

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET



Ana S. Sedlarević Zorić

**Sekundarni metabolizam i antioksidativni  
status žutog lanilista (*Linaria vulgaris* Mill.)  
tokom formiranja gala  
izazvanih žiškrom (*Rhinusa pilosa* Gyllenhal)**

doktorska disertacija

Beograd, 2026.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY



Ana S. Sedlarević Zorić

**Secondary metabolism and antioxidant status  
of yellow toadflax (*Linaria vulgaris* Mill.)  
during gall formation induced by the weevil  
(*Rhinusa pilosa* Gyllenhal)**

Doctoral Disertation

Belgrade, 2026.

**Mentori:**

dr Sonja Veljović Jovanović, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu – Institut za multidisciplinarna istraživanja, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Filis Morina, naučni savetnik  
Institut za molekularnu biologiju biljaka, Češka akademija nauka- Češke Buđejovice

**Članovi komisije za ocenu doktorske disertacije:**

dr Aneta Sabovljević, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Tijana Cvetić Antić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Vele Tešević, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Ivo Toševski, naučni savetnik u penziji  
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu

dr Jelena Savić, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu – Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

**Datum odbrane:**



*Ova doktorska disertacija urađena je u laboratoriji Odseka za nauku o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja (IMSI) – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu. Istraživanja su finansirana sa projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije III 43010 pod nazivom „Modifikacije antioksidativnog metabolizma biljaka sa ciljem povećanja tolerancije na abiotički stres i identifikacija novih biomarkera sa primenom u remedijaciji i monitoringu degradiranih staništa“. Eksperimentalne biljke i insekti su gajeni u Laboratoriji za primenjenu entomologiju Odseka za štetočine bilja Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu (IZBIS) u Beogradu.*

## ***Želim da se zahvalim,***

*Najveću zahvalnost dugujem svojim mentorkama, dr Sonji Veljović Jovanović i dr Filis Morini, za pomoć u svim etapama izrade disertacije, za nesebičnu podršku, strpljenje, izdvojeno vreme i trud. Posebno zahvaljujem dr Sonji Veljović Jovanović na pruženoj prilici da budem deo njenog projekta i najužeg tima saradnika tokom prethodnih godina. Mojoj mentorki Filis dugujem neizmernu zahvalnost za strpljenje, posvećenost i entuzijazam, za nesebično deljenje znanja i trud uložen od prvog eksperimenta do poslednje tačke kojom je disertacija dobila svoj konačni oblik. Zahvalna sam vam na iskrenoj i prijateljskoj podršci i verovanju u moje sposobnosti!*

*Zahvaljujem dr Tijani Cvetić Antić na pomoći i vrednim savetima tokom izrade teze, kao i na prijatnoj saradnji tokom doktorskih studija. Dr Jeleni Savić, na vremenu izdvojenom za pregled teze i savetima za njeno poboljšanje. Prof. Aneti Sabovljević zahvaljujem na lepoj saradnji i korisnim smernicama prilikom uobličavanja teksta disertacije, kao i tokom doktorskih studija. Zahvaljujem prof. Veletu na pažljivom čitanju teze i korisnim sugestijama za njeno poboljšanje. Zahvaljujem dr Ivu Toševskom na podršci i pomoći tokom pisanja disertacije. Takođe, dr Ivu Toševskom, dr Jeleni Jović i dr Oliveru Krstić dugujem zahvalnost za prikupljanje entomološkog i biljnog materijala za potrebe realizacije eksperimentalnog dela ove disertacije.*

*Dragim koleginicama i prijateljicama, dr Sonji Milić Komić i dr Bojani Živanović, dugujem duboku zahvalnost za uvođenje u svet nauke, nesebično prenošenje veština u laboratoriji i van nje, kao i za potpuno prihvatanje kao ravnopravnog člana tima. Njihova podrška i prisustvo ulepšavaju mi dane provedene na institutu.*

*Zahvaljujem svim koleginicama i kolegama iz Instituta za multidisciplinarna istraživanja, a posebno Mileni, Aleksandri, Sanji, Nikoli i Nataši, koji su mi ulepšavali dane provedene na institutu.*

*Dragim prijateljicama sa doktorskih studija, „četvercu bez kormilara“ – Bojani, Danijeli i Jeleni – hvala za podršku, razumevanje, bliskost i smeh tokom svih ovih godina.*

*Hvala dr Mariji Vidović iz Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo na prenetom znanju, uvođenju u svet nauke i pomoći oko pripreme, analize uzoraka i obrade rezultata. Hvala dr Tomislavu Tostiju sa Hemijskog fakulteta na pomoći u analizi rastvornih ugljenih hidrata, kao i dr Urošu Gašiću sa Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ na pomoći u analizi fenolnih jedinjenja na UHPLC-MS/MS Orbitrapu.*

*Konačno, posebno se zahvaljujem svojoj porodici- mom životnom saputniku Dušanu i našim potomcima Rastku, Vukanu i Iskri, kao i tati, mami, tetki i Jasni. Zahvalna sam i Nani i dedi, koji više nisu sa nama, ali su ostavili neizbrisiv trag u mom životu i zauvek ostaju deo mog sećanja. Hvala na bezgraničnoj podršci, strpljenju, razumevanju, poverenju i ljubavi u svakom trenutku!*

*Beograd, maj 2026.*

*Ana Sedlarević Zorić*

## **Sekundarni metabolizam i antioksidativni status žutog lanilista (*Linaria vulgaris* Mill.) tokom formiranja gala izazvanih žiškom (*Rhinusa pilosa* Gyllenhal)**

### **Sažetak**

U ovom istraživanju analizirane su kompleksne promene u antioksidativnom, primarnom i sekundarnom metabolizmu žutog lanilista (*Linaria vulgaris* Mill.) tokom interakcije sa galikolnim žiškom (*Rhinusa pilosa* Gyll.). Osnovni cilj je bio otkrivanje mehanizama kojima insekt biohemijski reprogramira biljna tkiva, pretvarajući ih u specijalizovane strukture – gale, koje juvenilnim stadijumima insekta služe kao izvor hrane i zaštite.

Istraživanje je pokazalo da formiranje gala značajno menja redoks homeostazu biljke. Dok obična herbivorija (ishrana insekata) izaziva porast redukovano glutaciona (GSH) u stablu, razvoj gala dovodi do njegovog trošenja i akumulacije oksidovanog oblika (GSSG), što ukazuje na intenzivne oksidativne procese. Aktivnost ključnih antioksidativnih enzima, poput askorbat peroksidaze (APX), značajno opada u tkivu gala, dok aktivnost dehidroaskorbat reduktaze (DHAR) raste u kasnijim fazama razvoja, što dovodi do regeneracije askorbata. Ovakva preraspodela redoks dinamike omogućava inicijaciju, morfogenezu i dugotrajnu stabilnost galozne strukture, čime se jasno razlikuje od klasične herbivorije i potvrđuje uloga oksidativnog stresa kao regulatornog mehanizma, a ne samo nuspojave interakcije.

U pogledu primarnog metabolizma, gale deluju kao snažna potrošačka (*uvir*) tkiva. Inicijacija gala izaziva prolaznu akumulaciju signalnih molekula trehaloze i trehaloza-6-fosfata (T6P), dok se u razvijenim galama nakupljaju heksoze (glukoza i fruktoza). Istovremeno, fotosintetski kapacitet u galama je redukovano, što je potvrđeno smanjenjem sadržaja hlorofila i efikasnosti transporta elektrona. Takođe je zabeležen dramatičan porast ukupnih slobodnih aminokiselina, naročito glutamina, asparagina i glicina, što potvrđuje nutritivnu hipotezu o galama kao izvoru azota za larve. Značajna je i specifična uloga određenih aminokiselina u antioksidativnoj zaštiti kao i u biosintezi glutaciona.

Analiza sekundarnog metabolizma otkrila je da cecidogen (ovipoziciona tečnost insekta) sadrži specifična fenolna jedinjenja, poput protokatehuinske kiseline i diosmetin-*O*-acetilrutinozida, koja se ne nalaze u intaktnom stablu i verovatno služe kao stimulansi za indukciju gala. Zanimljivo je da tkivo gale ima značajno manji sadržaj fenola u poređenju sa kontrolnim stablom, što sugerira da insekt suprimira odbrambene mehanizme biljke kako bi tkivo bilo pogodnije za ishranu.

Istraživanje jasno razgraničava sistemski odgovor biljke na herbivoriju od specifičnog, lokalizovanog reprogramiranja tokom razvića gala.

**Ključne reči:** *Linaria vulgaris* (žuti lanilist), *Rhinusa pilosa* (galikolni žižak), biljne gale (galogeneza), biotički stres i herbivorija, antioksidativni metabolizam, ugljeni hidrati, aminokiseline, fenolna jedinjenja

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Fiziologija biljaka

**UDK broj:**

## Secondary metabolism and antioxidant status of yellow toadflax (*Linaria vulgaris* Mill.) during gall formation induced by the weevil (*Rhinusa pilosa* Gyllenhal)

### Abstract

This research analyzes the complex changes in the antioxidant, primary, and secondary metabolism of the yellow toadflax (*Linaria vulgaris* Mill.) during its interaction with the gall-inducing weevil (*Rhinusa pilosa* Gyll.). The primary aim was to reveal the mechanisms by which the insect biochemically reprograms plant tissues, transforming them into specialized structures – galls, which serve as both a food source and protection for immature stages of the insect.

The study demonstrated that gall formation significantly alters the plant's redox homeostasis. While common herbivory induces an increase in reduced glutathione (GSH) in the stem, gall development leads to its depletion and the accumulation of its oxidized form (GSSG), indicating intense oxidative processes. The activity of key antioxidant enzymes, such as ascorbate peroxidase (APX), significantly declines in gall tissue, while dehydroascorbate reductase (DHAR) activity increases in the later developmental stages, aiding in ascorbate regeneration. Such redistribution of redox dynamics enables the initiation, morphogenesis, and long-term stability of the gall structure, clearly distinguishing it from classical herbivory and confirming the role of oxidative stress as a regulatory mechanism rather than a byproduct of the interaction.

Regarding the primary metabolism, galls act as powerful sink tissues. Gall initiation triggers a transient accumulation of the signaling molecules trehalose and trehalose-6-phosphate (T6P), while developed galls accumulate hexoses (glucose and fructose) at the expense of sucrose. Simultaneously, photosynthetic capacity in the galls is reduced, as evidenced by a decrease in chlorophyll content and electron transport efficiency. A dramatic increase in total free amino acids (particularly glutamine, asparagine, and glycine) was also recorded, confirming the nutritional hypothesis of galls as a nitrogen source for larvae. Certain amino acids exert a distinct role in sustaining antioxidant defense and serve as essential precursors in glutathione biosynthesis.

Analysis of secondary metabolism revealed that the cecidogen (the insect's oviposition fluid) contains specific phenolic compounds, such as protocatechuic acid and diosmetin-*O*-acetylrutinoside, which are absent in the intact stem and likely serve as stimuli for gall induction. Interestingly, gall tissue possesses a significantly lower phenolic content compared to control stems, suggesting that the insect suppresses the plant's defense mechanisms to make the tissue more suitable for feeding.

The research clearly distinguishes the plant's systemic response to herbivory from the specific, localized reprogramming occurring during cecidogenesis.

**Keywords:** *Linaria vulgaris* (yellow toadflax), *Rhinusa pilosa* (gall-inducing weevil), plant galls (gall formation), biotic stress and herbivory, antioxidant metabolism, carbohydrates, amino acids, phenolic compounds

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Plant physiology

**UDC number:**

## Skraćenice

•OH	hidroksil-radikal
•OH <sub>2</sub>	hidroperoksil-radikal
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	singletni kiseonik
AA	akrilamid
ACN	acetonitril
ABA	apscisinska kiselina
AK	aminokiseline
Ala	alanin
AO	askorbat oksidaza
APS	amonijum persulfat
APX	askorbat-peroksidaza
Arg	arginin
Asc	redukovani askorbat
Asc-GSH	askorbat-glutation ciklus
Asn	asparagin
Asp	asparaginska kiselina
BSA	goveđi serum-albumin (eng. <i>Bovine Serum Albumin</i> )
C	ugljenik
C	kontrolni uzorci (intaktne biljke)
Car	karotenoidi
CAT	katalaza
CBB G-250	eng. <i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i>
Chl	hlorofil
CO <sub>2</sub>	ugljen-dioksid
covPOD	kovalentno vezane peroksidaze za ćelijski zid
Cu/ZnSOD	bakar/cink-superoksid dismutaza
dH <sub>2</sub> O	destilovana voda
DHA	dehidroaskorbat
DHAR	dehidroaskorbat reduktaze
DTT	ditiotreitrol
DW	suva masa (eng. <i>Dry Weight</i> )
EDTA	etilendiamintetra sirćetna kiselina
ELISA	eng. <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ETC	brzina linearnog elektronskog transporta (eng. <i>Electron Transport Chain</i> )
ETI	imunitet pokrenut efektorima (eng. <i>Effector-Triggered Immunity</i> )
F <sub>0</sub> , F <sub>m</sub> , F <sub>v</sub>	parametri fluorescencije hlorofila (minimalna, maksimalna i varijabilna fluorescencija)
Flav	flavonoidi
FW	sveža masa (eng. <i>Fresh Weight</i> )
G	gala
G1, G2, G3, G4, G5	gale različite faze razvoja (od 24h do 10 dana starosti)
GA	giberelini
Gln	glutamin
GLPs	proteini slični germinu (eng. <i>Germin-Like Proteins</i> )
Glu	glutaminska kiselina
GOX	glukoza-oksidaza
GPX	glutation peroksidaza
GR	glutation-reduktaza
GSH	redukovani glutation

GSSG	glutation-disulfid, oksidovani glutation
Gly	glicin
H	herbivorija
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodonik peroksid
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sumporna kiselina
HAMPs	molekularni obrasci povezani sa herbivorima (eng. <i>Herbivory-Associated Molecular Patterns</i> )
HBAs	hidroksibenzojeve kiseline
HCAs	hidroksicimetne kiseline
HCl	hlorovodonična kiselina
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazin-etansulfonska kiselina
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi (eng. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HSD	eng. <i>Honest Significant Difference</i> , deo Tukey testa
IAA	indol sirćetna kiselina
ionPOD	jonski vezane peroksidaze za ćelijski zid
IEF	izoelektrofokusanje
Ile	izoleucin
JA	jasmonska kiselina
KOH	kalijum hidroksid
L	list
LAC	lakaza
Leu	leucin
Lys	lizin
MAPK	MAPK kinaza (eng. <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> )
MDA•	monodehidroaskorbat radikal
MDA	monodehidroaskorbat
MDAR	monodehidroaskorbat reduktaza
MeOH	metanol
MgCl <sub>2</sub>	magnezijum hlorid
Mn-SOD	mangan-superoksid dismutaza
MPA	<i>meta</i> -fosforna kiselina
MS	masena spektrometrija (eng. <i>Mass Spectrometry</i> )
MS/MS	tandemska masena spektrometrija
N	azot
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	natrijum karbonat
NaBH <sub>4</sub>	natrijum borhidrid
NADH	nikotinamid-adenindinukleotid redukovani
NADPH	nikotinamid-adenindinukleotid-fosfat redukovani
NaOH	natrijum hidroksid
NFDM	eng. <i>Non-Fat Dry Milk</i>
NOX	NADPH oksidaza
ns	statistički neznačajne razlike (eng. <i>not significant</i> )
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	superoksid-anjon-radikal
O <sub>3</sub>	ozon
OPA	<i>o</i> -ftalaldehid
<i>o</i> -PDA	<i>orto</i> -fenilen-diamin
OJIP	analiza kinetičkih tranzijenata fluorescencije hlorofila
Orn	ornitin
PAGE	poliakrilamidna gel elektroforeza
PAL	fenilalanin-amonijak liaza

PBS	fiziološki rastvor puferisan fosfatom ( <i>eng. Phosphate Buffered Saline</i> )
PVDF	poliviniliden-difluorid (membrana)
Phe	fenilalanin
Pi	inhibitor proteaza
pI	izoelektrična tačka proteina
PMSF	<i>eng. phenylmethylSulfonyl Fluoride</i>
POD/POXs	peroksidaze III klase
PPA	<i>eng. Peroxidase-Phenolics-Ascorbate</i>
PPO	polifenol oksidaza
PR-9 i PR-6	proteini u vezi sa patogenezom ( <i>eng. Pathogenesis-Related proteins</i> )
PS I	fotosistem I
PS II	fotosistem II
PVP	polivinilpirolidon
Q <sub>A</sub> /Q <sub>B</sub>	primarni i sekundarni akceptori elektrona u fotosistemu II
RBOH	homolog respiratorne NADPH oksidaze ( <i>eng. Respiratory Burst Oxidase Homolog</i> )
RNS	reaktivne azotne vrste ( <i>eng. Reactive Nitrogen Species</i> )
ROO•	peroksil-radikal
ROS	reaktivne kiseionične vrste ( <i>eng. Reactive Oxygen Species</i> )
RsA	redoks stanje askorbata
RsG	redoks stanje glutationa
S	stablo
SA	salicilna kiselina
SBD-F	amonijum-7-fluoro-2,1,3-benzooksadiazol-4-sulfonat
SDS	natrijum-dodecil-sulfat ( <i>eng. Sodium DodecylSulphate</i> )
SE	standardna greška
Ser	serin
SIPK	protein kinaza indukovana salicilnom kiselinom ( <i>eng. salicylic acid-induced protein kinase</i> )
SnRK1	kinaza ( <i>eng. SNF1-Related protein Kinase 1</i> )
SOD	superoksid-dismutaza
solPOD	solubilne peroksidaze
T6P	trehaloza-6-fosfat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etan-1,2-diamin
Thr	treonin
Ti	plazmid koji indukuje tumor ( <i>eng. tumor-inducing</i> )
TIC	ukupni nerastvorni ugljeni hidrati ( <i>eng. Total water-Insoluble Carbohydrates</i> )
TOR	centralni regulator rasta ( <i>eng. TARGET OF RAPAMYCIN</i> )
Tris	tris(hidroksimetil)-aminometan
Trp	triptofan
Tyr	tirozin
UHPLC	tečna hromatografija ultravisokih performansi ( <i>eng. Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i> )
UV	ultraljubičasto zračenje, elektromagnetno zračenje u opsegu: 200 - 400 nm
v	zapreminski udeo
Val	valin
VIS	vidljiva oblast spektra elektromagnetnog zračenja (400 - 770 nm)
VOCs	isparljiva organska jedinjenja ( <i>eng. Volatile Organic Compounds</i> )
w	maseni udeo
WIPK	protein kinaza indukovana ranjavanjem ( <i>eng. Wound-Induced Protein Kinase</i> )

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
1.1. Biotički stres kod biljaka .....	4
1.1.1. Herbivorija.....	6
1.1.2. Formiranje, razviće i adaptivni značaj gala .....	7
1.2. Oksidativni stres i antioksidativni sistem u odgovoru na herbivoriju i galogenezu.....	13
1.3. Antioksidativni odgovor biljke na herbivoriju i indukciju gala .....	17
1.3.1. Neenzimski antioksidanti .....	19
1.3.1.1. Askorbat .....	19
1.3.1.2. Glutation .....	21
1.3.2. Enzimski antioksidanti.....	22
1.3.2.1. Enzimi askorbat-glutation ciklusa .....	23
1.3.2.2. Superoksid-dismutaza.....	25
1.3.2.3. Peroksidaze III klase .....	26
1.4. Izmene primarnog metabolizma biljke kao odgovor na biotički stres .....	28
1.4.1. Fotosinteza u uslovima herbivorije i indukciji gala .....	28
1.4.2. Ugljeni hidrati.....	30
1.4.3. Aminokiseline.....	33
1.5. Sekundarni metabolizam i strukturna odbrana u odgovoru na biotički stres - fenolna jedinjenja i lignifikacija kao barijera .....	35
1.5.1. Fenolna jedinjenja.....	35
1.5.2. Lignin .....	38
1.6. Kompromis između rasta i odbrane: fotosinteza, antioksidativni odgovor i metabolička preraspodela.....	40
1.7. Značaj istraživanja .....	41
2. Ciljevi istraživanja .....	42
3. Materijal i metode.....	43
3.1. Gajenje biljaka <i>Linaria vulgaris</i> Mill. ....	43
3.2. Održavanje uzgojnih kolonija galikolnog žiška <i>Rhinusa pilosa</i> .....	44
3.3. Razviće gala i eksperimentalni dizajn .....	45
3.4. Biohemijski parametri biljnog tkiva <i>L. vulgaris</i> .....	48
3.4.1. Ekstrakcija i kvantifikacija sadržaja ukupnog i redukovano askorbata u galama, stablu i listovima <i>L. vulgaris</i> i određivanje njegovog redoks statusa.....	49
3.4.1.1. Određivanje redukovane forme askorbata spektrofotometrijski .....	49
3.4.1.2. HPLC analiza ukupnog i oksidovanog askorbata i redoks stanje .....	49
3.4.2. Ekstrakcija i određivanje glutaciona i redoks-stanja u galama, stablu i listovima <i>L. vulgaris</i> .....	51

3.4.2.1. Ekstrakcija glutationa .....	51
3.4.2.2. Redukcija glutationa i derivatizacija tiolnih grupa; Identifikacija i kvantifikacija SBD- F/GSH derivata HPLC metodom.....	51
3.4.3. Ekstrakcija i kvantifikacija ugljenih hidrata u biljnom tkivu <i>L. vulgaris</i> .....	52
3.4.3.1. Ekstrakcija i kvantifikacija rastvornih ugljenih hidrata u galama, stablu i listovima <i>L. vulgaris</i> HPLC metodom.....	52
3.4.3.2. Određivanje ukupnih ugljenih hidrata i skroba kod <i>L. vulgaris</i> .....	52
3.4.4. Ekstrakcija i analiza fotosintetskih pigmenata .....	53
3.4.5. Analiza brze kinetičke fluorescencije hlorofila (OJIP) .....	53
3.4.6. Ekstrakcija i HPLC analiza slobodnih aminokiselina u galama, stablu i listovima <i>L. vulgaris</i> .....	55
3.4.7. Ekstrakcija i određivanje fenolnih jedinjenja primenom HPLC metoda.....	56
3.4.7.1. Ekstrakcija i određivanje solubilnih fenolnih jedinjenja i fenolnih jedinjenja vezanih za ćelijski zid u galama, stablu i listovima <i>L. vulgaris</i> .....	56
3.4.7.2. Identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja vezanih za ćelijski zid korišćenjem UPLC-DAD metode.....	56
3.4.7.3. UHPLC-MS/MS OrbiTrap analiza fenolnih jedinjenja kod cecidogena i u stablu <i>L. vulgaris</i> .....	57
3.4.7.4. Ekstrakcija solubilnih fenolnih jedinjenja iz gala, stabla i listova <i>L. vulgaris</i> .....	57
3.4.7.5. Identifikacija i kvantifikacija solubilnih fenolnih jedinjenja pomoću HPLC-DAD .....	58
3.4.8. Određivanje lignina u biljnom tkivu .....	58
3.4.9. Ekstrakcija antioksidativnih enzima iz stabla, listova i gala <i>L. vulgaris</i> .....	59
3.4.9.1. Ekstrakcija solubilnih peroksidaza III klase (POD), katalaze (CAT) i superoksid-dismutaza (SOD) .....	59
3.4.9.2. Ekstrakcija enzima iz askorbat-glutation ciklusa (APX, DHAR, MDAR, GR) .....	59
3.4.9.3. Izolacija ćelijskog zida i ekstrakcija solubilnih i peroksidaza vezanih za ćelijski zid .....	60
3.4.10. Određivanje aktivnosti ekstrahovanih enzima u stablu, listovima i galama <i>L. vulgaris</i> .....	60
3.4.10.1. Određivanje aktivnosti POD .....	60
3.4.10.2. Određivanje aktivnosti APX.....	61
3.4.10.3. Određivanje aktivnosti MDAR .....	61
3.4.10.4. Određivanje aktivnosti DHAR .....	61
3.4.10.5. Određivanje aktivnosti GR .....	62
3.4.11. Određivanje koncentracije proteina u ekstraktima biljnog tkiva .....	62
3.4.12. Elektroforetsko razdvajanje proteina iz stabla, listova i gala <i>L. vulgaris</i> .....	62
3.4.12.1. Izoelektrično fokusiranje proteina .....	62
3.4.12.2. Vizuelizacija izoforni peroksidaza na gelu .....	63
3.4.13. Analiza proteina metodom imunoblota .....	64

3.4.13.1. Vertikalna elektroforeza na poliakrilamidnom gelu pod denaturišućim uslovima (SDS- PAGE).....	64
3.4.13.2. Imunoblot (Western blot) .....	65
3.4.14. Statistička obrada rezultata .....	66
4. Rezultati .....	67
4.1. Inicijacija i razvoj galoznog tkiva (galogeneza) na stablu <i>L. vulgaris</i> .....	67
4.2. Promene u fotosintetskom aparatu pri galogenezi.....	68
4.2.1. Fotosintetski pigmenti .....	68
4.2.2. OJIP analiza fluorescencije hlorofila.....	68
4.3. Sadržaj rastvornih i nerastvornih ugljenih hidrata u tkivu <i>L. vulgaris</i> pod uticajem galogeneze.....	70
4.3.1 Sadržaj skroba i ukupnih nerastvornih ugljenih hidrata (TIC).....	70
4.3.2. Sadržaj rastvornih ugljenih hidrata .....	71
4.4. Promena sadržaja slobodnih aminokiselina u stablu <i>L. vulgaris</i> pod uticajem galogeneze i herbivorije.....	74
4.5. Uloga sekundarnih metabolita fenilpropanoidnog biosintetskog puta u interakciji lanilista i <i>R. pilosa</i> .....	78
4.5.1. Sadržaj solubilnih fenolnih jedinjenja .....	78
4.5.2. Sadržaj solubilnih fenolnih jedinjenja <i>L. vulgaris</i> , gala, cecidogena, insekta i larve dobijen HPLC-DAD metodom.....	78
4.5.2.1. Sadržaj fenolnih jedinjenja u stablu <i>L. vulgaris</i> i cecidogenu identifikovan UHPLC-MS/MS Orbitrap analizom .....	80
4.5.3. Sadržaj fenolnih jedinjenja vezanih za ćelijski zid dobijen UPLC metodom.....	83
4.6. Koncentracija lignina .....	84
4.7. Efekat herbivorije i razvića gala na antioksidativni metabolizam <i>L. vulgaris</i> .....	84
4.7.1. Uticaj herbivorije i razvića gala na sadržaj ukupnog askorbata i njegovo redoks stanje kod <i>L. vulgaris</i> .....	84
4.7.2. Uticaj herbivorije i razvića gala na sadržaj ukupnog glutaciona i njegovo redoks stanje kod <i>L. vulgaris</i> .....	85
4.7.3. Aktivnost peroksidaza III klase (solPOD) .....	87
4.7.4. Aktivnost enzima askorbat-glutation ciklusa (APX, DHAR, MDAR, GR) .....	89
4.7.5. Detekcija SOD izoformi (Cu/ZnSOD i MnSOD) Western blot metodom .....	90
5. Diskusija .....	92
5.1. Odgovor <i>Linaria vulgaris</i> na herbivoriju .....	92
5.1.1. Promene u primarnom i sekundarnom metabolizmu <i>L. vulgaris</i> .....	92
5.1.2. Antioksidativni odgovor <i>L. vulgaris</i> na herbivoriju.....	95
5.2. Metaboličke promene <i>L. vulgaris</i> tokom galogeneze.....	96
5.2.1. Biohemijski profil cecidogena u galoznoj morfogenezi .....	97

5.2.2. Promene u primarnom metabolizmu (fotosinteza, ugljeni hidrati i aminokiseline) .....	99
5.2.3. Promene u fenilpropanoidnom metabolizmu i profilu fenolnih jedinjenja kao odgovor na indukciju i razviće gala.....	102
5.2.4. Uloga antioksidativnog metabolizma u galogenezi .....	103
5.3. Interakcija biljke i insekta u model sistemu <i>Linaria vulgaris</i> – <i>Rhinusa pilosa</i> , biotički stres, koevolucija ili oblik simbioze? .....	106
6. Zaključci .....	110
7. Literatura .....	112
8. Prilozi .....	146

## 1. Uvod

Interakcije između biljaka i insekata biljojeda oblikovane su neprekidnom koevolucijom, što je rezultiralo izuzetnom raznovrsnošću odbrambenih i adaptivnih strategija obe grupe organizama. Kao sesilni organizmi, biljke su neprestano izložene biotičkom stresu izazvanom ishranom insekata, ali i ovipozicijom galikolnih vrsta, koje direktno narušavaju njihovu metaboličku homeostazu i primoravaju biljku na kompleksno prilagođavanje metaboličkih puteva.

Formiranje gala (galogeneza) predstavlja jedan od najspecijalizovanijih oblika interakcije biljka – insekt, u kojem insekt deluje kao induktor koji modifikuje fiziologiju i morfogenezu biljke-domaćina. Putem biohemijskog reprogramiranja, galikolni organizmi pretvaraju biljna tkiva u jedinstvene, složeno organizovane strukture koje im obezbeđuju optimalne uslove za njihovo razviće: nutrijente i zaštitu od predatora i nepovoljnih faktora spoljašnje sredine. Proučavanje ovih specifičnih odnosa insekt–biljka-domaćin pruža fundamentalni model za razumevanje mehanizama biljne odbrane, kao i metaboličke i energetske preraspodele u uslovima biotičkog stresa.

U okviru ove disertacije, model sistem za proučavanje interakcije između biljaka i insekata biljojeda čini odnos *Linaria vulgaris* – *Rhinusa pilosa*. Studije prikladnosti domaćina kod vrsta iz ove grupe pokazale su visoko specifične interakcije između populacija žižaka i njihovog domaćina *L. vulgaris* (Toševski i sar., 2005; 2012). Ovaj odnos predstavlja značajan model za razumevanje biohemijskih procesa, naročito antioksidativnog metabolizma koji je u osnovi odgovora biljke na biotički stres, kao i specifičnih morfoloških promena indukovanih insektom, pri čemu se autotrofna tkiva transformišu u heterotrofna.

Žuti lanilist (*Linaria vulgaris* Mill.; sinonimi: lanilist, divlji lan) je višegodišnja zeljasta biljka iz porodice zevalica (Plantaginaceae, Antirrhineae) (Olmstead i sar., 2001; Oxelman i sar., 2005) (slika 1).



**Slika 1.** *Linaria vulgaris* Mill. Foto: Ana Sedlarević Zorić.

*Linaria vulgaris* je prirodno rasprostranjena na području Evrope i severne Azije. Raste na livadama, pašnjacima, uz puteve, nasipe, duž pruge i rubova šuma, često u velikim skupinama, od nizina do 1600 m nadmorske visine, uglavnom na peskovitim ili šljunkovitim zemljištima. Izvorna rasprostranjenost *L. vulgaris* obuhvata umerene oblasti Evrope i Azije. Ova biljna vrsta se širi preko severne, centralne i južne Evrope ka Skandinaviji i Britanskim ostrvima, uključujući Balkan i Mediteran, a dalje do Turske i jugozapadne oblasti Rusije i Kine (Saner i sar., 1995; CABI. 2022; ISSG 2022). Introdukovana je u Severnu Ameriku, gde je postala naturalizovana širom SAD i Kanade, osim severozapadne teritorije Kanade. Značaj ove biljne vrste nije samo u hortikulturi, već i u narodnoj medicini. U 16. veku baštovani su bili podsticani da uzgajaju *L. vulgaris* zbog lepote cveta i privlačenja oprašivača, ali ubrzo su upozoravali na „onog đavola žutog lana koji potiskuje druge vredne biljke“ (Mitich, 1993). U Severnu Ameriku uneli su ga doseljenici u 17. veku, a već krajem 19. veka počeo je da se širi nekontrolisano (Mack, 2003).

*Linaria vulgaris* je invazivna biljna vrsta, veoma prilagodljiva različitim okruženjima, generalista za stanište, pionirska vrsta u narušenim područjima, višegodišnja biljka sa visokim reproduktivnim potencijalom i genetičkom varijabilnošću. Ima negativan uticaj na lokalnu životnu sredinu i na agroekonomiju, a ishodi njenog uticaja su promena ekosistema i izmena staništa, formiranje monokulture, smanjenje izvornog biodiverziteta, kao i pretnja po native biljne vrste.

*Rhinusa pilosa* (Gyllenhal, 1838) (Coleoptera, Curculionidae) je univoltinski žižak (sa jednom generacijom godišnje) koji pripada tribusu Mecinini. To je monofagna vrsta koja polaže jaja isključivo na *L. vulgaris* (Gassmann i sar., 2014) (slika 2). U istraživanju 20 vrsta i podvrsta iz roda *Linaria* iz 290 populacija, uključujući tri grupacije u kojima se *L. genistifolia* i *L. vulgaris* pojavljuju simpatrično (postoje na istom geografskom području i često se zajedno susreću), *R. pilosa* je primećena isključivo na *L. vulgaris*.



**Slika 2.** Galikolni insekt *Rhinusa pilosa* Gyll. Foto: Ivo Toševski.

*Rhinusa pilosa* izlaze iz dijapauze u kasnu zimu ili rano proleće, između marta i maja, što se poklapa sa ranim prolećnim rastom biljaka (slika 3). Jedinke se potom hrane 3-5 dana prolećnim izdancima i listovima biljaka pre nego što počnu da kopuliraju. Ženke počinju sa

ovipozicijom desetak dana kasnije, što se obično odigrava u aprilu ili maju. Ženka progriza „kanal za ovipoziciju“ na stablu biljke-domaćina i polaže jaje u sunderasto tkivo (srž) apikalnog dela izdanka mlade biljke (Barnewall i sar., 2012). Na temperaturi od 22°C jaja će se izleći za osam dana, a ženke žiška obično položi 3-5 jaja u stablo lanilista. Tokom procesa ovipozicije ženka izlučuje bistru tečnost – cecidogen. Larve *R. pilosa* kompletiraju razviće kroz tri larvene faze, i hrane se biljnim tkivom unutar biljne gale.



**Slika 3.** Godišnji životni ciklus žiška *Rhinusa pilosa*: 1- *R. pilosa* polaže jaja u mlado stablo žutog lanilista na proleće; 2- gale počinju da se razvijaju nakon ovipozicije; 3- jaje *R. pilosa* u gale (zaokruženo); 4, 5, 6- larve *R. pilosa* 1., 2. i 3. stepena razvoja u gale; 7- adulti žiška *R. pilosa* spremni da izađu iz gale; 8- adulti *R. pilosa* prezimljuju u obližnjem zemljištu. Prilagođeno iz De Clerck-Floate, 2019.

Gale su globularne, okrugle ili duguljaste, i javljaju se između sredine i vrha mladog stabla (slika 4). Nastanak bilnog galoznog tkiva je podstaknut položenim jajima, a prve promene bilnog tkiva postaju vidljive oko 48 sati nakon što ženka položi jaja. Novorazvijene odrasle jedinke ostaju u gale, i hrane se oko 10-15 dana pre nego što progrickaju izlazne rupe kroz zid gale i izađu u spoljašnju sredinu. Smatra se da je ishrana adulta unutar gale od presudnog značaja za preživljavanje žižaka tokom zimske dijapauze. Ceo preadultni životni ciklus *R. pilose* od jajeta do adulta traje 55-65 dana, i u potpunosti se odvija u gale. Nakon što nove odrasle jedinke izađu iz gale, hrane se stablom biljaka-domaćina još desetak dana pre nego što potraže odgovarajuća mesta u tlu za opstanak do zime.



**Slika 4.** Ovipozicija ženke *Rhinusa pilosa* u apikalnoj meristemskoj zoni stabla mlade biljke *L. vulgaris*, i gala nastala ovipozicijama ovog žiška. Foto: Ivo Toševski i Ana Sedlarević Zorić.

## 1.1. Biotički stres kod biljaka

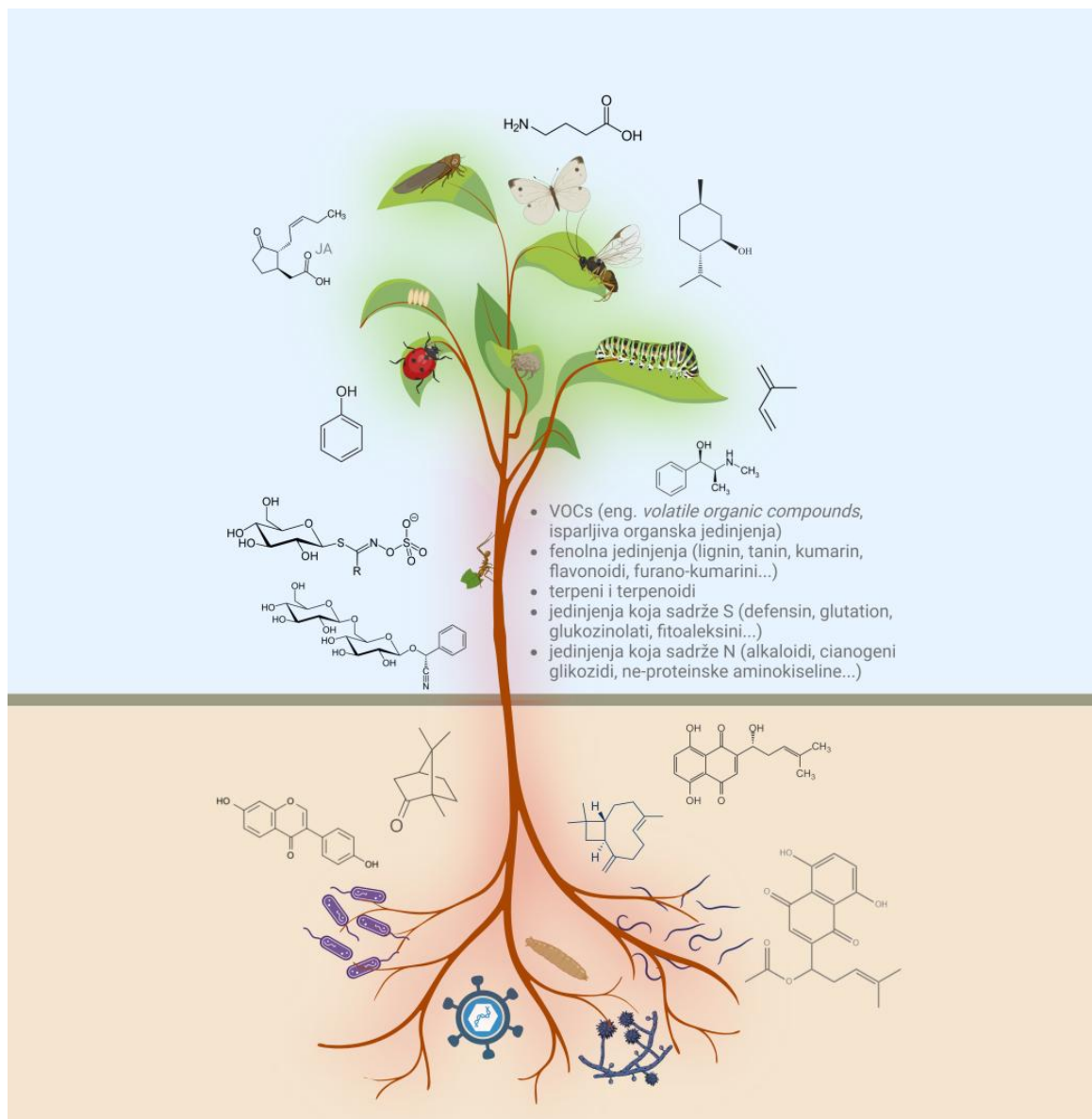
Stres kod biljaka se definiše kao narušavanje metaboličke homeostaze biljke usled negativnog delovanja spoljašnjih faktora ili organizama na biljku i zahteva prilagođavanje metaboličkih puteva novim uslovima sredine (Shulaev i sar., 2008). Biljke ne mogu izbeći nepovoljne uslove okoline, pa su razvile složene mehanizme adaptacije kako bi opstale u promenljivom okruženju. Razlikujemo dve vrste stresa: abiotički, izazvan faktorima životne sredine (suša, višak vode, salinitet, visoka temperatura, ultraljubičasto zračenje, niska temperatura, teški metali), i biotički stres, uzrokovan patogenim ili parazitskim organizmima, kao što su bakterije, gljive, artropode, virusi i ostali organizmi. Nepovoljni sredinski uslovi za rastenje, kao što su ekstremne temperature, nedostatak hranljivih materija, suša i kontaminacija zemljišta visokim koncentracijama soli i metala, smatraju se glavnim abiotičkim faktorima koji ne samo da mogu da ograniče rastenje i razviće biljaka, već određuju i njihovu geografsku rasprostranjenost (Krasensky i Jonak, 2012; Ghori i sar., 2019; Zhang i sar., 2023; El-Sappah i sar., 2024; Abbas i sar., 2021). Gljivični paraziti mogu izazvati vaskularno uvenuće biljaka domaćina i pege na listovima (Laluk i Mengiste, 2010); nematode se hrane delovima biljaka i prvenstveno izazivaju bolesti koje se prenose preko zemljišta, što dovodi do nedostatka hranljivih materija, usporavanja rasta i posledičnog uvenuća (Jones i sar., 2013); virusi su takođe sposobni za lokalna i sistemska oštećenja koja rezultiraju hlorozom i zaostajanjem u razvoju (Pallas i García, 2011); grinje i insekti interaguju sa biljnim tkivom tako što se hrane ili polažu jaja u biljna tkiva (Hilker i Meiners, 2002). Tokom miliona godina zajedničke evolucije sa drugim organizmima, biljke su se različitim mehanizmima prilagodile kako bi izbegle napade intrudera i smanjile efekat herbivorije na svoje preživljavanje.

Insekti predstavljaju jedan od najznačajnijih faktora biotičkog stresa za biljke; s obzirom na to da se skoro polovina od oko milion poznatih vrsta insekata hrani biljnim tkivima (Eggleton, 2020), direktno utiču na vitalnost biljaka i stabilnost ekosistema. Budući da biljke ne mogu izbeći napade herbivora koji oštećuju biljne organe, na taj način se direktno narušava metabolička homeostaza biljke i ugrožava njeno rastenje i razviće. Napad insekta na biljku nije samo mehaničko oštećenje tkiva, već predstavlja specifičan biohemijski dijalog u kojem biljke prepoznaju specifične hemijske signale (elicitore) iz oralnog sekreta ili ovipozicijske tečnosti insekata, razlikuju tip napada (npr. grickanje lista ili polaganje jaja), i aktiviraju složene signalne mreže koje pokreću efikasne odbrambene mehanizme (Jones i sar., 2022; Wang i sar., 2023; Prajapati i sar., 2024).

U širem smislu, insekti nisu samo spoljni faktori koji utiču na razviće biljaka, već integralni deo ekosistema, a njihova aktivnost oblikuje ekonomsku stabilnost, dostupnost hrane i održivost poljoprivrede (Jankielsohn, 2023; Barragán-Fonseca i sar., 2025; Ma i sar., 2025). Prema savremenim procenama, insekti i patogeni uzrokuju globalne gubitke poljoprivrednih prinosa kod pet ključnih useva (pšenica, pirinač, kukuruz, krompir i soja) u opsegu od 17% do čak 30% (Savary i sar., 2019). Takođe, globalno zagrevanje direktno povećava štetno dejstvo insekata na useve pšenice, pirinča i kukuruza (Deutsch i sar., 2018), sa procenom da će gubici prinosa rasti za 10-25% po svakom stepenu globalnog zagrevanja. S druge strane, usko specifične interakcije mogu imati značajnu primenu u suzbijanju invazivnih biljnih vrsta koji potiskuju autohtone vrste. Uvođenje pažljivo odabranih insekata, specifičnih za određenu invazivnu vrstu, predstavlja oblik ekološki održive, tzv. zelene tehnologije kontrole korova (biološka kontrola) (Harris, 1993). Na taj način biokontrola ne samo da smanjuje rasprostranjenost invazivnih vrsta, već istovremeno doprinosi očuvanju ekološke ravnoteže i stabilnosti ekosistema (McEvoy, 1996; Toševski i sar., 2018).

Na planeti postoji oko milion vrsta insekata, i skoro polovina njih se hrani biljkama. Interakcije između biljaka i insekta obuhvataju širok spektar ekoloških odnosa, od mutualizma do parazitizma (slika 5). Odbrambeni odgovor biljke počinje preciznim prepoznavanjem stresora, nakon čega se aktivira signalna kaskada koja prenosi informacije i dovodi do promene transkripcije i sinteze odbrambenih jedinjenja (Wu i Baldwin, 2010). Biljke, kada detektuju fizičke i hemijske signale usled kontakta sa biljojedima (poput elicitora u oralnom sekretu insekata ili jedinjenja u ovipozicijskoj tečnosti), značajno preoblikuju svoj metabolizam kako bi pokrenule efikasne odbrambene mehanizme (Hilker i Fatouros, 2015). Efikasna otpornost biljaka nameće pritisak selekcije na biljojede, koji zauzvrat razvijaju načine da ometaju odbrambene mehanizme ili se prilagode štetnom uticaju biljnih metabolita. Uzajamni odnosi, ostvareni kroz procese kao što su oprašivanje i herbivorija, igraju važnu ulogu u reproduktivnom uspehu biljnih vrsta (Motta i sar., 2022). Bilo da su zasnovani na međusobnoj koristi ili antagonizmu, ovakve interakcije predstavljaju važne pokretače opstanka biljnih populacija, doprinoseći raznovrsnosti njihovih adaptivnih strategija (Stahl i sar., 2018). Posebno značajan model za razumevanje fundamentalnih odbrambenih mehanizama biljaka u uslovima biotičkog stresa jesu specijalizovane interakcije između galikolnih insekata i njihovih biljaka-domaćina. U zavisnosti od tipa interakcije sa herbivorima, biljke razvijaju različite odbrambene strategije koje obuhvataju konstitutivne mehanizme (fizičke barijere i toksična jedinjenja), ali se često dopunjuju indukovanim odgovorima. Direktna odbrana uključuju povećanu akumulaciju toksičnih sekundarnih metabolita (alkaloidi, fenoli, terpenoidi) i sintezu inhibitora proteinaza koji blokiraju probavne enzime u crevima insekata, dok se indirektna odbrana manifestuju kroz emisiju isparljivih organskih jedinjenja (*volatile organic compounds*, VOCs) koja privlače prirodne neprijatelje herbivora (Mithöfer i Boland, 2012; War i sar., 2012) (slika 5).

Biljke i insekti biljojedi zajedno su evoluirali milionima godina, i smatra se da su ove interakcije stvorile veliku raznovrsnost biljnih i zglavkarskih vrsta koje naseljavaju našu planetu. Koevolucija biljaka i biljojeda je primer biotičkog stresa koji vodi ka stabilnoj i dugoročnoj koegzistenciji. Ovi procesi nisu međusobno isključujući, već naprotiv, biotički stres koji izazivaju herbivori narušava metaboličku homeostazu biljke i time stvara snažan selekциони pritisak neophodan za pokretanje koevolutivnih promena (Gatehouse, 2002).



**Slika 5.** Različiti tipovi interakcija biljaka sa gljivama, virusima, bakterijama, nematodama, grinjama i insektima) u ekosistemu (predatorstvo, mutualizam, komensalizam, amensalizam, parazitizam). Ovi odnosi uključuju i sintezu brojnih sekundarnih metabolita. Slika napravljena preko BioRender.com.

### 1.1.1. Herbivorija

Biljka ne odgovara isključivo na fizičko oštećenje i narušavanje strukture tkiva, već poseduje sposobnost da razlikuje mehaničko oštećenje od napada herbivora (Wu i Baldwin, 2009, 2010; Hilker i Meiners, 2010). Ovaj proces percepcije odvija se kroz nekoliko faza, gde i pre samog napada herbivora biljka može osetiti dodir insekta ili „otiske stopala”, što može

izazvati rane fiziološke promene poput akumulacije gama-aminobuterne kiseline (Bown i sar., 2006). Mnoge biljke detektuju specifične hemijske signale (elicitore) u tečnosti kojom insekti pričvršćuju jaja za list (npr. bruhini), što služi kao upozorenje na predstojeći napad gusenica koje će se izleći (Doss i sar., 2000). Ključni trenutak je prepoznavanje molekularnih obrazaca povezanih sa herbivorima (eng. *herbivory-associated molecular patterns*, HAMPs) (Felton i Tumlinson, 2008; Mithöfer i Boland, 2008; Basu i sar., 2018). Ovi elicitori se nalaze u oralnom sekretu insekata, koji predstavlja složenu smešu izlučevina pljuvačnih žlezda i sadržaja iz digestivnog trakta. Ova jedinjenja imaju ključnu ulogu u interakciji biljka-insekt jer sadrže molekule koji utiču na otpornost biljke. Prepoznavanje HAMP-ova, kao što su volicitin ili inceptini, aktivira odbrambene odgovore u vidu povećanja nivoa kalcijuma, proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika (ROS-a) i lučenja odbrambenih hormona u biljci (Prajapati i sar., 2024).

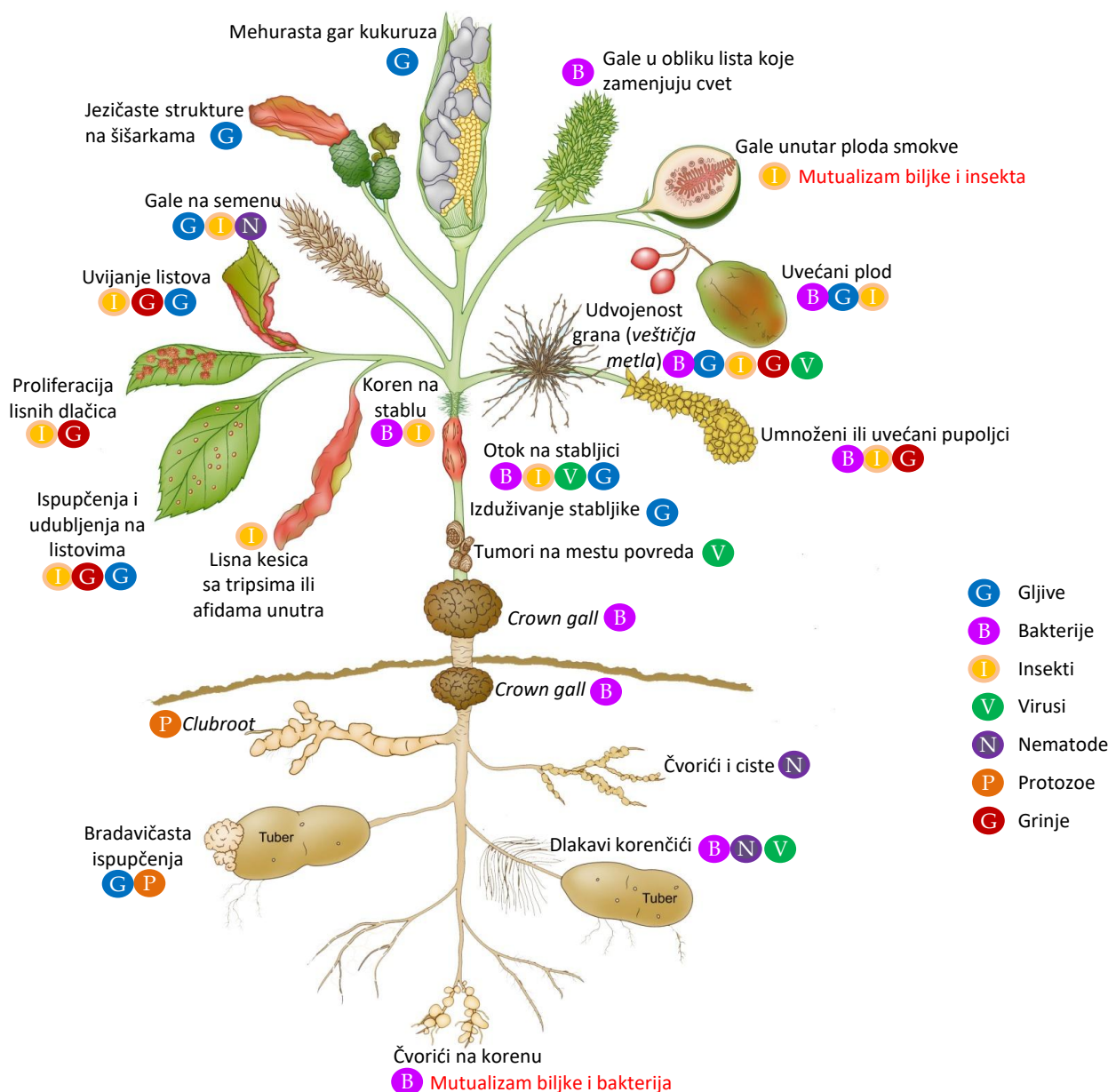
Nakon percepcije elicitora, u biljnim ćelijama se pokreće kaskada brzih signala. Depolarizacija ćelijske membrane i povećanje intracelularne koncentracije kalcijuma su najraniji odgovori koji se javljaju u roku od nekoliko minuta na mestu oštećenja (Maffei i sar., 2004; Vincent i sar., 2017). Aktivacija MAP kinaza (eng. *Mitogen-Activated Protein kinase*), kao što su SIPK (*salicylic acid-induced protein kinase*) i WIPK (*wound-induced protein kinase*), prenose signal dalje u unutrašnjost ćelije, regulišući ekspresiju odbrambenih gena i dovodeći do brze sinteze jasmonske kiseline (JA), salicilne kiseline (SA) i etilena (Pedley i Martin, 2005; Wu i sar., 2007). Prema dostupnim literaturnim podacima, proces herbivorije može dovesti do poremećaja redoks homeostaze u biljnim tkivima. Pokazano je da dolazi do akumulacije vodonik peroksida, molekula sa dvostrukom funkcijom: on deluje kao direktni toksin, ali istovremeno i kao sekundarni glasnik u koordinaciji odbrambenih odgovora biljke (Orozco-Cárdenas i sar., 2001). Ipak, sveobuhvatne analize koje sistematski razmatraju indukciju promena u antioksidativnom metabolizmu u modelu insekt-biljka, posebno u kontekstu herbivorije, i dalje su retke u literaturi.

### 1.1.2. Formiranje, razviće i adaptivni značaj gala

Gale su jedinstvene, karakteristične biljne strukture formirane abnormalnim razvojem biljnih organa koji nastaje uvećanjem ćelija (hipertrofija) i/ili njihovim ubrzanim deobama (hiperplazija). Zbog načina na koji nastaju, gale se definišu i kao prošireni fenotip biljke-domaćina, jer biljka pod spoljnim uticajem gradi strukture koje u normalnim uslovima ne bi razvila (Pan i sar., 2015). Ove tvorevine, koje nastaju ektopičnom proliferacijom i ekspanzijom ćelija, mogu indukovati različiti parazitski ili patogeni organizmi, uključujući viruse, mikoplazme, bakterije, gljive, nematode, grinje i insekte (Shorthouse i Rohfritsch, 1992; Dreger-Jauffret, 1992; Stone i Schönrogge, 2003; Mani, 2013; de Oliveira i dos Santos Isaias, 2025) (slika 6).

Iako različiti organizmi mogu izazvati formiranje gala, insekti se izdvajaju kao primarni i najznačajniji inicijatori razvića ovih struktura. Procenjeni broj insekata koji indukuju formiranje gala (galikolnih insekata) je od 21,000 do 211,000 vrsta (Price i sar., 1987; Espírito-Santo i Fernandes, 2007). Oni poseduju sposobnost da putem specifičnih hemijskih i mehaničkih signala reprogramiraju razvojne puteve biljke-domaćina (Stone i Schönrogge, 2003; Espírito-Santo i Fernandes, 2007; Raman, 2011; Mani, 2013). Iako se skoro 50% poznatih vrsta insekata hrani biljkama, samo mali broj njih indukuje ove visoko specijalizovane strukture (Eggleton, 2020). U poređenju sa svojim srodnicima koji ne izazivaju gale, oni često pokazuju sofisticiranu biologiju i fiziologiju, što ih čini efikasnijim korisnicima biljaka-domaćina (Raman, 2011).

Gale se mogu formirati na listovima, stablima, pupoljcima, plodovima ili korenu, a morfofenetske promene su izrazito *species*-specifične, što znači da su rezultat interakcije tačno određene vrste induktora sa određenom vrstom biljke-domaćina (Raman, 2011; Harris i Pitzschke, 2020) (slika 6). Zašto su galikolni insekti vezani za određenu biljnu vrstu ostaje i dalje nepoznato, iako se pretpostavlja da indukcija ovog procesa zahteva specifične molekularne signale koji se mogu pokrenuti jedino određenom vrstom insekata na određenoj biljnoj vrsti (Raman, 2021).



**Slika 6.** Na različitim delovima biljke nastaju različiti tipovi gala, nastale delovanjem različitih induktora. Prilagođeno iz Harris i Pitzschke, 2020.

Mnoge gale imaju jedinstvene oblike, i pružaju sklonište i hranljive materije organizmima-induktorima (slika 7). Uprkos visokoj specifičnosti odnosa induktora i biljke domaćina, gotovo 15.000 vaskularnih biljnih vrsta širom sveta, od četinara do cvetnica, su domaćini galikolnih insekata (Espírito-Santo i Fernandes, 2007). Ovi organizmi su obično specifični za određene organe i tkiva domaćina (Shorthouse i sar., 2005; Miller i Raman, 2019),

i koriste sposobnost biljke da odgovorom na uljeza čak i diferencirana tkiva prevede u stadijum meristema. Sposobnost indukcije gala prisutna je kod određenih porodica artropoda unutar nekoliko klasa: Acari (eriofoidne grinje), Thysanoptera (tripsi), Hemiptera (stenice i lisne vaši), Diptera (dvokrilci), Lepidoptera (leptiri i moljci), Coleoptera (tvrdokrilci) i Hymenoptera (opnokrilci). Među njima, predstavnici određenih porodica unutar redova Hemiptera, Diptera, Lepidoptera i Coleoptera (Curculionidae) indukuju gale procesom hranjenja svojih larvi (Toševski, 2015), dok je kod Himenoptera inicijacija gala povezana sa ovipozicijom, tako što ženka koja polaže jaja ubacuje svoj ovipozitor u biljno tkivo i ispušta bistru tečnost (*cecidogen*) zajedno sa jajima (Bronner, 1985; Shorthouse i Floate, 2010). Ove specijalizovane interakcije predstavljaju jedinstven primer koevolucije, gde insekti oblikuju morfologiju biljke, a biljka istovremeno obezbeđuje resurse i zaštitu za induktora gala. Gale nisu samo patološka promena, već visokospecijalizovane strukture koje organizmu-induktoru pružaju sigurno sklonište i bogat izvor hranljivih materija. Sposobnost insekata da diferencirana biljna tkiva vrata u stadijum meristema (stanje ubrzanog rasta nediferenciranih ćelija) čini ih jednim od najefikasnijih korisnika resursa biljke-domaćina (Raman i sar., 2005).

Gale izazvane insektima privukle su pažnju mnogih istraživača zbog svojih jedinstvenih oblika i širokog spektra varijacija oblika, boja i veličina (slika 7). Iako gale često podsećaju na plodove ili cvetne pupoljke, njihova morfologija se značajno razlikuje od morfologije ovih biljnih organa. Stoga se čini da insekti koji izazivaju formiranje gala preuzimaju sistem razvoja biljaka kako bi stvorili novu strukturu u biljkama, proizvodeći stimulse koji pokreću i razvoj i održavanje galoznog tkiva. Zanimljivo je da se fitohormoni, kao što su indol sirćetna kiselina i citokinini, detektuju u većim koncentracijama kod galikolnih insekata nego u galama stvorenim na biljkama domaćinima (Tooker i De Moraes, 2011; Yamaguchi i sar., 2012; Tanaka i sar., 2013; Andreas i sar., 2020; Ponce i sar., 2021;). Takođe, podaci sugerišu da su određene aminokiseline, proteini i njihovi derivati, poput peptida i proteinskih efektor, mogući signali za indukciju galoznog tkiva (Stone i Schönrogge, 2003; Hogenhout i Bos, 2011; Zhao i sar., 2015; Korgaonkar i sar., 2021). Ovi rezultati sugerišu da supstance koje se prenose na biljke preko ovipozitora, ili izlučene iz pljuvačke larve i/ili izlučevina larvi, indukuju reprogramiranje razvića biljnih ćelija (Stone i Schönrogge, 2003; Barnewall i sar., 2012; Giron i sar., 2016).



Slika 7. Gale nalik cvetu (A) i plodu (B). Prilagođeno iz Schultz i sar., 2019.

Evolucioni put biljnih gala i njihova kompleksna ekološka istorija najjasnije se ogledaju u bogatim fosilnim zapisima koji svedoče o istoriji interakcije između biljaka i artropoda. Ovi zapisi nam govore o izuzetnoj starosti ove interakcije- najstarija poznata gala je pronađena na fosilnim ostacima jetrenjača (grupa briofita) iz perioda srednjeg devona od pre 385 miliona godina (Labandeira, 2021). Iako su ove strukture prisutne stotinama miliona godina, tek tokom perioda krede su postale uobičajena pojava, u vreme diverzifikacije biljaka cvetnica i insekata biljojeda (Redfern, 2011). Darwin je bio zaintrigiran galama uzrokovanim insektima i njihovoj velikoj sličnosti sa cvetovima i plodovima (Darwin, 1868). Takođe je primetio i sličnost između određenih gala i plodova u broju, složenosti i rasporedu unutrašnjih slojeva tkiva. On je napisao: „Svuda oko nas možemo da vidimo bezbrojna prilagođavanja i strategije za preživljavanje, koje opravdano izazivaju veliko divljenje svakog posmatrača. Postoji, na primer, muva (*Cecidomyia*) koja polaže svoja jaja u prašnike biljki iz roda *zevalica* (*Scrophularia*), i luči otrov koji proizvodi gale, kojom se larva hrani. Postoji još jedan insekt (*Misocampus*) koji polaže svoja jaja u telo larve unutar gale, i tako se hrani svojim živim plenom; tako da ovde himenopterusni insekt zavisi od insekta dvokrilca, a sve ovo zavisi od njegove moći da proizvede abnormalni rast biljnog tkiva u određenom organu određene biljke” (Darwin, 1868).

Smatra se da je sposobnost formiranja gala na biljkama evoluirala nezavisno i više puta unutar klase Insecta, što dodatno potvrđuje visoku adaptivnu vrednost ovog načina života (Cook i Gullan, 2004). Koegzistencija biljaka i insekata tokom višemilionske evolutivne hronologije dovela je do razvoja sofisticiranog specijalizovanog metabolizma, koji je biljkama omogućio da odgovore na ekološke izazove i pretnje herbivora.

Gale predstavljaju raznolike abnormalne izrasline na biljkama, čija se morfologija i unutrašnja organizacija bitno razlikuju u zavisnosti od toga da li ih indukuju mikroorganizmi ili insekti. Postoji suštinska razlika u složenosti gala zavisno od induktora, gde u slučaju mikrobnih gala (primer *Agrobacterium tumefaciens*) nastaju tumorska tkiva usled nekontrolisanih deoba ćelija bez jasnog šablona, dok su gale insekata složene i uređene strukture.

*Agrobacterium tumefaciens* je fitopatogena zemljišna bakterija koja izaziva formiranje gala poznatih kao tumori (*crown gall*) na velikom broju biljnih vrsta (Gelvin, 2003) (slika 8).



**Slika 8.** Tumorske izrasline (*crown gall*) na različitim biljnim vrstama (vinova loza, ruža, četinari) nastale interakcijom bakterije *A. tumefaciens* i biljke. Izvor slika: Wikipedia.

*A. tumefaciens* uzrokuje bolest krunskih gala (engl. *crown gall disease*), koja se manifestuje formiranjem tumora na mestu infekcije biljke. Gale nastaju kada bakterija prenese specifični T-DNK segment sa Ti (*tumor-inducing*) plazmida u nuklearni biljni genom (Larebeke, 1974). Integracija T-DNK dovodi do ekspresije gena za biosintezu auksina i citokinina, čime se stvara hormonska neravnoteža koja u biljci dovodi do nekontrolisane deobe ćelija, što rezultira stvaranjem gala (Gohlke i Deeken, 2014; Mashiguchi i sar., 2019). Pored toga, pojedini geni iz T-DNK regiona kodiraju sintezu opina, jedinjenja koja bakterija koristi kao izvor ugljenika i azota, stvarajući tako sebi specifičnu ekološku nišu (Escobar i Dandekar, 2003). Njena jedinstvena sposobnost da transformiše ćelije domaćina čini je jednim od najfascinantnijih organizama u biologiji biljaka (Păcurar i sar., 2011). Ona predstavlja prvi i najpoznatiji primer horizontalnog transfera gena između različitih domena živog sveta- bakterija i eukariota. Ovaj mehanizam je iskorišćen tako što su tumorski geni *A. tumefaciens* zamenjeni genima od interesa, čime je *Agrobacterium* postao glavno sredstvo za stvaranje transgenih biljaka (Gohlke i Deeken, 2014). Danas je transformacija pomoću bakterija roda *Agrobacterium* standardna metoda u biotehnologiji biljaka, jer omogućava stabilnu integraciju stranog DNK u hromosome biljaka i time postaje osnova genske manipulacije i oplemenjivanja useva (Păcurar i sar., 2011; Aliu i sar., 2024).

Među galama koje indukuju različiti organizmi, gale insekata se izdvajaju kao izuzetno složeno organizovane strukture u kojima se diferencira više specijalizovanih tipova tkiva (Stone i Schönrogge, 2003; Giron i sar., 2016). Gale insekata su atipične biljne izrasline koje nisu posledica neorganizovane proliferacije ćelija bez obrasca, kao što je primećeno kod mikrobnih gala. Naprotiv, svaka vrsta insekata oblikuje karakterističnu galu, čak i u slučaju kada srodne vrste insekata napadaju istu biljku, što sugeriše da svaka vrsta insekata daje jedinstvena uputstva za reprogramiranje razvojnih puteva biljke (Cook i Gullan, 2008; Hearn i sar., 2019; Martinson i sar., 2022). Gale insekata kreću se po složenosti od relativno jednostavnih gala minera lista (Guiguet i sar., 2018), preko gala uvijenog lista, do složenih struktura u kojima su galikolni insekti u potpunosti zatvoreni biljnim tkivom (Dreger-Jauffret i Shorthouse, 1992; Guiguet i sar., 2019). Najsloženije strukture biljnih gala indukuju galikolne ose, mušice i lisne vaši, gde gale imaju vancvetne nektarije (služe kao „sekundarni mamci“ za predatore i parazitoide, privlačeći ih da štite galu od herbivora) i sloj dlaka, bodlji i lepljive smole (stvaraju fizičku i hemijsku barijeru) (Price i sar., 1987; Stone i Schönrogge, 2003; Wool, 2004) (Slika 7). Takve gale nisu samo pasivne strukture, već funkcionišu kao mali ekosistemi u kojima se prepliću interesi biljke, insekta-induktora i drugih organizama. Kompleksne gale insekata sastoje se od različitih tipova tkiva (tkiva koja služe za ishranu i tkiva za zaštitu) (Stone i Schönrogge, 2003; Heil, 2016).

Na osnovu morfoloških karakteristika i tipova ćelija koje čine galu, razvijene su tri glavne hipoteze o adaptivnom značaju ovih struktura za galikolne insekate: hipoteza o nutrijentima (hranljivim materijama), hipoteza o mikrookruženju i hipoteza o neprijatelju (Price i sar., 1987; Stone i Schönrogge, 2003). Hipoteza o hranljivim materijama objašnjava da gale služe kao izvor hranljivih materija za insekte tokom njihovog razvića, gde galikolni insekti manipulišu biljnim tkivom tako da ono akumulira aminokiseline i fotoasimilate, pretvarajući galu u organe potrošaće metabolita (uvir tkiva), obezbeđujući hranljive materije sve dok se juvenilni stadijumi insekata razvijaju u gali. U slučaju gala na listovima izazvanih lisnim vašima, utvrđeno je da akumuliraju mnogo veće količine aminokiselina u odnosu na intaktne listove, što sugeriše da gale obezbeđuju izvor azota za insekte koji indukuju galu (Koyama i sar., 2004; Suzuki i sar., 2009). Fotoasimilati se akumuliraju u nekim galama izazvanim lisnim vašima, što sugeriše da mogu delovati kao organi potrošači (Larson i Whitham, 1991; 1997). Moljci *Caloptilia cecidophora* i *Borboryctis euryae* ne mogu da završe svoj larveni period bez hranjenja galoznim tkivom, što ukazuje da su ovi galikolni insekti izgubili sposobnost preživljavanja bez specifičnih

nutrijenata iz galoznog tkiva (Kawahara i sar., 2017; Li i sar., 2021). Hipoteza o neprijatelju sugeriše da su gale biljne tvorevine koje služe za fizičku zaštitu insekta od predatora i patogena. Mnoge gale su zatvorene strukture sa lignifikovanim ćelijskim zidom koji služi kao barijera od napada nespecijalizovanih neprijatelja (Price i Pschorn-Walcher 1988; Hawkins, 1997). Hipoteza o mikrokruženju pretpostavlja da galozno tkivo štiti insekte od abiotičkog stresa, kao što su ekstremne temperature i nepovoljna vlažnost vazduha, obezbeđujući stabilnije uslove za razvoj unutar same strukture (Cornell, 1983; Blanche, 2000).

Kada insekti napadaju biljke, oni imaju pristup unutrašnjim tkivima biljke stvarajući fizičke otvore koji podsećaju na mehaničko povređivanje. Istraživanjima je pokazano da mehaničko ranjavanje i infestacija insekata izazivaju različite reakcije biljke zbog ključne uloge oralnog i ovipozicionog sekreta insekata u procesu infestacije biljke-domaćina (Reymond i sar., 2004; Devoto i Turner, 2005; Qi i sar., 2016; Howe i Jander, 2008). Kako bi se formirale jedinstvene strukture gala, veruje se da insekti-induktori gala luče određene efektorske molekule i menjaju razvojne programe biljke-domaćina, a precizni molekularni mehanizmi indukcije i razvoja gala još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni (Schultz i sar., 2019; Takeda i sar., 2021; Desnitskiy i sar., 2023). Prvi korak često podrazumeva mehaničko ranjavanje i ubrizgavanje salivarnih sekreta (cecidogena) koji izazivaju *hemijski šok* u biljnim ćelijama (Raman, 2011). Ovaj šok dovodi do osmotskih promena i metaplazije, tj. transformacije pojedinih ćelija u hranljiva tkiva. Ključni citološki procesi uključuju hipertrofiju i hiperplaziju, dok ROS deluju kao prvi signalni molekuli za reprogramiranje razvojnih puteva biljke (Oliveira, 2016). Kada je intenzitet šoka nizak, dolazi do formiranja gale; kada je visok, ćelije odumiru i biljka odbacuje induktora. Tokom hranjenja, osmotski stres traje sinhrono sa životnim ciklusom insekta, utičući na transport protona, aktivnost auksina i razgradnju ćelijskog zida, čiji fragmenti dalje deluju kao elicitori.

Gale predstavljaju fascinantno primer reprogramiranja biljnog genoma, gde strani organizmi utiču na to da biljka formira potpuno nove, specijalizovane organe koji služe induktoru (insektu) za ishranu i zaštitu (Harris i Pitzschke, 2020). Proces počinje prepoznavanjem reaktivnih biljnih tkiva od strane induktora gale, nakon čega polaganje jaja ili hranjenje pokreće kaskadu molekularnih događaja (Oliveira i sar., 2016). Istraživanja na modelu hesenske muve (*Mayetiola destructor*) otkrila su stotine kandidata za efektore, molekule kojima insekti direktno manipulišu biljkom (Chen i sar., 2008; Zhao i sar., 2015b; Giron i sar., 2016). Identifikovani su brojni efektorni proteini, uključujući: SSGP-71 proteine, koji oponašaju biljne F-box-LRR proteine i manipulišu proteazomom domaćina (Zhao i sar., 2015); glukozo-oksidazu (GOX) i apirazu, enzime koji potiskuju odbrambene odgovore biljke razgradnjom signalnih molekula poput ATP-a i modulacijom SA/JA/ET signalizacije (Guiguet i sar., 2016); proteine koji vežu kalcijum, koji ometaju ranu signalizaciju kalcijumom aktiviranu herbivorijom (Giron i sar., 2016); lipazi slične proteine, ključne za uspostavljanje mesta hranjenja i citološke promene pri herbivoriji (Shukle i sar., 2009).

Proces razvoja gale se može podeliti na sledeće faze (Giron i sar., 2016): (1) lučenje signalnih molekula od strane insekta-induktora u mehanički oštećeno biljno tkivo, pri ishrani i ovipoziciji; (2) percepcija signala od strane biljke-domaćina; (3) regeneracija i diferencijacija biljnih ćelija, i (4) organizacija galoznog tkiva. Tokom ovih procesa, insekti treba da potisnu odbrambene reakcije biljke-domaćina. Pretpostavlja se da galikolni insekti imaju sposobnost da luče određene efektore (uključujući biljne hormone) u biljna tkiva koristeći svoje usne organe ili ovipozitore, kako bi izazvali stvaranje gala u biljci-domaćinu (Matsukura i sar., 2009; Yamaguchi i sar., 2012; Giron i sar., 2016; Ponce i sar., 2021). Kako bi indukovali složene strukture gala, galikolni insekti poseduju mehanizme kojima kontrolišu ćelijsku mašineriju svojih domaćina u svoju korist. Genetskim NGS analizama (eng. *Next Generation Sequencing*) omogućeno je da se identifikuju i opišu molekularni mehanizmi i genetski putevi u različitim

biljkama, uključujući galikolne insekte i njihove biljke-domaćine. Komparativna analiza transkriptoma četiri različite vrste lisnih gala izazvanih insektima na četiri biljne vrste (Takeda i sar., 2019) pokazala je da je u gali: (i) smanjena ekspresija fotosintetskih gena, što podržava hipotezu da se gale pretvaraju u tkiva potrošače fotoasimilata (uvir tkiva), a ne u tkiva proizvođače (izvor tkiva); (ii) povećana ekspresija gena uključenih u razviće, ćelijski ciklus i metabolizam fitohormona; i (iii) da je povećana ekspresija oko 40 gena među kojima se izdvajaju ključni regulatori nastanka matičnih ćelija (*CLE44*, *BAM3*, *WOXs*) (Jun i sar., 2008; Yamaguchi i sar., 2016) i razvoja cvetnih organa (*SEPALLATA*, *AGAMOUS*, *APETALA1*) (Ó'Maoiléidigh i sar., 2014).

Hormoni takođe imaju važnu ulogu u morfogenezi gala. Insekti ih mogu sintetisati *de novo* ili modifikovati njihovu ravnotežu u biljci (Tooker i Helms, 2014). Pokazano je da auksini indukuju hipertrofiju na mestu inicijacije gale i formiranje nutritivnog tkiva (Zhu i sar., 2011), a u slučaju citokinina da njihove visoke koncentracije stimulišu deobu ćelija i održavaju galu kao snažanog potrošača hranljivih materija (uvir) za hranljive materije, odlažući tako starenje tkiva (Giron i sar., 2013).

Među ostalim molekularnim faktorima indukcije gale, pokazano je da se i fenolna jedinjenja akumuliraju kako bi se neutralisale različite ROS forme, i da utiču na aktivnost auksina a tako i na rastenje ćelija (Isaias i sar., 2015; Bedetti i sar., 2014; Ferreira i sar., 2018). Takođe, mikroRNK su ključni transkripcioni regulatori ekspresije i reprogramiranja gena pri galogenezi; na primer, miR159 i miR390/TAS3 su neophodni za formiranje gala na korenu *Arabidopsis thaliana* delovanjem nematode *Meloidogyne incognita* (Medina i sar., 2017). Pored toga, insektni mikroorganizmi poput simbiotičke bakterije roda *Wolbachia* sp. mogu pomoći insektima u manipulaciji biljnim metabolizmom putem citokinina (Kaiser i sar., 2010; Bansal i sar., 2014).

Osim na morfološke promene biljnog tkiva, razvoj biljnih gala utiče na fiziološku dinamiku distribucije hranljivih materija unutar biljke između gale i susednih tkiva, gde gale postaju prioritetna mesta za akumulaciju resursa na račun ostatka biljnog organizma (Castro i sar., 2012). Manipulacija biljnim tkivima od strane galikolnih insekata menja ćelijski metabolizam ugljenih hidrata, podstičući galozno tkivo da deluje kao tkivo-potrošač asimilata kako bi se ispunili energetske zahteve herbivora i larvi unutar gale (Wingler i Roitsch, 2008). Ovaj efekat dovodi do akumulacije rastvorljivih jedinjenja kao što su ugljeni hidrati i azot u galoznom tkivu, poboljšavajući tako nutritivni kvalitet mikrookruženja gale (Hartley, 1998).

## 1.2. Oksidativni stres i antioksidativni sistem u odgovoru na herbivoriju i galogenezu

Herbivorija, a naročito specifičan proces nastanka gala, izaziva značajne poremećaje u redoks homeostazi biljke, što pokreće složenu mrežu odbrambenih i signalnih mehanizama (Isaias i sar., 2015; Zebelo i Maffei, 2015; Mishra i sar., 2024). Dok herbivori uzrokuju mehanička oštećenja i uvode elicitore, galikolni organizmi preoblikuju metabolizam biljke-domaćina, pretvarajući tkiva u mesta intenzivnog oksidativnog stresa praćenog akumulacijom ROS-a (Kerchev i sar., 2012; Isaias i sar., 2015).

Reaktivne vrste kiseonika (ROS) se sintetišu u biljnim ćelijama kroz različite reakcije kao deo metabolizma ćelije, mada se stopa njihove proizvodnje povećava u uslovima stresa (Mittler, 2002; Asada, 2006; Navrot i sar., 2007; Suzuki i sar., 2011). Slobodni radikal je svaka hemijska vrsta (atom, jon ili molekul) sposobna za nezavisno postojanje (zato i termin slobodni) koja sadrži jedan ili više nesparenih elektrona u poslednjem sloju (Halliwell, 2007). Prisustvo

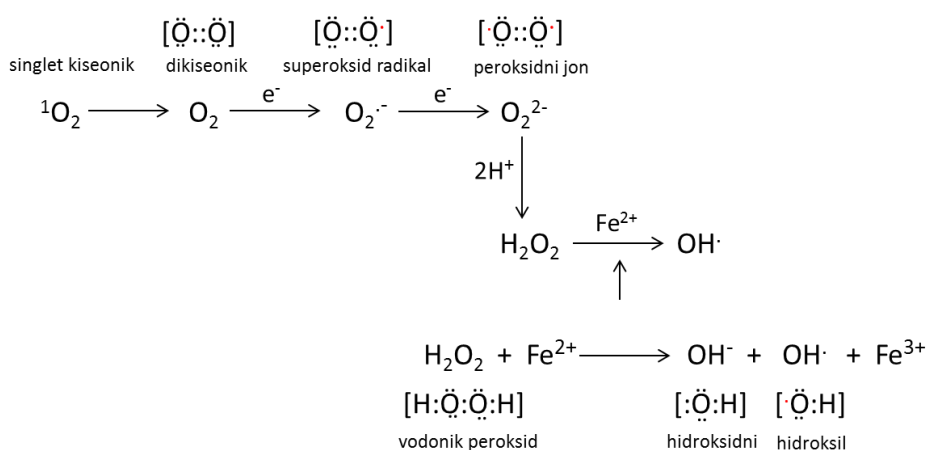
nesparenog elektrona čini radikale veoma reaktivnim i kratkoživećim. Kako bi se sprečila interakcija između molekula radikala i bioloških molekula, antioksidanti treba da budu u neposrednoj blizini mesta formiranja radikalskih vrsta, u konkurenciji sa slobodnim radikalima za biološki supstrat (Arora i sar., 2002). Ako antioksidant nije prisutan u dovoljnoj količini da neutrališe ROS, dolazi do oksidacije biomolekula, poput peroksidacije lipida, oštećenja proteina (karbonilacije), oksidacije pojedinačnih nukleotida nukleinskih kiselina, inhibicije enzima i aktivacije apoptoze (Gill i Tuteja, 2010.). Antioksidant je stoga svaka supstanca koja, kada je prisutna u niskim koncentracijama u poređenju sa koncentracijama potencijalnog supstrata koji bi se oksidovao, odlaže ili inhibira oksidaciju tog supstrata. Mehanizmi antioksidativnog delovanja mogu uključivati: uklanjanje O<sub>2</sub>; uklanjanje reaktivnih vrsta kiseonika/azota (ROS/RNS) ili inhibiranje formiranja ROS/RNS; vezivanje metalnih jona potrebnih za katalizu stvaranja ROS-a; povećanje endogene regulacije antioksidativne odbrane (Halliwell, 1996). Antioksidanti mogu direktno uklanjati (eng. *scavenge*) ROS, doniranjem ili prihvatanjem elektrona (u slučaju flavonoida, tokoferola ili askorbata) kako bi se eliminisalo nesporeno stanje elektrona kod radikala (Cao i sar., 1997; Rice-Evans i sar., 1997; Pietta, 2000). Takođe, jedan od načina eliminacije ROS-a je gašenje (eng. *quenching*), gde se na određena jedinjenja (npr. karotenoide ili tokoferole) prebacuje energija sa pobuđenih molekula-radikala, a višak energije se oslobađa u obliku toplote, i pobuđeni molekul se vraća u osnovno, stabilno stanje (Halliwell, 2007; Ramel i sar., 2012). Antioksidanti mogu da deluju i indirektno, tako što vežu jone metala za sebe i tako spreče nastanak ROS-a (u npr. Fentonovoj ili Haber-Weiss-ovoj reakciji) (Agati i Tattini, 2010). ROS nisu samo toksični nusproizvodi. Pri niskim (bazalnim) koncentracijama, oni služe kao sekundarni glasnici (signalni molekuli) koji regulišu rastenje, razviće, zatvaranje stoma i odgovor na stres (Foyer i Noctor, 2005a; Mittler i sar., 2011; Mittler, 2017).

