

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Sofija B. Nešić

**Molekularne osnove interakcija
korisnih endofitnih bakterija sa
*Arabidopsis thaliana***

doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Sofija B. Nešić

**Molecular mechanisms of interactions
between beneficial endophytic bacteria
and *Arabidopsis thaliana***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

MENTORI:

dr Dragana Nikolić, viši naučni saradnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

dr Milorad Vujičić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

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

dr Jelena Samardžić, viši naučni saradnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

dr Svetlana Soković Bajić, viši naučni saradnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

Zahvalnica

Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka, Departmana za mikrobiologiju i molekularnu biologiju biljaka Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu.

Ovom prilikom želim da se zahvalim:

Dr Dragani Nikolić, na posvećenosti, strpljenju, i podršci prilikom realizacije ove teze, na osmišljavanju eksperimenata, uloženom trudu i bodrenju kada nije sve teklo kako smo planirale. Hvala na svim korisnim savetima, uloženom vremenu, trudu i sugestijama koje su bile neophodne za finalno oblikovanje teze.

Dr Miloradu Vujičiću hvala na čitanju teze i korisnim komentarima koji su značajno unapredili njen kvalitet.

Dr Aneti Sabovljević, na konstruktivnim i dobronamernim sugestijama koje sam dobila tokom studija i pisanja ove teze.

Dr Jeleni Samardžić, prvenstveno hvala na ukazanoj prilici da postanem deo ove laboratorije. Hvala na svim diskusijama, kao i na komentarima i sugestijama koji su doprineli poboljšanju ove doktorske disertacije.

Dr Svetlani Soković Bajić, se zahvaljujem na uloženom vremenu tokom čitanja ove doktorske disertacije, kao i korisnim sugestijama koje su učinile ovu disertaciju još kvalitetnijom.

Zahvaljujem se dr Aziz Aziz, dr Simon Duchateau i Sandra Villaume na velikoj pomoći i gostoprimstvu za vreme mog boravka u laboratoriji Resistance Induction and Bioprotection of Plants, University of Reims, u Reimsu Francuska.

Hvala Bojani, Igoru i Saši na velikoj pomoći i sugestijama tokom bioinformatičke obrade rezultata sekvenciranja ove disertacije.

Hvala svim kolegama sa Instituta na druženju i savetima.

Posebno bih se zahvalila Ivani na ogromnoj podršci tokom svih ovih godina doktorata. Hvala ti na druženju, konstantnom bodrenju i razgovorima, kako na institutu tako i van njega. Hvala ti na prijateljstvu! Mariji i Jeleni, hvala na druženju i podršci, razumevanju i ohrabrivanju, na svim savetima i lepim zajedničkim trenucima.

Svim članovima Laboratorije za molekularnu biologiju biljaka bih želela da se zahvalim na druženju, razgovorima, savetima, podeljenom iskustvu i stalnog bodrenja kad god nam eksperimenti ne bi išli po planu. Posebno bih želela da se zahvalim omladini lab08 – Dejani, Nataliji, Stefanu, Tanji, Ani, Maši i Kaći, hvala na prijateljstvu, smehu i konstantnoj podršci.

Neizmerno sam zahvalna svima koji su bili uz mene tokom najgoreg perioda mog života! Hvala vam na nesebičnoj pomoći u ovom periodu života kada prelazim cilj bez osobe koja je za to najviše zaslužna!

Najveću zahvalnost dugujem mom tati, mom kompasu, bez čije podrške ništa od ovoga ne bi bilo moguće. Hvala ti za sve što si učinio za mene, hvala na bezgraničnoj podršci, savetima, motivaciji, a pre svega na безусловnoj ljubavi! Ovu tezu posvećujem mom tati!

mom tati, tvoja Sofija



Molekularne osnove interakcija korisnih endofitnih bakterija sa *Arabidopsis thaliana*

Sažetak

Fungalni patogeni predstavljaju jedan od glavnih uzroka gubitka prinosa, drastično ugrožavajući poljoprivrednu proizvodnju širom sveta. Korisni mikroorganizmi, uključujući rizosferne i endofitne bakterije (eng. *Plant Growth Promoting Bacteria*, *PGPB*) imaju značajan potencijal za razvoj ekološki prihvatljivih rešenja za zaštitu useva. Cilj ovog rada je bio testiranje protektivnog dejstva PGPB soja *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN u biljkama *Arabidopsis thaliana* zaraženim patogenom gljivom *Botrytis cinerea* i analiza uticaja ovog soja na ekspresiju gena u *A. thaliana*. Kako su ekstracelularne vezikule (EV) i male RNK prepoznate kao važni akteri u interakcijama između mikroorganizama i njihovih domaćina, istraživano je i njihovo učešće u mutualističkom odnosu *P. phytofirmans* PsJN sa biljkama.

U ovoj tezi je prvi put potvrđeno da *P. phytofirmans* PsJN smanjuje nekrozu listova *A. thaliana* inficiranih patogenom *B. cinerea*. Analiza transkriptoma je ukazala da *P. phytofirmans* PsJN u korenu lokalno ublažava odbrambene odgovore radi olakšane kolonizacije i održavanja mutualizma, dok u listovima indukuje povećanu ekspresiju gena povezanih sa odbranom i sistemski indukovanom rezistencijom.

U cilju izučavanja interakcije EV korisnih bakterija sa biljnim ćelijama, izolovane su i okarakterisane EV soja *P. phytofirmans* PsJN. Korišćenjem lipid-vezujućih fluorescentnih boja i konfokalne mikroskopije, uočena je direktna interakcija između *P. phytofirmans* PsJN-EV i epidermalnih ćelija korena *A. thaliana* i *Solanum lycopersicum*. Specifičnim esejem potvrđena je i fuzija membrana *P. phytofirmans* PsJN-EV sa membranama biljnih ćelija, što ukazuje na isporučivanje sadržaja bakterijskih EV u biljne ćelije. Sekvenciranje malih RNK asociranih sa *P. phytofirmans* PsJN-EV je pokazalo da pakovanje RNK u EV nije nasumičan proces, već da uključuje selekciju određenih RNK.

Ključne reči: korisne rizosferne bakterije, *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN, *Arabidopsis thaliana*, *Botrytis cinerea*, ekstracelularne vezikule, male RNK

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija biljaka

Molecular mechanisms of interactions between beneficial endophytic bacteria and *Arabidopsis thaliana*

Abstract

Fungal pathogens are among the primary causes of yield losses, severely affecting agricultural production worldwide. Recently, beneficial microorganisms, including plant growth-promoting bacteria (PGPB), have emerged as environmentally friendly and sustainable solutions for plant protection. The aim of this work was to examine the protective potential of the PGPB strain *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN in the *Arabidopsis thaliana*–*Botrytis cinerea* pathosystem and to characterize transcriptomic changes induced by this strain in *A. thaliana*. As extracellular vesicles (EVs) and small RNAs have recently been recognized as important players in inter-kingdom communications, the potential involvement of *P. phytofirmans* PsJN-EVs and sRNAs in these plant-bacterial interactions was also investigated.

The results of this thesis show that root inoculation with *P. phytofirmans* PsJN reduces *Botrytis*-induced necrosis in *A. thaliana* leaves, indicating its protective effect against fungal infection. At the transcriptomic level, *P. phytofirmans* PsJN locally attenuates defense responses in roots to facilitate colonization and maintain mutualism, while in leaves, *P. phytofirmans* PsJN increases expression of defense-related genes and induces systemic resistance against *B. cinerea*.

To investigate the interaction of PGPB EVs with plant cells, EVs were isolated and characterized. Direct interactions between *P. phytofirmans* PsJN-EVs and the epidermal cells of *A. thaliana* and *Solanum lycopersicum* were demonstrated by fluorescent labeling of EVs and confocal laser scanning microscopy. The fusion of EVs with the plant cell membranes was also observed, indicating EV cargo delivery. Sequencing of sRNA associated with EVs revealed that RNA packaging into *P. phytofirmans* PsJN-EVs is not random but involves selective enrichment of certain RNA species.

Keywords: plant growth-promoting bacteria (PGPB), *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN, *Arabidopsis thaliana*, *Botrytis cinerea*, extracellular vesicles, small RNA

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Plant physiology and molecular biology

Lista skraćenica:

ABA - abscisinska kiselina

ACC - 1-aminociklopropan-1-karboksilat

ACO1 - eng. *Aconitase 1*

AlaAT1 - alanin aminotransferaza

BcsRNK - male RNK *B. cinerea*

BDG4 - eng. *lysophospholipase BODYGUARD 4*

bEV - ekstracelularne vezikule bakterija

bHLH - eng. *basic Helix-Loop-Helix*

BNS - osnovnog hranljivog rastvora

bZIP - eng. *Basic Leucine Zipper*

CBc - biljke koje su lažno inokulisane (tretman sa 10 mM MgSO₄ ili BNS, bez bakterija) i koje su zaražene sa *B. cinerea*

cDNK - komplementarna DNK

CFU - eng. *Colony-Forming Unit*

CLMS - konfokalna laserska skenirajuća mikroskopija

CMV - citoplazmatske membranske vezikule

CNI - biljke koje su lažno inokulisane (tretman sa 10 mM MgSO₄ ili BNS, bez bakterija) i nisu zaražene sa *B. cinerea* (nanet samo ½ PDB na listove)

CP29A eng. *Chloroplast RNA-binding Protein 29 A*

CRK28 - eng. *Cysteine-rich Receptor-like protein Kinase 28*

DAB - 3,3'-diaminobenzidin tetrahidrohlorid

DCL - protein sličan protein Dicer

DEG - diferencijalno eksprimirani geni

DiD - Vybrant™ DiD, fluorescentna bojom koja vezuje lipide

DOF eng. *DNA-binding with One Finger*

dsRNK - dvolančana RNK

DTT - ditiotreitol

dpi - eng. *days post-infection*

EBP2 - eng. *rRNA-processing protein*

EOMV - eng. *Explosive Outer Membrane Vesicles*

ERF - transkripcioni faktori uključeni u odgovor na etilen (eng. *Ethylene Response Factor*)

eRNK - ekstracelularna RNK

ERS2 - eng. *Ethylene Response Sensor 2*

ET - etilen

ETI - imunitet indukovano efektorima

ETR2 - eng. *Ethylene Response 2*

EV - ekstracelularne vezikule

EV-RNK - RNK u ekstracelularnim vezikulama

exWAGO - eng. *extracellular Worm AGO*

FBA6 - fruktoza-1,6-bisfosfat aldolaza 6

FEG-SEM - skenirajuća elektronska mikroskopija sa emisijom elektrona/primenom polja

GA - glutaraldehid

GDH1 - glutamat dehidrogenazu

GLYI7 - glikozilaza I

GM - germinacioni medijum

GO - ontologija gena

HER2 - humani receptor epidermalnog faktora rasta

HR - hipersenzitivni odgovor

HRE - eng. *Hypoxia-Responsive ERFs*

HSP - protein toplotnog stresa (eng. *Heat Shock Proteins*)

Ipk2 β - eng. *Inositol Polyphosphate Kinase 2 beta*

ISR - indukovana sistemska rezistencija

JA - jasmonati

LDH1 - laktat dehidrogenaza

LEA - eng. *Late Embryogenesis Abundant*

LPS - lipopolisaharidi

LRR - eng. *Leucine-Rich Repeat*

MAMP - mikrob - asocirani molekularni obrasci

MAPK - eng. *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MeSA - metil salicilat

miRNK - mikro RNK

MSM - minimalni medijum

MYB - eng. *Myeloblastosis-related Protein*

NB - eng. *Nucleotide Binding*

ncRNK - nekodirajuće RNK

NET1 - eng. *KIP1-like protein MYB-related*

NTA - analiza praćenja nanočestica

OD - optička gustina

OHP2 - eng. *ONE-HELIX PROTEIN 2*

OIMV - eng. *Outer and Inner Membrane Vesicles*

OMV - eng. *Outer Membrane Vesicles*

PAMP - patogen-asocirani molekularni obrasci

PBc - biljke koje su inokulisane sa PsJN i čiji su listovi zaraženi sa *B. cinerea*

PBS - fosfatni slani pufer (eng. *phosphate-buffered saline*)

PCA - analiza glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis*)

PCO1 - eng. *Plant cysteine oxidase 1*

PDB - eng. *Potato Dextrose Broth*

PDC2 - piruvat dekarboksilaza

PE - tip sekvenciranja (eng. *paired end*)

PGPB - korisne bakterije koje podstiču rastenje biljaka (eng. *Plant Growth Promoting Bacteria*).

phasiRNK - eng. *Phased secondary small interfering RNAs*

PNI - biljke koje su inokulisane sa PsJN i nisu zaražene sa *B. cinerea* (nanet samo ½ PDB na listove)

PR geni - eng. *Pathogenesis-Related Genes*

PRR - eng. *Pattern Recognition Receptors*

PTI - imunitet izazvan obrazcima

R geni - eng. *Resistance genes*

R18 - oktadecil-rodamin B hlorid

RAP2 - eng. *Related to Apetala 2*

RBS - mesto vezivanja ribozoma

RIN - eng. *RNA Integrity Number*

RLK - eng. *Receptor-Like Kinases*

RLP - eng. *Receptor-Like Proteins*

ROS - reaktivne kiseonične vrste

SA - salicilna kiselina

SAR - sistemski stečena rezistencija

SE - tip sekvenciranja (eng. *single end*)

SEM - skenirajuća elektronska mikroskopija

sRNK - male RNK

SUMO - eng. Small Ubiquitin-like MOdifier conjugation

SUS1 - sintaza saharoze

tasiRNK - eng. *trans acting small interfering RNA*

TE - Tris/EDTA

TEM - transmisiona elektronska mikroskopija

UMI - eng. *Unique Molecular Identifiers*

WRKY - eng. *WRKY DNA-binding Protein*

WT - eng. *wild type*

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Korisne rizosferne i endofitne bakterije	1
1.1.1. Kolonizacija biljnih tkiva i uspostavljanje mutualizma između biljaka i korisnih bakterija	3
1.1.2. <i>Paraburkholderia phytofirmans</i> PsJN.....	4
1.2. Mehanizmi odgovora biljaka na stres	4
1.2.1. Abiotički stres.....	5
1.2.2. Biotički stres.....	6
1.2.2.1. Sistemska rezistencija kod biljaka	7
1.2.2.2. <i>Botrytis cinerea</i> – model fitopatogene gljive	8
1.3. Promene u ekspresiji kodirajućih i nekodirajućih RNK u biljkama tokom interakcije sa patogenim i korisnim mikroorganizmima	10
1.4. Ekstracelularne vezikule	10
1.4.1. Učešće EV i ekstracelularnih sRNK u komunikaciji između ćelija i organizama ..	12
1.4.2. Ekstracelularne vezikule bakterija.....	15
1.5. Nekodirajuće RNK poreklom od bakterija	17
1.5.1. Male regulatorne RNK	18
1.5.2. Riboprekidači	19
1.5.3. RNK termosenzori.....	20
1.6. Uloga bakterijskih EV i sRNK u komunikaciji između ćelija i organizama	20
1.6.1. <i>Intra-kingdom</i> komunikacija posredovana bEV i sRNK	20
1.6.2. <i>Cross-kingdom</i> komunikacija posredovana bEV i sRNK.....	21
1.6.2.1. OMV i sRNK u interakcijama između bakterija i biljaka	21
1.7. Potencijalna primena OMV u biomedicini i poljoprivredi	23
2. Ciljevi rada.....	25
3. Materijal i metode.....	27
3.1. Biljni materijal i uslovi gajenja	27
3.1.1. Uslovi gajenja na čvrstim podlogama	27
3.1.2. Uslovi gajenja biljaka u supstratu	29
3.1.3. Uslovi gajenja biljaka u hidroponoj kulturi.....	29
3.2. Metode korišćene u radu sa <i>P. phytofirmans</i> PsJN	31
3.2.1. Hranljivi medijumi	31
3.2.2. Gajenje <i>Paraburkholderia phytofirmans</i> PsJN	32

3.2.3. Inokulacija biljaka u zemlji - <i>Soil Drench</i>	32
3.2.4. Inokulacija biljaka u hidroponoj kulturi.....	33
3.3. Metode korišćene u radu sa <i>B. cinerea</i>	33
3.4. Zaražavanje biljaka gljivom <i>B. cinerea</i>	33
3.4.1. Analiza simptoma nakon zaražavanja (nekrotičnih lezija).....	34
3.4.2. Metoda bojenja pomoću DAB za detekciju vodonik-peroksida u biljnom tkivu....	34
3.4.3. Uzorkovanje biljaka za dalje analize	36
3.5. Metode korišćene u radu sa RNK iz biljnog tkiva	37
3.6. Metode korišćene u radu sa ekstracelularnim vezikulama.....	38
3.6.1. Izolacija vezikula spoljašnje membrane (OMV, <i>outer membrane vesicles</i>) soja <i>P. phytofirmans</i> PsJN.....	38
3.6.2. Metode karakterizacije OMV soja <i>P. phytofirmans</i> PsJN.....	41
3.6.2.1. Određivanje koncentracije i veličine nanočestica	41
3.6.2.2. Kvantifikacija lipopolisaharida (LPS) i proteina	41
3.6.2.3. Transmisiona elektronska mikroskopija OMV soja <i>P. phytofirmans</i> PsJN	41
3.6.2.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija OMV soja <i>P. phytofirmans</i> PsJN	42
3.6.3. Obeležavanje OMV i uklanjanje nevezane boje	43
3.6.4. Praćenje interakcije OMV sa korenovima uz pomoć konfokalne laserske skenirajući mikroskopije – CLMS	43
3.7. Metode korišćene u radu sa RNK asociranih sa OMV	44
3.7.1. Izolacija RNK iz OMV.....	44
3.7.2. Izolacija RNK iz bakterijskih ćelija	44
3.7.3. Sekvenciranje RNK iz OMV i bakterija <i>P. phytofirmans</i> PsJN.....	44
3.7.4. Bioinformatička analiza sRNK asociranih sa OMV bakterija	45
4. Rezultati	47
4.1. Uspostavljanje patosistema <i>Arabidopsis thaliana</i> - <i>Botrytis cinerea</i>	47
4.2. Protektivno dejstvo PGPB <i>P. phytofirmans</i> PsJN tokom infekcije fitopatogenom <i>B. cinerea</i>	47
4.3. Analiza transkriptoma biljaka <i>A. thaliana</i> nakon inokulacije sojem <i>P. phytofirmans</i> PsJN i infekcije patogenom <i>B. cinerea</i>	49
4.3.1. <i>P. phytofirmans</i> PsJN moduliše ekspresiju gena <i>A. thaliana</i> povezanih sa abiotičkim stresom.....	53
4.3.2. <i>P. phytofirmans</i> PsJN moduliše ekspresiju gena <i>A. thaliana</i> povezanih sa biotičkim stresom.....	56
4.4. Analiza malih RNK <i>A. thaliana</i> nakon inokulacije sojem <i>P. phytofirmans</i> PsJN i infekcije patogenom <i>B. cinerea</i>	59

4.4.1. Obrasci ekspresije miRNK pod uticajem inokulacije sojem <i>P. phytofirmans</i> PsJN	59
4.4.2. Promene u ekspresiji miRNK pod uticajem infekcije patogenom <i>B. cinerea</i> , u odsustvu <i>P. phytofirmans</i> PsJN	60
4.4.3. Promene ekspresije miRNK pod uticajem infekcije patogenom <i>B. cinerea</i> , u biljkama inokulisanim sojem <i>P. phytofirmans</i> PsJN	62
4.5. Analiza ko-ekspresije miRNK <i>A. thaliana</i> i njihovih predikovanih targeta	64
4.6. Karakterizacija ekstracelularnih vezikula soja <i>P. phytofirmans</i> PsJN i interakcija sa korenom <i>A. thaliana</i>	65
4.6.1. Optimizacija metode za izolovanje OMV soja <i>P. phytofirmans</i> PsJN	65
4.6.2. Karakterizacija OMV soja <i>P. phytofirmans</i> PsJN	66
4.6.3. Analiza sRNK asociranih sa OMV	68
4.6.3.1. Analiza sRNK asociranih sa OMV soja <i>P. phytofirmans</i> PsJN	68
4.6.3.2. Bioinformatička analiza OMV-sRNK	69
4.6.3.2.1. Uporedna analiza pet alata za mapiranje sRNK asociranih sa ekstracelularnim vezikulama bakterija	69
4.6.3.2.2. Bioinformatička analiza OMV-RNK soja <i>P. phytofirmans</i> PsJN	71
4.6.3.2.3. Predikcija targeta sRNK-OMV u <i>P. phytofirmans</i> PsJN	78
4.6.3.2.4. GO analiza predikovanih targeta sRNK obogaćenih u OMV- <i>P. phytofirmans</i> PsJN	90
4.6.4. Interakcija OMV soja <i>P. phytofirmans</i> PsJN sa klijancima <i>A. thaliana</i> i <i>S. lycopersicum</i>	90
4.6.4.1. Fuzija OMV soja <i>P. phytofirmans</i> PsJN sa membranama epidermalnih ćelija korena	91
5. Diskusija	93
5.1. Stimulacija rastenja biljaka <i>A. thaliana</i> nakon inokulacije sojem <i>P. phytofirmans</i> PsJN	93
5.2. Protektivno dejstvo PGPB <i>P. phytofirmans</i> PsJN na biljke <i>A. thaliana</i> inficirane fitopatogenom <i>B. cinerea</i>	93
5.2.1. Uticaj inokulacije <i>A. thaliana</i> sojem <i>P. phytofirmans</i> PsJN na ekspresiju gena koji učestvuju u odgovoru na abiotički stres	94
5.2.2. Uticaj inokulacije <i>A. thaliana</i> sojem <i>P. phytofirmans</i> PsJN na ekspresiju gena koji učestvuju u interakciji biljke sa mikroorganizmima i indukovanoj sistemskoj rezistenciji - ISR	95
5.2.2.1. Uticaj inokulacije <i>A. thaliana</i> sojem <i>P. phytofirmans</i> PsJN na ekspresiju gena koji učestvuju u interakciji mikroorganizama i korena biljke	95
5.2.2.2. Uticaj inokulacije <i>A. thaliana</i> sojem <i>P. phytofirmans</i> PsJN na ekspresiju gena koji učestvuju u interakciji biljke sa mikroorganizmima i indukovanoj sistemskoj rezistenciji - ISR u listovima	97

5.2.2.3. Uticaj inokulacije <i>A. thaliana</i> sojem <i>P. phytofirmans</i> PsJN na ekspresiju gena etilenskog puta	98
5.2.3. Promene u ekspresiji gena <i>A. thaliana</i> izazvane infekcijom <i>B. cinerea</i>	99
5.2.4. Promene u ekspresiji miRNK <i>A. thaliana</i> izazvane inokulacijom sojem <i>P. phytofirmans</i> PsJN i infekcijom <i>B. cinerea</i>	99
5.3. Ekstracelularne vezikule Gram-negativnih bakterija	101
5.3.1. Bioinformatička analiza sRNK asociranih sa OMV	101
5.3.2. Analiza sRNK asociranih sa OMV soja <i>P. phytofirmans</i> PsJN	102
5.3.3. Interakcija OMV soja <i>P. phytofirmans</i> PsJN sa klijancima <i>A. thaliana</i> i <i>S. lycopersicum</i>	104
6. Zaključci	107
7. Literatura	109

1. Uvod

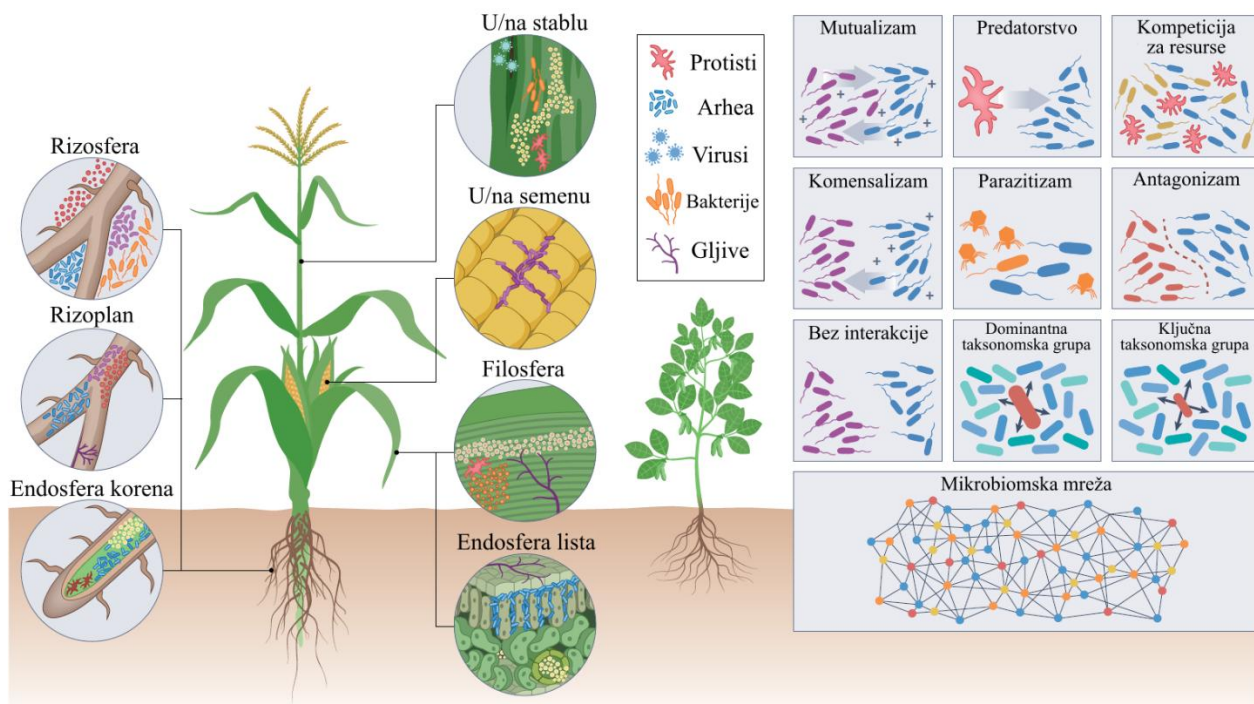
1.1. Korisne rizosferne i endofitne bakterije

Prva istraživanja asocijacije mikroorganizama sa biljkama datiraju od pre više od 200 godina (Compant *et al.*, 2025). Nemački botaničar Heinrich Friedrich Link je prvi opisao endofite 1809. godine (Hardoim *et al.*, 2015). Tada su ovi mikroorganizmi nazvani entofite (eng. *entophytae*) i opisani kao posebna grupa delimično parazitskih gljiva koje žive u biljkama. Do danas je postojalo mnogo različitih definicija koje su se uglavnom odnosile na patogene ili parazitske organizme, prvenstveno gljive. Tek 1866. godine Béchamp je opisao takozvane mikrozyme (eng. *microzymas*) u biljkama, govoreći o mikroorganizmima (Hardoim *et al.*, 2015).

U 19. veku je postojalo opšte uverenje da su zdrave biljke sterilne tj. bez mikroorganizama (Compant *et al.*, 2012). Suprotno tome, Galippe je pisao o prisustvu bakterija i gljiva u unutrašnjosti povrtarskih biljaka i pretpostavio da ti mikroorganizmi potiču iz zemljišta i migriraju u biljku, gde mogu imati korisne uloge za domaćina (Hardoim *et al.*, 2015; Compant *et al.*, 2025). Druge studije su krajem 19. i početkom 20. veka potvrdile postojanje korisnih mikroorganizama unutar biljaka (Hardoim *et al.*, 2015). Danas se zna da biljke predstavljaju domaćine za mnoge tipove mikroorganizama, uključujući bakterije, gljive, arhee, jednoćelijske eukariote, kao što su alge i amebe. Ovi mikroorganizmi zajedno čine biljnu mikrobiotu (eng. *microbiota*).

Decenijama su istraživanja prvenstveno bila usmerena na simbiozu između mikoriznih gljiva i biljaka, kao i između rizobija koje fiksiraju azot i leguminoza. Međutim, poslednje dve-tri decenije, značajan broj istraživanja je pokazao da biljke interaguju sa veoma raznovrsnim mikroorganizmima koji kolonizuju rizosferu, episferu biljke (tj. rizoplan i filosferu) i endosferu (Compant *et al.*, 2025). Sva biljna tkiva mogu biti kolonizovana, uključujući koren, stabla, listove, cvetove i semena (slika 1.1).

Svaki od mikroorganizama u mikrobioti obavlja važne funkcije u zajednici. Mikrobne interakcije u mreži mikrobiote se mogu klasifikovati kao mutualizam (sve uključene vrste imaju koristi od svojih interakcija), antagonizam (jedan organizam ima korist na štetu drugog), predatorstvo (jedan organizam, predator, ubija i jede drugi organizam), komensalizam (jedna vrsta dobija hranu ili druge koristi od druge, bez štete ili koristi za drugu vrstu), parazitizam (jedan organizam živi na ili u drugom organizmu i ima korist nanoseći mu određenu štetu), i kompeticija (borba za resurse) (Faust & Raes, 2012; Compant *et al.*, 2025). Najbrojnije taksonomske grupe su označene kao dominantne, međutim i malobrojne grupe mogu spadati u ključne taksonomske grupe (eng. *keystone taxa*), koje su visoko povezane i imaju presudan značaj za funkcionisanje mikrobiote (Compant *et al.*, 2025).



Slika 1.1 Mikroorganizmi u mikrobioti biljaka obavljaju ključne uloge kroz interakcije poput mutualizma, antagonizma, predatorstva, komensalizma, parazitizma i takmičenja za resurse. Dominantne taksonomske grupe oblikuju funkcionisanje zajednice, dok ključne grupe (eng. *keystone taxa*), čak i one malobrojne, imaju presudan značaj za stabilnost i održavanje ekosistema. (Preuzeto iz Compant *et al.*, 2025).

Značaj mikroorganizama za rastenje i otpornost biljaka je dobro istražen i pokazan u velikom broju publikacija. Teškoća u kultivisanju biljaka različitih vrsta u odsustvu bakterija i gljiva je dobro poznata (Hardoim *et al.*, 2008), što ukazuje na značaj takvih mikroorganizama u rastu i razviću biljaka. Stoga se biljka sa svojom mikrobiotom posmatra kao holobiont (Vandenkoornhuysen *et al.*, 2015).

U okviru mikrobiote najbrojniju grupu mikroorganizama čine bakterije (Poria *et al.*, 2021). Biljke i bakterije imaju kontinuiran i dinamičan koevolucionarni odnos u kom međusobno komuniciraju putem oslobađanja hemijskih signala (Fanai *et al.*, 2024). Kao što je ranije pomenuto interakcije mikroorganizama i domaćina biljke mogu biti pozitivne i negativne. Bakterije koje dovode do pozitivnih promena kod biljaka, kao što su rastenje i otpornost na abiotički i biotički stres su u literaturi označene kao PGPB (eng. *Plant Growth Promoting Bacteria*) (Fanai *et al.*, 2024). Na osnovu interakcija PGPB se mogu svrstati u dve grupe: slobodno-živeće rizobakterije i simbiotske bakterije. Slobodno-živeće rizobakterije se nalaze izvan biljnih tkiva, dok simbiotske bakterije, poznate kao endofiti, žive u međucelijskim prostorima biljke, što im omogućava direktan pristup razmeni metabolita (Fanai *et al.*, 2024). Svojim delovanjem PGPB kod biljaka ublažavaju efekte biotičkog stresa (uzrokovano negativnim delovanjem živih organizama) i abiotičkog stresa koji nastaje usled delovanja nepovoljnih faktora u životnoj sredini).

Niu i saradnici su 2011. godine pokazali da rizobakterija *Bacillus cereus* AR156 indukuje otpornost na fitopatogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 kod *Arabidopsis thaliana*. Biljke tretirane sojem *B. cereus* AR156 su pokazale povećanje biomase i ublažavanje simptoma bolesti aktivacijom indukovane sistemske rezistencije (ISR - eng. *Induced systemic resistance*). Endofitna bakterija *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN štiti vinovu lozu od fungalnog fitopatogena *Botrytis cinerea* migriranjem iz korena do nadzemnih delova biljke gde na površini lista formira biofilm oko micelijuma *B. cinerea* kako bi se fizički ograničilo širenje patogena (Miotto-Vilanova *et al.*, 2016).

Takođe, pored direktne antifungalne uloge, ova PGPB je u tkivima vinove loze dovela do aktivacije odbrambenih mehanizama, i mobilizacije izvora ugljenika. Inokulacija *A. thaliana* sojem PGPB *Paenibacillus polymyxa* omogućava toleranciju na patogen *Erwinia carotovora*, kao i na stres izazvan sušom evaporacije podloge tokom tri dana (Timmusk & Wagner, 1999). Mayak i saradnici su 2004. godine pokazali da inokulacija rizobakterijom *Achromobacter piechaudii* ARV8 povećava toleranciju na stres suše kod paprike i paradajza. Ova bakterija proizvodi 1-aminociklopropan-1-karboksilat - ACC deaminazu i smanjuje nivo etilena, hormona čija je sinteza kod biljaka pojačana pri izlaganju povišenim koncentracijama soli.

1.1.1. Kolonizacija biljnih tkiva i uspostavljanje mutualizma između biljaka i korisnih bakterija

Kao što je ranije pomenuto, decenijama su istraživanja interakcija biljaka sa korisnim bakterijama bila usmerena na simbiozu između rizobijalnih bakterija i leguminoza. Uspostavljanje ove interakcije karakteriše nekoliko koraka. Biljke u rizosferu otpuštaju flavonoide kao hemijske signale koje prepoznaju rizobijalne bakterije, koje potom proizvode Nod faktore koje biljka prepoznaje i čime se aktivira signalni put simbioze i formiranje nodula (Oldroyd, 2013). Mnogo je slabije okarakterisano uspostavljanje mutualističkog odnosa između nerizobijalnih rizosfernih bakterija i korena. Ove interakcije takođe uključuju razmenu signala i promene u ekspresiji gena kako u bakterijama tako i u biljnim ćelijama. Geni uključeni u odbrambene odgovore, signalne puteve hormona i transport hranljivih materija su diferencijalno eksprimirani u biljakama tokom interakcija sa PGPB (Mukherjee, 2022).

Važni učesnici u percepciji mikroorganizama su RLK (eng. *Receptor-Like Kinases*) kinaze, kao što su WAK (eng. *Wall-Associated Kinases*) i LysM (eng. *Lysin motif*) (Mukherjee, 2022). Regulacija njihove ekspresije u prisustvu mikroorganizama važna je za adekvatni imunski odgovor biljke, kako u susretu sa patogenima, tako i u mutualizmu.

Jedna od ključnih promena u transkriptomu biljaka tokom interakcije sa mikroorganizmima jeste regulacija aktivnosti gena uključenih u odbranu od patogena. Dok njihova ekspresija raste u prisustvu patogena, istraživanja ukazuju da se tokom interakcije sa nekim korisnim mikroorganizmima ekspresija ovih gena u korenu smanjuje (Soto *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2017). Različiti obrasci ekspresije odbrambenih gena u zavisnosti od tipa interakcije biljke sa mikroorganizmima podržavaju pretpostavku da biljka prilagođava ekspresiju kako bi favorizovala kolonizaciju korisnih mikroorganizama u odnosu na patogene (Mukherjee, 2022). Međutim, ekspresija nekih odbrambenih gena, kao što su određeni transkripcioni faktori, nije smanjena ni tokom korisnih interakcija, čime biljke fino regulišu nivo kolonizacije korisnim mikroorganizmima.

Biljni hormoni imaju ključnu regulatornu ulogu ne samo u rastanju biljaka, već i tokom njihovih interakcija sa korisnim i patogenim mikroorganizmima. Istraživanja su ukazala na to da biljka domaćin smanjuje nivo etilena redukcijom njegovog prekursora ACC kao odgovor na prisustvo PGPB. Tokom interakcije pirinča sa PGPB *Azospirillum brasilense* i *Herbaspirillum seropedicae* zabeležena je smanjena ekspresija nekoliko gena koji kodiraju ACC oksidaze (Wiggins *et al.*, 2022). Same PGPB proizvode enzim ACC deaminazu koji ograničava biosintezu etilena. Ovaj enzim tako suprimira etilen-zavisni odbrambeni sistem koji inhibira rastenje biljke u uslovima stresa (Glick, 2014). Sa druge strane, pojedini korisni mikroorganizmi zahtevaju etilen kako bi ispoljili svoje protektivno dejstvo i ublažili stres u nepovoljnim uslovima (Shekhawat *et al.*, 2021) (Mukherjee, 2022). Iz ovih primera može se zaključiti da je efekat etilena tokom interakcije biljaka sa mikroorganizmima zavistan od koncentracije, soja i drugih uslova, te da je precizna regulacija etilenskog puta od suštinskog značaja za uspostavljanje mutualističkih interakcija (Shekhawat *et al.*, 2022).

Regulacija gena uključenih u transport hranljivih materija značajna je tokom interakcija biljaka sa korisnim mikroorganizmima. Transporteri šećera i sintaze saharoze omogućavaju razmenu ugljenih hidrata između biljaka i mikroorganizama. Pokazano je da dolazi do povećane ekspresije ovih gena tokom mutualističkih interakcija pirinača sa PGPB *A. brasilense* kako bi se obezbedila dostupnost ugljenih hidrata ovoj korisnoj bakteriji (Thomas *et al.*, 2019).

1.1.2. *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN

Gram-negativna bakterija *P. phytofirmans* PsJN (ranije poznata kao *Burkholderia phytofirmans* PsJN) kolonizuje širok spektar biljnih vrsta uključujući vinovu lozu, pirinač i paradajz, kao i *A. thaliana* (Poupin *et al.*, 2013; Issa *et al.*, 2018; Timmermann *et al.*, 2019; King *et al.*, 2019). *P. phytofirmans* PsJN aktivira odbrambeni sistem biljaka u *A. thaliana* i različitim usevima, čime se smanjuje njihova podložnost različitim patogenima (Timmermann *et al.*, 2017; Colavolpe *et al.*, 2021). Ovaj korisni bakterijski soj svoj životni ciklus provodi u rizosferi, kao i unutar biljnih tkiva kao endofit, podstičući rastenje biljaka i njihovu otpornost na različite abiotičke i biotičke stresove. Poupin i saradnici su 2013. godine pokazali da jedna inkolucija *A. thaliana* sa PsJN utiče na ceo životni ciklus biljke, povećavajući stopu rasta i skraćujući vegetativni period, što je od značaja za poljoprivrednu proizvodnju. PsJN poboljšava rastenje i zdravstveni status biljaka kroz različite mehanizme, uključujući proizvodnju fitohormona koji podstiču rastenje poput auksina, enzima ACC deaminaze koji smanjuje nivo hormona stresa etilena i sekreciju siderofora u rizosferi koji povećavaju dostupnost gvožđa.

1.2. Mehanizmi odgovora biljaka na stres

Biljke su sesilni organizmi, i kao takve, izložene raznim uslovima sredine jer za razliku od životinja, nemaju mogućnost kretanja i izbegavanja nepovoljnih sredinskih uslova. Zarad opstanka biljke su razvile brojne adaptivne mehanizme u cilju prevazilaženja i ublažavanja stresnih sredinskih uslova. Mutualističke zajednice sa mikroorganizmima su jedne od najznačajnijih adaptacija u biotičkom stresu.

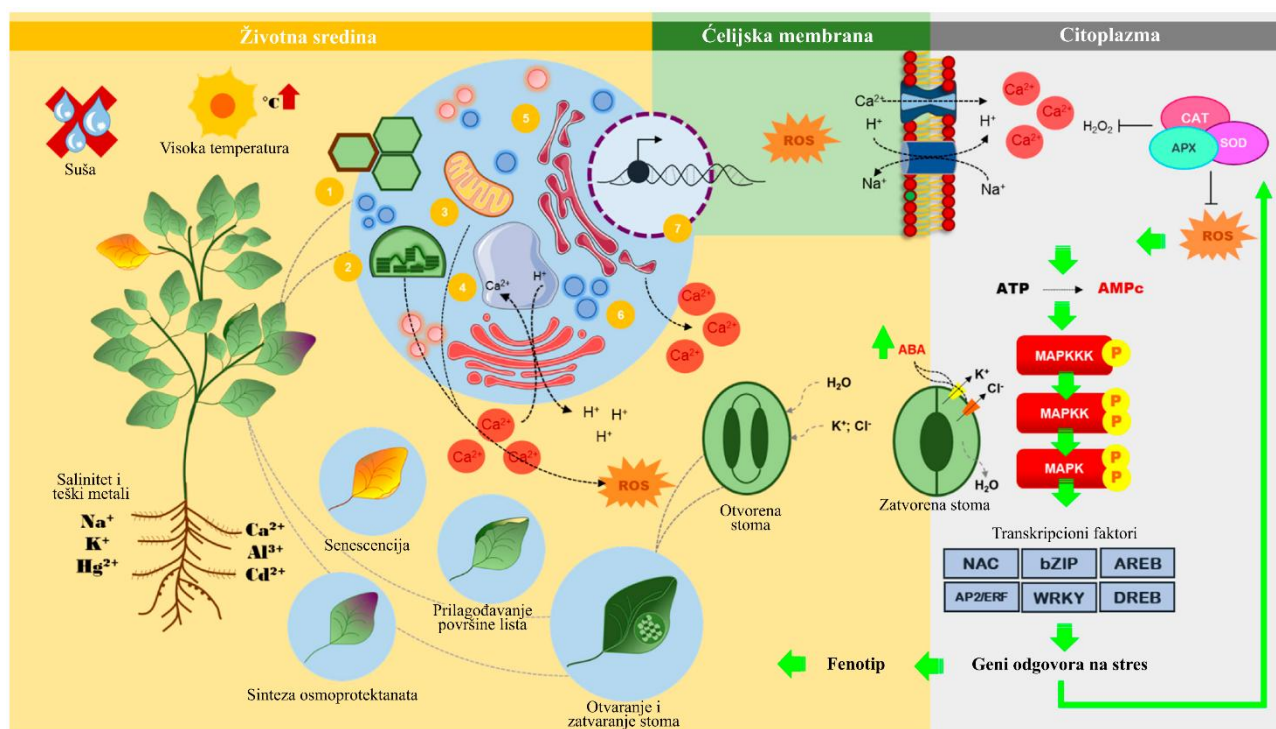
Odgovori biljaka na stres su kompleksni procesi koji obuhvataju fiziološke, biohemijske i molekularne mehanizme. Odgovori biljaka na stres se ostvaruju kroz visoko orkestrirane i programirane nizove događaja, koji uključuju:

1. percepciju signala putem primarnih receptora (membranski proteini) i sekundarnih glasnika (molekuli poput Ca^{2+} , nekih ROS - reaktivnih kiseoničnih vrsta),
2. transdukciju signala (aktivacija Ca^{2+} zavisne protein kinaze, ROS, MAPK (eng. *Mitogen-Activated Protein Kinase*) kaskade, hormonski odgovor – apscisinska kiselina – ABA (suša/toplotni stres), salicilna kiselina SA (odbrana od patogena), jasmonata JA (napad herbivora), etilen - ET)
3. aktivaciju transkripcionih faktora kao što su bZIP (eng. *Basic Leucine Zipper*), WRKY (eng. *WRKY DNA-binding Protein*), MYB (eng. *Myeloblastosis-related Protein*) i bHLH (eng. *basic Helix-Loop-Helix*),
4. aktivaciju mreže regulatornih gena, i
5. sintezu antioksidanasa i proteina specifičnih funkcija kao što su osmoprotektanti, proteini toplotnog šoka - HSP (eng. *Heat Shock Proteins*), LEA proteini eng. *Late Embryogenesis Abundant*), PR proteini (eng. *pathogenesis-related*), antioksidativni enzimi, proteini koji učestvuju u remodelovanju ćelijskog zida i mnogi drugi.

U zavisnosti od porekla stresa možemo razlikovati abiotički i biotički stres. Ova dva tipa stresa aktiviraju zajedničke, ali i specifične mehanizme odgovora.

1.2.1. Abiotički stres

Abiotički stres, nastaje usled delovanja nepovoljnih uslova spoljašnje sredine, može biti izazvan sušom, visokim ili niskim temperaturama, nedostatkom hranljivih materija, viškom soli ili toksičnih metala u zemljištu (Zhu, 2016). Stresni uslovi sredine mogu biti pojedinačni ili pak međusobno povezani i udruženi, kao što su suša, salinitet i ekstremne temperature. Percepcija abiotičkog stresa može se odvijati u različitim ćelijskim odeljcima, kao što su ćelijski zid, plazma membrana, citoplazma, mitohondrije, hloroplasti, peroksizomi, endoplazmatski retikulum i jedro, nakon čega dolazi do pokretanja specifičnih ćelijskih odgovora (slika 1.2). Odgovor ćelije ide u smeru očuvanja homeostaze i zaštite integriteta ćelije. U zavisnosti od tipa stresa, u odgovor mogu biti uključeni različiti efektorni molekuli, kao što su osmoprotektanti, antioksidativni enzimi i proteini odgovora na stres (HSP i LEA). Odgovor je regulisan na različitim nivoima: transkripcionom, posttranskripcionom, translacionom i posttranslacionom. Osim transkripcionih faktora, bitan učesnik u brzom i finom regulaciji i modulaciji odgovora ćelija na nove sredinske uslove su nekodirajuće RNK. Male RNK su među najviše proučavanim molekulima u kontekstu odgovora na stres, jer mogu biti indukovane stresom i inhibirati negativne regulatore odgovora na stres, čime se omogućava tolerancija. Sa druge strane, snižavanje nivoa malih RNK koje targetiraju pozitivne regulatore tolerancije omogućava aktivaciju ovih regulatora i povećanje tolerancije na stres (Sunkar *et al.*, 2007).

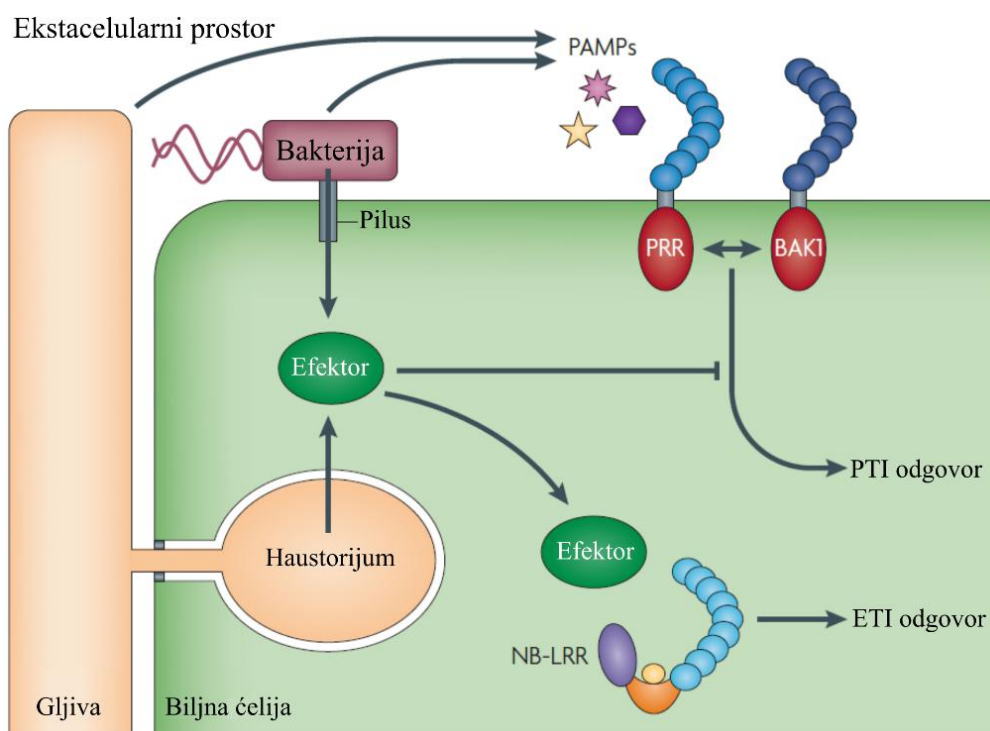


Slika 1.2 Percepcija signala abiotičkog stresa, signalna transdukcija i odgovor biljne ćelije. Biljke percipiraju signale abiotičkog stresa putem receptora u plazma membrani i ćelijskom zidu, što dovodi do influksa jona i ulaska Ca^{2+} u citosol. Stres narušava energetska ravnotežu u hloroplastima i mitohondrijama generišući ROS. Druge organele poput endoplazmatskog retikuluma i peroksizoma takođe učestvuju u signalnoj transdukciji tokom stresa. Signali se integrišu putem sekundarnih glasnika i kaskada kinaza, aktivirajući biosintezu hormona kao što je ABA i transkripcionih faktora koji regulišu ekspresiju gena što rezultira adaptivnim fiziološkim odgovorima na abiotički stres. Preuzeto iz Paes De Melo *et al.*, 2022.

1.2.2. Biotički stres

Biotički stres izazivaju živi organizmi kao što su patogeni i štetočine. Biljni patogen je svaki organizam čiji se životni ciklus delimično ili potpuno obavlja unutar biljke, čime joj nanosi štetu. Štetočine čine herbivori kao što su insekti, nematode, sisari ili ptice koji se hrane delovima biljke.

Većina mikroorganizama produkuje molekule (lipopolisaharidi, flagelin, hitin) koje biljke prepoznaju kao patogen-asocirane molekularne obrasce - PAMP (eng. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) ili mikrob – asocirane molekularne obrasce – MAMP (eng. *Microbe-Associated Molecular Patterns*), (Dodds & Rathjen, 2010). Ove molekule prepoznaju receptori na ćelijama – PRR (eng. *Pattern Recognition Receptors*) koji se sastoje od ekstracelularnog domena, transmembranskog domena i intracelularnog domena. U zavisnosti od intracelularnog domena, PRR mogu biti receptorima slične kinaze RLK (eng. *Receptor-Like Kinases*) ili, ukoliko je ovaj domen bez kinazne aktivnosti, receptorima slični proteini RLP (eng. *Receptor-Like Proteins*, slika 1.3). Prepoznavanje MAMP/PAMP aktivira imunitet izazvan obrascima - PTI (eng. *Pattern-Triggered Immunity*), (Dodds & Rathjen, 2010). Kako bi suprimirali PTI, patogeni u biljne ćelije ubacuju efektorske proteine. Međutim, mnogi od njih bivaju prepoznati od strane unutarćelijskih receptora NB-LRR (NB, eng. *Nucleotide Binding* - LRR - *Leucine-Rich Repeat*) čime se pokreće imunitet indukovano efektorima – ETI (eng. *Effector-Triggered Immunity*). Za ETI su zaslužni geni rezistencije – R geni koji prepoznaju ili same efektore ili signale koji se šire ćelijom nakon prepoznavanja efektoru (Dodds & Rathjen, 2010). U toku ovog imunskog odgovora aktivira se hipersenzitivna reakcija, tip programirane ćelijske smrti, usled čega se formiraju nekrotične lezije i suzbija širenje biotrofnih patogena, koji mogu opstati samo na živim ćelijama domaćina. Međutim, ovaj mehanizam odbrane biljaka zloupotrebili su nekrotrofni patogeni, koji se upravo hrane mrtvim biljnim tkivom.



