4
pGBT9:SAP54- <i>like</i>	pGAD424:AtAP1	SAP54- <i>like</i> -AtAP1
	pGAD424:AtSEP3	SAP54- <i>like</i> -AtSEP3
pGBT9:ST6	pGAD424:aktin	ST6-aktin
pGBT9:ST9		ST9-aktin

**Plazmidni konstrukti su konstruirani iz osnovnih plazmida pGBT9 i pGAD424 (Clontech Laboratories, Inc. Takara Bio).

Za pozitivnu kontrolu interakcije u sustavu Y2H korišteni su plazmidni konstrukti pGBT9:RDM1 i pGAD424:DMS3, dok su pGBT9 i pGAD424 bez umetnutih gena od interesa korišteni kao negativna kontrola.

Tablica 5. Plazmidni konstrukti korišteni za prekomjernu ekspresiju gena u *E. coli****

pGEX-4T-1 konstrukt	pET28a konstrukt	Istraživana interakcija
pGEX-4T-1:aktin	pET28a:ST6(H)	aktin-ST6(H)
	pET28a:ST9(H)	aktin-ST9(H)

***Plazmidni konstrukti su konstruirani iz osnovnih plazmida pGEX-4T-1-TaMAB2 i pET28a-RDM1 (Jagić i sur., 2022.).

3.1.1.5 Početnice

Parovi početnica za umnažanje gena homologa *SAP11* i *SAP54* iz genoma sojeva '*Ca. P. solani*' specifično su dizajnirani pomoću softvera *Geneious Prime 2024.0.7* (Biomatters Ltd., Auckland, Novi Zeland), sintetizirani u servisu (Macrogen Europe Amsterdam, Nizozemska) i korišteni u sklopu ovog projekta (HRZZ-IP-2019-04-2469) u svrhu filogenetske analize i analize raznolikosti i polimorfizma efektor SAP11-like i SAP54-like sojeva '*Ca. P. solani*' (**Prilog C.1**).

Parovi početnica korištenih za umnažanja gena iz ishodišnih plazmidnih konstrukata i za kloniranje inserata u odredišne plazmidne vektore. Dizajnirani su specifično za svaki insert te su također sintetizirani u servisu (Macrogen Europe Amsterdam, Nizozemska) (**Prilog C.2**).

Za provjeru plazmidnih konstrukata sekvenciranjem (Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska), korištene su odgovarajuće univerzalne početnice (**Prilog C.3**).

Za provjeru kvalitete komplementarne DNA (cDNA) (638 bp) '*Ca. P. solani*' spram potencijalno zaostale genomske g(DNA) (732 bp) korištene su početnice ACT3_fw/rv (**Prilog C.4**).

Pri izvođenju kvantitativne PCR reakcije (RT-qPCR) korištene su dizajnirane početnice 142Fw i 302Rv za umnažanje gena *SAP11-like*, a za umnažanje gena *SAP54-like* korištene su dizajnirane početnice 88Fw i 217Rv. Za umnažanje kontrolnog gena za ekspresiju *ogio* (pristupni broj: AT5G51880) korišten je par početnica *ogioF* i *ogioR*, a za umanažanje kontrolnog gena za ekspresiju *act2* (pristupni broj: AT3G18780), korištene su početnice ACTIN2_8_F i ACTIN2_8_R (**Prilog C.5**).

Konačna koncentracija svih matičnih otopina početnica iznosila je 100 µM.

Radne koncentracije svih otopina početnica u konačnici su iznosile 10 µM.

Otopine početnica pohranjene su na -20 °C.

3.1.2 Bakterijski sojevi

U svrhu kloniranja pomoću sustava *In-Fusion®* korištene su visoko kemijski kompetentne stanice bakterijskog soja HST08, *E. coli* (Stellar™ Competent Cells, Takara Bio Europe S.A.S, Saint-Germain-en-Laye, Francuska) iz komercijalno dostupnog kompleta.

Za prekomjernu ekspresiju eukariotskih proteina u bakterijskom sustavu korišten je soj kompetentnih stanica *E. coli*, BL21 varijanta Rosetta™ (DE3) (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka). Ova varijanta kemijski kompetentnih stanica nosi rezistenciju na kloramfenikol na plazmidu pRARE (Novy *i sur.*, 2001.) (**Prilog E**).

Za transformaciju uročnjaka metodom *floral dip* i izvođenje agroinfiltracije listova duhana vrste *N. benthamiana* L. metodom BiFC korištene su elektrokompetentne stanice *Agrobacterium tumefaciens*, soj GV3101 (pMP90) (Gold Biotechnology, St. Louis, SAD). Soj GV3101 potječe iz soja C58, koji u svojoj kromosomskoj DNA nosi rezistenciju na antibiotik rifampicin, dok Ti-plazmid pMP90 (pTiC58DT-DNA) koji nosi rezistenciju na antibiotik gentamicin (**Prilog E**).

Elektrokompetentne stanice prethodno su pripravljene u Laboratoriju za kulturu biljnog tkiva, Zavoda za molekularnu biologiju PMF-a i pohranjene na -80 °C u Zavodu za molekularnu biologiju Sveučilišta u Zagrebu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta.

3.1.3 Sojevi kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*

Za izvođenje metode Y2H korišteni su sojevi HF7c i AH109 kvasca *S. cerevisiae*.

HF7c [*MATa*, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-801*, *trp1-901*, *leu2-3*, 112, *gal4-542*, *gal80-538*, *LYS2:GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *URA3:GAL417mers(x3)-CYC1TATA-lacZ*] ima dva reporterska gena *lacZ* i *HIS3* integrirana u genom (Feilotter i sur., 1994.).

AH109 [*MATa*, *trp1-901*, *leu2-3*, 112, *ura3-52*, *his3-200*, *Δgal4*, *Δgal80*, *LYS2: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*, *URA3: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*] ima tri reporterska gena *lacZ*, *HIS3* i *ADE2* (James, 2001.; James i sur., 1996.).

3.1.4 Eksperimentalne biljne linije

Biljke uročnjaka divljeg tipa *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, ekotipa Columbia (Col-0) korištene su za transformaciju metodom *floral dip*.

Biljke duhana, vrste *N. benthamiana* Domin. korišteni su za agroinfiltraciju pri izvođenju metode BiFC.

3.1.5 Mediji, puferi i otopine

3.1.5.1 Hranjivi mediji za bakterije

Kruti i tekući hranjivi medij Luria-Bertani (LB), pH 7, uz dodatak odgovarajućih antibiotika (Tablica 6, Prilog E) korišten je za uzgoj bakterijskih sojeva *E. coli* i *A. tumefaciens*.

Tablica 6. Sastav hranjivog medija LB za uzgoj bakterijskih sojeva

Sastav medija	Konačna koncentracija (g/L)
Ekstrakt kvasca	5
NaCl	10
Trypton	10
Agar (samo za kruti medij)	15
pH 7, autoklavirati	

Za oporavak kompetentnih bakterijskih stanica nakon toplinskog šoka ili elektroporacije prilikom transformacije, korišten je medij SOC, pH 7 predgrijan na 37 °C (Tablica 7).

Tablica 7. Sastav medija SOC za oporavak kompetentnih bakterijskih stanica

Sastav medija	Konačna koncentracija
Ekstrakt kvasca	5 g/L
NaCl	10 mM
Trypton	20 g/L
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glukoza	20 mM
pH 7, autoklavirati	

3.1.5.2 Hranjivi mediji za kvasce

Kvasci *S. cerevisiae* uzgajani su na krutom ili u tekućem YPD (engl. *yeast extract peptone dextrose*) hranjivom mediju, pH 6.5 (**Tablica 8**), a korišteni su u svrhu izvođenja metode sustava Y2H. Za izvođenje transformacije kvasaca korišteni su različiti puferi (**Tablica 9**), a za selekciju uspješno kotransformiranih kvasaca korištena je kruta selektivna podloga sintetski definiranog (SD) medija bez aminokiselina leucin i triptofan (SD/-Leu/-Trp), za potvrdu interakcije proteina podloga bez leucina, triptofana i histidina (SD/-Leu/-Trp/-His) te za strožu potvrdu proteinske interakcije podloga bez leucina, triptofana, histidina i adenina (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade) (**Tablica 10**).

Sastav pufera i kemikalije korištenih pri dodatnoj potvrdi interakcije β -galaktozidaznim testom prikazuje **Tablica 11**.

Tablica 8. Sastav medija YPD za uzgoj kvasaca *S. cerevisiae*

Medij YPD	Konačna koncentracija (g/L)
Ekstrakt kvasca	10
D-glukoza	20
Pepton	20
Agar (za kruti medij)	20
pH 6.5, autoklavirati	

Tablica 9. Puferi korišteni pri izvođenju metode sustava Y2H

Pufer	Sastav	Koncentracija/količina	Napomena
10× TE	Tris-HCl	0.1 M	Autoklavirati
	EDTA	10 mM	
10× LiAc	LiAc	1 M	Autoklavirat, pH podešen octenom kiselinom
50% PEG	PEG	0.5 g/mL	Sterilna Milli-Q H ₂ O
pH 7.5			

Tablica 10. Mediji SD bez aminokiselina za istraživanje interakcija proteina i provjeru prototrofije kvasaca *S. cerevisiae*

Sastav medija (g/L)	Sintetski definirani medij		
	SD/-Leu/-Trp	SD/-Leu/-Trp/-His	SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade
YNB bez aminokiselina	6.7	6.7	6.7
D-glukoza	20	20	20
Jantarna kiselina	10	10	10
<i>Yeast synthetic Dropout Medium Supplements</i>	0.62*	0.62**	0.62***
Agar (za kruti medij)	20	20	20
pH 5.8 - 7.0, autoklavirati			

*bez leucina i triptofana

**bez leucina, triptofana i histidina

***bez leucina, triptofana, histidina i adeina

Tablica 11. Puferi i kemikalije za izvođenje β-galaktozidaznog testa

Pufer/ kemikalija	Sastav	Koncentracija/ količina
Z pufer	Na ₂ HPO ₄ × 7H ₂ O	16.1 g/L
	NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O	5.0 g/L
	KCl	0.75 g/L
	MgSO ₄ × 7H ₂ O	0.246 g/L
Agaroza	agaroza	0.07 g
X-Gal	5-brom-4-kloro-3-ibdol-b-D-galaktopiranozid u N, N-dimetilformamid (DMF)	40 mg/mL
β-ME*	β-merkaptetanol	2.7 mL/L
pH 7, autoklavirati		
*β-ME dodati nakon autoklavliranja		

3.1.5.3 Mediji i supstrati za eksperimentalne biljke

Za uzgoj klijanaca uročnjaka korišten je gotovi medij *Murashige and Skoog Basal Medium* (MS) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, SAD), koji sadrži organske tvari, mikro i makronutrijente, uz dodatak 20 g/L agara visoke čistoće (A1296, Sigma-Aldrich, Saint Louis, SAD), pH 5.7, autoklaviran (**Tablica 12**).

Tablica 12. Sastav medija MS za uzgoj uročnjaka

Makronutrijenti	mg/L
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂	332.2
MgSO ₄	180.7
KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	170
Mikronutrijenti	
H ₃ BO ₃	6.2
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
KI	0.83
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
Organske tvari	
Glicin (slobodna baza)	2
Mio-inozitol	100
Nikotinska kiselina (slobodna kiselina)	0.5
Piridoksin hidroklorid (vitamin B6)	0.5
Tiamin hidroklorid (vitamin B1)	0.1
Kelator	
Na ₂ -EDTA	37.26

Za uzgoj uročnjaka starih 15 dana od stratifikacije i duhana *N. benthamiana* korištena je mješavina bijelog treseta i perlita (Agroperl®, Stauss-Perlite GmbH, St. Pölten, Austrija; Steckmedium KLASMANN, Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Njemačka).

3.1.5.4 Puferi za elektroforetsku i imunodetekcijsku analizu proteina

U izvođenju metode kopurifikacije proteina korišteni su puferi prikazani u **Tablica 13**.

Tablica 13. Sastav pufera za ekstrakciju i ispiranje proteina

Puferi za ekstrakciju	PBS-triton, pH 7.4	NTI-Tris, pH 7.4
	NaCl 140 mM	Tris 25 mM
	HCl 2,7 mM	NaCl 150 mM
	Na ₂ HPO ₄ 10 mM	β-merkaptetoetanol 1 mM
	KH ₂ PO ₄ 1.8 mM	0.1% Triton x-100
	0.1% Triton x-100	DNAza I 3 mg/L
	PMSF 1 mM	PMSF1 mM
Puferi za ispiranje	PBS, pH 7.4	NTI-Tris, pH 7.4
	NaCl 140 mM	Tris 25 mM
	HCl 2.7 mM	NaCl 150 mM
	Na ₂ HPO ₄ 10 mM	β-merkaptetoetanol 1 mM
	KH ₂ PO ₄ 1.8 mM	Imidazol 10 mM

Prije elektroforetskog razdvajanja proteinski uzorci su pomiješani s 2× Laemmlijevim puferom (**Tablica 14**) te denaturirani zagrijavanjem. Za razdvajanje denaturiranih proteina SDS-PAGE elektroforezom korišten je pufer 1× SDS-PAGE (**Tablica 15**). Proteini razdvojeni na poliakrilamidnom gelu pomoću vertikalnog sustava *Mini-PROTEAN® Tetra electrophoresis system* (Bio-Rad Laboratories, Inc., SAD) u puferu 1× SDS-PAGE vizualizirani su pomoću boje *Coomassie Brilliant Blue R-250* (**Tablica 16, Poglavlje 3.2.8.1.3, 3.2.8.1.4**).

Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na PVDF membranu proveden je elektrotransferom u puferu za prijenos pomoću sustava *Mini-PROTEAN® Tetra electrophoresis system* (Bio-Rad™ Laboratories, Inc., SAD (**Tablica 17, Poglavlje 3.2.8.1.5**)).

Za priređivanje imunodetekcijske otopine protutijela korištena je pufer PBS-T (**Tablica 18**).

Tablica 14. Sastav 2× Laemmlijeva pufera

Naziv pufera	Sastav	Koncentracija
2× Laemmlijev pufer	Tris-HCl (pH 6,8)	62.5 mM
	SDS	2%
	Glicerol	25%
	Bromfenol plavo	0.01%
	β-ME*	5%
*β-ME dodan neposredno prije korištenja		

Tablica 15. Sastav 10× SDS-PAGE pufera

Naziv pufera	Sastav	Koncentracija
10× SDS–PAGE	Tris	250 mM
	Glicin	1.92 M
	SDS	1%
pH 8.3		

Tablica 16. Otopina za bojanje proteina pomoću Coomassie Brilliant Blue R-250 i odbojavanje

Otopina	Sastav	Koncentracija
Otopina za bojanje	CBB R-250	0.1% (w/v)
	Metanol	45% (v/v)
	Octena kiselina	10% (v/v)
Otopina za odbojavanje	Metanol	30% (v/v)
	Octena kiselina	10% (v/v)

Tablica 17. Western blot: pufer za prijenos proteina

Naziv pufera	Sastav	Koncentracija
Pufer za prijenos proteina	Tris-HCl	3.39 g/L
	Glicin	14.4 g/L
	Metanol	20% (v/v)
pH 8.3		

Tablica 18. Sastav fosfatno puferirane fiziološke otopine 1× PBS-T

Naziv otopine	Sastav	Koncentracija
1× PBS	NaCl	137 mM
	KCl	2.7 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	1.8 mM
pH 7.3		
1× PBS-T	Tween-20	0.1% (v/v)

3.2 Metode

3.2.1 *In silico* predviđanje i filogenetska analiza efektor fitoplazme '*Ca. P. solani*'

Predviđanje potencijalnih efektorskih gena provedena je na prethodno sekvenciranim skicama genoma sojeva '*Ca. P. solani*' SA-1, STOL i ST19. Efektori fitoplazmi do sada su najbolje okarakterizirani za vrstu '*Ca. P. asteris*', stoga se identifikacija kandidata temeljila na homologiji s poznatim efektorima te vrste i na predviđanju izlučenih proteina. Za soj SA-1 podaci o predviđenim efektorima bili su dostupni iz prethodno objavljenog istraživanja (Seruga Music *i sur.*, 2019.), dok je u ovom radu ista metodologija primijenjena na skice genoma sojeva STOL i ST19 radi identifikacije i usporedbe efektor. Za predikciju signalnih peptida korišten je program SignalP v. 5.0 (Almagro Armenteros *i sur.*, 2019.), dok su transmembranske domene identificirane programom TMHMM v. 2.0 (Krogh *i sur.*, 2001.). Duljina signalnog peptida između 21 i 52 aminokiseline korištena je kao kriterij za identifikaciju potencijalno izlučenih proteina. Nadalje, svi kandidati bez transmembranskih domena ručno su pregledani kako bi se uklonili oni s drugim precizno anotiranim funkcijama (npr. ABC transporter). Višestruka poravnanja nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova provedena su programom ClustalX (Larkin *i sur.*, 2007.). Filogenetska stabla konstruirana su metodom maksimalne vjerojatnosti (*Maximum Likelihood*) u programu MEGA11 (Tamura *i sur.*, 2021.). Za odabrane PMU-povezane i efektorske gene analizirani su nukleotidni i aminokiselinski sljedovi homolognih gena dostupnih u javnim bazama podataka. Pouzdanost dobivenih filogenetskih stabala procijenjena je *bootstrap* analizom s 1000 ponavljanja.

Za odabrane potencijalne efektorske gene *SAP11-like* i *SAP54-like* (AB2N29_0110), dizajnirane su specifične početnice korištenjem softvera Geneious Prime 2024.0.7 (Biomatters Ltd., Auckland, Novi Zeland) radi provjere njihove prisutnosti i varijabilnosti nukleotidnih sljedova u sojevima '*Ca. P. solani*' ST19, STOL i SA-1, PCR produkti sekvencirani su u servisu (Azenta Life Sciences, Leipzig, Njemačka). Dobiveni sirovi nukleotidni sljedovi uređeni su i analizirani pomoću softvera Geneious Prime 2024.0.7. Nakon uređivanja, nukleotidni sljedovi su ručno poravnati te su provedene filogenetske analize prema prethodno opisanom postupku. Nukleotidni sljedovi početnica i uvjeti PCR reakcija za umnažanje efektorskih gena *SAP11-like* i *SAP54-like* iz genoma ST19, STOL i SA-1 prikazani su u **Prilog C.1.**

3.2.2 Konstrukcija rekombinantnih plazmida i kloniranje korištenjem sustava *In Fusion*®

3.2.2.1 Predviđanje i optimizacija kodona nukleotidnih sljedova

Priprema nukleotidnih sljedova za konstrukciju rekombinantnih plazmida i kloniranje obuhvaćala je *in silico* detekciju signalnih peptida pomoću alata SignalP v.3.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>; 29. srpanj 2022.) (Bendtsen *i sur.*, 2004.), optimizaciju nukleotidnih sljedova bez signalnih peptida pomoću alata „GenSmart™ Codon Optimization tool“ (<https://www.genscript.com/gensmart-free-gene-codon-optimization.html>; 29. srpanj 2022.), ovisno o eksperimentalnom sustavu u kojem su istraživane proteinske interakcije, te sintezu tako pripremljenih nukleotidnih sljedova u polazišnom plazmidnom vektoru pGEX-4T-1 u servisu (GenScript Biotech Netherlands B.V., Leiden, Nizozemska).

3.2.2.2 Umnažanje nukleotidnih sljedova metodom PCR

Nukleotidni sljedovi gena od interesa umnažani su metodom PCR iz polazišnih plazmidnih konstrukata pGEX-4T-1, pDESTGADT7 i pDONR207 (**Poglavlje 3.1.1, Prilog A**).

U svakoj reakciji umnažanja gena, ukupnog volumena 50 µL, korištena je smjesa *PrimeSTAR® Max Premix* (2×) (polimeraza *PrimeSTAR® Max DNA Polymerase*, 2 mM Mg²⁺ i 0.4 mM dNTP) (Clontech, Takara, Kusatsu, Japan), 0.5 µL razrijeđene DNA polazišnog plazmidnog konstrukta koncentracije 1 ng/µL i po 1.5 µL svake specifično dizajnirane početnice (fw/rv) za umnažanje gena, ovisno o odredišnom plazmidnom vektoru i ekspresijskom sustavu (**Tablica 19, Poglavlje 3.1.1.4, Prilog C.2**).

Sva PCR umnažanja odvijala su se prema jednakim uvjetima u tri koraka: denaturacija pri 98 °C tijekom 10 sekundi, vezivanje početnica pri 55 °C tijekom 5 sekundi i ekstenzija pri 72 °C tijekom 5 sekundi/kb, u 35 ciklusa.

Tablica 19. Sastav PCR reakcijske smjese za umnažanje gena iz polazišnih plazmidnih konstrukata*

Sastav	Jedinica		Volumen (µL)
<i>PrimeSTAR® Max Premix</i> (2×)	25 µL	1×	25
fw početnica	10-15 pmol	0.2-0.3 µM	1.5
rv početnica	10-15 pmol	0.2-0.3 µM	1.5
kalup (plazmidna DNA)	< 200 ng		0.5
H ₂ O	do 50 µL		

*Preuzeto i prilagođeno iz protokola proizvođača kompleta *In-Fusion® Snap Assembly Starter Bundle* ([In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual](#)).

U svrhu sinteze plazmidnih konstrukata za transformaciju biljaka uročnjaka metodom *floral dip*, PCR-om su umnoženi fitoplazmatski geni *SAP11-like* pomoću para početnica pGWB529-SAP11 fw/rv i *SAP54-like* pomoću pGWB529-SAP54 fw/rv (**Prilog C.2**). U oba slučaja nizvodna početnica imala je dodatnih 18 nukleotida koji kodiraju His₆-biljeg za označavanje rekombinantnog proteina efektora.

Za sintezu plazmidnih konstrukata korištenih za izvođenje metode BiFC u duhanu umnoženi su nukleotidni sljedovi koji su sadržavali START kodon, ali ne i STOP kodon, uključujući fitoplazmatske gene *SAP11-like*, *SAP54-like*, *ST6*, *ST9*; gene uročnjaka *AtTCP2*, *AtTCP4*, *AtAP1*, *AtSEP3* te gen *act3* kukca pomoću odgovarajućih početnica (**Prilog C.2**).

Za kotransformaciju kvasaca *S. cerevisiae* u sustavu Y2H, umnažanje gena *SAP11-like*, *SAP54-like*, *ST6*, *ST9*, *AtTCP2*, *AtTCP4*, *AtAP1*, *AtSEP3* i *act3* provedeno je metodom PCR pomoću odgovarajućih početnica (**Prilog C.2**).

U svrhu izvođenja afinitetne kopurifikacije i imunodetekcije proteina, nukleotidni sljedovi fitoplazmatskih gena *ST6(H)* i *ST9(H)* umnoženi su pomoću odgovarajućih početnica (**Prilog C.2**). Sadržavali su START kodon, ali ne i STOP kodon. Nukleotidni sljedovi *act3* kukca umnoženi su pomoću pGEX4T1-Aktin fw/rv kod kojeg je nizvodna početnica sadržavala STOP kodon (**Prilog C.2**).

Umnoženi geni analizirani su elektroforezom u agaroznom gelu (**Poglavlje 3.2.2.7**) te pročišćeni uporabom kompleta *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (MACHEREY-NAGEL Inc., Allentown, PA, SAD) (<https://www.mn-net.com/media/pdf/02/1a/74/Instruction-NucleoSpin-Gel-and-PCR-Clean-up.pdf>).

3.2.2.3 Priprema plazmidnih vektora

U laboratoriju su bili dostupni plazmidni konstrukti pGWB529-ami6bpm (ustupljeno od strane prof. dr. sc. Bauer, neobjavljeno), pSPYNE-BPM1 i pSPYCE-BPM1 (Rendulić, 2018.), pGBT9 i pGAD424 (Clontech Laboratories, Inc. Takara Bio), pGEX-4T-1- TaMAB2 i pET28a-RDM1 (Jagić *i sur.*, 2022.) održavani u prethodno transformiranim stanicama *E. coli*. Navedeni plazmidni konstrukti pripremljeni su kao polazišni plazmidni kalupi za konstrukciju rekombinantnih proteina korištenih u ovom radu.

Priprema je obuhvaćala uzgoj prekonoćnih kultura bakterija *E. coli* koje su nosile navedene plazmide u 3 mL tekućeg medija LB s dodatkom odgovarajućeg antibiotika (**Prilog E**), pročišćavanje plazmidne DNA korištenjem komercijalnog kompleta *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega, Madison, SAD) prema uputama proizvođača

(**Poglavlje 3.2.2.8**) te uklanjanje postojećih DNA inserata i linearizaciju plazmidnog vektora enzimskom digestijom za daljnja kloniranja.

Plazmidi su linearizirani pomoću odgovarajućih restrikcijskih enzima (*FastDigest*, Thermo Scientific™ Vilnius, Litva) (**Tablica 20**). Ukupni volumen reakcijske smjese za linearizaciju svakog plazmidnog vektora (**Tablica 20**) iznosio je 20 µL, a sadržavao je 1 µg plazmidne DNA, 2 µL pufera 10× *FastDigest Green Buffer* (Thermo Scientific™ Vilnius, Litva), po 1 µL odgovarajućeg enzima i vodu bez nukleaza. Uvjeti enzimske digestije i inaktivacije enzima provedeni su prema uputama proizvođača ([FastDigest restriction enzymes](#)) (**Tablica 20**).

Tablica 20. Restrikcijski enzimi i uvjeti restrikcijske digestije i inaktivacije korišteni za linearizaciju plazmidnih vektora

Plazmidni konstrukt	Uklonjeni insert	Restrikcijski enzimi	Trajanje restrikcijske digestije/ temperatura	Trajanje inaktivacije enzima/ temperatura
pGWB529-ami6bpm	<i>ami6bpm</i>	XbaI, SacI	15 min/ 37 °C	10 min/ 80 °C
pSPYNE-BPM1	<i>BPM1</i>	BamHI		
pSPYCE-BPM1	<i>BPM1</i>	BamHI		
pGAD424	/	EcoRI, SalI		
pGBT9	/	EcoRI, SalI		
pGEX-4T-1-TaMAB2	<i>TaMAB2</i>	BamHI		
pET28a-RDM1	<i>RDM1</i>	EcoRI, XhoI		

Nakon inkubacije, uspješnost linearizacije plazmida provjerena je elektroforezom u 0.8% agaroznom gelu u puferu 0.5× TBE (*Invitrogen*™ TBE (10x), RNase-free, Thermo Scientific™ Vilnius, Litva). Uzorci su propušteni kroz gel prvih nekoliko min na 25 V, zatim oko 45 min na 50 V pomoću uređaja Bio-Rad™, PowerPac 300 (Bio-Rad Laboratories, Inc, SAD).

Agarozni gel s uzorkom linearizirane plazmidne DNA inkubiran je 2-3 min u otopini etidijevog bromida (EtBr) te je uzorak vizualiziran pomoću UV osvjetljenja, izrezan skalpelom i pročišćen korištenjem komercijalnog kompleta *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (MACHEREY-NAGEL Inc., Allentown, PA, SAD) (<https://www.mn-net.com/media/pdf/02/1a/74/Instruction-NucleoSpin-Gel-and-PCR-Clean-up.pdf>).

3.2.2.4 *In Fusion*® kloniranje genskih inserata u plazmidne vektore

Genski inserti koji kodiraju proteine, čije su interakcije istraživane u radu, umetnuti su u prethodno linearizirane plazmidne vektore korištenjem komercijalno dostupnog kompleta *In-*

Fusion® tehnologije kloniranja (Clontech, Takara, San Jose, CA, SAD) prema protokolu proizvođača ([In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual](#)).

Količine gena inserta i linearizirane plazmidne DNA po reakciji kloniranja određene su pomoću kalkulatora molarnih odnosa predloženog protokolom ([In-Fusion® molar ratio calculator](#), 20. veljače 2023.) (**Prilog B**). Za 10 µL volumena reakcije smjese *In-Fusion*® kloniranja optimalni molarni odnos inserta i plazmida bio je 2:1, a ukupna količina DNA (insert i plazmid) iznosila je 200 ng za reakcije u kojima je linearizirani plazmid veći od 10 kb. U reakcijama u kojima je linearizirani plazmid bio dug 0.5-10 kb, ukupna količina DNA iznosila je 100 ng. Reakcija kloniranja odvijala se 15 min pri temperaturi 50 °C (**Tablica 21**).

Tablica 21. Sastav smjese reakcije *In-Fusion*® kloniranja

Sastav	Količina
5× <i>In-Fusion HD Enzyme Premix</i>	2 µL
Linearizirani plazmid	x µL*
Pročišćeni PCR fragment	x µL*
dH ₂ O (destilirana voda)	prema potrebi
Ukupni volumen	10 µL

*Određeno za svaku reakciju pomoću alata [In-Fusion® molar ratio calculator](#); 25. ožujak 2023.

Preuzeto i prilagođeno iz protokola [In-Fusion® HD Cloning Kit](#).

Za vizualizaciju i izradu mapa rekombinantnih plazmidnih konstrukata korišten je program [SnapGene® Viewer v6.0.2](#) (18. ožujak 2023.) (GSL Biotech LLC, San Diego, CA, SAD). Program je korišten za prikaz organizacije vektora, položaja umetnutih genskih inserata te relevantnih regulatornih i selekcijskih elemenata plazmida (**Prilog D**).

3.2.2.5 Transformacija kemijski kompetentnih bakterija *Escherichia coli*

Reakcije transformacija bakterijskog soja HTS08 *E. coli* (Stellar™ Competent Cells, Takara Bio Europe S.A.S, Saint-Germain-en-Laye, Francuska) plazmidnim konstruktima koji su nosili gen od interesa, priređivale su se u ohlađenim sterilnim Falcon™ epruvetama okruglog dna i volumena 14 mL, na ledu. Volumenu od 50 µL bakterijskih stanica dodano je 2.5 µL plazmidnog konstrukta te vrlo lagano i kratko promiješano vrhom nastavka pipete nakon čega je smjesa 30 min inkubirana na ledu. Za negativnu kontrolu transformacije korišten je odgovarajući plazmid bez inserta. Epruvete s transformacijskim smjesama su 45 sekundi uronjene u vodenu kupelj na 42 °C te su nakon toplinskog šoka 1-2 min ohlađene na ledu. U svaku transformacijsku smjesu dodano je 500 µL hranjivog medija SOC za oporavak bakterija, priloženog u kompletu, prethodno zagrijanog na 37 °C. Transformirane bakterije su inkubirane

jedan sat na temperaturi 37 °C , uz trešnju 200 rpm te potom nasađene na kruti medij LB s dodatkom odgovarajućih antibiotika (**Prilog E**). Volumeni svake transformacijske smjese podijeljeni su na dvije ploče krutog medija LB, tako da je na jednu ploču nasađeno 50 µL, a na drugu ostatak volumena smjese. Ploče su inkubirane na 37 °C preko noći. Uspješnosti transformacija provjerene su PCR analizom kolonija (**Poglavlje 3.2.2.6**).

3.2.2.6 PCR analiza kolonija

Za provjeru uspješnosti transformacije bakterija željenim plazmidnim konstruktom, napravljene su PCR analize kolonija (engl. *colony PCR*) transformiranih bakterija *E. coli* (sojevi HST08 Stellar™, varijanta BL21 Rosetta™ (DE3)). Odabrane su pojedinačne kolonije bakterija naraslih na Petrijevim pločama s krutim medijem LB i uzgajane u po 3 mL tekućeg medija LB uz dodatak odgovarajućih antibiotika (**Prilog E**), na temperaturi 37 °C, uz trešnju 250 rpm, preko noći.

Kod analize uspješnosti transformacije kolonija *A. tumefaciens*, iz Petrijevih ploča s krutim medijem LB odabrane su pojedinačne kolonije i uzgajane u po 5 mL tekućeg medija LB uz dodatak odgovarajućih antibiotika (**Prilog E**), na temperaturi 28 °C, uz trešnju 250 rpm, preko noći.

Postupak provjere bakterijskih kultura proveden je jednako za sve bakterijske sojeve. Po 200 µL provjeravane suspenzije prekonoćnih kultura transformiranih bakterija, prebačeno je u epruvete volumena 1.5 mL (*Eppendorf® Safe-Lock*, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka), te centrifugirano jednu minutu na 14 000 okretaja. Supernatant je uklonjen, a stanice su u resuspendirane u 200 µL dH₂O i denaturirane 5 min na 95 °C.

U reakcijskoj smjesi za PCR analizu kolonija korištena je smjesa *EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix* (Takara Bio, Inc., San Jose, CA, SAD) uz dodatak odgovarajućih početnica ovisno o kalupu (**Prilog C.2**), pri PCR uvjetima: početna denaturacija 98 °C tijekom 3 min, potom 40 ciklusa koji su uključivali denaturaciju na 98 °C tijekom 10 sekundi, vezivanje početnica pri 58 °C tijekom 30 s, ekstenziju pri 72 °C u trajanju od 1 min/kb. Reakcija završne ekstenzije odvijala se pri 72 °C, 7 min. Umnoženi fragmenti DNA su analizirani elektroforezom u agaroznom gelu (**Poglavlje 3.2.2.7**) te su po elektroforetskoj provjeri odabrane prekonoćne kulture iz tekućeg medija LB za daljnje pročišćavanje plazmidne DNA kompletom *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega, Madison, SAD) (**Poglavlje 3.2.2.7**) i provjeru sekvenciranjem u servisu (Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska) korištenjem univerzalnih početnica za provjeru gena inserata (**Prilog C.3**).

3.2.2.7 Elektroforeza u agaroznom gelu

Fragменти DNA su analizirani horizontalnom elektroforezom u agaroznom gelu. Gustoća agaroznog gela (0.8-1%) ovisila je o veličini analiziranih fragmenata DNA (**Prilog B**), a gel je pripravljen otapanjem agaroze (*UltraPure™ Agarose*, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, SAD) u puferu 0.5× TBE (*Invitrogen™ TBE (10x)*, RNase-free, Thermo Scientific™ Vilnius, Litva) uz dodatak DNA vežuće boje (*Invitrogen™ SYBR™ Safe DNA Gel Stain*, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, SAD) u mikrovalnoj pećnici. Prije nanošenja u jažice, uzorci su pomiješani s 1 µL pufera za nanošenje uzorka *Thermo Scientific™ DNA Gel Loading Dye (6X)* (Thermo Scientific™, Waltham, SAD). Razdvajanje fragmenata DNA odvijalo se na 120 V, oko 45 min pomoću uređaja Bio-Rad™, PowerPac 300 (Bio-Rad Laboratories, Inc, SAD).

Prisutnost i veličina fragmenata DNA (**Prilog B**) analizirani su prema standardu za određivanje molekularne mase DNA, *1 kb DNA Ladder GeneRuler™* (Thermo Scientific™, Waltham, SAD), *1 kb Plus DNA Ladder for Safe Stains* (New England Biolabs, Ipswich, SAD) ili *ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9* (Thermo Scientific™ Vilnius, Litva), nakon snimanja CCD kamere integrirane u uređaju *Amersham ImageQuant™ 800 Western blot imaging systems* (© Cytiva, Marlborough, SAD).

3.2.2.8 Izolacija plazmidne DNA

Izolacija plazmidne DNA izvedena je iz 3 mL prekonoćnih kultura transformiranih *E. coli* uzgajanih u tekućem mediju LB. Prisutnost i veličina gena prethodno je provjerena elektroforetskom analizom. Izolacija plazmidne DNA izvedena je pomoću kompleta *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega, Madison, SAD) prema uputama proizvođača. Protokol je modificiran u koraku elucije gdje je 100 µL vode bez nukleaza prije nanošenja na kolonu zagrijano na 37 °C, potom nanoseno na kolonu te je kolona inkubirana jednu minutu na sobnoj temperaturi, nakon čega je centrifugirana 2 min na 14 000 rpm.

Uzorcima eluirane pročišćene plazmidne DNA vektorskih konstrukata izmjerena je koncentracija pomoću spektrofotometra *NanoDrop™ 2000/2000c* (Thermo Fischer Scientific™, Waltham, MA, SAD) te su sekvencirani pomoću univerzalnih početnica (**Prilog C.3**) u servisu (MacroGen Europe, Amsterdam, Nizozemska), kako bi se potvrdila uspješnost kloniranja i točnost nukleotidnih sljedova plazmidnih konstrukata za provođenje transformacije uročnjaka, metode BiFC, transformacije kvasaca za sustav Y2H, afinitetne kopurifikacije i imunodetekcije rekombinantnih proteina.

3.2.2.9 Pohrana i reaktivacija transformiranih mikroorganizama

Nakon provjere plazmidnih konstrukta sekvenciranjem, transformirani sojevi bakterija i kvasca pohranjeni su u 20% (v/v) glicerol i komercijalno dostupan sustav *Microbank*TM (Pro-Lab Diagnostics, Ontario, Canada), koji također omogućuje dugotrajnu krioprezervaciju mikroorganizama pri temperaturi -80 °C.

Kriovial s krio-zaštitnim kuglicama inokuliran je svježom mikrobnom kulturom (18 do 24 h rasta), a stanice su resuspendirane u priloženom mediju. Nakon kratke inkubacije, višak supernatanta je uklonjen, a krioviali su pohranjeni na -80 °C.

Za reaktivaciju pojedina kuglica iz sustava *Microbank*TM, aseptički je prenesena na odgovarajući kruti medij, a stanice su uzgajane u uvjetima ovisno o soju mikroorganizma i rezistenciji koju nosi plazmidni konstrukt kojim su stanice transformirane.

3.2.3 Transformacija elektrokompetentnih bakterija *Agrobacterium tumefaciens*

Elektrokompetentne agrobakterije *A. tumefaciens*, soja GV3101 (pMP90) postepeno su odmrznute na ledu, nakon čega im je dodano 100-200 ng plazmidne DNA određenih vektorskih konstrukata te su napravljene suspenzije za svaki plazmidni konstrukt. Suspenzije stanica i plazmidnih DNA prebačene su u prethodno rashlađene kivete. Kivete su pojedinačno umetnute u elektroporator (*MicroPulser*TM electroporator, Bio-Rad Laboratories, Inc., SAD) te je svaki plazmidni konstrukt elektroporiran u stanice agrobakterija djelovanjem električnog impulsa jakosti 2.1-2.3 kV, u trajanju 5 ms. Neposredno nakon elektroporacije u svaku suspenziju, svake kivete dodan je medij SOC predgrijan na 37 °C (**Tablica 7**) kako bi se transformirane stanice agrobakterija oporavile, a zatim su suspenzije prebačene u posebne epruvete 1.5 mL i inkubirane 2 sata na temperaturi 28 °C, pri trešnji 350 rpm. Nakon inkubacije, iz svake suspenzije transformiranih agrobakterija prenesen je volumen od 50 µL te je sterilnim drigalskim L-štapićem ravnomjerno razmazan po pločama s krutim medijem LB za svaki uzorak. medij LB je za sve uzorke sadržavao antibiotike gentamicin (50 ng/mL) i rifampicin (50 ng/mL) za rast agrobakterija, a ovisno o tome kojim se plazmidnim konstruktom transformirane agrobakterije, dodani su i antibiotici kanamicin (50 ng/mL) ili spektinomycin (100 ng/mL) (**Prilog E**). Postupak nasađivanja transformiranih agrobakterija na ploče je ponovljen i s preostalim volumenima suspenzija, za svaki uzorak. Inkubacija transformiranih agrobakterija je trajala 48 sati na 28 °C.

3.2.4 Uzgoj i uvjeti rasta biljnog materijala

3.2.4.1 Priprema supstrata za uzgoj biljnog materijala

Za uzgoj biljnog materijala korištena je sterilizirana mješavina bijelog treseta i perlita (Steckmedium KLASMANN, Klamann-Deilmann GmbH, Geeste, Njemačka). Sterilizacija supstrata odvijala se pri temperaturi 70 °C , 45 min, a po hlađenju, u litru supstrata dodano je 0.01 g/L insekticida FORCE® (Syngenta, Basel, Švicarska).

3.2.4.2 Uzgoj uročnjaka

Sjeme divljeg tipa uročnjaka (*A. thaliana* (L.) Heynh.) ekotipa Col-0 površinski je sterilizirano u 70% etanolu tijekom 1 min, a zatim u 1% otopini Izosan G (100% natrijev dikloroizocijanurat dihidrat, Pliva, Zagreb, Hrvatska) i 0.1% Mucasol™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) tijekom 10 min. Isprano je 5 puta sterilnom destiliranom vodom i posijano na medij MS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, SAD) za rast biljaka (Murashige i Skoog, 1962.). Petrijeve ploče sa sjemenom stratificirane su tijekom 72 sata na 4 °C, a zatim inkubirane u ciklusima 16h svjetlo/8h tama (intenzitet svjetla 150 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$) na 24 °C. Nakon 15 dana, klijanci su presađeni u prethodno priređeni supstrat mješavine bijelog treseta i perlita i uzgajani u uvjetima dugog dana s ciklusom 16h svjetlo/8h tama (intenzitet svjetla 70 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$) ostvarenim pomoću osvjetljenja s dvije fluorescentne cijevi, PHILIPS TL-D Super80 830 (toplo bijelo) i 865 (hladno bijelo). U navedenim uvjetima uzgajane su i transgenične biljke uročnjaka s ciljem istraživanja ekspresije efektoru SAP11-like i SAP54-like.

Za istraživanje ekspresije fenotipa transgena SAP11-like i SAP54-like u uvjetima kratkog dana s ciklusom 8h svjetlo/16h tama (intenzitet svjetla 70 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$) pri relativnoj vlažnosti od 50% na 21 °C (Mittelberger i sur., 2022.), korištena je komora za uzgoj biljaka RK-500 CH (Kambič d.o.o., Semič, Slovenija) s fluorescentnim cijevima OSRAM L-36W/TT Fluora.

3.2.4.3 Uzgoj duhana

Sjeme duhana divljeg tipa *N. benthamiana* L. direktno je posijano u mješavinu bijelog treseta i perlita (**Poglavlje 3.2.4.1**) te stratificirano na 4 °C tijekom 72 sata. Klijanci duhana su uzgajani pri temperaturi 24 °C, u uvjetima dugog dana s ciklusom 16h svjetlo/8h tama (intenzitet svjetla 70 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$) ostvarenim pomoću osvjetljenja s dvije fluorescentne cijevi, PHILIPS TL-D Super80 830 (toplo bijelo) i 865 (hladno bijelo), uz 50% relativne vlažnosti zraka. U navedenim uvjetima uzgajane su i biljke duhana agroinfiltriranih listova.

3.2.5 Transformacija uročnjaka metodom *floral dip*

3.2.5.1 Priprema transformacijske otopine za izvođenje metode *floral dip*

Neposredno nakon transformacije, smjese agrobakterija transformiranih binarnim plazmidnim konstruktima pGWB529:SAP11-*like* i pGWB529:SAP54-*like* nasađene su na kruti medij LB uz dodatak antibiotika (**Prilog E**) i inkubirane 48 sati na 28 °C, nakon čega su odabrane kolonije i uzgajane u po 5 mL tekućeg mediju LB preko noći uz dodatak antibiotika (**Prilog E**). Iz prekonoćnih kultura uzgajanih u tekućem mediju LB, izdvojeno je 3 mL te je provjerena uspješnost transformacije PCR analizom (**Poglavlje 3.2.2.6**), nakon koje je 2 mL provjerenih prekonoćnih kultura preneseno u 200 mL autoklaviranog tekućeg medija LB, uz dodatak odgovarajućih antibiotika (**Prilog E**) te uzgajano preko noći na temperaturi 28 °C i trešnju 250 rpm. Prije centrifugiranja prekonoćnih kultura, ponovljena je PCR analiza. Talog transformiranih agrobakterija sakupljen je centrifugiranjem u centrifugi *DuPont Sorvall RC-5B* (Sorvall Instruments, Thermo Fisher Scientific) 15 min na 5000 rpm, a potom resuspendiran u 200 mL otopine 5% saharoze i 0.03% ili 0.003% surfaktanta *Silwet L-77* (OSi Specialties, Inc., Danbury, CT, SAD), čime su priređene otopine SAP11-*like* ili SAP54-*like* korištene za transformaciju uročnjaka metodom *floral dip* (Clough i Bent, 1998.).

3.2.5.2 Transformacija uročnjaka metodom *floral dip*

Cvjetne stapke biljaka divljeg tipa uročnjaka starosti 4-6 tjedana, s razvijenim pupovima, potpuno su uranjane u transformacijsku otopinu SAP11-like ili SAP54-like, ovisno o resuspendiranoj agrobakterijskoj kulturi, u trajanju od 30 sekundi do 2 min. Za svaki efektor tretirano je po 8 biljaka u odgovarajućoj transformacijskoj suspenziji agrobakterija. Inokulirane biljke položene su vodoravno na pladnjeve, a pupovi uz rozetu uročnjaka dodatno su tretirani s nekoliko mikrolitara suspenzije u koju su biljke prethodno bile uronjene. Nakon što su biljke izložene transformacijskoj suspenziji, polegnute su i pohranjene u plastične vrećice za očuvanje vlage i inkubirane 24 sata u mraku (Clough i Bent, 1998.) (Slika 9).



Slika 9. *Floral dip*: transformacija uročnjaka metodom uranjanja cvjetnih stapki. A) uronjene cvjetne stapke uročnjaka u transformacijsku suspenziju koja je sadržavala agrobakterije transformirane plazmidnim konstruktom pGWB529:SAP54-like; B) biljke uročnjaka inokulirane agrobakterijama transformiranim s plazmidnim konstruktom pGWB529:SAP11-like i pripremljene za 24-satnu inkubaciju u mraku, polegnute u plastičnim vrećicama.

Po inkubaciji, biljke su uspravljene te bez vrećica uzgajane u komori, u uvjetima dugog dana (Poglavlje 3.2.4.2). U istim uvjetima uzgajane su i netretirane kontrolne biljke, divljeg tipa. Postupak transformacije metodom *floral dip* ponovljen je nakon jednog tjedna, a biljke su uzgajane u uvjetima dugog dana do razvoja komuški i postupnog venuća jedinki, nakon čega je sakupljano sjeme.

3.2.5.3 Uzgoj i selekcija transformiranih uročnjaka

Sjeme prve generacije (T1) svih transgeničnih biljaka te divljeg tipa sterilizirano je (**Poglavlje 3.2.4.2**) i po ~4 g sjemena nasađeno na ploče sa krutim selekcijskim medijem MS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, SAD) uz dodatak saharoze 20 g/L i 30 mg/L antibiotika higromicina B, za selekciju sjemena s integriranim genom od interesa u genomu uročnjaka. Deset Petrijevih ploča sa sjemenom SAP11-*like* transgeničnih uročnjaka, deset Petrijevih ploča sa sjemenom SAP54-*like* transgeničnih uročnjaka te dvije ploče divljeg tipa stratificirane su tijekom 72 h na 4 °C, a zatim inkubirane u ciklusima 16h svjetlo/8h tama (intenzitet svjetla 150 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$) na 24 °C. Nakon toga je po 12 higromicin B rezistentnih biljaka presađeno u sterilizirani supstrat (**Poglavlje 3.2.4.1**) i uzgajano u ciklusima dugog dana 16h svjetlo/8h tama (intenzitet svjetla 70 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$) pri relativnoj vlažnosti od 50% na 21 °C (Mittelberger *i sur.*, 2022.) (**Poglavlje 3.2.4.2**).

Nakon samooplodnje transgeničnih uročnjaka generacije T1, prikupljeno je sjeme deset biljaka uročnjaka za transgen SAP11-*like* i sjeme 9 biljaka transgena SAP54-*like* generacije T2 i sterilizirano (**Poglavlje 3.2.4.2**). U svrhu analize segregacije u T2 generaciji ~100 sjemenki po svakoj T2 liniji je nasađeno na ploče s krutim selekcijskim medijem MS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, SAD) uz dodatak saharoze 20 g/L i 30 mg/L i antibiotika higromicin B, nakon čega su ploče stratificirane tijekom 72 sata na 4 °C, a zatim inkubirane u ciklusima 16h svjetlo/8h tama (intenzitet svjetla 150 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$) na 24 °C. (**Poglavlje 3.2.4.2**). Na temelju Mendelovog omjera 3:1 između rezistentnih i osjetljivih klijanaca na antibiotik higromicin B u podlozi, odabrane su linije koje su rezistentne odnosno one koje su sadržavale samo jednu inserciju transgena. Za daljnji uzgoj generacije T3 transgeničnih potomka uročnjaka, sakupljeno je sjeme biljaka T2 generacije kod kojih je pokazana karakteristična segregacija za jednu inserciju gena, u svrhu dobivanja homozigotnih jedinki transgeničnih uročnjaka.

Sjeme T3 generacije je sterilizirano (**Poglavlje 3.2.4.2**) i nasađeno na ploče s krutim selekcijskim medijem MS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, SAD) uz dodatak saharoze 20 g/L i 30 mg/L antibiotika higromicin B, nakon čega su ploče stratificirane tijekom 72 sata na 4 °C, a zatim inkubirane u ciklusima 16h svjetlo/8h tama (intenzitet svjetla 150 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$) na 24 °C. Nakon 2 tjedna, po 8 homozigotnih klijanaca iz svake linije presađeno je u supstrat (**Poglavlje 3.2.4.1**) i uzgajano u uvjetima dugog dana s ciklusom 16h svjetlo/8h tama (**Poglavlje 3.2.4.2**). Za istraživanje ekspresije fenotipa transgena SAP11-*like* i SAP54-*like* u uvjetima kratkog dana klijanci uročnjaka presađeni u zemlju su uzgajani u ciklusu 8h svjetlo/16h tama (**Poglavlje 3.2.4.2**). Tkivo uzgojenih transformiranih biljaka pohranjeno je na -80 °C u svrhu izolacije nukleinskih kiselina i proteina.

3.2.5.4 Fenotipska analiza transgeničnih biljaka uročnjaka s prekomjernom ekspresijom gena *SAP11-like* i *SAP54-like*

Fenotipske promijene transgeničnih uročnjaka uslijed prekomjerne ekspresije *SAP11-like* i *SAP54-like* gena kao i fenotip uročnjaka divljeg tipa fotodokumentirani su kroz razvojne faze linija generacija T1, T2 i T3, s posebnim naglaskom na fotodokumentaciju nasumično odabranih homozigotnih jedinki linija *SAP11-like* 2b, *SAP11-like* 3b, *SAP54-like* B2P4, *SAP54-like* B4P2, T3 generacije uzgojenih na podlozi MS s dodatkom saharoze 20 g/L bez dodatka antibiotika higromicina B.

Za fotodokumentacijske potrebe ovog istraživanja korišten je *iPhone® 15 Pro* (Apple Inc., Cupertino, SAD), čije specifikacije primarne kamere uključuju sljedeće: 48 MP, senzor od 1/1.28", piksel veličine 1.22 μm , otvor blende f/1.78, optička stabilizacija slike (OIS). Također, korištena je i kamera *Zeiss AxioCam ERc 5s* povezana s mikroskopom *Zeiss Stemi 2000-C Stereo Microscope*.

Parametri rasta uročnjaka dviju neovisnih linija koje prekomjerno ekspimiraju gen *SAP11-like* (linije *SAP11-like* 2b i *SAP11-like* 3b) i uročnjaka dviju neovisnih linija koje prekomjerno ekspimiraju gen *SAP54-like* (linije *SAP54-like* B2P4 i *SAP54-like* B4P2), T3 generacije, 45 dana od stratifikacije (n=30 po liniji), analizirani su i uspoređeni s divljim tipom. Biljkama uzgajanim u uvjetima dugog dana, mjerene su masa (mg) svježeg nadzemnog dijela uročnjaka vaganjem pomoću precizne vage (*Sartorius Excellance E1200S*, Sartorius AG, Göttingen, Njemačka), visina (cm), promjer rozete (cm), duljina i širina (cm) triju najvećih listova rozete i duljine komuški (mm) pomoću mjerne skale u milimetrima, te je utvrđen broj aksilarnih izbojaka u jedinkama. Za svaku navedenu liniju i divlji tip, uzorkovano je po 5 komuški sa svake od 6 nasumično odabranih biljaka uročnjaka, približno 5 cm od vrha cvijeta. Opisan je fenotip i izmjerena je duljina ukupno 30 komuški po liniji T3 generacije. Dodatno je analiziran izgled korijena klijanaca starih 15 dana od stratifikacije.

U istim linijama (*SAP11-like* 2b, *SAP11-like* 3b, *SAP54-like* B2P4, *SAP54-like* B4P2, divlji tip), T3 generacije, uročnjaka starih 45 dana od stratifikacije (n = 30 po liniji), ali uzgajanim u uvjetima kratkog dana mjereni su parametri: masa (mg) svježeg nadzemnog dijela uročnjaka vaganjem pomoću precizne vage (*Sartorius Excellance E1200S*, Sartorius AG, Göttingen, Njemačka), promjer rozete (cm) te duljina i širina (cm) triju najvećih listova rozete pomoću mjerne skale u milimetrima. Statistička analiza rezultata mjerenja provedena je primjenom Studentovog t-testa programom Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, SAD), pri čemu su razlike između divljeg tipa i transformiranih biljaka uročnjaka smatrane statistički značajnima za $p < 0.05$ i $p < 0.0001$.

3.2.5.5 Izolacija nukleinskih kiselina i proteina iz uročnjaka

3.2.5.5.1 Izolacija DNA i potvrda prisutnosti T-DNA iz klijanaca uročnjaka

Ukupna DNA iz tkiva *SAP11-like* i *SAP54-like* klijanaca T3 generacije starih 10 dana te iz biljaka istih linija starih 4 tjedna i divljeg tipa uročnjaka izolirana je korištenjem kompleta *OmniPrep™ for Plant* (G-Bioscience®, St. Louis, MO, SAD) prema uputama proizvođača. Za ekstrakciju je korišteno ~80 mg biljnog tkiva po uzorku, homogeniziranog u tekućem dušiku. Koncentracija i čistoća uzoraka DNA izmjerene su spektrofotometrom *NanoDrop™ 2000/2000c* (Thermo Fischer Scientific™, Waltham, MA, SAD).

Za potvrdu prisutnosti T-DNA iz klijanaca uročnjaka, kao kalup korišteno je 2 µL razrijeđene izolirane DNA (~50 ng), a umnažanja *SAP11-like* i *SAP54-like* gena izvedena su primjenom specifičnih početnica pGWB529-SAP11 fw/rv i pGWB529-SAP54 fw/rv (**Prilog C.2**) uz *EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix* (Takara Bio, Inc., San Jose, CA, SAD) prema PCR uvjetima: početna denaturacija pri 98 °C tijekom 3 min, slijedi 40 ciklusa denaturacije pri 98 °C tijekom 30 sekundi, prijanjanje početnica pri 58 °C tijekom 30 sekundi, ekstenzija pri 72 °C tijekom 1 min/kb i završni korak ekstenzije pri 72 °C tijekom 7 min. Umnoženi fragmenti analizirani su gel elektroforezom u agaroznom 1.5% gelu uz korištenje pufera 0.5× TBE (Tris-borat-EDTA) kao što je već opisano (**Poglavlje 3.2.2.7**) te su nukleotidni sljedovi provjereni sekvenciranjem u servisu (Macrogen Europe BV, Amsterdam, Nizozemska).

3.2.5.5.2 Izolacija RNA iz klijanaca uročnjaka.

Homogenizirano je po 30 mg tkiva izbojaka deset dana starih klijanaca linija *SAP11-like*, *SAP54-like* i divljeg tipa, T3 generacije. Iz homogenata uzoraka izolirana je RNA pomoću kompleta *RNeasy® Plant Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Njemačka), prema protokolu proizvođača. Pročišćavanje izolirane RNA izvedeno je pomoću kompleta *GenElute™ Total RNA Purification Kit* (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka), uz naknadnu obradu DNazom I, prema uputama proizvođača. Koncentracija i čistoća uzoraka RNA izmjerene su spektrofotometrom *NanoDrop™ 2000/2000c* (Thermo Fischer Scientific™, Waltham, MA, SAD).

3.2.5.5.3 Sinteza komplementarne DNA

Za reverznu transkripciju (RT), korišteno je po 500 ng RNA prethodno izolirane iz uzoraka transformanata *SAP11-like* i *SAP54-like* uz dodatak 100 pmol *Oligo(dt)18 Primer* i 0.5 mM dNTP smjese (Thermo Scientific™, Waltham, MA, SAD) te vode bez nukleaza do volumena

14.5 µL. Suspenzija je inkubirana 5 min na temperaturi 65 °C, nakon čega je ohlađena na ledu te je suspenziji dodano 4 µL pufera 5× RT, 20 U *Thermo Scientific™ RiboLock™ RNase Inhibitor*-a i 200 U *Maxima H Minus Reverse Transcriptase*, u konačnom volumenu od 20 µL. Inkubacija 30 min na 50 °C je prekinuta zagrijavanjem smjese 5 min na 85 °C.

Uspješnost sinteze cDNA za oba istraživana efektorska nukleotidna slijeda *SAP11-like* i *SAP54-like*, provjerena je standardnom PCR reakcijom u ukupnom volumenu reakcijske smjese 25 µL, korištenjem *EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix* (Takara Bio, Inc., San Jose, CA, SAD) te specifično dizajniranih početnica pGWB529-*SAP11-like* fw/rv i pGWB529-*SAP54-like* fw/rv (**Prilog C.2**), pri uvjetima početne denaturacije 98 °C tijekom 3 min, 35 ciklusa denaturacije pri 98 °C tijekom 30 sekundi, vezivanja početnica pri 58 °C tijekom 30 sekundi, ekstenzije pri 72 °C tijekom 1 min/kb i završne ekstenzije pri 72 °C tijekom 7 min. Umnoženi fragmenti analizirani su gel elektroforezom u agaroznom 1.5% gelu uz korištenje pufera 0.5× TBE (**Poglavlje 3.2.2.7**).

Kako bi se razlikovala komplementarna DNA (cDNA) od potencijalne rezidualne genomske DNA (gDNA), korištene su ACT3_fw/rv početnice (**Prilog C.4**) zajedno s *EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix* (Takara Bio, Inc., San Jose, CA, SAD) u standardnom PCR-u pri uvjetima početne denaturacije 98 °C tijekom 3 min, 35 ciklusa denaturacije pri 98 °C tijekom 30 sekundi, vezivanje početnica pri 58 °C tijekom 30 sekundi, ekstenzija pri 72 °C tijekom 1 min/kb i završni korak ekstenzije pri 72 °C tijekom 7 min. Upotreba ACT3 para početnica omogućila je amplifikaciju ACT3 gena u svrhu razlikovanja cDNA (amplikon od 638 bp) od gDNA (amplikon od 732 bp). Umnoženi fragmenti analizirani su elektroforezom u 1.5% agaroznom gelu uz pufera 0.5× TBE (*Invitrogen™ TBE (10x)*, *RNase-free*, *Thermo Scientific™ Vilnius*, Litva).