U biljkama, ROS se proizvode u različitim ćelijskim odeljcima, i predstavlja oksidacione vrste (naročito hidroksilne radikale i singletni kiseonik) koje mogu izazvati ozbiljna oštećenja u biološkim sistemima, tzv. oksidativni stres. Ovaj termin su prvobitno uveli Sies i Cadenas (1985). Oksidativni stres podrazumeva narušavanje redoks ravnoteže kao posledicu povećanog nivoa ROS-a unutar same ćelije; međutim, najnovija verzija definicije može biti „neravnoteža između oksidantata i antioksidantata u korist oksidantata, što dovodi do poremećaja redoks signalizacije i kontrole i/ili molekularnog oštećenja“ (Sies, 2020). Zadnjih decenija u istraživanjima oksidativni stres se klasifikuje u podforme: oksidativni stres prisutan u fiziološkim uslovima (*eustres*) i oksidativni stres koji ispoljava štetne efekte na makromolekule (*distres*) (Lushchak, 2014).

Koncept „oksidativnog stresa“ (eng. *oxidative stress*) je redefinisano u „oksidativno signaliziranje“ (eng. *oxidative signalling*) (Foyer i Noctor, 2005b), čime se naglašava da produkcija ROS-a nije isključivo štetan proces, već važna komponenta regulatorne signalne mreže koju biljke koriste za svoje razviće i za odgovor na izazove životne sredine. ROS igra važnu ulogu u regulisanju širokog spektra bioloških procesa uključujući ćelijsku proliferaciju, morfogenezu, odgovor na biotički i abiotički stres, kao i strogo kontrolisanu programiranu ćelijsku smrt (Del Río, 2015). Na primer, kao odgovor na napad herbivora ili patogenu infekciju, biljka proizvodi oksidativni prasak - brzu i intenzivnu produkciju ROS-a (Torres i sar., 2006), prvenstveno u apoplastu. Stabilnije vrste ROS-a, kao što je vodonik peroksid, mogu čak da difunduju kroz ćelijske membrane, čime prenose signalne informacije u druge ćelijske odeljke i omogućavaju koordinisan odgovor biljke na nivou čitavog organizma (Foyer i Noctor, 2005b; Mittler i sar., 2011; Waszczak i sar., 2015). Apoplastični ROS primarno proizvode enzimi NADPH oksidaze (NOX) lokalizovani na plazma membrani (Sagi i Fluhr, 2006), kao i peroksidaze u ćelijskom zidu i oksalat-oksidaze (germini) (Das i Roychoudhury, 2014). Pored njih, peroksidaze lokalizovane na ćelijskom zidu, kao i diamin/poliamin oksidaze i oksalat-oksidaze, doprinose produkciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u apoplastičnom prostoru (Spiteller, 2003; Higuchi, 2006), koji se

dalje može metabolisati u vrlo reaktivan hidroksilni radikal ( $\text{OH}\cdot$ ) aktivnošću peroksidaza klase III (putem Haber-Weiss-ove ili Fentonove reakcije), što je proces ključan za modifikacije ćelijskog zida (Kukavica i sar., 2009; Kärkönen i Kuchitsu, 2015). Ovaj apoplastični ROS, zajedno sa aktivnošću peroksidaza ćelijskog zida, formira tzv. ROS talas (eng. *ROS wave*) (Mittler i sar., 2011), koji deluje kao samopropagirajući signal koji se širi od ćelije do ćelije, omogućavajući biljci sistemsko prilagođavanje na stresne uslove sredine.

ROS je zajednički pojam koji uključuje i radikale kiseonika, kao što su superoksid-anjon-radikal ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), hidroksil-radikal ( $\text{OH}\cdot$ ), hidroperoksil-radikal ( $\cdot\text{OH}_2$ ), peroksil-radikal ( $\text{ROO}\cdot$ ), i druge neradikale koji nemaju nesparene elektrone, kao što su vodonik peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), singletni kiseonik ( $^1\text{O}_2$ ) i ozon ( $\text{O}_3$ ) (Halliwell, 2006; Gupta i sar., 2015) (Slika 9).



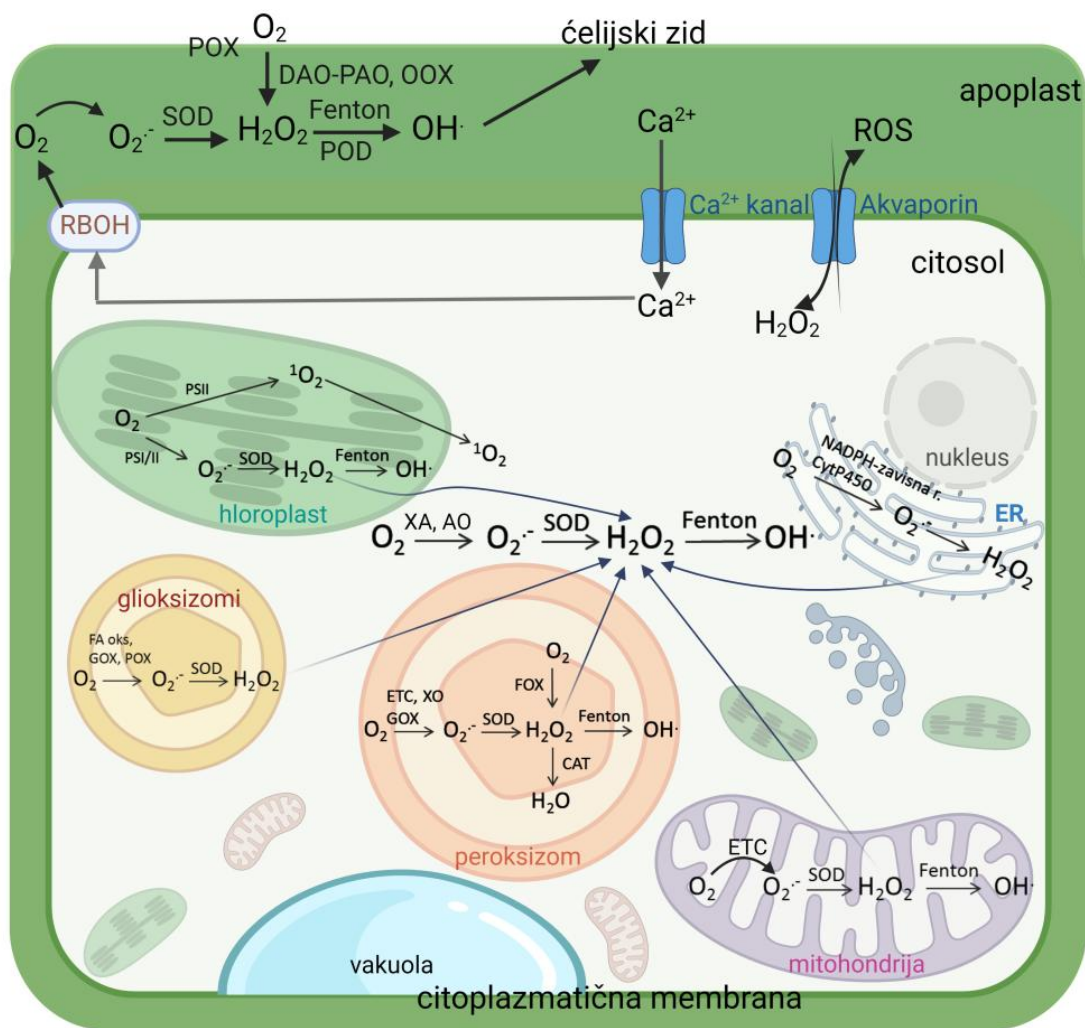
**Slika 9.** Nastanak različitih vrsta ROS-a iz atmosferskog kiseonika. Predstavljen je niz monovalentnih redukcija molekuskog kiseonika (tripleta) do radikala i neradikalnih vrsta. Atmosferski kiseonik (dikiseonik,  $\text{O}_2$ ) podleže ekscitaciji ili redukciji i formira singlet kiseonik ( $^1\text{O}_2$ ) ili superoksid radikal ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Od superoksida može nastati vodonik peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), koji može interagovati sa  $\text{Fe}^{2+}$  i formirati hidroksil radikale ( $\text{OH}\cdot$ ) preko Fentonove reakcije.

Procesi produkcije i uklanjanje ROS-a su strogo lokalizovani u biljnim ćelijama. Najvažnija mesta sinteze su hloroplasti (tokom fotosinteze), mitohondrije (tokom respiracije) i peroksizomi (tokom fotorespiracije) (Go i Jones, 2008; Ahmad i sar., 2010; Gupta i sar., 2015; Mittler, 2017; Czarnocka i Karpiński, 2018; Janků i sar., 2019) (slika 10). Antioksidativni sistem je takođe raspoređen tako da prati ova mesta produkcije ROS-a (Ahmad i sar., 2010).

Napad herbivora, bilo kroz ishranu ili polaganje jaja, inicira brzu produkciju ROS-a u biljkama, što dovodi do oksidativnog stresa (Shinya i sar., 2016; Bittner i sar., 2017; Mahanta i sar., 2025). Porast nivoa ROS-a i intracelularnih jona kalcijuma ( $\text{Ca}^{2+}$ ) deluje kao ključni sekundarni signalni mehanizam koji aktivira odbrambene gene biljke u roku od nekoliko minuta nakon napada herbivora (Aldon i sar., 2018). Primarno mesto proizvodnje ROS-a je plazma membrana, gde NADPH oksidaza, aktivirana jonima kalcijuma, katalizuje formiranje superoksida, koji se potom konvertuje u  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Lokalizovana akumulacija ROS-a može izazvati programiranu ćelijsku smrt na mestu napada (npr. pri polaganju jaja), čime se napadač izoluje i sprečava dalje širenje oštećenja (Aldon i sar., 2018). Biljke kontrolišu oksidativni stres putem složenog sistema enzima (superoksid dismutaze, katalaze, askorbat peroksidaze, glutathion-S-transferaze) i neenzimske odbrane (askorbat, glutathion, karotenoidi,  $\alpha$ -tokoferol, fenolna jedinjenja, prolin) (Mansoor i sar., 2022). Sa druge strane, određeni specijalizovani herbivori razvili su strategije za neutralizaciju biljnih ROS-a. Na primer, sekreti iz ovidukta borove ose poseduju visoku aktivnost katalaze koja suzbija akumulaciju  $\text{H}_2\text{O}_2$  u tkivu borovih iglica, štiteći tako jaja od biljnog odbrambenog odgovora (Bittner i sar., 2017). Istovremeno, insekti poput

leptiraste vaši duvana (*Bemisia tabaci*) koriste sopstvene enzime (superoksidge dismutaze i katalaze) kako bi preživeli delovanje sekundarnih metabolita i ublažili oksidativni stres izazvan ishranom na biljci-domaćinu (Lin i sar., 2019).

Proces formiranja gale započinje aktivnošću insekta (polaganjem jaja ili hranjenjem), što biljka prepoznaje kao stres i na koji odgovara oksidativnim praskom tj. brzom i intenzivnom produkcijom ROS-a, prvenstveno  $O_2^{\cdot-}$  i  $H_2O_2$  (de Oliveira i sar., 2014; Guedes i sar., 2022). U kontekstu razvika gala, ROS se ne smatraju samo toksičnim nusproizvodima, već ključnim signalnim molekulima koji pokreću diferencijaciju tkiva i formiranje specifične strukture gale (Isaias i sar., 2015). Oni deluju sinergistički sa biljnim hormonima kako bi „omekšali“ ćelijske zidove i omogućili hipertrofiju i hiperplaziju (Oates i sar., 2021).



**Slika 10.** Šematski prikaz reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), proizvodnja i metabolizam ROS-a u različitim subćelijskim odeljcima biljne ćelije. U ekstraćelijskom prostoru (apoplastu), glavnom mestu ROS signalizacije, NADPH oksidaza (RBOH), locirana na citoplazmatičnoj membrani, stvara  $O_2^{\cdot-}$ , koji potom proizvodi  $H_2O_2$ , a zatim i  $OH^{\cdot}$ , što direktno utiče na ćelijski zid, a takođe aktivira  $Ca^{2+}$  kanale hiperpolarizacijom. Priliv  $Ca^{2+}$  u citosol, zauzvrat, aktivira RBOH enzime. Ekstraćelijski ROS ( $H_2O_2$ ) takođe može ući u citosol preko akvaporina i dovesti do intraćelijske signalizacije vezivanjem sa redoks senzorom u citosolu ili u nukleusu zajedno sa  $Ca^{2+}$  kako bi delovali na nukleus aktivnosti. Mitohondrije, hloroplasti, endoplazmatični retikulum i endozomi proizvode ROS koji može učestvovati u signalizaciji, ili preći u apoplastični prostor ili vakuolu.  $O_2^{\cdot-}$ -superoksid-anjon-radikal;  $H_2O_2$ - vodonik peroksid;  $^1O_2$ - singletni kiseonik;  $OH^{\cdot}$ - hidroksil-radikal; AO- aldehid oksidaza; CAT- katalaza; DAO-diamin oksidaza; GOX- glikolat oksidaza; ETC- elektron transportni lanac; FOX- flavin oksidaza; OOX- oksalat oksidaza; PAO- poliamin oksidaza; POX- peroksidaze; PS I/II- fotosistem I/II; RBOH- NADPH oksidaza; SOD- superoksid dismutaza; XO- ksantin oksidaza/dehidrogenaza. Fentonova reakcija- prevođenje  $H_2O_2$  na  $OH^{\cdot}$  i  $OH^{\cdot}$ , uz jone  $Fe^{2+}$  kao katalizatore. Slika napravljena preko BioRender.com

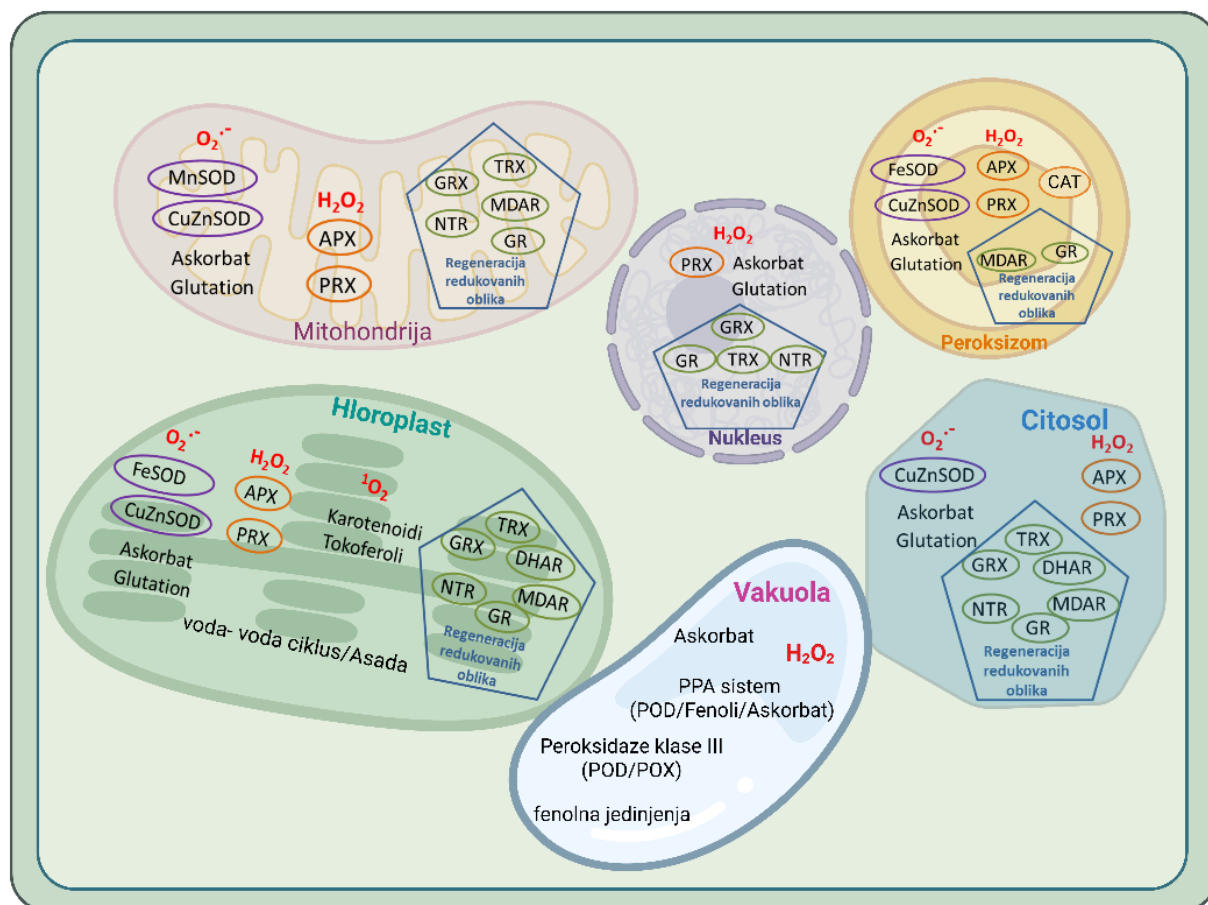
Akumulacija ROS-a u galama prati specifične histohemijske i citološke gradijente, pri čemu je nivo oksidativnog stresa najintenzivniji u unutrašnjem sloju (hranljivom tkivu) u neposrednoj blizini insekta (de Oliveira i sar., 2014). U ovim unutrašnjim slojevima ROS se primarno nakuplja u simplastu usled visoke metaboličke aktivnosti mitohondrija, dok se u spoljašnjim slojevima detektuje uglavnom u apoplastu (ćelijskim zidovima) (Isaias i sar., 2015). Ove razlike deluju kao generativna sila za morfogenezu gale, gde ROS u apoplastu omogućava širenje ćelija slabljenjem veza u ćelijskom zidu, dok biljka istovremeno akumulira šećere i fenolna jedinjenja kao antioksidativne agense ROS-a kako bi održala redoks homeostazu (Isaias i sar., 2015). Uspešno formiranje gale zavisi od precizne ravnoteže između oksidativnog stresa, koji služi kao morfogenetski signal, i snažnog antioksidativnog odgovora biljke-domaćina koji sprečava autodestrukciju sopstvenog tkiva.

### 1.3. Antioksidativni odgovor biljke na herbivoriju i indukciju gale

Antioksidativni sistem biljaka je visoko koordinisana mreža koja služi za održavanje redoks homeostaze kroz precizan balans između stvaranja i neutralizacije ROS-a (Mignolet-Spruyt i sar., 2016; Noctor i sar., 2018; Foyer i Noctor, 2020). Ovaj sistem se sastoji od enzimskih komponenti (kao što su superokside dismutaze, katalaze i askorbat peroksidaze) i neenzimskih antioksidanata (askorbat, glutation, fenolna jedinjenja, tokoferoli i karotenoidi) koji deluju sinhronizovano u različitim ćelijskim odeljcima (Noctor i Foyer, 1998) (slike 10 i 11). U okviru ovog sistema, vakuole takođe imaju kritičnu ulogu kao skladišta fenolnih jedinjenja i deluju kao efikasan organ za nakupljanje  $H_2O_2$  koji tamo dospeva difuzijom iz drugih organela tokom stresa (Veljović Jovanović i sar., 2018). Vakuole i apoplast ne sadrže katalazu, pa se uklanjanje  $H_2O_2$  oslanja na PPA (eng. *Peroxidase-Phenolics-Ascorbate*) sistem (Takahama i Oniki, 1997; Takahama, 2004). Mehanizam ovog ciklusa obuhvata nekoliko faza, gde peroksidaze katalizuju redukciju  $H_2O_2$  u vodu koristeći fenolna jedinjenja kao donore elektrona (Passardi i sar., 2007; Veljović Jovanović i sar., 2018); tokom reakcije sa POD, fenoli se oksiduju u fenoksil-radikale (Takahama, 2004); askorbat deluje kao krajnji reduktans koji vraća fenoksil-radikale u njihovo probitno stanje, pri čemu se askorbat oksiduje u monodehidroaskorbat (MDA) ili dehidroaskorbat (DHA) (Takahama, 2004). Oksidovani produkti askorbata se zatim transportuju nazad u citosol, gde se regenerišu putem askorbat-glutation ciklusa, čime se zatvara krug odbrane (Zechmann, 2018). Ovakva složena organizacija, gde proces zavisi od mesta nastanka i količine ROS-a, omogućava biljci da ROS koristi kao informacije o stanju u ćeliji i za prilagođavanje stresu, dok istovremeno sprečava oksidativna oštećenja (Foyer i Shigeoka, 2011).

Antioksidativni odgovor biljke na herbivoriju je dinamičan i složen proces odbrane i signalizacije nakon napada biljojeda. Napad insekata, naročito onih koji žvaću biljno tkivo, izaziva oksidativni prasak, koji se karakteriše brзом i prolaznom proizvodnjom ROS-a, prvenstveno vodonik peroksida, superoksidnih anjona i hidroksilnih radikala (War i sar., 2012; Fürstenberg-Hägg i sar., 2013). Proizvodnja ROS-a je jedan od najranijih događaja nakon detekcije oštećenja, a lokalne promene se mogu detektovati u roku od nekoliko sekundi ili minuta (Fürstenberg-Hägg i sar., 2013; Erb i Reymond, 2019). ROS u apoplastu može nastati delovanjem NADPH oksidaza (RBOHs, eng. *respiratory burst oxidase homologs*), a kod *Arabidopsis thaliana* povreda tkiva izaziva RBOHD-zavisan nalet ROS-a, čija je aktivacija posredovana prilivom  $Ca^{2+}$  i kalcijum-zavisnim protein kinazama (Miller i sar., 2009). Vodonik peroksid deluje kao sekundarni glasnik koji aktivira kaskadu što dovodi do ekspresije odbrambenih gena (Wu i sar., 1997; Torres, 2010; Pathak i sar., 2025).

Biljke koriste niz enzima kako bi upravljale oksidativnim statusom i iskoristile ga za izgradnju efikasnog odbrambenog sistema. Polifenol oksidaza (PPO) oksiduje fenole u hinone koji su visoko reaktivni i toksični za insekte; hinoni se vezuju za proteine u digestivnom traktu insekta, smanjujući njihovu hranljivu vrednost i otežavajući varenje (War i sar., 2012; Singh i sar., 2021). POD imaju dvojaku ulogu: s jedne strane uklanjaju višak ROS-a, a s druge učestvuju u polimerizaciji fenolnih jedinjenja, lignifikaciji i suberizaciji ćelijskih zidova, čime biljno tkivo postaje čvršće i otpornije na uticaj stresa, a ujedno se smanjuje njegova svarljivost za herbivore (Francoz i sar., 2015; Liu i sar., 2018b). Lipoksigenaze su važne za aktivaciju oktadekanoidnog puta (sinteza jasmonata), ali takođe stvaraju i reaktivne aldehide i ROS koji direktno oštećuju digestivni trakt herbivora (War i sar., 2012).



**Slika 11.** Antioksidativni sistem u biljnoj ćeliji. APX, askorbat peroksidaze; POD, peroksidaze; CAT, katalaze; DHAR, dehidroaskorbat reduktaze; MDAR, monodehidroaskorbat reduktaze; GR, glutation reduktaze; GRX, glutaredoksin; SOD, superokside dismutaze; NTR, NADPH-tioredoxin reduktaze; PRX, peroksiredoksin; TRX, tioredoxin; PPA, Peroxidase-Phenolics-Ascorbate sistem;  $O_2^{\cdot-}$ , superoksid anjonski radikal;  $H_2O_2$ , vodonik peroksid. Prilagođeno iz: Noctor i sar., 2018. Slika napravljena preko BioRender.com

Takođe, fenolna jedinjenja deluju kao antioksidansi koji neutrališu slobodne radikale i smanjuju njihovo stvaranje heliranjem metala (Treutter, 2006). Neke biljke skladište ove metabolite u inertnom, redukovanom stanju unutar tonoplasta (u obliku feniloplasta) (Singh i sar., 2021). Prilikom napada herbivora, oslobođeni oralni sekreti insekta izazivaju oksidativni stres koji dovodi do razgradnje ovih odeljaka i brzog oslobađanja polifenola i enzima koji deluju pri odbrani (Singh i sar., 2021). Fenoli u biljkama mogu se oksidovati pomoću PPO i POD, pri čemu nastaju hinoni. Oni takođe učestvuju u neutralisanju ROS-a, čime se pokreće niz reakcija koji dalje aktivira odbrambene enzime.

Određeni insekti su razvili načine da iskoriste ili priguše oksidativni odgovor biljke. Na primer, gusenice koje u pljuvački izlučuju enzim glukoza-oksidadu (GOX) mogu uticati na nivo ROS-a kako bi suprimirale signalne puteve koji aktiviraju toksična jedinjenja (poput nikotina) ili izazvale hlorozu tkiva, čime biljku dovode u stanje smanjene odbrambene sposobnosti (Fürstenberg-Hägg i sar., 2013).

Regulacija oksidativnog stresa u biljci na formiranje gale predstavlja složen proces koji prevazilazi klasičnu reakciju na biotički stres. Dok biljka nastoji da neutrališe oksidativni stres izazvan napadom insekta, galikolni organizmi vešto preoblikuju ove odbrambene mehanizme kako bi osigurali razvoj specifičnog galoznog tkiva (Tooker i De Moraes, 2008). Inicijalni napad insekta izaziva brzu produkciju ROS-a, koji ne deluju samo kao toksični stresori, već kao ključni signalni molekuli koji aktiviraju odbrambene gene i modifikuju transkripcione faktore (Torres, 2010). Za razliku od obične herbivorije, formiranje gale prati pad aktivnosti određenih enzima koja omogućava lokalnu akumulaciju ROS-a neophodnu za metaboličko reprogramiranje tkiva domaćina (Liu i sar., 2010; Gätjens-Boniche, 2019). Iako su peroksidaze uključene u lignifikaciju i očvršćavanje tkiva, u ranim fazama razvića gale one imaju suprotnu ulogu, gde generišu hidroksilne radikale koji „labave“ ćelijski zid (eng. *cell wall loosening*), čime mu omogućavaju fleksibilnost i brzu ekspanziju neophodnu za rastenje gale (Almagro i sar., 2009). Sekundarni metaboliti, posebno flavonoidi i fenolne kiseline, igraju ključnu ulogu u smanjenju akumulaciju ROS-a i zaštiti tkiva od oksidativnog oštećenja (Erb i Kliebenstein, 2020; Singh i sar., 2021).

Induktori gale mogu izbeći ili potisnuti antioksidativni i hormonalni odgovor biljke kako bi osigurali razviće gale (Tooker i De Moraes, 2008). Na primer, kod vrste *Eurosta solidaginis* ne dolazi do porasta jasmonske kiseline, koja bi inače zaustavila deobe ćelija, i time se omogućava hiperplazija i hipertrofija tkiva potrebna za formiranje gale (Tooker i De Moraes, 2008). Neki insekti podstiču akumulaciju tanina unutar gale, koji tu ne služe odbrani biljke-domaćina, već postaju resurs za razviće larvi (Chen i sar., 2018).

### 1.3.1. Neenzimski antioksidanti

Uklanjanje ROS-a u biljkama ne zavisi samo od enzima, već i od mreže solubilnih i lipofilnih antioksidanata kao što su askorbat i glutation i određena fenolna jedinjenja, tokoferol i karotenoidi (Apel i Hirt, 2004; Mittler, 2002; Smirnoff, 2005), koji deluju kao ključni regulatori i prenosioci signala. Ova složena interakcija između metabolita i enzima omogućava održavanje redoks homeostaze, procesa koji je od ključnog značaja za preživljavanje, rastenje i prilagođavanje biljaka stresnim uslovima sredine (Noctor i Foyer, 1998a; Apel i Hirt, 2004; Halliwell, 2006; Quan i sar., 2008).

#### 1.3.1.1. Askorbat

L-Askorbat (vitamin C, Asc) predstavlja najzastupljeniji i najvažniji hidrofilni antioksidant u biljnom svetu, koji pored zaštitne uloge u uslovima stresa (Noctor i Foyer, 1998a; Smirnoff, 2005; Foyer i Noctor, 2011; Zechmann, 2011), deluje i kao kofaktor enzima (Noctor i Foyer, 1998a), prekursor za biosintezu oksalata i tartrata, a takođe učestvuje i u deobi i elongaciji biljnih ćelija (Smirnoff, 2000; Veljović Jovanović i sar., 2001; Foyer i Noctor, 2011). Asc učestvuje i u procesima regulacije fotosinteze (Noctor i Foyer, 1998a; Foyer i Noctor, 2011), kao i u regulaciji ćelijskog ciklusa (Noctor i Foyer, 1998a); takođe, učestvuje i u biosintezi biljnih hormona (ABA, GA i etilena) (Foyer i Noctor, 2011). Prisutan je u gotovo svim delovima ćelije, uključujući hloroplaste, nukleus, peroksizome, citosol, mitohondrije, vakuole i apoplast

(Smirnoff, 2000; Veljović Jovanović i sar., 2001; Zechmann, 2011; Zechmann i sar., 2011; Noctor i Foyer, 2016). U biljnim tkivima se nalazi u milimolarnim koncentracijama (5–20 mM) (Noctor i Foyer, 1998a; Mittler, 2002).

Askorbat uklanja ROS na više načina, kroz direktne hemijske reakcije, ali predstavlja i ključnu komponentu enzimskog sistema odbrane (Zechmann, 2011). Direktna neutralizacija ROS-a omogućena je sposobnošću askorbata da donira jedan ili dva elektrona iz svoje C2-C3 endiolne grupe, čime može direktno eliminisati vrste poput singletnog kiseonika (Smirnoff, 2005). Najznačajnija enzimska uloga askorbata ostvaruje se u procesu uklanjanja  $H_2O_2$  putem enzima askorbat peroksidaze (APX), gde APX koristi askorbat kao donor elektrona za redukciju  $H_2O_2$  u vodu, pri čemu se askorbat oksiduje do MDA. Ovaj mehanizam je od presudnog značaja u hloroplastima (unutar ciklusa voda-voda) i citosolu, jer sprečava oksidativna oštećenja fotosintetskog aparata (Asada, 2006). Askorbat je takođe neophodan za uklanjanje superoksidnog radikala. Iako SOD prva deluje na superoksidni radikal prevodeći ga u  $H_2O_2$ , askorbat je taj koji omogućava finalnu eliminaciju nastalog peroksida (Veljović Jovanović i sar., 2001).

Askorbat se u ćeliji javlja u redukovanom obliku (askorbinska kiselina) i u dva oksidovana oblika: monodehidroaskorbat (MDA) i dehidroaskorbat (DHA). Redukovana forma je dominantna jer se stalno regeneriše putem askorbat-glutation (Asc-GSH) ciklusa (Foyer-Halliwell-Asada ciklus) (Noctor i Foyer, 1998a). U ovom ciklusu učestvuju četiri ključna enzima: APX, koja uklanja  $H_2O_2$  prenosom elektrona sa askorbata, pri čemu nastaju MDA i voda; monodehidroaskorbat-reduktaza (MDAR), koja redukuje MDA nazad u Asc koristeći nikotinamid adenin dinukleotid fosfat NAD(P)H; dehidroaskorbat-reduktaza (DHAR), koja redukuje DHA u Asc koristeći redukovani glutacion (GSH) kao donor elektrona pri čemu nastaje njegova oksidovana forma (GSSG); glutacion reduktaza (GR), koja regeneriše oksidovani glutacion (GSSG) nazad u GSH u prisustvu NADPH (Foyer i Noctor, 2011).

Redoks stanje askorbata u apoplastu reguliše askorbat-oksidaza (AO), smeštena u ćelijskom zidu, koja vrši oksidaciju Asc do monodehidroaskorbata (MDA), uz istovremenu redukciju  $O_2$  do  $H_2O_2$  (Pignocchi i Foyer, 2003). Takođe, peroksidaze klase III (POD) učestvuju u oksidaciji askorbata u okviru PPA sistema (Peroksidaza/Fenoli/Askorbat) (Takahama i Oniki, 1997) (objašnjeno detaljnije u sekciji 1.4.).

Biosinteza askorbata u biljkama je složen proces koji započinje od guanozin-difosfat-manoze (GDP-Man), preko različitih galaktoznih intermedijera do konačnog prekursora, L-galakono-1,4-laktona (Smirnoff i Wheeler, 2000). Sama biosinteza se primarno dešava u citosolu ćelije, ali se poslednji korak ovog procesa odvija na unutrašnjoj membrani mitohondrija (Smirnoff, 2011; Schertl i Braun, 2014). *De novo* sinteza, zajedno sa procesima regeneracije u askorbat-glutation ciklusu, predstavlja ključni mehanizam za eliminaciju ROS-a. Ako se stabilnost askorbata ne održava ovim putevima, oksidovane forme askorbata podležu raspadanju do oksalata ili tartrata (Green i Fry, 2005).

Askorbat igra dualnu ulogu u interakciji insekt-biljka, delujući istovremeno kao ključni element biljne odbrane i esencijalni faktor preživljavanja insekata (Kerchev i sar., 2012; Zebelo i Maffei, 2015). Kada su pod napadom herbivora, biljke aktiviraju niz oksidativnih enzima, kao što je askorbat oksidaza čime se smanjuje nivo redukovanog askorbata, što biljku prebacuje u „oksidovano stanje” koje negativno utiče na preživljavanje herbivora, tako što insekti ostaju bez antioksidanata potrebnih za neutralizaciju ROS-a pri varenju hrane, što dovodi do oksidativnih oštećenja njihovog digestivnog trakta (Kerchev i sar., 2012). S druge strane, za mnoge insekte, naročito gusenice, askorbat je esencijalni nutrijent i zavise od askorbata iz biljke kako bi zaštitili svoj digestivni trakt od oksidativnog oštećenja izazvanog obradom biljnih fenola i tanina koji u

alkalnim uslovima digestivnog trakta ovih insekata oksiduju što dovodi do oksidativnog stresa i toksičnosti (Barbehenn i sar., 2001; Zebelo i Maffei, 2015).

Promena askorbata u galama povezana je sa promenama redoks stanja u apoplastu izazvanih porastom ROS-a na plazma membrani, gde redukovani askorbat prelazi u MDA i DHA, i kroz interakcije sa peroksidazama i drugim enzimima (kao što su NADPH oksidaze i SOD), utiče na sastav ćelijskog zida (Pignocchi i Foyer, 2003; Isaias i sar., 2015). Iako je redoks potencijal očigledno uključen u galogenezu, tačni mehanizmi indukcije i razvića gala su još uvek nedovoljno razjašnjeni jer prisustvo i uloga specifičnih enzima i metabolita nisu detaljno ispitani u svim tipovima gala.

### 1.3.1.2. Glutation

Glutation (GSH) je mali unutarćelijski tripeptidni tiol ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) koji predstavlja glavni izvor neproteinskog redukovanog sumpora kod većine prokariota i eukariota. Njegova biosinteza se odvija kroz dve uzastopne ATP-zavisne reakcije u prisustvu enzima  $\gamma$ -glutamilcistein sintetaze i glutacione sintetaze, koristeći aminokiseline cistein, glutamat i glicin kao supstrate. U biljnim ćelijama glutacione se nalazi u citosolu, mitohondrijama i endoplazmatičnom retikulumu, dok je u normalnim, fiziološkim uslovima, njegova koncentracija u vakuolama i apoplastu veoma niska ili zanemarljiva (Noctor i sar., 2002a; Zechmann i sar., 2008). U ćelijama je glutacione prisutan u nekoliko oblika: kao glutacione disulfid (GSSG), ili u obliku disulfida mešovito tipa (GSSR) (Sies, 1999; Noctor i sar., 2012). Glutacione učestvuje u širokom spektru vitalnih procesa, kao što su diferencijacija ćelija, deoba ćelije, sinteza proteina i nukleinskih kiselina, kao i ekspresija gena, naročito tokom abiotičkog stresa; služi kao prekursor za fitohelatine koji heliraju jone teških metala (Grill, 1989); sprečava lipidnu peroksidaciju i štiti integritet ćelijske membrane (Mullineaux i Rausch, 2005). Zahvaljujući visokom reduktivnom potencijalu svog centralnog cisteinskog ostatka, glutacione direktno uklanja ROS kao što su  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$ ,  $OH^\bullet$  i  $O_2^{\bullet-}$ . Ključnu ulogu igra u Asc-GSH ciklusu, gde pomaže u regeneraciji askorbata. Enzim dehidroaskorbat reduktaza (DHAR) povezuje oksidaciju glutaciona sa redukcijom dehidroaskorbata (DHA), čime se omogućava uklanjanje ROS-a.

U biljnim ćelijama glutacione se obično akumulira do milimolarnih koncentracija (Noctor i sar., 2011). U fiziološkim uslovima u ćeliji redukovani GSH je dominantni oblik, čija koncentracija je 10 do 100 puta veća od koncentracije oksidovanih vrsta (oksidovani GSH, GSSG i mešani disulfid, GSSR) (Aquilano i sar., 2014).

Mnoge uloge GSH su povezane sa reverzibilnim redoks reakcijama sumporne grupe cisteina (Noctor i Foyer, 1998a; Kopriva i Rennenberg, 2004; Noctor i sar., 2012). Kao i drugi tioli, glutacione može da podleže brojnim redoks reakcijama. Glutacione se održava u pretežno redukovanom stanju pomoću specifičnih enzima GR koji se nalaze u citosolu, plastidima, mitohondrijama i peroksisomima, a koje imaju visok afinitet za GSSG i NADPH (Halliwell i Foyer, 1978; Smith i sar., 1989; Chew i sar., 2003). Enzim DHAR povezuje oksidaciju glutaciona sa regeneracijom askorbata (Foyer i Mullineaux, 1998). Smanjenje DHA zavisno od GSH omogućava da se NADPH oksidacija poveže sa uklanjanjem ROS-a preko askorbata i glutaciona (Noctor i Foyer, 1998a).

Redoks stanje glutaciona je u korelaciji sa nivoom oksidativnog stresa u biljci (Noctor i Foyer, 1998a; Schafer i Buettner, 2001). Održavanje glutaciona u pretežno redukovanom stanju omogućava GR, ali u uslovima ekstremnog stresa povećana produkcija oksidovanog oblika prevazilazi kapacitete regeneracije, što dovodi do pada redoks stanja (Noctor i sar., 2002a).

Dinamika glutaciona u biljci tokom biotičkog stresa predstavlja složen i precizno usklađen proces koji obuhvata promene u njegovoj koncentraciji, redoks stanju, biosintezi i

subćelijskoj distribuciji (Noctor i sar., 2024). GSH igra ključnu dvostruku ulogu: deluje kao antioksidans, neutrališući ROS koje nastaju usled oštećenja tkiva, i služi kao signalni molekul za aktivaciju odbrambenih mehanizama (Zechmann, 2020). Dinamika glutaciona je specifična za svaki ćelijski odeljak (Zechmann i sar., 2008). Promene u koncentraciji glutaciona i prelazak ka oksidovanom stanju u organelama kao što su mitohondrije i hloroplasti predstavljaju važne okidače za indukciju otpornosti putem salicilne kiseline (SA) i PR (eng. *Pathogenesis-Related*) gena (Zechmann, 2020). Citosol predstavlja centralno mesto sinteze glutaciona, odakle se on transportuje u druge organele (npr. putem CLT transportera) kako bi se zadovoljila povećana potražnja tokom biotičkog napada (Zechmann, 2020; Noctor i sar., 2024).

Biljka na napad herbivora reaguje pojačanom biosintezom glutaciona kako bi nadoknadila gubitke i podržala odbrambene mehanizme (Noctor i sar., 2024). Herbivorija i hormoni poput jasmonske kiseline stimulišu transkripciju gena *GSH1* i *GSH2* koji su odgovorni za sintezu glutaciona (Noctor i sar., 2012). U uslovima oksidativnog stresa, enzim GSH1, koji katalizuje prvi korak sinteze, može se post-translaciono aktivirati formiranjem disulfidnih mostova, što omogućava brzi odgovor biljke bez čekanja na novu transkripciju (Dorion i sar., 2021).

Glutacion je direktno uključen u sintezu odbrambenih jedinjenja; neophodan je kao donor sumpora u biosintezi glukozinolata i indolnih fitoaleksina poput kamaleksina (Czerniawski i Bednarek, 2018; Noctor i sar., 2024). Biljke sa smanjenim kapacitetom za sintezu glutaciona (npr. *pad2* mutanti kod *Arabidopsis*) akumuliraju manje glukozinolata i pokazuju značajno veću osetljivost na herbivore poput larvi insekata (Parisy i sar., 2007.; Schlaeppli i sar., 2008). Glutacion S-transferaza (GST) posreduje u vezivanju GSH sa izotiocijanatima, reaktivnim i potencijalno štetnim proizvodima razgradnje glukozinolata, čime se biljka štiti od sopstvenog hemijskog oružja (Czerniawski i Bednarek, 2018). Napad herbivora često izaziva privremenu oksidaciju GSH u GSSG, čija akumulacija može poslužiti kao signal za aktivaciju odbrambenih gena (Noctor i sar., 2024).

Dinamika glutaciona tokom galogeneze karakteriše se izraženim pomeranjem redoks ravnoteže ka oksidovanom obliku (GSSG), što je posledica pojačane produkcije ROS-a koji deluju kao signalni molekuli tokom formiranja gale (Han i sar., 2013; Zechmann, 2020). U galoznom tkivu, kontinuirani porast sadržaja GSSG predstavlja važan redoks signal za reprogramiranje ekspresije gena neophodno za razvoj gale (Han i sar., 2013). Ovaj sistem neposredno modifikuje sastav i fleksibilnost ćelijskog zida kroz interakciju sa specifičnim enzimima: SOD, koje dismutacijom superoksida obezbeđuju supstrat ( $H_2O_2$ ), i peroksidazama (POD), čija je visoka aktivnost u ranoj fazi razvića gale primarno usmerena na hemijsko labavljenje ćelijskog zida (eng. *cell wall loosening*), a ne na lignifikaciju (Schweikert i sar., 2000; Passardi i sar., 2005; Almagro i sar., 2009; Francoz i sar., 2015).

### 1.3.2. Enzimski antioksidanti

Efikasnost antioksidativne odbrane biljnih ćelija zasniva se na preciznoj distribuciji enzimskih komponenti unutar različitih organela (slika 11). Superoksid dismutaza (SOD) predstavlja prvu liniju odbrane koja deluje u gotovo svim ćelijskim odeljcima, pretvarajući superoksidne radikale u  $H_2O_2$  (Asada, 1987; Bolwer i sar., 1992; Alscher i sar., 2002). Razgradnja  $H_2O_2$  u hloroplastima primarno zavisi od APX i komponenti Asc-GSH ciklusa, poznatog i kao ciklus voda-voda, koji koristi elektrone iz vode za redukciju ROS-a (Foyer i Halliwell, 1976; Mittler, 2002; Asada, 2006; Foyer i Shigeoka, 2011). U peroksidomima ključnu ulogu ima katalaza (CAT), koja je u najvećoj meri zaslužna za uklanjanje  $H_2O_2$  (Scandalios i sar., 1997; Willekens i sar., 1997; Mittler, 2002), dok su u vakuolama i apoplastu aktivne peroksidaze III

klase (POD) u kombinaciji sa askorbatom i fenolnim jedinjenjima (Takahama, 2004; Kukavica i sar., 2009; Ferreres i sar., 2011) (slika 11).

Prisustvo Asc-GSH ciklusa u većini istraživanih odeljaka, uz visok afinitet APX prema  $H_2O_2$ , ukazuje na to da ovaj sistem vrši finu modulaciju nivoa ROS-a neophodnu za procese signalizacije (Asada, 2006). Nasuprot tome, katalaza je, uprkos prisustvu određenih izozima u mitohondrijama kod nekih vrsta, primarno lokalizovana u peroksizomima i neophodna je za uklanjanje ekstremno visokih nivoa ROS-a tokom stresa (Scandalios i sar., 1997; Willekens i sar., 1997). Održavanje ravnoteže između aktivnosti SOD i enzima koji uklanjaju  $H_2O_2$  (APX, CAT, GR, POD) (Bowler i sar., 1991; Mittler, 2002; Apel i Hirt, 2004) je ključno za održavanje stabilnog nivoa superoksidnih radikala i vodonik peroksida. Različiti afiniteti APX ( $\mu M$  opseg) i CAT (mM opseg) prema  $H_2O_2$  potvrđuju njihove specifične uloge: APX je zadužen za održavanje homeostaze ROS-a u fiziološkim uslovima, dok CAT, zahvaljujući velikoj brzini reakcije i činjenici da ne troši ćelijske redukujuće ekvivalente, preuzima ulogu glavnog zaštitnog mehanizma tokom intenzivnog oksidativnog stresa (Willekens i sar., 1997). U vakuolama, par peroksidaza-sekundarni metaboliti (poput fenola) može formirati regenerativni ciklus sa askorbatom, omogućavajući efikasno neutralisanje visokih doza  $H_2O_2$  koje difunduju iz hloroplasta (Ferreres i sar., 2011).

### 1.3.2.1. Enzimi askorbat-glutation ciklusa

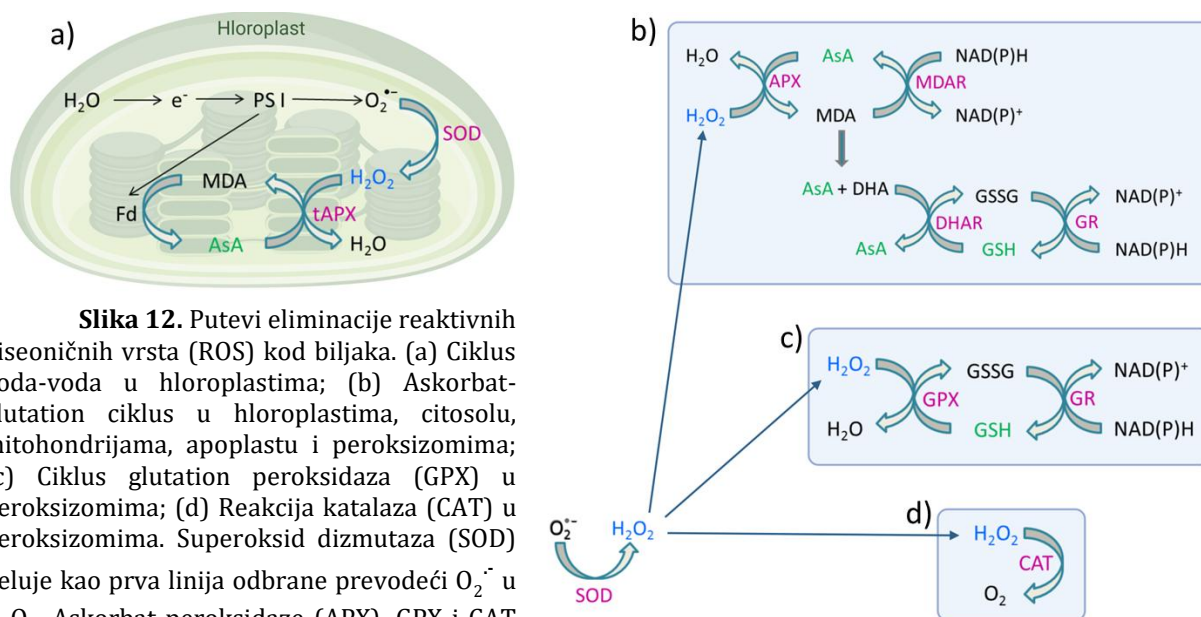
Ciklus askorbat-glutation, poznat i kao ciklus Foyer-Halliwell-Asada (Asada i sar., 1974), predstavlja primarni metabolički put za razgradnju  $H_2O_2$  u biljnim ćelijama (Foyer i Shigeoka, 2011; Foyer i Noctor, 2011) (Slika 12b). Ovaj sistem deluje usklađeno u različitim ćelijskim odeljcima, uključujući hloroplaste, citosol, mitohondrije i peroksizome (Jimenez i sar., 1997; Chew i sar., 2003), održavajući redoks homeostazu putem četiri ključna enzima: APX, monodehidroaskorbat-reduktaze (MDAR), dehidroaskorbat-reduktaze (DHAR) i glutathion-reduktaze (GR).

Askorbat peroksidaze (APX, EC 1.11.1.11) su hem-peroksidaze klase I koje katalizuju redukciju  $H_2O_2$  u vodu, koristeći askorbat kao specifični donor elektrona (Asada, 1999). U ovom procesu, askorbat se oksiduje do monodehidroaskorbat radikala ( $MDA\cdot$ ) (slika 12a). Hloroplastične izoforme APX su integralni deo ciklusa voda-voda, koji omogućava brzu eliminaciju ROS-a na samom mestu nastanka (u blizini PS I) i disipaciju viška ekscitacione energije (Huang i sar., 2019). Biljke poseduju više izoformi APX: stromalnu (sAPX), tilakoidnu (tAPX), luminalnu, citosolnu (cAPX), mitohondrijalnu i peroksizomalnu (Shigeoka i sar., 2002). Ključna karakteristika svih APX izoformi, a naročito hloroplastnih, jeste njihova velika nestabilnost u odsustvu askorbata; ukoliko koncentracija Asc padne ispod  $20 \mu M$ , hloroplastne APX bivaju inaktivirane za manje od 30 sekundi, dok su ostale izoforme stabilne do jednog sata (Shigeoka i sar., 2002; Ishikawa i Shigeoka, 2008).

Monodehidroaskorbat-reduktaza (MDAR, EC 1.6.5.4) je FAD-enzim koji katalizuje direktnu regeneraciju askorbata iz  $MDA\cdot$  koristeći NAD(P)H kao donor elektrona (Foyer i Noctor, 2011) (slika 12b). MDAR je ključan za održavanje rezervi askorbata u redukovanom stanju pre nego što dođe do spontane disproporcije  $MDA\cdot$  u dehidroaskorbat (DHA) (Asada, 1999). MDAR ima nekoliko izoformi koje se kolokalizuju sa APX u hloroplastima, mitohondrijama i peroksizomima (Hasanuzzaman i sar., 2020). Ukoliko  $MDA\cdot$  radikali ne budu direktno redukovani, oni spontano disproporcionišu u Asc i DHA (Shigeoka i sar., 2002). Enzim dehidroaskorbat-reduktaza (DHAR, EC 1.8.5.1) tada vrši redukciju DHA u askorbat, koristeći redukovani glutathion (GSH), koji se tom prilikom oksiduje u glutathion-disulfid (GSSG) (slika 12b). DHAR pripada superfamiliji glutathion S-transferaza, a njena aktivnost je esencijalna za

regulaciju Asc/DHA odnosa (Foyer i Noctor, 2011). Izoforme DHAR su prisutne u hloroplastima, mitohondrijama i citosolu (Mittler, 2002; Hasanuzzaman i sar., 2020).

Glutation reduktaza (GR, EC 1.6.4.2) zatvara Asc-GSH ciklus tako što katalizuje NADPH-zavisnu redukciju GSSG nazad u GSH (Mittler, 2002) (slika 12c), čime se obnavljaju zalihe ovog ključnog antioksidanta. GR je esencijalna za održavanje visokog GSH/GSSG odnosa, što je neophodno za aktivnu funkciju proteina i sprečavanje formiranja mešovityh disulfida (Foyer i Noctor, 2005b). GR izoforme su lokalizovane uglavnom u hloroplastima, ali je njihova aktivnost otkrivena i u mitohondrijama, peroksizomima i citosolu (Mhamdi i sar., 2010b).



**Slika 12.** Putevi eliminacije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) kod biljaka. (a) Ciklus voda-voda u hloroplastima; (b) Askorbat-glutation ciklus u hloroplastima, citosolu, mitohondrijama, apoplastu i peroksizomima; (c) Ciklus glutacion peroksidaze (GPX) u peroksizomima; (d) Reakcija katalaze (CAT) u peroksizomima. Superoksid dizmutaza (SOD) deluje kao prva linija odbrane prevodeći O<sub>2</sub><sup>•-</sup> u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Askorbat peroksidaze (APX), GPX i CAT potom eliminišu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Suprotno CAT (d), APX i GPX zahtevaju askorbat (Asc) i/ili glutation (GSH) regenerativni ciklus (a-c). Ovaj ciklus zahteva elektrone direktno iz fotosintetskog aparata (a) ili NAD(P)H (b,c) kao redukujući agens. O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - superoksid radikal; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - vodonik peroksid; DHA - dehidroaskorbat; DHAR - DHA reduktaza; Fd - feredoksin; GR - glutation reduktaza; GSSG - oksidovani glutation; MDA - monodehidroaskorbat; MDAR - MDA reduktaza; PS I - photosistem I; tAPX - APX vezan za tilakoide. Prilagođeno iz Mittler, 2002. Slika napravljena preko BioRender.com

Integritet Asc-GSH ciklusa je od ključnog značaja za održavanje redoks ravnoteže u ćeliji, budući da poremećaj u bilo kojoj njegovoj fazi, naročito na nivou GR ili DHAR, dovodi do nagomilavanja oksidovanih formi antioksidanata, inaktivacije APX i, posledično, urušavanja celokupne antioksidativne odbrane (Asada, 1999, 2006; Foyer i Shigeoka, 2011).

Napad herbivornih insekata izaziva mehanička oštećenja i lučenje specifičnih elicitatora (poput onih prisutnih u pljuvački insekata), što dovodi do trenutnog oksidativnog praska. Ovi molekuli deluju kao rani signalni mehanizmi koji pokreću ekspresiju odbrambenih gena, ali njihova prekomerna akumulacija zahteva strogu regulaciju kako bi se sprečilo oštećenje ćelija (Kerchev i sar., 2012). U tom kontekstu, Asc-GSH ciklus ima ključnu ulogu u održavanju ravnoteže između signalizacije i oksidativnog stresa (Foyer i Kunert, 2024). Tokom herbivorije, biljke modifikuju aktivnost enzima ovog ciklusa. Pokazano je da napad insekata, poput lisnih vaši ili gusenica, često dovodi do povećane aktivnosti APX i GR enzima, što je povezano sa većom otpornošću biljke (Kerchev i sar., 2012). Istraživanja na *Arabidopsisu* otkrivaju da su komponente Asc-GSH ciklusa istovremeno usmerene i u hloroplaste i u mitohondrije, što

omogućava integrisanu antioksidativnu odbranu unutar ćelije (Chew i sar., 2003). Tokom napada, aktivnost APX može porasti i do četiri puta u odnosu na kontrolne uslove (Skwarek-Fadecka i sar., 2024).

Redoks signalizacija je usko povezana i sa putevima jasmonske kiseline, salicilne kiseline i etilena, čime se osigurava koordinisan i višeslojan odgovor na stres (de Vos sar., 2007; Kerchev i sar., 2012; Foyer i Kunert, 2024). Pored unutrašnjih odbrambenih mehanizama, Asc-GSH sistem učestvuje i u regulaciji sinteze VOCs. Ova jedinjenja, poput 2,4-nonadienala, služe kao signali u rizosferi, privlačeći ili odbijajući prirodne neprijatelje herbivora, poput entomopatogenih nematoda (Laznik i sar., 2024).

Enzimi i molekuli askorbat-glutation ciklusa igraju ključnu ulogu u održavanju redoks homeostaze tokom razvicia gala, jer nakupljanje ROS-a predstavlja jedan od prvih signala i odgovora biljke na aktivnost insekata (Isaias i sar., 2015; Oliveira i sar., 2016; Gätjens-Boniche, 2019). Aktivnost APX se značajno menja u tkivu gale kako bi se neutralisao oksidativni prasak izazvan ishranom ili polaganjem jaja insekata (Isaias i sar., 2015; Zebelo i Maffei, 2015; Pawłowski i sar., 2017). Proteomske analize su potvrdile da je aktivnost APX-a značajno veća u određenim galama, poput onih koje indukuje osa *Neuroterus quercusbaccarum* na hrastu, što ukazuje na intenzivnu aktivnost ovog enzima u uklanjanju vodonik peroksida (Pawłowski i sar., 2017)

Biljke često pokušavaju da zaustave razvicia gala putemhipersenzitivnog odgovora, koji podrazumeva lokalizovanu nekrozu ćelija izazvanu ROS-om, čime se parazit izoluje i sprečava njegovo dalje napredovanje (Isaias i sar., 2015; Miller i Raman, 2019). Da bi preživeli, insekti induktori moraju da manipulišu redoks statusom domaćina; enzimi poput APX-a, zajedno sa askorbatom i glutationom, deluju kao efikasni „čistači” ROS-a, sprečavajući nekrozu i omogućavajući tkivu gale da nastavi sa rastom (Isaias i sar., 2015).

Pored zaštitne uloge, ROS prisutni u apoplastu deluju sinergistički sa auksinima u labavljenju veza između polimera ćelijskog zida, dok Asc-GSH sistem precizno reguliše njihov nivo, omogućavajući remodelovanje bez toksičnih efekata što je naročito važno u kontekstu hipertrofije ćelija tokom formiranja gala (Isaias i sar., 2015; Oliveira i sar., 2016; Cosgrove, 2024).

### 1.3.2.2. Superoksid-dismutaza

Superoksid-dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1) pripada porodici metaloenzima i predstavlja prvu liniju odbrane od ROS-a u biljnim ćelijama (Mittler, 2002). Ovaj enzim katalizuje uklanjanje superoksidnog radikala  $O_2^{\cdot-}$  putem njegove dismutacije u  $O_2$  i  $H_2O_2$  (Kliebenstein i sar., 1998; Alscher i sar., 2002; Pilon i sar., 2011). S obzirom na to da je primarni proizvod univalentne redukcije kiseonika, SOD je esencijalan i nalazi se u gotovo svim ćelijskim odeljcima gde dolazi do stvaranja ovog radikala, uključujući hloroplaste, mitohondrije, peroksizome, citosol i apoplast (Asada, 1999; Mittler, 2002). Na osnovu vrste metalnog kofaktora, u biljkama razlikujemo tri glavna izoenzima: Mn-SOD (lokalizovan prvenstveno u mitohondrijama i peroksizomima), Fe-SOD (prisutan u stromi hloroplasta kod nekih vrsta) i Cu/Zn-SOD (zastupljen u hloroplastima, citosolu, peroksizomima, nukleusu i apoplastu) (Asada 1999, 2006; Mittler, 2002). Unutar hloroplasta, Cu/Zn-SOD je često vezan za membrane tilakoida u blizini fotosistema I, što omogućava trenutnu eliminaciju radikala na mestu nastanka (Asada 1999, 2005). Ekspresija i aktivnost SOD-a se značajno povećavaju kao odgovor na različite biotičke i abiotičke stresove, čime se održava stabilan nivo ROS-a i sprečava nastanak toksičnijeg hidrosilnog radikala (Alscher i sar., 2002; Mittler, 2002; Gill i sar., 2015; Lu i sar., 2017).

Napad herbivora izaziva brzu i intenzivnu produkciju ROS-a, a povećana aktivnost SOD-a u ovim uslovima ukazuje na to da biljka prepozna napad i aktivira signalne kaskade odbrane (Torres i sar., 2006). Proizvod delovanja SOD-a,  $H_2O_2$ , je stabilniji od superoksida i može delovati kao sekundarni glasnik koji prenosi signale unutar ćelije i aktivira ekspresiju odbrambenih gena (Foyer i Noctor, 2005a; Mittler i sar., 2011). Dismutacijom superoksida, SOD obezbeđuje  $H_2O_2$  neophodan za rad peroksidaza, koje dalje katalizuju polimerizaciju lignina (Almagro i sar., 2009). Na taj način se ojačava ćelijski zid, stvarajući fizičku barijeru daljoj ishrani herbivora (Passardi i sar., 2005; Almagro i sar., 2009; Gill i sar., 2010). Različite izoforme SOD-a aktiviraju se u zavisnosti od tipa stresa i subćelijske lokacije (Sharma i sar., 2012). Pored navedenog, nivo aktivnosti SOD-a može služiti kao biohemijski marker za razlikovanje otpornih od osetljivih sorti biljaka, s obzirom na to da njegova povišena aktivnost tokom stresa direktno ukazuje na efikasniji odbrambeni kapacitet biljke (Tariq i sar., 2020).

U strukturama gala, aktivnost SOD-a se značajno povećava kako bi se održala ravnoteža između zaštite od oksidativnog oštećenja i stvaranja signalnih molekula neophodnih za aktivaciju odbrambenih gena tokom intenzivne proliferacije i hipertrofije tkiva (Foyer i Noctor, 2005a; Mittler i sar., 2011).

### 1.3.2.3. Peroksidaze III klase

Peroksidaze (POD, POXs, EC 1.11.1.7) predstavljaju veliku grupu glikoproteina koji igraju ključnu ulogu u redoks homeostazi biljaka (Veljović Jovanović i sar., 2018). Ovi enzimi se sintetišu u endoplazmatičnom retikulumu a potom se preko Goldžijevog aparata transportuju do svojih krajnjih odredišta – vakuola ili vanćelijskog prostora (apoplasta i ćelijskog zida) (Passardi i sar., 2005; Almagro i sar., 2009; Veljović Jovanović i sar., 2018). Kao oksidoreduktaze, peroksidaze katalizuju redukciju  $H_2O_2$  uz istovremenu oksidaciju širokog spektra supstrata, prvenstveno fenolnih jedinjenja, indola, amina i sekundarnih metabolita (Passardi i sar., 2005, 2007; Veljović Jovanović i sar., 2018). Široko su rasprostranjene u prirodi i prisutne su kod životinja, biljaka i mikroorganizama, gde učestvuju u esencijalnim biološkim procesima (Hiraga i sar., 2001).

Biljne peroksidaze se na osnovu primarne strukture i subćelijske lokalizacije klasifikuju u tri klase unutar superporodice hem-peroksidaza (Hiraga i sar., 2001; Passardi i sar., 2005). Peroksidaze klase I su intracelularne i ova klasa deli se na 3 grupe: askorbat peroksidaze, citohrom c peroksidaze i katalaza-peroksidaze (Hiraga i sar., 2001). Njihova primarna uloga je uklanjanje  $H_2O_2$  unutar ćelije, naročito u hloroplastima i citosolu (Shigeoka i sar., 2002; Passardi i sar., 2007). Peroksidaze klase II obuhvataju sekretorne peroksidaze gljiva- lignin peroksidaze i mangan-zavisne peroksidaze (Hiraga i sar., 2001). Biljne peroksidaze klase III su specifične biljne peroksidaze koje se izlučuju u ćelijski zid ili transportuju u vakuole (Passardi i sar., 2004; Veljović Jovanović i sar., 2018). Geni koji kodiraju peroksidaze klase III formiraju veliku multigensku porodicu (Tognolli i sar., 2002; Veitch, 2004; Passardi i sar., 2005) koja je prisutna kod svih kopnenih biljaka, ali je nema kod jednoćelijskih zelenih algi (Passardi i sar., 2005). Pojava ovih peroksidaza može se povezati sa prilagođavanjem biljaka na kopneni život u uslovima povišene koncentracije kiseonika (Passardi i sar., 2005). Katalitička aktivnost peroksidaza klase III direktno zavisi od protoporfirinskog IX prstena sa centralnim jonom gvožđa Fe(III), kao i od dva strogo konzervirana aminokiselinska ostatka (distalni arginin i histidin) (Passardi i sar., 2005).

Peroksidaze ispoljavaju funkcionalnu fleksibilnost kroz tri različita katalitička ciklusa; u standardnom peroksidativnom ciklusu, enzimi koriste  $H_2O_2$  za oksidaciju donatorskih molekula kao što su fenolna jedinjenja, indoli, amini, prekursori lignina ili auksin, stvarajući fenoksil radikale koji se dalje polimerizuju ili regenerišu pomoću askorbata (Hiraga i sar., 2001; Passardi

i sar., 2004, 2007); oksidativni ciklus, gde u odsustvu  $H_2O_2$ , peroksidaze mogu generisati superoksidni radikal i oksidacijom NADH ili fenola, što je važno za procese poput lignifikacije (Veljović Jovanović i sar., 2018); hidroksilni ciklus, koji omogućava stvaranje visoko reaktivnog hidroksilnog radikala, koji učestvuje u kontrolisanom slabljenju ćelijskog zida neophodnom za izduživanje ćelija (Veljović Jovanović i sar., 2018).

Pored antioksidativne odbrane, POD grupe III su uključeni ugotovo sve faze razvića biljaka, od embriogeneze i klijanja do starenja, uključujući: formiranje i modifikacije ćelijskog zida (O'Brien i sar., 2012), zarastanje (suberizacija) oštećenih tkiva (Allison i Schultz, 2004), klijanje semena (Bellani i sar., 2002), oprašivanje (McInnis i sar., 2006), sazrevanje ploda (Pandey i sar., 2017a), starenje tkiva (Abarca i sar., 2001) i katabolizam hormona i pigmenata (Pandey i sar., 2017a; Liu i sar., 2018a). Većina peroksidaza ove grupe su sekretorni proteini koji se nalaze u apoplastu (gde mogu biti rastvorljivi ili jonski i kovalentno vezani za ćelijski zid) i u vakuolama.

U vakuolama i apoplastu, POD formiraju efikasan sistem za uklanjanje  $H_2O_2$  uz učešće askorbata i fenolnih jedinjenja (Takahama i Oniki, 1997). U ovom sistemu, fenoli se oksiduju do fenoksil radikala koji se zatim regenerišu pomoću askorbata, dok se produkti oksidacije askorbata (DHA) transportuju nazad u citosol na redukciju.

Kao odgovor na različite biotičke i abiotičke stresove (mehanička oštećenja, infekcija patogenima, teški metali, ozon), apoplastične POD se snažno indukuju i mogu delovati kao primarni izvor ROS-a, doprinoseći oksidativnom prasku (Almagro i sar., 2009; Gill i Tuteja, 2010). Ovakva brza produkcija ROS-a služi kao signal za aktivaciju odbrambenih gena i stvaranje strukturnih barijera koje ograničavaju širenje patogena (Van Loon i sar., 2006).

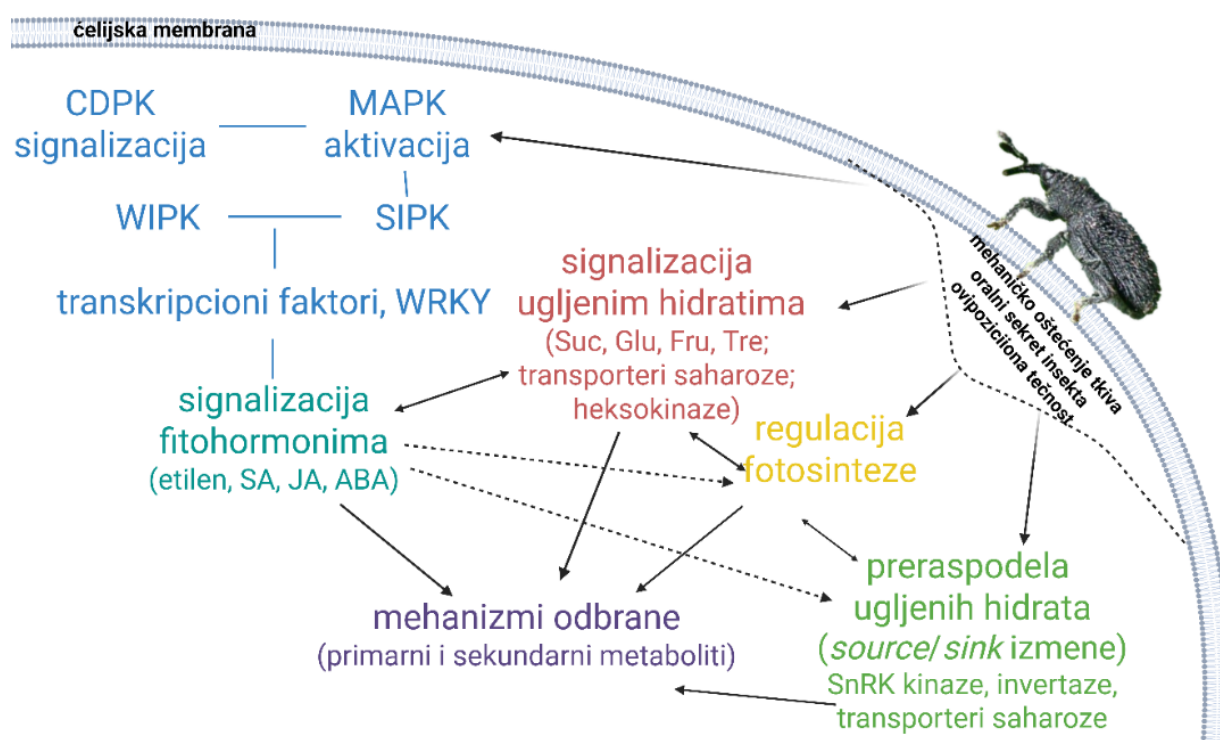
POD imaju značajnu ulogu u odgovoru biljaka na mehanički stres izazvan ishranom herbivora, kao i u procesima razvića gala. Njihova specifičnost ogleđa se u bifunkcionalnosti: one mogu istovremeno učestvovati u učvršćivanju ćelijskog zida i u generisanju ROS koje dovode do njegovog opuštanja (Passardi i sar., 2004; 2005). Napad herbivora uzrokuje mehanička oštećenja tkiva, na koja biljka odgovara aktivacijom peroksidaza radi odbrane i zaceljivanja (Hiraga i sar., 2001). POD učestvuju u deponovanju suberina u oštećenim tkivima, što sprečava prodor patogena i obnavlja integritet biljke (Hiraga i sar., 2001; Passardi i sar., 2004; 2005; Almagro i sar., 2009). Pokazano je da prekomerna aktivnost peroksidaza može učiniti biljna tkiva tvrdim za konzumaciju usled akumulacije lignina, što predstavlja zaštitni efekat protiv napada insekata (Dowd i sar., 2000). Ekspresija gena za peroksidaze regulisana je složenim signalnim putevima koji uključuju hormone poput JA, etilena i apscisinske kiseline (Allison i Schultz, 2004). Peroksidaze pripadaju grupi PR-9 proteina, koji se indukuju pri napadu patogena ili herbivora, dok porodica PR-6 proteina deluje kao inhibitor proteaza, direktno ometajući varenje herbivora i mikroorganizama (Almagro i sar., 2009; Dos Santos i Franco, 2023).

Nasuprot ulozi u učvršćivanju tkiva tokom herbivorije, u galama peroksidaze omogućavaju specifičnu ekspanziju i manipulaciju biljnim tkivom. Putem hidroksilnog ciklusa generišu hidroksilne radikale, koji kidaju polisaharidne veze (pektin, ksiloglukan) (Fry, 1998; Schweikert i sar., 2000; Liskay i sar., 2003; Passardi i sar., 2005) dovodeći do neenzimskog opuštanja zida i ireverzibilnog povećanja zapremine ćelija, što je neophodno za brzo rasteenje gala (Passardi i sar., 2005; Kukavica et al., 2009; Cosgrove, 2024). Peroksidaze su uključene i u procese organogeneze i diferencijacije ćelija (Hiraga i sar., 2001; Veljović Jovanović i sar., 2018), a direktno utiču na nivo auksina putem oksidativne dekarboksilacije, čime kontrolišu morfogenezu tkiva (Hiraga i sar., 2001; Passardi i sar., 2005). U ćelijskom zidu, enzim MnSOD dismutacijom superoksida obezbeđuje  $H_2O_2$  neophodan za funkcionisanje samih peroksidaza (Almagro i sar., 2009; Kukavica i sar., 2009).

## 1.4. Izmene primarnog metabolizma biljke kao odgovor na biotički stres

U svom prirodnom staništu, biljke su neprestano izložene mnogobrojnim i različitim insektima i drugim herbivorima, što indukuje razvoj složenih odbrambenih strategija kroz produkciju konstitutivnih i inducibilnih jedinjenja kako bi se umanjile posledice uticaja ovih biotičkih stresora. Osim aktiviranja metaboličkih puteva koji neposredno učestvuju u sintezi toksičnih i odbijajućih jedinjenja (sekundarnih metabolita) i antioksidanata, ovaj odgovor obuhvata i modulaciju fotosintetske aktivnosti, remobilizaciju ugljenika i azota, kao i promene u dinamici rastenja biljaka (Zhou i sar., 2015) (slika 13).

Ovaj preusmereni tok postiže se modulacijom nivoa ugljenih hidrata, aminokiselina i organskih kiselina, čime se obezbeđuju energija i prekursori neophodni za uspostavljanje rezistencije na infestaciju (Bolton, 2009; Zhou i sar., 2015; Zaynab i sar., 2019). Takve metaboličke promene doprinose povećanju adaptivne sposobnosti biljke kroz podsticanje reakcija povezanih sa odgovorom na stres, ali istovremeno nameću metaboličke troškove koji se odražavaju na rasteenje (Bolton, 2009; Caretto i sar., 2015).



**Slika 13.** Uticaj herbivorije na primarne i sekundarne biljne metabolite. Oštećenje biljnog tkiva izazvano mehaničkim povredama herbivora usled ishrane ili polaganja jaja, izaziva reorganizaciju primarnog metabolizma biljke-domaćina, uključujući izmenjenu signalizaciju fitohormonima, regulaciju fotosinteze i preraspodelu ugljenih hidrata od tkiva proizvođača asimilata (izvor tkiva) do tkiva potrošača asimilata (uvir tkiva). Prilagođeno iz: Schwachtje i Baldwin, 2008. Slika napravljena preko BioRender.com.

### 1.4.1. Fotosinteza u uslovima herbivorije i indukciji gala

Interakcija između biljaka i herbivora izaziva složene promene u fiziologiji biljke, posebno u procesu fotosinteze, pri čemu se primarni metabolizam biljke često preraspoređuje kako bi se resursi usmerili na odbranu ili formiranje specijalizovanih struktura poput gala (Kerchev i sar., 2012). Iako bi se moglo očekivati povećanje fotosintetske aktivnosti radi sinteze

nutritivenata i odbrambenih jedinjenja, u većini slučajeva herbivorije dolazi do smanjenja fiksacije ugljenika (Bilgin i sar., 2010; Kerchev i sar., 2012). Smanjenje fotosinteze nije samo posledica fizičkog oštećenja tkiva, već je i genetički programiran odgovor biljke na stres, gde biljka ciljano smanjuje ekspresiju gena povezanih sa fotosintezom. Smanjena fotosinteza tokom infestacije insektima povezana je sa fiziološkim dešavanjima kao što su redukovani vodni potencijal listova usled oštećenja vaskularnog sistema (Nabity i sar., 2009), pojačan gubitak vode na mestima oštećenja tkiva (Aldea i sar., 2005) i zatvaranjem stoma (Bueno i sar., 2009). Merenja razmene gasova u kombinaciji sa metodama koje koriste modulisanu fluorescenciju hlorofila pokazala su da u određenim interakcijama biljka–insekt smanjenje stope fotosinteze ne nastaje zbog smanjene dostupnosti CO<sub>2</sub> ili izmenjenim reakcijama svetle faze fotosinteze, već zbog smanjenih stopa fiksacije CO<sub>2</sub> u tamnoj fazi pri Kalvinovom ciklusu (Gutsche i sar., 2009). Ovo ukazuje da je dinamika fotosinteze povezana sa aktivnošću ribulozo-1,5-bisfosfat karboksilaze/oksigenaze (Rubisco) ili sa regeneracijom ribulozo-bisfosfata. U primeru određenih insekata koji se hrane floemskim sokom može doći do nakupljanja ugljenih hidrata u listovima što dodatno inhibira fotosintezu modifikacijom ekspresije fotosintetskih gena (Lin i sar., 2000).

U slučaju galogeneze, većina gala se opisuje kao fotosintetski deficitarna, i ove tvorevine su potrošači proizvoda fotosinteze (uviri), izvlačeći fotoasimilate iz okolnih listova putem novouspostavljenih vaskularnih snopića (Dorchin i sar., 2009). Pokazano je da gale imaju drastično manji sadržaj hlorofila u poređenju sa neinfestovanim listovima (Castro i sar., 2012). Kod nekih tipova gala, kao što su gale na *Litsea acuminata* koje indukuje mušica *Bruggmanniella* sp., nivoi hlorofila i karotenoida su svedeni na samo 2% u odnosu na vrednosti u intaktnim tkivima, a stome potpuno odsustvuju (Huang i sar., 2015). Ipak, spoljašnji zeleni slojevi gale održavaju minimalnu ali funkcionalnu fotosintetsku aktivnost čime se obezbeđuje produkcija O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub>, sprečava hipoksija i hiperkarbija, i omogućava preživljavanje larve (Haiden i sar., 2012; Carneiro i sar., 2017). U tkivu gala često postoji specifičan raspored hloroplasta, gde su ove organele najgušće raspoređene u spoljašnjim slojevima izloženim svetlosti, dok ih u unutrašnjim slojevima idući ka larvi ima manje (Huang i sar., 2015). Fotosinteza u tkivu gale doprinosi sopstvenom izvoru energije i ugljenika, čime se smanjuje negativan uticaj gale kao uvira na biljku domaćina i ublažava kompeticija između više gala na bliskom prostoru (Haiden i sar., 2012). U galama na listovima lipe, indukovanim delovanjem *Eriophyes tiliae*, zabeležena je snažna inhibicija fotosintetske aktivnosti (Morina i sar., 2025), gde je analiza fluorescencije hlorofila (OJIP test) pokazala smanjenje maksimalnog kvantnog prinosa PS II, kao i smanjenu efikasnost transporta elektrona u poređenju sa intaktnim tkivom lista. Takođe, u istom istraživanju pokazano je da su hloroplasti u nutritivnom tkivu razvijenih gala dezorganizovani i da sadrže brojna skrobna zrnca (Morina i sar., 2025), a analizom transkriptoma je potvrđena smanjena ekspresija gena povezanih sa funkcijom hloroplasta i regulacijom procesa fotosinteze, dok je pad nivoa lipida tilakoidnih membrana (fosfatidilglicerola) u skladu sa strukturnim propadanjem hloroplasta.