Slika 1.3 Tipovi imunskog odgovora kod biljaka. PRR i BAK1 receptori na biljnim ćelijama prepoznaju PAMP i pokreću odgovor izazvan PAMP molekulima - PTI. Patogene bakterije i gljive ubacivanjem efektoru direktno u biljne ćelije pokušavaju da suprimiraju PTI, ali njihovo prepoznavanje u biljnoj ćeliji pokreće drugi tip odgovora/imuniteta kod biljaka – ETI. (preuzeto iz Dodds & Rathjen, 2010).

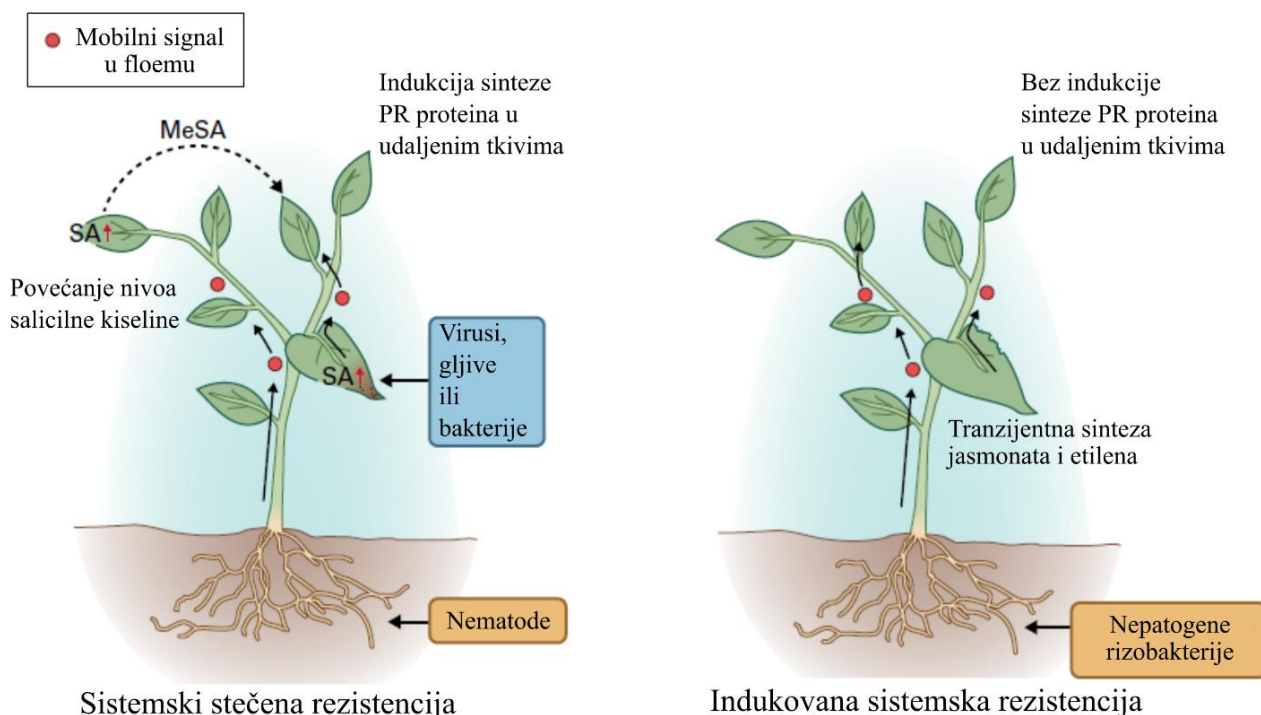
1.2.2.1. Sistemska rezistencija kod biljaka

Osim odbrambene reakcije koja se razvija na mestu napada patogena, biljke imaju i sposobnost da indukuju odbrambene mehanizme u delovima koji su udaljeni od inicijalnog mesta infekcije. Sistemska rezistencija omogućava imunski odgovor na širok spektar patogena u celoj biljci. Zahvaljujući ovome, biljke imaju sposobnost efikasnijeg odgovora na naredne infekcije (eng. *defence priming*).

Patogene gljive, bakterije i virusi aktiviraju odbrambeni odgovor poznat kao sistemski stečena rezistencija – SAR (eng. *systemic acquired resistance*). Tokom SAR aktivira se specifična grupa gena povezanih sa patogenezom – PR geni u distalnim biljnim tkivima. Da bi došlo do SAR potrebno je da infekcija izazove nekrotične lezije koje dovode do povećanja nivoa salicilne kiseline – SA (eng. *salicylic acid*) i metil salicilata (MeSA) koji putem floema prenosi signal u udaljene delove biljke (slika 1.4). MeSA se u distalnim organima hidrolizom prevodi u bioaktivnu formu SA što omogućava sistemsku rezistenciju. Tokom SAR dolazi i do otpuštanja volatilnog metil-SA čime se indukuje sinteza PR proteina i u neinficiranim biljkama. Sa druge strane, mehaničke povrede koje izazivaju herbivori dovode do odgovora koji su kontrolisani drugim hormonima: etilenom – ET i jasmonatom – JA.

Drugi vid sistemske rezistencije kod biljaka je indukovana sistemska rezistencija – ISR (eng. *Induced systemic resistance*) koju izazvaju nepatogene rizobakterije tokom kolonizacije korenova. Ovaj tip odbrambenog mehanizma odlikuje prisustvo i JA i ET signalnih puteva koji pokreću protektivni odgovor u distalnim listovima. Novije studije su pokazale da SA put takođe može biti uključen u pokretanje ISR (Yu *et al.*, 2022).

Postoji dvosmerna komunikacija između biljaka i njihove mikrobiote u korenu. Sve je više studija koje pokazuju da informacija o stresnim stimulusima koji se percipiraju u listovima dolazi do korena i dovodi do promena u sastavu endofitne i rizosferne mikrobiote (Jung *et al.*, 2024). U stresnim uslovima, biljke „regrutuju“, tj. hemijskim atraktantima privlače i olakšavaju kolonizaciju korisnim sojevima mikroorganizama, koji zauzvrat podižu njihovu otpornost ili direktno učestvuju u borbi protiv patogena (Zhu *et al.*, 2021b; Wang *et al.*, 2021).



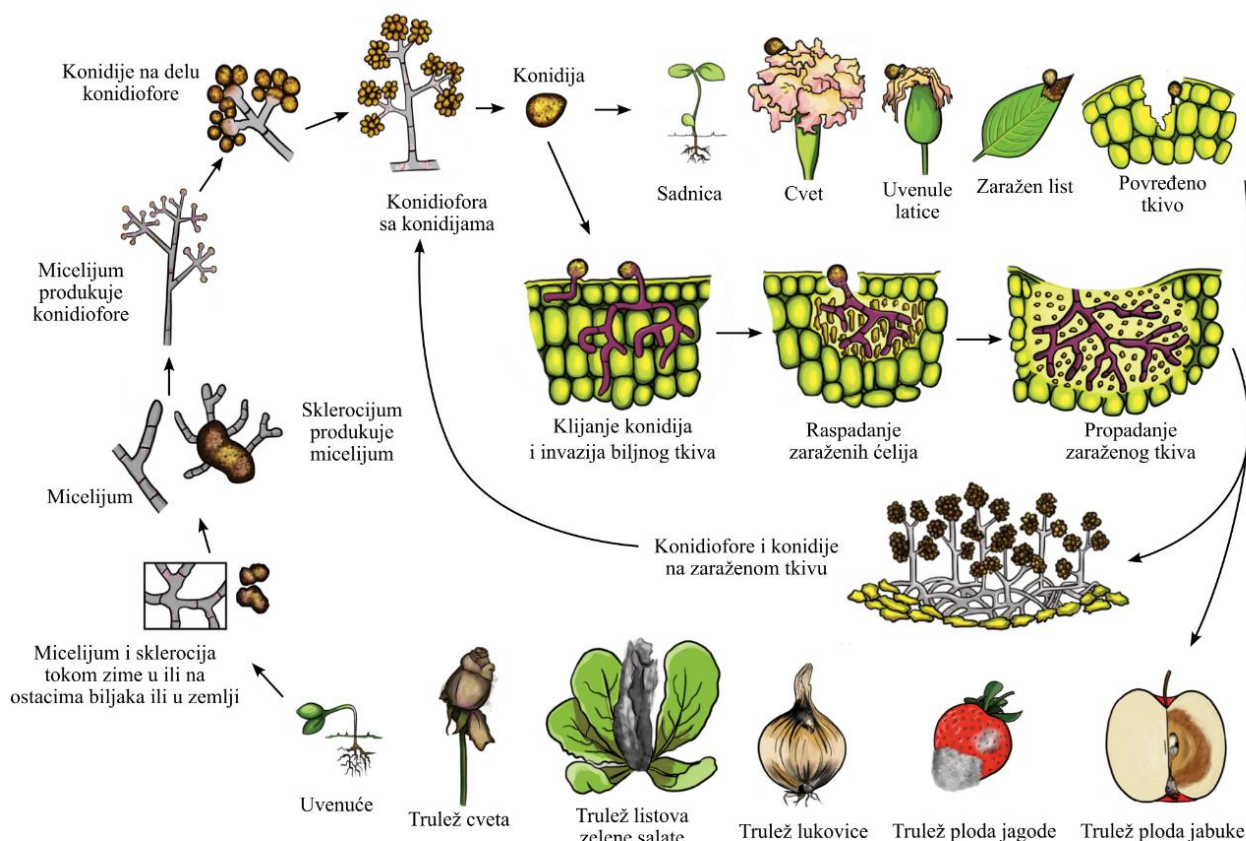
Slika 1.4 Patogene gljive, bakterije i virusi pokreću sistemski stečenu rezistenciju (SAR), pri čemu nekrotične lezije izazvane infekcijom dovode do povećanja nivoa salicilne kiseline (SA) kao mobilnog signala u floemu. Povećanje SA u udaljenim tkivima omogućava oslobađanje metil-SA što

indukuje sintezu PR proteina i zaštitu neinficiranih delova biljke. Indukovana sistemska rezistencija (ISR) koju izazivaju nepatogene rizobakterije oslanja se na signalne puteve jasmonata (JA) i etilena (ET) radi aktivacije odbrambenih odgovora u udaljenim tkivima (preuzeto iz Buchanan *et al.*, 2015).

1.2.2.2. *Botrytis cinerea* – model fitopatogene gljive

Razlažući složenu organsku materiju i reciklirajući hranljive materije, gljive su od suštinskog značaja za održavanje ekološke ravnoteže. Saprotofne gljive igraju značajnu ulogu u razgradnji biljnog materijala, oslobađanju nutrijenata i obogaćivanju zemljišta. Nezaobilazni akteri u održavanju ravnoteže u ekosistema su i mikorizne gljive, koje formiraju mutualističke odnose sa biljkama, pomažući u apsorpciji hranljivih materija i poboljšavajući zdravlje biljaka. Međutim, patogene gljive mogu izazvati razorne posledice (Jayawardena *et al.*, 2018). Fitopatogene gljive dovode do ogromnih šteta u poljoprivredi i šumarstvu. Jedan od najvećih uzročnika smanjenja prinosa poljoprivrednih kultura je *Botrytis cinerea*, nekrotrofni patogen koji prouzrokuje sivu trulež. *B. cinerea* se smatra tipičnim nekrotrofom, koji koristi puteve programirane ćelijske smrti u domaćinu radi uspostavljanja infekcije. Ova gljiva može zaraziti preko 200 različitih vrsta biljaka, izazivajući ozbiljna oštećenja (Tanovic *et al.*, 2011). Ona ima sposobnost da ostane u stanju mirovanja duži vremenski period dok se ne jave povoljni uslovi za njeno širenje. Infekcija *B. cinerea* se može javiti u svim razvojnim fazama biljke, počev od klijanaca pa sve do zrelih plodova. Infekcija se može razviti i nakon berbe kod naizgled zdravih useva, te je nemoguće predvideti štetu koji ovaj fitopatogen može izazvati. Rezistencija na fungicide predstavlja sve veći problem zbog čega se istraživanja fokusiraju na alternativne metode suzbijanja patogenih gljiva.

Infekcija *B. cinerea* započinje klijanjem spora na površini biljke. Proizvodnja enzima koji razgrađuju ćelijski zid biljke i toksina koji omogućavaju ubijanje dovoljnog broja ćelija domaćina omogućavaju nekrozu biljnog tkiva potrebnog za akumulaciju biomase ovog patogena (slika 1.5). Progresija između ćelijske smrti biljke i *B. cinerea* određuje da li će infekcija napredovati ili ne. Pored proizvodnje enzima koji razgrađuju ćelijski zid i toksina, *B. cinerea* sintetiše širok spektar proteina koji indukuju ćelijsku smrt, i manipuliše biljnim mehanizmima programirane ćelijske smrti čime se olakšava širenje zaraze putem hipersenzitivnog odgovora (HR) (Bi *et al.*, 2023). Dok ova reakcija biljke predstavlja važan mehanizam suzbijanja biotrofnih patogena, nekrotrofi kao što je *B. cinerea*, zapravo koriste mrtvo biljno tkivo za svoju ishranu i napredovanje.



Slika 1.5 Životni ciklus *B. cinerea* – Konidije se odvajaju od konidiofora i dospevaju na biljku gde klijaju i dovode do propadanja biljnog tkiva. Nakon smrti ćelija domaćina *B. cinerea* može da preživi formiranjem konidiofora na mrtvom tkivu ili da stvori sklerocije koje služe za preživljavanje nepovoljnih uslova sredine, od kojih se po uspostavljanju povoljnih uslova razvijaju micelijum i konidiofore sa konidijama. (preuzeto iz Agrios, 2008)

Za percepciju patogena su zaslužni receptori na površini biljnih ćelija RLK i RLP koji prepoznaju PAMP molekule, kao što su oligomeri hitina, kao i proteini koji indukuju ćelijsku smrt domaćina, što vodi aktiviranju imunskog odgovora biljke. Percepcija patogena uzrokuje influks jona kalcijuma i inicira kaskadu fosforilacije kinazama. Imunski odgovor aktiviran ovim kaskadama obuhvata produkciju ROS, depoziciju kaloze, ojačavanje ćelijskog zida i sintezu odbrambenih jedinjenja fitoaleksina (Veronese *et al.*, 2005). Ovi procesi ograničavaju infekciju i sistemski povećavaju imunitet kod neinficiranih delova biljke putem SAR.

Pokazano je da *B. cinerea* isporučuje male RNK (BcsRNK) u biljne ćelije kako bi utišala gene imunskog odgovora domaćina. Za sintezu ovih regulatornih nekodirajućih RNK potrebno je prisustvo proteina sličnih Diceru 1 i 2 (Bc-DCL1 i Bc-DCL2). Sa druge strane, i biljka se sličnim mehanizmom bori protiv ovog patogena. Wang i saradnici su 2017. godine pokazali da se u *A. thaliana* i paradajzu sintetišu male RNK čiji su targeti upravo virulentni geni *B. cinerea*, Bc-DCL1 i Bc-DCL2. Biljka ubacuje svoje male RNK u ćelije gljive i utišava Bc-DCL gene, čime smanjuje patogenost i rast gljive, što predstavlja primer dvosmerne RNK interferencije i razmene malih RNK između biljaka i gljiva. Pokazano je da i biljke i gljive koriste ekstracelularne vezikule za transport i ubacivanje malih nekodirajućih RNK u drugi organizam (Cai *et al.*, 2018; He *et al.*, 2023, p. 20). Ova istraživanja imaju potencijal za razvoj ekološki prihvatljivih rešenja za suzbijanje fitopatogenih gljiva. (Wang *et al.*, 2016) Wang i saradnici su pokazali da aplikacija nekodirajućih RNK koje utišavaju virulentne gene gljive, na različite vrste voća, povrća i hortikulturnih vrsta biljaka može smanjivati širenje sive truleži.

1.3. Promene u ekspresiji kodirajućih i nekodirajućih RNK u biljkama tokom interakcije sa patogenim i korisnim mikroorganizmima

Pokazano je da korisni mikroorganizmi poput rizobija, mikoriznih gljiva i PGPB, reprogramiraju gensku ekspresiju biljaka kako bi poboljšali rastenje i toleranciju na stres. Patogeni mikroorganizmi indukuju ili suprimiraju transkripciju gena povezanih sa imunitetom.

Poupin i saradnici (2016) su pokazali da prisustvo *P. phytofirmans* PsJN reguliše značajan broj gena uključenih u signalne puteve auksina i etilena kod *A. thaliana*. Takođe, pokazano je da *P. phytofirmans* PsJN, indukuje brz i specifičan molekularni odgovor koji je snažno povezan sa signalnim putevima jasmonata, salicilne kiseline, etilena i ROS, a koji podržava otpornost *A. thaliana* na *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Timmermann *et al.*, 2019). Infekcija rezistentnog genotipa *Camellia sinensis* biotrofnom gljivom *Exobasidium vexans* je dovela do diferencijalne ekspresije 149 gena povezanih sa odbranom, među kojima su enzimi koji učestvuju u odbrani, geni rezistencije, transkripcioni faktori, šaperoni, što sugerise njihovu ulogu u odbrani protiv ovog patogena (Jayaswall *et al.*, 2016). Transkriptomске studije su pokazale da tokom interakcije pirinča sa PGPB *A. brasilense* i *H. seropedicae* dolazi do diferencijalne ekspresije 628 gena tokom interakcije sa obe PGPB (Wiggins *et al.*, 2022). Geni za koje je detektovana povećana ekspresija su uključeni u biosintezu flavonoida, i transportere nitrata i šećera, dok su geni uključeni u biosintezu etilena, signalizaciju auksina i geni uključeni u odbranu bili sa smanjenom ekspresijom.

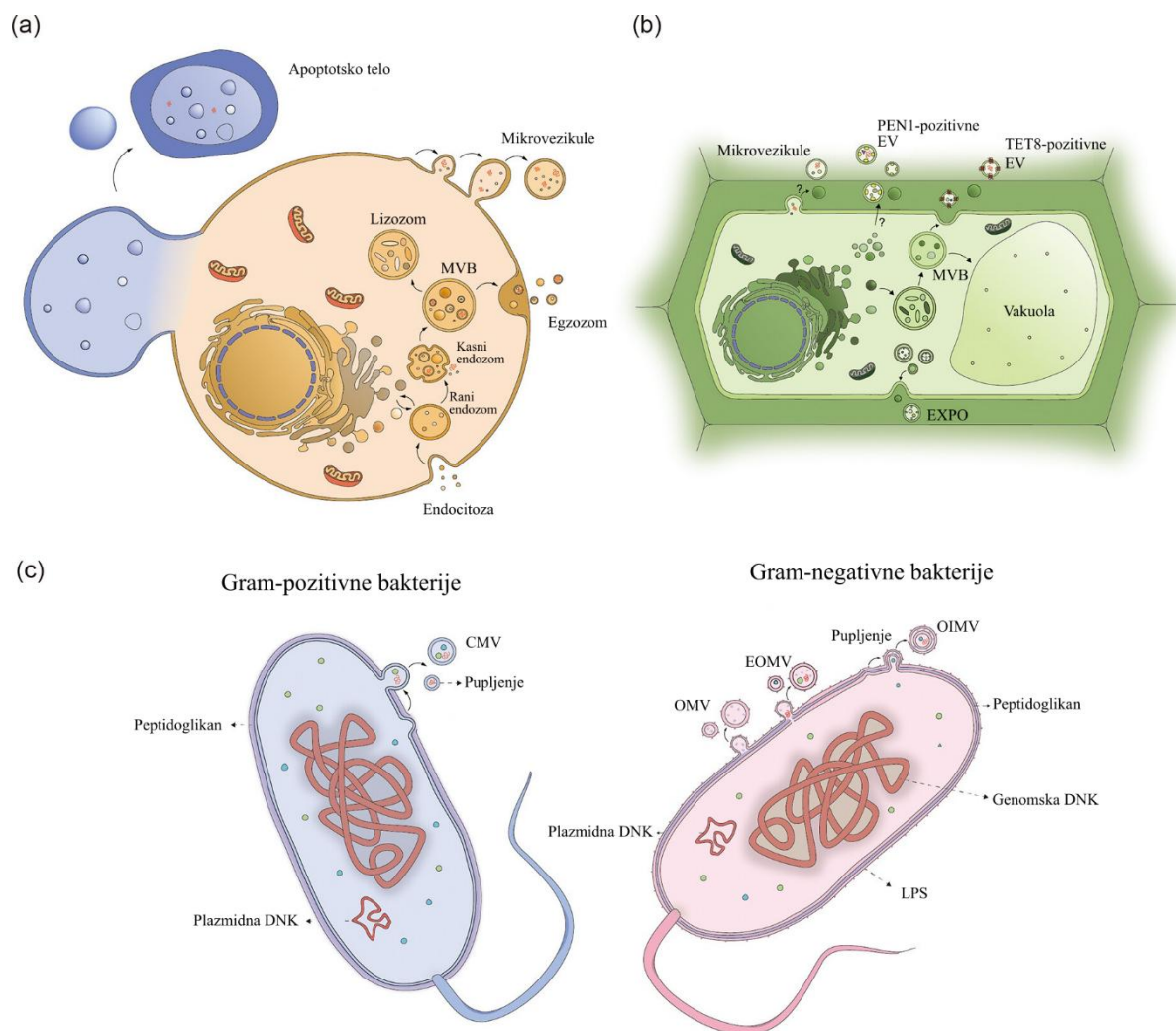
Različite klase malih nekodirajućih RNK u biljkama su uključene u regulaciju imunskog odgovora. Mikro RNK *A. thaliana*, miR863-3p, predstavlja dobar primer kako male nekodirajuće RNK mogu regulisati negativne i pozitivne regulatore biljnog imuniteta i precizno modulisati vreme i jačinu imunskog odgovora (Niu *et al.*, 2016). Tokom rane faze infekcije *P. syringae* pv. tomato DC3000 indukovana je ekspresija miR863-3p. Kroz degradaciju iRNK, miR863-3p utišava ekspresiju dva negativna regulatora odbrane ARLPK1 i ARLPK2 (eng. *atypical receptor-like pseudokinase*) i indukuje imunski odgovor. Kasnije tokom infekcije, ova miRNK utišava ekspresiju gena SERRATE, koji je ključan za akumulaciju miRNK što dovodi do smanjenja nivoa miR863-3p, čime se formira negativna povratna sprega koja ublažava imunski odgovor nakon uspešno sprovedene odbrane od *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Niu *et al.*, 2016). Male interferirajuće RNK takođe učestvuju u imunskom odgovoru. Biogeneza phasiRNK (eng. *Phased secondary small interfering RNAs*) podrazumeva postojanje dvolančane RNK - dsRNK koja se dobija nakon isecanja targetnog iRNK molekula uz pomoć 22 nt duge miRNK. U odsustvu patogena phasiRNK kontrolišu ekspresiju NLR (eng. *nucleotide-binding, leucine-rich repeat receptor*) - receptora koji prepoznaje PAMP. Infekcija biljke pamuka patogenom *Verticillium dahliae* potiskuje ekspresiju miR482 što zauzvrat smanjuje generisanje phasiRNK čime se povećava ekspresija NLR gena (Zhu *et al.*, 2013).

1.4. Ekstracelularne vezikule

Ekstracelularne vezikule (EV) su nanopartikule koje produkuju sve eukariotske i prokariotske ćelije. One nose različite biomolekule, uključujući proteine i nukleinske kiseline, obavijene i zaštićene lipidnom membranom i izlučuju ih van ćelije. Njihova glavna uloga je prenos biomolekula između ćelija, čime omogućavaju međućelijsku komunikaciju u fiziološkim i patološkim procesima. Postojanje nanopartikula u biološkim uzorcima prvi put je uočeno polovinom 20. veka u frakcijama izolovanim iz krvi (Chargaff, 1945). Početkom sedamdesetih godina prošlog veka je Crawford koristeći elektronsku mikroskopiju pokazao da ove partikule sadrže lipide i proteine, čime je ukazano na njihov potencijalni biološki značaj. Nunez i saradnici su 1974. godine opisali multivezikularne organele koje se fuzionišu sa plazma membranom, pri čemu se oslobađaju vezikule veličine 1-10nm. Danas se taj proces definiše kao formiranje egzozoma. Osamdesetih i devedesetih godina prošlog veka rađeni su eksperimenti u kojima su ekstracelularne vezikule – EV definisane kao posebni entiteti sa funkcionalnim i enzimskim potencijalom (Couch *et al.*, 2021). Ova pionirska istraživanja postavila

su temelje savremenoj biologiji EV. Sveprisutnost EV u svim carstvima živih organizama potvrđena je 2000. godine kada je njihovo prisustvo detektovano i kod arhea (Raposo & Stoorvogel, 2013). Tokom poslednjih 25 godina broj istraživanja o EV eksponencijalno raste. Iako se prvobitno smatralo da vezikule služe samo za odstranjivanje nepotrebnih materija, sada se zna da ove strukture učestvuju u međucelijskoj komunikaciji kao i komunikaciji između različitih organizama, a njihov lipidni dvosloj obezbeđuje intaktnost sadržaja koji prenose.

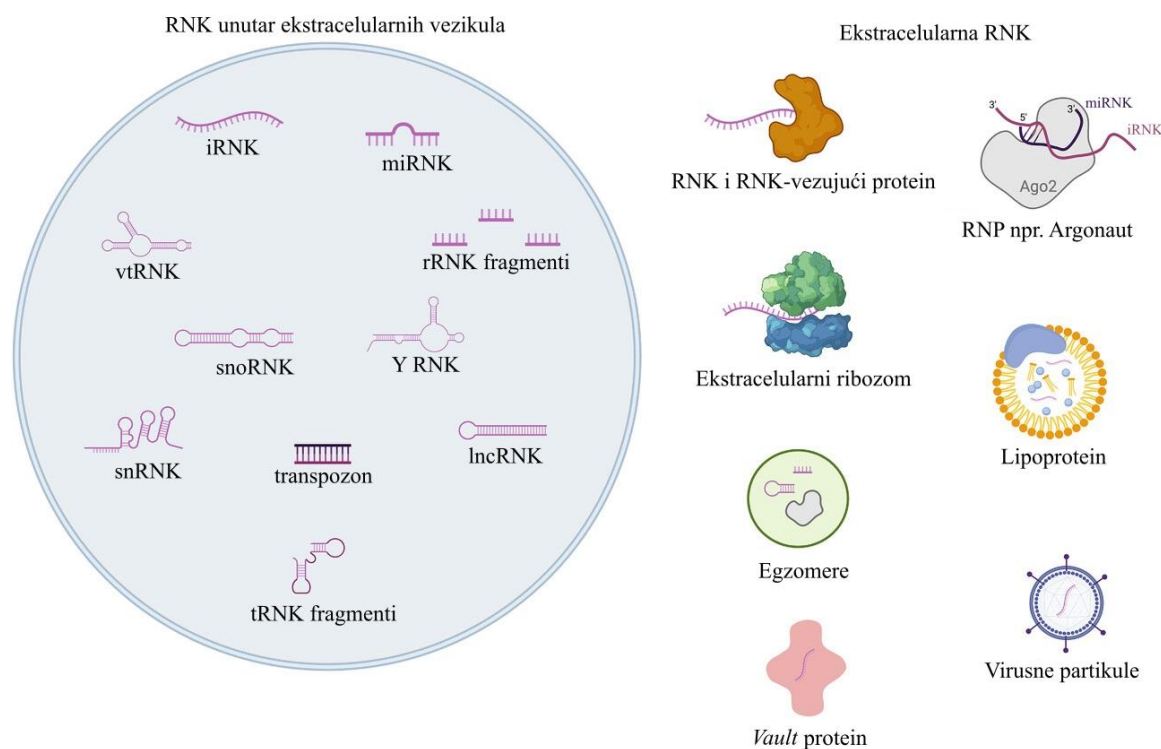
Sadržaj EV zavisi od tipa vezikule, fiziološkog stanja ćelije i uslova sredine. Pored toga vezikule koje proizvode iste ćelije pod istim uslovima nisu homogene, već variraju po veličini i karakteristikama (Ñahui Palomino *et al.*, 2021). U zavisnosti od svoje biogeneze i veličine, kod životinja se mogu razlikovati egzozomi, mikrovezikule i apoptotska tela. Egzozome karakteriše veličina od 30 do 150 nm, i biogeneza koja uključuje multivezikularna tela. Mikrovezikule predstavljaju strukture veličine od 100 do 1000 nm koje nastaju pupljenjem ćelijske membrane. Apoptotska tela nastaju usled programirane ćelijske smrti i mogu dostići veličinu od 5000 nm (Ng *et al.*, 2022). EV biljaka takođe možemo svrstati u tri grupe: vezikule slične egzozomima, egzocist pozitivne vezikule i vezikule koje vode poreklo od vakuole. EV Gram-pozitivnih bakterija čine citoplazmatske membranske vezikule - CMV. Vezikule Gram-negativnih bakterija uglavnom čine vezikule koje se formiraju pupljenjem spoljašnje membrane po čemu su i dobile naziv – OMV (eng. *outer membrane vesicles*). Pored OMV kod Gram-negativnih bakterija opisane su vezikule koje nastaju pupljenjem i spoljašnje i unutrašnje membrane – OIMV (eng. *outer and inner membrane vesicles*), kao vezikule koje se formiraju nasumičnim fuzionisanjem delova membrane nakon eksplozivne ćelijske lize – EOMV (eng. *explosive outer membrane vesicles*), slika 1.6, (Suri *et al.*, 2023).



Slika 1.6 Različiti tipovi vezikula poreklom od a) animalnih, b) biljnih, i c) bakterijskih ćelija. Preuzeto iz Lo *et al.*, 2024.

1.4.1. Učešće EV i ekstracelularnih sRNK u komunikaciji između ćelija i organizama

Ekstracelularnu RNK - eRNK čine RNK molekuli koji se nalaze izvan ćelija, i najčešće su zaštićeni ekstracelularnim vezikulama (EV-RNK) ili nevezikularnim proteinskim kompleksima. Ekstracelularnu RNK čine gotovo sve klase RNK: iRNK (i njihovi fragmenti), regulatorne nekodirajuće RNK (male nekodirajuće RNK - miRNK, siRNK, duge nekodirajuće RNK, cirkularne RNK), tRNK i rRNK fragmenti, male nuklearne i nukleolarne RNK (Dellar *et al.*, 2022), (slika 1.7).



Slika 1.7 Ekstracelularna RNK unutar ekstracelularnih vezikula (EV) i eRNK vezana za nevezikularne proteine. Ekstracelularne RNK mogu biti vezane Argonaut proteine, ekstracelularne ribosome, RNK-vezujuće proteine, egzomere, vault proteine, lipoproteine i čestice virusa. Preuzeto iz Dellar *et al.*, 2022.

Novije studije pokazuju da je pakovanje RNK u EV selektivan proces - neke RNK su obogaćene, dok druge odsustvuju ili su slabo zastupljene u vezikulama. Posebno su zanimljive i značajne studije koje potvrđuju signalnu i regulatornu ulogu EV-RNK u recipijentnim ćelijama (Baldrich *et al.*, 2019; Leitão *et al.*, 2020; Dellar *et al.*, 2022).

Transfer iRNA i miRNA između ćelija posredstvom ekstracelularnih vezikula, prvi put je pokazan 2007. godine (Valadi *et al.*, 2007). Egzozomi mišjih i humanih mastocitnih linija, kao i primarnih mastocita iz koštane srži, sadrže iRNA i miRNA i mogu ih transportovati u druge mišje i humane mastocyte. Nakon prenosa mišje egzozomske RNK u humane mastocyte, u recipijentnim ćelijama su detektovani mišji proteini što ukazuje da preneti egzozomska iRNA može biti translirana nakon ulaska u drugu ćeliju. Ova i druge studije koje su usledile ukazale su da EV imaju ključnu ulogu u prenosu informacija između susednih i udaljenih ćelija i u modulaciji fiziologije recipijentnih ćelija (Dellar *et al.*, 2022).

Pored uloge u međućelijskoj komunikaciji, nedavna istraživanja otkrila su značajne uloge EV i eRNA u komunikaciji između različitih organizama koji pripadaju različitim vrstama, pa čak i različitim carstvima.

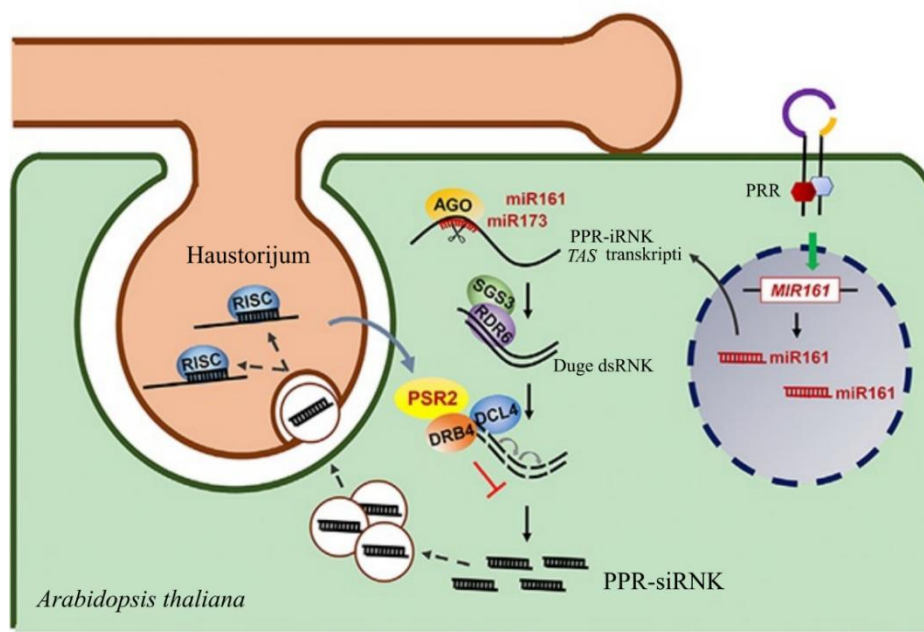
Transfer RNK između različitih animalnih vrsta putem EV pokazan je između humanih i ćelija crevnih parazita. U studiji Buck i sar. (2014) okarakterisane su EV koje nematoda *Heligmosomoides polygyrus bakeri* proizvodi u crevima miševa. Ove EV nose parazitske miRNA i Y RNA i ubacuju ih u mišje ćelije crevnog epitela. Nakon inkubacije sa *H. polygyrus* EV, u ćelijama miša dolazi do supresije imunog odgovora tipa 2, kao i do smanjenja ekspresije nekih gena uključenih u zaštitu od višćelijskih parazita (Buck *et al.*, 2014). U EV ovog parazita je detektovano prisustvo i siRNA, u većem udelu u odnosu na miRNA, kao i specifičnog Argonaut proteina exWAGO (eng. *extracellular Worm AGO*) (Chow *et al.*, 2019). Imunoprecipitacija exWAGO je potvrdila pretpostavku da se ovaj

protein vezuje za siRNK poreklom od transpozona i repetitivnih elemenata, koje se pakuju u EV i otpuštaju u okruženje domaćina. Ovi rezultati ukazuju da se selekcija RNK molekula za eksport može ostvarivati učešćem RNK-vezujućih proteina. Odrasli crvi oslobađaju velike količine exWAGO zbog čega se može zaključiti da je ovaj protein potreban tokom infekcije domaćina. ExWAGO je detektovan i unutar imunih ćelija domaćina koje su okružene ćelijama ovog parazita, ali se ne može zaključiti da li je to vezikularna ili nevezikularna forma exWAGO (Neophytou *et al.*, 2025).

U kasnijim istraživanjima potvrđeno je učešće EV i eRNK i u interakcijama između vrsta koje pripadaju različitim carstvima. Pokazano je da se transfer eRNK sadržanih u EV, praćen regulacijom ekspresije gena u ćelijama domaćina, odvija između biljaka i gljiva, kao i između bakterijskih i animalnih ćelija (uključujući i humane). Utvrđeno je da biljne EV prenose sRNK u fungalne patogene i time utišavaju gene virulencije. S druge strane, fungalne sRNK mogu da utišaju biljne gene uključene u imuni odgovor.

Cai i saradnici su pokazali da *A. thaliana* šalje male RNK u ćelije *B. cinerea* uz pomoć EV. Tokom infekcije, *A. thaliana* proizvodi specifične tasiRNK (eng. *trans acting small interfering RNA*) TAS1c-siR483 i TAS2-siR453 koje ciljaju fungalne gene uključene u vezikularni transport i sekreciju - procese ključne za patogenezu. Prečišćeni protoplasti fungalnih ćelija iz zaraženog tkiva sadrže najmanje 42 biljne sRNK, od kojih je 31 pronađena i u apoplastnim EV, što snažno sugerise da EV prenose ove RNK u *B. cinerea*. Time je obezbeđeno utišavanje virulentnih gena i virulencija *B. cinerea*. Mutantne linije *A. thaliana* sa overeksuprimiranim TAS1c-siR483 i TAS2-siR453 su otpornije na *B. cinerea*. EV koje prenose ove tasiRNK su TET-8 (tetraspanin 8) pozitivne biljne vezikule slične egzozomima. Obeležavanjem sa GFP takođe je pokazano njihovo nakupljanje na mestu infekcije. Mutanti *tet8 A. thaliana* su podložniji infekciji *B. cinerea* (Cai *et al.*, 2018). Ova borba između biljaka i fungalnih patogena posredstvom EV i malih RNK je dvosmerna. *B. cinerea* stvara sRNK koje targetuju odbrambene gene *A. thaliana* i ubacuje ih u ćelije ove biljke upravo putem EV (He *et al.*, 2023).

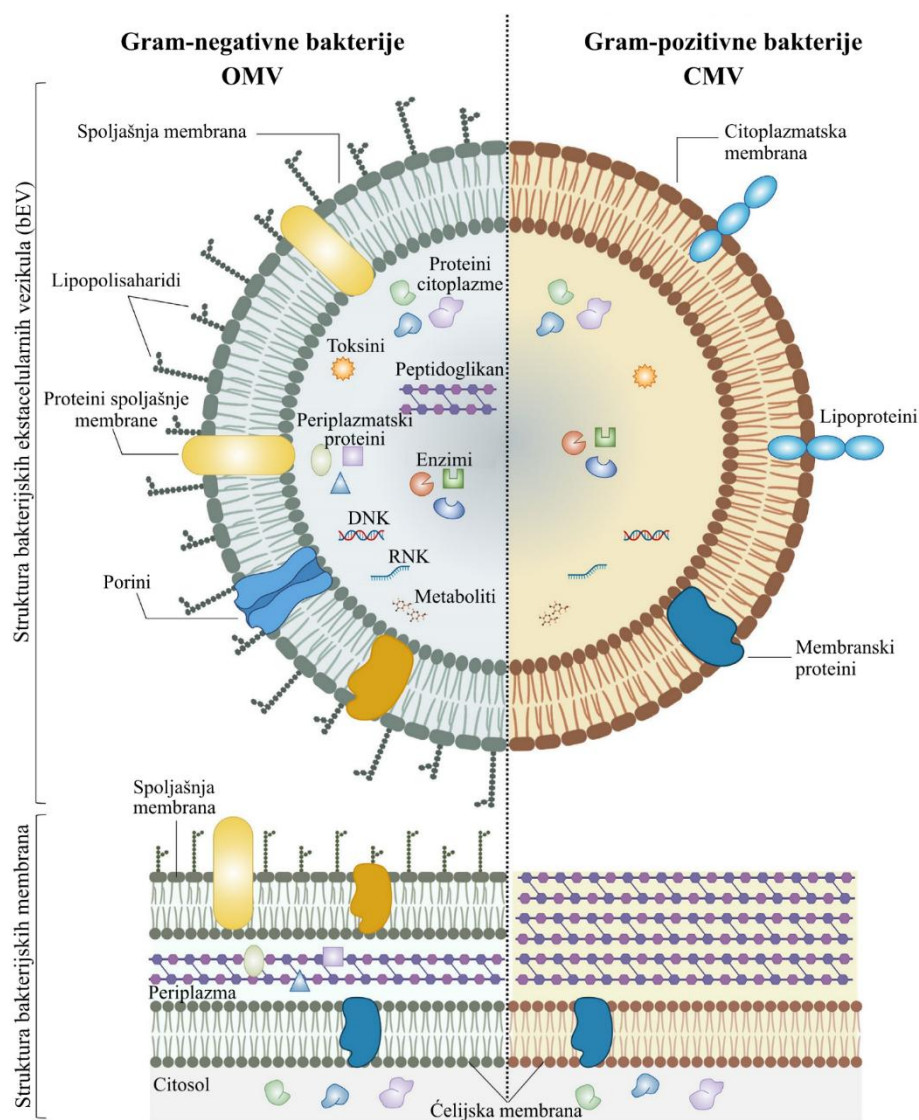
Transportovanje malih RNK putem EV i utišavanje gena drugog organizma uočeno je i u interakciji biljaka sa oomicetama. Tokom infekcije *A. thaliana* oomicetom *Phytophthora capsici* povećava se nivo miR161 koja pokreće biogenezu sekundarnih malih interferirajućih RNK - siRNK sa PPR lokusa (eng. *pentatricopeptide-repeat protein*) (Hou *et al.*, 2019). Ove PPR-siRNK ne utišavaju biljne gene, već se transportuju putem biljnih EV i utišavaju target gene *P. capsici* koji učestvuju u razviću i patogenosti ove oomicete. PPR-siRNK kao što su siR1310 i siR0513 su detektovane u biljnim EV, a njihova količina u EV raste posle infekcije. Sa druge strane, *P. capsici* proizvodi efektor PSR2 koji specifično suprimira biogenezu sekundarnih siRNK u *A. thaliana*, čime utišava EV-posredovanu odbranu, što predstavlja klasičan primer evolutivne trke (slika 1.8).



Slika 1.8. Uloga sekundarnih siRNK i ekstracelularnih vezikula u odbrani *A. thaliana* od infekcije fitopatogenom oomicetom *Phytophthora capsici*. (Preuzeto iz Hou *et al.*, 2019).

1.4.2. Ekstracelularne vezikule bakterija

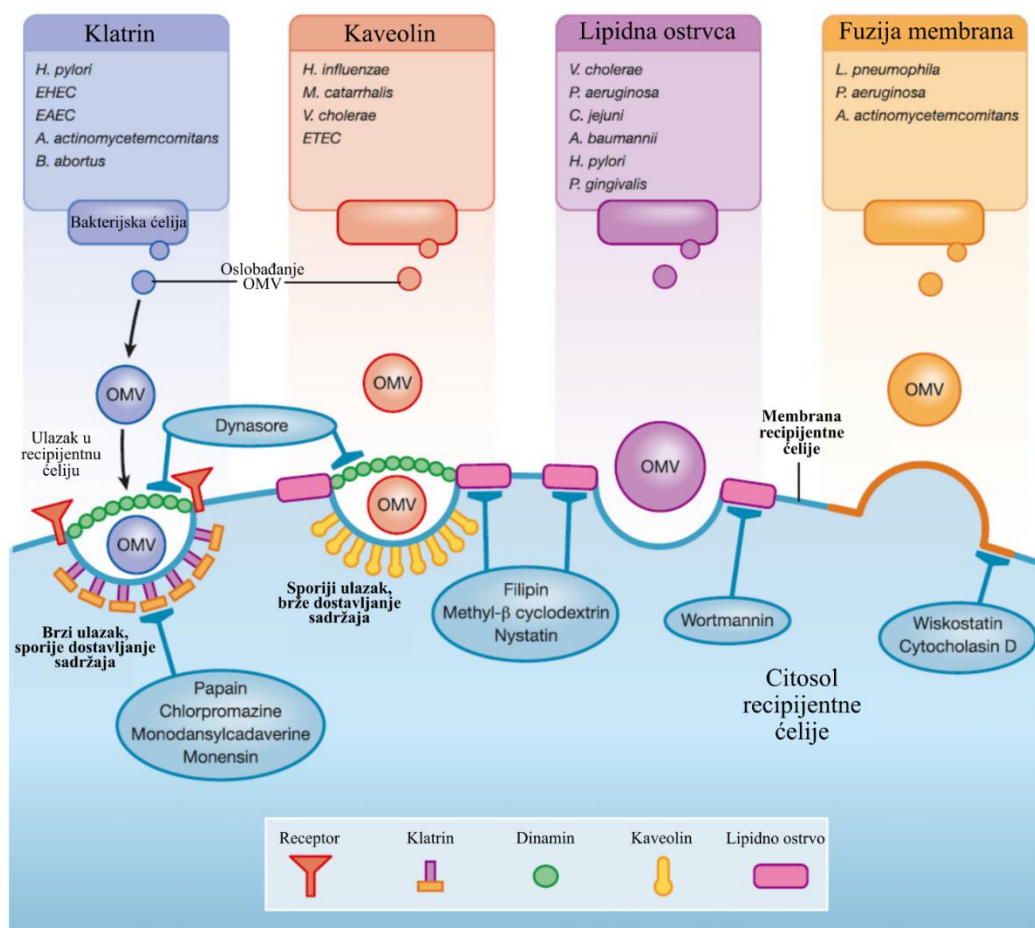
Ekstracelularne vezikule bakterija – bEV su lipidnim dvoslojem oivčene strukture veličine od 20 do 500 nm, koje proizvode i Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije (O'Donoghue & Krachler, 2016; Suri *et al.*, 2023). Kulp i saradnici su 2015. godine pokazali da je kod *E. coli* u proces formiranja vezikula uključeno skoro 150 gena (Kulp *et al.*, 2015). Biogeneza OMV je modulirana uslovima rasta i dostupnošću nutrijenta. Zapažena je povećana proizvodnja OMV kod *Lysobacter* sp. i *Pseudomonas fragi* kao odgovor na smanjenu ili povećanu količinu nutrijenata. EV Gram-pozitivnih nastaju pupljenjem citoplazmatske membrane po čemu su ove vezikule i dobile ime - citoplazmatske membranske vezikule odnosno CMV. Pretpostavlja se da enzimi poput endolizina/autolizina stanjuju peptidoglikan i omogućavaju izbočenje membrane i oslobađanje CMV (Suri *et al.*, 2023), slika 1.9). Nedavne studije su pokazale da EV Gram-pozitivnih bakterija imaju značajnu ulogu u formiranju biofilмова i uspostavljanju antibiotske rezistencije (Briaud & Carroll, 2020). Pored toga, pokazano je da se ovim EV transportuju receptori za fage i toksine, čime ćelije postaju podložnije napadima faga i drugih bakterija. Vezikule Gram-negativnih bakterija se pretežno formiraju pupljenjem spoljašnje membrane - OMV (eng. *outer membrane vesicles*). Kao što je ranije pomenuto, kod Gram-negativnih bakterija postoje i vezikule koje nastaju pupljenjem i spoljašnje i unutrašnje membrane – OIMV (eng. *outer and inner membrane vesicles*), kao i vezikule koje se formiraju nasumičnim spajanjem delova mebrane nakon eksplozivne ćelijske lize – EOMV (eng. *explosive outer membrane vesicles*), slika 1.6. (Effah *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2025).



Slika 1.9. Struktura i sastav bEV koje sekretuju Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije (Preuzeto iz (Effah *et al.*, 2024))

Unutrašnji sadržaj vezikula se sastoji od proteina (enzima, toksina, faktora virulencije, periplazmatskih/citoplazmatskih proteina), nukleinskih kiselina (plazmidske/genomske DNK, iRNK, nekodirajućih RNK molekula), peptidoglikana (Yáñez-Mó *et al.*, 2015; Suri *et al.*, 2023; Magaña *et al.*, 2023).

Opisano je nekoliko različitih mehanizama koji omogućavaju da OMV poreklom od različitih Gram-negativnih bakterija uđu u ćelije domaćina kako bi ostvarile svoju ulogu (slika 1.10). Veličine OMV variraju, a njihova veličina može uticati na način ulaska u recipijentne ćelije (O'Donoghue & Krachler, 2016). Jedan od načina ulaska OMV u ćelije domaćina jeste endocitoza posredovana kaveolinom ili klatrinom za koje je potrebno prisustvo dinamina. Endocitoza posredovana lipidnim ostrvcima (*lipid rafts*) je nezavisna od kalveolina i dinamina. Uprkos različitoj arhitekturi membranskog dvosloja prisutnog u OMV i eukariotskim ćelijama domaćina, fuzija membrana je opisana kao jedan od mehanizama ulaska OMV u ćelije domaćina. U studiji Bomberger i saradnika (2009), OMV poreklom od *Pseudomonas aeruginosa* su obeležene auto-utišavajućom (*self quenching*) fluorescentnom bojom Rodamin-R18. Kada su ovako obeležene vezikule dodate epitelnim ćelijama domaćina, došlo je do fuzije vezikula sa ćelijskim membranama domaćina, što je dovelo do razblaživanja boje, prestanka auto-utišavanja i pojave fluorescentnog signala.



Slika 1.10. Načini ulaska OMV u recipijentne ćelije. Ulazak OMV u ćelije domaćina može biti zavisen od klatrina, zavisen od kaveolina, posredovan lipidnim ostrvcima, i omogućen fuzijom membrane OMV i ćelije domaćina. Ulazak OMV može biti onemogućen upotrebom inhibitora komponenti ovih puteva. (Preuzeto iz O'Donoghue & Krachler, 2016)

1.5. Nekodirajuće RNK poreklom od bakterija

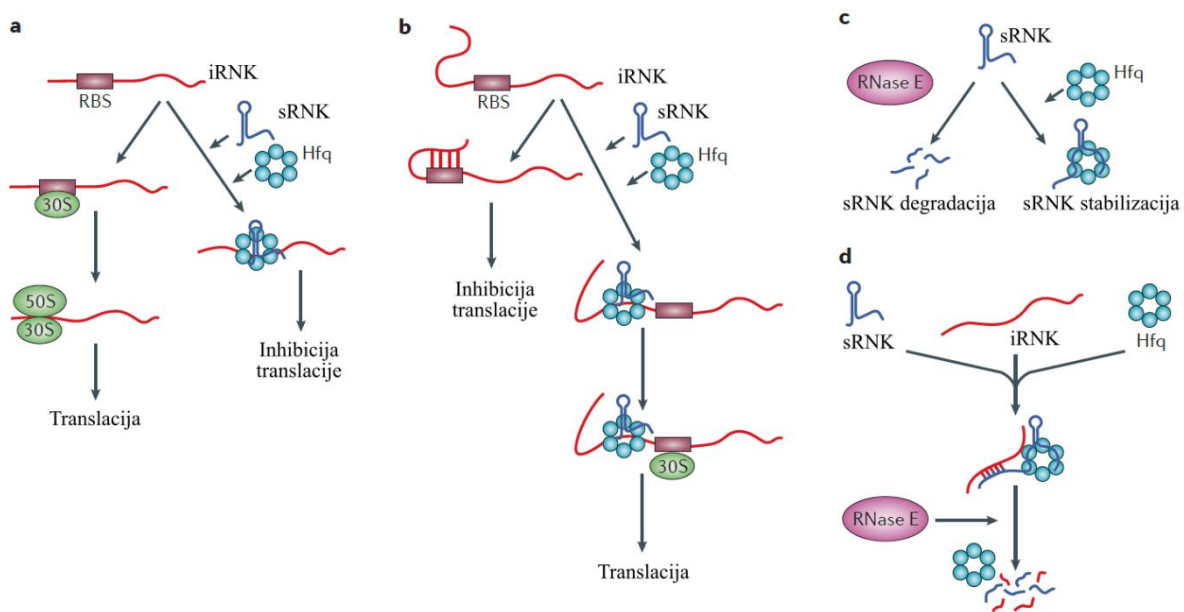
Regulatorne RNK čine grupu RNK molekula čija je glavna uloga da regulišu ekspresiju gena. Iako se ranije smatralo da ovi RNK molekuli ne služe kao matrica za sintezu proteina, istraživanja su pokazala da neke regulatorne RNK mogu i kodirati proteine.