3.2.5.5.4 Određivanje razine ekspresije transgena metodom RT-qPCR

Za određivanje razine ekspresije transgena u biljkama uročnjaka metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu nakon reverzne transkripcije (RT-qPCR), 1 µL cDNA koncentracije 10 ng/µL pomiješan je s *Go-Taq qPCR Master Mix* (Promega, Madison, WI, SAD) i specifično dizajniranim početnicama, ovisno o smjesi (**Prilog C.5**). Provedena su dva neovisna RT-qPCR mjerenja. Za normalizaciju ekspresije gena *SAP11-like* i *SAP54-like* korištena su dva različita referentna gena, *ogio* i *act2*. Svaki referentni gen korišten je u zasebnom mjerenju. U prvom RT-qPCR mjerenju razine ekspresije transgena u biljkama uročnjaka kao referentni gen za normalizaciju ekspresije korišten je gen *ogio* (pristupni broj: AT5G51880) (Škiljaica i sur., 2022.), umnožen pomoću para početnica *ogioF* i *ogioR* (**Prilog**

C.5). Analiza je provedena u dva tehnička ponavljanja i dva biološka ponavljanja na platformi MIC (Bio Molecular Systems, Upper Coomera, Australija) u ukupnom volumenu reakcije od 15 µL. Uvjeti PCR-a su bili: 95 °C tijekom 5 min, zatim 35 ciklusa na 95 °C tijekom 5 sekundi i 60 °C tijekom 30 sekundi. Krivulje taljenja generirane su u rasponu od 70 °C do 92 °C pri brzini povećanja temperature od 0.1 °C/s kako bi se provjerilo specifično umnažanje. Drugo RT-qPCR mjerenje provedeno je pod jednakim uvjetima s razlikom u normalizaciji ekspresije, za koju je korišten referentni gen *act2* (pristupni broj: AT3G18780) umnožen pomoću početnica ACTIN2_8_F i ACTIN2_8_R (**Prilog C.5**) (Bi i ostali, 2017). Zabilježene su vrijednosti broja ciklusa (Cq) pri kojem fluorescencija amplificirane DNA prelazi prag detekcije što ukazuje na razinu ekspresije gena *SAP11-like* i *SAP54-like* u uzorcima cDNA iz tkiva transgeničnih linija i divljeg tipa kao kontrole.

3.2.5.5.5 Ekstrakcija proteina iz klijanaca uročnjaka

Za ekstrakciju ukupnih proteina iz 100 mg homogeniziranog tkiva transformiranih klijanaca i biljaka divljeg tipa uročnjaka starih 15 dana korišten je komercijalno dostupan komplet za ukupnu ekstrakciju proteina iz biljnog tkiva *Pierce™ Plant Total Protein Extraction Kit* (Thermo Scientific™, Rocford, SAD) uz dodatak *Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, EDTA-free* (100×) (Thermo Scientific™, Rocford, SAD), prema uputi proizvođača ([Pierce™ Plant Total Protein Extraction Kit](#)).

3.2.5.5.6 Detekcija rekombinantnih proteina *SAP11-like* i *SAP54-like* iz transformiranih uročnjaka

Za izdvajanje rekombinantnih proteina *SAP11-like* i *SAP54-like* iz proteinskih ekstrakata homogenata transformiranih klijanaca korištene su afinitetne magnetske kuglice *HisPur™ Ni-NTA Magnetic Beads* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD), koje na temelju privlačnosti Ni²⁺-NTA kompleksa i histidinskih biljega vezuju His₆-označene proteine. Pročišćavanje je izvedeno prema protokolu proizvođača ([User Guide: HisPur Ni-NTA Magnetic Beads](#)), a eluirani proteinski uzorci su denaturirani, analizirani SDS-PAGE elektroforezom (**Poglavlje 3.2.8.1.3**), vizualizirani bojenjem *Coomassie Brilliant Blue* bojom (**Poglavlje 3.2.5.1.4**) te dodatno analizirani metodom *Western blot* (**Poglavlje Error! Reference source not found.**).

3.2.6 Bimolekulska fluorescencijska komplementacija (BiFC)

3.2.6.1 Priprema transformacijskih suspenzija za izvođenje agroinfiltracije

Neposredno nakon transformacije, smjese agrobakterija transformiranih binarnim plazmidnim konstruktima pSPYNE:SAP11-*like*, pSPYNE:SAP54-*like*, pSPYNE:ST6, pSPYNE:ST9, pSPYCE:AtTCP2, pSPYCE:AtTCP4, pSPYCE:AtAP1, pSPYCE:AtSEP3, pSPYCE:aktin, pCB301-p19 i pB7WGF2.0-EGFP-DMS3 (Jagić, 2024.) (**Tablica 3, Prilog D**) nasadene su na kruti medij LB uz dodatak antibiotika (**Prilog E**) i inkubirane 48 sati na 28 °C , nakon čega su odabrane kolonije uzgajane preko noći (12–16 sati) u po 5 mL tekućeg mediju LB uz dodatak antibiotika (**Prilog E**) pri temperaturi 28 °C pri trešnji 250 rpm. Agrobakterije su istaložene centrifugiranjem pri 4000 rpm tijekom 20 min na sobnoj temperaturi te su tri puta isprane s 2.5 mL pufera koji je sadržavao 10 mM MES i 10 mM MgCl₂ (pH 5.3). Inkubirane su 3-4 sata na sobnoj temperaturi u mediju za ispiranje uz dodatak acetosiringona (konačna koncentracija 150 µM) radi indukcije. Pojedinačnim suspenzijama transformiranih agrobakterija, prethodno razrijeđenim puferom za ispiranje u omjeru 1:10, izmjerena je optička gustoća. Na temelju dobivenih vrijednosti izračunati su potrebni volumeni suspenzija za postizanje optičke gustoće OD₆₀₀=0.5 za svaku suspenziju, a kako bi se pojačala ekspresija transgena, svim uzorcima suspenzija dodana je suspenzija agrobakterija transformiranih plazmidom pCB301-p19, optičke gustoće OD₆₀₀=0.2, tako da je konačni volumen svake transformacijske otopine bio 3 mL (Win i Kamoun, 2004.). Pojedinačne suspenzije transformiranih agrobakterija su pomiješane, ovisno o istraživanim interakcijama. Za provjeru uspješnosti agroinfiltracije korištena je suspenzija agrobakterija transformiranih s plazmidnim konstruktom pB7WGF2.0-EGFP-DMS3 (Jagić, 2024.) (**Tablica 22, Tablica 23, Tablica 24, Prilog D**).

Tablica 22. Kombinacije agroinfiltracijskih suspenzija za analizu interakcija proteina SAP11-like i AtTCP2/AtTCP4 u listovima duhana

Broj kombinacije suspenzije bakterija <i>A. tumefaciens</i>	Plazmidni konstrukti u suspenziji za agroinfiltraciju	Vrsta uzorka
1	pSPYNE:SAP11-like pSPYCE:AtTCP2 pCB301-p19	Eksperimentalni uzorak
2	pSPYNE:SAP11-like pSPYCE:AtTCP4 pCB301-p19	Eksperimentalni uzorak
3	pSPYNE:SAP11-like pCB301-p19	Negativna kontrola
4	pSPYCE:AtTCP2 pCB301-p19	Negativna kontrola
5	pSPYCE:AtTCP4 pCB301-p19	Negativna kontrola
6	pB7WGR2.0-EGFP-DMS3 pCB301-p19	Pozitivna kontrola agroinfiltracije

Tablica 23. Kombinacije agroinfiltracijskih suspenzija za analizu interakcija proteina SAP54-like s proteinima AtAP1 i AtSEP3 u listovima duhana

Broj kombinacije suspenzije bakterija <i>A. tumefaciens</i>	Plazmidni konstrukti u suspenziji za agroinfiltraciju	Vrsta uzorka
1	pSPYNE:SAP54-like pSPYCE:AtAP1 pCB301-p19	Eksperimentalni uzorak
2	pSPYNE:SAP54-like pSPYCE:AtSEP3 pCB301-p19	Eksperimentalni uzorak
3	pSPYNE:SAP54-like pCB301-p19	Negativna kontrola
4	pSPYCE:AtAP1 pCB301-p19	Negativna kontrola
5	pSPYCE:AtSEP3 pCB301-p19	Negativna kontrola
6	pB7WGR2.0-EGFP-DMS3 pCB301-p19	Pozitivna kontrola agroinfiltracije

Tablica 24. Kombinacije agroinfiltracijskih suspenzija za analizu interakcija proteina ST6/ST9 i aktin u listovima duhana

Broj kombinacije suspenzije bakterija <i>A. tumefaciens</i>	Plazmidni konstrukti u suspenziji za agroinfiltraciju	Vrsta uzorka
1	pSPYNE:ST6 pSPYCE:aktin pCB301-p19	Eksperimentalni uzorak
2	pSPYNE:ST9 pSPYCE:aktin pCB301-p19	Eksperimentalni uzorak
3	pSPYNE:ST6 pCB301-p19	Negativna kontrola
4	pSPYNE:ST9 pCB301-p19	Negativna kontrola
5	pSPYCE:aktin pCB301-p19	Negativna kontrola
6	pB7WGR2.0-EGFP-DMS3 pCB301-p19	Pozitivna kontrola agroinfiltracije

3.2.6.2 Agroinfiltracija

Listovi biljaka duhana *N. benthamiana* divljeg tipa (**Poglavlje 3.2.4.3**), starosti 6-8 tjedana (vegetativna faza) (Win i Kamoun, 2004.) korišteni su za agroinfiltraciju pripremljenih suspenzija ovisno o kombinaciji istraživane proteinske reakcije (**Tablica 22,**

Tablica 23, Tablica 24, Prilog D).

Agroinfiltracija je provedena blagim mehaničkim oštećenjem epiderme na naličju lista duhana pomoću inzulinske igle, nakon čega je transformacijska smjesa suspenzija agrobakterija lagano utisnuta u međustanične prostore lista primjenom šprice bez igle. Agroinfiltrirane biljke duhana su uzgajane pri temperaturi 24 °C, u ciklusu 16h svjetlo/8h tama (intenziteta svjetlosti 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) uz 50% relativne vlažnosti zraka, ~60 sati prije uzorkovanja i mikroskopske analize (**Poglavlje 3.2.6.3**). Priprema i izvođenje agroinfiltracije provedeni su u tri neovisna ponavljanja.

3.2.6.3 Mikroskopiranje

Uzorci epidermskih stanica naličja agroinfiltriranog lista svake biljke, pripremljeni su u otopini 1× PBS i analizirani na prisutnost fluorescencije pomoću konfokalnog laserskog skenirajućeg modula TCS SP8 × FLIM (Leica Microsystems, Wetzlar, Njemačka), opremljenog jedinicom za vremenski korelirano brojanje pojedinačnih fotona TCSPC (engl.

time-correlated single photon counting) (PicoQuant, Berlin, Njemačka) i objektivom HC PL APO CS2 40×/OIL. Fluorescencija YFP se pratila se pri pobudi na 514 nm i emisiji u rasponu 516-549 nm, dok se autofluorescencija klorofila bilježila pri istoj valnoj duljini pobude uz emisiju u rasponu 654-735 nm. Detekcija EGFP u pozitivnoj kontroli agroinfiltracije provodila se pri pobudi na 488 nm i emisiji u rasponu 500–550 nm. Za svaki mikroskopirani uzorak snimljeno je 10 fotografija.

3.2.7 Sustav dvaju kvašćevih hibrida (Y2H)

Za potrebe izvođenje metode sustava Y2H korišteni su iz laboratorija dostupni sojevi kvasaca *S. cerevisiae* HF7c i AH109 u odvojenim pokusima, kao dvostruka kontrola interakcije istraživanih proteina.

3.2.7.1 Kotransformacija kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Stanice soja kvasca HF7c/AH109 kotransformirane su parom plazmidnih konstrukata plazmida pGBT9 (mamac) i pGAD424 (plijen): pGBT9:SAP11-*like*, pGBT9:SAP54-*like*, pGBT9:ST6, pGBT9:ST9, pGAD424:AtTCP2, pGAD424:AtTCP4, pGAD424:AtAP1, pGAD424:AtSEP3, pGAD424:aktin, koji su sadržavali gen od interesa, ovisno o istraživanoj interakciji. Kao negativna kontrola korištene su kotransformirane stanice kvasca s jednim od plazmida (mamac/plijen) koji nije sadržavao gen od interesa. Za pozitivnu kontrolu pokusa korišten je kotransformirani soj kvasca parom plazmidnih konstrukata pGBT9:RDM1 i pGAD424:DMS3 (Sasaki *i sur.*, 2014.) (**Tablica 25, Tablica 26, Tablica 27, Prilog D**). Transformacija je provedena prema protokolu temeljenom na metodi litijev acetat/nosač jednolančane DNA/polietilen glikol (*LiAc/carrier ssDNA/PEG*) (Agatep *i sur.*, 1998.).

Dvije kolonije kvasca prenesene su u posebne epruvete u po 5 mL tekućeg YPD medija (**Tablica 8**) te su na temperaturi 28 °C, uz trešnju 250 rpm uzgajane preko noći. Nakon prekonoćne inkubacije suspenzije kvasaca su razrijeđene 20 puta, svježim YPD tekućim medijem te su kvasci inkubirani 3-4 sata u istim uvjetima kao i preko noći, dok optička gustoća suspenzije OD₆₀₀ nije dosegla 0.4-0.6. Potom su kvasci centrifugirani 2 min na 2000 rpm, supernatanti pažljivo odliveni, a talozi resuspendirani u 1 mL ohlađenog pufera LiAc/TE (**Tablica 9**). U sterilnu epruvetu prebačen je 1 mL suspenzije kvasca te ponovno centrifugiran 2 min na 2000 rpm. Supernatant se odlio, a ukupni talog kvasca resuspendiran je u 100 µL pufera LiAc/TE, po epruveti, odnosno transformacijskom uzorku.

Nakon pripreme kvasaca za transformaciju, pripremljena je plazmidna smjesa, na ledu u novim sterilnim epruvetama volumena 1.5 mL, miješanjem 10 µL nosača jednolančane DNA (*UltraPure™ Herring Sperm DNA Solution, Invitrogen™*, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, SAD, 10 mg/mL), koji je prethodno inkubiran na 95 °C, 5 min i 200-300 ng svakog plazmida (mamac i plijen), za svaku ispitivanu interakciju u posebno (**Tablica 25, Tablica 26, Tablica 27**). Plazmidnim smjesama dodano je po 100 µL prethodno pripremljenih kvasaca, te su kratko vorteksirane, da se smjesa dobro promiješa. Svakoj smjesi je dodano 600 µL pufera LiAc/TE/PEG (**Tablica 9**) te su smjese inkubirane 30 min na temperaturi 30 °C, pri trešnji 300 rpm. Nakon inkubacije transformacijskim smjesama je dodano po 70 µL DMSO (dimetil sulfoksid) i inkubirane su u vodenoj kupelji na temperaturi 42 °C, 15 min te potom ohlađene dvije min na ledu. Centrifugirane su jednu minutu na 5000 rpm, a talozi su nakon odlijevanja supernatanta, resuspendirani u 200 µL pufera 1× TE (**Tablica 9**), te su cijeli volumeni suspenzija preneseni na ploče sa selekcijskim medijem SD/-Leu/-Trp (**Tablica 10**). Ploče su inkubirane ~48 sati na temperature 28 °C.

Tablica 25. Kombinacije plazmidnih konstrukata za kotransformaciju HF7c i AH109 sojeva kvasca i analizu interakcija proteina SAP11 i AtTCP2/AtTCP4

Broj kombinacije	Plazmidni konstrukti (mamac/plijen)	Vrsta uzorka
1	pGBT9:SAP11-like pGAD424:AtTCP2	Eksperimentalni uzorak
2	pGBT9:SAP11-like pGAD424:AtTCP4	Eksperimentalni uzorak
3	pGBT9:SAP11-like pGAD424 (prazan)	Negativna kontrola
4	pGBT9 (prazan) pGAD424:AtTCP2	Negativna kontrola
5	pGBT9 (prazan) pGAD424:AtTCP4	Negativna kontrola
6	pGBT9:RDM1 pGAD424:DMS3	Pozitivna kontrola

Tablica 26. Kombinacije plazmidnih konstrukata za kotransformaciju HF7c i AH109 sojeva kvasca i analizu interakcija proteina SAP54 i AtAP1/AtSEP3

Broj kombinacije	Plazmidni konstrukti (mamac/plijen)	Vrsta uzorka
1	pGBT9:SAP54-like pGAD424:AtAP1	Eksperimentalni uzorak
2	pGBT9:SAP54-like pGAD424:AtSEP3	Eksperimentalni uzorak
3	pGBT9:SAP54-like pGAD424 (prazan)	Negativna kontrola
4	pGBT9 (prazan) pGAD424:AtAP1	Negativna kontrola
5	pGBT9 (prazan) pGAD424:AtSEP3	Negativna kontrola
6	pGBT9:RDM1 pGAD424:DMS3	Pozitivna kontrola

Tablica 27. Kombinacije plazmidnih konstrukata za kotransformaciju HF7c i AH109 sojeva kvasca i analizu interakcija proteina ST6/ST9 i aktin

Broj kombinacije	Plazmidni konstrukti (mamac / plijen)	Vrsta uzorka
1	pGBT9:ST6 pGAD424:aktin	Eksperimentalni uzorak
2	pGBT9:ST9 pGAD424:aktin	Eksperimentalni uzorak
3	pGBT9:ST6 pGAD424 (prazan)	Negativna kontrola
4	pGBT9:ST9 pGAD424 (prazan)	Negativna kontrola
5	pGBT9 (prazan) pGAD424:aktin	Negativna kontrola
6	pGBT9:RDM1 pGAD424:DMS3	Pozitivna kontrola

Kada su kolonije transformanta narasle, za svaku od 4 replike odabrane su po 4 različite klonije svakog transformanta (**Tablica 25, Tablica 26, Tablica 27**). Resuspendirane su u 100 μ L sterilne dH₂O. Iz svake suspenzije inokulirano je 15 μ L na ploče medija bez aminokiseline histidin, (SD/-Leu/-Trp/-His), odnosno histidin i adenin (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade) (**Tablica 10**), uz dodatak ili bez 20 mM 3AT (3-amino-1,2,4-triazole). Na taj je način provjerena

prototrofija kvasaca te su eliminirane nespecifične interakcije i utvrđena prisutnost i jakost interakcija između istraživanih proteina.

3.2.7.2 Beta-galaktozidazni test

Prema protokolu proizvođača (*Yeast Protocols Handbook*, Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, SAD), proveden je kvalitativni β -galaktozidazni test, kako bi se potvrdila prototrofija kvasca za histidin i/ili adenin, a time i istraživane proteinske interakcije (**Tablica 25, Tablica 26, Tablica 27**). Beta-galaktozidaznom testu je prethodio uzgoj transformiranih kvasaca na pločama koje su sadržavale selekcijski medij SD/-Leu/-Trp prema opisanom postupku (**Poglavlje 3.2.7.1**).

Prije izvođenja testa, pripremljena je smjesa otapanjem 0.07 g agaroze u 10 mL Z-pufera (**Tablica 11**). Zatim je čisti filter papir promjera Petrijeve ploče, zarezan radi označavanja orijentacije i pomoću pincete položen na kolonije transformiranih kvasaca uzgojenih na selekcijskom mediju SD/-Leu/-Trp. Kolonije su prenesene na filter papir blagim i ravnomjernim pritiskom dna staklene čaše u trajanju 3 min. Nakon odvajanja, filter papir je tri puta uzastopno smrznut u tekućem dušiku te je potom položen u novu sterilnu Petrijevu ploču, pri čemu su preslikane kolonije transformiranih kvasaca bile okrenute prema gore. U rashlađenu agarozu (na $\sim 50^\circ\text{C}$) dodano je 165 μL X-gal i 27 μL β -ME (**Tablica 11**), te je smjesa homogenizirana i izlivena preko filter papira. Nakon učvršćivanja agaroze, Petrijeva ploča je zatvorena parafilmom i inkubirana 5 sati.

3.2.8 Kopurifikacija i imunodetekcija proteina

3.2.8.1.1 Transformacija *E. coli*, BL21 varijanta Rosetta™ (DE3)

Transformacija i kotransformacija bakterija *E. coli* BL21 varijante Rosetta™ (DE3) kompetentnih stanica (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka), plazmidnim konstruktima pGEX-4T-1, pGEX-4T-1:aktin, pET28a:ST6(H) i pET28a:ST9(H) (**Prilog D**) provedena je metodom toplinskog šoka.

Kompetentnim bakterijskim stanicama volumena 50 μL dodan je 1 μL odgovarajućeg plazmidnog konstrukta, ovisno o ispitivanoj interakciji proteina (**Tablica 5**), nakon čega su stanice inkubirane na ledu 30 min. Potom su epruvete sa smjesom stanica i plazmida izložene temperaturnom šoku uranjanjem u vodenu kupelj zagrijanu na 42°C , u trajanju od 90 sekundi, nakon kojeg su epruvete s transformacijskim smjesama ponovno ohlađene na ledu 2-3 min. Stanicama je dodan medij SOC, predgrijan na 37°C . Inkubacija transformacijskih smjesa

odvijala se na 37 °C , 1 sat, te su potom transformirane bakterije nasađene na ploče s krutim medijem LB uz dodatak odgovarajućih antibiotika za selekciju transformanata (**Prilog E**) i inkubirane preko noći, također na 37 °C.

3.2.8.1.2 Pročišćavanje proteina iz *Escherichia coli*

Nakon prekonoćne inkubacije na pločama s krutim medijem LB uz dodatak odgovarajućih antibiotika (**Prilog E**) za selekciju transformanata pri temperaturi 37 °C , u svrhu izvođenja metode kopurifikacije proteina iz bakterijskih stanica *E. coli* BL21 varijante Rosetta™ (DE3) transformiranih plazmidnim konstruktima (**Tablica 5**), odabrane su pojedinačne kolonije. Iz odabranih kolonija priređene su prekonoćne kulture u volumenu po 3 mL tekućeg medija LB s dodatkom odgovarajućih antibiotika (**Prilog E**).

Prekonoćne kulture korištene su za inokulaciju 100 mL svježeg tekućeg medija LB s dodatkom određenih antibiotika (**Prilog E**) dodavanjem 2.5 mL transformiranih stanica. Stanice su inkubirane 4 sata pri temperaturi 37 °C, uz trešnju 250 rpm. Za indukciju ekspresije rekombinantnih proteina u bakterijskim stanicama dodano je 0.3 mM izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozida (IPTG), nakon čega su stanice inkubirane preko noći, pri temperaturi 15 °C, uz trešnju 250 rpm.

Transformirane stanice su sakupljene centrifugiranjem u centrifugi *DuPont Sorvall RC-5B* (Sorvall Instruments, Thermo Fisher Scientific, SAD) na 10000 g, pri temperaturi 4 °C, 10 min. Dobiveni talozi stanica su isprani s 50 mL pufera PBS resuspendiranjem i ponovnim centrifugiranjem pod istim uvjetima.

Talozima bakterijskih stanica koje ekspimiraju proteine označene GST-biljegom dodano je 20 mL pufera PBS-triton, a talozima stanica koje ekspimiraju proteine označene His₆-biljegom dodano je 20 mL pufera NTI (**Tablica 13**). Liza bakterijskih stanica provedena je ultrazvučnim tretmanom (8 puta po 30 sekundi) primjenom sonifikatora *Vibra-Cell*™, 50 W (Bioblock Scientific, Illkirch, Francuska).

Bakterijski lizati prebačeni su u *Nalgene*® epruvete (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) volumena 50 mL i centrifugirani 20000 g, na temperaturi 4 °C, 20 min. Dobiveni supernatanti profiltrirani su kroz filtere *Minisart*® (Sartorius, Göttingen, Njemačka), veličina pora 0.45 μ m. Iz svakog filtrata odvojeno je 150 μ L filtrata (*input*) te je u ostalih 14 mL po filtratu dodano 100 μ L prethodno ispranih afinitetnih kuglica *Glutathion-Sepharose 4B* (© Cytiva, GE Healthcare, Uppsala, Švedska) ili 100 μ L prethodno ispranih *Ni-NTA* agaroznih afinitetnih kuglica (QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka), ovisno o tipu afinitetne kromatografije, na temelju oznaka proteina GST-biljegom ili His₆-biljegom. Tako pripremljeni uzorci inkubirani

su preko noći na 4 °C uz laganu trešnju. Po inkubaciji, iz svih filtrata izdvojeno je po 150 µL (*flow-through*), nakon čega su uzorci s afinitetnim kuglicama centrifugirani 5 min na 500 g pri temperaturi 4 °C. Slijedila su 3 uzastopna ispiranja: Proteini označeni GST-biljekom ispirani su puferom PBS, a za ispiranje proteina označeni His₆-biljekom korišten je pufer za ispiranje NTI-Tris (**Tablica 13**). U svakom koraku ispiranja izdvojeno je po 150 µL uzorka (*wash 1, 2, 3*), a između pojedinih ispiranja uzorci su centrifugirani 1 minutu na 500 g u ohlađenoj centrifugi na 4 °C.

3.2.8.1.3 SDS-PAGE elektroforeza

Proteini iz uzoraka razdvojeni su poliakrilamidnom gel elektroforezom (SDS-PAGE). Prije nanošenja na gel, proteinskim uzorcima dodan 2× Laemmlijev pufer (**Tablica 14**) u omjeru volumena 1:1, nakon čega su uzorci denaturirani na temperaturi 95 °C tijekom 5 min. U jažice poliakrilamidnog gela (15% gel za razdvajanje i 4% gel za sabijanje, (**Tablica 28**) nanoseno je 15 µL prethodno denaturiranih uzoraka. Za procjenu molekulske mase proteina korišteni su proteinski standardi *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (10–250 kDa) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD), *Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker-Full range* (© Cytiva Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) i *Unstained Protein Standard, Broad Range* (10–200 kDa) (New England Biolabs® Ipswich, SAD).

Tablica 28. Poliakrilamidni gel za SDS-PAGE elektroforezu

Gel za razdvajanje (15%) (5 ml)		Gel za sabijanje (4%) (5ml)	
Sastojak	Volumen	Sastojak	Volumen
40% akrilamid	1.8 ml	40% akrilamid	0.483 ml
2% bisakrilamid	1.238 ml	2% bisakrilamid	0.333 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	1.25 ml	0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25 ml
10% SDS*	50 µL	10% SDS	50 µL
10% APS**	50 µL	10% APS	50 µL
TEMED***	5 µL	TEMED	5 µL
H ₂ O	0.6 ml	H ₂ O	2.85 ml

*SDS: natrijev dodecil sulfat

**APS: amonijev persulfat

***TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin

Razdvajanje proteina je provedeno vertikalnom u sustavu *Mini-PROTEAN® Tetra electrophoresis system* (Bio-Rad Laboratories, Inc., SAD) u puferu 1× SDS-PAGE (**Tablica 15**). Za prolazak uzoraka kroz gel za sabijanje elektroforeza se odvijala ~20 min pod naponom struje 100 V, dok su se uzorci razdvajali pod naponom 200 V, ~100 min odnosno do optimalnog razdvajanja proteina.

Uzorci su nanošeni u duplikatu na paralelne gelove pri čemu je jedan gel korišten za provjeru uspješnosti razdvajanja proteina bojanjem s *Coomassie Brilliant Blue R-250* bojom (**Poglavlje 3.2.8.1.4**), a drugi korišten u daljnjoj analizi *Western blot* metodom i imunodetekcijom (**Poglavlje 3.2.8.1.5**).

3.2.8.1.4 Bojanje poliakrilamidnih gelova *Coomassie Brilliant Blue* bojom

Boja *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) R-250 korišten je za bojanje proteina razdvojenih SDS-PAGE elektroforezom. Gelovi su inkubirani u otopini za bojanje (**Tablica 16**) proteina oko 10 min uz povremeno zagrijavanje u mikrovalnoj pećnici radi ubrzavanja procesa bojanja. Odbojavanje gelova provodilo se u otopini za odbojavanje uz kontinuirano miješanje ~30 min, a naknadno i u dH₂O nekoliko sati, također uz miješanje na orbitalnoj miješalici (OS-20 Orbital Shaker, Biosan Ltd., Riga, Latvia) radi potpunog uklanjanja viška boje te postizanja jasne vizualizacije razdvojenih proteinskih traka.

3.2.8.1.5 *Western blot*

Nakon SDS-PAGE elektroforeze, a prije prijenosa proteina na PVDF membrane (*Amersham™ Hybond® P Western blotting membranes*, PVDF, Darmstadt, Njemačka), poliakrilamidni gelovi ekvilibrirani su 10 min u puferu za prijenos (**Tablica 17**). Aktivacija PVDF membrana prije prijenosa uključivala je uranjanje membrane u 100% metanol tijekom jedne minute, zatim ispiranje membrane u reH₂O dva puta u trajanju po jednu minutu te naposljetku inkubiranje membrane u puferu za prijenos 5 min (**Tablica 17**). Filtar papir i spužvice (Bio-Rad™ Laboratories, Inc., SAD) također su prethodno natopljene u puferu za prijenos. Prijenos proteina proveden je u sustavu *Mini-PROTEAN® Tetra electrophoresis system* (Bio-Rad™ Laboratories, Inc., SAD) pri električnom naponu 12V preko noći, na temperature 4 °C.

Po završetku prijenosa, membrane su inkubirane jedan sat u otopini za blokiranje (2% *Amersham ECL Blocking Agent* u 1× PBS-T) (**Tablica 18**) na sobnoj temperaturi, uz lagano miješanje na orbitalnoj miješalici (OS-20 Orbital Shaker, Biosan Ltd., Riga, Latvia). Nakon blokiranja membrane su dva puta kratko isprane u otopini PBS-T.

Za imunodetekciju, membrana s proteinima označenim GST-biljegom inkubirala se s primarnim protutijelima Anti-GST (B-14) iz mišjih IgG1 protutijela (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, SAD), razrijeđenim 1:1000 u otopini PBS-T, jedan sat na sobnoj temperaturi uz lagano miješanje na orbitalnoj miješalici (OS-20 Orbital Shaker, Biosan Ltd., Riga, Latvija).

Membrana s proteinima od interesa, koji su označeni His₆-biljegom inkubirala se u primarnim protutijelima Anti-His₆ iz mišjih IgG1 protutijela (Roche, Mannheim, Njemačka), razrijeđenim 1:1000 u otopini PBS-T, jedan sat na sobnoj temperaturi uz lagan miješanje na orbitalnoj miješalici.

Nakon inkubacije, membrane su kratko isprane dva puta u otopini PBS-T, te dodatno 4-6 puta po 5 min uz lagano miješanje na orbitalnoj miješalici, na sobnoj temperaturi.

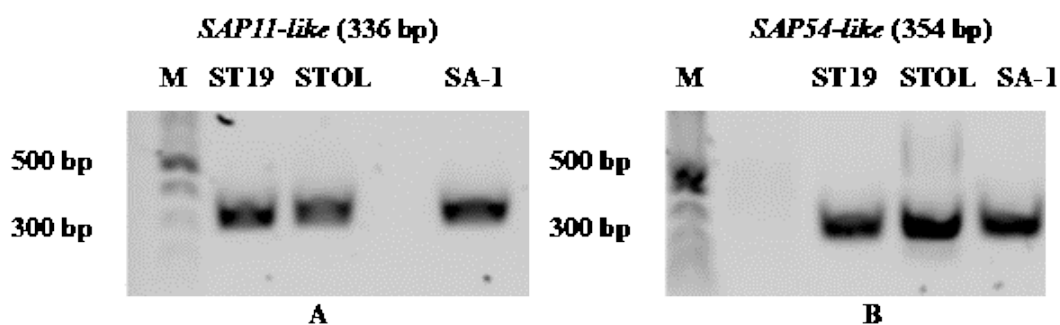
Tako isprane membrane su potom inkubirane sa sekundarnim kozjim protutijelima Anti-Mouse IgG (cijela molekula)-peroksidaza (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Saint Louis, SAD), razrijeđenim 1:5000 u otopini PBS-T (**Tablica 18**) jedan sat na sobnoj temperaturi, uz miješanje na orbitalnoj miješalici. Provedeni su koraci ispiranja identični onima opisanima za ispiranje membrana nakon inkubacije s primarnim protutijelima.

Za detekciju signala korišten je reagens *Amersham ECL Prime Western blotting Detection Reagent* (© Cytiva, Marlborough, SAD), pripremljen miješanjem otopina A (luminol) i B (peroksid) u omjeru 1:1, u volumenu od 0.1 ml/cm³ membrane. Membrane su inkubirane s detekcijskim reagensom 5 min na sobnoj temperaturi u mraku. Signali su detektirani snimanjem CCD kamerom uređaja *Amersham ImageQuant™ 800 Western blot imaging systems* (© Cytiva, Marlborough, SAD).

4 REZULTATI

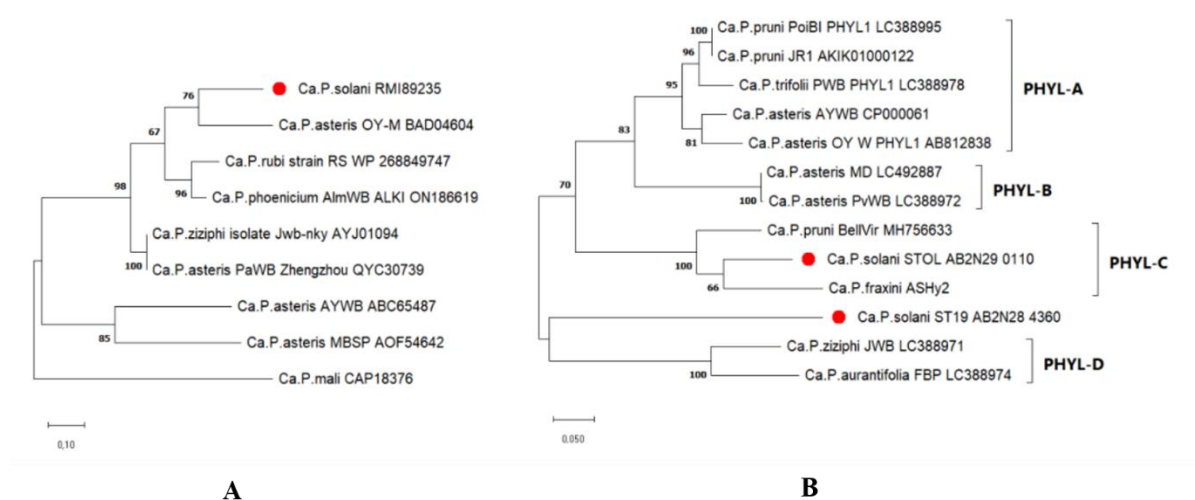
4.1 *In silico* usporedba i analiza nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova efektor fitoplazme 'Ca. P. solani'

U skicama genoma STOL (656141 bp u 18 kontiga) i ST19 (707036 bp u 28 kontiga) identificirano je 28, odnosno 26 potencijalnih gena efektor. Neki od tih gena efektor kodiraju homologe sekrecijskim proteinima fitoplazme AY-WB (SAP) poput: *SAP19-like*, *SAP39-like*, *SAP40-like*, *SAP44-like*, *SAP50-like*, *SAP53-like*, *SAP54-like*, *SAP55-like*, *SAP59-like*, *SAP61-like*, *SAP64-like* i *SAP65-like*. Neki efektori kao *SAP39-like*, *SAP50-like*, *SAP53-like* i *SAP61-like* pronađeni su u sva tri soja SA-1 (Seruga Music *i sur.*, 2019.), ST19 i STOL, i smatraju se homologima efektor SAP specifičnim za 'Ca. P. solani' (**Prilog H.1, H.2**). Homolozi efektor SAP11 pronađeni su u svim fitoplazmama potpuno sastavljenih genoma, kao i u skici genoma 'Ca. P. solani' SA-1, ali nisu pronađeni u skicama genoma sojeva 'Ca. P. solani' ST19 i STOL. Ipak, umnažanjem fragmenta *SAP11-like* koje je bilo uspješno za sva tri soja 'Ca. P. solani', dokazana je prisutnost ovoga gena u genomu 'Ca. P. solani' (**Slika 10A**). Sekvenciranjem tih amplikona utvrđena je 100% identičnost nukleotidnih sljedova među svim analiziranim sojevima. Ovaj nukleotidni slijed pokazuje 87.94% nukleotidne sličnosti s homologom u 'Ca. P. rubi', 87.41% s *Ca. P. ziziphy* te 81.93% s 'Ca. P. asteris' OY-M. Filogenetske analize aminokiselinskih sljedova potvrdile su da je *SAP11-like* efektor 'Ca. P. solani' blisko srodan homologu u 'Ca. P. asteris' OY-M (**Slika 11A**).



Slika 10. Potvrda prisutnosti gena A) *SAP11-like* (336 bp) i B) *SAP54-like* (354 bp) u sojevima ST19, STOL i SA-1 fitoplazme 'Ca. P. solani' metodom PCR-a i elektroforezom u agaroznom gelu. Standard za određivanje molekularne mase DNA: 1 kb DNA Ladder GeneRuler™ (Thermo Scientific™, Waltham, SAD).

Homolozi efektor SAP54 pronađeni su u dvije varijante: jedna u soju STOL (oznaka lokusa: AB2N29_0110), a druga u ST19 (oznaka lokusa: AB2N28_4360). BLAST analiza pokazala je da AB2N29_0110 dijeli 74.36% identičnosti aminokiselinskog slijeda s homologom u fitoplazmi ribosomske skupine 16SrXIII, 54.40% s '*Ca. P. trifolii*', 56.80% s '*Ca. P. pruni*' i 52.63% s '*Ca. P. asteris*' AY-WB. Također, homolozi sa 100% identičnošću aminokiselinskog slijeda, anotirani kao konzervirani hipotetski proteini, pronađeni su u još dvije skice genoma sojeva '*Ca. P. solani*' 284/09 i 231/09. Druga varijanta pokazala je samo 42.27.% identičnosti aminokiselinskog slijeda sa SAP54 efektorom '*Ca. P. asteris*' AY-WB, 41.84.% s '*Ca. P. phoenicium*' i 41.67% s fitoplazmom skupine 16SrIII. Umnažanje pomoću specifičnih početnica i sekvenciranje amplikona potvrdilo je prisutnost SAP54-like varijante AB2N29_0110 u sva tri soja '*Ca. P. solani*', SA-1, ST19 i STOL (**Slika 10B**), pri čemu su sekvence bile 100 % identične. Filogenetska analiza nukleotidnih sljedova pokazala je da ova SAP54-like varijanta pripada prethodno opisanoj filogenetskoj skupini *phyl-C* efektor tipa *phyllogen*, dok je varijanta SAP54-like AB2N28_4360 bila udaljeno srodna svim dosad opisanim skupinama (**Slika 11B**) (Iwabuchi *i sur.*, 2020.).

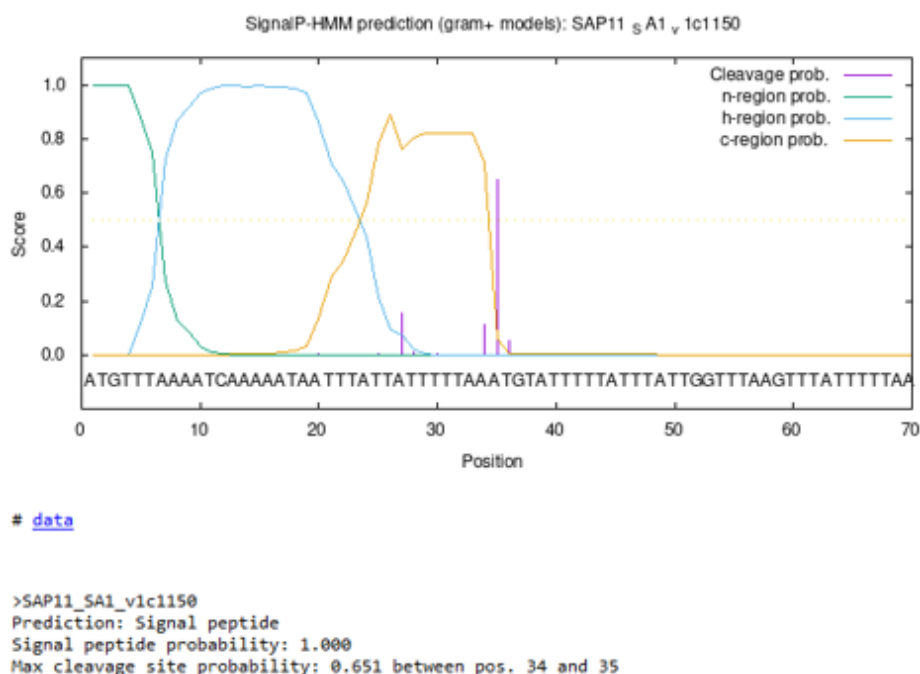


Slika 11. Filogenetski odnosi efektoru među fitoplazmama. A) SAP11-like i B) SAP54-like. Filogenetska stabla rekonstruirana su metodom maksimalne vjerojatnosti (Maximum Likelihood) na temelju A) aminokiselinskih, odnosno B) nukleotidnih sekvenci. Vrijednosti bootstrap potpore, izračunate su na temelju 500 ponavljanja i prikazane uz unutarnje grane stabla. Mjerilo prikazuje broj supstitucija po mjestu u sekvenci. GenBank pristupni brojevi navedeni su uz naziv svake vrste ili soja. Sekvence sojeva '*Ca. P. solani*' STOL i ST19 označene su crvenim točkama.

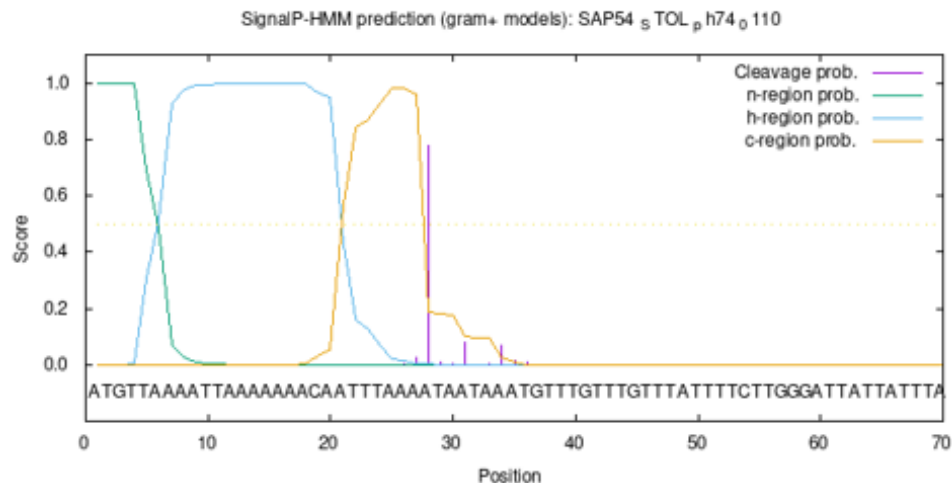
4.2 Konstrukcija rekombinantnih plazmida

Analizom nukleotidnih sljedova, utvrđena je prisutnost signalnih peptida proteina za koje kodiraju fitoplazmatski geni *SAP11-like*, *SAP54-like*, *ST6* i *ST9*, dok analizom nukleotidnih sljedova koji kodiraju za modificirane proteine *ST6(H)* i *ST9(H)*, biljne proteine i protein kukca *AtTCP2*, *AtTCP4*, *AtAP1*, *AtSEP3* i aktin nije predviđena prisutnost signalnih peptida, kako je i očekivano.

Za gen *SAP11-like* mjesto cijepanja nukleotidnog slijeda koji kodira signalni peptid predviđeno je između 34. i 35. nukleotida (**Slika 12**), dok je za *SAP54-like* mjesto cijepanja predviđeno između 27. i 28. nukleotida (**Slika 13**). Kod gena *ST6* i *ST9* mjesto cijepanja predviđeno je između 30. i 31. nukleotida (**Slika 14**, **Slika 15**).



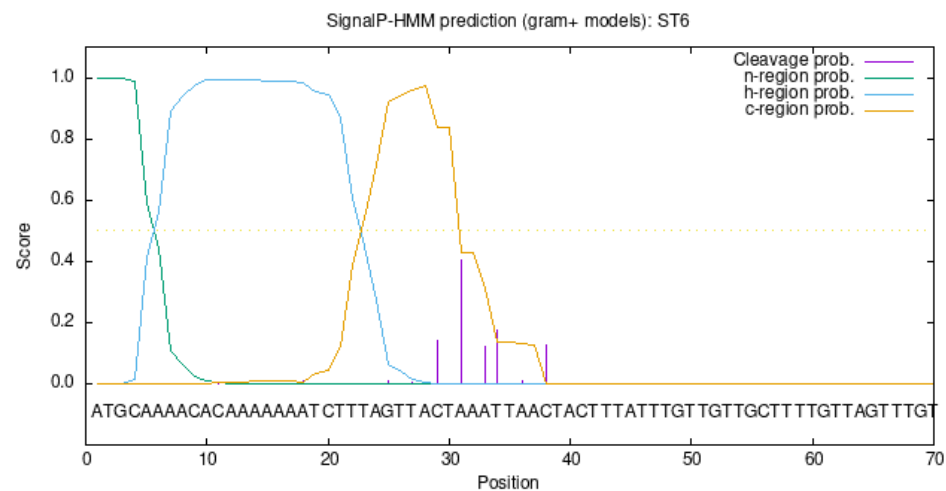
Slika 12. Predviđanje signalnih peptida i mjesta cijepanja između 34. i 35. nukleotida nukleotidnog slijeda gena *SAP11-like* pomoću alata SignalP 3.0.



[data](#)

```
>SAP54_STOL_ph74_0110
Prediction: Signal peptide
Signal peptide probability: 1.000
Max cleavage site probability: 0.779 between pos. 27 and 28
```

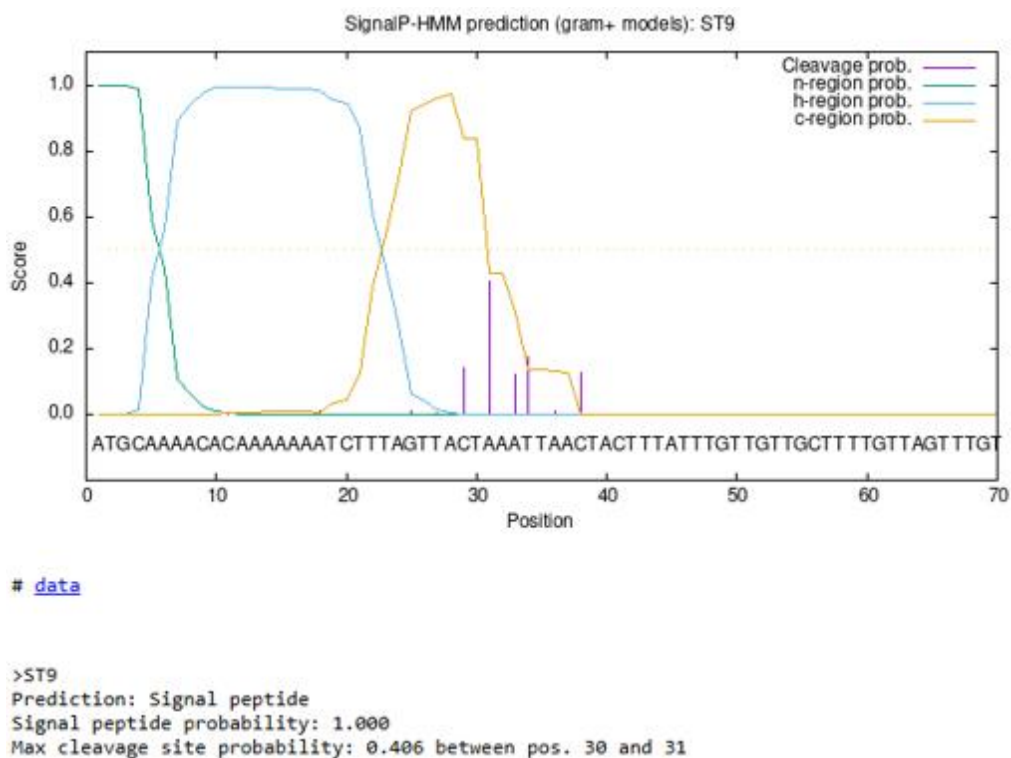
Slika 13. Predviđanje signalnih peptida i mjesta cijepanja između 27. i 28. nukleotida nukleotidnog slijeda gena *SAP54-like* pomoću alata SignalP 3.0.



[data](#)

```
>ST6
Prediction: Signal peptide
Signal peptide probability: 1.000
Max cleavage site probability: 0.406 between pos. 30 and 31
```

Slika 14. Predviđanje signalnih peptida i mjesta cijepanja između 30. i 31. nukleotida nukleotidnog slijeda gena *ST6* pomoću alata SignalP 3.0.



Slika 15. Predviđanje signalnih peptida i mjesta cijepanja između 30. i 31. nukleotida nukleotidnog slijeda gena *ST9* pomoću alata SignalP 3.0.

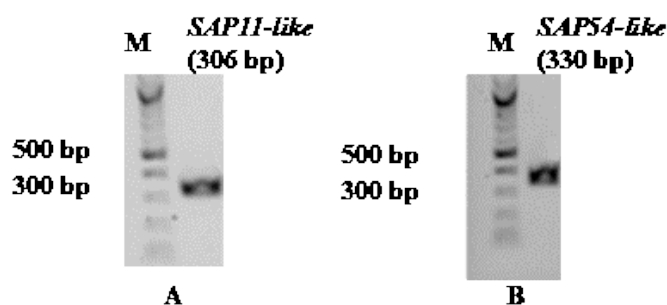
Nakon uklanjanja nukleotidnih sljedova signalnih peptida fitoplazmatskim genima koji kodiraju za efektorske i transmembranske proteine, kodirajući sljedovi su optimizirani za ekspresiju u domaćinima *A. thaliana*, *N. benthamiana* i *S. cerevisiae*. Nukleotidni sljedovi optimiziranih gena navedeni su u **Prilog A.1**.

Biljni geni *AtTCP2*, *AtTCP4*, *AtAP1*, *AtSEP3* optimizirani su za ekspresiju u *S. cerevisiae* (**Prilog A.2**), dok je gen kukca *act3* optimiziran za ekspresiju u *N. benthamiana* i *S. cerevisiae* (**Prilog A.3**).

Nukleotidni sljedovi optimiziranih gena umetnuti su i sintetizirani u plazmidnom vektoru pGEX-4T-1 u komercijalnom servisu (GenScript Biotech Netherlands B.V., Leiden, Nizozemska).

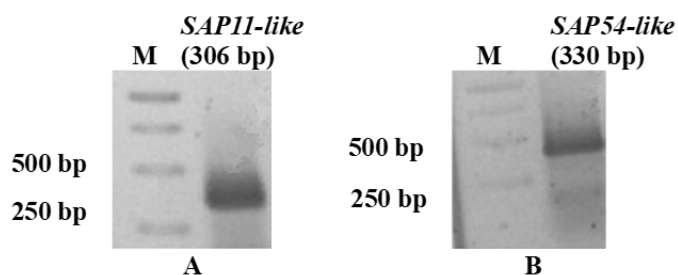
4.2.1 Plazmidni konstrukti za izvođenje metode *floral dip*

Za izvođenje transformacije uročnjaka metodom *floral dip*, optimizirani fragmenti gena *SAP11-like* i *SAP54-like* iz konstrukata plazmida pGEX-4T-1:*SAP11-like* i pGEX-4T-1:*SAP54-like* (GenScript Biotech Netherlands B.V., Leiden, Nizozemska) umnoženi su pomoću odgovarajućih parova početnica (**Slika 16**, **Prilog C.2**).



Slika 16. Agarozna gel elektroforeza. PCR produkti umnažanja nukleotidnih sljedova za umetanje u linearizirani plazmidni vektor pGWB529. A) *SAP11-like* i B) *SAP54-like*. Standard za određivanje molekularne mase DNA: 1 kb DNA Ladder GeneRuler™ (Thermo Scientific™, Waltham, SAD).

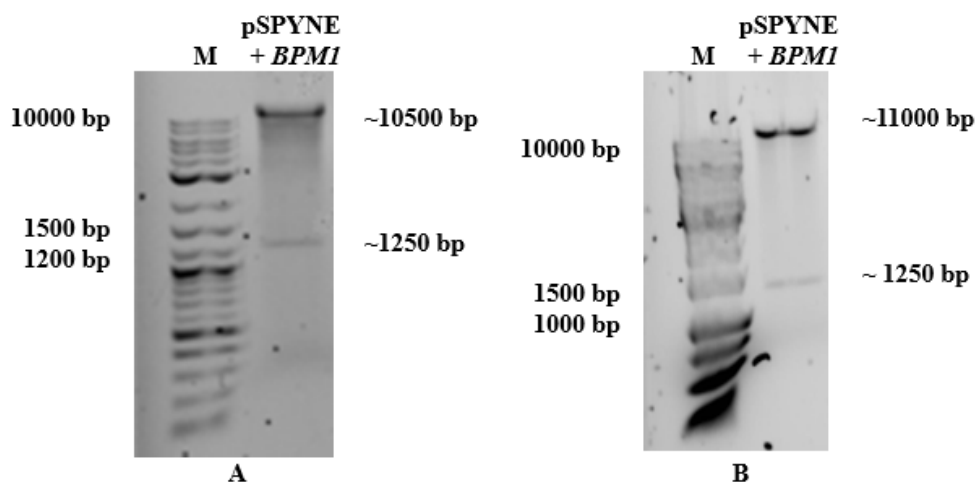
U linearizirani plazmidni vektor pGWB529 uspješno su umetnuti pročišćeni optimizirani nukleotidni sljedovi gena *SAP11-like* i *SAP54-like* korištenjem *In-Fusion*® tehnologije kloniranja. Dobivenim rekombinantnim plazmidnim konstruktima pGWB529:*SAP11-like* i pGWB529:*SAP54-like* (**Prilog D.1, D.2**) transformirane su kompetentne stanice *E. coli* (Stellar™ Competent Cells, Takara Bio Europe S.A.S, Saint-Germain-en-Laye, Francuska). Nakon provjere dobivenih transformata PCR analizom kolonija i elektroforezom u 1.5% agaroznom gelu, iz otopina transformiranih *E. coli* uzgojenih u tekućem mediju LB s dodatkom odgovarajućih antibiotika (**Prilog E**), izolirani su rekombinatni plazmidi (**Poglavlje 3.2.2.8**), a prisutnost inserata uspješno je potvrđena sekvenciranjem. Dobiveni plazmidni konstrukti elektroporacijom su uneseni u stanice *A. tumefaciens*, a nakon selekcije na odgovarajućim selektivnim podlogama, u kolonijama transformanata je uspješno dokazana prisutnost odgovarajućih inserata metodom PCR (**Slika 17**).



Slika 17. Provjera prisutnosti plazmidnih konstrukata pGWB529:*SAP11-like* i pGWB529:*SAP54-like* PCR analizom kolonija agrobakterija agaroznom gel elektroforezom. A) umnoženi nukleotidni slijed *SAP11-like* i B) umnoženi nukleotidni slijed *SAP54-like*. Standard za određivanje molekularne mase DNA: 1 kb DNA Ladder GeneRuler™ (Thermo Scientific™, Waltham, SAD).

4.2.2 Plazmidni konstrukti za izvođenje metode BiFC

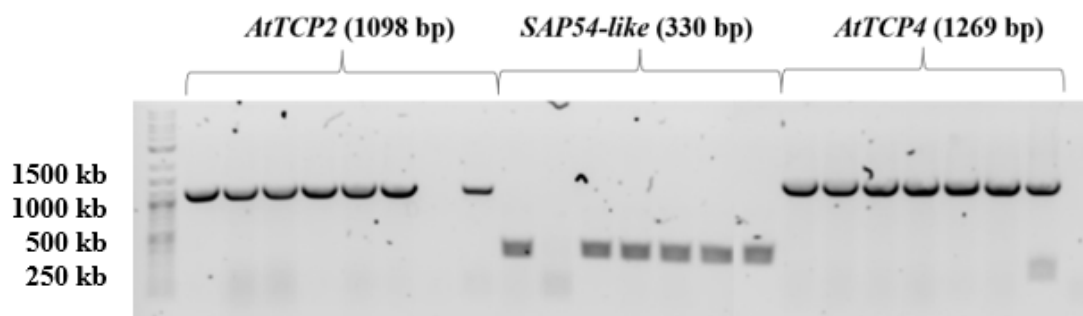
Za *in planta* istraživanje proteinskih interakcija fitoplazmatskih proteina efektor i biljnih transkripcijskih faktora primjenom metode BiFC, optimizirani nukleotidni sljedovi efektorskih gena umnoženi su pomoću odgovarajućih parova početnica (**Prilog C.2**) iz plazmidnih konstrukata pGEX-4T-1:SAP11-like i pGEX-4T-1:SAP54-like (GenScript Biotech Netherlands B.V., Leiden, Nizozemska). Plazmidni vektor pSPYNE-BPM1 (Rendulić, 2018.) lineariziran je restrikcijskom digestijom pomoću enzima BamHI, pri čemu je insert *BPM1* uklonjen, što je potvrđeno elektroforezom u agaroznom gelu (**Slika 18A**).



Slika 18. Razdvajanje lineariziranog plazmidnog vektora i inserta restrikcijskom digestijom pomoću enzima BamHI agaroznom gel elektroforezom A) linearizirani plazmidni vektor pSPYNE (~10500 bp) i insert *BPM1* (~1250). Standard za određivanje molekularne mase DNA: *1 kb Plus DNA Ladder for Safe Stains* (New England Biolabs, SAD); B) linearizirani plazmidni vektor pSPYCE (~11000 bp) i insert *BPM1* (~1250). Standard za određivanje molekularne mase DNA: *1 kb DNA Ladder GeneRuler™* (Thermo Scientific™, Waltham, SAD).

Nakon pročišćavanja uzoraka iz agaroznog gela, optimizirani nukleotidni sljedovi efektorskih gena su umetnuti korištenjem *In-Fusion®* tehnologije kloniranja u linearizirani odredišni plazmidni vektor pSPYNE. Dobivenim rekombinantnim plazmidnim konstruktima pSPYNE:SAP11-like i pSPYNE:SAP54-like (**Prilog D.3, D.4**) transformirane su kompetentne *E. coli* (Stellar™ Competent Cells, Takara Bio Europe S.A.S, Saint-Germain-en-Laye, Francuska).

Nakon provjere dobivenih transformanata PCR analizom kolonija i elektroforezom u 1% agaroznom gelu (**Slika 19**), iz otopina transformiranih *E. coli* uzgojenih u tekućem mediju LB s dodatkom odgovarajućih antibiotika (**Prilog E**), izolirani su rekombinatni plazmidi (**Poglavlje 3.2.2.8**), a prisutnost inserata uspješno je potvrđena sekvenciranjem.