Takođe, nekoliko studija je pokazalo inhibiciju procesa fotosinteze nakon ovipozicije insekata čak i kada su jaja položena na površinu lista bez oštećenja biljnog tkiva (Schröder i sar., 2005; Velikova i sar., 2010), što ukazuje da je smanjenje stope fotosinteze odgovor biljke na percepciju stresa, a ne sekundarni efekat oštećenja tkiva (Kerchev i sar., 2012).

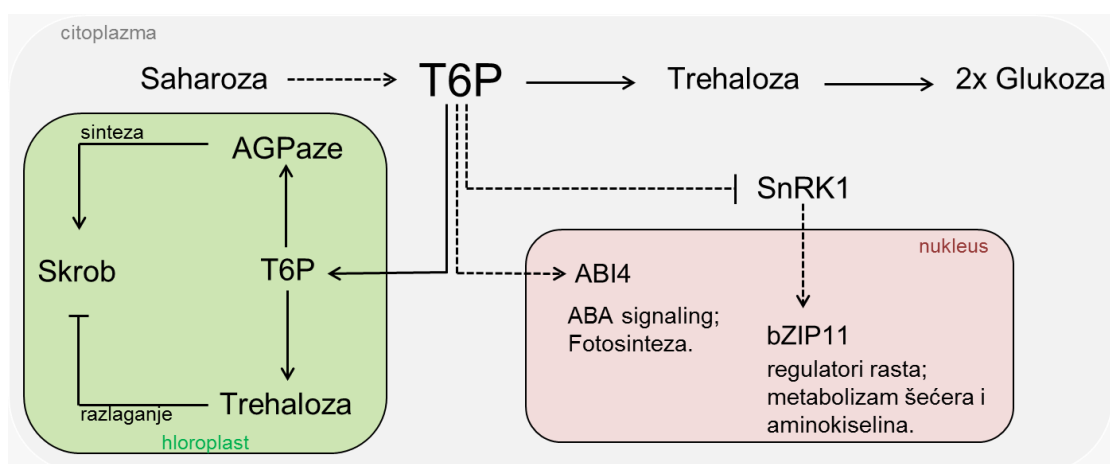
Proces galogeneze predstavlja prelazak biljnog tkiva iz autotrofnog (proizvođačkog) u pretežno heterotrofno (potrošačko) stanje. Dok herbivorija generalno smanjuje stopu fotosinteze kroz gensko reprogramiranje, unutar samih gala se zadržava niža fotosintetska aktivnost prvenstveno radi održavanja unutrašnje homeostaze gasova i podrške energetskim potrebama larve u razviću.

## 1.4.2. Ugljeni hidrati

Život na Zemlji neraskidivo je povezan sa fotosintetskom konverzijom svetlosne energije u hemijsku, skladištenu u obliku energetski bogatih molekula ugljenih hidrata (šećera), uz istovremeno oslobađanje kiseonika. Biljke, kao autotrofni organizmi, sastoje se od tkiva koja prave šećere (tkiva proizvođači asimilata) i tkiva koja ih troše ili skladište (tkiva potrošači asimilata), čime se uspostavlja kompleksna dinamika asimilacije neorganskog ugljenika i zadovoljenja energetskih potreba organizma (Smith i sar., 2018; Hennion i sar., 2019). Svojom ulogom izvora energije i ugljenika, i svojim regulatornim funkcijama, šećeri utiču na sve faze životnog ciklusa biljaka, stupajući u interakciju sa drugim signalnim molekulima i fitohormonima (Rolland i sar., 2006; Smeekens i sar., 2010; Ciereszko, 2018). Nivoi šećera, njihov transport, korišćenje i skladištenje, su precizno regulisani i zavise od fiziološke aktivnosti ćelije, tipa organa, cirkadijalnog ritma, razvojnog stadijuma biljke, uslova okoline a naročito od fluktuacija svetlosti u okruženju (Lemoine i sar., 2013).

Rastvorljivi ugljeni hidrati, pre svega saharoza, glukoza i fruktoza, učestvuju u antioksidativnom odgovoru biljaka kroz složenu mrežu metaboličkih puteva, signalizacije i direktnih hemijskih reakcija (Couée i sar., 2006; Bolouri-Moghaddam i sar., 2010). Šećeri doprinose antioksidativnoj odbrani na nekoliko načina: uključeni su u oksidativni pentozo-fosfatni put, koji predstavlja glavni izvor redukujuće snage u obliku NADPH (Couée i sar., 2006); glukoza služi kao prekursor u biosintezi važnih antioksidanata, među kojima su askorbat, karotenoidi i aminokiseline koje ulaze u sastav glutationa (Linster i sar., 2008; Bolouri-Moghaddam i sar., 2010); deluju i kao signalni molekuli, aktivirajući specifične transdukcione puteve i menjajući ekspresiju gena uključenih u odbranu od oksidativnog stresa. Tako, na primer, saharoza može indukovati ekspresiju gena za SOD, kao i gena uključenih u sintezu flavonoida i antocijanina (Koch, 2004; Couée i sar., 2006).

Pored svoje metaboličke uloge, šećeri (trehaloza i trehalozo-6-fosfat, T6P) takođe mogu delovati i kao signalni molekuli koji moduliraju mnoge važne metaboličke i razvojne procese u biljkama, sa sve više istraživanja koja ukazuju da T6P igra centralnu ulogu u regulisanju metabolizma ugljenih hidrata (Figueroa i Lunn, 2016; Fichtner i Lunn, 2021; Kerbler i sar., 2023) (slika 14).



**Slika 14.** Uloga trehaloze i T6P u metabolizmu ugljenih hidrata. T6P ima centralnu ulogu u regulisanju metabolizma šećera u biljkama. Prekursori T6P potiču iz metabolizma saharoze. Pretpostavlja se da se T6P nepoznatim mehanizmom transportuje u plastide gde indukuje sintezu skroba putem aktivacije AGPaze posredovane tioredoksinom. T6P se može pretvoriti u trehalozu, za koju se pokazalo da reguliše razgradnju skroba u plastidima. SnRK1, koji ograničava rastenje biljaka, inhibira T6P. Predložena regulatorna petlja (uključuje T6P, SnRK1 i bZIP11) smatra se da kontroliše dostupnost i korišćenje saharoze. Prilagođeno iz Ponnu i Schmid, 2011.

Uloga T6P u metabolizmu ugljenih hidrata neodvojiva je od širih regulatornih procesa, jer svi eukarioti poseduju dve važne regulatorne mreže koje modifikuju odgovore na promene u hranljivom i energetsom statusu. Kinaze SnRK1 (SNF1-related protein kinase 1) i TOR (TARGET OF RAPAMYCIN) predstavljaju centralne regulatore koji povezuju rastenje i razviće sa energetsom statusom ćelije (Smeeken i sar., 2010; Morales-Herrera i sar., 2024; Feng i sar., 2025). Dok biljni TOR podstiče rastenje kao odgovor na visok nivo šećera (Deprost i sar., 2007; Rawat i Laxmi, 2024), SnRK1 je posebno aktivan u slučaju nedostatka šećera, gde T6P može inhibirati aktivnost protein kinaze SnRK1 (Van Leene i sar., 2022). Ovi sistemi su aktivni tokom celog životnog ciklusa i neophodni su za opstanak biljaka u uslovima stresa (Baena-González i Lunn, 2020).

Novi koncepti „slatkog imuniteta“ (eng. *sweet immunity*) i „slatkog prajminga“ (eng. *sweet priming*) predstavlja šećere kao ključne prajming molekule, koji utiču na otpornost biljaka na biotičke i abiotičke stresove (Bolouri Moghaddam i Van den Ende, 2012; 2013; Svava i sar., 2020).

Metabolizam ugljenih hidrata je veoma dinamičan proces, gde se metabolički tokovi i koncentracije šećera stalno menjaju kako tokom rastenja i razvića, tako i pri odgovoru na dnevne promene i stresove iz okruženja (Roitsch, 1999; Bläsing i sar., 2005; Chen i sar., 2010; Keunen i sar., 2013). Šećeri, osim što su glavni supstrati koji se koriste u procesima ćelijskog disanja, obezbeđuju i neophodan ugljeni skelet za biosintezu odbrambenih jedinjenja (sekundarnih metabolita) kao što su flavonoidi, stilbeni i lignini (Nabavi i sar., 2020; Jeandet i sar., 2021). Pored toga, specifični šećeri, kao što su saharoza, glukoza, fruktoza i trehaloza, deluju kao metabolički signalni molekuli, koji indukuju ekspresiju mnogih biljnih odbrambenih gena, omogućavajući biljci da balansira između procesa rastenja i odbrane (tzv. *growth-defense trade-off*) (He i sar., 2022). Na taj način, šećeri postaju ključni medijatori koji integrišu informacije o energetsom statusu ćelije sa molekularnim odgovorima na stresne faktore iz spoljašnje sredine.

Biljke poseduju metabolički aparat koji omogućava konverziju asimilata u širok spektar strukturnih i nestrukturnih ugljenih hidrata. Strukturni šećeri se sastoje od dugolančanih molekula (celuloza i hemiceluloza), koji znatno doprinose biljnoj biomasi i ćelijskoj strukturi (Hartmann i Trumbore, 2016). Nestrukturni (rastvorljivi) šećeri obuhvataju monosaharide (trioze, tetraoze, pentoze i heksoze), disaharide (poput saharoze, maltoze i trehaloze), oligosaharide (rafinoza i stahioza) i polisaharide (skrob i fruktani, npr inulin). Šećerni alkoholi (polioli) su derivati šećera koji uključuju inozitol, sorbitol, manitol i galaktitol (Dong i Beckles, 2019; Sharma i sar., 2019). Monosaharidi glukoza i disaharid saharoza su metaboliti uključeni u regulaciju različitih fizioloških funkcija, uključujući rastenje i razviće biljaka, predstavljaju izvor energije, kao i prekursore za različite metaboličke puteve (npr. aminokiselina, šećernih alkohola, nukleotida i biosinteze lipida); komponente su strukturnih blokova, signalnih molekula i osmoprotektanti u uslovima stresa (Braun i sar., 2014; Hennion i sar., 2019). Trehaloza je disaharidni šećer ( $\alpha$ -D-glukopiranozil-[1,1]- $\alpha$ -D-glukopiranozid) i može da funkcioniše kao osmolit koji održava integritet membrane, uklanja ROS i štiti strukturu proteina (Elbein i sar., 2003; Suprasanna i sar., 2016; Zulfiqar i sar., 2020). Trehalozo-6-fosfat (T6P) je metabolit uključen u regulaciju fotosinteze, metabolizma šećera i odgovora na stimuluse iz okoline (Elbein i sar., 2003; Jain i Roy, 2009; Ponnu i sar., 2011; Fernandez i sar., 2010; O'Hara i sar., 2013). Ćelijski nivo T6P je direktno proporcionalan koncentraciji saharoze i T6P može da deluje kao endogeni stimulan, kao i da reguliše nivo saharoze putem mehanizma negativne povratne sprege (Sakr i sar., 2018) (slika 14).

Kada su biljke izložene napadu herbivora, dolazi do značajnog reprogramiranja ćelija. Infestirana biljna tkiva prelaze iz statusa tkiva koja proizvode energiju u status tkiva koja troše energiju za odbranu (Bolton, 2009). Ovaj prelaz je praćen smanjenjem fotosinteze i povećanom

aktivnošću određenih enzima (invertaze u ćelijskom zidu) (Roitsch i sar., 2003). Invertaza razlaže saharozu na glukozu i fruktozu, koje se zatim transportuju u ćeliju kako bi zadovoljili povećani energetska zahtevi odbrambenog odgovora na biotički stres (Liu i sar., 2025). Pored svoje uloge kao izvora energije za biosintezu odbrambenih molekula, glukoza i fruktoza deluju i kao metabolički signali, gde njihova povećana koncentracija može direktno indukovati ekspresiju gena povezanih sa odbranom i smanjiti stopu fotosinteze (Smeekens, 2000). Enzimi senzori, poput heksokinaza, prepoznaju ove metaboličke promene i mogu regulisati procese kao što je programirana ćelijska smrt, čime se direktno povezuje primarni metabolizam sa odbrambenim odgovorom biljke (Kim i sar., 2006). U borbi protiv herbivora, biljke često koriste strategiju poznatu kao „sekvestracija resursa”, što podrazumeva brzo preusmeravanje ugljenih hidrata i azota iz oštećenih tkiva u bezbednije delove biljke (Schwachtje i sar., 2006; Robert i sar., 2014). Ovakva realokacije resursa ima dvostruku ulogu; sa smanjenjem nutritivne vrednosti tkiva herbivori se izgledaju, a resursi se čuvaju za kasniji rast i regeneraciju (Millard i Grelet, 2010). Tokom infestacije afidama (biljne vaši) primećeno je da se količina trehaloze povećava, i to deluje kao signal koji reguliše ekspresiju odbrambenih gena (poput *PAD4*) i podstiče skladištenje ugljenih hidrata u vidu skroba (Singh i sar., 2011).

Metabolizam ugljenih hidrata tokom razvića gale karakteriše se transformacijom galoznog tkiva u metaboličko čvorište koje aktivno manipuliše resursima biljke-domaćina (Kanwar i Jha, 2019; Breia i sar., 2021). Rana faza razvića gale karakteriše se značajnim porastom signalnog molekula T6P i akumulacijom trehaloze. Trehaloza u ovoj fazi verovatno ima signalnu ulogu u diferencijaciji ćelija i preraspodeli ugljenih hidrata (Foster i sar., 2003; Iturriaga i sar., 2009). T6P deluje kao važan regulator ćelijskog ciklusa i biosinteze ćelijskog zida, inhibirajući SnRK1 kinazu i tako usklađujući metabolizam biljke sa energetskim potrebama u uslovima biotičkog stresa (Zhang i sar., 2009; Ponnu i sar., 2011; Han i sar., 2024). Dok SnRK1 funkcioniše kao senzor energetskog deficita (gladovanja) koji potiskuje biosintetske procese, njegova inhibicija putem T6P zaobilazi regulatorne mehanizme biljke, indukujući anaboličke puteve i deobe ćelija uprkos biotičkom stresu. Na taj način se primarni metabolizam preusmerava na rast tkiva gale i ishranu larve.

Pokazano je da tokom razvića gale dolazi do nakupljanja heksoza (Granot i sar., 2013), što može biti rezultat povećane aktivnosti invertaza (Rehill i Schultz, 2003; Oliveira i sar., 2010). Akumulirane heksoze u nutritivnom tkivu gale ne služe samo kao izvor energije, već imaju i važnu signalnu ulogu preko heksokinaza (Granot i sar., 2013). Kod *Arabidopsis* heksokinaza AtHXK1 funkcioniše kao senzor glukoze koji, nezavisno od svoje katalitičke funkcije, u nukleusu direktno suprimira ekspresiju fotosintetskih gena kao što su *RbcS* i *Cab* (Cho i sar., 2006; Granot i sar., 2013; 2014). Ova represija fotosintetskog aparata, uz uočeno smanjenje hlorofila i karotenoida, čini razvoj gale u potpunosti zavisnim od priliva fotoasimilata iz listova preko floema (Carneiro i sar., 2014; Jiang i sar., 2018).

Uporedo sa povećanom aktivnošću invertaza ćelijskog zida, koje hidrolizuju saharozu u apoplastu, detektovana je i povećana ekspresija transportera iz porodice *SWEET* i heksoznih transportera kao što su *STP13* (kod *Arabidopsis*) ili *VvHT5* (kod vinove loze) (Tauzin i Giardina, 2014; Kanwar i Jha, 2019; Breia i sar., 2021). Ovi transporteri funkcionišu sinergijski sa invertazama: dok enzimi hidrolizuju saharozu, transporteri omogućavaju aktivan unos nastalih heksoza u ćelije gale (Breia i sar., 2021). Ovaj mehanizam ne samo da obezbeđuje neophodnu energiju za hiperplaziju i razviće larve, već i dodatno pojačava snagu uvira galoznog tkiva, čime se domaćin lišava resursa koji bi inače bili usmereni na njegovo rasteenje i reprodukciju (Tauzin i Giardina, 2014; Breia i sar., 2021).

Visoka metabolička aktivnost u galama često rezultira ubrzanom potrošnjom ugljenih hidrata na rasteenje i respiraciju, usled čega u mnogim tipovima gale izostaje skladištenje skroba (Castro i sar., 2012; Carneiro i Isaias, 2015; Huang i sar., 2015; Ferreira i sar., 2019; Staszak i sar.,

2023). Nasuprot tome, skrob kao rezerva ugljenika akumulira se u galama formiranim na korenu vinove loze (Griesser i sar., 2015) i galama na listovima (de Oliveira i dos Santos Isaias, 2010). Ipak, značajan deo ugljenika se preusmerava na restrukturiranje ćelijskog zida jer tokom razvića gale dolazi do *de novo* vaskularizacije i taloženja lignina i ksilana u ćelijske zidove, što obezbeđuje mehaničku zaštitu larvi unutar gale (Markel i sar., 2024). Kod nekih galikolnih insekata, ovaj proces uključuje i aktivaciju gena poput onih za celulaze i pektin liaze, hidrolitičke enzime koji razgrađuju ćelijski zid (Hearn i sar., 2019).

Nedavna istraživanja ukazuju na to da insekti ne utiču na formiranje bilo kakvog uvir tkiva u vidu gale, već efektorskim molekulima reprogramiraju biljno tkivo tako da ono oponaša razviće plodova ili semenki (Schultz i sar., 2019). Aktivacija reproduktivnih genetičkih programa, uključujući gene poput *AGAMOUS* i *SEPALLATA*, omogućava insektu da iskoristi prirodno jake mehanizme biljke za akumulaciju hranljivih materija koji su inače rezervisani za reproduktivne organe (Schultz i sar., 2019).

Takođe, akumulacija turanoze pokazuje korelaciju sa fazama razvića gale i može biti povezana sa indukcijom biosinteze auksina, hormona ključnog za deobe i rasteenje ćelija (Gonzali i sar., 2005; Oliveira i sar., 2016). Pored manipulacije biljnim hormonima, neki galikolni insekti poseduju i sopstvene metaboličke puteve za sintezu auksina, čime direktno preuzimaju kontrolu nad fiziologijom i razvićem biljke-domaćina (Suzuki i sar., 2014).

### 1.4.3. Aminokiseline

Aminokiseline (AK) predstavljaju osnovne metaboličke jedinice čiji je stalan metabolizam neopohodan za održavanje organizma u životu; obezbeđuju gradivne blokove, energiju i redukcionu potencijal za procese rasteenja, razvića i reprodukcije. Pored njihove primarne uloge u biohemijskim reakcijama, AK i njihovi metabolički intermedijeri funkcionišu kao signalni molekuli koji omogućavaju biljkama odgovor na dinamične faktore spoljašnje sredine (Rodziewicz i sar., 2014; Heinemann i Hildebrandt, 2021). Strukturno, aminokiseline su organska jedinjenja koja sadrže primarnu amino grupu ( $-NH_3^+$ ) i karboksilnu grupu ( $-COO^-$ ) vezane za  $\alpha$ -atom ugljenika ( $\alpha$ -AK). Među više od 300 AK nađenih u prirodi, samo njih 20 ( $\alpha$ -AK) služe kao gradivni blokovi proteina.

Pored svoje uloge kao konstituenata proteina, aminokiseline učestvuju u brojnim ćelijskim reakcijama i utiču na fiziološke procese kao što su signalizacija (npr. uloga serina i fenilpropanoida dobijenih od fenilalanina), regulacija unutarćelijske pH vrednosti, stvaranje metaboličke energije i otpornost na abiotički i biotički stres (Zeier, 2013; Fagard i sar., 2014; Galili i sar., 2014; Häusler i sar., 2014; Pratelli i Pilot, 2014). Tokom infekcije patogenima, AK predstavljaju ključni izvor azota za biotrofne patogene (Solomon i sar., 2003; Rico i Preston, 2008) i služe kao prekursori u sintezi odbrambenih sekundarnih jedinjenja, poput glukozinolata i alkaloida (Häusler i sar., 2014).

Metabolizam azota u biljkama neraskidivo je vezan za AK, pa su njihova biosinteza, degradacija i transport strogo regulisani procesi (Pratelli i Pilot, 2014; Hildebrandt i sar., 2015). Sintaza glutamina je jedini put koji omogućava asimilaciju neorganskog azota u organske molekule. Postoji jasna subćelijska kompartmentalizacija ovih procesa: dok se biosinteza većinom odvija u plastidima i hloroplastima (gde su dostupni ATP i redukciona snaga), katabolički putevi su primarno lokalizovani u mitohondrijama i citosolu (Hildebrandt i sar., 2015). Aromatične aminokiseline (triptofan, fenilalanin i tirozin) sintetišu se u hloroplastima (Maeda i Dudareva, 2012; Yoo i sar., 2013). Aminokiseline razgranatog lanca (leucin, izoleucin, valin), aminokiseline izvedene iz asparaginske kiseline (treonin, metionin, lizin) i histidin sintetišu se u plastidima (Binder, 2010; Jander i Joshi, 2010; Ingle, 2011). Veći deo puta sinteze

arginina takođe je lokalizovan u hloroplastu (Slocum, 2005). Ostale AK se sintetišu u različitim ćelijskim odeljcima uz učešće specifičnih izoenzima (Ribeilli i Douce, 1998; Ho i Saito, 2001; Hawkesford i De Kok, 2006).

Aminokiseline imaju višestruku i kompleksnu ulogu u interakciji između biljaka i insekata, služeći i kao osnovni gradivni blokovi za sintezu proteina i kao ključni prekursori za brojne primarne i sekundarne metabolite uključene u rastenje, razviće i odbranu (Zhou i sar., 2015). One predstavljaju glavni oblik azota koji se nalazi u biljkama, a kako je azot ključni ograničavajući nutrijent za fitofagne insekte, njihov metabolizam direktno određuje kvalitet ishrane herbivora (Yang i sar., 2020).

Kada su napadnute herbivorima, biljke pojačavaju biosintezu specifičnih aminokiselina, prvenstveno triptofana i metionina (Appel i sar., 2014), kako bi proizvele sekundarne metabolite kao što su glukozinolati ili alkaloidi koji služe za direktnu odbranu (Halkier i Gershenzon, 2006). Međutim, tokom formiranja gala, ovaj metabolički put se menja u skladu sa hipotezom o nutrijentima, prema kojoj ove strukture akumuliraju značajno veće koncentracije slobodnih aminokiselina kako bi se obezbedila optimalna ishrana za larve insekata (Zhou i sar., 2015). Ova akumulacija je direktna posledica sposobnosti galikolnih insekata da manipulišu ekspresijom biljnih gena, tako što povećaju nivoe esencijalnih aminokiselina koje sami ne mogu da sintetišu (Lu i sar., 2021).

Među njima se posebno izdvaja triptofan, koji pored nutritivne vrednosti služi i kao ključni prekursor za sintezu auksina, fitohormona čija visoka koncentracija u galama podstiče abnormalnu hiperplaziju i rastenje biljnog tkiva (Zhou i sar., 2015). S druge strane, asparagin je ključan za efikasan transport i skladištenje azota u tkivima koja se aktivno razvijaju, zahvaljujući svojoj visokoj mobilnosti i stabilnosti (Zhou i sar., 2015).

Pored uloge u ishrani i rastenju, aminokiseline pružaju i vitalnu zaštitu od stresa; na primer, visoka koncentracija prolina u galama može zaštititi insekte od ROS-a i potencijalnih odbrambenih odgovora biljke, poput rane nekroze tkiva (Zhou i sar., 2015).

Aminokiseline u biljkama imaju višestruku ulogu, ne samo kao osnovni gradivni blokovi proteina, već i kao direktni antioksidanti i prekursori za sintezu različitih sekundarnih metabolita koji štite biljku od oksidativnog stresa (Xu i sar., 2017; Trovato i sar., 2021).

Dosadašnja istraživanja izdvojila su nekoliko aminokiselina koje poseduju značajan ukupni antioksidativni kapacitet zbog specifičnih struktura njihovih bočnih lanaca (Milić i sar., 2015; Xu i sar., 2017). Prema rezultatima Milić i sar. (2015), redosled aminokiselina prema njihovoj sposobnosti uklanjanja hidroksilnog radikala je sledeći: triptofan (Trp) > fenilalanin (Phe), leucin (Leu) > izoleucin (Ile) > histidin (His) > arginin (Arg) > valin (Val) > lizin (Lys), tirozin (Tyr), prolin (Pro) > glutamin (Gln), treonin (Thr), serin (Ser) > glutamat (Glu), alanin (Ala), glicin (Gly), asparagin (Asn), aspartat (Asp). Aminokiseline sa sumporom (cistein i metionin) se lako oksiduju jer atom sumpora u njihovim bočnim lancima ima dva slobodna elektronska para i relativno je velik. Aromatične aminokiseline (triptofan i tirozin) sadrže aromatične prstenove bogate elektronima koji ih čine podložnim napadu oksidanata. Tirozin ima benzenski prsten aktiviran hidroksilnom grupom koja donira elektrone, dok triptofan sadrži pirolov prsten. Aminokiseline sa azotom u bočnom lancu (histidin, lizin i arginin) se takođe lako oksiduju jer atom azota poseduje jedan slobodan elektronski par, što ih čini metama za oksidante. Nasuprot njima, aminokiseline poput glicina, alanina, valina, leucina i fenilalanina imaju stabilne bočne lance i pokazuju nizak ili nikakav direktni antioksidativni kapacitet.

Aromatične aminokiseline (fenilalanin, tirozin i triptofan) služe kao prekursori antioksidativnih sekundarnih metabolita koji su uključeni u odbranu biljaka od abiotiskog i biotičkog stresa (Parthasarathy i sar., 2018). Fenilalanin i tirozin se metabolišu u *p*-kumaril-CoA, koji se dalje koristi za sintezu antioksidanata kao što su flavonoidi, izoflavonoidi,

antocijanini i stilbeni. Tirozin je prekursor za sintezu tokoferola, koji su esencijalni antioksidanti rastvorljivi u mastima i štite biljne membrane. Triptofan je prekursor za ove regulatore rastenja koji se sintetisu kao odgovor na stresove poput suše, visokog saliniteta i ekstremnih temperatura, delujući kao zaštita ćelija.

## 1.5. Sekundarni metabolizam i strukturalna odbrana u odgovoru na biotički stres – fenolna jedinjenja i lignifikacija kao barijera

Sposobnost biljaka da sintetisu više od 200.000 specijalizovanih metabolita nastala je kao evolutivni odgovor na određene ekološke izazove, naročito na koegzistenciju tokom nekoliko stotina miliona godina sa biotičkim stresorima (Gatehouse, 2002; Pichersky i Lewinsohn, 2011; Labandeira i Wappler, 2023). Biljke poseduju izuzetnu sposobnost sinteze skoro neiscrpnog spektra metabolita, stvarajući bogat rezervoar odbrambenih jedinjenja različitih hemijskih klasa, uključujući terpenoide, alkaloidne i fenolne derivate (Mithöfer i Boland, 2012). Strukturalna raznolikost ovih molekula ukazuje na postojanje različitih ciljnih mesta na koje biljna odbrana treba da reaguje. Identifikovan je veliki broj specijalizovanih jedinjenja sa potvrđenom ulogom u odbrani biljaka od insekata biljojeda i drugih artropoda, ali njihovi precizni mehanizmi delovanja na molekularnom nivou, kao i srodne ciljne strukture, ostaju nedovoljno razjašnjeni. Smatra se da njihova aktivnost obuhvata oštećenje ćelijskih membrana, ometanje transporta hranljivih materija i jona, inhibiciju signalnih puteva, poremećaje u metabolizmu ili narušavanje hormonske regulacije fizioloških procesa (Wittstock i Gershenzon, 2002; Mithöfer i sar., 2009; Mithöfer i Boland, 2012; Erb i Reymond, 2019; Mahanta i sar., 2025).

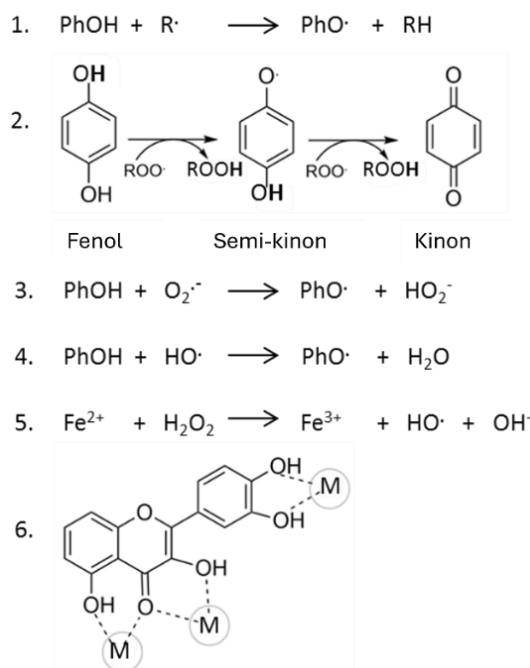
### 1.5.1. Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja su široko rasprostranjena i raznovrsna grupa sekundarnih metabolita, sa različitim funkcijama u rastenju i razviću biljaka, kao i pri interakcijama biljaka sa životnom sredinom (Cheynier i sar., 2013; Lattanzio i sar., 2006; Michalak, 2006; Agati i Tattini, 2010). Sadrže aromatični prsten (C6), koji nosi jednu ili više hidroksilnih (-OH) grupa, uključujući i funkcionalne derivate (estre, metil etre, glikozide, itd.). Na osnovu svoje hemijske strukture (fenilpropanoidna jedinica, C6-C3), prirodna fenolna jedinjenja se mogu klasifikovati na: hidroksibenzoeve kiseline (HBA, C6-C1), hidroksicimetne kiseline (HCA, C6-C3), kumarine (C6-C3), flavonoide (C6-C3-C6), proantocijanidine [(C6-C3-C6)<sub>n</sub>], stilbene (C6-C2-C6), lignane (C6-C3-C3-C6) i lignine [(C6-C3)<sub>n</sub>]. Na osnovu stepena oksidacije i zasićenja prisutnih u C3 elementu (C prsten), flavonoidi se dalje dele u sledeće grupe: flavoni, flavon-3-oli, flavanoni, flavanoli, izoflavoni, halkoni i antocijanidini (Marais i sar., 2006). Većina flavonoida i hidroksicimetnih kiselina u biljnim ćelijama je glikozilovana (Falcone Ferreyra i sar., 2012). Glikozilacija ovih jedinjenja je od presudnog značaja jer se dodavanjem šećernih grupa modifikuju njihova rastvorljivost i hemijska reaktivnost, čime se omogućava njihov pravilan transport i stabilno skladištenje, kao i precizna interakcija sa specifičnim ćelijskim metama radi ostvarivanja bioloških funkcija (Le Roy i sar., 2016; Slámová i sar., 2018).

Biosinteza fenolnih jedinjenja predstavlja najbolje opisan put biosinteze sekundarnih metabolita (Winkel, 2004; Vogt, 2010; Falcone i sar., 2012; Davies i sar., 2020; Hasanuzzaman i sar., 2020; Marchiosi i sar., 2020). Polazna tačka biosinteze fenola je šikimatni put, ključna veza između primarnog i sekundarnog metabolizma. Ovaj put usmerava ugljenik iz glikolize (u obliku fosfoenolpiruvata, PEP) i iz reduktivnog pentozofosfatnog puta (u obliku eritroza 4-fosfata,

E4P), ka sintezi aromatičnih jedinjenja. Fenilalanin i tirozin dobijeni iz horizmata (konačni proizvod na putu šikimata) su prekursori za sva fenolna jedinjenja (Vogt, 2010). Prvi korak biosinteze fenilpropanoide iz fenilalanina je katalizovan fenilalanin-amonijak liazom (PAL), čiju ekspresiju regulišu različiti biotički i abiotički stresori (Boerjan i sar., 2003; Huang i sar., 2010). Nakon biosinteze, fenolna jedinjenja se transportuju u vakuolu ili apoplast (Kitamura, 2006; Petrusa i sar., 2013; Zhao, 2015a).

Hemijski, fenolna jedinjenja mogu da uklanjaju slobodne radikale prenosom atoma vodonika (H) sa svojih OH grupa na slobodne radikale (slika 15). Povećana stabilnost formiranog fenoksil-radikala pripisuje se prvenstveno delokalizaciji elektrona i postojanju nekoliko rezonantnih oblika. Sa povećanjem stabilnosti formiranog fenoksil-radikala, povećava se mogućnost serija reakcija koje dovode do prekida procesa nastanka slobodnih radikala (Heim i sar., 2002). Fenolna jedinjenja mogu da reaguju sa peroksi-radikalima (ROO·), hidroksi-radikalima (OH·) i superoksidnim anjonskim-radikalima (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) (slika 15). Reakcija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sa prelaznim metalima u Fentonovoj reakciji (slika 15) dovodi do stvaranja izuzetno reaktivnog OH· radikala koji promovise oksidativni stres i dovodi do brojnih oštećenja ćelijskih komponenti. Fenolna jedinjenja poseduju sposobnost da heliraju metalne katjone, čime se smanjuje njihovo učešće u Fentonovoj reakciji i intenzitet oksidativnog stresa (Rice-Evans i sar., 1996) (slika 15). Antioksidativna aktivnost fenola se zato uglavnom zasniva na njihovom potencijalu da heliraju metalne jone i uklanjaju slobodne radikale. Hanasaki i sar. (1994) su pokazali da su flavonoidi koji uklanjaju O<sub>2</sub><sup>·-</sup> ili OH· veoma efikasni u ublažavanju peroksidacije lipida. Takođe, flavonoidi koji nisu imali sposobnost uklanjanja slobodnih radikala, na primer morin, imali su antioksidativnu aktivnost.



**Slika 15.** Mehanizmi antioksidativnog delovanja flavonoida; uklanjanje slobodnih radikala (reakcije 1-5) i helacija metala (reakcije 6). Prilagođeno iz Hider i sar., 2001.

Flavonoidi i fenolne kiseline su klase fenolnih jedinjenja koja pokazuju najjaču antioksidativnu aktivnost u odnosu na druge klase fenolnih jedinjenja, a na osnovu njihove hemijske strukture, koja prvenstveno zavisi od prirode supstituenata na aromatičnim prstenovima, kao i od položaja i broja prisutnih hidroksilnih grupa (Cos i sar., 1998; Heim i sar., 2002; Kumar i Pandey, 2013). Hidroksilna konfiguracija u B prstenu fenolnih jedinjenja je najznačajnija determinanta za uklanjanje ROS-a (Rice-Evans i sar., 1996; Pietta, 2000).

Fenolna jedinjenja kao sekundarni metaboliti smatraju se neesencijalnim za biljke, međutim, oni pružaju različite prednosti pri interakciji biljaka sa okolinom i za rastenje biljaka. Flavonoidi su važni za prilagođavanje na dinamične faktore spoljašnje sredine i kao odgovor na abiotičke i biotičke stresore (Simmonds, 2003; Lattanzio i sar., 2006; Morina i sar., 2008; Agati i sar., 2013; Mierziak i sar., 2014; Vidović i sar., 2015a). Fenoli akumulirani u vakuoli su uključeni u odbrambene mehanizme biljaka od biljojeda i fitopatogena, jer poseduju antimikrobna, antifungalna i repelentna svojstva (Lattanzio i sar., 2006; Hassan i Mathesius, 2012; Pacheco-Ordaz i sar., 2018; Yang i sar., 2018; Lattanzio, 2021; Tatipamula i Kukavica, 2021; Patil i sar., 2024). Fenolna jedinjenja, naročito flavonoidi, imaju ključnu ulogu u prilagođavanju biljaka na stresne uslove okoline (Simmonds, 2003; Lattanzio i sar., 2006; Morina i sar., 2008; Agati i sar., 2013; Vidović i sar., 2015a).

Flavonoidi su moćni neutralizatori ROS-a koji nastaju kao odgovor na stres, i sprečavaju oksidativna oštećenja ćelija tako što direktno uklanjaju slobodne radikale, inhibiraju enzime koji generišu ROS i prekidaju lančane reakcije peroksidacije lipida u biološkim membranama (Mierziak i sar., 2014). U epidermalnim slojevima deluju kao zaštita od UV zračenja (Lattanzio i sar., 2006; Agati i sar., 2013). Flavonoidi mogu biti prisutni kao stalna hemijska barijera (fitoanticipini) ili se indukovati kao odgovor na napad (fitoaleksini- antimikrobna jedinjenja koja se sintetišu tek kao direktan odgovor na napad patogena) (Lattanzio i sar., 2006). Oni inhibiraju spore patogena, ometaju mikrobne adhezije i transportne proteine, i učestvuju u jačanju ćelijskog zida kroz procese lignifikacije (Mierziak i sar., 2014). Deluju kao deterenti, odbijajući insekte od ishrane ili polaganja jaja, i mogu smanjiti palatabilnost i hranljivu vrednost biljke, otežati varenje ili delovati kao direktni toksini za insekte i nematode (Lattanzio i sar., 2006). Flavonoidi, naročito flavonoli poput kvercetina, modulišu transport i katabolizam auksina, što omogućava biljkama da promene svoj oblik rasta (npr. grananje, veličinu listova) kako bi se bolje prilagodile stresnim uslovima (Lattanzio i sar., 2006). Mogu da heliraju jone prelaznih metala (gvožđe, bakar, cink, aluminijum), sprečavajući tako generisanje ROS-a (Morina i sar., 2008). U zemljištu flavonoidi izlučeni kroz koren (poput naringenina ili genisteina) imaju ulogu signalnih molekula koji privlače korisne bakterije iz rodova *Rhizobium* i *Frankia*, pomažući biljci da ublaži stres izazvan nedostatkom azota (Taylor i Grotewold, 2005; Cooper, 2007; Patil i sar., 2024). Dodatno učestvuju u mobilizaciji minerala, kao što su fosfor i gvožđe (Kumar i sar., 2024).

Fenolna jedinjenja, koja obuhvataju grupe poput tanina, flavonoida i salicilata, predstavljaju ključne sekundarne metabolite u odbrambenom arsenalu biljaka. Ovi molekuli aktivno suzbijaju herbivore delujući kao direktni toksini, deterenti (odbojna sredstva) pri ishrani ili inhibitori rasta (Nyman i Julkunen-Tiitto, 2000; War i sar., 2018). Nastanak biljnih gale predstavlja primer biološkog reprogramiranja, gde galikolni organizmi manipulišu metabolizmom domaćina kako bi stvorili specijalizovano tkivo koje insektu pruža hranu i zaštitu (Isaias i sar., 2015; Zebelo i Maffei, 2015). U ovom procesu, fenolna jedinjenja igraju centralnu i višestruku ulogu. Utvrđeno je da ovipozicionai tečnost (cecidogen) sadrži ključne stimulanse koji mogu pokrenuti formiranje gale čak i bez prisustva jaja (Barnwall, 2011; Barnewall i sar., 2012). Pretpostavlja se da ovi fenoli poreklom iz insekta deluju kao aktivni regulatori biljnog metabolizma nakon što ih tkivo domaćina prepozna i modifikuje. Na ovaj način, galikolni insekti uspešno manipulišu metabolizmom biljke-domaćina kako bi smanjili nivo odbrambenih toksina, čime tkivo gale postaje pogodnije za ishranu larvi (Nyman i Julkunen-Tiitto, 2000; Desnitskiy i sar., 2023; Mishra i sar., 2024). Pored direktne indukcije, fenoli učestvuju i kao signalni molekuli koji utiču na međućelijsku komunikaciju i hormonsku signalizaciju, naročito auksina, što je presudno za specifičnu morfogenezu tkiva gale (Mapes i Davies, 2001). Dok biljke na opštu herbivoriju tipično reaguju akumulacijom fenolnih jedinjenja radi odbrane (War i sar., 2018), specijalizovani galikolni organizmi, poput lisnih osa iz roda

*Pontania* na vrbama, uspešno reprogramiraju metabolizam domaćina kako bi optimizovali svoje razvojno okruženje (Nyman i Julkunen-Tiitto, 2000). Ovaj proces podrazumeva drastično smanjenje koncentracije toksičnih fenola u unutrašnjosti gale, čime se formira nutritivno povoljnije tkivo neophodno za preživljavanje i brže razviće larvi. Nasuprot tome, tanini se selektivno akumuliraju u spoljašnjim slojevima gale, stvarajući efikasnu hemijsku i strukturnu barijeru koja štiti induktora od potencijalnih napada parazitoida i patogenih gljivičnih infekcija (Taper i sar., 1986; Giron i sar., 2016).

Flavonoidi i hidroksicinamične kiseline učestvuju u uklanjanju  $H_2O_2$  kroz integrisani Asc/fenoli/POD sistem koji je lokalizovan u vakuolama i apoplastu (Takahama i Oniki, 1997). Ovaj mehanizam omogućava efikasno neutralisanje  $H_2O_2$  čak i u odeljcima ćelije gde nema direktne aktivnosti APX (Takahama, 2004). POD u vakuolama i apoplastu koriste  $H_2O_2$  za oksidaciju fenolnih jedinjenja, kao što su kvercetin, kempferol ili hlorogenska kiselina (Takahama, 2004). Tokom ove reakcije se redukuje u vodu, dok fenoli prelaze u visoko reaktivne fenoksil radikale, koje direktno redukuje askorbat nazad u prvobitna fenolna jedinjenja (Yamasaki, 1997). Na ovaj način, flavonoidi i hidroksicimetne kiseline deluju kao posrednici (intermedijerni prenosioci elektrona) koji omogućavaju askorbatu da indirektno ukloni  $H_2O_2$  u ćelijskim odeljcima gde on nije primarni supstrat za peroksidaze (Yamasaki, 1997). Nastali oksidovani oblici askorbata se transportuju u citosol radi regeneracije putem askorbat-glutation ciklusa, što omogućava kontinuirano funkcionisanje ovog zaštitnog sistema (Takahama, 2004). Dokle god je askorbat prisutan, flavonoidi i hidroksicimetne kiseline se ne troše ireverzibilno, već kontinuirano cirkulišu, sprečavajući oksidativno oštećenje ćelije.

## 1.5.2. Lignin

Lignin je aromatični polimer koji je rezultat oksidativnog kombinatnog spajanja 4-hidroksi-fenilpropanoida (Boerjan i sar., 2003; Ralph i sar., 2004). Proces njegove biosinteze započinje u citoplazmi iz fenilalanina (Phe), odakle se, nakon niza hemijskih modifikacija (deaminacije, hidroksilacije, metilacije i redukcije) monomeri transportuju u apoplast. Konačna polimerizacija lignina odvija se u sekundarnom ćelijskom zidu uz pomoć enzima peroksidaza (POD) i lakaza (LAC), pri čemu se kombinuju tri glavna tipa monolignola: sinapil alkohol (S jedinica), koniferil alkohol (G jedinica) i *p*-kumaril alkohol (H jedinica) (Bonawitz i Chapple, 2010; Sun i sar., 2018).

Lignin i njegov metabolizam igraju važnu ulogu u rasteњу i razviću biljaka. Kao složeno fenolno jedinjenje, lignin povećava rigidnost ćelijskog zida biljke i daje mu hidrofobna svojstva, čime se olakšava transport vode i minerala kroz vaskularne snopove (Schuetz i sar., 2014). Pored strukturne potpore, lignin služi kao moćna barijera protiv štetočina i patogena (Moura i sar., 2010; Liu i sar., 2018b). U uslovima biotičkog i abiotičkog stresa, jedna od prvih reakcija biljaka je akumulacija ROS-a, praćena povećanjem akumulacije lignina (Moura i sar., 2010; Liu i sar., 2015). Zbog toga metabolizam lignina ima značajnu ulogu u otpornosti biljaka na bolesti i insekte, kao i u njihovoj toleranciji na sušu, visoke i niske temperature i prisutvo teških metala (Moura i sar., 2010; Santiago i sar., 2013). Pod dejstvom biotičkog stresa, u ćelijski zid se intezivno ugrađuje lignin, pri čemu je u njegovoj strukturi udeo H jedinica dosta uvećan (Zhang i sar., 2007; Kärkönen i Koutaniemi, 2010). Povećana akumulacija lignina može da obezbedi osnovnu barijeru protiv širenja uljeza i smanji infiltraciju patogenih enzima i toksina u zidove biljnih ćelija (Balakrishnan i sar., 2024). Lignin povećava tvrdoću biljnog tkiva, što otežava ishranu insektima (Santiago i sar., 2013). Tokom biosinteze lignina nastaju jedinjenja poput ROS-a, peroksida i kinona, koji su direktno štetni za herbivore (Felton sar., 1989). Biljka može

povećati nivo lignina kao direktan odgovor na napad (post-herbivorna indukcija) da bi pojačala fizičku barijeru ka herbivorima (Zhang i sar., 2022a).

Lignin, kao kompleksan fenolni polimer, igra centralnu ulogu u morfogenezi i strukturnom integritetu gala, služeći kao ključna komponenta za mehaničku potporu, transport vode i odbranu od herbivora (Moura i sar., 2010; Liu i sar., 2018b; Xie i sar., 2018). Metabolizam lignina tokom razvića gale neraskidivo je povezan sa reprogramiranjem metabolizma biljke-domaćina, pri čemu se formiraju složene strukture poput *de novo* vaskularnog sistema (Dolzblasz i sar., 2018; Markel i sar., 2024). Formiranje gala podrazumeva značajne promene ćelijskih zidova pod uticajem galikolnog insekta (Bragança i sar., 2020; Markel i sar., 2024). Razviće gale kod osa šiškarića (*Cynipidae*) obuhvata taloženje lignina i ksilana, čime nastaje nova vaskularna mreža koja obezbeđuje efikasan transport hranljivih materija od biljke-domaćina ka larvi (Markel i sar., 2024). Istovremeno, lignifikovani sklerenhimski slojevi pružaju mehaničku zaštitu larvi od predatora i parazitoida.

Razviće gale zahteva pažljivo usklađivanje fleksibilnosti ćelijskog zida, koja omogućava ekspanziju, i njegove rigidnosti, koja obezbeđuje potporu. Indukcija galogeneze dovodi do akumulacije fenolnih jedinjenja koja inhibiraju IAA-oksidadu, dovodeći do visokih koncentracija auksina (IAA) u tkivu (Bedetti i sar., 2014). Hormonalni skok menja fluks jona i zakiseljava ćelijski zid, čime se inicira njegovo labavljenje (Bragança i sar., 2020). Nastale modifikacije fizičkih svojstava primarnih zidova omogućavaju ubranu ekspanziju ćelija putem procesa rasta uslovljenog zakišeljavanjem (kiselo rastenje, eng. *acid growth*) u ranim fazama razvića gale (Zhao, 2010; Majda i Robert, 2018). ROS, prvenstveno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, deluju kao signalni molekuli i kofaktori za peroksidaze koje vrše lignifikaciju (Isaias i sar., 2015).

Lignin u galama često pokazuje drugačiji hemijski sastav u poređenju sa okolnim zdravim tkivom. Kod određenih tipova gala, zabeležen je značajno niži odnos siringilnih (S) i gvajacilnih (G) jedinica (Weng i Chapple, 2010). Ovakav sastav je karakterističan za vaskularne elemente i tzv. „odbrambeni ili stresni lignin“ koji je često bogatiji G ili H jedinicama, jer njihova sinteza zahteva manje metaboličke energije i omogućava brži strukturni odgovor na napad herbivora (Yadav i Chattopadhyay, 2023).

Peroksidaze igraju dualnu i biohemijski složenu ulogu u dinamici ćelijskog zida: mogu delovati kao stimulatori labavljenja zida i rasta (npr. u galama), ali i kao ključni enzimi za očvršćavanje i lignifikaciju, naročito u odgovoru na herbivoriju (Marjamaa i sar., 2009). Tokom faze rasta i ekspanzije ćelija, peroksidaze posreduju u labavljenju polimerne mreže ćelijskog zida, što je ključno za formiranje struktura poput gala (Liszkay i sar., 2003; Majda i Robert, 2018; Bragança i sar., 2020). Suprotno tome, kada deluju u pravcu učvršćivanja, peroksidaze postaju glavni mehanizam za prekid rasta i formiranje odbrambenih barijera (Marjamaa i sar., 2009). Povećana aktivnost ovih enzima i ubrana depozicija lignina na mestu infekcije („odbrambeni lignin“) predstavljaju ključnu strategiju za fizičku blokadu, hemijsku izolaciju i ograničavanje dostupnih resursa patogenima (Liu i sar., 2018b; Tiwari i sar., 2025).

U razvijenim galama ove dve suprotstavljene funkcije peroksidaza često su prostorno organizovane: unutrašnji zidovi ostaju fleksibilni kako bi omogućili transport nutrijenata ka larvi, dok spoljašnji slojevi gala prolaze kroz intenzivnu lignifikaciju posredovanu peroksidazama, formirajući sloj sklerenhima koji štiti larve unutar gale od predatora i istovremeno sprečava nekontrolisano širenje modifikovanog tkiva (Teixeira i sar., 2018; Markel i sar., 2024).

## 1.6. Kompromis između rasta i odbrane: fotosinteza, antioksidativni odgovor i metabolička preraspodela

Kompromis (eng. *trade-off*) između rastenja i odbrane predstavlja osnovni mehanizam kojim sesilni organizmi, poput biljaka, optimizuju svoj opstanak u promenljivom okruženju (Zhou i sar., 2015). Budući da su energetske resursi ograničeni, biljke moraju precizno da balansiraju između ulaganja u primarni metabolizam, koji podržava rast i reprodukciju, i aktivacije složenih odbrambenih strategija protiv stresa (Caretto i sar., 2015; Zhou i sar., 2015; Zaynab i sar., 2019). Ovaj preusmereni tok energije i prekursora neizbežno nameće metaboličke troškove, koji se direktno odražavaju na dinamiku rasta biljke (Bolton, 2009; Caretto i sar., 2015). U uslovima herbivorije i indukcije gala, jedan od najizrazitijih fizioloških odgovora je smanjenje fotosintetske aktivnosti (Castro i sar., 2012; Kerchev i sar., 2012). Smanjene stope fotosinteze nisu rezultat samo fizičkog oštećenja tkiva ili zatvaranja stoma, već su povezane sa smanjenom aktivnošću enzima Rubisco u tamnoj fazi fotosinteze i smanjenjem fiksacije CO<sub>2</sub> (Gutsche i sar., 2009). Formiranje gala dovodi do drastične inhibicije fotosinteze u tim strukturama, koje gube svoj autotrofni karakter i postaju prioritetna mesta za akumulaciju resursa (Dorchin i sar., 2009). Analize pokazuju značajan pad sadržaja hlorofila i karotenoida u galama, što ih čini potpuno zavisnim od priliva fotoasimilata iz okolnih listova preko floema (Carneiro i sar., 2014; Jiang i sar., 2018). Nakupljanje ugljenih hidrata u listovima usled ishrane insekata dodatno inhibira ekspresiju fotosintetskih gena, čime se zatvara krug energetske preraspodele ka odbrani (Lin i sar., 2000). Promene u fotosintetskoj aktivnosti povlače za sobom dalju preraspodelu metabolizma, pri čemu signalni molekuli imaju ključnu ulogu u usmeravanju energetske tokova. Suština ovog kompromisa ogleda se u transformaciji tkiva iz uloge proizvođača (izvor) u ulogu potrošača (uvir) (Bolton, 2009). Ovaj proces je vođen specifičnim šećerima i aminokiselinama koji funkcionišu kao ključni medijatori energetske statusa. Molekuli poput T6P i trehaloze igraju centralnu ulogu u reprogramiranju metabolizma (Figueroa i Lunn, 2016; Fichtner i Lunn, 2021; Kerbler i sar., 2023). T6P deluje kao senzor koji „vara” biljku, indukujući deobu ćelija i anaboličke puteve neophodne za rast gala, uprkos prisustvu biotičkog stresa (Foster i sar., 2003; Iturriaga i sar., 2009). Herbivorija pokreće masovnu remobilizaciju azota, naročito kroz sintezu asparagina i glutamina (Qiao i sar., 2026). Asparagin, sa svojim visokim odnosom azota i ugljenika, idealan je za transport i skladištenje resursa koji se preusmeravaju sa rastenja na odbranu ili ishranu larvi u galama (Qiao i sar., 2026). Biljke često brzo povlače nutrijente iz oštećenih tkiva u bezbednije delove, čime istovremeno izgladnjuju herbivore i čuvaju energiju za kasniju regeneraciju (Schwachtje i sar., 2006; Robert i sar., 2014). Ova preraspodela resursa usko je povezana sa antioksidativnim odgovorom i održavanjem redoks homeostaze, jer svaki kontakt sa herbivorom indukuje oksidativni prasak tj. brzu produkciju ROS-a (Torres i sar., 2006; Shinya i sar., 2016; Bittner i sar., 2017; Mahanta i sar., 2025). Upravljanje ovim oksidativnim statusom je ključno za ishod interakcije. Pri niskim koncentracijama, ROS služe kao sekundarni glasnici koji aktiviraju odbrambene gene (Foyer i Noctor, 2005a; Mittler i sar., 2011; Mittler, 2017). Međutim, ako se ne neutrališu, dovode do teških oštećenja biomolekula (Gill i Tuteja, 2010.).

Asc-GSH ciklus predstavlja glavnu mrežu za detoksikaciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chew i sar., 2003; Foyer i Shigeoka, 2011; Foyer i Noctor, 2011). Tokom herbivorije, povećana aktivnost enzima poput APX i GR doprinosi većoj otpornosti biljke (Kerchev i sar., 2012). U tkivu gala često se beleži pad aktivnosti APX enzima, što omogućava lokalnu akumulaciju ROS-a neophodnu za labavljenje ćelijskih zidova i brzu hipertrofiju tkiva (Almagro i sar., 2009; Liu i sar., 2010; Gätjens-Boniche, 2019). Galikolni insekti vešto manipulišu redoks statusom biljke-domaćina, sprečavajući nekrozu tkiva i koristeći oksidativni stres kao morfogenetski signal za razviće gale (Isaias i sar., 2015; Miller i Raman, 2019; Oates i sar., 2021). Nakon ovih procesa, biljka resurse usmerava ka

lignifikaciji i sintezi fenolnih jedinjenja (Gatehouse, 2002; Moura i sar., 2010; Mithöfer i Boland, 2012; Liu i sar., 2015; Zhang i sar., 2022a). Povećana aktivnost POD katalizuje polimerizaciju lignina, čime se ojačava ćelijski zid i stvara fizička prepreka ishrani insekata (Zhang i sar., 2007; Santiago i sar., 2013; Balakrishnan i sar., 2024). Resursi se preusmeravaju sa primarnog rasta na šikimatni put radi sinteze flavonoida i tanina, koji deluju kao direktni toksini ili deterenti za herbivore (Nyman i Julkunen-Tiitto, 2000; War i sar., 2018). Dok biljka akumulira ove materije u odbrambene svrhe, specijalizovani insekti mogu reprogramirati metabolizam tako da smanje nivo toksina u unutrašnjosti gale radi lakše ishrane larvi (Nyman i Julkunen-Tiitto, 2000; Desnitskiy i sar., 2023; Mishra i sar., 2024).

Složena mreža ovih odgovora pokazuje da biljka nije pasivni objekat napada, već dinamičan sistem koji stalnim prilagođavanjem svoje fiziologije nastoji da umanjí štetu i sačuva resurse za budući rast.

## 1.7. Značaj istraživanja

Značaj istraživanja obuhvaćenih ovom doktorskom disertacijom ogleda se u integraciji fundamentalnih naučnih saznanja i njihove potencijalne primene, pružajući nov uvid u kompleksne mehanizme interakcije biljaka i insekata kroz sledeće aspekte:

- Model sistem za biotički stres i metaboličku relokaciju: Interakcija između lanilista i žiška predstavlja model za izučavanje procesa u kojima insekti preotimaju ćelijske mehanizme biljke kako bi preusmerili primarni metabolizam i resurse, poput azota i ugljenih hidrata, iz autotrofnih u novoformirana heterotrofna tkiva. Ovaj proces biohemijskog reprogramiranja omogućava formiranje gale koja funkcioniše kao specijalizovan organ za ishranu i zaštitu larvi.
- Redoks homeostaza i preživljavanje: Istraživanje objašnjava na koji način insekt manipuliše antioksidativnim sistemom domaćina, pre svega Asc-GSH ciklusom, kako bi sprečio odbrambenu reakciju biljke (nekrozu tkiva) kojom biljka pokušava da izoluje napadača. Ovakva redoks manipulacija omogućava insektu da transformiše početni oksidativni stres u koordinisan morfogogenetski signal neophodan za razviće i stabilnost galozne strukture.
- Koncept „slatkog imuniteta“ (eng. *sweet immunity*): Dobijeni rezultati pružaju značajan doprinos razumevanju novih koncepata u biljnoj fiziologiji, prema kojima šećeri, naročito signalni molekuli poput trehaloze i T6P, ne služe samo kao energetske izvori već kao ključni regulatori koji određuju ishod interakcije između biljke i herbivornih insekata.
- Biološka kontrola invazivnih vrsta: S obzirom da je žuti lanilist (*L. vulgaris*) invazivna korovska vrsta koja nekontrolisanim širenjem ugrožava biodiverzitet i prirodna staništa u Severnoj Americi, razumevanje suptilnih mehanizama kojima *R. pilosa* (kao agens biokontrole) suzbija vitalnost svog domaćina ima kritičan značaj za razvoj efikasnih i ekološki održivih strategija biološke kontrole. Kao visoko specifičan herbivor, ovaj žižak predstavlja ključni alat za očuvanje ekološke ravnoteže kroz suzbijanje vitalnosti korovskih populacija.

## 2. Ciljevi istraživanja

Interakcija galikolnih insekata i odgovarajuće biljne vrste predstavlja primer visoko specijalizovane organogeneze nastale njihovom koevolucijom. Osnovni cilj ovog istraživanja jeste da se u složenom adaptacionom procesu interakcije između galikolnih insekata i biljke-domaćina identifikuju i razgraniče odbrambene reakcije biljke koje su od opšteg značaja za razumevanje odgovora biljke na biotički stres. Posebna pažnja posvećena je razgraničavanju odgovora biljke na herbivoriju od odgovora na formiranje galoznog tkiva, jer oba procesa predstavljaju različite, ali međusobno povezane oblike biotičkog pritiska. Dodatno, istraživanje se fokusira na ispitivanje specifičnih mehanizama odbrane u različitim biljnim organima – listovima i stablu – tokom celokupnog razvića galoznog tkiva.

Specifični ciljevi istraživanja obuhvataju:

- Ispitivanje dinamike reprogramiranja primarnog metabolizma (odnos izvor-uvir), kako galikolni insekti modifikuju fiziološku distribuciju hranljivih materija, pretvarajući tkivo domaćina iz izvora u uvir, sa posebnim naglaskom na ulogu trehalozo-6-fosfata u ranoj fazi indukcije i na inhibiciji fotosinteze u pogođenim biljnim organima.
- Analiza redoks ravnoteže i uloga Asc-GSH ciklusa: praćenje aktivnosti antioksidativnih sistema tokom različitih faza razvića gale, radi razjašnjavanja njihove uloge u odbrani biljke ili u sprečavanju nekroze tkiva i omogućavanju rastenje gale.
- Utvrđivanje bifunkcionalnosti peroksidaza (dualna uloga peroksidaza klase III u odbrani i organogenezi): razgraničiti faze u kojima peroksidaze doprinose „labavljenju“ ćelijskog zida radi hipertrofije gale od faza u kojima podstiču lignifikaciju i formiranje zaštitnog sklerenhima oko larve unutar gale.
- Definisanje specifičnosti odgovora po organima (list i stablo): upoređivanje metaboličkih i signalnih odgovora u listovima i stablu tokom herbivorije i ovipozicije. Praćenje sadržaja slobodnih aminokiselina kao pokazatelja nutritivne preraspodele i organ-specifične adaptacije biljnog odgovora u procesu galogeneze.

### 3. Materijal i metode

U ovom poglavlju opisane su specifične eksperimentalne metode primenjene tokom višegodišnjeg istraživanja, fokusirane na interakciju između žutog lanilista (*Linaria vulgaris* Mill.) i galikolnog žiška (*Rhinusa pilosa* Gyll.). Eksperimentalna postavka podrazumevala je uzgoj biljaka-domaćina i populacija žiška u strogo kontrolisanim uslovima, pomno praćenje procesa polaganja jaja (ovipozicije) i inicijacije gala, i finalno uzorkovanje biljnog tkiva i gala za dalje biohemijske analize.

#### 3.1. Gajenje biljaka *Linaria vulgaris* Mill.

*Linaria vulgaris* Mill. je biljka domaćin za žiška *Rhinusa pilosa* Gyll., na kojoj ovaj insekt polaže jaja, što vodi formiranju gala na stablu biljke-domaćina (slika 19 i 21).

Za potrebe našeg istraživanja, biljke su prikupljane u rano proleće (mart–april) sa lokaliteta Zemun polje i Dobanovci na teritoriji Beograda, Srbija. Biljke sa terena su presađivane sa okolnom zemljom da bi korenovi ostali nepovređeni. Njihovo rasađivanje i dalje gajenje u kontrolisanim uslovima obavljeno je u stakleniku i komorama za gajenje biljaka Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu (IZBIS), Odseka za štetočine bilja u Zemunu (slika 16). Za ovipozicije i razviće galoznog tkiva odabrane su mlade biljke visine oko 10 cm, zdravog izgleda, sa zelenim listovima i stablom. Svaka biljka je posađena u pojedinačne plastične cilindrične saksije (dimenzija 10 × 9 × 35 cm) sa poklopcima (gazom) radi ventilacije, održavanja vlage i sprečavanja kontaminacije insektima i patogenima (slika 16). Podloga za sađenje bila je kombinacija peska, vermikulita, perlita i zemljišta za rasađivanje biljaka. Sve biljke u eksperimentu rasle su u sledećim uslovima: temperatura od 21 do 24°C, sa 16/8 h dnevno/noćnim ciklusom osvetljenja i 60% relativna vlažnost vazduha, sve u cilju optimalnog razvoja gala.



**Slika 16.** Priprema *L. vulgaris* biljaka za introdukciju sa *R. pilosa* u kontrolisanim uslovima.  
Foto: Ivo Toševski i Ana Sedlarević Zorić.

### 3.2. Održavanje uzgojnih kolonija galikolnog žiška *Rhinusa pilosa*

*Rhinusa pilosa* (Gyllenhal) je univoltna galikolna vrsta žiška (Coleoptera: Curculionidae) koja polaže jaja isključivo na apikalnom delu stabla *Linaria vulgaris*, što dovodi do nastanka globularnih gala na stablu domaćina (Caldara i sar., 2008; Toševski i sar., 2015). Zbog uskog raspona domaćina, *R. pilosa* se istražuje i kao potencijalni agens za biološku kontrolu *L. vulgaris*.

Adultni žišci provode zimu u dijapauzi i aktiviraju se u rano proleće (mart–maj), što se poklapa sa rastom izdanaka domaćina *L. vulgaris*. Pre parenja, adulti se hrane mladim izdancima i lišćem 3 do 5 dana (slika 17). Ukupan razvojni ciklus od polaganja jajeta do izlaska novog adulta iz gale traje između 55 i 65 dana, pri čemu larveni stadijumi traju oko 45–50 dana.

Za uspostavljanje uzgojnih kolonija i eksperimente korišćene su jedinke sakupljene na terenu širom Srbije i istočne Evrope. Parovi žižaka smešteni su u saksije sa mladim, aktivno rastućim biljkama *L. vulgaris*, i površina tla saksije prekrivala se belim peskom radi lakše vidljivosti insekata i regulacije vlage (slika 17).



Slika 17. *Rhinusa pilosa* na *Linaria vulgaris* u kontrolisanim uslovima. Foto: Ana Sedlarević Zorić.

Ženka vrši ovipoziciju (polaganje jaja) kroz specifičan proces (slika 18):

1. Gricka dubok kanal (1-2 mm) u apikalnom meristemu stabla;
2. Okreće telo za 180° i kroz kanal ubacuje ovipozitor u srž stabla;
3. Jaja polaže pojedinačno, najčešće u seriji 3-5 jaja, retko više od 10;
4. Na mestu polaganja jaja uočavaju se kapi cecidogena (ovipozicione tečnosti).

Tokom jedne sedmice, parovi *R. pilosa* su svakodnevno premeštani na nove biljke kako bi se osiguralo da imaju dovoljno dostupne hrane i optimalne uslove za parenje. Nakon toga, kopulirane ženke su odvojene od mužjaka i prebačene da vrše ovipoziciju na novim biljkama (slika 18). Korišćeno je između 18 i 30 parenih ženki žiška *R. pilosa* tokom jedne sezone. Kada su ovipozije uočene, ženka se prebacuje u novu saksiju sa intaktnom biljkom, kako bi ženka

žiška nastavila i dalje da polaže jaja. Biljka sa položenim jajima se prenosi u komoru za gajenje biljaka sa optimalnim uslovima za dalji rast biljke i uspešno formiranje gala.

U eksperimentima tokom jedne sezone je prosečno 100 mladih biljaka *L. vulgaris* izlagano žiškama *R. pilosa* radi indukcije gala; od 100 biljaka, uspešno je inicirano 80-90 gala tokom tronedeljnog perioda.



Slika 18. Žižak *Rhinusa pilosa*. Prilagođeno iz De Clerck-Floate i sar., 2012.

### 3.3. Razviće gala i eksperimentalni dizajn

Gale su globularne strukture koje nastaju hipertrofijom i hiperplazijom biljnog tkiva. Gale koje inicira *R. pilosa* na *L. vulgaris* su globularne strukture, koje se razvijaju u apikalnom (vršnom) delu stabla, na mladim i brzo rastućim vegetativnim izdancima (slika 19 i 21). Prve morfološke promene (bubrenje stabla) vidljive su nakon 2 do 3 dana, a potpuno razviće gale u laboratorijskim uslovima (pri 23°C) završava se za 8 do 10 dana, što koincidira sa pojavom prve larve. Prosečna veličina potpuno formirane gale je oko 18,7 × 9,1 mm.

Dinamika galogeneze i efekti herbivorije na vrstu *L. vulgaris* praćeni su kroz seriju kontrolisanih oglada u periodu od 2013. do 2021. godine, uz standardizovane uslove gajenja biljaka (na temperaturi između 21–24°C, vlažnost vazduha 60%, sa fotoperiodom dan/noć: 16/8 h). Eksperiment je dizajniran tako da jasno razgraniči lokalni i sistemski odgovor biljke kroz tri kategorije uzoraka (slika 20):

- kontrola (C): intaktne *L. vulgaris* biljke bez oštećenja,
- herbivorija (H): *L. vulgaris* biljke sa oštećenjima na stablu nastalim isključivo ishranom žižaka *R. pilosa*, i
- gale (G1–G5): *L. vulgaris* biljke sa galama različite starosti (od 24h do 10 dana nakon izvršenih ovipozicija).

Dok su znaci herbivorije na stablu i listovima (H uzorci) bili vidljivi već nakon 24 časa od uvođenja insekata u saksiju sa biljkom, galozno tkivo (G uzorci) sistematski je uzorkovano od trenutka uočenih ovipozicija do desetog dana nakon uočenih ovipozicija. Ovakav protokol omogućio je komparativnu analizu metaboličkih promena u listovima i stablu tokom ključnih

morfoloških faza, uključujući inicijalno bubrenje stabla (G2) i dostizanje maksimalne mase gale (G4 i G5).



**Slika 19.** Gale na *Linaria vulgaris* indukovane ovipozijama *Rhinusa pilosa*. GS- uzorci gale/deo stabla sa galom. Foto: Ana Sedlarević Zorić.

Za uzorke gale prikupljani su delovi stabla *L. vulgaris* u zoni gale (GS uzorci) i listovi sa te biljke (GL uzorci) (slika 19). Sa kontrolnih biljaka su takođe prikupljeni uzorci stabla iz zone gde se inače formiraju gale/gornja trećina stabla (CS) i uzorci listova (CL), a sa biljaka izloženih herbivoriji uzorkovani su delovi stabla iz zone vidljivih oštećenja usled ishrane insekata (HS) kao i listovi sa tih biljaka (HL uzorci) (slika 20). Svi uzorci su odmah zamrzavani u tečnom azotu (-195°C) i čuvani na temperaturi -80°C. Kod početnih vremenskih tački formiranja gale (G1–G2), gde morfološke promene na stablu lanilista tek počinju da budu vidljive (stablo počinje da bubri), uzorkovan je deo stabla gde se jasno vide rupice koje je ženka *R. pilosa* progrizla i u koje su položena jaja.

Na stablu *L. vulgaris* na mestu polaganja jaja mogu se uočiti kapi ovipozicione tečnosti koju luči ženka tokom ovipozicije (cecidogen). Kapi cecidogena sakupljene su kada su se osušile, 24 h posle ovipozicije.

Adulti *R. pilosa* za analizu fenolnih jedinjenja sakupljeni su nakon ovipozicije, a larve su uzete iz galoznog tkiva i odmah zamrznute u tečnom azotu.



mlade, intaktne *L. vulgaris* biljke bez oštećenja (C uzorci)

proleće (mart-april)



*L. vulgaris* biljke sa oštećenjima na stabljici nastalim isključivo ishranom *R. pilosa* (H uzorci)

indukcija nastanka gala na stabljici *L. vulgaris* usled izvršenih ovipozicija žiška *R. pilosa*



početnih faze razvića gale (24h-G1, 48h-G2)



gala starosti 4 dana (G3)



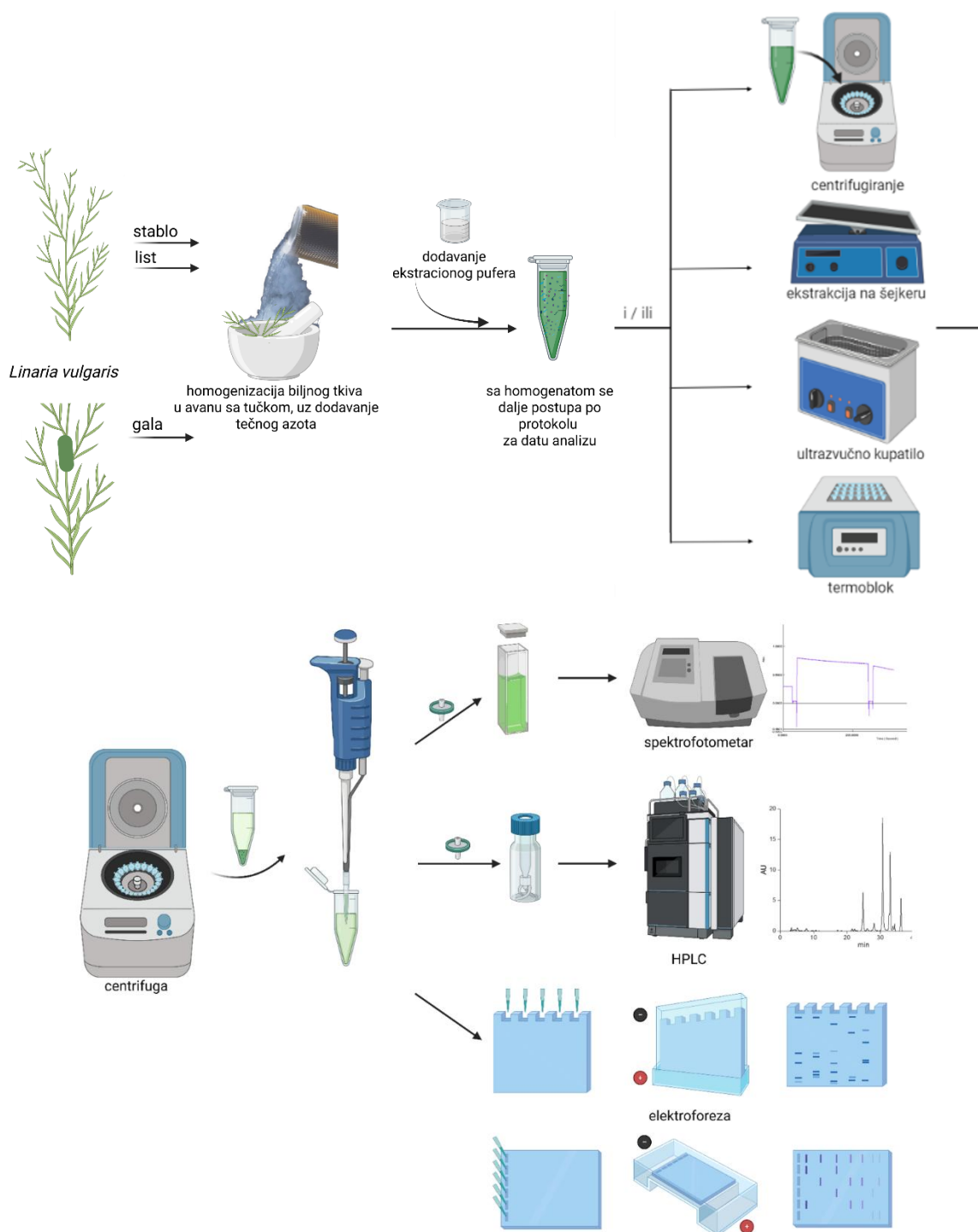
finalne faze razvića gale (7. dan- G4, 10. dan- G5)

proleće-letno (april, maj, jun)

**Slika 20.** Eksperimentalne grupe biljaka iz kojih je vršeno uzorkovanje biljnog materijala za analize. Slika napravljena preko BioRender.com.

### 3.4. Biohemijski parametri biljnog tkiva *L. vulgaris*

Nakon izvršenih ovipozicija i nastanka galoznog tkiva, sakupljeni su uzorci za biohemijske analize (gale različite starosti, kao i kontrolne biljke i biljke mehanički oštećenje ishranom insekta *R. pilosa*). Uzorci su pažljivo homogenizovani u keramičkom avanu sa tučkom uz dodatak tečnog azota, a zatim i ekstrahovani i centrifugirani u skladu sa zahtevima planiranih biohemijskih analiza (slika 21). Dobijeni ekstrakti dalje su analizirani prema odgovarajućim protokolima primenom različitih analitičkih i biohemijskih tehnika, uključujući spektrofotometriju, tečnu hromatografiju visokih performansi (HPLC), elektroforezu i Western blot metodu.



**Slika 21.** Šematski prikaz procesa ekstrahovanja i analiziranja uzoraka. Slika napravljena preko BioRender.com.

### 3.4.1. Ekstrakcija i kvantifikacija sadržaja ukupnog i redukovano askorbata u galama, stablu i listovima *L. vulgaris* i određivanje njegovog redoks statusa

Ekstrakcija neenzimskih antioksidanata iz homogenizovanih tkiva *L. vulgaris* (gala, stablo i listova) izvršena je prema optimizovanom protokolu koji su opisali Vidović i saradnici (2016). Zamrznuti biljni materijal (-80°C) je ekstrahovan u 1,5% (v:v) meta-fosfornoj kiselini (MPA) koja je sadržala 2 mM EDTA, u odnosu 1:10 (w:v). Dobijeni homogenat je centrifugiran na 16.000 g tokom 8 minuta na 4°C. Supernatant je odmah nakon centrifugiranja zamrznut u tečnom azotu i čuvan na -80°C do dalje analize, kako bi se osigurala stabilnost ekstrahovanih metabolita.

#### 3.4.1.1. Određivanje redukovane forme askorbata spektrofotometrijski

Sadržaj redukovane forme askorbata određen je spektrofotometrijski prema metodi koju su opisali Kukavica i Veljović Jovanović (2004). Princip detekcije zasniva se na specifičnoj oksidaciji askorbata katalizovanoj enzimom askorbat-oksidadom (AO).

Reakciona smeša (ukupne zapremine 1 ml) sastojala se od 300 mM kalijum-fosfatnog pufera (pH 5,5) koji je sadržao 2 mM EDTA i 30 µl biljnog ekstrakta. Sadržaj redukovano askorbata utvrđen je na osnovu smanjenja apsorbance na 262 nm nakon dodavanja 0,5 U askorbat-oksidade u reakcionu smešu.

Merenja su izvedena na UV-VIS spektrofotometru sa kontrolom temperature (*Shimadzu UV-160, Kjoto, Japan*) na 28°C. Koncentracija askorbata izračunata je korišćenjem molarog ekstinkcionog koeficijenta ( $\epsilon^{265}_{Asc} = 14,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) i potvrđena na osnovu standardne krive konstruisane korišćenjem serije poznatih koncentracija askorbata (0,1–1,0 mM).

#### 3.4.1.2. HPLC analiza ukupnog i oksidovanog askorbata i redoks stanje

Koncentracija ukupnog askorbata u uzorcima određena je metodom tečne hromatografije visoke efikasnosti (HPLC, eng. *High Performance Liquid Chromatography*), prema protokolu optimizovanom od strane Vidović i sar. (2015c). Postupak se zasniva na enzimskoj oksidaciji askorbata i naknadnoj derivatizaciji dobijenog dehidroaskorbata (DHA) u fluorescentno jedinjenje.

Uzorci su prethodno razblaženi 19 puta u 1,5% MPA koja je sadržala 2 mM EDTA. Potpuna oksidacija askorbata do DHA izvršena je inkubacijom uzorka sa 2,5 U askorbat-oksidade (AO) u kalijum-fosfatnom puferu (pH 4,5) tokom jednog minuta na sobnoj temperaturi. Nakon oksidacije, pH vrednost reakcione smeše podešena je na 8,0 pomoću 1 M KOH, nakon čega je usledila derivatizacija dodatkom *orto*-fenilendiamina (*o*-PDA) u finalnoj koncentraciji od 0,2 mM. Reakcija je tekla 10 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, a zaustavljena je dodatkom 85% fosforne kiseline (finalna koncentracija 1,65%).

Ovako pripremljeni *o*-PDA-DHA derivati (zapremina injektovanja 50 µl) naneti su na reverzno-faznu kolonu (5,0 µm, 250 × 4,6 mm Luna C18(2), *Phenomenex Ltd., Torrance, CA, USA*) i analizirani na *Shimadzu LC-20AB Prominence* HPLC (*Shimadzu, Kjoto, Japan*) uređaju (slika 22).

Elucioni gradijent je formiran pomoću rastvora A: 20 mM kalijum-fosfatni pufer pH 6,5 i rastvora B: MeOH, pri brzini protoka od 1,0 ml min<sup>-1</sup> na 25°C:

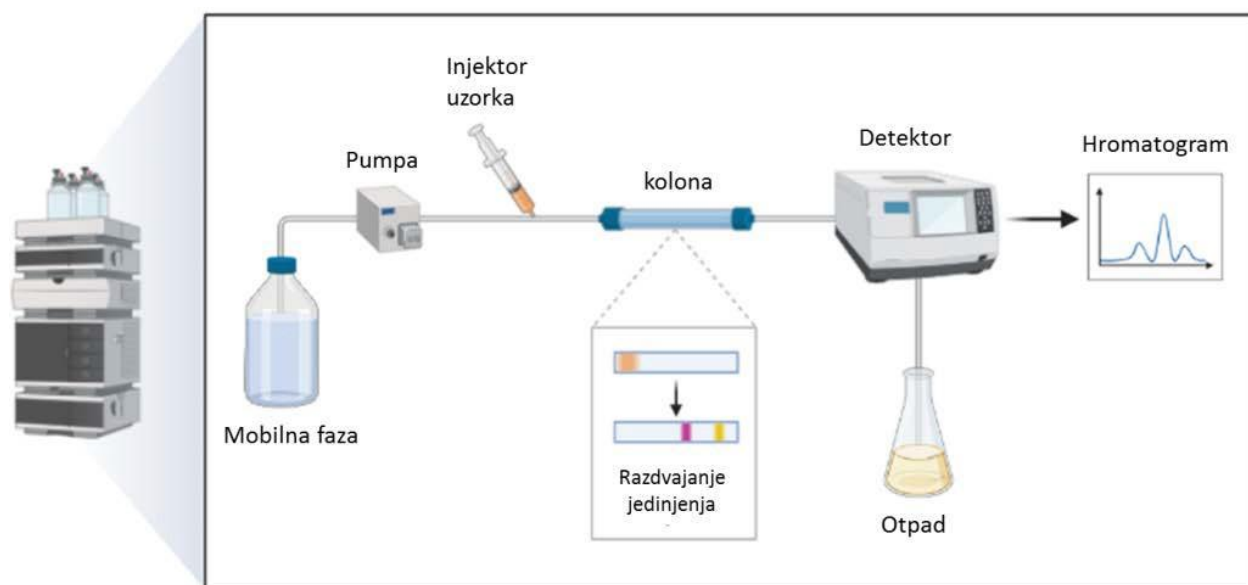
0–6 min: 30% B (izokratska elucija);

6,01–13 min: 55–30% B (linearni gradijent);

13,01–18 min: 30% B (izokratska elucija).