Nekodirajuće RNK – ncRNK (eng. *non-coding RNA*) predstavljaju klasu RNK molekula koji se ne transliraju u proteine. Ovi RNK molekuli predstavljaju glavne posttranskripcione regulatore ekspresije gena, i imaju ključnu ulogu u mnogim fiziološkim i adaptivnim odgovorima kod bakterija (Nitzan *et al.*, 2017). Iako im naziv govori da ne kodiraju proteine neke od njih kao što su SgrS ili RNAIII od *E. coli* ili *Staphylococcus aureus* ipak sadrže kodirajuće regione (Michaux *et al.*, 2014). Suočene sa brzo promenljivim okruženjem, za bakterije je povoljnije da koriste odgovore posredovane ncRNK nego regulacijom putem transkripcionih faktora budući da ncRNK zahtevaju manje energije i vremena za sintezu i razgradnju (Michaux *et al.*, 2014). Dužina nekodirajućih RNK kod bakterija je uglavnom od 50 do 250 nukleotida. Za razliku od eukariotskih, male RNK bakterija su heterogene po veličini i strukturi (Vogel & Luisi, 2011). Uz pomoć ncRNK bakterije usklađuju svoju fiziologiju sa promenama životne sredine kako bi preživele. Regulatorne RNK imaju ključne uloge u različitim ćelijskim procesima kao što su virulencija, kvorum-sensing (eng. quorum-sensing, QS), odgovor na manjak gvožđa, oksidativni stres i manjak ugljenika (Hoe *et al.*, 2013). Razlikujemo male regulatorne RNK – sRNK (eng. *small RNA*), riboprekidače i RNK termosenzore.

1.5.1. Male regulatorne RNK

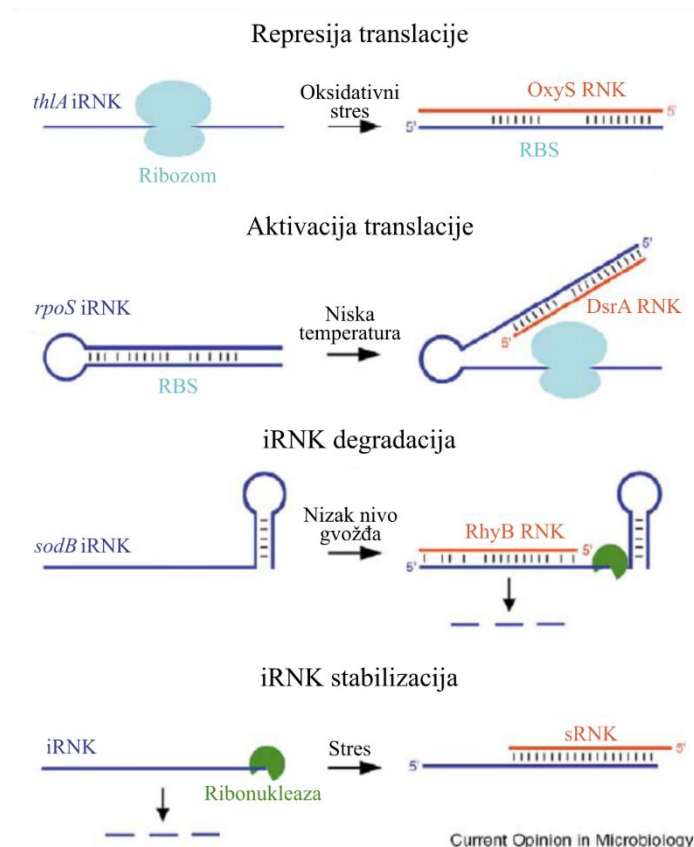
Male RNK - sRNK su kratki transkripti, do 200 nukleotida, koji su uglavnom *trans*-kodirani ili u manjoj meri *cis* regulatorni RNK molekuli.

Trans-kodirane regulatorne male RNK su najbrojnija i najbolje proučena klasa bakterijskih sRNK. One čine centralni deo posttranskripcione kontrole u većini bakterija. Ove sRNK se transkribuju sa zasebnih promotora u intergenskim regionima na lokacijama udaljenim od svojih ciljnih gena (Mahendran *et al.*, 2022). Sa ciljnom iRNK ostvaruju samo delimičnu komplementarnost i stoga jedna mala RNK može regulisati više različitih iRNK. Zbog nepotpune komplementarnosti, a kako bi se stabilisala mala RNK i olakšao prepoznavanje i sparivanje sa ciljnom iRNK potrebno je vezivanje male RNK za RNK šaperon – protein Hfq. Vezivanje sRNK za iRNK može voditi represiji ili aktivaciji ekspresije ciljnog gena. Male RNK se uz pomoć Hfq šaperona vezuju za mesto vezivanja ribozoma – RBS (eng. *ribosome binding site*) na ciljnoj iRNK, čime se blokira vezivanje 30S i 50S ribozomskih subjedinica i inhibira translacija (slika 1.11). Kod nekih iRNK sekundarna struktura 5'UTR regiona može da se veže za RBS i inhibira translaciju. Vezivanjem kompleksa sRNK i Hfq uzvodno od RBS, sprečava se formiranje ove inhibitorne strukture i omogućava vezivanje 30S subjedinice i translacija. Šaperon Hfq može omogućiti stabilnost sRNK za koju je vezan, ali može i regrutovati RNazu čime dolazi do degradacije i sRNK i iRNK targeta. Informacione RNK nisu jedini targeti malih RNK bakterija, već to mogu biti i drugi tipovi RNK i proteini.



Slika 1.11. Aktivnost sRNK u kompleksu sa Hfq proteinom. (Preuzeto iz Vogel & Luisi, 2011)

Kao što se može videti na slici 1.12. kod *E. coli*, sparivanje male RNK OxyS sa iRNK ThIA tokom oksidativnog stresa sprečava translaciju ove iRNK, dok sparivanje između DsrA i njene ciljne iRNK rpoS olakšava translaciju u uslovima niske temperature. Kada se *E. coli* nađe u okruženju sa manjkom gvožđa, mala RNK RhyB se vezuje za ciljnu RNK sodB čime dovodi do njene degradacije. Takođe, vezivanjem za ciljnu iRNK male RNK mogu dovesti do stabilizacije iRNK kroz blokadu pristupa ribonukleazi (Storz *et al.*, 2004).



Slika 1.12. Primeri sRNA i njihove uloge tokom vezivanja za ciljne iRNA (Preuzeto iz Storz *et al.*, 2004)

Cis-antisense RNA se transkribuju sa antisense lanca ciljnog gena, što im omogućava potpunu komplementarnost sa iRNA targetom. *Cis*-antisense RNA mogu imati i više od 75 komplementarnih baza sa ciljnom iRNA (Michaux *et al.*, 2014). Ovi regulatorni RNA molekuli se perfektno sparuju sa svojim ciljnim iRNA, čime se formira stabilan RNA-RNA dupleks. Ovaj dupleks može inhibirati translaciju kroz blokadu vezivanja ribozoma, ili obezbediti vezivanje RNAze III i druge endonukleaze čime dolazi do degradacije oba transkripta (Vogel & Sharma, 2005; Hoe *et al.*, 2013). Zbog duge i gotovo savršene komplementarnosti ove male RNA često deluju nezavisno od Hfq šaperona. U *E. coli* je detektovana antisense RNA *sokB*, koja se sparuje sa ciljnim transkriptom *mokB*, čime se inhibira njegova ekspresija. Slično tome, antisense *rdlB* modulira translaciju *LdrB* verovatno putem mehanizma blokiranja RBS (Ghosal *et al.*, 2015).

1.5.2. Riboprekidači

Riboprekidači (eng. *riboswitches*) su *cis*-delujućim RNA regulatori poreklom od 5' UTR (eng. *untranslated regions*) regiona (Ellinger *et al.*, 2023). Ove nekodirajuće RNA direktno vezuju male ligande (metabolite, jone ili koenzime) i koristeći svoje specifične sekundarne strukture utiču na transkripciju i translaciju (Mahendran *et al.*, 2022; Narunsky *et al.*, 2024). Riboprekidači se sastoje od aptamer domena koji je visoko konzervisan i koji prepoznaje ligand, i ekspresione platforme koja menja strukturu pri vezivanju liganda i utiče na terminaciju transkripcije, inicijaciju translacije i stabilnost (Mahendran *et al.*, 2022; Narunsky *et al.*, 2024).

Prema ligandu koji vezuju, riboprekidači se mogu grupisati u nekoliko grupa:

1. purinski i koenzimski riboprekidači – vezuju adenin/guanin, S-adenozil-metionin i/ili S-adenozin-homocistein, tiamin pirofosfat, flavin-mononukleotid, adenzil-kobalamin, NAD

2. metal/jonski riboprekidači – vezuju Mg^{2+} , Ni^{2+} i Co^{2+} , Mn^{2+}
3. aminokiselinski riboprekidači direktno vezuju slobodne aminokiseline (npr. glicin, lizin, glutamin), dok tRNK (T-box) riboprekidači indirektno detektuju dostupnost aminokiselina vezujući neaminoaciliranu tRNK.
4. katalitički riboprekidači – ribozim koji formira 3D strukturu kojom se omogućava sopstveno isecanje (Mahendran *et al.*, 2022; Narunsky *et al.*, 2024).

1.5.3. RNK termosenzori

RNK termosenzori – RNAT (eng. *RNA thermometers*) su *cis*-regulatorni elementi u 5' UTR koji koriste promene temperature da uključe ili isključe translaciju bez potrebe za dodatnim proteinima ili ligandima (Hoe *et al.*, 2013). RNAT su najčešće u formi ukosnice ili skupa ukosnica u 5' UTR koje na niskoj temperaturi zaklanjaju Shine-Dalgarno sekvencu i/ili start kodon, čime blokiraju vezivanje ribozoma i inicijaciju translacije (Hoe *et al.*, 2013; Mahendran *et al.*, 2022). Povećanje temperature destabilizuje vodonične veze i mehanizmom rajsferšlusa se omogućava formiranje kompleksa inicijacije translacije (Hoe *et al.*, 2013). Suprotno tome, kod nekih RNAT niža temperatura favorizuje konfiguraciju koja omogućava translaciju (Hoe *et al.*, 2013). Glavni tip RNK termosenzora su ROSE elementi (eng. *Repression Of heat Shock gene Expression*) koji su asocirani sa genima koji kodiraju male *heat shock* proteine. ROSE elementi su pronađeni kod rizobija i α - i γ -proteobakterija (Hoe *et al.*, 2013).

1.6. Uloga bakterijskih EV i sRNK u komunikaciji između ćelija i organizama

1.6.1. *Intra-kingdom* komunikacija posredovana bEV i sRNK

Pre skoro 30 godina je pokazano da se ekstracelularne membranske vezikule Gram-negativne bakterije *Pseudomonas aeruginosa* vezuju ili fuzionišu sa membranama drugih bakterija (Kadurugamuwa & Beveridge, 1996). Interakcija OMV *P. aeruginosa* je pokazana i sa Gram-pozitivnom - *S. aureus* i Gram-negativnom bakterijom - *E. coli*.

Unutar bakterijskih zajednica, bEV i sRNK služe za koordinaciju odgovora na stres, horizontalni transfer gena, formiranje biofilma i kompeticiju među vrstama. Neke sRNK mogu učestvovati u regulaciji biogeneze OMV. Mala RNK VrrA *Vibrio cholerae* reprimira OmpA, protein koji povezuje spoljašnju membranu sa peptidoglikanima. Sa smanjenjem ekspresije ovog proteina povećava se oslobađanje vezikula. Ova sRNK ima homologe u *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Yersinia pestis* i *Klebsiella pneumoniae* (Ahmadi Badi *et al.*, 2020). Regulacija OMV biogeneze preko sRNK omogućava populaciji da pojača ili utiša ovaj put komunikacije u zavisnosti od uslova.

Iako je većina eksperimentalnih podataka trenutno na relaciji bakterija-domaćin postoje naznake da sRNK upakovane u OMV mogu targetirati i druge bakterije. OMV-sRNK mogu predstavljati strategiju koju bakterije koriste za ostvarivanje konkurentске prednosti u nastanjivanju iste ekološke niše. Kod *P. aeruginosa* tRNK fragment sRNA52320, prisutan u OMV *in silico* je predikovan kao komplementaran sekvencama funkcionalnih gena drugih bakterija kao što su *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Rhizobium*, *Clostridium*, *Methylobacterium* i *Variovorax paradoxus* (Koeppen *et al.*, 2016).

Predikovani ciljni geni sRNA52320 utiču na metabolizam, enzime transportere i transkripcione faktore kod *Streptococcus*, *Rothia*, *Prevotella* i *Burkholderia*, koje često ko-kolonizuju osetljive domaćine (Koeppen *et al.*, 2016). Jedan od predikovanih targeta sRNA5230 u više drugih bakterija

je TonB-zavisni sideroforni receptor, koji je bitan pri unosu gvožđa, esencijalnog elementa za rast i preživljavanje bakterija.

Mnoge sRNK su unutarćelijski regulatori metabolizma, stresa i formiranja biofilma, i deo su globalnih regulacionih mreža koje određuju fiziološko stanje bakterijske ćelije i populacije (Hoe *et al.*, 2013; Michaux *et al.*, 2014; Pita *et al.*, 2020). Male RNK koje se nalaze unutar OMV potiču iz ovih regulatornih mreža, a profil OMV-sRNK zavisi od uslova rasta i tipa stresa, pri čemu se on razlikuje od sastava intercelularne RNK. Kada se sRNK preuzmu od susednih ćelija one mogu podešavati iste regione čime se sinhronizuje prelazak dela populacije u novu fiziološku fazu (Bossi & Figueroa-Bossi, 2016).

1.6.2. Cross-kingdom komunikacija posredovana bEV i sRNK

Koeppen i saradnici su 2016. godine prvi put uočili da bakterijske EV i sRNK mogu učestvovati u *cross-kingdom* interakciji između bakterijskih i animalnih ćelija. U njihovoj studiji pokazano je da se sRNK upakovane u OMV patogene bakterije *P. aeruginosa* ubacuju u humane epitelne ćelije disajnih puteva. Detaljnije je okarakterisana sRNK sRNA52320, koja reguliše imunske odgovore kako u humanim ćelijama tako i u plućima miševa. Ova sRNK, poreklom od tRNK metionina, smanjuje LPS-indukovanu i OMV-indukovanu sekreciju interleukina-8 (IL-8) interferirajući sa iRNK u humanim epitelnim ćelijama disajnih puteva. Takođe ublažava OMV-indukovanu sekreciju homologa IL-8 KC (eng. *keratinocyte-derived chemokine*) citokina i infiltraciju neutrofila, koji uništavaju bakterijske ćelije, u plućima miševa. Korišćenjem OMV-sRNK *P. aeruginosa* obezbeđuje utišavanje neutrofilnog odgovora i perzistenciju u plućima.

Sličan način delovanja je pokazan i za sRNK koje se nalaze u OMV *Helicobacter pylori* (Zhang *et al.*, 2020). Ove OMV nose više desetina nekodirajućih RNK od kojih su dve, sR-2509025 i sR-989262, visoko obogaćene. Korišćenjem fluorescentne mikroskopije pokazano je da se ove male RNK isporučuju u ćelije adenokarcinoma želudca putem OMV. U recipijentnim ćelijama potom dolazi do smanjenja i LPS- i OMV- indukovane sekrecije IL-8. *H. pylori* koristi sRNK upakovane u OMV da oslabi neutrofilni/IL-8 imunski odgovor i tako doprinosi hroničnoj infekciji – gastritisu (Zhang *et al.*, 2020).

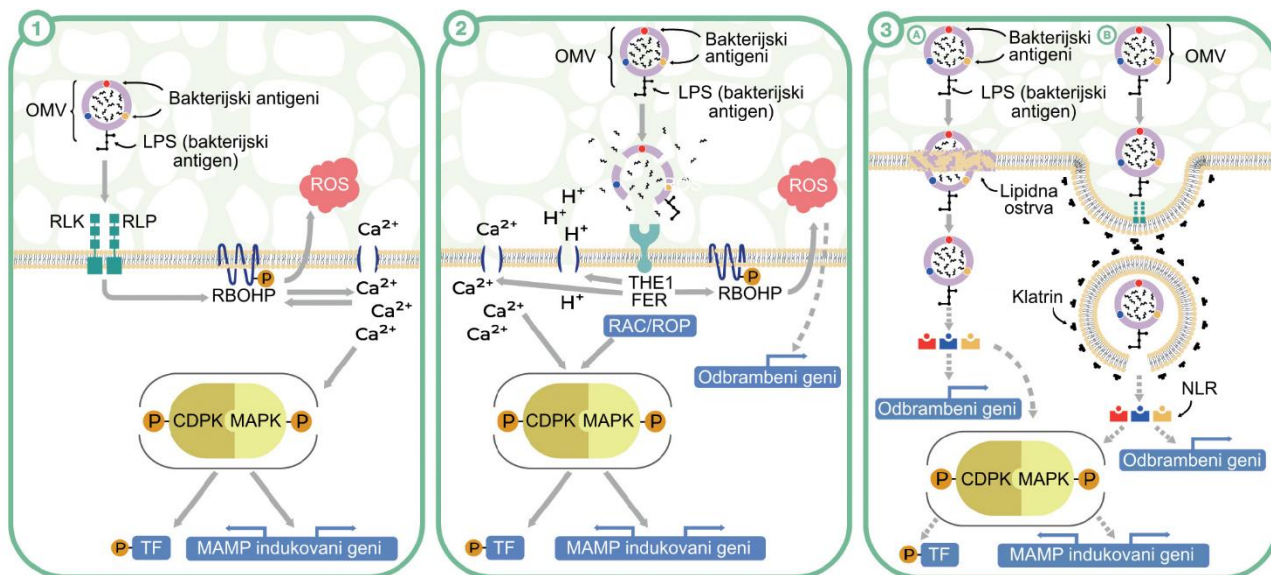
Analizom OMV uropatogene bakterije *E. coli* 536, Blenkiron i saradnici su pokazali da OMV koje oslobađa ovaj patogen sadrže rRNK, tRNK, iRNK i sRNK, kao i da se RNK profil vezikula razlikuje od ćelijskog. OMV obeležene lipidnom bojom ulaze u humane epitelne ćelije, a sadržaj OMV, odnosno RNK obeležene 5-EU (5-etinil uridin), se detektuje u citoplazmi i nukleusu. Procena je da se oko 1% OMV-RNK internalizuje u epitelnim ćelijama bešike (Blenkiron *et al.*, 2016).

Mala RNK koja je asocirana sa OMV, SsrA, se pokazala kao ključna tokom simbiotskih interakcija između *Vibrio fischeri* i lignje *Euprymna scolopes* (Pita *et al.*, 2020). Prenos signala putem SsrA radi modulacije odbrambenih mehanizama lignje ključni je element koji leži u osnovi simbiotske homeostaze (Moriani-Gutierrez *et al.*, 2020).

1.6.2.1. OMV i sRNK u interakcijama između bakterija i biljaka

Uloga OMV može se posmatrati kao deo strategije koje su razvile endofitske i patogene bakterije kako bi se zaštitile od antimikrobnih uslova unutar biljaka (McMillan *et al.*, 2021; Rudnicka *et al.*, 2022; Janda *et al.*, 2023). OMV fitopatogenih bakterija *P. syringae* pv tomato DC300 i *Stenotrophomonas maltophilia* sadrže β laktamaze i katjonske peptide, što sugerise na njihovu potencijalnu ulogu u deaktivaciji antimikrobnih peptida i drugih metabolita sintetisanih od strane biljaka (Devos *et al.*, 2015; Rudnicka *et al.*, 2022; Janda *et al.*, 2023). OMV koje sinetišu patogene bakterije sadrže i antioksidativne enzime kao što su superoksid dismutaza i katalaza uz pomoć kojih

se bakterije nose sa oksidativnim praskom u biljnim ćelijama (Rudnicka *et al.*, 2022). Bahar i saradnici su 2016. godine pokazali da OMV imaju imunostimulativno dejstvo tokom interakcije sa *A. thaliana*. Ova interakcija uključuje EF-Tu protein koji se nalazi u OMV, a kog prepoznaje PPR receptor EFR (eng. elongation factor receptor) *A. thaliana* (Bahar *et al.*, 2016). Rudnicka i saradnici su definisali tri hipotetička puta interakcije OMV sa biljnim ćelijama. Prvi pretpostavlja prepoznavanje OMV antigena od strane receptora na površini biljnih ćelija, drugi se zasniva na lizi OMV i oslobađanju njenog sadržaja u apoplast, dok teći predviđa internalizaciju OMV putem klatrin-zavisnog ili -nezavisnog puta (Rudnicka *et al.*, 2022), slika 1.13.



Slika 1.13. Tri pretpostavljena puta ulaska OMV u biljnu ćeliju. 1) Prepoznavanje OMV antigena uz pomoć receptora RLK i RLP, fosforilacija NADPH oksidaze RBOHP (eng. *respiratory burst oxidase homolog protein D*) koja dovodi do oksidativnog praska i povećanog unosa Ca^{2+} jona u ćeliju, aktivacije kalcijum zavisne protein kinaze - CDPK i MAPK kinaze i signalne kaskade koja uključuje aktivaciju transkripcionih faktora i mreže regulatornih gena. 2) Liza OMV i otpuštanje njenog sadržaja usled zakišeljavanja apoplasta. THE1 i FER, receptorske kinaze koje su uključene u održavanje integriteta ćelijskog zida, prepoznaju sadržaj OMV i dalje aktiviraju signalnu kaskadu posredovanu sa RBOHP i CDPK/MAPK. 3) Ulazak OMV u biljne ćelije klatrin-nezavisnim putem (uz pomoć lipidnih ostrva) i klatrin-zavisnim putem. Nakon ulaska u ćeliju OMV prepoznaju NLR receptori (eng. *nucleotide-binding, leucine-rich repeat receptor*) koji dalje pokreću signalnu kaskadu. Preuzeto iz Rudnicka *et al.*, 2022.

Upotreba OMV *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na klijancima *A. thaliana* dovodi do značajne zaštite od infekcije *X. campestris* pv. *campestris*, što je potvrđeno smanjenom bakterijskom populacijom u biljkama koje su tretirane OMV (Tran *et al.*, 2022). Ovi rezultati su pokazani i za *wild-type* OMV i za OMV izolovane od fliC mutanta, koji ne eksprimira FliC subjedinicu molekula flagelina, čime je pokazano da je zaštita samo delimično zasnovana na flg22/flagelinu, a dobrim delom na drugim komponentama OMV. Zaštita se primećuje čak i kod mutantnih biljaka za pojedine PRR i BAK1 receptore, što znači da OMV-posredovana biokontrola nije oslonjena na jedan receptor već na kompleksnu mrežu signala (Tran *et al.*, 2022). Ova studija je značajna i zato što je u njoj prvi put vizuelizovana direktna interakcija OMV sa biljnom plazma membranom. Insercija nanodomena membrane OMV u biljnu plazma membranu menja njenu kompartmentalizaciju i organizaciju, što podstiče imunski odgovor biljnih ćelija. Za ovaj proces su potrebni fitosteroli i remorin proteini u membrani. Tokom rane faze infekcije, nanodomeni se brzo modulišu što olakšava fuziju OMV sa biljnom membranom. Integracija OMV tokom infekcije dalje pojačava formiranje nanodomena čime se uspostavlja povratna sprega koja omogućava prostornu koordinaciju u regrutovanje OMV na mesta nanodomena i na kraju povećava sposobnost odbrambenih reakcija. Povećanje uređenosti lipida u

membrani je sporije, ali mnogo jače i dugotrajnije od tranzijentne promene koju izazivaju MAMP. Postavlja se pitanje da li i kako organizacija nanodomena, koju uzrokuju OMV, dodatno olakšava receptorom-posredovan MTI prenos signala.

Ren i saradnici su 2019. godine, istraživanjem interakcije rizobije *Bradyrhizobium japonicum* sa *Glycine max* pokazali da sRNK poreklom od rizobijalnih tRNK - tRF učestvuju u modulaciji nodulacije. Dvadeset pet jedinstvenih rizobijalnih tRF-sRNK dužine 21-22 nt imaju targete u 52 gena soje, dok njihovi targeti nisu pronađeni u *B. japonicum* (Ren *et al.*, 2019). Potvrđeno je da ove sRNK učestvuju u inicijaciji i razvoju nodula putem korišćenja mašinerije RNK interferencije u ćelijama domaćina. Utišavanje ovih sRNK suprimira se formiranje nodula, dok se njihovom prekomernom ekspresijom podstiče nodulacija. Ova istraživanja su pokazala da male RNK poreklom od PGPB igraju značajnu ulogu tokom interakcije PGPB sa domaćinom.

1.7. Potencijalna primena OMV u biomedicini i poljoprivredi

Potencijalne primene OMV u biomedicini i poljoprivredi obuhvataju praktično sve velike domene savremene terapije i dijagnostike, uključujući vakcine, imunoterapiju, apliciranje lekova, antimikrobnu strategiju i biomarkere.

Efikasnost sticanja adaptivnog imuniteta upotrebom OMV je potvrđena njihovom upotrebom u razvoju vakcina poput norveške vakcine MenBVac (Micoli & MacLennan, 2020). Ova vakcina protiv meningokoka B koje izaziva *Neisseria meningitidis* je odobrena za upotrebu i široko se koristi. OMV *N. meningitidis* sa sobom nose više površinskih membranskih proteina PorA, PorB, RmpM i OpcA koji indukuju humoralni odgovor.

Otpornost OMV na temperaturne fluktuacije i posedovanje brojnih imunogenih komponenti koje imaju sposobnost da izazovu imunološki odgovor u ćelijama domaćina, čine OMV izuzetno pogodnim za primenu kako u obliku vakcina tako i u obliku imunomodulatora u terapiji raka (Zahid *et al.*, 2025). Kao prirodni imunoadjuvansi OMV snažno aktiviraju dendritske ćelije i T-limfocite preko TLR/NOD signalnih puteva pa su pogodni kao tumorske vakcine.

U skorije vreme ulažu se naponi na povećanju potentnosti OMV vakcina primenom sintetičke biologije i rekombinantne DNK tehnologije, koje omogućavaju dizajn i produkciju OMV sa heterolognim antigenima na površini. Takvi antigeni direktno interaguju sa antigen-specifičnim B-ćelijama, čime se obezbeđuje snažna imunološka stimulacija. Mutantni soj *E. coli* sa smanjenom endotoksičnošću prema humanim ćelijama konstruisan je tako da proizvodi OMV na čijoj membrani se nalazi antitelo specifično za humani receptor epidermalnog faktora rasta – HER2 koji služi kao ciljani ligand. Sistemskom primenom OMV, u koje su upakovane siRNK postignuto je ciljano utišavanje gena što je dovelo do značajne regresije rasta tumora u animalnom modelu (Gujrati *et al.*, 2014). Takođe, primena ovih OMV nije izazivala neželjene efekte, što predstavlja jedan od glavnih ograničavajućih faktora u terapiji raka. Prednost ovakve primene je i proizvodnja OMV na velikoj skali putem bakterijske fermentacije.

Zbog stabilnosti, biokompatibilnosti i sposobnosti usmerenog delovanja, OMV su poželjni nosači lekova i nukleinskih kiselina. Za ubacivanje u OMV relativno hidrofobnih i pozitivno naelektrisanih malih molekula lekova, koji lako interaguju sa lipofilnim membranama, može se koristiti pasivna difuzija. Međutim za hidrofilne molekule dvoslojna lipidna membrana može predstavljati prepreku, u kom slučaju elektroporacija može omogućiti unos ovih molekula u OMV (Kuerban *et al.*, 2020).

U poslednje vreme sve je više bakterijskih sojeva koji su rezistentni na antibiotike, što predstavlja ozbiljan problem u borbi protiv bakterijskih infekcija. Inherentna antibiotska svojstva bakterijskih ekstracelularnih vezikula u kompeticiji između vrsta privukla su interesovanje za njihovu upotrebu kao prirodnih antibakterijskih agenasa (Xie *et al.*, 2022). Pokazano je da OMV poreklom

od miksobakterija *Cystobacter velatus* Cbv34 i *Sorangiineae species* soj SBSr073 imaju sposobnost da liziraju druge bakterije i inhibiraju rast *E. coli* i *Staphylococcus aureus* u uslovima *in vitro* (Schulz *et al.*, 2018). Takođe, prednost OMV se ogleda u njihovoj stabilnosti na različitim uslovima skladištenja uključujući 4 °C, -20 °C, - 80 °C i liofilizaciju. OMV poreklom od Cbv34 su inhibirale rast *E. coli* sa efikasnošću koja može da se meri sa široko korišćenim antibiotikom gentamicinom. Analiza ovih OMV je otkrila prisustvo ciklobaktamida, inhibitora bakterijske topoizomerase (Schulz *et al.*, 2018).

Kao što je već pomenuto, imunostimulišuća svojstva OMV uočena su i u interakciji OMV fitopatogenih bakterija i PGPB sa biljkama (Bahar *et al.*, 2016; McMillan *et al.*, 2021; Tran *et al.*, 2022; Janda *et al.*, 2023). Ovi rezultati daju polaznu osnovu za istraživanja potencijalne primene OMV kao biokontrolnih agenasa, zajedno sa primenom PGPB sojeva, kao ekološki prihvatljive i održive alternative konvencionalnoj poljoprivredi.

2. Ciljevi rada

Predmet izučavanja ove doktorske disertacije je da se na molekularnom nivou okarakteriše interakcija korisne endofitne bakterije *P. phytofirmans* PsJN sa biljnom vrstom *A. thaliana* u optimalnim uslovima rastenja i u stresu izazvanom fungálnim fitopatogenom *B. cinerea*, sa fokusom na ekspresiju gena i ispitivanje uključenosti sRNK i bakterijskih ekstracelularnih vezikula u ovim procesima.

Specifični ciljevi ove doktorske disertacije obuhvataju:

1. Ispitivanje sposobnosti endofitne bakterije *P. phytofirmans* PsJN da poveća otpornost biljaka *A. thaliana* na infekciju izazvanu fungálnim fitopatogenom *B. cinerea*.
2. Određivanje uticaja *P. phytofirmans* PsJN na ekspresiju gena i malih RNK *A. thaliana* u nezaraženim biljkama, kao i tokom biotičkog stresa izazvanog fungálnim fitopatogenom *B. cinerea*.
3. Testiranje hipoteze da ekstracelularne vezikule endofitnih bakterija mogu interagovati sa *A. thaliana*.
4. Analiza sekvenci sRNK izolovanih iz ekstracelularnih vezikula soja *P. phytofirmans* PsJN i njihovo poređenje sa sRNK izolovanih iz ćelija ovog soja.

3. Materijal i metode

3.1. Biljni materijal i uslovi gajenja

Biljni materijal korišćen za potrebe eksperimenata ove disertacije je obuhvatao semena divljeg tipa biljke *Arabidopsis thaliana* ekotipa Columbia, i semena paradajza *Solanum lycopersicum* sorte Novosadski jabučar. Semena koja su namenjena za korišćenje u hidroponici, na čvrstoj podlozi i u zemlji su prethodno podvrgnuta vlažnoj sterilizaciji. Semena *A. thaliana* su sterilisana u tubi od 1,5 mL u 70% etanolu 5 minuta uz konstantno mešanje. Nakon uklanjanja etanola, sterilizacija je nastavljena u rastvoru 10% varikine i 0,05% Tween 20 u trajanju od 20 min. Semena su potom ispirana 3-4 puta sterilnom bidestilovanom vodom. Između svaka dva koraka sterilizacije ili ispiranja, semena su obarana centrifugiranjem na 1000 g/ 10s kako bi se rastvor prethodnog koraka bolje uklonio i izbegao gubitak semena. Nakon sterilizacije, semena su ostavljena u 500 µL vode u mraku na +4°C, 4-6 dana u cilju prekida dormancije.

Semena *S. lycopersicum* su sterilisana po istom protokolu, ali u tubi od 50ml. Nakon sterilizacije, semena su prenošena na čvrstu podlogu i ostavljena u mraku na +4°C 4-21 dan.

3.1.1. Uslovi gajenja na čvrstim podlogama

Za potrebe gajenja semena na čvrstim podlogama korišćena je ½ MS podloga (Murashige i Skoog) (Murashige & Skoog, 1962). Podloga ½ MS sadrži polovinu mikroelemenata i makroelemenata dok su ostale komponente nepromenjene (tabela 3.1).

Tabela 3.1. Koncentracije makro- i mikroelemanta u ½ MS podlozi

Makroelementi		Mikroelementi	
Soli	Koncentracija (mg/l)	Soli	Koncentracija (mg/l)
NH ₄ NO ₃	825	MnSO ₄ ·4H ₂ O	11.15
KNO ₃	950	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4.3
CaCl ₂ ·2H ₂ O	220	H ₃ BO ₃	3.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185	KJ	0.415
KH ₂ PO ₄	85	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.125
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0125
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0125
		Koncentracija (g/l)	
Inozitol		0,1	
FeNaEDTA		0,036	
MES		0,25	
Saharoza		10	
Agar		7	
VITAMINI			
		Koncentracija (mg/l)	
thiamine hydrochloride – B1		0.05	
nicotinic acid		0.25	
pyridoxine hydrochloride –B6		0.25	
glicin		1	

pH vrednost medijuma je podešena na 5.7 dodavanjem 1N NaOH. Podloga je sterilisana u autoklavu na 116°C 25 minuta i potom izlivena u Petri šolje.

Sterilisanim semenima *A. thaliana* je dodavan sterilisan rastvor 0.1% agaroze i semena su nanošena na podloge koristeći pipetman sa isečenim nastavkom od 10 µL. Kapljice sa semenima su kratko ostavljane u laminaru da se osuše i Petri šolje su potom zatvarane i obavijane para-filmom.

Hranljive podloge sa semenima su u vertikalnom položaju postavljane pod lampe intenziteta svetlosti od 150 µmol m⁻²s⁻¹, fotoperiod 10 h dan/14h noć, i dnevne temperature od 21°C i noćne od 19°C. Klijanci stari 4-5 dana su korišćeni za eksperimente interakcija sa vezikulama, dok su za zaražavanje sa *B. cinerea* i praćenje protektivnog efekta PGPB bakterija, klijanci starosti 2 nedelje prebacivani u sterilisani supstrat i dalje gajeni pod istim režimom osvetljenja i temperature.

Semena *S. lycopersicum* su postavljana na ½ MS hranljive podloge u Petri šoljama šolje kao i semena *A. thaliana*, ali su gajena pod drugačijim uslovima: na temperaturi od 24°C u mraku 4-5

dana, a nakon toga pod intenzitetom svetlosti od $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, i fotoperiodom 16 h dan/8h noć. Nakon rastenja u navedenim uslovima dugog dana u trajanju od 3-4 dana klijanci paradajza su korišćeni za eksperimente interakcija sa vezikulama.

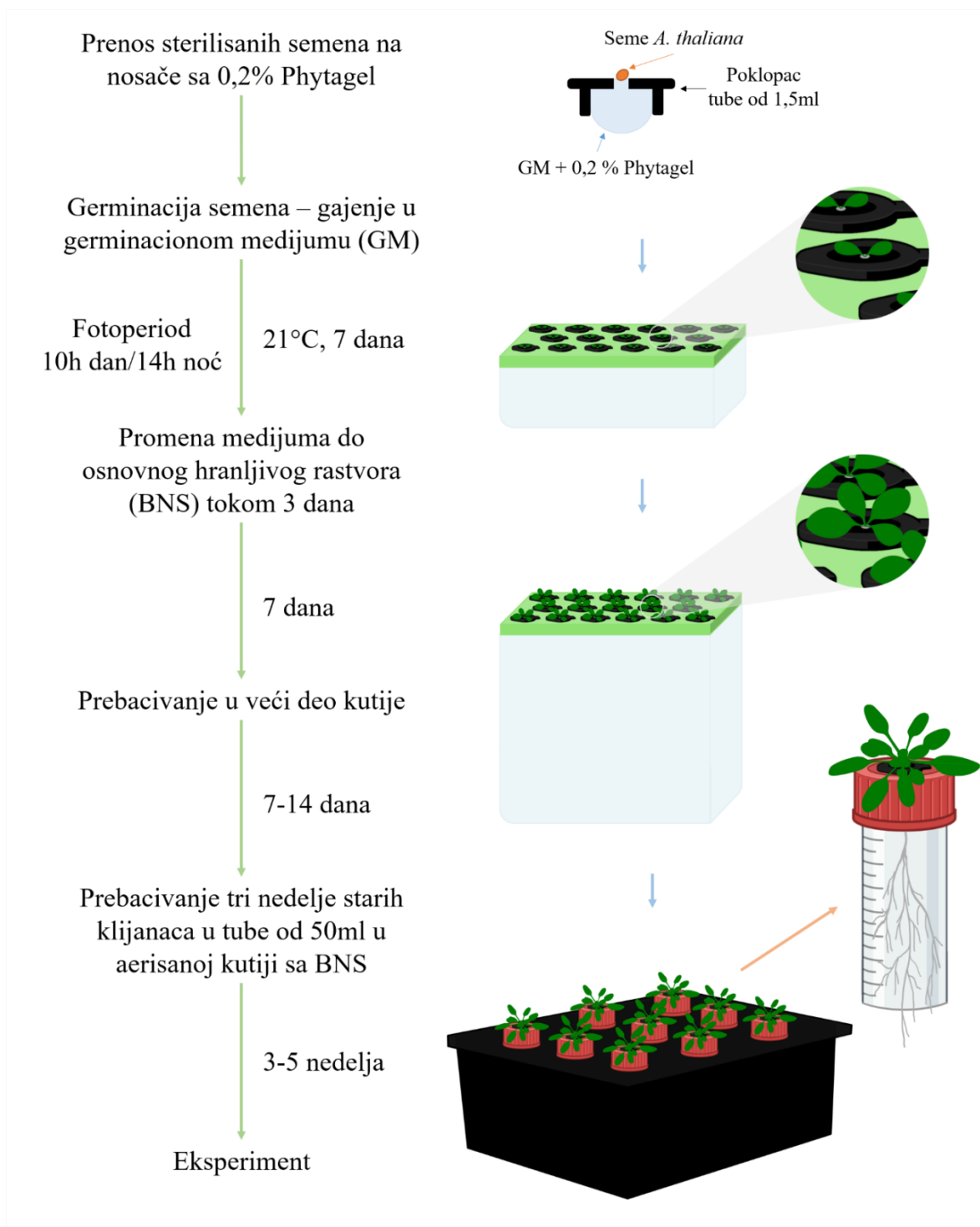
3.1.2. Uslovi gajenja biljaka u supstratu

Biljke *A. thaliana* su gajene u supstratu Potgrond H proizvođača *Klasmann-Deilmann* koji sadrži crni i beli sphagnum treset, mikroelemente i đubrivo. Supstrat je sterilisan u autoklavu na 121°C 30 minuta. U prohladeni supstrat raspoređen u saksije su presađivani klijanci *A. thaliana* koji su prethodno gajeni 14 dana na čvrstoj $\frac{1}{2}$ MS podlozi kao što je opisano pod 3.1.1. Kako bi se obezbedila neophodna vlažnost, saksije sa klijancima su obavijane providnom folijom i biljke su vraćene na iste uslove ($150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperiod 10 h dan/14h noć, dnevna temperatura od 21°C i noćna od 19°C). Nakon nedelju dana aklimatizacije, providna folija je skinuta sa saksija, a vlažnost prostorije je korišćenjem sistema ovlaživača i odvlaživača održavana na nivou oko 55%. Površina zemlje je prekrivana sterilisanim perlitom.

3.1.3. Uslovi gajenja biljaka u hidroponoj kulturi

Gajenje *A. thaliana* u hidaponici je rađeno po uzoru na protokol iz studije Conn *et al.*, (2013), u prilagođenom sistemu kutija, poklopaca tuba, i nosača čvrste podloge za semena, koji su sterilisani pre svake upotrebe (slika 3.1). Nosači za semena su pravljani od isečenih poklopaca od tuba od 1.5 mL koji su probušeni. Nosači su potom ravnom stranom lepljeni za selotejp i punjeni sa $400 \mu\text{L}$ 0,2% Phytagela (Phytigel™, SIGMA, SAD), u medijumu za klijanje (GM). Nakon 20-30 minuta, koliko je potrebno za prelazak medijuma sa Phytagelom u čvrsto agregatno stanje nosači su odlepljivani od selotejpa i postavljani u stalak za nastavke od 5 mL (Finntip kutije) na svaku drugu poziciju. Stalak za nastavke je postavljan u manji deo Finntip kutije zapremine 250 mL koji je napunjen tečnim medijumom za klijanje (slika 3.1, tabela 3.2). Na rupe na nosačima su naneta sterilisana semena *A. thaliana* pomoću sterilnih čačkalica. Finntip kutije su zatvarane, a kontakt između delova kutija lepljen selotejpom. Donji deo kutija je obavijan alufolijom kako bi se sprečio rast algi.

Kutije sa klijancima su postavljane u sobu sa kontrolisanim uslovima pod lampe intenziteta svetlosti $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperiod 10 h dan/14h noć, i dnevne temperature od 21°C , a noćne od 19°C . Nakon nedelju dana od stavljanja hidropone kulture u uslove svetlosti bilo je potrebno postepeno prilagoditi medijum. Tokom tri dana vrši se izmena medijuma. Prvog dana GM je menjan medijumom koji se sastoji od $\frac{2}{3}$ GM medijuma i $\frac{1}{3}$ osnovnog hranljivog rastvora (BNS, eng. *basal nutritive solution*) (modifikovani Hoaglandov rastvor) medijuma, drugog dana se povećava udeo BNS medijuma na $\frac{2}{3}$ u odnosu na $\frac{1}{3}$ GM medijuma, dok se trećeg dana prelazi na 100% BNS medijum (tabela 3.3). BNS medijum, čiji je sastav prilagođen biljkama starosti 7 dana i više, se potom menja svakih nedelju dana. Nakon 2 nedelje od postavke u hidroponu kulturu stalak sa nosačima je prebacivan u veći deo kutije zapremine 1L. Nakon 7-14 dana od prebacivanja u veći deo kutije nosači sa biljkama su prebacivani u crne kutije zapremine 9 L napunjene rastvorom BNS. Medijum je konstantno aerisan i menjan na nedelju dana.



Slika 3.1. Šematski prikaz gajenja *A. thaliana* u hidroponici.

Tabela 3.2. Sastav GM rastvora

Makroelementi		Mikroelementi	
Soli	Koncentracija (mM)	Soli	Koncentracija (μM)
CaCl ₂	0,75	NaFe(III)EDTA	50
KCl	1	H ₃ BO ₃	50
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0,25	MnCl ₂ ·4H ₂ O	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10
KH ₂ PO ₄	0,2	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,5
		Na ₂ MoO ₃	0,1

Tabela 3.3. Sastav BNS rastvora

Makroelementi		Mikroelementi	
Soli	Koncentracija (mM)	Soli	Koncentracija (μM)
NH ₄ NO ₃	2	NaFe(III)EDTA	50
KNO ₃	3	H ₃ BO ₃	50
CaCl ₂	0,1	MnCl ₂ ·4H ₂ O	5
KCl	2	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	2	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2	Na ₂ MoO ₃	0,1
KH ₂ PO ₄	0,6		
NaCl	1,5		

3.2. Metode korišćene u radu sa *P. phytofirmans* PsJN

U ovoj disertaciji je soj *P. phytofirmans* PsJN korišćen kao model korisne rizosferne bakterije. Ova bakterija je dobijena iz kolekcije mikroorganizama i ćelijskih kultura Leibniz Instituta DSMZ (nem. *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulture*) iz Nemačke. Rad sa bakterijama *P. phytofirmans* PsJN je podrazumevao njihovo gajenje u LB ili mineralnom medijumu u zavisnosti od potreba eksperimenta.

3.2.1. Hranljivi medijumi

Lurijs-Bertani (LB) medijum

Bakterije namenjene za inokulaciju biljaka gajenih u zemlji uzgajane su u tečnom LB medijumu. Tečni LB medijum sadrži 1% (w/v) tripton; 1% (w/v) NaCl i 0,5% (w/v) ekstrakt kvasca. Za pripremu čvrste podloge (LA) u LB se dodaje i 1,5% (w/v) agar. Sterilizacija podloga se vrši u autoklavu na 121°C, 25 min ili u mikrotalasnoj pećnici na 100°C, 10 min.

Minimalni mineralni medijum

Bakterije za inokulaciju hidropone kulture kao i za izolaciju vezikula su gajene u minimalnom medijumu - MSM (eng. *Mineral Salts Medium*). Sastav ovog medijuma je prikazan u tabeli 3.4. Medijum je sterilisan u autoklavu na 121°C/ 25 min, nakon čega je dodata glukoza kao izvor šećera u finalnoj koncentraciji 0,2%.

Tabela 3.4. Sastav MSM medijuma

	Koncentracija (mM)
K₂HPO₄	13,03
KH₂PO₄	6,98
(NH₄)₂SO₄	5,07
Rastvor metala	Koncentracija (µM)
Fe₂EDTA·2H₂O	34,23
ZnSO₄·7H₂O	6,96
CaCl₂·2H₂O	6,8
FeSO₄·7H₂O	17,98
NaMoO₄·2H₂O	0,91
CuSO₄·5H₂O	0,8
CoCl₂·6H₂O	1,68
MnSO₄·H₂O	6,15
MgSO₄·7H₂O	490

3.2.2. Gajenje *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN

Bakterije *P. phytofirmans* PsJN se, iz glicerolskog stoka koji se čuva na -80°C, seju na LA podloge i gaje na 30°C/ 18-24 sata, a zatim čuvaju na +4°C. Kulture na čvrstim podlogama se obnavljaju na dve nedelje.

Tečna kultura bakterija je gajena u LB ili MSM medijumu. Od početne tečne kulture je sejana veća količina prekonoćne kulture sa početnom OD (optičkom gustinom) u vrednosti 0,001 i gajena na 30°C/150-170 rpm, do dostizanja OD vrednosti 1, što odgovara eksponencijalnoj fazi rasta.

3.2.3. Inokulacija biljaka u zemlji - *Soil Drench*

Prekonoćna kultura *P. phytofirmans* PsJN u LB medijumu je obarana na 2500g/15 min/ 4°C. Nakon pranja u 10 mM MgSO₄, talog je resuspendovan u 100-200 mL istog rastvora. Suspenzija bakterija je nanošena oko korenova *A. thaliana* u finalnoj koncentraciji od 10⁷-10⁸ CFU/g zemlje. Kontrolne biljke su tretirane rastvorom 10 mM MgSO₄.

3.2.4. Inokulacija biljaka u hidroponoj kulturi

Inokulacija biljaka *A. thaliana* u hidroponici je rađena dve nedelje pre zaražavanja i ponavljana jednom nedeljno tokom izmene hranljivog medijuma. *P. phytofirmans* PsJN gajen za inokulaciju biljaka u hidroponici je gajen u minimalnom medijumu preko noći. Sutradan, prekonoćna kultura je obarana na 2500g/15 min/4°C, a zatim je talog pran sa BNS medijumom. Merenjem optičke gustine i razblaživanjem sa BNS podešavana je koncentracija bakterija u suspenziji. Suspenzija *P. phytofirmans* PsJN je dodavana u medijum do finalne koncentracije od 10⁶ CFU/mL medijuma. BNS je korišćen za *mock* inokulaciju kontrolnih biljaka.

3.3. Metode korišćene u radu sa *B. cinerea*

Za potrebe ove disertacije korišćen je nekrotrofni fitopatogen *B. cinerea* soj 630. Ovaj soj je dobijen tokom saradnje sa profesorom Aziz Aziz sa Univerziteta u Reimsu, Francuska. *B. cinerea* soj 630 je prvobitno izolovan iz vinograda Regiona Šampanje (INRA, Versaj, Francuska).

Kao medijum za gajenje *B. cinerea* korišćen je PDB (eng. *Potato Dextrose Broth*) medijum proizvođača Difco koji sadrži krompir i dekstrozu. Za gajenje na čvrstoj podlozi - PDA (eng. *Potato Dextrose Agar*) u tečni medijum je dodat agar (1,5% (w/v)) pre sterilizacije. Za germinaciju konidiospora korišćen je tečni ½ PDB medijum. Podloga je sterilisana 121°C, 25 min.

Zrele konidiospore su prebacivane na novu PDA podlogu i *B. cinerea* je gajen nekoliko nedelja na 21°C pod indirektnim svetlom do pojave zrelih konidiospora. Zrele konidiospore (spore) su skupljane, analizirane na svetlosnom mikroskopu i korišćene za zaražavanje. Alikvoti spora su čuvani na -80°C.

Stokovi *B. cinerea* za duže čuvanje pravljani su dodavanjem glicerola u suspenziju spora do finalne koncentracije 50% glicerola i skladišteni na -80°C do potrebe za zasejavanjem na čvrstu podlogu. Spore se sa -80°C ostavljaju na sobnoj temperaturi kako bi proključale. Nakon germinacije uzima se 20 µL spora i nanosi na centar Petri šolja sa PDA. Kako bi se dobila dovoljna količina spora potrebno je postaviti *B. cinerea* na desetak Petri šolja.