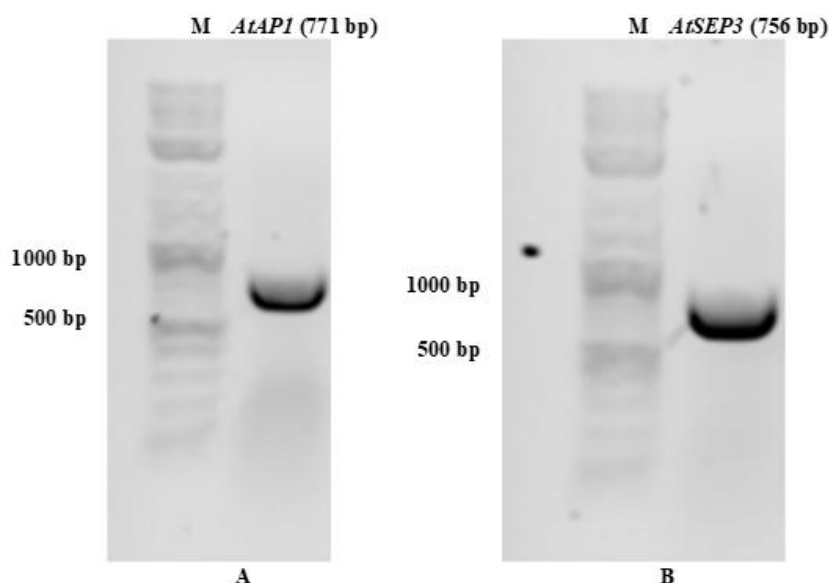
Slika 19. Reprezentativni prikaz rezultata PCR analize kolonija agaroznom gel elektroforezom. Dobiveni PCR produkti odgovaraju očekivanim veličinama inserata *TCP2* (1098 bp), *SAP54-like* (330 bp) i *TCP4* (1269 bp), umnoženim iz uspješno transformiranih bakterija *E. coli* (HST08) plazmidnim konstruktima pSPYCE:TCP2, pSPYNE:SAP54-like i pSPYCE:TCP4. Standard za određivanje molekularne mase DNA: 1 kb Plus DNA Ladder for Safe Stains (New England Biolabs, SAD).

Dobiveni plazmidni konstrukti elektroporacijom su uneseni u stanice *A. tumefaciens*, a nakon selekcije na odgovarajućim selektivnim podlogama, u kolonijama transformanata je uspješno dokazana prisutnost odgovarajućih inserata metodom PCR.

U pročišćeni linearizirani plazmidni vektor pSPYNE (**Slika 18A**) umetnuti su pročišćeni optimizirani nukleotidni sljedovi koji kodiraju za fitoplazmatske transmembranske proteine ST6, ST9 te za njihove modificirane oblike ST6(H) i ST9(H). Inerti su prethodno umnoženi iz plazmidnih konstrukata pGEX-4T-1:ST6, pGEX-4T-1:ST9, pGEX-4T-1:ST6(H) i pGEX-4T-1:ST9(H) (GenScript Biotech Netherlands B.V., Leiden, Nizozemska), pomoću odgovarajućih početnica (**Prilog C.2**) kojima su također umetnuti u odredišni plazmid pSPYNE, korištenjem *In-Fusion*® tehnologije kloniranja. Dobivenim rekombinantnim plazmidnim konstruktima pSPYNE:ST6, pSPYNE:ST9, pSPYNE:ST6(H) i pSPYNE:ST9(H) (**Prilog D.5, D.6, D.7, D.8**) transformirane su kompetentne *E. coli* (Stellar™ Competent Cells, Takara Bio Europe S.A.S, Saint-Germain-en-Laye, Francuska). Nakon provjere dobivenih transformata PCR analizom kolonija i elektroforezom u 0.8% agaroznom gelu, iz otopina transformiranih *E. coli* uzgojenih u tekućem mediju LB s dodatkom odgovarajućih antibiotika, izolirani su rekombinatni plazmidi (**Poglavlje 3.2.2.8**), a prisutnost inserata uspješno je potvrđena sekvenciranjem. Dobiveni plazmidni konstrukti elektroporacijom su uneseni u stanice *A. tumefaciens*, a nakon selekcije na odgovarajućim selektivnim podlogama, u kolonijama transformanata je uspješno dokazana prisutnost odgovarajućih inserata metodom PCR.

Iz plazmidnih konstrukata pDESTGADT7:AtTCP2, pDESTGADT7:AtTCP4, pDONR207:AtAP1 i pDONR207:AtSEP3 (ustupljeno iz kolekcije prof. Saskije Hogenhout, John Innes Center, Norwich, UK), umnoženi su nukleotidni sljedovi koji kodiraju za biljne

transkripcijske faktore AtTCP2, AtTCP4, AP1 i SEP3 pomoću odgovarajućih početnica, PCR metodom (**Prilog C.2, Slika 20**).



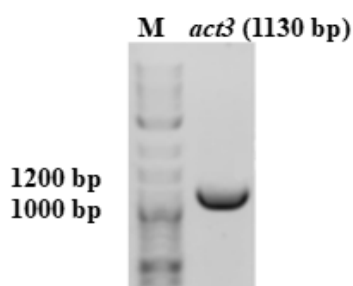
Slika 20. Reprezentativni prikaz PCR produkata nakon agarozne gel elektrofore. A) *AtAP1* umnožen iz plazmidnog konstrukta pDONR207:*AtAP1* i B) *AtSEP3* umnožen iz plazmidnog konstrukta pDONR207:*AtSEP3*. Standard za određivanje molekularne mase DNA: *1 kb Plus DNA Ladder for Safe Stains* (New England Biolabs, SAD).

Navedeni inserti su umetnuti u pročišćeni linearizirani odredišni vektor pSPYCE (**Slika 18B**), pomoću *In-Fusion*® tehnologije kloniranja. Dobivenim rekombinantnim plazmidnim konstruktima pSPYCE:TCP2, pSPYCE:TCP4, pSPYCE:AP1, pSPYCE:SEP3 (**Prilog D.9, D.10, D.11, D.12**) transformirane su kompetentne *E. coli* (Stellar™ Competent Cells, Takara Bio Europe S.A.S, Saint-Germain-en-Laye, Francuska). Nakon provjere dobivenih transformata PCR analizom kolonija i elektroforezom u 1% agaroznom gelu (**Slika 19**), iz otopina transformiranih *E. coli* uzgojenih u tekućem mediju LB s dodatkom odgovarajućih antibiotika, izolirani su rekombinatni plazmidi (**Poglavlje 3.2.2.8**), a prisutnost inserata uspješno je potvrđena sekvenciranjem. Dobiveni plazmidni konstrukti elektroporacijom su uneseni u stanice *A. tumefaciens*, a nakon selekcije na odgovarajućim selektivnim podlogama, u kolonijama transformanata je uspješno dokazana prisutnost odgovarajućih inserata metodom PCR.

Iz agaroznog gela pročišćen, linearizirani plazmidni vektor pSPYCE (**Slika 18B**) korišten je i kao odredišni vektor za optimizirani gen kukca *act3* umnožen iz sintetiziranog plazmidnog konstrukta pGEX-4T-1:aktin (GenScript Biotech Netherlands B.V., Leiden, Nizozemska), pomoću odgovarajućih početnica (**Prilog C.2**). Umnažanje fragmenta gena *act3* provjereno je

elektroforezom u 0.8 % agaroznom gelu, nakon čega je PCR produkt pročišćen i pomoću odgovarajućih početnica (**Prilog C.2**) umetnut u prethodno linearizirani pSPYCE, primjenom *In-Fusion*® tehnologije kloniranja. Kompetentne stanice *E. coli* (Stellar™ Competent Cells, Takara Bio Europe S.A.S, Saint-Germain-en-Laye, Francuska) transformirane su dobivenim rekombinantnim plazmidnim konstruktom pSPYCE:aktin (**Prilog D.13**). Nakon provjere dobivenih transformata PCR analizom kolonija i elektroforezom u 0.8% agaroznom gelu (**Slika 21**), iz otopina transformiranih *E. coli* uzgojenih u tekućem mediju LB s dodatkom odgovarajućih antibiotika (**Prilog E**), izoliran je rekombinatni plazmid (**Poglavlje 3.2.2.8**), a prisutnost inserta uspješno je potvrđena sekvenciranjem. Dobiveni plazmidni konstrukt unesen je elektroporacijom u stanice *A. tumefaciens*, a nakon selekcije na odgovarajućoj selektivnoj podlozi, u kolonijama transformanata je uspješno dokazana prisutnost odgovarajućih inserata metodom PCR.

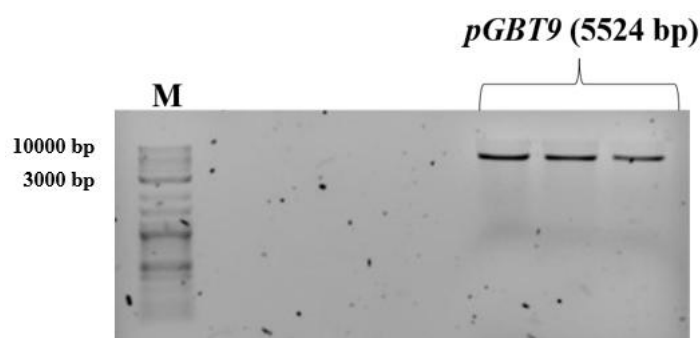
Plazmidni konstrukti, pCB301-p19 i pB7WGR2.0-EGFP-DMS3 bili su dostupni u laboratorijskoj zbirci transformiranih bakterijskih stanica *A. tumefaciens* (**Prilog D.14, D.15**). Stanice su uzgojene na selektivnim podlogama te u tekućem mediju uz dodatak odgovarajućih antibiotika (**Prilog E**).



Slika 21. Reprezentativni prikaz PCR analize kolonija. Umnoženi fragment *act3* (1113 bp) iz stanica *E. coli* transformiranih rekombinantnim plazmidnim konstruktom pSPYCE:aktin. Standard za određivanje molekularne mase DNA: 1 kb Plus DNA Ladder for Safe Stains (New England Biolabs, SAD).

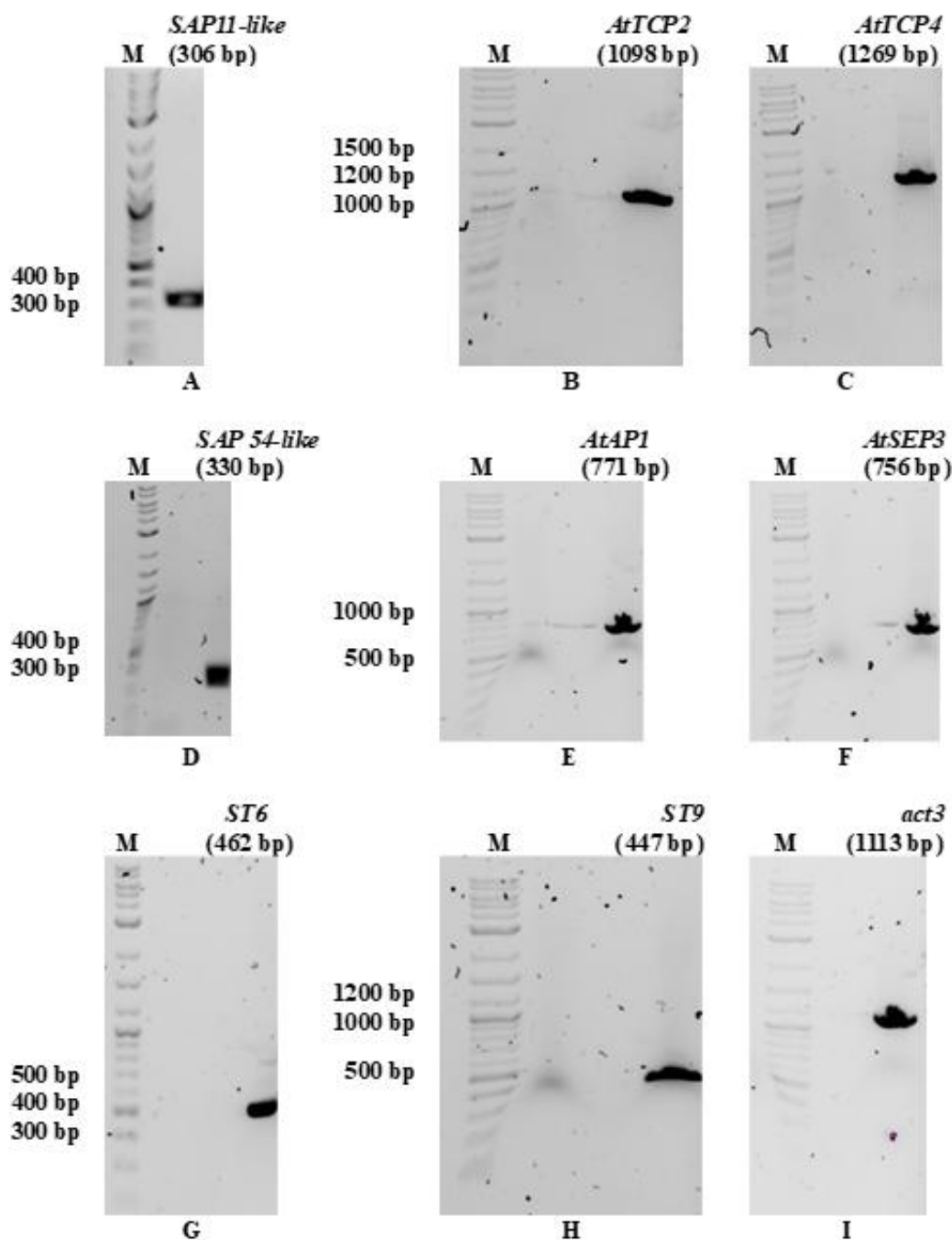
4.2.3 Plazmidni konstrukti za izvođenje metode sustava Y2H

Optimizirani nukleotidni sljedovi *SAP11-like* (Slika 23A), *SAP54-like* (Slika 23D), *ST6* (Slika 23G) i *ST9* (Slika 23H) umnoženi su pomoću odgovarajućih početnica (Prilog C.2) iz plazmidnih konstrukata pGEX-4T-1:*SAP11-like*, pGEX-4T-1:*SAP54-like*, pGEX-4T-1:*ST6* i pGEX-4T-1:*ST9* (GenScript Biotech Netherlands B.V., Leiden, Nizozemska). U linearizirani plazmidni vektor mamac pGBT9 (Clontech Laboratories, Inc. Takara Bio) (Slika 22) umetnuti su navedeni nukleotidni sljedovi korištenjem *In-Fusion*® tehnologije kloniranja.



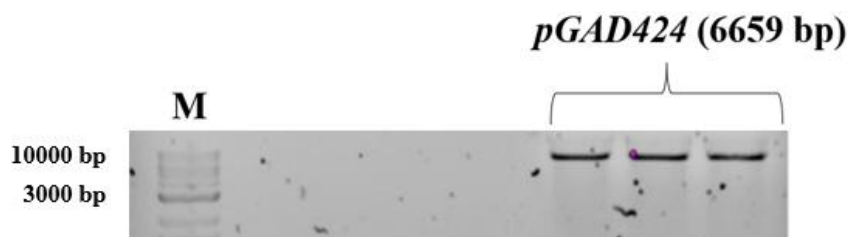
Slika 22. Reprezentativni prikaz lineariziranog plazmida pGBT9 (5524 bp) restrikcijom digestijom pomoću enzima EcoRI i SalI, nakon agarozne gel elektroforeze. Standard za određivanje molekularne mase DNA: 1 kb Plus DNA Ladder for Safe Stains (New England Biolabs, SAD).

Dobivenim rekombinantnim plazmidnim konstruktima pGBT9:*SAP11-like* (Prilog D.16), pGBT9:*SAP54-like* (Prilog D.17), pGBT9:*ST6* (Prilog D.18) i pGBT9:*ST9* (Prilog D.19) transformirane su kompetentne *E. coli* (Stellar™ Competent Cells, Takara Bio Europe S.A.S, Saint-Germain-en-Laye, Francuska). Nakon provjere dobivenih transformanata PCR analizom kolonija i elektroforezom u 1% agaroznom gelu, iz otopina transformiranih *E. coli* uzgojenih u tekućem mediju LB s dodatkom odgovarajućih antibiotika, izolirani su rekombinatni plazmidi (Poglavlje 3.2.2.8). Prisutnost inserata uspješno je potvrđena sekvenciranjem. Dobiveni plazmidni konstrukti korišteni su za kotransformaciju kvasca *S. cerevisiae*, sojeva HF7c i AH109 s odgovarajućim plazmidnim konstruktima pGAD424:AtTCP2, pGAD424:AtTCP4, pGAD424:AtAP1, pGAD424:AtSEP3 i pGAD424:aktin. Rastom kolonija na SD/-Leu/-Trp podlogama, uspješno je dokazana prisutnost odgovarajućih inserata u kotransformiranim kvascima.



Slika 23. Reprezentativni prikaz elektroforetske analize PCR produkata umnoženih iz plazmidnih konstrukata pGEX-4T-1:SAP11-like, pGEX-4T-1:SAP54-like, pGEX-4T-1:ST6, pGEX-4T-1:ST9, pGEX-4T-1:AtTCP2, pGEX-4T-1:AtTCP4, pGEX-4T-1:AtAP1, pGEX-4T-1:AtSEP3 i pGEX-4T-1:aktin za umetanje u plazmidne vektore pGBT9 i pGAD424 sustava Y2H. Dobiveni PCR produkti odgovaraju očekivanim veličinama inserata: A) *SAP11-like* (306 bp); B) *AtTCP2* (1098 bp); C) *AtTCP4* (1269 bp); D) *SAP54-like* (330 bp); E) *AtAP1* (771 bp); F) *AtSEP3* (756 bp); G) *ST6* (462 bp); H) *ST9* (447 bp) i (I) *act3* (1113 bp). Standard za određivanje molekularne mase DNA: 1 kb Plus DNA Ladder for Safe Stains (New England Biolabs, SAD).

Nukleotidni sljedovi *AtTCP2* (**Slika 23B**), *AtTCP4* (**Slika 23C**), *AtAP1* (**Slika 23E**), *AtSEP3* (**Slika 23F**) i *act3* (**Slika 23I**) umnoženi su pomoću odgovarajućih početnica (**Prilog C.2**) iz plazmidnih konstrukata pGEX-4T-1:*AtTCP2*, pGEX-4T-1:*AtTCP4*, pGEX-4T-1:*AtAP1*, pGEX-4T-1:*AtSEP3* i pGEX-4T-1:aktin (GenScript Biotech Netherlands B.V., Leiden, Nizozemska). U linearizirani plazmidni vektor pGAD424 (**Slika 24**) umetnuti su navedeni nukleotidni sljedovi korištenjem *In-Fusion*® tehnologije kloniranja.



Slika 24. Reprezentativni prikaz elektroforetske analize plazmidnog vektora pGAD424 (6659 bp), lineariziranog restriksijskom digestijom pomoću enzima EcoRI i Sall.

Dobivenim rekombinantnim plazmidnim konstruktima pGAD424:*AtTCP2*, pGAD424:*TCP4*, pGAD424:*AP1*, pGAD424:*SEP3* i pGAD424:aktin (**Prilog D.20, D.21, D.22, D.23, D.24**) transformirane su kompetentne *E. coli* (Stellar™ Competent Cells, Takara Bio Europe S.A.S, Saint-Germain-en-Laye, Francuska). Nakon provjere dobivenih transformata PCR analizom kolonija i elektroforezom u 1% agaroznom gelu, iz otopina transformiranih *E. coli* uzgojenih u tekućem mediju LB s dodatkom odgovarajućih antibiotika (**Prilog E**), izolirani su rekombinantni plazmidi (**Poglavlje 3.2.2.8**), a prisutnost inserata uspješno je potvrđena sekvenciranjem. Dobiveni plazmidni konstrukti korišteni za kotransformaciju kvasca *S. cerevisiae*, sojeva HF7c i AH109 s odgovarajućim plazmidnim konstruktima vektora pGBT9, prethodno opisanim.

Prstenasti plazmidi pGBT9 i pGAD424 bez umetnutih gena te rekombinantni plazmidni konstrukti pGBT9:*RDM1* i pGAD424:*DMS3* bili su dostupni u laboratorijskoj zbirci transformiranih bakterijskih stanica *E.coli*.

Plazmidni konstrukti su pročišćeni iz stanice uzgojenih na selektivnim podlogama te u tekućem mediju LB uz dodatak odgovarajućih antibiotika (**Prilog E, Poglavlje 3.2.2.8**)

te su korišteni za kontrolu transformacijskog sustava Y2H (**Tablica 25, Tablica 26, Tablica 27**).

4.2.4 Plazmidni konstrukti za izvođenje kopurifikacije i imunodetekcije proteina

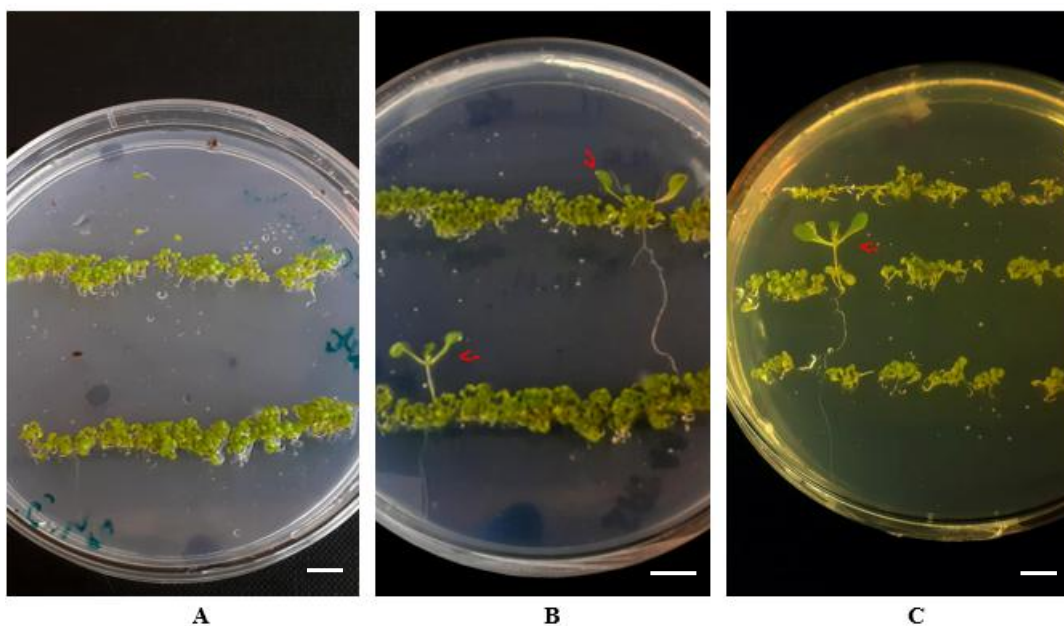
Za izvođenje kopurifikacije i imunodetekcije proteina nukleotidni sljedovi *ST6(H)* i *ST9(H)* umnoženi su iz plazmidnih konstrukata pSPYNE:ST6(H) i pSPYNE:ST9(H) pomoću odgovarajućih početnica (**Prilog C.2**), pročišćeni i umetnuti u linearizirani odredišni plazmidni vektor pET28a korištenjem *In-Fusion*® tehnologije kloniranja. Dobivenim rekombinantnim plazmidnim konstruktima pET28a:ST6(H) i pET28a:ST9(H) (**Prilog D.25, D.26**) transformirane su kompetentne *E. coli* (Stellar™ Competent Cells, Takara Bio Europe S.A.S, Saint-Germain-en-Laye, Francuska). Nakon provjere dobivenih transformata PCR analizom kolonija i elektroforezom u 1% agaroznom gelu, iz otopina transformiranih *E. coli* uzgojenih u tekućem mediju LB s dodatkom odgovarajućih antibiotika, izolirani su rekombinatni plazmidi (**Poglavlje 3.2.2.8**), a prisutnost inserata uspješno je potvrđena sekvenciranjem. Dobiveni plazmidni konstrukti umetnuti su u bakterijske stanice *E. coli*, varijanta BL21 Rosetta™ (DE3) transformacijskom metodom toplinskog šoka.

Optimizirani nukleotidni slijed koji kodira za aktin umnožen je iz plazmidnog konstrukta pSPYCE:aktin pomoću odgovarajućih početnica (**Prilog C.2**), pročišćen i umetnut u linearizirani odredišni plazmidni vektor pGEX-4T-1 korištenjem *In-Fusion*® tehnologije kloniranja. Dobivenim rekombinantnim plazmidnim konstruktom pGEX-4T-1:aktin (**Prilog D.27**) transformirane su kompetentne *E. coli* (Stellar™ Competent Cells, Takara Bio Europe S.A.S, Saint-Germain-en-Laye, Francuska). Nakon provjere dobivenih transformata PCR analizom kolonija i elektroforezom u 1% agaroznom gelu, iz otopina transformiranih *E. coli* uzgojenih u tekućem mediju LB s dodatkom odgovarajućih antibiotika, izolirani su rekombinatni plazmidi (**Poglavlje 3.2.2.8**), a prisutnost inserata uspješno je potvrđena sekvenciranjem. Dobiveni plazmidni konstrukti umetnuti su u bakterijske stanice *E. coli*, varijanta BL21 Rosetta™ (DE3) transformacijskom metodom toplinskog šoka.

4.3 Transformacija uročnjaka metodom *floral dip*

4.3.1 Praćenje razvoja i fenotipa transgeničnih linija uročnjaka kroz generacije T0 do T3

Učinkovitost transformacije uročnjaka metodom *floral dip* iznosila je približno 1%, što je utvrđeno na temelju udjela sjemenki T1 generacije koje su pokazale rezistenciju na higromicin B dodan u kruti medij MS na koji su posijane sjemenke uročnjaka generacije T0 (Slika 25).



Slika 25. Reprezentativni prikaz fenotipa T1 generacije uročnjaka. Biljke su uzgajane na mediju MS uz dodatak antibiotika higromicina B za selekciju transformiranih jedinki, 10 dana nakon stratifikacije sjemena biljaka transformiranih metodom *floral dip*. A) divlji tip (Col-0). B) SAP11-like transformant. C) SAP54-like transformant. Mjerna skala: 10 mm.

Divlji tip uročnjaka pokazao je osjetljivost na higromicin B iz podloge. Deset dana od stratifikacije sjemena, za svaki je transgen presađeno po 12 klijanaca u sterilizirani supstrat (Poglavlje 3.2.4.2). Od presađenih biljaka preživjelo je 10 biljaka transgene linije SAP11-like te 9 biljaka uročnjaka transgene linije SAP54-like. Već u prvoj generaciji (T1) u obje varijante SAP11-like i SAP54-like transgeničnih biljaka uročnjaka uočene su značajne razvojne promjene (Slika 26). Transformanti su pokazali deformacije cvjetnih i vegetativnih organa, uključujući reducirani broj latica, zakržljale pupove, nerazvijene reproduktivne organe, abnormalan razvoj vršnog meristema i poremećen rast izboja. Uočen je i filodiji sličan fenotip cvjetnih organa, povećana gustoća trihoma, nepravilno razvijeni, uvijeni i nazubljeni listovi te poremećena filotaksija (Slika 26).



Slika 26. Reprezentativni prikaz fenotipa T1 generacije uročnjaka 4 tjedna nakon stratifikacije sjemena generacije T0. A) divlji tip (Col-0). Reprezentativne linije transgeničnih uročnjaka; B) SAP11-*like* 4: reducirani broj latica cvijeta, nepravilna morfologija cvjetnih organa; C) SAP54-*like* B1: sušenje lapova i kržljanje cvijeta; D) SAP11-*like* 9: povećana gustoća trihoma, filodija, kovrčanje i nazubljenost listova, abnormalan razvoj vršnog meristema; E) SAP54-*like* B7: filodija, povećana gustoća trihoma, uvijanje listova; F) SAP11-*like* 7: filodiji slične promjene, abnormalni razvoj vršnog meristema; G) SAP54-*like* 5: kržljanje cvijeta i uvijanje organa, simptomi nalik filodiji. Mjerna skala: 5mm.

Biljke T1 generacije koje su preživjele, razvile su cvjetove, samooprašile se te proizvele vijabilno sjeme druge generacije (T2). Od svake biljke iz T1 generacije posijano je ~100 sjemenki na krutu podlogu MS uz dodatak saharoze 20 g/L i 30 mg/L antibiotika higromicina B. Brojanjem rezistentnih i osjetljivih klijanaca T2 generacije uročnjaka utvrđeno je 90% SAP11-*like* transformanata s jednom insercijom gena te 88.89% SAP54-*like* transformanata s jednom insercijom gena.

U T2 generaciji klijanaca starih 10 dana od stratifikacije, uočene su promjene fenotipa poput uvijanja listova za SAP11-*like* transgene uročnjake i povećana gustoća trihoma klijanaca SAP54-*like* transgeničnih uročnjaka (**Slika 27**). Odrasle biljke transgeničnih linija T2 generacije, presađene u sterilizirani supstrat pokazale su izraženu fenotipsku varijabilnost koja se očitovala u različitim stupnjevima morfoloških i razvojnih abnormalnosti. Uočeni su simptomi deformiranih cvjetnih pupova, nepravilnosti u razvoju cvjetnih organa, skraćeni internodiji, zbijanje vršnog dijela izboja, odnosno poremećaj razvoja i organizacije vršnog meristema, što je često praćeno pojavom fascijacije i rozetastim izgledom vršnog dijela biljke (**Slika 28**).

Promjene u vegetativnim organima uključivale su abnormalno razvijene listove, promjene u veličini i obliku lista koje su obuhvaćale uvijanje, kovrčavost i nazubljenost lisnih plojki, poremećenu filotaksiju, filodiju, skraćene internodije, povećanu gustoću trihoma, patuljasti rast, nekrotične promjene i zakržljaloost biljaka (**Slika 28**).



A

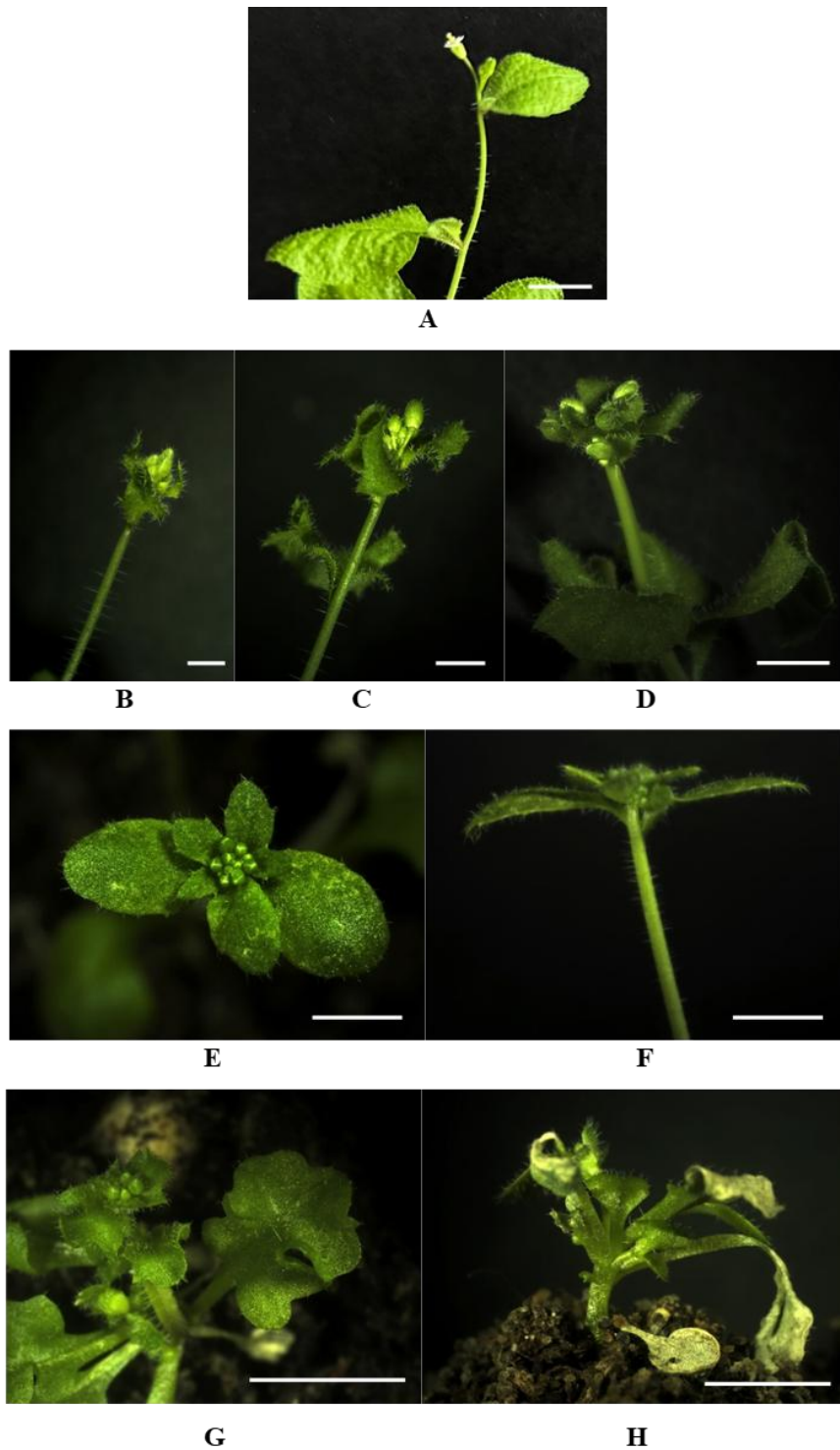


B



C

Slika 27. Reprezentativni prikaz ekspresije fenotipa T2 generacije uročnjaka, 10 dana nakon stratifikacije sjemena generacije T1. A) divlji tip (Col-0) uzgajan na mediju MS bez dodatka antibiotika higromicina; B) SAP11-*like* 2b transformant: uvijanje kotiledona i pravih listova; C) SAP54-*like* B4P6 transformant: pojačana gustoća trihoma na listovima. Transgenične biljake uročnjaka su uzgajane na mediju MS uz dodatak antibiotika higromicina za selekciju. Mjerna skala: 2.5 mm.



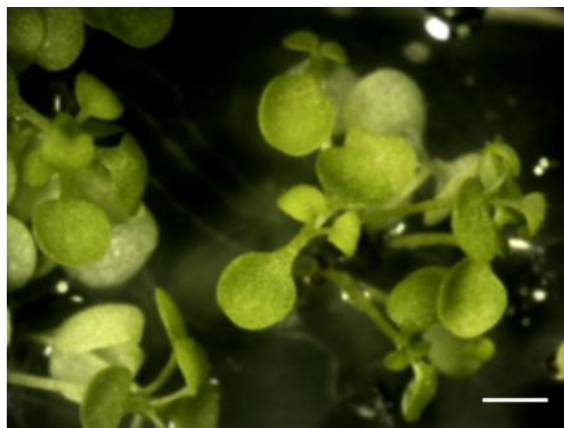
Slika 28. Reprezentativni prikaz ekspresije fenotipa T2 generacije uročnjaka 4 tjedna nakon stratifikacije sjemena generacije T1. A) divlji tip; B) *SAP11-like 3e*: simptomi nalik filodiji, kovrčanje i nazubljenost listova, povećana gustoća trihoma, zbijen vršni dio izboja; C) *SAP11-like 2c*: kovrčanje i nazubljenost listova, zbijeni pupovi, skraćeni internodiji, povećana gustoća trihoma; D) *SAP11-like 2f*: kovrčanje i nazubljenost listova, zbijeni pupovi, skraćeni internodiji, povećana gustoća trihoma, abnormalna organizacija vršnog meristema; E) i F) *SAP54-like B2P6*: povećani i zaobljeni listovi, poremećena filotaksija, skraćeni internodiji, povećana gustoća trihoma; G) *SAP11-like 2g*: nepravilno razvijeni i nazubljeni listovi, kovrčanje listova, zbijeni pupovi, patuljasti rast; H) *SAP54-like B8P4*: poremećen razvoj vršnog meristema i rozete, zakržljalogost i venuće organa. Mjerna skala: 10 mm.

Sakupljeno je sjeme biljaka T2 generacije koje su razvile cvjetove i samooprašile se, za uzgoj homozigotnih biljaka treće generacije (T3).

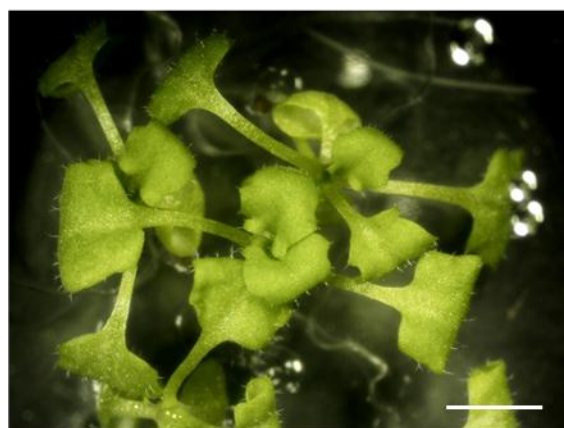
Klijavost steriliziranog sjemena T3 generacije posijanog na krutu podlogu MS s dodatkom saharoze 20 g/L i 30 mg/L antibiotika higromicina B i razvoj rezistentnih uročnjaka iznosila je 100%.

Fenotipske promjene u transgeničnih uročnjaka homozigotnih linija generacije T3 uočene su već na početku razvojnog stadija jedinki. Klijanci *SAP11-like* transformanata stari 10 dana imali su izrazito nazubljene i uvijene lisne plojke, a kod nekih klijanaca *SAP54-like*, osim povećane gustoće trihoma, zamijećen je fenotip sraslih listića (**Slika 29**).

Odrasle jedinke *SAP11-like* transformanata zadržale su nazubljenost listova, listovi su se uvijali, bili su smanjene veličine, a sporadično je uočena i poremećena filotaksija. Kao i kod klijanaca i odraslih biljaka *SAP54-like* transgeničnih linija generacije T3, uočena pojava srastanja biljnih organa, fascijacija, skraćenje internodija, povećana gustoća trihoma, abnormalna organizacija vršnog meristema, zbijenost pupoljaka, smanjena veličina lisnih plojki, poremećena filotaksija i patuljasti rast jedinki (**Slika 30**).



A

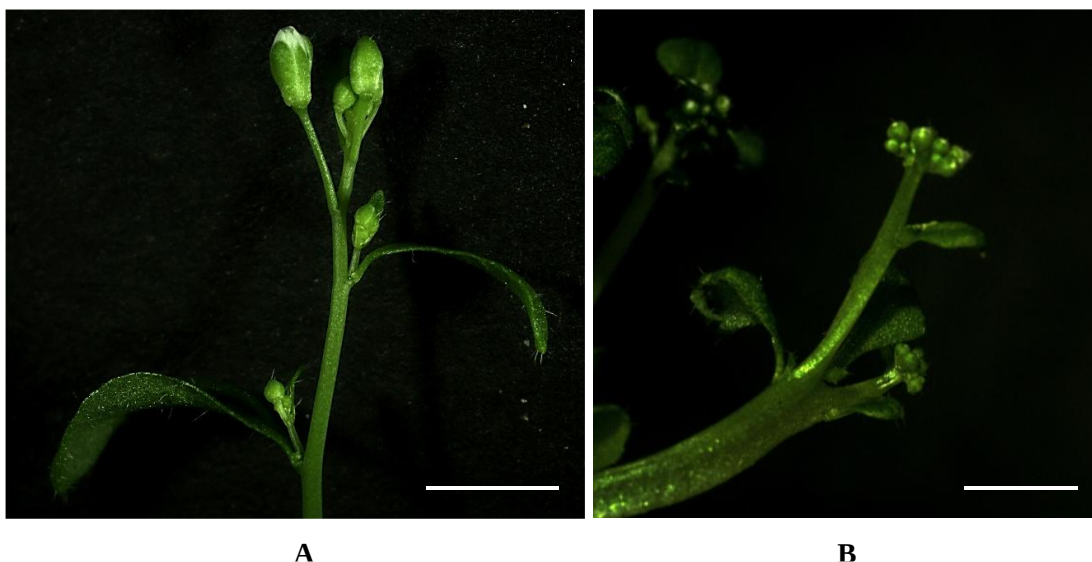


B



C

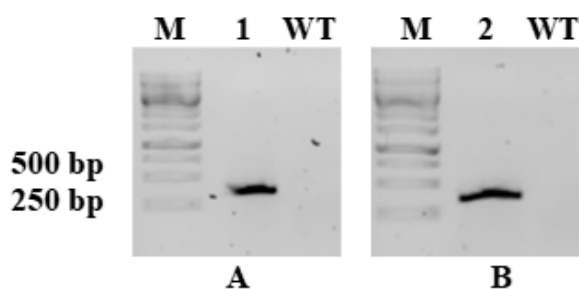
Slika 29. Reprezentativni rezultati ekspresije fenotipa T3 generacije uročnjaka, 10 dana nakon stratifikacije sjemena generacije T2. A) divlji tip (Col-0) uzgajan na mediju MS bez dodatka antibiotika higromicina B; B) SAP11-*like* 3h transformant: nazubljeni i uvijeni listovi; C) SAP54-*like* B4P2 transformant: abnormalan razvoj listova, srašteni listovi. Transgenične biljake uročnjaka su uzgajane na mediju MS uz dodatak antibiotika higromicina B za selekciju. Mjerna skala: 2.5 mm.



Slika 30. Reprezentativni prikaz ekspresije fenotipa T3 generacije uročnjaka, 4 tjedna nakon stratifikacije sjemena generacije T2. A) divlji tip (Col-0); B) SAP54-like B2P4 transformant: abnormalan razvoj stabljike: fascijacija cvijeta i listova, abnormalna organizacija vršnog meristema, skraćeni internodiji, zbijeni pupovi, uvijanje listova. Transgenične biljke uročnjaka su uzgajane na krutoj podlozi MS uz dodatak antibiotika higromicina B za selekciju. Navedeni simptomi su bili prisutni u svim linijama T3 generacije, ali nisu bili jednako izraženi. Mjerna skala: 1 cm.

4.3.2 Dokazivanje prisutnosti T-DNA i ekspresije gena *SAP11-like* i *SAP54-like* u transgeničnim biljkama uročnjaka

Izolirana je ukupna DNA iz tkiva linija *SAP11-like* i *SAP54-like* starih 10 dana i starih 4 tjedna od stratifikacije te divljeg tipa uročnjaka. Metodom PCR dobiven je odgovarajući ampikon gena *SAP11-like* veličine 306 bp iz izolirane ukupne DNA biljaka uročnjaka linija *SAP11-like*, dok je prisutnost gena *SAP54-like* potvrđena umnažanjem nukleotidnog slijeda veličine 330 bp iz izolirane ukupne DNA biljaka uročnjaka linija *SAP54-like* (**Slika 31**).

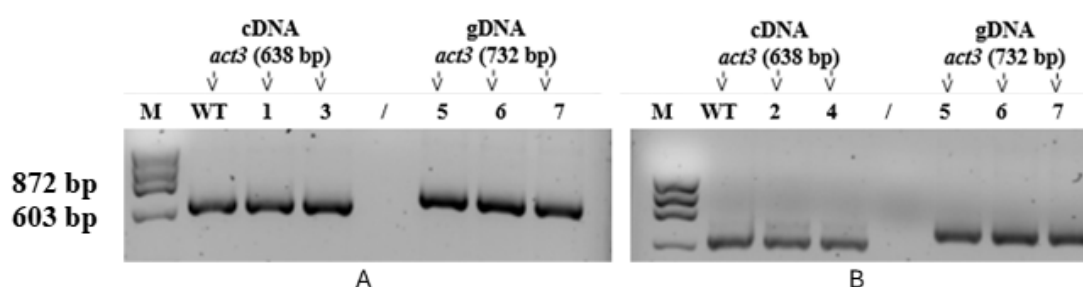


Slika 31. Reprezentativni prikaz elektroforetske analiza PCR produkata umnoženih iz ukupne DNA uročnjaka linija *SAP11-like* 3b i *SAP54-like* B2P4. A) 1: produkt veličine 306 bp potvrđen u liniji *SAP11-like* 3b. WT: negativno B) 2: produkt veličine 330 bp potvrđen u liniji *SAP54-like* B2P4. Standardu za određivanje molekularne mase DNA: 1 kb DNA Ladder GeneRuler™ (Thermo Scientific™, Waltham, SAD).

Prisutnost oba gena u odgovarajućim transformiranim linijama dodatno je potvrđena sekvenciranjem u servisu (Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska), čime je potvrđena integracija T-DNA u transgenične biljke i porijeklo nukleotidnih sljedova *SAP11-like* i *SAP54-like*.

Izolirana RNA iz tkiva uročnjaka linija *SAP11-like* i *SAP54-like* i divljeg tipa, starih 10 od stratifikacije, tretirana je DNazom. Pročišćeni RNA uzorci uročnjaka linija *SAP11-like* i *SAP54-like* i divljeg tipa korišteni su kao kalupi za reverznu transkripciju i sintezu cDNA.

Uspješnost sinteze cDNA i odsutnost kontaminacije gDNA potvrđene su amplifikacijom *act3* gena na temelju dobivenog fragmenta veličine 638 bp, karakterističnog za cDNA (Slika 32).

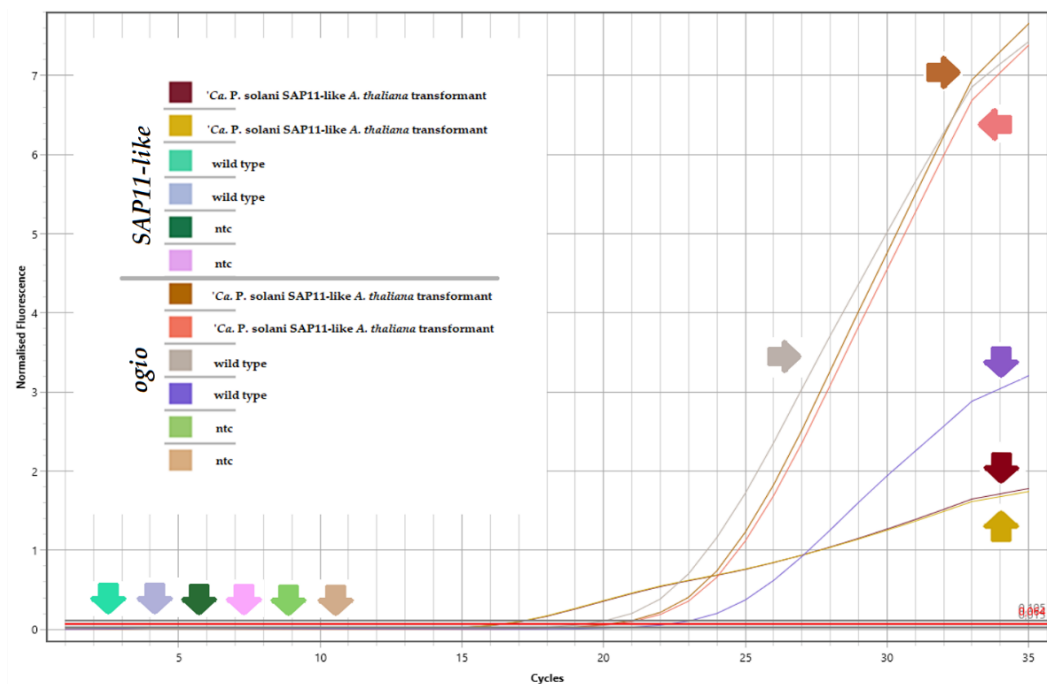


Slika 32. Analiza uspješnosti sinteze cDNA i odsutnosti gDNA elektroforezom na agaroznom gelu, na temelju amplifikacijske linije gena *act3* (cDNA: 638 bp; gDNA:732 bp). A) s lijeva na desno: divlji tip, 1: *SAP11-like* 2b, 3: *SAP11-like* 3b, prazno, 5, 6, 7: pozitivna kontrola; B) s lijeva na desno: divlji tip, 2: *SAP54-like* B2P4, 4: *SAP54-like* B4P2, prazno, 2, 3, 4: pozitivna kontrola. Pozitivne kontrole: DNA prethodno izolirana iz klijanaca divljeg tipa i transformiranih linija uročnjaka). Standardu za određivanje molekularne mase DNA: *ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker*, 9 (Thermo Scientific™ Vilnius, Litva).

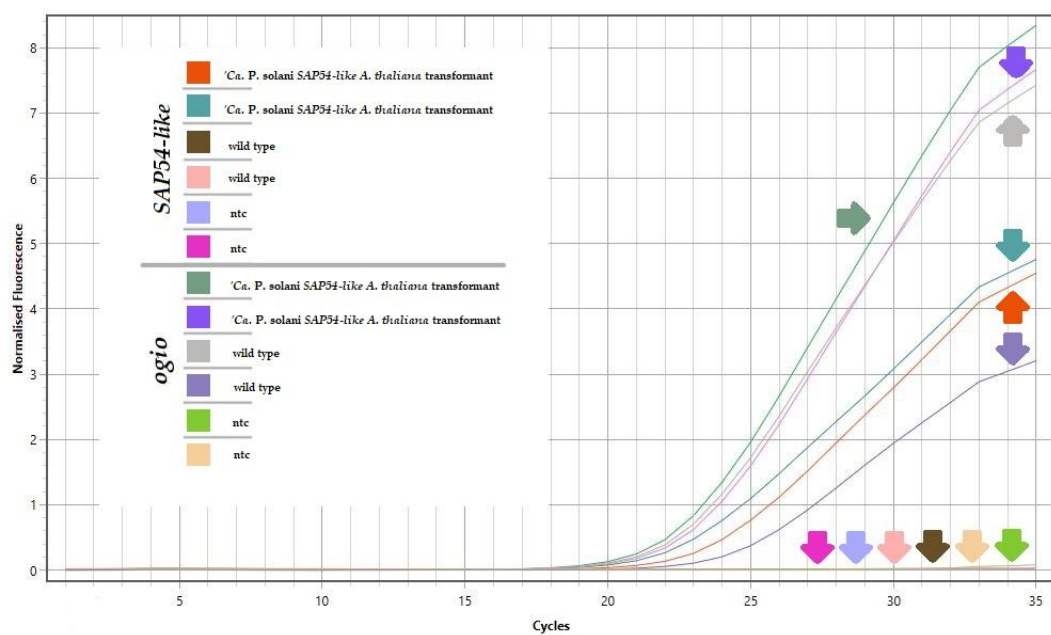
U prvom izvođenju RT-qPCR analize razine ekspresije transgena u odnosu na referentni gen *ogio* provedene su u liniji *SAP11-like* 3b u kojoj je ekspresija gena *SAP11-like* potvrđena, u liniji *SAP54-like* B2P4 u kojoj je potvrđena ekspresija gena *SAP54-like* te u divljem tipu, T3 generacije uročnjaka. Gen *ogio* je korišten za normalizaciju u RT-qPCR analizi zbog njegove stabilne ekspresije u biljkama uročnjaka.

Prosječna vrijednost *Cq* za *SAP11-like* u *SAP11-like* transgeničnim biljkama uročnjaka iznosila je 16.32, dok je ΔCq u odnosu na gen *ogio* iz istih biljaka bio -3.85.

Prosječna vrijednost *Cq* za *SAP54-like* u *SAP54-like* transgeničnim biljkama uročnjaka 20.26, a ΔCq u odnosu na gen *ogio* iz istih transgeničnih biljaka bio 1.13. Ekspresije gena *SAP11-like* u *SAP54-like* B2P4 transgeničnim biljkama te u biljkama divljeg tipa, nije bilo. Ekspresija gena *SAP54-like* nije bila prisutna u *SAP11-like* transgeničnim biljkama, niti u biljkama divljeg tipa uročnjaka U negativnim kontrolama (ntc) nije bilo amplifikacije. Amplifikacijske krivulje su pokazale specifično umnažanje ciljnih fragmenata (Slika 33, Slika 34, Prilog I.1).



Slika 33. Reprezentativni prikaz RT-qPCR: amplifikacijske krivulje ekspresije gena *SAP11-like* i referentnog gena *ogio* u transgeničnim biljkama uročnjaka linije *SAP11-like* 3b te u divljem tipu uročnjaka. Obojene strelice označavaju amplifikacijske krivulje pripadajućih uzoraka i negativnih kontrola (ntc).



Slika 34. Reprezentativni prikaz RT-qPCR: amplifikacijske krivulje ekspresije gena *SAP54-like* i referentnog gena *ogio* u transgeničnim biljkama uročnjaka linije *SAP54-like* B2P4 te u divljem tipu uročnjaka. Obojene strelice označavaju amplifikacijske krivulje pripadajućih uzoraka i negativnih kontrola (ntc).

U drugom izvođenju RT-qPCR analize razine ekspresije transgena u odnosu na referentni gen *act2* provedene su u linijama *SAP11-like* 2b i *SAP11-like* 3b u kojima je ekspresija gena *SAP11-like* potvrđena, u linijama *SAP54-like* B2P4 i *SAP54-like* B4P2 u kojima je potvrđena ekspresija gena *SAP54-like* te u divljem tipu, T3 generacije uročnjaka. Gen *act2* korišten je za normalizaciju u RT-qPCR analizi. Prosječna vrijednost *Cq* za *SAP11-like* u *SAP11-like* 2b transgeničnim biljkama uročnjaka iznosila je 14.33, dok je ΔCq u odnosu na gen *act2* iz istih biljaka bio 1.18. Prosječna vrijednost *Cq* za *SAP11-like* u *SAP11-like* 3b transgeničnim biljkama uročnjaka iznosila je 15.16, dok je ΔCq u odnosu na gen *act2* iz istih biljaka bio 2.20. Prosječna vrijednost *Cq* za *SAP54-like* u *SAP54-like* B2P4 transgeničnim biljkama uročnjaka iznosila je 19.58, a ΔCq u odnosu na gen *act2* iz istih transgeničnih biljaka bio 6.30. Prosječna vrijednost *Cq* za *SAP54-like* u *SAP54-like* B4P2 transgeničnim biljkama uročnjaka iznosila je 17.34, a ΔCq u odnosu na gen *act2* iz istih transgeničnih biljaka bio 3.32.

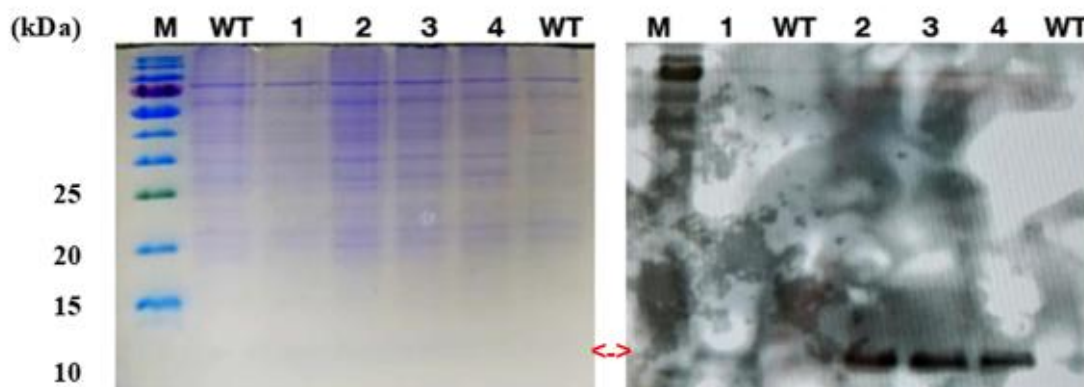
Ekspresije gena *SAP11-like* u linijama *SAP54-like* B2P4 i *SAP54-like* B4P2 transgeničnih biljaka te u biljkama divljeg tipa uročnjaka, nije bilo. Ekspresija gena *SAP54-like* nije bila prisutna u linijama *SAP11-like* 2b i *SAP11-like* 3b transgeničnih biljaka, niti u biljkama divljeg tipa uročnjaka.

U negativnim kontrolama (ntc) nije bilo amplifikacije. Amplifikacijske krivulje su pokazale specifično umnažanje ciljnih fragmenata (**Prilog I.2**).

4.3.3 Izolacija i imunodetekcija proteina *SAP11-like* i *SAP54-like* iz klijanaca uročnjaka

Ukupni proteini su izolirani iz tkiva T3 generacije, 15 dana starih klijanaca, linija *SAP11-like* 2b, *SAP11-like* 3b, *SAP54-like* B2P4 i *SAP54-like* B4P2 te divljeg tipa uročnjaka. Uspješnost izolacije proteinskih uzoraka analizirana je SDS-PAGE elektroforezom i bojenjem *Coomassie Brilliant Blue* bojom (**Slika 35A**).

Proteini *SAP11-like* i *SAP54-like* potvrđeni su imunodetekcijom na PVDF membrani, pomoću anti-His₆ monoklonskog protutijela, budući da su oba proteina označena His₆-biljegom na C-terminalnom kraju nukleotidnog slijeda. Specifični proteinski signali zabilježeni su u uzorcima *SAP11-like* 2b, *SAP11-like* 3b, *SAP54-like* B2P4 i *SAP54-like* B4P2, dok u uzorku divljeg tipa nije uočen signal. (**Slika 35B**) Detektirani signali odgovarali su veličini rekombinantnih proteina *SAP11-like* i *SAP54-like* (~10-15 kDa).



Slika 35. Izolacija His₆-označenih SAP11-like i SAP54-like proteina u transgeničnim linijama uročnjaka.

A) SDS-PAGE analiza ukupnih proteina obojenih Coomassie Brilliant Blue bojom. B) *Western blot* analiza provedena je upotrebom anti-His protutijela za imunodetekciju proteina označenih His₆-biljegom (~10-15 kDa) na PVDF membrani. Oznake uzoraka: WT: divlji tip); 1: SAP54-like B4P2; 2: SAP11-like 2b; 3: SAP11-like 3b; 4: SAP54-like B2P4. M: proteinski standard *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (10–250 kDa) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD).

4.3.4 Fenotipska i statistička analiza SAP11-like i SAP54-like homozigotnih transgeničnih uročnjaka

Za potrebe detaljne fenotipske karakterizacije iz T3 generacije su odabrane homozigotne linije SAP11-like 2b, SAP11-like 3b, kod kojih je potvrđena prekomjerna ekspresija transgena *SAP11-like*, te homozigotne linije SAP54-like B2P4 i SAP54-like B4P2 za uročnjake kod kojih je potvrđena prekomjernu ekspresiju *SAP54-like*.