Detekcija *o*-PDA-DHA derivata vršena je fluorescentnim detektorom RF-10-AXL (*Prominence, Shimadzu, Japan*) pri talasnoj dužini ekscitacije od 360 nm i emisije od 430 nm.

Sadržaj dehidroaskorbata (DHA) izračunat je kao razlika između ukupnog askorbata (utvrđenog HPLC metodom) i redukovano askorbata (utvrđenog spektrofotometrijski).



Slika 22. Shema analize sadržaja ukupnog askorbata na HPLC Shimadzu LC-20AB Prominence aparatu.

Kvantifikacija askorbata zasnovana je na obradi površine pika *o*-PDA-DHA derivata korišćenjem standardne krive za askorbat (injektovan je standard askorbinske kiseline u koncentracijama od 0 do 0,25 μM rastvoren u 1,5% MPA).

Redoks stanje askorbata (RsA) predstavljeno je kao procenat sadržaja redukovane forme askorbata u odnosu na ukupni sadržaj askorbata, prema formuli:

$$\text{RsA (\%)} = \frac{[\text{Asc}]}{([\text{Asc}] + [\text{DHA}])} \times 100.$$

Svi dobijeni hromatogrami obrađeni su pomoću softvera Shimadzu LC Solution software (*Shimadzu, Kyoto, Japan*). Isti softverski paket korišćen je za obradu podataka svih analiza sprovedenih na HPLC sistemu (*Shimadzu LC-20AB Prominence*), uključujući određivanje sadržaja askorbata, glutationa, slobodnih aminokiselina i fenolnih jedinjenja. Svi reagensi i rastvarači korišćeni u hromatografskim analizama bili su visokog stepena čistoće (*HPLC grade*).

### 3.4.2. Ekstrakcija i određivanje glutaciona i redoks-stanja u galama, stablu i listovima *L. vulgaris*

#### 3.4.2.1. Ekstrakcija glutaciona

Ekstrakcija redukovanog (GSH) i oksidovanog glutaciona (GSSG) izvršena je na ledu u 0,1 M hlorovodoničnoj kiselini (HCl) koja je sadržala 1 mM EDTA (1:5, w:v). Protokol je modifikovan iz Masi i sar. (2002) i opisan u Vidović i sar. (2016). Nakon centrifugiranja homogenata na 16.000 g tokom 8 minuta na 4°C, dobijeni supernatant je podeljen na dva alikvota: jedan za određivanje GSH, i drugi za određivanje sadržaja ukupnog glutaciona.

Određivanje glutaciona u uzorcima se zasniva na derivatizaciji tiolne grupe GSH molekula pomoću fluorogenog obeleživača, kao što je amonijum-7-fluoro-2,1,3-benzooksadiazol-4-sulfonat (SBD-F). Nakon uspešne derivatizacije, dobijeni fluorescentni derivat se detektuje i kvantifikuje pomoću HPLC-a, i ovako se dobija količina redukovanog GSH u uzorcima. Da bi se odredio GSSG u uzorcima, potrebno je da se redukuje do GSH, koji se zatim derivatizuje pomoću SBD-F, i dobijeni rezultat se odnosi na količinu ukupnog glutaciona: [GSH + 2GSSG], jer se redukovanjem 1 mola GSSG dobijaju 2 mola GSH.

#### 3.4.2.2. Redukcija glutaciona i derivatizacija tiolnih grupa; Identifikacija i kvantifikacija SBD-F/GSH derivata HPLC metodom

Za određivanje sadržaja ukupnog glutaciona, izvršena je redukcija GSSG u GSH mešanjem 50 µl supernatanta sa 10 µl 3 M natrijum-borhidrida (NaBH<sub>4</sub>) pripremljenog u 0,1 M NaOH. Smeša je inkubirana 30 minuta na 55°C uz stalno mešanje (šejker), nakon čega je reakcija zaustavljena dodatkom 50 µl 1 M HCl sa 1 mM EDTA. Postupak za određivanje slobodnog GSH bio je identičan, uz zamenu NaBH<sub>4</sub> rastvorom 1 M NaOH. Derivatizacija tiolnih grupa (-SH) pomoću fluorescentnog markera SBD-F sprovedena je prema protokolima Masi i sar. (2002) i Vidović i sar. (2016). Reakcija se odvija u baznoj sredini; u 110 µl pripremljenih ekstrakata dodato je 117 µl 1 M kalijum-boratnog pufera (pH 10,5). Potom je u smešu dodato 33 µl 0,3% rastvora SBD-F, a derivatizacija je tekla 60 minuta na 55°C u mraku. Reakcija je prekinuta naglim hlađenjem na ledu i dodatkom 35 µl 2 M HCl sa 2 mM EDTA.

Kvantifikacija SBD-F/GSH derivata rađena je na HPLC-u prema Vidović i sar. (2016). Derivatizovani uzorci (20 µl) naneti su na reverzno-faznu kolonu (5,0 µm, 250×4,6 mm Luna C18(2), Phenomenex Ltd., Torrance, CA, USA) i analizirani na Shimadzu LC-20AB Prominence HPLC (Shimadzu, Kjoto, Japan) uređaju.

Elucioni gradijent je formiran pomoću rastvora A: 75 mM amonijum-formijatnog pufera, pH 2,9 i rastvora B: MeOH, sa gradijentom elucije prema protokolu Vidović i sar. (2016), pri brzini protoka od 1 ml min<sup>-1</sup> na 25°C: 0-25 min: 10-25% B (linearni gradijent).

Intenzitet fluorescencije SBD-F/GSH derivata meren je pomoću fluorescentnog detektora RF-10-AXL (Prominence, Shimadzu, Japan) na 516 nm, nakon ekscitacije na 386 nm.

Kvantifikacija se zasniva na obradi površine pika SBD-F/GSH derivata pomoću standardne krive konstruisane korišćenjem serije poznatih koncentracija GSH (0,5–25 µM) pripremljenih u 1,5% MPA.

Redoks stanje glutaciona (RsG) izraženo je kao procentualni udeo redukovane forme u odnosu na ukupni sadržaj glutaciona, prema formuli:  $RsG (\%) = [GSH / (GSH + 2GSSG)] \times 100$ .

### 3.4.3. Ekstrakcija i kvantifikacija ugljenih hidrata u biljnom tkivu *L. vulgaris*

#### 3.4.3.1. Ekstrakcija i kvantifikacija rastvornih ugljenih hidrata u galama, stablu i listovima

##### *L. vulgaris* HPLC metodom

Zamrznuto biljno tkivo *L. vulgaris* (gale, listovi i stabla) homogenizovano je u avanu uz dodavanje tečnog azota, i ekstrahovano u dejonizovanoj vodi (1:10, w:v) u ultrazvučnom kupatilu tokom 30 minuta na sobnoj temperaturi (25°C), prema protokolu iz Vidović i sar. (2015c). Nakon ekstrakcije, uzorci su centrifugirani na 14.000 g tokom 10 minuta na 4°C. Dobijeni supernatant je odvojen, i izvršena je re-ekstrakcija taloga u metanolu pod istim uslovima. Vodeni i metanolni ekstrakti su spojeni i korišćeni za dalju analizu.

Identifikacija i kvantifikacija rastvornih ugljenih hidrata urađena je primenom visoko-efikasne jonoizmenjivačke hromatografije na HPLC DIONEX ICS 3000 (*Dionex, Sunnyvale, USA*) opremljenom kvaternernom gradijentnom pumpom. Za razdvajanje je korišćena hidroksidselektivna anjon-izmenjivačka kolona CarboPac PA100 dimenzija 250x4 mm (*Dionex, Sunnyvale, USA*).

Elucija je postignuta sa tri mobilne faze. Faza A: 600 mM NaOH, faza B: 500 mM natrijum-acetat i faza C: ultra čista voda, pri protoku od 0,7 ml min<sup>-1</sup> i temperaturi kolone od 30°C. Gradijentni program sastojao se iz 7 koraka, 0–5 min: A = 15%, C = 85% (izokratska elucija); 5,0–5,1 min: A = 15%, B = 2%, C = 83% (izokratska elucija); 5,1–12,0 min: A = 15%, B = 2%, C = 83% (izokratska elucija); 12,0–12,1 min: A = 15%, B = 4%, C = 81% (izokratska elucija); 12,1–20,0 min: A = 15%, B = 4%, C = 81% (izokratska elucija); 20,0–20,1 min: A = 20%, B = 20%, C = 60% (izokratska elucija); 20,1–30,0 min: A = 20%, B = 20%, C = 60% (izokratska elucija).

Detekcija je vršena pomoću elektrohemijuskog detektora sa zlatnom radnom elektrodom i Ag/AgCl referentnom elektrodom (Akšić i sar., 2019).

Standardi za glukozu, fruktozu i saharozu pripremljeni su u Ultrapure TKA vodi u koncentraciji 1.000 ng ml<sup>-1</sup>, dok su standardi za ostale ugljene hidrate pripremljeni na isti način, ali u koncentraciji 100 ng ml<sup>-1</sup>.

#### 3.4.3.2. Određivanje ukupnih ugljenih hidrata i skroba kod *L. vulgaris*

Nakon ekstrakcije rastvornih ugljenih hidrata, preostali talozi su isprani 80% etanolom i osušeni tokom 24 časa na 40–50°C. Osušeni materijal je podeljen na dva dela: jedan za određivanje ukupnih nerastvornih ugljenih hidrata (TIC, eng. *total water-insoluble carbohydrates*) i drugi za određivanje koncentracije skroba, prema modifikovanoj metodi po Sadasivam i Manickam (2008).

Za određivanje koncentracije ukupnih ugljenih hidrata antronovim reagensom, osušeni i fino sprášeni talog kuvan je tri sata na 80–90°C sa 2,5 M HCl. Uzorak je potom ohlađen i centrifugiran. Ekstraktu je dodata dejonizovana vode (1:4, v:v), a zatim je usledila neutralizacija čvrstim natrijum-karbonatom (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Koncentracija TIC određena je kolorimetrijski pomoću antronskog reagensa (40 mg antrona rastvorenog u 20 ml koncentrovane H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Kuvanje uzorka sa antronovim reagensom (10 µl ekstrakta + 90 µl dH<sub>2</sub>O + 400 µl antronovog reagens, 1:9:40, v:v:v) odvijalo se u vodenom kupatilu ili termobloku, na temperaturi od 90°C, tokom 8 minuta. Tokom reakcije, ugljeni hidrati se u prisustvu koncentrovane kiseline prevode u furfural, koji sa antronom gradi plavo-zeleni kompleks. Nakon hlađenja na ledu, apsorbanca je

merena na 630 nm pomoću čitača mikrotitar ploča ELISA (*GDV MPT Reader, DV 990 BV6*). Kvantifikacija je izvršena na osnovu standardne krive glukoze (0,1–1,0 mg ml<sup>-1</sup>), a sadržaj je izražen u mg g<sup>-1</sup> suve mase (DW, eng. *dry weight*).

Određivanje koncentracije ukupnih nerastvornih ugljenih hidrata izvršeno je po računu:

$$C \text{ (mg g}_{\text{DW}}^{-1}) = (c(\text{mg ml}^{-1}) \times 10 \times 5 \times V_{\text{HCl}}(\text{ml})) / m(\text{g}_{\text{DW}}),$$

gde je 10 – razblaženje u odnosu na standard, 5 – razblaženje uzorka, a g<sub>DW</sub> – suva masa korišćenog taloga u gramima.

Za određivanje skroba antronskom metodom, talozi iz ekstrakcija za rastvorne ugljene hidrate ispirani su pet puta po 10 minuta sa 80% EtOH na 80°C (1:30, w:v), zatim je talog sušen 24 časa u sušnici na 40°C. Ekstrakcija skroba izvršena je kiselom hidrolizom na ledu u trajanju od 20 minuta, uz dodatak dejonizovane vode (1:10, w:v) i perhlorne kiseline (1:10, w:v). Nakon centrifugiranja na 16.000 g (4°C), supernatant je odvojen, a postupak ekstrakcije taloga je ponovljen pod istim uslovima. Dobijeni supernatanti su spojeni, a alikvot od 0,2 ml je razblažen pet puta dejonizovanom vodom pre dalje analize. Reakciona smeša, koja se sastojala od 50 µl ekstrakta, 50 µl dH<sub>2</sub>O i 400 µl antronskog reagensa (40 mg antrona u 20 ml koncentrovanoj H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), inkubirana je 8 minuta na 90°C. Nakon naglog hlađenja na ledu, apsorbancija je merena na 630 nm pomoću čitača mikrotitar ploča. Kvantifikacija je izvršena pomoću standardne krive glukoze (0,1–1,0 mg ml<sup>-1</sup>).

Određivanje koncentracije skroba izvršeno je po računu:

$$C \text{ (mg g}_{\text{DW}}^{-1}) = (c(\text{mg ml}^{-1}) \times 2 \times 5 \times V_{(\text{voda+perhlorna kiselina})}(\text{ml})) / m(\text{g}_{\text{DW}}),$$

gde je 2 – razblaženje u odnosu na standard, 5 – razblaženje uzorka, g<sub>DW</sub> – suva masa korišćenog taloga u gramima.

### 3.4.4. Ekstrakcija i analiza fotosintetskih pigmenata

Zamrznuti uzorci biljnog tkiva *L. vulgaris* (gale, stablo i listovi) ekstrahovani su u 80% acetonu (1:10, v:v), i centrifugirani na 10.000 g na sobnoj temperaturi. Supernatanti su razblaženi u 80% acetona, a apsorbancija je merena na 663 nm, 645 nm i 470 nm. Koncentracije hlorofila *a* i *b* (Chl *a* i Chl *b*) i karotenoida (Car) određene su spektrofotometrijski (*Shimadzu, UV-160, Kjoto, Japan*) prema jednačinama iz Lichtenthaler i Wellburn (1983), a vrednosti su izražene u µg pigmenta po g sveže mase (FW, eng. *fresh weight*):

$$\text{Chl } a = 12,21 \times A_{663} - 2,81 \times A_{645}$$

$$\text{Chl } b = 20,13 \times A_{645} - 5,03 \times A_{663}$$

$$\text{Car} = (1000 \times A_{470} - 3,27 \times \text{Chl } a - 104 \times \text{Chl } b) / 227$$

### 3.4.5. Analiza brze kinetičke fluorescencije hlorofila (OJIP)

Direktno brzo snimanje fluorescencije hlorofila izvršeno je korišćenjem makroskopskog sistema za fluorescentno snimanje (*FluorCam, Photon Systems Instruments, Brno, Češka Republika*), opremljenog kamerom, softverom i protokolom za merenje koji omogućava praćenje brze indukcije fluorescencije (OJIP, eng. *Analysis of fast chlorophyll fluorescence kinetic transients*), kao što je opisano u Küpper i sar. (2019). OJIP test ne meri direktno količinu (koncentraciju) hlorofila u gramima, već meri fluorescenciju Chl *a*, odnosno njegovu aktivnost i

efikasnost u realnom vremenu. Kada molekuli hlorofila apsorbuju svetlost, oni tu energiju koriste za pokretanje fotosinteze (fotohemiju). Deo energije koji se ne iskoristi za fotohemiju ili ne disipira kao toplota, vraća se nazad u obliku crvene svetlosti — fluorescencije. Upravo tu reemisiju registruje OJIP instrument. Merenje počinje veoma brzo (od 50  $\mu\text{s}$ ) i prati polifazni rast fluorescencije Chl *a* kroz četiri karakteristične faze (O-J-I-P). Grafik OJIP testa sastoji se od x-ose (vreme u  $\mu\text{s}$  na logaritamskoj skali), i y-ose (normalizovani intenzitet fluorescencije, od  $F_0$  do  $F_m$ ) (slika 23).

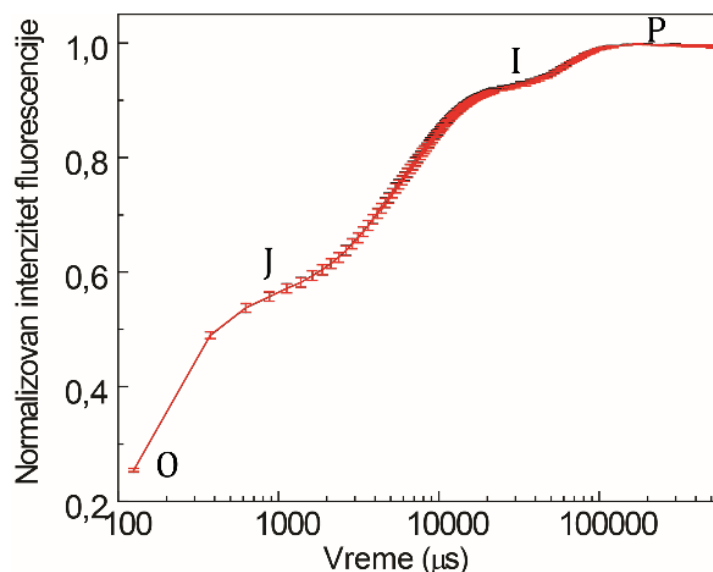
Kriva raste kroz četiri ključne tačke:

1. O (Origin/Početak) – oko 50  $\mu\text{s}$ ; minimalna fluorescencija ( $F_0$ ), kada su svi reakcioni centri otvoreni;
2. J (prva infleksija) – oko 2 ms; redukcija primarnog akceptora  $Q_A$ ;
3. I (druga infleksija) – oko 30 ms; prenos elektrona ka plastohinonu i PS I;
4. P (Peak/Vrh) – maksimalna fluorescencija ( $F_m$ ), kada su reakcioni centri zasićeni/zatvoreni.

Odnos  $F_v/F_m$  (gde je  $F_v = F_m - F_0$ ) je indikator maksimalne kvantne efikasnosti PS II i koristi se kao dijagnostički parametar.

Promene u obliku krive ili vrednostima ovih parametara ukazuju na stresne uslove (npr. suša, patogeni, toksičnost metala) ili oštećenja fotosintetskog aparata.

Za ove eksperimente korišćene su kontrolne biljke i biljke sa razvijenim galama (faza G2). Tkivo je smešteno u mernu komoru, ventilisanu strujom vazduha zasićenog vodenom parom na temperaturi od 24°C, i pažljivo položeno na stakleni prozor vlažnim pamučnim jastučićem fiksiranim najlonskom mrežicom, prema radu Küpper i sar. (2007). Dobijene OJIP krive uzoraka prilagođenih mraku normalizovane su njihovim  $F_p$  vrednostima (ekvivalentno  $F_m$  jer je korišćeno zasićeno zračenje) nakon oduzimanja pozadine. Ekscitaciono svetlo je obezbeđeno sa dva svetlosna panela sa plavom svetlošću (LED diode sa pikom od 460 nm) i zasićujućim bljeskovima plave svetlosti od 4.000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , dok su druga dva panela obezbeđivala merne bljeskove sa optimizovanom kontrolnom elektronikom za brzu kinetiku i sinhronizaciju sa ultrabrzom kamerom. Merenja su sprovedena korišćenjem prilagođenog protokola prema Küpper i sar. (2019). Slike su snimane kroz filter propusnog opsega (684 nm) svakih 250  $\mu\text{s}$  na početku, sa postepenim smanjivanjem brzine kadrova.



Slika 23. OJIP kriva fluorescencije hlorofila *a*.

Analiza je urađena korišćenjem *FluorCam* softvera, a opis korišćenih OJIP-test parametara dat je u tabeli 1 (Stirbet i Govindjee, 2011).

**Tabela 1.** Jednačine i definicije JIP parametara prema Stirbet i Govindjee (2011).

$\varphi_{P0} = J_o^{TR}/J_o^{ABS} = 1 - F_o/F_m$	Maksimalni kvantni prinos primarne PS II fotohemije
$\varphi_{ET20} = J_o^{ET2}/J_o^{ABS} = 1 - F_i/F_m$	Kvantni prinos fluksa transporta elektrona od $Q_A$ do $Q_B$
$\varphi_{RE10} = J_o^{RE1}/J_o^{ABS} = 1 - F_i/F_m$	Kvantni prinos fluksa transporta elektrona do PS I akceptora elektrona
$\psi_{ET20} = J_o^{ET2}/J_o^{TR} = 1 - V_j$	Efikasnost/verovatnoća sa kojom se zarobljeni elektron sa PS II prenosi sa $Q_A$ na $Q_B$
$\psi_{RE10} = J_o^{RE1}/J_o^{TR} = 1 - V_i$	Efikasnost/verovatnoća sa kojom se zarobljeni electron sa PS II prenosi do PS I akceptora
$\delta_{RE10} = J_o^{RE1}/J_o^{ET2} = (1 - V_i)/(1 - V_j)$	Efikasnost/verovatnoća sa kojom se elektron sa $Q_B$ prenosi do PS I akceptora

### 3.4.6. Ekstrakcija i HPLC analiza slobodnih aminokiselina u galama, stablu i listovima *L. vulgaris*

Tkivo gala, listova i stabla *L. vulgaris* ekstrahovani su u 50% MeOH (1:10, w:v), prilagođeno prema protokolu Živanović i sar. (2020). Homogenat je centrifugiran 10 minuta na 14.000 *g* na temperaturi od 4°C. Izdvojeni supernatant je zamrznut u tečnom azotu i čuvan na -80°C za kasniju analizu.

Određivanje slobodnih aminokiselina izvršeno je metodom tečne hromatografije visoke efikasnosti (HPLC) uz prekolonsku derivatizaciju sa *orto*-ftalaldehidom (OPA) u prisustvu  $\beta$ -merkaptetoanola, prema principu koji je opisao Roth (1971). Reagens za derivatizaciju sastojao se od 20 mM natrijum-boratnog pufera (pH 9,5), 0,4 M OPA i  $\beta$ -merkaptetoanola (9:1:0,01, v:v:v). Alikvoti supernatanta su razblaženi 10 puta, pomešani sa istom zapreminom reagensa i nakon 5 minuta inkubacije injektirani u HPLC sistem. OPA reagens sam po sebi nije fluorescentan, ali u reakciji sa aminokiselinama i u prisustvu redukujućeg jedinjenja (kao što je 2-merkaptetoanol) daje derivate (izoindole) koji su fluorescentni i tada ih je moguće detektovati pomoću fluorescentnog detektora (Roth, 1971).

Analiza je urađena na uređaju Shimadzu LC-20AB Prominence korišćenjem reverzno-fazne kolone Luna C18(2) (5,0  $\mu$ m, 250  $\times$  4,6 mm, *Phenomenex Ltd.*). Injekciona zapremina iznosila je 20  $\mu$ l. Mobilna faza se sastojala iz sledećih eluenata, A – 20 mM natrijum-fosfatni pufer pH 6,8 : MeOH : tetrahidrofuran (90:9:1, v:v:v) i B – 20 mM natrijum-fosfatni pufer pH 6,8 : MeOH : tetrahidrofuran (40:59:1, v:v:v), sa brzinom protoka od 1,2 ml min<sup>-1</sup> na temperaturi od 40°C. Razdvajanje proteinogenih aminokiselina (osim prolina, cisteina i histidina) postiglo se sledećim elucionim gradijentom:

- 0–5 min: A = 100%, B = 0% (izokratska elucija);
- 5–30 min: A = 70%, B = 30% (izokratska elucija);
- 30–35 min: B = 30–60% (linearni gradijent);
- 35–45 min: A = 50%, B = 50% (izokratska elucija);
- 45–70 min: B = 50–70% (linearni gradijent);
- 70–90 min: A = 0%, B = 100% (izokratska elucija).

Fluorescencija nastalih derivata merena je pomoću detektora RF-10-AXL na talasnoj dužini ekscitacije od 340 nm i emisije od 455 nm (Noctor i Foyer, 1998b). Kvantifikacija je izvršena poređenjem površina pikova uzoraka sa standardima derivatizovanim na identičan način.

### 3.4.7. Ekstrakcija i određivanje fenolnih jedinjenja primenom HPLC metoda

#### 3.4.7.1. Ekstrakcija i određivanje solubilnih fenolnih jedinjenja i fenolnih jedinjenja vezanih za ćelijski zid u galama, stablu i listovima *L. vulgaris*

Određivanje fenolnih jedinjenja vezanih za ćelijski zid urađeno je metodom bazne hidrolize taloga po protokolu opisanom Gruz i sar. (2011). Tkiva *L. vulgaris*, prethodno zamrznuta, brzo su samlevena tučkom u fini prah i ekstrahovana u MeOH sa 0,1% HCl (1:10, v:v). Uzorci su inkubirani 60 minuta na ledu u mraku, zatim centrifugirani 10 minuta na 16.000 g na 4 °C, prema Cocuron i sar. (2019) i Vidović i sar. (2015).

Talag preostao nakon ekstrakcije osušen je u vakuum uparivaču. Odmereno je 5 mg suvog taloga i inkubirano sa 500 µl 2 M rastvora NaOH tokom 24 h na 25°C uz stalno mešanje, kako bi se raskinule estarske veze između fenolnih kiselina i polisaharida ćelijskog zida. Nakon inkubacije, ekstrakt je zakiseljen dodatkom 100 µl koncentrovane HCl. Oslobođena fenolna jedinjenja su zatim ekstrahovana iz vodene faze dodatkom 1 ml etil-acetata, nakon čega je usledilo centrifugiranje tokom 5 minuta na 16.000 g na sobnoj temperaturi. Gornja faza (etil-acetat) je sačuvana, a postupak ekstrakcije sa etil-acetatom ponovljen je četiri puta. Dobijene frakcije su spojene i uparene do suvog ostatka na vakuum uparivaču. Pre HPLC analize, suvi ekstrakti su resuspendovani u 500 µl 50% MeOH i centrifugirani na 16.000 g tokom 5 minuta na sobnoj temperaturi.

#### 3.4.7.2. Identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja vezanih za ćelijski zid korišćenjem UPLC-DAD metode

Fenolna jedinjenja vezana za ćelijski zid razdvajana su pomoću tečnog hromatografa ultravisokih performansi (UPLC hromatograf, Thermo Dionex Ultimate 3000), koji je kuplovan sa fotodiodnim detektorom. Korišćena je Luna C18(2) reverzno-fazna kolona (5,0 µm, 250 × 4,6 mm, Phenomenex Ltd., Torrance, CA, USA). Mobilna faza se sastojala od sledećih eluenata:

A- acetonitril (ACN), i B - sirćetna kiselina : ACN : fosforna kiselina : voda (10:5:0,1:84,9; v:v:v:v).

Metod je trajao 70 minuta, pri brzini protoka od 1,1 ml min<sup>-1</sup>, i temperaturi od 25°C, a primenjen je sledeći elucioni gradijent, 0–25 min: A = 0%, B = 100% (izokratska elucija); 25–35 min: A = 20%, B = 80% (izokratska elucija); 35–65 min: A = 40%, B = 60% (izokratska elucija); 65–70 min: A = 0%, B = 100% (izokratska elucija).

Hromatogrami su snimani na različitim talasnim dužinama (280 nm za katehine, hidrosibenzojeve kiseline i njihove derivate; 320 nm za hidroksicinamične kiseline i njihove derivate; i flavone na 340 nm). Identifikacija pojedinačnih fenolnih jedinjenja urađena je komparacijom retencionih vremena i njihovih apsorpcionih spektara sa autentičnim odgovarajućim standardima. Kvantifikacija je zasnovana na integrisanoj površini dobijenih pikova, korišćenjem *Chromeleon 6.8* softvera.

### 3.4.7.3. UHPLC-MS/MS OrbiTrap analiza fenolnih jedinjenja kod cecidogena i u stablu *L. vulgaris*

Pre UHPLC-MS/MS OrbiTrap analize, ekstrakti su filtrirani kroz 0,45-mm PTFE membranski filter. Hromatografska razdvajanja su izvedene korišćenjem sistema tačne hromatografije ultravisokih performansi (UHPLC, eng. *Ultra-high-Performance Liquid Chromatography*), koji se sastoji od kvaternarne Accela 600 pumpe i Accela autosamplera (*Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka*). UHPLC sistem je spojen sa hibridnim masenim spektrometrom linearnom jonskom zamkom i OrbiTrap-om (*LTQ-OrbiTrap MS*), opremljenim elektrosprej jonskim izvorom sa zagrevanjem (*HESI-II, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka*). Kolona Synchronis C18 (100 × 2,1 mm, veličina čestica 1,7 μm, *Thermo Fisher Scientific*) korišćena je kao analitička kolona za razdvajanje jedinjenja (Gašić i sar., 2014).

Mobilna faza sastojala se od sledećih eluata: A: voda + 0,01% sirćetna kiselina, i B: ACN. Korišćen je linearni gradijent pri brzini protoka od 0,25 ml min<sup>-1</sup>, a zapremina injektovanja je bila 5 μl: 0–1 min: B = 2%, 1–14 min: B = 2 do 98%, 14–14,1 min: B = 98 do 2%, a zatim B = 2% tokom 5 min.

Maseni spektrometar je radio u negativnom jonizacionom modu. Parametri jonskog izvora podešeni su na sledeći način: napon izvora 4,5 kV; napon kapilare -4 V; napon cevnog sočiva -59,11 V; temperatura kapilare 275°C; protok glavnog i pomoćnog gasa (N<sub>2</sub>) 30 i 7 proizvodnih jedinica (Kečkeš i sar., 2013).

MS spektri su dobijeni akvizicijom punog opsega koji pokriva 100–1.000 *m/z*. Rezolucija je postavljena na 30.000 za kompletnu analizu skeniranja. Za detekciju monoizotopske mase nepoznatih jedinjenja korišćena je potpuna analiza skeniranja, dok je put fragmentacije dobijen pomoću MS<sup>n</sup>. Ova precizna metoda pretrage masa zasnovana je na MS analizi visoke rezolucije (OrbiTrap), pretrazi baze podataka i predviđanje MS<sup>n</sup> fragmentacije korišćenjem softvera *Mass Frontier 6.0* (*Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka*).

Priprema osnovnog rastvora mešavine svih fenolnih jedinjenja (1.000 mg l<sup>-1</sup>) urađena je u metanolu. Razblaživanje osnovnog rastvora metanolom dalo je radne rastvore koncentracije od 0.025; 0.050; 0.100; 0.250; 0.500; 0.750 i 1.000 mg l<sup>-1</sup>. Kalibracione krive su dobijene crtanjem površina pikova standarda u odnosu na njihovu koncentraciju. Fenoli su identifikovani i kvantifikovani prema odgovarajućim spektralnim karakteristikama: maseni spektar, tačna masa, karakteristična fragmentacija i karakteristično vreme zadržavanja. Za kontrolu instrumenta, prikupljanje podataka i analizu podataka korišćen je softver *Xcalibur* (verzija 2.1). Kvantifikacija je urađena prema metodu tačne pretrage mase (± 5 ppm) poređenjem vremena zadržavanja i tačne mase dostupnih standarda. Fenolni glikozidi bez dostupnih standarda su kvantifikovani korišćenjem odgovarajućih aglikona ili odgovarajućih glikozida kao standarda. Kvantifikacija aglikona bez standarda i njihovih glikozida je urađena korišćenjem jednog od reprezentativnih fenola iz iste podklase fenola. Apigenin je korišćen za kvantifikaciju apigenin glikozida, diosmetina, hispidulina i njihovih glikozida; hesperetin je korišćen za kvantifikaciju acetina, pektolinaringenina, izorhamnetina i njihovih glikozida i naringenin glikozida; hrizin je korišćen za kvantifikaciju hispidulina i njegovog izomera. Nepoznato jedinjenje je kvantifikovano korišćenjem apigenina kao standarda.

### 3.4.7.4. Ekstrakcija solubilnih fenolnih jedinjenja iz gala, stabla i listova *L. vulgaris*

Zamrznuto biljno tkivo *L. vulgaris* (gale, stablo i listovi) homogenizovano je u tečnom azotu do finog praha, a zatim ekstrahovano u metanolu (MeOH) sa 0,1% HCl (1:10, w:v), prema

protokolu koji su opisali Vidović i sar. (2015b). Ekstrakcija je vršena na ledu u mraku tokom 50 minuta, nakon čega je homogenat centrifugiran na 16.000 *g* tokom 10 minuta na 4°C. Radi uklanjanja lipofilnih jedinjenja (hlorofila i lipida) koja mogu ometati hromatografsku analizu, 600 µl supernatanta pomešano je sa 400 µl dejonizovane vode i 600 µl hloroforma. Smeša je inkubirana na šejkeru 45 minuta na 4°C u mraku, a zatim ponovo centrifugirana (16.000 *g*, 10 min, 4°C). Donja, hloroformska frakcija je odbačena, dok je gornji vodeni sloj zadržan za dalju analizu i podeljen na dva jednaka alikvota: frakcija solubilnih fenolnih glikozida, i frakcija aglikona, koja je dobijena kiselom hidrolizom glikozida u 2 M HCl tokom 60 minuta na 85°C prema metodi koju su opisali Hertog i sar. (1992). Iz svih pripremljenih ekstrakata uklonjen je kiseonik propuštanjem struje inertnog gasa (azotom ili argonom) radi sprečavanja oksidacije fenola, nakon čega su uzorci čuvani na -80°C do hromatografske analize.

Fenolna jedinjenja u insektima (*n* = 3) i larvama (*n* = 3) ekstrahovana su korišćenjem iste procedure kao za biljno tkivo, osim dodatka hloroforma.

### 3.4.7.5. Identifikacija i kvantifikacija solubilnih fenolnih jedinjenja pomoću HPLC-DAD

Fenolni profil lista, stabla i gala *L. vulgaris* analiziran je pomoću HPLC-a, gde je korišćena reverzno-fazna kolona (5,0 µm, 250×4,6 mm Luna C18(2), *Phenomenex Ltd.*, Torans, CA, USA) i HPLC Shimadzu LC-20AB Prominence liquid chromatograph (*Shimadzu, Kyoto, Japan*). Zapremina injektovanja svakog uzorka bila je po 50 µl.

Elucioni gradijent je sadržao dve mobilne faze:

A: acetonitril (ACN) i

B: sirćetna kiselina: ACN:fosforna kiselina:voda (10:5:0,1:84,9, v:v:v:v),

pri protoku 1 ml min<sup>-1</sup>, na temperaturi od 25°C.

Primenjen je sledeći gradijent elucije, kako bi se postiglo fino razdvajanje fenola:

0–5 min: A = 0%, B = 100% (izokratska elucija);

5–25 min: A = 0–20%, B = 100–80% (linearni gradijent);

25–35 min: A = 20–40%, B = 80–60% (linearni gradijent);

35–40 min: A = 40–0%, B = 60–100% (linearni gradijent).

Fenolna jedinjenja su detektovana pomoću fotodiodnog detektora (*SPD-M20A Diode array Prominence detector*). Hromatogrami su snimani na više talasnih dužina (280, 320 i 340 nm), kako bi se obuhvatili specifični maksimumi apsorpcije za datu grupu fenolnih jedinjenja (hidroksibenzoeve kiseline i njihovi derivati na 280 nm, hidroksicinamati i derivati na 320 nm, flavoni na 340 nm).

Pojedinačni fenolne komponente prisutne u uzorcima su identifikovane na osnovu poređenja retencionih vremena i apsorpcionih spektara sa autentičnim standardima.

### 3.4.8. Određivanje lignina u biljnom tkivu

Sadržaj lignina u uzorcima *L. vulgaris* određen je metodom solubilizacije u acetilbromidu, prema protokolima koje su opisali Chen i sar. (2000). Postupak je započet korišćenjem taloga preostalog nakon ekstrakcije fenola vezanih za ćelijski zid. Frakcija ćelijskog zida izolovana je alkalnom hidrolizom u 2 M NaOH tokom 17 časova na sobnoj temperaturi uz

konstantno mešanje. Talog dobijen nakon centrifugiranja ispran je dva puta dejonizovanom vodom i sušen 24 časa na 80°C.

Kvantifikacija lignina je izvedena acetil bromidnim testom, gde je korišćeno 2,5 mg frakcije ćelijskog zida sa 250 µl 25% acetil-bromida (v:v u glacijalnoj sirćetnoj kiselini). Smeša je inkubira na 60°C tokom 60 minuta, čime je postignuta acilacija i potpuna solubilizacija lignina (Morrison, 1972). Nakon toga, uzorci su ohlađeni na ledu, a zatim neutralisani sa 2 M NaOH. Posle centrifugiranja od 5 minuta na 4°C na 15.000 g, supernatant (250 µl) je pomešan sa 5 µl 15 M hidroksilamina (radi uklanjanja slobodnog broma), i 2,495 µl glacijalne sirćetne kiseline.

Apsorbanca finalnog rastvora merena je spektrofotometrijski na 280 nm (*Shimadzu, UV-160, Kyoto, Japan*). Standardne krive su dobijene korišćenjem rastvora koniferil alkohola, koji je sveže pripremljen u glacijalnoj sirćetnoj kiselini ili u MeOH, u opsegu koncentracija 10–150 µM. 10 mM štok rastvara se u MeOH, a ostala razblaženja prave se u sirćetnoj kiselini. U ovom testu lignin hidrolizuje na monomere, pa se zato koniferil alkohol koristi kao standard.

Sadržaj lignina izražen je kao µmol ekvivalenata koniferil alkohola po mg ćelijskog zida.

### 3.4.9. Ekstrakcija antioksidativnih enzima iz stabla, listova i gale *L. vulgaris*

Priprema uzoraka za određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima izvršena je homogenizacijom zamrznutog biljnog tkiva *L. vulgaris* (list, stablo i gale) u tečnom azotu do forme finog praha. Ekstrakcija je rađena u odgovarajućim puferima specifičnim za svaki enzim, uz dodatak 5% (w:v) nerastvornog polivinil-pirolidona (PVP), 5% (w:v) koktela inhibitora proteaza (Pi; *P2714, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) ili fenilmetilsulfonyl fluorida (PMSF, eng. *phenylmethylsulfonyl fluoride*) kao inhibitora proteaza. Odnos tkiva i ekstrakcionog pufera je bio 1:10 (w:v) za list, dok je 1:6 (w:v) za stablo i gale. Nakon homogenizacije, ekstrakti su inkubirani na ledu tokom 30 minuta uz povremeno mešanje, a potom su centrifugirani na 10.000 g tokom 10 minuta na 4°C. Dobijeni supernatanti su odvojeni i odmah korišćeni za merenje aktivnosti enzima.

#### 3.4.9.1. Ekstrakcija solubilnih peroksidaza III klase (POD), katalaze (CAT) i superoksid-dismutaza (SOD)

Ekstrakcija solubilnih POD (EC 1.11.14.7), CAT (EC 1.11.1.6) i SOD (EC 1.15.1.1) iz biljnog tkiva *L. vulgaris* urađena je u 50 mM Tris-HCl pH 7,2 puferu sa 50 mM NaCl i 0,05% Tween- 20, 5% PVP (w:v) i 1 mM PMSF (w:v), po metodi opisanoj u Kukavica i sar. (2009).

#### 3.4.9.2. Ekstrakcija enzima iz askorbat-glutation ciklusa (APX, DHAR, MDAR, GR)

Ekstrakcija askorbat-peroksidaze (APX, EC 1.11.1.11) vršena je u ekstrakcionom medijumu koji je sadržao 100 mM kalijum-fosfatni pufer pH 7,2 sa 1mM EDTA, 0,1% (w:v) Triton X-100, 5% (w:v) PVP, 5% (w:v) Pi i 10mM askorbat.

Ekstrakcija za enzime monodehidroaskorbat-reduktazu (MDAR, EC 1.6.5.4), dehidroaskorbat-reduktazu (DHAR, EC 1.8.5.1) i glutation-reduktazu (GR, EC 1.6.4.2) iz smrznutog, spraćenog biljnog tkiva rađena je u 100mM HEPES-KOH puferu pH 7,8 sa 2 mM EDTA, 5 mM magnezijum-hloridom (MgCl<sub>2</sub>), 3 mM 2-merkaptioetanolom, 5% (w:v) PVP, 5% (w:v) Pi i 0,1% (w:v) Triton X-100 (Morina i sar., 2010).

### 3.4.9.3. Izolacija ćelijskog zida i ekstrakcija solubilnih i peroksidaza vezanih za ćelijski zid

Ekstrakcija peroksidaza (POD) koje su jonski ili kovalentno vezane za elemente ćelijskog zida, izvršena je prema protokolu iz Kukavica i sar. (2009). Biljni materijal je homogenizovan u 50 mM M Tris-HCl puferu (pH 7,2) koji je sadržao 50mM NaCl, 1mM PMSF (*w:v*) i 0,05% Tween-80. Homogenat je inkubiran na ledu uz stalno mešanje tokom 40 minuta, a nakon toga je centrifugiran na 1.000 *g* tokom 20 minuta na 4°C. Dobijeni supernatant predstavljao je frakciju solubilnih peroksidaza (solPOD), dok je preostali talog korišćen za dalju izolaciju jonski i kovalentno vezanih formi enzima. Za ekstrakciju jonski vezanih peroksidaza (ionPOD), talog je resuspendovan u 50 mM Tris-HCl puferu (pH 7,2) sa dodatkom 1 M NaCl u odnosu 1:6 (*w:v*) za uzorke lista, odnosno 1:4 (*w:v*) za uzorke stabla. Nakon inkubacije od 30 minuta na ledu uz mešanje, ekstrakti su centrifugirani na 10.000 *g* tokom 20 minuta na 4°C, a supernatant sa ionPOD je odvojen za dalju analizu. Preostali talog je ispran nekoliko puta 50 mM Tris-HCl puferom (pH 7,2) kako bi se uklonili tragovi soli. Kovalentno vezane peroksidaze (covPOD) ekstrahovane su iz ispranog taloga dodatkom istog pufera u koji su dodati digestivni enzimi 0,5% celulaza (EC 3.2.1.4, *Sigma*) i 2,5% pektinaza (EC 3.2.1.15, *Sigma*). Proces enzimske ekstrakcije trajao je 24 časa na 4°C uz stalno mešanje. Finalni ekstrakt je centrifugiran na 1.000 *g* tokom 10 minuta na 4°C, nakon čega je izdvojen supernatant sa frakcijom covPOD.

### 3.4.10. Određivanje aktivnosti ekstrahovanih enzima u stablu, listovima i galama *L. vulgaris*

Aktivnosti svih ekstrahovanih enzima u tkivu *L. vulgaris* određene su spektrofotometrijski korišćenjem UV-VIS spektrofotometra sa sistemom za kontrolu temperature (*Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan*). Sva merenja su izvedena u tri nezavisna uzorka, na temperaturi od 25°C. Dobijene vrednosti enzimske aktivnosti izražavane su na dva načina: kao specifična aktivnost u odnosu na koncentraciju ukupnih rastvornih proteina (Sp, U mg<sup>-1</sup> proteina), ili kao aktivnost po jedinici sveže mase biljnog tkiva (A, U g<sup>-1</sup>FW). Enzimski eseji su sprovedeni prema protokolima opisanim u radovima Morina i sar. (2010) i Vidović i sar. (2015b).

#### 3.4.10.1. Određivanje aktivnosti POD

Aktivnost peroksidaza klase III (POD) određena je spektrofotometrijski praćenjem oksidacije gvajakola (2-metoksifenola) u tetragvajakol, prema optimizovanom protokolu opisanim u radu Vidović i sar. (2015b). Reakciona smeša (u kiveti ukupne zapremine 1 ml) sastojala se od 100 mM kalijum-fosfatnog pufera (pH 6,5) sa dodatkom 1 mM EDTA, 30 µl ekstrakta, 20 µl 1 M gvajakola, a reakcija je započeta dodavanjem 20 µl 1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Kinetika reakcije praćena je kao linearno povećanje apsorbance na 470 nm tokom 3 minuta, usled formiranja tetragvajakola. Aktivnost enzima izračunata je korišćenjem ekstinkcionog koeficijenta za tetragvajakol ( $\epsilon^{470}_{\text{tetragvajakol}} = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Jedna jedinica enzimske aktivnosti (U) definisana je kao količina enzima koja katalizuje oksidaciju 1 µmol gvajakola u minuti pri standardnim uslovima na 25°C.

### 3.4.10.2. Određivanje aktivnosti APX

Aktivnost askorbat-peroksidaze (APX; EC 1.11.1.11) određena je spektrofotometrijski praćenjem oksidacije askorbata prema metodu Nakano i Asada (1981), optimizovanom za tkivo *L. vulgaris* (Vidović i sar., 2015b). Princip eseja zasniva se na merenju pada apsorbance askorbata na 290 nm u prisustvu vodonik peroksida, što odgovara oksidaciji askorbata u dehidroaskorbat. Reakciona smeša (ukupne zapremine 1 ml) sastojala se od 50 mM kalijum-fosfatnog pufera (pH 7,2) koji je sadržao 2 mM EDTA, 0,2 mM askorbata i ekstrakta koji je prethodno razblažen 33 puta. Reakcija je započeta dodavanjem 20  $\mu$ l 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Kinetika je praćena tokom 3 minuta na 25°C, uz obavezno oduzimanje vrednosti neenzimske oksidacije askorbata (merene u odsustvu biljnog ekstrakta). Aktivnost enzima izračunata je korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta za askorbat ( $\epsilon^{290}_{Asc} = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Jedna jedinica enzimske aktivnosti (U) definisana je kao količina enzima neophodna da katalizuje oksidaciju 1  $\mu$ mol askorbata u minuti pod navedenim eksperimentalnim uslovima.

### 3.4.10.3. Određivanje aktivnosti MDAR

Aktivnost monodehidroaskorbat-reduktaze (MDAR; EC 1.6.5.4) određena je spektrofotometrijski praćenjem oksidacije nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADH) na 340 nm, prema metodi Hossain i Asada (1985). Princip eseja se zasniva na regeneraciji askorbata iz monodehidroaskorbat radikala (MDA<sup>•</sup>), pri čemu NADH služi kao donor elektrona. Reakciona smeša (ukupne zapremine 1 ml) sadržala je 100 mM kalijum-fosfatni pufer (pH 7,8) sa 1 mM EDTA, 2,5 mM askorbata, 0,25 mM NADH i 1 U askorbat-oksidge (AO). U smešu je dodavano 40  $\mu$ l (za uzorke lista), odnosno 10  $\mu$ l ekstrakta (za uzorke stabla). MDA<sup>•</sup> radikali su generisani *in situ* u reakcionom sistemu pomoću askorbata i AO. Merenje je izvedeno u dva koraka tokom 3 minuta na 25°C. Prvo je praćena ukupna promena apsorbance u punoj reakcionoj smeši, a zatim je snimana nespecifična oksidacija NADH u odsustvu askorbat-oksidge. Stvarna aktivnost MDAR izračunata je kao razlika između ove dve reakcije, koristeći molarni ekstinkcioni koeficijent za NADH ( $\epsilon^{340}_{NADH} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Jedna jedinica enzimske aktivnosti (U) definisana je kao količina enzima koja oksiduje 1  $\mu$ mol NADH u minuti u prisustvu MDA<sup>•</sup> radikala pod navedenim uslovima.

### 3.4.10.4. Određivanje aktivnosti DHAR

Aktivnost dehidroaskorbat-reduktaze (DHAR; EC 1.8.5.1) određena je spektrofotometrijski praćenjem stvaranja askorbata na 265 nm, prema modifikovanom protokolu Hossain i Asada (1984). Princip testa se zasniva na redukciji dehidroaskorbata (DHA) u askorbat, uz prisustvo redukovanog glutaciona (GSH) kao donora elektrona. Reakciona smeša (ukupne zapremine 1 ml) sastojala se od 100 mM kalijum-fosfatnog pufera (pH 7,0) koji je sadržao 1 mM EDTA, 0,2 mM DHA i 40  $\mu$ l ekstrakta. Reakcija je započeta dodavanjem GSH (finalne koncentracije 2 mM). Promena apsorbance je praćena tokom 3 minuta na konstantnoj temperaturi od 25°C. Od ukupne brzine reakcije oduzeta je vrednost neenzimske redukcije između DHA i GSH, merene u odsustvu biljnog ekstrakta.

Aktivnost enzima izračunata je korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta za askorbat ( $\epsilon^{265}_{Asc} = 14,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Jedna jedinica enzimske aktivnosti (U) definisana je kao količina enzima neophodna za proizvodnju 1  $\mu$ mol askorbata u minuti pod navedenim eksperimentalnim uslovima.

### 3.4.10.5. Određivanje aktivnosti GR

Aktivnost glutation-reduktaze (GR; EC 1.8.1.7) određena je spektrofotometrijski praćenjem oksidacije NADPH na 340 nm, prema metodi Foyer i Halliwell (1976). Princip eseja se zasniva na redukciji oksidovanog glutationa (GSSG) u prisustvu NADPH kao donora elektrona. Reakciona smeša (ukupne zapremine 1 ml) sastojala se od 50 mM kalijum-fosfatnog pufera (pH 7,8) sa 2 mM EDTA, 0,1 mM NADPH i 50  $\mu$ l biljnog ekstrakta. Reakcija je započeta dodavanjem GSSG (finalne koncentracije 1 mM). Pad apsorbance je praćen tokom 1 do 3 minuta na konstantnoj temperaturi od 25°C. Od ukupne reakcije oduzeta je vrednost nespecifične oksidacije NADPH merene u odsustvu supstrata (GSSG).

Aktivnost enzima izračunata je korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta za NADPH ( $\epsilon^{340}_{\text{NADPH}} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Jedna jedinica enzimske aktivnosti (U) definisana je kao količina enzima neophodna za oksidaciju 1  $\mu$ mol NADPH u minuti pod navedenim eksperimentalnim uslovima.

### 3.4.11. Određivanje koncentracije proteina u ekstraktima biljnog tkiva

Koncentracija ukupnih rastvornih proteina u biljnim ekstraktima određena je kolorimetrijskom metodom po Bradfordu (1976), prilagođenom za rad na mikrotitar pločama. Metoda se zasniva na specifičnom vezivanju boje *Coomassie Brilliant Blue G-250* za bočne grupe aminokiselina, što dovodi do pomeranja maksimuma apsorbance sa 465 nm na 595 nm.

Bradfordov reagens pripremljen je rastvaranjem 100 mg boje *Coomassie Brilliant Blue G-250* u 50 ml 95% etanola, uz dodatak 100 ml 85% fosforne kiseline, i dopunjavanjem destilovanom vodom do 200 ml. Pre same upotrebe, rastvor je razblažen destilovanom vodom u odnosu 1:5 (v:v) i filtriran.

Analiza je izvedena pipetiranjem 5  $\mu$ l ekstrakta i 200  $\mu$ l radnog reagensa u bunariće mikrotitar ploče (odnos uzorak:reagens = 1:40). Nakon inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, apsorbance je merena na 595 nm pomoću čitača za mikrotitar ploče (*Tecan Infinite M Nano+* ili *GDV DV.990 BV6*).

Koncentracija proteina izračunata je na osnovu standardne krive konstruisane korišćenjem goveđeg serum albumina (BSA) kao standarda, u opsegu koncentracija od 0,1 do 1,0 mg ml<sup>-1</sup>. Standardi su pripremljeni u istom ekstrakcionom puferu koji je korišćen za izolaciju enzima, kako bi se eliminisao eventualni uticaj komponenti pufera na razvoj boje.

### 3.4.12. Elektroforetsko razdvajanje proteina iz stabla, listova i gale *L. vulgaris*

#### 3.4.12.1. Izoelektrično fokusiranje proteina

Izoelektrično fokusiranje (IEF) je elektroforetska tehnika u kojoj se razdvajanje proteina vrši na osnovu njihove izoelektrične tačke (pI). Izoelektrična tačka proteina je jednaka pH rastvora pri kome su proteini električno neutralni. Zavisí od sastava proteina i zato predstavlja fizičko-hemijsku konstantu za svaki protein. Metodom IEF razdvajane su izoforme peroksidaza (POD) iz ekstrakata biljnog tkiva *L. vulgaris* (stablo i gale).

IEF se izvodi na poliakrilamidnom gelu u kome je prethodno uspostavljen konstantan pH gradijent između dve elektrode. Gradijent se uspostavlja mešavinom amfolita nosača koji su raspoređeni u gelu prema svojim izoelektričnim tačkama kada se gel podvrgne električnoj struji (prefokusiranje). U fazi fokusiranja, proteini putuju do anode ili katode, u zavisnosti od njihovog naelektrisanja, ili do zone sa pH vrednošću jednakom njihovoj pI. Proteini su u ovom trenutku električno neutralni, gube elektroforetsku pokretljivost i fokusiraju se u uskoj zoni. Po završetku izoelektričnog fokusiranja na gel, fiksacija odvojenih proteina se vrši bojenjem srebrom ili bojom kao što je Coomassie-Blue.

Za razdvajanje enzima na osnovu njihove pI vrednosti, uzorci su izoelektrofokusirani pomoću horizontalnog *Multifor* sistema (*Amersham, Biosciences*). Izoforme proteina razdvajane su u pH opsegu od 3,0-9,0 na 7,5% poliakrilamidnom gelu, čiji se sastav (zapremine za 1 gel, za 16,5 ml gela):

30% akrilamid (AA/bis AA): 4,125 ml (finalna koncentracija 7,5%),  
N,N,N',N'-tetrametil-etan-1,2-diamina (TEMED): 13,2  $\mu$ l (finalna koncentracija 7 mM),  
10% amonijum persulfat (APS): 82,5  $\mu$ l (finalna koncentracija 0,05%),  
50% glicerol: 4,4 ml (finalna koncentracija 13,3%),  
meša amfolita pI 3-10: 1,65 ml (finalna koncentracija 3%), i  
dejonizovana voda: 6,325 ml.

Izoelektrično fokusiranje proteina izvedeno je na horizontalnim gelovima dimenzija 15 × 11 cm. Rastvor za polimerizaciju je uliven između staklenih ploča, a gornja ivica je prekrivena slojem *n*-butanola radi obezbeđivanja ravne površine i sprečavanja kontakta sa atmosferskim kiseonikom. Polimerizacija je vršena na sobnoj temperaturi u trajanju od 60 do 120 minuta. Nakon polimerizacije, ploča sa gelom je fiksirana na rashladnu platformu IEF aparature pomoću tankog sloja dejonizovane vode. Za uspostavljanje kontakta sa elektrodama korišćene su papirne trake natopljene anodnim (75 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i katodnim (150 mM NaOH) rastvorom. Pre nanošenja uzoraka, izvršeno je prefokusiranje gela radi formiranja stabilnog pH gradijenta pod uslovima od 2.000 V, 50 mA i 10 W, pri konstantnoj temperaturi od 4°C u trajanju od 30 do 45 minuta. Uzorci su naneti na površinu gela pomoću aplikacionih papirića, pri čemu je na svaki papirić naneta količina od 8  $\mu$ g proteina (maksimalne zapremine do 20  $\mu$ l), nakon čega je nastavljeno fokusiranje do postizanja konačnog razdvajanja proteina prema njihovim izoelektričnim tačkama. Fokusiranje uzoraka izvedeno je pod uslovima od 2.000 V, 50 mA i 15 W, pri konstantnoj temperaturi od 4°C, u trajanju od 90 do 120 minuta. Napredak procesa praćen je putem jačine struje; rad elektroforeze je prekidano u trenutku kada je jačina struje opala na stabilnih 8 mA, što je indikator da su proteini dostigli svoje izoelektrične tačke i da je gradijent u potpunosti formiran. Po završetku procesa, gel je odmah podvrgnut fiksaciji i bojenju.

Radi precizne identifikacije pI vrednosti svake izoforme ispitivanih proteina, korišćeni su komercijalni markeri sa pI opsegom 3,8-9,3 (*IEF-MIA Sigma Aldrich*). Marker je pripremljen kombinacijom sledećih jedinjenja: metil-crveno (pI 3,8), inhibitor tripsina (pI 4,6), karbonska anhidraza II (pI 5,9), karbonska anhidraza I (pI 6,6) i tripsinogen (pI 9,3).

#### 3.4.12.2. Vizuelizacija izoformi peroksidaza na gelu

Nakon završene elektroforeze, gelovi su isprani dejonizovanom vodom, a zatim podvrgnuti postupku fiksiranja i bojenja. Ukupni proteini i trake pI markera vizuelizovani su fiksiranjem gelova u rastvoru 50% metanola i 10% sirćetne kiseline tokom 20 minuta, nakon čega je usledilo bojenje rastvorom 0,1% *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) tokom dodatnih 20 minuta (Veljović Jovanović i sar., 2006). Višak boje je uklonjen ispiranjem gelova tokom noći u

rastvoru 5% metanola i 7% sirćetne kiseline. Specifična detekcija izoformi peroksidaza (POD) na gelu izvršena je prema protokolu koji su opisali Kukavica i sar. (2012). Gelovi su inkubirani u rastvoru za bojenje koji je sadržao 10 mg  $\alpha$ -naftola rastvorenog u 10 ml metanola, uz dodatak 90 ml 100 mM kalijum-fosfatnog pufera (pH 6,0). Reakcija vizuelizacije enzimske aktivnosti započeta je dodavanjem 50  $\mu$ l 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Izoforme peroksidaza postale su vidljive u obliku tamnih traka nakon 5–15 minuta inkubacije.

### 3.4.13. Analiza proteina metodom imunoblota

Ispitivanje enzima u uzorcima urađeno je i primenom Western blot metode, koja se sastoji od tri faze: razdvajanje proteina prema veličini elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE), transfera razdvojenih proteina sa gela na membranu i imunodetekcije proteina pomoću specifičnih antitela.

#### 3.4.13.1. Vertikalna elektroforeza na poliakrilamidnom gelu pod denaturišućim uslovima (SDS- PAGE)

Primenom SDS-PAGE elektroforeze proteini se razdvajaju prema svojoj molekularnoj masi i naelektrisanju, jer ovi faktori određuju brzinu kojom će polipeptidi putovati kroz gel. Za razdvajanje proteina korišćena je tehnika jednodimenzionalnog razdvajanja proteina prema molekularnim masama u denaturišućim uslovima na poliakrilamidnom gelu (PAGE, eng. *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) u prisustvu natrijum dodecil sulfata (SDS, eng. *Sodium Dodecyl Sulfate*), po modifikovanoj Laemmli metodi (Laemmli, 1970). SDS (nosioc negativnog naelektrisanja) se snažno vezuje za proteine, i kada se kuvaju sa SDS-om, proteini dobijaju negativno naelektrisanje proporcionalno svojoj molekularnoj masi. Ova negativna naelektrisanja se međusobno odbijaju, dolazi do promene konformacije proteina, i ovako denaturisani, izduženi polipeptidni lanci negativnog naelektrisanja se razdvajaju isključivo na osnovu mase, i na gelu dobijaju samo monomeri. Korišćenjem ditiotreitola (DTT), koji redukuje disulfidne mostove proteina, pojačava se destabilizacija tercijarne i kvaternarne strukture proteina i pojačava efekat razmotavanja polipeptidnih lanaca. Što je manja veličina polipeptidnog lanca, to brže putuje kroz pore gela.

Razdvajanje proteina prema njihovim molekularnim masama izvršeno je metodom vertikalne elektroforeze na sistemu *Mini-PROTEAN® II* (Bio-Rad, Minhen, Nemačka). Korišćeni su diskontinuirani poliakrilamidni gelovi debljine 1 mm, sastavljeni iz gela za koncentrovanje (eng. *stacking gel*) (5% akrilamida) i gela za razdvajanje (15% akrilamida). Gel za razdvajanje pripremljen je u 0,375 M Tris-HCl puferu (pH 8,8) i sadrži 29% AA i 1% N,N' bis AA, dok je gel za koncentrovanje pripremljen u 0,13 M Tris-HCl puferu (pH 6,8) i sadrži 5% AA. Polimerizacija oba dela gela indukovana je dodatkom 0,1% APS i 0,1% TEMED.

Uzorci su pre nanošenja na gel pripremljeni mešanjem sa puferom za uzorke (PUZ) u odnosu 1:2 (v:v), čime su postignute finalne koncentracije od 2% (w:v) SDS, 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% (w:v) glicerola, 100 mM DTT i 0,002% (w:v) bromfenol plavog (Veljović Jovanović i sar., 2006). Ovako pripremljeni uzorci kuvani su 30 minuta na 100°C, a potom ohlađeni na sobnu temperaturu. U svaki bunarić gela naneto je po 8  $\mu$ g proteina.

Elektroforeza je izvedena u elektrodnom puferu (0,025 M Tris-HCl, 0,192 M glicin, 10% SDS, pH 8,3). Proces je započet pri konstantnom naponu od 120 V dok su se uzorci nalazili u gelu za koncentrovanje, nakon čega je napon smanjen na 100 V tokom prolaska kroz gel za razdvajanje. Proteini se kreću ka pozitivnoj elektrodi, prvo kroz gel za koncentrovanje, a zatim

kroz gel za razdvajanje. Elektroforeza je prekinuta nakon 2–3 sata, kada je front boje (bromfenol plavo) dostigao donju ivicu gela. Za identifikaciju molekulskih masa proteina korišćen je standardni marker u opsegu 10–260 kDa (*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder*, Thermo Scientific, Rokford, SAD).

### 3.4.13.2. Imunoblot (Western blot)

Nakon završene SDS-PAGE, proteini su sa gela preneti na membranu od polivinilidendifluorida (PVDF) ili nitrocelulozne membrane polusuvim postupkom (eng. *semi-dry*) (Burnette 1981). Elektro-transfer je izveden pomoću uređaja *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD) u transfer puferu (tris-glicin puferu, pH 8,3) sa dodatkom 20% metanola (v:v). Elektrotransfer je obavljen pri 55 mA (za dva gela/„sendviča“), pri naponu od 10 do 20 V, u trajanju oko 50 minuta. Listovi gustog filter papira (*Whatman 3MM*) i nitrocelulozne membrane su ekvilibrisani u transfer puferu tokom 30 minuta, dok se PVDF membrane aktiviraju u metanolu pa zatim ekvilibrišu u transfer puferu (30 minuta). Nakon završene SDS-PAGE elektroforeze gelovi su isprani od SDS-a i ekvilibrisani u transfer puferu 20 minuta. Membrana se priljubljuje direktno uz gel iz SDS-PAGE elektroforeze. Par gel – membrana se stavlja između listova filter papira, a zatim se ovaj „sendvič“ postavlja između elektroda, i ceo sklop potapa u kadicu sa puferskim rastvorom za prenos. Proteini pod dejstvom električne struje putuju kroz gel ka pozitivnoj elektrodi, i na tom putu se zadržavaju na membrani. Po završetku, gelovi su stavljeni u rastvor za bojenje, a membrane u 1% NFDM (eng. *Non-Fat Dry Milk*) u PBS puferu (eng. *Phosphate Buffered Saline*, pufersani fiziološki rastvor: 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,7 mM KCl, 0,14 M NaCl; pH 7,2) da se ne bi osušili. Efikasnost transfera potvrđena je reverzibilnim bojenjem membrane rastvorom 1% Ponceau-S u 5% sirćetnoj kiselini. Ova boja se reverzno vezuje za proteine na membrani čime je omogućena njihova vizuelizacija, nakon čega je boja uklonjena ispiranjem u dejonizovanoj vodi.

Nespecifično vezivanje antitela sprečeno je blokiranjem membrane u rastvoru 0,5% bezmasnog mleka u prahu (NFDM, eng. *Non-Fat Dry Milk*; GE Healthcare Bio-Sciences) u PBS puferu (eng. *Phosphate Buffered Saline*, pufersani fiziološki rastvor: 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,7 mM KCl, 0,14 M NaCl; pH 7,2) tokom jednog sata na sobnoj temperaturi uz stalno mešanje. Imunodetekcija ciljnih proteina obavljena je dvostepenom inkubacijom. Membrana je prvo inkubirana sa primarnim antitelom (nakon blokiranja u 1% NFDM u PBS-u) tokom noći na 4°C uz blago mešanje. Višak nevezanih antitela uklonjen je serijom ispiranja u TPBS rastvoru (0,1% Tween 20 u PBS, 4 × 5 minuta), nakon čega je usledila inkubacija sa odgovarajućim sekundarnim antitelom u TPBS-u u trajanju od dva sata na 4°C uz blago mešanje. Finalni koraci ispiranja obuhvatili su TPBS (4 × 5 minuta) i PBS (3 × 5 minuta) na sobnoj temperaturi uz blago mešanje, kako bi se membrana pripremila za vizuelizaciju imunokompleksa.

Detekcija imunoobeležanih proteinskih traka izvršena je metodom pojačane hemiluminiscencije. Membrane su inkubirane 5 minuta u reakcionoj smeši pripremljenoj mešanjem jednakih zapremina rastvora 1 (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 250 mM luminol; 85 mM *p*-kumarna kiselina) i rastvora 2 (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Nakon inkubacije, membrane su zaštićene providnom folijom i postavljene u kasetu za ekspoziciju. U mračnoj komori, pod kontrolisanim uslovima (crveno svetlo), na membrane je postavljen rendgenski film (Kodak), koji je nakon ekspozicije razvijen u rastvoru za razvijanje do pojave vidljivih traka, fiksiran i ispran dejonizovanom vodom. Za detekciju izoformi superoksid-dizmutaze (SOD) korišćena su specifična primarna antitela prema protokolu opisanim u Vidović i sar. (2016). Za obeležavanje Cu/ZnSOD korišćeno je zečije poliklonsko antitelo (*AS06 170, Agrisera*) u

razblaženju 1:1.000, dok je za MnSOD korišćeno zečije poliklonsko antitelo (*AS09 524, Agrisera*) u razblaženju 1:2.000. Oba antitela su konstruisana prema sekvencama proteina izolovanih iz biljke *A. thaliana* (Vidović i sar., 2016).

### 3.4.14. Statistička obrada rezultata

Biohemijske analize su izvršene na uzorcima prikupljenim sa nezavisnih biljaka, pri čemu je broj bioloških ponavljanja iznosio  $n = 5$  za pigmente, ugljene hidrate, aminokiseine i enzime u kontrolnim (CL, CS) i biljkama izloženim herbivoriji (HL, HS), kao i u tkivu gala u fazi inicijacije (G1). U fazi intenzivnog rasta gala (G2-G5), analizirano je između 5 do 12 nezavisnih uzoraka, zavisno od stadijuma razvića gale. Za analizu cecidogena korišćeno je  $n = 8$  bioloških ponavljanja. Za analizu fenolnih jedinjenja korišćeno je po 3 nezavisna uzorka za adulte i larve *R. pilosa*. Svi rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (SE).

Tukey post hoc test je korišćen za poređenje srednjih vrednosti između više grupa (kontrola, herbivorija i različite faze razvoja gale) kako bi se utvrdile statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ), i primenjen je kod merenja sadržaj skroba i ukupnih nerastvornih ugljenih hidrata, kod sadržaja rastvornih (solubilnih) ugljenih hidrata i aminokiselina, askorbata, glutaciona, enzima antioksidativne zaštite i fenolnih jedinjenja. Parametri fluorescencije hlorofila i fotosintetski pigmenti testirani su Mann-Whitney U-testom.

Sve statističke analize su izvršene u programskom paketu *IBM SPSS Statistics* (verzija 20.0, *SPSS Inc., Chicago, IL, SAD*), uz usvojeni prag značajnosti od 0,05. Stepene statističke značajnosti u radu su označeni na sledeći način: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p \leq 0,05$ , dok su statistički neznačajne razlike označene sa *ns*.

## 4. Rezultati

### 4.1. Inicijacija i razvoj galoznog tkiva (galogeneza) na stablu *L. vulgaris*

U periodu od 2013 do 2021. godine (mart-maj) prosečno po 100 mladih *Linaria vulgaris* biljaka je izloženo žiškama *Rhinusa pilosa* i time je omogućeno polaganje njihovih jaja u stablo biljke-domaćina i nastanak galoznog tkiva. Korišćeno je 20-30 parenih ženki *R. pilosa* po sezoni. Nakon prestanka dijapauze, odrasle jedinke *R. pilosa* raspoređene su u parovima na biljke-domaćine *L. vulgaris* radi oporavka, ishrane i parenja. Već nakon 24 časa na stablu ovih biljaka primećeni su znaci oštećenja izazvani ishranom insekta, pa su ove biljke korišćene za analizu efekta herbivorije (H uzorci).

Tokom eksperimenta uzorkovane su kontrolne, neinfestirane biljke (C; uzorci lista - CL i uzorci stabla - CS), kao i biljke sa mehaničkim oštećenjima na stablu i na listovima usled ishrane *R. pilosa* (H; HL - listovi nakon herbivorije, i HS - stablo nakon herbivorije). Biljke sa formiranim galama uzorkovane su za analize po zadatoj vremenskoj skali starosti ovipozicija: G1 - 24 h, G2 - 48 h, G3 - 4 dana, G4 - 7 dana i G5 - 10 dana nakon ovipozicije (slika 24). I za sve stupnjeve razvoja gala sakupljeni su uzorci listova (G×L) i uzorci stabla (G×S).

Prosečna težina svežeg biljnog tkiva (FW) u nivou gde se gale indukuju (gornja trećina kontrolnog stabla) iznosi  $0,12 \pm 0,01$  g<sub>FW</sub> za kontrolne biljke (C) i biljke izložene herbivoriji (H); nakon 48 sati (G2) nije došlo do značajnog povećanja mase stabla, dok se 7 dana (G4) nakon ovipozicije galozno tkivo stabla povećalo na  $0,22 \pm 0,02$  g<sub>FW</sub>. Potpuno formirane gale su globularne, okrugle ili duguljaste strukture na stablu biljke domaćina, prosečne dužine oko  $18,7 \pm 1,7$  mm i širine oko  $9,1 \pm 0,5$  mm.



Slika 24. Faze razvića gale na *L. vulgaris*: ovipozicija; gala stara 48 h/4 dana/7 dana. Foto: Ivo Toševski.

## 4.2. Promene u fotosintetskom aparatu pri galogenezi

### 4.2.1. Fotosintetski pigmenti

Sadržaj Chl *a* i Chl *b* značajno je smanjen u formiranim galama G4S (2,7 puta za Chl *a* i 2 puta Chl *b*) u odnosu na kontrolno stablo (CS), a ukupni hlorofil 2,5 puta, dok je odnos Chl *a/b* smanjen za trećinu (tabela 2). Sadržaj ukupnih karotenoida (Car) u galoznom tkivu je takođe bio značajno niži u odnosu na kontrolno stablo.

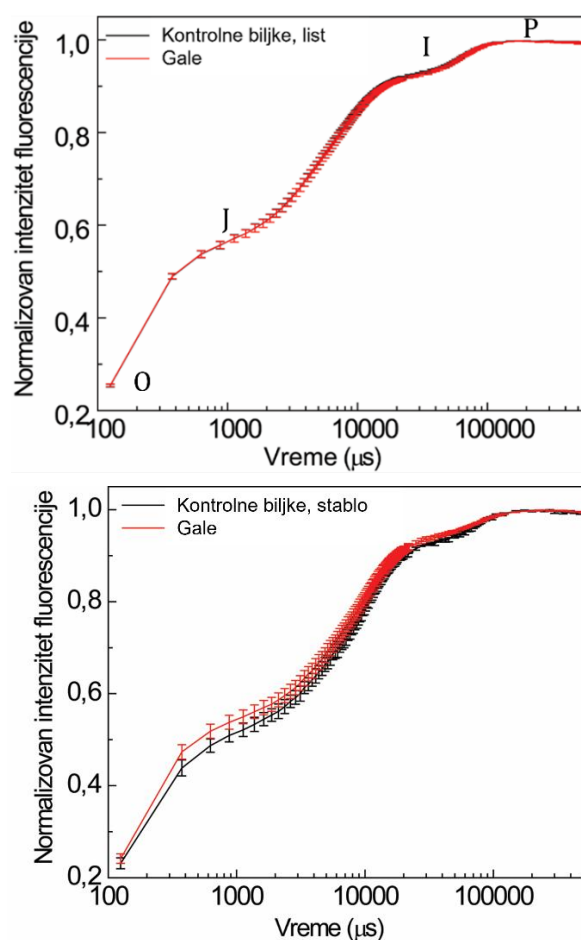
U listovima biljaka sa razvijenom galom (G4L) sadržaj karotenoida je bio 1,3 puta manji u odnosu na kontrolu (tabela 2). Ipak, tokom trajanja eksperimenta (7 dana) nivo fotosintetskih pigmentata nije značajno promenjen u odnosu na kontrolne listove.

**Tabela 2.** Hlorofil *a* i *b* (Chl *a* i *b*,  $\mu\text{g g}^{-1}\text{FW}$ ), njihov odnos (Chl *a/b*), i sadržaj karotenoida (Car,  $\mu\text{g g}^{-1}\text{FW}$ ) kod *L. vulgaris* kontrolnih biljaka (list - CL i stablo - CS), i u stablu i listovima biljaka sa galama starim sedam dana (G4L i G4S). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  SE ( $n \geq 8$ ). Zvezdice predstavljaju statistički značajne razlike između kontrolnog i galoznog biljnog tkiva (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  and \*\*\*  $p < 0,001$ ).

	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl <i>a + b</i>	Chl <i>a/b</i>	Car
CL	1418 $\pm$ 200	496 $\pm$ 68	1914 $\pm$ 265	2,9 $\pm$ 0.1	254 $\pm$ 22
G4L	1190 $\pm$ 403	520 $\pm$ 225	1518 $\pm$ 734	2,3 $\pm$ 0.6	202 $\pm$ 16
CS	179 $\pm$ 14	47 $\pm$ 5	226 $\pm$ 18	4,1 $\pm$ 0.6	49 $\pm$ 4
G4S	62 $\pm$ 3***	24 $\pm$ 2**	86 $\pm$ 5***	2,9 $\pm$ 0.8*	28 $\pm$ 5*

### 4.2.2. OJIP analiza fluorescencije hlorofila

Brza fluorescencija hlorofila se koristi kao osetljiva metoda za detekciju promena u fotosintetskom protoku elektrona i u efikasnosti fotosinteze (PS II). OJIP testom se prikazuje polifazni rast fluorescencije Chl *a*, tj njegova aktivnost i efikasnost transporta elektrona. Merenja nisu pokazala razlike u vrednostima ovog parametra u uzorcima listova između biljaka sa galama u poređenju sa kontrolnim biljkama (slika 25). Nasuprot tome, kod gala starih sedam dana (G4S), povećana fluorescencija Chl na  $F_{300\mu\text{s}}$ ,  $F_j$  i  $F_i$ , dovela je do promene nagiba O-J i J-I dela krive, što ukazuje na promene u primarnim fotohemijским reakcijama i transportu elektrona (slika 25). Formiranje gale na stablu nije uticalo na fotosintetsku aktivnost listova. Međutim, kod stabla sa galom primećeno je smanjenje fluksa elektrona od  $Q_A$  do  $Q_B$  i ka PS I kao i verovatnoće transporta elektrona od PS II ka PS I u odnosu na kontrolne listove.



**Slika 25.** OJIP kriva u listovima i stablu *L. vulgaris* kontrola i biljaka sa razvijenom galom starom 7 dana (G4). Na logaritamskoj skali vremena uočavaju se četiri faze: O- početni nivo ( $F_o$ ) na 100  $\mu$ s; J korak- infleksija na oko 2 ms; I korak- infleksija na oko 30 ms; P- maksimum ( $F_M$ ) na oko 100 ms. Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  SE ( $n \geq 12$ ).

Formiranje gala na stablu *L. vulgaris* nije značajno uticalo na fotosintetsku aktivnost listova. Kao što je prikazano u tabeli (tabela 3), nije bilo statistički značajnih razlika ni u jednom od merenih parametara između kontrolnih listova (CL) i listova biljaka sa galama starim 7 dana (G4L). Što se tiče galoznog tkiva na stablu u odnosu na kontrolu (G4S i CS uzorci), izmerene su razlike u efikasnosti transporta elektrona (tabela 3). Nisu uočene značajne razlike u slučaju maksimalnog kvantnog prinosa PS II primarne fotohemije ( $F_v/F_m$ ) između kontrolnih stabala (0,77) i stabala sa galama (0,76) (tabela 3), što ukazuje da je proces primarnog razdvajanja naelektrisanja stabilan uprkos formiranju galoznog tkiva. Što se tiče kinetike reakcije, iako je sam prinos primarne fotohemije ( $\phi_{P_0}$ ) bio stabilan u obe vrste tkiva, primećene su promene u nagibu O-J dela krive fluorescencije kod gala starih sedam dana (G4) (slika 25). Ovo ukazuje na promene u dinamici primarnih fotohemijskih reakcija, pre svega transport elektrona, ali ne i na maksimalnu efikasnost primarnog razdvajanja naelektrisanja, tj ne dolazi do drastičnog oštećenja ili fotoinhibicije u reakcionim centrima PS II ( $F_v/F_m$ ). Transport elektrona između hinona (od  $Q_A$  do  $Q_B$ ), čime se opisuje efikasnost prenosa elektrona unutar PS II od primarnog ( $Q_A$ ) do sekundarnog ( $Q_B$ ) akceptora, prikazan je parametrom  $\psi_{ET20}$  u Tabeli 3. Dobijene vrednosti za gala su statistički značajno niže u poređenju sa kontrolom, što ukazuje da iako je primarna fotohemija stabilna, prenos elektrona nizvodno ka sekundarnom hinonu je inhibiran u galoznom tkivu (tabela 3). Parametri koji mere protok elektrona dalje kroz fotosintetski lanac,

sve do krajnjih akceptora PS I ( $\Psi_{RE10}$ ,  $\delta_{RE10}$  i  $\Phi_{RE10}$ ) pokazuju značajno smanjenje u galama u odnosu na kontrolno tkivo (tabela 3).

**Tabela 3.** JIP parametri OJIP-testa u listovima i stablima kontrolnih *Linaria vulgaris* biljaka, i listovima i stablima biljaka sa 7 dana starim galama (G4). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  SE ( $n \geq 12$ ), \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Računanje navedenih parametara dato je u Tabeli 1.

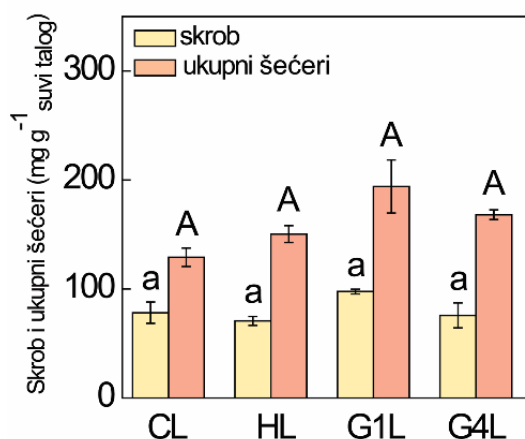
	CL	G4L	CS	G4S
$\Phi_{Po}$	0,74 $\pm$ 0,02	0,73 $\pm$ 0,02	0,77 $\pm$ 0,01	0,76 $\pm$ 0,04
$\Psi_{ET20}$	0,57 $\pm$ 0,03	0,56 $\pm$ 0,04	0,60 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,01*
$\Psi_{RE10}$	0,19 $\pm$ 0,03	0,18 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01***
$\delta_{RE10}$	0,34 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,02***
$\Phi_{ET20}$	0,42 $\pm$ 0,03	0,41 $\pm$ 0,04	0,47 $\pm$ 0,01	0,44 $\pm$ 0,03*
$\Phi_{RE10}$	0,14 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01***

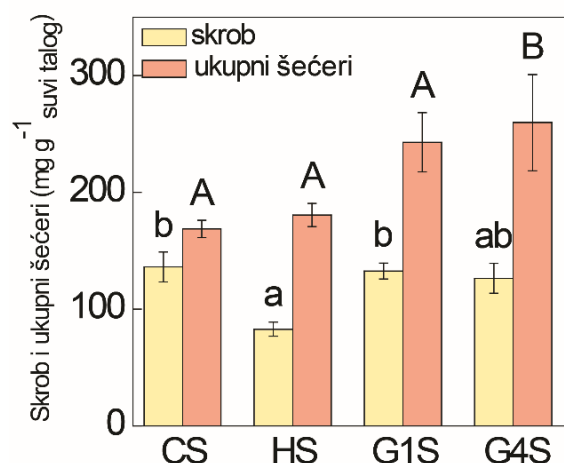
### 4.3. Sadržaj rastvornih i nerastvornih ugljenih hidrata u tkivu *L. vulgaris* pod uticajem galogeneze

#### 4.3.1 Sadržaj skroba i ukupnih nerastvornih ugljenih hidrata (TIC)

Kod kontrolnih stablala (CS) oko 80% TIC sadržaja potiče od skroba. Ovaj odnos sadržaja skroba u sklopu ukupnih nerastvornih ugljenih hidrata je smanjen na oko 45-50% u stablima sa formiranim galama i kod stabala nakon herbivorije (slika 26). Sadržaj skroba se značajno smanjio nakon herbivorije (HS) u poređenju sa kontrolom (CS). Međutim, kod gala nije uočena razlika u sadržaju skroba u poređenju sa kontrolnim stablima. Sa druge strane, sadržaj TIC-a se postepeno povećavao sa razvojem gale. Povećanje je bilo 1,5 do 1,7 puta u poređenju sa kontrolnim stablima (CS), pri čemu je razlika između CS i G4S statistički značajna ( $p < 0,05$ ) (slika 26).