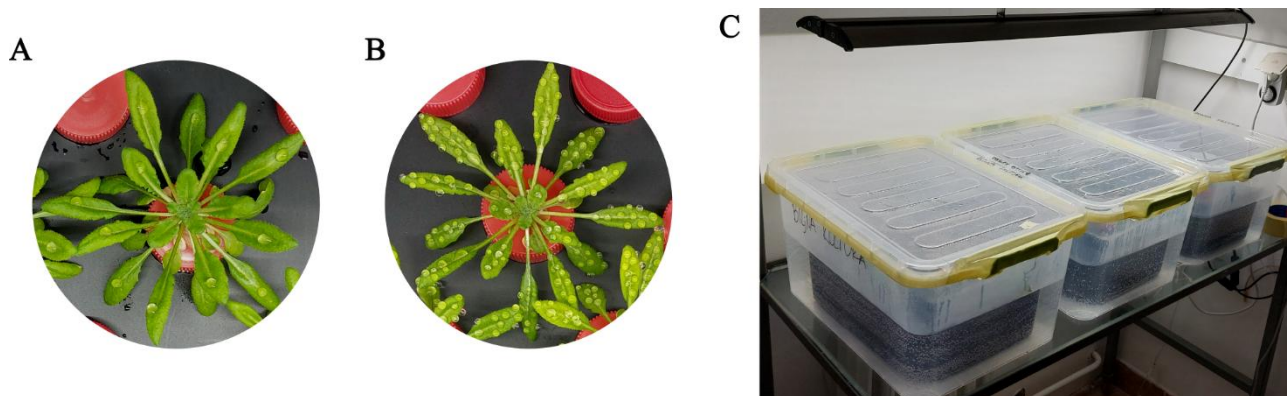
3.4. Zaražavanje biljaka gljivom *B. cinerea*

Kako bi se obezbedilo uspešno zaražavanje biljaka potrebno je dan pre zaražavanja pripremiti i spore *B. cinerea* i biljke *A. thaliana*.

Kako bi se povećala vlažnost u okruženju biljaka, što je neophodno za zaražavanje sa *B. cinerea*, saksije sa biljkama starim 6 nedelja su 24h pre zaražavanja prebacivane u providne kutije napunjene vodom do nivoa od 2 cm ispod gornje ivice saksija. Kutije su potom zatvarane i oblepljivane krep trakom (slika 3.2).

Alikvoti spora su odmrzavani 18 do 22 sata pre zaražavanja, a koncentracija spora podešavana na 10⁶ po mL medijuma ½ PDB. Suspenzija spora je inkubirana na sobnoj temperaturi, a uspešnost klijanja proveravana posmatranjem pod svetlosnim mikroskopom.

Dve nedelje nakon bakterijske inokulacije, biljke su zaražavane sa po jednom kapljicom od 20 µL proključalih spora po razvijenom listu (slika 3.2.A). Radi olakšavanja infekcije, intenzitet svetlosti je smanjen na 60–80 µmol m⁻² s⁻¹. Za analizu simptoma korišćeni su razvijeni listovi slične veličine. Za analizu ekspresije gena, kako bi se obezbedila homogena primena, suspenzija spora je nanosena u većem broju kapljica na cele površine listova (slika 3.2.B). Medijum ½ PDB je korišćen na isti način kao kontrolni (*mock*) tretman



Slika 3.2. Zaražavanje listova *A. thaliana* za A) analizu simptoma, B) analizu ekspresije gena. C) kutije u kojima je postavljen eksperiment zaražavanja *A. thaliana* sa *B. cinerea*.

Uzorci su podeljeni u četiri grupe u zavisnosti od tretmana:

1. CNI – biljke koje su lažno inokulisane (tretman sa 10 mM MgSO₄ ili BNS, bez bakterija) i nisu zaražene sa *B. cinerea* (nanet samo ½ PDB na listove)
2. CBc – biljke koje su lažno inokulisane (tretman sa 10 mM MgSO₄ ili BNS, bez bakterija), i koje su zaražene sa *B. cinerea*
3. PNI – biljke koje su inokulisane sa *P. phytofirmans* PsJN i nisu zaražene sa *B. cinerea* (nanet samo ½ PDB na listove)
4. PBc – biljke koje su inokulisane sa *P. phytofirmans* PsJN i čiji listovi su zaraženi sa *B. cinerea*

3.4.1. Analiza simptoma nakon zaražavanja (nekrotičnih lezija)

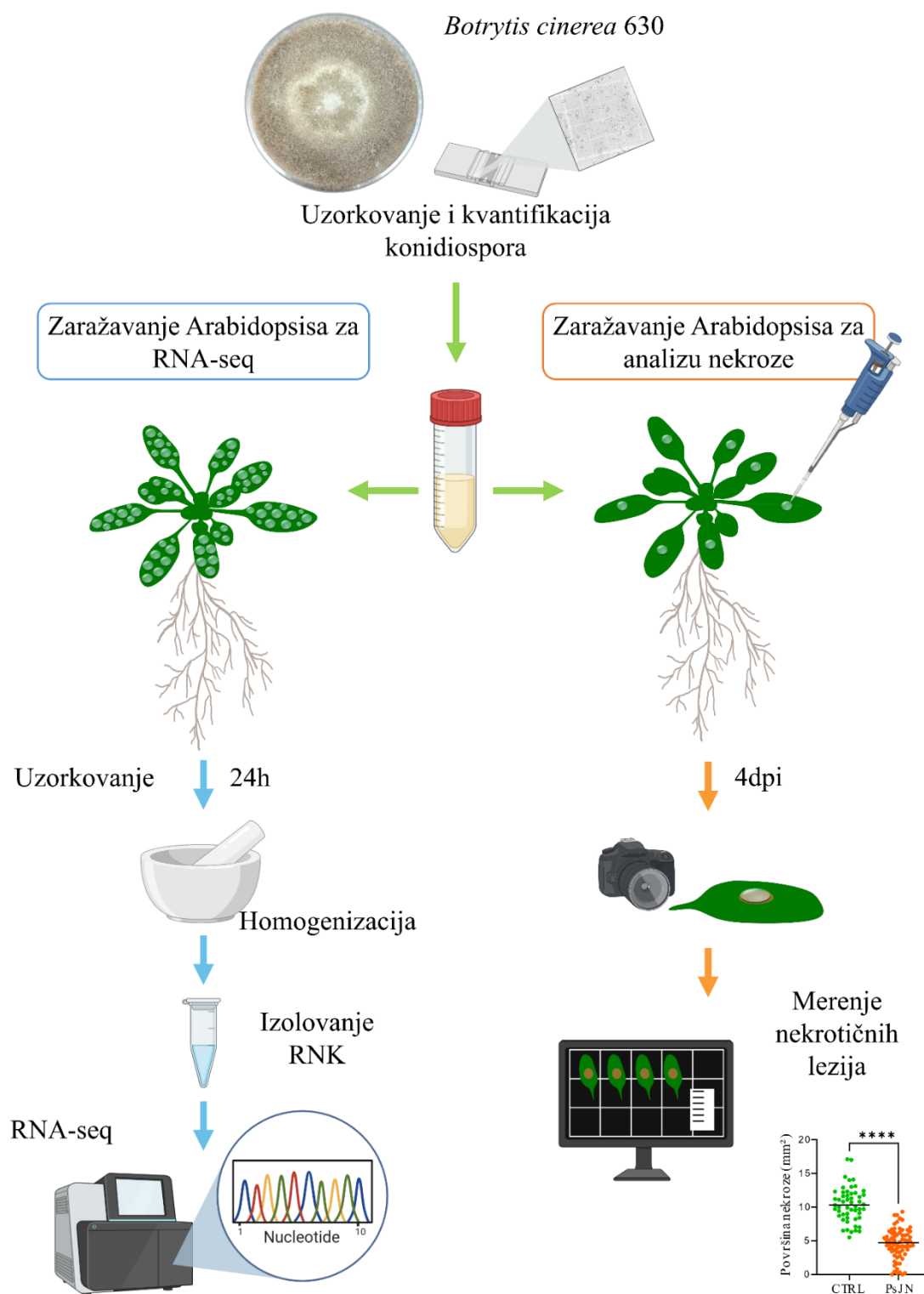
Za analizu simptoma nakon zaražavanja nekrotrofnim patogenom *B. cinerea*, listovi zaraženih biljaka su odvojeni i nanešeni na grafički papir - crni karton koji je obeležen sa poljima stranica od 5 cm (slika 3.3). Grafički papir sa listovima je slikan koristeći Nikon D3500 DSLR fotoaparatus. Prosečna veličina lezija koje su se razvile četiri dana nakon infekcije - dpi (eng. *days post-infection*), merena je kod CBc i PBc biljaka i analizirana pomoću softvera za analizu slika ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). Uz pomoć grafičkog papira sa kvadratima stranica 5 cm podešena je razmera svih slika tokom analize (*Analyse*→*Set Scale*→50 mm). Kako bi se odredila površina lezija korišćen je alat za crtanje linije slobodnom rukom (*Freehand Line*). Linijom su praćeni rubovi lezija čija površina je potom izmerena koristeći alat za merenje (*Analyse*→*Measure*, CTRL+M). Statistička obrada je rađena u *Graph Pad Prism* programu korišćenjem *Mann-Whitney* testa..

3.4.2. Metoda bojenja pomoću DAB za detekciju vodonik-peroksida u biljnom tkivu

Četiri dana nakon zaražavanja sa sporama *B. cinerea* urađena je *in situ* detekcija molekula vodonik-peroksida pomoću DAB·4HCl (3,3'-diaminobenzidin tetrahidrohlorid) (SERVA, Nemačka) (Thordal-Christensen *et al.*, 1997). Listovi zaraženih biljaka su isećeni u nivou lisne drške, obrisani od kapljice koja je nanosena tokom zaražavanja, i potopljeni u vodeni rastvor DAB (1 mg/mL, pH 3,8). Rastvori DAB sa listovima su držani u obeleženim staklenim teglicama koje su pokrivene sa

nekoliko slojeva parafilma i potom kompletno obavijeni sa alu folijom kako bi se listovi inkubirali u mraku. Tako pripremljeni listovi su inkubirani 24 h, uz konstantno mešanje na klackalici. Nakon inkubacije, DAB boja je fiksirana prebacivanjem listova u etanol (100%) u tubama zapremine 50ml. Listovi u etanolu su potom zagrevani u vodenom kupatilu na 100°C/20 minuta uz povremeno mešanje. Tokom ovog koraka pored fiksacije DAB dolazi i do uklanjanja hlorofila iz tkiva listova. Da bi se listovi u potpunosti depigmentisali, proces inkubacije je ponavljan nekoliko puta u svežem etanolu.

Depigmentisani listovi su poređani na beli papir i slikani fotoaparatom Nikon D3500 DSLR. Slike biljaka su u ImageJ programu pretvorene u 8 bitne (*Image→Type→8-bit*). Uz pomoć lenjira koji se nalazi pored listova na slici podešena je razmera slike (*Analyse→Set Scale*). Kako bi se odredio ukupni intenzitet signala koji potiče od H₂O₂, merene su površine kao i intenzitet obojenosti svake lezije. Koristeći alat za crtanje linije slobodnom rukom (*Freehand Line*) rubovi lezija su označeni i potom izmereni (*Analyse→Measure*, CTRL+M). Kao rezultat dobijene su vrednosti površine (*Area*) i srednjeg intenziteta (*Mean*). S obzirom da se lezije analiziraju u 8 bitnoj slici, vrednost intenziteta se nalaze na skali od 0 do 255, gde vrednost od 0 označava crnu boju, a 255 belu boju. Pošto veća količina detektovanog H₂O₂ daje jači signal što nije srazmerno predstavljeno na skali (veći intenzitet H₂O₂ ima nižu vrednost na skali) obrnute su vrednosti u skali tako da se jačina intenziteta H₂O₂ ogleda u većem intenzitetu. Ovo je postignuto oduzimanjem izmerenog intenziteta od 255. Totalni intenzitet H₂O₂ je dobijen množenjem izmerenog intenziteta (*255-Mean*) i površine lezija (*Area*). Dobijeni rezultati su potom analizirani u GraphPad Prism korišćenjem *Mann-Whitney* testa.



Slika 3.3. Šematski prikaz eksperimentalnog rada sa *B. cinerea*. Šema pravljen uz pomoć BioRender softvera (<https://www.biorender.com/>)

3.4.3. Uzorkovanje biljaka za dalje analize

Korenovi i listovi biljaka gajenih u hidroponici su uzorkovani 24 sata nakon infekcije sa *B. cinerea* (slika 3.3). Listovi su isečeni u nivou lisne drške, kondenzacija i kap spora *B. cinerea*, koje su se nalazile na listovima, su upijeni sa filter papirom. Uzorkovani listovi od tri biljke su objedinjeni

kao jedan uzorak. Listovi svakog uzorka su izmereni na analitičkoj vagi, obeleženi i potom smrznuti u tečnom azotu. Korenovi su pre zamrzavanja ispirani 2–3 puta sterilnom destilovanom vodom (H₂O). Ostatak vode je uklonjen koristeći filter papir, i korenovi su potom izmereni na analitičkoj vagi i potom obeleženi i smrznuti u tečnom azotu. Tri ponovljena uzorka su prikupljena za svaki tretman, pri čemu je svaki uzorak sadržao listove ili korenove sa po tri pojedinačne biljke. Zamrznuti uzorci su čuvani na -80 °C do izolacije RNK.

3.5. Metode korišćene u radu sa RNK iz biljnog tkiva

Uzorci tkiva lista i korenova sprášeni su uz pomoć avana i tučka. Za izolaciju RNK korišćeno je 50 mg sprášenog materijala. Višak materijala je prebačen u nove tube koje su prethodno ohlađene u tečnom azotu kako ne bi došlo do otapanja tkiva. RNK je izolovana koristeći microRNA Purification Kit (*Norgen BioTek*), u skladu sa protokolom za biljne uzorke. Tokom korišćenja ove metode za izolaciju RNK uspešno se razdvajaju kratki (do 200 nukleotida) i dugi (duži od 200 nukleotida) molekuli RNK. Pošto je za sekvenciranje bila potrebna totalna RNK, izolati kratkih i dugih RNK molekula su spojeni za svaki uzorak.

Zaostala genomska DNK je odstranjena tretiranjem uzoraka sa DNazom (*DNA-free™ DNA Removal Kit, Invitrogen, SAD*) koristeći standardni protokol koji sadrži do 10 µg RNK u zapremini od 50 µL. Ukratko, 5 µL 10x pufera (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂) i 1 µL DNaze tipa I je dodato u 44 µL svakog uzorka. Uzorci su potom inkubirani na 37°C 30 minuta. Nakon inkubacije reakcija je zaustavljena sa 5 µL inaktivatora DNaze I i inkubirana 2 minuta na sobnoj temperaturi uz povremeno mućkanje. Posle obaranja na 10 000g/ 1,5 minut u centrifugi, supernatant je prebačen u novu tubu. Kvalitet i integritet uzoraka očišćenih od genomske DNK je analiziran korišćenjem RNK čipa.

Kvalitet RNK je proveren na *Bioanalyser 2100 (Agilent)* instrumentu korišćenjem RNK čipa - *Agilent RNA 6000 Nano Kit*-a u skladu sa uputstvom proizvođača. *Bioanalyser 2100 (Agilent)* funkcioniše na principu kapilarne elektroforeze tokom koje se razdvajaju RNK molekuli po dužini. Tokom analize moguće je kvantifikovati RNK, kao i odrediti kvalitet/integritet RNK putem RIN (eng. *RNA Integrity Number*) vrednosti. Kvalitet RNK se kreće od 1 – potpuno degradovana RNK do 10 – visoko očuvana RNK. Uzorci sa RIN vrednosti većom od 7 su korišćeni za pripremu biblioteka.

Uzorci RNK listova i korenova *A. thaliana* su sekvencirani metodom iRNK sekvenciranja i sekvenciranja malih RNK. Oba tipa sekvenciranja i bioinformatičke analize su rađeni u kompaniji *Novogene Bioinformatics Technology Co., Ltd. (Cambridge, UK)*.

Po 12 uzoraka izolata RNK listova i 12 uzoraka RNK korenova su korišćeni za konstrukciju cDNK biblioteke. Priprema cDNK biblioteke uključivala je obogaćivanje poli-A sekvenci i sintezu komplementarne DNK - cDNK (eng. *complementary DNA*). Pripremljene biblioteke sekvencirane su na *NovaSeq X Plus Series (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)* platformi koristeći pair-end strategiju sekvenciranja od 150 bp.

Rezultati sekvenciranja iRNK analizirani su standardnim Novogene protokolom. Izvršena je kontrola kvaliteta sekvenciranja, mapiranje na referentni genom koristeći TAIR10.1 verziju referentnog genoma *A. thaliana* (ncbi_arabidopsis_thaliana_gcf_000001735_4_tair10_1), kvantifikacije nivoa genske ekspresije kao i analize diferencijalno eksprimiranih gena - DEG (eng. *Differentially Expressed Genes*). Geni sa korigovanom p vrednosti manjom od 0,05 označeni su kao statistički značajni DEG. Analizi Ontologije Gena (od eng. *Gene Ontology*, GO) podvrgnuti su geni sa diferencijalnom ekspresijom. Uz pomoć GO analize moguće je grupisati gene po funkciji, biološkim procesima i lokalizaciji. Mapman softver je korišćen za pregled i grafički prikaz DEG povezanih sa metaboličkim putevima i drugim biološkim procesima (Thimm *et al.*, 2004).

Po 12 uzoraka izolata malih RNK listova i 12 uzoraka malih RNK korenova su korišćeni za konstrukciju cDNK biblioteke. Nakon ligacije adaptera na oba kraja malih RNK, prvi lanac cDNK sintetisan je tokom hibridizacije sa prajmerom za reverznu transkripciju. Biblioteka cDNK dobijena je obogaćivanjem pomoću PCR metode (eng. *Polimerase Chain Reaction*). Nakon prečišćavanja i selekcije po veličini, biblioteke su bile spremne za sekvenciranje. Sekvenciranje cDNK biblioteke je vršeno na *Illumina NovaSeq 6000* platformi koristeći single-end strategiju sekvenciranja od 50 bp.

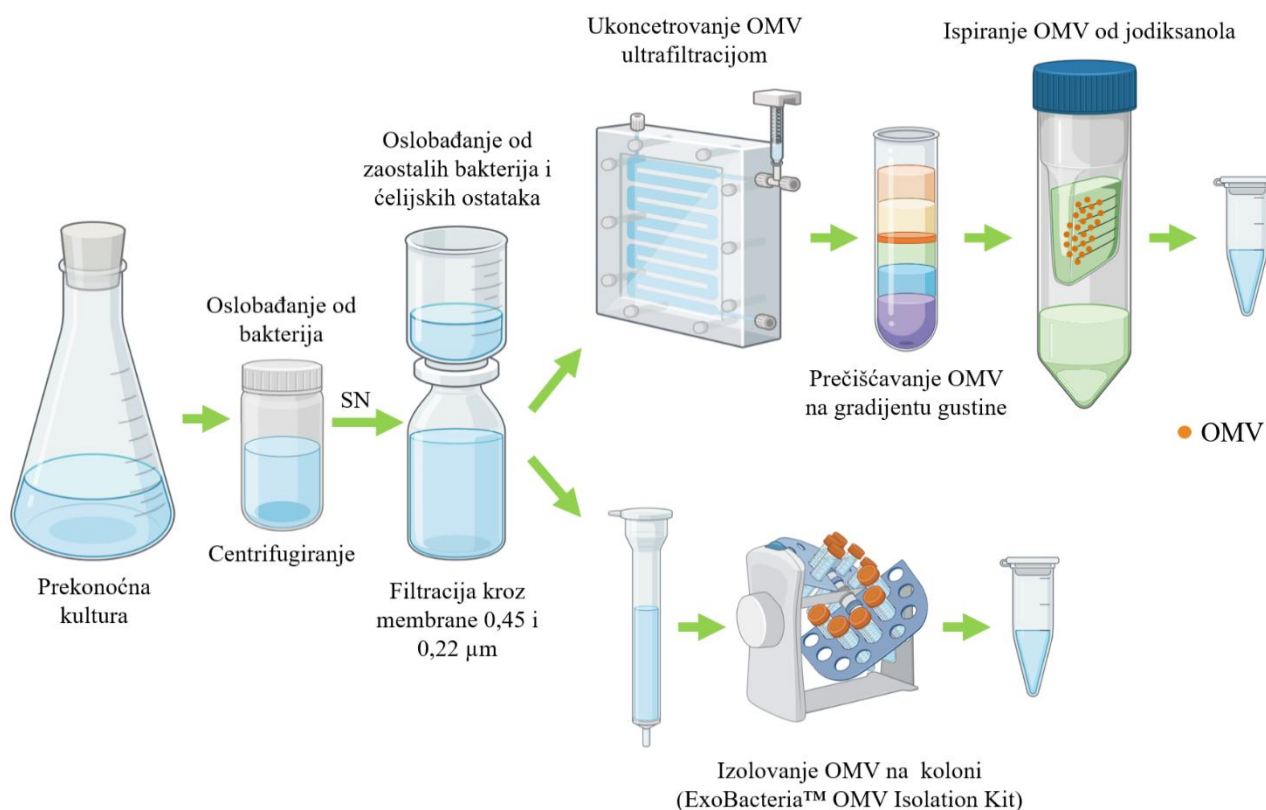
Rezultati sekvenciranja malih nekodirajućih RNK analizirani su standardnim Novogene protokolom za sRNK. Male nekodirajuće RNK su mapirane na referentni genom bez grešaka ili sa jednom greškom. Izvršena je kvantifikacija nivoa ekspresije miRNK, predikcija ciljnih iRNK i analiza diferencijalne ekspresije između grupa/tretmana. miRNK sa korigovanom p vrednosti manjom od 0,05 označeni su kao statistički značajno eksprimirane miRNK.

Mreža miRNK-iRNK ko-ekspresionih parova konstruisana je pomoću *Cytoscape* softvera verzija 3.10.1 (Shannon *et al.*, 2003).

3.6. Metode korišćene u radu sa ekstracelularnim vezikulama

3.6.1. Izolacija vezikula spoljašnje membrane (OMV, *outer membrane vesicles*) soja *P. phytofirmans* PsJN

Za izolaciju OMV, soj *P. phytofirmans* PsJN je gajen u medijumu MSM čiji je sastav dat u poglavlju 2.2.1. U zavisnosti od potrebne količine OMV, zapremina kulture je bila 250 mL – 3L. Kultura je gajena na 150 rpm/ 30°C u erlenmajerima nominalne zapremine četiri puta veće od zapremine kulture, do OD 1, kada se kultura nalazi u sredini logaritamske faze. Bakterijske ćelije su peletirane na +4°C/ 6000g/ 20 minuta u Sorval centrifugi. Supernatant je ponovo centrifugiran pod istim uslovima, zatim filtriran kroz 0,45 µm membranu i nakon toga kroz 0,22 µm membranu, kako bi se uklonile zaostale bakterijske ćelije i ćelijski ostaci (slika 3.4).

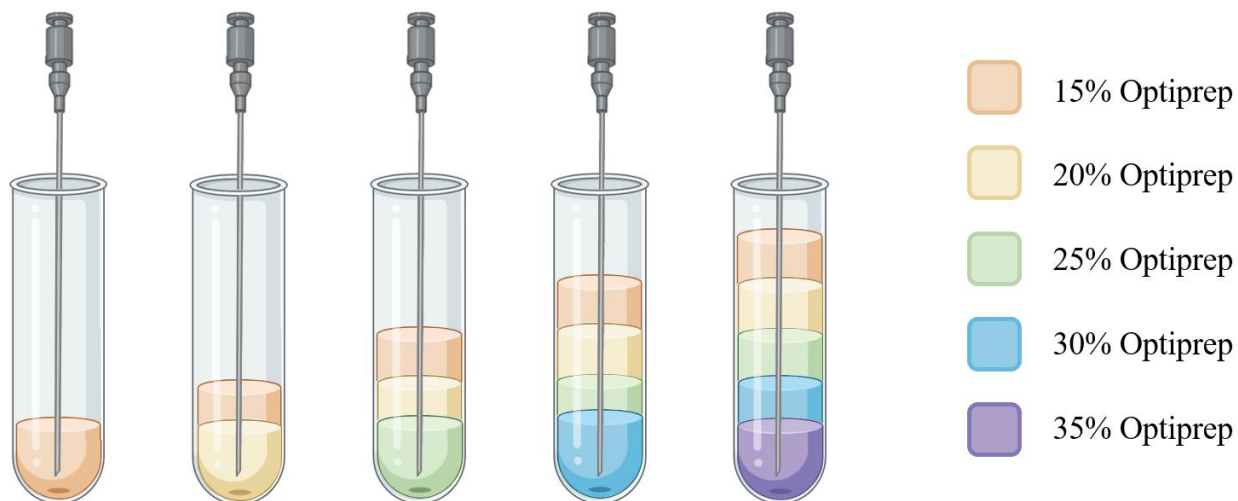


Slika 3.4. Šematski prikaz različitih načina izolacije ekstracelularnih vezikula. Šema pravljen uz pomoć BioRender softvera (<https://www.biorender.com/>).

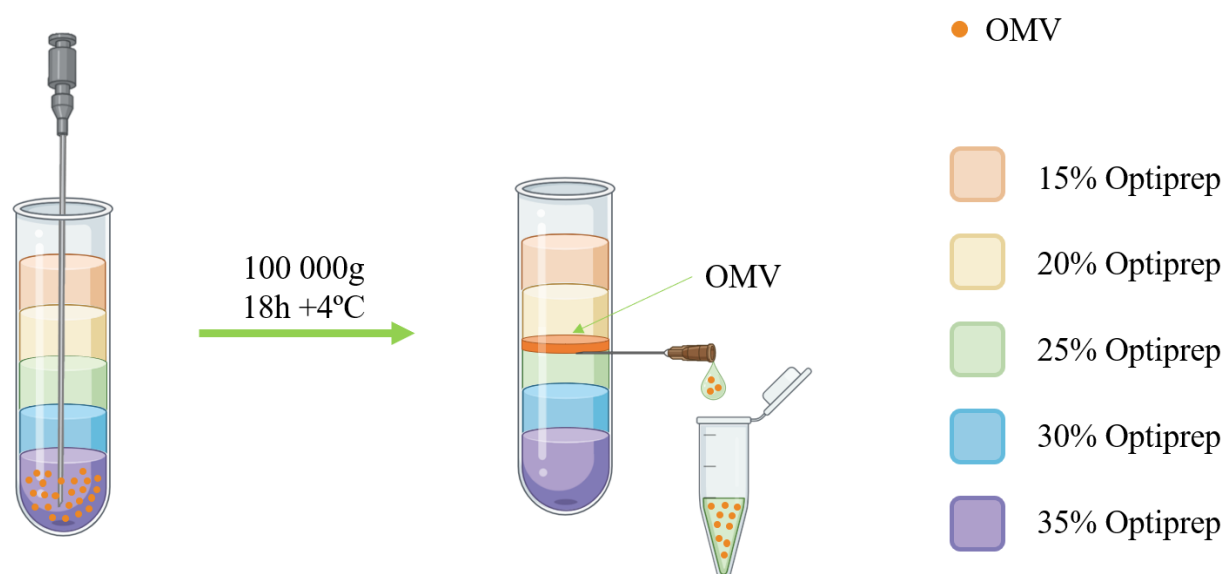
Profiltrirani supernatant je ukoncentrovan na Vivaflow 200 sistemu korišćenjem Vivaflow 200 kasete sa PES (eng. *Polyethersulfone*) membranom sa porama veličine 100kDa MWCO (eng. *molecular weight cut-off*) (slika 3.4). Ukratko 1-2 litre supernatanta je ukoncentrovano na oko 30 mL tokom par sati. Tokom rada pritisak nije prelazio 1 bar. Uzorak OMV je potom oboren u ultracentrifugi na 75 000g/ 2h, supernatant je odliven, a talog je rastvoren u 600 μL PB (75 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 24.6 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) pufera. Uzorak je potom mešan sa jodiksanolom (OptiPrep™) kako bi se naneo na gradijent gustine.

Gradijent gustine je pravljen od jodiksanela (Optiprep™). Slojevi gustina: 15%, 20%, 25%, 30% i 35% su pravljeni razblaživanjem jodiksanela u puferu PBS. Gradijent je nanošen od sloja najmanje gustine do sloja najveće gustine tako što je nakon nanošenja sloja najmanje gustine na dno tube, ispod njega iglom nanet naredni sloj veće gustine. Postupak je ponavljan u nanošenju ostalih slojeva rastuće gustine (slika 3.5).

Uzorak je poslednji nanošen na gradijent, u najgušćem sloju (slika 3.6). Gradijent je centrifugiran 18 sati na +4°C/100.000 g u SW55Ti rotoru, u Beckman Coulter - Optima L-80 XP ultracentrifugi. Nakon centrifugiranja iz tube je uz pomoć tanke ugle vađen sloj sa OMV (slika 3.6), a jodiksanol uklanjnjan ispiranjem u 10 zapremina PBS, ultrafiltracijom u Amicon® ultracentrifugalnom filteru, membrana od regenerisane celuloze, MWCO 100 kDa, na 1500 g/ +4°C.



Slika 3.5. Koraci u naslojavanju gradijenta gustine od sloja najmanje gustine do sloja najveće gustine. Šema pravljen uz pomoć BioRender softvera (<https://www.biorender.com/>)



Slika 3.6. Postavka uzorka na gradijent gustine i vađenje sloja sa ekstracelularnim vezikulama. Šema pravljen uz pomoć BioRender softvera (<https://www.biorender.com/>)

Drugi i jednostavniji metod OMV izolacije je bio pomoću ExoBacteria™ OMV Isolation Kit-a (System Biosciences, EXOBAC100A-1, slika 3.4) zasnovanog na afinitetnoj hromatografiji, prema uputstvima proizvođača.

3.6.2. Metode karakterizacije OMV soja *P. phytofirmans* PsJN

3.6.2.1. Određivanje koncentracije i veličine nanočestica

Koncentracija i raspodela veličine nanočestica analizirane su analizom praćenja nanočestica NTA (eng. *Nanoparticle Tracking Analysis*) korišćenjem instrumenta ZetaView Quatt PMX-430 i softvera ZetaView verzije 8.05.16 SP3 (*Particle Metrix, Inning, Nemačka*) na Odeljenju za imunologiju i imunoparazitologiju, Instituta za primenu nuklearne energije, Univerziteta u Beogradu. Kalibracija instrumenta, uključujući automatsku verifikaciju ćelija, poravnanje kamere i lasera i optimizaciju fokusa, izvršena je prema protokolu proizvođača korišćenjem polistirenskih perli od 100 nm. Pre analize, elucioni pufer u uzorcima je zamenjen puferom PBS (136.893 mM NaCl, 2.683 mM KCl, 10.144 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) ultrafiltracijom u Amicon® ultracentrifugalnom filteru, 100 kDa MWCO, na 1500 g/+4°C ili dijalizom u crevu od celuloze sa porama veličine 12 kDa. Uzorci su razblaženi 1:250 u PBS-u kako bi se osiguralo da koncentracija čestica bude unutar optimalnog opsega detekcije. Osvetljavanje čestica je postignuto korišćenjem plavog lasera od 488 nm. Za merenja u režimu rasejanja, snimanje videa je podešeno na osetljivost od 78, brzinu zatvarača od 100 i brzinu kadrova od 30 kadrova u sekundi, sa snimcima napravljenim tokom jednog ciklusa merenja. Za obradu podataka podešena je minimalna površina od 10, maksimalna površina od 1000 i minimalni prag osvetljenosti od 30. Svaki uzorak je analiziran na 11 različitih pozicija da bi se izračunala srednja veličina čestica.

NTA analiza OMV obeleženih oktaedril-rodamin B hloridom (R18) izvršena je korišćenjem lasera od 520 nm i filtera od 550 nm, razblaženja uzorka 1:67 i podešavanja osetljivosti instrumenta na 90 i brzine zatvarača na 200.

3.6.2.2. Kvantifikacija lipopolisaharida (LPS) i proteina

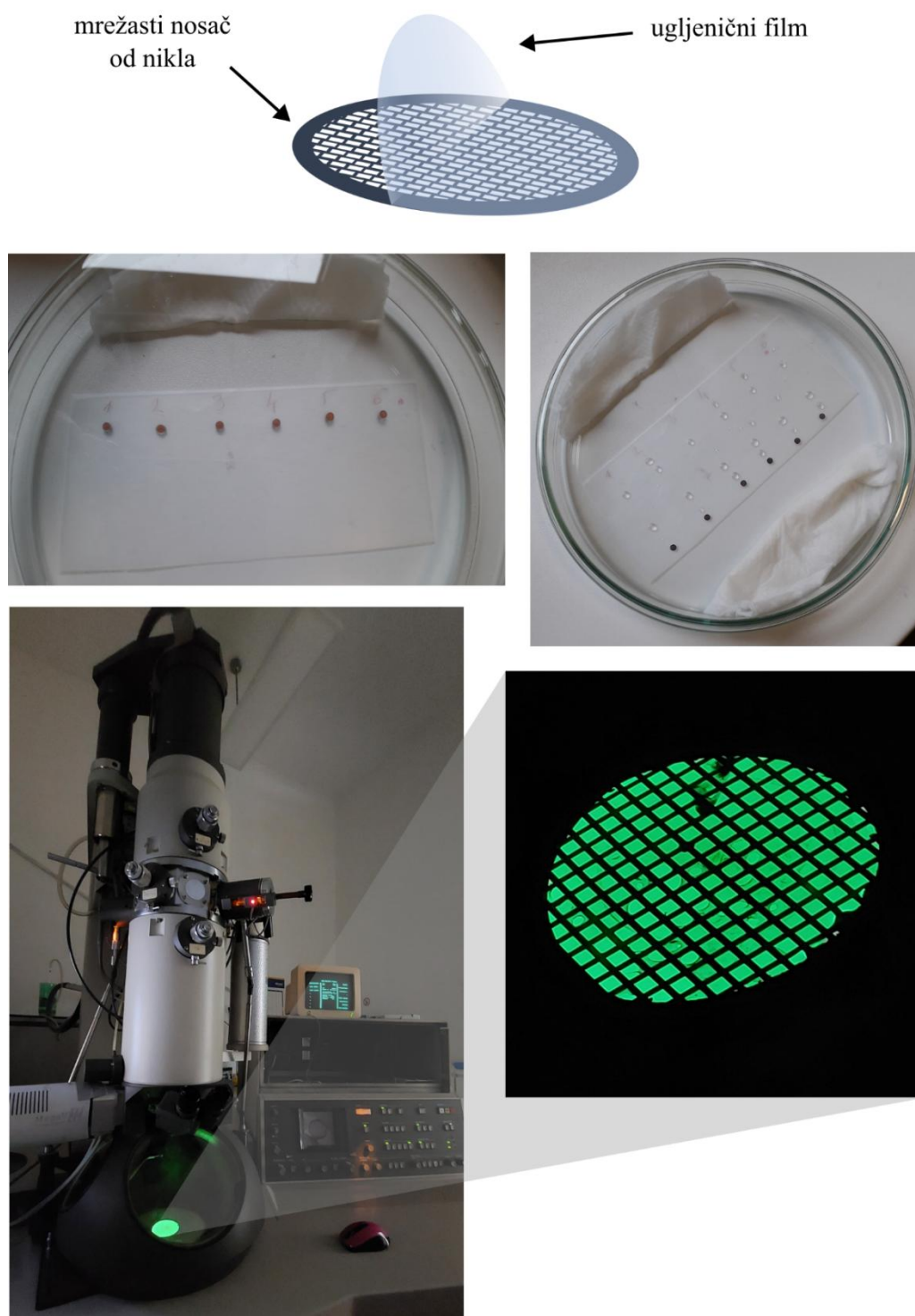
Koncentracija LPS u uzorcima i kontroli (PBS) je merena korišćenjem *Thermo Scientific Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit*-a prema uputstvima proizvođača. Koncentracija proteina u izolatima OMV je određena pomoću *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*-a.

3.6.2.3. Transmisiona elektronska mikroskopija OMV soja *P. phytofirmans* PsJN

OMV soja *P. phytofirmans* PsJN su vizuelizovani korišćenjem transmisionog elektronskog mikroskopa (TEM). Uzorci su prethodno ukoncentrisani korišćenjem Amicon kolonika za ultrafiltraciju (membrana od regenerisane celuloze, MWCO 100 kDa), do koncentracije od 10¹¹/mL. Takvi uzorci su naneti na mrežasti nosač od nikla presvučen ugljenikom (Carbon Film 200 Mesh Ni) koje su prethodno pripremljene sa 2% glutaraldehida (GA).

Svi koraci su rađeni u Petri šolji na parafilmu na čijim rubovima je postavljan vlažan ubrus kako se mrežica ne bi osušila tokom nanošenja rastvora i uzorka. Mrežasti nosač je sjajnom stranom postavljen na kapljicu (eng. *grid on drop*) od 10 µL 2% sveže pripremljenog GA koji je profiltriran kroz 0.1 nm filter (slika 3.7). Nakon inkubacije sa GA, ivica nosača je naslonjena na filter papir kako bi se pokupio višak GA. Na nosač je potom nanesen uzorak metodom kapljice na mrežu (eng. *drop on grid*) tokom kog se kapljica od 2-3 µL uzorka nanosi na nosač, a nakon sušenja kapljice nanosi novih 2-3 µL uzorka. Ovaj proces se ponavlja tokom 10 minuta kako bi se postiglo vezivanje što veće količine vezikula za mrežicu. Nakon vezivanja uzorka za mrežicu, ona je ispirana sa H₂O koja je takođe profiltrirana kroz 0,1 nm filter. Mrežasti nosač je postavljen na kapljice od 10 µL vode. Ispiranje je ponovljeno dva puta na novim kapljicama vode. Na kraju je višak vode upijen ivicom filter papira i nosač je ostavljen sa sjajnom stranom nagore kako bi se mrežica potpuno osušila do skladištenja i posmatranja na TEM. Tokom svih koraka - nanošenja GA, uzorka i pranja sa vodom

važno je sprečiti sušenje mrežice kako ne bi se izbeglo pucanje mrežice. Uzorci su slikani na TEM Centra za elektronsku mikroskopiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.



Slika 3.7. Nanošenje ekstracelularnih vezikula na mrežaste nosače.

3.6.2.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija OMV soja *P. phytofirmans* PsJN

Pored TEM, vezikule su posmatrane i na skenirajućem elektronskom mikroskopu (SEM) čime se omogućava posmatranje oblika i površine vezikula.

Za SEM je korišćen isti tip mrežica kao i za TEM, i praćen je isti protokol pripreme nosača i nanošenja uzoraka kao za TEM, ali je pre cele procedure uveden korak koji omogućava lakše vezivanje vezikula za mrežaste nosače. Nosači su nanošeni na kapljicu od 10 μ L Poli-L-Lizina koja se nalazila na parafilmu u Petri šolji. Nosači su držani 30 minuta u zatvorenoj Petri šolji. Tretman sa Poli-L-Lizinom je pratilo pranje na kapljici od 10 μ L komercijalnog PBS. Zaostali pufer je uklanjan bočnim upijanjem filter papirom. Pranje je ponovljeno sa tri kapljice PBS-a. Dalji koraci su bili identični kao za TEM. Mrežice su posmatrane primenom skenirajuće elektronske mikroskopije emisijom elektrona/primenom polja FEG-SEM (eng. *Field Emission Gun Scanning Electron Microscope*) na Tescan Mira 3 skenirajućem mikroskopu Inovacionog centra Tehnološko-metalurškog fakulteta.

3.6.3. Obeležavanje OMV i uklanjanje nevezane boje

Nakon izmene elucionog pufera sa PBS-om, dijalizom u crevu sa porama veličine 12 kD, izolovane OMV (2,4 mL) su obeležene fluorescentnom bojom koja vezuje lipide, *Vybrant™ DiD Cell-Labeling Solution* (Invitrogen™). Uzorak OMV sa dodatom DiD bojom finalne koncentracije 10 μ M je inkubiran sat vremena na temperaturi od 37°C. Pufer PBS sa istom koncentracijom boje je korišćen kao kontrola i tretiran je istom procedurom kao uzorak do nanošenja na korenove. Da bi se uklonila nevezana boja, DiD-om obeležene OMV su prečišćene ultracentrifugiranjem u diskontinuiranom gradijentu gustine jodiksana (OptiPrep™). Testirana su dva različita gradijenta: jedan sa slojevima u rasponu od 21% do 35% i drugi, sa finijim razlikama u gustini slojeva, od 21% do 28%. Finiji gradijent gustine je obezbedio konzistentnost i reproduktivnost u potpunom uklanjanju nevezane boje DiD, što je uočeno u kontroli (podaci nisu prikazani); stoga je korišćen za pranje DiD-OMV i kontrole pre nanošenja na korenove. DiD-OMV ili kontrola su pomešani sa OptiPrep™-om da bi se dobilo 28% jodiksana, koji je nanošen na dno gradijenta, ispod slojeva: 21%, 22%, 23%, 24%, 25% i 26%. Za svaki uzorak OMV i kontrolu korišćene su tri ultra-providne epruvete za centrifugiranje sa tankim zidom (5 mL).

Za test fuzije membrana, OMV su obeležene bojom koja vezuje lipide, oktadecil-rodamin B hloridom (R18), prema Gnopo & Putnam, 2020. OMV u PBS-u ili sam PBS kao kontrola (2,4 mL) su inkubirani sa 8 μ g/mL R18 sat vremena na sobnoj temperaturi. Korišćene su dve varijante gradijenta gustine OptiPrep™: finija varijanta sa slojevima od 21% do 28%, i druga varijanta sa slojevima od 15%, 20%, 25%, zatim 30% koji sadrže R18-OMV ili kontrolu (PBS sa R18), i slojem od 35% Optiprep-a na dnu. Obe varijante gradijenta rezultirale su potpunim uklanjanjem nevezanog R18, jer su signali bili odsutni u kontroli, dok su primećeni u korenima tretiranim R18-OMV u istim vremenskim tačkama.

Svi gradijenti su centrifugirani 18 sati na +4°C/ 100.000 g u SW55Ti rotoru, *Beckman Coulter - Optima L-80 XP* ultracentrifugi. Prsten koji sadrži fluorescentno obeležene OMV-ove je sakupljen iz svake od tri epruvete i objedinjen. Ista količina gradijentnog medijuma je sakupljena iz kontrole na istoj poziciji u epruvetama. Jodiksanol je uklonjen ispiranjem u 10 zapremina PBS-a ultrafiltracijom u Amicon® ultracentrifugalnom filteru, 100 kDa MWCO, na 1500 g/ +4°C i konačno koncentrovan na 300 μ L, finalne koncentracije 10^{10} čestica/mL, što je određeno NTA metodom.

3.6.4. Praćenje interakcije OMV sa korenovima uz pomoć konfokalne laserske skenirajuće mikroskopije – CLMS

Korenovi klijanaca *S. lycopersicum* ili *A. thaliana* stari četiri dana ispirani su u puferu PBS, a zatim inkubirani sa DiD- ili R18- obeleženim vezikulama ili odgovarajućim kontrolama na sobnoj temperaturi u mraku tokom perioda od jednog do četiri sata. Nakon inkubacije korenovi su ispirani tri puta PBS-om i posmatrani pod CLMS. Slike su snimljene koristeći kameru *Leica TCS SP8*

konfokalnog mikroskopa sa objektivima od 20x ili 63x. Z-podeoci na 10µm po rezu su dobijeni pomoću LasAF softvera (Leica).

3.7. Metode korišćene u radu sa RNK asociranih sa OMV

3.7.1. Izolacija RNK iz OMV

RNK asocirane sa OMV su izolovane korišćenjem *EVERY EV RNA Isolation Kit-a* (System Biosciences) sa svim preporučenim dodatnim koracima (zagrevanje pufera za lizu na 60°C, dodatak 1 M DTT (ditiotritol) i glikogena). Po sugestiji proizvođača urađen je i DNazni tretman na kolonici za izolovanje RNK. Koncentracija RNK je merena korišćenjem *Qubit™ RNA HS (High Sensitivity) Assay Kit-a*, prateći protokol proizvođača.

3.7.2. Izolacija RNK iz bakterijskih ćelija

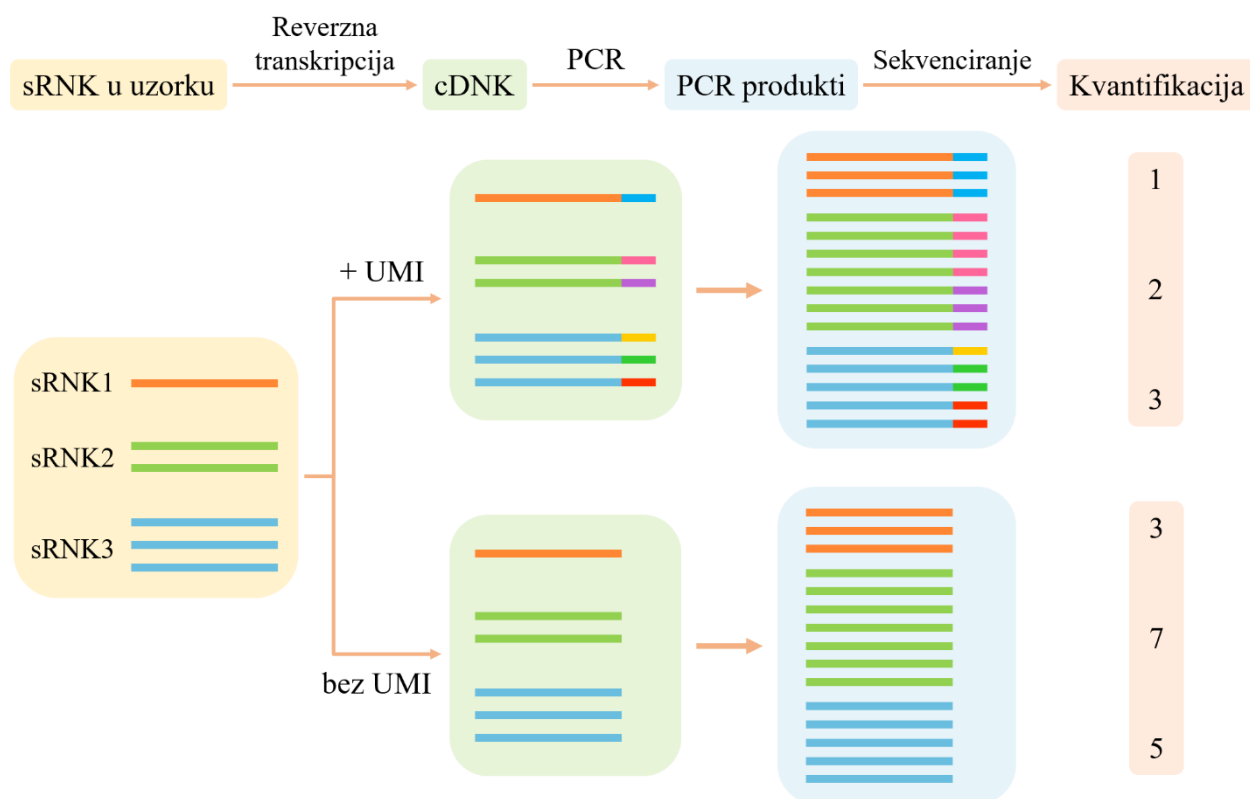
Za izolaciju RNK iz bakterijskih ćelija odvojeno je 15 mL od prekonoćne kulture koja je korišćena za izolovanje OMV. Bakterije su oborene na 1500g/+4°C/ 5 min. Supernatant je uklonjen i bakterije su oprane medijumom MSM tri puta na 1700g/ 1 min. Talog je rastvoren u 0,5 mL MSM, a zatim gustina podešena na OD 2,6 dodavanjem MSM-a. Po 700 µL tako dobijene suspenzije bakterija je prebačeno u tube od 2 mL i oboreno na 1700g/2 min. Nakon uklanjanja supernatanta talog je čuvan na -80°C do izolacije RNK.

RNK iz bakterija je izolovana korišćenjem *microRNA Purification Kit* (Norgen BioTek), u skladu sa protokolom za bakterijske uzorke. Po 100 µL lizozima (1 mg/mL) rastvorenog u TE puferu je nanoseno na smrznute taloge *P. phytofirmans* PsJN, dobro promešano i ostavljeno da se inkubira na sobnoj temperaturi 5 minuta, nakon čega je nastavljena izolacija po uputstvu proizvođača za izolaciju malih RNK, dužine do 200 nt.

3.7.3. Sekvenciranje RNK iz OMV i bakterija *P. phytofirmans* PsJN

Niska koncentracija i mali prinos izolata RNK asociranih za OMV (eng. *low input*) uticali su na korake tokom pripreme biblioteka i sekvenciranja kako uzoraka izolovanih iz OMV izolata tako i bakterija.

Nakon provere kvaliteta, uzorci malih RNK iz OMV čija je koncentracija bila viša od 0,3 ng/µL i ukupna količina veća od 10 ng korišćeni su za pravljenje biblioteka i sekvenciranje. Uzorci su razdvojeni korišćenjem poliakrilamidne gel elektroforeze - PAGE (eng. *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Koristeći marker za dužinu, iz gela su isečena po dva uzorka malih RNK, za svaki od izolata: jedan je sadržao RNK dužina 18-40 nukleotida, a drugi RNK dužina 40-200 nukleotida. Nakon selekcije po dužini, uzorci su korišćeni za konstrukciju biblioteka, koja je obuhvatala sledeće korake: ligaciju adaptera, sintezu cDNK i dodavanje jedinstvenih UMI sekvenci (eng. *Unique Molecular Identifiers*), obogaćivanje putem PCR metode, prečišćavanje PCR produkata na PAGE gelu, kao i denaturaciju i cirkularizaciju u jednolančanu cirkularnu DNK – ssCirDNA (eng. *single strand circle DNA*). Pre sekvenciranja kvalitet biblioteka je proveren na RNK čipu. Biblioteke su amplifikovane koristeći phi29 polimerazu kako bi se formirale DNK nanoloptice koje se sastoje od više od 300 kopija jednog RNK molekula. S obzirom na malu količinu početnog uzorka korišćenje UMI sekvenci omogućava da se eliminišu nepoželjni PCR duplikati (slika 3.8). Nakon PCR reakcije, molekuli koji sadrže istu UMI sekvencu se smatraju da potiču sa istog početnog molekula RNK, čime je omogućena preciznija kvantifikacija ekspresije u uzorcima sa malom početnom količinom RNK.



Slika 3.8. Princip korišćenja UMI sekvenci.

Kao što je napomenuto, svaki izolat malih RNK je podeljen na dva nova uzorka za koje su konstruisane zasebne biblioteke koje su potom sekvencirane na DNBseq-G400 na dva različita načina. Biblioteke koje su pravljene od RNK dužine 18 do 40 nukleotida su sekvencirane SE50 pristupom, dok su biblioteke koje su pravljene od RNK dužina od 40 do 200 nukleotida sekvencirane PE100 pristupom.