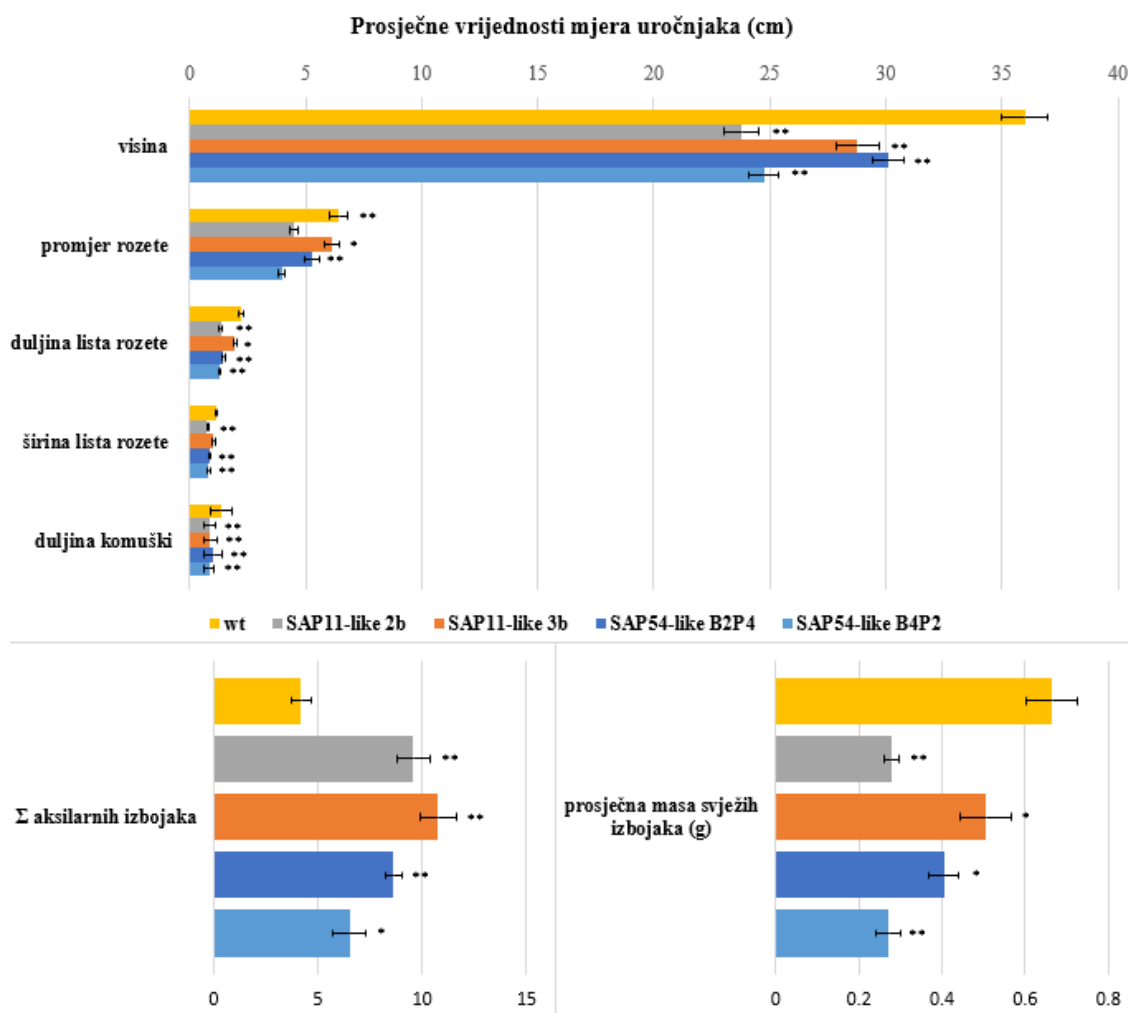
Fenotipske promijene uočene su kod homozigotnih klijanaca starih 10 dana od stratifikacije, uzgojenih iz sjemena posijanog na krutu podlogu MS uz dodatak saharoze 20 g/L bez dodatka antibiotika higromicina B. U usporedbi s biljkama divljeg tipa, transgene linije pokazivale su promjene u morfologiji listova i razvoju rozete. Klijanici linije SAP11-like 2b imali su karakteristično nazubljene listove, zadebljane i uvrnute listove poremećene simetrije. Sličan fenotip uočen je kod klijanaca linije SAP11-like 3b, ali uz karakteristično nazubljene, zadebljane i uvrnute, uočen je i povećan broj listova poremećene simetrije (**Prilog F**).

Kod klijanaca linije SAP54-like B2P4 uočeno je uvijanje, poremećena simetrija i povećan broj listova, dok je kod klijanaca linije SAP54-like B4P2 fenotip karakterizirala smanjena veličina, uvijanje, poremećena simetrija i povećan broj listova. Opisane fenotipske promijene nisu opažene kod biljaka divljeg tipa (**Prilog F**).

Fenotipske promjene transgeničnih uročnjaka detaljno su analizirane i statistički obrađene za biljke uzgajane u uvjetima dugog i kratkog dana, 45 dana od stratifikacije.

U uvjetima dugog dana, transgene linije uročnjaka SAP11-like 2b, SAP54-like B2P4, SAP54-like B4P2 pokazale su statistički značajne razlike u svim mjerenim parametrima u odnosu na biljke divljeg tipa (Error! Reference source not found., **Slika 36**).

Kod navedenih biljaka zabilježene su manje vrijednosti mase svježih izbojaka, visine biljaka, promjera rozete, duljine i širine listova rozete u odnosu na vrijednosti izmjerene za divlji tip uročnjaka. Kod linije SAP11-like 3b razlike u promjeru rozete i širini listova nisu bile statistički značajne u odnosu na divlji tip, dok su ostali mjereni parametri imali niže vrijednosti. (**Prilog I.3, Slika 36**). Broj aksilarnih izbojaka za sve transgene bio je značajno veći (**Slika 37**), a komuške su bile značajno kraće, nego komuške biljaka divljeg tipa (**Slika 37A, B**).



Slika 36. Prosječne vrijednosti parametara visine, promjera rozete, duljine i širine lista rozete, duljine komuški, mase svježih izbojaka i ukupan broj aksilarnih izbojaka divljeg tipa i transgeničnih uročnjaka uzgajanih u uvjetima dugog dana (16h svjetla/8h tame). Istaknuta je vrijednosti standardne greške (SE). Razlike između divljeg tipa (wt) i transformiranih biljaka uročnjaka statistički su značajne ako su označene jednom ($p < 0.05$) ili dvjema ($p < 0.0001$) zvjezdicama, kako je utvrđeno Studentovim t-testom.



A



B

C

Slika 37. Reprezentativan prikaz fenotipa transgeničnih biljaka uročnjaka linije SAP54-like B2P4 i SAP54-like B4P2 s prekomjernom ekspresijom gena SAP54-like fitoplazme ‘*Ca. P. solani*’ u usporedbi s biljkama divljeg tipa (WT), 5 tjedana nakon stratifikacije. Biljke uročnjaka su uzgajane u uvjetima dugog dana (16h svjetlo/8h tama). A) pojačano grananje u vidu povećanja broja aksilarnih izbojaka u transgena linije SAP54-like B2P4; B) pojačano grananje u vidu povećanja broja aksilarnih izbojaka u transgena linije SAP54-like B2P4; C) Aksilarni izbojci transgena linije SAP54-like B4P2. Mjerna skala: 1cm.



Slika 38. Reprezentativan prikaz fenotipskih promjena uzrokovanih ekspresijom SAP11-like i SAP54-like efektor fitoplazme 'Ca. P. solani' u transgeničnim linijama uročnjaka uzgajanih u uvjetima dugog dana (16h svjetlo/8h tama). A) komuške, s lijeva na desno: divlji tip; nepravilne, naborane i skraćene komuške: SAP11-like 2b i SAP11-like 3b; B) komuške, s lijeva na desno: divlji tip; nepravilne, zadebljane i skraćene komuške: SAP54-like B2P4 i SAP54-like B4P2; C) korjenčići 15 dana starih klijanaca, s lijeva na desno: divlji tip; dulji i razgranatiji korijenov sustav: SAP11-like 2b i SAP11-like 3b; D) korjenčići 15 dana starih klijanaca, s lijeva na desno: divlji tip; dulji i razgranatiji korijenov sustav: SAP54-like B2P4 i SAP54-like B4P2. Mjerna skala: 5 mm.

Osim promjena u veličini komuški (**Slika 38 A,B**), kod linija SAP54-like B2P4 i SAP54-like B4P2 promijenjena je i organizacija reproduktivnih organa, pri čemu su uočeni srašteni cvjetni pupovi te skraćena duljina tučka u odnosu na duljinu prašnika uročnjaka (**Slika 39**).

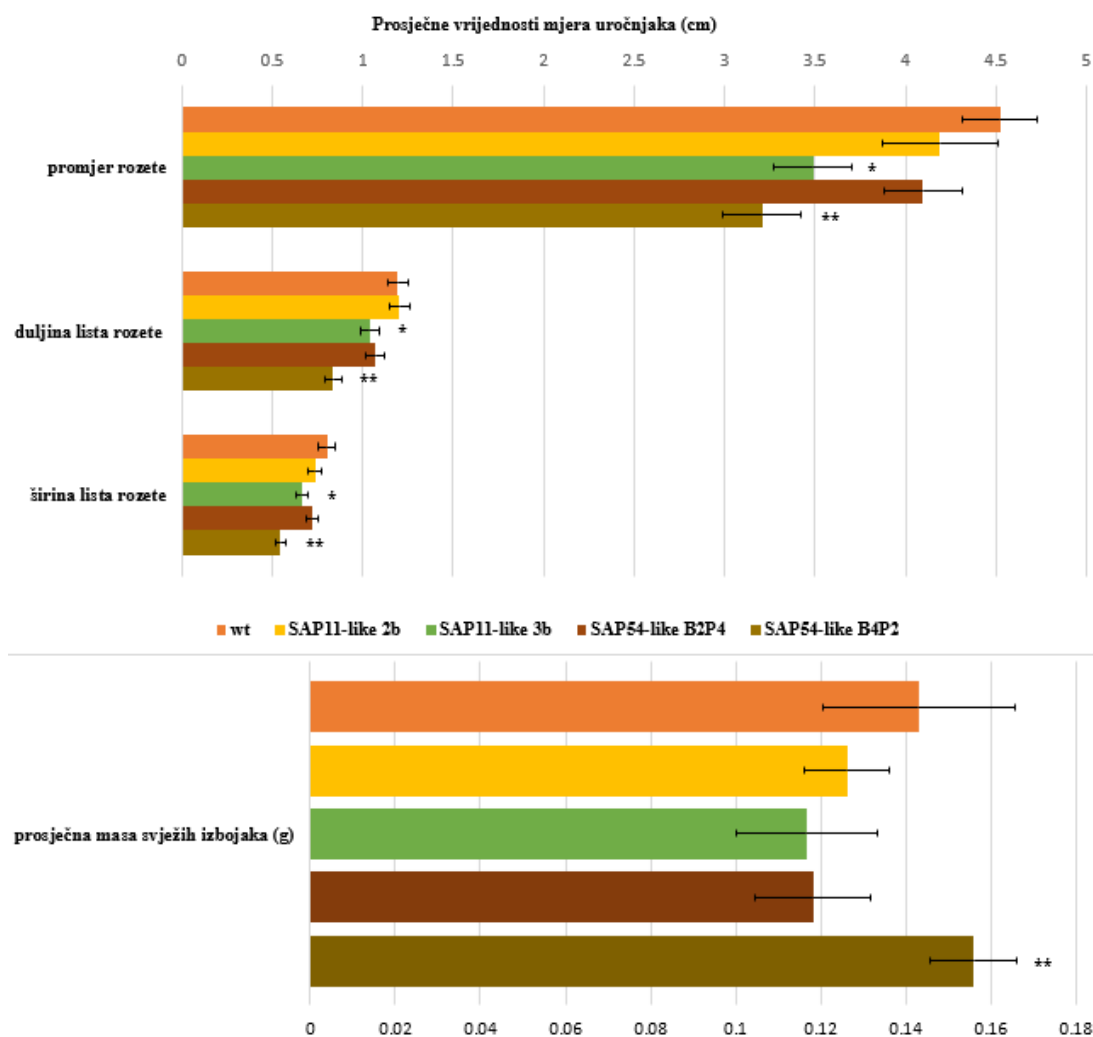


Slika 39. Reprezentativni prikaz morfologije cvijeta divljeg tipa i transgene linije SAP54-like B2P4 uročnjaka s prekomjernom ekspresijom efektor SAP54-like fitoplazme 'Ca. P. solani', uzgajanih u uvjetima dugog dana (16h svjetlo/8h tama), 5 tjedana nakon stratifikacije. A) cvijet divljeg tipa uročnjaka-pogled odozgo; B) cvijet divljeg tipa uročnjaka-bočni prikaz; C) cvijet transgene linije SAP54-like B2P4 s promijenjenom organizacijom reproduktivnih organa, pri čemu je tučak kraći od prašnika i tučka u biljaka divljeg tipa, a pupovi srašteni. Mjerna skala: 5 mm.

Transgenične biljke s prekomjernom ekspresijom gena *SAP11-like* pokazivale su promijenjenu morfologiju listova, uključujući kovrčavost, naboranost i uvijanje liske, reducirani rast biljaka, nepravilno grananje stabljike te skraćene i deformirane komuške (**Slika 38A**). Promjene su opažene i u morfologiji korijena (**Slika 38C**).

Transgenične biljke s prekomjernom ekspresijom gena *SAP54-like* razvile su fenotip karakteriziran smanjenom veličinom listova, pojačanim i nepravilnim grananjem stabljike, promjenama u razvoju rozete, pupova i organizaciji cvjetnih organa te povećanom gustoćom trihoma (**Slika 37**). Uočene su i promjene u morfologiji komuški (**Slika 38C**) i korijena (**Slika 38D**).

Transgenične biljke uročnjaka uzgajane u uvjetima kratkog dana pokazivale su blaže fenotipske promjene u statističkoj analizi parametara mase svježih izbojaka, promjera duljine i širine lista rozete. Linije *SAP11-like* 2b i *SAP54-like* B2P4 nisu pokazale statistički značajne razlike u analiziranim parametrima u odnosu na divlji tip. Za liniju *SAP11-like* 3b utvrđene su statistički značajne razlike u promjeru te u duljini i širini listova rozete. Linija *SAP54-like* B4P2 pokazala je povećanu masu svježih izbojaka, dok su promjer te duljina i širina listova rozete bili značajno manji u usporedbi s biljkama divljeg tipa (**Prilog I.4, Slika 40**).



Slika 40. Usporedba prosječne vrijednosti parametara promjera rozete, duljine lista rozete i širine lista rozete divljeg tipa i transgeničnih uročnjaka uzgajanih u uvjetima kratkog dana (8h svjetla/16h tame). Istaknute su vrijednosti standardne greške (SE). Razlike između divljeg tipa (wt) i transformiranih biljaka uročnjaka statistički su značajne ako su označene jednom ($p < 0.05$) ili dvjema ($p < 0.0001$) zvjezdicama, kako je utvrđeno Studentovim t-testom.

U uvjetima kratkog dana (**Poglavlje 3.2.4.2**) i transgenične biljke s prekomjernom ekspresijom gena *SAP11-like*, pokazivale su promijenjenu morfologiju listova, uključujući kovrčavost, uvijanje, nazubljenost i naboranost liske, reducirani rast biljaka, nepravilno grananje stabljike te skraćene i deformirane komuške (**Slika 41, Slika 42**). Dok su transgenične biljke s prekomjernom ekspresijom gena *SAP54-like* također razvile fenotip karakteriziran smanjenom veličinom listova, pojačanim i nepravilnim grananjem stabljike, promjenama u razvoju rozete, pupova i organizaciji cvjetnih organa te povećanom gustoćom trihoma (**Slika 43, Slika 44**). Uočene su i promjene u morfologiji komuški (**Slika 38C**).



A



B

C

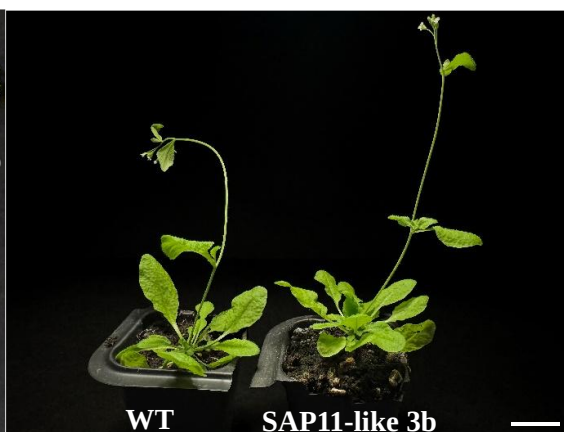
Slika 41. Fenotip transgeničnih biljaka uročnjaka linije *SAP11-like 2b* s prekomjernom ekspresijom gena *SAP11-like* fitoplazme '*Ca. P. solani*' u usporedbi s biljkama divljeg tipa (WT). Prikaz biljaka uzgajanih u uvjetima kratkog dana (8h svjetla/16h tame), 5 tjedana od stratifikacije. A) transgene linije *SAP11-like 2b* pokazivale su smanjeni rast i promijenjenu morfologiju listova, uključujući uvijanje, naboranost i nazubljenost; B) transgenične biljke pokazivale su reducirani rast i nepravilno grananje stabljike u odnosu na divlji tip-bočni prikaz; C) detalj rozete transgene linije *SAP11-like 2b* s izraženom deformacijom i kovrčavosti listova. Mjerna skala: 1 cm.



A



B



C

Slika 42. Fenotip transgeničnih biljaka uročnjaka linije *SAP11-like 3b* s prekomjernom ekspresijom gena *SAP11-like* fitoplazme '*Ca. P. solani*' u usporedbi s biljkama divljeg tipa (WT). Prikaz biljaka uzgajanih u uvjetima kratkog dana (8h svjetla/16h tame), 5 tjedana nakon stratifikacije. A) transgenične biljke pokazivale su smanjeni rast te promijenjenu morfologiju listova, uključujući uvijanje, naboranost i nazubljenost liske; B) usporedba morfologije listova rozete transgene linije *SAP11-like 3b* (gore) i biljaka divljeg tipa (dolje), pri čemu su kod transgeničnih biljaka listovi bili manji, nazubljeni i asimetrični; C) transgenične biljke pokazivale su reducirani rast i promijenjenu arhitekturu stabljike u odnosu na divlji tip-bočni prikaz. Mjerna skala: 1 cm.



A



B

C

Slika 43. Fenotip transgeničnih biljaka uročnjaka linije SAP54-like B2P4 s prekomjernom ekspresijom gena SAP54-like fitoplazme 'Ca. P. solani' u usporedbi s biljkama divljeg tipa (WT). Prikaz biljaka uzgajanih u uvjetima kratkog dana (8h svjetla/16h tame), 5 tjedana nakon stratifikacije. A) transgenične biljke pokazivale su promijenjenu morfologiju listova, uključujući povećanu gustoću trihoma; B) transgenične biljke pokazivale su reducirani rast i promijenjenu arhitekturu stabljike i promijenjenu morfologiju listova rozete u odnosu na divlji tip-bočni prikaz; C) uvećani detalj vršnog dijela transgenične biljke linije SAP54-like B2P4; povećana gustoća trihoma na listovima izraženog poremećaja filotaksije. Mjerna skala: 1 cm.



A



B

C

Slika 44. Fenotip transgeničnih biljaka uročnjaka linije *SAP54-like B4P2* s prekomjernom ekspresijom gena *SAP54-like* fitoplazme '*Ca. P. solani*' u usporedbi s biljkama divljeg tipa (WT). Prikaz biljaka uzgajanih u uvjetima kratkog dana (8h svjetla/16h tame), 5 tjedana nakon stratifikacije. A) transgenične biljke pokazivale su promijenjenu morfologiju listova, uključujući asimetriju listova; B) transgenične biljke pokazivale su povećan broj aksilarnih izdanaka i promijenjenu morfologiju listova rozete u odnosu na divlji tip-bočni prikaz; C) uvećani detalj vršnog dijela transgenične biljke linije *SAP54-like B4P2*; povećana gustoća trihoma na stabljici i listovima s izraženim poremećajem filotaksije. Mjerna skala: 1 cm.

U konačnici, iako postoji razlika u ekspresiji fenotipa transgeničnih linija uročnjaka ovisno o uvjetima uzgoja, transgenične biljke s prekomjernom ekspresijom gena *SAP11-like* pokazivale su promijenjenu morfologiju listova, uključujući kovrčavost, naboranost i uvijanje liske, reducirani rast biljaka, nepravilno grananje stabljike te skraćene i deformirane komuške. Promjene su opažene i u morfologiji korijena (**Slika 38C**).

Transgenične biljke s prekomjernom ekspresijom gena *SAP54-like* razvile su fenotip karakteriziran smanjenom veličinom listova, pojačanim i nepravilnim grananjem stabljike, promjenama u razvoju rozete, povećanom gustoćom trihoma, promjenama u razvoju pupova i organizaciji cvjetnih organa. Uočene su promjene i u morfologiji komuški i korijena (**Slika 38D**).

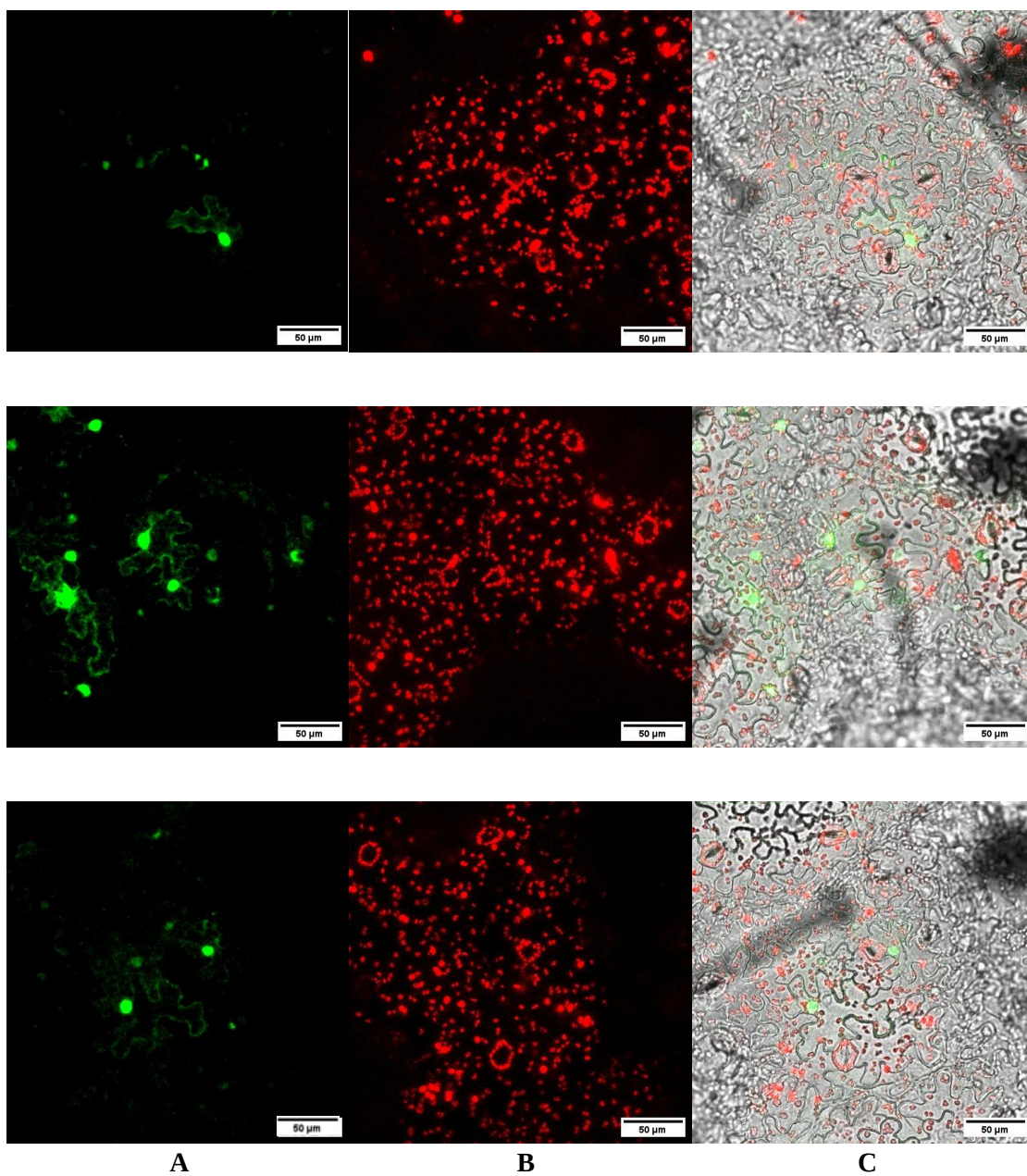
Fenotipske promjene bile su vidljive već u ranim fazama razvoja biljaka, a intenzitet simptoma razlikovao se među analiziranim transgeničnim linijama.

4.4 Analiza proteinskih interakcija metodom BiFC

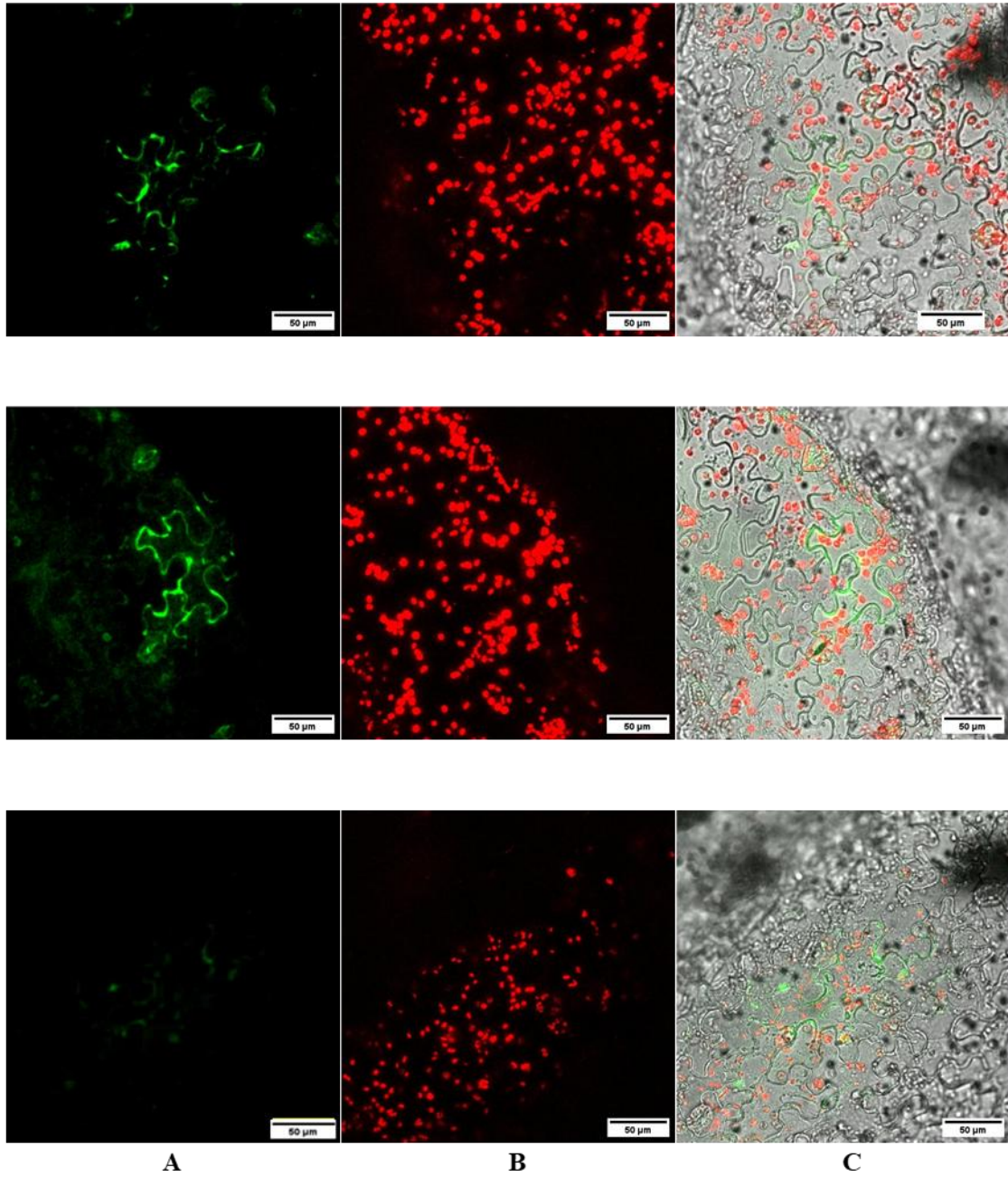
4.4.1 Interakcija *SAP11-like* proteina s AtTCP2 i AtTCP4 proteinima

Mikroskopiranjem preparata epidermskih stanica donje strane agroinfiltriranih listova duhana detektiran je pozitivan YFP fluorescencijski signal u oba eksperimentalna uzorka, čime je potvrđena uspješna ekspresija rekombinantnih proteina efektor fitoplazme '*Ca. P. solani*' i istraživanih biljnih transkripcijskih faktora *in planta*.

U eksperimentalnom uzorku u kojem se istraživala interakcija proteina *SAP11-like* i AtTCP2 zabilježen je YFP signal jakog intenziteta, lokaliziran u citoplazmi i jezgri epidermskih stanica agroinfiltriranih listova duhana (**Slika 45**). Detekcija YFP signala potvrđuje ostvarenje *in planta* interakcije između efekorskog proteina *SAP11-like* i transkripcijskog faktora AtTCP2. U eksperimentalnom uzorku u kojem se istraživala interakcija proteina *SAP11-like* i AtTCP4 također je zabilježen YFP signal jakog intenziteta, pri čemu je signal bio lokaliziran isključivo u citoplazmi epidermskih stanica agroinfiltriranih listova duhana (**Slika 46**). Dobiveni rezultat potvrđuje *in planta* interakciju efekorskog proteina *SAP11-like* i transkripcijskog faktora AtTCP4 te ukazuje na različitu subcelularnu lokalizaciju istraživanih proteinskih interakcija. U preparatima negativnih kontrola iz listova duhana nije uočen fluorescencijski signal u epidermskim stanicama, što potvrđuje specifičnost opaženih interakcija. Pozitivna kontrola pokazala je očekivani EGFP signal, čime je potvrđena uspješnost agroinfiltracije (**Prilog G.1**). Prikazani rezultati predstavljaju tri neovisno provedena pokusa za svaku istraživanu interakciju.



Slika 45. Detekcija signala interakcije proteina SAP11-like fitoplazme '*Ca. P. solani*' s transkripcijskim faktorom AtTCP2 u epidermskim stanicama listova duhana primjenom metode BiFC. A) YFP fluorescencijski signal interakcije SAP11-like i AtTCP2 lokaliziran u citoplazmi i jezgri stanica; B) autofluorescencija klorofila duhana; C) preklapljena slika YFP signala i autofluorescencije klorofila u svijetlom polju. Prikazani su reprezentativni rezultati tri neovisno provedena pokusa. Mjerna skala: 50 µm.



Slika 46. Detekcija signala interakcije proteina SAP11-like fitoplazme '*Ca. P. solani*' s transkripcijskim faktorom AtTCP4 u epidermskim stanicama listova duhana primjenom metode BiFC. A) YFP fluorescencijski signal interakcije SAP11-like i AtTCP4 lokaliziran u citoplazmi stanica; B) autofluorescencija klorofila duhana; C) preklopljena slika YFP signala i autofluorescencije klorofila u svijetlom polju. Prikazani su reprezentativni rezultati tri neovisno provedena pokusa. Mjerna skala: 50 µm.

4.4.2 Interakcija SAP54-like proteina s AtAP1 i AtSEP3 proteinima

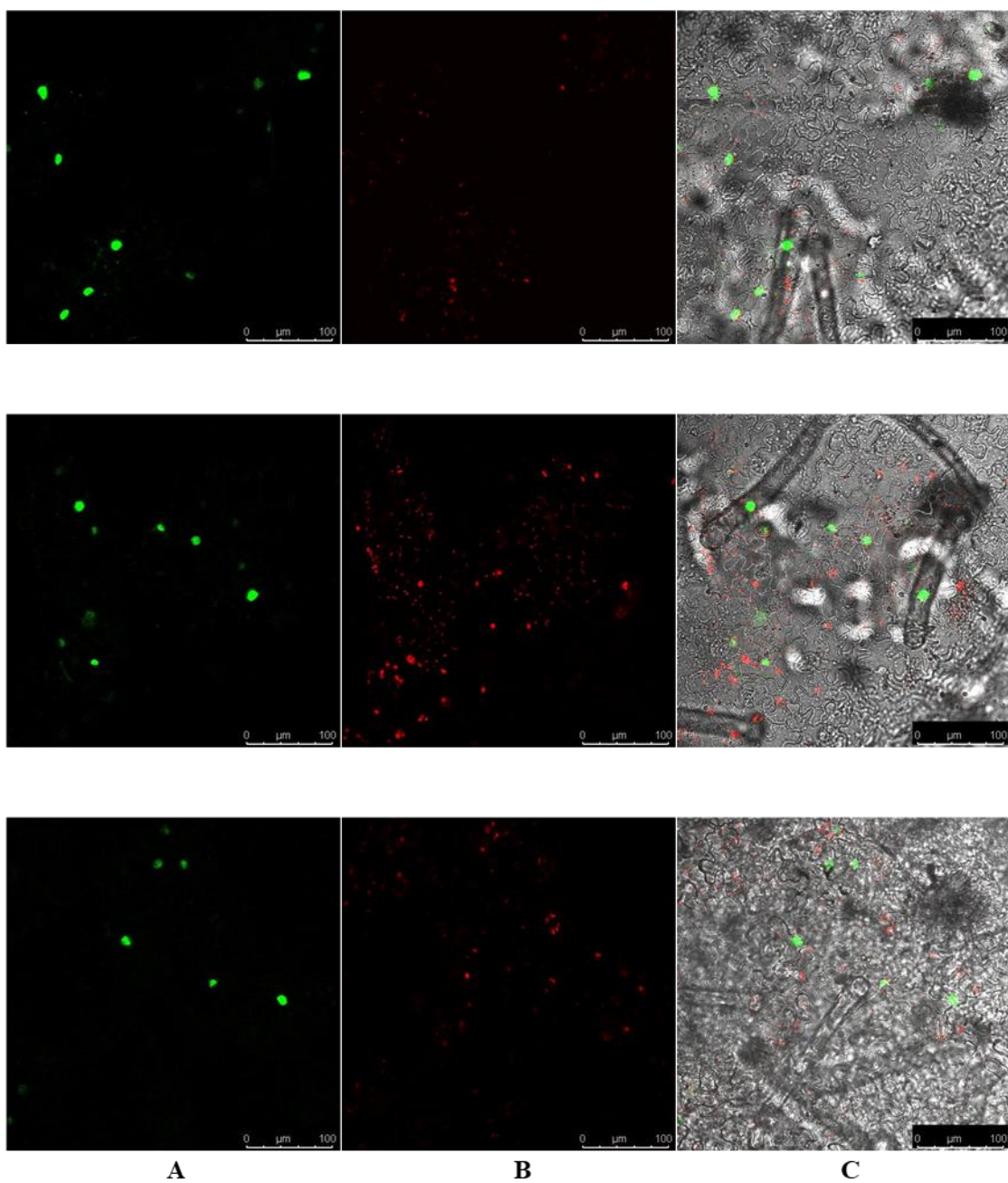
Mikroskopiranjem preparata epidermskih stanica donje strane agroinfiltriranih listova duhana detektiran je pozitivan YFP fluorescencijski signal u oba eksperimentalna uzorka, čime je potvrđena uspješna ekspresija SAP54-like, rekombinantnog proteina efektor fitoplazme 'Ca. P. solani i istraživanih biljnih transkripcijskih faktora *in planta*.

U eksperimentalnom uzorku u kojem se istraživala interakcija proteina SAP54-like i AtAP1 zabilježen je YFP signal jakog intenziteta, dominantno lokaliziran u jezgrama epidermskih stanica agroinfiltriranih listova duhana (**Slika 47**). Detekcija YFP signala potvrđuje ostvarenje *in planta* interakcije između efekorskog proteina SAP54-like i transkripcijskog faktora AtAP1.

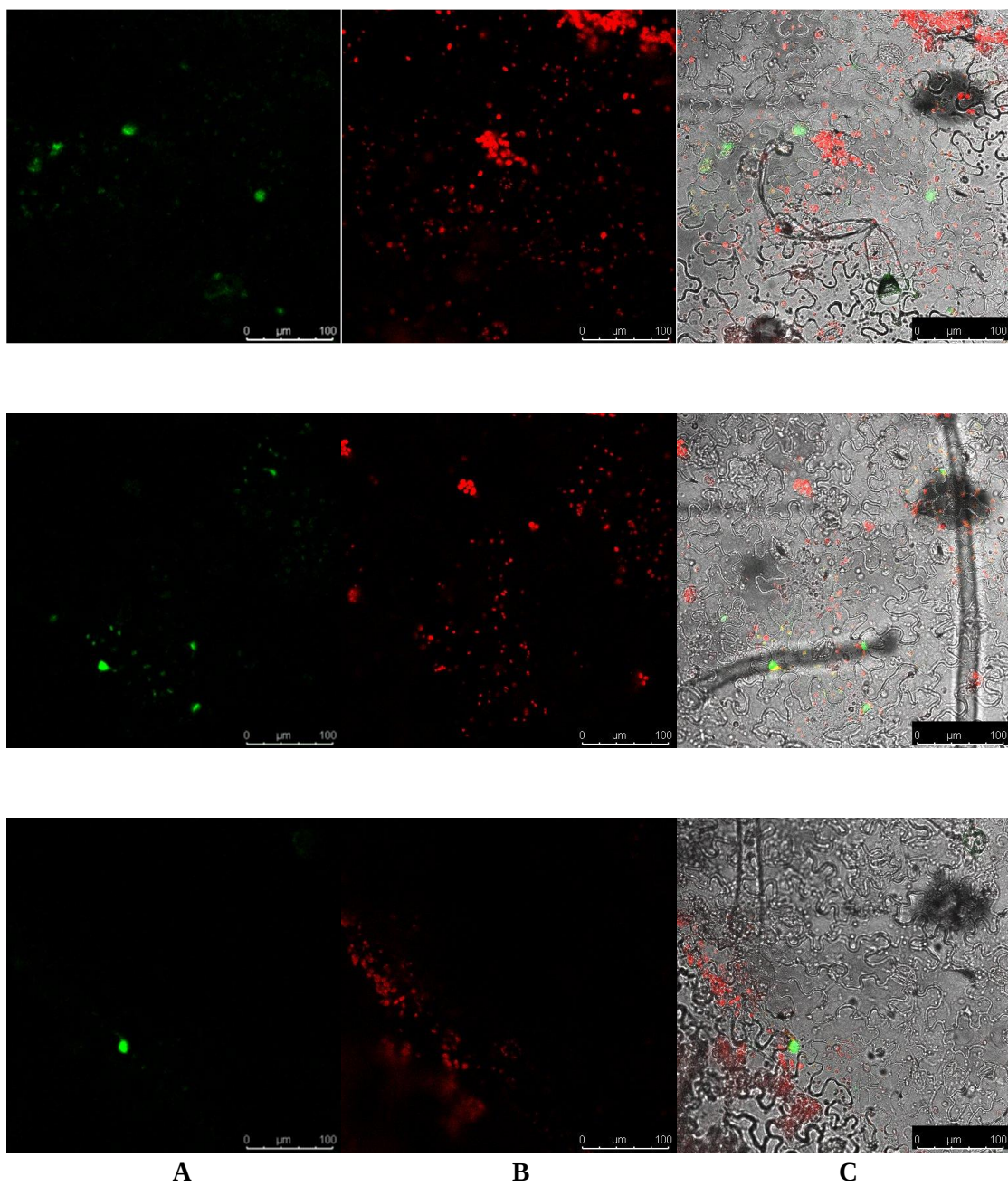
U eksperimentalnom uzorku u kojem se istraživala interakcija proteina SAP54-like i AtSEP3 također je zabilježen YFP signal jakog intenziteta, dominantno lokaliziran u jezgrama epidermskih stanica agroinfiltriranih listova duhana. Dobiveni rezultat potvrđuje *in planta* interakciju efekorskog proteina SAP54-like i transkripcijskog faktora AtSEP3 (**Slika 48**).

U preparatima epidermskih stanica agroinfiltriranih listova duhana negativnim kontrolnim suspenzijama nije uočen fluorescencijski signal, što potvrđuje specifičnost opaženih interakcija. Pozitivna kontrola pokazala je očekivani EGFP signal, čime je potvrđena uspješnost agroinfiltracije (**Prilog G.2**).

Prikazani rezultati predstavljaju tri neovisno provedena pokusa za svaku istraživanu interakciju.



Slika 47. Detekcija signala interakcije proteina *SAP54-like* fitoplazme '*Ca. P. solani*' s transkripcijskim faktorom *AtAP1* u epidermskim stanicama listova duhana primjenom metode BiFC. A) YFP fluorescencijski signal interakcije *SAP54-like* i *AtAP1* lokaliziran u jezgri stanica; B) autofluorescencija klorofila duhana; C) preklapljena slika YFP signala i autofluorescencije klorofila u svijetlom polju. Prikazani su reprezentativni rezultati tri neovisno provedena pokusa. Mjerna skala: 50 µm



Slika 48 Detekcija signala interakcije proteina *SAP54-like* fitoplazme '*Ca. P. solani*' s transkripcijskim faktorom SEP3 u epidermskim stanicama listova duhana primjenom metode BiFC. A) YFP fluorescencijski signal interakcije *SAP54-like* i SEP3 lokaliziran u jezgri stanica; B) autofluorescencija klorofila duhana; C) preklopljena slika YFP signala i autofluorescencije klorofila u svijetlom polju. Prikazani su reprezentativni rezultati tri neovisno provedena pokusa. Mjerna skala: 50 µm.

4.4.3 Interakcija ST6 i ST9 proteina s proteinom aktinom kukca

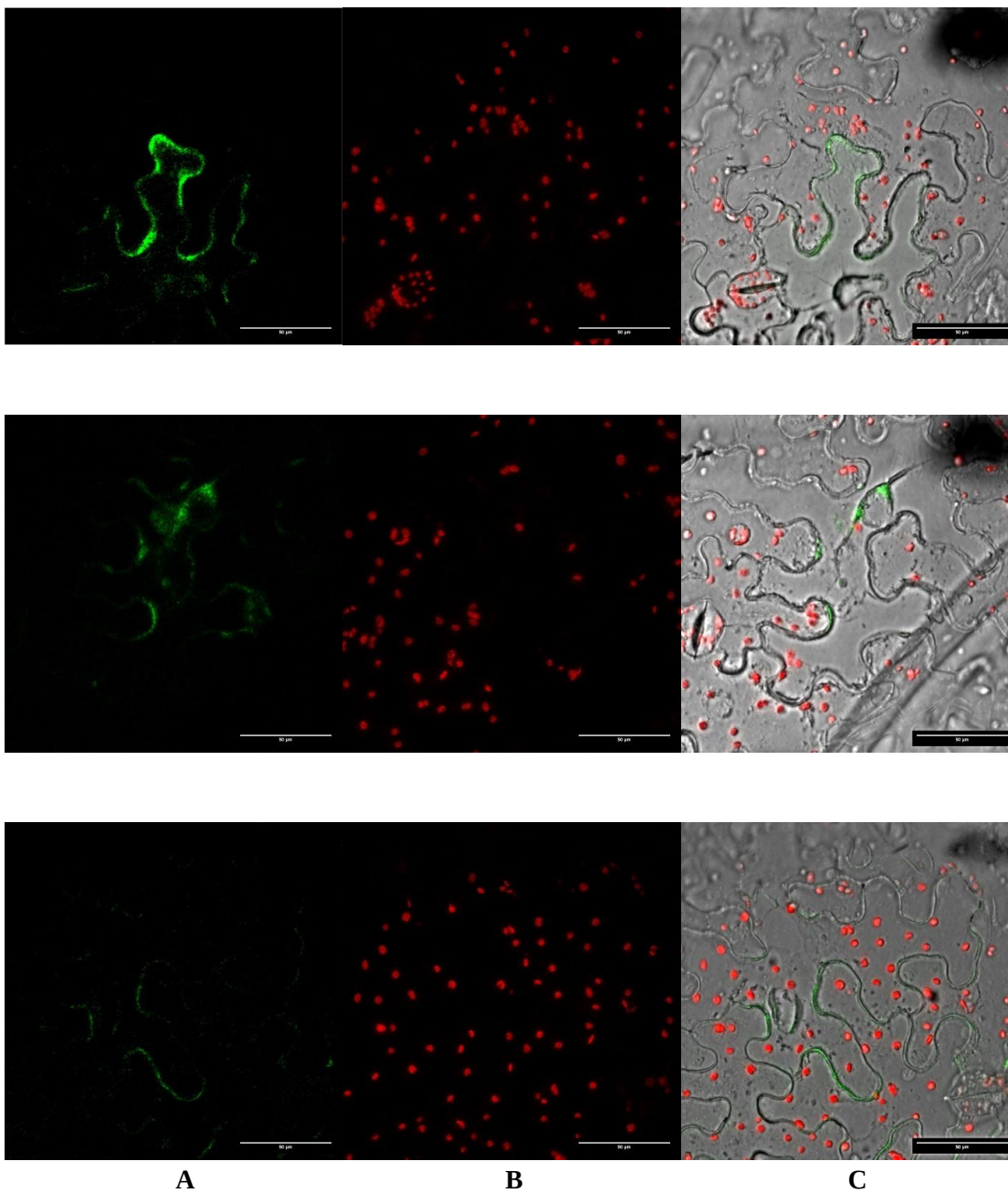
Mikroskopiranjem preparata epidermskih stanica donje strane agroinfiltriranih listova duhana detektiran je pozitivan YFP fluorescencijski signal u eksperimentalnim uzorcima u kojima se istraživala interakcija genotipova ST6 i ST9 transmembranskog proteina STAMP fitoplazme 'Ca. P. solani s aktinom kukca *H. obsoletus*, čime je potvrđena uspješna ekspresija rekombinantnih proteina *in planta*.

U obje istraživane interakcije zabilježen je YFP signal slabijeg intenziteta, lokaliziran u citoplazmi epidermskih stanica agroinfiltriranih listova duhana (**Slika 49, Slika 50**). Detekcija YFP signala potvrđuje ostvarenje interakcije proteina ST6 i ST9 s aktinom.

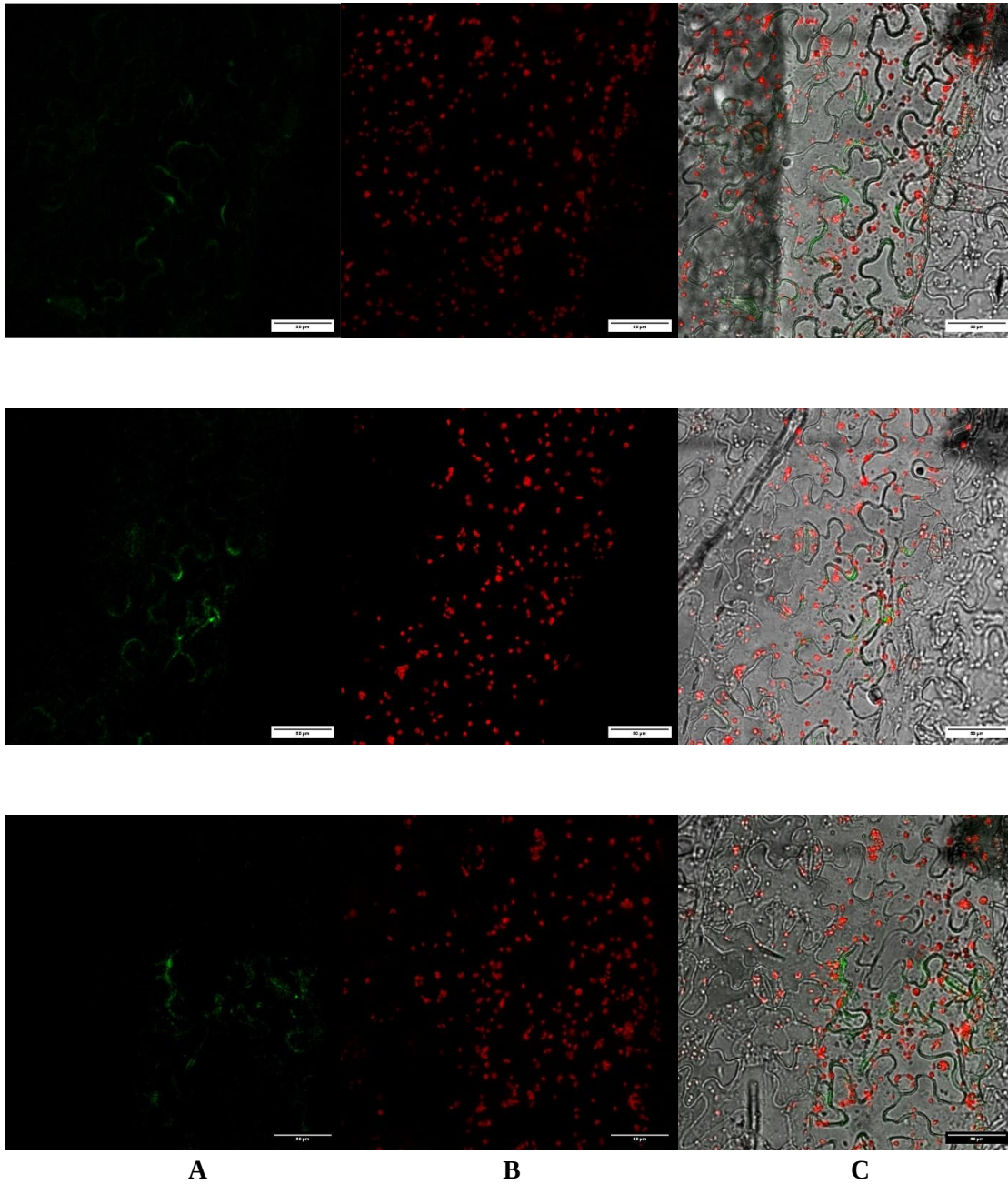
U preparatima epidermskih stanica donje strane listova duhana agroinfiltriranih negativnim kontrolnim suspenzijama nije uočen fluorescencijski signal, što potvrđuje specifičnost opaženih proteinskih interakcija.

Očekivano, u pozitivnoj kontroli zabilježen je EGFP signal u epidermskim stanicama, čime je potvrđena uspješnost provedene agroinfiltracije i ekspresije rekombinantnih proteina (**Prilog G.3**).

Prikazani rezultati predstavljaju tri neovisno provedena pokusa za svaku istraživanu interakciju.



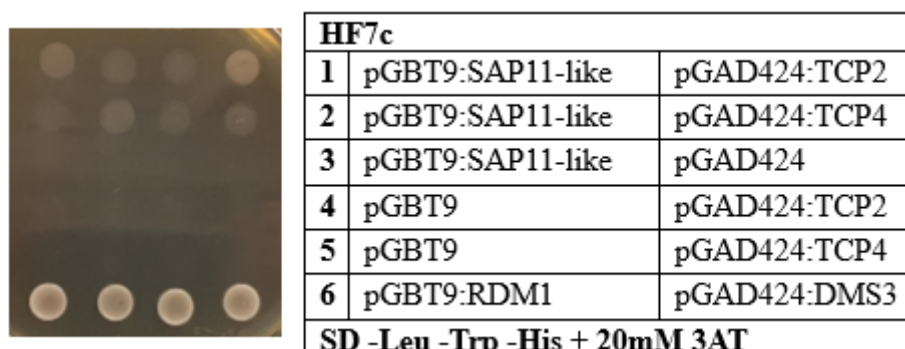
Slika 49. Detekcija signala interakcije ST6 transmembranskog proteina fitoplazme '*Ca. P. solani*' s proteinom aktinom kukca *H. obsoletus* u epidermskim stanicama listova duhana primjenom metode BiFC. A) YFP fluorescencijski signal interakcije ST6 i aktin lokaliziran u jezgri stanica; B) autofluorescencija klorofila duhana; C) preklapljena slika YFP signala i autofluorescencije klorofila u svijetlom polju. Prikazani su reprezentativni rezultati tri neovisno provedena pokusa. Mjerna skala: 50 µm.



Slika 50. Detekcija signala interakcije ST9 transmembranskog proteina fitoplazme '*Ca. P. solani*' s proteinom aktinom kukca *H. obsoletus* u epidermskim stanicama listova duhana primjenom metode BiFC. A) YFP fluorescencijski signal interakcije ST9 i aktin lokaliziran u jezgri stanica; B) autofluorescencija klorofila duhana;. C) preklapljena slika YFP signala i autofluorescencije klorofila u svijetlom polju. Prikazani su reprezentativni rezultati tri neovisno provedena pokusa. Mjerna skala: 50 μm .

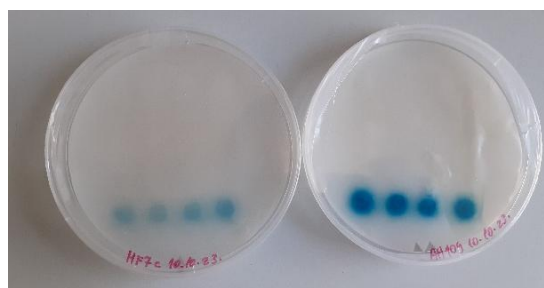
Kvasci soja HF7c uzgajani na selektivnom mediju bez histidina SD/-Leu/-Trp/-His, neovisno o dodatku 10 ili 20 mM 3AT, kotransformirani plazmidnim konstruktima pGBT9:SAP11-*like* i pGAD424:AtTCP2 odnosno pGBT9:SAP11-*like* pGAD424:AtTCP4 narasli su u sve četiri testne kolonije.

Kolonije nisu uočene kod negativnih kontrola kvasaca kotransformiranih plazmidnim konstruktima pGBT9:SAP11-*like* i pGAD424, pGBT9 i pGAD424AtTCP2 te pGBT9 i pGAD424AtTCP4. Pozitivna kontrola, kvasaca kotransformiranih plazmidnim konstruktima pGBT9:RDM1 i pGAD424:DMS3, pokazala je rast kolonija (**Slika 52**)



Slika 52. Analiza interakcije proteina u sustavu Y2H u soju HF7c na selektivnom mediju SD/-Leu/-Trp/-His uz dodatak 20 mM 3AT. Kvasci kotransformirani plazmidnim konstruktima pGBT9:SAP11-*like* i pGAD424:TCP2 (1) te pGBT9:SAP11-*like* i pGAD424:TCP4 (2) dali su kolonije na selektivnom mediju. Negativne kontrole pGBT9:SAP11-*like* i pGAD424 (3) pGBT9 i pGAD424:TCP2 (4) te pGBT9 i pGAD424:TCP4 (5) nisu pokazale rast kolonija. Pozitivna kontrola pGBT9:RDM1 i pGAD424:DMS3 (6) dala je kolonije, potvrđujući funkcionalnost sustava Y2H.

Rezultati β -galaktozidaznog testa pokazali su plavo obojenje samo za pozitivnu kontrolu, kao potvrdu aktivacije *lacZ*, odnosno interakciju proteina u kvascima uzgojenima na osnovnom mediju SD/-Leu/-Trp (**Slika 53**).

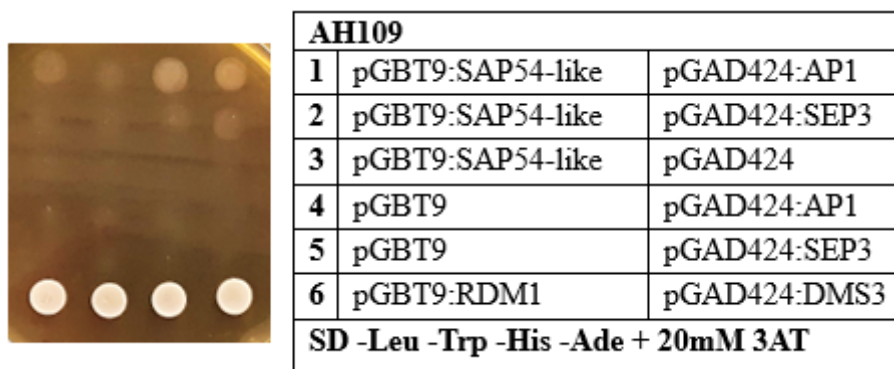


Slika 53. Reprezentativni rezultat β -galaktozidaznog testa kvantifikacije jačine interakcija proteina SAP11-*like* i AtTCP2 te SAP11-*like* i AtTCP4. Kotransformirani sojevi kvasaca HF7c i AH109 uzgojeni su na selektivnom mediju SD/-Leu/-Trp. Aktivacija *lacZ* prikazana je plavim obojenjem kolonija pozitivne kontrole.

4.5.2 Interakcija SAP54-like proteina s AtAP1 i AtSEP3 proteinima

Kvasci soja AH109 uzgajani na selektivnim medijima SD/-Leu/-Trp/-His, odnosno SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade, neovisno o dodatku 10 ili 20 mM 3AT, kotransformirani plazmidnim konstruktima pGBT9:SAP54-like i pGAD424:AtAP1 narasli su u tri od četiri testne kolonije, dok su kvasci kotransformirani plazmidnim konstruktima pGBT9:SAP54-like i pGAD424:AtSEP3 narasli u dvije od četiri kolonije. Kolonije su bile slabo izražene.

Kolonije nisu uočene kod negativnih kontrola kvasaca kotransformiranih plazmidnim konstruktima pGBT9:SAP54-like i pGAD424, pGBT9 i pGAD424:AtAP1 te pGBT9 i pGAD424:AtSEP3. Pozitivna kontrola, kvasaca kotransformiranih plazmidnim konstruktima pGBT9:RDM1 i pGAD424:DMS3, pokazala je rast kolonija (Slika 54).



Slika 54. Analiza interakcije proteina u sustavu Y2H u soju AH109 na selektivnom mediju SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade uz dodatak 20 mM 3AT. Kvasci kotransformirani plazmidnim konstruktima pGBT9:SAP54-like i pGAD424:AP1 (1) te pGBT9:SAP54-like i pGAD424:SEP3 (2) dale su kolonije na selektivnom mediju. Negativne kontrole pGBT9:SAP54-like i pGAD424 (3), pGBT9 i pGAD424:AP1 (4) te pGBT9 i pGAD424:SEP3 (5) nisu pokazale rast kolonija. Pozitivna kontrola pGBT9:RDM1 i pGAD424:DMS3 (6) je narasla, potvrđujući funkcionalnost sustava Y2H.

Kvasci soja HF7c uzgajani na selektivnom mediju SD/-Leu/-Trp/-His, bez obzira na dodatak 10 ili 20 mM 3AT, kotransformirani plazmidnim konstruktima pGBT9:SAP54-like i pGAD424:AtAP1 te pGBT9:SAP54-like i pGAD424:AtSEP3 nisu dali kolonije. Kolonije nisu uočene kod negativnih kontrola kvasaca kotransformiranih plazmidnim konstruktima pGBT9:SAP54-like i pGAD424, pGBT9 i pGAD424:AtAP1 te pGBT9 i pGAD424:AtSEP3. Kolonije kvasaca transformiranih plazmidnim konstruktima pGBT9:RDM1 i pGAD424:DMS3, korištenima kao pozitivna kontrola, su narasle na selektivnim medijima bez histidina, čime je potvrđena funkcionalnost sustava.

Rezultati β -galaktozidaznog testa pokazali su plavo obojenje samo za pozitivnu kontrolu, kao potvrdu aktivacije *lacZ*, odnosno interakciju proteina u kvascima uzgojenima na osnovnom medijem SD/-Leu/-Trp.

4.5.3 Interakcije ST6 i ST9 proteina s proteinom aktinom kukca

Kvasci oba soja AH109 i HF7c kotransformirani plazmidnim konstruktima pGBT9:ST6 i pGAD424:aktin te pGBT9:ST9 i pGAD424:aktin nisu razvili kolonije na pločama sa selektivnim medijem bez histidina SD/-Leu/-Trp/-His odnosno bez histidina i adenina SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade.