U listovima biljaka, bilo da su izložene ishrani insekata ili su sa stablala gde se razvijaju gale, nije bilo značajnije promene u sadržaju skroba ili TIC-a. Skrob je u listovima doprinio oko 45-50% ukupnom sadržaju TIC-a (slika 26).





**Slika 26.** Sadržaj skroba (žuti stubići) i ukupnih nerastvornih ugljenih hidrata (TIC, narandžasti stubići) u listovima (L) i stablima (S) *L. vulgaris* kontrolnih biljaka (CS, CL), biljaka sa povredama tkiva usled herbivorije (HS, HL), biljkama sa galama u ranim fazama razvića u prvih 24 h (G1S, G1L) i kod biljaka sa formiranim galama (sedam dana nakon izvršenih ovipozicija; G4S, G4L). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  SE ( $n \geq 8$ ). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.3.2. Sadržaj rastvornih ugljenih hidrata

Primenom jonoizmenjivačke hromatografije sa elektrohemijском detekcijom određen je sadržaj rastvornih ugljenih hidrata u biljnom tkivu *L. vulgaris* biljaka, u slučaju rane faze razvića galoznog tkiva (G1), u galama starim oko sedam dana (G4), kao i kod biljaka nakon herbivorije (H) i kontrolnih biljaka (C).

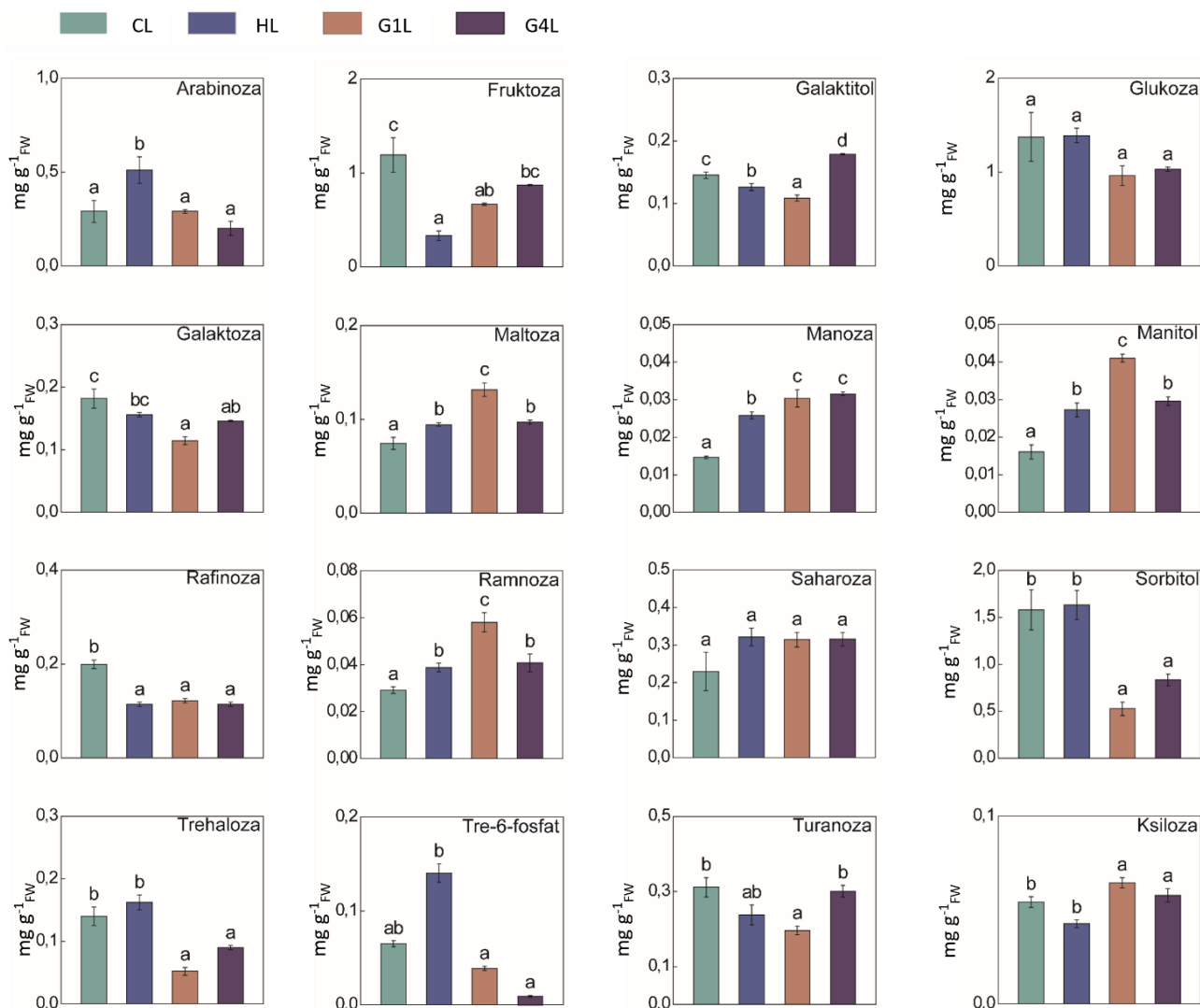
U listovima kontrolnih biljaka (CL) sadržaj rastvornih ugljenih hidrata bio je viši u poređenju sa biljkama sa galama. Nakon herbivorije (HL), uočeno je smanjenje sadržaja rastvornih ugljenih hidrata, dok su u listovima sa galama (GL1 i GL4) vrednosti bile dodatno niže. Sličan obrazac nije zabeležen u stablima: sadržaj ugljenih hidrata u kontrolnim stablima (CS) bio je niži nego u stablima sa galama (GS1 i GS4), gde je uočeno postepeno povećanje u odnosu na kontrolu (tabela 4).

**Tabela 4.** Sadržaj rastvornih ugljenih hidrata ( $\text{mg g}_{\text{FW}}^{-1}$ ) u listovima (L) i stablima (S) *L. vulgaris*. Kontrole-C, biljke nakon herbivorije-H, rana faza razvića gale-G1, gale stare oko 7 dana-G4. Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  SE ( $n \geq 8$ ).

CL	$6,0 \pm 1,1$	CS	$4,4 \pm 0,4$
HL	$5,2 \pm 0,2$	HS	$4,5 \pm 0,7$
GL1	$3,9 \pm 0,1$	GS1	$5,5 \pm 0,6$
GL4	$4,7 \pm 0,1$	GS4	$7,0 \pm 0,8$

U listovima biljaka izloženim herbivoriji (HL) zabeležen je najviši nivo trehalozo-6-fosfata (T6P), što predstavlja trend sličan onom u stablima ( $p < 0,05$  u odnosu na kontrolne listove, CL) (slika 27 i 28). Metabolički odgovor na herbivoriju prate značajne promene u profilu ugljenih hidrata: dolazi do povećanja nivoa arabinoze, maltoze, manoze, manitola i ramnoze u HL, uz blagi porast sadržaja saharoze, dok se istovremeno smanjuju nivoi fruktoze, galaktitola i rafinoze u poređenju sa kontrolom (slika 27). Listovi pokazuju suprotan trend u odnosu na stablo kada je u pitanju nivo T6P tokom razvoja gale (slika 27 i 28); dok u stablima T6P raste, u listovima sa inicijalnom fazom razvića gale (G1L) i već formiranom galom (G4L) sadržaj T6P je

bio značajno niži nego u kontroli ( $p < 0,05$  i  $p < 0,01$ ). U ranoj fazi nastanka gale (G1L) uočava se prolazni porast maltoze, manitola, ramnoze i ksiloze. Nasuprot tome, u ovoj fazi opada sadržaj fruktoze, galaktoze, galaktitola, rafinoze, sorbitola, trehaloze i turanoze (slika 27). Sadržaj saharoze u G1L ostaje na nivou zabeleženom kod biljaka pod herbivorijom, dok nivo glukoze u obe faze razvića gale (G1L i G4L) pokazuje blagi pad. Dalje razviće gale do faze potpuno razvijene gale (G4L) pokazuje da se nivoi galaktitola, fruktoze i turanoze ponovo povećavaju u odnosu na ranu fazu, dok sorbitol i ksiloza zadržavaju stabilne vrednosti (slika 27).

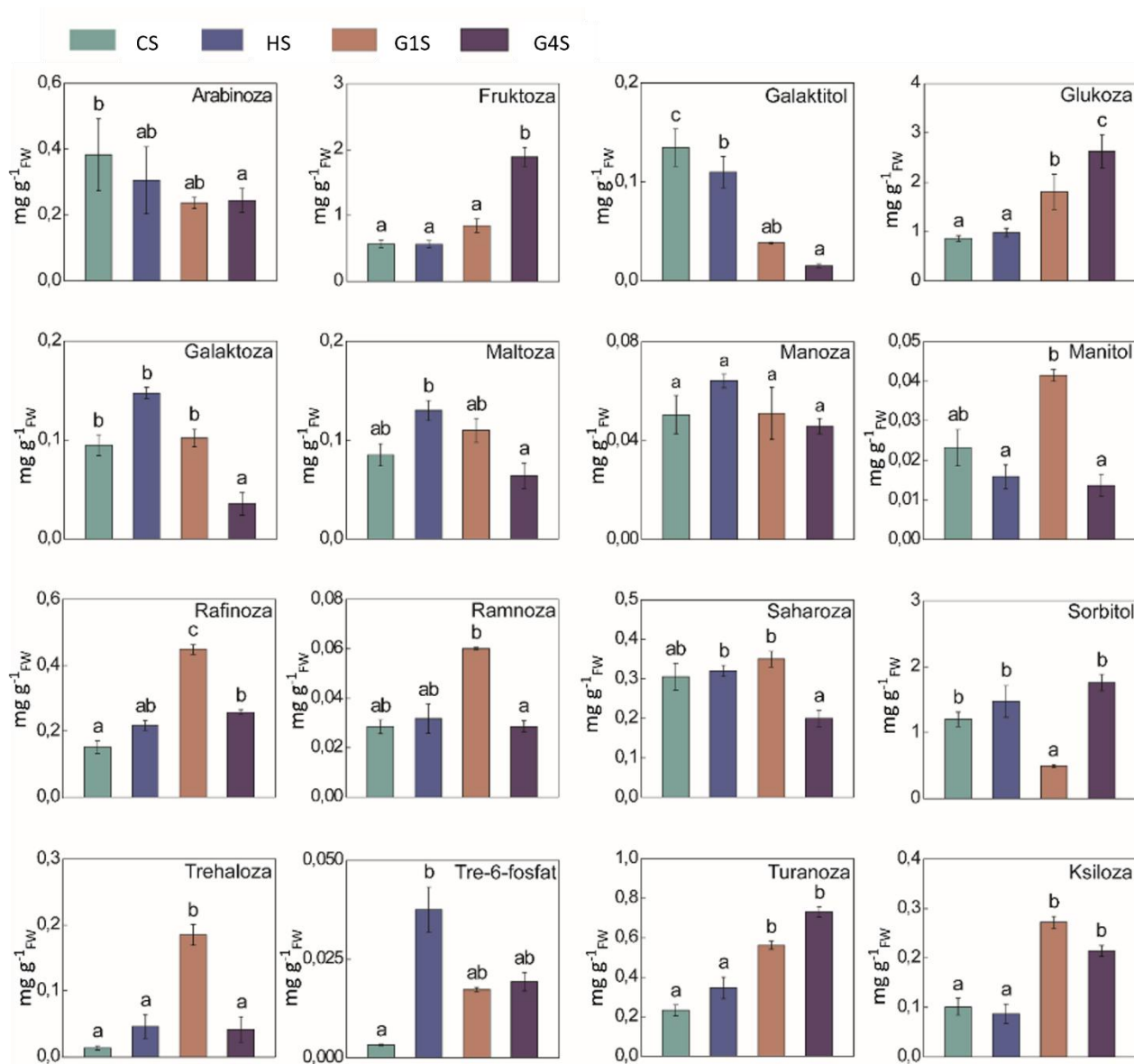


**Slika 27.** Sadržaj rastvornih ugljenih hidrata u listovima *L. vulgaris* biljaka; kontrola (CL), nakon herbivorije (HL), rana faza nastanka gale (G1L, oko 24 h od izvršene ovipozicije) i kod razvijene gale (G4L, sedam dana nakon izvršene ovipozicije). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  SE ( $n \geq 8$ ). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ( $p \leq 0,05$ ).

U stablu *L. vulgaris* identifikovan je širok spektar rastvorljivih ugljenih hidrata, uključujući monosaharide (dominantno arabinozu, fruktozu, galaktozu, glukoze, manozu, ramnozu i ksilozu), disaharide (maltozu, saharozu, trehalozu, trehalozo-6-fosfat i turanozu), trisaharid rafinozu, kao i šećerne alkohole galaktitol, manitol i sorbitol (slika 28).

Izlaganje stabla *L. vulgaris* herbivoriji (HS) dovodi do značajnog povećanja sadržaja T6P, maltoze i galaktoze ( $p < 0,01$ ), dok se nivo galaktitola u ovoj fazi smanjuje. Međutim, najdramatičnije promene dešavaju se u ranoj fazi razvića gale (G1S), oko 24 sata nakon

ovipozicije. U ovom periodu dolazi do ekstremne akumulacije trehaloze, čiji nivo raste čak 14 puta u poređenju sa kontrolom (CS), stabilima pod herbivorijom (HS) i razvijenim galama (G4S). Ovu fazu karakteriše i značajna, ali prolazna akumulacija manitola, rafinoze i ramnoze, kao i blagi porast saharoze. Iako je nivo T6P u G1S uzorcima bio značajno viši nego u kontroli, on je dalje ostao niži u poređenju sa HS uzorcima.



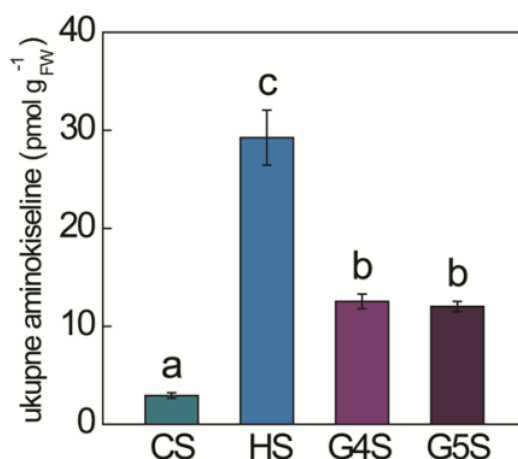
**Slika 28.** Sadržaj solubilnih ugljenih hidrata u stablu *L. vulgaris*, u slučaju kontrole (CS), nakon herbivorije (HS), rane faze nastanka gale (G1S, oko 24 h od izvršene ovipozicije) i kod razvijene gale (G4S, 7 dana nakon izvršene ovipozicije). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  SE ( $n \geq 8$ ). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ( $p \leq 0,05$ ).

Nasuprot ovim trendovima, inicijacija gale dovodi do smanjenja sadržaja sorbitola i arabinoze. Razviće gale do faze G4S (sedam dana nakon ovipozicije) donosi novu promenu u metaboličkom profilu rastvorljivih ugljenih hidrata. Akumulacija glukoze i turanoze direktno korelira sa razvićem gale, dostižući svoje najviše vrednosti upravo u G4S fazi. Pored njih, sadržaj fruktoze je značajno povišen u odnosu na CS i G1S, dok ksiloza ostaje na višem nivou nego u kontroli. S druge strane, u razvijenoj gali dolazi do pada koncentracije galaktitola, galaktoze i saharoze. Pri prelasku iz G1S u G4S fazu primećena je prolazna priroda promena, jer se nivoi

trehaloze, manitola i ramnoze, koji su bili na vrhuncu u ranoj fazi, u razvijenoj gali značajno smanjuju. Ovakva dinamična preraspodela ugljenih hidrata ukazuje na intenzivan i vremenski definisan metabolički odgovor biljke tokom procesa formiranja gale.

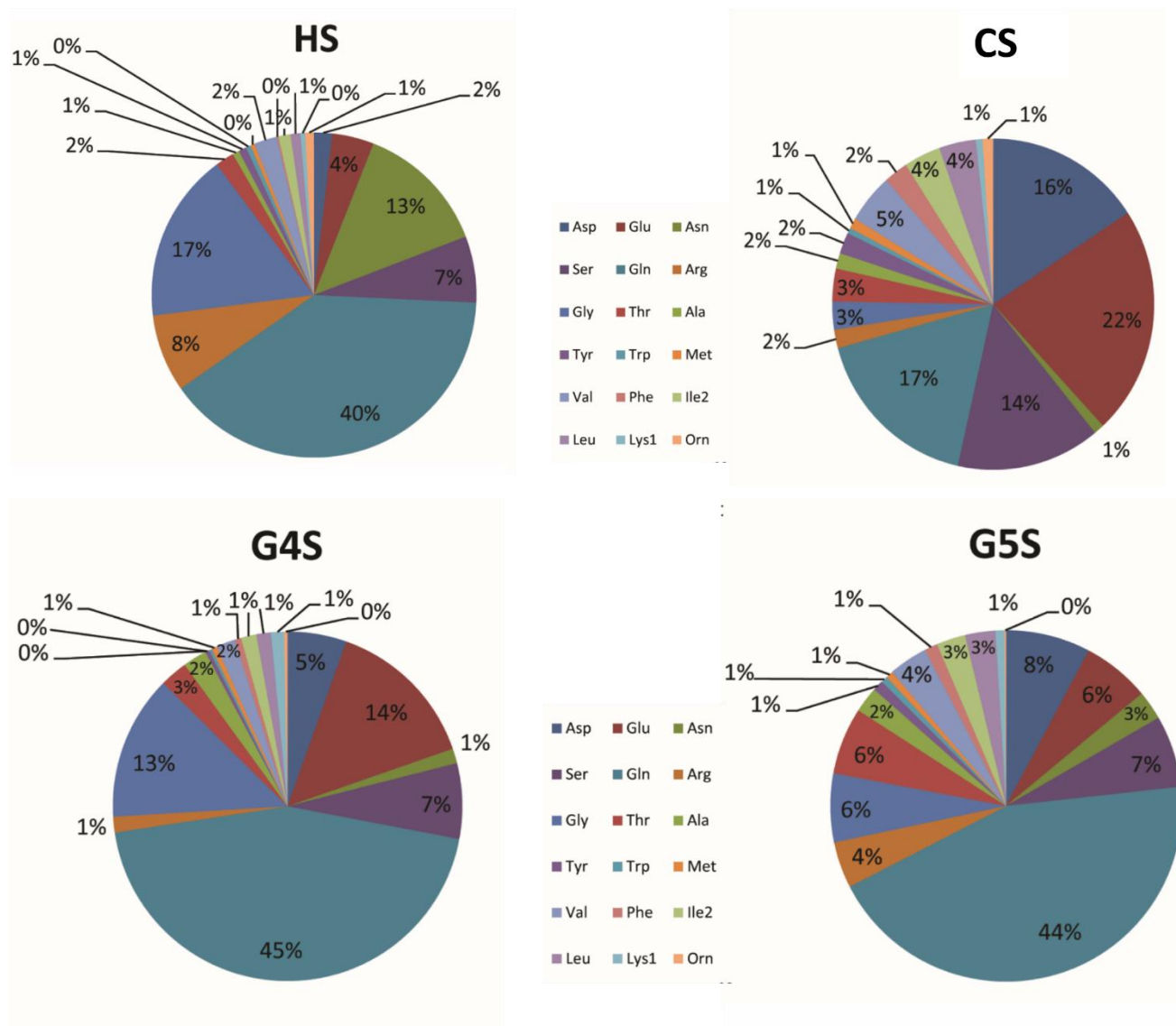
#### 4.4. Promena sadržaja slobodnih aminokiselina u stablu *L. vulgaris* pod uticajem galogeneze i herbivorije

Aminokiseline su analizirane u stablima kontrolnih biljaka (CS), u stablima nakon herbivorije (HS), i kod stabla sa formiranim galama starosti 7 dana (G4S) i 10 dana (G5S). Rezultati su pokazali da se sadržaj ukupnih slobodnih aminokiselina, kao i pojedinačnih, razlikuje od vrste interakcije insekta sa biljkom domaćinom, tj. da li je insekt mehanički ošteti biljku prilikom ishrane ili je biljno tkivo manipulirano pri ovipoziciji i daljim razvojem galoznog tkiva. Akumulacija specifičnih aminokiselina bila je najveća u stablima nakon herbivorije (HS uzorci). Sadržaj je bio deset puta veći u poređenju sa kontrolnim stablima (CS) i oko dva puta veća u odnosu na stabla sa galom (GS) (slika 29).



**Slika 29.** Sadržaj ukupnih aminokiselina u stablu i galama *L. vulgaris*. CS- *L. vulgaris* kontrolne biljke, HS- biljke nakon herbivorije, G4S i G5S biljke sa formiranim galama (7 i 10 dana nakon izvršenih ovipozicija). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  SE ( $n \geq 4$ ). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ( $p \leq 0,05$ ).

Aminokiselina koja je bila najzastupljenija u stablu HS i GS je glutamin (Gln), sa oko 40% zastupljenosti u sadržaju ukupnih aminokiselina, dok je kod CS najzastupljenija Gln zajedno sa glutaminskom kiselinom (Glu) (slika 30).

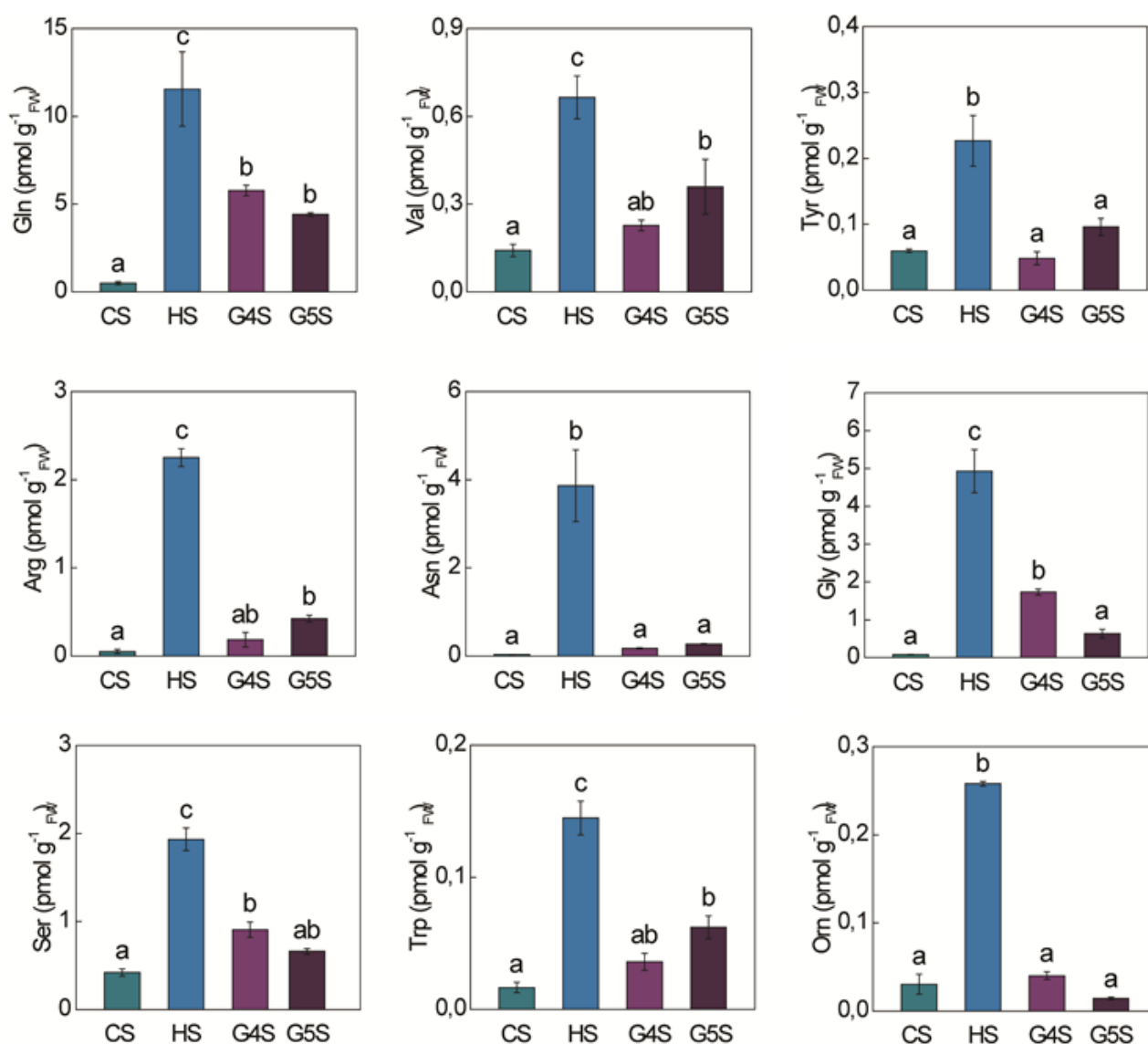


**Slika 30.** Zastupljenost slobodnih aminokiselina u stablu i galama *L. vulgaris*. CS- kontrolne biljke; HS- biljke nakon herbivorije; G4S i G5S- biljke sa formiranim galama (sedam i deset dana nakon izvršenih ovipozicija). Na slici je prikazan % zastupljenosti aminokiselina: Asp, asparaginska kiselina; Glu, glutaminska kiselina; Asn, asparagin; Ser, serin; Gln, glutamin; Arg, arginin; Gly, glicin; Thr, treonin; Ala, alanin; Tyr, tirozin; Trp, triptofan; Met, metionin; Val, valin; Phe, fenilalanin; Ile, izoleucin; Leu, leucin; Lys, lizin; Orn, ornitin.

Takođe, distribucija određenih aminokiselina se promenila nakon stresa ishrane insekata (HS), gde je uočeno povećanje u sadržaju glicina (Gly) (sa 3% na 17%), arginina (Arg) (sa 2% na 8%), glutamina (sa 17% na 40%) i asparagina (Asn) (sa 1% na 13%) u odnosu na kontrolne uzorke. U slučaju nekih aminokiselina došlo je do smanjenja udela u njihovoj zastupljenosti u ukupnim aminokiselinama: serina (Ser), sa 14% na 7%; Glu, sa 22% na 4%; asparaginske kiseline (Asp), sa 16% na 2% i leucina (Leu), sa 4% na 1%. Formiranjem gala na stablu *L. vulgaris* uočeno je značajno povećanje u količini Gln u odnosu na kontrolne stablo (sa 17% na 45%), kao i Gly (sa 3% na 13%); dok su određene aminokiseline smanjile svoj udeo u

ukupnom sadržaju aminokiselina: Ser (sa 14% na 7%), Glu (sa 22% na 14% u G4S, tj 6% u G5S), Asp (sa 16% na 5% kod G4S i 8% kod G5S).

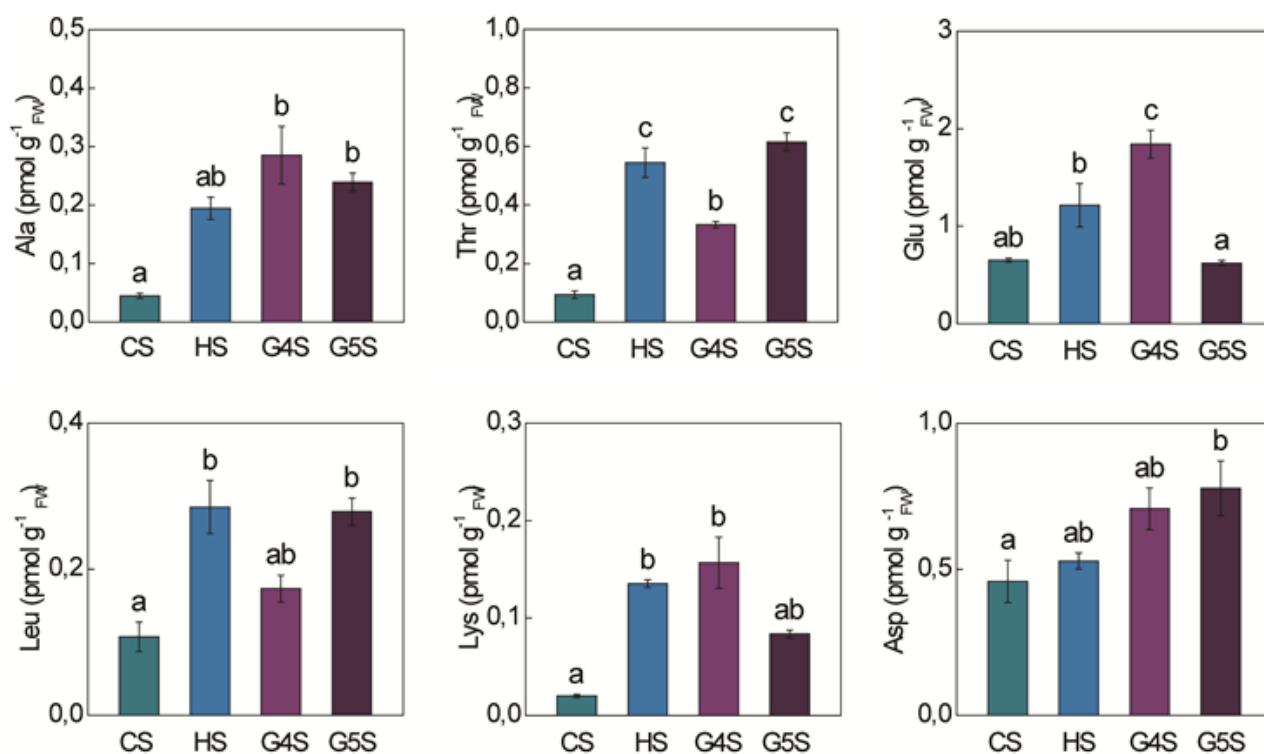
Herbivorija (HS) je indukovala povećanje u akumulaciji Gln za oko 25 puta u odnosu na kontrolna stabla (CS); razvoj gale (G4S) povećao je akumulaciju Gln za oko 11 puta u odnosu na kontrolu, a kod starije gale (G5S) povećanje je bilo za oko 9 puta (slika 31). Takođe, herbivorija je izazvala značajno povećanje sledećih aminokiselina u poređenju sa ostalim uzorcima: Arg, Gln, valina (Val), Gly, tirozina (Tyr), ornitina (Orn), Ser i triptofana (Trp) (slika 31).



**Slika 31.** Sadržaj aminokiselina u stablu i galama *L. vulgaris*. CS, kontrolne biljke; HS, biljke sa povredama tkiva usled herbivorije; G4S i G5S, biljke sa formiranim galama (sedam i deset dana nakon izvršenih ovipozicija). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  SE ( $n \geq 4$ ). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ( $p \leq 0,05$ ). Gln, glutamin; Val, valin; Tyr, tirozin; Arg, arginin; Asn, asparagin; Gly, glicin; Ser, serin; Trp, triptofan; Orn, ornitin.

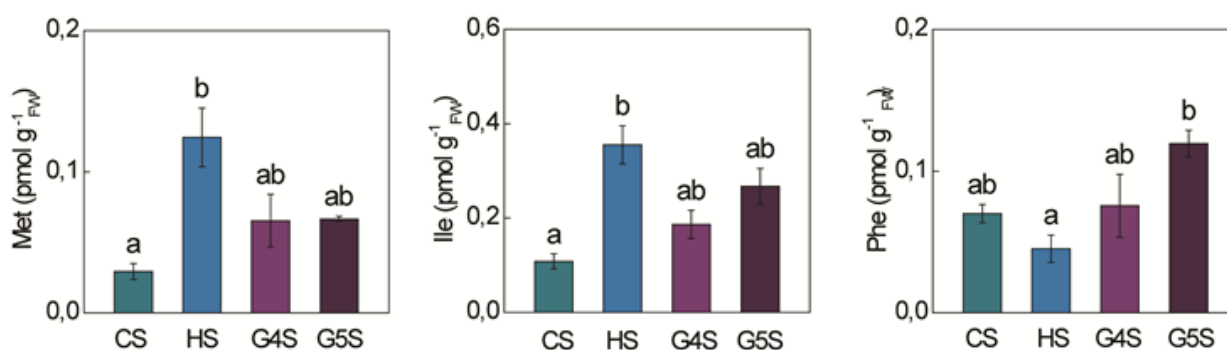
Razvoj gale indukovao je akumulaciju alanina (Ala), Gln i treonina (Tre) u odnosu na kontrolna stabla i posle 7 i 10 dana (slika 32). Međutim, kod gala starosti sedam dana uočeno je

povećanje Glu, Gly, lizina (Lys) i Ser, dok kod gala starosti desetak dana, G5S), uočen je značajan porast Asp, Val, Arg, Leu, fenilalanina (Phe) i Trp (slika 32 i 33).



**Slika 32.** Sadržaj aminokiselina u stablu i galama *L. vulgaris*. CS, kontrolne biljke; HS, biljke sa povredama tkiva usled herbivorije; G4S i G5S, biljke sa formiranim galama (sedam i deset dana nakon izvršenih ovipozicija). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  SE ( $n \geq 4$ ). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ( $p \leq 0,05$ ). Ala, alanin; Thr, treonin; Glu, glutaminska kiselina; Leu, leucin; Lys, lizin; Asp, asparaginska kiselina.

Manje zastupljene aminokiseline u stablu *L. vulgaris* i galama (Met, Ile, Phe) takođe su pokazale povećanje akumulacije kod uzoraka oštećenih herbivorijom (H) u slučaju Met i Ile, dok je kod Phe uočen pad u zastupljenosti kod H uzoraka i porast kod gala, u odnosu na kontrolne uzorke (slika 33).

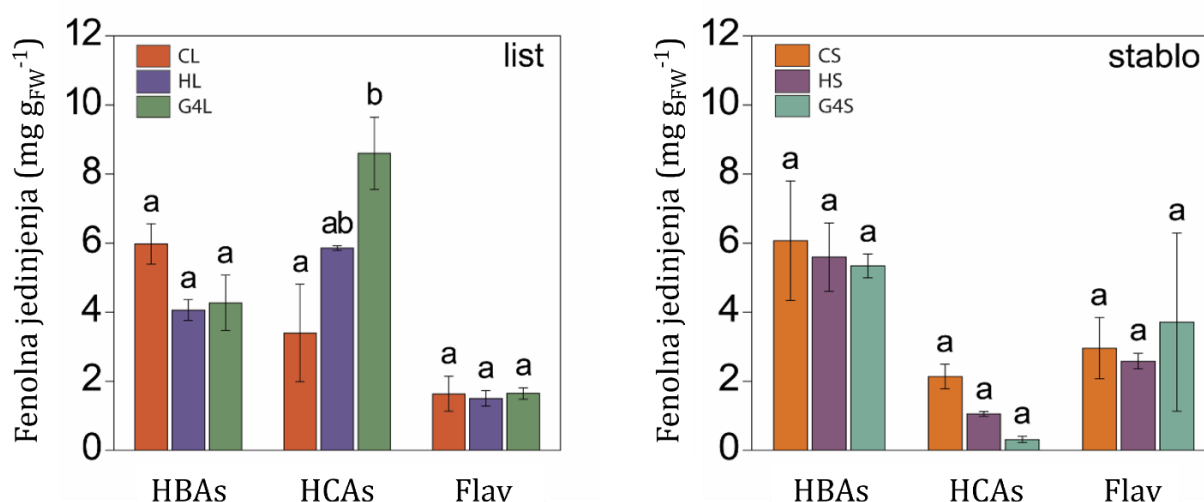


**Slika 33.** Sadržaj aminokiselina u stablu i galama *L. vulgaris*. CS, *L. vulgaris* kontrolne biljke; HS, biljke sa povredama tkiva usled herbivorije; G4S i G5S, biljke sa formiranim galama (sedam i deset dana nakon izvršenih ovipozicija). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  SE ( $n \geq 4$ ). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ( $p \leq 0,05$ ). Met- metionin, Ile- izoleucin, Phe- fenilalanin.

## 4.5. Uloga sekundarnih metabolita fenilpropanoidnog biosintetskog puta u interakciji lanilista i *R. pilosa*

### 4.5.1. Sadržaj solubilnih fenolnih jedinjenja

Uopšteno sagledano, ne uočavaju se značajne razlike u prikazanim grupama fenolnih jedinjenja između kontrolnih stabala i listova (C) u odnosu na tkiva nakon herbivorije (H) i gale u kasnijoj fazi razvića (G4, gala starosti 7 dana) (slika 34).



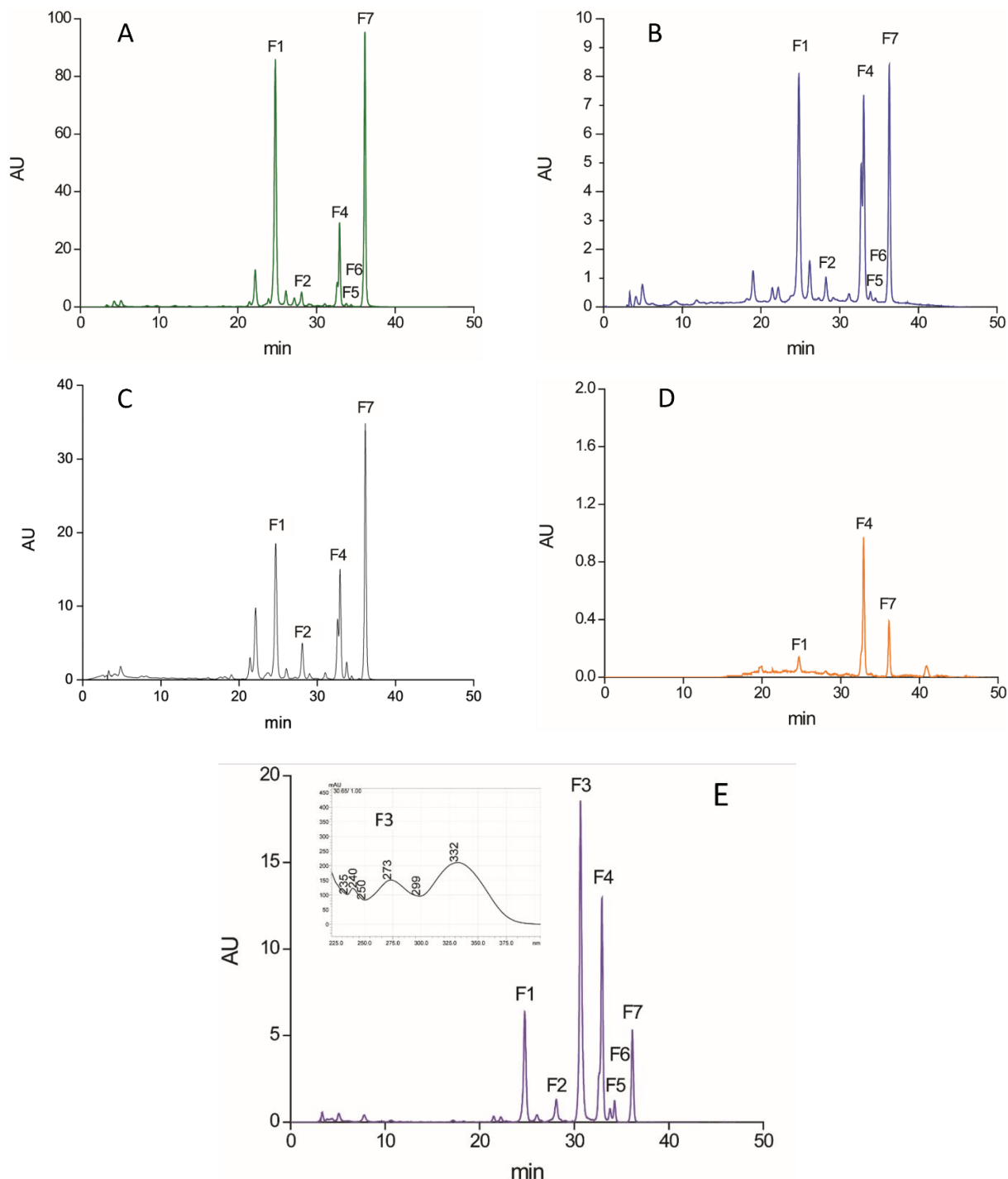
**Slika 34.** Sadržaj fenolnih jedinjenja u listovima i stablu *L. vulgaris* kontrola (C), uzorka nakon herbivorije (H), i kod gale starosti sedam dana (G4). HBAs- hidroksibenzojeve kiseline, HCAs- hidroksicimetne kiseline, Flav- flavonoidi. Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  SE ( $n \geq 4$ ). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ( $p \leq 0,05$ ). Poređenje (oznake slovima) se vrši za svaku grupu jedinjenja unutar istog tipa tkiva, nezavisno od drugih grupa.

U okviru grupe jedinjenja hidroksibenzojevih kiselina (HBAs), nisu primećene razlike u sadržaju ovih fenola ni u stablu ni u listovima ispitivanih grupa uzoraka (C, H, G4). Sa druge strane, hidroksicimetne kiseline (HCAs) pokazale su razlike u zavisnosti od tipa oštećenja biljnog tkiva i vrste tkiva. U uzorcima listova gale starosti sedam dana (G4L), zabeleženo je 2,5 puta uvećanje količine HCAs u odnosu na kontrolne listove (CL) (slika 34). Poređenjem tkiva (stablo - list), uočena je značajna akumulacija HCAs jedinjenja u listovima svih vrsta uzoraka, sa najvećim uvećanjem kod gale (G4L), gde je koncentracija HCAs bila skoro 30 puta veća u poređenju sa tkivom stabla gale (G4S) (slika 34).

### 4.5.2. Sadržaj solubilnih fenolnih jedinjenja *L. vulgaris*, gale, cecidogena, insekta i larve dobijen HPLC-DAD metodom

Reprezentativni tečni hromatogrami na 320 nm prikazani su na slici 36. Rezultati HPLC-DAD analize ukazuju na razlike u distribuciji i koncentraciji fenolnih glikozida (F1-F7) između stabla kontrolnih biljaka (CS) i tkiva gale (G4S) (slika 35). Sadržaj fenolnih jedinjenja bio je

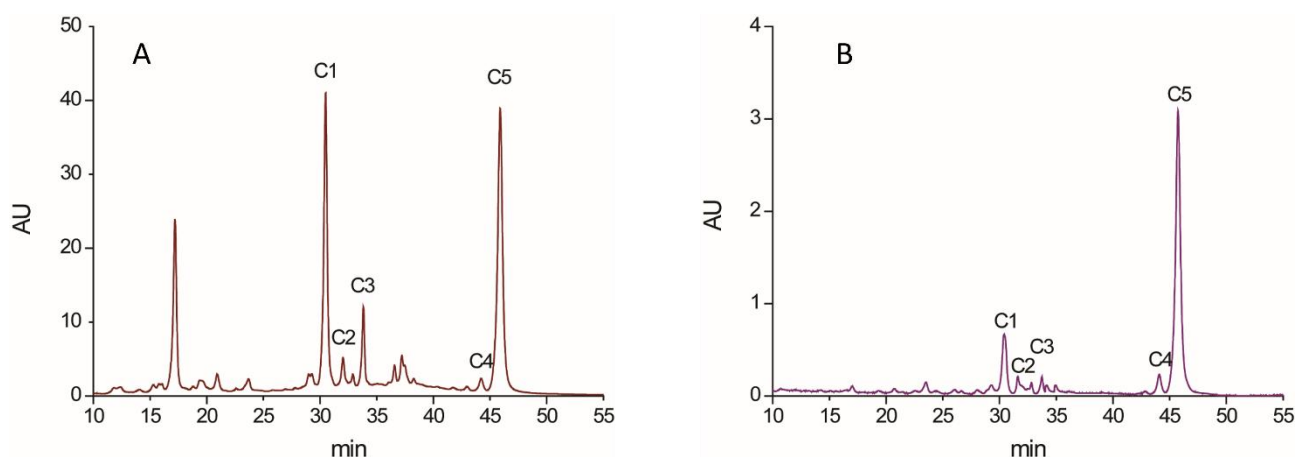
najveći u CS (slika 35A), dok je u tkivu gale zabeležen manji sadržaj svih fenola (slika 35B). Fenolna jedinjenja F1, F4 i F7 detektovana su u CS, kao i u larvama i adultima insekta *R. pilosa*. Glikozidi F5 i F6 su detektovani u kontrolnim stablima, dok su u tkivu gale i kod larvi uočeni u malim količinama. Za razliku od ostalih, jedinjenje F3 (Rt 30,65 min;  $A_{\max}$  273 i 332 nm) detektovano je isključivo u ekstraktu cecidogena i nije bilo prisutno u ekstraktima stabla kontrole niti u samoj gali (slika 35E).



**Slika 35.** Hromatogrami metanolnih ekstrakata, dobijeni HPLC-DAD metodom. Hromatogram stabla kontrolne biljke *L. vulgaris* (CS) (A), gale stare 7 dana (G4S) (B), larve žiška *R. pilosa* (C), adulta žiška *R. pilosa* (D) i cecidogena (E) na 320 nm. Apsorpcioni spektar jedinjenja nađenog samo u uzorku cecidogena (jedinjenje F3) je prikazan u sklopu grafika E. Rt (min) i  $A_{\max}$  (nm) najznačajnijih glikozida u cecidogenu su F1 (26,04 min; 278, 330 nm), F2 (28,08 min; 268, 330 nm), F4 (32,92 min; 274, 332 nm), F5 (33,77 min; 273, 330 nm), F6 (34,25 min; 274, 332 nm) i F7 (36,14 min; 274, 331 nm).

Nakon hidrolize, u metanolnim ekstraktima stabla *L. vulgaris* izdvojeno je pet glavnih pikova aglikona (slika 36A), koji su zatim potvrđeni i u hidrolizovanim ekstraktima galoznog tkiva. Identifikovana jedinjenja pokazala su se identičnim onima koja su izdvojena u ekstraktu cecidogena (slika 36B). Ovi rezultati, zajedno sa karakteristikama apsorpcije F3 jedinjenja (slika 35E), sugerišu da se radi o glikozidu flavonola poreklom iz biljnog tkiva. Pored toga, *p*-kumarinska kiselina, koja nije bila prisutna u uzorku cecidogena, detektovana je u ekstraktima stabla (Rt 17,09 min). Hidrolizovani ekstrakti insekata i larvi (36 C,D) pokazali su dva glavna pika (Rt 37,44 min,  $A_{\max}$  262 nm; Rt 45,73 min,  $A_{\max}$  274, 332 nm), dok je dodatni pik (Rt 40,86 min,  $A_{\max}$  327 nm) bio prisutan samo u ekstraktu larve.

Analiza aglikona je bila ključna jer je omogućila razdvajanje jedinjenja koja imaju istu masu i slično retenciono vreme. Hidrolizom glikozida dobijeni su osnovni flavonoidni skeleti (aglikoni), čiji su spektri i retenciono vremena jasno pokazali da se radi o različitim strukturama. Time je identitet glikozida potvrđen na dva nivoa – fragmentacijom u MS analizi i nezavisnom verifikacijom putem aglikona – što je pružilo dodatnu sigurnost u razlikovanje jedinjenja sa istim masama.



**Slika 36.** Hromatogrami hidrolizovanih metanolnih ekstrakata stabla kontrole *L. vulgaris*, CS (A) i cecidogena (B). Retenciona vremena (min) i  $A_{\max}$  najznačajnijih aglikona u cecidogenu su: C1 (30,49 min; 245, 310 nm), C2 (32,02 min; 245, 323 nm), C3 (33,82 min; 273, 331 nm), C4 (44,08 min; 271, 330 nm) i C5 (45,81 min; 274, 333 nm).

#### 4.5.2.1. Sadržaj fenolnih jedinjenja u stablu *L. vulgaris* i cecidogenu identifikovan UHPLC-MS/MS Orbitrap analizom

UHPLC-MS/MS Orbitrap analiza metanolnih ekstrakata cecidogena i stabla *L. vulgaris* otkrila je ukupno 49 jedinjenja (videti tabelu u dodatku rezultata). Identifikovano je ukupno 22 jedinjenja na osnovu standarda, a 27 jedinjenja je identifikovano na osnovu poređenja [M-H]<sup>-</sup> molekula i njegove fragmentacije. U metanolnim ekstraktima stabla *L. vulgaris* identifikovano je pet fenolnih kiselina (galna, protokatehuinska, *p*-hidroksibenzoeva, *p*-hidroksifenilsirćetna i siringinska kiselina), četiri hidroksicimetne kiseline (kafeinska, vanilnska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina), i glikozidi trianest flavonoida iz potklasa flavona, flavonola, flavanola i flavanona (apigenin, hispidulin, luteolin, krizin, pektolaringenin i *o*-metilovani flavoni-acacetin i diosmetin; kvercetin, kampferol i *o*-metilovani flavonol-izoramnetin; hesperetin; naringenin). Dvadeset šest glikozida je bilo u vidu monoglikozida flavonoida i disaharida rutinoze ( $\alpha$ -L-ramnopiranozil-(1→6))- $\beta$ -D-glukopiranoze) ili monosaharida heksoze. Skoro svi identifikovani

glikozidi su povezani *O*-glikozidnom vezom, a samo dva su bila povezana *C*-glikozidnom vezom, naringenin-6,8-di-*C*-heksozid i apigenin-6,8-di-*C*-heksozid. Većina identifikovanih glikozida bila je u vidu derivata hispidulina i diosmetina. Ova dva flavonoida imaju istu masu i retenciono vreme, ali korišćenjem tandemne masene spektrometrije (UHPLC–MS/MS Orbitrap) i proučavanjem literature (Sun i sar., 2012), MS<sup>4</sup> spektri glikozida hispidulina i diosmetina su jasno razdvojeni i pokazali su razlike. Identitet ovih glikozida dodatno je potvrđen analizom njihovih aglikona u hidrolizovanim uzorcima, čime je jasno pokazano da se radi o različitim izomerima.

U metanolnom ekstraktu cecidogena izdvojeno je 43 jedinjenja. Tri fenolna jedinjenja bila su prisutna isključivo u cecidogenu. Jedan je identifikovan kao diosmetin-*O*-acetilrutinozid na osnovu podataka MS<sup>2</sup> (tabela P1). Diosmetin-*O*-acetilrutinozid je imao MS<sup>2</sup> osnovni jon na 299 *m/z* (deprotonovani diosmetin) i sekundarne MS<sup>2</sup> jone na 607 *m/z* ([M–acetil]<sup>-</sup>) i 284 *m/z*, koji je nastao gubitkom acetila, rutinoze i metil grupe [M–acetil–rutinoza–CH<sub>3</sub>]<sup>-</sup>. Drugo jedinjenje je na osnovu standarda identifikovano kao protokatehuinska kiselina. Treće jedinjenje sa retencionim vremenom 9,23 min i formulom deprotonovanog molekula C<sub>32</sub>H<sub>31</sub>O<sub>18</sub><sup>-</sup> nije identifikovano (tabela P2). Fragmentacijom nepoznatog jedinjenja dobijen je MS<sup>2</sup> osnovni jon na 387 *m/z*, i MS<sup>3</sup> i MS<sup>4</sup> osnovni joni na 327 i 267 *m/z*, respektivno (tabela P2).

Na osnovu prethodne analize rezultata dobijenih UHPLC–MS/MS Orbitrap metodom može se zaključiti o sastavu jedinjenja u stablu i cecidogenu. U metanolnim ekstraktima *L. vulgaris* glavni glikozidi su bili glikozidi kumarinske, ferulične, hispidulin-, acacetin-, diosmetin- i pektolinaringenin- glikozidi. Tragovi lutolina, kvercetina, apigenina i kempferola kao i metil estra *p*-kumarinske kiseline otkriveni su u cecidogenu, ali ne i u metanolnom ekstraktu *L. vulgaris*. Međutim, ovi aglikoni i metil estar *p*-kumarinske kiseline bili su prisutni u ekstraktima stabla nakon hidrolize.

Glavne komponente identifikovane u cecidogenu bile su diosmetin-7-*O*-rutinozid, naringenin-6,8-di-*C*-heksozid, luteolin-*O*-rutinozid i pektolinaringenin-7-*O*-rutinozid (tabela 5). Procenjeni sadržaj nepoznatog jedinjenja je 14,04 ± 1,84 mg ml<sup>-1</sup>.

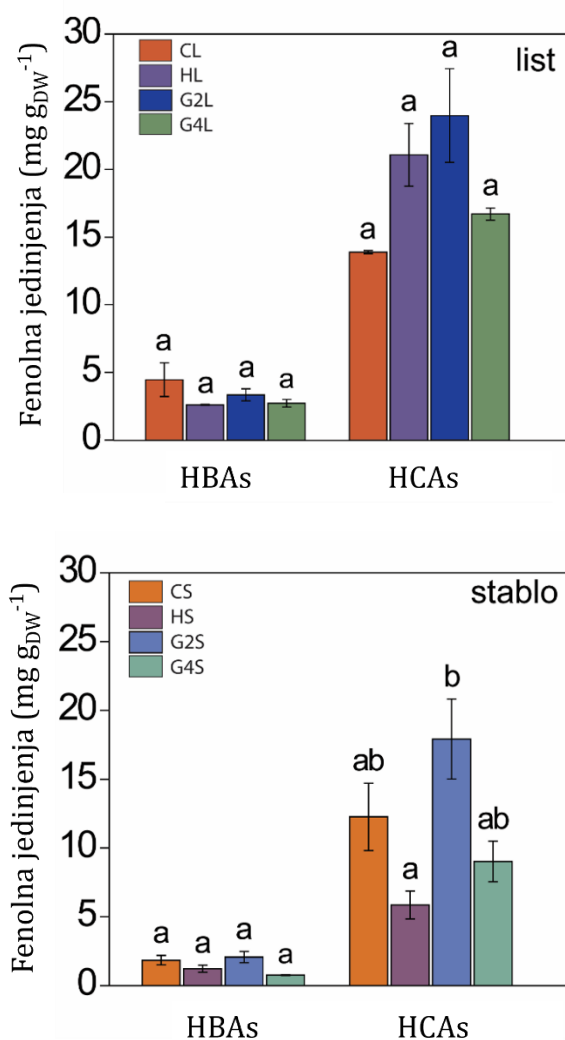
**Tabela 5.** Sadržaj fenolnih jedinjenja nađenih u cecidogenu (µg µl<sup>-1</sup>) i stablu *Linaria vulgaris* (µg g<sub>FW</sub><sup>-1</sup>), n.d. (eng. *not detected*)- nije detektovano u uzorku.

Jedinjenje	Cecidogen	glikozidi stablo <i>L. vulgaris</i>
Galna kiselina	0,14 ± 0,01	1,01 ± 0,03
Protokatehuinska kiselina- <i>O</i> -heksozid	0,86 ± 0,12	41,3 ± 8,34
Hidroksibenzoeva kiselina- <i>O</i> -heksozid izomer 1	0,25 ± 0,04	30,45 ± 6,15
Protokatehuinska kiselina	0,01 ± 0,00	n.d.
Hidroksibenzoeva kiselina- <i>O</i> -heksozid izomer 2	0,26 ± 0,02	30,45 ± 6,15
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	0,08 ± 0,02	0,5 ± 0,1
Kumarinska kiselina- <i>O</i> -heksozid	0,88 ± 0,18	451,94 ± 91,00
Naringenin-6,8-di- <i>C</i> -heksozid	68,79 ± 16,76	148,7 ± 35,22
<i>p</i> -Hidroksifenil-sirćetna kiselina	0,02 ± 0,01	0,24 ± 0,05
Apigenin-6,8-di- <i>C</i> -heksozid	1,92 ± 1,41	116,72 ± 18,01
Kafeinska kiselina	0,05 ± 0,01	0,1 ± 0,01
Vanilinska kiselina	0,04 ± 0,01	0,15 ± 0,05

Ferulinska kiselina- <i>O</i> -heksozid	0,32 ± 0,07	252,21 ± 47,75
Siringinska kiselina	0,01 ± 0,00	0,15 ± 0,02
Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid (Rutin)	0,01 ± 0,00	0,36 ± 0,05
Luteolin- <i>O</i> -rutinozid	15,79 ± 3,95	191,02 ± 45,78
Apigenin-8- <i>C</i> -glukozid (Viteksin)	n.d.	0,35 ± 0,09
Kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid (Hiperozid)	0,07 ± 0,02	0,09 ± 0,02
Izoramnetin- <i>O</i> -rutinozid	5,43 ± 1,04	15,92 ± 3,22
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	0,55 ± 0,10	1,32 ± 0,33
Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid (Cinarozid)	0,12 ± 0,03	2,23 ± 0,53
Vanillin	0,02 ± 0,00	0,1 ± 0,02
Kampferol- <i>O</i> -rutinozid	1,6 ± 0,21	60,91 ± 3,94
Ferulinska kiselina	0,07 ± 0,02	0,15 ± 0,03
Naringenin-7- <i>O</i> -neohesperidozid (Naringin)	0,01 ± 0,00	1,29 ± 0,26
Kampferol-3- <i>O</i> -glukozid (Astragalin)	0,08 ± 0,01	0,97 ± 0,27
Diosmetin-7- <i>O</i> -rutinozid (Diosmin)	86,36 ± 18,88	816,2 ± 149,21
Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid (Apigetrin)	n.d.	30,18 ± 3,99
Hispidulin- <i>O</i> -heksozid	0,53 ± 0,08	20,49 ± 3,18
Diosmetin- <i>O</i> -acetilrutinozid	4,03 ± 0,89	n.d.
Hispidulin- <i>O</i> -rutinozid	5,44 ± 0,14	109,92 ± 29,02
Apigenin- <i>O</i> -glukuronid	n.d.	125,72 ± 21,50
Hispidulin- <i>O</i> -acetilrutinozid	0,91 ± 0,21	217,07 ± 33,48
Diosmetin- <i>O</i> -glukuronid	n.d.	191,06 ± 32,87
Acacetin-7- <i>O</i> -rutinozid (Linarin)	1,3 ± 0,07	23,9 ± 3,06
Pektolinarigenin-7- <i>O</i> -rutinozid (Pektolinarin)	10,71 ± 0,36	67,92 ± 16,48
Hispidulin- <i>O</i> -acetilrutinozid izomer	n.d.	267,26 ± 42,91
Luteolin	0,02 ± 0,00	n.d.
Pektolinarigenin 7- <i>O</i> -(4'''-acetilrutinozid) (Linariin)	0,42 ± 0,04	9,48 ± 1,61
Kvercetin	0,56 ± 0,08	n.d.
Linariin izomer	0,58 ± 0,09	42,47 ± 8,28
<i>p</i> -Kumarinska kiselina metil estar	5,2 ± 1,22	n.d.
Naringenin	n.d.	0,67 ± 0,13
Apigenin	0,08 ± 0,00	n.d.
Kampferol	1,04 ± 0,16	n.d.
Hispidulin	0,2 ± 0,03	1,21 ± 0,24
Diosmetin	0,2 ± 0,03	1,21 ± 0,24
Pektolinarigenin	0,09 ± 0,02	136,72 ± 27,62

### 4.5.3. Sadržaj fenolnih jedinjenja vezanih za ćelijski zid dobijen UPLC metodom

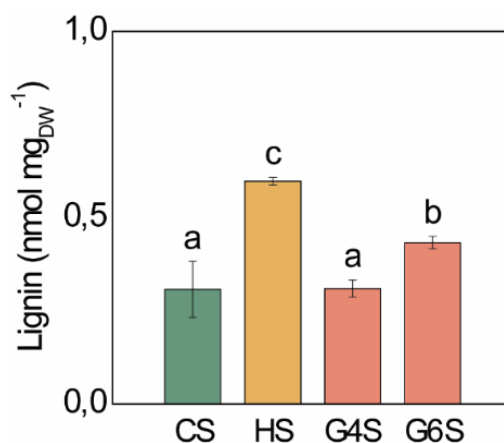
Na slici 37 prikazane su vrednosti sadržaja fenolnih jedinjenja izmerenih u stablu i listovima *L. vulgaris* kontrolnih biljaka (CL i CS), kao i onih oštećenih herbivorijom (HL i HS), i biljkama sa galama starosti 48 h (G2L i G2S) i 7 dana (G4L i G4S). U okviru grupe jedinjenja hidroksibenzojevih kiselina (HBAs) ne uočavaju se razlike među analiziranim uzorcima, ni u stablu ni u listu. U listu je izmerena veća koncentracija HBAs u svim uzorcima u odnosu na stablo (2,4 puta veća količina HBAs u listu kontrola, do 3,6 puta veća u listu G4). Sa druge strane, uočene su razlike u količini hidroksicimetnih kiselina (HCAs) zavisno od vrste biljnog tkiva, gde u stablu G2 gala ima najviše HCAs, skoro 2 puta više nego u G4S, oko 1,5 više nego u kontrolnom stablu (CS), i čak 3 puta više nego u stablu oštećenim herbivorijom (HS). Za list, između merenih vrsta uzoraka (C, H, G2 i G4) nisu uočene statistički značajne razlike. Vrednosti HCAs za list u odnosu na tkivo stabla su za oko 1,7 puta više u izmerenim uzorcima. Najzastupljenije HCAs u svim uzorcima su *p*-kumarna kiselina i ferulinska kiselina.



**Slika 37.** Sadržaj fenolnih jedinjenja vezanih za ćelijski zid, u listovima i stablu *L. vulgaris* kontrola (C), uzoraka izlaganih herbivoriji (H), i gala starosti 48 h (G2) i sedam dana (G4). HBAs, hidroksibenzojeve kiseline; HCAs, hidroksicimetne kiseline. Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  SE ( $n \geq 4$ ). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ( $p \leq 0,05$ ).

## 4.6. Koncentracija lignina

Sadržaj lignina u biljnom tkivu *L. vulgaris* kvantifikovan je nakon izolovanja ćelijskog zida, pri čemu je količina lignina izražena u odnosu na ekvivalent količinu koniferil alkohola (slika 38).



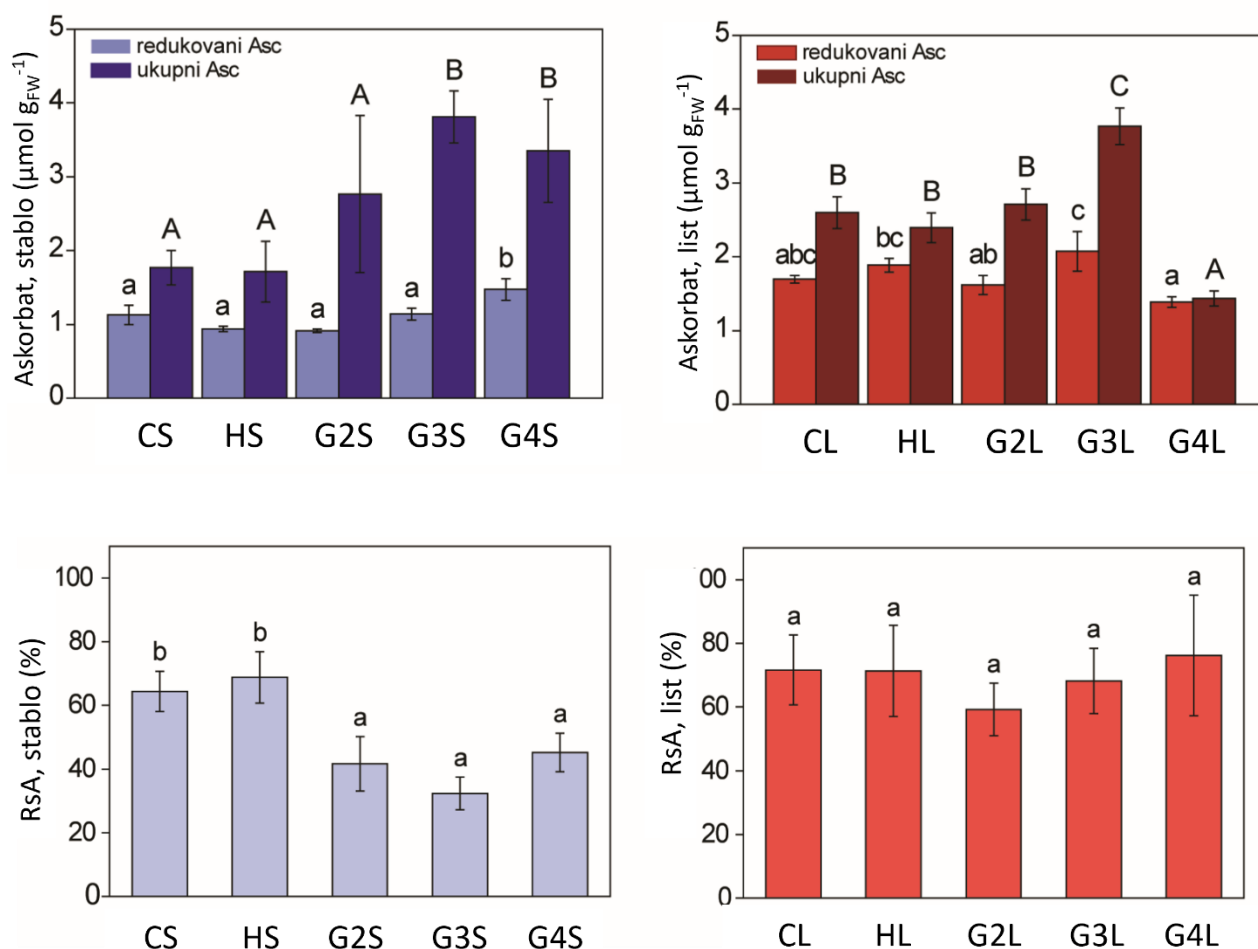
**Slika 38.** Količina lignina u ćelijskom zidu izolovanom iz stabla kontrolnih biljaka *L. vulgaris* (CS), stablo nakon herbivorije (HS) i stablo sa galama starim 7 dana (G4S) i mesec dana (G6S). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  SE ( $n \geq 4$ ). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ( $p \leq 0,05$ ).

Koncentracija lignina izražena na suhu masu (DW) ćelijskog zida značajno je veća u uzorcima stabla *L. vulgaris* na kojem su se hranili žišci (HS) (slika 38). Najmanja koncentracija lignina je uočena kod kontrolnih uzoraka (C) i stabla sa galom starosti sedam dana (G4S).

## 4.7. Efekat herbivorije i razvića gala na antioksidativni metabolizam *L. vulgaris*

### 4.7.1. Uticaj herbivorije i razvića gala na sadržaj ukupnog askorbata i njegovo redoks stanje kod *L. vulgaris*

U stablu *L. vulgaris* bio je uočljiv trend povećanja ukupnog sadržaja askorbata i dehidroaskorbata (DHA) u slučaju gala (slika 39). Ukupni sadržaj askorbata (Asc + DHA) u stablu razvijenih gala (G3 i G4) bio je oko dva puta veći u poređenju sa kontrolnim stablom i galama u ranoj fazi razvoja (G2-48 sati). Ovo je dovelo do smanjenog redoks stanja askorbata (u proseku niži % RsA nego u kontrolnom stablu). U listovima je primećeno povećanje ukupnog askorbata kod G3 uzoraka, ali je smanjeno kod G4 uzoraka. Metabolizam askorbata u stablu i listovima nije bio pod uticajem herbivorije.

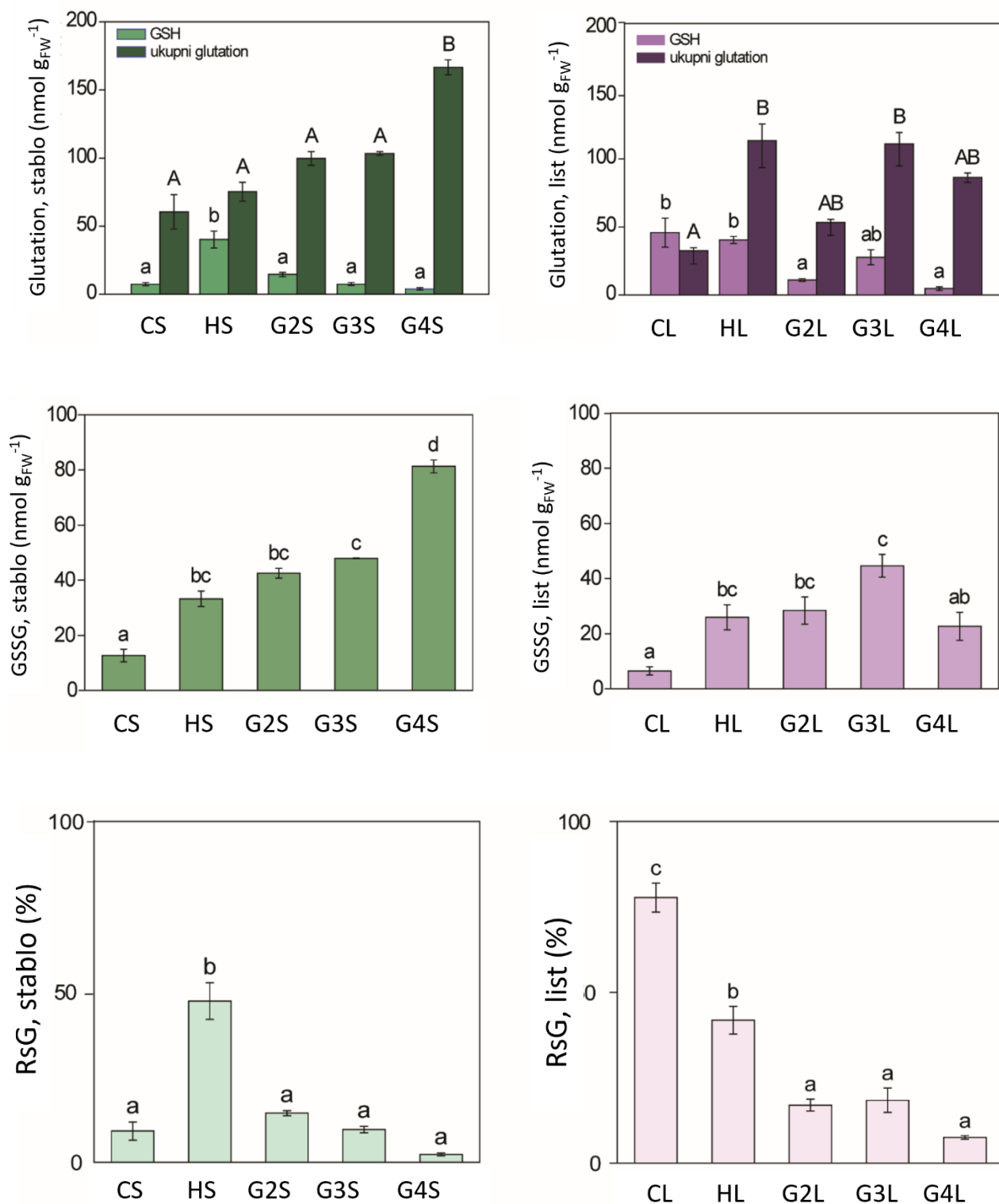


**Slika 39.** Redukovani askorbat (Asc) i ukupni askorbat ( $\mu\text{mol g}_{\text{FW}}^{-1}$ ), i redoks stanje (RsA) *Linaria vulgaris* kontrolnih biljki (C), biljaka oštećenih herbivorijom (H), i gala različite starosti (G2-48 h stare gale, G3- 4 dana i G4- 7 dana stare gale), mereni odvojeno u listovima (L) i stabu (S). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  SE ( $n \geq 4$ ). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ( $p \leq 0,05$ ). Mala slova odnose se na razlike za redukovani Asc, dok se velika slova odnose na razlike u ukupnom Asc.

#### 4.7.2. Uticaj herbivorije i razvića gala na sadržaj ukupnog glutaciona i njegovo redoks stanje kod *L. vulgaris*

Herbivorsko oštećenje tkiva stabla *L. vulgaris* podstiče akumulaciju GSH i time povećava redoks stanje glutaciona. Dok nivo GSH linearno opada od faze gala G2S do faze G4S, sadržaj GSSG raste, što je naročito izraženo u G4S galama gde zalihe glutaciona premašuje vrednosti izmerenih kod kontrola (CS) (slika 40). Herbivorija, s druge strane, direktno indukuje nakupljanje GSH u stablu i poboljšava redoks stanje glutaciona.

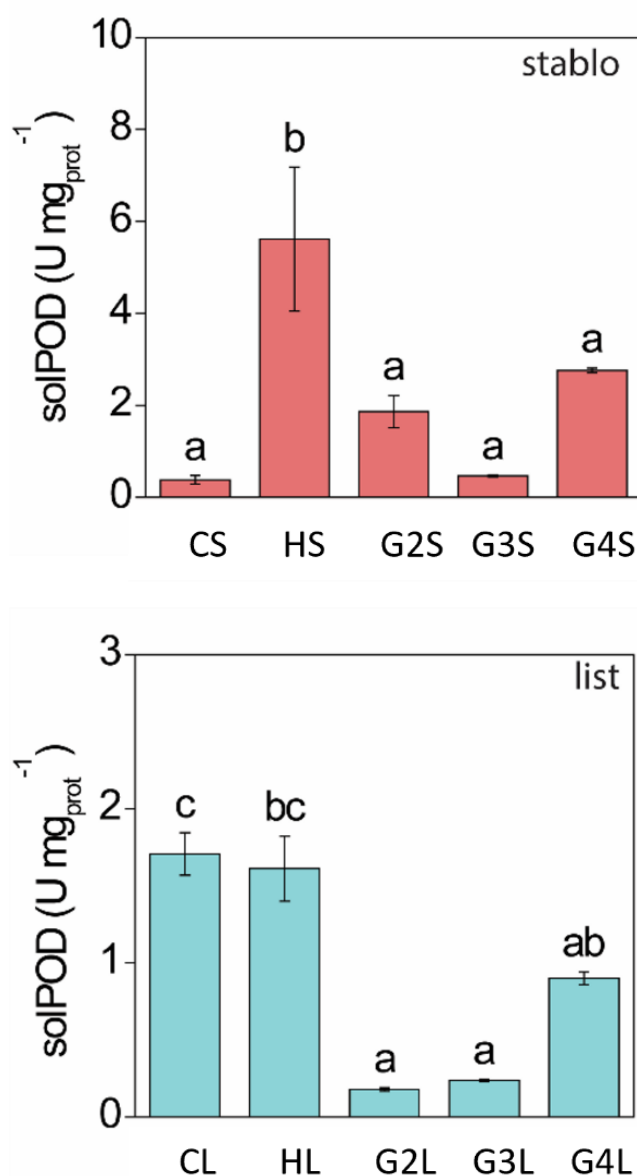
U listovima se redoks stanje glutaciona smanjilo sa delovanjem herbivora, i smanjivalo se još više nakon inicijacije i razvića gala (G2-G4). Nivo ukupnog glutaciona je bio veći nego u kontrolnim listovima u svim tretmanima, mada je GSH je bio istrošen u galama, i ostao je na sličnom nivou kao u listovima biljaka izloženih herbivoriji.



**Slika 40.** Ukupni i redukovani glutation (GSH), oksidovani glutation (GSSG) (nmol g<sub>FW</sub><sup>-1</sup>) i redoks stanje (RsG,%) *L. vulgaris* kontrolnih biljki (C), biljaka oštećenih herbivorijom (H), i gala različite starosti (G2, gala stara 48 h; G3, gala stara 4 dana; G4, gala stara 7 dana), mereni odvojeno u stablu i listu. Predstavljene su srednje vrednosti ± SE (n≥4). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu (p≤0,05). Mala slova odnose se na razlike za redukovani glutation, dok se velika slova odnose na razlike u ukupnom sadržaju glutationa.

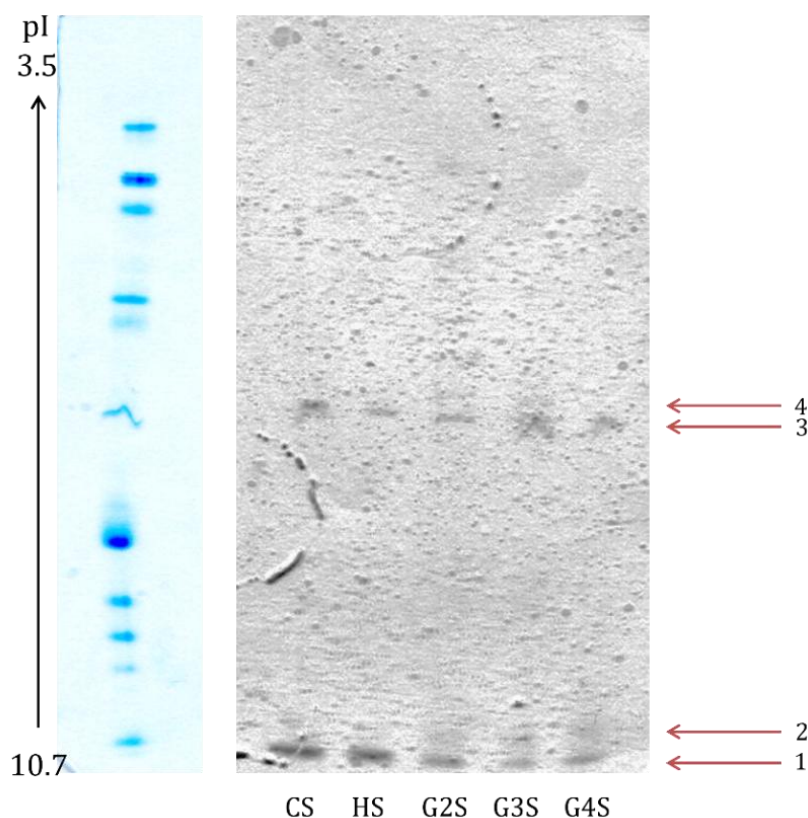
### 4.7.3. Aktivnost peroksidaza III klase (solPOD)

Aktivnost solubilnih peroksidaza III klase (solPOD) određivana je spektrofotometrijski, sa gvajakolom kao donorom elektrona. Specifična aktivnost solPOD je veća u stablu u odnosu na list (slika 41), sa najvećim vrednostima izmerenim kod HS uzoraka za stablo. U listu, najveća aktivnost solPOD detektovana je u kontrolnim listovima (CL).