Ovaj pristup je korišćen i za uzorke malih RNK izolovanih iz bakterija, ali kako je u ćelijama zastupljenost ribozomalne RNK velika, uveden je korak uklanjanja rRNK u uzorcima RNK dužina od 40 do 200 nukleotida.

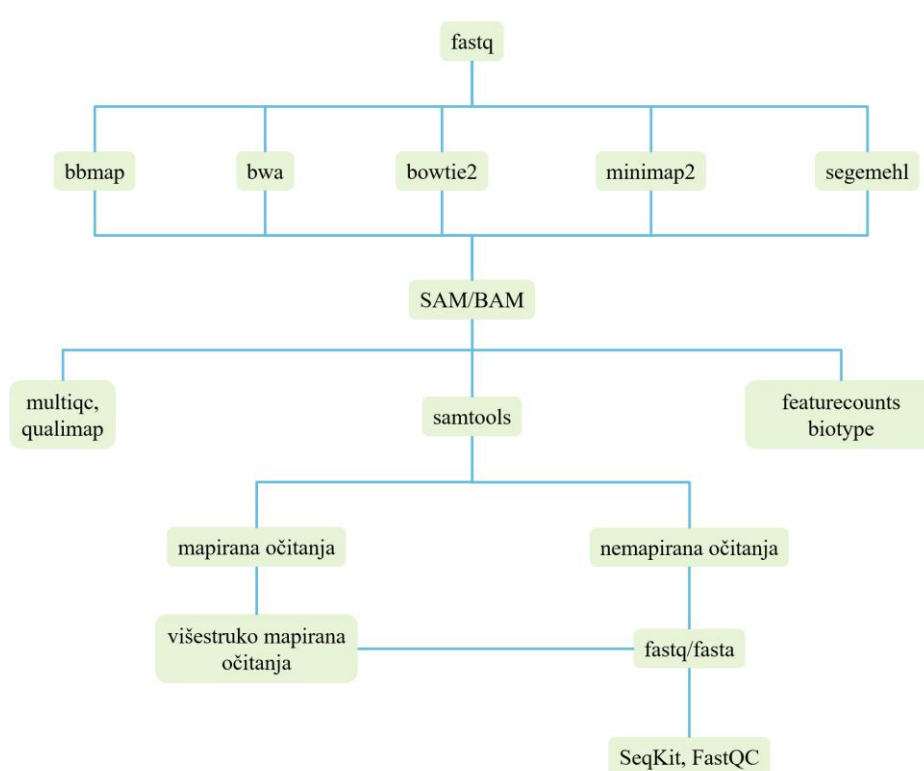
Za uklanjanje ribozomalne RNK korišćen je *TLANSeq rRNA Depletion Kit (G- bacteria)*. Ukratko, sekvencno-specifične RNK probe omogućavaju hibridizaciju sa rRNK molekulima. Hibridi rRNK-proba se potom vezuju za magnetne loptice sa streptavidinom, nakon čega se ispiranjem uklanja rRNK, dok se eluira rRNK-depletirana RNK koja se koristi za dalje korake konstrukcije biblioteka i sekvenciranja.

3.7.4. Bioinformatička analiza sRNK asociраних sa OMV bakterija

S obzirom na specifične karakteristike uzoraka sRNK-OMV urađena je detaljna analiza različitih alata za mapiranje, korišćenjem dostupnih podataka dobijenih za sRNK iz OMV bakterije *Aliivibrio fischeri*. Razlike ovih alata ogledaju se u prepoznavanju biotipova sRNK koje potiču od iRNK, tRNK i rRNK. S obzirom na to da ovi biotipovi imaju različite biološke funkcije, njihovo neprepoznavanje može imati značajne posledice tokom interpretacije rezultata sekvenciranja.

Na slici 3.9 je predstavljen šematski prikaz bioinformatičke analize OMV-sRNK. Tokom analize korišćeno je pet alata za mapiranje: BBmap (Bushnell, 2017), Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012), BWA (Li, 2013), Minimap2 (Li, 2018) i Segemehl (Otto *et al.*, 2014), koji se koriste za mapiranje NGS sekvenci na referentni genom. Svaki od navedenih alata je korišćen sa njihovim

podrazumevanim podešavanjima. Dobijeni SAM fajlovi su korišćeni za dobijanje BAM fajlova, nakon čega su iz BAM fajlova izdvojeni brojevi mapiranih, nemapiranih, jedinstveno mapiranih i višestruko mapiranih očitavanja. Stope poravnanja (mapiranih sekvenci) i dodeljivanja, kao i vreme obrade su korišćeni za analizu uticaja svakog alata na mapiranje sekvenci RNK iz OMV *A. fischeri* na referentni genom bakterije. Za svaki mapper su izdvojene nemapirane i višestruko mapirane sekvence od jedinstveno mapiranih sekvenci. Ove sekvence su sortirane i upoređene pomoću samtool i seqkit, a rezultati su analizirani korišćenjem featurecounts alata.



Slika 3.9. Šematski prikaz bioinformatičke analize sRNK

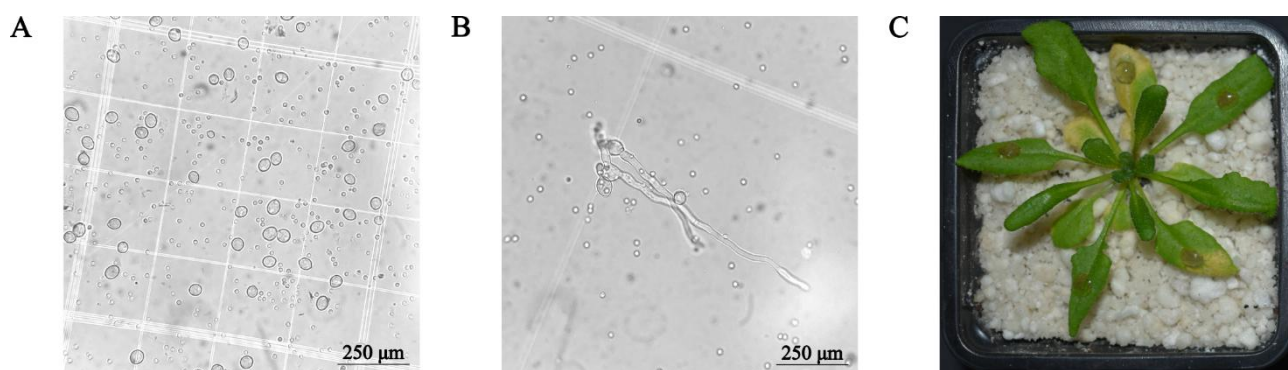
Sekvence dobijene sekvenciranjem RNK izolovanih iz OMV i ćelija *P. phytofirmans* PsJN su prošle sličnu bioinformatičku analizu kao i sekvence *A. fischeri*, ali uz par izmena. Iz sekvenci su ekstrahovane UMI sekvence koristeći Umitools, a istovremeno su UMI sekvence dodate na kraj naziva sekvence. Uz pomoć Fastp alata uklonjeni su adapteri i sekvence lošeg kvaliteta. Sekvence su mapirane na referentni genom *P. phytofirmans* PsJN koji se nalazi na NCBI sajtu (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000020125.1/). Za mapiranje su korišćeni isti alati kao za *A. fischeri*, a nakon mapiranja sekvence u uzorcima su deduplikovane na osnovu UMI sekvenci sadržanih u njihovim nazivima, čime su eliminisani duplikati dobijeni tokom procesa pripreme biblioteke. Korišćenjem samtools alata uklonjene su višestruko mapirane sekvence i uz pomoć alata Featurecounts pobrojane su jedinstveno mapirane sekvence. Analiza glavnih komponenti - PCA (eng. *principal component analysis*), kao i analiza diferencijalne ekspresije su rađeni u R studio programu. Za predikciju targeta sRNK, koje su obogaćene u OMV, korišćen je RNAPlex program dostupan preko online servera RNAPredator (http://nibiru.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAPredator/target_search.cgi).

4. Rezultati

4.1. Uspostavljanje patosistema *Arabidopsis thaliana* - *Botrytis cinerea*

Iako *B. cinerea* ima veliki broj domaćina, simptomi infekcije su slabije izraženi kod *A. thaliana* nego kod useva. Ovaj patogen najčešće zaražava plodove različitih vrsta voća i povrća. Model biljka korišćena u ovom radu je *A. thaliana*, kod koje se zaražavanje i širenje nekroze kao posledice infekcije mogu pratiti samo na listovima (slika 4.1). Uspešnost zaražavanja i stepen infekcije na listovima *A. thaliana* su veoma niski. U toku izrade ove teze, testirana je sposobnost nekoliko sojeva *B. cinerea* da zaraze listove *A. thaliana*. Jedini testirani soj koji je uspešno izazivao nekrotične lezije na ovoj model biljci bio je soj 630, koji je izolovan sa površine plodova grožđa u vinogradima Šampanje (Ait Barka *et al.*, 2004).

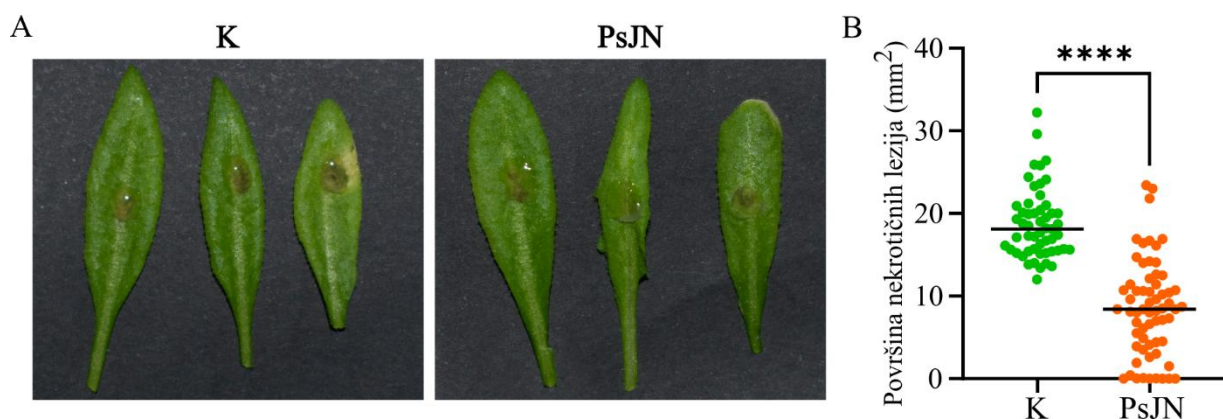
Optimizacija protokola za zaražavanje listova uključivala je primenu različitih rastvora/medijuma za inkubaciju konidiospora i različita vremena inkubacije. Zaražavanje listova konidiosporama inkubiranim u vodi nije izazvalo infekciju, pa je u sledećem eksperimentu inkubacija vršena u medijumu ½ PDB.



Slika 4.1. A) Konidiospore *B. cinerea* 630 na svetlosnom mikroskopu na 10x uveličanju, B) proklijale konidiospore (10x uveličanje), C) nekroza na listovima *A. thaliana*.

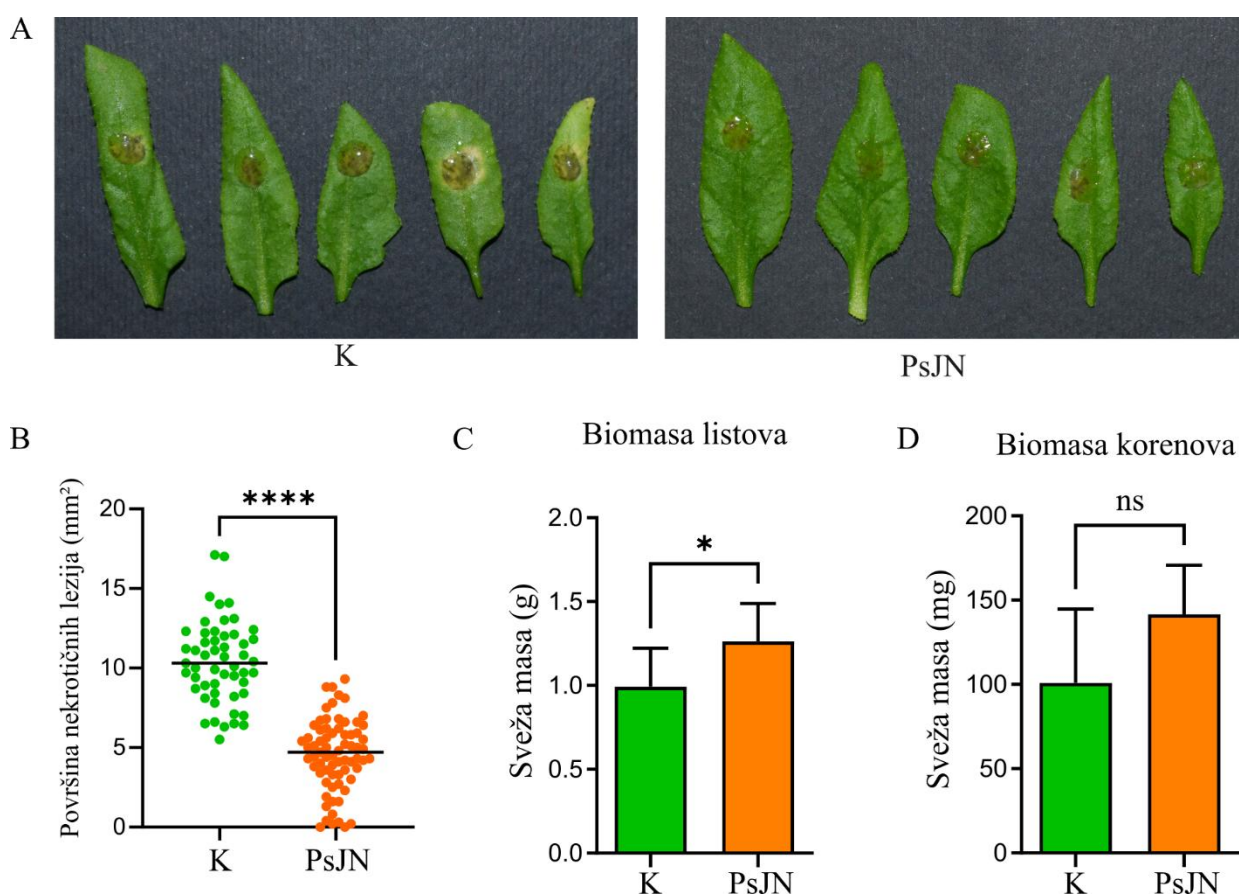
4.2. Protektivno dejstvo PGPB *P. phytofirmans* PsJN tokom infekcije fitopatogenom *B. cinerea*

Protektivno dejstvo soja *P. phytofirmans* PsJN u borbi biljaka protiv patogena *B. cinerea*, je ranije uočeno na vinovoj lozi (Miotto-Vilanova *et al.*, 2016). U ovoj disertaciji je prvi put testirana sposobnost soja *P. phytofirmans* PsJN da podiže odbrambeni odgovor *A. thaliana* nakon infekcije fitopatogenom gljivom. Četiri nedelje stare biljke gajene u zemlji su inokulisane sojem *P. phytofirmans* PsJN *soil drench* metodom i nakon dve nedelje zaražene proklijalim sporama *B. cinerea*. Četiri dana posle zaražavanja, detektovane su i analizirane nekrotične lezije na listovima (slika 4.2). Prosečna veličina lezija na listovima biljaka koje su bile inokulisane bakterijom je bila značajno manja od one na neinokulisanim biljkama, čime je potvrđeno protektivno dejstvo *P. phytofirmans* PsJN u patosistemu *B. cinerea* - *A. thaliana*. Važno je naglasiti da se *soil drench* metodom bakterije apliciraju samo na korenove biljaka, a da je zaštitni efekat uočen na listovima, što ukazuje na sistemsko delovanje korišćenog bakterijskog soja.



Slika 4.2. Protektivno dejstvo *P. phytofirmans* PsJN na *A. thaliana* gajenih u zemlji tokom infekcije *B. cinerea*. A) nekroza na listovima *A. thaliana* izazvana infekcijom *B. cinerea*, B) Površina nekrotičnih lezija tokom infekcije sa *B. cinerea* kod *P. phytofirmans* PsJN-inokulisanih i kontrolnih biljaka.

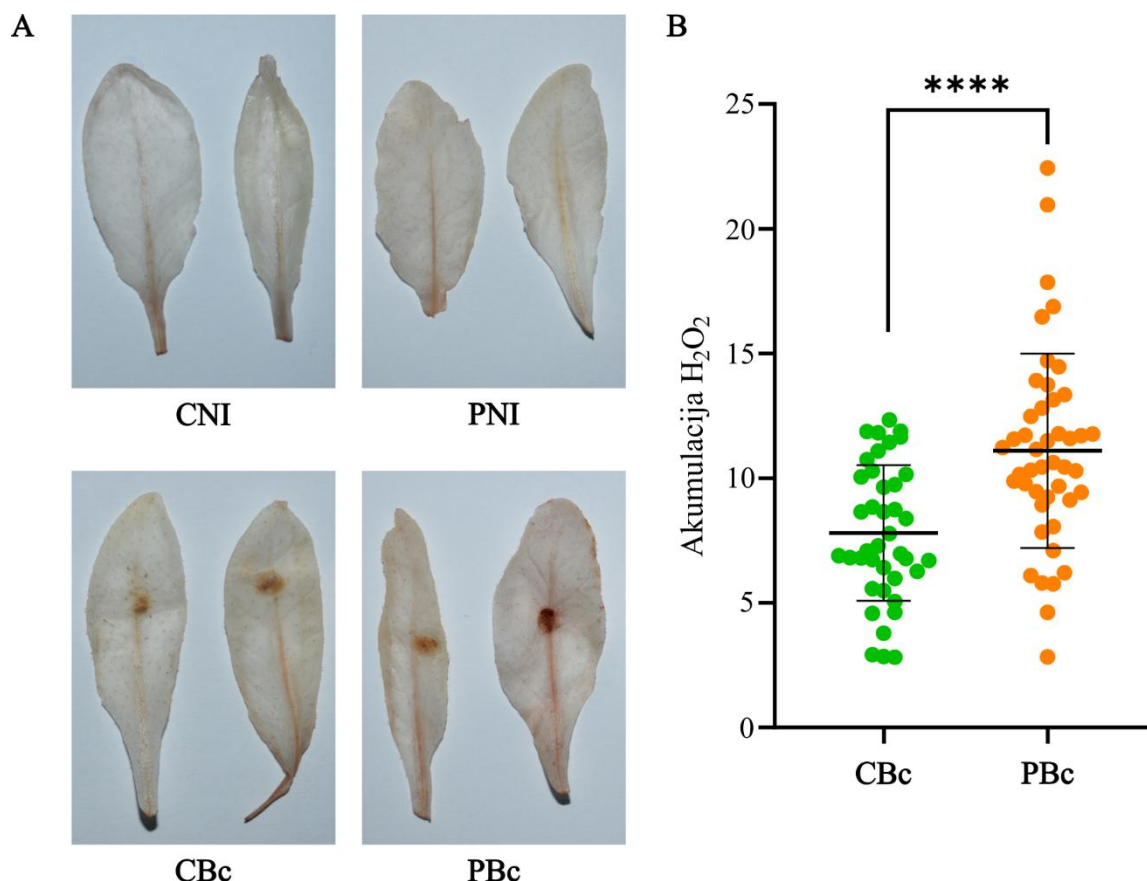
Jedan od ciljeva disertacije bio je i analiza promena u transkriptomu listova i korena *A. thaliana* koje nastaju kao odgovor na infekciju *B. cinerea* i inokulaciju sojem *P. phytofirmans* PsJN. Kako je tkivo korena biljaka gajenih u zemlji nepodnožno za izolaciju RNK zadovoljavajuće čistoće, testirana je i potvrđena protektivna sposobnost *P. phytofirmans* PsJN na biljkama *A. thaliana* gajenim u hidroponici (slika 4.3 C i D). Osim zaštitnog efekta, uočeno je i povećanje biomase biljaka u prisustvu soja *P. phytofirmans* PsJN.



Slika 4.3. Protektivno dejstvo *P. phytofirmans* PsJN na *A. thaliana* gajenih u hidroponici tokom infekcije *B. cinerea*. A) nekroza na listovima *A. thaliana*, B) Površina nekrotičnih lezija tokom

infekcije sa *B. cinerea*. Biomase listova C) i korena D) kontrolnih i biljaka inokulisanih sa *P. phytofirmans* PsJN.

Prisustvo H_2O_2 , kao indikatora hipersenzitivnog odgovora u listovima *A. thaliana*, detektovano je bojenjem 3,3'-diaminobenzidinom (DAB) 24 sata nakon zaražavanja konidiosporama *B. cinerea* ili lažnog zaražavanja medijumom $\frac{1}{2}$ PDB. Na slici 4.4 A se može zapaziti da se H_2O_2 detektuje samo kad su biljke izložene *B. cinerea*. Akumulacija H_2O_2 nije detektovana u biljkama koje su bile izložene medijumu bez *B. cinerea* nezavisno od toga da li su inokulisane ili ne sa *P. phytofirmans* PsJN. Merenjem dijametra i intenziteta H_2O_2 vizuelizovanog DAB bojenjem pokazano je da prisustvo *P. phytofirmans* PsJN dovodi do veće akumulacije H_2O_2 tokom infekcije (slika 4.4 B).



Slika 4.4. Akumulacija H_2O_2 kod biljaka gajenih u zemlji. A) Vizuelizacija prisustva H_2O_2 bojenjem DAB rastvorom (CNI – biljke koje su lažno inokulisane (tretman sa $MgSO_4$, bez bakterija) i nisu zaražene sa *B. cinerea* (nanet samo $\frac{1}{2}$ PDB na listove); CBc – biljke koje su lažno inokulisane (tretman sa $MgSO_4$, bez bakterija) i koje su zaražene sa *B. cinerea*; PNI – biljke koje su inokulisane sa *P. phytofirmans* PsJN i nisu zaražene sa *B. cinerea* (nanet samo $\frac{1}{2}$ PDB na listove); PBc – biljke koje su inokulisane sa *P. phytofirmans* PsJN i čiji listovi su zaraženi *B. cinerea*), B) Akumulacija H_2O_2 određena merenjem intenziteta boje i površine obojene regije pomoću ImageJ i Graphpad softvera.

4.3. Analiza transkriptoma biljaka *A. thaliana* nakon inokulacije sojem *P. phytofirmans* PsJN i infekcije patogenom *B. cinerea*

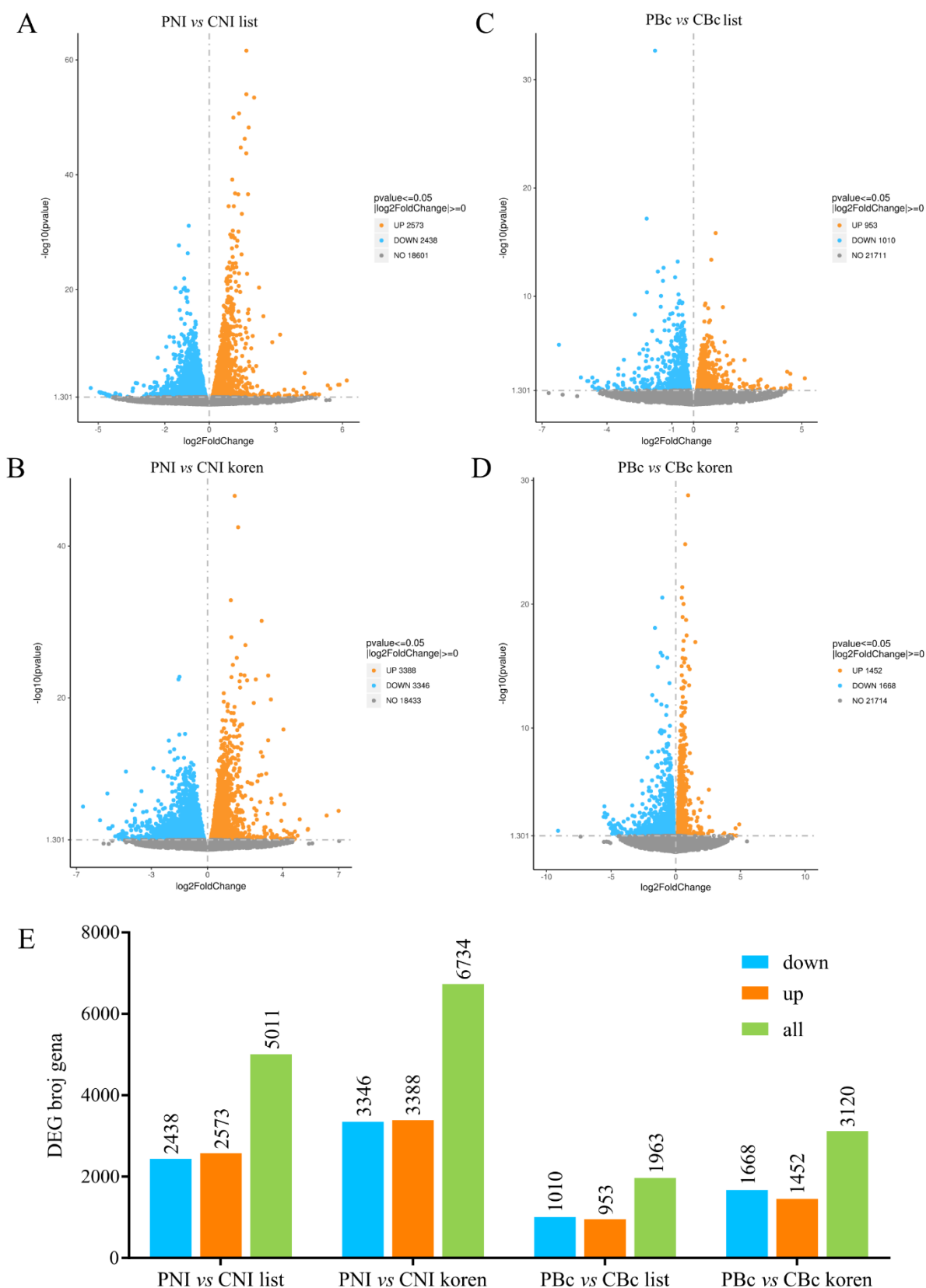
Uticaj soja *P. phytofirmans* PsJN i infekcije gljivom *B. cinerea* na ekspresiju gena u listovima i korenu *A. thaliana* ispitivan je poređenjem transkriptoma dobijenih tehnologijom NGS (Next generation Sequencing).

Uzorci su podeljeni u četiri grupe:

1. CNI – biljke koje su lažno inokulisane (C - *control*, tretman medijumom BNS, bez bakterija) i nisu zaražene konidiosporama *B. cinerea* (NI – *non infected*, nanet samo medijum (½ PDB) na listove)
2. CBc – biljke koje su lažno inokulisane (tretman medijumom BNS, bez bakterija) i koje su zaražene konidiosporama *B. cinerea*
3. PNI – biljke koje su inokulisane sojem *P. phytofirmans* PsJN i nisu zaražene konidiosporama *B. cinerea* (nanet samo ½ PDB na listove)
4. PBc – biljke koje su inokulisane sojem *P. phytofirmans* PsJN i čiji listovi su zaraženi konidiosporama *B. cinerea*

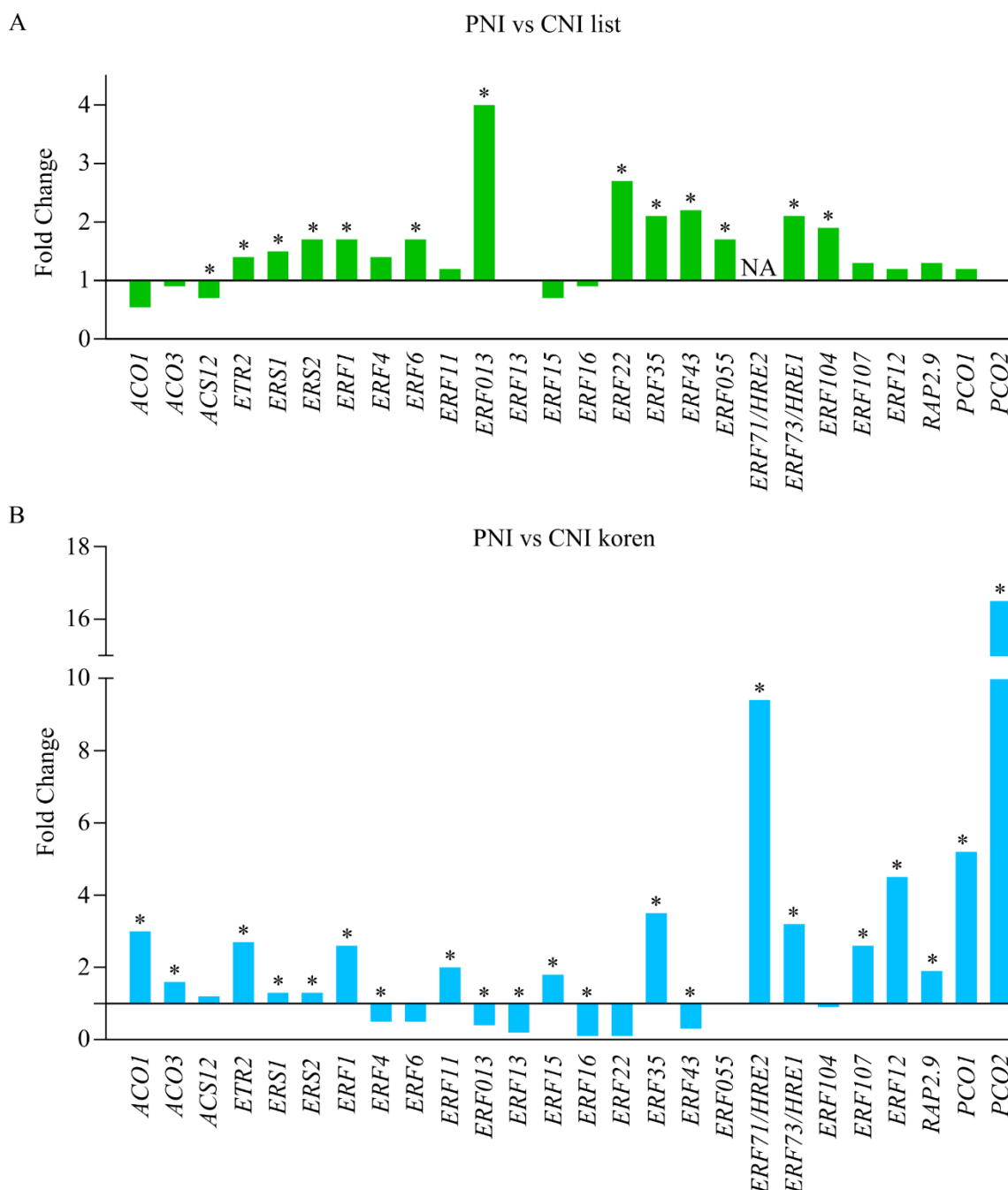
Analizom transkriptoma listova biljaka *A. thaliana* koje su inokulisane sa *P. phytofirmans* PsJN i koje nisu inficirane *B. cinerea*, u poređenju sa kontrolnom grupom (PNI vs CNI) utvrđeno da je 2573 gena imalo povišenu ekspresiju, a 2438 gena smanjenu ekspresiju (slika 4.5 A i E). Broj različito eksprimiranih gena – DEG (eng. *Differentially expressed genes*) sa korigovanom p vrednosti - padj (eng. *Adjusted Probability*) manjom od 0,05 i sa stepenom promene ekspresije većim od 1,5 iznosio je 496, a onih sa stepenom promene manjim od 0,6 (smanjena ekspresija) bilo je 358. U korenovima biljaka inokuliranih sa *P. phytofirmans* PsJN 3388 gena je imalo povećanu ekspresiju, a 3346 smanjenu u poređenju sa kontrolom (slika 4.5 B i E). Broj DEG sa padj manjom od 0,05 i sa stepenom promene ekspresije većim od 1,5 je bilo 837, a onih sa stepenom promene manjim od 0,6 je bilo 899.

Dvadeset četiri sata nakon infekcije *B. cinerea*, 953 gena je imalo povećanu, a 1010 gena smanjenu ekspresiju u listovima biljaka *A. thaliana* inokuliranih sa *P. phytofirmans* PsJN u odnosu na neinokulirane biljke (PBc vs CBc) (slika 4.5 C i E). Broj DEG sa padj < 0,05 i sa stepenom promene ekspresije većim od 1,5 iznosio je 51, a onih sa stepenom promene manjim od 0,6 bilo je 81. U korenovima biljaka koje su inokulirane sa *P. phytofirmans* PsJN i inficirane sa *B. cinerea*, 1452 gena je bilo sa povećanom ekspresijom, a 1668 sa smanjenom u poređenju sa neinokuliranim biljkama (slika 4.5 D i E). Broj DEG sa padj < 0,05, i sa stepenom promene ekspresije većim od 1,5 je bilo 75, a onih sa stepenom promene manjim od 0,6 bilo je 121.



Slika 4.5. Vizuelizacija diferencijalno eksprimiranih gena (DEG) u listovima i korenovima biljaka u poređenjima tretmana PNI vs CNI, i PBc vs CBc. *Volcano* plot – prikaz distribucije diferencijalno eksprimiranih gena u poređenjima PNI vs CNI A) list i B) koren; PBc vs CBc C) list i D) koren. Horizontalna osa predstavlja nivo promene ekspresije gena, a vertikalna osa statističku značajnost nivoa promene. E) Histogramski prikaz ukupnih DEG i DEG smanjene i povećane ekspresije.

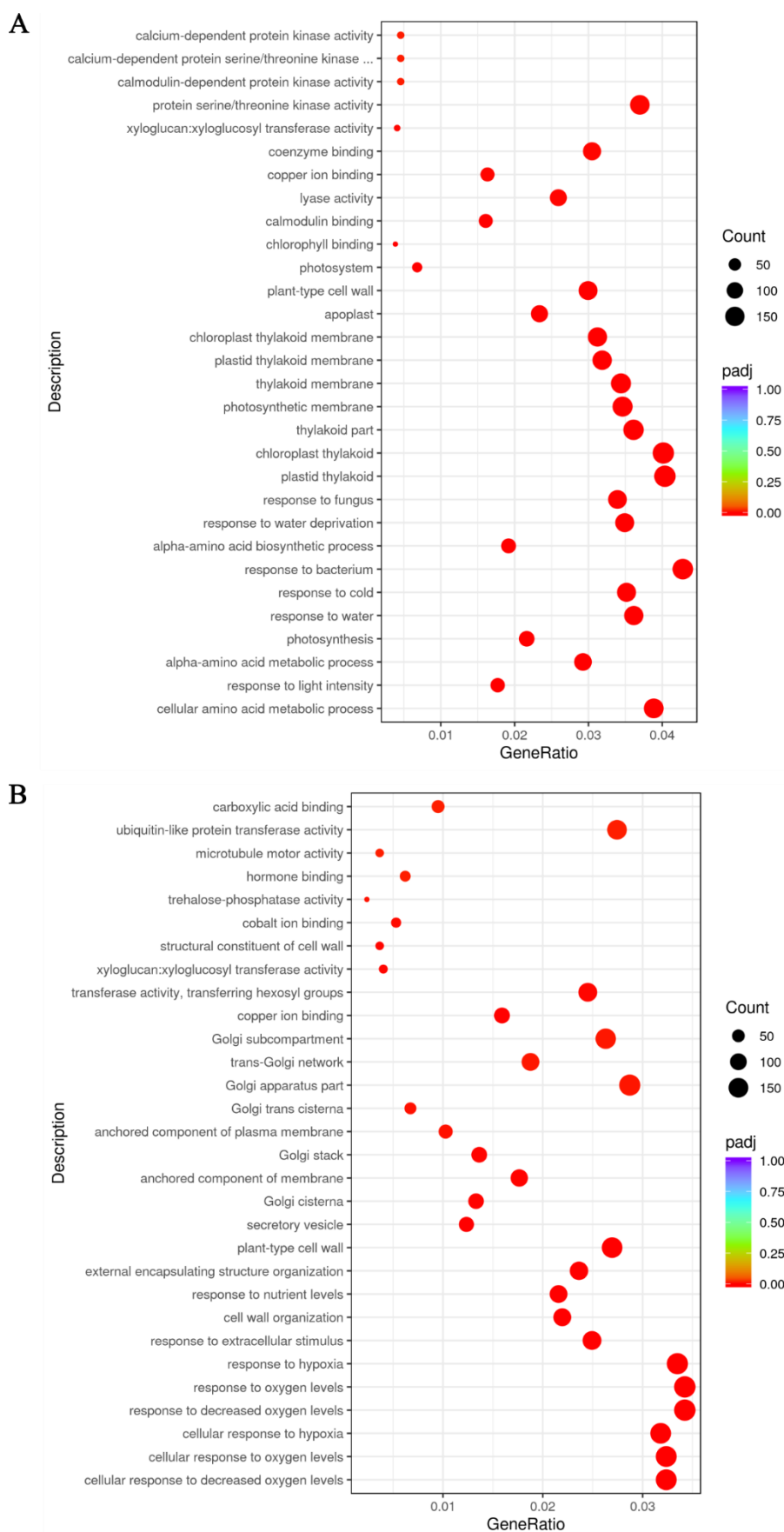
Analiza transkriptoma korena i listova biljaka pre infekcije sa *B. cinerea* (PNI vs CNI) otkrila je diferencijalno eksprimirane gene uključene u odgovore na abiotički i biotički stres. Podaci ukazuju da *P. phytofirmans* PsJN utiče na ekspresiju niza gena uključenih u sintezu etilena kao i signalni put etilena, kako u listovima tako i u korenu (slika 4.6). Prisustvo *P. phytofirmans* PsJN dovodi do značajnog porasta ekspresije gena *ACO1* (eng. *Aconitase 1*) i *ACO3* (eng. *Aconitase 3*) koji kodiraju ACC oksidazu u korenu. Takođe, povećanu ekspresiju u listovima i korenu biljaka, inokulisanih sa *P. phytofirmans* PsJN, pokazali su i geni *ETR2* (eng. *Ethylene Responce 2*) i *ERS2* (eng. *Ethylene Response Sensor 2*), koji kodiraju receptore za etilen i učestvuju u percepciji etilena. Analiza transkriptoma je otkrila da *P. phytofirmans* PsJN različito utiče na ekspresiju brojnih transkripcionih faktora uključenih u odgovor na etilen - ERF (eng. *Ethylene Response Factor*), u zavisnosti od njihovih targeta i biljnog organa (slika 4.6). Većina ERF gena je imala povećanu ekspresiju u listovima dok se u korenu detektuju i povećana i smanjena ekspresija različitih ERF gena kao odgovor na inokulaciju *P. phytofirmans* PsJN.



Slika 4.6. Nivoi ekspresije gena uključenih u sintezu i signalizaciju etilena u korenu i listovima biljaka inokulisanih sa *P. phytofirmans* PsJN pre zaražavanja sa *B. cinerea*. A) listovi i B) korenovi biljaka inokulisanih sa *P. phytofirmans* PsJN u poređenju sa kontrolom. * označava gene sa $p < 0,05$.

4.3.1. *P. phytofirmans* PsJN moduliše ekspresiju gena *A. thaliana* povezanih sa abiotičkim stresom

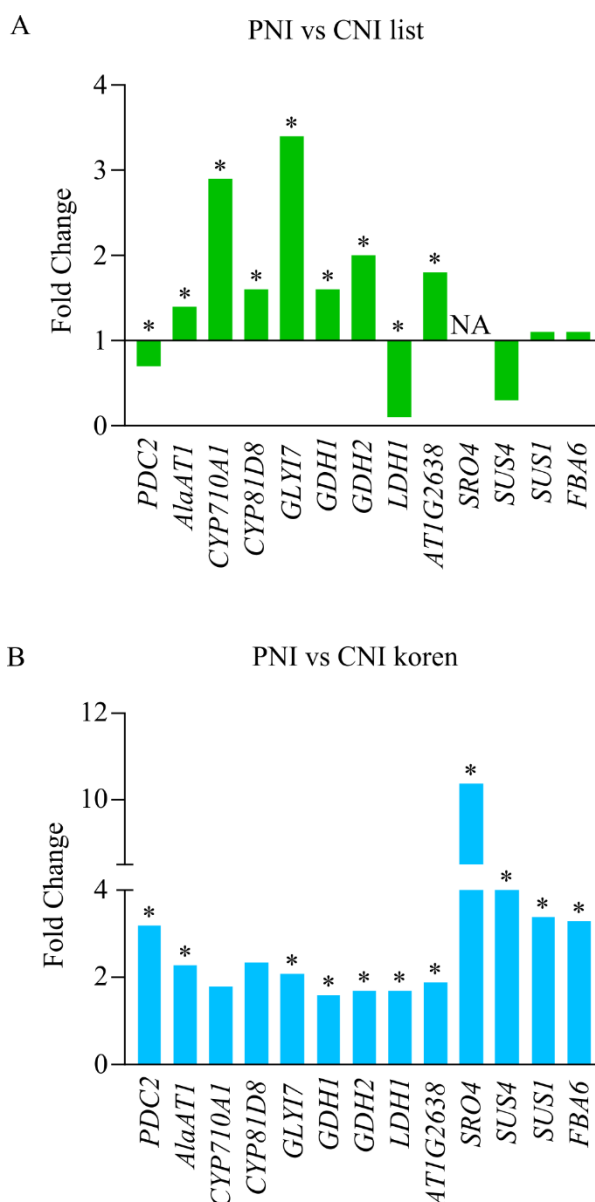
Diferencijalno eksprimirani geni okarakterisani su pomoću analize GO (eng. *Gene Ontology*, GO), koja grupiše gene sa istom funkcijom, lokalizacijom i učešćem u istim biološkim procesima. GO analiza gena sa povećanom ekspresijom usled prisustva *P. phytofirmans* PsJN ukazala je na različite funkcionalne kategorije bioloških procesa, uključujući puteve vezane za odgovore na abiotičke stimuluse kao što su smanjen nivo kiseonika, nivo hranljivih materija i odsustvo svetlosti (slika 4.7).



Slika 4.7. Analiza Ontologije Gena - GO (eng. *Gene Ontology*) za različito eksprimirane gene biljaka inokuliranih sa *P. phytofirmans* PsJN pre zaražavanja *B. cinerea* u poređenju sa neinokuliranim kontrolama, poređenje tretmana PNI vs CNI. GO dijagram pokazuje 30 najznačajnijih

puteva koji obuhvataju gene sa statistički značajnim promenama u ekspresiji u A) listovima i B) korenu. Boje označavaju različite nivoe značajnosti, crvena boja označava puteve sa $\text{padj} < 0,05$.

U analizama razlika u ekspresiji gena identifikovan je značajan broj gena povezanih sa detekcijom i odgovorom na hipoksiju kako u korenu tako i u listovima (slike 4.6 i 4.8). Ovo može biti posledica uslova pod kojima su biljke gajene. Ključni senzori kiseonika spadaju u ERFVII (eng. *Group VII Ethylene Response Factor*) familiju transkripcionih faktora: *HRE* (eng. *Hypoxia-Responsive ERFs*) i *RAP2* (eng. *Related to Apetala 2*) (Licausi et al. 2010; Gibbs et al., 2011). Ekspresija *HRE1* i *HRE2* značajno je porasla u korenovima biljaka inokulisanim sa *P. phytofirmans* PsJN, dok je povećanje *HRE1* takođe zabeleženo u listovima. Prisustvo *P. phytofirmans* PsJN nije značajno uticalo na ekspresiju RAP transkripcionih faktora sa izuzetkom *RAP9.2* čija je ekspresija u korenu bila dvostruko povećana. *PCO1* i *PCO2* koji kodiraju biljne oksidaze cisteina, a takođe su senzori kiseonika i uključeni u N-terminalni put, su u korenu imali povećanu ekspresiju kod biljaka inokulisanih sa *P. phytofirmans* PsJN.



Slika 4.8. Relativna ekspresija gena uključenih u odgovor na hipoksiju u A) listovima i B) korenu biljaka inokulisanih sa *P. phytofirmans* PsJN pre zaražavanja *B. cinerea* u poređenju sa neinokulisanim kontrolama. * označava gene sa $\text{padj} < 0,05$.

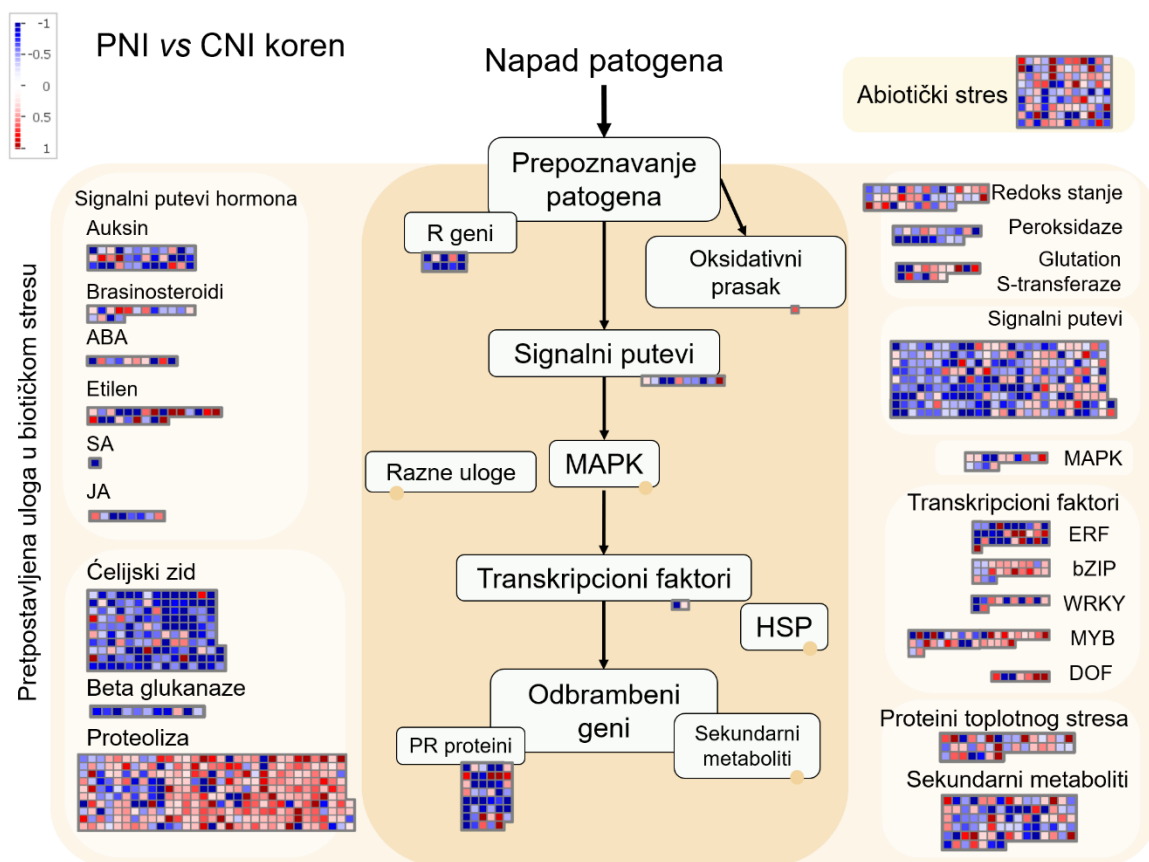
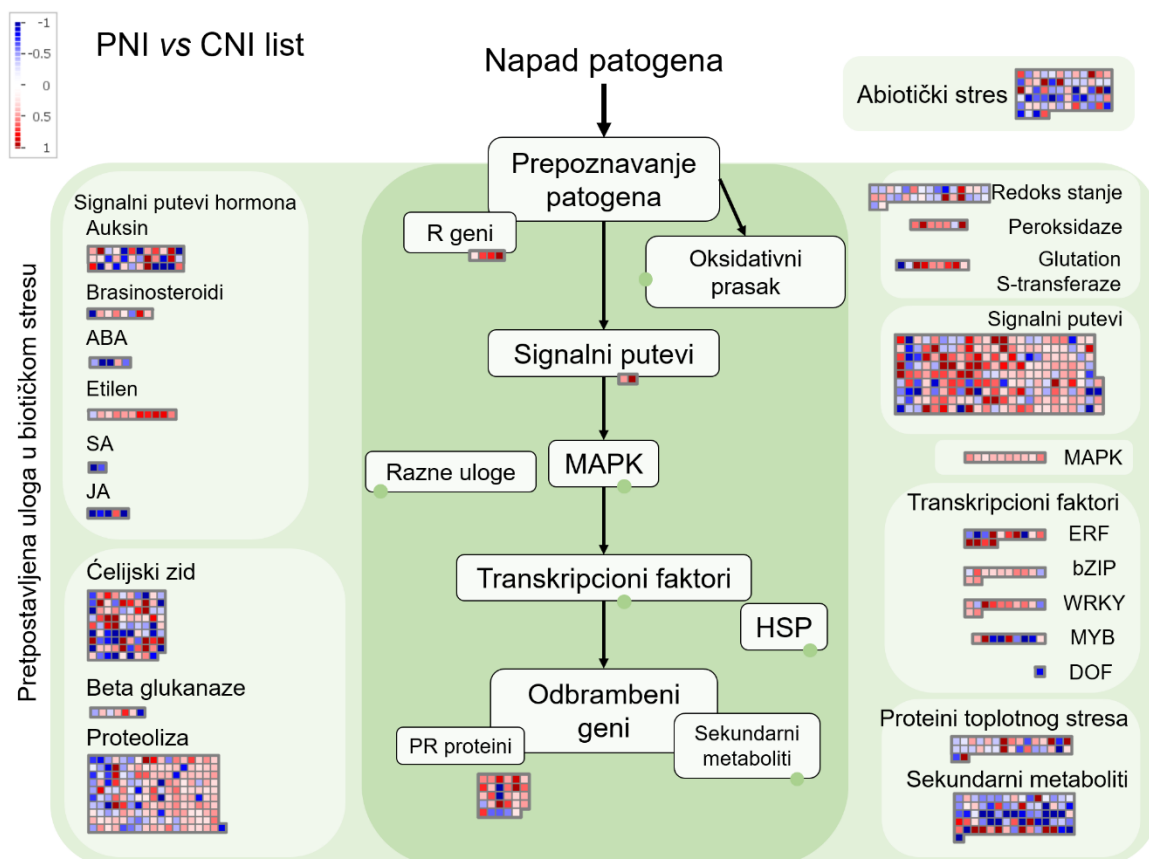
Analizom transkriptoma korena pokazano je da *P. phytofirmans* PsJN značajno povećava transkripciju gena uključenih u fermentacione procese koji koriste piruvat kao supstrat. Ovi geni su *PDC2* (piruvat dekarboksilaza), *LDH1* (laktat dehidrogenaza) i *AlaAT1* (alanin aminotransferaza). Detektovan je i porast ekspresije drugih gena koji su uključeni u toleranciju biljaka na smanjeno prisustvo kiseonika, kao što su *GDH1* i *GDH2* koji kodiraju glutamat dehidrogenazu, *SUS1* i *SUS4* (sintaze saharoze) *FBA6* (fruktoza-1,6-bisfosfat aldolaza 6) i *GLY17* (glikozilaza I) (slika 4.8).