Kolonije nisu uočene kod negativnih kontrola kvasaca kotransformiranih plazmidnim konstruktima pGBT9:ST6 i pGAD424, pGBT9:ST9 i pGAD424 te pGBT9 i pGAD424:aktin. Pozitivna kontrola, interakcija DMS3 i RDM1 proteina bila je izražena, dok kolonije negativnih kontrola nisu narasle na medijima. Kvasci transformirani plazmidnim konstruktima pGBT9:RDM1 i pGAD424:DMS3, korišteni kao pozitivna kontrola, dali su kolonije na selektivnim medijima bez histidina i/ili bez adenina, čime je potvrđena funkcionalnost sustava (Slika 55).

AH109			
1-1	1-2	1-3	1-4
2-1	2-2	2-3	2-4
3-1	3-2	3-3	3-4
4-1	4-2	4-3	4-4
5-1	5-2	5-3	5-4
6-1	6-2	6-3	6-4
SD -Leu -Trp -His + 20mM 3AT			

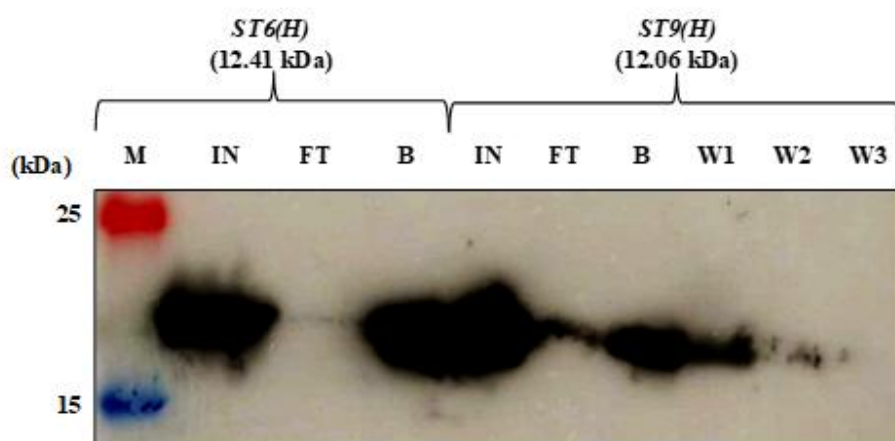
1	pGBT9:ST6	pGAD424:aktin
2	pGBT9:ST9	pGAD424:aktin
3	pGBT9:ST6	pGAD424
4	pGBT9:ST9	pGAD424
5	pGBT9	pGAD424:aktin
6	pGBT9:RDM1	pGAD424:DMS3

Slika 55. Analiza interakcije proteina u sustavu Y2H u soju AH109 na selektivnom mediju SD/-Leu/-Trp/-His uz dodatak 20 mM 3AT. Kvasci kotransformirani plazmidnim konstruktima pGBT9:ST6 i pGAD424:aktin (1) te pGBT9:ST9 i pGAD424:aktin (2) i negativne kontrole pGBT9:ST6 i pGAD424 (3), pGBT9:ST9 i pGAD424 (4) te pGBT9 i pGAD424:aktin (5) nisu narasle. Pozitivna kontrola pGBT9:RDM1 i pGAD424:DMS3 (6) je narasla, potvrđujući funkcionalnost sustava Y2H.

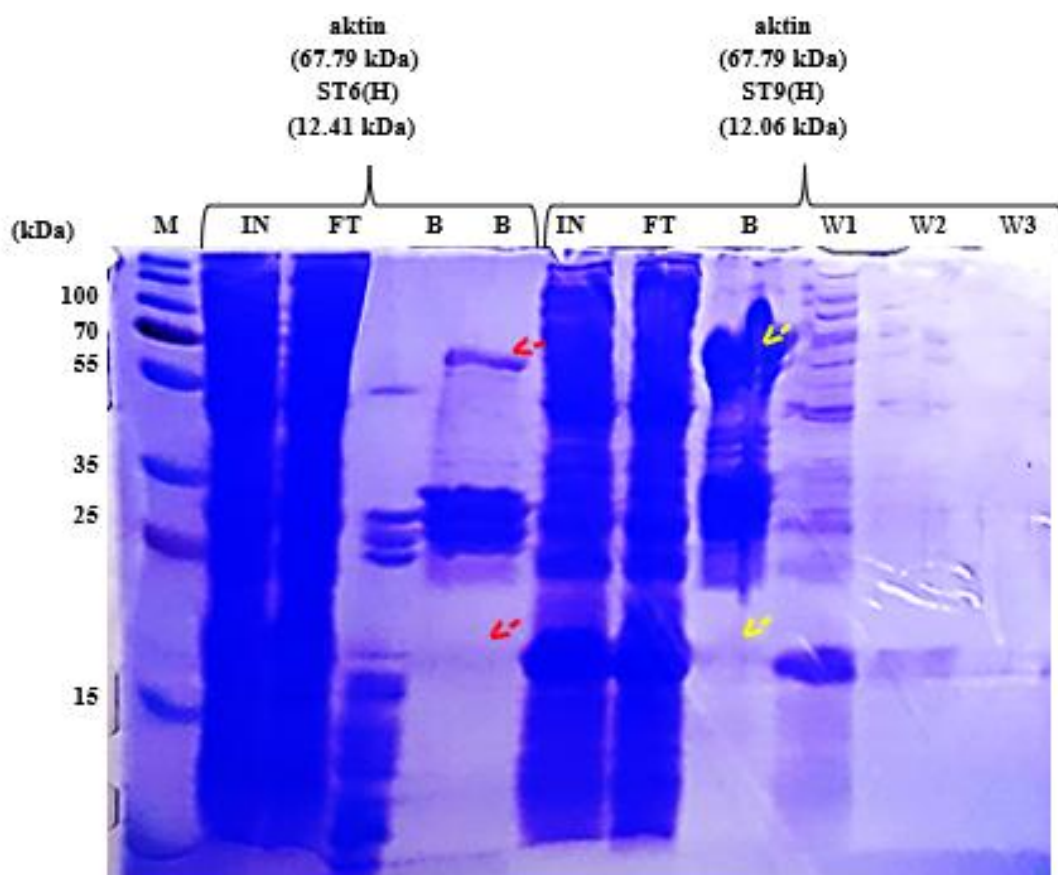
Rezultati β-galaktozidaznog testa pokazali su plavo obojenje samo za pozitivnu kontrolu, kao potvrdu aktivacije *lacZ*, odnosno interakciju proteina u kvascima uzgojenima na osnovnom medijem SD/-Leu/-Trp.

4.6 Kopurifikacija proteina i imunodetekcija

Pri kopurifikaciji prekomjerno eksprimiranih proteina iz *E. coli*, varijanta BL21 Rosetta™ (DE3) pomoću afinitetnih kuglica *Glutation-Sepharose 4B* (© Cytiva GE Healthcare, Uppsala, Švedska), protein aktin označen GST-biljegom služio je kao mamac, a proteini ST6(H) i ST9(H) označeni His₆-biljegom, u odvojenim reakcijama korišteni su kao plijen. Proteini ST6(H) i ST9(H) imunodetektirani su pomoću anti-His₆ monoklonskog primarnog protutijela čime su potvrđene interakcije proteina aktina i ST6(H) te proteina aktina i ST9(H) (Slika 56). Proteinske linije očekivanih molekulskih masa proteina aktin (67.79 kDa), ST6(H) (12.4 kDa) i ST9(H) (12.06 kDa) vizualizirane su bojenjem proteina CBB R-250 (Poglavlje 3.2.8.1.4) u poliakrilamidnim gelovima nakon razdvajanja iz proteinskih frakcija afinitetnom kopurifikacijom, pomoću afinitetnih kuglica *Glutation-Sepharose 4B* (© Cytiva GE Healthcare, Uppsala, Švedska), odnosno Ni-NTA agaroznih afinitetnih kuglica (QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka) (Slika 57, Slika 59).

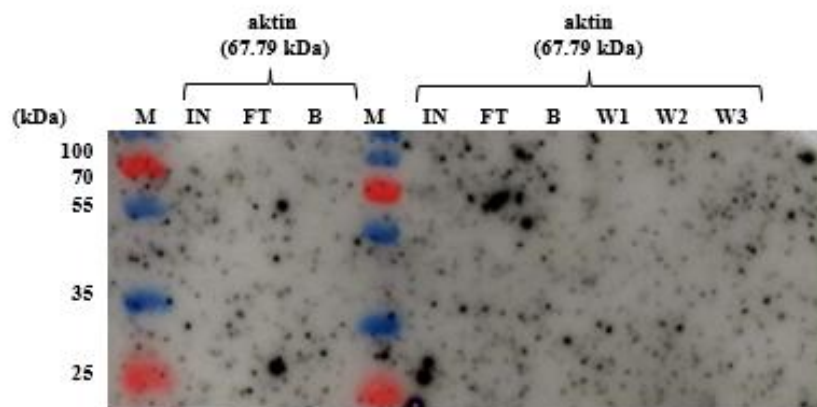


Slika 56. Western blot analiza kopurificiranih proteina pomoću afinitetnih kuglica *Glutation-Sepharose 4B* (© Cytiva, GE Healthcare, Uppsala, Švedska). S lijeva na desno: proteinski marker *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (10–250 kDa) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD) prikazuje referentne linije ~15 kDa i ~25 kDa. Vidljivi signali proteina ST6(H): ~12.4 kDa u frakcijama IN, FT, B (input, flow through, beads). Vidljivi signali proteina ST9(H): ~12.06 kDa u frakcijama IN, FT, B, W1, W2, W3 (input, flow through, beads, wash 1, wash 2, wash 3).

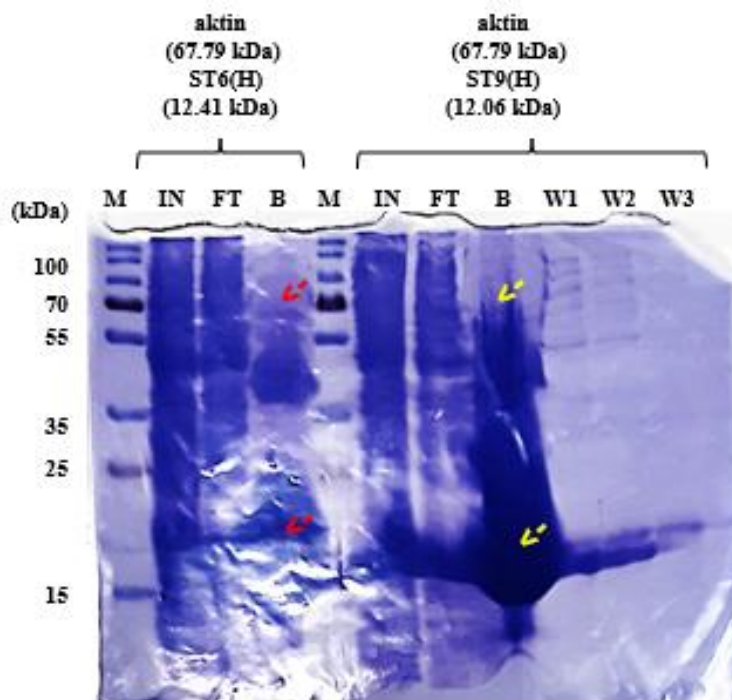


Slika 57. SDS-PAGE analiza eksprimiranih i kopurificiranih proteina nakon afinitetne kopurifikacije pomoću kuglica Glutathion-Sepharose 4B (© Cytiva, GE Healthcare, Uppsala, Švedska), uz vizualizaciju bojanjem Coomassie Brilliant Blue. S lijeva na desno: proteinski marker *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (10–250 kDa) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD). Vidljive proteinske linije očekivanih molekulskih masa: aktin: 67.79 kDa i ST6(H): 12.4 kDa u frakcijama IN, FT, B (input, flow through, beads), na visinama označenim crvenim strelicama. Vidljive proteinske linije očekivanih molekulskih masa: aktin: 67.79 kDa i ST9(H): 12.06 kDa u frakcijama IN, FT, B, W1, W2, W3 (input, flow through, beads, wash 1, wash 2, wash 3), na visinama označenim žutim strelicama.

Pri kopurifikaciji prekomjerno eksprimiranih proteina iz *E. coli*, varijanta BL21 Rosetta™ (DE3) pomoću Ni-NTA agaroznih afinitetnih kuglica (QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka) proteini ST6(H) i ST9(H) označeni His₆-biljgom, u odvojenim reakcijama korišteni su kao proteini mamci za protein plijen-aktin, označen GST-biljgom. U *Western blot* analizi izostao je jasan signal reakcije vezivanja GST-biljega proteina aktina i primarnog protutijela Anti-GST (B-14) iz mišjih IgG1 protutijela (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, SAD). Membrana je pokazala izraženo nespecifično vezanje antitijela (**Slika 58**).



Slika 58. Western blot analiza kopurificiranih proteina pomoću afinitetnih kuglica Ni-NTA agaroznih afinitetnih kuglica (QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka). S lijeva na desno: Između marker *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (10–250 kDa) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD) koji prikazuje referentne linije ~25 kDa, ~35 kDa, 55 kDa, ~70 kDa i ~100 kDa su nanosene frakcije IN, FT i B (input, flow through, beads) denaturirani uzoraka potencijalno kopurificiranih proteina aktin i ST6(H). Desno od markera nanosene su frakcije IN, FT, B, W1, W2, W3 (input, flow through, beads, wash 1, wash 2, wash 3) denaturirani uzoraka potencijalno kopurificiranih proteina aktin i ST9(H). Nema vidljivih signala proteina aktina. Izražena nespecifična vezanja antitijela na membrani.



Slika 59. SDS–PAGE analiza eksprimiranih i kopurificiranih proteina nakon afinitetne kopurifikacije pomoću Ni-NTA agaroznih kuglica (QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka), uz vizualizaciju bojanjem Coomassie Brilliant Blue. S lijeva na desno prikazan je proteinski marker *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (10–250 kDa) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD), te frakcije uzorka. Uočljive su proteinske linije približnih molekulskih masa proteina aktina (~67.8 kDa) i ST6(H) u frakcijama IN, FT, B (input, flow through, beads), na visinama označenim crvenim strelicama. (~12.4 kDa) i aktina (~67.8 kDa) ST9(H) (~12.06 kDa) u analiziranim frakcijama u frakcijama IN, FT, B, W1, W2, W3 (input, flow through, beads, wash 1, wash 2, wash 3), na označenim, indiciranim žutim strelicama.

5 RASPRAVA

Fitoplazma '*Ca. P. solani*' je značajan biljni patogen, širokog kruga domaćina, a odgovorna je za velike gospodarske gubitke u poljoprivrednoj proizvodnji (Hogenhout *i sur.*, 2008.; Namba, 2019.). Uzročnik je bolesti *stolbur* u brojnih biljnih vrsta i bolesti BN vinove loze, zbog čega je važan čimbenik u širenju žutice vinove loze (GY) euromediterranskim područjem (Constable, 2009.; Quaglino *i sur.*, 2013.).

'*Ca. P. solani*' ujedno je i najzastupljenija fitoplazmatska vrsta u Republici Hrvatskoj. Zbog složenog životnog ciklusa koji obično obuhvaća više vrsta domaćinskih biljaka i dominantno kukca-vektora *H. obsoletus*, razumijevanje molekularnih mehanizama patogenosti i prijenosa fitoplazme od posebne je važnosti za razvoj učinkovitih mjera suzbijanja ovog patogena. Dosadašnja istraživanja upućuju na to da fitoplazmatske male sekrecijske molekule efektori, imaju ključnu ulogu u uspostavljanju interakcije između fitoplazme i biljnog domaćina (Bai *i sur.*, 2006.; Hogenhout i Loria, 2008.; Sugio *i sur.*, 2011b.). Zbog nemogućnosti uzgoja ovih bakterija u čistoj kulturi u uvjetima *in vitro*, što znatno otežava njihovo istraživanje, samo 20-ak od potencijalnih stotinjak fitoplazmatskih efektora detaljno je opisano i eksperimentalno potvrđeno. Najdetaljnije opisani fitoplazmatski efektori su SAP11 i SAP54 (soj AY-WB) te TENGU i PHYLL1 (soj OY), za koje je potvrđeno da preusmjeravaju metabolizam i razvoj biljaka u korist patogena, što rezultira pojavom specifičnih simptoma u biljnim domaćinima. (Bai *i sur.*, 2008.; Hogenhout i Loria, 2008.; Hoshi *i sur.*, 2009.; MacLean *i sur.*, 2011., 2014.; Minato *i sur.*, 2014.; Mirkin *i sur.*, 2025.; Sugio *i sur.*, 2011b.). Za fitoplazmu '*Ca. P. solani*', podaci o efektorima bili su malobrojni do izvođenja ovog istraživanja te su se odnosili na identifikaciju i predikciju kandidata bez detaljne funkcionalne karakterizacije, eksperimentalne potvrde njihove uloge i opisa mehanizma djelovanja na domaćinske organizme (Seruga Music *i sur.*, 2019.).

Budući da se životni ciklus fitoplazmi odvija i u biljnom domaćinu i u kukcu-vektoru, interakcije s obje skupine organizama važne su za njihovu biologiju i epidemiologiju (Hogenhout *i sur.*, 2008.). S obzirom na to da fitoplazme nemaju staničnu stijenku, značajni potencijal za interakcije s domaćinom imaju transmembranski proteini fitoplazmi izloženi na njihovoj površini. Za određene fitoplazmatske membranske proteine poznato je da sudjeluju u procesima adhezije i kolonizacije organizma kukca-vektora, primjerice stupanjem u interakciju s komponentama citoskeleta kukca, uključujući mikrofilamente i aktin. Takvim interakcijama fitoplazma ostvaruje kolonizaciju vektora, kretanje i perzistenciju u njegovom organizmu, što je ključno za prijenos ovih patogena na nove biljne domaćine (Boonrod i ostali,

2012; Galetto i ostali, 2013; Rashidi i ostali, 2015; Suzuki i ostali, 2006). Zbog svoje strukturne i lokalizacijske sličnosti s transmembranskim proteinima Amp i Imp te izrazite varijabilnosti gena, do provedbe ovog istraživanja hipoteza o interakciji proteina STAMP s aktinom kukca-vektora nije bila eksperimentalno potvrđena (Boonrod i sur., 2012.; Fabre i sur., 2011b., 2011a.; Kakizawa i sur., 2006.; Suzuki i sur., 2006.).

Ovo istraživanje provedeno je u više komplementarnih eksperimentalnih sustava. Korištenjem različitih rekombinantnih plazmidnih konstrukata namijenjenih transformaciji biljaka metodom *floral dip*, analizi proteinskih interakcija metodom BiFC, sustavu Y2H, afinitetnoj kopurifikaciji i imunodetekciji proteina dobivena su nova saznanja i potpuniji uvid u mehanizme patogenosti i proteinske interakcije efektor a i membranskih proteina 'Ca. P. solani' s proteinima domaćinskih organizama.

Kako se u sekvenciranom genomu fitoplazmi identifikacija gena koji kodiraju sekrecijske proteine bazira na činjenici da takve molekule posjeduju signalne peptide (Bai i sur., 2008.), bioinformatičkom analizom nukleotidnih sljedova, potvrđena je prisutnost signalnih peptida kod efektorskih proteina SAP11-like i SAP54-like, ali i kod transmembranskih proteina ST6 i ST9, kako je i očekivano prema dosada objavljenim podacima o membranskom proteinu STAMP (Fabre i sur., 2011a.). Translokacijska uloga signalnih peptida omogućuje fitoplazmatskim efektorima prijelaz iz patogena u biljnu stanicu domaćina i usmjeravanje proteina kroz Sec-ovisan sekrecijski sustav te lokalizaciju proteina (Bai i sur., 2006.; Barbara i sur., 2002.; Kakizawa i sur., 2004.) Prema do sada objavljenim istraživanjima fitoplazmatskih efektor a (Bai i sur., 2008.; MacLean i sur., 2011.) i membranskih proteina (Boonrod i sur., 2023.; Fabre i sur., 2011a.), signalni peptidi su uklonjeni, a optimizacija kodona bila je nužna kako bi se omogućila ispravna i pojačana ekspresija rekombinantnih proteina u stanicama heterolognih sustava, biljkama *A. thaliana*, *N. benthamiana* i kvascu *S. cerevisiae* korištenima u istraživanju. Na taj način je smanjena vjerojatnost slabije translacije i stvaranja sekundarnih struktura mRNA (Bai i sur., 2006.; Gustafsson i sur., 2004.). Dobiveni konstrukti rekombinantnih plazmida, u konačnici su potvrđeni sekvenciranjem u servisu (MacroGen Europe, Amsterdam, Nizozemska) što je omogućilo provedbu funkcionalnih analiza interakcija proteina efektor a fitoplazme 'Ca. P. solani' SAP11-like i SAP54-like s biljnim proteinima AtTCP2, AtTCP4, AtAP1 i AtSEP3, te interakcije ST6 i ST9 i modificiranih oblika ST6(H) i ST9(H) proteina STAMP s aktinom kukca *H. obsoletus*.

5.1 Raznolikost i polimorfizam genoma fitoplazme '*Ca. P. solani*'

Iako je komparativna analiza genoma pokazala postojanje skupine konzerviranih efektora prisutnih u svim analiziranim sojevima, uočene su značajne razlike u ukupnog efektorskog sastava. Takve razlike upućuju na postojanje genomske varijabilnosti koja se odražava upravo kroz prisutnost, odsutnost ili divergentnost pojedinih efektorskih gena. U skicama genoma analiziranih sojeva ST19 i STOL identificirano je 28 odnosno 26 gena koji kodiraju potencijalne efekte i sekretirane proteine, dok je u soju SA-1 prethodno identificirano 38 takvih gena (Seruga Music *i sur.*, 2019.). Analizirani genomi dobiveni su na razini skica, stoga identificirani broj efektorskih gena predstavlja podcijenjenju vrijednost. Također moguća je i slabija zastupljenost ponavljajućih sljedova, odnosno genetičkih elemenata PMU koji često nose efektorske gene zbog fragmentiranosti genomskih sklopova skica. Prema tome, sastav efektora vjerojatno nije u potpunosti detektiran u sekvenciranim i sastavljenim kontizima (Toruño *i sur.*, 2010.). Navedene razlike ukazuju na neujednačenu zastupljenost efektoru među sojevima te potvrđuju da repertoar efektoru nije potpuno konzerviran unutar vrste. Posebno je značajna identifikacija većeg broja specifičnih efektoru za soj i hipotetskih proteina koji nisu bili prisutni u svim analiziranim genomima. Takvi geni predstavljaju potencijalne markere genomske diferencijacije pojedinih sojeva te mogu imati važnu ulogu u prilagodbi različitim domaćinima, vektorima ili okolišnim uvjetima (Hogenhout *i sur.*, 2009.; Toruño *i sur.*, 2010.). Iako su homolozi efektoru SAP11-like i SAP54-like, pokazali visoku razinu očuvanosti među analiziranim sojevima, njihova prisutnost ne umanjuje značaj ostalih varijabilnih komponenti efektorosoma. Naprotiv, rezultati upućuju na postojanje skupa efektoru u konzerviranom dijelu genoma odgovornih za osnovne mehanizme patogenosti te dodatnog skupa varijabilnih efektoru koji doprinose specifičnim biološkim svojstvima pojedinih sojeva. Takva organizacija efektoru u skladu je s evolucijskim modelom prema kojem konzervirani efektori osiguravaju temeljne funkcije potrebne za uspješnu kolonizaciju domaćina, dok varijabilni efektori omogućuju prilagodbu različitim selekcijskim pritiscima (Bai *i sur.*, 2006.; Sugawara *i sur.*, 2013.). Dodatnu potporu ovoj pretpostavci pruža identifikacija nove varijante efektoru SAP54-like (AB2N28_4360), koja pokazuje značajnu filogenetsku udaljenost u odnosu na do sada poznate skupine *phyllogen* efektoru (**Slika 11**). To ukazuje na kontinuirane evolucijske procese koji dovode do nastanka novih efektorskih varijanti unutar vrste '*Ca. P. solani*'. Prisutnost takvih divergentnih efektoru sugerira da polimorfizam efektorskih gena predstavlja važan mehanizam genomske diferencijacije sojeva. Kako su efektori ključni čimbenici u interakciji fitoplazme s biljkom domaćinom, njihova raznolikost može imati značajan utjecaj na virulentnost, simptomatologiju bolesti i prilagodbu različitim ekološkim nišama. Stoga se

može zaključiti da utvrđene razlike u sastavu i varijabilnosti efektorskih gena predstavljaju važne pokazatelje genetske raznolikosti unutar vrste '*Ca. P. solani*' te podupiru pretpostavku o postojanju sojno specifičnih efektorskih skupova.

5.2 Fenotipske promijene transgeničnih uročnjaka uzrokovane prekomjernom ekspresijom SAP11-like i SAP54-like efektora '*Ca. P. solani*'

U ovom istraživanju ekspresija efektorskih gena *SAP11-like* i *SAP54-like* fitoplazme '*Ca. P. solani*' u transgeničnim biljkama uročnjaka bila je pod kontrolom konstitutivnog 35S promotora virusa mozaika cvjetače (CaMV), čime je omogućena stabilna i kontinuirana ekspresija efektoru u biljnom tkivu. Očuvanje fenotipskih promjena kroz generacije T1–T3 dodatno potvrđuje uspješnu integraciju transgena u genom biljke te stabilno nasljeđivanje (**Slika 26, Slika 28, Slika 30**). Uspješna transformacija uročnjaka potvrđena je u biljkama T3 generacije PCR analizom prisutnosti T-DNA, RT-qPCR analizom ekspresije gena i sekvenciranjem u komercijalnom servisu (Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska), a prisutnost rekombinantnih proteina *SAP11-like* i *SAP54-like* u transformiranih uročnjaka potvrđena je detekcijom signala očekivane veličine *Western blot* analizom (**Slika 35**), što potvrđuje uspješnost konstrukcije ekspresijskog sustava.

Rezultati dobiveni analizom homozigotnih transgeničnih uročnjaka T3 generacije, pokazali su kako efektori fitoplazme '*Ca. P. solani*' uzrokuju slične fenotipske promjene (**Slika 37, Slika 38, Slika 39, Slika 41, Slika 42, Slika 43, Slika 44**) kakve su opisane za homologe efektoru SAP11 odnosno homologe efektoru SAP54 drugih fitoplazmi.

Poznato je da mali virulentni efektor SAP11 fitoplazme '*Ca. P. asteris*' soja AY-WB stupa u interakciju s TCP transkripcijskim faktorima uročnjaka te dovodi do njihove destabilizacije, što se naposljetku odražava na značajne promijene u morfogenezi te poremećaje razvoja listova, meristema i građe biljke (X. Bai i ostali, 2008; Mittelberger i ostali, 2024; Sugio i ostali, 2014; He i ostali, 2021; Li, 2015; Rath i ostali, 2022). Njegov homolog, efektor SAP11_{CaPm} iz fitoplazme '*Ca. P. mali*' ostvaruje interakciju s homolognim TCP proteinima iz jabuke (*Malus x domestica*), uključujući interakcije s MdTCP25 (homologom AtTCP4), MdTCP24 (homologom TCP13) i MdTCP16 (izomerom TCP18) (Xu i sur., 2014.), pri čemu modelira signalne puteve povezane s pojavom simptoma bolesti proliferacije jabuke i poremećenog razvoja. (Janik i sur., 2017.). Intenzivna istraživanja efektoru SAP11 i njegovih homologa u mnogih vrsta fitoplazmi, pridonijela su tezi o ovom proteinu kao „univerzalnom efektoru fitoplazmi“, ponajviše zbog široke rasprostranjenosti i konzerviranosti motiva ovog

proteina među različitim fitoplazmatskim vrstama (Janik *i sur.*, 2017.; Strohmayer *i sur.*, 2021.; Win *i sur.*, 2012.).

Zabilježene fenotipske promjene uročnjaka transformiranih s efektorom SAP11-*like* iz '*Ca. P. solani*' usporedive su s prethodno opisanim simptomima biljnih domaćina koji prekomjerno eksprimiraju efektor SAP11 iz fitoplazme '*Ca. P. asteris*' ili homologa SAP11 iz '*Ca. P. mali*' (Sugio *i sur.*, 2011a., 2011b., 2014.). Najizraženije promjene odnosile su se na razvoj listova, koji su u transgeničnim linijama SAP11-*like* uročnjaka pokazivali iznimnu nazubljenost, kovrčavost i smanjenu veličinu listova lisne rozete. Navedeni simptomi su u skladu s poznatom funkcijom CIN-TCP transkripcijskih faktora u regulaciji proliferacije i diferencijacije stanica tijekom razvoja lisne plojke, što je pokazano prethodnim istraživanjima homologâ efektorâ SAP11 u različitim fitoplazmama (Boonrod *i sur.*, 2022.; Lu *i sur.*, 2014.; Sugio *i sur.*, 2014.; Wang *i sur.*, 2018.).

Osim morfoloških promjena listova rozete, u transgeničnim linijama SAP11-*like* 2b i SAP11-*like* 3b uočen je veći broj aksilarnih izbojaka, nego u jedinki divljeg tipa uročnjaka. Povećan broj aksilarnih izbojaka upućuje na poremećenu regulaciju apikalne dominacije i hormonskih signalnih puteva uključenih u razvoj izboja. Simptom pojačanog grananja je do sada opisan samo u interakciji homologa SAP11 iz *Wheat Blue Dwarf* fitoplazme s transkripcijskim faktorom AtTCP18, što je ukazalo na to da modulacijom TCP signalnog puta dolazi do promjena u razvoju aksilarnih pupova i gradi biljke (Wang *i sur.*, 2018.). Rezultati ovog istraživanja podupiru pretpostavku da efektor fitoplazme '*Ca. P. solani*' SAP11-*like* ima sličan mehanizam djelovanja na transkripcijske faktore TCP, pri čemu utječe na signalne puteve regulacijske mreže odgovorne za rast i razvoj biljaka.

U obje transgene linije SAP11-*like* 2b i SAP11-*like* 3b osim na vegetativnim nadzemnim dijelovima biljke, promjene fenotipa su uočene i na generativnim organima i korijenskom sustavu klijanaca transgeničnih uročnjaka starih 15 dana, što do sada nije istraživano (**Slika 38C**). Opažene su deformirane i skraćene komuške čije sjeme je ostalo vijabilno, a izražena su bile i promjene u duljini te razvoju bočnih korjenčića (**Slika 38A, C**). Kako transkripcijski faktori TCP reguliraju staničnu proliferaciju, diferencijaciju i hormonsku ravnotežu u različitim biljnim organima (Danisman *i sur.*, 2012.; Lan i Qin, 2020.; Martín-Trillo i Cubas, 2010.), može se pretpostaviti da destabilizacija TCP proteina djelovanjem SAP11-*like* efektorâ ne utječe selektivno na razvoj listova i izbojaka, već i na procese razvoja ploda i korijenskog sustava.

Promjene u razvoju komuški vjerojatno su povezane s poremećajem reproduktivnog razvoja i hormonske ravnoteže biljke, osobito puteva auksina i citokina koji imaju direktnu ulogu u

razvoju reproduktivnih organa. (Marsch-Martínez & de Folter, 2016). Moguće je da su promjene u regulaciji rasta korijena i lateralnog grananja uzrokovane modulacijom TCP signalnih puteva s efektorom SAP11-like, pri čemu je promijenjen i odgovor na fitohormone, posebno auksin (Danisman *i sur.*, 2012.). Izmijenjen korijenski sustav, pa tako i mehanizam izmjene vode i hranjivih tvari potencijalno ima važnu ulogu u fiziološkoj prilagodbi biljke na zarazu fitoplazmom te na razvoj simptoma bolesti biljke (Buoso *i sur.*, 2019.).

Fenotipske promjene komuški, koje su bile kraće i deblje, kao i korjenčića koji su pokazivali pojačanu razgranatost i veću duljinu u usporedbi s divljim tipom, uočene su i u linijama transgeničnih uročnjaka s prekomjernom ekspresijom efektora SAP54-like iz fitoplazme '*Ca. P. solani*' (**Slika 38B, D**). Ovi rezultati upućuju na snažan utjecaj efektora SAP54-like na regulaciju reproduktivnog sustava kao i na regulaciju meristemskih aktivnosti i stanične diferencijacije, koja je posljedica poremećene regulacije signalnih puteva auksina, koji mijenjanjem polariteta rasta i aktivnosti meristema utječu na razvoj lateralnih korjenčića i korijenovog meristema (Dermastia, 2019.; Hren *i sur.*, 2009.). Osim grananja korijena transgene linije SAP54-like uročnjaka pokazale su i grananje nadzemnih vegetativnih dijelova biljaka (**Slika 37**), praćeno filotaksijom i fascijacijom pupova (**Slika 39**), što također ukazuje na promijene u hormonskoj regulaciji putem auksina, ali i citokina te promjene u regulaciji rasta apikalnog meristema (Marsch-Martínez i de Folter, 2016.; Sugio *i sur.*, 2011b.). Navedeni simptomi opisuju se kao fenotip vještije metle i iako su češće vezani za djelovanje efektorâ homologâ SAP11, prema istraživanjima provedenim za AY-WB efektor SAP54 vidljivo je da i ovaj efektor može indirektno utjecati na građu biljke kroz promijene u razvoju cvijeta i vegetativnih meristema (MacLean *i sur.*, 2011.).

Regulacija razvoja cvijeta je pod utjecajem MADS-box transkripcijskih faktora među kojima su i APETALA1 (AP1) i SEPALLATA3 (SEP3) transkripcijski faktori, a njihova destabilizacija rezultira abnormalnim razvojem cvjetnih struktura, filodijom i sterilnošću cvjetova. Prema dosadašnjim istraživanjima (MacLean *i sur.*, 2011., 2014.; Maejima *i sur.*, 2014b.) upravo SAP54 degradira ove transkripcijske faktore putem ubikvintin/proteasomskog sustava. Iako, u ovom istraživanju nije opažena potpuna filodija, deformacije cvjetova i reproduktivnih struktura, poput skraćenog tučka i skraćenih zadebljelih komuški, jasno potvrđuju da SAP54-like efektor fitoplazme '*Ca. P. solani*' interferira s regulacijskim mrežama razvoja cvijeta. Slične deformacije opisane su u uročnjaka koji ekspimiraju homologe SAP54 efektorâ (MacLean *i sur.*, 2011.; Orlovskis i Hogenhout, 2016.). Budući da fitoplazmatski efektori često djeluju kao modulatori transkripcijskih mreža domaćina, moguće je da SAP54-like indirektno utječe na ekspresiju gena uključenih u razvoj epidermskih struktura i

obrambenih odgovora biljke (Sugio i Hogenhout, 2012.), što je u transgeničnim linijama *SAP54-like* B2P4 i *SAP54-like* B4P2 izraženo kroz promjene u vegetativnom razvoju koje uključuju smanjenu veličinu listova, poremećenu morfologiju rozete i povećanu gustoću trihoma (**Slika 43**, **Slika 44**). Povećana gustoća trihoma osim što ukazuje na promjene u regulaciji diferencijacije epidermskih stanica, može biti potaknuta djelovanjem signalnih puteva povezanih s fitohormonima giberelinom i jasmonatima (Sugio i Hogenhout, 2012.).

Fenotipske promijene svih linija transgeničnih uročnjaka bile su izraženije u uvjetima dugog dana (**Slika 36**), nego u uvjetima kratkog dana (**Slika 40**) što upućuje na moguću povezanost djelovanja istraživanih fitoplazmatskih efektor s fotoperiodičkim signalnim putevima i regulacijom razvoja biljaka ovisnom o svjetlosti (Cagnola *i sur.*, 2018.).

U konačnici, simptomi vidljivi u homozigotnim transgeničnim biljkama uročnjaka T3 generacije bili su nešto slabije izraženi u usporedbi s opaženim simptomima biljaka generacije T1 i T2, vjerojatno zato što je razina ekspresije transgena bila viša ili varijabilnija zbog različitih mjesta insercije T-DNA i segregacije. Blaže fenotipske promijene u kasnijim generacijama su možda nastupile uslijed djelomičnog epigenetičkog utišavanja ili stabilizacije ekspresije. Intenzitet fenotipskih promjena razlikovao se unutar linija *SAP11-like* transgeničnih uročnjaka i unutar linija *SAP54-like* uročnjaka, a takva varijabilnost je česta pojava među neovisnim transgeničnim linijama i može biti posljedica različite razine ekspresije transgena, položaja insercije T-DNA ili razlika u stabilnosti rekombinantnih proteina (Gelvin, 2003.). Unatoč tome, zapažena je konzistencija skupova simptoma karakterističnih za djelovanje *SAP11-like* efektor u linijama *SAP11-like* 2b i *SAP11-like* 3b, te simptoma karakterističnih za djelovanje *SAP54-like* efektor u linijama *SAP54-like* B2P4 i *SAP54-like* B4P2. Time je potvrđena biološka aktivnost i funkcionalnu konzerviranost ovih efektor fitoplazme '*Ca. P. solani*'.

5.3 Analiza proteinskih interakcija metodom BiFC

Za istraživanje proteinskih interakcija metodom BiFC konstruirani su plazmidni vektori koji omogućuju fuziju ciljnih proteina s nefluorescentnim fragmentima fluorescentnog proteina YFP. Rekonstitucijom fragmenata proteina YFP *in planta* nastaje fluorescencijski signal.

Interakcija efektor *SAP11-like* fitoplazme '*Ca. P. solani*' s transkripcijskim faktorima AtTCP2 i AtTCP4 potvrđena je detekcijom fluorescencijskog signala mikroskopiranjem u epidermskim stanicama agroinfiltriranog duhana. U oba slučaja je zabilježen signal jakog intenziteta, što upućuje na učinkovitu rekonstituciju proteina YFP i stabilno ostvarenu

interakciju između proteina u stanicama u trenutku analize (**Slika 45, Slika 46**) (Kerppola, 2009.).

Interakcija SAP11-like s AtTCP2 i AtTCP4 transkripcijskim faktorima skupine CIN-TCP koji su odgovorni za regulaciju razvoja lisne plojke, proliferaciju i diferencijaciju te morfogenezu nadzemnih biljnih organa (Danisman *i sur.*, 2012.; Martín-Trillo i Cubas, 2010.) u skladu je s dosadašnjim istraživanjima interakcija efektor SAP11 i njegovih homologa iz različitih fitoplazmi, prema kojima u interakciji s TCP proteinima, utječe na njihovu destabilizaciju i regulaciju razvoja biljke (Bai *i sur.*, 2008.; Janik *i sur.*, 2017.; Mittelberger *i sur.*, 2024.; Sugio *i sur.*, 2011b.).

Za interakciju efektor SAP11-like i AtTCP2, YFP signal lokaliziran je u citoplazmi i u jezgri stanica, dok je pri interakciji SAP11-like i AtTCP4 YFP signal bio prisutan isključivo u citoplazmi (**Slika 45, Slika 46**). Razlike u subcelularnoj lokalizaciji ukazuju na različitu dinamiku ili funkcionalnost pojedinih proteinskih interakcija, s obzirom na to da je dokazano da SAP11 efektor može interferirati s transportom TCP proteina između jezgre i citoplazme ili destabilizirati TCP proteine prije ulaska u jezgru što na kraju rezultira promjenom regulacije ekspresije ciljnih gena (Sugio *i sur.*, 2014.). Prema tome, za pretpostaviti je da efektor SAP11-like fitoplazme '*Ca. P. solani*' različitim mehanizmima stupa u interakciju s TCP transkripcijskim faktorima.

Efektor SAP54-like fitoplazme '*Ca. P. solani*' stupa u interakciju s AtAP1 i AtSEP3 MADS-box transkripcijskim faktorima, što je dokazano detekcijom jakog fluorescencijskog signala proteina YFP, dominantno u jezgri epidermskih stanica agroinfiltriranih listova duhana (**Slika 47, Slika 48**). Prema dosadašnjim istraživanjima homologa SAP54 lokalizacija signala YFP je očekivana u jezgri stanice s obzirom na to da MADS-box transkripcijski faktori upravo u jezgri djeluju kao regulatori uključeni u razvoj cvijeta (MacLean *i sur.*, 2011., 2014.; Maejima *i sur.*, 2014a.).

Iz navedenog, SAP54-like efektor fitoplazme '*Ca. P. solani*' ima sličnu funkciju ciljanja regulatora razvoja cvijeta u biljaka kao i homolozi SAP54 iz drugih vrsta fitoplazmi. Potvrđene interakcije efektor fitoplazme '*Ca. P. solani*' SAP11-like i SAP54-like s transkripcijskim faktorima CIN-TCP i MADS-box skupina u skladu su s rezultatima fenotipske analize transgeničnih linija SAP11-like 2b, SAP11-like 3b, SAP54-like B2P4 i SAP54-like B4P2 uročnjaka.

Osim interakcija efektor fitoplazme '*Ca. P. solani*' s biljnim transkripcijskim faktorima, metodom BiFC istraživane su i interakcije fitoplazmatskog transmembranskog proteina

STAMP genotipova ST6 i ST9 s citoskeletnim proteinom sktinom iz *H. obsoletus*, kukca-vektora ove fitoplazme.

Iako je zabilježen YFP signal bio slabijeg intenziteta u usporedbi s istraživanim interakcijama efektor SAP11-like i SAP54-like, detektiran je u citoplazmi u obje interakcije ST6 i ST9 s aktinom (**Slika 49, Slika 50**). Rezultat je iznimno važan jer upućuje na funkcionalnu ulogu proteina STAMP u mehanizmima adherencije i kolonizacije organizma kukca-vektora, s obzirom da je aktin ključna komponenta citoskeleta odgovorna za unutarstanični transport, organizaciju stanice i procese vezane uz endocitozu i kretanje membranskih struktura (Rashidi *i sur.*, 2015.; Suzuki *i sur.*, 2006.).

Kako je transmembranski protein STAMP iznimno varijabilan, njegova genska raznolikost bi mogla biti prilagodba fitoplazme '*Ca. P. solani*' na različite populacije kukca-vektora i uspješniji prijenos i rasprostranjivanje ovog patogena.

Kako u negativnim kontrolama signal nije detektiran, dok je u pozitivnoj kontroli signal EGFP očekivano bio prisutan, potvrđuje se specifičnost interakcija i uspješnost agroinfiltracije. Pouzdanost rezultata potvrđena je u tri neovisno provedena pokusa za istraživanje svake od navedenih interakcija.

5.4 Analiza proteinskih interakcija u sustavu Y2H

Sposobnost aktivacije reporterskih gena kvasaca *S. cerevisiae* sojeva AH109 i HF7c, pokazala je neujednačenost dobivenih rezultata za iste kombinacije interakcijskih proteina u različitim sojevima. Soj AH109 sadrži veći broj reporterskih gena i općenito se smatra osjetljivijim za detekciju slabijih proteinskih interakcija, dok je HF7c manje osjetljiv te zahtijeva stabilnije interakcije za aktivaciju gena reportera (Fields i Song, 1989.; James *i sur.*, 1996.). Sustav Y2H može dati lažno negativan rezultat, u slučajevima kad interakcije ovise o specifičnim posttranslacijskim modifikacijama, o prisutnosti više interakcijskih partnera ili odgovarajućeg staničnog okruženja. Funkcionalnost sustava Y2H potvrđena je rastom kolonija kvasca *S. cerevisiae* (RDM1-BD/DMS3-AD) na selektivnim medijima bez histidina i/ili bez adenina te aktivacijom *lacZ* gena u kvascima pozitivne kontrole, prilikom izvođenja β-galaktozidaznog testa, dok kvasci negativne kontrole nisu narasli. Prema tome, specifične interakcije ili izostanak interakcija istraživanih proteina upućuju na tehničku ispravnost sustava Y2H.

Interakcija efektor SAP11-like fitoplazme '*Ca. P. solani*' i transkripcijskih faktora AtTCP2 i AtTCP4 nije ostvarena u soju AH109, jer kolonije kvasca ovog soja nisu narasle na selektivnim medijima, dok su sve testne kolonije kvasaca soja HF7c za obje kombinacije narasle na selektivnom mediju bez histidina (**Slika 52**). Takav rezultat pokazuje moguću

interakciju efektora *SAP11-like* s transkripcijskim faktorima AtTCP2 i AtTCP4, kojoj idu u prilog do sada.

Beta-galaktozidazni test kojim su dodatno testirane kolonije koje su narasle na temelju interakcije efektor i transkripcijskih faktora, nije pokazao aktivaciju *lacZ* gena kvasca što ukazuje na slabe ili prolazne interakcije ispitivanih proteina u heterolognom sustavu Y2H (**Slika 53**). U dosadašnjim istraživanjima interakcija fitoplazmatskih proteina drugih fitoplazmi β -galaktozidazni test nije proveden (Lu *i sur.*, 2014.; MacLean *i sur.*, 2014.; Mittelberger *i sur.*, 2022.). Različita manifestacija interakcija u sojevima AH109 i HF7c temelji se na razlikama u ekspresiji reporterskih gena i osjetljivosti reporterskog sustava, odnosno različitog praga aktivacije reporterskih gena.

Dobiveni rezultati interakcija u soju HF7c odgovaraju rezultatima istraživanja interakcije AY-WB SAP11 efektor s CIN-TCP transkripcijskim faktorima i njihovom destabilizacijom (Sugio *i sur.*, 2014.).

Slab rast kolonija na selektivnim podlogama bez histidina i adenina kod interakcija efektor *SAP54-like* '*Ca. P. solani*' i transkripcijskih faktora AtAP1 i AtSEP3 MADS-box skupine u soju AH109 te izostanak razvoja kolonija u HF7c kao i izostanak aktivacije reporterskog gena *lacZ* pri β -galaktozidaznom testu na razvijenim kolonijama soja AH109, ukazuje na relativno slabe i nestabilne interakcije *in vitro* istraživanih proteina (**Slika 54**).

Prethodno je pokazano da efektor SAP54 fitoplazme soja AY-WB potiče degradaciju transkripcijskih faktora MADS-box skupine, te da u sustavu Y2H stupa u interakciju s AP1 transkripcijskim faktorom (MacLean *i sur.*, 2014.). Dokazano je i da stupa u interakciju sa SEP transkripcijskim faktorima uključujući i SEP3 protein, što dovodi do poremećaja cvjetnog razvoja (MacLean *i sur.*, 2011., 2014.).

Prema tome, za očekivati je da u sustavu Y2H efektor *SAP54-like* fitoplazme '*Ca. P. solani*' vjerojatno stupa u interakciju s transkripcijskim faktorima AP1 i SEP3, ali s manjim intenzitetom i drugačijom specifičnošću od efektor *SAP54* fitoplazme AY-WB.

S obzirom na to da kolonije sojeva AH109 i HF7c nisu narasle (**Slika 55**), niti je zabilježena aktivacija β -galaktozidaze, u uvjetima sustava Y2H nije bilo ostvarene interakcije transmembranskih proteina STAMP genotipova ST6 i ST9 s proteinom aktinom iz kukca-vektora. Budući da je je STAMP transmembranski protein, za pravilno ostvarivanje svoje funkcije nužno je očuvanje njegove funkcionalne konformacije, koja prije svega ovisi o membranskom okruženju. Heterologna ekspresija rekombinantnog proteina u sustavu Y2H odvija se u jezgri kvasca, a ne u membrani, što može imati utjecaj na pravilno smatanje i prostornu organizaciju proteina te posljedično promijeniti konformaciju ovog, za fitoplazmu

'Ca. P. solani' jedinstvenog i varijabilnog proteina. Također, moguće je da ostvarenje interakcije s proteinom aktinom ovisi o dodatnim biljnim kofaktorima, regulatornim kompleksima i posebnim uvjetima, koji nisu dostupni u stanicama kvasca sustava Y2H.

Unatoč ograničenjima heterolognog sustava Y2H, dobiveni rezultati upućuju na slabu interakciju efektor SAP11-like i SAP54-like fitoplazme 'Ca. P. solani' s transkripcijskim faktorima AtTCP2, AtTCP4, AtAP1 i AtSEP3, dok interakcija membranskog proteina STAMP s aktinom kukca-vektora nije potvrđena. Uspješan rast pozitivne kontrole i izostanak rasta kolonija negativnih kontrola potvrđuju funkcionalnost eksperimentalnog sustava te vjerodostojnost dobivenih rezultata.

5.5 Analiza afinitetne kopurifikacije i imunodetekcije modificiranih proteina ST6(H) i ST9(H)

Transmembranski protein STAMP sadrži hidrofobnu transmembransku regiju i centralnu hidrofilnu regiju, izloženu izvan membrane. Zbog takve građe proteina, heterologna ekspresija i pročišćavanje rekombinantnih proteina su često ograničeni u bakterijskim sustavima poput *E. coli*.

Dosadašnja istraživanja fitoplazmatskih membranskih proteina Amp (membranski antigenski protein), Imp (imunodominantni membranski protein) i IdpA (imunodominantni membranski protein A) pokazala su niži prinos topivih cijelih transmembranskih proteina, njihovu agregacije ili inhibiciju rasta bakterija. Veća topivost i stabilnost rekombinantnih proteina postizana je uklanjanjem hidrofobnih dijelova istraživanih proteina (Arashida *i sur.*, 2008.; Barbara *i sur.*, 2002.; Boonrod *i sur.*, 2012., 2023.; Galetto *i sur.*, 2013b.; Kakizawa *i sur.*, 2006.; Siampour *i sur.*, 2015.). Zbog pretpostavke da hidrofobni dio transmembranskih proteina otežava pravilno konformiranje i topljivost u bakterijskom sustavu, u ovom istraživanju korištene su samo hidrofilne regije proteina STAMP genotipova ST6 i ST9, modificirani proteini označavani ST6(H) i ST9(H).

Signalima u *Western blot* analizi potvrđena je prisutnost proteina ST6(H) i ST9(H) u kopurificiranim proteinskim frakcijama, što je ujedno i rezultat njihove interakcije s aktinom u eksperimentu afinitetne kopurifikacije (**Slika 56, Slika 57**). Intenzitet signala ST6(H) je bio jači od intenziteta signala ST9(H), što može biti odgovor na jačinu interakcija s aktinom. U navedenom eksperimentalnom sustavu aktin je označen GST-biljegom i korišten kao protein mamac, a modificirani proteini ST6(H) i ST9(H) označeni His₆-biljegom korišteni kao plijen. Prisutnost proteina očekivanih molekulskih masa potvrđena je SDS-PAGE analizom.

Hidrofilne regije rekombinantnih proteina STAMP za oba genotipa pokazale su uspješnu ekspresiju i stabilnost prilikom kopurifikacije.

U obrnutoj varijanti eksperimenta modificirani proteini ST6(H) i ST9(H) označeni His₆-biljegom korišteni su kao proteini-mamci, dok je aktin označen GST-biljegom korišten kao protein-plijen. *Western blot* analiza nije pokazala jasan signal rekombinantnog proteina aktina uz izražena nespecifična vezanja antitijela na membrani (**Slika 58**). Prisutnost proteina odgovarajućih molekulskih masa u analiziranim proteinskim frakcijama je ipak potvrđena SDS-PAGE analizom (**Slika 59**), što je vjerojatno rezultat tehničkog ograničenja sustava i ne isključuje vjerojatnost nepostojanja interakcije.

6 ZAKLJUČCI

- Efektori su prema svojoj raznolikosti i polimorfizmu genoma fitoplazme '*Ca. P. solani*' specifični za pojedine sojeve unutar vrste. Dobiveni rezultati pokazuju prisutnost konzerviranih i varijabilnih efektorskih gena, pri čemu su *SAP11-like* i *SAP54-like* homolozi prisutni i relativno očuvani među analiziranim sojevima, dok se ostali efektori pojavljuju u različitoj zastupljenosti. Razlike u broju i sastavu efektoru među sojevima djelomično proizlaze i iz činjenice da su analizirani genomi na razini skica te da PMU regije, koje često nose efektorske gene, mogu biti nepotpuno obuhvaćene. Unatoč tome, identificirani specifični i divergentni efektori ovisno o soju, uključujući novu varijantu proteina *SAP54-like*, ukazuju na izraženu moguću gensku diferencijaciju unutar vrste te na kontinuiranu evolucijsku dinamiku efektoru. Rezultati potvrđuju da efektorski geni predstavljaju važne pokazatelje genske raznolikosti i adaptivnog potencijala sojeva '*Ca. P. solani*'.

- Efektori stupaju u interakciju s proteinima biljnog domaćina i mijenjaju njegov fenotip, pri čemu je metodama BiFC i Y2H dokazana interakcija *SAP11-like* efektoru fitoplazme '*Ca. P. solani*' s transkripcijskim faktorima AtTCP2 i AtTCP4 CIN-TCP skupine, a interakcija efektoru *SAP54-like* s transkripcijskim faktorima AtAP1 i AtSEP3 MADS-box proteinske skupine. Metodom BiFC određena je i lokalizacija interakcija efektoru *SAP11-like* i AtTCP2 u jezgri i citoplazmi epidermskih stanica agroinfiltriranih listova duhana, a *SAP11-like* i AtTCP4 u citoplazmi. Interakcije efektoru *SAP54-like* s AtAP1 i AtSEP3 lokalizirane su u jezgri epidermskih stanica agroinfiltriranih listova duhana. Ove interakcije su izravno povezane sa specifičnim fenotipskim promjenama transgeničnih uročnjaka.

Prekomjerna ekspresija gena *SAP11-like* u transgeničnih uročnjaka uzrokuje poremećaje u vegetativnom razvoju, što se odražava putem simptoma nazubljenosti i uvijanja listova, promijene filotaksije, pojačanog grananja, poremećaja apikalne dominacije te abnormalanog razvoja vršnog meristema. Promijene su zabilježene i u morfologiji komuški i korijena uročnjaka.

Prekomjerna ekspresija gena *SAP54-like* u transgeničnim biljkama uročnjaka uzrokuje poremećaje u razvoju cvjetnih i reproduktivnih struktura poput deformacije cvjetova, filodije, fascijacije, skraćenih internodija, zbijenosti pupova, te promijene vegetativnih organa kao što su smanjenje lisnih plojki i povećanje gustoće trihoma.

Navedeni simptomi su uglavnom opisani u skladu s rezultatima djelovanja homologâ efektorâ SAP11 i SAP54 na biljne domaćine, što dodatno potvrđuje opisanu funkcionalnost efektorâ SAP11-like i SAP54-like fitoplazme 'Ca. P. solani'.

- Fitoplazmatski membranski protein STAMP stupa u interakciju s aktinom kukca-vektora, a specifičnost interakcije ovisi o genotipu soja fitoplazme. U sustavu Y2H interakcija između membranskog proteina STAMP i aktina kukca-vektora *H. obsoletus* nije ostvarena, zbog ograničenja heterolognog sustava i ovisnosti ove interakcije o membranskom okruženju i pravilnoj konformaciji proteina STAMP.

Analiza BiFC *in planta* pokazala je jasnu citoplazmatsku lokalizaciju fluorescencijskog signala za detekciju interakcija ST6 i ST9 s aktinom, dok su afinitetna kopurifikacija i *Western blot* imunodetekcija potvrdile stvaranje proteinskih kompleksa modificiranih proteina ST6(H) i ST9(H) s aktinom u *in vitro* uvjetima. Razlike u intenzitetu signala između detektiranog proteina ST6(H) i ST9(H) upućuju na genotipski uvjetovanu varijabilnost proteina STAMP, gdje ST6 ima jaču stabilnost interakcije s aktinom. Ovi rezultati potvrđuju da membranski protein STAMP 'Ca. P. solani' specifično stupa u interakciju s aktinom kukca-vektora *H. obsoletus* te da je jačina interakcije uvjetovana genotipom soja fitoplazme 'Ca. P. solani', prema postavljenoj hipotezi.

Zaključno, prema dosadašnjim saznanjima ovim doktorskim radom predstavljen je prvi detaljni prikaz karakterizacije efektorâ SAP11-like i SAP54-like fitoplazme 'Ca. P. solani', kao i interakcije membranskog proteina STAMP s aktinom kukca-vektora vrste *Hyalesthes obsoletus*. Dobiveni rezultati pružaju nove spoznaje o molekularnim mehanizmima infekcije i prijenosa ove fitoplazme te predstavljaju važnu osnovu za razvoj novih strategija integrirane biljne zaštite i kontrole ovog značajnog biljnog patogena.

7 POPIS LITERATURE

- Agatep R, Kirkpatrick RD, Parchaliuk DL, Woods RA, Gietz RD (1998). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol protocol. *Tech Tips Online* **3**: 133–137.
- Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, i sur. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology* 2019 37:4 **37**: 420–423.
- Alvarez-Buylla ER, Benítez M, Corvera-Poiré A, Chaos Cador Á, Folter S de, Gamboa de Buen A, i sur. (2010). Flower development. *Arabidopsis Book* **8**: e0127.
- Arashida R, Kakizawa S, Hoshi A, Ishii Y, Jung HY, Kagiwada S, i sur. (2008). Heterogeneous dynamics of the structures of multiple gene clusters in two pathogenetically different lines originating from the same phytoplasma. *DNA Cell Biol* **27**: 209–217.
- Arricau-Bouvery N, Duret S, Dubrana M-P, Batailler B, Desqué D, Béven L, i sur. (2018). Variable Membrane Protein A of Flavescence Dorée Phytoplasma Binds the Midgut Perimicrovillar Membrane of *Euscelidius variegatus* and Promotes Adhesion to Its Epithelial Cells. *Appl Environ Microbiol* doi:https://doi.org/10.1128/AEM.02487-17.
- Bai B, Zhang G, Li Y, Wang Y, Sujata S, Zhang X, i sur. (2022). The ‘Candidatus Phytoplasma tritici’ effector SWP12 degrades the transcription factor TaWRKY74 to suppress wheat resistance. *Plant Journal* **112**: 1473–1488.
- Bai X, Correa VR, Toruño TY, Ammar ED, Kamoun S, Hogenhout SA (2008). AY-WB Phytoplasma Secretes a Protein That Targets Plant Cell Nuclei. *MPMI* **22**: 18–30.
- Bai X, Zhang J, Ewing A, Miller SA, Radek AJ, Shevchenko D V., i sur. (2006). Living with genome instability: The adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *J Bacteriol* **188**: 3682–3696.
- Barbara DJ, Morton A, Clark MF, Davies DL (2002). Immunodominant membrane proteins from two phytoplasmas in the aster yellows clade (chlorate aster yellows and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region. *Microbiology (Reading)* **148**: 157–167.
- Bendtsen JD, Nielsen H, Heijne G Von, Brunak S (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**: 783–795.