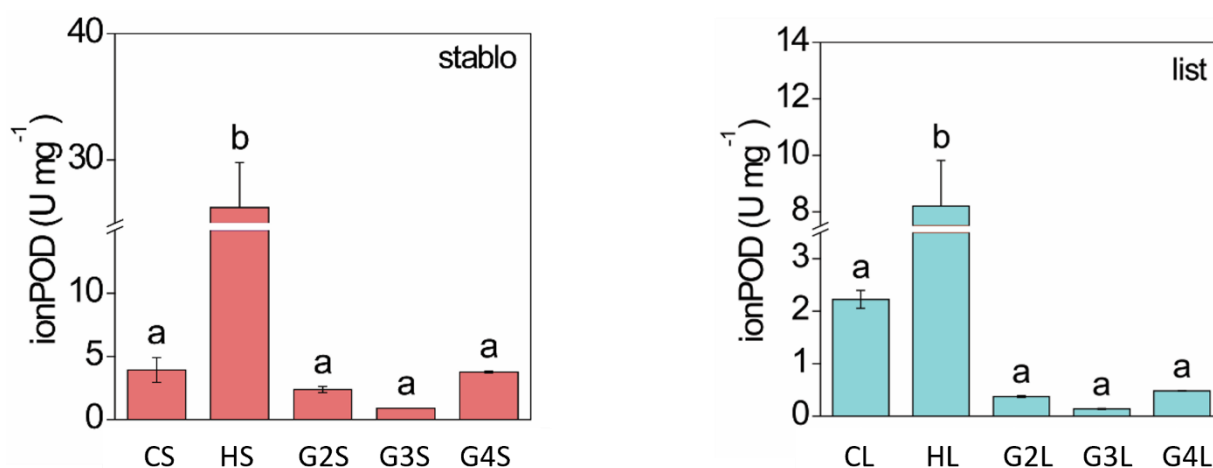
**Slika 41.** Aktivnost solubilnih peroksidaza (solPOD) u listu i stablu *L. vulgaris* kontrola (C), biljaka izloženih herbivoriji (H) i gala različitih starosti (G2, gala stara 48 h; G3, gala stara 4 dana; G4, gala stara 7 dana). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  SE ( $n \geq 4$ ). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ( $p \leq 0,05$ ).

Metodom izoelektrofokusanja razdvojene su različite izoforme solPOD u stablu (slika 42). U pH gradijentu 3-10 detektovane su dve izoforme prisutne u svim vrstama uzoraka (trake 1 i 3), dok se još dve izoforme izdvajaju samo kod uzoraka gala (G2, G3) (trake 2 i 4) (slika 42).



**Slika 42.** Detekcija različitih izoformi POD u solubilnim ekstraktima stabla *L. vulgaris* kontrola (C), biljaka izloženih herbivoriji (H) i gala različitih starosti (G2, gala stara 48 h; G3, gala stara 4 dana; G4, gala stara 7 dana), razdvojenih izoelektrofokusanjem (pH gradijent 3-10). Strelice upućuju na razdvojene izoforme.

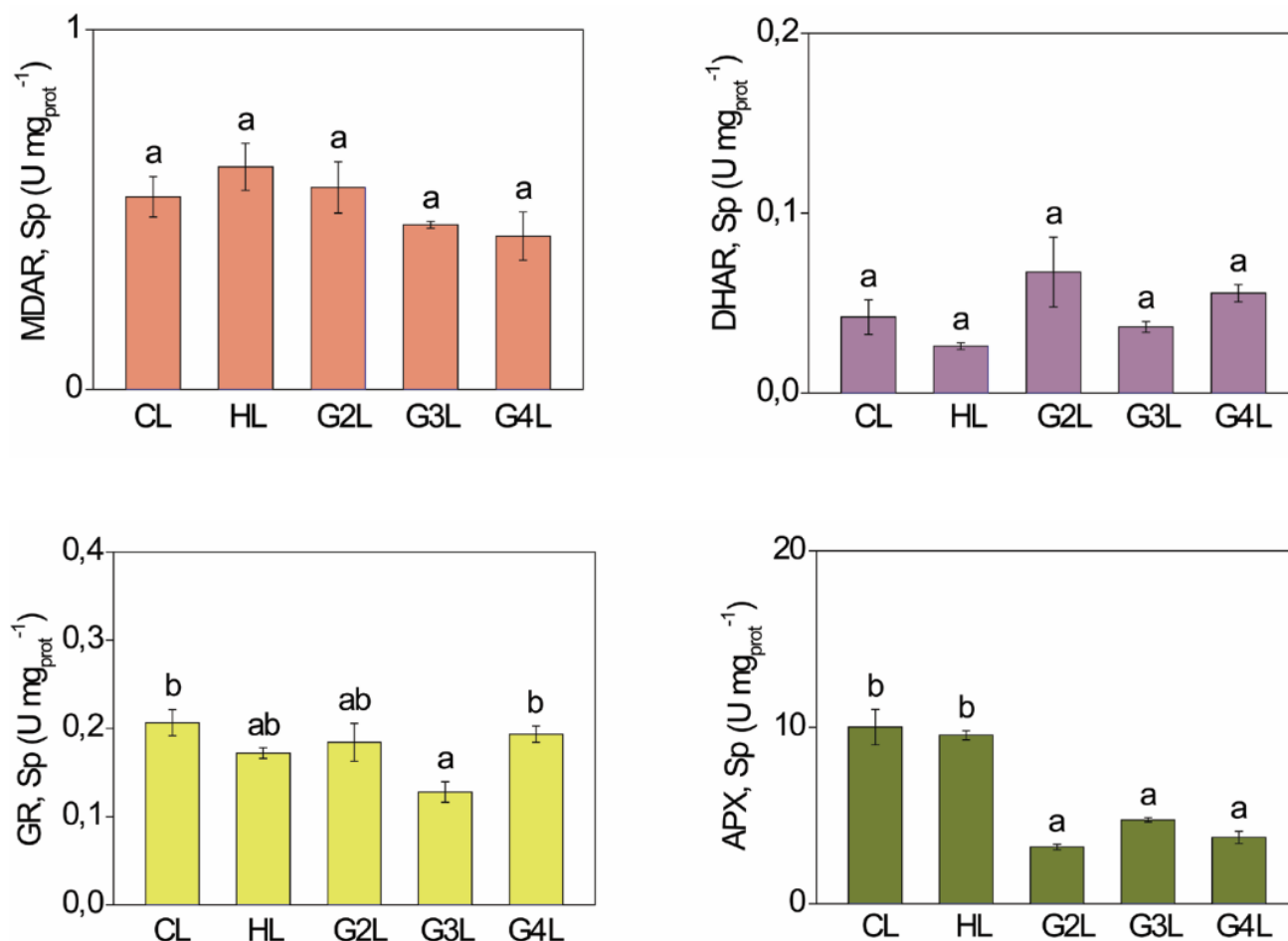
Aktivnost peroksidaza merena je i u jonski vezanoj frakciji (ionPOD) stabla i listova pomenutih vrsta uzoraka (slika 43). I u stablu i listu najveća aktivnost ionPOD uočena je u uzorcima biljaka izlaganih herbivoriji (H), sa oko 3 puta većim vrednostim u stablu u poređenju sa listom.



**Slika 43.** Aktivnost jonski vezanih za ćelijski zid peroksidaza (ionPOD) u stablu i listu *L. vulgaris* kontrola (C), biljaka izloženih herbivoriji (H) i gala različitih starosti (G2, gala stara 48 h; G3, gala stara 4 dana; G4, gala stara 7 dana). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  SE ( $n \geq 4$ ). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.7.4. Aktivnost enzima askorbat-glutation ciklusa (APX, DHAR, MDAR, GR)

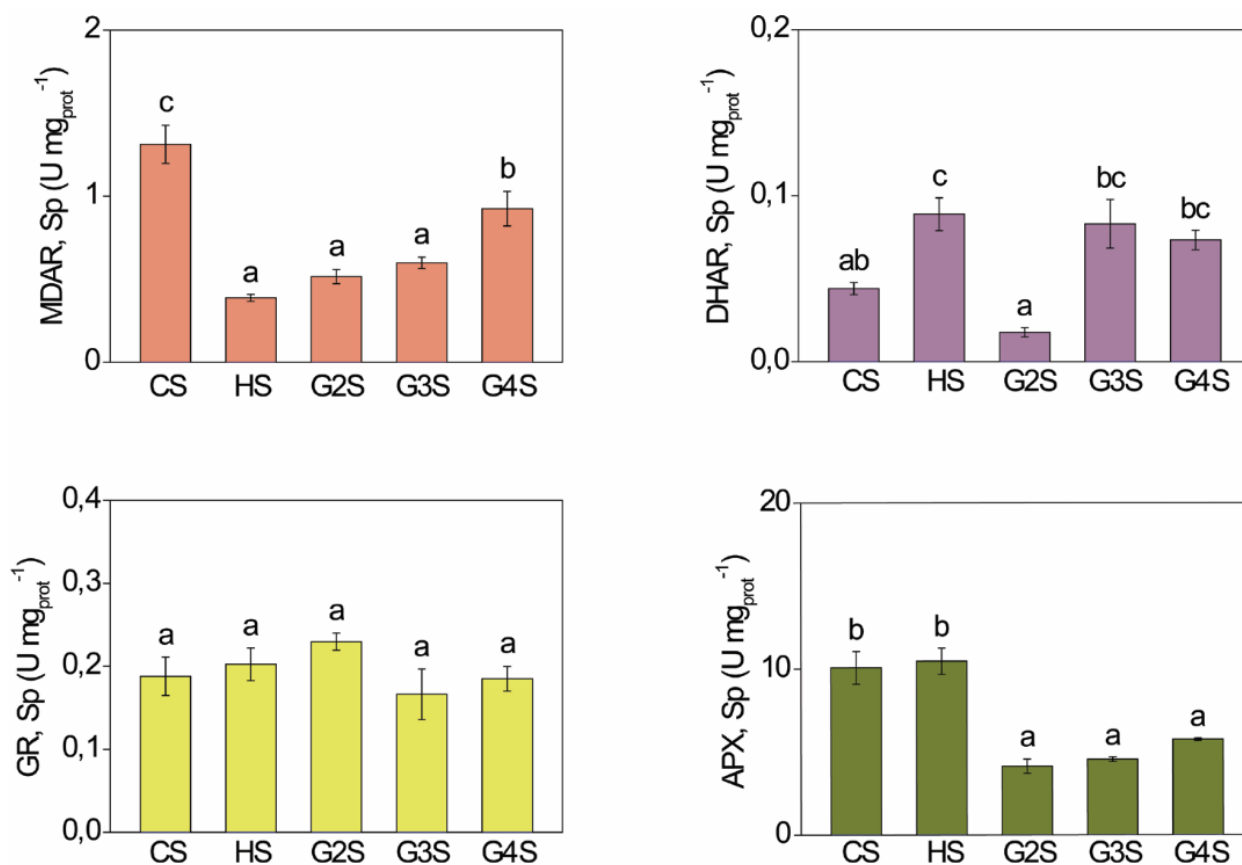
Promene aktivnosti enzima askorbat-glutation ciklusa u listovima i stablu *L. vulgaris* biljaka i gala predstavljene su na slikama 44 i 45.



**Slika 44.** Aktivnost APX, DHAR, GR i MDAR enzima kao U mg<sub>protein</sub><sup>-1</sup> u listovima *L. vulgaris* kontrola (CL), biljaka izloženih herbivoriji (HL) i gala različitih starosti (G2L, gala stara 48 h; G3L, gala stara 4 dana; G4L, gala stara 7 dana). Predstavljene su srednje vrednosti ± SE (n≥4). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ( $p \leq 0,05$ ).

Spektrofotometrijskim merenjima pokazano je da su specifične aktivnosti DHAR, GR i APX enzima bile sličnog reda veličine i u listu i u stablu, dok je MDAR u stablu pokazivao duplo veće vrednosti aktivnosti u odnosu na list istih grupa uzoraka. Aktivnost APX i u stablu i u listu pokazuje isti trend, tj. pad aktivnosti u tkivu gala za oko 40% u listu i oko 46% u stablu.

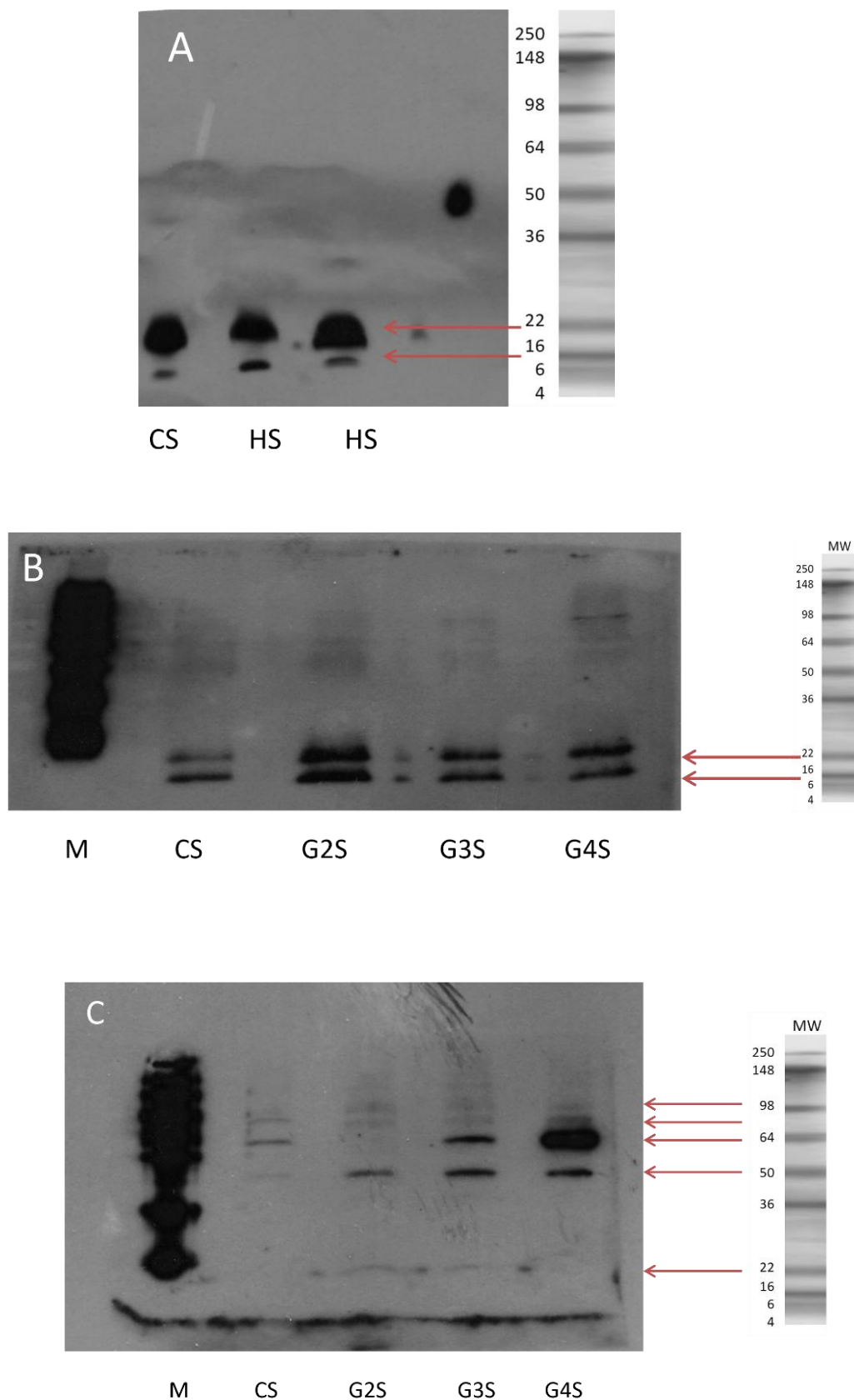
Aktivnost GR u stablu, kao ni aktivnost DHAR i MDAR u listu nije pokazivala razlike među ispitivanim grupama uzoraka (slika 45). U stablu biljaka oštećenih herbivorijom (HS), uočen je skok u aktivnosti DHAR enzima u odnosu na kontrolu, kao i blagi porast u aktivnostima istog enzima kod starijih gala (G3S i G4S) (slika 45). U slučaju MDAR enzima, najveću aktivnost pokazuje kontrola (CS), dok je kod HS uzoraka izmerena 3,4 puta niža aktivnost u odnosu na CS (slika 45).



**Slika 45.** Aktivnost APX, DHAR, GR i MDAR enzima kao U mg<sub>protein</sub><sup>-1</sup> u stablu *L. vulgaris* kontrola (CS), biljaka izloženih herbivoriji (HS) i gala različitih starosti (G2S, gala stara 48 h; G3S, gala stara 4 dana; G4S, gala stara 7 dana). Predstavljene su srednje vrednosti ± SE (n≥4). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.7.5. Detekcija SOD izoformi (Cu/ZnSOD i MnSOD) Western blot metodom

Nakon elektroforetskog razdvajanja solubilnih frakcija proteina, jasno su detektovane izoforme superoksid dismutaze (SOD) koje pripadaju grupama Cu/ZnSOD i MnSOD. Na slici 46A i B prikazane su Cu/ZnSOD izoforme u uzorcima stabla *L. vulgaris* kontrola (CS), stablo nakon herbivorije (HS) i kod gala starosti 48 h (G2S), 4 dana (G3S) i 7 dana (G4S), gde se vide dve izoforme za Cu/ZnSOD u svim uzorcima. MnSOD izoforme u uzorcima stabla *L. vulgaris* kontrola (CS), gala starosti 48 h (G2S), 4 dana (G3S) i 7 dana (G4S) prikazane su na slici 46C. Detektovano je nekoliko traka MnSOD izoformi, to je u skladu sa veličinom subjedinica enzima (~22-25 kDa-monomerna podjedinica, ~50 kDa-stabilni dimerni oblik, ~64 kDa- nespecifični kompleks ili intermedijarni oligomerni kompleks, ~88-98 kDa-nativni tetramerni kompleks).



**Slika 46.** Western blot, A: Cu/ZnSOD (15% PAG)- stablo kontrole, CS i biljaka izloženih herbivoriji, HS; B: Cu/ZnSOD (15% PAG)- stablo kontrole, CS, i gale starosti 48 h (G2S), 4 dana (G3S) i 7 dana (G4S); C: MnSOD (10% PAG). Na gel je naneta ista količina proteina u svaki bunarić za sve uzorke, u iznosu od 8  $\mu$ g. Strelice pokazuju na molekulska masu (MW, kDa) različitih subjedinica enzima.

## 5. Diskusija

Specifična interakcija između biljke-domaćina *L. vulgaris* i žiška *R. pilosa* u ovoj disertaciji poslužila je kao jedinstven model sistem koji je omogućio da se po prvi put istraže mehanizmi indukcije galoznog tkiva i identifikuju ključna jedinjenja odgovorna za ovaj proces u kontrolisanim uslovima. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da ova interakcija prevazilazi klasičan model biotičkog stresa i predstavlja primer visokospecijalizovane fiziološke manipulacije biljnog sistema u korist insekta.

### 5.1. Odgovor *Linaria vulgaris* na herbivoriju

#### 5.1.1. Promene u primarnom i sekundarnom metabolizmu *L. vulgaris*

Ovo istraživanje otkriva ključne sistemske odgovore *L. vulgaris* na herbivoriju, preko akumulacije trehalozo-6-fosfata (T6P), razgradnje skroba i akumulacije maltoze, povećanja aminokiselina (naročito asparagina) i sinteze fenola i lignina za jačanje odbrane biljke.

Rezultati ukazuju da je skrob glavni konzumirajući ugljeni hidrat u odgovoru biljke na herbivoriju, jer se njegova razgradnja direktno odrazila na promenu odnosa skroba prema ukupnim nerastvornim ugljenim hidratima (TIC) i na akumulaciju maltoze. Skrob je osnovna rezerva ugljenika u hloroplastima (Zeeman i sar., 2010). Kada je biljci potrebna energija, on se razgrađuje u maltozu (disaharid od dve glukoze), koja se potom transportuje u citosol gde se pretvara u glukozu i koristi za disanje, sintezu saharoze ili druge procese, tj. maltoza je neposredna veza između skladištene energije (skroba) i mobilne energije rastvorljivih šećera (Weise i sar., 2004; Grennan, 2006). T6P deluje kao signalni molekul koji, kao direktan senzor nivoa saharoze, reguliše metabolizam ugljenih hidrata, fotosintezu i ćelijski ciklus inhibicijom SnRK1 kinaze, čime usklađuje rastenje i razviće biljke sa njenim trenutnim energetske statusom (Smeecken i sar., 2010; Fichtner i Lunn, 2021; Van Leene i sar., 2022; Kerbler i sar., 2023). Ovi nalazi potvrđuju da herbivorija pokreće signalne puteve povezane sa metabolizmom ugljenih hidrata, što je u skladu sa ranijim zapažanjima o promeni u ekspresiji određenih gena koja reguliše metabolizam ugljenih hidrata i signalne puteve povezane sa odbranom od biljojeda (Singh i sar., 2011; Zhu i sar., 2023). Kod *Arabidopsis*a, hranjenje lisnih vaši biljnim tkivom izazvalo je promene u ekspresiji gena povezane sa metabolizmom ugljenih hidrata i metaboličkim aktivnostima u hloroplastima, kao i modifikacijama ćelijskog zida (Singh i sar., 2011; Appel i sar., 2014). Nalazi u ovoj disertaciji ukazuju na signalnu funkciju T6P izazvanu *R. pilosa* herbivorijom, što podržavaju raniji rezultati o ulozi *TPS11* gena (eng. *TREHALOSE PHOSPHATE SYNTHASE11*) koji kodiraju trehalozo-sintetišuće enzime pri odbrani *Arabidopsis*a od insekata koji se hrane floemskim sokom (Singh i sar., 2011). Zapažen rezultat u ovom istraživanju je i povećanje galaktoze u stablu *L. vulgaris* nakon herbivorije. Prema literaturnim podacima, galaktoza ukazuje na otpornost biljke ka herbivoriji u slučaju četinarske vrste *Pseudotsuga menziesii* i herbivora smrekinog moljca (Zou i Cates, 1994), i negativno je uticala na stopu rasta himenoptera *Dineura pullior* (Riipi i sar., 2005) i moljca *Epirrita autumnata* (Henriksson i sar., 2003).

Rezultati ove disertacije su takođe pokazali da oštećenje tkiva ishranom insekta dovodi do 10-strukog uvećanja sadržaja ukupnih aminokiselina u stablu *L. vulgaris* (slika 29). Promene u metabolizmu aminokiselina izazvane biljojedima mogu biti povezane sa realokacijom aminokiselina između napadnutih i udaljenih (sistemskih, nenapadnutih) tkiva. Pri floemskom

transportu azota u mnogim biljnim vrstama dominiraju glutamin, glutamat, asparagina i asparaginske kiseline - četiri aminokiseline koje su uključene u asimilaciju neorganskog azota (Coruzzi, 2003). U slučaju herbivorije moljca *Manduca sexta* u interakciji sa *Solanum lycopersicum* došlo do značajno veće koncentracije glutamina u stablu, kao i povećanja nivoa asparaginske kiseline (Steinbrenner i sar., 2011). Transkriptomikom je potvrđeno da herbivorija izaziva promene u ekspresiji gena povezanih sa proizvodnjom ovih aminokiselina, kao u primeru herbivorije zelene biljne vaši *Schizaphis graminum* na *Sorghum bicolor* gde je povećana ekspresija nitrit-reduktaza potrebnih za asimilaciju azota u glutamin (Gln) i glutaminsku kiselinu (Glu) (Zhu-Salzman i sar., 2004), zatim ekspresija Glu-sintaze indukovana ishranom lisnih vaši *Myzus nicotianae* na *Nicotiana attenuata* (Voelckel i sar., 2004), kao i Gln-sintetaze kod *Apium graveolens* (Divol i sar., 2005). Međutim, istraživanja pokazuju da od specifične interakcije biljka-herbivor, kao i vrste tkiva koje se posmatra (lokalno ili sistemsko), zavisi da li će doći do pojačane proizvodnje ili degradacije aminokiselina (Appel i sar., 2014).

Najistaknutije promene u profilu aminokiselina u našem sistemu *L. vulgaris* - *R. pilosa* u odgovoru na herbivoriju uključuju veliki skok nivoa asparagina (128 puta), glicina, arginina i glutamina (25 puta) (slika 31). Prema literaturi, odnos glicina i serina je direktan pokazatelj intenziteta fotorespiracije jer se glicin oksiduje u mitohondrijama, oslobađa amonijak i CO<sub>2</sub>, a zatim se pretvara u serin (Novitskaya i sar., 2002). Upravo zato se njihov balans koristi kao metabolički marker fotorespiratornog fluksa. S druge strane, koncentracije alanina i asparaginske kiseline pokazuju negativnu korelaciju sa fotorespiratornim fluksom, što znači da se njihovi nivoi smanjuju kada je intenzitet fotorespiracije visok. Ove aminokiseline doniraju amino grupe kako bi se amonijak koji se oslobađa iz glicina u mitohondrijama uspešno vratio u metabolizam. One deluju kao metabolički regulator, trošeći se kako bi se podržala ubrzana proizvodnja glicina i obezbedilo stabilno kruženje azota, čime se sprečava njegova potencijalna toksičnost i gubitak iz sistema (Novitskaya i sar., 2002). Takođe, zabeleženo je povećanje akumulacije tirozina, asparagina, ornitina, metionina i izoleucina kod *R. pilosa* herbivorije u našem istraživanju (slike 31-33), za razliku od procesa razvića gale. Asparagin je važna aminokiselina u biljkama jer ima visok odnos N/C u poređenju sa drugim aminokiselinama, što ga čini idealnim jedinjenjem za skladištenje i transport azota (Lea i sar., 2007). Ekstremni skok u akumulaciji asparagina u *L. vulgaris* biljkama tokom oštećenja uzrokovanih herbivorijom (slika 31) može se objasniti tako što herbivorno ranjavanje biljnog tkiva pokreće opšti sistemski stresni odgovor, koji podstiče brzu remobilizaciju azota i sintezu aminokiselina radi odbrane (Qiao i sar., 2026). Asparagin i glutamat, sintetisani delovanjem asparagin-sintetaze, deluju kao ključni metabolički posrednici koji integrišu status azota sa odgovorom na biotički stres, pri čemu glutamat oslobođen herbivorijom aktivira odbrambenu signalizaciju i hormonske puteve, uključujući jasmonsku kiselinu, radi preraspodele resursa sa rastenja na odbranu i preživljavanje (Qiao i sar., 2026). Enzim asparagin-sintetaza je centralni objedinitelj koji katalizuje sintezu asparagina iz aspartata, koristeći glutamin kao donor amino grupe, pri čemu se glutamin pretvara u glutamat (Lomelino i sar., 2017). Proizvod delovanja asparagin-sintetaze (glutamat) povezan je direktno sa biosintezom salicilne kiseline u hloroplastima, čime se integriše metabolizam azota sa sistemskom otpornošću na patogene (Torrens-Spence i sar., 2019). Asparagin služi kao stabilan molekul za transport i skladištenje azota, dok glutamat služi kao ključni prenosilac signala i prekursor za druge odbrambene molekule kao što su salicilna kiselina, glutation, i prolin (Qiao i sar., 2026).

Aminokiseline predstavljaju ključnu tačku preseka između primarnog metabolizma, odbrambenih mehanizama i nutritivne uloge biljke za potrebe herbivora, tj. da li će azot biti uloženi u rast, odbranu ili nutritivnu vrednost za druge organizme. Njihova akumulacija tokom stresa obezbeđuje ne samo skladištenje azota i energiju za oporavak, već i prekursore za sintezu sekundarnih metabolita i signalnih molekula koji jačaju odbranu biljke (Heinemann i

Hildebrandt, 2021). Herbivorna oštećenja indukuju sistemski odgovor posredovan jasmonatima i dovode do velike remobilizacije azota (posebno kroz asparagin i glutamin) (Steinbrenner i sar., 2011; Heinemann i Hildebrandt, 2021; Qiao i sar., 2026). Time se pokazuje da aminokiseline nisu samo gradivni blokovi proteina, već dinamični regulatori interakcija biljka–herbivor, pri čemu njihov balans određuje adaptivni potencijal biljke i ishod biotičkog stresa.

U domenu sekundarnog metabolizma, rezultati ovog istraživanja su pokazali da herbivorija stimuliše sintezu fenola i povećanje koncentracije lignina u stablu (slika 38), čime se ojačava ćelijski zid kao fizička barijera daljem delovanju insekta. Povećana aktivnost peroksidaza (POD) u stablu *L. vulgaris* nakon herbivorije (slika 43) korelira sa značajnim povećanjem koncentracije lignina u tim uzorcima. Ovi rezultati potvrđuju i ulogu POD u katalizi oksidativne polimerizacije monolignola, čime se ojačava ćelijski zid i stvara fizička barijera daljem prodoru ili ishrani insekta, što je pretpostavka i za druge sisteme biljka–herbivor (Passardi i sar., 2005; Almagro i sar., 2009; Gill i sar., 2010). Pokazano je da povećana ekspresija peroksidaza kod transgenih biljaka roda *Solanum* povećava nivo lignina za 30%, značajno podižući otpornost na herbivore (Tsuduki i sar., 2006). Prema rezultatima u ovom istraživanju, herbivorija takođe izaziva najveći porast aktivnosti i jonski vezanih peroksidaza u stablu *L. vulgaris*, što direktno korelira sa povećanom lignifikacijom tkiva.

Analize promena u sadržaju fenolnih kiselina (hidroksibenzoeve kiseline, HBAs i hidroksicimetne kiseline, HCAs) i flavonoida (Flav) kod biljke *L. vulgaris* u ovom istraživanju ukazuju na specifično reprogramiranje metabolizma u zavisnosti od tipa oštećenja (slika 34). Herbivorija deluje kao stresor koji podstiče biljku na pojačanu sintezu fenola putem šikimatnog i fenilpropanoidnog puta radi odbrane (Tooker i De Moraes, 2008; Singh i sar., 2021; Desnitskiy i sar., 2023; Yang i sar., 2023). Ključni enzim u ovom procesu, fenilalanin amonijak-lijaza (PAL), često pokazuje povećanu aktivnost u tkivima pogođenim herbivorima, preusmeravajući resurse sa primarnog rasta na sekundarni metabolizam (Mishra, i sar., 2020; Singh i sar., 2021; Yang i sar., 2023). HCAs (jedinjenja poput kafeinske, ferulinske i *p*-kumarne kiseline) igraju važnu ulogu u strukturnoj odbrani biljke; one su prekursori za lignin, čija se akumulacija povećava pod ovom vrstom biotičkog stresa kako bi se fizički ojačalo tkivo procesom lignifikacije. Pored toga, HCAs takođe deluju kao pro-oksidansi ili toksini koji direktno smanjuju fitnes herbivora (Singh i sar., 2021). HBAs, kao galna kiselina i njeni derivati, su često povišeni u tkivu gale, gde služe kao antiherbivorni agensi (Mishra i sar., 2020; Zhang i sar., 2022b). Biljka takođe koristi fenole za neutralizaciju ROS-a nastalih usled inicijalnog kontakta sa herbivorima (Koyama i sar., 2018; Mishra i sar., 2020).

U opštem kontekstu interakcija biljka–insekt, peroksidaze su deo grupe proteina povezanih sa patogenezom (PR-9) (eng. *Pathogenesis-Related proteins*) koji se indukuju napadom patogena (Almagro i sar., 2009; Dos Santos i Franco, 2023). Peroksidaze iz porodice PR-9 posreduju u zarastanju oštećenja usled toga što njihova katalitička aktivnost dovodi do polimerizacije makromolekula koji se ugrađuju u ćelijski zid, čime se on učvršćuje, oštećenja se saniraju i smanjuje mogućnost daljeg napada herbivora. Dodatno, porodica PR-6 proteina deluje kao inhibitori proteaza i poseduju sposobnost da razgrađuju egzopeptidaze koje proizvode insekti, bakterije i gljive, čime direktno učestvuju u odbrani biljke od napada herbivora (Dos Santos i Franco, 2023).

Predstavljeni su metabolički odgovori na herbivoriju (slika 47), koji uključuju aktiviranje signalnih puteva povezanih sa T6P i maltozom, remobilizaciju azota kroz asparagin i glutamin, i fotorespiraciju vidljivu u odnosu glicin–serin. Povećana sinteza fenolnih kiselina i aktivnost peroksidaza podstiču lignifikaciju stabla, stvarajući mehaničku barijeru. Uloga aminokiselina je u skladištenju azota i kao prekursora odbrambenih jedinjenja, usklađenih sa jasmonatskim signalima, dok fenoli ublažavaju oksidativni stres i direktno utiču na preživljavanje herbivora.

Na ovaj način *L. vulgaris* uspešno preusmerava resurse sa rasta ka odbrani, kombinujući primarni i sekundarni metabolizam u adaptaciji na herbivoriju.

### 5.1.2. Antioksidativni odgovor *L. vulgaris* na herbivoriju

Iako je uloga enzima askorbat-glutation ciklusa u ublažavanju oksidativnog stresa izazvanog abiotičkim faktorima dobro dokumentovana u literaturi, njihova specifična uloga u složenim biotičkim interakcijama ostaje nedovoljno razjašnjena (Pandey i sar., 2017b; Noctor i sar., 2024).

Antioksidativni odgovor *L. vulgaris* na herbivoriju značajno se razlikuje od onog tokom formiranja gala. Kod stabla *L. vulgaris* izloženih herbivoriji, zabeležen je porast redukovano glutaciona (GSH) od čak 5,5 puta. S druge strane porast oksidovanog oblika zabeležen je i kod stabla i listova, što vodi smanjenju redoks stanja glutaciona kod oba tkiva (slika 40). Rezultati ukazuju na postojanje oksidativnog stresa u toku herbivorije u našem sistemu lanilist-*R. pilosa*.

Rezultati ovog istraživanja u vezi sadržaja glutaciona ukazuju na specifične promene u zavisnosti od tipa biotičkog stresa (herbivorija naspram formiranja gala) i biljnih organa. Redoks stanje glutaciona u stablu je bilo nisko, dok je herbivorija indukovala njegov značajan porast na oko 50%, što ukazuje na aktivnu mobilizaciju antioksidativnih resursa u ovom tkivu (slika 40). Nasuprot tome, u listovima je uočen suprotan trend: visoko početno redoks stanje glutaciona (RkG) od oko 80% kod kontrola drastično je opalo na približno 40% usled ishrane insekata (slika 40). Ovakav pad u listovima reflektuje intenzivnu potrošnju redukovano glutaciona i pomeranje ravnoteže ka oksidovanom obliku, što služi kao snažan sistemski signal za pokretanje odbrambenih kaskada biljke (Zechmann, 2020).

Superoksid-dismutaza (SOD) predstavlja prvu liniju odbrane od reaktivnih vrsta kiseonika u biljnim ćelijama, a njena aktivnost i ekspresija se značajno povećavaju kao odgovor na biotički stres. Ovaj enzim katalizuje dismutaciju superoksidnog anjon-radikala u kiseonik i vodonik-peroksid, čime sprečava njegovo nakupljanje i formiranje znatno toksičnijeg hidroksilnog radikala (Asada, 1987; Mittler, 2002). Napad herbivora izaziva brzu i intenzivnu produkciju ROS-a, i tada SOD deluje trenutno kako bi sprečila nakupljanje radikala (Torres i sar., 2006). SOD proizvodi i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koji je stabilnija vrsta ROS-a, i može delovati kao sekundarni glasnik u signalnim mrežama biljke, omogućavajući koordinisan odbrambeni odgovor na nivou čitavog organizma (Foyer i Noctor, 2005b; Mittler i sar., 2011). Herbivorija kao biotički stres preoblikuje metabolizam biljke-domaćina i dovodi do intenzivnog oksidativnog odgovora; kada insekt ošteti biljno tkivo, dolazi do nagle produkcije ROS-a, što se manifestuje kao oksidativni stres. Kod herbivorije, povećana količina SOD-a ukazuje na to da biljka prepoznaje napad i pokreće signalne kaskade odbrane (Torres i sar., 2006). U ovim strukturama, aktivnost SOD-a se značajno povećava kako bi se održala redoks homeostaza tokom intenzivne proliferacije i hipertrofije tkiva, gde ovaj enzim balansira između zaštite od oksidativnog oštećenja i stvaranja signalnih molekula potrebnih za aktivaciju odbrambenih gena. Različite izoforme SOD-a se mogu specifično aktivirati u zavisnosti od tipa biotičkog stresa. Kod HS uzoraka uočljivo je umereno povećanje ovog enzima (slika 46), što sugeriše da je ekspresija Cu/ZnSOD inducibilna i da se povećava pod stresnim uslovima, tj. u uslovima herbivorije (Almagro i sar., 2009; Sharma i sar., 2012).

Askorbat-glutation ciklus predstavlja ključnu metaboličku mrežu enzima koji koordinisano deluju na detoksikaciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koristeći Asc i GSH kao redukciona jedinjenja i održavanju ćelijske redoks homeostaze (Foyer i Noctor, 2011; Foyer i Kunert, 2024). Ovaj ciklus obuhvata nekoliko koraka: enzim APX redukuje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u H<sub>2</sub>O koristeći askorbat kao donor

elektrona, dok enzimi MDAR, DHAR i GR služe za regeneraciju askorbata i glutaciona u njihovim redukovanim oblicima. U našem sistemu nisu dobijene značajne promene aktivnosti ovih enzima u listovima *L. vulgaris* (slika 44), što odgovara nepromenjenom sadržaju i redoks stanja askorbata (slika 39). Međutim, povećanje GSSG i u listovima i stablu *L. vulgaris* pri herbivoriji (slika 40) ukazuje na odgovor glutation-zavisnih antioksidativnih procesa na oksidativni stres izazvan oštećenjem ishranom insekta *R. pilosa*. Aktivnost enzima DHAR u stablu *L. vulgaris* pri herbivoriji se povećava (slika 45), što ukazuje na intenzivnu direktnu regeneraciju askorbata uz trošenje glutaciona, bez učešća MDAR, koji se znatno smanjuje (slika 45); dok aktivnost GR i APX enzima pri herbivoriji ostaje stabilna i u stablu i u listovima *L. vulgaris* (slike 44 i 45). S obzirom na znatno povećanu aktivnost POD u stablu pri herbivoriji (slika 41) može se pretpostaviti da one učestvuju u regulaciji redoks stanja preko POD/fenoli/Asc ciklusa (Takahama, 2004).

Kod osetljivih sorti pšenice napadnutih larvama mušice *Mayetiola destructor* nivoi transkripata za enzime koji uklanjaju ROS, uključujući DHAR, pokazuju trend povećanja u kasnijim fazama infekcije (od 72 h do 8. dana infestacije), što predstavlja pokušaj biljke da se izbori sa prolongiranim stresom (Liu i sar., 2010). Kod pirinča izloženog *M. destructor*, za razliku od pšenice, nivoi DHAR transkripata ostaju nepromenjeni, što sugeriše da različiti domaćini koriste različite strategije redoks regulacije protiv istog herbivora (Liu i sar., 2010). Zanimljivo je da u istom periodu delovanja stresa herbivorijom, aktivnost ovog enzima može opasti u mitohondrijama i peroksizomima, što ukazuje na to da biljka prioriteto usmerava redoks resurse ka fotosintetskom aparatu tokom napada insekta (Singh i sar., 2024). Primer iz literature povezan sa DHAR enzimom pri herbivoriji dolazi iz studija na *Arabidopsisu*, gde je pokazano da napad larvi *Spodoptera littoralis* indukuje antioksidativni odgovor uključujući povećanu aktivnost dehidroaskorbat reduktaze usled ekspresije *DHAR1*, što doprinosi održavanju redoks ravnoteže tokom oksidativnog stresa izazvanog herbivorijom (Schweizer i sar., 2013). Tokom napada pepeljaste vaši kupusa (*Brevicoryne brassicae*), *Arabidopsis* aktivira brzi odbrambeni mehanizam u kojem geni za MDAR (*MDAR1* i *MDAR4*) bivaju indukovani već u ranoj fazi infestacije, dostižući svoj maksimum ekspresije nakon 24 sata (Kuśnierczyk i sar., 2008). S druge strane, geni za DHAR pokazuju znatno varijabilniju ekspresiju u zavisnosti od vrste i otpornosti domaćina; kod pšenice napadnute mušicom *Mayetiola destructor*, nivoi transkripata DHAR mogu biti i povećani i smanjeni, zavisno od toga da li se radi o otpornoj ili osetljivoj sorti (Liu i sar., 2010). Nasuprot tome, kod pirinča izloženog istom insektu, ekspresija DHAR gena uglavnom ostaje nepromenjena, što ukazuje na visoku specifičnost redoks odgovora unutar porodice Poaceae (Liu i sar., 2010).

Herbivorna aktivnost u sistemu *L. vulgaris* – *R. pilosa* izaziva snažan oksidativni stres, koji se manifestuje kroz narušavanje redoks ravnoteže glutaciona i indukciju Cu/ZnSOD izoformi (slika 46). Istovremeno aktivacija enzima DHAR (slika 45) i pojačana aktivnost peroksidaza u stablu (slika 41 i 43) ukazuju na specifično preusmeravanje metabolizma biljke, sa ciljem održavanja redoks homeostaze i zaštite tkiva od oksidativnih oštećenja. Ovakav odgovor biljke se jasno razlikuje od reakcija koje prate formiranje gala, ukazujući da *L. vulgaris* primenjuje različite strategije antioksidativne regulacije u zavisnosti od tipa biotičkog stresa i organa koji je zahvaćen.

## 5.2. Metaboličke promene *L. vulgaris* tokom galogeneze

Intrigantna dinamika odnosa između galikolnih insekata, biljke-domaćina i gala već decenijama privlači pažnju istraživača, jer se radi o specifičnom odnosu u kojem biljka i insekt koevoluiraju milionima godina. Sa stanovišta biljke-domaćina, formiranje gale može se

posmatrati kao oblik tolerancije- parazitski insekti se lokalizuju na ograničenom prostoru, čime se sprečava širenje štete na ostatak biljke (Aldon i sar., 2018). Istovremeno, gale su metabolička čvorišta i mesta intenzivne razmene hranljivih materija (Wingler i Roitsch, 2008; Castro i sar., 2012; Chen i sar., 2020). Mehanizmi indukcije i razvića gala, naročito metabolički putevi i izvor-uvir interakcije, još uvek su nedovoljno razjašnjeni (Harris i Pitzschke, 2020). Upravo ta dvostruka priroda (zaštita biljke kroz lokalizaciju štete, i istovremeno stvaranje povoljnog mikrookruženja za insekte) čini gale fenomenom u istraživanjima biljnih odnosa sa okolinom.

U ovom istraživanju sproveden je niz metodoloških postupaka koji su po prvi put omogućili detaljan uvid u mehanizme interakcije između biljke *Linaria vulgaris* i insekta *Rhinusa pilosa*. Biljke su gajene u strogo kontrolisanim uslovima, pri čemu su birane mlade i zdrave biljke, što je obezbedilo optimalno razviće gala u apikalnom meristemu stabla *L. vulgaris*. Proces ovipozicije je pažljivo praćen, ženke su svakodnevno premeštane na nove biljke, a beleženo je vreme izvršenih ovipozicija kako bi uzorkovanje bilo po preciznoj vremenskoj skali (od trenutka polaganja jaja, u intervalima od 24 sata do 10. dana), što je omogućilo otkrivanje prolaznih signala presudnih za inicijalno reprogramiranje biljnog tkiva. Dodatno, odvojeno su analizirani stablo i list kao dva biljna organa, čime je postignuto preciznije razumevanje organspecifičnih odgovora na herbivoriju, ovipozicije i formiranje gala. Prvi put u okviru ovog sistema izvršeno je sakupljanje i analiza ostataka cecidogene tečnosti, što je dovelo do identifikacije specifičnih fenolnih jedinjenja koja nisu prisutna u intaktnom biljnom tkivu, i potencijalno predstavljaju primarni stimulus za formiranje gale. Istovremeno, istraživanje je jasno razgraničilo metabolički odgovor biljke na herbivoriju od odgovora na galogenezu.

### 5.2.1. Biohemijski profil cecidogena u galoznoj morfogenezi

Formiranje biljnih gala predstavlja složenu interakciju insekt-biljka, u kojoj insekti putem cecidogene tečnosti, efektorskih proteina i fitohormona reprogramiraju fiziologiju biljke-domaćina. Analize fenolnih jedinjenja u cecidogenima kod *L. vulgaris* otkrile su specifične metabolite za koje se smatra da služe kao stimulusi za inicijaciju gale, dok se njihovo poreklo povezuje sa metaboličkom transformacijom biljnih alelohemikalija u insektima. Izloženi podaci pružaju prvi opis sastava cecidogene tečnosti u ovom sistemu i ukazuju na kompleksnu mrežu biohemijskih i molekularnih mehanizama kojima insekti manipulišu hormonalnom ravnotežom i odbrambenim odgovorima biljke, čime se omogućava razvoj galoznih struktura.

Inicijacija i razviće biljnih gala predstavlja jedan od najsofisticiranijih oblika biotičke interakcije, gde insekti deluju kao induktori koji specifičnim hemijskim i mehaničkim signalima reprogramiraju fiziologiju i morfogenezu domaćina (Espírito-Santo i Fernandes, 2007; Raman, 2011; Mani, 2013). Ovaj proces prevazilazi mehaničko oštećenje i zasniva se na kompleksnom „biohemijskom dijalogu“, u kojem ključnu ulogu igraju cecidogen (ovipozicioni sekret) i efektorski molekuli koji preuzimaju kontrolu nad ćelijskom mašinerijom biljke (Chen i sar., 2008; Zhao i sar., 2015b; Giron i sar., 2016; Qi i sar., 2016; Jones i sar., 2022; Wang i sar., 2023; Desnitskiy i sar., 2023; Prajapati i sar., 2024). Induktori gala manipulišu hormonalnom ravnotežom, prvenstveno putem auksina i citokinina, koji podstiču abnormalnu hipertrofiju i hiperplaziju tkiva, vraćajući diferencirane ćelije u meristematsko stanje, potrebno za formiranje galoznih struktura (Zhu i sar., 2011; Giron i sar., 2013). Pored fitohormona, identifikovani su brojni proteinski efektori (poput SSGP-71 ili glukoza-oksidge) koji potiskuju odbrambene odgovore biljke (Zhao i sar., 2015). Takođe, signalni šećeri poput T6P i trehaloze indukuju anaboličke puteve uprkos prisutnom stresu (Foster i sar., 2003; Iturriaga i sar., 2009; Han i sar., 2024).

Proces ovipozicije praćen je lučenjem ovipozicione tečnosti (cecidogena), direktno povezane sa indukcijom galoznog tkiva (Barnewall i sar., 2012). Sa površine mesta ovipozicije na stablu *L. vulgaris* sakupljeni su ostaci cecidogena, i urađena je uporedna analiza fenola ekstrahovanih iz cecidogena, stabla i gale *L. vulgaris*, kao i iz adulta i larve *R. pilosa* pomoću HPLC-DAD. Detektovano je jedno jedinjenje sa  $A_{max}$  na 273, 332 nm ( $R_t$  30,65 min), prisutno isključivo u metanolnom ekstraktu cecidogena (slika 35). Dalja analiza metanolnih ekstrakata UHPLC-MS/MS Orbitrap-om pokazala je da su tri fenolna jedinjenja specifična za cecidogen: protokatehuinska kiselina, diosmetin-*O*-acetilrutinozid i nepoznati glikozid ( $C_{32}H_{31}O_{18}$ ) (tabela P1). Diosmetin i glikozidi protokatehuinske kiseline identifikovani su i u biljnim uzorcima, što sugeriše da insekt metaboliše ova jedinjenja tokom ishrane i akumulirati ih u svojim žlezdama pre vršenja ovipozicije. Pretpostavlja se da su upravo ovi modifikovani metaboliti odlučujući stimulus za inicijaciju razvića gale. Ovi nalazi se uklapaju u poznate mehanizme metabolizma biljnih alelohemikalija kod insekata, u koje spadaju enzimi kao što su glutathion transferaza, P-450 zavisne monooksigenaze i karboksilesteraze (Gullner i sar., 2018; Pandian i sar., 2020; Dar i sar., 2024). Određena jedinjenja mogu direktno da formiraju konjugate sa glutathionom ili aminokiselinama (npr. glicinom), dok je glikozilacija najčešći mehanizam metabolizma biljnih alelohemikalija, korišćen i za skladištenje i za detoksikaciju (Zhang i sar., 2022c). Acetilacija, posredovana acetil-koenzimom A, predstavlja još jedan oblik konjugacije stranih jedinjenja kod insekata (Wang i sar., 2024), što može objasniti poreklo diosmetin-*O*-acetilrutinozida u cecidogenu.

Kandidati za efektorne molekule potencijalno uključene u indukciju gala identifikovani su analizom transkriptoma jajnika i žlezda sa otrovom kod dve vrste cinipidnih osa (*Biorhiza pallida* i *Diplolepis rosae*), koje formiraju gale na hrastu, odnosno ruži (Cambier i sar., 2019), kao i analizom proteoma pljuvačnih žlezda filoksere *Daktulosphaira vitifoliae* koje indukuju gale na korenu vinove loze (Eitle i sar., 2019). Ipak, do sada ne postoje neposredni dokazi da ovi kandidati za efektore poseduju aktivnost indukcije gala u biljkama-domaćinima (Takeda i sar., 2021). Proučavanjem hesenske mušice (*Mayetiola destructor*) kao model organizma, identifikovano je nekoliko kandidata za efektorne molekule (Giron i sar., 2016). Sekvenciranjem genoma otkriveno je stotine transkriptata koji kodiraju potencijalne efektore, kao i četiri kandidata za avirulentne (*Avr*) efektorske gene (Aggarwal i sar., 2014; Zhao i sar., 2015b, 2016). Za svaki od ovih gena, mutacije koje dovode do gubitka funkcije omogućavaju insektu da izbegne odbranu biljke pokrenutu efektorima (ETI, eng. *effector-triggered immunity*), koja se aktivira odgovarajućim, *Avr*-specifičnim, genima otpornosti (R-genima) biljke (Giron i sar., 2016). Takođe, genom ove mušice sadrži na stotine gena koji kodiraju SSGP proteine (eng. *secreted salivary gland proteins*), među kojima se izdvaja porodica SSGP-71 čiji članovi oponašaju biljne F-box-LRR proteine i time preusmeravaju proteozome biljke, što dovodi do promene njene fiziologije i pogoduje razvoju insekta (Chen i sar., 2004; Giron i sar., 2016). Insekti često luče ili stimulišu biljku da proizvodi povišene nivoe auksina, citokinina i gibberelina, koji podstiču abnormalno uvećanje ćelija (hipertrofiju) i rasteenje biljnog tkiva (Tooker i De Moraes, 2011; Zhang i sar., 2016). Ovi hormoni su često prisutni u samim insektima (njihovoj pljuvački ili digestivnom traktu) u koncentracijama koje su dva do tri puta veće nego u normalnom biljnom tkivu (Ponce i sar., 2021; Tokuda i sar., 2022). Identifikovane su i nove porodice sekretovanih proteina insekata, poput BICYCLE proteina kod afida, za koje se veruje da direktno regulišu razviće gale (Korgaonkar i sar., 2021). Takođe, jedinjenja kao što su bruhini (dugolančani dioli esterifikovani na jednom ili na oba atoma kiseonika sa 3-hidroksipropanskom kiselinom) mogu stimulisati formiranje neoplazmi čak i u veoma malim koncentracijama (Doss i sar., 2000).

Dobijeni rezultati ukazuju da insekti putem cecidogene tečnosti i efektorskih molekula aktivno preoblikuju biljne metabolite i hormonalnu ravnotežu, čime pokreću inicijaciju i razviće

galoznih struktura. Prikazani podaci predstavljaju prvi opis sastava cecidogene tečnosti u sistemu *L. vulgaris* – *R. pilosa* i doprinose boljem tumačenju složenog biohemijskog dijaloga insekt–biljka.

### 5.2.2. Promene u primarnom metabolizmu (fotosinteza, ugljeni hidrati i aminokiseline)

Nalazi istraživanja u sistemu *L. vulgaris* – *R. pilosa* potvrđuju adaptivni značaj nutritivne hipoteze za razviće larve koja, putem biohemijske manipulacije, pretvara biljno tkivo u metaboličko čvorište (*potrošač tkivo*) koje povlači šećere i azot iz okolnih tkiva. Praćenjem razvića gale uočene su jasno razgraničene faze: G1 (24 h)- inicijacija, sa naglim porastom trehaloze; G2 (48 h)- prve morfološke promene, bubrenje stabla; G3 (4 dana)- aktivan rast i diferencijacija tkiva; G4 (7 dana)- formirana gala i porast mase; G5 (10 dana)- „drugi talas“ akumulacije aminokiselina (fenilalanin, triptofan, valin) za završno razviće larve. Metodološki pristup omogućio je razlikovanje prolaznih signalnih molekula, poput rane trehaloze, od trajnih metaboličkih promena koje prate potpuno razviće galoznog tkiva. Rezultati istraživanja ukazuju da nutritivna hipoteza predstavlja značajan okvir za razumevanje adaptivnih procesa u interakciji biljke-domaćina i galikolnog insekta, pri čemu se nutritivne transformacije galoznog tkiva mogu tumačiti kao mehanizmi koji obezbeđuju stabilan izvor resursa za razvoj larve (Diamond i sar., 2008; Oates i sar., 2021; Takeda i sar., 2021).

Inicijacija formiranja gala izaziva prolaznu akumulaciju trehaloze i značajan porast T6P, koji služe kao signali za reprogramiranje razvoja tkiva (slika 28) (Foster i sar., 2003; Iturriaga i sar., 2009). Analiza cecidogena žiška pokazala je da je trehaloza glavna komponenta ugljenih hidrata ali je njeno prisustvo u cecidogenu veoma nisko (podaci nisu prikazani). Treba ukazati i na to da trehaloza kod insekata služi kao primarni disaharid u hemolimfi i tkivima (Tang i sar., 2018). Prema našim saznanjima, nema izveštaja o sadržaju trehaloze u ovipozicionoj tečnosti insekata; stoga, imajući u vidu 14-struko povećanje sadržaja trehaloze u stablu u ranim fazama galogeneze (oko 24 h nakon izvršenih ovipozicija) (slika 28), njeno nakupljanje je najverovatnije izazvano efektorima koji pokreću inicijaciju gale. Takvo povećanje sadržaja trehaloze tokom inicijacije gale može delovati kao početni signal za diferencijaciju ćelija i preraspodelu ugljenih hidrata (Foster i sar., 2003; Iturriaga i sar., 2009). Poznato je da je trehaloza među najvažnijim faktorima virulencije kod biljaka pri bakterijskoj infestaciji *Pseudomonas aeruginosa* (Djonović i sar., 2013), dok je takođe uključena u ranu regulaciju metaboličkih procesa u sinergističkim interakcijama između biljaka i mikroorganizama (Figuroa i Lunn, 2016). Pored toga, trehaloza je važna za početnu infekciju pirinča sa *Magnaporthe grisea*, dok je njena kasnija degradacija omogućila dalje razviće ovog patogena (Foster i sar., 2003). U istraživanju ove disertacije, posle inicijalnog skoka, sadržaj trehaloze se smanjio u gali nakon sedam dana (slika 28). S druge strane, trehaloza može indukovati odbrambene odgovore biljaka (Morkunas i Ratajczak, 2014), što bi moglo objasniti prolazno povećanje kod gale u početnim fazama rastenja, pre očekivanog reprogramiranja transkripcije od strane još nepoznatih efektor iz *R. pilosa*. Objavljeno je da patogene bakterije *Xanthomonas citri*, koje izazivaju tumorske promene tkiva kod citrusa, sintetišu trehalozu kako bi modifikovali metabolizam biljke domaćina u svoju korist, dok u isto vreme biljke prepoznaju trehalozu kao znak napada patogena (Piazza i sar., 2015).

Pri inicijaciji galoznog tkiva u stablu *L. vulgaris* (G1S), pored trehaloze i T6P akumulacije, uočeno je i nakupljanje heksoza (glukoze, ksiloze, ramnoze, rafinoze i turanoze) (slika 28), bez značajnih promena u sadržaju skroba (slika 26) i sa blagom akumulacijom saharoze (slika 28). Nivo T6P je povezan sa koncentracijom saharoze u biljkama (Lunn i sar., 2006). T6P igra važnu

ulogu u regulisanju metabolizma ugljenih hidrata, a takođe se u istraživanjima ukazuje i na njegovu ulogu u organizovanju ćelijskog ciklusa i biosinteze ćelijskog zida (Ponnu i sar., 2011). Pokazano je da T6P inhibira kompleks SnRK1 kinaze (eng. *SNF1-related Kinase 1*) (Zhang i sar., 2009). SnRK1 funkcioniše kao metabolički senzor koji stalno usklađuje puteve metabolizma sa raspoloživošću i potrebama energije (Wurzinger i sar., 2018; Peixoto i Baena-González, 2022; Han i sar., 2024). Promene nivoa heksoza ili odnosa saharoza/heksoza mogu aktivirati signalne puteve posredovane heksokinazama, među kojima važnu ulogu ima Ser/Thr protein kinaza meta rapamicina (TOR, eng. *TARGET Of RAPAMYCIN*)- centralni regulator rastenja i metabolizma koji integriše nutritivne i hormonske signale zajedno sa drugim transkripcionim faktorima (Xiong i sar., 2013; Yadav i sar., 2014; Figueroa i Lunn, 2016; Li i sar., 2021). Što se tiče ovih hipoteza, u model-sistemu našeg istraživanja, odnos saharoza/heksoze smanjen je sa 0,21 u kontrolnim stablima na 0,13 u inicijalnoj fazi gale (GS1) i 0,04 gali u razviću (GS2). Akumulacija glukoze u GS1 i GS2 može biti povezana sa ranim razvićem organa i povećanom mitotičkom aktivnošću kao što je primećeno kod kotiledona u razvoju (Rolland i sar., 2006; Horacio i Martinez-Noel, 2013; Wingler i Henriques, 2022). Takođe, istraživanjima je potvrđena interakcija između glukoze i fitohormona (auksini, citokinini, apscisinska kiselina) tokom razvića biljaka (Sairanen i sar., 2012; Kushwah i Laxmi, 2017). Dodatno, akumulacija turanoze u stablu *L. vulgaris* bila je u korelaciji sa fazom razvića gale (G1S, G3S) (slika 28). Postoje istraživanja o stimulatvnom efektu turanoze na akumulaciju auksina (Gonzali i sar., 2005), što može biti od značaja s obzirom na učešće auksina i citokinina u rastenju i deobi ćelija u galama (Oliveira i sar., 2016). Smanjenje sadržaja trehaloze i saharoze je u korelaciji sa povećanjem metabolita (saharoze, glukoze, fruktoze) kod gala u razvoju (GS2) (slika 28). U nutritivnom tkivu mladih i formiranih gala otkrivena je aktivnost enzima invertaze, koja katalizuje razgradnju saharoze na glukozu i fruktozu (Rehill i Schultz, 2003; Oliveira i sar., 2010). Povećana akumulacija rastvorljivih ugljenih hidrata u listovima gala u poređenju sa neinfestiranim listovima zabeležena je kod nekoliko biljaka (Hartley, 1998; Castro i sar., 2012; Huang i sar., 2015). Pored toga, skrob kao rezerva ugljenika akumulirao se u galama formiranim na korenu (Griesser i sar., 2015) i galama na listovima (Oliveira i sar., 2010), što nije primećeno u galama na stablu u istraživanju ove disertacije (slika 26). Slično kao u našoj studiji, nije primećeno povećanje sadržaja skroba u lisnim galama *Copaifera langsdorffii* i *Litsea acuminata* (Castro i sar., 2012; Huang i sar., 2015). Izostanak akumulacije skroba u galama *L. vulgaris* ukazuje na intenzivnu metaboličku aktivnost stabla, pri čemu se pristižući ugljeni hidrati neposredno troše na procese rastenja i respiracije, umesto da budu deponovani kao rezerve. Takva dinamika odražava princip prema kojem se ugljeni hidrati usmeravaju ka neposrednoj potrošnji radi podrške uvećanju galoznog tkiva i razvoju larve unutar gale (Carneiro i Isaias, 2015; Ferreira i sar., 2019).

U galama dolazi do akumulacije heksoza (glukoze i fruktoze) usled povećane aktivnosti invertaza, dok skrob izostaje jer se ugljeni hidrati ubrzano troše na rastenje. Istovremeno, u galama se smanjuje sadržaj hlorofila, što vodi ka inhibiciji fotosinteze, pa razvoj gala u potpunosti zavisi od asimilata iz listova. Gale ne zavise od sopstvene fotosinteze jer se ponašaju kao metabolički uviri- povlače fotoasimilate iz lista (Castro i sar., 2012; Carneiro i sar., 2014; Huang i sar., 2014). Njihova fotosintetska aktivnost jeste smanjena, ali nije potpuno ugašena (Isaias i sar., 2015). Tkivo se preusmerava ka zaštiti i skladištenju, uz smanjenje količine pigmenta; pigmenti se zadržavaju u spoljnim slojevima tkiva gale (ispod epiderma), dok unutrašnja tkiva ostaju heterotrofna i imaju minimalan fotosintetski kapacitet (Moreira i sar., 2025).

Analiza kinetičkih tranzijenta fluorescencije hlorofila je pokazala značajne promene u fotohemiji fotosistema II (PS II) i efikasnosti transporta elektrona u galama u poređenju sa kontrolnim biljkama (slika 25, tabela 3). Ovo je bilo u korelaciji sa smanjenjem količine Chl *a* i

Chl *b* u galama (tabela 2). Slično ovome, Aldea i sar. (2006) su pokazali smanjenu efikasnost PS II u lisnim galama nekoliko vrsta drveća u poređenju sa neinfestiranim listovima. Osim toga, niža maksimalna kvantna efikasnost za PS II i niži sadržaj pigmentno-proteinskih kompleksa primećeni su u delovima lista gde je gala u odnosu na delove lista gde ih nema (Yang i sar., 2007; Huang i sar., 2011; Morina i sar., 2025). Smanjen sadržaj hlorofila i karotenoida primećen je u galama *Psidium mirtoides* (Carneiro i sar., 2014), lisnim galama *Machilus thunbergii* (Huang i sar., 2011) i *Copaifera langsdorffii* (Castro i sar., 2012), dok je neto stopa fotosinteze smanjena u galama na hrastu (Jiang i sar., 2018). S druge strane, kod *Aspidosperma australe* nakon formiranja gale nije primećen nikakav uticaj na brzinu fotosinteze (Oliveira i sar., 2011), dok su čak i povećane stope fotosinteze primećene kod filoda sa klasterizovanim galama izazvanim osama nego kod kontrolnih uzoraka *Acacia picnantha* (Dorchin i sar., 2006).

Inhibicija fotosintetske aktivnosti u galama *L. vulgaris* može biti regulisana akumuliranim heksozama u istom tkivu. Smatra se da enzimi Kalvinovog ciklusa, heksokinaze i fruktokinaze mogu detektovati nagomilane ugljene hidrate i potisnuti ekspresiju fotosintetskih gena kao što su Rubisco i Chl *a/b* vezujući proteini (Granot i sar., 2013; Granot i sar., 2014), što može biti povezano sa uočenim promenama u galama ovog istraživanja. Takođe, u nutritivnom tkivu formiranih gala (npr. kod lipe *Tilia cordata*) uočeni su dezorganizovani (deformisani) hloroplasti koji gube svoju tipičnu unutrašnju strukturu (Morina i sar., 2025), često sadrže brojna skrobna zrna, a pigment-proteinski kompleksi ključni za proces fotosinteze se razgrađuju (Huang i sar., 2015). Posledično, fotosintetska aktivnost je snažno inhibirana, smanjuje se kvantni prinos PS II, onemogućena je gasna razmena, a gale prestaju da budu autotrofni izvori i postaju energetska zavisna uvir tkiva koja aktivno uvoze fotoasimilate (Huang i sar., 2014).

Dobijeni rezultati o smanjenom kvantnom prinosu fluksa elektrona od  $Q_A$  do  $Q_B$  i dalje do PS I akceptora nakon sedam dana u poređenju sa kontrolnim stablom *L. vulgaris* ukazuju na ograničenu sposobnost fotosinteze da podrži intenzivnu ekspanziju tkiva u galama. S druge strane, u listovima biljaka sa galama nije bilo promene u fotosintetskim performansama u odnosu na kontrolne, što je bilo u korelaciji sa nepromenjenim nivoom skroba i ukupnih nerastvorljivih ugljenih hidrata. Uzimajući u obzir da je rastenje biljaka izmenjeno u odnosu na dramatično povećanje biomase gale tokom razvića (oko 3 puta u poređenju sa kontrolnim stablom), smatramo da je alokacija fotoasimilata kroz floem ka galama kao uviru glavni izvor energije za ubrzane metaboličke procese rastenja i razvića gala (Huang i sar., 2015; Jiang i sar., 2018; Martini i sar., 2020).

Kod gala indukovanih žiškom sadržaj aminokiselina raste (oko 4 puta) (slika 29), sa specifičnim „drugim talasom“ akumulacije fenilalanina i triptofana u kasnijim fazama (10. dan) (slike 31 i 33), što služi kao nutritivni rezervoar za larvu. Dobijeni rezultati podudaraju se sa ranijim istraživanjima gde herbivorija i indukcija galoznog tkiva izazivaju akumulaciju aminokiselina, kao što je objavljeno u studiji herbivorije na paradajzu (Steinbrenner i sar., 2011) i u primeru gala na *Sorbus commixta* indukovanih biljnim vašima (Koyama i sar., 2004). Sadržaj alanina, glutaminske kiseline i asparaginske kiseline kontinuirano se povećavao tokom razvića gale (slika 32), što ukazuje da se ove aminokiseline mogu koristiti za skladištenje amino grupa koje se oslobađaju tokom razgradnje drugih aminokiselina (Batista-Silva i sar., 2019). Dakle, akumulacija specifičnih aminokiselina može biti povezana sa skladištenjem prekursora za sintezu proteina kako bi se pripremili za oporavak biljnog metabolizma nakon stresa ili za razviće larve unutar gale. Rezultati takođe pokazuju specifičan porast određenih jedinjenja (npr. fenilalanin, triptofan, asparaginska kiselina, valin) tek u razvojnoj fazi gale posle 10 dana (G5S) u odnosu na fazu od 7 dana (G4S), što može poslužiti kao dodatni nutritivni rezervoar za larvu koja završava svoje razviće, ili predstavlja promenu u metabolizmu same biljke u završnoj fazi razvića gale.

Sumirajući izložene rezultate, može se zaključiti da promene u primarnom metabolizmu transformišu galu iz autotrofnog tkiva u heterotrofno metaboličko čvorište koje, potiskivanjem sopstvene fotosinteze i intenzivnim povlačenjem asimilata iz okolnih tkiva, podređuje resurse domaćina isključivo potrebama galogeneze i ishrani larve, što je u skladu sa nutritivnom hipotezom.

### 5.2.3. Promene u fenilpropanoidnom metabolizmu i profilu fenolnih jedinjenja kao odgovor na indukciju i razviće gala

Modifikacija profila fenolnih jedinjenja tokom razvoja gala kod *L. vulgaris* odražava precizno usklađen balans između akumulacije antioksidanata neophodnih za neutralizaciju oksidativnog praska i aktivacije fenilpropanoidnog puta radi strukturnog učvršćivanja i lignifikacije zaštitnih slojeva gale.

Formiranje gala dovodi do značajnog smanjenja koncentracije ukupnih fenola i flavonoida u tkivu nakon 7 dana. Rezultati pokazuju da su HBAs, kako solubilni tako i oni vezani za ćelijski zid, stabilni i ne pokazuju značajne razlike među analiziranim grupama uzoraka (slike 34 i 37). Bez obzira na kategoriju uzorka ili tip oštećenja, u listu je uvek izmerena veća koncentracija HBAs u odnosu na stablo, i to od 2,4 do 3,6 puta više. Ova stabilnost sugeriše da HBAs ne učestvuju direktno u specifičnim odgovorima na razviće gale kod ove vrste. Za razliku od HBAs, HCAs pokazuju značajne promene u zavisnosti od starosti gale (slika 37). Kod listova biljaka sa razvijenim galama zabeleženo je 2,5 puta veće prisustvo HCAs u odnosu na kontrolne listove, dok je u poređenju sa samim tkivom gale na stablu sadržaj u listovima čak 30 puta veći. Fenolne kiseline, naročito HCAs, pokazuju dinamične promene kao odgovor na indukciju gala, često se povećavajući u tkivima koja nisu zahvaćena galama kako bi ojačale indirektnu odbranu, poput emisije isparljivih materija koje privlače parazitoide (Tooker i De Moraes, 2008; Detoni i sar., 2011; Isaias i sar., 2018). U stablu *L. vulgaris* najveća količina HCAs vezanih za ćelijski zid zabeležena je kod mladih gala (starosti 48 h), što je skoro 2 puta više nego u starijim galama (slika 37). Ovakva akumulacija u ranim fazama razvića gale može doprineti indirektnoj odbrani biljke. Tkivo razvijene gale (G4) ima manji sadržaj svih fenola, uključujući flavonoide, u poređenju sa kontrolnim stablima (slika 34). Ovaj trend smanjenja flavonoida u galama primećen je i kod drugih sistema, poput *Tibouchina pulchra*, gde su nivoi bili skoro četiri puta manji nego u ostalim tkivima, a određeni flavonoli i flavoni uopšte nisu detektovani u galama (Motta i sar., 2005). Smanjenje koncentracije flavonoida u galama može se povezati sa smanjenom ekspresijom gena za njihovu biosintezu, čime se resursi preusmeravaju ka primarnim metabolitima neophodnim za ishranu larvi insekata, što je i indirektno pokazano u nekim primerima gde geni za primarni metabolizam (sinteza proteina i lipida) dominiraju u nutritivnim ćelijama gala, sugerišući supresiju flavonoidnih puteva (Harper i sar., 2004; Oates i sar., 2021; Takeda i sar., 2021). Između kontrolnih uzoraka i onih izloženih herbivoriji nisu uočene veće konstitutivne razlike u ukupnim grupama flavonoida, što sugeriše da je njihovo smanjenje specifično vezano za proces razvića gale. Dok su nivoi u galama niski, u susjednim listovima mogu biti povišeni, što ukazuje na prostornu regulaciju koja izoluje nutritivne zone od odbrambenih jedinjenja (Singh i sar., 2021; Yang i sar., 2023). Kod tropskih vrsta je pokazano da formiranje gala dovodi do povećanja ukupnih fenola u listovima, što dovodi do smanjenja herbivorne aktivnosti za 20 do 50% (Pascual-Alvarado i sar., 2008). Ovi rezultati podržavaju hipotezu da insekti koji formiraju gale manipulišu fiziologijom biljke kako bi stimulisali proizvodnju sekundarnih metabolita. Povećana koncentracija fenola u tkivu koje okružuje galu služi kao hemijska barijera koja odbija druge insekte, čime insekti u galama indirektno štite i sebe od predatora.

Dobijeni rezultati potvrđuju da kod *L. vulgaris* dolazi do prilagođavanja sekundarnog metabolizma (fenolnih kiselina i flavonoida), što ukazuje na sposobnost biljke-domaćina da dinamički reprogramira svoje metaboličke puteve (kompromis između rasta nasuprot odbrane) kao direktan odgovor na fazu razvića gale i vrstu oštećenja tkiva. Dok su HBAs relativno stabilne kroz sve kategorije uzoraka (kontrola, herbivorija i gale), HCAs pokazuju dinamične promene i značajnu akumulaciju u listovima biljaka sa galama u ranoj fazi razvića galoznog tkiva (Detoni i sar., 2011; Teixeira i Ferreira, 2021). Nasuprot tome, flavonoidi su smanjeni u tkivu razvijene gale, što je primećeno i u drugim sistemima gde gale redukuju ova jedinjenja kako bi pospešile ishranu larvi (Motta i sar., 2005; Mishra i sar., 2020). Ovi rezultati time potvrđuju ranija zapažanja, ali dodatno naglašavaju fazno-specifičnu regulaciju metabolizma u ovom sistemu.

#### 5.2.4. Uloga antioksidativnog metabolizma u galogenezi

Proces formiranja gala odražava visoko kompleksnu interakciju biljke i insekta, gde insekt-induktor manipuliše ćelijskim mehanizmima domaćina radi formiranja specijalizovanih nutritivnih i zaštitnih organa. U osnovi ovih procesa nalazi se antioksidativni metabolizam, čija je presudna uloga očuvanje dinamičke ravnoteže između razvojnih signala i odbrambenih odgovora biljke. Proces galogeneze započinje aktivnošću insekta (hranjenjem i ovipozicijom), što biljka prepoznaje kao stresni signal i na šta odgovara oksidativnim praskom- brzom i intenzivnom produkcijom ROS-a (de Oliveira i sar., 2014; Guedes i sar., 2022). U formiranju gala antioksidativni sistem ima nekoliko važnih uloga: reguliše morfogenezu, gde ROS deluju kao signalni molekuli čija se aktivnost uravnotežuje snažnim antioksidativnim odgovorom (Isaias i sar., 2015); učestvuje u modifikaciji ćelijskog zida, pri čemu peroksidaze u ranim fazama razvoja omogućavaju njegovo 'labavljenje' i brzu ekspanziju ćelija (Almagro i sar., 2009); sprečava odbrambenu nekrozu manipulišući redoks statusom domaćina uz pomoć askorbata i glutationa, čime se obezbeđuje kontinuitet rasta galoznog tkiva (Isaias i sar., 2015; Miller i Raman, 2019).

U stablu *L. vulgaris* razviće gala prati porast ukupnog sadržaja askorbata (redukovani Asc + oksidovani DHA) (slika 39). Ukupni sadržaj Asc u tkivu razvijenih gala (faze G3 i G4) približno je dvostruko veći u poređenju sa kontrolnim stablom ili onima u ranoj fazi indukcije (G2) (slika 39). Uprkos povećanoj ukupnoj količini, u galama se smanjuje udeo redukovane forme askorbata u odnosu na kontrolu. Takva dinamika ukazuje da se Asc intenzivno troši ili da procesi njegove regeneracije ne uspevaju da održe visok nivo redukovanog oblika u uslovima pojačanog oksidativnog stresa koji prati galogenezu. Ova dinamika askorbata ukazuje na ulogu APX enzima u održavanju redoks ravnoteže tokom galogeneze.

Askorbat peroksidaza (APX) predstavlja važan enzim u antioksidativnom odbrambenom sistemu biljaka, prvenstveno kroz svoju ulogu u Asc-GSH ciklusu (Foyer -Halliwell-Asada ciklus) (Noctor i Foyer, 1998a). Njena osnovna funkcija je kataliza prelaska vodonik peroksida u vodu, koristeći askorbat kao specifični donor elektrona (Foyer i Noctor, 2011). Različite izoforme ovog enzima raspoređene su u subćelijskim odeljcima (citosolu, hloroplastima, mitohondrijama i peroksizomima), što omogućava efikasnu kontrolu nivoa ROS-a u čitavoj ćeliji (Shigeoka i sar., 2002). Stabilnost i aktivnost APX-a direktno zavise od prisustva askorbata (Caverzan i sar., 2012). Istraživanja pokazuju da su ove izoforme izuzetno nestabilne u odsustvu Asc, tj. aktivnost APX-a se brzo gubi kada koncentracija askorbata padne ispod 20  $\mu\text{M}$ . Među svim izoformama, hloroplastna APX (chlAPX) je najosetljivija, sa poluvremenom inaktivacije kraćim od 30 sekundi u uslovima niskog nivoa askorbata, dok su citosolne i mikrozomalne forme znatno stabilnije (Yoshimura i sar., 1998). Gubitak aktivnosti chlAPX (posebno tilakoidno vezane tAPX) smatra se kritičnim faktorom, jer dovodi do akumulacije  $\text{H}_2\text{O}_2$  i oksidativnog

oštećenja proteina u hloroplastima, što direktno narušava proces fotosinteze (Maruta i sar., 2010). Pored direktne zaštitne uloge, APX učestvuje i u redoks-signalizaciji (Caverzan i sar., 2012). Finim podešavanjem nivoa ROS-a, APX izoforme regulišu signalne puteve koji upravljaju razvojem biljke i njenim odgovorom na stresne uslove. U situacijama kada je aktivnost APX suprimirana, biljke aktiviraju kompenzacione mehanizme, povećavajući ekspresiju drugih antioksidativnih enzima, poput katalaze i glutathion peroksidaze, kako bi održale redoks-homeostazu i preživele nepovoljne uslove (Caverzan i sar., 2012).

Razvoj galoznog tkiva dovodi do pada aktivnosti APX enzima u svim fazama formiranja gale (slike 44 i 45). Smanjenje u aktivnosti enzima APX omogućava lokalnu akumulaciju ROS-a kao signalnih molekula za reprogramiranje tkiva. Dostupna literatura ne pruža direktne dokaze o aktivnoj supresiji APX enzima putem insektnih efektor iz cecidogena, već ukazuju na indirektno mehanizme povezane sa promenom u metabolizmu askorbata i manipulacijom fitohormonima (salicilna kiselina, jasmonska kiselina) (Tooker i Helms, 2014; Herrera-Vásquez i sar., 2015). Ovo podržava hipotezu da je smanjenje u APX verovatno posledica metaboličkih promena izazvanih delovanjem insekta, a ne specifične supresije enzima (Mittapalli i sar., 2007; Liu i sar., 2010; Gätjens-Boniche, 2019). Kako se aktivnost APX-a smanjuje, redoks ravnoteža se sve više oslanja na glutathion, čiji se status značajno menja tokom razvića gale.

Sadržaj glutathiona u listovima opada, dok u stablu dolazi do drastičnog porasta oksidovanog glutathiona (GSSG), koji je kod formiranih gala bio 6 puta veći nego u kontroli. GSH izmeren u uzorcima stabla *L. vulgaris* nije pokazao promene između kontrolnih uzoraka i gala različite starosti, dok je u listovima gala u svim fazama primećeno smanjenje GSH, što sugerira da se ovaj antioksidant ubrzano troši usled povećane stope oksidativnih procesa izazvanih razvojem galoznog tkiva. Posebno je značajan kontinuirani porast GSSG u stablu tokom razvoja gala, sa najvišim vrednostima kod gala starosti sedam dana koje su bile oko 6 puta više u odnosu na kontrolu (slika 40). Ovo pomeranje redoks ravnoteže ka oksidovanom obliku glutathiona nije nužno znak oksidativnog stresa, već može biti signal za specifične promene u ekspresiji gena (Zechmann, 2020; Noctor i sar., 2024). Vrednosti ukupnog glutathiona pokazuju sličan trend kao i vrednosti za GSSG, sa najnižim vrednostima za kontrolna stabla i početne faze razvića gala, i sa najvišim vrednostima kod formiranih gala (gale 7. dan) (slika 40). Redoks stanje glutathiona (RkG) u stablu je bilo izuzetno nisko i bez statistički značajnih odstupanja kod kontrola i gala svih faza razvića (slika 40). S druge strane, u uzorcima listova zabeležen je visok RkG od oko 80%, dok je kod svih gala uočen pad RkG na oko 14% (slika 40). Ovaj pad RkG, koji je u listovima mnogo izraženiji u odnosu na stablo gde se tvorevina gale nalazi, ukazuje na sistemski odgovor biljke na biotički stres. Sadržaj oksidovanog glutathiona (GSSG) u listovima prati trend zabeležen u stablu: najniže vrednosti su izmerene kod kontrolnih biljaka, dok se porast GSSG beleži u svim fazama razvića gale, osim što je u galama 4. dana izmeren GSSG sa najvišim vrednostima (slika 40). Što se tiče sadržaja GSH, uočeno je smanjenje količine redukovano glutathiona kod listova gala svih faza razvića u odnosu na kontrolne listove. Slično je pokazano kod Morina i sar. (2025), gde gale na listu lipe imaju niži ukupni redukcionni kapacitet i sporiju kinetiku antioksidanata u poređenju sa listovima bez gala. Ovakva dinamika sadržaja glutathiona priprema uslove za peroksidaze, koje preuzimaju regulatornu ulogu u regulaciji strukture ćelijskog zida.