4.3.2. *P. phytofirmans* PsJN moduliše ekspresiju gena *A. thaliana* povezanih sa biotičkim stresom

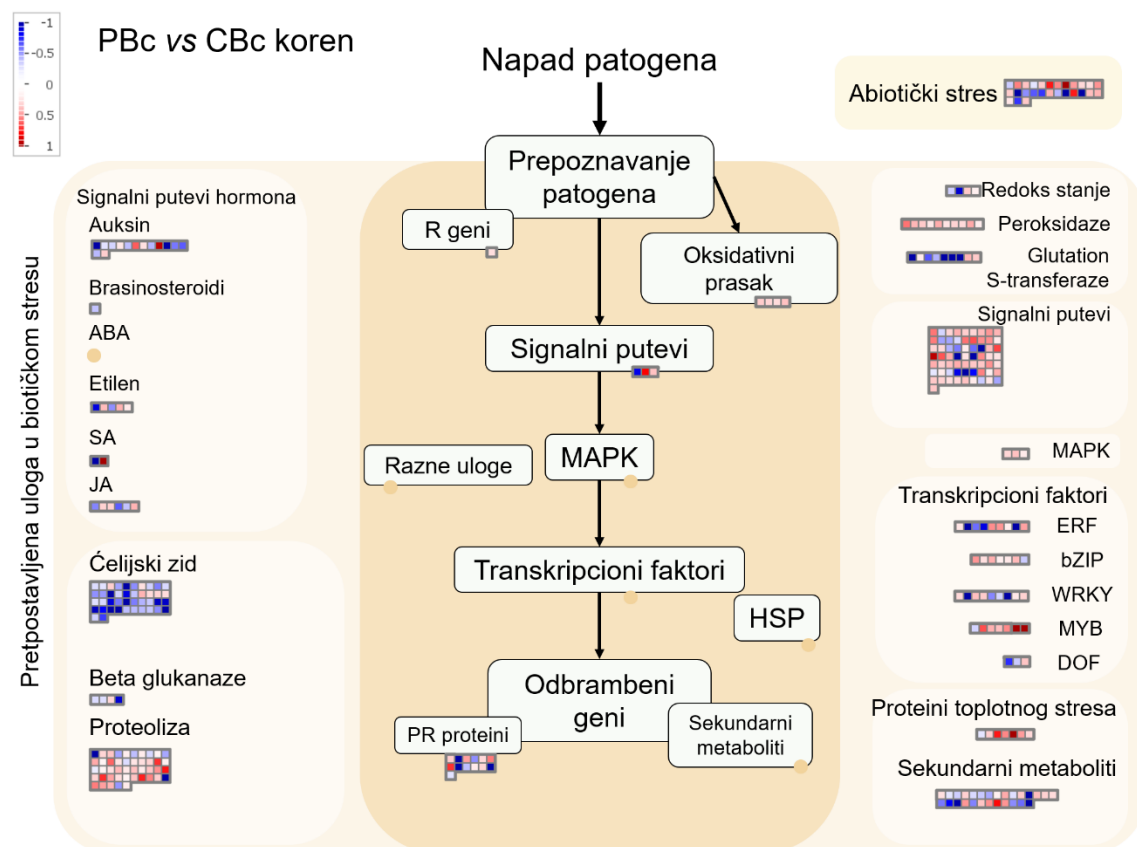
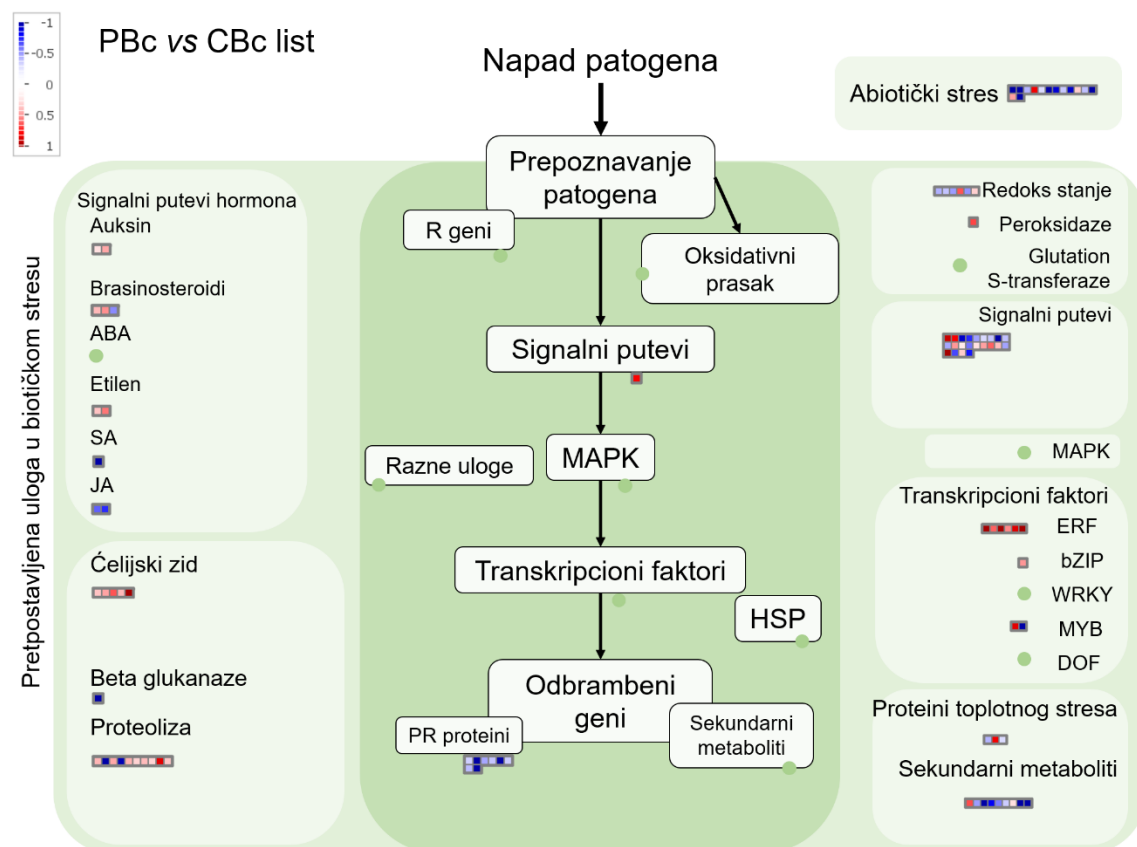
Koristeći MapMan softver (Thimm *et al.*, 2004) kreiran je vizuelni pregled promena u ekspresiji gena u putevima uključenim u biotički stres koje su indukovane prisustvom *P. phytofirmans* PsJN. Kao što je prikazano na slikama 4.9 i 4.10, uticaj *P. phytofirmans* PsJN na transkripciju gena u *A. thaliana* bio je znatno izraženiji pre infekcije *B. cinerea* (slika 4.9) nego 24 sata nakon infekcije (slika 4.10). Tabele u kojima su prikazane promene u ekspresiji gena, koje su korišćene za MapMan prikaz nalaze se u *supplementary materials* (*supplementary tables* S2, S3, S4, S5) rada *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN triggers local and systemic transcriptional reprogramming in *Arabidopsis thaliana* and increases resistance against *Botrytis cinerea* (Nešić *et al.*, 2025).

Najizraženije promene na transkripcionom nivou pre infekcije uočene su kod gena uključenih u signalne puteve odgovora na sredinske stimuluse i stres, proteolizu i modifikacije ćelijskog zida (slika 4.9). U korenu ekspresija većine gena signalnih puteva (poput E3 ubikvitin-protein ligaza i različitih proteaza) je bila smanjena u prisustvu *P. phytofirmans* PsJN, dok se u listovima uočava suprotan efekat. Prisustvo soja *P. phytofirmans* PsJN je uticalo na ekspresiju transkripcionih faktora iz familije ERF, bZIP (eng. *Basic Leucine Zipper*), WRKY (eng. *WRKY DNA-binding Protein*), MYB (eng. *Myeloblastosis-related Protein*) i DOF (eng. *DNA-binding with One Finger*), kao i gena uključenih u signalne puteve fitohormona. U listovima se primećuje tendencija povećane ekspresije gena iz puta etilena, slično kao za ERF faktore, dok je u korenu ekspresija gena za regulaciju etilena bila različito izmenjena. U listovima je zabeleženo i povećanje i smanjenje ekspresije gena za ćelijski zid, a u korenu je pretežno smanjena ekspresija ovih gena. Pokazano je da *P. phytofirmans* PsJN snažno utiče na ekspresiju gena uključenih u proteolizu u korenu i listovima, pri čemu je efekat izraženiji u korenu. *PR* geni (eng. *Pathogenesis-Related Genes*) i *R* geni (eng. *Resistance genes*) bili su uglavnom sa smanjenom ekspresijom u korenovima inokulisanih biljaka, dok je u listovima istih biljaka zabeležena povećana ekspresija ovih gena.

Iako je znatno manji broj gena sa diferencijalnom ekspresijom pod uticajem *P. phytofirmans* PsJN 24 sata nakon infekcije sa *B. cinerea*, i dalje se primećuje stimulacija ERF transkripcionih faktora u listovima (slika 4.10). Iako je zahvaćen manji broj gena za ćelijski zid, u korenu je nivo njihove ekspresije smanjen, dok je kod nekih gena zabeleženo povećanje ekspresije u listovima.



Slika 4.9. MapMan prikaz diferencijalne ekspresije gena u korenu i listovima *A. thaliana* kao odgovor na *P. phytofirmans* PsJN, pre infekcije gljivom *B. cinerea*. Zeleni panel – listovi, Bež panel - koren.



Slika 4.10. MapMan prikaz diferencijalne ekspresije gena čija u korenu i listovima *A. thaliana* kao odgovor na *P. phytofirmans* PsJN, 24 sata nakon infekcije gljivom *B. cinerea*. Zeleni panel – listovi, Bež panel - koren.

4.4. Analiza malih RNK *A. thaliana* nakon inokulacije sojem *P. phytofirmans* PsJN i infekcije patogenom *B. cinerea*

U cilju ispitivanja uticaja inokulacije sojem *P. phytofirmans* PsJN na ekspresiju miRNK *A. thaliana* gajenog u hidroponici i tokom infekcije gljivom *B. cinerea*, urađeno je sekvenciranje malih RNK iz listova i korena u sva 4 tretmana. Svaka biblioteka dala je prosečno 30 miliona prečišćenih sekvenci, od kojih je 19,2 miliona bilo dužine od 18 do 30 nukleotida. Identifikovane male RNK klasifikovane kao mikro RNK (miRNK) su dalje analizirane.

4.4.1. Obrasci ekspresije miRNK pod uticajem inokulacije sojem *P. phytofirmans* PsJN

Inokulacija sojem *P. phytofirmans* PsJN ne menja značajno ekspresiju miRNK kod analiziranih biljaka, bez obzira na prisustvo ili odsustvo infekcije. U neinficiranim listovima samo je jedna miRNK (ath-miR8183) imala statistički značajno povećanje ekspresije i to 4 puta (tabela 4.1). Predikovani targeti ove miRNK učestvuju u degradaciji proteina i sintezi DNK. U korenovima neinficiranih biljaka, inokulisanih sa *P. phytofirmans* PsJN, nije bilo značajnih promena u ekspresiji miRNK.

Tabela 4.1. Analiza ekspresije miRNK kao odgovor na prisustvo *P. phytofirmans* PsJN u neinficiranim biljkama (Poređenje PNI sa CNI tretmanom)

PNI vs CNI	miRNK	Fold Change	Predviđeni targeti	Putevi
list	ath-miR8183	4.08	<i>AT5G06700</i> , <i>IPK2BETA</i> , <i>AT1G32120</i> , <i>UBP17</i> , <i>AT5G11350</i> , <i>AT5G01160</i> , <i>SBT1.3</i> , <i>AT2G29370</i>	• Degradacija proteina, • Sintaza DNK
koren			N/A	

Tokom infekcije gljivom *B. cinerea*, prisustvo *P. phytofirmans* PsJN je dovelo do promene ekspresije samo dve miRNK u listovima – ath-miR163 i ath-miR845a (tabela 4.2). Obe miRNK su imale smanjenu ekspresiju. Predviđeni targeti ovih miRNK su uključeni u metabolizam fitohormona (naročito salicilne kiseline), sintezu DNK, posttranslacione modifikacije i ćelijsku deobu. U korenu je ath-miR161.1 imala povećanu ekspresiju, dok su ath-miR158a-3p i ath-miR159c imale smanjenu ekspresiju. Targeti ovih miRNK su povezani sa regulacijom transkripcije.

Tabela 4.2. Ekspresija miRNK tokom odgovora na prisustvo *P. phytofirmans* PsJN u zaraženim biljkama – Poređenje PBc sa CBc tretmanom.

PBc vs CBc	miRNK	Fold Change	Predviđeni targeti	Putevi
list	ath-miR163	0,66	<i>AT5G38100, PXMT1, ZYP1a, AT1G66690, AT3G44840, FDM1, AT1G66720, AT3G44870, FAMT, AT1G66710, AT5G38096</i>	● Metabolizam hormona, ● Sinteza DNK, ● Posttranslacione modifikacije proteina, ● Čelijska deoba
	ath-miR845a	0,44	<i>MIR829, AT3G03995</i>	
koren	ath-miR158a-3p	0,7	<i>EXO70E2, BUB3.2, FUT2, AT1G12615, FT1, AT3G03580, AT1G64100, AT1G09040, DAG2, Phox4, AT5MAT, AT4G38350, AT4G17565, ACR4, BGLU10, AT1G62860</i>	● Regulacija transkripcije
	ath-miR159c	0,57	<i>MYB120, RER1B, MYB65, MYB33, AT2G34010, MYB104, ACS8, MYB97, DUO1, MYB101, SPL</i>	
	ath-miR161.1	1,42	<i>AT1G63400, AT1G63630, AT1G63080, MIR161, AT1G63230, AT1G63130, AT1G63150, AT1G64583, AT2G16880, AT1G06580, AT5G41170, AT5G16640, RPF3, AT1G62910, AT1G62860, PGR3, RPF2</i>	

4.4.2. Promene u ekspresiji miRNK pod uticajem infekcije patogenom *B. cinerea*, u odsustvu *P. phytofirmans* PsJN

Kako bismo stekli uvid u promene u obrascu ekspresije miRNK indukovane infekcijom *B. cinerea*, nezavisno od inokulacije sojem *P. phytofirmans* PsJN, poredili smo miRNK eksprimirane u biljkama inficiranim ovim patogenom (CBc) u odnosu na neinficirane biljke (CNI). U ovom poređenju je u listovima detektovano dvadeset miRNK koje su diferencijalno eksprimirane sa statističkom značajnošću (tabela 4.3). Od analiziranih miRNK deset su imale povećanu ekspresiju, dok je deset miRNK imalo smanjenu ekspresiju. Pet miRNK sa povećanom ekspresijom (ath-miR157a-3p, ath-miR161.2, ath-miR168b-3p, ath-miR169f-3p i ath-miR858b) i pet miRNK sa smanjenom ekspresijom (ath-miR161.1, ath-miR1888a, ath-miR5020b, ath-miR5634 i ath-miR863-5p) su imale više od dva puta promenjen nivo ekspresije u odnosu na kontrolne biljke. ath-miR858b, je čak bila osam puta više eksprimirana u odnosu na kontrolu.

U korenu je značajno diferencijano eksprimirana samo jedna miRNK (ath-miR398b-5p). Ekspresija ove miRNK je bila 77 puta smanjena u poređenju sa kontrolom.

Tabela 4.3. Analiza ekspresije miRNK tokom odgovora na infekciju gljivom *B. cinerea* – Poređenje CBc sa CNI tretmanom

CBc vs CNI	miRNK	Fold Change	Predikovani targeti	Putevi
list	ath-miR157a-3p	2,78	<i>AT4G40000, SSI2, NET1A, OHP2</i>	● Regulacija transkripcije i sinteze proteina, ● Razviće, ● Odgovor na stres, ● Obrada RNK, ● Biogeneza ćelijskog zida i organizacija biogeneze ćelijskih komponenti i fenilpropanoidnog metaboličkog procesa.
	ath-miR158b	1,76	<i>DAG2, EXO70E2, BUB3.2, FUT2, AT1G22490, AT1G12615, FT1, AT3G03580, AT1G64100, AT5G37072, AT4G38350, AT1G62860</i>	
	ath-miR161.1	0,49	<i>AT1G63400, AT1G63630, AT1G63080, MIR161, AT1G63230, AT1G63130, AT1G63150, AT1G64583, AT2G16880, AT1G06580, AT5G41170, AT5G16640, RPF3, AT1G62910, AT1G62860, PGR3, RPF2</i>	
	ath-miR161.2	4,05	<i>AT1G63400, AT5G65560, AT1G63630, AT1G63230, AT5G55840, AT1G64583, EMB2654, AT4G26800, AT5G16640, AT5G41170, RPF3, AT1G62910, AT1G63070, AT1G61180, AT3G16710, AT1G63080, AT1G62590, MIR161, AT1G63130, TTL2, AT1G63330, AT1G64100, AT1G62914, RPF2</i>	
	ath-miR166a-5p	0,5	<i>N/A</i>	
	ath-miR167c-3p	1,9	<i>MIR167d, MIR167a, MIR167b</i>	
	ath-miR168a-3p	1,59	<i>AT5G07140, AT5G17780, AT3G07195</i>	
	ath-miR168b-3p	2,11	<i>JMJ14, CYP714A1, AT5G39350</i>	
	ath-miR169f-3p	3,23	<i>AT1G73710, AT1G13470</i>	
	ath-miR169g-3p	0,52	<i>MIR169f, MIR169b, AT1G24560, MIR169g, MIR169c</i>	
	ath-miR170-5p	0,6	<i>AT2G06790</i>	
	ath-miR188a	0,24	<i>MIR188a, IBS1, AT1G76110, MIR188b, AT2G35658, AT2G41770, AT1G18090, AT1G35740, GLIP7, AT1G28620, CYP76C6</i>	
	ath-miR319c	0,59	<i>ALDH22A1, SUT4, MYB65, TCP4, TCP10, MYB33, AT5G67090, MIR319c, AT3G06450, MYB104</i>	
	ath-miR390a-3p	1,87	<i>MIR390a, MIR390b, VPS11</i>	
	ath-miR3932b-5p	0,51	<i>AT4G06608, AT1G33910, AT4G33080, AT2G14070, AT5G41840</i>	
	ath-miR396b-5p	1,67	<i>ASG4, ACHT5, AT2G34530, AT1G75295, RD21B, LSU2, AT3G01790, UGT73C7, ACI1, AT3G19400, FLU, AT1G23880, PPR40, HAF2, RNEE/G, AT2G35040, RAP2.12, AT1G05030, BIO1, AT1G23600, PUB23, AT5G58980, AT5G41100, AT4G27595, AT1G80060, MIR396b, MIR396a, ACS9</i>	
	ath-miR5020b	0,3	<i>ARPC3, PIL5, MIR832, AT2G26882, AT4G19191</i>	
	ath-miR5634	0,34	<i>AT5G52010, AT3G22660, MIR5634, AL7, AT5G67130, AT4G30760, AT1G74220, AT4G21950, VCS, AT4G30750, AT5G10630, AT4G17950</i>	
koren	ath-miR858b	8,27	<i>MYB65, MYB80, MYB12, MYB83, MYB20, MYB104, MYB111, MYB13, TT2, MYB40, MYB37, MYB42, MYBL2, CLC-B, MYB63, MYB93, MYB84</i>	● Regulacija transkripcije, transporta i signalizacije
	ath-miR863-5p	0,5	<i>AT5G45570, MCM3, CID3, AT1G74840, AT3G32966, IMPA-7, AT5G56350, MIR863, AT1G28630, AT5G49430, AT4G08430, AT5G28810, ATH13</i>	
	ath-miR398b-5p	0,01	<i>PGM, NCRK, AT3G09720, AT2G04090, CP29, AT5G14550, AT2G04070, AT2G04100, AT1G20910, AT5G37910, APD1</i>	

Predikovani targeti miRNK koji su diferencijalno eksprimirani nakon infekcije patogenom *B. cinerea*, uglavnom su uključeni u regulaciju transkripcije i sintezu i degradaciju proteina. Predikovani targeti su takođe uključeni u razvoj, odgovore na stres, obradu RNK, biogenezu i organizaciju ćelijskog zida, regulaciju biogeneze ćelijskih komponenti, i uključeni u metabolizam fenilpropanoida. Targeti ath-miR398b-5p, čija je ekspresija drastično smanjena u korenu, uglavnom su uključeni u regulaciju RNK, transkripciju, transport i signalne puteve.

4.4.3. Promene ekspresije miRNK pod uticajem infekcije patogenom *B. cinerea*, u biljkama inokulisanim sojem *P. phytofirmans* PsJN

Infekcija patogenom *B. cinerea* je takođe uticala na ekspresiju miRNK u biljkama koje su prethodno inokulisane sojem *P. phytofirmans* PsJN (PBC vs PNI). U listovima je oko dvadeset miRNK bilo različito eksprimirano, dok u korenu nije bilo miRNK sa značajnim promenama u ekspresiji (tabela 4.4). Jedna miRNK, ath-miR398b-5p, je imala čak osam puta veću ekspresiju. Uočeno je smanjenje ekspresije ath-miR157a-3p, ath-miR161.2, ath-miR167c-3p, ath-miR169f-3p, ath-miR824-5p, ath-miR5020b, ath-miR5634 i ath-miR8183 dva puta u biljkama koje su inficirane gljivom *B. cinerea* u odnosu na neinficirane biljke, inokulisane sojem *P. phytofirmans* PsJN. Predviđeni targeti miRNK čija je ekspresija izmenjena kao odgovor na infekciju uključeni su u signalne puteve, odbranu od patogena, regulaciju transkripcije, proteolizu i sintezu hemiceluloze.

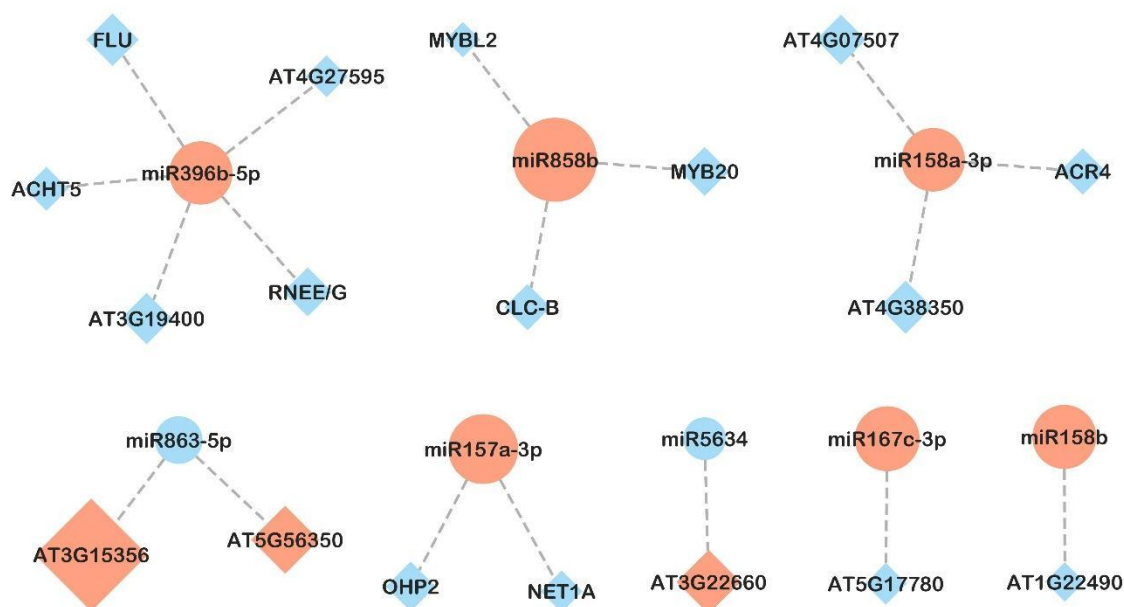
Tabela 4.4. Analiza ekspresije miRNK tokom odgovora na infekciju patogenom *B. cinerea* u *P. phytofirmans* PsJN–inokulisanim biljkama – Poređenje PBc sa PNI tretmanom.

PBc vs PNI	miRNK	Fold Change	Predikovani targeti	Putevi
list	ath-miR157a-3p	2,31	<i>AT4G40000, SSI2, NET1A, OHP2</i>	● Signalni putevi, ● Odbrana, ● Regulacija transkripcije, ● Proteoliza, i sinteza hemiceluloze.
	ath-miR158a-3p	1,46	<i>EXO70E2, BUB3.2, FUT2, AT1G12615, FT1, AT3G03580, AT1G64100, AT1G09040, DAG2, Phox4, AT5MAT, AT4G38350, AT4G17565, ACR4, BGLU10, AT1G62860</i>	
	ath-miR158a-5p	1,69	<i>AT1G19390, AT1G48745, AT1G63610, AT5G27395, AT3G47580, AT4G26120, AT5G22080, AT5G63490, SEC15A, SYP51, PAR2, TPPG</i>	
	ath-miR161.1	0,68	<i>AT1G63400, AT1G63630, AT1G63080, MIR161, AT1G63230, AT1G63130, AT1G63150, AT1G64583, AT2G16880, AT1G06580, AT5G41170, AT5G16640, RPF3, AT1G62910, AT1G62860, PGR3, RPF2</i>	
	ath-miR161.2	3,53	<i>AT1G63400, AT5G65560, AT1G63630, AT1G63230, AT5G55840, AT1G64583, EMB2654, AT4G26800, AT5G16640, AT5G41170, RPF3, AT1G62910, AT1G63070, AT1G61180, AT3G16710, AT1G63080, AT1G62590, MIR161, AT1G63130, TTL2, AT1G63330, AT1G64100, AT1G62914, AT1G63150, AT1G06580, AT2G25570, AT2G25565, AT1G62860, RPF2</i>	
	ath-miR166a-5p	0,53	<i>N/A</i>	
	ath-miR167c-3p	2,19	<i>MIR167d, MIR167a, MIR167b</i>	
	ath-miR168a-5p	1,46	<i>AGO1</i>	
	ath-miR168b-3p	1,92	<i>JMJ14, CYP714A1, AT5G39350</i>	
	ath-miR169f-3p	2,09	<i>AT1G73710, AT1G13470</i>	
	ath-miR319c	0,57	<i>ALDH22A1, SUT4, MYB65, TCP4, TCP10, MYB33, AT5G67090, MIR319c, AT3G06450, MYB104</i>	
	ath-miR398b-5p	8,1	<i>PGM, NCRK, AT3G09720, AT2G04090, CP29, AT5G14550, AT2G04070, AT2G04100, AT1G20910, AT5G37910, APD1</i>	
	ath-miR5020b	0,38	<i>ARPC3, PIL5, MIR832, AT2G26882, AT4G19191</i>	
	ath-miR5634	0,45	<i>AT5G52010, AT3G22660, MIR5634, AL7, AT5G67130, AT4G30760, AT1G74220, AT4G21950, VCS, AT4G30750, AT5G10630, AT4G17950</i>	
	ath-miR5659	0,52	<i>MIR5659</i>	
	ath-miR8183	0,31	<i>AT5G06700, IPK2BETA, AT1G32120, UBP17, AT5G11350, AT5G01160, SBT1.3, AT2G29370</i>	
	ath-miR822-3p	0,53	<i>AT5G55770, MIR822, AT5G55780, AT3G19810, AT2G13900, AT1G66450, AT4G10370, AT2G02620, AT5G02330, AT5G02350, AT3G10840, AT1G66440, AT1G44020</i>	
	ath-miR824-5p	4,35	<i>AT3G05470, AT3G52535, AT4G28000, AT4G24413, AGL16, MIR824</i>	
	ath-miR845a	0,54	<i>MIR829, AT3G03995</i>	
	ath-miR866-3p	0,56	<i>ARF2, AT5G64640, AT1G09680, ALY2, GPDHC1, CHX20, AT5G38130, AT4G10730, VSR7, AT3G57730, AT4G38010, XI-I, CRK28, AT3G43240, AT5G52650, AT1G20230, AT2G22070, AT5G11960, AT2G33280, GSL1, AT2G43465, AT1G24310, AT5G18370, AT1G07203, AT3G15010, AT1G57835, AT4G33600, SBT3.12</i>	
koren	N/A			

4.5. Analiza ko-ekspresije miRNK *A. thaliana* i njihovih predikovanih targeta

Da bismo istražili korelaciju ekspresije miRNK i njihovih predikovanih target gena, sprovedena je integrativna analiza podataka transkriptoma i sekvenci malih RNK molekula. Predikovano je ukupno 487 targeta za sve diferencijalno eksprimirane miRNK koje su identifikovane u ovom istraživanju. Većina miRNK ima više targeta, a u ovom istraživanju su uočene i pozitivne i negativne interakcije miRNK-iRNK parova. Na primer, pokazano je da ath-miR396b-5p ima povećanu ekspresiju u inficiranim listovima. Od svojih osam targeta, pet su sa smanjenom ekspresijom, dok su ostala tri sa povećanom ekspresijom.

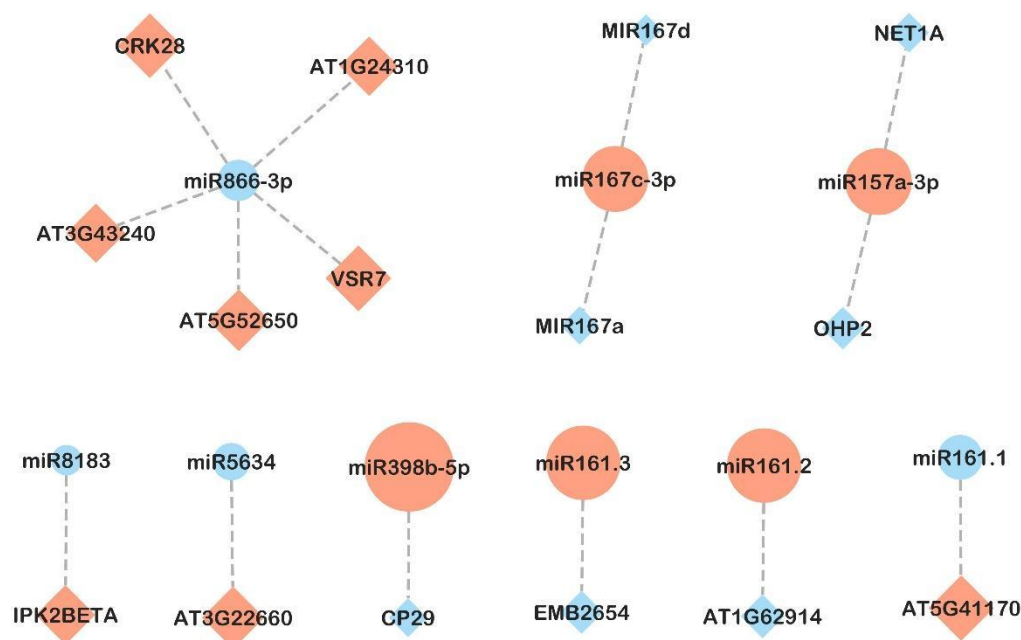
U listovima, od 108 ispitivanih miRNK-iRNK parova, 30 je pokazalo suprotne obrasce ekspresije gena i svi pripadaju grupi koja je detektovana u odgovoru na infekciju patogenom *B. cinerea* (poređenje tretmana CBc vs CNI, i PBc vs PNI, slike 4.11 i 4.12). U oba poređenja povećana ekspresija ath-miR157a-3p je povezana sa smanjenom ekspresijom dva ciljna gena: *NET1* (eng. *KIP1-like protein MYB-related*) i *OHP2* (eng. *ONE-HELIX PROTEIN 2*). U poređenju CBc vs CNI (slika 4.11), ath-miR168a-3p i njen target *BDG4* (eng. *lysophospholipase BODYGUARD 4*) imali su obrnuti obrazac ekspresije. Integrativna analiza je takođe otkrila suprotne promene u ekspresiji nekih miRNK i transkripcionih faktora koji su predikovani kao njihovi targeti. Ath-miR858b je imala povećanu ekspresiju tokom infekcije, dok su njeni targeti koji pripadaju familiji MYB transkripcionih faktora imali smanjenu ekspresiju. Obrnut obrazac ekspresije je takođe primećen između ath-miR158b i njenog predikovanog ciljnog gena *bHLH94* (eng. *basic Helix-Loop-Helix*).



Slika 4.11. miRNK-iRNK mreža u listovima kao odgovor na infekciju patogenom *B. cinerea* (poređenje CBc vs CNI). Parovi uključuju 8 miRNK sa diferencijalno izmenjenom ekspresijom i 18 diferencijalno eksprimiranih iRNK integrisanih u mrežu. Kvadrati predstavljaju iRNK. Krugovi predstavljaju miRNK. RNK čija je ekspresija povećana su obeležene narandžastom bojom, dok su RNK sa smanjenom ekspresijom obeležene plavom bojom. Dimenzije kvadrata ili krugova odgovaraju veličini promene ekspresije. Prikazani su samo parovi sa obrnutim obrascem ekspresije.

Što se tiče odgovora na infekciju gljivom *B. cinerea* u biljkama inokulisanim sojem *P. phytofirmans* PsJN (PBc vs PNI, slika 4.12), obrnut obrazac ekspresije pokazali su ath-miR161.1 i

ath-miR161.2 i članovi superfamilije proteina sa pentatrikopeptidnim ponovcima (PPR-slični). Od šest predikovanih targeta ath-miR398b-5p, samo je *CP29A* (eng. *chloroplast RNA-binding protein 29*) imao obrnut obrazac ekspresije. Ostali miRNK-iRNK parovi sa obrnutim obrascem ekspresije uključuju ath-miR5634 i *EBP2* (eng. *rRNA-processing protein*), kao i ath-miR8183 i *Ipk2β* (eng. *inositol polyphosphate kinase 2 beta*). Detektovana je i negativna korelacija između ekspresije ath-miR866-3p i *CPK28* gena, koji je povezan sa antifungalnom odbranom.



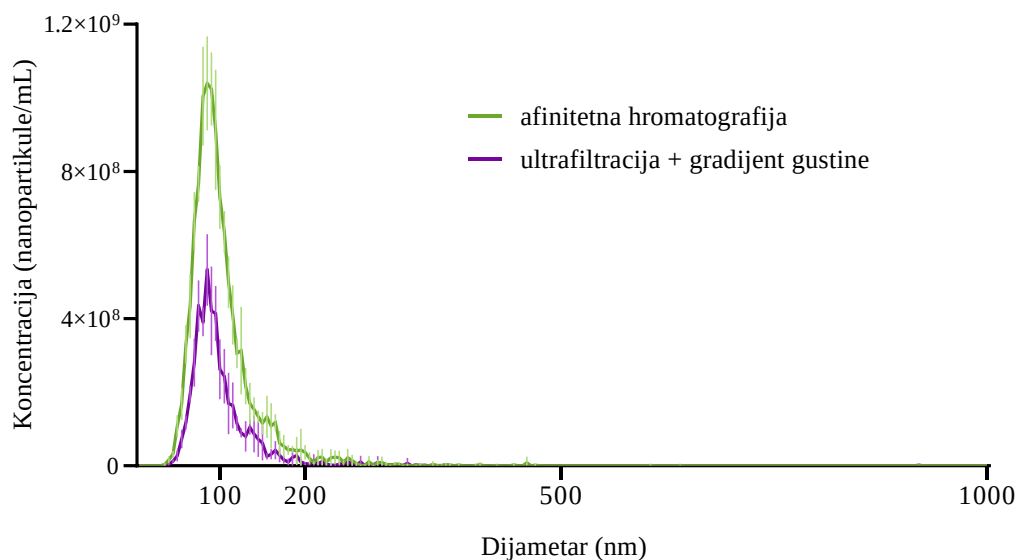
Slika 4.12. miRNK-iRNK mreža u listovima kao odgovor na infekciju patogenom *B. cinerea* (poređenje PBc vs PNI). Parovi uključuju 9 miRNK diferencijalno izmenjene ekspresije i 15 diferencijalno eksprimiranih iRNK integriranih u mrežu. Kvadrati predstavljaju iRNK, a krugovi miRNK. RNK čija je ekspresija povećana su obeležene narandžastom bojom, dok su RNK sa smanjenom ekspresijom obeležene plavom bojom. Dimenzije kvadrata ili krugova odgovaraju veličini promene ekspresije. Prikazani su samo parovi sa obrnutim obrascem ekspresije.

4.6. Karakterizacija ekstracelularnih vezikula soja *P. phytofirmans* PsJN i interakcija sa korenom *A. thaliana*

U okviru ove teze su po prvi put okarakterisane OMV korisne bakterije *P. phytofirmans* PsJN, kao i njihova interakcija sa biljnim ćelijama.

4.6.1. Optimizacija metode za izolovanje OMV soja *P. phytofirmans* PsJN

Izolacija OMV soja *P. phytofirmans* PsJN predstavljala je veliki izazov tokom realizacije ove disertacije. U cilju izbora metode koja daje najveći prinos prečišćenih OMV, testirano je i upoređivano nekoliko metoda koje se koriste za koncentrovanje i prečišćavanje OMV (detaljno opisane u poglavlju Metode). U prvoj metodi koncentrovanje OMV je vršeno ultrafiltracijom, nakon čega su vezikule prečišćavane na gradijentu gustine. Druga metoda se zasnivala na afinitetnoj hromatografiji. Kriterijum za izbor metode je bio prinos OMV iz datog volumena prekonoćne kulture (slika 4.13).



	Koncentracija (nanopartikula/mL)	Prinos iz 100 mL prekonoćne kulture
Afinitetna hromatografija	$1,12 \times 10^{10}$	$6,7 \times 10^9$
Ultrafiltracija + gradijent gustine	$4,71 \times 10^9$	$2,77 \times 10^8$

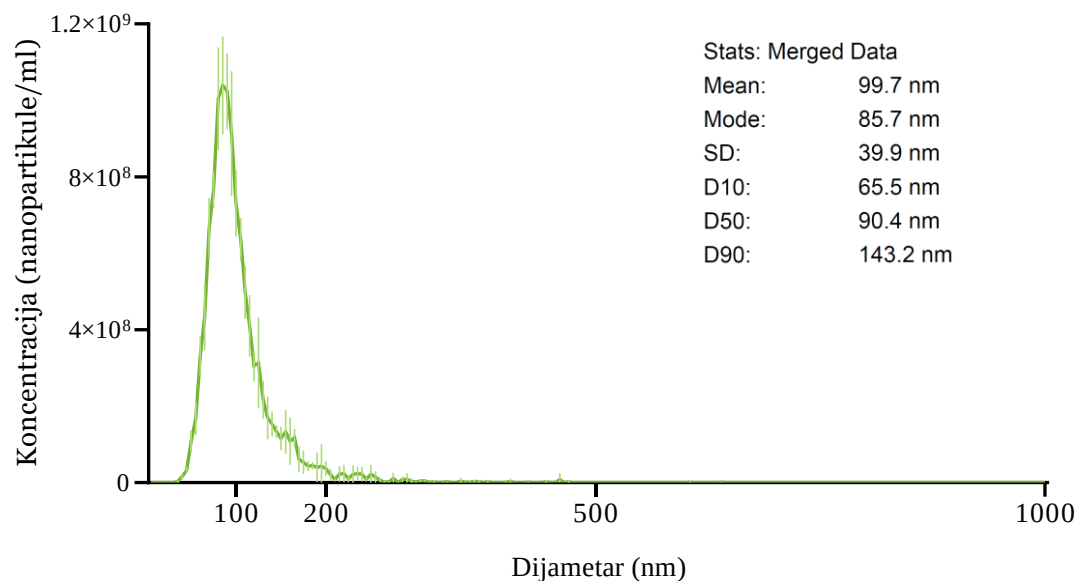
Slika 4.13. Poređenje koncentracije nanopartikula u izolatima OMV soja *P. phytofirmans* PsJN prečišćenih na afinitetnoj hromatografiji (kit ExoBacteria™, zelena kriva) ili ultrafiltracijom i prečišćavanjem centrifugiranjem u gradijentu gustine (ljubičasta kriva). Koncentracija i prinos OMV nakon izolovanja na afinitetnoj hromatografiji ili ultrafiltracijom i prečišćavanjem u gradijentu gustine.

Najveći prinos dobijen je izolovanjem OMV na afinitetnoj hromatografiji (slika 4.13), te je ova metoda korišćena za izolovanje OMV u svim narednim eksperimentima. Afinitetna hromatografija, zahvaljujući specifičnom vezivanju za određene molekule na površini partikula, obezbeđuje i veću čistoću izolata.

Izolovane OMV su okarakterisane različitim metodama koje omogućavaju dobijanje potpunije slike o njihovom poreklu, izgledu, kao i RNK molekulima koje sadrže. Nakon karakterizacije, praćena je interakcija OMV sa biljnim ćelijama.

4.6.2. Karakterizacija OMV soja *P. phytofirmans* PsJN

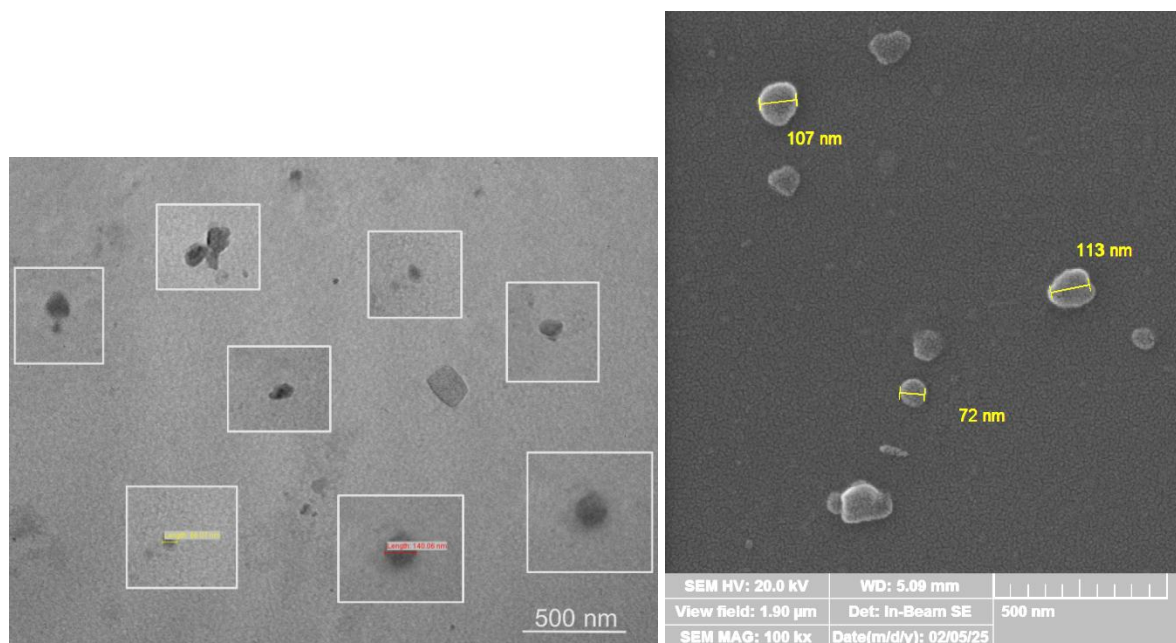
Raspodela veličina, koncentracija i prinos izolovanih vezikula su određeni metodom praćenja čestica - nanopartikula. Dimenzije OMV soja *P. phytofirmans* PsJN kretale su se u opsegu od 50 do 200 nm (slika 4.14).



Slika 4.14. Grafik raspodele veličina nanopartikula u izolatu OMV, određeni analizom praćenja čestica - nanopartikula (NTA – eng. *Nanoparticle Tracking Analysis*).

Konzentracija vezikula *P. phytofirmans* PsJN u izolatima kretala se u opsegu 10^9 - 10^{10} čestica/ml, dok je prinos iz jednolitarske prekonoćne kulture optičke gustine oko 1 iznosio oko 10^{11} nanopartikula.

Veličina OMV, kao i njihov oblik su određeni korišćenjem elektronske mikroskopije (slika 4.15). Na slici 4.15 se može primetiti karakterističan *cup-shaped* oblik vezikula, što potvrđuje prisustvo EV u izolatu. Na elektronskoj mikroskopiji su uočene OMV sličnih dimenzija kao i metodom praćenja nanopartikula.



Slika 4.15. TEM i SEM mikrografije OMV izolovanih iz prekonoćne kulture *P. phytofirmans* PsJN.

Poreklo OMV je potvrđeno korišćenjem eseja za merenje koncentracije lipopolisaharida koji su karakteristični za spoljašnju membranu Gram-negativnih bakterija. Koncentracija lipopolisaharida u izolatima OMV je iznosila 10^6 EU/mL. Opseg koncentracija proteina u izolatima OMV izmerenih

BCA metodom se kretao od 9 do 11 $\mu\text{g/mL}$. Iako se u vezikulama mogu nalaziti različit tipovi biomolekula, predmet proučavanja u ovoj tezi su bile sRNK asocirane sa OMV.

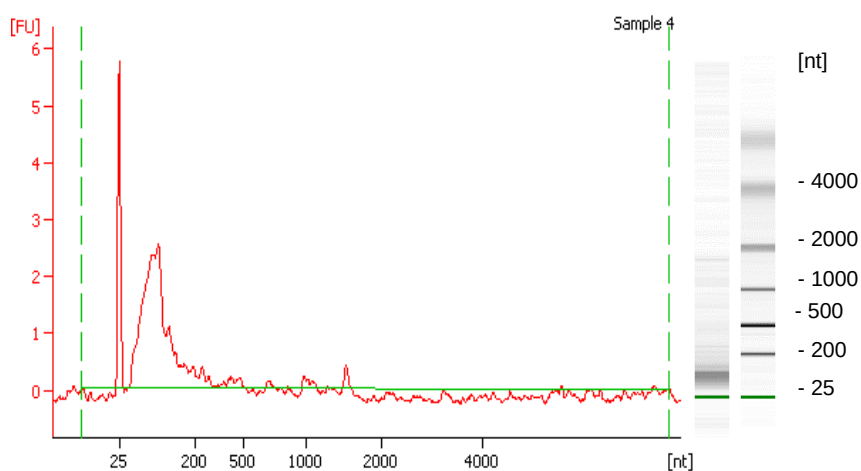
4.6.3. Analiza sRNK asociranih sa OMV

Poznato je da RNK molekuli koji su asocirani sa EV nisu u njih upakovani nasumično već su specifično selektovani za pakovanje u vezikule. EV omogućavaju interakciju sa drugim mikroorganizmima ili domaćinom kroz transport ovih molekula u ćelije domaćina gde utiču na regulaciju ekspresije gena. Rasvetljavanje kriterijuma selekcije RNK molekula koji se pakuju u ekstracelularne vezikule bi omogućilo razumevanje mehanizama koji stoje u osnovi ovih interakcija bakterija sa domaćinom. Analiza sekvenci RNK asociranih sa vezikulama je važan korak ka ovom cilju.

4.6.3.1. Analiza sRNK asociranih sa OMV soja *P. phytofirmans* PsJN

Najveći prinos tokom izolacije RNK asociranih sa OMV soja *P. phytofirmans* PsJN dobijen je korišćenjem komercijalnog kita *EV RNA Isolation Kit* (System Biosciences) koji omogućava izolaciju ukupne EV-RNK uključujući i male RNK. Tokom izolacije RNK urađen je i tretman DNazom na samoj koloni za izolaciju čime se smanjuje gubitak RNK. DNaznim tretmanom uklonjeni su zaostaci DNK, što je neophodan korak u pripremi za sekvenciranje čime se obezbeđuje čitanje sekvenci samo RNK molekula. Koncentracija RNK poreklom iz izolata OMV je bila 3-4 ng/mL.

Raspon dužina RNK asociranih sa OMV soja *P. phytofirmans* PsJN je analiziran pomoću RNK čipa. Uočavaju se RNK dužine do 200 nukleotida (slika 4.16), što je u skladu sa literaturnim podacima o sRNK bakterija.



Slika 4.16. Analiza dužina RNK asociranih sa OMV

Nizak prinos RNK je ograničavajući faktor za njihovo sekvenciranje, ali sa prilagođenom pripremom biblioteka za male količine početnog uzorka, korišćenjem jedinstvenih UMI sekvenci i razdvajanjem uzoraka po dužini, postignuta je bolja pokrivenost RNK tokom sekvenciranja. Uzorci RNK su nakon elektroforeze na gelu podeljeni na osnovu dužine u dva uzorka i skladno tome sekvencirani na različite načine:

1. RNK u opsegu od 18 do 40 nukleotida su sekvencirane SE50 tipom sekvenciranja
2. RNK u opsegu od 40 do 200 nukleotida su sekvencirane PE100 tipom sekvenciranja.

Zajedno sa OMV-sRNK sekvencirani su i uzorci RNK izolovani iz ćelija odvojenih od OMV i urađeno je poređenje njihovih sekvenci (DEG analiza). Tokom izolacije RNK iz ćelija selektovani

su RNK molekuli dužine do 200 nukleotida, a zatim je urađen DNazni tretman. Kako bi se sekvence ovih RNK mogle porediti sa sekvencama sRNK asociranih sa OMV, svi uzorci su prošli iste korake pravljenja biblioteka i sekvenciranja, sa dodatim korakom uklanjanja rRNK. Kako je u ćelijama zastupljenost ribozomalne RNK veoma velika, u izolatima bi, bez obzira na selekciju dužina ispod 200 nt, očekivan je znatan zaostatak rRNK većih dužina. Zato je iz uzoraka unutarćelijske RNK uklonjena rRNK metodom vezivanja rRNK za RNK probe i magnetne kuglice sa streptavidinom.

4.6.3.2. Bioinformatička analiza OMV-sRNK

Bioinformatička analiza je sprovedena korišćenjem alata za kontrolu kvaliteta biblioteka i uklanjanje adaptera, mapiranje na referentni genom, kvantifikaciju i anotaciju, normalizaciju, statističku analizu i diferencijalnu ekspresiju, i funkcionalnu analizu.

4.6.3.2.1. Uporedna analiza pet alata za mapiranje sRNK asociranih sa ekstracelularnim vezikulama bakterija

Kako bi se izabrao najbolji alat za mapiranje i minimizovala pogrešna interpretacija rezultata bilo je potrebno da se uradi uporedna analiza različitih alata za mapiranje malih RNK asociranih sa EV bakterija. Izbor alata za mapiranje određuje koji biotipovi RNK će biti detektovani, a određuje i njihovu zastupljenost, što može dovesti do nepotpunog ili pogrešnog razumevanja njihovih bioloških funkcija.