- Berg M, Davies DL, Clark MF, Vetten HJ, Maier G, Marcone C, i sur. (1999). Isolation of the gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation phytoplasma, and expression and characterization of the gene product. *Microbiology (Reading)* **145 (Pt 8)**: 1937–1943.
- Bi B, Tang J, Han S, Guo J, Miao Y (2017). Sinapic acid or its derivatives interfere with abscisic acid homeostasis during *Arabidopsis thaliana* seed germination. *BMC Plant Biol* **17**: 99.
- Blanc-Mathieu R, Dumas R, Turchi L, Lucas J, Parcy F (2022). Plant-TFClass: a structural classification for plant transcription factors. *bioRxiv* 2022.11.22.517060doi:10.1101/2022.11.22.517060.
- Blomquist CL, Barbara DJ, Davies DL, Clark MF, Kirkpatrick BC (2001). An immunodominant membrane protein gene from the Western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. *Microbiology (Reading)* **147**: 571–580.
- Boonrod K, Kuaguim L, Braun M, Müller-Renno C, Ziegler C, Krczal G (2023). Identification of the Actin-Binding Region and Binding to Host Plant Apple Actin of Immunodominant Transmembrane Protein of ‘Candidatus Phytoplasma mali.’ *Int J Mol Sci* **24**: .
- Boonrod K, Munteanu B, Jarausch B, Jarausch W, Krczal G (2012). An immunodominant membrane protein (Imp) of “Candidatus Phytoplasma mali” binds to plant actin. *Mol Plant Microbe Interact* **25**: 889–895.
- Boonrod K, Strohmayer A, Schwarz T, Braun M, Tropf T, Krczal G (2022). Beyond Destabilizing Activity of SAP11-like Effector of Candidatus Phytoplasma mali Strain PM19. *Microorganisms* **10**: .
- Buoso S, Pagliari L, Musetti R, Martini M, Marroni F, Schmidt W, i sur. (2019). ‘Candidatus Phytoplasma solani’ interferes with the distribution and uptake of iron in tomato. *BMC Genomics* 2019 20:1 **20**: 703-.
- Cagnola JI, Cerdán PD, Pacín M, Andrade A, Rodriguez V, Zurbriggen MD, i sur. (2018). Long-Day Photoperiod Enhances Jasmonic Acid-Related Plant Defense. *Plant Physiol* **178**: 163.
- Carreón-Anguiano KG, Vila-Luna SE, Sáenz-Carbonell L, Canto-Canché B (2023). Novel Insights into Phytoplasma Effectors. *Horticulturae* **9**: 1228.
- Chang HC, Chen JC (2024). An efficient grafting method for phytoplasma transmission in *Catharanthus roseus*. *Plant Methods* **20**: 1–10.

- Chen K, Rajewsky N (2007). The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat Rev Genet* **8**: 93–103.
- Chowdhary AA, Mishra S, Mehrotra S, Upadhyay SK, Bagal D, Srivastava V (2022). Plant transcription factors: an overview of their role in plant life. *Plant Transcription Factors: Contribution in Development, Metabolism, and Environmental Stress* 3–20doi:10.1016/B978-0-323-90613-5.00003-0.
- Christensen NM, Axelsen KB, Nicolaisen M, Schulz A (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends Plant Sci* **10**: 526–535.
- Clough SJ, Bent AF (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**: 735–743.
- Constable FE (2009). Phytoplasma epidemiology: Grapevines as a model. *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors* 188–212doi:10.1079/9781845935306.0188;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION.
- Cordova I, Jones P, Harrison NA, Oropeza C (2003). In situ PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Mol Plant Pathol* **4**: 99–108.
- Crawford BCW, Nath U, Carpenter R, Coen ES (1996). CINCINNATA Controls Both Cell Differentiation and Growth in Petal Lobes and Leaves of *Antirrhinum* 1. doi:10.1104/pp.103.036368.
- Cubas P, Lauter N, Doebley J, Coen E (1999). The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *The Plant Journal* **18**: 215–222.
- Cvrković T, Jović J, Mitrović M, Krstić O, Toševski I (2013). Experimental and molecular evidence of *Reptalus panzeri* as a natural vector of bois noir _ Enhanced Reader. doi:https://doi.org/10.1111/ppa.12080.
- Dale JL, Kim KS (1969). Mycoplasmalike bodies in dodder parasitizing aster yellows-infected plants. *Phytopathology* **59**: 1765–1766.
- Dangl JL, Jones JDG (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826–833.
- Danisman S, Wal F van der, Dhondt S, Waites R, Folter S de, Bimbo A, i sur. (2012). *Arabidopsis* Class I and Class II TCP Transcription Factors Regulate Jasmonic Acid Metabolism and Leaf Development Antagonistically. *Plant Physiol* **159**: 1511–1523.
- Dawkins R (1999). The extended phenotype : the long reach of the gene. *The Bactra Review* viii, 313 p.at <http://www.amazon.com/dp/0192880519>.

- Dermastia M (2019). Plant hormones in phytoplasma infected plants. *Front Plant Sci* **10**: 453710.
- Dermastia M, Drčelić, MD, Music'2 MŠ, Music'2 M (2025). Molecular Interactions of ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ with its Hosts: Insights into Pathogenicity Mechanisms. *Phytoplasmas* 161–172doi:10.1079/9781800627031.0010.
- Doi Y, Teranaka M, Yora K, Asuzama H (1967). Mycoplasma- or PLT Group-like Microorganisms Found in the Phloem Elements of Plants Infected with Mulberry Dwarf, Potato Witches’ Broom, Aster Yellows, or Paulownia Witches’ Broom. *Japanese Journal of Phytopathology* **33**: 259–266.
- Dong J, Sun N, Yang J, Deng Z, Lan J, Qin G, i sur. (2019). The Transcription Factors TCP4 and PIF3 Antagonistically Regulate Organ-Specific Light Induction of SAUR Genes to Modulate Cotyledon Opening during De-Etiolation in Arabidopsis. *Plant Cell* **31**: 1155–1170.
- Edward DGFF, Freundnt EA (1967). Proposal for Mollicutes as name of the class established for the order Mycoplasmatales. *Int J Syst Evol Microbiol* **17**: 267–268.
- Efroni I, Blum E, Goldshmidt A, Eshed Y (2008). A protracted and dynamic maturation schedule underlies Arabidopsis leaf development. *Plant Cell* **20**: 2293–2306.
- Efroni I, Han SK, Kim HJ, Wu MF, Steiner E, Birnbaum KD, i sur. (2013). Regulation of leaf maturation by chromatin-mediated modulation of cytokinin responses. *Dev Cell* **24**: 438–445.
- EFSA Panel on Plant Health (Wiley-Blackwell Publishing Ltd: 2014). *Scientific Opinion on the pest categorisation of Candidatus Phytoplasma solani*EFSA Journal **12**: .
- Fabre A, Balakishiyeva G, Ember I, Omar A, Acs Z, Kolber M, i sur. (2011a). *StAMP encoding the antigenic membrane protein of stolbur phytoplasma is useful for molecular epidemiology*Bull Insectology **64**: .
- Fabre A, Danet JL, Foissac X (2011b). The stolbur phytoplasma antigenic membrane protein gene stamp is submitted to diversifying positive selection. *Gene* **472**: 37–41.
- Feilotter HE, Harmon GJ, Ruddell CJ, Beach D (1994). Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucleic Acids Res* **22**: 1502–1503.
- Fields S, Song OK (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245–246.
- Firrao G, Andersen M, Bertaccini A, Boudon E, Bové JM, Daire X, i sur. (2004). “*Candidatus Phytoplasma*”, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1243–1255.

- Firrao G, Garcia-Chapa M, Marzachì C (2007). *Phytoplasmas: Genetics, Diagnosis and Relationships with the Plant and Insect Host* *Frontiers in Bioscience* **12**: .
- Galetto L, Bosco D, Balestrini R, Genre A, Fletcher J, Marzachì C (2011). The Major Antigenic Membrane Protein of “Candidatus *Phytoplasma asteris*” Selectively Interacts with ATP Synthase and Actin of Leafhopper Vectors. *PLoS One* **6**: e22571.
- Galetto L, Bosco D, Marzachì C (2013a). Selection of reference genes from two leafhopper species challenged by phytoplasma infection, for gene expression studies by RT-qPCR. *BMC Res Notes* **6**: .
- Galetto L, Siampour M, Marzachì C (2013b). Preparation of phytoplasma membrane recombinant proteins. *Methods Mol Biol* **938**: 351–369.
- Gelvin SB (2003). Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**: 16–37.
- González-Grandío E, Poza-Carrión C, Sorzano COS, Cubas P (2013). BRANCHED1 promotes axillary bud dormancy in response to shade in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 834–850.
- Gregis V, Sessa A, Colombo L, Kater MM (2008). AGAMOUS-LIKE24 and SHORT VEGETATIVE PHASE determine floral meristem identity in Arabidopsis. *Plant J* **56**: 891–902.
- Gundersen DE, Lee IM, Schaff DA, Harrison NA, Chang CJ, Davis RE, i sur. (1996). Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA groups I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas). *Int J Syst Bacteriol* **46**: 64–75.
- Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* **22**: 346–353.
- He Z, Zhou · Xiaomei, Chen J, Yin L, Zeng Z, Xiang J, i sur. (2021). Identification of a consensus DNA-binding site for the TCP domain transcription factor TCP2 and its important roles in the growth and development of Arabidopsis. *Mol Biol Rep* **48**: 2223–2233.
- Hogenhout SA, Hoorn RAL Van Der, Terauchi R, Kamoun S (2009). Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 115–122.
- Hogenhout SA, Loria R (2008). Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 449–456.

- Hogenhout SA, Oshima K, Ammar ED, Kakizawa S, Kingdom HN, Namba S (2008). Phytoplasmas: Bacteria that manipulate plants and insects. *Mol Plant Pathol* **9**: 403–423.
- Hogenhout SA, Šeruga Musić M (CABI Publishing: 2009). *Phytoplasma Genomics, from Sequencing to Comparative and Functional Genomics – What Have We Learnt? Phytoplasmas – Genomes, Plant Hosts and Vectors* at <<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20093353125>>.
- Hoorn RAL Van Der, Kamoun S (2008). From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *Plant Cell* **20**: 2009.
- Hoshi A, Oshima K, Kakizawa S, Ishii Y, Ozeki J, Hashimoto M, i sur. (2009). A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 6416–6421.
- Hren M, Nikolić P, Rotter A, Blejec A, Terrier N, Ravnikar M, i sur. (2009). “Bois noir” phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomics* 2009 10:1 **10**: 460-.
- Huang T, Irish VF (2015). Temporal Control of Plant Organ Growth by TCP Transcription Factors. *Curr Biol* **25**: 1765–1770.
- Huang W, MacLean AM, Sugio A, Maqbool A, Busscher M, Cho ST, i sur. (2021). Parasitic modulation of host development by ubiquitin-independent protein degradation. *Cell* **184**: 5201-5214.e12.
- Huitema E, Bos JIB, Tian M, Win J, Waugh ME, Kamoun S (2004). Linking sequence to phenotype in Phytophthora-plant interactions. *Trends Microbiol* **12**: 193–200.
- Immink RGH, Posé D, Ferrario S, Ott F, Kaufmann K, Valentim FL, i sur. (2012). Characterization of SOC1’s Central Role in Flowering by the Identification of Its Upstream and Downstream Regulators. *Plant Physiol* **160**: 433–449.
- Imo M, Maixner M, Johannesen J (2013). Sympatric diversification vs. immigration: deciphering host-plant specialization in a polyphagous insect, the stolbur phytoplasma vector *Hyalesthes obsoletus* (Cixiidae). *Mol Ecol* **22**: 2188–2203.
- Ishii T (1965). Dwarf Disease of Mulberry Tree. *Japanese Journal of Phytopathology* **31**: 139–144.
- Iwabuchi N, Kitazawa Y, Maejima K, Koinuma H, Miyazaki A, Matsumoto O, i sur. (2020). Functional variation in phyllogen, a phyllody-inducing phytoplasma effector family, attributable to a single amino acid polymorphism. *Mol Plant Pathol* **21**: 1322–1336.

- Jagić M (2024). Domain-specific interactions of BPM1 with DMS3 and RDM1 in RNAdirected DNA methylation. at <<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:359683>>.
- Jagić M, Vuk T, Škiljaica A, Markulin L, Vičić Bočkor V, Tokić M, i sur. (2022). BPM1 regulates RdDM-mediated DNA methylation via a cullin 3 independent mechanism. *Plant Cell Rep* **41**: 2139–2157.
- James P (2001). Yeast two-hybrid vectors and strains. *Methods Mol Biol* **177**: 41–84.
- James P, Halladay J, Craig EA (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425–1436.
- Janik K, Mithöfer A, Raffener M, Stellmach H, Hause B, Schlink K (2017). An effector of apple proliferation phytoplasma targets TCP transcription factors-a generalized virulence strategy of phytoplasma? *Mol Plant Pathol* **18**: 435–442.
- Jović J, Toševski I (2024). A plea for using the correct taxon names of phytoplasma vectors: a case of *Reptalus artemisiae*, a vector of “*Candidatus Phytoplasma solani*.” *The 6th European Bois Noir Workshop -1stInternational Pro-AECOGY Conference 2024* 2024.
- Jung HY, Miyata SI, Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Wei W, i sur. (2003). First complete nucleotide sequence and heterologous gene organization of the two rRNA operons in the phytoplasma genome. *DNA Cell Biol* **22**: 209–215.
- Kakizawa S, Oshima K, Namba S (2006). Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. *Trends Microbiol* **14**: 254–256.
- Kakizawa S, Oshima K, Nishigawa H, Jung HY, Wei W, Suzuki S, i sur. (2004). Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellows phytoplasma through the Sec protein-translocation system in *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading)* **150**: 135–142.
- Kamoun S (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu Rev Phytopathol* **44**: 41–60.
- Kamoun S (2007). Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 358–365.
- Kerppola TK (2009). Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: Characteristics of protein fragment complementation. *Chem Soc Rev* **38**: 2876–2886.
- Kirdat K, Tiwarekar B, Swetha P, Padma S, Thorat V, Manjula KN, i sur. (2022). Nested Real-Time PCR Assessment of Vertical Transmission of Sandalwood Spike Phytoplasma (‘*Ca. Phytoplasma asteris*’). *Biology (Basel)* **11**: 1494.

- Koyama T, Furutani M, Tasaka M, Ohme-Takagi M (2007). TCP transcription factors control the morphology of shoot lateral organs via negative regulation of the expression of boundary-specific genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 473–484.
- Koyama T, Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M (2010). TCP transcription factors regulate the activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as well as the auxin response, during differentiation of leaves in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**: 3574–3588.
- Krogh A, Larsson B, Heijne G Von, Sonnhammer ELL (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**: 567–580.
- Kube M, Schneider B, Kuhl H, Dandekar T, Heitmann K, Migdoll AM, i sur. (2008). The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma “Candidatus Phytoplasma mali.” *BMC Genomics* **9**: .
- Kunkel LO (1926). Studies on Aster Yellows. *Am J Bot* **13**: 646.
- Lan J, Qin G (2020). The regulation of CIN-like TCP transcription factors. *Int J Mol Sci* **21**: 1–17.
- Lan J, Zhang J, Yuan R, Yu H, An F, Sun L, i sur. (2021). TCP transcription factors suppress cotyledon trichomes by impeding a cell differentiation-regulating complex. *Plant Physiol* **186**: 434–451.
- Langer M, Maixner M (2004). Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis* **43**: 191–199.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, McWilliam H, i sur. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947–2948.
- Lee IM, Davis RE, Gundersen-Rindal DE (2000). Phytoplasma: Phytopathogenic mollicutes. *Annu Rev Microbiol* **54**: 221–255.
- Li S (2015). The Arabidopsis thaliana TCP transcription factors: A broadening horizon beyond development. doi:10.1080/15592324.2015.1044192.
- Lim P-O, Sears BB (1989). 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *J Bacteriol* **171**: 5901–5906.
- Liu C, Zhou J, Bracha-Drori K, Yalovsky S, Ito T, Yu H (2007). Specification of Arabidopsis floral meristem identity by repression of flowering time genes. *Development* **134**: 1901–1910.

- Lu H, Wilson B, Zhang H, Woruba SB, Feng B, Johnson AC, i sur. (2024). Detection and identification of Bogia coconut syndrome phytoplasma from seed-associated tissues and seedlings of coconut (*Cocos nucifera*) and betel nut (*Areca catechu*). *Scientific Reports* 2024 14:1 **14**: 1–9.
- Lu YT, Li MY, Cheng KT, Tan CM, Su LW, Lin WY, i sur. (2014). Transgenic plants that express the phytoplasma effector SAP11 show altered phosphate starvation and defense responses. *Plant Physiol* **164**: 1456–1469.
- MacLean AM, Orlovskis Z, Kowitzwanich K, Zdzarska AM, Angenent GC, Immink RGH, i sur. (2014). Phytoplasma Effector SAP54 Hijacks Plant Reproduction by Degrading MADS-box Proteins and Promotes Insect Colonization in a RAD23-Dependent Manner. *PLoS Biol* **12**: .
- MacLean AM, Sugio A, Makarova O V., Findlay KC, Grieve VM, Tóth R, i sur. (2011). Phytoplasma Effector SAP54 Induces Indeterminate Leaf-Like Flower Development in Arabidopsis Plants. *Plant Physiol* **157**: 831–841.
- Maejima K, Iwai R, Himeno M, Komatsu K, Kitazawa Y, Fujita N, i sur. (2014a). Recognition of floral homeotic MADS domain transcription factors by a phytoplasmal effector, phylogen, induces phyllody. *Plant J* **78**: 541–554.
- Maejima K, Oshima K, Namba S (2014b). Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria. *Journal of General Plant Pathology* **80**: 210–221.
- Marccone C (2014). Molecular biology and pathogenicity of phytoplasmas. *Annals of Applied Biology* **165**: 199–221.
- Marccone C, Neimark H, Ragozzino A, Lauer U, Seemüller E (1999). *Chromosome Sizes of Phytoplasmas Composing Major Phylogenetic Groups and Subgroups***89**: .
- Marsch-Martínez N, Folter S de (2016). Hormonal control of the development of the gynoeceum. *Curr Opin Plant Biol* **29**: 104–114.
- Martín-Trillo M, Cubas P (2010). TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends Plant Sci* **15**: 31–39.
- Minato N, Himeno M, Hoshi A, Maejima K, Komatsu K, Takebayashi Y, i sur. (2014). The phytoplasmal virulence factor TENGU causes plant sterility by downregulating of the jasmonic acid and auxin pathways. *Sci Rep* **4**: .
- Mirkin FG, Mugford ST, Thole V, Marzo M, Hogenhout SA (2025). Effector innovation in genome-reduced phytoplasmas and other host-dependent mollicutes. *PLoS Genet* **21**: e1011946.

- Mitrović J, Siewert C, Duduk B, Hecht J, Mölling K, Broecker F, i sur. (2014). Generation and Analysis of Draft Sequences of ‘Stolbur’ Phytoplasma from Multiple Displacement Amplification Templates.’ *J Mol Microbiol Biotechnol* **24**: 1–11.
- Mittelberger C, Hause B, Janki K (2022). The ‘Candidatus Phytoplasma mali’ effector protein SAP11CaPm interacts with MdTCP16, a class II CYC/TB1 transcription factor that is highly expressed during phytoplasma infection. *PLoS ONE* **17**(12):e0272467 doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272467>.
- Mittelberger C, Moser M, Hause B, Janik K (2024). ‘Candidatus Phytoplasma mali’ SAP11-Like protein modulates expression of genes involved in energy production, photosynthesis, and defense in *Nicotiana occidentalis* leaves. *BMC Plant Biol* **24**: 1–18.
- Murashige T, Skoog F (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* **15**: 473–497.
- Murray RGE, Schleifer KH (1994). Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *Int J Syst Bacteriol* **44**: 174–176.
- Murray RGE, Stackebrandt E (1995). Taxonomic note: implementation of the provisional status Candidatus for incompletely described procaryotes. *Int J Syst Bacteriol* **45**: 186–187.
- Namba S (2019). Molecular and biological properties of phytoplasmas. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **95**: 401.
- Navaud O, Dabos P, Carnus E, Tremousaygue D, Hervé C (2007). TCP transcription factors predate the emergence of land plants. *J Mol Evol* **65**: 23–33.
- Ng M, Yanofsky MF (2001). Activation of the Arabidopsis B class homeotic genes by APETALA1. *Plant Cell* **13**: 739–753.
- Nishigawa H, Miyata S-I, Oshima K, Sawayanagi T, Komoto A, Kuboyama T, i sur. (2001). In planta expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins *Microbiology (N Y)* **147**: .
- Novy R, Drott D, Yaeger K, Mierendorf R (2001). Overcoming the codon bias of E . coli for enhanced protein expression 1 Enhanced sensitivity of ChIP through the application of Pellet Paint. .
- Okuda S (1972). Occurrence of diseases caused by mycoplasma-like organisms in Japan. *Plant Prot* **26**: 180–183.

- Orlovskis Z, Hogenhout SA (2016). A bacterial parasite effector mediates insect vector attraction in host plants independently of developmental changes. *Front Plant Sci* **7**: .
- Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Jung HY, Wei W, Suzuki S, i sur. (2004). Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nat Genet* **36**: 27–29.
- Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Kuboyama T, Miyata SI, Ugaki M, i sur. (2001). A plasmid of phytoplasma encodes a unique replication protein having both plasmid- and virus-like domains: Clue to viral ancestry or result of virus/plasmid recombination? *Virology* **285**: 270–277.
- Oshima K, Maejima K, Namba S, Nishida H, Jung H-Y, Bertaccini A, i sur. (2013). Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. doi:10.3389/fmicb.2013.00230.
- Plavec J, Ivančan G, Škorić D, Foissac X, Šeruga Musić M (2024). Genetically divergent “Candidatus *Phytoplasma solani*” isolates in Croatian vineyard pathosystems suggest complex epidemiological networks. *Phytopathology Research* 2024 6:1 **6**: 46-.
- Quaglino F, Zhao Y, Casati P, Bulgari D, Bianco PA, Wei W, i sur. (2013). “Candidatus *Phytoplasma solani*”, a novel taxon associated with stolbur-and bois noir-related diseases of plants. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**: 2879–2894.
- Rao GP, Bertaccini A (2026). Phytoplasma and phytoplasma-associated diseases in a global context. *Indian Phytopathology* 2026 1–17doi:10.1007/S42360-026-01035-4.
- Rashidi M, Galetto L, Bosco D, Bulgarelli A, Vallino M, Veratti F, i sur. (2015). Role of the major antigenic membrane protein in phytoplasma transmission by two insect vector species. *BMC Microbiol* **15**: .
- Rath M, Challa KR, Sarvepalli K, Nath U (2022). CINCINNATA-Like TCP Transcription Factors in Cell Growth – An Expanding Portfolio. *Front Plant Sci* **13**: .
- Rendulić T (2018). *Istraživanje interakcija proteina BPM1, DMS3 i RDM1 bimolekulskom fluorescencijskom komplementacijom u stanicama duhanaat* <<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:006801>>.

- Riedle-Bauer M, Sára A, Regner F (2008). Transmission of a Stolbur Phytoplasma by the Agalliinae Leafhopper *Anaceratagallia ribauti* (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cicadellidae). *Journal of Phytopathology* **156**: 687–690.
- Sasaki T, Lorković ZJ, Liang SC, Matzke AJM, Matzke M (2014). The ability to form homodimers is essential for RDM1 to function in RNA-directed DNA methylation. *PLoS One* **9**: .
- Satta E, Paltrinieri S, Bertaccini A (2019). Phytoplasma Transmission by Seed. *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - II: Transmission and Management of Phytoplasma - Associated Diseases* 131–147doi:10.1007/978-981-13-2832-9_6.
- Sears BB, Kirkpatrick BC (1994). Unveiling the evolutionary relationships of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. *ASM News* **60**: 307–312.
- Seruga Music M, Samarzija I, Hogenhout SA, Haryono M, Cho ST, Kuo CH (2019). The genome of ‘Candidatus Phytoplasma solani’ strain SA-1 is highly dynamic and prone to adopting foreign sequences. *Syst Appl Microbiol* **42**: 117–127.
- Siampour M, Izadpanah K, Marzachi C, Abarkoochi MS (2015). Identification and characterization of conserved and variable regions of lime witches’ broom phytoplasma genome. *Microbiology (Reading)* **161**: 1741–1751.
- Škiljaica A, Jagić M, Vuk T, Leljak Levanić D, Bauer N, Markulin L (2022). Evaluation of reference genes for RT-qPCR gene expression analysis in *Arabidopsis thaliana* exposed to elevated temperatures. *Plant Biol* **24**: 367–379.
- Škorić D, Šarić A, Vibio M, Murari E, Krajačić M, Bertaccini A (1998). Molecular identification and seasonal monitoring of phytoplasmas infecting Croatian grapevines. *Vitis-Geilweilerhof* **37**: 171–175.
- Strader L, Weijers D, Wagner D (2022). Plant transcription factors — being in the right place with the right company. *Curr Opin Plant Biol* **65**: 102136.
- Strauss E (2009). Phytoplasma Research Begins to Bloom. *Science (1979)* **325**: 388–390.
- Strohmayr A, Schwarz T, Braun M, Krczal G, Boonrod K (2021). The effect of the anticipated nuclear localization sequence of ‘Candidatus phytoplasma Mali’ SAP11-like protein on localization of the protein and destabilization of TCP transcription factor. *Microorganisms* **9**: .
- Sugawara K, Honma Y, Komatsu K, Himeno M, Oshima K, Namba S (2013). The alteration of plant morphology by small peptides released from the proteolytic processing of the bacterial peptide TENGU. *Plant Physiol* **162**: 2005–2014.

- Sugio A, Hogenhout SA (2012). The genome biology of phytoplasma: Modulators of plants and insects. *Curr Opin Microbiol* **15**: 247–254.
- Sugio A, Kingdom HN, MacLean AM, Grieve VM, Hogenhout SA (2011a). Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: E1254–E1263.
- Sugio A, Maclean AM, Hogenhout SA (2014). The small phytoplasma virulence effector SAP11 contains distinct domains required for nuclear targeting and CIN-TCP binding and destabilization. *New Phytologist* **202**: 838–848.
- Sugio A, MacLean AM, Kingdom HN, Grieve VM, Manimekalai R, Hogenhout SA (2011b). Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. *Annu Rev Phytopathol* **49**: 175–195.
- Suzuki S, Oshima K, Kakizawa S, Arashida R, Jung HY, Yamaji Y, i sur. (2006). Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 4252–4257.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol* **38**: 3022–3027.
- Todd JNA, Carreón-Anguiano KG, Islas-Flores I, Canto-Canché B (2022). Microbial Effectors: Key Determinants in Plant Health and Disease. *Microorganisms* **10**: .
- Toruño TY, Seruga Musić M, Simi S, Nicolaisen M, Hogenhout SA (2010). Phytoplasma PMU1 exists as linear chromosomal and circular extrachromosomal elements and has enhanced expression in insect vectors compared with plant hosts. *Mol Microbiol* **77**: 1406–1415.
- Toth R, Huettel B, Eini O, Varrelmann M, Kube M (2025). The complete genome sequence of the stolbur pathogen “Candidatus Phytoplasma solani” from *Pentastiridius leporinus*. *Microbiol Resour Announc* **14**: .
- Tran-Nguyen LTT, Kube M, Schneider B, Reinhardt R, Gibb KS (2008). Comparative genome analysis of “Candidatus Phytoplasma australiense” (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and “Ca. Phytoplasma asteris” Strains OY-M and AY-WB. *J Bacteriol* **190**: 3979–3991.
- Vadde BVL, Challa KR, Sunkara P, Hegde AS, Nath U (2019). The TCP4 Transcription Factor Directly Activates TRICHOMELESS1 and 2 and Suppresses Trichome Initiation. *Plant Physiol* **181**: 1587–1599.

- Vindimian ME, Ciccotti A. M., Filippi M., Springhetti M., Deromedi M. (2002). Trasmissione di Apple Proliferation (AP) tramite anastomosi radicale. *Petria* **12**: 375–375.
- Wang N, Yang H, Yin Z, Liu W, Sun L, Wu Y (2018). Phytoplasma effector SWP1 induces witches' broom symptom by destabilizing the TCP transcription factor BRANCHED1. *Mol Plant Pathol* **19**: 2623–2634.
- Webb DR, Bonfiglioli RG, Carraro L, Osler R, Symons RH (1999). Oligonucleotides as hybridization probes to localize phytoplasmas in host plants and insect vectors. *Phytopathology* **89**: 894–901.
- Wei W, Shao J, Zhao Y, Inaba J, Ivanauskas A, Bottner-Parker KD, i sur. (2024). iPhyDSDB: Phytoplasma Disease and Symptom Database. *Biology (Basel)* **13**: 657.
- Wei W, Zhao Y (2022). Phytoplasma Taxonomy: Nomenclature, Classification, and Identification. *Biology (Basel)* **11**: .
- Weintraub PG, Beanland LA (2006). Insect vectors of phytoplasmas. *Annu Rev Entomol* **51**: 91–111.
- Win J, Chaparro-Garcia A, Belhaj K, Saunders DGO, Yoshida K, Dong S, i sur. (2012). Effector Biology of Plant-Associated Organisms: Concepts and Perspectives. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **77**: 235–247.
- Win J, Kamoun S (2004). pCB301-p19: A Binary Plasmid Vector to Enhance Transient Expression of Transgenes by Agroinfiltration. at <<http://www.KamounLab.net>>.
- Wu MF, Sang Y, Bezhani S, Yamaguchi N, Han SK, Li Z, i sur. (2012). SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPases overcome polycomb repression and control floral organ identity with the LEAFY and SEPALLATA3 transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 3576–3581.
- Xu R, Sun P, Jia F, Lu L, Li Y, Zhang S, i sur. (2014). Genomewide analysis of TCP transcription factor gene family in *Malus domestica*. *J Genet* **93**: 733–746.
- Yang CQ, Fang X, Wu XM, Mao YB, Wang LJ, Chen XY (2012). Transcriptional Regulation of Plant Secondary MetabolismF. *J Integr Plant Biol* **54**: 703–712.
- Yu YL, Yen KW, Lin CP (1998). An antigenic protein gene of a phytoplasma associated with sweet potato witches' broom. *Microbiology (Reading)* **144 (Pt 5)**: 1257–1262.
- Zhang S, Li C, Si J, Han Z, Chen D (2022). Action Mechanisms of Effectors in Plant-Pathogen Interaction. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 6758 **23**: 6758.

Zhou Y, Xun Q, Zhang D, Lv M, Ou Y, Li J (2019). TCP Transcription Factors Associate with PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 and CRYPTOCHROME 1 to Regulate Thermomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *iScience* **15**: 600–610.

8 ŽIVOTOPIS

Marina Drčelić rođena je 6. rujna 1987. u Zadru, gdje je završila prirodoslovno-matematički smjer Gimnazije Franje Petrića. Preddiplomski studij biologije te diplomski studij eksperimentalne biologije, smjer fiziologija i imunobiologija završila je na Sveučilištu u Zagrebu Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, 2014. godine. Tijekom studija radila je kao edukator u JU Park-šuma Maksimir i Zoološkom vrtu Zagreb. U suradnji s ATJ Lučko vodila je Veliku eko-akciju „24 sata“: čišćenje ilegalnih odlagališta otpada te aktivno sudjelovala u organizaciji kulturno-zabavnih događanja diljem Hrvatske. Pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivana Kosaleca u Zavodu za mikrobiologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, četiri je godine razvijala laboratorijske vještine te interes za mikrobiologiju.

Nakon diplome zaposlila se u PrimeVigilance d.o.o., gdje je tijekom pet godina napredovala do pozicije voditeljice projekta i međunarodnog tima. Godine 2019. vratila se znanosti te započinje rad u Zavodu za mikrobiologiju PMF-a, gdje vodi vježbe iz više kolegija. Upisala je doktorski studij biologije pod mentorstvom prof. dr. sc. Martine Šeruge Musić; te istražuje fitoplazme, njihovu epidemiologiju i interakcije s domaćinima. Sudjelovala je u bilateralnom projektu sa Srbijom te na trima projektima Hrvatske zaklade za znanost.

Koautorica je četiri znanstvena rada, poglavlja u drugom izdanju knjige „*Phytoplasmas Genomes, Plant Hosts and Vectors*“ i 21 kongresna sažetka. Usavršavala se na dva programa u Hrvatskoj i četiri u inozemstvu. Dobitnica je dviju Sveučilišnih stipendija za akademsku mobilnost i stipendije „*Student Travel Award*“ (IOM) za sudjelovanje na kongres u Japanu. Aktivna je u Hrvatskom mikrobiološkom društvu, a bila je i članica Organizacijskog odbora međunarodnog simpozija Power of Viruses 2024.

Sudjelovala je u manifestacijama „Dan i noć PMF-a“ kao mentorica studentima i koordinatorica posjetitelja, a 2024. je bila i sudionica trkačkog tima PMF-a na Zagrebačkom noćnom ceneru.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

- Dermastia M, Drčelić M, Šeruga Musić M (2025). Molecular interactions of ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ with its hosts: Insights into pathogenicity mechanisms. In: *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors* 2nd ed. pp. 161–172. CABI. <https://doi.org/10.1079/9781800627031.0010>
- Drčelić M, Skiljaica A, Polak B, Bauer N, Šeruga Musić M (2024). ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ predicted effector SAP11-like alters morphology of transformed *Arabidopsis* plants and interacts with AtTCP2 and AtTCP4 plant transcription factors. *Pathogens* **13**: 893.
- Goic-Barisic I, Music MS, Drcelic M, Tuncbilek S, Akca G, Jakovac S, Tonkić M, Hrenovic J (2023). Molecular characterisation of colistin and carbapenem-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Southeast Europe. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* **33**: 26–30.
- Musić MŠ, Polak B, Drčelić M, Pei S-C, Kuo C-H (2025). Sequencing and comparative analyses of ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ genomes reveal diversity of effectors and potential mobile units. *Microbial Genomics* **11**: 001401.
- Pustijanac E, Hrenović J, Vranić-Ladavac M, Močenić M, Karčić N, Lazarić Stefanović L, Hrستیć I, Lončarić J, Šeruga Musić M, Drčelić M, Majstorović D, Kovačić I (2023). Dissemination of clinical *Acinetobacter baumannii* isolate to hospital environment during the COVID-19 pandemic. *Pathogens* **12**: 410.

9 PRILOZI

Prilog A Reprezentativni nukleotidni i aminokiselinski sljedovi gena i proteina korišteni u istraživanju

Prilog A.1: Sljedovi fitoplazmatskih gena i proteina

>SAP11-like

ATGTTTAAAATCAAAAATAATTTATTATTTTTAAATGTATTTTTATTATTGGTTTAAGTTTATTTTAAATTACT
AATAATAATTCCATTATGGCTACACCTAAAAAAAATCATGGAAAAGATATAATTTTCATCAAAAGAAGAAGCT
AAAAAAGATGTAAAAAATTTTTATGAATTATATAATACTCTTGAAAATTATTCAGAAGAAGATAGAAGTAAA
ATTATTCAAATGTTATCGAATCCAGAAATAATAAAAAAATTTAAAGAAAAAATTGAAGAAGAAAAAAAACA
GGAAAAAGGTTCTTCTTCTAGACAGCCTGATAATTGCCACAAATAA

>SAP11-like_optimizacija_Ath

ATGAATGTTTTCTCTTCATTGGTTTAAGTTTGTTCCTAATAACAAACAACAATTCAATCATGGCTACTCCTAA
AAAGAATCATGGGAAAGATATAATATCCAGCAAAGAAGAAGCAAAGAAGGATGTGAAGAACTTTTATGAGC
TTTACAACACCTTGGAGAATTATTCTGAAGAAGATAGATCAAAGATCATTCAGATGCTTAGTAACCCGGAGA
TTATCAAGAAACTGAAAGAGAAGATTGAAGAGGAGAAAAACAAGAAAAAGGATCTTCTTCGAGGCAACCA
GACAATTGTCACAAGTGA

>SAP11-like_optimizacija_Nbe

ATGAATGTTTTCTCTTCATTGGTCTAAGTTTGTTCCTTATAACAAACAACAATTCAATCATGGCTACTCCAAA
GAAAAATCATGGAAAAGATATTATATCTTCTAAAGAAGAAGCAAAAAAGGACGTGAAGAATTTTTATGAGCT
GTACAACACCTTAGAAAATTATTCTGAGGAAGATAGATCGAAAATTATTCAAATGCTTTCAAATCCCGAAAT
AATCAAGAAGTTGAAGGAGAAGATTGAAGAGGAGAAAAACAAGAAAAAGGGAGTTCCAGCAGGCAGCCT
GATAATTGTCACAAGTGA

>SAP11-like_optimizacija_Sce

ATGAACGTTTTCTTATTCATCGGTTTGTCTTTGTTTCTAATTACCAACAACAATTCCATCATGGCCACTCCAAA
GAAGAACCACGGTAAGGATATTATTTCTTCAAAGAAGAAGCTAAGAAAGATGTCAAGAAGTTCTACGAATT
GTACAACACTTTGAAAACTACTCTGAAGAAGACAGATCCAAGATCATCCAAATGTTGTCCAACCCAGAAAT
TATCAAGAAGTTGAAGGAAAAGATTGAAGAAGAAAAAAGCAAGAAAAGGGTTCTTCTCTAGACAACCGA
ACAACTGTCACAAGTGA

>SAP11-like

MFKIKNNLLFLNVFLFIGLSLFLITNNNSIMATPKKNHKGDISSKEEAKKDVKNFYELYNTLENYSEEDRSKIIQML
SNPEIHKLLKEKIEEEKKQEKGSSSRQPDNCHK

>SAP54-like

ATGTTAAATTAATAAAACAATTTAAATAATAAATGTTTGTGTTTATTTCTTGGGATTATTATTTATCGT
TAACAATACAAAAGTAATGGCAATGAATAATAATGAAGCTGGAAGTAGTAATGCTCCGTCAATAGAAGAAAT
AATTGTTAATATAAAAAATAAAATTCGTGAAAATGCAAGCAAAAAAGTTAATGTAGAAAAAGAAATATCAC
AAGAAAGAAATAATCGAAATAATCTTCAAAAAATTGAAAATCTTACTAAAATATTAACAAATTTGACAAAAT
TAATTAATAATCAAAAAGAACAACCTGAAAATATATAAAACACTTTTAAAATCTTTAAATGATTAA

>SAP54-like_optimizacija_Ath

ATGATTATAAATGTATGTCTTTTCATCTTTCTTGGTTTACTATTTATTGTTAACAACACAAAAGTGATGGCAAT
GAATAACAATGAAGCTGGAAGTAGTAATGCTCCTAGCATTGAAGAAATCATTGTCAACATCAAGAACAAAAT
ACGTGAAAATGCCTCAAAGAAGGTTAATGTTGAGAAAGAGATTTCTCAAGAGAGGAACAACAGAAACAATC
TTCAGAAGATTGAGAACTTGACAAAGATCTTAACGAATCTCACCAAACCTCATCAATAATCAGAAAGAACAAT
TGAAGATATATAAGACTCTTCTGAAATCCTTGAATGATTGA

>SAP54-like_optimizacija_Nbe

ATGATTATCAACGTCTGTTTGTTCATCTTCTTGGGTTTGTATTATTGTTAACAACACTAAGGTTATGGCTAT
GAACAATAACGAAGCTGGTACTTCTAACGCTCCATCCATCGAAGAAATTATTGTCAACATCAAGAACAAGAT
CCGTGAAAACGCCTCCAAGAAGGTCAACGTTGAAAAGGAAATCTCTCAAGAAAGAAATAACAGAAACAACCT
TGCAAAAAATTGAAAATTTAACCAAGATCTTGACCAACCTAACCAAGTTGATTAACAACCAAAAAGGAACAAT
TGAAAATCTACAAGACTTTGTTGAAGTCTTTGAACGACTGA

>SAP54-like_optimizacija_Sce

ATGATTATCAATGTGTGTCTTTTCATATTTCTTGGTCTACTCTTTATTGTTAACAACACTAAAGTTATGGCAAT
GAATAACAATGAAGCTGGAAGTAGCAATGCCCCCTCCATTGAAGAAATAATAGTCAATATTAAGAACAAGAT
AAGGGAAAATGCTTCAAAGAAAGTAAATGTTGAGAAAGAGATTTCTCAAGAACGTAACAACAGAAATAATC
TTCAGAAAATTGAGAATTTGACAAAAATCTTAACAAATTTAACCAAGCTCATCAACAATCAAAAGGAGCAGT
TGAAGATTTATAAACTCTGCTGAAAAGTTTGAATGATTGA

>SAP54-like

MLKLKKQFKIINVCLFIFLGLLFIVNNTKVMAMNNNEAGTSNAPSIEEIIIVNIKNKIRENASKKVNVEKEISQERNR
NNLQKIENLTKILTNLTKLINNQKEQLKIYKTLKSLND

>ST6

ATGCAAAACACAAAAAATCTTTAGTTACTAAATTAAC TACTTTATTTGTTGTTGCTTTTGTAGTTTGTTC
TGCGACTTCAGCTTTTGCTGCTTTTCGGAAGTAAAGATTACCATCAGGAACAGAAACAAAAGAAGTTGCTATC
AGCATAGATGATGTAACAAATCAAAGTGAACCTTGTAAGCTTTGAAAAAATTGACGCATTAAAGATGTT
AAAGAAAATGATTTTGACGCTTCATTAAACACCACCGATAAAAAAGAGATAACTCTTAAATCTAAAGATGGC
GGACAATTTAAACCTGGTGAAATTAAGTTAAACGCAGAGATCTTACTGATACAGAAAAAGCCGAAAAAGA
AGCTCAAAAAGAAGCTGAAAAAGGTTTCATTCTGGACATCAACTCTTTTATCGTTCTTTACGTTGTAGCTGGT
GTTTTAGTTGTAGCTGGAGTTGCTTTCTTTGTTATTAAAAAAGAAGACAATAA

>ST6_optimizacija_Nbe

ATGAAATTAAC TACATTATTCGTGGTCGCCTTCGTCTCGCTATTTGCCGCTACCTCAGCTTTTGCGGCATTGG
TTCTAAGGATCTTCCAAGTGGCACAGAGACGAAAGAAGTGGCAATAAGTATCGATGATGTTACAAATCAATC
TGAGCTTGTGAAAGCTTTGAAGAAGATTGATGCACTGAAAGATGTGAAGGAAAATGATTTTGATGCTTCACT
GAACACAAC TGAATAAAAAAGAGATAACTCTCAAAAGCAAAGACGGAGGGCAGTTCAAGCCTGGTGAAATTA
AAGTTAAGAGGAGAGACTTGACCGACACTGAAAAGGCTGAGAAGGAGGCTCAGAAAGAAGCAGAAAAAGG
ATCTTTTGGACTTCCACACTTTTTATTGTTTTGTATGTAGTAGCAGGAGTTCTCGTCGTAGCTGGTGTTCCTT
CTTTGTTATCAAGAAGAGACGTCAATGA

>ST6_optimizacija_Sce

ATGAAGTTGACCACTTTATTTGTCGTCGCTTTTCGTCTCCTTGTTTGCTGCTACTTCTGCTTTTCGCTGCCTTCGGT
TCCAAGGATTTGCCATCTGGTACCGAAACCAAGGAAGTTGCTATCTCCATTGATGACGTTACCAACCAATCTG
AATTGGTCAAGGCCCTAAAGAAGATTGACGCTTTGAAGGATGTCAAAGAAAACGATTTTCGATGCTTCTTTGA
ACACCACCGACAAGAAGGAAATTACTTTGAAATCAAAGGACGGTGGTCAATTCAAGCCAGGTGAAATCAAG
GTTAAGAGAAGAGACTTGACTGACACTGAAAAGGCTGAAAAAGAAGCTCAAAAGGAAGCCGAAAAGGGTTC
TTTCTGGACTTCCACATTATTCATCGTTTTGTACGTTGTCGCTGGTGTCTTGGTTGTTGCCGGTGTTCCTTCTT
CGTTATCAAGAAACGTAGACAATGA

>ST6

MKLTTLFVVA FVSLFAATS AFAAFGSKDLP SGTETKEVAISID DVTNQSELVKALKKIDALKDVKENDFDASLNTT
DKKEITL KSKDGGQFKPGEIKVKRRDLTDTEKAEKEAQKEAEKGSFWTSTLFIVLYVVAGVLVVAGVAFFVIKKR
RQ

>ST6(H)

ATGGGAAGTAAAGATTTACCATCAGGAACAGAAACAAAAGAAGTTGCTATCAGCATAGATGATGTAACAAA
TCAAAGTGAAC TTGTAAAAGCTTTGAAAAAATTGACGCATTAAAGATGTTAAAGAAAATGATTTTGACGC
TTCATTAAACACCACCGATAAAAAAGAGATAACTCTTAAATCTAAAGATGGCGGACAATTTAAACCTGGTGA
AATTAAAGTTAAACGCAGAGATCTTACTGATACAGAAAAAGCCGAAAAAGAAGCTCAAAAAGAAGCTGAAA
AAGGTTCAATTCTGGACATCAACT

>ST6(H)

MGSKDLP SGTETKEVAISID DVTNQSELVKALKKIDALKDVKENDFDASLNTT DKKEITL KSKDGGQFKPGEIKVK
RRDLTDTEKAEKEAQKEAEKGSFWTST

>ST9

ATGCAAAACACAAAAAATCTTTAGTTACTAAATTAACACTTTTATTTGTTGTTGCTTTTGTAGTTTGTTC
TGCGACTTCAGCTTTTGTCTGCTTTTCGGAGGTAAAGATTACCAACAGGAACAGACACAAAAGAAGTTGCTAT
CAGCACAGATGATGTAACAAATCAAAGTGAACCTTGTAAGCTTTGAAAAAATTGAAGCATTAAAAGATGT
TACAGAAAAAGGATTTTGATGCTGTATTAAGCACCGATAAAAGAGAGATAACTCTTAAATCTAAAGATGGCGG
ACAATTTAAAGCTGGTGAAATTAAGTTAAACGCAGAGATCTTAATGATACAGAAAAAGCCGAAAAAGAAG
CTGAAAAAGGTTTCATTCTGGACATCAACTCTTTTATCGTTCTTTACGTTGTAGCTGGTGTTTTAGTTGTAGCT
GGAGTTGCTTTCTTTGTTATTAAAAAAGAAGACAATAA

>ST9_optimizacija_Nbe

ATGAAGTTGACTACTTTGTTTGTCTGTTGCTTTTCGTTTCTTTGTTTCGCTGCTACCTCTGCTTTTGTCTGCCTTCGGT
GGTAAGGACTTGCCAACTGGTACCGACACCAAGGAAGTTGCCATTTCCACCGATGACGTTACCAACCAATCT
GAATTGGTCAAGGCTTTGAAGAAGATTGAAGCCCTAAAAGATGTCACCGAAAAGGATTTTCGATGCTGTCTTA
TCCACTGACAAGAGAGAAATCACTTTGAAGTCCAAGGACGGTGGTCAATTCAAGGCTGGTGAAATTAAGGTT
AAGAGACGTGATTTGAACGACACTGAAAAAGCTGAAAAGGAAGCTGAAAAGGGTTCTTTCTGGACTTCAACA
TTATTCATCGTTTTGTACGTTGTTGCCGGTGTCTTGGTTGTCTGCTGGTGTGCTTTCTTCGTCATCAAGAAAAG
AAGACAATGA

>ST9_optimizacija_Sce

ATGAAGTTAACAACCTCTTTTTGTGGTTGCATTTGTTTCTCTATTTGCTGCAACTTCTGCCTTTGCAGCTTTTGGT
GGAAAGGACCTTCCTACTGGAAGTACTAAAGAAGTAGCGATTTCCACCGATGATGTTACAAACCAGAGT
GAACTGGTGAAAGCATTAAAGAAAATTGAAGCTTTGAAAGACGTCCTGAAAAGGATTTTGATGCTGTTTTG
AGCACGGACAAAAGGGAGATAAACTCAAATCAAAGATGGTGGCCAATTCAAGGCAGGGGAAAATAAAGGT
CAAAAGAAGAGATTTGAATGATACAGAGAAGGCTGAAAAAGAGGCTGAGAAAGGAAGTTTTTGGACATCAA
CCCTGTTTCATTGTGCTCTATGTTGTGGCTGGTGTACTTGTGTTGCAGGGGTAGCCTTCTTCGTCATCAAGAAG
CGCCGTCAATGA

>ST9

MKLTTLFVVFVSLFAATSFAFAFGGKDLPTGTDTKVEAISTDDVTNQSELVKALKKIEALKDVTEKDFDAVLST
DKREITLKS KDGGQFKAGEIKVKRRDLNDTEKAEKEAEKGSFWTSTLFIVLYVVGVLVVGVAFFVIKRRQ

>ST9(H)

ATGGGAGGTAAAGATTTACCAACAGGAACAGACACAAAAGAAGTTGCTATCAGCACAGATGATGTAACAAA
TCAAAATCAAAGTGAAC TTGTAAAAGCTTTGAAAAAAATTGAAGCATTAAAAGATGTTACAGAAAAGGATTT
TGATGCTGTATTAAGCACCGATAAAAGAGAGATAACTCTTAAATCTAAAGATGGCGGACAATTTAAAGCTGG
TGAAATTAAAGTTAAACGCAGAGATCTTAATGATACAGAAAAAGCCGAAAAAGAAGCTGAAAAAGGTTTCAT
TCTGGACATCAACT

>ST9(H)

MGGKDLPTGTDTKVAISTDDVTNQNQSELVKALKKIEALKDVTEDFDVLTSTDKREITLKSKDGGQFKAGEIK
VKRRDLNDTEKAEKEAEKGSFWTST

Prilog A.2: Sljedovi biljnih gena i proteina

>AtTCP2

ATGATTGGAGATCTAATGAAGAATAACAACAATGGCGACGTTGTGGATAACGAAGTGAACAACC
GGTTAAGCCGGTGGCATCACAAATTCTTCCCGGATAATTAGGGTTTCACGAGCTTCCGGTGGTAAA
GATCGACACAGCAAAGTCTTGACTTCTAAAGGACCACGTGACCGTCGTGTCCGGTTATCAGTCTC
CACCGCTCTTCAATTCTATGATCTTCAAGATCGGTTAGGTTATGATCAACCTAGCAAAGCTGTTGA
ATGGTTAATCAAAGCTGCTGAAGATTCAATCTCTGAGCTTCCTTCACTCAACAACACTCATTTC
GACCGATGACGAGAATCACCAGAATCAGACATTAACAACAGTTGCTGCTAATTCCTTGTCTAAAT
CTGCTTGTAGTAGCAATTCAGACACGAGCAAGAACTCTTCTGGTTTGTCTTTATCAAGATCGGAGC
TTAGAGATAAAGCTAGAGAGAGGGCTAGAGAGAGAACAGCTAAAGAGACCAAGGAAAGAGATC
ATAACCACACTTCGTTTACGGATTTGTTAAATTCCGGTTCAGATCCGGTTAACTCAAACCGGCAAT
GGATGGCTTCAGCTCCTTCTTCATCTCCAATGGAGTATTCAGTTCGGGTTTAATTCTCGGGTCGG
GTCAACAAACCCATTTCCCTATTTCAACAAATTCTCATCCTTTCTCATCAATCTCCGATCATCATCA
TCATCATCCTCATCATCAGCATCAAGAGTTTTATTTCGTTCCCGACCATTTGATATCACCGGCAGA
ATCCAACGGCGGAGCATTCAATCTTGATTTTAATATGTCAACACCCTCCGGCGCCGGAGCTGCCG
TCTCCGCCGCATCAGGTGGTGGCTTCAGTGGTTTCAACAGGGGGACCCTTCAGTCCAATTCAACA
AATCAGCATCAGTCATTCTCGCTAATCTACAGAGGTTTCCAACATCAGAAAGTGGAGGAGGTCC
ACAGTTCTTATTCGGTGCCTGCCTGCAGAGAATCACCACCACAATCACCAGTTTCAGCTTTACTA
TGAAAATGGATGCAGAACTCATCAGAACATAAGGGTAAAGGCAAGAACTGA

>AtTCP2_optimizacija_Sce

ATGATTGGTGACTTGATGAAGAATAACAACAATGGTGATGTTGTTGACAACGAAGTCAACAACCG
TCTATCCAGATGGCACCACAACCTCTTCTAGAATCATCAGAGTCTCTAGAGCTTCCGGCGGTAAGG
ACAGACACTCTAAGGTTTTGACTTCTAAAGGTCCTAGAGATAGAAGAGTTAGATTATCTGTCTCC
ACTGCTTTGCAATTCTACGATTTACAAGACAGATTGGGTTACGACCAACCATCCAAGGCTGTGCA
ATGGTTGATCAAGGCTGCTGAAGATTCTATTTCTGAATTGCCATCTTTGAACAACACTCACTTCCC
AACCGATGACGAAAACCATCAAAAACCAAACTTTGACCACCGTTGCCGCCAACTCTTTATCCAAGT
CTGCTTGTTCCTCCAACAGTGACACTTCAAAAAATTCCTCTGGTTTATCTTTGTCCCGTTCTGAATT
GAGAGACAAGGCCAGAGAAAGAGCTCGTGAAAGAACCGCTAAGGAAACCAAGGAACGTGATCA
CAACCACACATCTTTCACTGATTTGTTGAACTCCGGTTCTGATCCAGTTAACTCCAACAGACAATG
GATGGCTTCTGCTCCATCTTCTTCTCCAATGGAATATTTCTCTTCCGGTTTGATTTTGGGTTCGGT
CAACAAACCCACTTCCCAATCTCCACCAACTCACACCCATTCTCTTCCATCTCTGACCATCACCAT
CACCATCCACACCACCAACACCAAGAATTTTCTTTTGTTCAGACCACTTGATTTCCCCTGCTGAA
TCTAACGGTGGTGCTTTCAACTTGGAATTCAACATGTCTACTCCATCTGGTGCTGGTGCTGCTGTTT
CCGCCGCTCTGGTGGTGGTTTTTCTGGTTTCAACAGAGGTACCTTGCAATCCAACCTCAACTAATC
AACACCAATCTTTCTTGCTAACCTTCAAAGATTCCCAACTAGCGAATCCGGTGGTGGTCCACAAT
TTTTATTCGGTGCCTTGCCAGCTGAAAATCATCATCACAACCACCAATTCCAATTGTACTACGAAA
ACGGTTGTAGAACTCCAGTGAACACAAGGGTAAGGGTAAGAACTGA

>AtTCP2

MIGDLMKNNNNGDVVDNEVNNRLSRWHHNSRIIRVSRASGGKDRHSKVLTSKGPRDRRVRLSVSTA
LQFYDLQDRLGYDQPSKAVEWLIKAAEDSISELPSLNNTHFPTDDENHQNLTLTTVAANSLKSACSS
NSDTSKNSSGLSLSRSELRDKARERARERTAKETKERDHNHTSFTDLLNSGSDPVNSNRQWMASAPSS
SPMEYFSSGLILGSGQQTHFPISTNSHPFSSISDHHHHHPHHQHQEFSFVPDHLISPAESNGGAFNLDFN
MSTPSGAGAAVSAASGGGFSGFNRGTLQSNSTNQHSFLANLQRFPTSESGGGPQFLFGALPAENHHH
NHQFQLYYENGCRNSSEHKGKGKN

>AtTCP4

ATGTCTGACGACCAATTCCATCACCCGCCGCTCCTTCTTCAATGAGGCACCGTTCTACGTCGGAT
GCGGCGGACGGCGGCTGCGGCGAGATTGTTGAGGTGCAAGGTGGTCACATTGTTCCGGTCTACCGG
AAGAAAAGACCGCCACAGCAAAGTCTGCACGGCTAAAGGGCCACGTGACCGGCGCGTGAGACTC
TCTGCTCACACGGCGATTCACTTTTACGATGTTCAAGACAGGCTTGTTTCGACCGACCTAGCAAA
GCCGTTGATTGGCTTATCAAAAAGGCTAAGACTTCCATTGACGAGCTCGCTGAGCTTCCTCCCTGG
AATCCCGCGGATGCAATTGCGCTAGCCGCTGCTAACGCTAAACCCAGAAGAACCACCGCCAAAAC
CCAAATCTCTCCGTCTCCGCCACCGCCGCAACAGCAACAACAACAACAGCTTCAGTTCGGTG
TTGGCTTCAACGGAGGAGGAGCAGAGCATCCGAGTAACAACGAGTCGAGTTTTCTCCCGCCGTCA
ATGGATTCAAGATTCGATAGCTGACACTATAAAGTCGTTTTTTCCGGTGATTGGCTCTTCAACGGAG
GCTCCTTCGAATCATAACCTTATGCACAACATCATCATCAGCATCCGCCGGATTTGCTTTCTCGA
ACTAATAGCCAAAACCAAGATCTCCGTCTCTCGCTGCAATCGTTCCCGGATGGTCCACCGTCGCTT
CTGCACCACCAACATCACCACCACACCTCTGCTTCCGCCTCCGAGCCTACTCTGTTCTACGGACAG
AGCAATCCGTTAGGGTTTGACACATCGAGTTGGGAGCAGCAGTCGTCGGAATTCGGAAGGATTCA
GAGACTAGTGGCTTGGAACAGCGGCGGTGGCGGCGGAGCAACCGATACAGGAAACGGAGGAGG
GTTTCTGTTGCTCCTCCTACTCCTTCAACGACGTCGTTTCAGCCAGTTCTTGCCAAAGCCAACA
GCTTTATTCTCAGAGGGGTCCCCTTCAGTCCAGTTACAGTCCCATGATCCGTGCTTGGTTTGATCC
TCACCATCATCACCAATCCATCTCCACCGACGATCTCAACCACCACCATCACCTTCCTCCACCGGT
TCACCAATCAGCAATCCCCGGAATCGGATTGCGCTCAGGTGAATTCTCTTCGGGTTTTCGCATACC
AGCACGGTTTTAGGGCCAAGAAGAGGAGCAGCACGACGGTCTCACTCACAAGCCGTCTCTGCTT
CCTCTATTTCTCGCCATTGA

>AtTCP4_optimizacija_Sce

ATGTCTGACGACCAATTCCATCACCCACCACCACCATCCTCCATGAGACACAGATCCACTTCTGAT
GCTGCTGATGGTGGTTGTGGTGAATCGTTGAAGTTCAAGGTGGTCACATTGTCAGATCTACCGG
TAGAAAGGATCGTCACTCTAAGGTTTGTACCGCTAAGGGTCCAAGAGACAGAAGAGTTCGTTTGT
CCGCTCACACCGCCATCCAATTTTACGATGTCCAAGACAGATTAGGTTTTGACAGACCATCCAAG
GCTGTTGACTGGTTGATTAAGAAAGCTAAGACCTCCATTGACGAATTAGCTGAATTGCCACCATG
GAACCCAGCTGACGCTATCAGATTGGCTGCTGCAAACGCTAAACCAAGAAGAAGTACAGCCAAG
ACTCAAATCTCTCCTTCTCCACCGCCACCACAACAACAACAACAACAACAATTGCAATTCGG
TGTCGGTTTCAACGGCGGTGGTGCCGAACACCCATCCAACAACGAATCTTCTTCTTGCCACCATC
CATGGACTCCGATAGTATTGCTGATACTATCAAGTCTTTCTTCCCAGTCATTGGTAGTTCAACTGA
AGCTCCATCTAATCACAACCTGATGCACAACCTACCACCACCAACATCCACCTGACCTGCTATCTAG
AACCAACTCTCAAAACCAAGATTTGAGATTGTCGTTGCAATCCTTCCCAGACGGTCCACCTTCTTT
GTTGCACCACCAACACCACCACCACACTTCGGCTTCTGCTTCCGAACCAACCTTATTCTACGGTCA
ATCCAACCCATTGGGTTTTCGATACCTCTTCTTGGAACAACAATCATCTGAATTTGGTCGTATTCA
AAGATTAGTTGCCTGGAACCTCTGGTGGGGGTGGTGGTGCCACTGACACTGGTAACGGTGGTGGTT
TCTTGTTTGCCCCACCAACTCCAAGCACCACTCTTTCCAACCTGTTTTGGGTCAATCTCAACAGTT
GTATTCCCAAAGAGGTCCATTGCAAAGTTCTACTCTCCAATGATTAGAGCTTGGTTCGACCCACA
CCATCACCATCAATCTATCTCTACTGATGACCTAAACCACCATCATCATTTGCCACCACCTGTCCA
CCAATCTGCTATCCCAGGTATCGGTTTTCGCTTCTGGTGAATTTTCTTCCGGCTTCAGAAATCCCAGCT
CGTTTCCAAGGTCAAGAAGAAGAACAACACGATGGTTTGACCCACAAGCCATCCTCAGCCTCTTC
CATCTCCAGACATTGA