Peroksidaze III klase (POD) imaju ključnu, ali i dvojak ulogu u procesu galogeneze, delujući kao centralni regulatori dinamike ćelijskog zida (Passardi i sar., 2004; 2005). Za razliku od tipičnog odgovora na herbivoriju, gde POD primarno učestvuju u očvršćavanju i lignifikaciji tkiva radi odbrane, u ranim fazama razvića gale ovi enzimi utiču na razmekšavanje strukture ćelijskog zida (Almagro i sar., 2009). U zrelim galama funkcija peroksidaza postaje prostorno diferencirana: unutrašnji slojevi ostaju fleksibilni radi transporta nutrijenata, dok spoljašnji prolaze kroz intenzivnu lignifikaciju, formirajući zaštitni sloj koji obezbeđuje mehaničku barijeru protiv predatora (Teixeira i sar., 2018; Markel i sar., 2024).

Povećana aktivnost POD-a u ranoj fazi razvića gale (G2-G3) (slika 42), uprkos niskom nivou lignina, sugeriše da ovi enzimi služe za labavljenje ćelijskog zida ili unakrsno povezivanje proteina radi održavanja fleksibilnosti zida neophodne za rast ćelija gala. Specifična aktivnost solPOD-a u stablu značajno je veća nego u listovima (slika 41), što ukazuje da stablo, kao primarno mesto interakcije i ovipozicija, predstavlja centar metaboličkog odgovora zasnovanog na peroksidazama. Metodom izoelektrofokusiranja (IEF) otkrivene su dve dodatne izoforme solPOD koje su prisutne isključivo u uzorcima gala (kod G2 i G3) (slika 42). Ove nove izoforme sugerišu funkcionalnu specijalizaciju (Passardi i sar., 2004; Cosio i Dunand, 2009) i specifičan signalni put kojim insekt manipuliše biljkom. Iako su poznate po očvršćavanju zida, peroksidaze u galama mogu imati suprotnu funkciju. Kroz hidroksilni ciklus, one mogu generisati hidroksilne radikale ( $\cdot\text{OH}$ ) koji raskidaju veze između polisaharida, dovodeći do labavljenja ćelijskog zida (eng. *cell wall loosening*) (Schweikert i sar., 2000; Passardi i sar., 2005; Kukavica i sar., 2009). Prisustvo specifičnih izoformi u ranoj fazi rasta gale (G2-G3) može biti povezano sa potrebom za brzim širenjem galoznog tkiva (Francoz i sar., 2015). U galama starosti 48 h izmerena je visoka koncentracija hidroksicimetnih kiselina (ferulinske i *p*-kumarinske), koje su supstrati za POD (Veljović Jovanović i sar., 2018). Niske koncentracije lignina u galama (4GS), uprkos visokoj aktivnosti POD, ukazuju na to da se enzimi ovde više koriste za unakrsno povezivanje ferulata ili proteina (ekstenzina) a manje za samu lignifikaciju, čime se održava određena fleksibilnost tkiva neophodna za rastenje gale (Almagro i sar., 2009; Veljović Jovanović i sar., 2018). Rezultati Morina i sar. (2025), vezani za gale na listu lipe, pokazuju da je ekspresija gena za POD i MnSOD bila povećana u poređenju sa zdravim listovima, kako bi ovi enzimi podržali razvoj strukture gale (očvršnjavanjem zida gale) i učestvovali u regulaciji ROS-homeostaze u apoplastu. Istraživanje Takeda i sar. (2019) daje uvid u ekspresiju određenih gena koji direktno kontrolišu procese formiranja ovih struktura. Među njima se ističe *AtPrx25* (Shigeto i sar., 2014), gen koji kodira peroksidazu uključenu u biosintezu lignina. On je identifikovan kao jedan od 38 zajedničkih regulatora razvića gala kod različitih biljnih vrsta (Takeda i sar., 2019). Sličnu ulogu ima i *RHD2* (Foreman i sar., 2003), gen za NADPH oksidazu koja direktno utiče na produkciju ROS-a, čija je povećana ekspresija u svim analiziranim tipovima gala pokazatelj da je ROS neophodan za modifikaciju ćelijskog zida i signalizaciju tokom morfogeneze (Takeda i sar., 2008). Pored njih, *AtMYB77*, transkripcioni faktor povezan sa metabolizmom ROS-a putem direktne transkripcione kontrole gena *OMG1*, dodatno potvrđuje da aktivna produkcija ROS-a doprinosi lignifikaciji unutar gale (Sng i sar., 2019). Ovi procesi, iako tipično predstavljaju odbrambeni odgovor biljke na biotički stres, u slučaju gala bivaju preuzeti od strane induktora gale (Takeda i sar., 2008). Ovo istraživanje ukazuje i na pojačanu ekspresiju gena povezanih sa imunitetom i odbranom, poput *DLO2*, koji potiskuje imunitet biljke i time olakšava insektima manipulaciju tkivom (Zeilmaker i sar., 2015), kao i *WRKY48* i *WRKY23*, koji moduliraju odbrambene odgovore biljke-domaćina (Xing i sar., 2008). Njihova aktivacija u galama može predstavljati strategiju insekta da oslabi otpornost biljke na infestaciju. Uz peroksidaze, značajnu adaptivnu ulogu imaju i MnSOD izoforme, koje dodatno stabilizuju antioksidativni odgovor biljke.

Rezultati Western blot analize *L. vulgaris* pokazali su prisustvo više izoformi MnSOD u stablu *L. vulgaris* (slika 46). Višestruke izoforme MnSOD-a se javljaju u rasponu od približno 22 do 98 kDa u biljnim tkivima (Alscher i sar., 2002). Ove izoforme se često pojavljuju kao oligomerni oblici, poput dimera i tetramera, koji povećavaju stabilnost enzima i katalitičku efikasnost u uslovima oksidativnog stresa (Bonetta Valentino, 2022). Njihova povećana zastupljenost u galama u poređenju sa kontrolnim uzorcima ukazuje na specifične adaptacije na oksidativni stres izazvan ovipozicijama. MnSOD primarno vrši dismutaciju superoksida u  $\text{H}_2\text{O}_2$ , koji služi kao supstrat za peroksidaze u daljim antioksidativnim putevima. U literaturi je pokazano da se MnSOD i peroksidaze nalaze udruženo u ćelijskom zidu gde MnSOD obezbeđuje  $\text{H}_2\text{O}_2$  (dismutacijom superoksida) neophodan za rad POD (Almagro i sar., 2009; Kukavica i sar.,

2009; Batool i sar., 2022). Istraživanja pokazuju da se geni za MnSOD i GLPs (*Germin-like proteins*) često istovremeno aktiviraju kao odgovor na biotičke stresne faktore. Kod gala koje izazivaju grinje na listu *Tilia cordata* zabeležena je paralelna povećana ekspresija gena koji regulišu sintezu Mn-enzima *germin-like* proteina (GLPs) i MnSOD (Morina i sar., 2025). Ovakva koordinacija ukazuje da biljka mobilizuje oba sistema kako bi neutralisala oksidativne izazove i osigurala efikasnu odbranu od stresa. Glavna funkcionalna veza je to što mnogi GLPs poseduju SOD-aktivnost i koriste mangan kao kofaktor (Govindan i sar., 2024). Dok je MnSOD primarno lociran u mitohondrijama, GLPs sa SOD aktivnošću su često lokalizovani u apoplastu (ćelijskom zidu) ili vakuolama, pružajući tako komplementarnu zaštitu od superoksidnih radikala u različitim delovima ćelije (Liao i sar., 2021). Prekomerna ekspresija GLPs-a povećava akumulaciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koji dalje ima ulogu za učvršćavanje ćelijskog zida, a deluje i kao signalni molekul koji aktivira odbrambene gene i metaboličke puteve povezanih sa jasmonskom kiselinom (Govindan i sar., 2024).

Zaključno, antioksidativni metabolizam tokom galogeneze u sistemu *L. vulgaris* – *R. pilosa* nadilazi klasičnu odbrambenu ulogu i postaje ključni alat za razvojno reprogramiranje tkiva domaćina. Kroz supresiju aktivnosti APX enzima i pomeranje redoks ravnoteže askorbata i glutationa ka oksidovanim oblicima, omogućava se lokalna akumulacija ROS-a koji služe kao neophodni signalni molekuli za promenu sudbine ćelija i inicijaciju morfogeneze. Centralno mesto u ovom procesu zauzimaju peroksidaze, čija se uloga dinamički menja: od modifikacija ćelijskog zida koje omogućava brzu ekspanziju galoznog tkiva u ranim fazama razvića gale, do kasnije lignifikacije spoljašnjih slojeva gale radi mehaničke zaštite larve. Ovakva precizna modulacija antioksidativnog kapaciteta potvrđuje da insekt uspešno preotima redoks mašineriju biljke-domaćina, pretvarajući stresni odgovor u koordinisan razvojni program za formiranje specijalizovanog metaboličkog čvorišta.

### 5.3. Interakcija biljke i insekta u model sistemu *Linaria vulgaris* – *Rhinusa pilosa*, biotički stres, koevolucija ili oblik simbioze?

Biljke su tokom dugog evolutivnog perioda koevoluirale sa velikim brojem različitih insekata biljojeda i patogenih mikroorganizama u uslovima dnevnih i sezonskih varijacija abiotičkih uslova životne sredine. Samim tim, biljne ćelije pokazuju visok kapacitet da odgovore na različite stresne uslove oslanjajući se na fleksibilnu i pažljivo usklađenu mrežu regulatornih menahizama. Ova mreža obuhvata redoks signalne puteve, signalne puteve povezane sa ugljenim hidratima, hormonima stresa i regulatorima rastenja (Wu i Baldwin, 2009, 2010; Zhu i sar., 2011; Zhou i sar., 2015; Harris i Pitzschke, 2020; Korgaonkar i sar., 2021; Jones i sar., 2022; Wang i sar., 2023; Prajapati i sar., 2024; de Oliveira i dos Santos Isaias, 2025; Staszak i sar., 2026). U konkurentnom okruženju, odlučujući faktor koji leži u osnovi otpornosti i opstanka je sposobnost biljaka da prepoznaju, integrišu i reaguju na biotičke i abiotičke varijable životne sredine stalnim prilagođavanjem svoje fiziologije i metabolizma radi optimizacije rastenja i reprodukcije u okruženju koje se stalno menja (Pastori i Foyer, 2002).

Gala se definiše i kao „*ispoljavanje reprogramiranja ćelijskog rastenja i razvića biljke – štetnog, korisnog ili neutralnog za biljku – koje počinje na mestu kolonizacije određenog stranog organizma, koji dobija specijalizovane usluge od biljke i nastavlja da stupa u interakciju sa de novo biljnim tkivom ili organom kako se dalje odvija njegovo razviće*“ (Harris i Pitzschke, 2020). Insekti su glavni induktori nastanka gala (Espírito-Santo i Fernandes, 2007), a one se mogu formirati na listu, stablu, cvetnim pupoljcima, cvetu, plodu ili na korenu (Harris i Pitzschke, 2020). Smatra se da galikolni insekti luče određene efektorske molekule i preuzimaju razvojne programe

domaćina kako bi se formirale jedinstvene strukture gala (Reymond, 2013; Hilker i Fatouros, 2015; Giron i sar., 2016; Erb i Reymond, 2019; Vega-Muñoz i sar., 2020). Međutim, molekularni mehanizmi indukcije i razvoja biljnih gala od strane insekata ostaju uglavnom nerazjašnjeni i veliki istraživački izazov (Takeda i sar., 2021; Desnitskiy i sar., 2023; Mishra i sar., 2024).

Odnos između *L. vulgaris* i *R. pilosa* prevazilazi okvire klasičnog modela biotičkog stresa. Iako formiranje gala predstavlja specifičan vid parazitizma, ono se može posmatrati i kao rezultat visoko specijalizovana koevolucija u kojoj insekt preuzima razvojne puteve domaćina. Postojeće hipoteze sugerišu da je ova interakcija toliko složena da može uključivati horizontalni transfer gena sa insekta na biljku ili čak genetsku transformaciju biljke posredovanu endosimbiotičkim bakterijama iz insekta (Jankiewicz i sar., 2017; Gätjens-Boniche, 2019). Međutim, drugim istraživanjima pokazano je da gala prestaje da se razvija i da se degeneriše ako larva u njoj ugine, što sugeriše da je za razviće gale potreban neprekidan protok signala (kontinuirani molekularni dijalog) između larve i biljke-domaćina (Jankiewicz i sar., 2021). Iako u okviru ove disertacije nisu rađene genske analize, dobijeni rezultati otkrivaju važnu biohemijsku vezu koja potvrđuje postojanje ovog dijaloga i razotkriva mehanizme kojima žižak *R. pilosa* preuzima kontrolu nad razvićem *L. vulgaris*. Cecidogen ovde deluje kao inicijalni skup signala: identifikovana fenolna jedinjenja iz ovipozicione tečnosti (protokatehuinska kiselina, diosmetin-*O*-acetylrutinoside i jedinstveni glikozid), koja su inače odsutna u biljnom tkivu, predstavljaju specifičan stimulus za prevođenje diferenciranog tkiva u meristematsko stanje. Dobijeni rezultati pružaju biohemijske dokaze o „otmici“ metabolizma biljke, u skladu sa konceptom koji su opisali Giron i sar. (2016). Pokazano je da insekt efektorskim molekulima pokreće reprogramiranje ćelija, pri čemu dramatičan porast trehaloze i T6P usmerava redistribuciju resursa i stimulaciju deobe, dok fenoli iz cecidogena, inhibicijom IAA-oksidade, održavaju visoku koncentraciju auksina potrebnu za hipertrofiju tkiva gale (Iturriaga i sar., 2009; Bedetti i sar., 2014; Han i sar., 2024).

Tokom formiranja gale na mladim stablima *L. vulgaris*, *R. pilosa* uspostavlja tkivno-specifičnu interakciju sa svojom biljkom-domaćinom, gde određeni stimuli iniciraju proliferaciju novog biljnog tkiva i nastanak globularne strukture u apikalnom meristemu stabla. Ranija histološka istraživanja ove galikolne interakcije (Barnewall i sar., 2012) potvrdila su da ovipoziciona tečnost, kao i precizan položaj jajeta unutar tkiva stabla, imaju presudan uticaj na indukciju i razviće gale. Uspešno formiranje gale prati *de novo* produkcija ksilema, formiranje interćelijskih prostora u korteksu, kao i hiperplazija prokambijuma i parenhima srži u delu koji okružuje položeno jaje insekta (Barnewall i sar., 2012). Ženka *R. pilosa* polaže jaja direktno u apikalni meristem mladog stabla, gde je tkivo najaktivnije i najpodložnije promenama, i na taj način insekt pokreće specifično reprogramiranje genoma domaćina. Istraživanja su pokazala da se u galama povećava ekspresija gena koji su inače zaduženi za razvoj cvetnih organa (Yamaguchi i sar., 2016; Schultz i sar., 2019), a insekt tako koristi prirodne mehanizme biljke namenjene akumulaciji hranljivih materija za reprodukciju, usled čega biljka-domaćin gubi sposobnost razvoja funkcionalnih cvetova i produkcije semena (Breia i sar., 2021). Iako formiranje gale zahteva veliku energiju, *R. pilosa* osigurava preživljavanje biljke kako bi larva imala svež izvor hrane tokom celog ciklusa razvića unutar gale (55–65 dana). Gala postaje metabolički uviri koji povlače fotoasimilate i azot iz okolnih listova (Wingler i Roitsch, 2008). Dok se biljka bori da održi homeostazu, resursi se preusmeravaju sa primarnog rasta i reprodukcije na razviće gale (Castro i sar., 2012). Biljka-domaćin ipak ostaje zelena i funkcionalna jer joj je to jedini način da obezbedi energiju koju gala i larve eksploatišu, ali zbog tog velikog troška, biljka više nema kapacitet za ulazak u reproduktivnu fazu (Tauzin i Giardina, 2014; Breia i sar., 2021).

Sa stanovišta biljke, tolerisanje gale može biti strategija lokalizacije štete, dok u nekim sistemima biljka čak može profitirati od metabolita dobijenih od insekta, što ukazuje na prelaz

ka simbiotskom odnosu. Intrigantna priroda odnosa, kao i mehanizmi interakcija galikolnih insekata, biljke-domaćina i samih gala, predmet su višedecenijskih istraživanja (Stone i Schönrogge, 2003; Raman, 2011, 2021; Giron i sar., 2016; Harris i Pitzschke, 2020; Mishra i sar., 2024). Sa gledišta biljke-domaćina, one mogu tolerisati stvaranje gale kako bi lokalizovale parazitske galikolne insekte na ograničeni prostor, što im omogućava redukciju širenja štete. Takođe, biljke mogu apsorbovati i koristiti izlučevine galikolnih insekata (Kutsukake i sar., 2012). U slučaju interakcije biljne vaši *Schlechtendalia chinensis* i biljke *Rhus chinensis*, gala i lisne vaši unutar gale predstavljaju vrstu metaboličkog čvorišta i razmene hranljivih materija, što koristi ne samo vašima već i biljci-domaćinu (Takeda i sar., 2021). Shodno tome, biljke-domaćini obezbeđuju i sklonište i hranljive materije, a zauzvrat, metaboliti dobijeni od insekata koriste i domaćinu (Chen i sar., 2020). Nastanak galoznog tkiva kod nekih biljaka utiče na povećanje fotosinteze i provodljivost stoma (Fay i sar., 1996; Larson, 1998; Dorchin i sar., 2006; Takeda i sar., 2021). Žižak *Smicronik madaranus* formira sferične gale na izdancima parazitske biljke *Cuscuta campestris* koja ima nizak sadržaj hlorofila i manju fotosintetsku aktivnost jer zavisi od biljke-domaćina kao izvora hranljivih jedinjenja. Međutim, gale na *C. campestris* izazvane *S. mandaranes* imaju značajno uvećan sadržaj hlorofila i fotosintetsku aktivnost, što sugerise da ovaj galikolni žižak pojačava fotosintetsku aktivnost kako bi modifikovao razvojne programe biljke ka proizvodnji hranljivih materija za svoje potrebe (Murakami i sar., 2021). Istraživanja pokazuju da moljci *Caloptilia cecidophora* i *Borboryctis euryae* ne mogu da završe larvenu fazu svog razvića bez ishrane galoznim tkivom, što ukazuje da su tokom evolucije ovi galikolni insekti izgubili sposobnost preživljavanja hraneći se samo normalnim lisnim tkivom, i da neki hranljivi sastojci dobijeni iz galoznog tkiva ne predstavljaju suplemente već su presudni za njihov opstanak. Korgaonkar i sar. (2021) uočili su zanimljivu pojavu da se gale izazvane lisnim vašima *Hormaphis cornu* javljaju u dve boje, kao crvene i zelene gale u obliku roga na listu *Hamamelis virginiana*. Pokazali su da ove razlike potiču od jednog od *bicycle* gena (*dgc* gena, eng. *determinant of gall color*) koji su uključeni u sintezu antocijanina u galoznom tkivu. Oni smatraju da lisne vaši ubrizgavaju DGC protein u gale i da to rezultira diferencijalnom ekspresijom nekoliko biljnih gena. *Dgc* je član velike porodice *bicycle* gena koji se specifično ekspimiraju u pljuvačnim žlezdama galikolnih lisnih vaši, gde varijacije ovih gena menjaju ekspresiju biljnih gena i fenotip gale.

Interakcija između *L. vulgaris* i galikolnog žiška *R. pilosa* predstavlja specifičan model koji pojašnjava adaptivni značaj galogeneze. Tri fundamentalne hipoteze (o ishrani, zaštiti i mikrookruženju) ovde se argumentuju kombinacijom biohemijskih, strukturnih i fizioloških rezultata. Nalazi ukazuju na adaptivni značaj hipoteze o ishrani, pokazujući da larva, putem biohemijske manipulacije biljke posredovane insektom, transformiše biljno tkivo u metabolički uvir, obogaćen trehalozom, signalnim molekulom T6P i slobodnim aminokiselinama, naročito glutaminom. Na ovaj način, gala funkcioniše kao struktura nalik plodu koja akumulira resurse neophodne za optimalno razviće larve. Hipoteza o zaštiti oslanja se na lignifikaciju spoljašnjih slojeva tkiva gale, podstaknutu aktivnošću peroksidaza, čime se formira mehanička barijera protiv predatora i patogena. Treća hipoteza, o mikrookruženju, sugerise da gala štiti larvu od abiotičkog stresa, kao što su promene temperature i isušivanje. Rezultati pokazuju da spoljašnji zeleni slojevi gale zadržavaju minimalnu ali funkcionalnu fotosintetsku aktivnost, čime se obezbeđuje neophodna produkcija kiseonika i sprečava hipoksija unutar zatvorene globularne strukture. Istovremeno, visoka koncentracija trehaloze i prolina u galoznom tkivu može funkcionisati kao mehanizam za održavanje integriteta membrana i zaštita od osmotskog stresa. Dinamičko reprogramiranje primarnog i sekundarnog metabolizma potvrđuje da se radi o tkivno-specifičnoj interakciji, u kojoj balans između odbrambenog odgovora domaćina i manipulacije insekta određuje konačni ishod ovog biotskog procesa.

Bez obzira na predstavljene nalaze, određena pitanja zahtevaju dalja istraživanja. Pitanje indukcije ostaje i dalje nerazrešeno; molekularni signali koji određuju *species*-specifičnost ovog odnosa ostaju neidentifikovani. Takođe, dinamika kontinuiranog molekularnog dijaloga između larve i biljke-domaćina, od inicijalnog cecidogena do višenedeljne interakcije larve sabiljnim tkivom, zahteva detaljniju analizu.

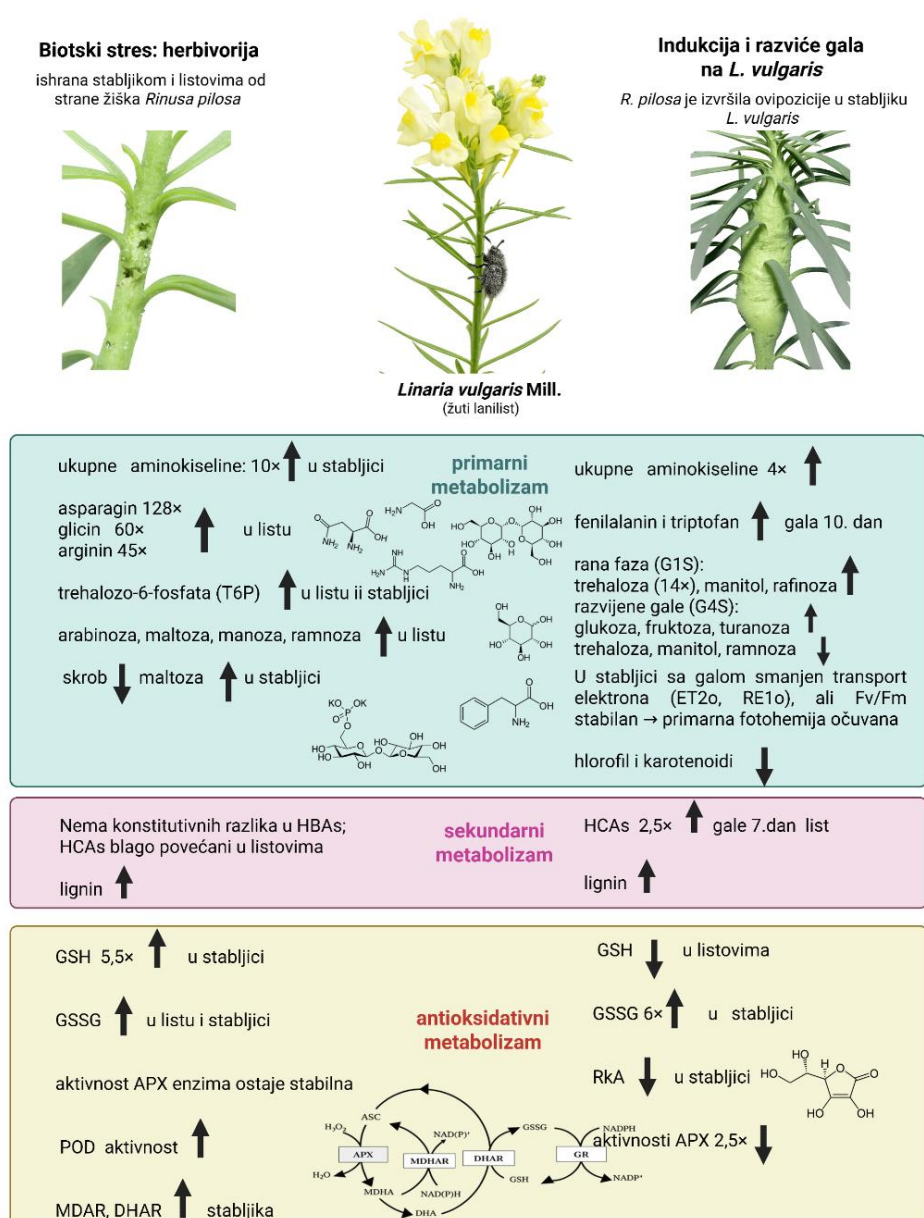
## 6. Zaključci

Ova disertacija pruža pregled fizioloških i biohemijskih mehanizama kojima *Linaria vulgaris* reaguje na dva različita tipa biotičkog stresa: herbivoriju i indukciju gala od strane žiška *Rhinusa pilosa*. Integracijom morfoloških, metaboličkih i enzimskih analiza, po prvi put je detaljno prikazano na koji način insekt preusmerava razvojne puteve biljke i transformiše njeno tkivo u specijalizovani nutritivni organ (galu). Dobijeni rezultati otkrivaju složenu mrežu metaboličkih adaptacija koje obuhvataju primarni, sekundarni i antioksidativni metabolizam, potvrđujući dinamičnu prirodu interakcije između biljke-domaćina i galikolnog insekta (slika 47).

I pored višedecenijskih istraživanja, proces kojim insekti menjaju metabolizam biljaka ostao je nedovoljno razjašnjen, a precizni stimulusi koji pokreću formiranje gala nisu bili u potpunosti definisani. U slučaju sistema *Linaria vulgaris* – *Rhinusa pilosa*, ova disertacija donosi nekoliko fundamentalnih novina:

- Po prvi put je opisan sastav ovipozicione tečnosti (cecidogena) insekta *R. pilosa*. Utvrđeno je da sadrži specifična fenolna jedinjenja koja nisu detektovana u intaktnom biljnom tkivu i deluju kao ključni signali za inicijaciju gale, a mogu se smatrati kandidatima za pokretanje galoznog razvoja.
- Herbivorija izaziva sistemski odgovor koji uključuje akumulaciju signalnog molekula trehalozo-6-fosfata (T6P). Glavna promena je razgradnja skroba i akumulacija maltoze u stablu, što ukazuje na to da je skrob primarni konzumirajući ugljeni hidrat.
- Gala postaje snažan metabolički uvir koji aktivno povlači resurse iz ostatka biljke. Akumulacija heksoza (glukoze i fruktoze) potencijalno je rezultat povećane aktivnosti invertaza koje hidrolizuju saharozu radi ishrane larve, dok skrob izostaje jer se energija ubrzano troši na rastenje.
- Rana faza formiranja gale karakteriše se dramatičnim porastom trehaloze i značajnom akumulacijom T6P u stablu.
- Razviće gale prati pad hlorofila, karotenoida i efikasnosti transporta elektrona (parametri ET2o i RE1o), čime se aktivnost fotosinteze u samoj gali smanjuje kako bi se resursi usmerili na rast gale a tkivo gale postaje heterotrofno i potpuno zavisno od okolnih listova.
- Herbivorija izaziva značajno uvećanje ukupnih aminokiselina u stablu, uz ekstremni skok asparagina (128 puta), glicina i glutamina. Ovo služi za brzu remobilizaciju azota i sistemski odbrambeni odgovor.
- Gala predstavlja nutritivni rezervoar sa povećanim sadržajem aminokiselina do 4 puta, ali sa specifičnim „drugim talasom“ akumulacije specifičnih aminokiselina (fenilalanin, triptofan, valin) tek nakon 10 dana razvića, što predstavlja pripremu nutritivnih rezervi za larvu koja završava razviće. Glutamin ostaje dominantna aminokiselina (40-45% ukupnog sadržaja) u svim fazama razvoja gale.
- Za razliku od herbivorije koja podstiče lignifikaciju (očvršćavanje) tkiva radi odbrane, u galama je uočen pad aktivnosti APX enzima (40%). Ovo omogućava lokalnu akumulaciju reaktivnih vrsta kiseonika koji deluju kao signalni molekuli za „labavljenje“ ćelijskog zida, omogućavajući brzu hipertrofiju gale.
- Tokom galogeneze se pojavljuju nove izoforme enzima. Detektovane su specifične izoforme peroksidaza (solPOD) koje su prisutne isključivo u tkivu gale, što potvrđuje postojanje visoko specijalizovanog signalnog puta kojim insekt manipuliše biljkom.

- Herbivorija indukuje Cu/ZnSOD izoforme, dok razviće gale prati drastičan porast oksidovanog glutationa (GSSG), koji je u formiranim galama bio 6 puta veći nego u kontroli.
- Herbivorija stimuliše sintezu fenola i povećanje koncentracije lignina u stablu, čime se ćelijski zid ojačava kao fizička barijera protiv insekta.
- U ranim fazama razvića gale, peroksidaze imaju suprotnu ulogu- generišu hidroksilne radikale koji „labave“ ćelijski zid radi brze hipertrofije. U tkivu razvijene gale zabeležen je značajno manji sadržaj ukupnih fenola i flavonoida, jer se resursi preusmeravaju na ishranu larvi.
- Rezultati podržavaju adaptivne hipoteze o nutrijentima (akumulacija ugljenih hidrata i aminokiselina), zaštiti (lignifikacija spoljašnjih slojeva gale kao barijera) i mikrookruženju (održavanje homeostaze gasova i zaštita od isušivanja unutar gale).
- Interakcija *Linaria vulgaris* i *Rhinusa pilosa* nije statična, već zahteva neprekidan protok signala između larve i biljke-domaćina. Ako larva uginu, razviće gale prestaje, što ukazuje na to da insekt mora stalno da suzbija odbrambene odgovore biljke i održava fiziološku kontrolu.

Slika 47. Metabolizam *L. vulgaris* pod biotskim stresom, herbivorija naspram formiranja gale.

## 7. Literatura

- Abarca, D., Martín, M., & Sabater, B. (2001). Differential leaf stress responses in young and senescent plants. *Physiologia Plantarum*, *113*(3), 409-415.
- Abbas, S., Javed, M. T., Ali, Q., Azeem, M., & Ali, S. (2021). Nutrient deficiency stress and relation with plant growth and development. In *Engineering Tolerance in Crop Plants Against Abiotic Stress* (pp. 239-262). CRC Press.
- Agati, G., & Tattini, M. (2010). Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *The New Phytologist*, *186*(4), 786-793.
- Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., & Tattini, M. (2013). Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry*, *72*, 35-45.
- Aggarwal, R., Subramanyam, S., Zhao, C., Chen, M. S., Harris, M. O., & Stuart, J. J. (2014). Avirulence effector discovery in a plant galling and plant parasitic arthropod, the Hessian fly (*Mayetiola destructor*). *PLoS One*, *9*(6), e100958.
- Ahmad, P., Jaleel, C. A., Salem, M. A., Nabi, G., & Sharma, S. (2010). Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology*, *30*(3), 161-175.
- Akšić, M. F., Tosti, T., Sredojević, M., Milivojević, J., Meland, M., & Natić, M. (2019). Comparison of sugar profile between leaves and fruits of blueberry and strawberry cultivars grown in organic and integrated production system. *Plants*, *8*(7), 205.
- Aldea, M., Hamilton, J. G., Resti, J. P., Zangerl, A. R., Berenbaum, M. R., & DeLUCIA, E. H. (2005). Indirect effects of insect herbivory on leaf gas exchange in soybean. *Plant, Cell & Environment*, *28*(3), 402-411.
- Aldea, M., Hamilton, J. G., Resti, J. P., Zangerl, A. R., Berenbaum, M. R., Frank, T. D., & DeLucia, E. H. (2006). Comparison of photosynthetic damage from arthropod herbivory and pathogen infection in understory hardwood saplings. *Oecologia*, *149*(2), 221-232.
- Aldon, D., Mbengue, M., Mazars, C., & Galaud, J. P. (2018). Calcium signalling in plant biotic interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(3), 665.
- Aliu, E., Ji, Q., Wlazlo, A., Grosic, S., Azanu, M. K., Wang, K., & Lee, K. (2024). Enhancing *Agrobacterium*-mediated plant transformation efficiency through improved ternary vector systems and auxotrophic strains. *Frontiers in Plant Science*, *15*, 1429353.
- Allison, S. D., & Schultz, J. C. (2004). Differential activity of peroxidase isozymes in response to wounding, gypsy moth, and plant hormones in northern red oak (*Quercus rubra* L.). *Journal of Chemical Ecology*, *30*(7), 1363-1379.
- Almagro, L., Gómez Ros, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A., & Pedreño, M. A. (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, *60*(2), 377-390.
- Alscher, R. G., Erturk, N., & Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, *53*(372), 1331-1341.
- Andreas, P., Kisiala, A., Emery, R. J., Clerck-Floate, D., Tooker, J. F., Price, P. W., ... & Connor, E. F. (2020). Cytokinins are abundant and widespread among insect species. *Plants*, *9*(2), 208.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signaling transduction. *Annual Review of Plant Biology*, *55*, 373.
- Appel, H. M., Fescemyer, H., Ehrling, J., Weston, D., Rehrig, E., Joshi, T., ... & Schultz, J. (2014). Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* to chewing and sucking insect herbivores. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 565.

- Aquilano, K., Baldelli, S., & Ciriolo, M. R. (2014). Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in Pharmacology*, 196.
- Arora, A., Sairam, R. K., & Srivastava, G. C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 82 (10), 1227-1238.
- Asada, K., Kiso, K., & Yoshikawa, K. (1974). Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination. *Journal of Biological Chemistry*, 249(7), 2175-2181.
- Asada, K., & Takahashi, M. (1987). Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In D. J. Kyle, C. B. Osmond, & C. J. Arntzen (Eds.), *Photoinhibition* (Topics in Photosynthesis, Vol. 9, pp. 227-287). Amsterdam: Elsevier.
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Biology*, 50(1), 601-639.
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141(2), 391-396.
- Baena-González, E. (2010). Energy signaling in the regulation of gene expression during stress. *Molecular Plant*, 3(2), 300-313.
- Baena-González, E., & Lunn, J. E. (2020). SnRK1 and trehalose 6-phosphate—two ancient pathways converge to regulate plant metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 55, 52-59.
- Balakrishnan, D., Bateman, N., & Kariyat, R. R. (2024). Rice physical defenses and their role against insect herbivores. *Planta*, 259(5), 110.
- Bolouri-Moghaddam, M. R., Le Roy, K., Xiang, L., Rolland, F., & Van den Ende, W. (2010). Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *The FEBS journal*, 277(9), 2022-2037.
- Bansal, R., Hulbert, S. H., Reese, J. C., Whitworth, R. J., Stuart, J. J., & Chen, M. S. (2014). Pyrosequencing reveals the predominance of *Pseudomonadaceae* in gut microbiome of a gall midge. *Pathogens*, 3(2), 459-472.
- Barragán-Fonseca, K. B., Ortiz, J. E., García-Arteaga, J. D., & Giron, D. (2025). The role of insects in agri-food sustainability: Taking advantage of ecosystem services to achieve integrated insect management. *Insects*, 16(8), 866.
- Barbehenn, R. V., Bumgarner, S. L., Roosen, E. F., & Martin, M. M. (2001). Antioxidant defenses in caterpillars: role of the ascorbate-recycling system in the midgut lumen. *Journal of Insect Physiology*, 47(4-5), 349-357.
- Barnewall, E.C. (2011). Plant-insect interactions between yellow toadflax, *Linaria vulgaris*, and a potential biocontrol agent, the gall-forming weevil, *Rhinusa pilosa*. M.Sc. Thesis, Department of Biological Sciences, University of Lethbridge, Lethbridge, 168 pp.
- Barnewall, E. C., Clerck-Floate, D., & Rosemarie, A. (2012). A preliminary histological investigation of gall induction in an unconventional galling system. *Arthropod-Plant Interactions*, 6(3), 449-459.
- Basu, S., Varsani, S., & Louis, J. (2018). Altering plant defenses: herbivore-associated molecular patterns and effector arsenal of chewing herbivores. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(1), 13-21.
- Batista-Silva, W., Heinemann, B., Rugen, N., Nunes-Nesi, A., Araújo, W. L., Braun, H. P., & Hildebrandt, T. M. (2019). The role of amino acid metabolism during abiotic stress release. *Plant, Cell & Environment*, 42(5), 1630-1644.
- Batool, R., Umer, M. J., Hussain, B., Anees, M., & Wang, Z. (2022). Molecular mechanisms of superoxide dismutase (SODs)-mediated defense in controlling oxidative stress in plants. In *Antioxidant Defense in Plants: Molecular Basis of Regulation* (pp. 157-179). Singapore: Springer Nature Singapore.

- Bedetti, C. S., Modolo, L. V., & dos Santos Isaias, R. M. (2014). The role of phenolics in the control of auxin in galls of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) MacBr (Fabaceae: Mimosoideae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 55, 53-59.
- Bellani, L. M., Guarnieri, M., & Scialabba, A. (2002). Differences in the activity and distribution of peroxidases from three different portions of germinating *Brassica oleracea* seeds. *Physiologia Plantarum*, 114(1), 102-108.
- Bilgin, D. D., Zavala, J. A., Zhu, J. I. N., Clough, S. J., Ort, D. R., & DeLUCIA, E. H. (2010). Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant, Cell & Environment*, 33(10), 1597-1613.
- Binder, S. (2010). Branched-chain amino acid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 8.
- Bittner, N., Trauer-Kizilelma, U., & Hilker, M. (2017). Early plant defence against insect attack: involvement of reactive oxygen species in plant responses to insect egg deposition. *Planta*, 245(5), 993-1007.
- Blanche, K. R. (2000). Diversity of insect-induced galls along a temperature–rainfall gradient in the tropical savannah region of the Northern Territory, Australia. *Austral Ecology*, 25(4), 311-318.
- Bläsing, O. E., Gibon, Y., Günther, M., Höhne, M., Morcuende, R., Osuna, D., ... & Stitt, M. (2005). Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17(12), 3257-3281.
- Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 519- 546.
- Bolouri Moghaddam, M. R., & Van den Ende, W. (2012). Sugars and plant innate immunity. *Journal of Experimental Botany*, 63(11), 3989-3998.
- Bolouri Moghaddam, M. R., & Van den Ende, W. (2013). Sweet immunity in the plant circadian regulatory network. *Journal of experimental botany*, 64(6), 1439-1449.
- Bolton, M. D. (2009). Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. *Molecular plant-microbe Interactions*, 22(5), 487-497.
- Bonawitz, N. D., & Chapple, C. (2010). The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annual Review of Genetics*, 44, 337-363.
- Bonetta Valentino, R. (2022). The structure–function relationships and physiological roles of MnSOD mutants. *Bioscience Reports*, 42(6), BSR20220202.
- Bowler, C., Slooten, L., Vandenbranden, S., De Rycke, R., Botterman, J., Sybesma, C., ... & Inzé, D. (1991). Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *The EMBO journal*, 10(7), 1723-1732.
- Bowler, C., Montagu, M. V., & Inze, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 43(1), 83-116.
- Bown, A. W., MacGregor, K. B., & Shelp, B. J. (2006). Gamma-aminobutyrate: defense against invertebrate pests?. *Trends in Plant Science*, 11(9), 424-427.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bragança, G. P. P., Alencar, C. F., Freitas, M. S. C., & Isaias, R. M. S. (2020). Hemicelluloses and associated compounds determine gall functional traits. *Plant Biology*, 22(6), 981-991.
- Braun, D. M., Wang, L., & Ruan, Y. L. (2014). Understanding and manipulating sucrose phloem loading, unloading, metabolism, and signalling to enhance crop yield and food security. *Journal of Experimental Botany*, 65(7), 1713-1735.
- Breia, R., Conde, A., Badim, H., Fortes, A. M., Gerós, H., & Granell, A. (2021). Plant SWEETs: from sugar transport to plant–pathogen interaction and more unexpected physiological roles. *Plant Physiology*, 186(2), 836-852.

- Bronner, R. (1985). Anatomy of the ovipositor and oviposition behavior of the gall wasp *Diplolepis rosae* (Hymenoptera: Cynipidae). *The Canadian Entomologist*, 117(7), 849-858.
- Bueno, A. D. F., Bueno, R. C. O. D. F., Nabity, P. D., Higley, L. G., & Fernandes, O. A. (2009). Photosynthetic response of soybean to twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) injury. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(4), 825-834.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2), 195-203.
- CABI. 2022. Datasheet: *Linaria vulgaris* (common toadflax). Invasive Species Compendium. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/30828#toDistributionMaps>.
- Caldara, R., Desančić, M., Gassmann, A., Legarreta, L., Emerson, B. C., & Toševski, I. (2008). On the identity of *Rhinusa hispida* (Brullé) and its current synonyms (Coleoptera: Curculionidae). *Zootaxa*, 1805(1), 61-68.
- Cambier, S., Ginis, O., Moreau, S. J., Gayral, P., Hearn, J., Stone, G. N., ... & Drezen, J. M. (2019). Gall wasp transcriptomes unravel potential effectors involved in molecular dialogues with oak and rose. *Frontiers in Physiology*, 10, 926.
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 749-760.
- Caretto, S., Linsalata, V., Colella, G., Mita, G., & Lattanzio, V. (2015). Carbon fluxes between primary metabolism and phenolic pathway in plant tissues under stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26378-26394.
- Carneiro, R. G. S., Castro, A. C., & Isaias, R. M. S. (2014). Unique histochemical gradients in a photosynthesis-deficient plant gall. *South African Journal of Botany*, 92, 97-104.
- Carneiro, R. G. D. S., & Isaias, R. M. D. S. (2015). Gradients of metabolite accumulation and redifferentiation of nutritive cells associated with vascular tissues in galls induced by sucking insects. *AoB Plants*, 7, plv086.
- Carneiro, R. G., Isaias, R. M., Moreira, A. S., & Oliveira, D. C. (2017). Reacquisition of new meristematic sites determines the development of a new organ, the Cecidomyiidae gall on *Copaifera langsdorffii* Desf.(Fabaceae). *Frontiers in Plant Science*, 8, 1622.
- Castro, A. C., Oliveira, D. C., Moreira, A. S. F. P., Lemos-Filho, J. P., & Isaias, R. M. S. (2012). Source-sink relationship and photosynthesis in the horn-shaped gall and its host plant *Copaifera langsdorffii* Desf.(Fabaceae). *South African Journal of Botany*, 83, 121-126.
- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F., & Margis-Pinheiro, M. (2012). Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 1011-1019.
- Chen, M., Sommer, A. J., & McClure, J. W. (2000). Fourier transform-IR determination of protein contamination in thioglycolic acid lignin from radish seedlings, and improved methods for extractive-free cell wall preparation. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 11(3), 153-159.
- Chen, M. S., Fellers, J. P., Stuart, J. J., Reese, J. C., & Liu, X. (2004). A group of related cDNAs encoding secreted proteins from Hessian fly [*Mayetiola destructor* (Say)] salivary glands. *Insect Molecular Biology*, 13(1), 101-108.
- Chen, M. S. (2008). Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Science*, 15(2), 101-114.
- Chen, L. Q., Hou, B. H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X. Q., ... & Frommer, W. B. (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, 468(7323), 527-532.

- Chen, G., Liu, Y., Wang, R., Zhang, J., & Owens, G. (2013). Cadmium adsorption by willow root: the role of cell walls and their subfractions. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(8), 5665-5672.
- Chen, H., Liu, J., Cui, K., Lu, Q., Wang, C., Wu, H., ... & Chen, X. (2018). Molecular mechanisms of tannin accumulation in Rhus galls and genes involved in plant-insect interactions. *Scientific Reports*, 8(1), 9841.
- Chen, X., Yang, Z., Chen, H., Qi, Q., Liu, J., Wang, C., ... & Chen, M. S. (2020). A complex nutrient exchange between a gall-forming aphid and its plant host. *Frontiers in Plant Science*, 11, 811.
- Chew, O., Whelan, J., & Millar, A. H. (2003). Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46869-46877.
- Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., & Martens, S. (2013). Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant physiology and biochemistry*, 72, 1-20.
- Cho, Y. H., Yoo, S. D., & Sheen, J. (2006). Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell*, 127(3), 579-589.
- Ciereszko, I. (2018). Regulatory roles of sugars in plant growth and development. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 87(2).
- Cocuron, J. C., Casas, M. I., Yang, F., Grotewold, E., & Alonso, A. P. (2019). Beyond the wall: High-throughput quantification of plant soluble and cell-wall bound phenolics by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1589, 93-104.
- Cook, L. G., & Gullan, P. J. (2004). The gall-inducing habit has evolved multiple times among the eriococcid scale insects (Sternorrhyncha: Coccoidea: Eriococcidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 83(4), 441-452.
- Cook, L.G. & Gullan, P.J. (2008). Insect, not plant, determines gall morphology in the *Apiomorpha pharetrata* species-group (Hemiptera: Coccoidea). *Australian Journal of Entomology*, 47, 51-57.
- Cooper, J. E. (2007). Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1355-1365.
- Cornell, H. V. (1983). The secondary chemistry and complex morphology of galls formed by the Cynipinae (Hymenoptera): why and how? *American Midland Naturalist*, 225-234.
- Coruzzi, G. M. (2003). Primary N-assimilation into amino acids in *Arabidopsis*. The *Arabidopsis Book*/American Society of Plant Biologists, 2, e0010.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Van Poel, B., ... & Berghe, D. V. (1998). Structure- activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, 61(1), 71-76.
- Cosio, C., & Dunand, C. (2009). Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 391-408.
- Cosgrove, D. J. (2024). Structure and growth of plant cell walls. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 25(5), 340-358.
- Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., & El Amrani, A. (2006). Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57(3), 449-459.
- Czarnocka, W., & Karpiński, S. (2018). Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 4-20.

- Czerniawski, P., & Bednarek, P. (2018). Glutathione S-transferases in the biosynthesis of sulfur-containing secondary metabolites in Brassicaceae plants. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1639.
- Dar, S. A., Hasan, W., Devi, Y. K., Tlak Gajger, I., & John, J. (2024). Enzyme-mediated adaptation of herbivorous insects to host phytochemicals. *Phytochemistry Reviews*, 23(5), 1-24.
- Darwin, C. (1868). The variation of animals and plants under domestication (Vol. 2).
- Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 53.
- Davies, K. M., Jibrán, R., Zhou, Y., Albert, N. W., Brummell, D. A., Jordan, B. R., ... & Schwinn, K. E. (2020). The evolution of flavonoid biosynthesis: a bryophyte perspective. *Frontiers in Plant Science*, 11, 7.
- De Clerck-Floate, R., A. Gassmann, S. Sing, and I. Toševski. 2012. Petition for field release of *Rhinusa pilosa* (Gyllenhal, 1838) (Coleoptera: Curculionidae) against yellow toadflax (*Linaria vulgaris* Mill.: Plantaginaceae) in Canada and the U.S.A. TAG Petition submitted to USDA-APHIS. 89 pp.
- De Clerck-Floate, R. (2019). Weevils from Serbia show promise in yellow toadflax biological control in Canada. Agriculture and Agri-Food Canada, Lethbridge, Alberta, Canada. Catalogue No. A22-631/2019E-PDF, ISBN No.978-0-660-32854-6, AAFC No. 12990E. 4 pp.
- de Oliveira, D. C., & dos Santos Isaias, R. M. (2010). Cytological and histochemical gradients induced by a sucking insect in galls of *Aspidosperma australe* Arg. Muell (Apocynaceae). *Plant Science*, 178(4), 350-358.
- de Oliveira, D. C., Moreira, A. S. F. P., & dos Santos Isaias, R. M. (2014). Functional gradients in insect gall tissues: studies on Neotropical host plants. In *Neotropical insect galls* (pp. 35-49). Dordrecht: Springer Netherlands.
- de Oliveira, D. C., & dos Santos Isaias, R. M. (Eds.). (2025). Plant galls: Structure and functions. *Springer Nature*.
- de Vos, M., Kim, J. H., & Jander, G. (2007). Biochemistry and molecular biology of *Arabidopsis*-aphid interactions. *BioEssays*, 29(9), 871-883.
- Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolai, M., ... & Meyer, C. (2007). The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO reports*, 8(9), 864-870.
- Desnitskiy, A. G., Chetverikov, P. E., Ivanova, L. A., Kuzmin, I. V., Ozman-Sullivan, S. K., & Sukhareva, S. I. (2023). Molecular aspects of gall formation induced by mites and insects. *Life*, 13(6), 1347.
- Detoni, M. D. L., Vasconcelos, E. G., Rust, N. M., Isaias, R. M. D. S., & Soares, G. L. G. (2011). Seasonal variation of phenolic content in galled and non-galled tissues of *Calliandra brevipes* Benth (Fabaceae: Mimosoidae). *Acta Botanica Brasilica*, 25(3), 601-604.
- Deutsch, C. A., Tewksbury, J. J., Tigchelaar, M., Battisti, D. S., Merrill, S. C., Huey, R. B., & Naylor, R. L. (2018). Increase in crop losses to insect pests in a warming climate. *Science*, 361(6405), 916-919.
- Devoto, A., & Turner, J. G. (2005). Jasmonate-regulated Arabidopsis stress signalling network. *Physiologia Plantarum*, 123(2), 161-172.
- Diamond, S. E., Blair, C. P., & Abrahamson, W. G. (2008). Testing the nutrition hypothesis for the adaptive nature of insect galls: does a non-adapted herbivore perform better in galls?. *Ecological Entomology*, 33(3), 385-393.
- Divol, F., Vilaine, F., Thibivilliers, S., Amselem, J., Palauqui, J. C., Kusiak, C., & Dinant, S. (2005). Systemic response to aphid infestation by *Myzus persicae* in the phloem of *Apium graveolens*. *Plant Molecular Biology*, 57(4), 517-540.

- Djonović, S., Urbach, J. M., Drenkard, E., Bush, J., Feinbaum, R., Ausubel, J. L., ... & Ausubel, F. M. (2013). Trehalose biosynthesis promotes *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity in plants. *PLoS Pathogens*, 9(3), e1003217.
- Dolzblasz, A., Banasiak, A., & Vereecke, D. (2018). Neovascularization during leafy gall formation on *Arabidopsis thaliana* upon *Rhodococcus fascians* infection. *Planta*, 247(1), 215-228.
- Dong, S., & Beckles, D. M. (2019). Dynamic changes in the starch-sugar interconversion within plant source and sink tissues promote a better abiotic stress response. *Journal of Plant Physiology*, 234, 80-93.
- Dorchin, N., Cramer, M. D., & Hoffmann, J. H. (2006). Photosynthesis and sink activity of wasp-induced galls in *Acacia pycnantha*. *Ecology*, 87(7), 1781-1791.
- Dorchin, N., Hoffmann, J. H., Stirk, W. A., Novák, O., Strnad, M., & Van Staden, J. (2009). Sexually dimorphic gall structures correspond to differential phytohormone contents in male and female wasp larvae. *Physiological Entomology*, 34(4), 359-369.
- Dorion, S., Ouellet, J. C., & Rivoal, J. (2021). Glutathione metabolism in plants under stress: beyond reactive oxygen species detoxification. *Metabolites*, 11(9), 641.
- Dos Santos, C., & Franco, O. L. (2023). Pathogenesis-related proteins (PRs) with enzyme activity activating plant defense responses. *Plants*, 12(11), 2226.
- Doss, R. P., Oliver, J. E., Proebsting, W. M., Potter, S. W., Kuy, S., Clement, S. L., ... & DeVilbiss, E. D. (2000). Bruchins: insect-derived plant regulators that stimulate neoplasm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(11), 6218-6223.
- Dowd, P. F., Herms, D. A., Berhow, M. A., & Lagrimini, L. M. (2000). Mechanisms of insect resistance in transgenic plants (over) expressing a tobacco anionic peroxidase. *Plant Peroxidase Newsletter*, 14, 93-101.
- Dreger-Jauffret, F. (1992). Diversity of gallinducing insects and their galls. *Biology of Insect Induced Galls*, 8-33.
- Eggleton, P. (2020). The state of the world's insects. *Annual Review of Environment and Resources*, 45, 61-82.
- Eitle, M. W., Carolan, J. C., Griesser, M., & Forneck, A. (2019). The salivary gland proteome of root-galling grape phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch) feeding on *Vitis* spp. *PLoS One*, 14(12), e0225881.
- El-Sappah, A. H., Zhu, Y., Huang, Q., Chen, B., Soaud, S. A., Abd Elhamid, M. A., ... & El-Tarabily, K. A. (2024). Plants' molecular behavior to heavy metals: from criticality to toxicity. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1423625.
- Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I., & Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13(4), 17R-27R.
- Erb, M., & Reymond, P. (2019). Molecular interactions between plants and insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 70(1), 527-557.
- Erb, M., & Kliebenstein, D. J. (2020). Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy. *Plant physiology*, 184(1), 39-52.
- Escobar, M. A., & Dandekar, A. M. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science*, 8(8), 380-386.
- Espírito-Santo, M. M. & Fernandes, G. W. (2007). How many species of gall-inducing insects are there on earth, and where are they?. *Annals of the Entomological Society of America*, 100(2), 95-99.
- Fagard, M., Launay, A., Clément, G., Courtial, J., Dellagi, A., Farjad, M., ... & Masclaux-Daubresse, C. (2014). Nitrogen metabolism meets phytopathology. *Journal of Experimental Botany*, 65(19), 5643-5656.
- Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S. P., & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3, 222.

- Fay, P. A., Hartnett, D. C., & Knapp, A. K. (1996). Plant tolerance of gall-insect attack and gall-insect performance. *Ecology*, *77*(2), 521-534.
- Felton, G. W., Donato, K., Del Vecchio, R. J., & Duffey, S. S. (1989). Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, *15*(12), 2667-2694.
- Felton, G. W., & Tumlinson, J. H. (2008). Plant-insect dialogs: complex interactions at the plant-insect interface. *Current Opinion in Plant Biology*, *11*(4), 457-463.
- Feng, L., Li, X., Zheng, X. A., Zheng, Z., Liu, Q. R., Liu, C., ... & Gao, C. (2025). SnRK1 and TOR: central regulators of autophagy in plant energy stress responses. *Abiotech*, *6*(4), 663-679.
- Fernandez, O., Béthencourt, L., Quero, A., Sangwan, R. S., & Clément, C. (2010). Trehalose and plant stress responses: friend or foe?. *Trends in Plant Science*, *15*(7), 409-417.
- Ferreira, B. G., Oliveira, D. C., Moreira, A. S., Faria, A. P., Guedes, L. M., França, M. G., ... & Isaias, R. M. (2018). Antioxidant metabolism in galls due to the extended phenotypes of the associated organisms. *PLoS One*, *13*(10), e0205364.
- Ferreira, B., Freitas, M., Bragança, G., Moreira, A., Carneiro, R., & Isaias, R. (2019). Enzyme-mediated metabolism in nutritive tissues of galls induced by *Ditylenchus gallaeformans* (Nematoda: Anguinidae). *Plant Biology*, *21*(6), 1052-1062.
- Ferreres, F., Figueiredo, R., Bettencourt, S., Carqueijeiro, I., Oliveira, J., Gil-Izquierdo, A., ... & Sottomayor, M. (2011). Identification of phenolic compounds in isolated vacuoles of the medicinal plant *Catharanthus roseus* and their interaction with vacuolar class III peroxidase: an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> affair?. *Journal of Experimental Botany*, *62*(8), 2841-2854.
- Fichtner, F., & Lunn, J. E. (2021). The role of trehalose 6-phosphate (Tre6P) in plant metabolism and development. *Annual Review of Plant Biology*, *72*(1), 737-760.
- Figueroa, C. M., & Lunn, J. E. (2016). A tale of two sugars: trehalose 6-phosphate and sucrose. *Plant Physiology*, *172*(1), 7-27.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., ... & Dolan, L. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, *422*(6930), 442-446.
- Foster, A. J., Jenkinson, J. M., & Talbot, N. J. (2003). Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *The EMBO journal*, *22*(2), 225-235.
- Foyer, C. H., & Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, *133*(1), 21-25.
- Foyer, C. H., & Mullineaux, P. M. (1998). The presence of dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase in plant tissues. *FEBS letters*, *425*(3), 528-529.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005a). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, *17*(7), 1866-1875.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005b). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*, *28*(8), 1056-1071.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*, *155*(1), 2-18.
- Foyer, C. H., & Shigeoka, S. (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, *155*(1), 93-100.
- Foyer, C. H., Rasool, B., Davey, J. W., & Hancock, R. D. (2016). Cross-tolerance to biotic and abiotic stresses in plants: a focus on resistance to aphid infestation. *Journal of Experimental Botany*, *67*(7), 2025-2037.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2020). Redox homeostasis and signaling in a higher-CO<sub>2</sub> world. *Annual Review of Plant Biology*, *71*, 157-182.

- Foyer, C. H., & Kunert, K. (2024). The ascorbate–glutathione cycle coming of age. *Journal of Experimental Botany*, 75(9), 2682-2699.
- Francoz, E., Ranocha, P., Nguyen-Kim, H., Jamet, E., Burlat, V., & Dunand, C. (2015). Roles of cell wall peroxidases in plant development. *Phytochemistry*, 112, 15-21.
- Fry, S. C. (1998). Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemical Journal*, 332(2), 507-515.
- Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., & Bak, S. (2013). Plant defense against insect herbivores. *International Journal of Molecular sciences*, 14(5), 10242-10297.
- Galili, G., Avin-Wittenberg, T., Angelovici, R., & Fernie, A. R. (2014). The role of photosynthesis and amino acid metabolism in the energy status during seed development. *Frontiers in Plant Science*, 5, 447.
- Gassmann, A., Clerck-Floate, D., Sing, S., Toševski, I., Mitrović, M. & Krstić, O. (2014). Biology and host specificity of *Rhynusa pilosa*, a recommended biological control agent of *Linaria vulgaris*. *BioControl*, 59(4), 473-483.
- Gašić, U., Kečkeš, S., Dabić, D., Trifković, J., Milojković-Opsenica, D., Natić, M., & Tešić, Ž. (2014). Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. *Food Chemistry*, 145, 599-607.
- Gatehouse, J. A. (2002). Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist*, 156(2), 145-169.
- Gätjens-Boniche, O. (2019). The mechanism of plant gall induction by insects: revealing clues, facts, and consequences in a cross-kingdom complex interaction. *Revista de Biología Tropical*, 67(6), 1359-1382.
- Gelvin, S. B. (2003). Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16-37.
- Ghori, N. H., Ghori, T., Hayat, M. Q., Imadi, S. R., Gul, A., Altay, V., & Ozturk, M. (2019). Heavy metal stress and responses in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16, 1807-1828.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Gill, R., Gupta, A., Taggar, G., & Taggar, M. (2010). Role of oxidative enzymes in plant defenses against insect herbivory. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 45(2), 277-290.
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Gill, R., Yadav, S., Hasanuzzaman, M., Fujita, M., ... & Tuteja, N. (2015). Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(14), 10375-10394.
- Giron, D., Frago, E., Glevarec, G., Pieterse, C. M., & Dicke, M. (2013). Cytokinins as key regulators in plant–microbe–insect interactions: connecting plant growth and defence. *Functional Ecology*, 27(3), 599-609.
- Giron, D., Huguet, E., Stone, G. N. & Body, M. (2016). Insect-induced effects on plants and possible effectors used by galling and leaf-mining insects to manipulate their host-plant. *Journal of Insect Physiology*, 84, 70-89.
- Go, Y. M., & Jones, D. P. (2008). Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1780(11), 1273-1290.
- Gohlke, J., & Deeken, R. (2014). Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. *Frontiers in Plant Science*, 5, 155.
- Gonzali, S., Novi, G., Loreti, E., Paolicchi, F., Poggi, A., Alpi, A., & Perata, P. (2005). A turanose-insensitive mutant suggests a role for *WOX5* in auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 44(4), 633-645.

- Govindan, G., KR, S., Alphonse, V., & Somasundram, S. (2024). Role of germin-like proteins (GLPs) in biotic and abiotic stress responses in major crops: A review on plant defense mechanisms and stress tolerance. *Plant Molecular Biology Reporter*, 42(3), 450-468.
- Granot, D., David-Schwartz, R., & Kelly, G. (2013). Hexose kinases and their role in sugar-sensing and plant development. *Frontiers in Plant Science*, 4, 44.
- Granot, D., Kelly, G., Stein, O., & David-Schwartz, R. (2014). Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development. *Journal of Experimental Botany*, 65(3), 809-819.
- Griesser, M., Lawo, N. C., Crespo-Martinez, S., Schoedl-Hummel, K., Wieczorek, K., Gorecka, M., ... & Forneck, A. (2015). Phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch) alters the carbohydrate metabolism in root galls to allowing the compatible interaction with grapevine (*Vitis* spp.) roots. *Plant Science*, 234, 38-49.
- Griffiths, C. A., Paul, M. J., & Foyer, C. H. (2016). Metabolite transport and associated sugar signalling systems underpinning source/sink interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1857(10), 1715-1725.
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E. L., & Zenk, M. H. (1989). Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(18), 6838-6842.
- Green, M. A., & Fry, S. C. (2005). Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature*, 433(7021), 83-87.
- Grennan, A. K. (2006). Regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology*, 142(4), 1343-1345.
- Gruz, J., Ayaz, F. A., Torun, H., & Strnad, M. (2011). Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit at different stages of ripening. *Food Chemistry*, 124(1), 271-277.
- Guedes, L. M., Torres, S., Sáez-Carillo, K., Becerra, J., Pérez, C. I., & Aguilera, N. (2022). High antioxidant activity of phenolic compounds dampens oxidative stress in *Espinosa nothofagi* galls induced on *Nothofagus obliqua* buds. *Plant Science*, 314, 111114.
- Guiguet, A., Dubreuil, G., Harris, M. O., Appel, H. M., Schultz, J. C., Pereira, M. H., & Giron, D. (2016). Shared weapons of blood-and plant-feeding insects: surprising commonalities for manipulating hosts. *Journal of Insect Physiology*, 84, 4-21.
- Guiguet, A., Hamatani, A., Amano, T., Takeda, S., Lopez-Vaamonde, C., Giron, D. & Ohshima, I. (2018). Inside the horn of plenty: Leaf-mining micromoth manipulates its host plant to obtain unending food provisioning. *PLoS One*, 13(12), e0209485.
- Guiguet, A., Ohshima, I., Takeda, S., Laurans, F., Lopez-Vaamonde, C. & Giron, D. (2019). Origin of gall-inducing from leaf-mining in *Caloptilia micromoths* (Lepidoptera, Gracillariidae). *Scientific Reports*, 9(1), 1-7.
- Gullner, G., Komives, T., Király, L., & Schröder, P. (2018). Glutathione S-transferase enzymes in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1836.
- Gupta, D. K., Palma, J. M., & Corpas, F. J. (Eds.). (2015). Reactive oxygen species and oxidative damage in plants under stress (pp. 1-22). Heidelberg: Springer.
- Gutsche, A. R., Heng-Moss, T. M., Higley, L. G., Sarath, G., & Mornhinweg, D. W. (2009). Physiological responses of resistant and susceptible barley, *Hordeum vulgare* to the Russian wheat aphid, *Diurpahis noxia* (Mordvilko). *Arthropod-Plant Interactions*, 3(4), 233-240.
- Haiden, S. A., Hoffmann, J. H., & Cramer, M. D. (2012). Benefits of photosynthesis for insects in galls. *Oecologia*, 170(4), 987-997.
- Halkier, B. A., & Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 303-333.

- Halliwell, B., & Foyer, C. H. (1978). Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta*, 139(1), 9-17.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants: the basics-what they are and how to evaluate them. *Advances in Pharmacology*, 38, 3-20.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141(2), 312-322.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1147-1150.
- Han, Y., Chaouch, S., Mhamdi, A., Queval, G., Zechmann, B., & Noctor, G. (2013). Functional analysis of *Arabidopsis* mutants points to novel roles for glutathione in coupling H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to activation of salicylic acid accumulation and signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(16), 2106-2121.
- Han, C., Wang, H., Shi, W., & Bai, M. Y. (2024). The molecular associations between the SnRK1 complex and carbon/nitrogen metabolism in plants. *New Crops*, 1, 100008.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., & Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(6), 845-850.
- Harper, L. J., Schönrogge, K., Lim, K. Y., Francis, P., & Lichtenstein, C. P. (2004). Cynipid galls: insect-induced modifications of plant development create novel plant organs. *Plant, Cell & Environment*, 27(3), 327-335.
- Harris, P. (1993). Effects, constraints and the future of weed biocontrol. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 46(1-4), 289-303.
- Harris, P. & Shorthouse, J.D. (1996). Effectiveness of gall inducers in weed biological control. *The Canadian Entomologist*, 128, 1021-1055.
- Harris, M. O. & Pitzschke, A. (2020). Plants make galls to accommodate foreigners: some are friends, most are foes. *New Phytologist*, 225(5), 1852-1872.
- Hartley, S. E. (1998). The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and secondary compounds controlled by the gall-former?. *Oecologia*, 113(4), 492-501.
- Hartmann, H., & Trumbore, S. (2016). Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees—from what we can measure to what we want to know. *New Phytologist*, 211(2), 386-403.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., ... & Fotopoulos, V. (2020). Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 9(8), 681.
- Hassan, S., & Mathesius, U. (2012). The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions. *Journal of Experimental Botany*, 63(9), 3429-3444.
- Häusler, R. E., Ludewig, F., & Krueger, S. (2014). Amino acids—a life between metabolism and signaling. *Plant Science*, 229, 225-237.
- Hawkesford, M. J., & De Kok, L. J. (2006). Managing sulphur metabolism in plants. *Plant, Cell & Environment*, 29(3), 382-395.
- Hawkins, B. A., Cornell, H. V. & Hochberg, M. E. (1997). Predators, parasitoids, and pathogens as mortality agents in phytophagous insect populations. *Ecology*, 78(7), 2145-2152.
- He, Z., Webster, S., & He, S. Y. (2022). Growth–defense trade-offs in plants. *Current Biology*, 32(12), R634-R639.
- Hearn, J., Blaxter, M., Schönrogge, K., Nieves-Aldrey, J. L., Pujade-Villar, J., Huguet, E., ... & Stone, G. N. (2019). Genomic dissection of an extended phenotype: Oak galling by a cynipid gall wasp. *PLoS Genetics*, 15(11), e1008398.

- Heil, M. (2016). Host manipulation by parasites: cases, patterns, and remaining doubts. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 4, 80.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Heinemann, B., & Hildebrandt, T. M. (2021). The role of amino acid metabolism in signaling and metabolic adaptation to stress-induced energy deficiency in plants. *Journal of Experimental Botany*, 72(13), 4634-4645.
- Hennion, N., Durand, M., Vriet, C., Doidy, J., Maurousset, L., Lemoine, R., & Pourtau, N. (2019). Sugars en route to the roots. Transport, metabolism and storage within plant roots and towards microorganisms of the rhizosphere. *Physiologia Plantarum*, 165(1), 44-57.
- Henriksson, J., Haukioja, E., Ossipov, V., Ossipova, S., Sillanpää, S., Kapari, L., & Pihlaja, K. (2003). Effects of host shading on consumption and growth of the geometrid *Epirrita autumnata*: interactive roles of water, primary and secondary compounds. *Oikos*, 103(1), 3-16.
- Herrera-Vásquez, A., Salinas, P., & Holuigue, L. (2015). Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Frontiers in Plant Science*, 6, 171.
- Hertog, M. G., Hollman, P. C., & Venema, D. P. (1992). Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9), 1591-1598.
- Higuchi, T. (2006). Look back over the studies of lignin biochemistry. *Journal of Wood Science*, 52(1), 2-8.
- Hildebrandt, T. M., Nesi, A. N., Araújo, W. L., & Braun, H. P. (2015). Amino acid catabolism in plants. *Molecular Plant*, 8(11), 1563-1579.
- Hilker, M., & Meiners, T. (2002). Induction of plant responses to oviposition and feeding by herbivorous arthropods: a comparison. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 104(1), 181-192.
- Hilker, M., & Meiners, T. (2010). How do plants “notice” attack by herbivorous arthropods?. *Biological Reviews*, 85(2), 267-280.
- Hilker, M., & Fatouros, N. E. (2015). Plant responses to insect egg deposition. *Annual Review of Entomology*, 60(1), 493-515.
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42(5), 462-468.
- Ho, C. L., & Saito, K. (2001). Molecular biology of the plastidic phosphorylated serine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Amino acids*, 20(3), 243-259.
- Hogenhout, S. A., & Bos, J. I. (2011). Effector proteins that modulate plant–insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 422-428.
- Horacio, P., & Martinez-Noel, G. (2013). Sucrose signaling in plants: a world yet to be explored. *Plant Signaling & Behavior*, 8(3), e23316.
- Hossain, M. A., & Asada, K. (1984). Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant and Cell Physiology*, 25(1), 85-92.
- Hossain, M. A., & Asada, K. (1985). Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 260(24), 12920-12926.
- Howe, G. A., & Jander, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 41-66.
- Huang, J., Gu, M., Lai, Z., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y. H., ... & Chen, Z. (2010). Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology*, 153(4), 1526-1538.

- Huang, M. Y., Lin, K. H., Yang, M. M., Chou, H. M., Yang, C. M., & Chang, Y. T. (2011). Chlorophyll fluorescence, spectral properties, and pigment composition of galls on leaves of *Machilus thunbergii*. *International Journal of Plant Sciences*, *172*(3), 323-329.
- Huang, M. Y., Huang, W. D., Chou, H. M., Chen, C. C., Chang, Y. T., & Yang, C. M. (2014). Herbivorous insects alter the chlorophyll metabolism of galls on host plants. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *17*(3), 431-434.
- Huang, M. Y., Huang, W. D., Chou, H. M., Chen, C. C., Chen, P. J., Chang, Y. T., & Yang, C. M. (2015). Structural, biochemical, and physiological characterization of photosynthesis in leaf-derived cup-shaped galls on *Litsea acuminata*. *BMC Plant Biology*, *15*(1), 61.
- Huang, W., Yang, Y. J., & Zhang, S. B. (2019). The role of water-water cycle in regulating the redox state of photosystem I under fluctuating light. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1860*(5), 383-390.
- Ingle, R. A. (2011). Histidine biosynthesis. *The Arabidopsis Book*/American Society of Plant Biologists, 9.
- Isaias, R. M. S., Oliveira, D. C., Moreira, A. S. F. P., Soares, G. L. G., & Carneiro, R. G. S. (2015). The imbalance of redox homeostasis in arthropod-induced plant galls: mechanisms of stress generation and dissipation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1850*(8), 1509-1517.
- Isaias, R. M. D. S., Ferreira, B. G., Alvarenga, D. R. D., Barbosa, L. R., Salminen, J. P., & Steinbauer, M. J. (2018). Functional compartmentalisation of nutrients and phenolics in the tissues of galls induced by *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) on *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae). *Austral Entomology*, *57*(2), 238-246.
- Ishikawa, T., & Shigeoka, S. (2008). Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *72*(5), 1143-1154.
- ISSG (Invasive Species Specialist Group), 2015. Global Invasive Species Database (GISD). Invasive Species Specialist Group of the IUCN Species Survival Commission.
- ISSG (Invasive Species Specialist Group), 2022. Global Invasive Species Database: *Linaria vulgaris*(herb).[http://issg.org/database/species/ecology.asp?si=1176&fr=1&sts=&lang=EN#:~:text=Geographical%20range,USDA%2DGRIN%2C%202007\).&text=For%20ornamental%20purposes%3A%20Linaria%20vulgaris,ornamental%20\(Holdorf%2C%20undated\)](http://issg.org/database/species/ecology.asp?si=1176&fr=1&sts=&lang=EN#:~:text=Geographical%20range,USDA%2DGRIN%2C%202007).&text=For%20ornamental%20purposes%3A%20Linaria%20vulgaris,ornamental%20(Holdorf%2C%20undated)).
- Iturriaga, G., Suárez, R., & Nova-Franco, B. (2009). Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, *10*(9), 3793-3810.
- Jain, N. K., & Roy, I. (2009). Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science*, *18*(1), 24-36.
- Jander, G., & Joshi, V. (2010). Recent progress in deciphering the biosynthesis of aspartate-derived amino acids in plants. *Molecular Plant*, *3*(1), 54-65.
- Jankiewicz, L. S., Dyki, B., Machlanska, A., & Dubert, F. (2017). Oak leaf galls: *Neuroterus numismalis* and *Cynips quercusfolii*, their structure and ultrastructure. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, *86*(2).
- Jankiewicz, L. S., Guzicka, M., & Marasek-Ciolakowska, A. (2021). Anatomy and ultrastructure of galls induced by *Neuroterus quercusbaccarum* (Hymenoptera: Cynipidae) on oak leaves (*Quercus robur*). *Insects*, *12*(10), 850.
- Jankielsohn, A. (2023). Sustaining insect biodiversity in agricultural systems to ensure future food security. *Frontiers in Conservation Science*, *4*, 1195512.
- Janků, M., Luhová, L., & Petřivalský, M. (2019). On the origin and fate of reactive oxygen species in plant cell compartments. *Antioxidants*, *8*(4), 105.

- Jeandet, P., Vannozzi, A., Sobarzo-Sánchez, E., Uddin, M. S., Bru, R., Martínez-Márquez, A., ... & Nabavi, S. M. (2021). Phytostilbenes as agrochemicals: Biosynthesis, bioactivity, metabolic engineering and biotechnology. *Natural Product Reports*, *38*(7), 1282-1329.
- Jiang, Y., Veromann-Jürgenson, L. L., Ye, J., & Niinemets, Ü. (2018). Oak gall wasp infections of *Quercus robur* leaves lead to profound modifications in foliage photosynthetic and volatile emission characteristics. *Plant, Cell & Environment*, *41*(1), 160-175.
- Jimenez, A., Hernandez, J. A., del Río, L. A., & Sevilla, F. (1997). Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology*, *114*(1), 275-284.
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G., ... & Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, *14*(9), 946-961.
- Jones, A. C., Felton, G. W., & Tumlinson, J. H. (2022). The dual function of elicitors and effectors from insects: reviewing the 'arms race' against plant defenses. *Plant Molecular Biology*, *109*(4), 427-445.
- Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J., & Cuypers, A. (2012). Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(3), 3145-3175.
- Jun, J. H., Fiume, E. & Fletcher, J. C. (2008). The CLE family of plant polypeptide signaling molecules. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *65*(5), 743-755.
- Kaiser, W., Huguet, E., Casas, J., Commin, C., & Giron, D. (2010). Plant green-island phenotype induced by leaf-miners is mediated by bacterial symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *277*(1692), 2311-2319.
- Kanwar, P., & Jha, G. (2019). Alterations in plant sugar metabolism: signatory of pathogen attack. *Planta*, *249*(2), 305-318.
- Kärkönen, A., & Koutaniemi, S. (2010). Lignin biosynthesis studies in plant tissue cultures. *Journal of Integrative Plant Biology*, *52*(2), 176-185.
- Kärkönen, A., & Kuchitsu, K. (2015). Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. *Phytochemistry*, *112*, 22-32.
- Kawahara, A. Y., Plotkin, D., Ohshima, I., Lopez-Vaamonde, C., Houlihan, P. R., Breinholt, J. W., ... & Mitter, C. (2017). A molecular phylogeny and revised higher-level classification for the leaf-mining moth family *G. racillariidae* and its implications for larval host-use evolution. *Systematic Entomology*, *42*(1), 60-81.
- Kečkeš, S., Gašić, U., Veličković, T. Ć., Milojković-Opsenica, D., Natić, M., & Tešić, Ž. (2013). The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. *Food Chemistry*, *138*(1), 32-40.
- Kerbler, S. M. L., Armijos-Jaramillo, V., Lunn, J. E., & Vicente, R. (2023). The trehalose 6-phosphate phosphatase family in plants. *Physiologia Plantarum*, *175*(6), e14096.
- Kerchev, P. I., Fenton, B., Foyer, C. H., & Hancock, R. D. (2012). Plant responses to insect herbivory: interactions between photosynthesis, reactive oxygen species and hormonal signalling pathways. *Plant, Cell & Environment*, *35*(2), 441-453.
- Keunen, E. L. S., Peshev, D., Vangronsveld, J., Van Den Ende, W. I. M., & Cuypers, A. N. N. (2013). Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant, Cell & Environment*, *36*(7), 1242-1255.
- Kim, M., Lim, J. H., Ahn, C. S., Park, K., Kim, G. T., Kim, W. T., & Pai, H. S. (2006). Mitochondria-associated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell*, *18*(9), 2341-2355.
- Kitamura, S. (2006). Transport of flavonoids: from cytosolic synthesis to vacuolar accumulation. In *The Science of Flavonoids* (pp. 123-146). Springer, New York, NY.

- Kliebenstein, D. J., Monde, R. A., & Last, R. L. (1998). Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology*, 118(2), 637-650.
- Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3), 235-246.
- Kopriva, S., & Rennenberg, H. (2004). Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 55(404), 1831-1842.
- Korgaonkar, A., Han, C., Lemire, A. L., Siwanowicz, I., Bennouna, D., Kopec, R. E., ... & Stern, D. L. (2021). A novel family of secreted insect proteins linked to plant gall development. *Current Biology*, 31(9), 1836-1849.
- Kot, I., Jakubczyk, A., Karaś, M., & Złotek, U. (2018). Biochemical responses induced in galls of three *Cynipidae* species in oak trees. *Bulletin of Entomological Research*, 108(4), 494-500.
- Koyama, Y., Yao, I. & Akimoto, S. I. (2004). Aphid galls accumulate high concentrations of amino acids: a support for the nutrition hypothesis for gall formation. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 113(1), 35-44.
- Krasensky, J. & Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1593-1608.
- Krieger-Liszak, A. (2005). Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 56(411), 337-346.
- Kukavica, B., & Veljović Jovanović, S. (2004). Senescence-related changes in the antioxidant status of ginkgo and birch leaves during autumn yellowing. *Physiologia Plantarum*, 122(3), 321-327.
- Kukavica, B., Mojović, M., Vucčinić, Ž., Maksimović, V., Takahama, U., & Jovanović, S. V. (2009). Generation of hydroxyl radical in isolated pea root cell wall, and the role of cell wall-bound peroxidase, Mn-SOD and phenolics in their production. *Plant and Cell Physiology*, 50(2), 304-317.
- Kukavica, B. M., Veljović Jovanović, S. D., Menckhoff, L., & Lüthje, S. (2012). Cell wall-bound cationic and anionic class III isoperoxidases of pea root: biochemical characterization and function in root growth. *Journal of Experimental Botany*, 63(12), 4631-4645.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Kumar, G. A., Kumar, S., Bhardwaj, R., Swapnil, P., Meena, M., Seth, C. S., & Yadav, A. (2024). Recent advancements in multifaceted roles of flavonoids in plant–rhizomicrobiome interactions. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1297706.
- Küpper, H., Parameswaran, A., Leitenmaier, B., Trtlík, M., & Šetlík, I. (2007). Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, 175(4), 655-674.
- Küpper, H., Benedikty, Z., Morina, F., Andresen, E., Mishra, A., & Trtlík, M. (2019). Analysis of OJIP chlorophyll fluorescence kinetics and QA reoxidation kinetics by direct fast imaging. *Plant Physiology*, 179(2), 369-381.
- Kushwah, S., & Laxmi, A. (2017). The interaction between glucose and cytokinin signaling in controlling *Arabidopsis thaliana* seedling root growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, 12(5), e1312241.
- Kuśnierczyk, A., Winge, P. E. R., Jørstad, T. S., Troczyńska, J., Rossiter, J. T., & Bones, A. M. (2008). Towards global understanding of plant defence against aphids—timing and dynamics of early *Arabidopsis* defence responses to cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) attack. *Plant, Cell & Environment*, 31(8), 1097-1115.