Na dostupnim sekvencama RNK poreklom iz OMV Gram-negativne bakterije *A. fischeri* urađena je uporedna analiza nekoliko različitih alata za mapiranje RNK na referentni genom kako bi se odredio optimalan alat za mapiranje.

Tokom ove analize poređeni su rezultati mapiranja upotrebom najčešće korišćenih alata:

1. BBmap
2. Bowtie2
3. BWA
4. Minimap2
5. Segemehl.

Analizirano je više ključnih parametara ovih alata kao što je: stopa poravnanja i dodeljivanja, kvalitet mapiranja, pokrivenost, stopa grešaka i, što je najvažnije, broj i tip detektovanih biotipova RNK. Nađene su značajne razlike između korišćenih alata.

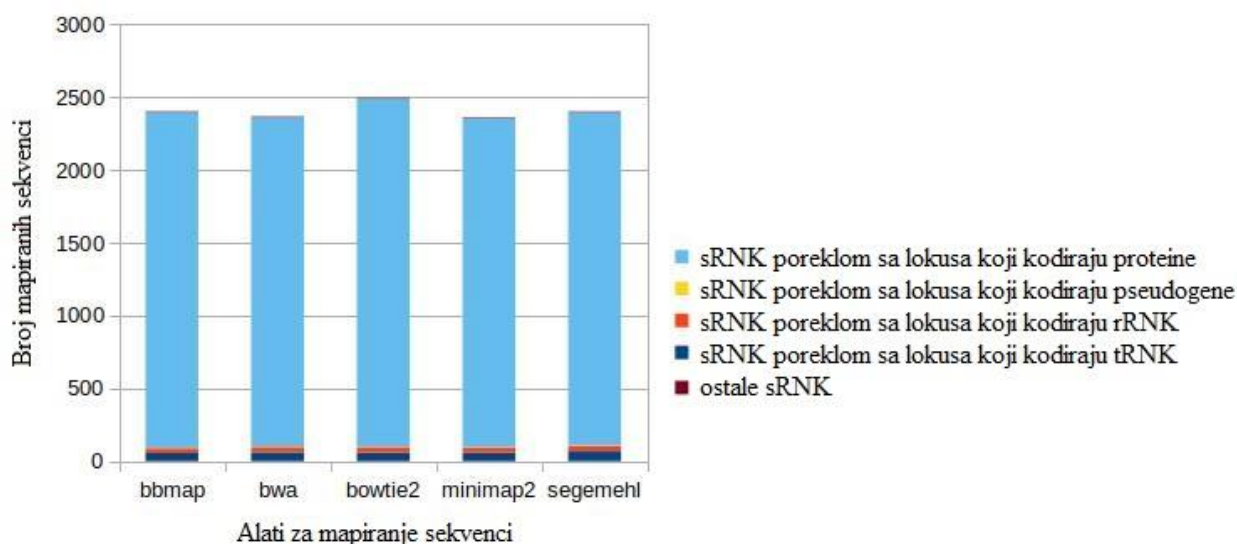
Stope poravnanja (mapiranih sekvenci) i dodeljivanja, kao i vreme obrade, korišćeni su za analizu uticaja svakog alata na mapiranje sekvenci malih RNK asociranih sa OMV *A. fischeri* na referentni genom bakterije.

BBmap je imao najveću stopu poravnanja, ali i statistički značajno veću stopu greške (tabela 4.5). BWA i Minimap2 su imali najbolju pokrivenost, dok je Segemehl bio najsporiji i imao najnižu stopu dodeljivanja zbog visoke zastupljenosti čitanja koja su mapirana na više mesta u referentnom genomu i najniži kvalitet mapiranja.

Tabela 4.5. Pregled srednjih vrednosti parametara izračunatih na osnovu šest uzoraka *A. fischeri* OMV-sRNK, za svaki od pet testiranih alata za poravnanje, poređanih abecednim redom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija. Različita slova u istom redu označavaju statistički značajne razlike na nivou značajnosti $p < 0,05$.

Alati za mapiranje	BBmap	Bowtie2	BWA	Minimap2	Segemehl
Procenat mapiranih sekvenci (%)	99,86 $\pm$ 0,01 ^a	99,80 $\pm$ 0,01 ^a	99,45 $\pm$ 0,04 ^b	99,11 $\pm$ 0,08 ^c	99,65 $\pm$ 0,02 ^d
Procenat mapiranih i uparenih sekvenci (%)	99,73 $\pm$ 0,02 ^a	99,64 $\pm$ 0,03 ^a	98,93 $\pm$ 0,08 ^b	98,29 $\pm$ 0,15 ^c	99,29 $\pm$ 0,03 ^d
Procenat pravilno uparenih sekvenci (%)	99,40 $\pm$ 0,04 ^a	96,49 $\pm$ 0,67 ^b	96,49 $\pm$ 0,57 ^b	96,00 $\pm$ 0,61 ^b	99,26 $\pm$ 0,04 ^a
Procenat dodeljenih sekvenci (%)	97,43 $\pm$ 0,42 ^a	96,27 $\pm$ 0,57 ^b	96,17 $\pm$ 0,52 ^b	95,67 $\pm$ 0,55 ^b	26,30 $\pm$ 0,13 ^c
Vreme obrade (u minutima)	3,00	35,00	5,00	3,00	37,00
Kvalitet mapiranja	40,43 $\pm$ 0,35 ^a	38,53 $\pm$ 0,31 ^b	56,54 $\pm$ 0,38 ^c	56,21 $\pm$ 0,39 ^c	25,90 $\pm$ 0,27 ^d
Pokrivenost	98,37 $\pm$ 7,38 ^a	96,63 $\pm$ 7,31 ^a	96,52 $\pm$ 7,30 ^a	97,29 $\pm$ 2,98 ^a	96,59 $\pm$ 7,31 ^a
Opšta stopa greške (%)	1,89 $\pm$ 0,56 ^a	0,19 $\pm$ 0,01 ^b	0,14 $\pm$ 0,01 ^b	0,13 $\pm$ 0,01 ^b	0,18 $\pm$ 0,01 ^b

Izbor alata je značajno uticao na identifikaciju jedinstvenih biotipova malih RNK, posebno onih koje su poreklom od iRNK, tRNK i rRNK. Bowtie2 je najveći broj jedinstvenih RNK dodelio iRNK biotipu, dok je Minimap2 dodelio najmanje. Segemehl je identifikovao najviše jedinstvenih RNK koje vode poreklo sa tRNK (slika 4.17).



Slika 4.17. Distribucija biotipova malih RNK asociranih sa OMV *A. fischeri* detektovanih pomoću svakog od alata za mapiranje.

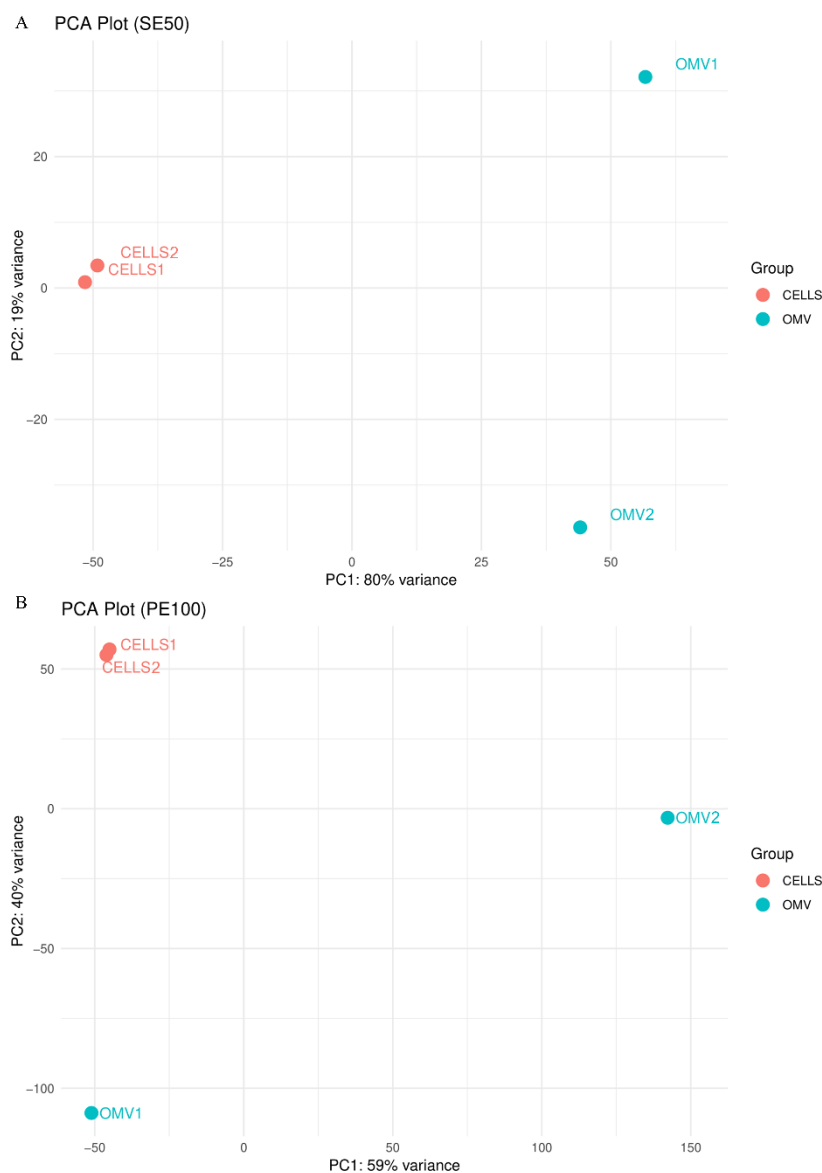
4.6.3.2.2. Bioinformatička analiza OMV-RNK soja *P. phytofirmans* PsJN

Sekvence sRNK-OMV soja *P. phytofirmans* PsJN očitane tokom SE50 i PE100 sekvenciranja su mapirane na referenti genom *P. phytofirmans* PsJN koristeći BWA, Minimap2, BBMap i Bowtie2 alate za mapiranje (tabela 4.6). Bioinformatička analiza je pokazala da je za uzorke OMV-sRNK od *P. phytofirmans* PsJN najbolje koristiti BWA alat za mapiranje jer su ostali korišćeni alati imali dosta niži procenat mapiranih sekvenci (tabela 4.6). Korišćenjem BWA alata mapirano je od 23,08% do 65,27% sekvenci u zavisnosti od uzorka i tipa sekvenciranja, dok su ostali alati imali znatno manji procenat mapiranih sekvenci, od 0,12% do 22,98 % za Minimap2, 10,01% do 57,52 % BBMap i od 10,15% do 36,10 % za Bowtie2. Zbog lošeg procenta mapiranja ostalih alata nije moguće raditi Intersect više mapera kao što je utvrđeno za sekvence OMV poreklom od *A. fischeri*.

Tabela 4.6. Rezultati mapiranja sekvenci uzoraka OMV sa više različitih alata za mapiranje.

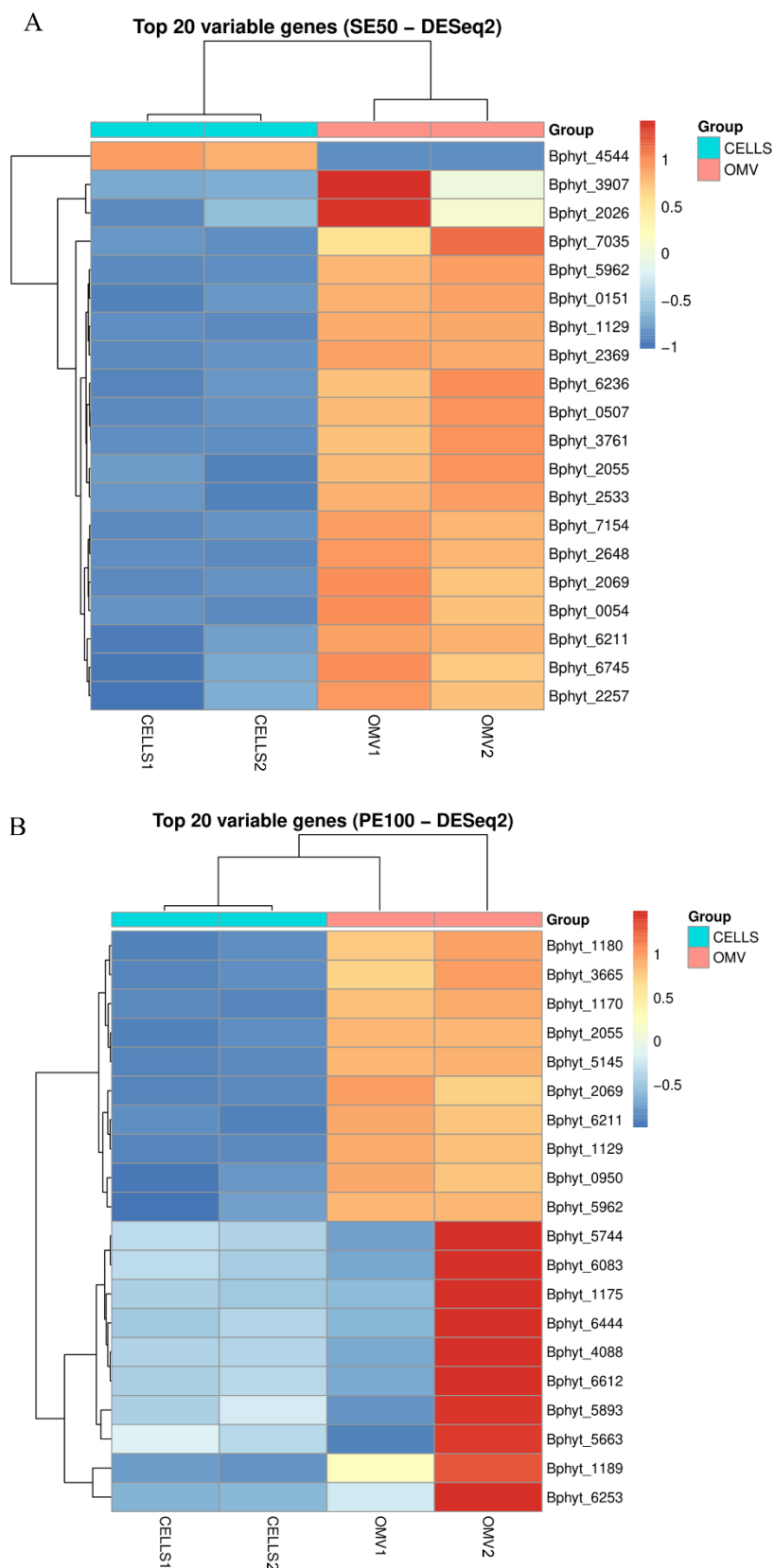
Alat za mapiranje	Uzorak	Ukupan broj sekvenci	Mapirane sekvence	% sekvenci koje su mapirane
BWA	OMV1_SE50	25 244 227	11 960 526	47,38 %
	OMV2_SE50	25 238 770	16 472 108	65,27 %
	OMV1_PE100	86 031 199	19 856 484	23,08 %
	OMV2_PE100	86 111 160	35 372 950	41,08 %
Minimap2	OMV1_SE50	25 244 227	30 886	0,12 %
	OMV2_SE50	25 238 774	98 368	0,39 %
	OMV1_PE100	86 031 517	3 756 674	4,37 %
	OMV2_PE100	86 114 394	19 786 941	22,98 %
BBMap	OMV1_SE50	25 244 215	2 527 023	10,01 %
	OMV2_SE50	25 238 743	4 157 746	16,47 %
	OMV1_PE100	86 031 199	13 789 149	16,03 %
	OMV2_PE100	86 111 160	49 529 069	57,52 %
Bowtie2	OMV1_SE50	25 244 227	2 562 864	10,15 %
	OMV2_SE50	25 238 774	4 567 674	18,10 %
	OMV1_PE100	86 031 199	16 215 082	18,85 %
	OMV2_PE100	86 111 160	31 089 302	36,10 %

Korišćenjem analize glavnih komponenti - PCA (eng. *principal component analysis*) prikazanoj na slici 4.18 može se primetiti grupisanje uzoraka sRNK iz OMV, kao i uzoraka sRNK iz ćelija. Na oba grafika (za SE50 i PE100) može se videti blisko grupisanje CELLS1 i CELLS2 uzoraka što ukazuje na konzistentnost između replika. Uzorci OMV1 i OMV2 SE50 (slika 4.18A) su jasno odvojeni od CELLS grupe uzoraka što se može videti na osi PC1 na grafiku A koja pokazuje 80% varijanse. Kod uzoraka OMV1 i OMV2 PE100 (slika 4.18B) se primećuje udaljenost između uzoraka što ukazuje na veću heterogenost u okviru OMV grupe. Separacija između uzoraka OMV i CELLS za PE100 je jasna, iako postoji varijabilnost u okviru OMV grupe uzoraka.



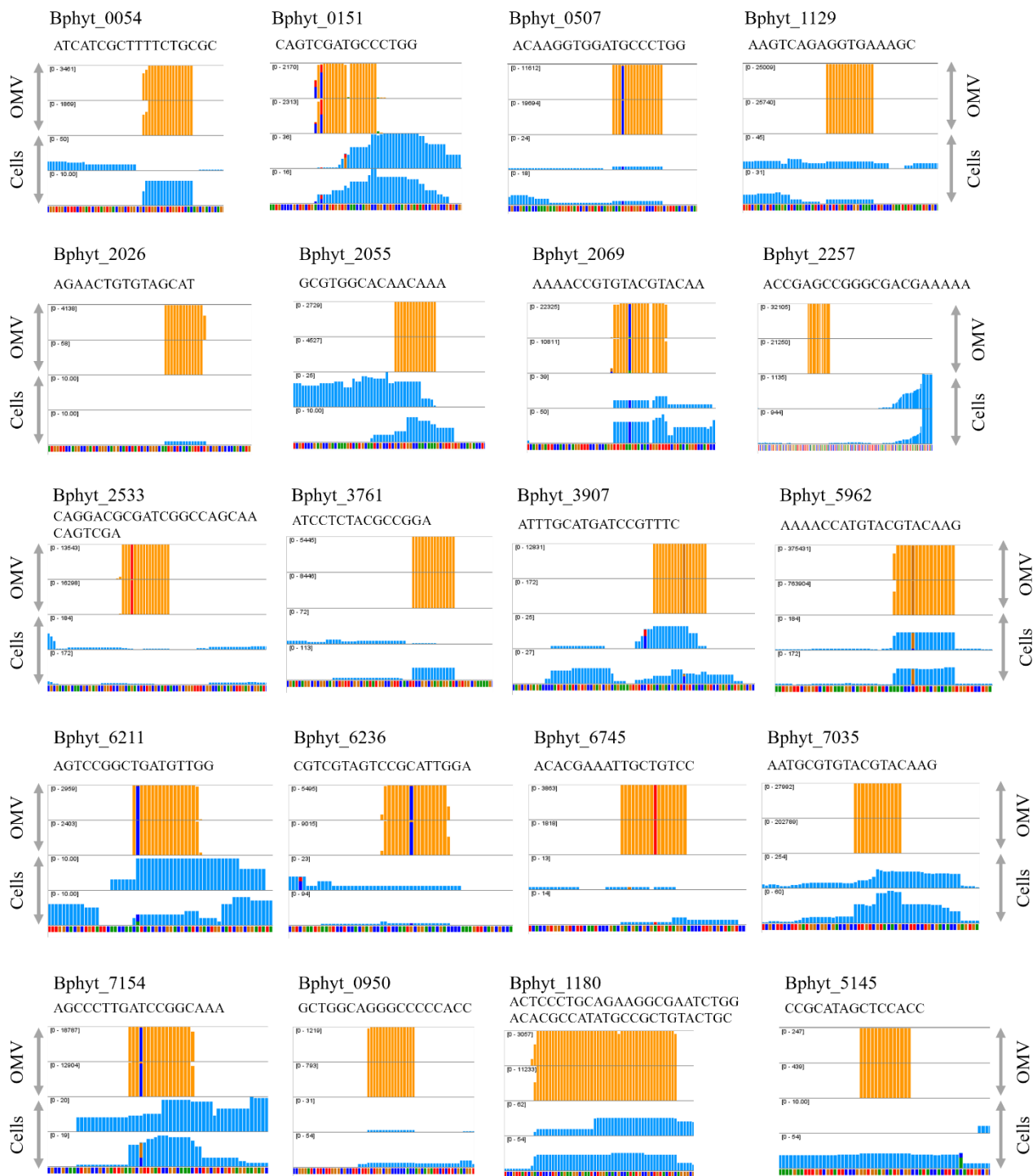
Slika 4.18. Analiza glavnih komponenti uzoraka sRNK iz OMV i ćelija *P. phytofirmans* PsJN kod A) SE50 i B) PE100 sekvenciranja.

Toplotne mape sa po 20 lokusa sa najvećom varijabilnošću (slika 4.19) prikazuju jasnu razliku između OMV i CELLS grupa. Prikazom na toplotnoj mapi može se jasno uvideti slična ili različita ekspresija lokusa u različitim uzorcima. Kod uzoraka koji su sekvencirani SE50 pristupom većina varijabilnih lokusa pokazuje grupisanu ekspresiju unutar uslova, što ukazuje na jasnu biološku separaciju. Kod sekvenci dobijenih PE100 pristupom sekvenciranja uočava se veća međusobna varijabilnost u okviru OMV grupe uzoraka, što je u skladu sa PCA analizom.



Slika 4.19 Toplotne mape poređenja sRNK uzoraka ćelija i vezikula pomoću alata DESeq2. Prikazano je 20 malih RNK koje su najzastupljenije u uzorcima OMV dobijenih nakon A) SE50 i B) PE100 tipa sekvenciranja.

Sekvence dvadeset najrepzentnijih lokusa prikazanih na *heatmap* kartama prikazane su u IGV programu kako bi se preglednije pokazala zastupljenost sekvenci sa određenih lokusa koje su obogaćene u OMV u odnosu na ćelije. Na slici 4.20. je iznad prikaza zastupljenosti sekvenci za dati lokus prikazana i najzastupljenija sekvenca.



Slika 4.20. Vizualizacija različitih grafikona pokrivenosti sekvenci za sRNK asociranih sa ekstracelularnim vezikulama i ćelijama *P. phytofirmans* PsJN, za različite lokuse, sa sekvencom koja je najzastupljenija za dati lokus. Pokrivenost RNK dobijena sekvenciranjem vizualizovana je pomoću softvera IGV (eng. *Integrative Genomics Viewer*). Svaki grafikon prikazuje broj čitanja mapiranih duž posmatrane sekvence, automatski skaliran u odnosu na najveći broj čitanja u tom delu genoma. Grafikoni narandžaste boje predstavljaju pokrivenost sekvenciranja u *P. phytofirmans* PsJN-OMV

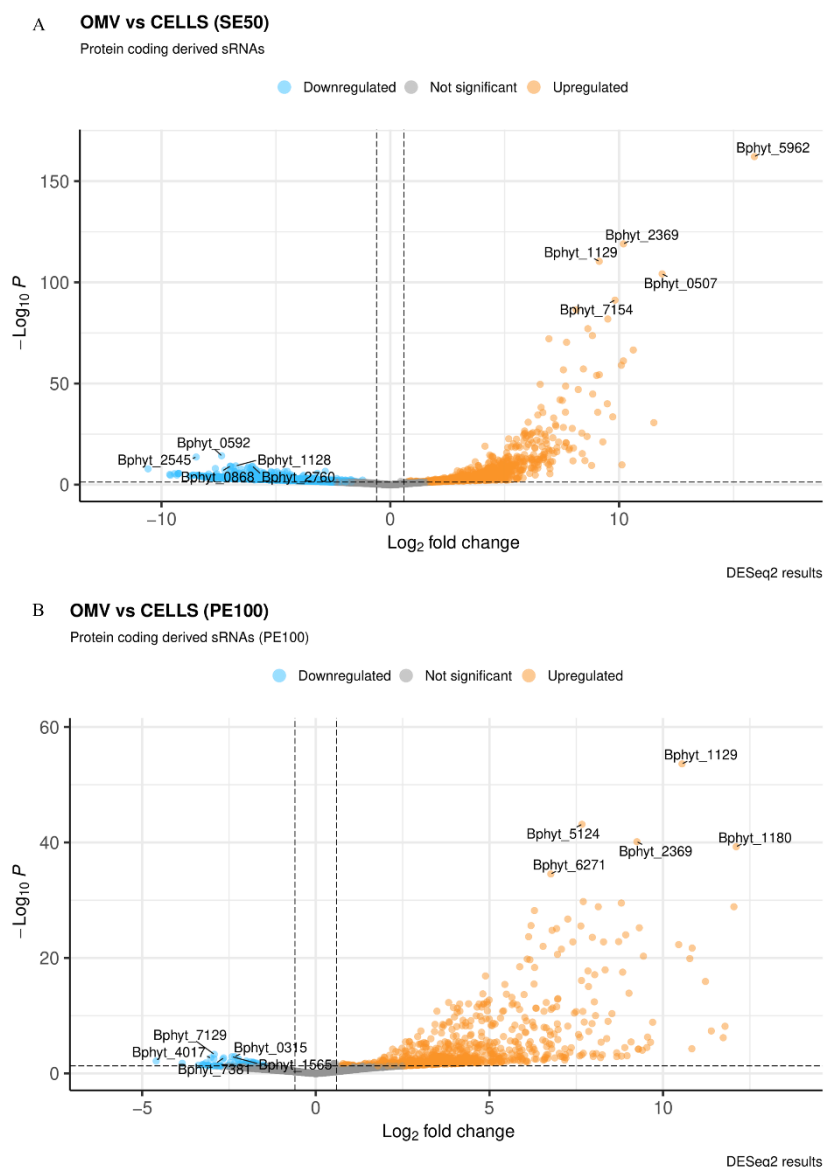
uzorcima, dok grafikoni plave boje predstavljaju pokrivenost sekvenciranja u uzorcima ćelija *P. phytofirmans* PsJN.

Analiza diferencijalne ekspresije sRNK između uzoraka OMV i ćelija *P. phytofirmans* PsJN ukazuje da se izdvaja značajna populacija sRNK koje su obogaćene u vezikulama (slika 4.21).



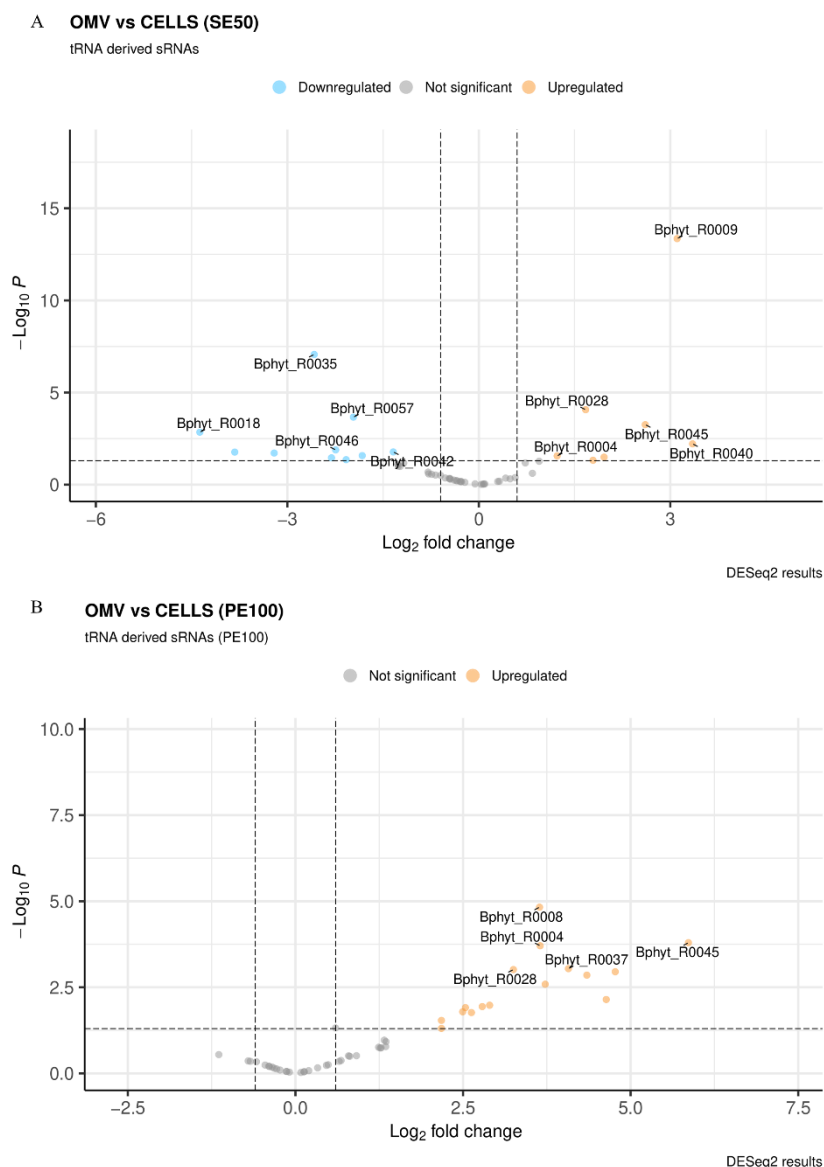
Slika 4.21. *Volcano* plot – poređenje sekvenci sRNK - OMV vs CELLS A) SE50 i B) PE100. Horizontalna osa predstavlja razliku u zastupljenosti sekvenci RNK asociranih sa OMV u odnosu na RNK iz ćelija, a vertikalna osa statističku značajnost. Narandžaste tačke prikazuju sRNK koji su statistički značajni, a obogaćene u OMV, a plave statistički značajne sRNK kojih ima manje u OMV u odnosu na ćelije.

Sa *volcano* grafika na slici 4.22. može se primetiti da je većina statistički značajnih sRNK poreklom sa lokusa koji kodiraju proteine.

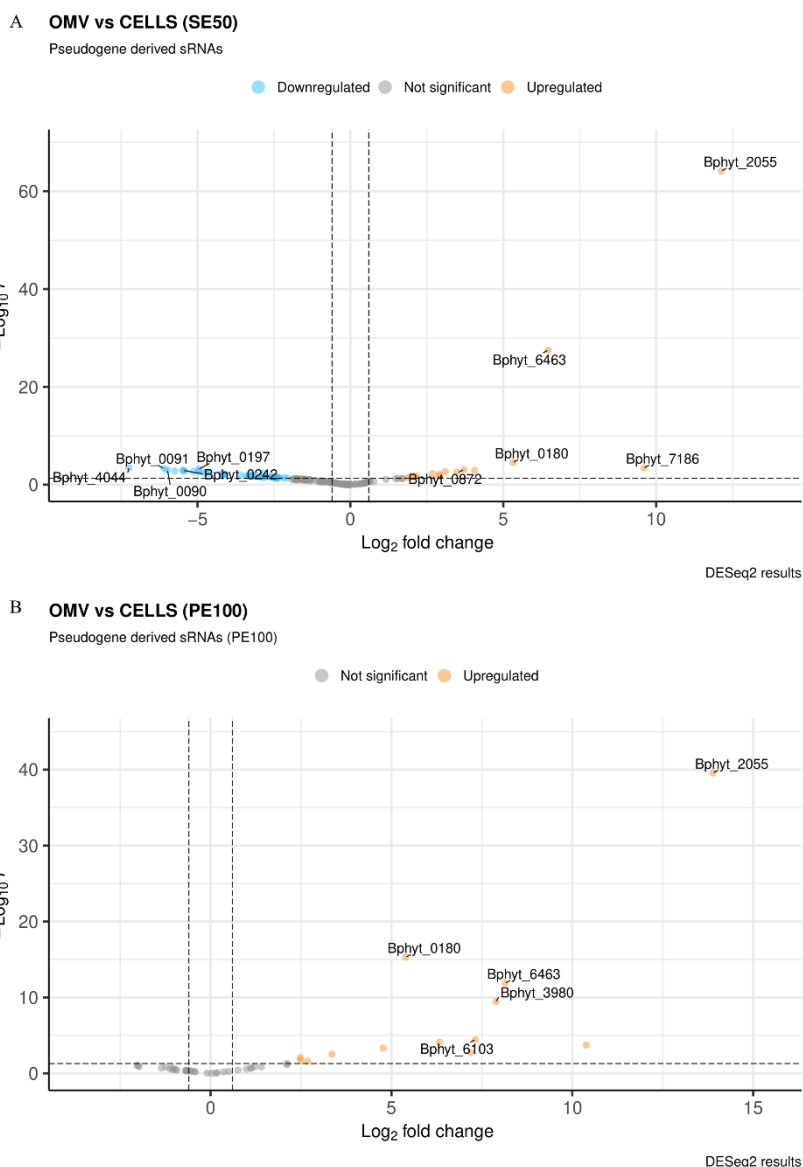


Slika 4.22. *Volcano* plot – poređenje sekvenci sRNK - OMV vs CELLS A) SE50 i B) PE100 poreklom od protein kodirajućih gena/lokusa. Horizontalna osa predstavlja razliku u zastupljenosti sekvenci RNK asociranih sa OMV u odnosu na RNK iz ćelija, a vertikalna osa statističku značajnost. Narandžaste tačke prikazuju sRNK koji su statistički značajno različito zastupljene, a obogaćene u OMV, a plave statistički značajne sRNK kojih ima manje u OMV u odnosu na ćelije.

Mnogo manji broj sRNK je mapiran na lokuse sa kojih se kodiraju tRNK i pseudogeni, ali i u tim populacijama sRNK prisutan je značajan broj sRNK koje su obogaćene u OMV (slike 4.23 i 4.24). Diferencijalna ekspresija sekvenci sRNK poreklom od rRNK je pokazala da su u OMV zastupljene sekvence koje se mapiraju na lokuse Bphyt_R0066 i Bphyt_R0011 (zbog malog broja statistički značajnih lokusa ovi rezultati nisu prikazani na *volcano* graficima).



Slika 4.23. *Volcano* plot – poređenje sekvenci sRNK - OMV vs CELLS A) SE50 i B) PE100 poreklom od tRNK. Horizontalna osa predstavlja razliku u zastupljenosti sekvenci RNK asociranih sa OMV u odnosu na RNK iz ćelija, a vertikalna osa statističku značajnost. Narandžaste tačke prikazuju sRNK koji su statistički značajno različito zastupljeni, a obogaćeni u OMV, a plave statistički značajne sRNK kojih ima manje u OMV u odnosu na ćelije.



Slika 4.24. *Volcano* plot – poređenje sekvenci sRNK - OMV vs CELLS A) SE50 i B) PE100 poreklom od pseudogena. Horizontalna osa predstavlja razliku u zastupljenosti sekvenci RNK asociranih sa OMV u odnosu na RNK iz ćelije, a vertikalna osa statističku značajnost. Narandžaste tačke prikazuju sRNK koji su statistički značajno različito zastupljeni, a obogaćeni u OMV, a plave statistički značajne sRNK kojih ima manje u OMV u odnosu na ćelije.

4.6.3.2.3. Predikcija targeta sRNK-OMV u *P. phytofirmans* PsJN

Za predikciju targeta sRNK obogaćenih u OMV korišćen je RNAPlex program dostupan preko *online* servera RNAPredator (http://nibiru.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAPredator/target_search.cgi). Predikovani su targeti za 20 reprezentativnih sRNK prikazanih na slici 4.20, dok je za 10 odabranih sRNK u tabelama 4.7-4.16 prikazano po 10 targeta sa najnižim energijama vezivanja.

Neki od predikovanih targeta sRNK su uključeni u hemotaksiju i signalne puteve koji regulišu odgovor bakterije na spoljašnje stimuluse. Među njima su i regulatori kvorum sensinga koji omogućavaju bakterijama da detektuju gustinu populacije, ali i da percipiraju signale poreklom od

biljaka. Takođe, potencijalni target-geneti koji obezbeđuju biogenezu pilusa važni su za formiranje biofilma i kolonizaciju biljnih tkiva.

Po predikciji, OMV-sRNK mogu učestvovati i u regulaciji gena zaduženih za metabolizam propionata, ugljenih hidrata i organskih kiselina, koji su prisutni u eksudatima korena i služe kao izvor ugljenika. Predikcija ukazuje i na moguću regulaciju transmembranskih transportera koji omogućavaju aktivni transport nutrijenata kroz ćelijsku membranu, kao i translokaza uključenih u sekreciju proteina.

Među predikovanim targetima su i geni uključeni u regulaciju esencijalnih bakterijskih funkcija, kao što su: skladištenje energije putem metabolizma ketona, biosinteza vitalnih kofaktora poput vitamina B12 i izgradnja ćelijskog zida. Potencijalni targeti ovih sRNK su i geni koji upravljaju integritetom genoma putem replikacije i popravke DNK, kao i oni zaduženi za posttranskripcione modifikacije tRNK neophodne za stabilan proces translacije.

Tabela 4.8. Predikovani targeti sRNK ACAAGGTGGATGCCCTGG, poreklom sa lokusa Bphyt_0507 (*dot-bracket* notacija – tačke označavaju neuparene baze, dok zagrade označavaju uparene baze, znakovi pre „&” predstavljaju RNK target, dok znakovi posle „&” predstavljaju sRNK).

Energija [kJ/mol]	z-Skor	Interakcija [<i>dot-bracket</i>]	iRNK [Start]	iRNK [End]	Anotacija	Lokus	Lanac	Replikon
-20,79	-4,89	((((((((((((((((((&))))))))))))))))	45	58	two component transcriptional regulator; LuxR family Bphyt	Bphyt_0374	-	hromozom 1
-18,98	-4,19	((((((((((((((((((&))))))))))))))))	303	317	inner membrane translocator Bphyt	Bphyt_3911	-	hromozom 1
-18,88	-4,15	((((((((((((((((((&))))))))))))))))	-63	-50	peptide chain release factor 1 Bphyt	Bphyt_3522	+	hromozom 1
-18,83	-4,13	((((((((((((((((((&))))))))))))))))	996	1008	hypothetical protein Bphyt 2112 Bphyt	Bphyt_2112	+	hromozom 1
-18,65	-4,06	((((((((((((((((((&))))))))))))))))	640	654	transcriptional regulator; GntR family with aminotransferase domain Bphyt	Bphyt_6889	+	hromozom 2
-18,62	-4,05	((((((((((((((((((&))))))))))))))))	849	861	cobalamin synthesis protein P47K Bphyt	Bphyt_0291	-	hromozom 1
-18,59	-4,04	((((((((((((((((((&))))))))))))))))	686	699	recombination factor protein RarA Bphyt	Bphyt_0103	-	hromozom 1
-18,14	-3,86	((((((((((((((((((&))))))))))))))))	2389	2402	preprotein translocase subunit SecA Bphyt	Bphyt_3461	-	hromozom 1
-18,11	-3,85	((((((((((((((((((&))))))))))))))))	410	425	AMP nucleosidase Bphyt	Bphyt_6793	-	hromozom 2
-18,04	-3,82	((((((((((((((((((&))))))))))))))))	1168	1179	propionate catabolism activator; Fis family Bphyt	Bphyt_5404	-	hromozom 2

Tabela 4.10. Predikovani targeti sRNK ACCGAGCCGGCGACGAAAAA, poreklom sa lokusa Bphyt_2257 (*dot-bracket* notacija – tačke označavaju neuparene baze, dok zgrade označavaju uparene baze, znakovi pre „&” predstavljaju RNK target, dok znakovi posle „&” predstavljaju sRNK).

Energija [kJ/mol]	z-Skor	Interakcija [<i>dot-bracket</i>]	iRNK [Start]	iRNK [End]	Anotacija	Lokus	Lanac	Replikon
-24,36	-4,67	((((((((((((((((((&)))))))))))))))))	993	1007	ABC transporter related Bphyt	Bphyt_4750	-	hromozom 2
-23,6	-4,37	((((((((((((((((((&)))))))))))))))))	821	837	drug resistance transporter; Bcr/CflA subfamily Bphyt	Bphyt_3096	-	hromozom 1
-22,87	-4,08	((((((((((((((((((&)))))))))))))))))	520	533	acyltransferase 3 Bphyt	Bphyt_1419	+	hromozom 1
-22,68	-4,01	((((((((((((((((((&)))))))))))))))))	113	127	type II secretion system protein Bphyt	Bphyt_3453	+	hromozom 1
-22,53	-3,95	((((((((((((((((((&)))))))))))))))))	746	760	glycosyl transferase family 2 Bphyt	Bphyt_1800	-	hromozom 1
-22,41	-3,9	((((((((((((((((((&)))))))))))))))))	118	133	Undecaprenyl phosphate glucose phosphotransferase Bphyt	Bphyt_6023	-	hromozom 2
-22,27	-3,85	((((((((((((((((((&)))))))))))))))))	529	541	peptidase M24 Bphyt	Bphyt_3518	-	hromozom 1
-22,08	-3,77	((((((((((((((((((&)))))))))))))))))	885	898	oligopeptide/dipeptide ABC transporter; ATPase subunit Bphyt	Bphyt_3178	+	hromozom 1
-21,9	-3,7	((((((((((((((((((&)))))))))))))))))	503	514	diguanylate cyclase/phosphodiesterase Bphyt	Bphyt_7195	+	hromozom 2
-21,7	-3,62	((((((((((((((((((&)))))))))))))))))	679	694	transcriptional regulator; LysR family Bphyt	Bphyt_0040	+	hromozom 1

Tabela 4.11. Predikovani targeti sRNK CAGGACGGGATCGCCAGCAACAGTCGA, poreklom sa lokusa Bphyt_2533 (*dot-bracket* notacija – tačke označavaju neuparene baze, dok zagrade označavaju uparene baze, znakovi pre „&” predstavljaju RNK target, dok znakovi posle „&” predstavljaju sRNK).

Energija [kJ/mol]	z-Skor	Interakcija [<i>dot-bracket</i>]	iRNK [Start]	iRNK [Kraj]	Anotacija	Lokus	Lanac	Replikon
-24,61	-4,46	(((((.....((((((((((((((((((((&))))))))).....)))))))))	577	600	membrane protein Bphyt	Bphyt_4877	-	hromozom 2
-23,85	-4,19	(((((.....((((((((((((((((((((&))))))))).....)))))))))	382	405	band 7 protein Bphyt	Bphyt_5653	+	hromozom 2
-23,6	-4,1	(((((.....((((((((((((((((((((&))))))))).....)))))))))	2153	2166	phosphoenolpyruvate protein phosphotransferase Bphyt	Bphyt_0563	+	hromozom 1
-23,49	-4,06	(((((.....((((((((((((((((((((&))))))))).....)))))))))	60	77	tartrate dehydrogenase Bphyt	Bphyt_5037	+	hromozom 2
-23,33	-4	(((((.....((((((((((((((((((((&))))))))).....)))))))))	1131	1156	GTP binding protein TypA Bphyt	Bphyt_1639	+	hromozom 1
-23,3	-3,99	(((((.....((((((((((((((((((((&))))))))).....)))))))))	96	121	cytochrome c oxidase subunit II Bphyt	Bphyt_0623	-	hromozom 1
-22,98	-3,88	(((((.....((((((((((((((((((((&))))))))).....)))))))))	1199	1216	phage portal protein; lambda family Bphyt	Bphyt_1172	+	hromozom 1
-22,9	-3,85	(((((.....((((((((((((((((((((&))))))))).....)))))))))	93	114	SpoVT/AbrB domain protein Bphyt	Bphyt_0157	-	hromozom 1
-22,76	-3,8	(((((.....((((((((((((((((((((&))))))))).....)))))))))	96	118	protein of unknown function DUF140 Bphyt	Bphyt_3570	-	hromozom 1
-22,65	-3,76	(((((.....((((((((((((((((((((&))))))))).....)))))))))	-77	-51	binding protein dependent transport systems inner membrane component Bphyt	Bphyt_3244	-	hromozom 1

Tabela 4.12. Predikovani targeti sRNK ATTTGCAATGATCCGTTTC, poreklom sa lokusa Bphyt_3907 (*dot-bracket* notacija – tačke označavaju neuparene baze, dok zagrade označavaju uparene baze, znakovi pre „&” predstavljaju RNK target, dok znakovi posle „&” predstavljaju sRNK).

Energija [kJ/mol]	z-Skor	Interakcija [<i>dot-bracket</i>]	iRNK [Start]	iRNK [End]	Anotacija	Lokus	Lanac	Replikon
-21,82	-6,23	((((((((((((((((((&))))))))))))))))))	3	19	ABC transporter related Bphyt	Bphyt_3907	-	hromozom 1
-19,82	-5,28	((((((((((((((((((&))))))))))))))))))	-173	-158	protein of unknown function DUF1486 Bphyt	Bphyt_4135	+	hromozom 2
-18,48	-4,65	((((((((((((((((((&))))))))))))))))))	1104	1119	glycosyl transferase family 9 Bphyt	Bphyt_4134	+	hromozom 2
-18,16	-4,5	((((((((((((((((((&))))))))))))))))))	831	847	Alkanesulfonate monooxygenase Bphyt	Bphyt_1546	+	hromozom 1
-18,02	-4,43	((((((((((((((((((&))))))))))))))))))	359	373	phospholipid/glycerol acyltransferase Bphyt	Bphyt_0875	+	hromozom 1
-17,68	-4,27	((((((((((((((((((&))))))))))))))))))	304	318	Ferritin Dps family protein Bphyt	Bphyt_2657	-	hromozom 1
-17,41	-4,14	((((((((((((((((((&))))))))))))))))))	141	156	transcriptional regulator; XRE family Bphyt	Bphyt_1446	+	hromozom 1
-17,25	-4,07	((((((((((((((((((&))))))))))))))))))	381	393	D isomer specific 2 hydroxyacid dehydrogenase NAD binding Bphyt	Bphyt_4217	+	hromozom 2
-16,77	-3,84	((((((((((((((((((&))))))))))))))))))	-8	3	hypothetical protein Bphyt 0222 Bphyt	Bphyt_0222	+	hromozom 1
-16,74	-3,82	((((((((((((((((((&))))))))))))))))))	66	78	transcriptional regulator; DeoR family Bphyt	Bphyt_0512	-	hromozom 1

Tabela 4.13. Predikovani targeti sRNK AGTCCGGCTGATGTTGG, poreklom sa lokusa Bphyt_6211 (*dot-bracket* notacija – tačke označavaju neuparene baze, dok zagrade označavaju uparene baze, znakovi pre „&” predstavljaju RNK target, dok znakovi posle „&” predstavljaju sRNK).

Energija [kJ/mol]	z-Skor	Interakcija [<i>dot-bracket</i>]	iRNK [Start]	iRNK [End]	Anotacija	Lokus	Lanac	Replikon
-20,23	-5,07	((((((((.((((((((&))))))))))))))))))	257	272	Gluconate 2 dehydrogenase (acceptor) Bphyt	Bphyt_6211	+	hromozom 2
-19,4	-4,74	((((((((.((((((((&))))))))))))))))))	48	62	transcriptional regulator; LysR family Bphyt	Bphyt_2280	-	hromozom 1
-18,48	-4,36	((((((((.((((((((&))))))))))))))))))	535	549	conserved hypothetical protein Bphyt	Bphyt_7249	+	plazmid pBPHYT01
-18,15	-4,23	((((((((.((((((((&))))))))))))))))))	182	197	conserved hypothetical protein Bphyt	Bphyt_6922	+	hromozom 2
-17,84	-4,11	((((((((.((((((((&))))))))))))))))))	364	378	Gluconate 2 dehydrogenase (acceptor) Bphyt	Bphyt_0625	-	hromozom 1
-17,8	-4,09	((((((((.((((((((&))))))))))))))))))	188	203	lipolytic protein G D S L family Bphyt	Bphyt_4719	-	hromozom 2
-17,78	-4,08	((((((((.((((((((&))))))))))))))))))	276	289	protein of unknown function DUF938 Bphyt	Bphyt_5974	-	hromozom 2
-17,71	-4,05	((((((((.((((((((&))))))))))))))))))	-170	-155	transcriptional regulator; LysR family Bphyt	Bphyt_1422	+	hromozom 1
-17,61	-4,01	((((((((.((((((((&))))))))))))))))))	2576	2591	Isoquinoline 1 oxidoreductase.; Gluconate 2 dehydrogenase (acceptor) Bphyt	Bphyt_4332	+	hromozom 2
-17,22	-3,86	((((((((.((((((((&))))))))))))))))))	240	255	conserved hypothetical protein Bphyt	Bphyt_4932	-	hromozom 2

Tabela 4.14. Predikovani targeti sRNK CGTCGTAGTCCGCATTGGA, poreklom sa lokusa Bphyt_6236 (*dot-bracket* notacija – tačke označavaju neuparene baze, dok zagrade označavaju uparene baze, znakovi pre „&” predstavljaju RNK target, dok znakovi posle „&” predstavljaju sRNK).