>AtTCP4

MSDDQFHHPPPSSMRHRSTSDAADGGCGEIVEVQGGHIVRSTGRKDRHSKVCTAKGPRDRRVRLSA
HTAIQFYDVQDRLGFDRPSKAVDWLIKKAKTSIDELAEPPWNPADAIRLAAANAKPRRTTAKTQISPS
PPPPQQQQQQQLQFGVGFNGGGAEHPSNNESSFLPPSMDSDSIADTIKSFFPVIGSSSTEAPSNHNL
MHNYHHQHPPDLLSRTNSQNQDLRLSLQSPDGPPSLLHHQHHTSASASEPTLFYQSNPLGFDTS
SWEQQSSEFGRIQRLVAWNSGGGGGATDTGNGGGFLFAPPTSTTSFQPVLGQSQQLYSQRG
PLQSSYSPMIRAWFDPHHHHQSISTDDLNNHHHHLPPPVHQSAIPGIGFASGEFSSGFRIPARFQ
GQEEEQHDGLTHKPSSASSISRH

>AtAP1

ATGGGAAGGGGTAGGGTTCAATTGAAGAGGATAGAGAACAAGATCAATAGACAAGTGACATTCT
CGAAAAGAAGAGCTGGTCTTTTGAAGAAAGCTCATGAGATCTCTGTTCTCTGTGATGCTGAAGTT
GCTCTTGTGTCTTCTCCCATAAGGGAAAACTCTTCGAATACTCCACTGATTCTTGTATGGAGAAG
ATACTTGAACGCTATGAGAGGTACTCTTACGCCGAAAGACAGCTTATTGCACCTGAGTCCGACGT
CAATACAACTGGTTCGATGGAGTATAACAGGCTTAAGGCTAAGATTGAGCTTTTGGAGAGAAACC
AGAGGCATTATCTTGGGGAAGACTTGCAAGCAATGAGCCCTAAAGAGCTTCAGAATCTGGAGCA
GCAGCTTGACACTGCTCTTAAGCACATCCGCACTAGAAAAAACCAACTTATGTACGAGTCCATCA
ATGAGCTCCAAAAAAGGAGAAGGCCATACAGGAGCAAAACAGCATGCTTTCTAAACAGATCAA
GGAGAGGGAAAAAATTCTTAGGGCTCAACAGGAGCAGTGGGATCAGCAGAACCAAGGCCACAAT
ATGCCTCCCCCTCTGCCACCGCAGCAGCACCAAATCCAGCATCCTTACATGCTCTCTCATCAGCCA
TCTCCTTTTCTCAACATGGGTGGTCTGTATCAAGAAGATGATCCTATGGCAATGAGGAGGAATGA
TCTCGAACTGACTCTTGAACCCGTTTACAACCTGCAACCTTGGCTGCTTCGCCGCATGA

>AtAP1_optimizacija_Sce

ATGGGTAGAGGTAGAGTCCAATTA AAAAGAATTGAAAACAAGATCAACCGTCAAGTTACTTTCTC
CAAGAGAAGAGCCGTTTGCTAAAGAAAGCTCACGAAATCTCTGTTTTGTGCGATGCTGAAGTTG
CTTTGGTTGTTTTTCTCACAAGGGTAAGTTGTTTGAATACTCCACCGACTCCTGTATGGAAAAGA
TTTTGGAAAGATACGAACGTTACTCTTACGCTGAAAGACAATTAATTGCTCCAGAATCCGATGTC
AACACCAACTGGTCCATGGAATATAACAGATTGAAGGCTAAGATCGAGTTATTGGAAAGAAATC
AAAGACACTACTTGGGTGAAGACTTGCAAGCTATGTCTCCAAAGGAATTGCAAAATCTCGAACAA
CAATTGGACACTGCTTTGAAGCACATCAGAACCAGAAAGAACCAATTGATGTACGAATCAATTAA
CGAATTACAAAAGAAGGAAAAGGCCATTCAAGAACAAAACCTCTATGTTGTCTAAGCAAATCAAG
GAAAGAGAAAAAATCTTGAGAGCTCAACAAGAACAATGGGACCAACAAAACCAAGGTCACAAC
ATGCCACCTCCATTGCCACCACAACAACATCAGATCCAACACCCATACATGTTGAGCCATCAACC
ATCTCCATTCTTGAACATGGGTGGTTTATACCAAGAAGATGACCCAATGGCTATGAGACGTAACG
ATTTGGAATTGACTTTGGAACCAGTCTACAACCTGTAACCTTGGGTGTTTCGCCGCCTGA

>AtAP1

MGRGRVQLKRIENKINRQVTF SKRRAGLLKKAHEISVLCDAEVALVVF SHKGKLF EYSTDSCMEKILE
RYERYSYAERQLIAPESDVNTNWSMEYNRLKAKIELLERNQRHYLGEDLQAMSPKELQNLEQLQDLTA
LKHIRTRKNQLMYESINELQKKEKAIQE QNSMLSKQIKEREKILRAQQEQWDQQNQGHNMPPPLPPQ
QHQIQHPYMLSHQSPFLNMGGLYQEDDPMAMRRNDLELTLEPVYNCNLGCFAA

>AtSEP3

ATGGGAAGAGGGAGAGTAGAATTGAAGAGGATAGAGAACAAGATCAATAGGCAAGTGACGTTTG
CAAAGAGAAGGAATGGTCTTTTGAAGAAAGCATACGAGCTTTCAGTTCTATGTGATGCAGAAGTT
GCTCTCATCATCTTCTCAAATAGAGGAAAGCTGTACGAGTTTTGTCAGTAGTTCGAGCATGCTTCGG
ACACTGGAGAGGTACCAAAAGTGTAACCTATGGAGCACCAGAACCCAATGTGCCTTCAAGAGAGG
CCTTAGCAGTTGAACTTAGTAGCCAGCAGGAGTATCTCAAGCTTAAGGAGCGTTATGACGCCTTA
CAGAGAACCCAAAGGAATCTGTTGGGAGAAGATCTTGGACCTCTAAGTACAAAGGAGCTTGAGT
CACTTGAGAGACAGCTTGATTCTTCCTTGAAGCAGATCAGAGCTCTCAGGACACAGTTTATGCTTG
ACCAGCTCAACGATCTTCAGAGTAAGGAACGCATGCTGACTGAGACAAATAAACTCTAAGACT
AAGGTTAGCTGATGGGTATCAGATGCCACTCCAGCTGAACCCTAACCAAGAAGAGGTTGATCACT
ACGGTCGTCATCATCAACAACAACAACACTCCCAAGCTTTCTTCCAGCCTTTGGAATGTGAAC
CCATTCTTCAGATCGGGTATCAGGGGCAACAAGATGGAATGGGAGCAGGACCAAGTGTGAATAA
TTACATGTTGGGTGTTACCTTATGACACCAACTCTATTTGA

>AtSEP3_optimizacija_Sce

ATGGGTCGTGGTAGAGTCGAATTGAAACGTATTGAAAACAAGATCAACAGACAAGTTACTTTTTG
CTAAGAGAAGAAACGGTTTGTTAAAGAAGGCTTACGAATTATCTGTTTTGTGCGATGCTGAAGTT
GCTTTGATTATCTTCTCCAACAGAGGTAAGCTGTATGAATTTTGTCTAGCTCATCCATGTTGAGA
ACCTTGAGAGATACCAAAAGTGTAACCTACGGTGCTCCAGAACCTAATGTTCCATCCAGAGAAG
CTTTAGCCGTTGAATTGTCCTCCCAACAAGAATACTTGAAATTGAAGGAACGTTACGATGCCCTA
CAAAGAACTCAAAGAACTTGTTGGGTGAAGACTTGGGTCCATTGTCTACCAAGGAATTGGAAT
CTCTAGAAAGACAGCTTGACTCTTCTTTGAAGCAAATCAGAGCTTTGAGAACCCAATTCATGTTA
GACCAATTGAACGATTTGCAATCCAAGGAAAGAATGTTGACTGAAACCAACAAGACTTTGAGAT
TGCGTTTGGCTGACGGTTACCAAAATGCCATTACAATTGAACCCAAACCAAGAAGAAGTTGACCA
CTACGGTAGACATCACCACCAACAACAACAACACTCTCAAGCTTTCTTCCAACCATTGGAATGTG
AACCAATCTTGCAAATTGGTTACCAAGGTCAACAAGATGGTATGGGTGCCGGCCCATCTGTCAAC
AACTACATGTTAGGTTGGTTGCCATACGACACTAATTCTATTTGA

>AtSEP3

MGRGRVELKRIENKINRQVTFKRNRGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSNRGKLYEFCSSSSMLRTLER
YQKCNYGAPEPNVPSREALAVELSSQQEYLKLKERYDALQRTQRNLLGEDLGPLSTKELESLESLERQLDS
SLKQIRALRTQFMLDQLNDLQSKERMLTETNKTLRLRLADGYQMPLQLNPNQEEVDHYGRHHHQQQ
QHSQAFFQPLECEPILQIGYQGQQDGMGAGPSVNNYMLGWLPYDTNSI

Prilog A.3: Sljedovi gena i proteina kukca

>act3

ATGTGTGACGACGACGTAGCCGCTCTTGTTGTGGACAATGGCTCCGGTATGTGCAAGGCCGGGTT
CGCCGGTGATGACGCCCCCAGGGCCGTCTTCCCATCCATCGTCGGCAGACCCCGTCACCAGGGTG
TGATGGTAGGTATGGGTCAGAAGGACAGCTATGTGGGTGACGAGGCACAGAGCAAGAGAGGTAT
CCTGACCCTGAAATACCCCATCGAGCACGGTATCATCACCAACTGGGATGACATGGAGAAGATCT
GGCATCACACCTTCTACAATGAAGTCCGTGTCGCTCCAGAAGAACACCCGATCCTCCTTACAGAA
GCTCCCCTCAACCCAAAGGCCAACCGTGAAAAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACAC
ACCAGCCATGTACGTCGCCATCCAGGCTGTACTCTCCCTCTACGCCTCCGGTCGTACCACCGGTAT
CGTGCTTGACTCCGGTGACGGTGTCTCCCACACAGTACCCATCTATGAAGGTTATGCTCTGCCACA
CGCCATCCTCCGTTTGGACTTGGCTGGCCGTGACTTGACCGACTACCTTATGAAGATCCTCACTGA
GCGTGGTTACAGCTTCACAACCACCGCTGAGCGTGAAATCGTCAGGGACATCAAGGAGAAGCTCT
GCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAAATGGCCACCGCCGCTGCGTCCACCTCCCTCGAGAAG
TCCTACGAGTTGCCCGACGGTCAGGTAATCACCATCGGTAACGAGAGGTTCCGTTGCCAGAGGC
TCTCTTCCAGCCTTCTTCTTGGGTATGGAATCTTGCGGTATCCACGAGACCGTCTACAACTCCAT
CATGAAGTGCGACGTCGACATCCGTAAGGACTTGTACGCCAACACCGTACTCTCCGGTGGTACCA
CCATGTACCCCGGTATCGCCGACAGGATGCAGAAGGAAATCACCGCCCTCGCTCCCTCGACCATC
AAGATCAAGATCATCGCTCCCCCGAGAGGAAGTACTCCGTATGGATCGGTGGCTCCATCTTGGC
CTCCCTCTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCTCAAAGCAGGAGTACGACGAATCAGGCCCAGGCA
TCGTCCACCGCAAGTGCTTCTAA

>act3_optimizacija_Nbe

ATGTGTGACGATGATGTTGCCGCATTAGTTGTAGATAATGGGTCTGGTATGTGCAAAGCTGGATT
GCTGGCGATGATGCACCTAGGGCCGTTTTTCCATCAATTGTCGGTCGTCCAAGGCATCAAGGGGT
GATGGTTGGTATGGGACAGAAGGATTCCTACGTAGGAGATGAAGCACAGTCTAAACGAGGGATT
CTTACGTTGAAATACCCAATCGAACACGGCATAATCACCAATTGGGATGACATGGAAAAAATTTG
GCATCATACATTTTATAATGAATTGCGGGTGGCACCCGAAGAACATCCTATTCTACTTACAGAAG
CTCCGTTGAATCCTAAGGCCAACAGAGAGAAGATGACACAAATTATGTTTGAAACTTTCAACACT
CCAGCAATGTATGTCGCTATTCAAGCAGTCCTTAGCCTGTATGCTTCAGGCAGAACAAACAGGTAT
TGTGCTTGACAGTGGTGATGGCGTTAGTCACACCGTGCCAATCTATGAAGGATACGCTTTACCTCA
TGCAATTCTCAGATTGGATCTTGCGGGTAGGGACTTGACTGATTATCTCATGAAGATACTGACTGA
GAGGGGATACTCTTTACCACAACGGCAGAAAGAGAAATTGTACGAGATATTAAGGAGAAACTA
TGCTATGTTGCTCTGGATTTTGAGCAAGAGATGGCAACTGCCGCAGCCTCCACTTCACTAGAAAA
GAGCTACGAGTTACCTGATGGACAAGTGATAACCATAGGAAATGAGAGGTTTAGATGTCCCGAG
GCTCTCTTCCAACCTTCTTTCTTAGGAATGGAAAGTTGTGGTATCCATGAGACTGTCTATAACTCT
ATTATGAAATGTGATGTAGACATACGTAAAGACCTCTATGCAAATACAGTTCTCTCAGGTGGCAC
TACAATGTACCTGGGATAGCTGATAGAATGCAAAAAGAAATTACTGCTTTGGCTCCAAGTACAA
TCAAAATAAAGATTATTGCGCCACCAGAGCGCAAGTATTCAGTTTGGATTGGAGGATCTATCCTT
GCTTCCCTTTCTACGTTCCAGCAGATGTGGATCTCGAAGCAGGAATATGACGAGTCAGGACCTGG
TATAGTTCACCGGAAATGCTTT

>act3_optimizacija_Sce

ATGTGTGACGACGACGTAGCCGCTCTTGTTGTGGACAATGGCTCCGGTATGTGCAAGGCCGGGTT
CGCCGGTGATGACGCCCCCAGGGCCGTCTTCCCATCCATCGTCGGCAGACCCCGTCACCAGGGTG
TGATGGTAGGTATGGGTCAGAAGGACAGCTATGTGGGTGACGAGGCACAGAGCAAGAGAGGTAT
CCTGACCCTGAAATACCCCATCGAGCACGGTATCATCACCAACTGGGATGACATGGAGAAGATCT
GGCATCGCACCTTCTACAATGAACTCCGTGTGCTCCAGAAGAACACCCGATCCTCCTTACAGAA
GCTCCCCTCAACCCAAAGGCCAACCGTGAAAAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACAC
ACCAGCCATGTACGTCGCCATCCAGGCTGTACTCTCCCTCTACGCCTCCGGTCGTACCACCGGTAT
CGTGCTTGACTCCGGTGACGGTGTCTCCACACAGTACCCATCTATGAAGGTTATGCTCTGCCACA
CGCCATCCTCCGTTTGGACTTGGCTGGCCGTGACTTGACCGACTACCTTATGAAGATCCTCACTGA
GCGTGGTTACAGCTTCACAACCACCGCTGAGCGTGAAATCGTCAGGGACATCAAGGAGAAGCTCT
GCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAAATGGCCACCGCCGCTGCGTCCACCTCCCTCGAGAAG
TCCTACGAGTTGCCCGGCGGTCAGGTAATCACCATCGGTAACGAGAGGTTCCGTTGCCAGAGGC
TCTCTTCCAGCCTTCCTTCTTGGGTATGGAATCTTGCGGTATCCACGAGACCGTCTACAACTCCAT
CATGAAGTGCGACGTCGACATCCGTAAGGACTTGTACGCCAACACCGTACTCTCCGGTGGTACCA
CCATGTACCCCGGTATCGCCGACAGGATGCAGAAGGAAATCACCGCCCTCGCTCCCTCGACCATC
AAGATCAAGATCATCGCTCCCCCGAGAGGAAGTACTCCGTATGGATCGGTGGCTCCATCTTGGC
CTCCCTCTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCTCAAAGCAGGAGTACGACGAATCAGGCCCAGGCA
TCGTCCACCGCAAGTGCTTCTAA

>act3

MCDDDDVAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQSKRGI
LTLKYPIEHGIITNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPILLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNTPAMY
VAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTT
TAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAAASTSLKSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESC
GIHETVYNSIMKCDVDIRKDLANTVLSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTIKIKIIPPERKYSVWIG
GSILASLSTFQQMWISKQEYDESGPGIVHRKCF

Prilog B Veličine plazmidnih vektora, gena, proteina i proteinskih biljega

plazmidni vektor	veličina vektora (bp)	veličina proteinskih biljega (kDa)	
pGWB529	11500	GST	26
pSPYNE	10500	His ₆	1
pSPYCE	11000	YFP	27
pGBT9	5524	Myc	1.2
pGAD424	6659		
gen	veličina gena (bp)*	veličina proteina kodirana genom (kDa)	
<i>SAP11-like</i>	306	13.01	
<i>SAP54-like</i>	330	13.53	
<i>STAMP 6</i>	462	16.8	
<i>STAMP 6 (H)</i>	309	11.41	
<i>STAMP 9</i>	447	16.2	
<i>STAMP 9 (H)</i>	300	11.05	
<i>act3</i>	1113	41.79	
<i>AP1</i>	771	30.91	
<i>SEP3</i>	756	29.07	
<i>TCP2</i>	1098	29.67	
<i>TCP4</i>	1269	45.98	

*broj baznih parova optimiziranih gena bez signalnog peptida

Prilog C Početnice

Prilog C.1 Početnice dizajnirane za umnažanje *SAP11-like* i *SAP54-like* gena iz sojeva 'Ca. P. solani' (SA-1, STOL, ST19) pri navedenim PCR uvjetima

Gen	Ime početnice	5'- početnica -3'	PCR uvjeti
<i>SAP11-like</i>	SAP11_2F	TCAAAGGAGTAT TTATTAAATGTT T	Početna denaturacija na 94 °C, 4 min; 35 ciklusa: denaturacija na 94°C, 1 min prijanjanje na 50 °C, 1 min, ekstenzija 68 °C, 1 min; završna ekstenzija na 68 °C, 7 min
	SAP11_336R	GCTGTCTAGAAG AAGAACCTT	
<i>SAP54-like</i>	SAP54_40F	TGTTTGTATT TCTTGGA	
	SAP54_319	TTTTCAGTTGTT TTTTGA	

Prilog C.2 Početnice za umnažanje gena i kloniranje inserata u plazmide za dobivanje plazmidnih konstrukata

	Plazmid	Gen insert	Ime početnice	5'- početnica -3'
<i>Floral dip</i>	pGWB529	<i>SAP11-like</i>	pGWB529-SAP11 Fw	CACGGGGGACTCT AGAATGAATGTTT TCCTCTTCATTGGT
			pGWB529-SAP11 Rv	GATCGGGGAAATT CGAGCTCTCAGtgat gatgatgatgatgCTTGT GACAATTGTCTGG T
	pGWB529	<i>SAP54-like</i>	pGWB529-SAP54 Fw	CACGGGGGACTCT AGAATGATTATAA ATGTATGTCTTTTC A
			pGWB529-SAP54 Rv	GATCGGGGAAATT CGAGCTCTCAGtgat gatgatgatgatgATCAT TCAAGGATTTTCAG A
<i>BiFC</i>	pSPYNE	<i>SAP11-like</i>	pSPY-SAP11_Fw	CGCCACTAGTGGA TCCATGAATGTTTT CCTCTTCATTGGTC

	Plazmid	Gen insert	Ime početnice	5'- početnica -3'
			pSPY-SAP11_Rv	TACTATCGATGGA TCCCTTGTGACAA TTATCAGGCTGC
	pSPYNE	<i>SAP54-like</i>	pSPY-SAP54_Fw	CGCCACTAGTGGA TCCATGATTATCA ATGTGTGTCTTTTC A
			pSPY-SAP54_Rv	TACTATCGATGGA TCCATCATTCAAA CTTTTCAGCAGA
	pSPYCE	<i>AtTCP2</i>	pSPY-TCP2_Fw	CGCCACTAGTGGA TCCATGATTGGAG ATCTAATGAAGAA TAAC
			pSPY-TCP2_Rv	TACTATCGATGGA TCCGTTCTTGCCTT TACCCTTATG
	pSPYCE	<i>AtTCP4</i>	pSPY-TCP4_Fw	CGCCACTAGTGGA TCCATGTCTGACG ACCAATTCC
			pSPY-TCP4_Rv	TACTATCGATGGA TCCATGGCGAGAA ATAGAGGAAG
	pSPYCE	<i>AtAP1</i>	pSPYCE-AP1-Nt-Fw	CGCCACTAGTGGA TCCATGGGAAGGG GTAGGGTTCAATT G
			pSPYCE-AP1-Nt-Rv	TACTATCGATGGA TCCTGCGGCGAAG CAGCCAAG
	pSPYCE	<i>AtSEP3</i>	pSPYCE-Sep3-Nt-Fw	CGCCACTAGTGGA TCCATGGGAAGAG GGAGAGTAGAATT G
			pSPYCE-Sep3-Nt-Rv	TACTATCGATGGA TCCAATAGAGTTG GTGTCATAAGGTA AC
	pSPYNE	<i>ST6(H)</i>	pSPYNE-ST6H-Nt-Fw	CGCCACTAGTGGA TCCGGCAGCAAAG ATCTTCCTTCTG
			pSPYNE-ST6H-Nt-Rv	TACTATCGATGGA TCCGGTTGAAGTC CAAAAACCTCCC
	pSPYNE	<i>ST9(H)</i>	pSPYNE-ST9H-Nt-Fw	CGCCACTAGTGGA TCCGGGGGAAAAG ACTTGCCTACTG

	Plazmid	Gen insert	Ime početnice	5'- početnica -3'
			pSPYNE-ST9H-Nt-Rv	TACTATCGATGGA TCCCGTGCTTGTCC AAAAACTTCC
	pSPYNE	ST6	pSPYNE-ST6-Nt-Fw	ACAACTCGAGGGA TCCATGAAGCTGA CCACCTTGTTTG
			pSPYNE-ST6-Nt-Rv	GCATGAATTCGGA TCCCTGTCTACGCT TTTTGATGACAAA G
	pSPYNE	ST9	pSPYNE-ST9-Nt-Fw	ACAACTCGAGGGA TCCATGAAGTTAA CCACGCTATTTGT G
			pSPYNE-ST9-Nt-Rv	GCATGAATTCGGA TCCCTGGCGCCTC TTCTTGATTACG
	pSPYCE	Act3	pSPYCE_Aktin_Nt_fw	CGCCACTAGTGGA TCCATGTGTGATG ATGATGTTGCAGC
			pSPYCE_Aktin_Nt_rv	TACTATCGATGGA TCCTCAGAAGCAC TTCCGGTGAACG
	Y2H	pGBT9	SAP11-like	pGBT9-SAP11_Fw
pGBT9-SAP11_Rv				TTGGCTGCAGGTC GACTCACTTGTGA CAGTTGTCTGG
pGBT9		SAP54-like	pGBT9-SAP54_Fw	TGTATCGCCGGAA TTCATTATCAACG TCTGTTTGTTTCATC T
			pGBT9-SAP54_rv	TTGGCTGCAGGTC GACTCAGTCGTTT AAAGACTTCAACA
pGBT9		ST6	pGBT9-ST6-Sc-Fw	TGTATCGCCGGAA TTCATGAAGTTGA CCACTTTATTTGTC G
			pGBT9-ST6-Sc-Rv	TTGGCTGCAGGTC GACTCATTGTCTA CGTTTCTTGATAA CG
pGBT9		ST9	pGBT9-ST9-Sc-Fw	CGCCACTAGTGGA TCCATGAAGTTAA CAACTCTTTTTGTG G

	Plazmid	Gen insert	Ime početnice	5'- početnica -3'
			pGBT9-ST9-Sc-Rv	TACTATCGATGGA TCCTGACGGCGCT TCTTGATG
	pGAD424	<i>AtTCP2</i>	pGAD424-TCP2 Fw	AAAAGAGATCGAA TTCATGATTGGAG ATCTAATGAAGAA T
			pGAD424-TCP2 Rv	ATCTCTGCAGGTC GACTCAGTTCTTG CCTTTACCCCTA
	pGAD424	<i>AtTCP4</i>	pGAD424-TCP4 Fw	AAAAGAGATCGAA TTCATGTCTGACG ACCAATTCCATCA CC
			pGAD424-TCP4 Rv	ATCTCTGCAGGTC GACTCAATGGCGA GAAATAGAGGAA GC
	pGAD424	<i>AtAP1</i>	pGAD424-AP1-Sc-Fw	AAAAGAGATCGAA TTCATGGGAAGGG GTAGGGTTCAATT G
			pGAD424-AP1-Sc-Rv	ATCTCTGCAGGTC GACTCATGCGGCG AAGCAGCC
	pGAD424	<i>AtSEP3</i>	pGAD424-Sep3-Sc-Fw	AAAAGAGATCGAA TTCATGGGAAGAG GGAGAGTAGAATT G
			pGAD424-Sep3-Sc-Rv	ATCTCTGCAGGTC GACTCAAATAGAG TTGGTGTCTATAAG G
	pGAD424	<i>act3</i>	pGAD424-actin-Sc-Fw	AAAAGAGATCGAA TTCATGTGTGATG ACGATGTTGCCG
			pGAD424-actin-Sc-Rv	ATCTCTGCAGGTC GACGAAACACTTT CTGTGGACTATAC C
Kopurifikacija i	pET28a	<i>ST6(H)</i>	pET28a ST6(H)_Fw	CGCCACTAGTGGA TCCGAATTCATGG GAAGTAAAGATTT ACCATCAG
			pET28a ST6(H)_Rv	TACTATCGATGGA TCCCTCGAGAGTT GATGTCCAGAATG AACC

	Plazmid	Gen insert	Ime početnice	5'- početnica -3'
	pET28a	<i>ST9(H)</i>	pET28a ST9(H)_Fw	CGCCACTAGTGGA TCCGAATTCATGG GAGGTAAAGATTT ACCAACAG
			pET28a ST9(H)_Fw	TACTATCGATGGA TCCCTCGAGAGTT GATGTCCAGAATG AACC
	pGEX-4T-1	<i>act3</i>	pGEX4T1-aktin Fw	GGTTCCGCGTGGA TCCATGTGTGACG ACGACGTAGC
			pGEX4T1-aktin Rv	GGAATTCCGGGGA TCCTTAGAAGCAC TTGCGGTGGACG

Prilog C.3 Univerzalne početnice za provjeru inserata gena sekvenciranjem u komercijalnom servisu

Osnovni plazmid	Početnica fw	početnica rv
pGAD424	univerzalna, GAL4AD TACCACTACAATGGATG	univerzalna, AD_Reverse AGATGGTGCACGATGCACAG
pGBT9	GAL4BD, početnica TCATCGGAAGAGAGTAG	1. GAL4BD_rv2*, početnica CCTAAGAGTCACTTTAAAATT TGTATACAC ili 2. Gal4BD_rv1, početnica ATCATAAGAAATTCGCCCCGG
pSPYCE	35S-B AGTGGAAGGAAGGTG GCT	EGFP-CR CGTCCATGCCGAGAGTG
pSPYNE	35S-B AGTGGAAGGAAGGTG GCT	EGFP-N CGTCGCCGTCCAGCTCGACCA G
pGWB529	35S-B AGTGGAAGGAAGGTG GCT	

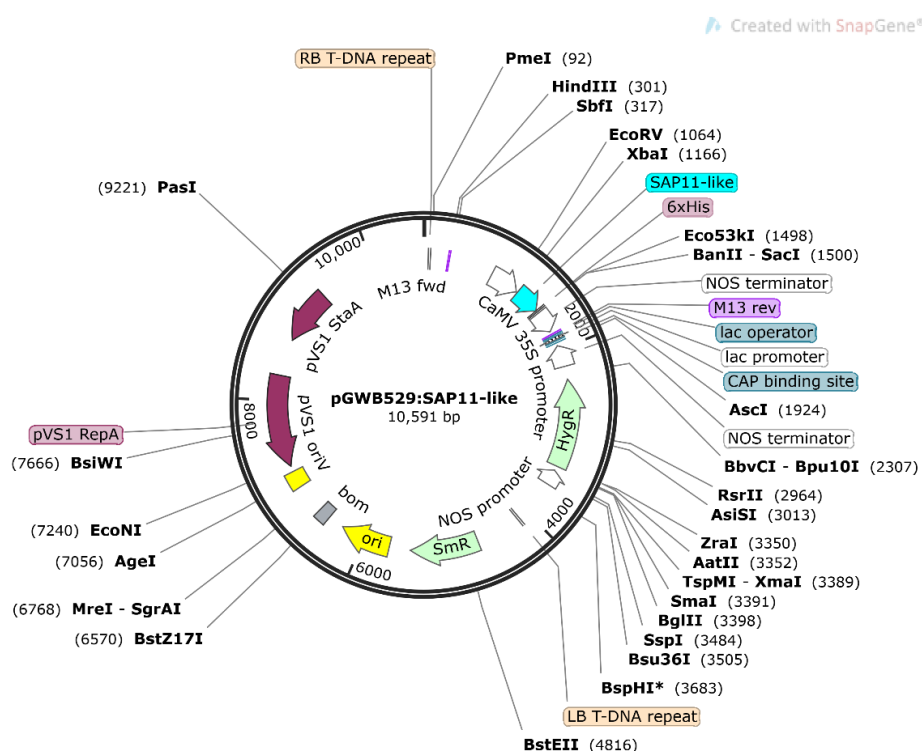
Prilog C.4 Početnice za umnažanje sekvenci gena korištenih za provjeru cDNA

Gen	Ime početnice	5'-početnica-3'
<i>Actin3</i>	ACT3_fw	CTGGCATCATACTTTCTACAATG
	ACT3_rev	CACCACTGAGCACAAATGTTAC

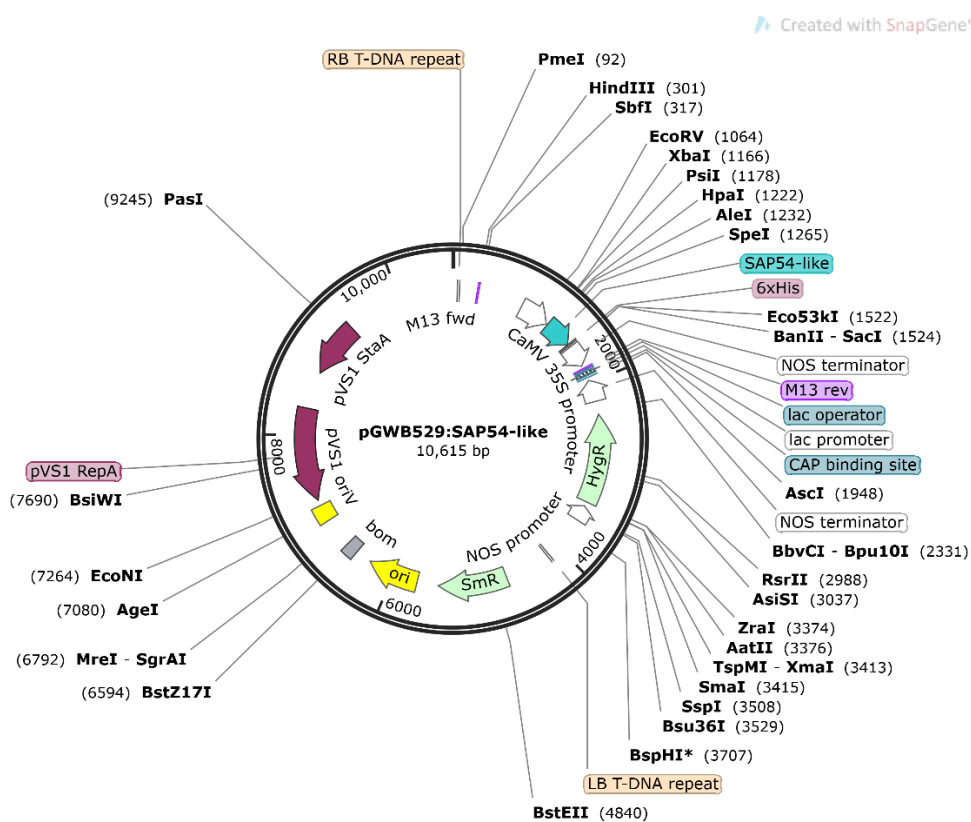
Prilog C.5 Početnice za umnažanje sekvenci gena korištenih pri izvođenju RT-qPCR analizu

Gen	Ime početnice	5'-početnica-3'
<i>SAP11-like</i>	142Fw	GAGCTTTACAACACCTTGGAG
	197Rv	TTGTGACAATTGTCTGGTTGC
<i>SAP54-like</i>	88Fw	GCTGGAAGTAGTAATGCTCCT
	271Rv	TGATGAGTTTGGTGAGATTCGT
<i>ogio</i>	ogioF	ATCCAAGAGCAGTTCAAGCAAG
	ogioR	GAGAGCCATACCTTCCACTG
<i>act2</i>	ACTIN2_8_F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG
	ACTIN2_8_R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC

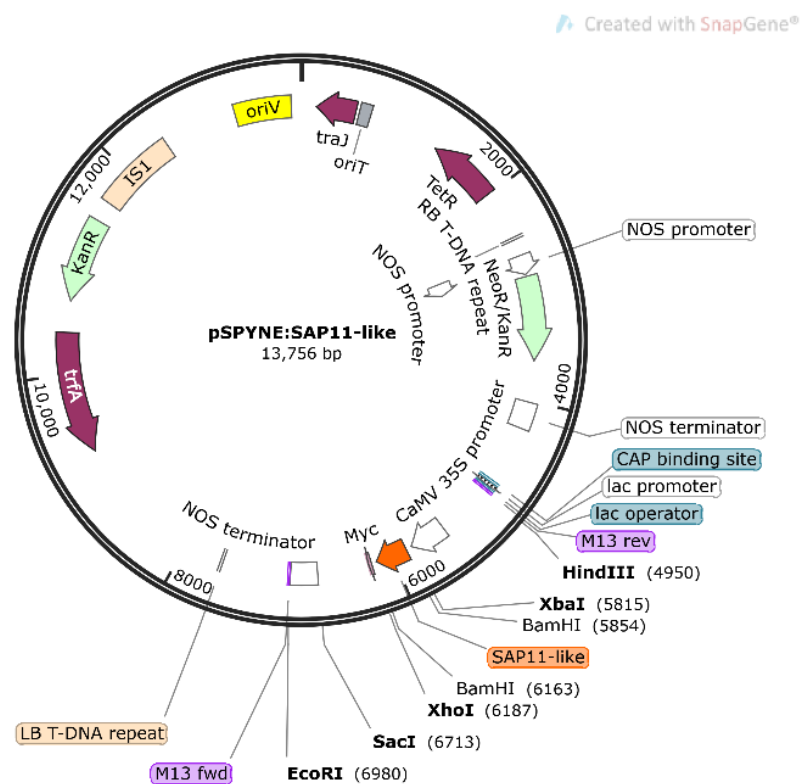
Prilog D Mape plazmidnih konstrukata



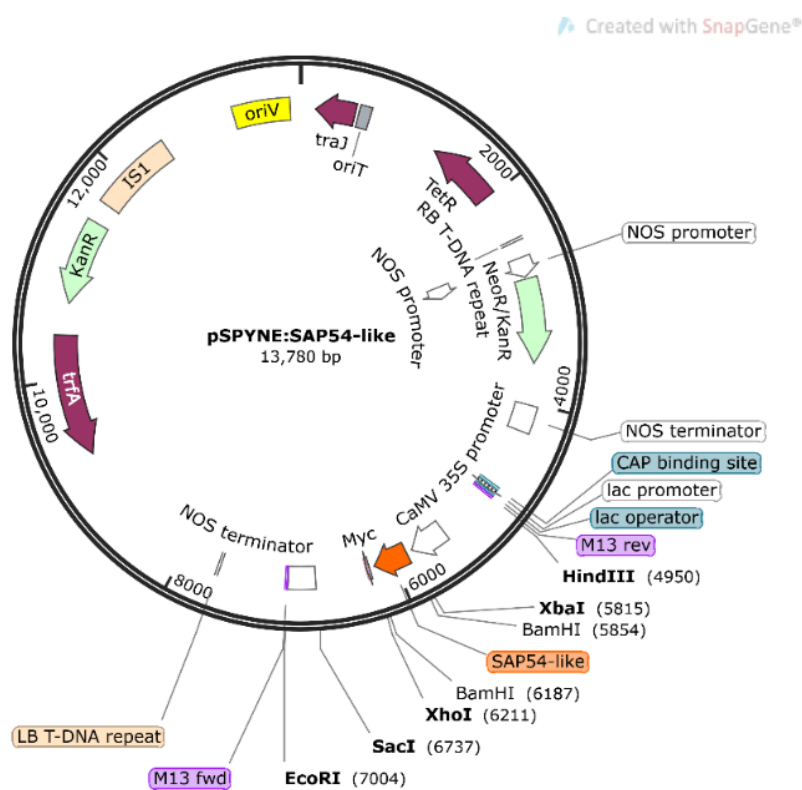
Prilog D.1 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pGWB529:SAP11-like



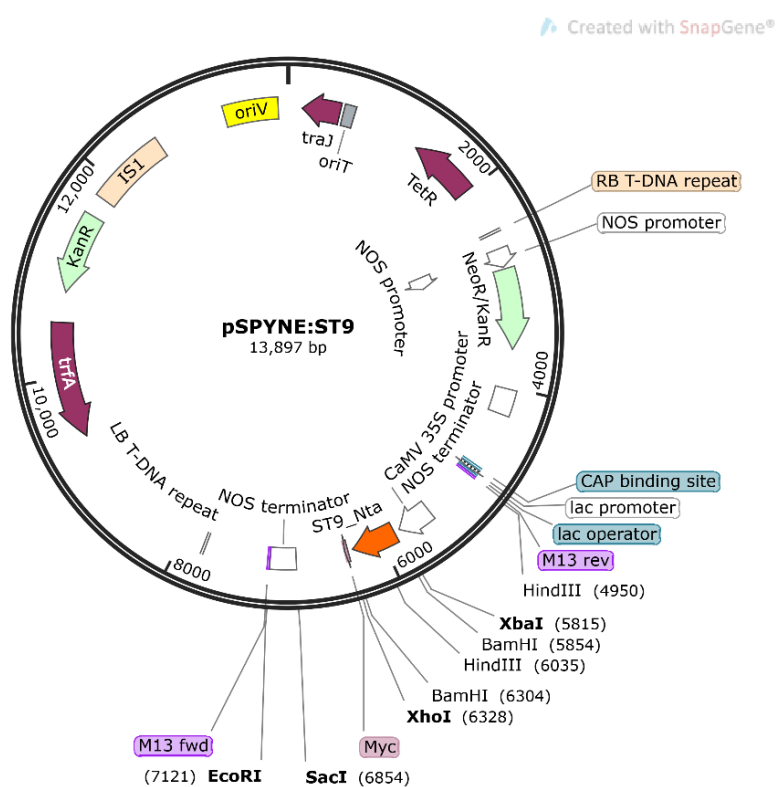
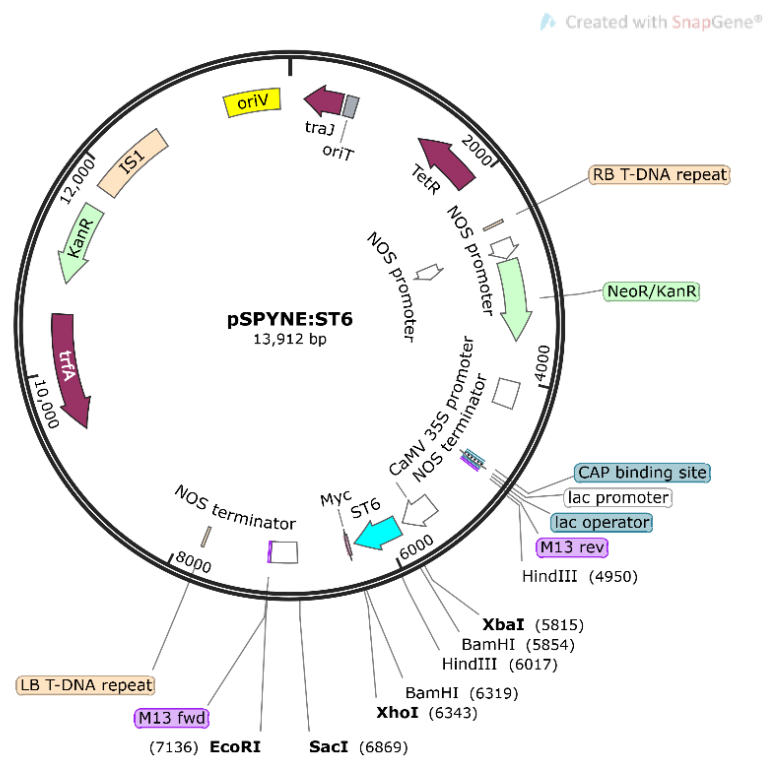
Prilog D.2 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pGWB529:SAP54-like

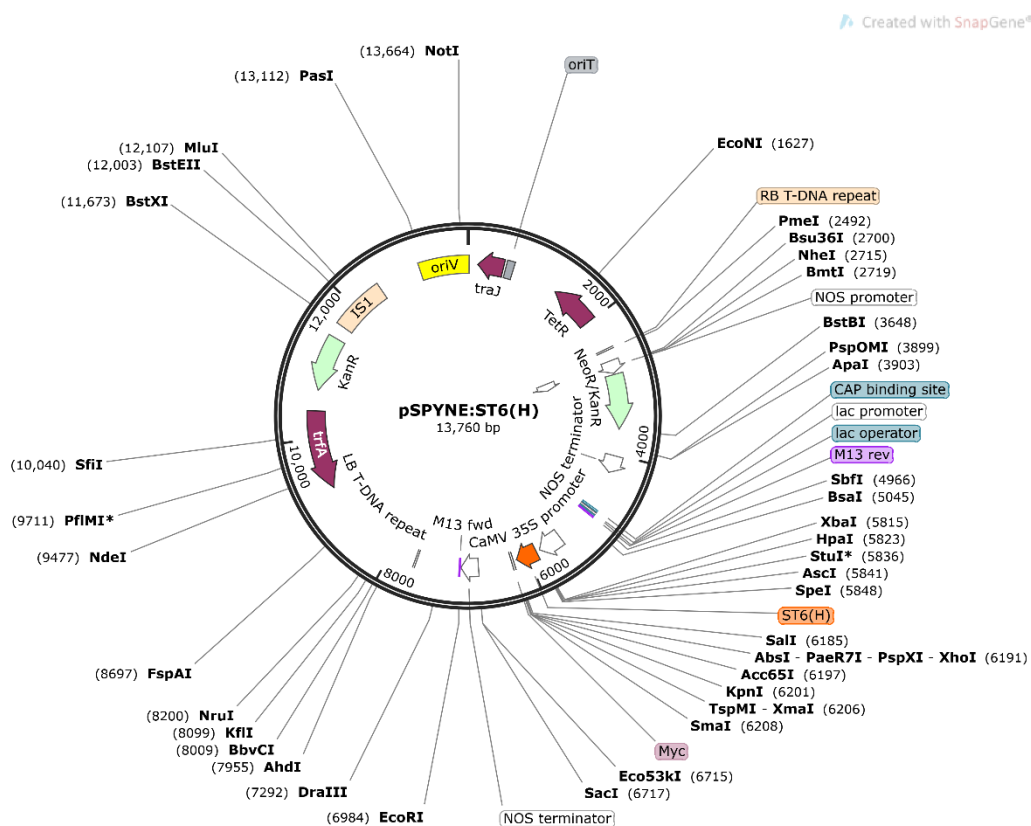


Prilog D.3 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pSPYNE:SAP11-like

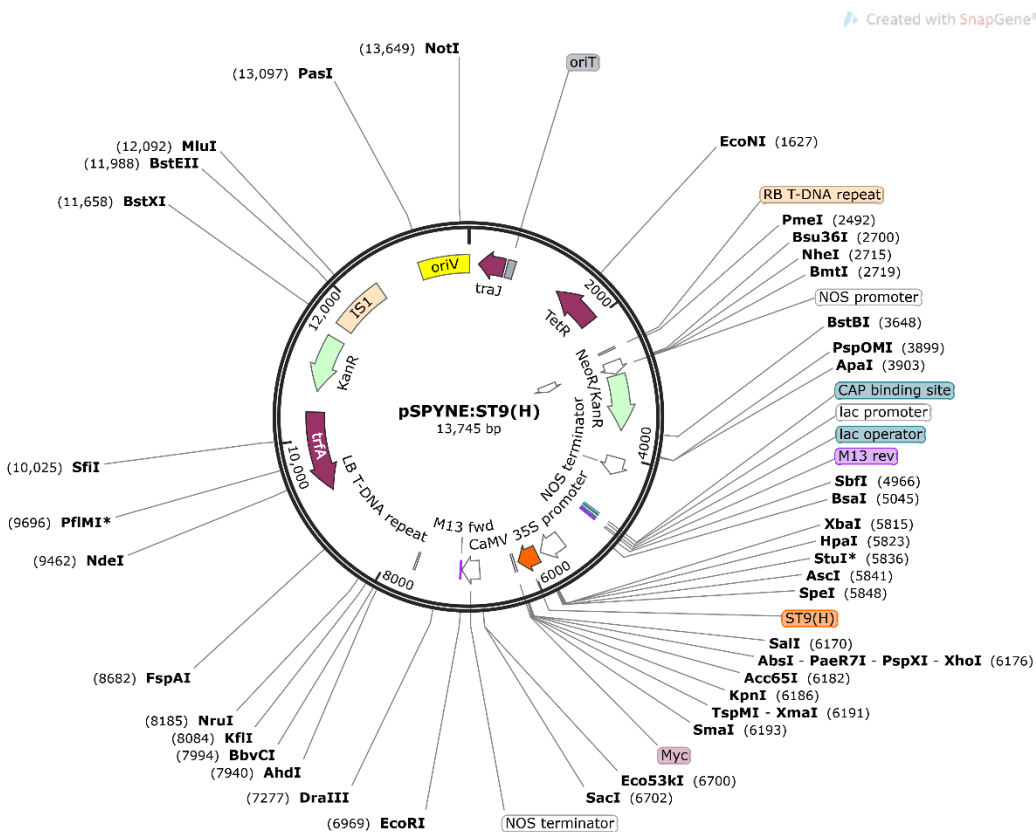


Prilog D.4 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pSPYNE:SAP54-like

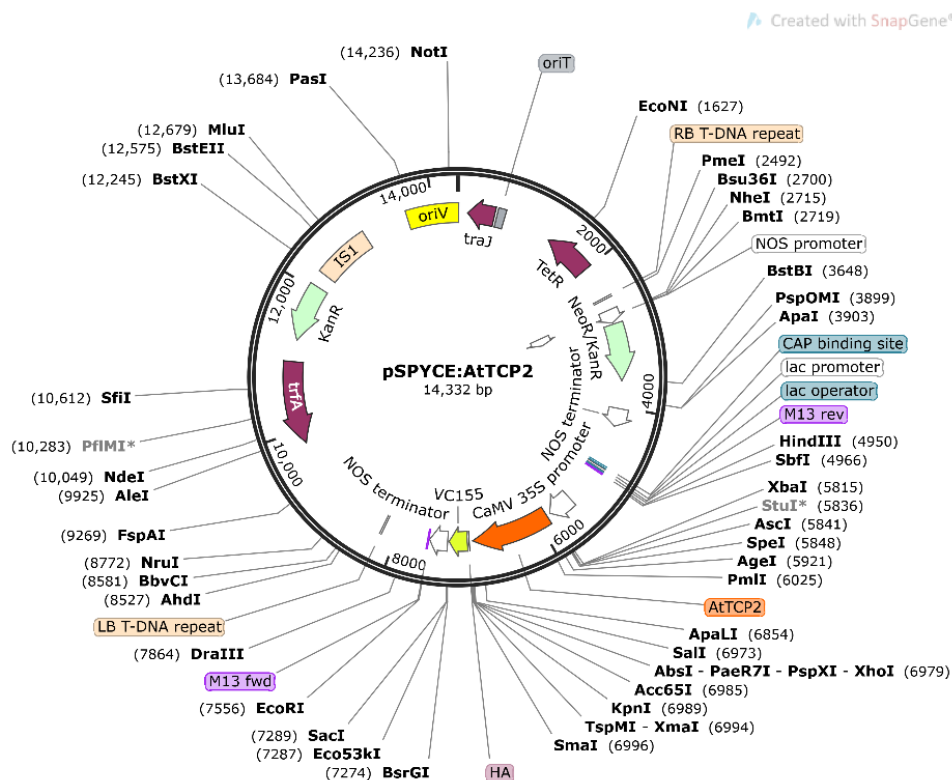




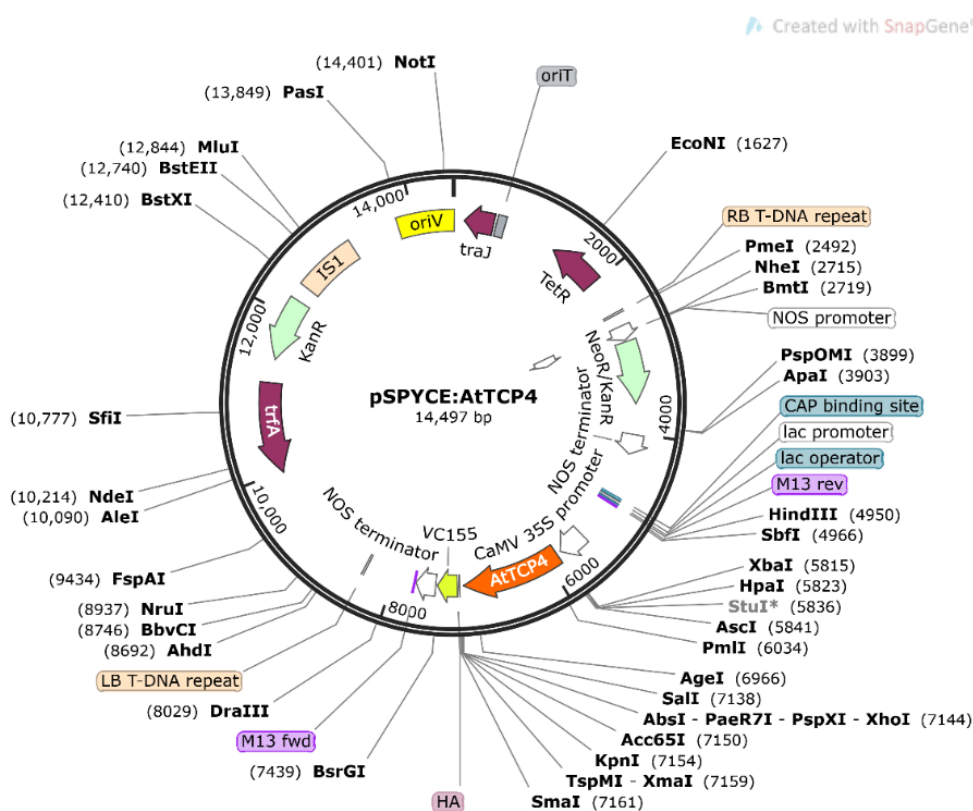
Prilog D.7 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pSPYNE:ST6(H)



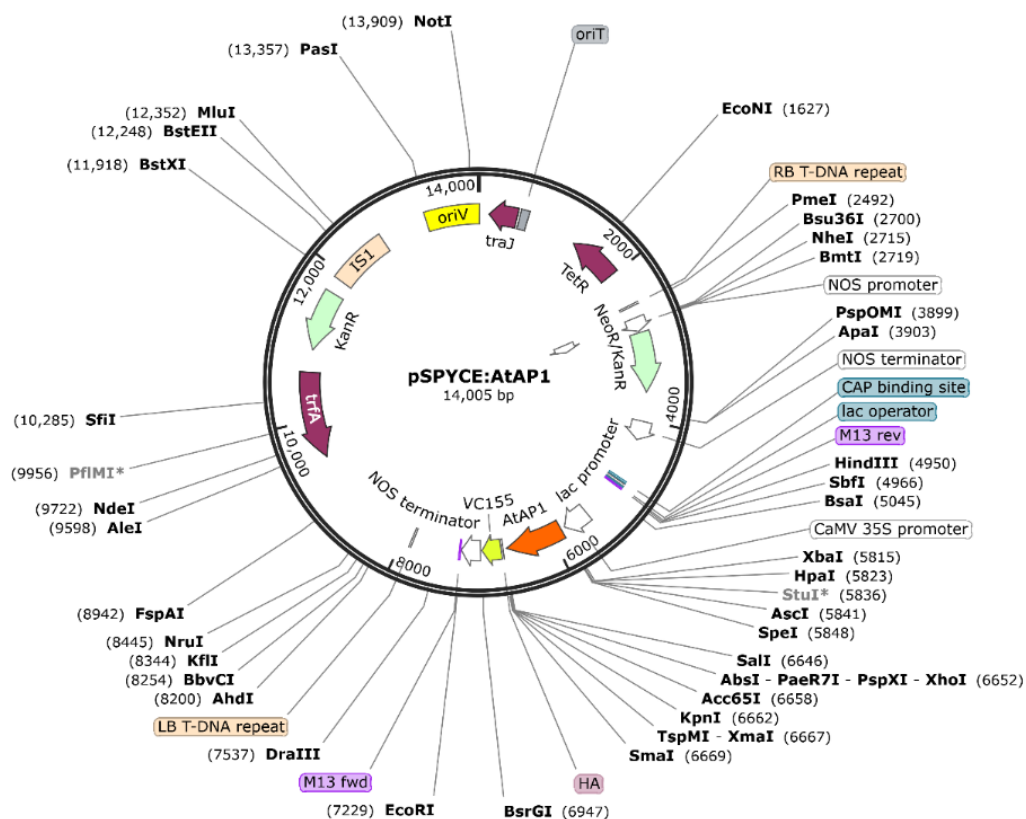
Prilog D.8 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pSPYNE:ST9(H)



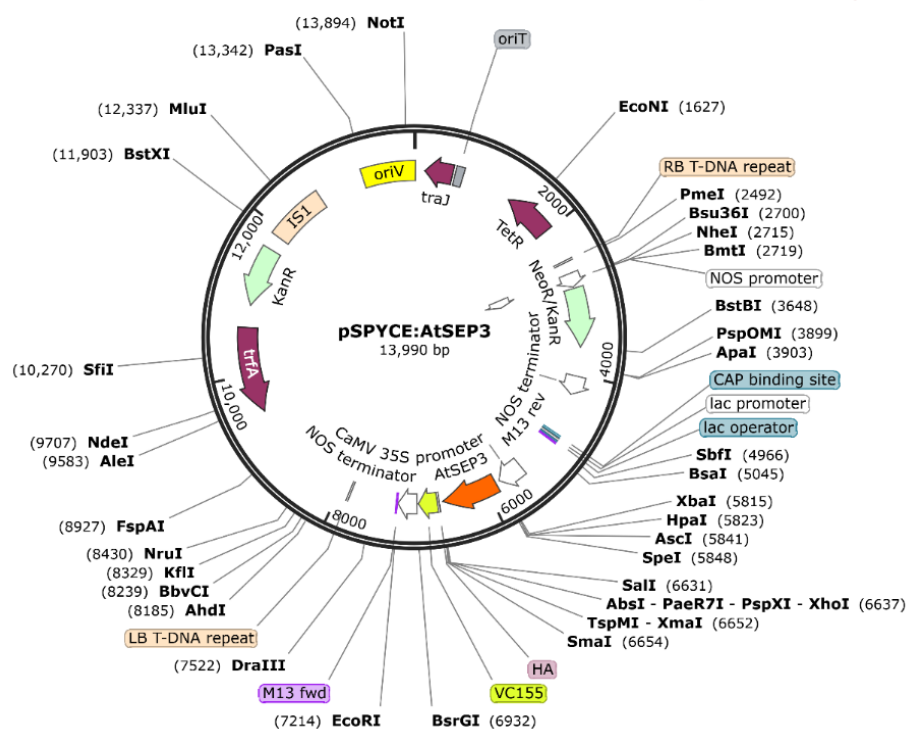
Prilog D.9 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pSPYCE:AtTCP2



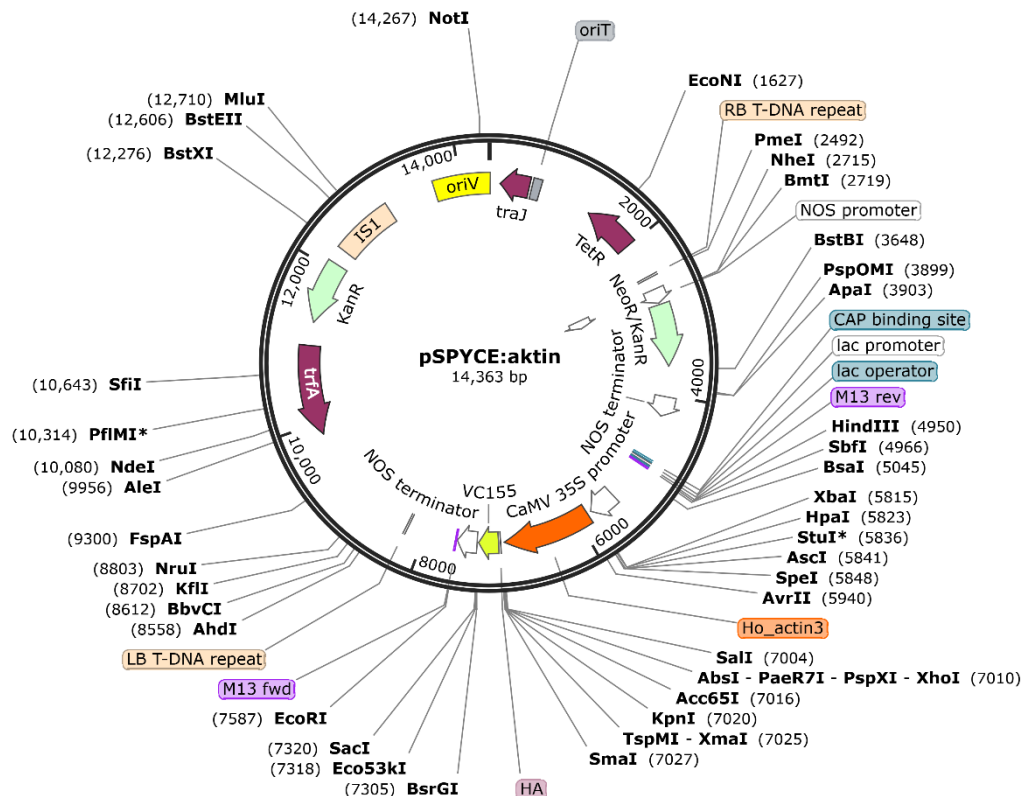
Prilog D.10 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pSPYCE:AtTCP4