- Kutsukake, M., Meng, X. Y., Katayama, N., Nikoh, N., Shibao, H., & Fukatsu, T. (2012). An insect-induced novel plant phenotype for sustaining social life in a closed system. *Nature Communications*, 3(1), 1187.
- Labandeira, C. C. (2021). Ecology and evolution of gall-inducing arthropods: The pattern from the terrestrial fossil record. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9, 632449.
- Labandeira, C. C., & Wappler, T. (2023). Arthropod and pathogen damage on fossil and modern plants: Exploring the origins and evolution of herbivory on land. *Annual Review of Entomology*, 68(1), 341-361.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Laluk, K., & Mengiste, T. (2010). Necrotroph attacks on plants: wanton destruction or covert extortion?. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 8
- Larebeke, N. V., Engler, G., Holsters, M., den Elsacker, S. V., Zaenen, I., Schilperoort, R. A., & Schell, J. (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature*, 252(5479), 169-170.
- Larson, K. C. & Whitham, T. G. (1991). Manipulation of food resources by a gall-forming aphid: the physiology of sink-source interactions. *Oecologia*, 88(1), 15-21.
- Larson, K. C. & Whitham, T. G. (1997). Competition between gall aphids and natural plant sinks: plant architecture affects resistance to galling. *Oecologia*, 109(4), 575-582.
- Larson, K. C. (1998). The impact of two gall-forming arthropods on the photosynthetic rates of their hosts. *Oecologia*, 115(1), 161-166.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M., & Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research*, 661(2), 23-67.
- Lattanzio, V. (2021). Relationship of phenolic metabolism to growth in plant and cell cultures under stress. In *Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites* (pp. 837-868). Springer, Cham.
- Laznik, Ž., Križman, M., Zekič, J., Roškarič, M., Trdan, S., & Urbanek Krajnc, A. (2024). Navigational signals for insect and slug parasitic nematodes: the role of ascorbate-glutathione system and volatiles released by insect-damaged sweet pepper roots. *Insects*, 15(10), 805.
- Le Roy, J., Huss, B., Creach, A., Hawkins, S., & Neutelings, G. (2016). Glycosylation is a major regulator of phenylpropanoid availability and biological activity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 735.
- Lea, P. J., Sodek, L., Parry, M. A., Shewry, P. R., & Halford, N. G. (2007). Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology*, 150(1), 1-26.
- Lemoine, R., Camera, S. L., Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Allario, T., Pourtau, N., ... & Durand, M. (2013). Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science*, 4, 272.
- Li, L., Liu, K. H., & Sheen, J. (2021). Dynamic nutrient signaling networks in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 37(1), 341-367.
- Li, X., St Laurent, R., Earl, C., Doorenweerd, C., van Nieukerken, E. J., Davis, D. R., ... & Kawahara, A. Y. (2022). Phylogeny of gracillariid leaf-mining moths: evolution of larval behaviour inferred from phylogenomic and Sanger data. *Cladistics*, 38(3), 277-300.
- Liao, L., Hu, Z., Liu, S., Yang, Y., & Zhou, Y. (2021). Characterization of germin-like proteins (GLPs) and their expression in response to abiotic and biotic stresses in cucumber. *Horticulturae*, 7(10), 412.
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11: 591-592

- Lin, T. B., Wolf, S., Schwartz, A., & Saranga, Y. (2000). Silverleaf whitefly stress impairs sugar export from cotton source leaves. *Physiologia Plantarum*, 109(3), 291-297.
- Lin, D., Xu, Y., Wu, H., Liu, X., Zhang, L., Wang, J., & Rao, Q. (2019). Plant defense responses induced by two herbivores and consequences for whitefly *Bemisia tabaci*. *Frontiers in Physiology*, 10, 346.
- Linster, C. L., Adler, L. N., Webb, K., Christensen, K. C., Brenner, C., & Clarke, S. G. (2008). A second GDP-L-galactose phosphorylase in *Arabidopsis* en route to vitamin C: covalent intermediate and substrate requirements for the conserved reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 283(27), 18483-18492.
- Liszkay, A., Kenk, B., & Schopfer, P. (2003). Evidence for involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta*, 217, 658-667.
- Liu, X., Williams, C. E., Nemacheck, J. A., Wang, H., Subramanyam, S., Zheng, C., & Chen, M. S. (2010). Reactive oxygen species are involved in plant defense against a gall midge. *Plant Physiology*, 152(2), 985-999.
- Liu, Q., Zheng, L., He, F., Zhao, F. J., Shen, Z., & Zheng, L. (2015). Transcriptional and physiological analyses identify a regulatory role for hydrogen peroxide in the lignin biosynthesis of copper-stressed rice roots. *Plant and Soil*, 387(1), 323-336.
- Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, R. E., Marcelis, L. F., Visser, R. G., & Bovy, A. (2018a). Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in Solanaceous vegetables: A review. *Frontiers in Chemistry*, 6, 52.
- Liu, Q., Luo, L., & Zheng, L. (2018b). Lignins: biosynthesis and biological functions in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 335.
- Liu, J., Cheng, Y., Ruan, M., Ye, Q., Wang, R., Yao, Z., ... & Wan, H. (2025). Roles and regulations of acid invertases in plants: Current knowledge and future perspectives. *Plants*, 14(3), 320.
- Lomelino, C. L., Andring, J. T., McKenna, R., & Kilberg, M. S. (2017). Asparagine synthetase: Function, structure, and role in disease. *Journal of Biological Chemistry*, 292(49), 19952-19958.
- Lu, F., Liang, X., Lu, H., Li, Q., Chen, Q., Zhang, P., ... & Zhang, L. (2017). Overproduction of superoxide dismutase and catalase confers cassava resistance to *Tetranychus cinnabarinus*. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.
- Lu, Q., Chen, X., Yang, Z., Bashir, N. H., Liu, J., Cui, Y., ... & Chen, H. (2021). Molecular and histologic adaptation of horned gall induced by the aphid *Schlechtendalia chinensis* (Pemphigidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 5166.
- Lunn, J. E., Feil, R., Hendriks, J. H., Gibon, Y., Morcuende, R., Osuna, D., ... & Stitt, M. (2006). Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADP glucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal*, 397(1), 139-148.
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*, 224, 164-175.
- Ma, C. S., Wang, B. X., Wang, X. J., Lin, Q. C., Zhang, W., Yang, X. F., ... & Ma, G. (2025). Crop pest responses to global changes in climate and land management. *Nature Reviews Earth & Environment*, 6(4), 264-283.
- Mack, R. N. (2003). Plant naturalizations and invasions in the eastern United States: 1634-1860. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 77-90.
- Maeda, H., & Dudareva, N. (2012). The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 73-105.
- Maffei, M., Bossi, S., Spiteller, D., Mithöfer, A., & Boland, W. (2004). Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. I. Membrane potentials, intracellular calcium variations, oral secretions, and regurgitate components. *Plant Physiology*, 134(4), 1752-1762.

- Mahanta, D. K., Komal, J., Samal, I., Bhoi, T. K., Kumar, P. D., Mohapatra, S., ... & Mastinu, A. (2025). Plant defense responses to insect herbivores through molecular signaling, secondary metabolites, and associated epigenetic regulation. *Plant-Environment Interactions*, 6(1), e70035.
- Majda, M., & Robert, S. (2018). The role of auxin in cell wall expansion. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 951.
- Marjamaa, K., Kukkola, E. M., & Fagerstedt, K. V. (2009). The role of xylem class III peroxidases in lignification. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 367-376.
- Mani, M. S. (2013). Ecology of plant galls. Springer; Felt, E. P. (1918). Gall insects and their relations to plants. *The Scientific Monthly*, 6(6), 509-525.
- Mansoor, S., Ali Wani, O., Lone, J. K., Manhas, S., Kour, N., Alam, P., ... & Ahmad, P. (2022). Reactive oxygen species in plants: from source to sink. *Antioxidants*, 11(2), 225.
- Mapes, C. C., & Davies, P. J. (2001). Indole-3-acetic acid and ball gall development on *Solidago altissima*. *New Phytologist*, 151(1), 195-202.
- Marais, J. P., Deavours, B., Dixon, R. A., & Ferreira, D. (2006). The stereochemistry of flavonoids. In *The science of flavonoids* (pp. 1-46). Springer, New York, NY.
- Marchiosi, R., dos Santos, W. D., Constantin, R. P., de Lima, R. B., Soares, A. R., Finger-Teixeira, A., ... & Ferrarese-Filho, O. (2020). Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. *Phytochemistry Reviews*, 19(4), 865-906.
- Markel, K., Novak, V., Bowen, B. P., Tian, Y., Chen, Y. C., Sirirungruang, S., ... & Shih, P. M. (2024). Cynipid wasps systematically reprogram host metabolism and restructure cell walls in developing galls. *Plant Physiology*, 195(1), 698-712.
- Martini, V., Moreira, A. S. F. P., Kuster, V. C., & Oliveira, D. C. (2020). Photochemical performance and source-sink relationships in galls induced by *Pseudophacopteron longicaudatum* (Hemiptera) on leaves of *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae). *Photosynthetica*, 58(3), 827-835.
- Martinson, E. O., Werren, J. H. & Egan, S. P. (2022). Tissue-specific gene expression shows a cynipid wasp repurposes oak host gene networks to create a complex and novel parasite-specific organ. *Molecular Ecology*, 31(11), 3228-3240.
- Maruta, T., Tanouchi, A., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T., & Shigeoka, S. (2010). *Arabidopsis* chloroplastic ascorbate peroxidase isoenzymes play a dual role in photoprotection and gene regulation under photooxidative stress. *Plant and Cell Physiology*, 51(2), 190-200.
- Mashiguchi, K., Hisano, H., Takeda-Kamiya, N., Takebayashi, Y., Ariizumi, T., Gao, Y., ... & Kasahara, H. (2019). *Agrobacterium tumefaciens* enhances biosynthesis of two distinct auxins in the formation of crown galls. *Plant and Cell Physiology*, 60(1), 29-37.
- Masi, A., Ghisi, R., & Ferretti, M. (2002). Measuring low-molecular-weight thiols by detecting the fluorescence of their SBD-derivatives: application to studies of diurnal and UV-B induced changes in *Zea mays* L. *Journal of Plant Physiology*, 159(5), 499-507.
- Matsukura, K., Matsumura, M. & Tokuda, M. (2009). Host manipulation by the orange leafhopper *Cicadulina bipunctata*: gall induction on distant leaves by dose-dependent stimulation. *Naturwissenschaften*, 96(9), 1059-1066.
- McEvoy, P. B. (1996). Host specificity and biological pest control. *BioScience*, 46(6), 401-405.
- McInnis, S. M., Desikan, R., Hancock, J. T., & Hiscock, S. J. (2006). Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signalling crosstalk?. *New Phytologist*, 172(2), 221-228.
- Medina, C., Da Rocha, M., Magliano, M., Ratpopoulo, A., Revel, B., Marteu, N., ... & Jaubert-Possamai, S. (2017). Characterization of microRNAs from *Arabidopsis* galls highlights a role for miR159 in the plant response to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *New Phytologist*, 216(3), 882-896.

- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., & Noctor, G. (2010a). Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 61(15), 4197-4220.
- Mhamdi, A., Hager, J., Chaouch, S., Queval, G., Han, Y., Taconnat, L., ... & Noctor, G. (2010b). *Arabidopsis* GLUTATHIONE REDUCTASE1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular hydrogen peroxide and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiology*, 153(3), 1144-1160.
- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4).
- Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19(10), 16240-16265.
- Mignolet-Spruyt, L., Xu, E., Idänheimo, N., Hoerberichts, F. A., Mühlenbock, P., Brosché, M., ... & Kangasjärvi, J. (2016). Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 67(13), 3831-3844.
- Millard, P., & Grelet, G. A. (2010). Nitrogen storage and remobilization by trees: ecophysiological relevance in a changing world. *Tree Physiology*, 30(9), 1083-1095.
- Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M. A., Shulaev, V., ... & Mittler, R. (2009). The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling*, 2(84), ra45-ra45.
- Miller III, D. G., & Raman, A. (2019). Host-plant relations of gall-inducing insects. *Annals of the Entomological Society of America*, 112(1), 1-19.
- Milić, S., Bogdanović Pristov, J., Mutavdžić, D., Savić, A., Spasić, M., & Spasojević, I. (2015). The relationship of physicochemical properties to the antioxidative activity of free amino acids in Fenton system. *Environmental Science & Technology*, 49(7), 4245-4254.
- Mishra, P., Meena, R. I., Patni, V., & Kant, U. (2020). Alteration in phenolics during development of insect induced plant galls-a review. *Journal of the Indian Botanical Society*, 100(A), 302-317.
- Mishra, P., Saini, P., & Patni, V. (2024). Biochemical dynamics during development of insect-induced plant galls: a review. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 131(6), 1803-1818.
- Mithöfer, A., & Boland, W. (2008). Recognition of herbivory-associated molecular patterns. *Plant Physiology*, 146(3), 825-831.
- Mithöfer, A., Boland, W., & Maffei, M. E. (2009). Chemical ecology of plant-insect interactions. Molecular aspects of plant disease resistance. *Chirchester: Wiley-Blackwell*, 261-291.
- Mithöfer, A., & Boland, W. (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 431-450.
- Mitich, L. W. (1993). Yellow toadflax. *Weed Technology*, 7(3), 791-793.
- Mittapalli, O., Neal, J. J., & Shukle, R. H. (2007). Antioxidant defense response in a galling insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(6), 1889-1894.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G. A. D., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., ... & Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave?. *Trends in Plant Science*, 16(6), 300-309.
- Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in plant science*, 22(1), 11-19.
- Morales-Herrera, S., Paul, M. J., Van Dijck, P., & Beeckman, T. (2024). SnRK1/TOR/T6P: three musketeers guarding energy for root growth. *Trends in Plant Science*, 29(10), 1066-1076.

- Moreira, A. S. F. P., Kuster, V. C., & de Lima, J. F. (2025). Green galls can photosynthesize: gall metabolism and host organ impact. In *Plant Galls: Structure and Functions* (pp. 135-147). Cham: Springer Nature Switzerland.
- Morina, F., Jovanović, L., Kukavica, B., & Veljović Jovanović, S. (2008). Peroxidase, phenolics, and antioxidative capacity of common mullein (*Verbascum thapsus* L.) grown in a zinc excess. *Archives of Biological Sciences*, 60(4), 687-695.
- Morina, F., Jovanović, Lj., Mojović, M., Vidović, M., Panković, D., & Veljović Jovanović, S. (2010). Zinc-induced oxidative stress in *Verbascum thapsus* is caused by an accumulation of reactive oxygen species and quinhydrone in the cell wall. *Physiologia Plantarum*, 140(3), 209-224.
- Morina, F., Takahama, U., Yamauchi, R., Hirota, S., & Veljovic Jovanovic, S. (2015). Quercetin 7-O-glucoside suppresses nitrite-induced formation of dinitrosocatechins and their quinones in catechin/nitrite systems under stomach simulating conditions. *Food & Function*, 6(1), 218-228.
- Morina, F., Kuvelja, A., Brückner, D., Mojović, M., Nakarada, Đ., Bokhari, S. N. H., ... & Küpper, H. (2025). How eriophyid mites shape metal metabolism in leaf galls on *Tilia cordata*. *New Phytologist*, 246(5), 2222-2242.
- Morkunas, I., & Ratajczak, L. (2014). The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(7), 1607-1619.
- Morrison, I.M., 1972. A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 23(4), pp.455-463.
- Motta, L. B., Kraus, J. E., Salatino, A., & Salatino, M. L. (2005). Distribution of metabolites in galled and non-galled foliar tissues of *Tibouchina pulchra*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(10), 971-981.
- Motta, C. I., Luong, J. C., & Seltmann, K. C. (2022). Plant–arthropod interactions of an endangered California lupine. *Ecology and Evolution*, 12(3), e8688.
- Moura, J. C. M. S., Bonine, C. A. V., de Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M. C., & Mazzafera, P. (2010). Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(4), 360-376.
- Mullineaux, P. M., & Rausch, T. (2005). Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynthesis Research*, 86(3), 459-474.
- Murakami, R., Ushima, R., Sugimoto, R., Tamaoki, D., Karahara, I., Hanba, Y., ... & Tsuchida, T. (2021). A new galling insect model enhances photosynthetic activity in an obligate holoparasitic plant. *Scientific Reports*, 11(1), 13013.
- Nabavi, S. M., Šamec, D., Tomczyk, M., Milella, L., Russo, D., Habtemariam, S., ... & Shirooie, S. (2020). Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. *Biotechnology Advances*, 38, 107316.
- Nabity, P. D., Zavala, J. A., & DeLucia, E. H. (2009). Indirect suppression of photosynthesis on individual leaves by arthropod herbivory. *Annals of Botany*, 103(4), 655-663.
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867-880.
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., & Jacquot, J. P. (2007). Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 129(1), 185-195.
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998a). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology*, 49(1), 249-279.
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998b). Simultaneous measurement of foliar glutathione and amino acids by high-performance liquid chromatography: a comparison with two other methods for assay of glutathione. *Analytical Biochemistry*, 264, 98-110.

- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., & Foyer, C. H. (2002a). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of Experimental Botany*, *53*(372), 1283-1304.
- Noctor, G., Veljović Jovanović, S., Driscoll, S., Novitskaya, L., & Foyer, C. H. (2002b). Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration?. *Annals of Botany*, *89*(7), 841-850.
- Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., & Foyer, C. H. (2011). Glutathione. The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists, 9.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y. I., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., ... & Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment*, *35*(2), 454-484.
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (2016). Intracellular redox compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling. *Plant Physiology*, *171*(3), 1581-1592.
- Noctor, G., Reichheld, J. P., & Foyer, C. H. (2018). ROS-related redox regulation and signaling in plants. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 80, pp. 3-12). Academic Press.
- Noctor, G., Cohen, M., Trémulot, L., Châtel-Innocenti, G., Van Breusegem, F., & Mhamdi, A. (2024). Glutathione: a key modulator of plant defence and metabolism through multiple mechanisms. *Journal of Experimental Botany*, *75*(15), 4549-4572.
- Novitskaya, L., Trevanion, S. J., Driscoll, S., Foyer, C. H., & Noctor, G. (2002). How does photorespiration modulate leaf amino acid contents? A dual approach through modelling and metabolite analysis. *Plant, Cell & Environment*, *25*(7), 821-835.
- Nyman, T., & Julkunen-Tiitto, R. (2000). Manipulation of the phenolic chemistry of willows by gall-inducing sawflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(24), 13184-13187.
- O'Brien, J. A., Daudi, A., Butt, V. S., & Paul Bolwell, G. (2012). Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta*, *236*(3), 765-779.
- O'Hara, L. E., Paul, M. J., & Wingler, A. (2013). How do sugars regulate plant growth and development? New insight into the role of trehalose-6-phosphate. *Molecular Plant*, *6*(2), 261-274.
- Ó'Maoiléidigh, D. S., Graciet, E. & Wellmer, F. (2014). Gene networks controlling Arabidopsis thaliana flower development. *New Phytologist*, *201*(1), 16-30.
- Oates, C. N., Denby, K. J., Myburg, A. A., Slippers, B., & Naidoo, S. (2021). Insect egg-induced physiological changes and transcriptional reprogramming leading to gall formation. *Plant, Cell & Environment*, *44*(2), 535-547.
- Oliveira, D. C., & Isaias, R. M. S. (2010). Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). *South African Journal of Botany*, *76*(2), 239-248.
- Oliveira, D. C., Isaias, R. D. S., Fernandes, G. W., Ferreira, B. G., Carneiro, R. G. S., & Fuzaro, L. (2016). Manipulation of host plant cells and tissues by gall-inducing insects and adaptive strategies used by different feeding guilds. *Journal of Insect Physiology*, *84*, 103-113.
- Orozco-Cárdenas, M. L., Narváez-Vásquez, J., & Ryan, C. A. (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell*, *13*(1), 179-191.
- Olmstead, R. G., de Pamphilis, C. W., Wolfe, A. D., Young, N. D., Elisons, W. J., & Reeves, P. A. (2001). Disintegration of the Scrophulariaceae. *American Journal of Botany*, *88*(2), 348-361.
- Oxelmann, B., Kornhall, P., Olmstead, R. G., & Bremer, B. (2005). Further disintegration of Scrophulariaceae. *Taxon*, *54*(2), 411-425.
- Pacheco-Ordaz, R., Wall-Medrano, A., Goñi, M. G., Ramos-Clamont-Montfort, G., Ayala-Zavala, J. F., & González-Aguilar, G. A. (2018). Effect of phenolic compounds on the growth of selected probiotic and pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, *66*(1), 25-31.

- Păcurar, D. I., Thordal-Christensen, H., Păcurar, M. L., Pamfil, D., Botez, C., & Bellini, C. (2011). *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76(2), 76-81.
- Pallas, V., & García, J. A. (2011). How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *Journal of General Virology*, 92(12), 2691-2705.
- Pan, L. Y., Chen, W. N., Chiu, S. T., Raman, A., Chiang, T. C., & Yang, M. M. (2015). Is a gall an extended phenotype of the inducing insect? A comparative study of selected morphological and physiological traits of leaf and stem galls on *Machilus thunbergii* (Lauraceae) induced by five species of *Daphnephila* (Diptera: Cecidomyiidae) in Northeastern Taiwan. *Zoological Science*, 32(3), 314-321.
- Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., & Dwivedi, U. N. (2017a). A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 6(1), 308.
- Pandey, S., Fartyal, D., Agarwal, A., Shukla, T., James, D., Kaul, T., ... & Reddy, M. K. (2017b). Abiotic stress tolerance in plants: myriad roles of ascorbate peroxidase. *Frontiers in Plant Science*, 8, 581
- Pandian, B. A., Sathishraj, R., Djanaguiraman, M., Prasad, P. V., & Jugulam, M. (2020). Role of cytochrome P450 enzymes in plant stress response. *Antioxidants*, 9(5), 454.
- Parthasarathy, A., Cross, P. J., Dobson, R. C., Adams, L. E., Savka, M. A., & Hudson, A. O. (2018). A three-ring circus: metabolism of the three proteogenic aromatic amino acids and their role in the health of plants and animals. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5, 29.
- Passardi F, Penel C, Dunand C (2004) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*, 9(11), 534-540.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., & Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24(5), 255-265.
- Passardi F, Theiler G, Zamocky M, Cosio C, Rouhier N, Teixeira F, Dunand C (2007) PeroxiBase: the peroxidase database. *Phytochemistry*, 68(12), 1605-1611.
- Pastori, G. M., & Foyer, C. H. (2002). Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiology*, 129(2), 460-468.
- Parisy, V., Poinssot, B., Owsianowski, L., Buchala, A., Glazebrook, J., & Mauch, F. (2007). Identification of *PAD2* as a  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 49(1), 159-172.
- Pascual-Alvarado, E., Cuevas-Reyes, P., Quesada, M., & Oyama, K. (2008). Interactions between galling insects and leaf-feeding insects: the role of plant phenolic compounds and their possible interference with herbivores. *Journal of Tropical Ecology*, 24(3), 329-336.
- Pathak, A., Kumar, A., & Wany, A. (2025). Hydrogen peroxide is a central ROS regulator in plant immunity. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 1-25.
- Patil, J. R., Mhatre, K. J., Yadav, K., Yadav, L. S., Srivastava, S., & Nikalje, G. C. (2024). Flavonoids in plant-environment interactions and stress responses. *Discover Plants*, 1(1), 68.
- Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurrea, D., & Zhang, Y. (2008). Trehalose metabolism and signaling. *Annual review of Plant Biology*, 59, 417.
- Pawłowski, T. A., Staszak, A. M., Karolewski, P., & Giertych, M. J. (2017). Plant development reprogramming by cynipid gall wasp: proteomic analysis. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(5), 114.
- Pedley, K. F., & Martin, G. B. (2005). Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(5), 541-547.
- Peixoto, B., & Baena-González, E. (2022). Management of plant central metabolism by SnRK1 protein kinases. *Journal of Experimental Botany*, 73(20), 7068-7082.

- Petrussa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S., & Vianello, A. (2013). Plant flavonoids—biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(7), 14950-14973.
- Pichersky, E., & Lewinsohn, E. (2011). Convergent evolution in plant specialized metabolism. *Annual Review of Plant Biology*, *62*(1), 549-566.
- Piazza, A., Zimaro, T., Garavaglia, B. S., Ficarra, F. A., Thomas, L., Maronedze, C., ... & Gottig, N. (2015). The dual nature of trehalose in citrus canker disease: a virulence factor for *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and a trigger for plant defence responses. *Journal of Experimental Botany*, *66*(9), 2795-2811.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, *63*(7), 1035-1042.
- Pignocchi, C., & Foyer, C. H. (2003). Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, *6*(4), 379-389
- Pignocchi, C., & Foyer, C. H. (2003). Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, *6*(4), 379-389.)
- Pilon, M., Ravet, K., & Tapken, W. (2011). The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1807*(8), 989-998.
- Ponce, G. E., Fuse, M., Chan, A. & Connor, E. F. (2021). The localization of phytohormones within the gall-inducing insect *Eurosta solidaginis* (Diptera: Tephritidae). *Arthropod-Plant Interactions*, *15*(3), 375-385.
- Ponnu, J., Wahl, V., & Schmid, M. (2011). Trehalose-6-phosphate: connecting plant metabolism and development. *Frontiers in Plant Science*, *2*, 70.
- Pospíšil, P. (2016). Production of reactive oxygen species by photosystem II as a response to light and temperature stress. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1950.
- Prajapati, V. K., Vijayan, V., & Vadassery, J. (2024). Secret weapon of insects: the oral secretion cocktail and its modulation of host immunity. *Plant and Cell Physiology*, *65*(8), 1213-1223.
- Pratelli, R., & Pilot, G. (2014). Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *Journal of Experimental Botany*, *65*(19), 5535-5556.
- Price, P. W., Fernandes, G. W. & Waring, G. L. (1987). Adaptive nature of insect galls. *Environmental Entomology*, *16*(1), 15-24.
- Price, P. W. & Pschorn-Walcher, H. (1988). Are galling insects better protected against parasitoids than exposed feeders?: a test using tenthredinid sawflies. *Ecological Entomology*, *13*(2), 195-205.
- Qi, J., Sun, G., Wang, L., Zhao, C., Hettenhausen, C., Schuman, M. C., ... & Wu, J. (2016). Oral secretions from *Mythimna separata* insects specifically induce defence responses in maize as revealed by high-dimensional biological data. *Plant, Cell & Environment*, *39*(8), 1749-1766.
- Qiao, G., Xiao, S., Dong, J., Yang, Q., Che, H., & Sun, X. (2026). The multifaceted functions of plant asparagine synthetase: regulatory mechanisms and functional diversity in growth and defense. *Plants*, *15*(3), 362.
- Quan, L. J., Zhang, B., Shi, W. W., & Li, H. Y. (2008). Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology*, *50*(1), 2-18.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P. F., ... & Boerjan, W. (2004). Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. *Phytochemistry Reviews*, *3*(1), 29-60.
- Raman, A. (2011). Morphogenesis of insect-induced plant galls: facts and questions. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, *206*(6), 517-533.

- Raman, A. (2021). Gall-inducing insects and plants: the induction conundrum. *Current Science*, 120(1), 66.
- Ramel, F., Birtic, S., Cuiné, S., Triantaphylidès, C., Ravanat, J. L., & Havaux, M. (2012). Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. *Plant Physiology*, 158(3), 1267-1278.
- Rampon, C., Volovitch, M., Joliot, A., & Vríz, S. (2018). Hydrogen peroxide and redox regulation of developments. *Antioxidants*, 7(11), 159.
- Rawat, S. S., & Laxmi, A. (2024). Sugar signals pedal the cell cycle!. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1354561.
- Redfern (2011). Plant Galls. The New Naturalist Library No. 117.
- Rehill, B. J., & Schultz, J. C. (2003). Enhanced invertase activities in the galls of *Hormaphis hamamelidis*. *Journal of Chemical Ecology*, 29(12), 2703-2720.
- Reymond, P., Bodenhausen, N., Van Poecke, R. M., Krishnamurthy, V., Dicke, M., & Farmer, E. E. (2004). A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *The Plant Cell*, 16(11), 3132-3147.
- Reymond, P. (2013). Perception, signaling and molecular basis of oviposition-mediated plant responses. *Planta*, 238(2), 247-258.
- Ribeilli, J. B. F., & Douce, R. (1998). Serine and glycine metabolism in higher plants. In *Plant Amino Acids* (pp. 125-160). CRC Press.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159.
- Rico, A., & Preston, G. M. (2008). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 uses constitutive and apoplast-induced nutrient assimilation pathways to catabolize nutrients that are abundant in the tomato apoplast. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(2), 269-282.
- Riipi, M., Lempa, K., Haukioja, E., Ossipov, V., & Pihlaja, K. (2005). Effects of simulated winter browsing on mountain birch foliar chemistry and on the performance of insect herbivores. *Oikos*, 111(2), 221-234.
- Robert, C. A., Ferrieri, R. A., Schirmer, S., Babst, B. A., Schueller, M. J., Machado, R. A., ... & Erb, M. (2014). Induced carbon reallocation and compensatory growth as root herbivore tolerance mechanisms. *Plant, Cell & Environment*, 37(11), 2613-2622.
- Rodziewicz, P., Swarczewicz, B., Chmielewska, K., Wojakowska, A., & Stobiecki, M. (2014). Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(1), 1-19.
- Rohfritsch, O., & Shorthouse, J. D. (Eds.). (1992). *Biology of Insect-Induced Galls*. Oxford University Press.
- Roitsch, T. (1999). Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(3), 198-206.
- Roitsch, T., Balibrea, M. E., Hofmann, M., Proels, R., & Sinha, A. K. (2003). Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany*, 54(382), 513-524.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., & Sheen, J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 675-709.
- Roth, M. (1971). Fluorescence reaction for amino acids. *Analytical Chemistry*, 43(7), 880-882.
- Runyon, J. (2019). Invasive Species Science Update (No. 11). Fort Collins, CO: US Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. 12 p.
- Sagi, M., & Fluhr, R. (2006). Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology*, 141(2), 336-340.

- Sadasivam, S. and Manickam (2008) A Biochemical Method. 3rd Edition, New Age International Publishers, New Delhi.
- Sairanen, I., Novák, O., Pěnčík, A., Ikeda, Y., Jones, B., Sandberg, G., & Ljung, K. (2012). Soluble carbohydrates regulate auxin biosynthesis via PIF proteins in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(12), 4907-4916.
- Sakr, S., Wang, M., Dédaldéchamp, F., Perez-Garcia, M. D., Ogé, L., Hamama, L., & Atanassova, R. (2018). The sugar-signaling hub: overview of regulators and interaction with the hormonal and metabolic network. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2506.
- Saner, M. A., D. R. Clements, M. R. Hall, D. J. Doohan & C. W. Crompton (1995). The biology of Canadian weeds.105. *Linaria vulgaris* Mill. *Canadian Journal of Plant Science* 75: 525–537.
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., & Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution*, 3(3), 430-439.
- Solomon, P. S., Tan, K. C., & Oliver, R. P. (2003). The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. *Molecular Plant Pathology*, 4(3), 203-210.
- Santiago, R., Barros-Rios, J., & Malvar, R. A. (2013). Impact of cell wall composition on maize resistance to pests and diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 6960-6980.
- Scandalios, J. G., Guan, L., & Polidoros, A. N. (1997). Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. *Cold Spring Harbor Monograph Series*, 34, 343-406.
- Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(11), 1191-1212.
- Schertl, P., & Braun, H. P. (2014). Respiratory electron transfer pathways in plant mitochondria. *Frontiers in Plant Science*, 5, 163.
- Schlaeppli, K., Bodenhausen, N., Buchala, A., Mauch, F., & Reymond, P. (2008). The glutathione-deficient mutant *pad2-1* accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *The Plant Journal*, 55(5), 774-786.
- Schröder, R., Forstreuter, M., & Hilker, M. (2005). A plant notices insect egg deposition and changes its rate of photosynthesis. *Plant Physiology*, 138(1), 470-477.
- Schuetz, M., Benske, A., Smith, R. A., Watanabe, Y., Tobimatsu, Y., Ralph, J., ... & Samuels, A. L. (2014). Laccases direct lignification in the discrete secondary cell wall domains of protoxylem. *Plant Physiology*, 166(2), 798-807.
- Schultz, J. C., Edger, P. P., Body, M. J., & Appel, H. M. (2019). A galling insect activates plant reproductive programs during gall development. *Scientific Reports*, 9(1), 1833.
- Schwachtje, J., Minchin, P. E., Jahnke, S., van Dongen, J. T., Schittko, U., & Baldwin, I. T. (2006). SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(34), 12935-12940.
- Schwachtje, J., & Baldwin, I. T. (2008). Why does herbivore attack reconfigure primary metabolism?. *Plant Physiology*, 146(3), 845-851.
- Schweikert, C., Liskay, A., & Schopfer, P. (2000). Scission of polysaccharides by peroxidase-generated hydroxyl radicals. *Phytochemistry*, 53(5), 565-570.
- Schweizer, F., Bodenhausen, N., Lassueur, S., Masclaux, F. G., & Reymond, P. (2013). Differential contribution of transcription factors to *Arabidopsis thaliana* defense against *Spodoptera littoralis*. *Frontiers in Plant Science*, 4, 13.

- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012.
- Sharma, A., Shahzad, B., Kumar, V., Kohli, S. K., Sidhu, G. P. S., Bali, A. S., ... & Zheng, B. (2019). Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. *Biomolecules*, 9(7), 285.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., & Yoshimura, K. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1305-1319.
- Shigeto, J., Nagano, M., Fujita, K., & Tsutsumi, Y. (2014). Catalytic profile of *Arabidopsis* peroxidases, AtPrx-2, 25 and 71, contributing to stem lignification. *PLoS One*, 9(8), e105332.
- Shinya, T., Hojo, Y., Desaki, Y., Christeller, J. T., Okada, K., Shibuya, N., & Galis, I. (2016). Modulation of plant defense responses to herbivores by simultaneous recognition of different herbivore-associated elicitors in rice. *Scientific Reports*, 6(1), 32537.
- Shorthouse, J. D., Wool, D., & Raman, A. (2005). Gall-inducing insects—Nature's most sophisticated herbivores. *Basic and Applied Ecology*, 6(5), 407-411.
- Shorthouse, J. D. & Floate, K. D. (2010). Galls induced by cynipid wasps of the genus *Diplolepis* (Hymenoptera: Cynipidae) on the roses of Canada's grasslands. *Arthropods of Canadian Grasslands*. Biological Survey of Canada, Ottawa, 251-279.
- Shukle, R. H., Mittapalli, O., Morton, P. K., & Chen, M. S. (2009). Characterization and expression analysis of a gene encoding a secreted lipase-like protein expressed in the salivary glands of the larval Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say). *Journal of Insect Physiology*, 55(2), 105-112.
- Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G. & Mittler, R. (2008). Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum*, 132(2), 199-208.
- Sies, H., & Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 311(1152), 617-631.
- Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9-10), 916-921.
- Sies, H. (2020). Oxidative stress: Concept and some practical aspects. *Antioxidants*, 9(9), 852.
- Simmonds, M. S. (2003). Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge. *Phytochemistry*, 64(1), 21-30.
- Singh, V., Louis, J., Ayre, B. G., Reese, J. C., & Shah, J. (2011). TREHALOSE PHOSPHATE SYNTHASE11-dependent trehalose metabolism promotes *Arabidopsis thaliana* defense against the phloem-feeding insect *Myzus persicae*. *The Plant Journal*, 67(1), 94-104.
- Singh, S., Kaur, I., & Kariyat, R. (2021). The multifunctional roles of polyphenols in plant-herbivore interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1442.
- Singh, K., Gupta, R., Shokat, S., Iqbal, N., Kocsy, G., Pérez-Pérez, J. M., & Riyazuddin, R. (2024). Ascorbate, plant hormones and their interactions during plant responses to biotic stress. *Physiologia Plantarum*, 176(4), e14388.
- Skwarek-Fadecka, M., Nawrocka, J., Sieczyńska, K., Patykowski, J., & Posmyk, M. M. (2024). Effect of Oak Powdery Mildew on ascorbate-glutathione cycle and other antioxidants in Plant—*Erysiphe alphitoides* Interaction. *Cells*, 13(12), 1035.
- Slámová, K., Kapešová, J., & Valentová, K. (2018). "Sweet flavonoids": Glycosidase-catalyzed modifications. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 2126.
- Slocum, R. D. (2005). Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(8), 729-745.
- Smeekens, S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 51(1), 49-81.

- Smeeckens, S., Ma, J., Hanson, J., & Rolland, F. (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(3), 273-278.
- Smirnoff, N. (2000). Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(3), 229-235.
- Smirnoff, N., & Wheeler, G. L. (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(4), 267-290.
- Smirnoff, N., Conklin, P. L., & Loewus, F. A. (2001). Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annual Review of Plant Biology*, 52, 437.
- Smirnoff, N. (2005). Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants, 2005*, 53-86.
- Smirnoff, N. (2011). Vitamin C: the metabolism and functions of ascorbic acid in plants. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 59, pp. 107-177). Academic Press.
- Smirnoff, N. (2018). Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 116-129.
- Smith, I. K., Vierheller, T. L., & Thorne, C. A. (1989). Properties and functions of glutathione reductase in plants. *Physiologia Plantarum*, 77(3), 449-456.
- Smith, M. R., Rao, I. M., & Merchant, A. (2018). Source-sink relationships in crop plants and their influence on yield development and nutritional quality. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1889.
- Sng, N. J., Kolaczkowski, B., Ferl, R. J., & Paul, A. L. (2019). A member of the CONSTANS-Like protein family is a putative regulator of reactive oxygen species homeostasis and spaceflight physiological adaptation. *AoB Plants*, 11(1), ply075.
- Spiteller, G. (2003). The relationship between changes in the cell wall, lipid peroxidation, proliferation, senescence and cell death. *Physiologia Plantarum*, 119(1), 5-18.
- Stahl, E., Hilfiker, O. & Reymond, P. (2018). Plant–arthropod interactions: who is the winner?. *The Plant Journal*, 93(4), 703-728.
- Staszak, A. M., Ratajczak, E., Leśniewska, J., Piotrowska-Niczyporuk, A., & Kostro-Ambroziak, A. (2023). A broad spectrum of host plant responses to the actions of the gall midge: case study of *Robinia pseudoacacia* L. and *Obolodiplosis robiniae* (Haldeman). *BMC Plant Biology*, 23(1), 19.
- Staszak, A. M., Kostro-Ambroziak, A., Sienkiewicz, A., & Piotrowska-Niczyporuk, A. (2026). Hormone variation in *Robinia pseudoacacia* L.(Fabaceae) leaves during gall formation by *Oblongoides robiniae* (Haldeman)(Diptera: Cecidomyiidae). *Scientific Reports*, 16(1), 8815.
- Steinbrenner, A. D., Gómez, S., Osorio, S., Fernie, A. R., & Orians, C. M. (2011). Herbivore-induced changes in tomato (*Solanum lycopersicum*) primary metabolism: a whole plant perspective. *Journal of Chemical Ecology*, 37(12), 1294-1303.
- Stirbet, A. and Govindjee (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 104(1-2), 236-257.
- Stone, G. N. & Schönrogge, K. (2003). The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(10), 512-522.
- Sun, Q., Chang, L., Ren, Y., Cao, L., Sun, Y., Du, Y., ... & Zhang, L. (2012). Simultaneous analysis of 11 main active components in *Cirsium setosum* based on HPLC-ESI-MS/MS and combined with statistical methods. *Journal of Separation Science*, 35(21), 2897-2907.
- Sun, Z., Fridrich, B., De Santi, A., Elangovan, S., & Barta, K. (2018). Bright side of lignin depolymerization: toward new platform chemicals. *Chemical Reviews*, 118(2), 614-678.

- Suprasanna, P., Nikalje, G. C., & Rai, A. N. (2016). Osmolyte accumulation and implications in plant abiotic stress tolerance. In *Osmolytes and plants acclimation to changing environment: Emerging Omics Technologies* (pp. 1-12). Springer, New Delhi.
- Suzuki, D. K., Fukushi, Y. & Akimoto, S. I. (2009). Do aphid galls provide good nutrients for the aphids?: comparisons of amino acid concentrations in galls among *Tetraneura species* (Aphididae: Eriosomatinae). *Arthropod-Plant Interactions*, 3(4), 241-247.
- Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M. A., & Mittler, R. (2011). Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(6), 691-699.
- Suzuki, H., Yokokura, J., Ito, T., Arai, R., Yokoyama, C., Toshima, H., ... & Suzuki, Y. (2014). Biosynthetic pathway of the phytohormone auxin in insects and screening of its inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 53, 66-72.
- Svara, A., Tarkowski, Ł. P., Janse van Rensburg, H. C., Deleye, E., Vaerten, J., De Storme, N., ... & Van den Ende, W. (2020). Sweet immunity: the effect of exogenous fructans on the susceptibility of apple (*Malus domestica* Borkh.) to *Venturia inaequalis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5885.
- Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Vujčić Bok, V., & Salopek-Sondi, B. (2021). The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure. *Plants*, 10(1), 118.
- Takahama, U., & Oniki, T. (1997). A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiologia Plantarum*, 101(4), 845-852.
- Takahama, U. (2004). Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochemistry Reviews*, 3(1), 207-219.
- Takeda, S., Gapper, C., Kaya, H., Bell, E., Kuchitsu, K., & Dolan, L. (2008). Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science*, 319(5867), 1241-1244.
- Takeda, S., Yoza, M., Amano, T., Ohshima, I., Hirano, T., Sato, M. H., ... & Kimura, S. (2019). Comparative transcriptome analysis of galls from four different host plants suggests the molecular mechanism of gall development. *PLoS One*, 14(10), e0223686.
- Takeda, S., Hirano, T., Ohshima, I. & Sato, M. H. (2021). Recent progress regarding the molecular aspects of insect gall formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9424.
- Tanaka, Y., Okada, K., Asami, T. & Suzuki, Y. (2013). Phytohormones in Japanese mugwort gall induction by a gall-inducing gall midge. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 130406.
- Tang, B., Wang, S., Wang, S. G., Wang, H. J., Zhang, J. Y., & Cui, S. Y. (2018). Invertebrate trehalose-6-phosphate synthase gene: genetic architecture, biochemistry, physiological function, and potential applications. *Frontiers in Physiology*, 9, 30.
- Taper, M. L., Zimmerman, E. M., & Case, T. J. (1986). Sources of mortality for a cynipid gall-wasp (*Dryocosmus dubiosus* (Hymenoptera: Cynipidae)): the importance of the tannin/fungus interaction. *Oecologia*, 68(3), 437-445.
- Tariq, A., Rizwan, M., Rafique, M. K., Sajid, S. N., Fatima, Z., Buneen, U., ... & Haroon, H. (2020). Expression of Oxidative Enzymes in Cotton Plant under Biotic Stress. *International Journal*, 10(5), 494-508.
- Tatipamula, V. B., & Kukavica, B. (2021). Phenolic compounds as antidiabetic, anti-inflammatory, and anticancer agents and improvement of their bioavailability by liposomes. *Cell Biochemistry and Function*, 39(8), 926-944.
- Tauzin, A. S., & Giardina, T. (2014). Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 5, 293.
- Taylor, L. P., & Grotewold, E. (2005). Flavonoids as developmental regulators. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(3), 317-323.
- Teixeira, C. T., Oliveira, D. C. D., Kuster, V. C., & Isaias, R. M. D. S. (2018). Immunocytochemical demonstration of cell wall components related to tissue compartments in the globoid

- galls induced by *Clinodiplosis* sp. (Cecidomyiidae) on *Croton floribundus* Spreng.(Euphorbiaceae). *Botany*, 96(1), 9-18.
- Teixeira, E. C., & Ferreira, R. O. (2021). Seasonal variation of phenols and flavonoids in non-galled and galled leaves of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae).
- Tiwari, R. K., Goswami, S. K., Gujjar, R. S., Kumar, R., Kumar, R., Lal, M. K., & Kumari, M. (2025). Mechanistic insights on lignin-mediated plant defense against pathogen infection. *Plant Physiology and Biochemistry*, 228, 110224.
- Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H., & Simon, P. (2002). Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 288(1-2), 129-138.
- Tokuda, M., Suzuki, Y., Fujita, S., Matsuda, H., Adachi-Fukunaga, S., & Elsayed, A. K. (2022). Terrestrial arthropods broadly possess endogenous phytohormones auxin and cytokinins. *Scientific Reports*, 12(1), 4750.
- Tooker, J. F., & De Moraes, C. M. (2008). Gall insects and indirect plant defenses: a case of active manipulation?. *Plant Signaling & Behavior*, 3(7), 503-504.
- Tooker, J. F. & De Moraes, C. M. (2011). Feeding by a gall-inducing caterpillar species alters levels of indole-3-acetic and abscisic acid in *Solidago altissima* (Asteraceae) stems. *Arthropod-Plant Interactions*, 5(2), 115-124.
- Torrens-Spence, M. P., Bobokalonova, A., Carballo, V., Glinkerman, C. M., Pluskal, T., Shen, A., & Weng, J. K. (2019). PBS3 and EPS1 complete salicylic acid biosynthesis from isochorismate in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 12(12), 1577-1586
- Torres, M. A., Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*, 141(2), 373-378.
- Tooker, J. F., & Helms, A. M. (2014). Phytohormone dynamics associated with gall insects, and their potential role in the evolution of the gall-inducing habit. *Journal of Chemical Ecology*, 40(7), 742-753.
- Torres, M. A. (2010). ROS in biotic interactions. *Physiologia plantarum*, 138(4), 414-429.
- Toševski, I., Gassmann, A. & Desančić, M. (2005). Biological Control of Dalmatian and yellow toadflaxes (*Linaria dalmatica* and *L. vulgaris*) – Annual Report 2004. Unpublished Annual Report. CABI Bioscience Switzerland Centre, Delémont.
- Toševski, I., Mitrović, M., Krstić, O., Jović, J. & Gassmann, A. (2012). Biological Control of Dalmatian and yellow toadflaxes, *Linaria dalmatica* and *L. vulgaris* – Annual Report 2011. Unpublished Annual Report. CABI Switzerland Centre, Delémont.
- Toševski, I., Caldara, R., Jović, J., Hernandez-Vera, G., Baviera, C., Gassmann, A. & Emerson, B.C. (2015). Host-associated genetic divergence and taxonomy in the *Rhinusa pilosa* Gyllenhal species complex: an integrative approach. *Systematic Entomology*, 40(1), 268–287.
- Toševski, I., Krstić, O., Jović, J., Vidović, B. & Petanović, R. (2018). Insects and mites in the fauna of Serbia-importance for the classical biological control of weeds. *Ecological and Economic Significance of Fauna of Serbia*, 171, 341-365.
- Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 4(3), 147-157.
- Trovato, M., Funck, D., Forlani, G., Okumoto, S., & Amir, R. (2021). Amino acids in plants: Regulation and functions in development and stress defense. *Frontiers in Plant Science*, 12, 772810
- Tsuduki, M., Takano, T., Nakatsubo, F., Yoshida, K., Shinmyo, A., & Asao, H. (2006). Resistance to insects in transgenic *Solanum* plants expressing a peroxidase gene from horseradish. *Plant Biotechnology*, 23(1), 71-74.
- Van Leene, J., Eeckhout, D., Gadeyne, A., Matthijs, C., Han, C., De Winne, N., ... & De Jaeger, G. (2022). Mapping of the plant SnRK1 kinase signalling network reveals a key regulatory role for the class II T6P synthase-like proteins. *Nature Plants*, 8(11), 1245-1261.

- Van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44(1), 135-162.
- Vega-Muñoz, I., Duran-Flores, D., Fernández-Fernández, Á. D., Heyman, J., Ritter, A., & Stael, S. (2020). Breaking bad news: dynamic molecular mechanisms of wound response in plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 610445.
- Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249-259.
- Velikova, V., Salerno, G., Frati, F., Peri, E., Conti, E., Colazza, S., & Loreto, F. (2010). Influence of feeding and oviposition by phytophagous pentatomids on photosynthesis of herbaceous plants. *Journal of Chemical Ecology*, 36(6), 629-641.
- Veljović Jovanović, S. D., Pignocchi, C., Noctor, G., & Foyer, C. H. (2001). Low ascorbic acid in the *vtc-1* mutant of Arabidopsis is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiology*, 127(2), 426-435.
- Veljović Jovanović, S., Kukavica, B., Stevanović, B., & Navari-Izzo, F. (2006). Senescence-and drought-related changes in peroxidase and superoxide dismutase isoforms in leaves of *Ramonda serbica*. *Journal of Experimental Botany*, 57(8), 1759-1768.
- Veljović Jovanović, S., Vidović, M., & Morina, F. (2017). Ascorbate as a key player in plant abiotic stress response and tolerance. In *Ascorbic Acid in Plant Growth, development and stress tolerance* (pp. 47-109). Springer, Cham.
- Veljović Jovanović, S., Kukavica, B., Vidović, M., Morina, F., & Menckhoff, L. (2018). Class III peroxidases: functions, localization and redox regulation of isoenzymes. In *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants* (pp. 269-300). Springer, Cham.
- Vidović, M., Morina, F., Milić, S., & Jovanović, S. V. (2015a). An improved HPLC-DAD method for simultaneously measuring phenolics in the leaves of *Tilia platyphyllos* and *Ailanthus altissima*. *Botanica Serbica*, 39(2), 177-186.
- Vidović, M., Morina, F., Milić, S., Albert, A., Zechmann, B., Winkler, J.B. & Veljovic Jovanovic, S. (2015b). Ultraviolet-B component of sunlight stimulates photosynthesis and flavonoid accumulation in variegated *Plectranthus coleoides* leaves depending on background light. *Plant, Cell & Environment*, 38(5), pp.968-979.
- Vidović, M., Morina, F., Milić, S., Albert, A., Zechmann, B., Tosti, T., ... & Veljović Jovanović, S. (2015c). Carbon allocation from source to sink leaf tissue in relation to flavonoid biosynthesis in variegated *Pelargonium zonale* under UV-B radiation and high PAR intensity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 93, 44-55.
- Vidović, M., Morina, F., Milić-Komić, S., Vuleta, A., Zechmann, B., Prokić, L., & Veljović Jovanović, S. (2016). Characterisation of antioxidants in photosynthetic and non-photosynthetic leaf tissues of variegated *Pelargonium zonale* plants. *Plant Biology*, 18(4), 669-680.
- Vincent, T. R., Avramova, M., Canham, J., Higgins, P., Bilkey, N., Mugford, S. T., ... & Sanders, D. (2017). Interplay of plasma membrane and vacuolar ion channels, together with BAK1, elicits rapid cytosolic calcium elevations in Arabidopsis during aphid feeding. *The Plant Cell*, 29(6), 1460-1479.
- Voelckel, C., Weisser, W. W., & Baldwin, I. T. (2004). An analysis of plant-aphid interactions by different microarray hybridization strategies. *Molecular Ecology*, 13(10), 3187-3195.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2-20.
- Wang, H., Shi, S., & Hua, W. (2023). Advances of herbivore-secreted elicitors and effectors in plant-insect interactions. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1176048.
- Wang, D., Bu, F., Yang, G., Brenke, H., & Liu, B. (2024). Structure of the endogenous insect acetyl-coA carboxylase carboxyltransferase domain. *Journal of Biological Chemistry*, 300(10), 107800.

- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., & Sharma, H. C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*, 7(10), 1306-1320.
- War, A. R., Taggar, G. K., Hussain, B., Taggar, M. S., Nair, R. M., & Sharma, H. C. (2018). Plant defence against herbivory and insect adaptations. *AoB Plants*, 10(4), ply037.
- Waszczak, C., Akter, S., Jacques, S., Huang, J., Messens, J., & Van Breusegem, F. (2015). Oxidative post-translational modifications of cysteine residues in plant signal transduction. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2923-2934.
- Weise, S. E., Weber, A. P., & Sharkey, T. D. (2004). Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta*, 218(3), 474-482.
- Weng, J. K., & Chapple, C. (2010). The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytologist*, 187(2), 273-285.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., ... & Van Camp, W. (1997). Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO journal*, 16(16), 4806-4816.
- Wingler, A., & Roitsch, T. (2008). Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biology*, 10, 50-62.
- Wingler, A., & Henriques, R. (2022). Sugars and the speed of life—Metabolic signals that determine plant growth, development and death. *Physiologia Plantarum*, 174(2), e13656.
- Winkel, B. S. (2004). Metabolic channeling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 85.
- Wittstock, U., & Gershenzon, J. (2002). Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(4), 300-307.
- Wool, D. (2004). Gallling aphids: specialization, biological complexity, and variation. *Annual Review of Entomology*, 49(1), 175-192.
- Wu, G., Shortt, B. J., Lawrence, E. B., Leon, J., Fitzsimmons, K. C., Levine, E. B., ... & Shah, D. M. (1997). Activation of host defense mechanisms by elevated production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic plants. *Plant Physiology*, 115(2), 427-435.
- Wu, J., Hettenhausen, C., Meldau, S., & Baldwin, I. T. (2007). Herbivory rapidly activates MAPK signaling in attacked and unattacked leaf regions but not between leaves of *Nicotiana attenuata*. *The Plant Cell*, 19(3), 1096-1122.
- Wu, J., & Baldwin, I. T. (2009). Herbivory-induced signalling in plants: perception and action. *Plant, Cell & Environment*, 32(9), 1161-1174.
- Wu, J., & Baldwin, I. T. (2010). New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annual Review of Genetics*, 44, 1-24.
- Wurzinger, B., Nukarinen, E., Nägele, T., Weckwerth, W., & Teige, M. (2018). The SnRK1 kinase as central mediator of energy signaling between different organelles. *Plant Physiology*, 176(2), 1085-1094.
- Xie, M., Zhang, J., Tschaplinski, T. J., Tuskan, G. A., Chen, J. G., & Muchero, W. (2018). Regulation of lignin biosynthesis and its role in growth-defense tradeoffs. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1427.
- Xing, D. H., Lai, Z. B., Zheng, Z. Y., Vinod, K. M., Fan, B. F., & Chen, Z. X. (2008). Stress-and pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY48 is a transcriptional activator that represses plant basal defense. *Molecular Plant*, 1(3), 459-470.
- Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., & Sheen, J. (2013). Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*, 496(7444), 181-186.
- Xu, N., Chen, G., & Liu, H. (2017). Antioxidative categorization of twenty amino acids based on experimental evaluation. *Molecules*, 22(12), 2066.

- Yadav, U. P., Ivakov, A., Feil, R., Duan, G. Y., Walther, D., Giavalisco, P., ... & Lunn, J. E. (2014). The sucrose-trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P. *Journal of Experimental Botany*, 65(4), 1051-1068.
- Yadav, S., & Chattopadhyay, D. (2023). Lignin: the building block of defense responses to stress in plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(10), 6652-6666.
- Yamaguchi, H., Tanaka, H., Hasegawa, M., Tokuda, M., Asami, T. & Suzuki, Y. (2012). Phytohormones and willow gall induction by a gall-inducing sawfly. *New Phytologist*, 196(2), 586-595.
- Yamaguchi, Y. L., Ishida, T. & Sawa, S. (2016). CLE peptides and their signaling pathways in plant development. *Journal of Experimental Botany*, 67(16), 4813-4826.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y., & Ikehara, N. (1997). Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiology*, 115(4), 1405-1412.
- Yang, C. M., Yang, M. M., Huang, M. Y., Hsu, J. M., & Jane, W. N. (2007). Life time deficiency of photosynthetic pigment-protein complexes CP1, A1, AB1, and AB2 in two cecidomyiid galls derived from *Machilus thunbergii* leaves. *Photosynthetica*, 45(4), 589-593.
- Yang, S. K., Low, L. Y., Soo-Xi Yap, P., Yusoff, K., Mai, C. W., Lai, K. S., & Erin Lim, S. H. (2018). Plant-derived antimicrobials: insights into mitigation of antimicrobial resistance. *Records of Natural Products*, 12(4), 295-316.
- Yang, X. H., Li, X. M., & Zhu, D. H. (2020). Alteration of free amino acid concentrations in insect galls induced by *Andricus mukaigawae* (Hymenoptera; Cynipidae). *Ecological Entomology*, 45(5), 945-954.
- Yang, M., Li, H., Qiao, H., Guo, K., Xu, R., Wei, H., ... & Xu, C. (2023). Integrated transcriptome and metabolome dynamic analysis of galls induced by the gall mite *Aceria pallida* on *Lycium barbarum* reveals the molecular mechanism underlying gall formation and development. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 9839.
- Yoo, H., Widhalm, J. R., Qian, Y., Maeda, H., Cooper, B. R., Jannasch, A. S., ... & Dudareva, N. (2013). An alternative pathway contributes to phenylalanine biosynthesis in plants via a cytosolic tyrosine: phenylpyruvate aminotransferase. *Nature Communications*, 4(1), 1-11.
- Yoshimura, K., Ishikawa, T., Nakamura, Y., Tamoi, M., Takeda, T., Tada, T., ... & Shigeoka, S. (1998). Comparative study on recombinant chloroplastic and cytosolic ascorbate peroxidase isozymes of spinach. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 353(1), 55-63.
- Zaynab, M., Fatima, M., Sharif, Y., Zafar, M. H., Ali, H., & Khan, K. A. (2019). Role of primary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial pathogenesis*, 137, 103728.
- Zebelo, S. A., & Maffei, M. E. (2015). Role of early signalling events in plant-insect interactions. *Journal of Experimental Botany*, 66(2), 435-448.
- Zechmann, B., Mauch, F., Sticher, L., & Müller, M. (2008). Subcellular immunocytochemical analysis detects the highest concentrations of glutathione in mitochondria and not in plastids. *Journal of Experimental Botany*, 59(14), 4017-4027.
- Zechmann, B. (2011). Subcellular distribution of ascorbate in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(3), 360-363.
- Zechmann, B., Stumpe, M., & Mauch, F. (2011). Immunocytochemical determination of the subcellular distribution of ascorbate in plants. *Planta*, 233(1), 1-12.
- Zechmann, B. (2018). Compartment-specific importance of ascorbate during environmental stress in plants. *Antioxidants & Redox Signaling*, 29(15), 1488-1501.
- Zechmann, B. (2020). Subcellular roles of glutathione in mediating plant defense during biotic stress. *Plants*, 9(9), 1067.
- Zeeman, S. C., Kossmann, J., & Smith, A. M. (2010). Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annual review of plant biology*, 61(1), 209-234.

- Zeier, J. (2013). New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant, Cell & Environment*, 36(12), 2085-2103.
- Zeilmaker, T., Ludwig, N. R., Elberse, J., Seidl, M. F., Berke, L., Van Doorn, A., ... & Van den Ackerveken, G. (2015). DOWNY MILDEW RESISTANT 6 and DMR 6-LIKE OXYGENASE 1 are partially redundant but distinct suppressors of immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 81(2), 210-222.
- Zhang, S. H., Yang, Q., & Ma, R. C. (2007). *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* infection induced "defense lignin" accumulation and lignin biosynthetic gene expression in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(7), 993-1002.
- Zhang, Y., Primavesi, L. F., Jhurrea, D., Andralojc, P. J., Mitchell, R. A., Powers, S. J., ... & Paul, M. J. (2009). Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiology*, 149(4), 1860-1871.
- Zhang, H., de Bernonville, T. D., Body, M., Glevarec, G., Reichelt, M., Unsicker, S., ... & Giron, D. (2016). Leaf-mining by *Phyllonorycter blancardella* reprograms the host-leaf transcriptome to modulate phytohormones associated with nutrient mobilization and plant defense. *Journal of Insect Physiology*, 84, 114-127.
- Zhang, Q., Li, T., Gao, M., Ye, M., Lin, M., Wu, D., ... & He, G. (2022a). Transcriptome and metabolome profiling reveal the resistance mechanisms of rice against brown planthopper. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4083.
- Zhang, X., Ran, W., Li, X., Zhang, J., Ye, M., Lin, S., ... & Sun, X. (2022b). Exogenous application of gallic acid induces the direct defense of tea plant against *Ectropis obliqua* caterpillars. *Frontiers in Plant Science*, 13, 833489.
- Zhang, W., Wang, S., Yang, J., Kang, C., Huang, L., & Guo, L. (2022c). Glycosylation of plant secondary metabolites: Regulating from chaos to harmony. *Environmental and Experimental Botany*, 194, 104703.
- Zhang, Y., Xu, J., Li, R., Ge, Y., Li, Y., & Li, R. (2023). Plants' response to abiotic stress: Mechanisms and strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10915.
- Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 49-64.
- Zhao, J. (2015a). Flavonoid transport mechanisms: how to go, and with whom. *Trends in Plant Science*, 20(9), 576-585.
- Zhao, C., Escalante, L. N., Chen, H., Benatti, T. R., Qu, J., Chellapilla, S., ... & Richards, S. (2015b). A massive expansion of effector genes underlies gall-formation in the wheat pest *Mayetiola destructor*. *Current Biology*, 25(5), 613-620.
- Zhao, C., Shukle, R., Navarro-Escalante, L., Chen, M., Richards, S., & Stuart, J. J. (2016). Avirulence gene mapping in the Hessian fly (*Mayetiola destructor*) reveals a protein phosphatase 2C effector gene family. *Journal of Insect Physiology*, 84, 22-31.
- Zhou, S., Lou, Y. R., Tzin, V., & Jander, G. (2015). Alteration of plant primary metabolism in response to insect herbivory. *Plant Physiology*, 169(3), 1488-1498.
- Zhu, L., Chen, M. S., & Liu, X. (2011). Changes in phytohormones and fatty acids in wheat and rice seedlings in response to Hessian fly (Diptera: Cecidomyiidae) infestation. *Journal of economic entomology*, 104(4), 1384-1392.
- Zhu, X., Fang, D., Li, D., Zhang, J., Jiang, H., Guo, L., ... & Qiao, Y. (2023). *Phytophthora sojae* boosts host trehalose accumulation to acquire carbon and initiate infection. *Nature Microbiology*, 8(8), 1561-1573.
- Zhu-Salzman, K., Salzman, R. A., Ahn, J. E., & Koiwa, H. (2004). Transcriptional regulation of sorghum defense determinants against a phloem-feeding aphid. *Plant Physiology*, 134(1), 420-431.

- Zou, J., & Cates, R. G. (1994). Role of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) carbohydrates in resistance to budworm (*Choristoneura occidentalis*). *Journal of Chemical Ecology*, 20(2), 395-405.
- Zulfiqar, F., Akram, N. A., & Ashraf, M. (2020). Osmoprotection in plants under abiotic stresses: New insights into a classical phenomenon. *Planta*, 251(1), 1-17.
- Živanović, B., Milić Komić, S., Tosti, T., Vidović, M., Prokić, L., & Veljović Jovanović, S. (2020). Leaf soluble sugars and free amino acids as important components of abscisic acid—Mediated drought response in tomato. *Plants*, 9(9), 1147.

## 8. Prilozi

**Tabela P1.** Sadržaj aminokiselina (pmol g<sup>-1</sup>FW) u stablu i galama *L. vulgaris*. CS- *L. vulgaris* kontrolne biljke, HS- biljke nakon herbivorije, G4S i G5S- biljke sa formiranim galama (7 i 10 dana nakon izvršenih ovipozicija). Predstavljene su srednje vrednosti ± SE (n≥4). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu (p ≤ 0,05).

Aminokiseline	CS	HS	G4S	G5S
Asparaginska kiselina	0,46 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,71 ± 0,07 <sup>ab</sup>	0,78 ± 0,09 <sup>b</sup>
Glutaminska kiselina	0,65 ± 0,02 <sup>ab</sup>	1,21 ± 0,22 <sup>b</sup>	1,84 ± 0,14 <sup>c</sup>	0,62 ± 0,03 <sup>a</sup>
Asparagin	0,03 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,86 ± 0,81 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>a</sup>
Serin	0,42 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,93 ± 0,13 <sup>c</sup>	0,91 ± 0,09 <sup>b</sup>	0,66 ± 0,03 <sup>ab</sup>
Glutamin	0,50 ± 0,09 <sup>a</sup>	11,56 ± 2,12 <sup>c</sup>	5,78 ± 0,30 <sup>b</sup>	4,42 ± 0,09 <sup>b</sup>
Arginin	0,05 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,25 ± 0,10 <sup>c</sup>	0,19 ± 0,08 <sup>ab</sup>	0,43 ± 0,04 <sup>b</sup>
Glicin	0,08 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,93 ± 0,57 <sup>c</sup>	1,73 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,63 ± 0,12 <sup>a</sup>
Treonin	0,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,33 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,62 ± 0,03 <sup>c</sup>
Alanin	0,04 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,29 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,24 ± 0,02 <sup>b</sup>
Tirozin	0,06 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a</sup>
Triptofan	0,02 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>b</sup>
Metionin	0,03 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,07 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,07 ± 0,00 <sup>ab</sup>
Valin	0,14 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,07 <sup>c</sup>	0,23 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,36 ± 0,09 <sup>b</sup>
Fenilalanin	0,07 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>b</sup>
Izoleucin	0,11 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,27 ± 0,04 <sup>ab</sup>
Leucin	0,11 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,28 ± 0,02 <sup>b</sup>
Lizin	0,02 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,08 ± 0,00 <sup>ab</sup>
Ornitin	0,03 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>Ukupne aminokiseline</b>	<b>2,91 ± 0,28<sup>a</sup></b>	<b>29,25 ± 2,81<sup>c</sup></b>	<b>12,55 ± 0,76<sup>b</sup></b>	<b>12,02 ± 0,53<sup>b</sup></b>

**Tabela P2.** Fenolna jedinjenja nađena u cecidogenu i kontrolnom stablu *L. vulgaris* u negativnom jonizacionom modu. n.d. (eng, *not detected*)- nije detektovano u uzorku.

Broj pika	$t_R$ , min	Molekulska formula, [M-H] <sup>-</sup>	Izračunata masa, [M-H] <sup>-</sup>	Tačna masa [M-H] <sup>-</sup>	$\Delta$ ppm	MS <sup>2</sup> fragmenti	MS <sup>3</sup> fragmenti	MS <sup>4</sup> fragmenti	Identifikacija
1	2,73	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	169,01	169,01345	4,73	125(100)	107(100)	n.d.	Galna kiselina <sup>a</sup>
2	4,04	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> O <sub>9</sub> <sup>-</sup>	315,07	315,07066	4,76	153(100), 152(50), 109(15), 108(10)	109(100)	84(100), 81(60)	Protokatehuinska kiselina- O-heksozid
3	4,04	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub> <sup>-</sup>	299,07	299,07584	4,68	137(100)	93(10)	n.d.	Hidroksibenzoeva kiselina- O-heksozid izomer 1
4	4,51	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> <sup>-</sup>	153,01	153,01866	4,38	109(100), 95(75), 79(20), 59(10)	81(100), 68(25), 65(15)	ND	Protokatehuinska kiselina <sup>a</sup>
5	5,04	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub> <sup>-</sup>	299,07724	299,07593	4,38	137(100)	93(10)	ND	Hidroksibenzoeva kiselina- O-heksozid izomer 2
6	5,34	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup>	137,02442	137,02376	4,82	109(10), 93(100)	93(10)	ND	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina <sup>a</sup>
7	5,34	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub> <sup>-</sup>	325,09289	325,09135	4,74	163(100), 119(10)	119(100)	119(100), 93(80)	Kumarinska kiselina-O- heksozid
8	5,48	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub> <sup>-</sup>	595,16684	595,16479	3,44	577(15), 505(25), 475(85), 385(80), 355(100)	311(20), 249(30), 235(100), 209(45), 167(25)	207(100), 191(80), 167(45), 151(35), 121(30)	Naringenin-6,8-di-C- heksozid
9	5,54	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup>	151,04007	151,03932	4,97	121(15), 107(100), 95(70), 79(15), 59(25)	123(10), 95(30), 79(100), 69(10), 51(20)	ND	<i>p</i> -Hidrofenil-sirćetna kiselina <sup>a</sup>
10	5,68	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub> <sup>-</sup>	593,15119	593,14856	4,43	575(10), 503(30), 473(100), 383(20), 353(40)	455(5), 383(20), 353(100)	325(100), 297(60)	Apigenin-6,8-di-C-heksozid
11	5,72	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> <sup>-</sup>	179,03498	179,0341	4,92	135(100), 117(10), 91(20), 59(15)	107(100), 59(50)	ND	Kafeinska kiselina <sup>a</sup>
12	5,73	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> <sup>-</sup>	167,03498	167,03419	4,73	153(10), 152(80), 124(10), 123(100), 108(20)	108(100)	79(100)	Vanilinska kiselina <sup>a</sup>

13	5,78	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub> <sup>-</sup>	355,10346	355,10199	4,14	217(60), 193(100), 175(40), 134(10)	178(20), 149(40), 134(100)	134(50), 106(100)	<b>Ferulinska kiselina-<i>O</i>-heksozid</b>
14	5,85	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	197,04555	197,04459	4,87	182(100), 153(50), 138(10)	167(100), 138(10), 123(5)	123(100)	<b>Siringinska kiselina<sup>a</sup></b>
15	6,42	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub> <sup>-</sup>	609,14611	609,14313	4,89	343(5), 301(100), 300(30), 271(10), 255(5)	273(25), 257(20), 179(100), 151(75)	151(100)	<b>Kvercetin-3-<i>O</i>-rutinozid (Rutin)<sup>a</sup></b>
16	6,52	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub> <sup>-</sup>	593,15119	593,14829	4,89	285(100)	257(30), 241(100), 217(75), 199(85), 175(95)	241(5), 226(15), 213(30), 197(100)	<b>Luteolin-<i>O</i>-rutinozid</b>
17	6,59	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub> <sup>-</sup>	431,09837	431,0972	2,71	341(20), 311(100)	283(100)	283(50), 239(100), 224(40), 197(50), 183(60)	<b>Apigenin-8-<i>C</i>-gluko-<i>zid</i> (Viteksin)<sup>a</sup></b>
18	6,61	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	463,0882	463,08694	2,72	301(100), 300(30)	273(25), 257(20), 179(100), 151(75)	151(100)	<b>Kvercetin-3-<i>O</i>-galaktozid (Hiperozid)<sup>a</sup></b>
19	6,66	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub> <sup>-</sup>	623,16176	623,15936	3,85	608(5), 477(10), 315(100), 300(35)	300(100)	299(70), 271(100), 255(60), 216(80), 151(20)	<b>Izoramnetin-<i>O</i>-rutinozid</b>
20	6,68	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup>	163,04007	163,03932	4,6	119(100)	119(60), 101(20), 93(25), 91(100), 72(10)	ND	<b><i>p</i>-kumarinska kiselina<sup>a</sup></b>
21	6,68	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	447,09329	447,09113	4,83	285(100)	257(30), 241(100), 217(75), 199(85), 175(95)	241(5), 226(15), 213(30), 197(100)	<b>Luteolin-7-<i>O</i>-gluko-<i>zid</i> (Cinarozid)<sup>a</sup></b>
22	6,83	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup>	151,04007	151,03934	4,83	136(100)	108(25), 92(100)	108(60), 79(60), 69(100), 51(35)	<b>Vanilin<sup>a</sup></b>
23	6,85	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub> <sup>-</sup>	593,15119	593,14886	3,93	285(100)	257(100), 241(30), 229(40), 213(30), 151(5)	255(10), 239(30), 229(100), 163(40)	<b>Kampferol-<i>O</i>-rutinozid</b>
24	6,88	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> <sup>-</sup>	193,05063	193,0497	4,82	178(70), 149(100), 134(50)	134(100)	106(100)	<b>Ferulinska kiselina<sup>a</sup></b>

25	7,02	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>14</sub> <sup>-</sup>	579,17193	579,16919	4,73	459(100), 357(5), 313(25), 271(45), 235(10)	441(30), 357(100), 339(30), 271(55), 235(85)	339(100), 169(20), 151(50), 125(20)	<b>Naringenin-7-<i>O</i>- neohesperidozid (Naringin)<sup>a</sup></b>
26	7,04	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	447,09329	447,09171	3,53	327(20), 285(80), 284(100), 255(10)	255(100), 227(10)	227(100), 211(60)	<b>Kampferol-3-<i>O</i>-glukozid (Astragalin)<sup>a</sup></b>
27	7,13	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub> <sup>-</sup>	607,16684	607,16492	3,16	299(100), 284(15)	284(100)	284(100), 256(50)	<b>Diosmetin-7-<i>O</i>-rutinozid (Diosmin)</b>
28	7,17	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub> <sup>-</sup>	431,09837	431,0968	3,64	311(5), 269(100)	269(30), 255(100), 197(45), 183(30), 151(20)	210(10), 197(100), 181(50), 169(40)	<b>Apigenin-7-<i>O</i>-glukozid (Apigetrin)<sup>a</sup></b>
29	7,35	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	461,10894	461,10783	2,41	446(40), 341(5), 299(100), 284(30)	284(100)	283(40), 256(100), 239(40), 227(50), 212(30)	<b>Hispidulin-<i>O</i>-heksozid</b>
30	7,56	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> O <sub>16</sub> <sup>-</sup>	649,17741	649,1745	4,48	607(30), 589(10), 300(15), 299(100), 284(40)	284(100)	284(100), 256(40)	<b>Diosmetin-<i>O</i>-acetilrutinozid</b>
31	7,67	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub> <sup>-</sup>	607,16684	607,16498	3,06	300(15), 299(100), 284(5)	284(100)	283(100), 256(30), 239(25), 227(80), 137(50)	<b>Hispidulin-<i>O</i>-rutinozid</b>
32	7,66	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	445,07763	445,07611	3,42	269(100), 175(15)	269(10), 225(100), 201(40), 183(30), 151(40)	225(5), 197(50), 181(100)	<b>Apigenin-<i>O</i>-glukuronid</b>
33	7,81	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> O <sub>16</sub> <sup>-</sup>	649,17741	649,17523	3,36	300(10), 299(100), 285(5), 284(40)	285(5), 284(100)	283(35), 255(100), 239(40), 227(45), 137(10)	<b>Hispidulin-<i>O</i>-acetilrutinozid</b>
34	7,93	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	475,0882	475,08636	3,87	371(5), 300(20), 299(100), 175(15)	284(100)	284(100), 256(70)	<b>Diosmetin-<i>O</i>-glukuronid</b>
35	8,07	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> O <sub>14</sub> <sup>-</sup>	591,17193	591,17084	1,84	283(100), 268(15)	268(100)	268(100), 240(30)	<b>Acacetin-7-<i>O</i>-rutinozid (Linarin)</b>
36	8,13	C <sub>29</sub> H <sub>33</sub> O <sub>15</sub> <sup>-</sup>	621,18249	621,18134	1,85	313(100), 298(15), 283(5)	298(100)	283(100)	<b>Pektolinarigenin-7-<i>O</i>- rutinozid (Pektolinarin)</b>
37	8,46	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> O <sub>16</sub> <sup>-</sup>	649,17741	649,17523	3,36	300(10), 299(100), 284(15)	284(100)	283(100), 256(60), 239(30), 227(85), 137(50)	<b>Hispidulin-<i>O</i>-acetilrutinozid izomer</b>

38	8,52	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	285,04046	285,03917	4,53	257(40), 241(100), 217(50), 199(70), 175(70)	255(50), 227(100), 211(75), 197(35), 183(85)	ND	Luteolin <sup>a</sup>
39	8,55	C <sub>31</sub> H <sub>35</sub> O <sub>16</sub> <sup>-</sup>	663,19306	663,19208	1,48	313(100), 298(20), 283(10)	298(100)	283(100)	Pektolinarigenin 7-O-(4'''- acetilrutinozid) (Linariin)
40	8,57	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub> <sup>-</sup>	301,03537	301,03391	4,85	283(15), 271(60), 257(25), 179(100), 151(80)	151(100)	107(100), 83(10)	Kvercetin <sup>a</sup>
41	9	C <sub>31</sub> H <sub>35</sub> O <sub>16</sub> <sup>-</sup>	663,19306	663,19128	2,68	313(100), 298(30), 283(25)	298(100)	283(100)	Linariin izomer
42	9,14	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup>	177,05572	177,05505	3,78	177(10), 162(40), 145(100), 118(50)	177(100)	ND	<i>p</i> -kumarinska kiselina metil estar
43	9,23	C <sub>32</sub> H <sub>31</sub> O <sub>18</sub> <sup>-</sup>	703,15159	703,15033	1,79	387(100)	369(70), 327(100), 315(10), 285(15), 267(10)	267(100), 207(10), 139(15), 121(10)	Nepoznato jedinjenje
44	9,31	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	271,0612	271,05994	4,65	177(10), 151(100)	107(100)	65(100)	Naringenin <sup>a</sup>
45	9,35	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	269,04554	269,04421	4,94	225(5), 177(15), 151(100)	65(100)	ND	Apigenin <sup>a</sup>
46	9,5	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	285,04046	285,03922	4,35	255(100), 227(10)	211(100), 195(5), 167(15)	ND	Kampferol <sup>a</sup>
47	9,5	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	299,05611	299,05487	4,15	285(20), 284(100)	283(100), 256(30), 239(25), 227(80), 137(50)	199(100), 183(30)	Hispidulin
48	9,6	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	299,05611	299,05463	4,95	285(15), 284(100)	284(10), 256(100)	227(100), 211(30), 188(60), 135(30)	Diosmetin
49	11,75	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	313,07176	313,07056	3,83	298(100)	283(100)	255(100), 239(5), 227(10), 211(5), 163(10)	Pektolinarigenin

<sup>a</sup> Potvrđeno korišćenjem standarda; ostala jedinjenja su identifikovana na osnovu MS/MS podataka.

---

## Biografija

Ana (Slavomir) Sedlarević Zorić rođena je 1986. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i XII beogradsku gimnaziju opšteg smera. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, završila je 2012. godine. Doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na modulu Fiziologija i molekularna biologija biljaka, upisala je 2013. godine. Od novembra 2014. zaposlena je u Institutu za multidisciplinarna istraživanja (IMSI) Univerziteta u Beogradu, na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije III43010 pod nazivom „*Modifikacije antioksidativnog metabolizma biljaka sa ciljem povećanja tolerancije na abiotički stres i identifikacija novih biomarkera sa primenom u remedijaciji i monitoringu degradiranih staništa*“.

Član je Društva za fiziologiju biljaka Srbije (DFBS) i Evropske federacije društava za biljnu biologiju (FESPB, *The Federation of European Societies of Plant Biology*), i učesnik COST akcije CA22158 pod nazivom „*Exploiting Plant-Microbiomes Networks and Synthetic Communities to improve Crops Fitness (MiCropBiomes)*“. Radila je na nacionalnom i bilateralnim projektima resornog ministarstva za nauku Republike Srbije. Do sada je autor pet publikacija u naučnim časopisima od međunarodnog značaja, i izdala je 23 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampanih u izvodu. U okviru doktorske disertacije objavila je dva naučna rada.

Kći Slavomira i Miline, sestra Jasnina. Supruga Dušanova, i mama Rastka, Vukana i Iskre.

---

## Изјава о ауторству

Потписана: **Ана С. Седларевић Зорић**  
Број индекса: **Б3020/2013**

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом: **„Секундарни метаболизам и антиоксидативни статус жутог ланилиста (*Linaria vulgaris* Mill.) током формирања гала изазваних жишком (*Rhinusa pilosa* Gyllenhal)“**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, \_\_\_\_\_

Потпис докторанда

\_\_\_\_\_

---

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора: **Ана С. Седларевић Зорић**

Број индекса: **Б3020/2013**

Студијски програм: **Биологија (Физиологија и молекуларна биологија биљака)**

Наслов рада: **„Секундарни метаболизам и антиоксидативни статус жутог ланилиста (*Linaria vulgaris* Mill.) током формирања гала изазваних жишком (*Rhinusa pilosa* Gyllenhal)“**

Ментори: **др Соња Вељовић Јовановић, научни саветник и др Фелис Морина, научни саветник**

Потписана **Ана С. Седларевић Зорић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада. Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библитеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

---

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**„Секундарни метаболизам и антиоксидативни статус жутог ланилиста (*Linaria vulgaris* Mill.) током формирања гала изазваних жишком (*Rhinusa pilosa* Gyllenhal)“**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- ③ Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Београду, \_\_\_\_\_

**Потпис докторанда**

\_\_\_\_\_

- 
- 1. Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
  - 2. Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
  - 3. Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
  - 4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
  - 5. Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
  - 6. Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.