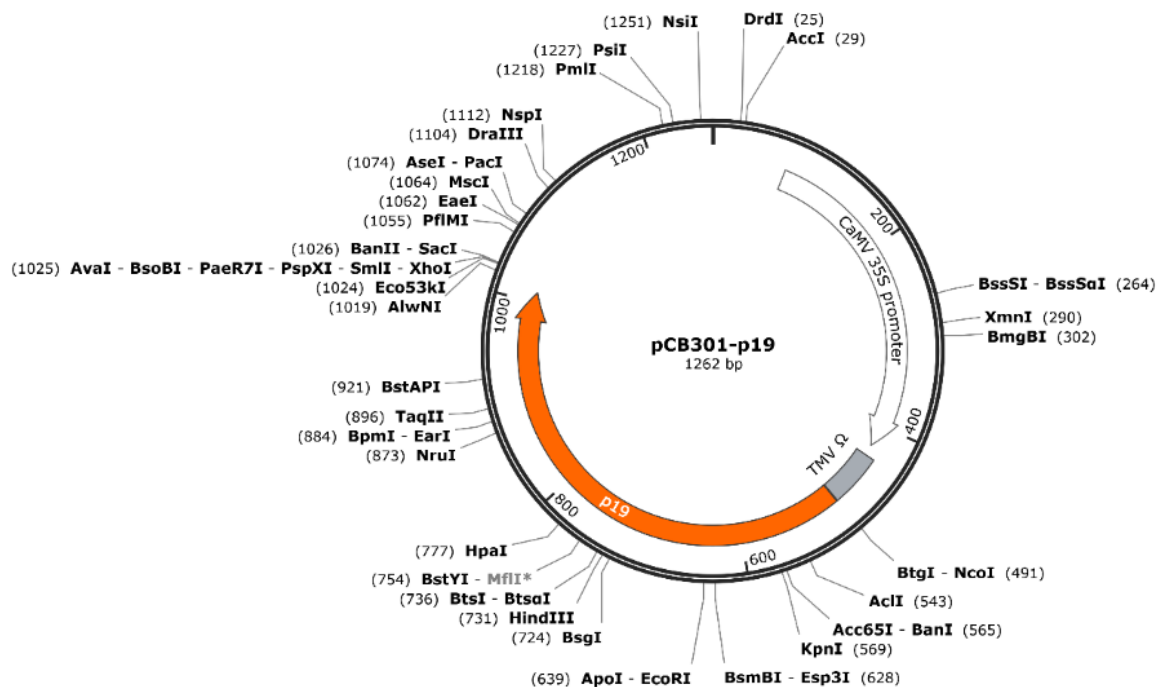
Prilog D.11 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pSPYCE:AtAP1



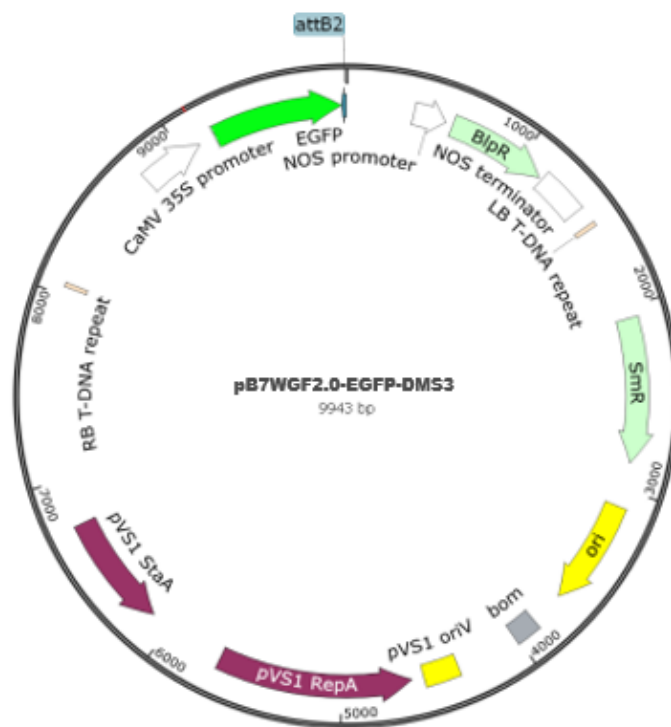
Prilog D.12 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pSPYCE:AtSEP3



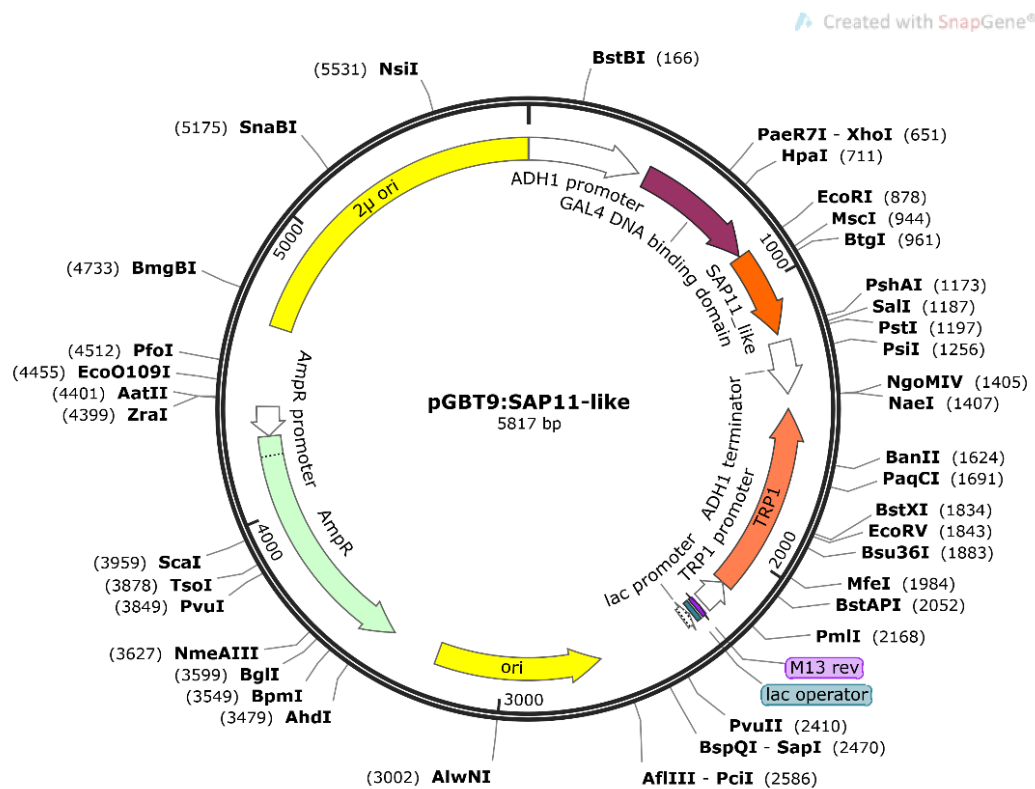
Prilog D.13 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pSPYCE:aktin



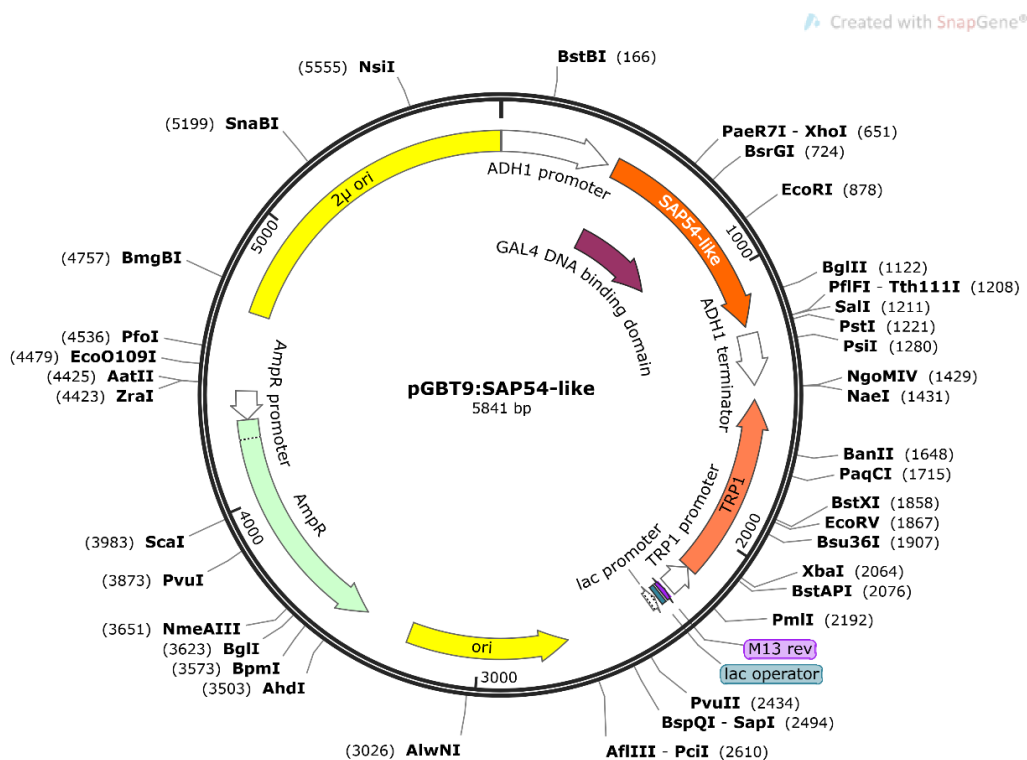
Prilog D.14 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pCB301-p19



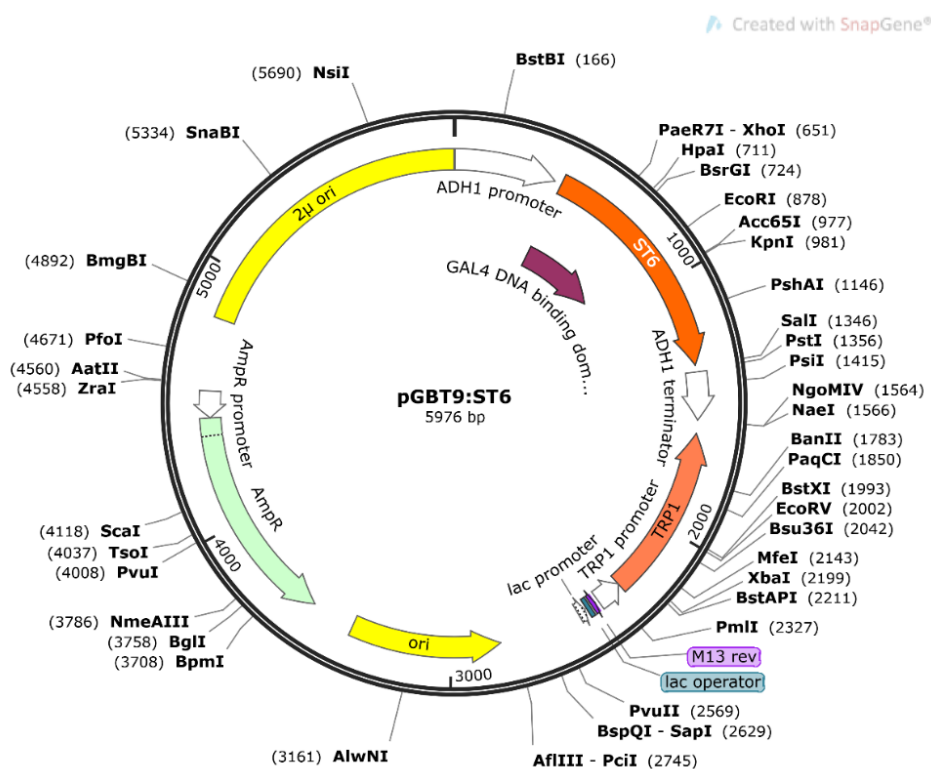
Prilog D.15 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pB7WGF2.0-EGFP-DMS3



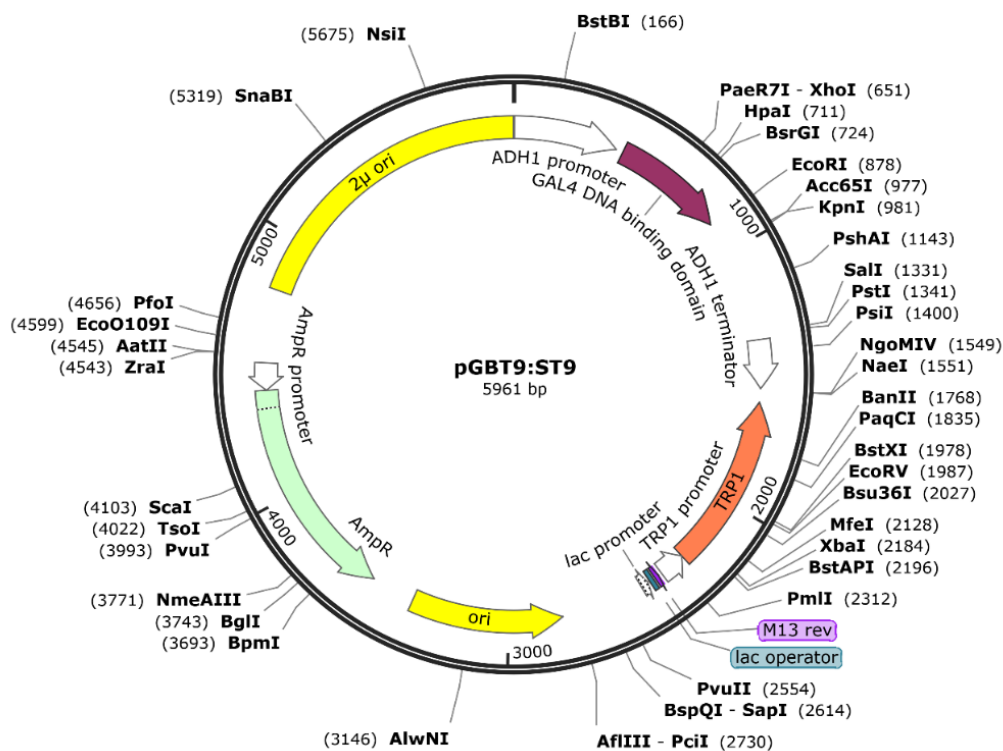
Prilog D.16 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pGBT9:SAP11-like



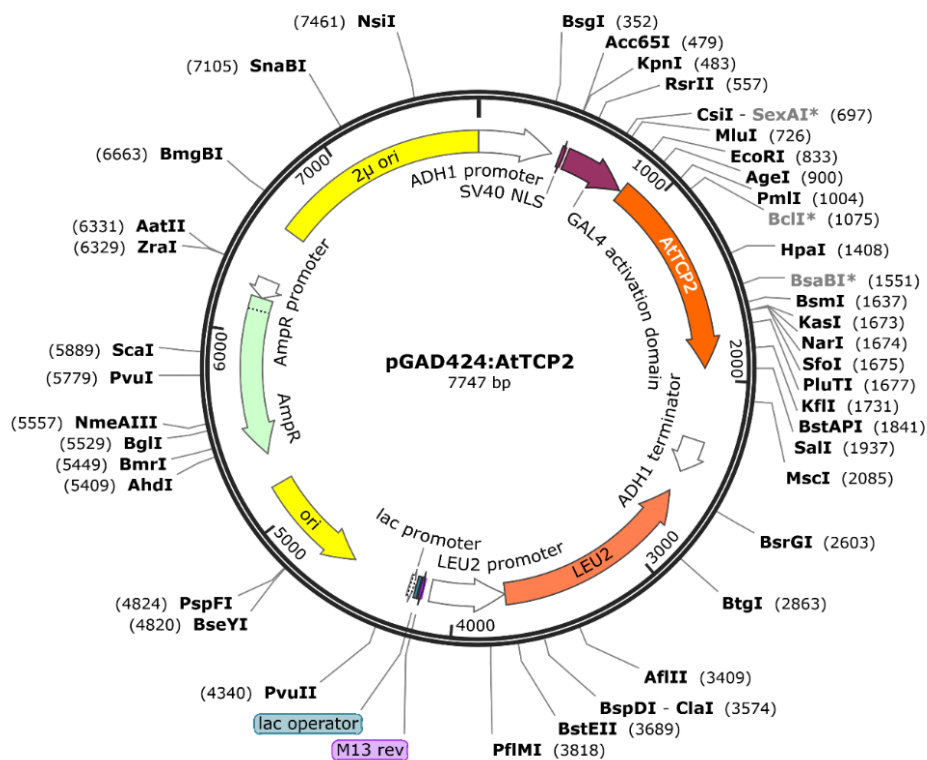
Prilog D.17 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pGBT9:SAP54-like



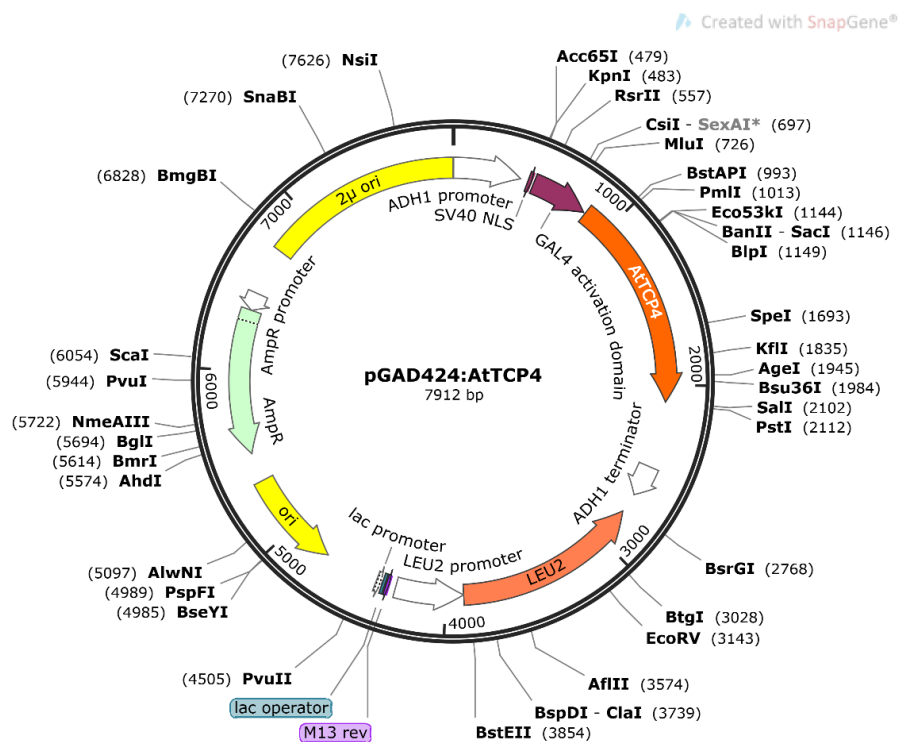
Prilog D.18 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pGBT9:ST6



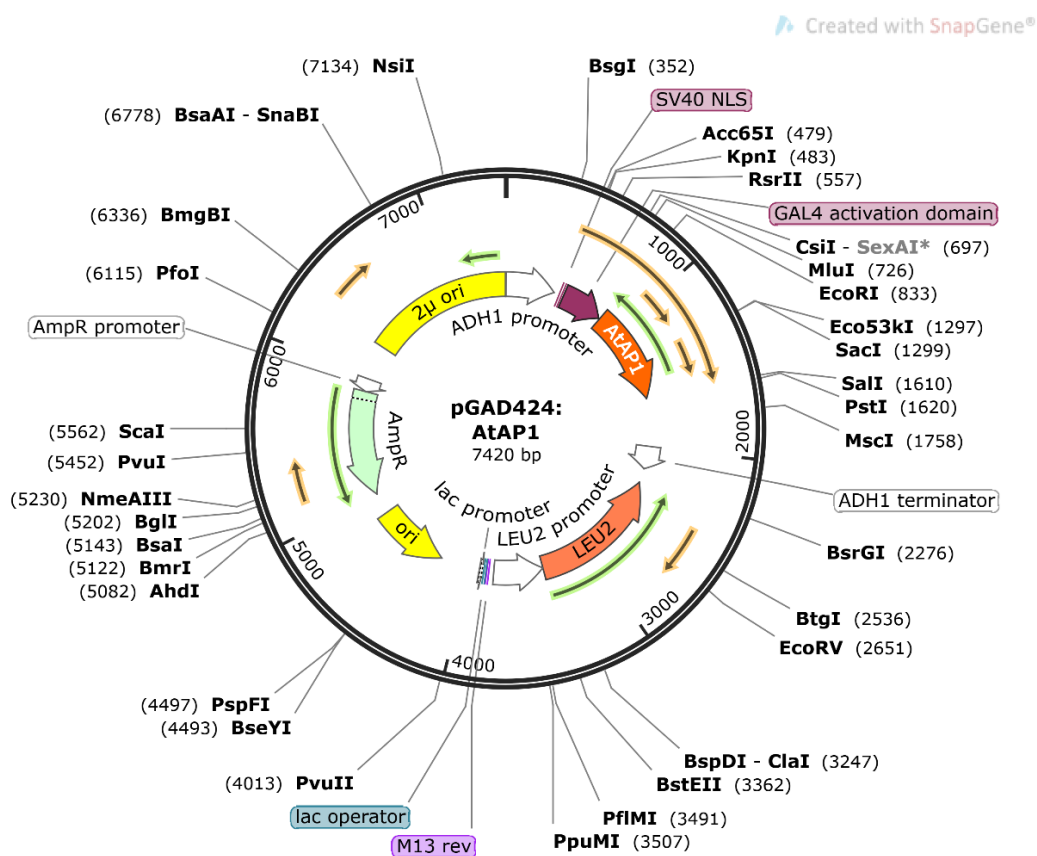
Prilog D.19 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pGBT9:ST9



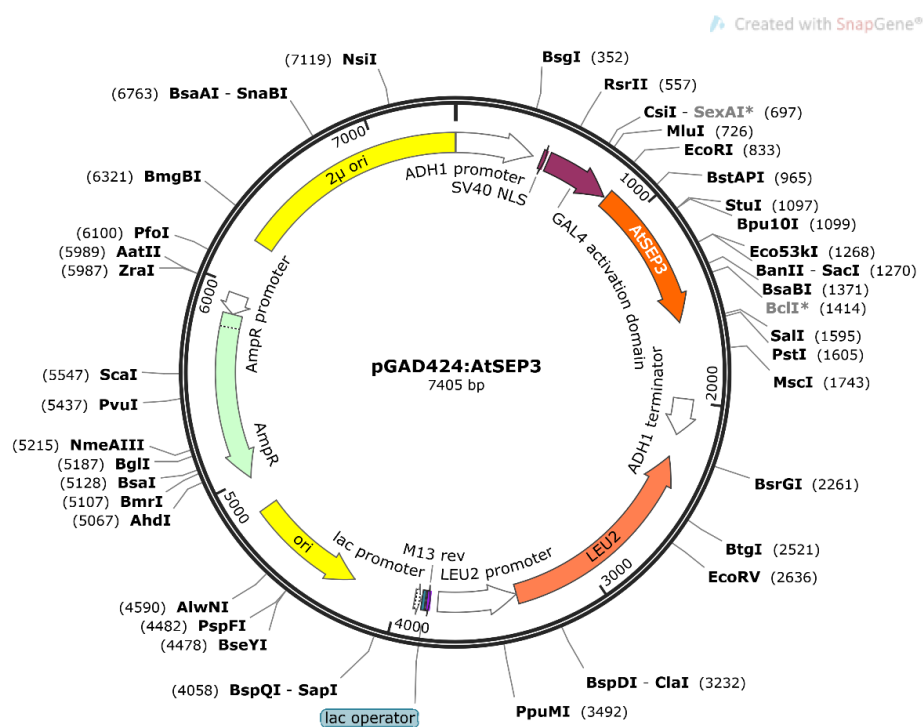
Prilog D.20 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pGAD424:AtTCP2



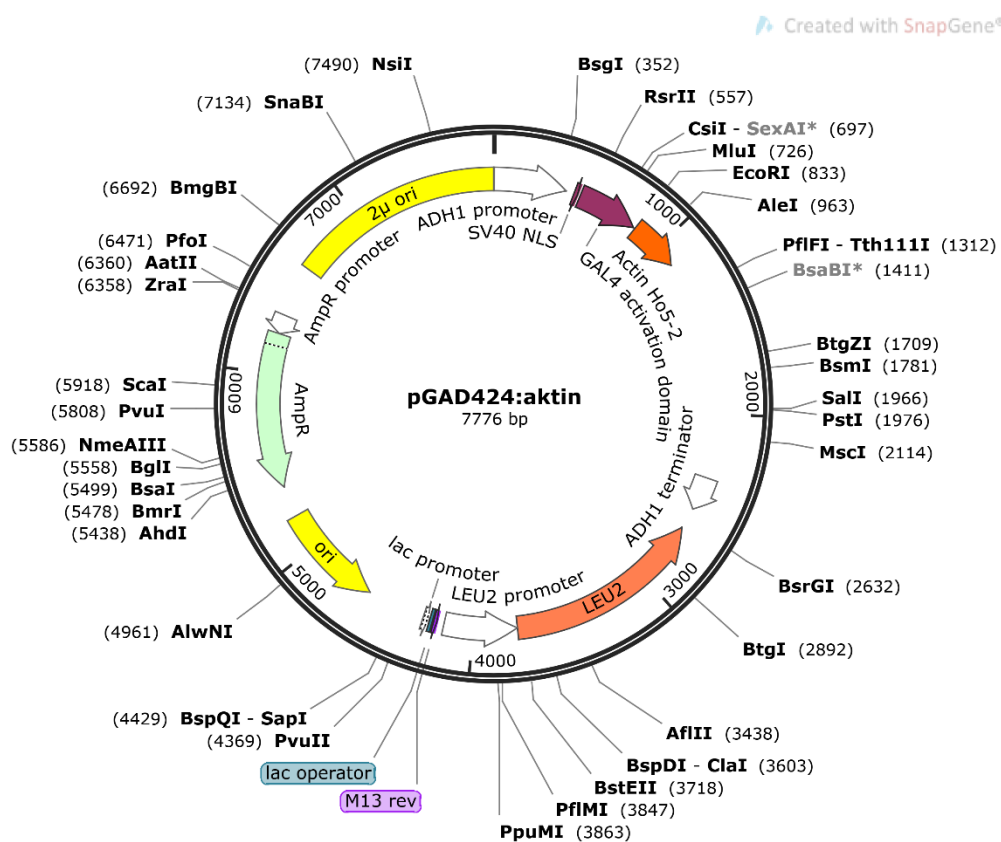
Prilog D.21 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pGAD424:AtTCP4



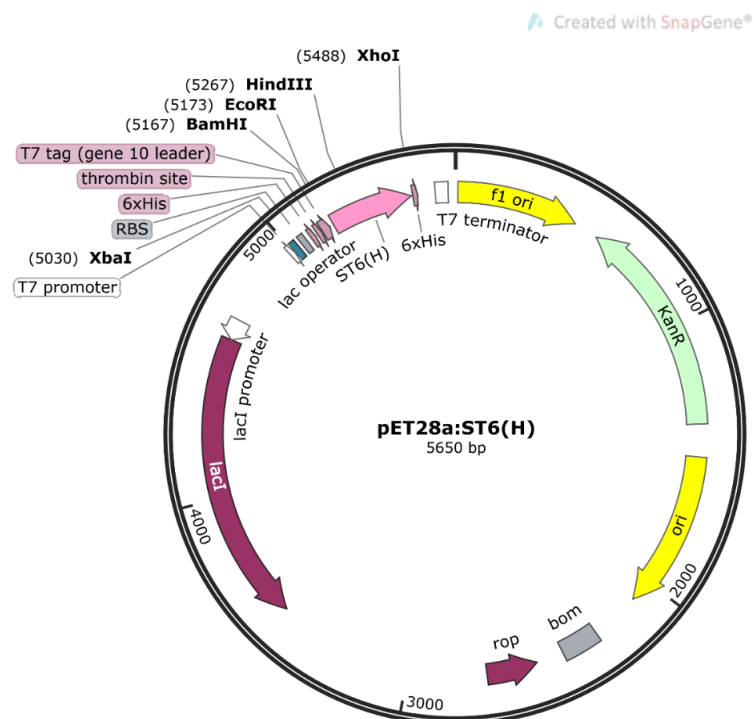
Prilog D.22 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pGAD424:AtAP1



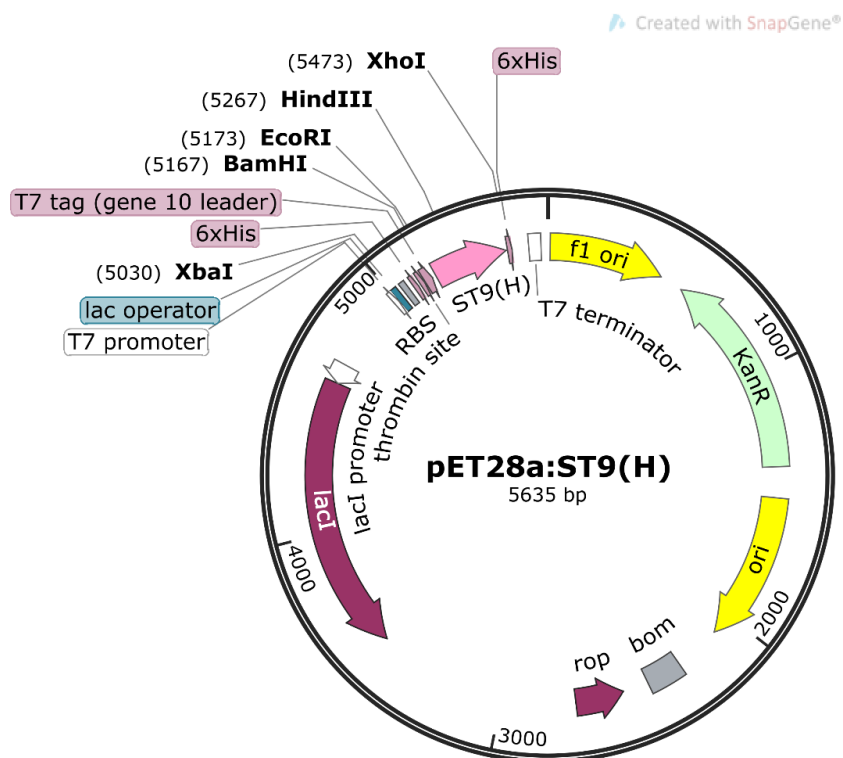
Prilog D.23 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pGAD424:AtSEP3



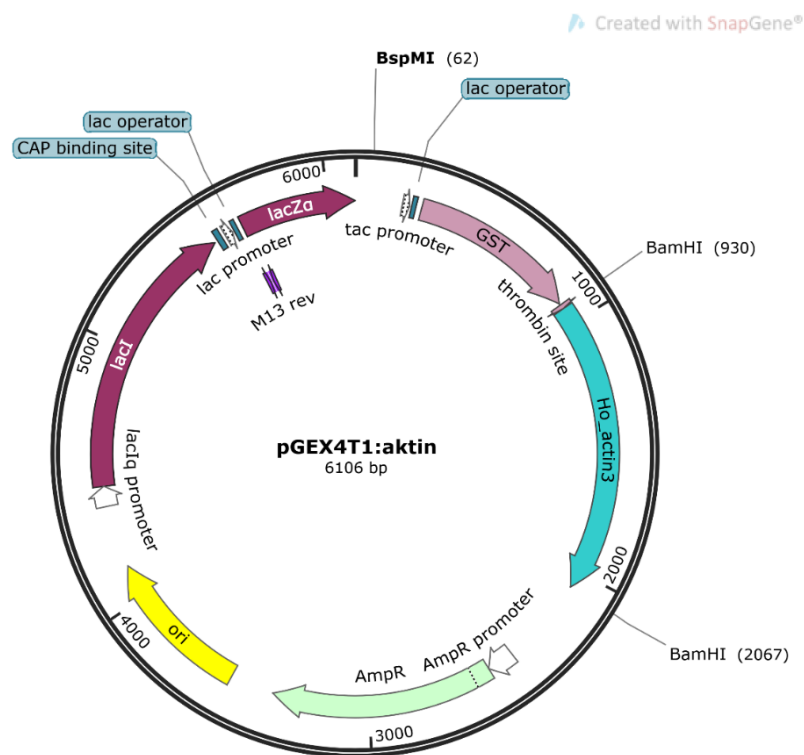
Prilog D.24 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pGAD424:aktin



Prilog D.25 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pET28a:ST6(H)



Prilog D.26 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pET28a:ST9(H)



Prilog D.27 SnapGene® Viewer 6.0.2: Mapa plazmidnog konstrukta pGEX4T1:aktin

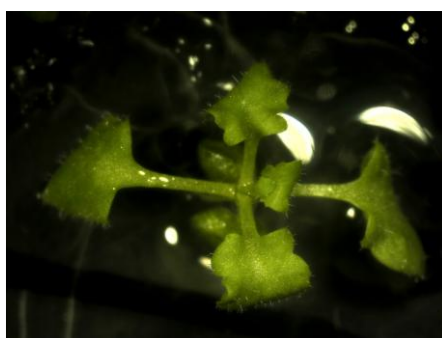
Prilog E Bakterijski sojevi i njihova otpornost na antibiotike

bakterije/plazmidi	pET28a	pGEX-4T-1	pSPYNE/pSPYCE	pCB301-p19	pB7WCF2.0-EGFP-DMS3	pGWB529	pGBT9	pGAD424
<i>E. coli</i> (Stellar™)	kanamicin (50 µg/mL)	ampicilin (50 µg/mL)	kanamicin (50 µg/mL)	kanamicin (50 µg/mL)	spektinomycin (100 µg/mL)	spektinomycin (100 µg/mL)	ampicilin (50 µg/mL)	ampicilin (50 µg/mL)
<i>E. coli</i> (Rosetta™) (DE3)	kanamicin (50 µg/mL), kloramfenikol (34 µg/mL)	ampicilin (100 µg/mL), kloramfenikol (34 µg/mL)	/	/	/	/	/	/
<i>A. tumefaciens</i>	/	/	rifampicin (50 µg/mL), kanamicin (50 µg/mL), gentamicin (50 µg/mL)	rifampicin (50 µg/mL), kanamicin (50 µg/mL)	rifampicin (50 µg/mL), gentamicin (50 µg/mL), spektinomycin (100 µg/mL)	rifampicin (50 µg/mL), gentamicin (50 µg/mL), spektinomycin (100 µg/mL)	/	/

Prilog F Fenotip T3 generacije klijanaca uročnjaka



A



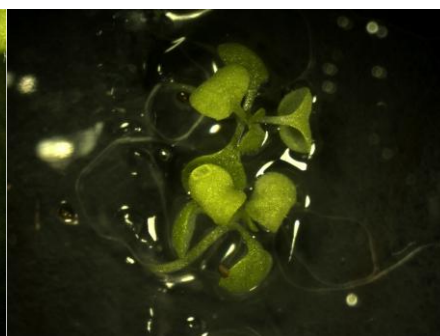
B



C



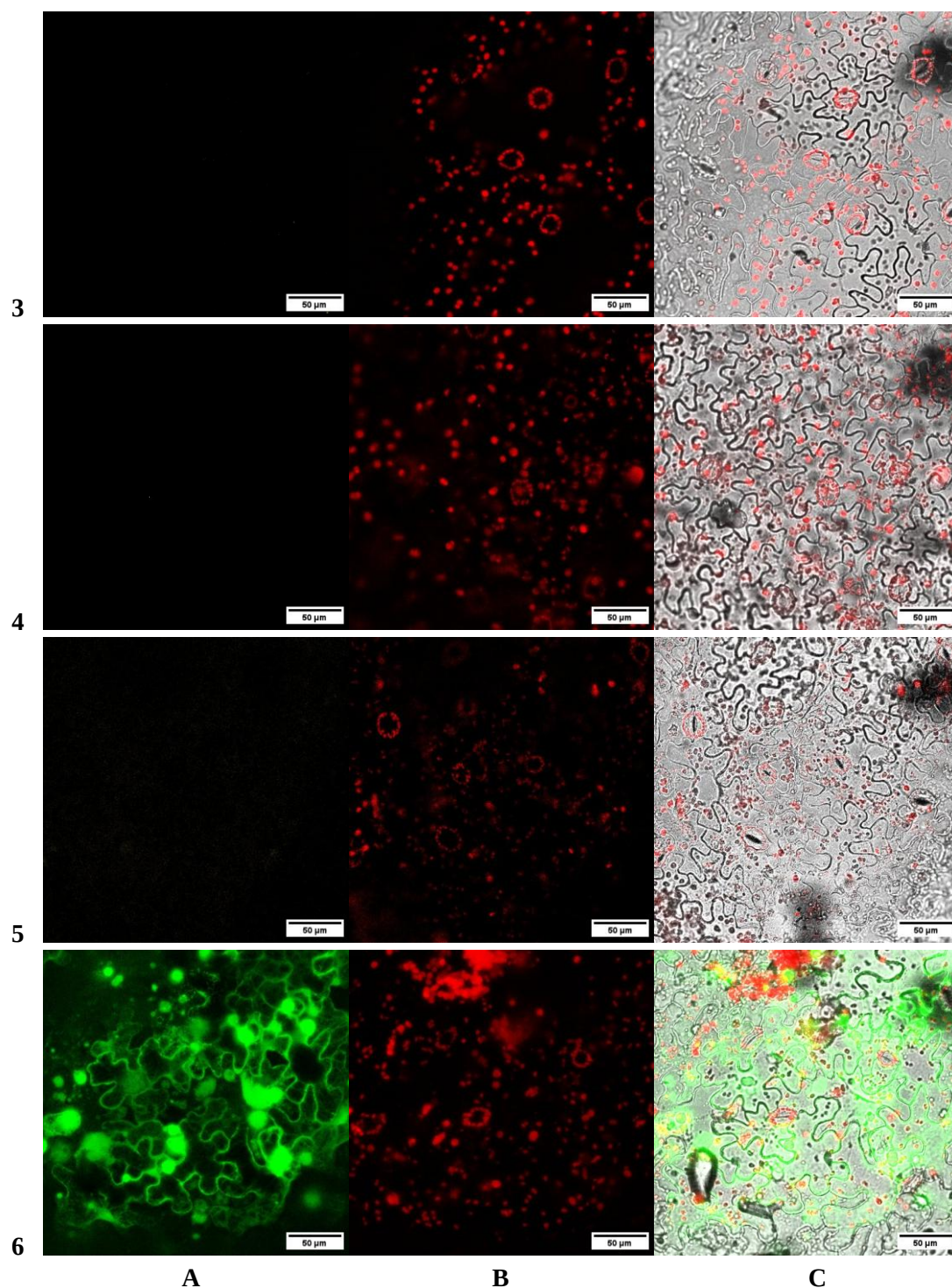
D



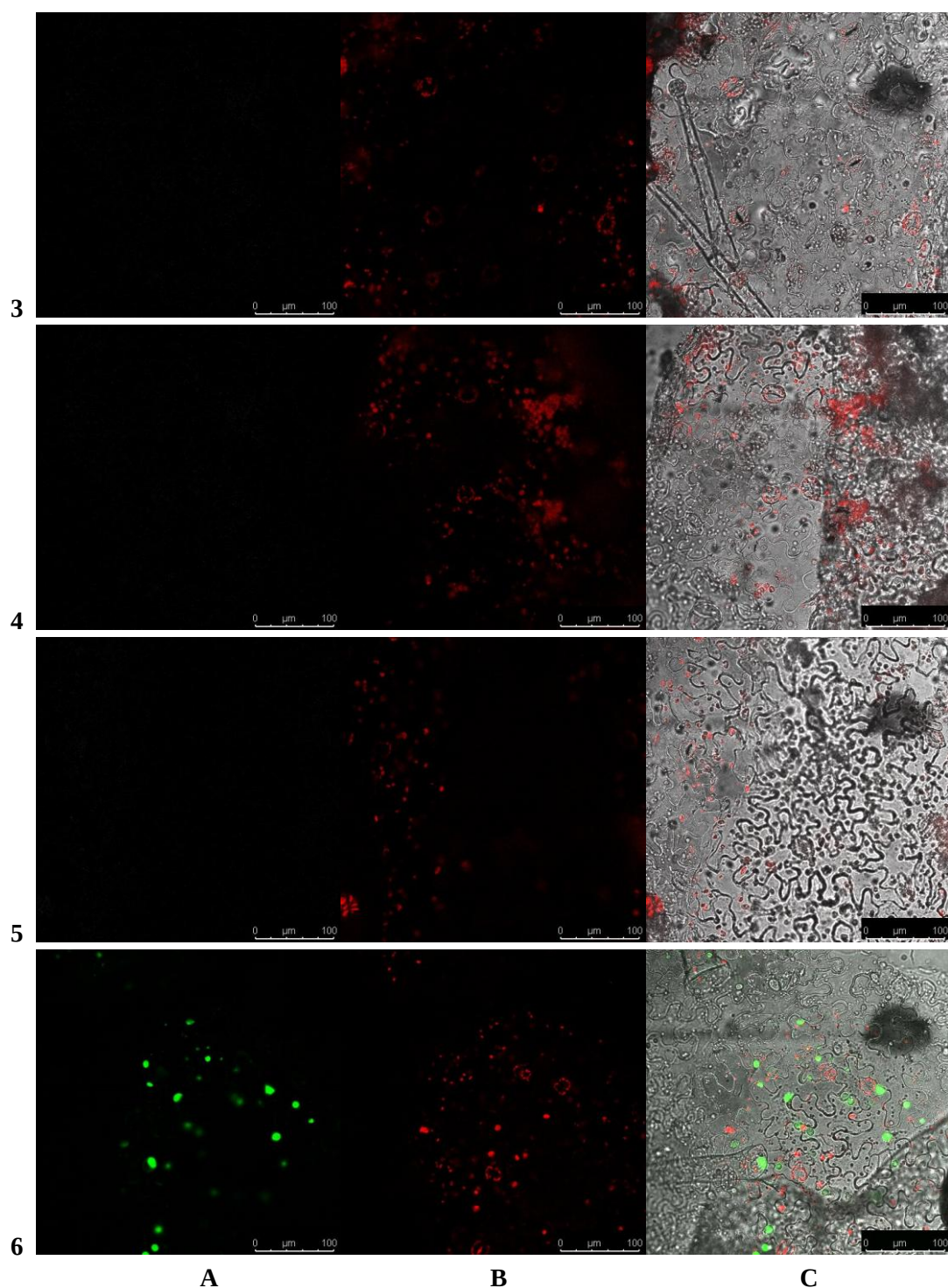
E

Reprezentativni rezultati ekspresije fenotipa T3 generacije uročnjaka, uzgajani na krutoj podlozi MS bez dodatka antibiotika higromicina, 10 dana nakon stratifikacije sjemena generacije T2. A) divlji tip. B) *SAP11-like 2b* transformant: uvijeni, nazubljeni i zadebljani listovi, poremećena simetrija listova. C) *SAP11-like 3b* transformant: uvijeni, nazubljeni i zadebljani listovi, poremećena simetrija listova, povećan broj listova. D) *SAP54-like B2P4* transformant: uvijanje listova, poremećena simetrija i povećan broj listova. E) *SAP54-like B4P2* transformant: smanjena veličina listova, uvijeni listovi, poremećena simetrija i povećan broj listova.

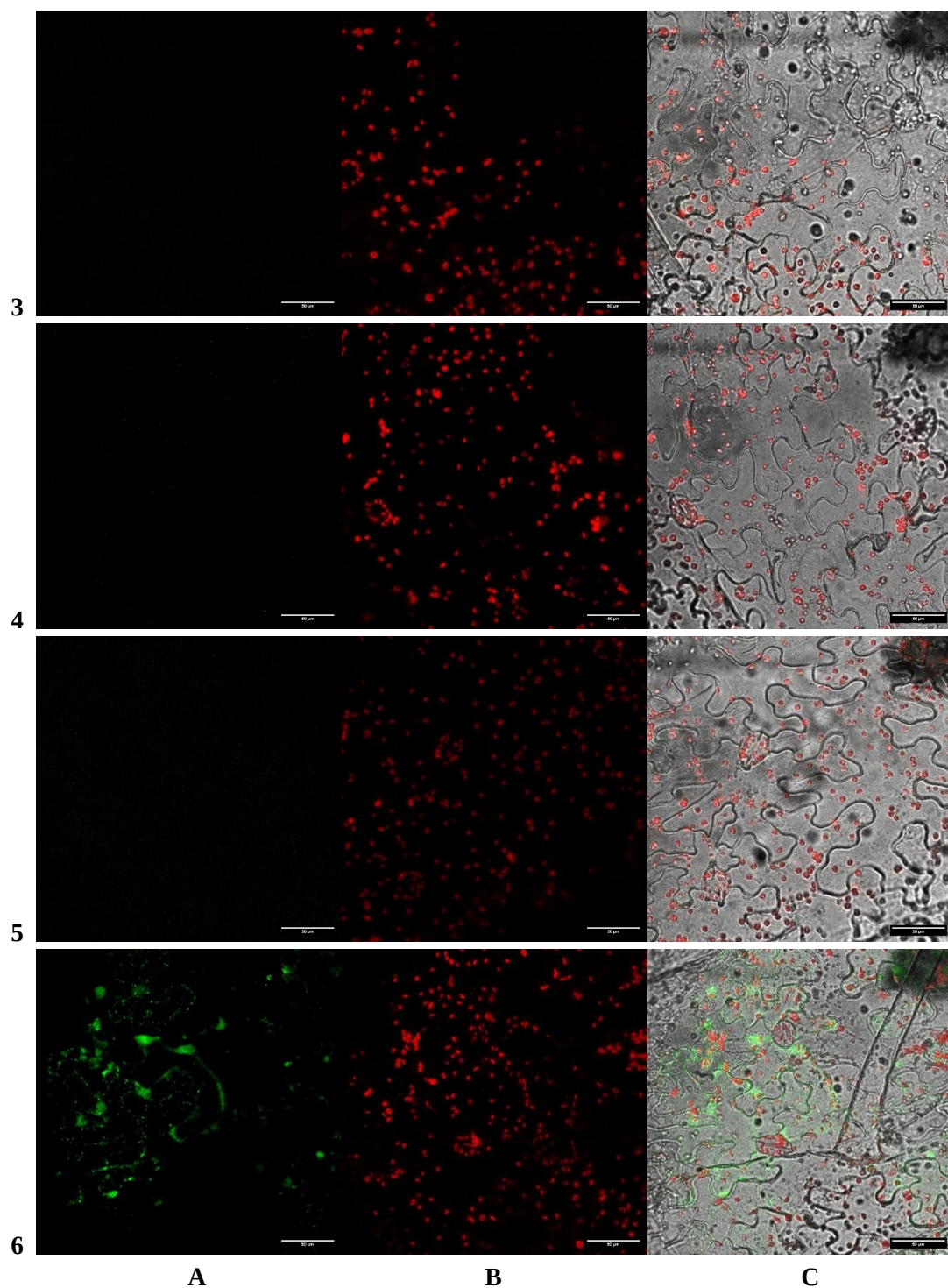
Prilog G BiFC analiza: negativne i pozitivna kontrola



Prilog G.1. BiFC analiza epidermskih stanica agroinfiltriranih listova duhana. Kontrole za interakciju SAP11-like i AtTCP2/AtTCP4: A) YFP signal; B) autofluorescencija klorofila duhana; C) Preklopljena slika sa svijetlim poljem. Negativne kontrole uključivale su kombinacije transformacijskih smjesa: 3) pSPYNE:SAP11-like i pCB301-p19. 4) pSPYCE:AtTCP2 i pCB301-p19. 5) pSPYCE:AtTCP4 i pCB301-p19. Pozitivna kontrola kombinacija transformacijske smjese: 6) pB7WGR2.0-EGFP-DMS3 i pCB301-p19. Mjerna skala: 50 µm.



Prilog G.2. BiFC analiza epidermskih stanica agroinfiltriranih listova duhana. Kontrole za interakciju SAP54-like i AtAP1/AtSEP3: A) YFP signal. B) Autofluorescencija klorofila duhana; C) preklapljen slika sa svijetlim poljem. Negativne kontrole uključivale su kombinacije transformacijskih smjesa: 3) pSPYNE:SAP54-like i pCB301-p19. 4) pSPYCE:AtAP1 i pCB301-p19. 5) pSPYCE:AtSEP3 i pCB301-p19. Pozitivna kontrola kombinacija transformacijske smjese: 6) pB7WGR2.0-EGFP-DMS3 i pCB301-p19. Mjerna skala: 100 µm.



Prilog G.3. BiFC analiza epidermskih stanica agroinfiltriranih listova duhana. Kontrole za interakciju ST6/ST9 i aktin: A) YFP signal. B) autofluorescencija klorofila duhana; C) preklopljena slika sa svijetlim poljem. Negativne kontrole uključivale su kombinacije transformacijskih smjesa: 3) pSPYNE:ST6 i pCB301-p19. 4) pSPYNE:ST9 i pCB301-p19. 5) pSPYCE:aktin i pCB301-p19. Pozitivna kontrola kombinacija transformacijske smjese: 6) pB7WGR2.0-EGFP-DMS3 i pCB301-p19. Mjerna skala: 50 µm.

Prilog H Lista potencijalnih sekrecijskih proteina sojeva STOL i ST19 '*Ca. P. solani*'

Prilog H.1. Potencijalni sekrecijski proteini identificiranih u '*Ca. P. solani*' soju STOL

Oznaka lokusa	Opis
AB2N29_0110	AYWB SAP54- <i>like</i> protein
AB2N29_0150	AYWB SAP44- <i>like</i> protein
AB2N29_0230	potencijalni efektor
AB2N29_0300	potencijalni sekrecijski protein
AB2N29_0750	potencijalni sekrecijski protein
AB2N29_1220	potencijalni sekrecijski protein
AB2N29_1510	potencijalni sekrecijski protein
AB2N29_1970	potencijalni sekrecijski protein
AB2N29_2630	potencijalni sekrecijski protein
AB2N29_2660**	AYWB SAP09, SAP39- <i>like</i> protein
AB2N29_2690	potencijalni sekrecijski protein
AB2N29_2710	potencijalni sekrecijski protein
AB2N29_3490	potencijalni sekrecijski protein
AB2N29_3920**	AYWB SAP50- <i>like</i> protein
AB2N29_3960**	potencijalni efektor
AB2N29_4030	protein za vezanje supstrata ABC-transportnog sustava za šećere
AB2N29_4130**	AYWB SAP53- <i>like</i> protein
AB2N29_4140	AYWB SAP19, SAP40- <i>like</i> protein
AB2N29_4160	potencijalni sekrecijski protein
AB2N29_4480	AYWB SAP59- <i>like</i> protein
AB2N29_4630	AYWB SAP65- <i>like</i> protein
AB2N29_4650	hipotetski protein
AB2N29_4780	potencijalni sekrecijski protein
AB2N29_5120**	AYWB SAP61- <i>like</i> protein
AB2N29_5460	potencijalni sekrecijski protein
AB2N29_5480	potencijalni sekrecijski protein
*potencijalni efektori specifični za soj	
**potencijalni efektori specifični za vrstu	

Prilog H.2. Potencijalni sekrecijski proteini identificiranih u 'Ca. P. solani' soju ST19

Oznaka lokusa	Opis
AB2N28_0500**	AYWB SAP09, SAP3-like protein
AB2N28_0630	potencijalni sekrecijski protein
AB2N28_1340	potencijalni sekrecijski protein
AB2N28_1570	AYWB SAP59-like protein
AB2N28_1710	protein za vezanje supstrata ABC-transportnog sustava za šećere
AB2N28_2310	potencijalni sekrecijski protein
AB2N28_2350**	AYWB SAP53-like protein
AB2N28_2360	AYWB SAP55-like protein
AB2N28_2650	potencijalni sekrecijski protein
AB2N28_3520	AYWB SAP25, SAP64-like protein
AB2N28_3620	potencijalni sekrecijski protein
AB2N28_3630	ATP-ovisna Zn proteaza
AB2N28_3750	ATP-ovisna Zn proteaza
AB2N28_4080*	potencijalni efektor
AB2N28_4360	AYWB SAP54-like protein
AB2N28_4840	potencijalni sekrecijski protein
AB2N28_4870	potencijalni sekrecijski protein
AB2N28_4880	potencijalni sekrecijski protein
AB2N28_5590	potencijalni sekrecijski protein
AB2N28_5600**	AYWB SAP50-like protein
AB2N28_5640**	potencijalni efektor
AB2N28_5650	potencijalni sekrecijski protein
AB2N28_5710*	potencijalni efektor
AB2N28_5730	hipotetski protein
AB2N28_5860	potencijalni sekrecijski protein
AB2N28_5950	varijabilni membranski protein
AB2N28_6190*	potencijalni efektor
AB2N28_6480**	AYWB SAP61-like protein
*potencijalni efektori specifični za soj	
**potencijalni efektori specifični za vrstu	

Prilog I Analize prisutnosti T-DNA i ekspresije gena SAP11-like i SAP54-like u ekserimentalnim biljkama uročnjaka

Prilog I.1 Prosječne Cq i ΔCq vrijednosti RT-qPCR analize gena SAP11-like i SAP54-like u transgeničnim linijama i divljem tipu uročnjaka. Gen *ogio* korišten je kao referentni gen, a „ntc“ označava negativnu kontrolu bez DNA uzorka

biljka	gen	prosječni Cq	ΔCq
SAP11-like 3b transgenični uročnjak	<i>ogio</i>	20.17	-3.85
	<i>SAP11-like</i>	16.32	
	<i>SAP54-like</i>	/	/
	ntc	/	/
SAP54-like B2P4 transgenični uročnjak	<i>ogio</i>	19.13	1.13
	<i>SAP54-like</i>	20.26	
	<i>SAP11-like</i>	/	/
	ntc	/	/
divlji tip uročnjaka	<i>ogio</i>	20.69	/
	<i>SAP11-like</i>	/	
	<i>SAP54-like</i>	/	
	ntc	/	

Prilog I.2 Prosječne Cq i ΔCq vrijednosti RT-qPCR analize gena SAP11-like i SAP54-like u transgeničnim linijama i divljem tipu uročnjaka. Gen act2 korišten je kao referentni gen, a „ntc“ označava negativnu kontrolu bez DNA uzorka.

biljka	gen	prosječni Cq	ΔCq
SAP11-like 2b transgenični uročnjak	<i>act2</i>	13.14	1.18
	<i>SAP11-like</i>	14.33	
	<i>SAP54-like</i>	/	/
	ntc	/	/
SAP11-like 3b transgenični uročnjak	<i>act2</i>	12.95	2.20
	<i>SAP11-like</i>	15.16	
	<i>SAP54-like</i>	/	/
	ntc	/	/
SAP54-like B2P4 transgenični uročnjak	<i>act2</i>	13.27	6.30
	<i>SAP54-like</i>	19.58	
	<i>SAP11-like</i>	/	/
	ntc	/	/
SAP54-like B4P2 transgenični uročnjak	<i>act2</i>	14.03	3.32
	<i>SAP54-like</i>	17.34	
	<i>SAP11-like</i>	/	/
	ntc	/	/
divlji tip uročnjaka	<i>act2</i>	13.39	/
	<i>SAP11-like</i>	/	
	<i>SAP54-like</i>	/	
	ntc	/	

Prilog I.3 Fenotipska analiza transgeničnih biljaka uročnjaka s prekomjernom ekspresijom SAP11-like i SAP54-like proteina

mjerenje	wt	SAP11-like 2b	SAP11-like 3b	SAP54-like B2P4	SAP54-like B4P2
masa svježih izbojaka (g)	0.66 ± 0.06	0.28 ± 0.02 **	0.50 ± 0.06 *	0.40 ± 0.04 *	0.27 ± 0.03 **
visina (cm)	36.00 ± 0.99	23.79 ± 0.74 **	28.78 ± 0.91 **	30.1 ± 0.68 **	24.75 ± 0.65 **
promjer rozete (cm)	6.42 ± 0.36	4.48 ± 0.19 **	6.09 ± 0.32	5.27 ± 0.28 *	3.96 ± 0.14 **
duljina lista rozete (cm)	2.19 ± 0.11	1.33 ± 0.05 **	1.94 ± 0.07 *	1.45 ± 0.07 **	1.3 ± 0.05 **
širina lista rozete (cm)	1.16 ± 0.05	0.76 ± 0.03 **	1.03 ± 0.08	0.86 ± 0.04 **	0.81 ± 0.08 *
Σ aksilarnih izbojaka	4.2 ± 0.33	9.57 ± 0.59 **	10.77 ± 0.85 **	8.63 ± 0.49 **	6.5 ± 0.71 *
duljina komuški (cm)	1.34 ± 0.47	0.88 ± 0.26 **	0.89 ± 0.28 **	1.03 ± 0.38 **	0.83 ± 0.25 **

Prikazane vrijednosti su srednje vrijednosti ± SE; n = 30 biljaka po liniji. Sva mjerenja provedena su 45 dana nakon stratifikacije. Biljke su uzgajane u ciklusu dugog dana (16h svjetla/8h tame). Razlike između divljeg tipa (wt) i transformiranih biljaka uročnjaka statistički su značajne ako su označene jednom (p < 0.05) ili dvjema (p < 0.0001) zvjezdicama, kako je utvrđeno Studentovim t-testom.

Prilog I.4 Fenotipska analiza transgeničnih biljaka uročnjaka s prekomjernom ekspresijom SAP11-like i SAP54-like proteina.

mjerenja	wt	SAP11-like 2b	SAP11-like 3b	SAP54-like B2P4	SAP54-like B4P2
masa svježih izbojaka (g)	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.1	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.01	1.56 ± 0.01 **
promjer rozete (cm)	4.52 ± 0.20	4.19 ± 0.32	3.48 ± 0.22 *	4.09 ± 0.21	3.21 ± 0.21 *
duljina lista rozete (cm)	1.19 ± 0.06	1.2 ± 0.06	1.04 ± 0.05 *	1.07 ± 0.05	0.83 ± 0.04 **
širina lista rozete (cm)	0.8 ± 0.05	0.7 ± 0.04	0.66 ± 0.03 *	0.72 ± 0.03	0.55 ± 0.03 **

Prikazane vrijednosti su srednje vrijednosti ± SE; n = 30 biljaka po liniji. Sva mjerenja provedena su 45 dana nakon stratifikacije. Biljke su uzgajane u ciklusu kratkog dana (8h svjetla/16h tame). Razlike između divljeg tipa (wt) i transformiranih biljaka uročnjaka statistički su značajne ako su označene jednom (p < 0.05) ili dvjema (p < 0.0001) zvjezdicama, kako je utvrđeno Student t-testom.