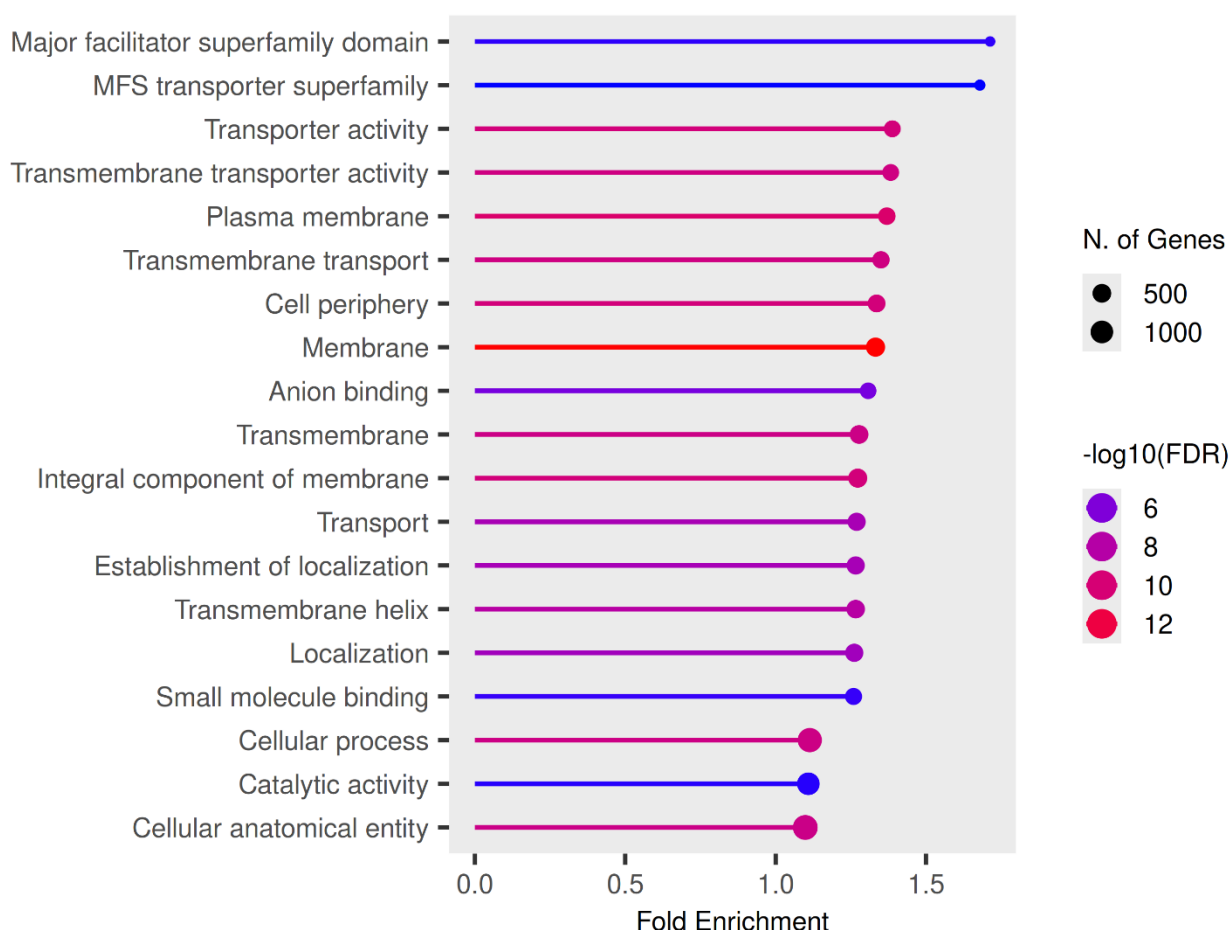
Energija [kJ/mol]	z-Skor	Interakcija [<i>dot-bracket</i>]	iRNK [Start]	iRNK [End]	Anotacija	Lokus	Lanac	Replikon
-24,52	-5,89	((((((((((((((((((&))))))))))))))))))	591	607	RNA polymerase; sigma 24 subunit; ECF subfamily Bphyt	Bphyt_6688	-	hromozom 2
-21,07	-4,51	((((((((((((((((((&))))))))))))))))))	381	396	conserved hypothetical cytosolic protein Bphyt	Bphyt_0015	-	hromozom 1
-20,89	-4,43	((((((((((((((((((&))))))))))))))))))	820	837	2 hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase Bphyt	Bphyt_1465	+	hromozom 1
-20,57	-4,3	((((((((((((((((((&))))))))))))))))))	913	929	NADH quinone oxidoreductase; F subunit Bphyt	Bphyt_1348	+	hromozom 1
-20,12	-4,12	((((((((((((((((((&))))))))))))))))))	589	600	Carbonate dehydratase Bphyt	Bphyt_1508	-	hromozom 1
-19,9	-4,04	((((((((((((((((((&))))))))))))))))))	430	446	bifunctional 3;4 dihydroxy 2 butanone 4 phosphate synthase/GTP cyclohydrolase II like protein Bphyt	Bphyt_3101	+	hromozom 1
-19,57	-3,9	((((((((((((((((((&))))))))))))))))))	259	274	tRNA dihydrouridine synthase A Bphyt	Bphyt_1755	-	hromozom 1
-19,48	-3,87	((((((((((((((((((&))))))))))))))))))	424	438	transcriptional regulator; IclR family Bphyt	Bphyt_2208	+	hromozom 1
-19,32	-3,8	((((((((((((((((((&))))))))))))))))))	355	371	(2Fe 2S) binding domain protein Bphyt	Bphyt_4959	+	hromozom 2
-18,9	-3,63	((((((((((((((((((&))))))))))))))))))	1080	1097	NAD dependent epimerase/dehydratase Bphyt	Bphyt_6265	+	hromozom 2

Tabela 4.16. Predikovani targeti sRNK TGCGGTGACACGACGAGAACGCCCTCGAAGTCG, poreklom sa lokusa Bphyt_1170 (*dot-bracket* notacija – tačke označavaju neuparene baze, dok zagrade označavaju uparene baze, znakovi pre „&” predstavljaju RNK target, dok znakovi posle „&” predstavljaju sRNK).

Energija [kJ/mol]	z-Skor	Interakcija [<i>dot-bracket</i>]	iRNK [Start]	iRNK [End]	Anotacija	Lokus	Lanac	Replikon
-20,99	-5,57	((((((((.(((((((((((((((((((((&)))))))).))))))))))))))	700	729	K potassium transporter Bphyt	Bphyt_6716	-	hromozom 2
-17,16	-4,05	((((((((.(((((((((((((((((((((&)))))))).))))))))))))))	1196	1223	cytochrome c oxidase; subunit I Bphyt	Bphyt_2027	+	hromozom 1
-16,8	-3,91	((((((((.(((((((((((((((((((((&)))))))).))))))))))))))	2646	2666	transporter; hydrophobe/amphiphile efflux 1 (HAE1) family Bphyt	Bphyt_5850	-	hromozom 2
-16,61	-3,84	((((((((.(((((((((((((((((((((&)))))))).))))))))))))))	1941	1965	aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase molybdopterin binding Bphyt	Bphyt_6629	-	hromozom 2
-16,22	-3,68	((((((((.(((((((((((((((((((((&)))))))).))))))))))))))	554	580	transcriptional regulator; LysR family Bphyt	Bphyt_1429	+	hromozom 1
-16,14	-3,65	((((((((.(((((((((((((((((((((&)))))))).))))))))))))))	938	962	PAS sensor protein Bphyt	Bphyt_1683	+	hromozom 1
-16,11	-3,64	((((((((.(((((((((((((((((((((&)))))))).))))))))))))))	2170	2183	DEAD like helicase Bphyt	Bphyt_6468	-	hromozom 2
-15,86	-3,54	((((((((.(((((((((((((((((((((&)))))))).))))))))))))))	557	577	transcriptional regulator; LysR family Bphyt	Bphyt_6326	-	hromozom 2
-15,71	-3,48	((((((((.(((((((((((((((((((((&)))))))).))))))))))))))	591	614	molecular chaperone DnaK Bphyt	Bphyt_0737	+	hromozom 1
-15,7	-3,48	((((((((.(((((((((((((((((((((&)))))))).))))))))))))))	483	496	glycosyl transferase group 1 Bphyt	Bphyt_6015	-	hromozom 2

4.6.3.2.4. GO analiza predikovanih targeta sRNK obogaćenih u OMV- *P. phytofirmans* PsJN

Predikovani targeti sRNK, koje su detektovane kao obogaćene u OMV u odnosu na ćelije *P. phytofirmans* PsJN, korišćeni su za analizu genske ontologije. Minimalna energija interakcije niža od -15 kJ/mol je bila glavni kriterijum za izbor targeta sRNK korišćenih u GO analizi. Iako je ova analiza rađena na predikovanim targetima iz ovih rezultata može se pretpostaviti regulatorna uloga sRNK obogaćenih u OMV, pre svega u regulaciji gena uključenih u aktivnost membranskih transportera, transmembranski transport i transport malih molekula (slika 4.25).



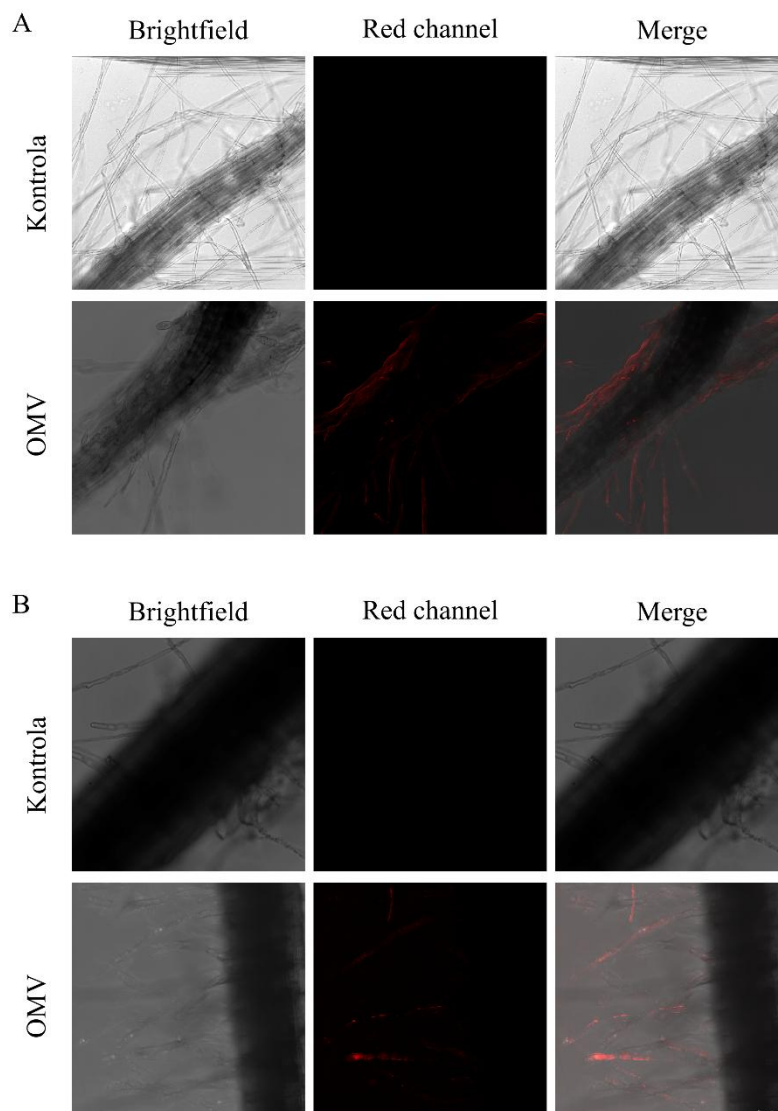
Slika 4.25. Analiza genske ontologije predikovanih targeta OMV-sRNK.

4.6.4. Interakcija OMV soja *P. phytofirmans* PsJN sa klijancima *A. thaliana* i *S. lycopersicum*

Pored karakterizacije OMV soja *P. phytofirmans* PsJN i analize malih RNK asociranih sa njima, praćena je i interakcija OMV sa korenovima *A. thaliana* i *S. lycopersicum*.

Kako bi se ispitala interakcija OMV i ćelija korena *S. lycopersicum* i *A. thaliana*, OMV su obeležene sa Vybrant™ DiD bojom. Ova boja se vezuje za lipide i uspešno inkorporira u biološke membrane što omogućava detekciju na konfokalnom mikroskopu. Zbog visokog afiniteta lipofilnih boja za vezivanje za lipide, potrebne su rigorozne kontrole i temeljno ispiranje uzoraka od ove boje. Pranjem nevezane boje na gradijentu gustine uspešno je uklonjena sva nevezana boja, što je potvrđeno

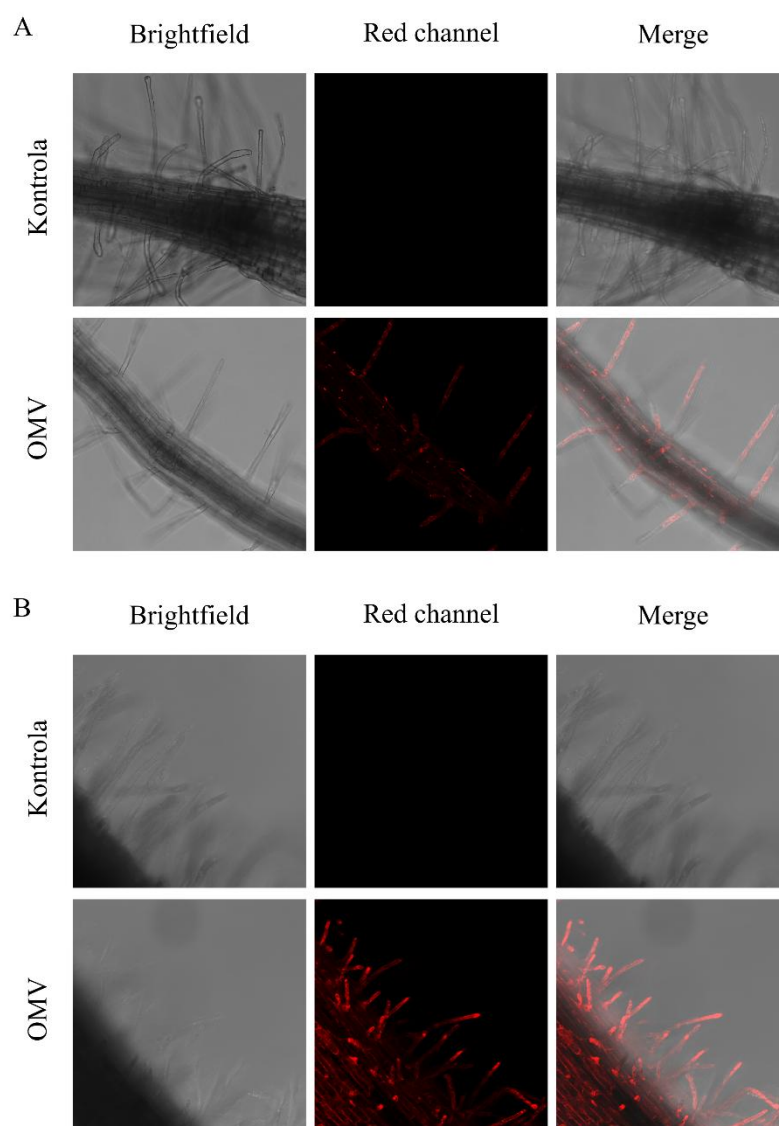
u kontrolnim uzorcima bez OMV. Nasuprot tome, crveni signali su bili jasno uočljivi na korenovima *A. thaliana* i *S. lycopersicum* nakon inkubacije sa DiD-obebeženim OMV. Najjači signali su zabeleženi na korenskim dlačicama (slika 4.26).



Slika 4.26. OMV soja *P. phytofirmans* PsJN ostvaruju kontakt sa epidermalnim ćelijama korena. Korenovi klijanaca starih 4 dana A) *A. thaliana* ili B) *S. lycopersicum*, inkubirani su sa OMV soja *P. phytofirmans* PsJN obeleženim Vybrant™ DiD fluorescentnom bojom. PBS sa istom količinom boje korišćen je kao kontrola.

4.6.4.1. Fuzija OMV soja *P. phytofirmans* PsJN sa membranama epidermalnih ćelija korena

Kako bismo utvrdili da li tokom pokazane interakcije dolazi do fuzije membrana OMV i epidermalnih ćelija korena, korišćena je boja Rodamin-R18. Zabeleženi su snažni signali u korenovima obe biljke tokom interakcije sa R18-obebeženim ekstracelularnim vezikulama soja *P. phytofirmans* PsJN, što ukazuje na fuziju OMV sa membranama korenskih ćelija (slika 4.27).



Slika 4.27. OMV soja *P. phytofirmans* PsJN obeležene bojom Rhodamine R18, fuzionišu se sa membranama epidermalnih ćelija korena. Korenovi klijanaca starih 4 dana A) *A. thaliana* ili B) *S. lycopersicum* inkubirani su sa OMV soja *P. phytofirmans* PsJN obeleženim bojom Rhodamine R18. PBS sa istom količinom boje korišćen je kao kontrola.

5. Diskusija

Patogeni mikroorganizmi ugrožavaju zdravlje i prinos biljaka, i predstavljaju glavne pretnje proizvodnji hrane. Rotacija useva, oplemenjivanje u cilju stvaranja otpornih sorti i primena pesticida nisu dovoljni za kontrolu bolesti biljaka. Prekomerna upotreba pesticida negativno utiče na ekosistem, oni se nakupljaju u zemljištu što dovodi do smanjenja diverziteta mikroflore zemljišta a samim tim i manje plodnosti zemljišta. Upotreba korisnih bakterija sa biokontrolnom aktivnošću predstavlja alternativni način zaštite biljaka od fitopatogena. Pokazano je da PGPB mogu razgraditi pesticide koji su zaostali u zemljištu (Chandrasekaran & Paramasivan, 2024) do manje štetnih ili bezopasnih ostataka. Pored zaštite od nepovoljnih uslova sredine, PGPB mogu povećati dostupnost hranljivih materija u zemljištu, čime se može smanjiti upotreba hemijskih đubriva. Korisne bakterije iz rodova *Pseudomonas*, *Bacillus* i *Paraburkholderia* su se pokazale kao efikasne u kontroli nekrotrofnog patogena *B. cinerea* kod pojedinih biljnih domaćina kao što su *A. thaliana* (Nie *et al.*, 2017), krastavac (Zhu *et al.*, 2021a) i vinova loza (Miotto-Vilanova *et al.*, 2016).

U ovoj disertaciji je ispitana efikasnost korisne bakterije *P. phytofirmans* PsJN u indukciji sistemske rezistencije na *B. cinerea* i podsticanju rastenja model biljke *A. thaliana*. *P. phytofirmans* PsJN je Gram-negativna korisna rizosferna bakterija za koju je pokazano da stimuliše rastenje biljaka i povećava toleranciju na abiotički i biotički stres (Timmermann *et al.*, 2019). Ovaj soj podiže otpornost vinove loze na infekciju patogenom gljivom *B. cinerea* (Miotto-Vilanova *et al.*, 2016), međutim taj efekat do sada nije pokazan na biljkama *A. thaliana*. Iako nije od važnosti za poljoprivredu, *A. thaliana* predstavlja model sistem u molekularnoj biologiji biljaka zbog svojih karakteristika: malog i dobro opisanog genoma, kratkog životnog ciklusa, samooplođenja i dostupnosti velikog broja mutanata (*The Arabidopsis Genome Initiative*). Za nekoliko sojeva PGPB je pokazano da podstiču rastenje ove model biljke i povećavaju njenu otpornost na stresove (Poupin *et al.*, 2013; Timmermann *et al.*, 2019). Protektivno dejstvo kod biljke *A. thaliana* u uslovima biotičkog stresa uočeno je za Gram-pozitivni soj PGPB, *Bacillus cereus* AR156 (Nie *et al.*, 2017). AR156 indukuje sistemsku rezistenciju kod *A. thaliana* aktiviranjem signalnih puteva zavisnih od salicilne kiseline i jasmonata/etilena (Nie *et al.*, 2017).

5.1. Stimulacija rastenja biljaka *A. thaliana* nakon inokulacije sojem *P. phytofirmans* PsJN

Poupin i saradnici su 2013. godine pokazali da jedna inokulacija sojem *P. phytofirmans* PsJN ima uticaj tokom celog životnog ciklusa *A. thaliana*. Inokulacija sojem PsJN tokom faze klijanja je imala pozitivne efekte na parametre rastenja, kao što su dužina korena, broj i dužina korenskih dlačica, veća biomasa i veći sadržaj hlorofila (Poupin *et al.*, 2013). U eksperimentima ove teze je uočeno povećanje biomase biljaka gajenih u hidroponoj kulturi u prisustvu soja *P. phytofirmans* PsJN. Primećene promene u ekspresiji gena uključenih u puteve auksina i giberelina u skladu su sa fenotipskim promenama u rastanju i razviću *A. thaliana* izazvanim inokulacijom *P. phytofirmans* PsJN.

5.2. Protektivno dejstvo PGPB *P. phytofirmans* PsJN na biljke *A. thaliana* inficirane fitopatogenom *B. cinerea*

U ovoj disertaciji je prvi put pokazano protektivno dejstvo soja *P. phytofirmans* PsJN na biljke *A. thaliana* inficirane fitopatogenom *B. cinerea* (slike 4.2 i 4.3). Ovaj efekat je potvrđen u biljkama *A. thaliana* gajenim u zemljišnom supstratu i u hidroponoj kulturi. U oba slučaja inokulacija je vršena

apliciranjem bakterija samo u nivou korena, a ublažavanje simptoma bolesti uočavano na listovima, što ukazuje na sistemsko delovanje ovog PGPB soja.

Takođe, pokazana je povećana akumulacija H_2O_2 molekula kod biljaka inokulisanih sa *P. phytofirmans* PsJN u odnosu na neinokulisane biljke nakon zaražavanja. Levin i saradnici su pokazali da H_2O_2 služi kao okidač koji lokalno izaziva programiranu ćelijsku smrt i difunduje kroz membrane kao signalni molekul do okolnih ćelija (Levine *et al.*, 1994). H_2O_2 omogućava brzi hipersenzitivni odgovor koji smanjuje širenje infekcije.

Makro-efekti koje PGPB ispoljavaju na biljkama pod optimalnim i stresnim uslovima predvođeni su promenama na molekularnom nivou. Analize metiloma, transkriptoma i proteoma mogu ukazati na molekularne mehanizme koji stoje u osnovi delovanja korisnih rizosfernih i endofitnih bakterija. Chen i saradnici su 2022. godine pokazali da interakcija PGPB sa *Phytolacca americana* L. indukuje promene u metilaciji DNK u korenu kako bi se podstaklo rastenje biljke. Zanimljivo je da ove modifikacije ostaju funkcionalne i nakon eliminacije inokuluma iz mikrobiote. U studiji koja je istraživala interakciju *P. phytofirmans* PsJN–*A. thaliana*, pre izlaganja biljaka patogenu, uočeno je da *P. phytofirmans* PsJN reguliše ekspresiju 405 gena (Timmermann *et al.*, 2019). U toj studiji je primećeno i da su nakon zaražavanja odgovori biljke indukovani sojem *P. phytofirmans* PsJN različiti od onih koje indukuje sam patogen. Mreža koja obuhvata četiri klastera gena promenjena je pod uticajem *P. phytofirmans* PsJN, uključujući gene povezane sa jasmonatima, etilenom, salicilnom kiselinom i ROS putevima (Timmermann *et al.*, 2019).

Uticaj soja *P. phytofirmans* PsJN na ekspresiju gena *A. thaliana*, praćen je analizom transkriptoma korenova i listova, pre izlaganja patogenu i 24h nakon zaražavanja. Korišćene su biljke gajene u hidroponoj kulturi kako bi se omogućilo uzorkovanje korenova bez oštećivanja i izolovanje RNK visokog stepena čistoće i integriteta, koji su neophodni za sekvenciranje tehnologijom NGS. Prethodna istraživanja su se uglavnom bavila isključivo procesima u listovima (Timmermann *et al.*, 2019). Stoga je jedan od ciljeva ove teze bilo karakterisanje promena u transkriptomu korena u odgovoru na inokulaciju sojem PGPB. Rezultati sekvenciranja RNK su pokazali da *P. phytofirmans* PsJN indukuje transkripciono reprogramiranje lokalno (u korenovima) i sistemski (u listovima) pre i posle infekcije sa *B. cinerea*.

5.2.1. Uticaj inokulacije *A. thaliana* sojem *P. phytofirmans* PsJN na ekspresiju gena koji učestvuju u odgovoru na abiotički stres

Komparativna GO analiza transkriptoma *P. phytofirmans* PsJN-inokulisanih i kontrolnih biljaka ukazala je na povećanu ekspresiju gena koji učestvuju u putevima vezanim za odgovor na abiotičke stimuluse, kao što su: nizak nivo kiseonika, promene u nivou nutrijenata i slabiji intenzitet svetlosti (slika 4.7). Među diferencijalno eksprimiranim genima vezanim za odgovor na abiotički stres identifikovan je značajan broj gena uključenih u odgovor na hipoksiju. *P. phytofirmans* PsJN je izazvao promene u genima odgovornim za detekciju kiseonika i signalnu transdukciju, transkripcione faktore vezane za hipoksiju, kao i nekolicinu efektornih gena neophodnih za odgovor i toleranciju na hipoksiju (slike 4.6 i 4.8). Ove promene u ekspresiji mogle bi biti posledica gajenja u hidroponoj kulturi kao i izlaganja biljaka visokoj vlažnosti, što je bio neophodan uslov za uspešno zaražavanje patogenom *B. cinerea*.

Etilen ima značajnu ulogu u prilagođavanju biljaka na hipoksiju, naročito tokom poplava (Liu *et al.*, 2022). Obrasci ekspresije gena povezanih sa sintezom, detekcijom i signalnim putevima etilena bili su izmenjeni kod biljaka koje su inokulisane sojem *P. phytofirmans* PsJN. *P. phytofirmans* PsJN je uticao na ekspresiju brojnih transkripcionih faktora iz familije ERF, poznatih regulatora gena koji učestvuju u putu etilena kao i drugih funkcija u odgovoru na abiotički stres (slika 4.6). Takođe, i u korenu i u listovima je detektovana povećana ekspresija gena koji kodiraju za enzime koji učestvuju

u adaptaciji na niske nivoe kiseonika (*PDC2*, *LDH1*, *AlaAT1*, *GLY17*, *SRO4*, *FBA6*, *SUS1* i *SUS3*) što ukazuje na aktivaciju alternativnih metaboličkih puteva za proizvodnju energije kao što su fermentacioni procesi koji koriste piruvat kao supstrat (slika 4.8).

5.2.2. Uticaj inokulacije *A. thaliana* sojem *P. phytofirmans* PsJN na ekspresiju gena koji učestvuju u interakciji biljke sa mikroorganizmima i indukovanoj sistemskoj rezistenciji - ISR

Iako većina korisnih bakterija izbegava i suprimira lokalne imunske odgovore kako bi uspešno kolonizovala biljna tkiva, one takođe modulišu odbrambene mehanizme biljaka putem indukovane sistemske rezistencije (ISR) (Van Loon *et al.*, 1998). ISR je izazvana nepatogenim rizobakterijama koje kolonizuju korenove biljaka. Ovaj tip odbrambenog mehanizma odlikuje prisustvo i JA i ET signalne transdukcije kako bi se indukovao protektivni odgovor u distalnim organima i omogućava biljkama pripremu za mogući napad patogena (Van Loon *et al.*, 1998). Brojna istraživanja su pokazala da tokom interakcija sa PGPB dolazi do promena na nivou transkriptoma. Geni uključeni u odbrambeni odgovor biljaka, hormonske signalne puteve i transport nutrijenata su diferencijalno ekspimirani tokom interakcije sa PGPB (Mukherjee, 2022). U ovoj tezi uočene su značajne promene transkriptoma u odgovoru na *P. phytofirmans* PsJN u neinficiranim biljkama. Inokulacija ovim sojem korisnih bakterija uticala je na ekspresiju velikog broja gena uključenih u odbrambeni odgovor i signalnu transdukciju (slike 4.7 i 4.9). Sa druge strane, 24 sata nakon infekcije patogenom *B. cinerea*, drastične promene su uočene između inficiranih i neinficiranih biljaka, dok je inokulacija bakterijom vrlo malo uticala na transkriptom zaraženih biljaka (slika 4.10). Odsustvo uticaja *P. phytofirmans* PsJN na transkriptom jedan dan nakon zaražavanja sugerise da se u tom periodu odbrambeni procesi u inokulisanim i neinokulisanim biljkama razlikuju na drugim nivoima regulacije, što kasnije rezultuje ublažavanjem simptoma.

Ako se uzme u obzir pokazano protektivno dejstvo *P. phytofirmans* PsJN na *A. thaliana* i stimulacija odbrambenih gena u inokulisanim biljkama pre zaražavanja, može se pretpostaviti da *P. phytofirmans* PsJN deluje povećanjem odbrambenih sposobnosti biljke pre susreta sa patogenom. Ovaj fenomen poznat je u literaturi kao „prajming efekat“ koji omogućava biljkama da razviju brži i jači odbrambeni odgovor na napad patogena, odlažući razvoj simptoma, smanjujući težinu bolesti i inhibirajući rast patogena (Van Loon *et al.*, 1998; Cartieaux *et al.*, 2008).

Inokulacija *A. thaliana* sojem *P. phytofirmans* PsJN na različit način je uticala na ekspresiju gena lokalno – u korenu i sistemski – u listovima.

5.2.2.1. Uticaj inokulacije *A. thaliana* sojem *P. phytofirmans* PsJN na ekspresiju gena koji učestvuju u interakciji mikroorganizama i korena biljke

Najistaknutije promene ekspresije gena u korenu koje su indukovane prisustvom *P. phytofirmans* PsJN kod *A. thaliana* su zabeležene u genima vezanim za signalne puteve, put etilena, proteolizu i ćelijski zid (slika 4.9). Percepcija mikroorganizama i prenos signala ključni su za sposobnost biljke da reguliše mikrobiotu i razlikuje korisne od patogenih mikroorganizama. Prisustvo *P. phytofirmans* PsJN značajno je uticalo na ekspresiju brojnih gena uključenih u signalne puteve, uključujući i receptorne kinaze i proteine koji vezuju kalcijum (Nešić *et al.*, 2025, *supplementary tables S2 i S3*).

Zbog velike raznovrsnosti, kinaze iz familije RLK (eng. *receptor-like kinases*) regulišu širok spektar važnih procesa u biljkama, uključujući rastenje i razviće, biotičke interakcije i imunitet, i odgovore na abiotički stres (Jose *et al.*, 2020). U našoj studiji je primećeno i povećanje i smanjenje ekspresije RLK i drugih gena uključenih u signalne puteve, i u korenu i u nadzemnim delovima biljke

što se može objasniti finom modulacijom pod uticajem *P. phytofirmans* PsJN. U *P. phytofirmans* PsJN-inokulisanim biljkama, ekspresija ovih gena je u korenu bila pretežno smanjena. Učešće RLK u percepciji mikroorganizama i uspostavljanju kolonizacije biljnih tkiva uočena je u studiji Song *et al.*, 2021. Isključivanje FER (eng. *FERONIA*) kinaze dovelo je do povećane kolonizacije korenova *A. thaliana* sojem PGPB *Pseudomonas fluorescens* WCS365. Funkcija FER bazira se na regulisanju nivoa ROS, čijim prisustvom se ograničava rast bakterija koje pripadaju rodu *Pseudomonas*. Smanjenje aktivnosti ove RLK dovodi do smanjenog bazalnog nivoa ROS na površini korena, što olakšava kolonizaciju korena bakterijama ovog roda. Ova studija je jedan od primera kako regulacija signalnih puteva može uticati na sastav biljne mikrobiote. Iako korisni i patogeni mikroorganizmi poseduju slične molekulske obrasce povezane sa mikroorganizmima - MAMP, koje prepoznaju RLK, postoje takođe i epitopi – regioni molekula koji su specifični za pojedine mikroorganizme. Kombinovanjem percepcije različitih epitopa, efektor, molekulskih obrazaca koji su povezani sa oštećenjem – DAMP (eng. *damage-associated molecular patterns*) i drugih signala, biljke mogu razlikovati mikroorganizme u njihovoj sredini i adekvatno reagovati na njih (Ghozlan *et al.*, 2020; Zhang & Kong, 2022). Može se pretpostaviti da sposobnost PGPB da modulišu ekspresiju receptornih kinaza i drugih gena koji učestvuju u signalnim putevima, s jedne strane može olakšati kolonizaciju korena, a sa druge strane uticati na opštu percepciju i reakciju biljke na mikroorganizme.

Ubikvitin-proteazni sistem (UPS) reguliše sve faze imunskog odgovora biljaka. Efektori patogena ometaju UPS domaćina i zaposedaju njegove funkcije (Langin *et al.*, 2023). Iako je pretpostavljena uloga UPS u uspostavljanju mutualističkih interakcija biljaka i mikroorganizama, mali je broj istraživanja koja se bave ovom temom. Pokazano je da endofitna kolonizacija *A. thaliana* korisnim bakterijama *Kosakonia radicincitans* ometa degradaciju proteina zavisnu od ubikvitina, dok istovremeno povećava ekspresiju alfa-3 subjedinice 20S proteazoma (Witzel *et al.*, 2017). Ovaj obrazac povećanja ekspresije se može tumačiti blokadom 26S ubikvitin-zavisne proteolize, tokom kog dolazi do nakupljanja 20S subjedinice (Book *et al.*, 2010). Takođe, Dudnik i saradnici su 2014. godine pokazali da endofitna bakterija *Rhysobium* sp. soj AP16 produkuje inhibitor proteazoma siringolin A. Mikroorganizmi mogu dovesti do kompleksnih promena u proteolitičkom putu biljke, što uključuje i targetiranje nekih proteina imunskog odgovora za degradaciju, kao i narušavanje obnove proteina neophodnih za adekvatan imunski odgovor (Langin *et al.*, 2023). Iako promene koje se detektuju u transkriptomu ne odražavaju uvek nivo ili funkcionalnost proteina, uticaj *P. phytofirmans* PsJN na ekspresiju značajnog broja gena vezanih za UPS i proteolizu sugerise da ovaj soj moduliše aktivnost proteolitičkih puteva u *A. thaliana* (slika 4.9, Nešić *et al.*, 2025 *supplementary materials (supplementary tables S2 i S3)*).

U ovom istraživanju je takođe uočeno *P. phytofirmans* PsJN-zavisno smanjenje ekspresije gena za proteine povezane sa patogenezom -PR (eng. *pathogenesis-related proteins*) i β -glukanaze u korenu. Ovi proteini su neophodni za biljnu odbranu i njihova ekspresija raste pri kontaktu biljke sa patogenima. Istraživanja su pokazala da u PGPB-inokulisanim biljkama dolazi do povećane akumulacije PR proteina koji su deo ISR mehanizma zaštite (Van De Mortel *et al.*, 2012; Leandro *et al.*, 2019). Međutim, istraživanja drugih autora su pokazala suprotan efekat, gde tokom inokulacije biljaka PGPB dolazi do smanjene ekspresije PR proteina, što sugerise da utišavanje pojedinih faktora odbrambenog odgovora biljke može dovesti do olakšane kolonizacije biljnog tkiva (Brusamarello-Santos *et al.*, 2012; Thomas *et al.*, 2019; Soares *et al.*, 2024).

Korisni i patogeni mikroorganizmi utiču na sastav ćelijskog zida, što im omogućava lakše prijanjanje i kolonizaciju. Primećena je smanjena ekspresija gena vezanih za formiranje i modifikaciju ćelijskog zida kod *A. thaliana* i pirinča u prisustvu PGPB. Pretpostavlja se da korisne bakterije mogu suprimirati modifikacije ćelijskog zida korena kako bi olakšale ranu fazu kolonizacije korena (Lakshmanan *et al.*, 2013; Rekha *et al.*, 2018). Uticaj PGPB na ćelijski zid u korenu zavisi od bakterijskog soja, biljne vrste, faze razvića i uslova gajenja. U našoj eksperimentalnoj postavci većina gena koji kodiraju za enzime i proteine vezane za ćelijski zid je imala smanjenu ekspresiju u korenu

nakon inokulacije sojem *P. phytofirmans* PsJN. Snižena ekspresija ovih gena kao i gena uključenih u odbranu i percepciju mikroorganizama (PR i RLK), sugerije da *P. phytofirmans* PsJN moduliše transkriptom korena u cilju smanjenja lokalnog imunskog odgovora i lakše kolonizacije.

Poznato je da korisni mikroorganizmi koji kolonizuju koren suprimiraju imunski odgovor biljke kako bi uspostavili kolonizaciju i mutualistički odnos (Yu *et al.*, 2019b). Iako se MAMP molekuli, kao elicitori imunskog odgovora ne razlikuju mnogo kod patogenih i korisnih bakterija, biljka ne podiže odbrambeni odgovor u prisustvu nepatogenih sojeva. Nedavno je uočeno da do imunskog odgovora ćelija korena dolazi samo kada su istovremeno prisutni i MAMP molekuli i oštećenja susjednih ćelija izazvana patogenima (Zhou *et al.*, 2020). Jedan od načina na koji mutualistički mikroorganizmi utišavaju imunske reakcije biljnog tkiva je i uticaj na sredinske faktore u neposrednoj blizini korena.

Yu i saradnici (2019) su pokazali da acidifikacija predstavlja kritičan mehanizam kojim rizosferni mikrobi suprimiraju imunitet domaćina kako bi olakšali kolonizaciju korena. Smanjenje ekspresije odbrambenih gena i gena vezanih za signalne puteve nakon inokulacije *A. thaliana* sojem *P. phytofirmans* PsJN ukazuje da i ove korisne bakterije suprimiraju imunske odgovore u korenu u cilju uspostavljanja i održavanja kolonizacije i mutualističkog odnosa.

5.2.2.2. Uticaj inokulacije *A. thaliana* sojem *P. phytofirmans* PsJN na ekspresiju gena koji učestvuju u interakciji biljke sa mikroorganizmima i indukovanoj sistemskoj rezistenciji - ISR u listovima

Analizom transkriptoma listova u ovoj studiji, uočeno je da se efekat soja PsJN na ekspresiju gena razlikuje od efekta koji ova PGPB ostvaruje u korenu. Dok su transkripti gena koji kodiraju za gene uključene u odbrambeni odgovor bili pretežno smanjeni u *P. phytofirmans* PsJN-inokulisanim korenovima, u listovima je ekspresija ovih gena uglavnom bila povećana (RLK, peroksidaze i PR proteini) ili različito regulisana (proteini ćelijskog zida). Takođe, dok je u korenu biljaka inokuliranih sojem *P. phytofirmans* PsJN detektovano i povećanje i smanjenje ekspresije različitih transkripcionih faktora i hormonskih puteva vezanih za odgovor na biotičke stimuluse, u listovima je njihova ekspresija bila uglavnom povećana; ovaj efekat je najuočljiviji na genima etilen-zavisnog puta (slika 4.9, Nešić *et al.*, *supplementary materials (supplementary tables S2 i S3)*). Promene u ekspresiji gena koji učestvuju u ISR u listovima *P. phytofirmans* PsJN-inokuliranih biljaka bez prisustva patogena u odnosu na kontrolne biljke ukazuju na ulogu bakterije u pripremi biljaka na brži i intenzivniji odgovor na patogene. Efekti ovakvog „prajminga“ biljaka bakterijom uočljivi su na listovima nakon infekcije gljivom u vidu blaže ispoljenih simptoma (slike 4.2 i 4.3). Druge studije su takođe sugerisale da je ISR važan mehanizam ostvarivanja protektivnog efekta PGPB u biljkama izloženim biotičkom stresu. Pokretanjem ISR, PGPB *Peribacillus frigiditolerans* štiti paradajz od *B. cinerea* povećanjem ekspresije gena koji učestvuju u signalnim putevima SA, JA i ET (Mazuecos-Aguilera *et al.*, 2025). Tretman sa *Bacillus cereus* AR156 kod *A. thaliana* dovodi do indukovane sistemske rezistencije protiv *B. cinerea* kroz aktivaciju JA/ET zavisnog signalnog puta i NPR1 (eng. *non-expressor of PR genes 1*)- zavisnog signalnog puta (Nie *et al.*, 2017).

Efikasni imunski odgovor biljke ne zavisi samo od *de novo* sinteze odbrambenih proteina već i od njihovih post-translacionih modifikacija i regulisane degradacije. Post-translacione modifikacije omogućavaju brže i dinamičnije odgovore na spoljašnje stimuluse i imaju važnu ulogu u imunitetu biljaka (Sharma *et al.*, 2021). Sve je više dokaza o pozitivnoj ulozi SUMO-ilacije (eng. *Small Ubiquitin-like MODifier conjugation*) u biljnom imunitetu. SUMO-ilacija funkcioniše kao molekularni prekidač koji može aktivirati ili inaktivirati proteine, omogućiti protein-protein interakcije, uticati na stabilnost i lokalizaciju proteina (Sharma *et al.*, 2021). Ova modifikacija reguliše funkcionisanje imunskog odgovora biljke jer su komponente odbrambenog signalnog puta prepoznate kao targeti

SUMO proteina. Sa druge strane, patogeni targetiraju SUMO-ilaciju domaćina kako bi manipulirali biljnom odbranom. Pokazana je pozitivna korelacija između SUMO-ilacije i rezistencije na fungalne patogene (Li *et al.*, 2013; Colignon *et al.*, 2017). U transkriptomima analiziranim u ovoj tezi, uočeno je vrlo izraženo povećanje ekspresije SAE1B (eng. SUMO-activating enzyme 1B), u listovima *P. phytofirmans* PsJN-inokuliranih biljaka (čak 19 puta). SAE1B kodira za jednu od dve subjediniice E1-aktivacionog enzima koji je neophodan za prepoznavanje SUMO proteina tokom SUMO-ilacije (Sharma *et al.*, 2021). Povećanje ekspresije SAE1B sugerise ulogu SUMO-ilacije u protektivnom efektu *P. phytofirmans* PsJN protiv infekcije *B. cinerea* (Nešić *et al.*, 2025, *supplementary materials (supplementary tables S2)*).

5.2.2.3. Uticaj inokulacije *A. thaliana* sojem *P. phytofirmans* PsJN na ekspresiju gena etilenskog puta

Inokulacija sojem *P. phytofirmans* PsJN dovodi i do lokalnih i sistemskih promena u ekspresiji gena koji učestvuju u etilenskom signalnom putu (slika 4.6). Izmenjena ekspresija ovih gena u korenu tokom mutualističkih interakcija sugerise da signalni put etilena učestvuje ne samo u odbrani od patogena već i u prepoznavanju korisnih endofitnih mikroorganizama i time potencijalno regulise kolonizaciju korena (Shekhawat *et al.*, 2022). Etilen može delovati i kao pozitivan i kao negativan regulator, u zavisnosti od soja i faze interakcije. Neki korisni mikroorganizmi kao što je *P. fluorescens* WCS417r indukuju produkciju etilena kako bi doveli do ISR (Shekhawat *et al.*, 2022). Sa druge strane, deo korisnih bakterija proizvodi ACC deaminazu koja snižava nivo etilena kako bi ublažila stres kod domaćina i podstakla rastenje potiskivanjem etilen-zavisnog odbrambenog sistema (Glick, 2014). Ovo ukazuje da je efekat etilena tokom interakcije biljaka sa mikroorganizmima zavisn od koncentracije, te da je fino regulisan put etilena ključan za uspostavljanje korisnih interakcija i pojačanje protektivnih dejstva korisnih mikroorganizama (Shekhawat *et al.*, 2022). Uočeno je da soj *P. phytofirmans* PsJN lokalno smanjuje nivo etilena aktivacijom ACC deaminaze (Sun *et al.*, 2009), ali takođe i da povećava ekspresiju etilena u korenu i izdanku (Pinedo *et al.*, 2015). Pokazano je i da je stimulativni efekat *P. phytofirmans* PsJN na rastenje *A. thaliana*, zavisn od etilena, jer je ovaj efekat izostao u ein2-1 mutantima (Pinedo *et al.*, 2015). Dakle, pretpostavlja se da *P. phytofirmans* PsJN fino moduliše put etilena kako bi doveo do korisnih efekata u biljkama. U transkriptomima analiziranim u ovoj tezi uočili smo da *P. phytofirmans* PsJN u korenu različito regulise pojedine gene povezane sa etilenom. Uzimajući u obzir i sniženje ekspresije gena za percepciju mikroorganizama, signalne puteve i PR proteine u korenu, može se pretpostaviti da utišani imunski odgovor i modulacija etilenskog puta može olakšati kolonizaciju korena i uspostavljanje mutualističkog odnosa.

U listovima, povećana ekspresija gena u etilenskom putu i signalnim putevima ukazuje na *P. phytofirmans* PsJN-indukovani sistemski odgovor, koji priprema biljku za napad patogena. Bitno je napomenuti da je nakon infekcije *B. cinerea*, među malobrojnim diferencijalno eksprimiranim genima u *P. phytofirmans* PsJN-inokuliranim biljkama, identifikovana povećana ekspresija gena etilenskog puta, što ukazuje na ključnu ulogu etilena u *P. phytofirmans* PsJN-posredovanoj ISR u *A. thaliana*. Ovo je u skladu sa velikim značajem ovog fitohormona za otpornost biljaka na nekrotrofne patogene (Ghozlan *et al.*, 2020).

Pored etilena, neke PGPB stimulišu i put jasmonata, koji je uključen u regulaciju odbrambenih gena. Uočili smo da *P. phytofirmans* PsJN povećava ekspresiju *ERF1*, faktora važnog za integraciju signala puteva etilena i jasmonata (Lorenzo *et al.*, 2003). Međutim, nijedan od enzima uključenih u biosintezu jasmonata nije bio diferencijalno eksprimiran u *P. phytofirmans* PsJN-inokuliranim biljkama 24 sata nakon infekcije sa *B. cinerea*. Analiza ekspresije regulatora JA puta u ranijim fazama odgovora, kao i proteomska analiza dale bi potpuniju sliku učešća ovog hormona u ISR izazvanoj sojem *P. phytofirmans* PsJN.

5.2.3. Promene u ekspresiji gena *A. thaliana* izazvane infekcijom *B. cinerea*

Analiza transkriptoma *A. thaliana* zaraženog *B. cinerea* omogućava uvid u odbrambene mehanizme biljke. Kao što je ranije opisano, biljka domaćin prolazi kroz reprogramiranje transkriptoma tokom infekcije *B. cinerea* (Wei *et al.*, 2024). Rezultati ove disertacije su potvrdili promene u metaboličkim putevima, signalnim kaskadama i regulaciji transkripcije 24 sata nakon infekcije (slika 4.10, Nešić *et al.*, 2025, *supplementary materials (supplementary tables S4 i S5)*).

Razumevanje reakcija koje se dešavaju u korenu biljaka na infekciju listova patogenom *B. cinerea* od suštinskog je značaja za rasvetljavanje složenih signalnih puteva koji upravljaju odbrambenim mehanizmima biljke, čemu je dosad malo posvećeno pažnje. U patosistemu *A. thaliana*-*B. cinerea* skoro 300 gena je imalo značajno povećanu, a oko 600 smanjenu ekspresiju u korenu nakon infekcije listova (poređenje CBc vs CNI). Oni učestvuju u nekoliko ključnih procesa: biosintezi i regulaciji etilena, metabolizmu šećera i odbrani od stresa. Među genima vezanim za etilen, gen *ACO3* je pokazao najznačajniju promenu u ekspresiji u odnosu na neinficirane biljke. Ovaj gen ima ključnu ulogu u poslednjem koraku biosinteze etilena. Transkripcioni faktori odgovora na etilen kao što su *ERF15*, *ERF35*, *RAP2.9* i *ORA59*, takođe su imali povećanu ekspresiju u korenu, što sugerše bitnu ulogu etilena u odgovoru na patogene i u nadzemnim i udaljenim podzemnim organima biljke. Identifikovali smo i povećanu ekspresiju gena uključenih u metabolizam šećera tokom odgovora na infekciju kao što su *SUS3* (sintaza saharoze) i *SWEET11* i *SWEET12* (transporteri šećera). Ranije je pokazano da se transporteri *SWEET11* i *SWEET12* akumuliraju u korenu tokom stresnih uslova, čime se olakšava transport saharoze iz apoplasta u ćelije korena (Fatima *et al.*, 2022). Ovaj proces omogućava rast korena premeštanjem saharoze iz listova u korenove (Durand *et al.*, 2016). Osim toga *SWEET* transporteri regulišu dostupnost šećera u biljci od nadzemnog do podzemnog dela i potom ih dostavljaju korisnim rizobakterijama (Desrut *et al.*, 2021). Povećana je i ekspresija metalotienina *MT2* koji ima važnu ulogu u odgovoru na oksidativni stres i homeostazu metala (Liu *et al.*, 2022).

5.2.4. Promene u ekspresiji miRNK *A. thaliana* izazvane inokulacijom sojem *P. phytofirmans* PsJN i infekcijom *B. cinerea*

Osim promena u ekspresiji gena, tokom izlaganja biljke stresu dolazi i do promena u ekspresiji miRNK. Inokulacija sojem *P. phytofirmans* PsJN nije značajno uticala na ekspresiju miRNK kod analiziranih biljaka, bez obzira na prisustvo infekcije. U neinficiranim listovima jedino je ath-miR8183 pokazala značajno povećanje ekspresije, a njeni targeti povezani su sa degradacijom proteina i sintezom DNK. U korenu neinficiranih biljaka nisu zabeležene značajne promene u ekspresiji miRNK.

Tokom infekcije gljivom *B. cinerea*, prisustvo soja *P. phytofirmans* PsJN izazvalo je promene u ekspresiji dve miRNK u listovima — ath-miR163 i ath-miR845a — koje su imale smanjenu ekspresiju. Njihovi predikovani targeti učestvuju u metabolizmu fitohormona, sintezi DNK, posttranslacionim modifikacijama i ćelijskoj deobi. U korenu je povećana ekspresija ath-miR161.1, dok su ath-miR158a-3p i ath-miR159c imale smanjenu ekspresiju, a njihovi targeti povezani su sa regulacijom transkripcije.

Mali broj miRNK sa značajno promenjenom ekspresijom pod uticajem *P. phytofirmans* PsJN u ovoj eksperimentalnoj postavci, može biti odraz dinamičke prirode ekspresija ovih nekodirajućih RNK. Poznato je da male regulatorne RNK, uključujući miRNK, podležu brzim promenama nivoa ekspresije u ćeliji i da svoj regulatorni uticaj na targete najčešće ostvaruju u ranim fazama odgovora na stres. Njihov nivo ekspresije može brzo da se menja nakon delovanja stresnog faktora, što

omogućava brzu regulaciju targeta. U ovoj studiji su analizirane promene u nivoima miRNK, kao i mRNK, dve nedelje nakon inokulacije bakterijom, čime se može objasniti dobijen rezultat. Pretpostavljamo da soj korišćen u ovoj tezi, kao i druge PGPB, ima značajnijeg uticaja na ekspresiju miRNK u ranijim fazama kolonizacije.

Sama infekcija patogenom *B. cinerea* izmenila je ekspresiju nešto većeg broja miRNA u listovima *A. thaliana*, dok je u korenu detektovana statistički značajna promena samo za jednu miRNK. Integrativnom analizom ekspresije parova miRNK i njihovih predikovanih targeta, identifikovana su dva miRNK-iRNK para koja mogu biti uključena u odgovore na biotički stres. U listovima biljaka inficiranih *B. cinerea* povećana je ekspresija ath-miR168a-3p, dok je njen target *BDG4* imao smanjenu ekspresiju. Zanimljivo je da je ova miRNK takođe imala povećanu ekspresiju u *A. thaliana* tokom infekcije *Sclerotinia sclerotiorum* (Cao *et al.*, 2020). *BDG4* je povezan sa rezistencijom na nivou kutikule i odbranom biljaka. Biljke *A. thaliana* sa izmenjenom strukturom kutikule imale su potpuni imunitet na zaražavanje *B. cinerea* (Bessire *et al.*, 2007), dok su *bdg4* mutanti imali povećanu rezistenciju na *B. cinerea* (Chassot *et al.*, 2007; Voisin *et al.*, 2009; Aragón *et al.*, 2021). Pored uloge u vidu fizičke barijere, kutikula je verovatno uključena u signalnu transdukciju, i *BDG4* kao njen sastavni deo može igrati značajnu ulogu u interakcijama biljka – patogen, posebno protiv *B. cinerea*, doprinoseći otpornosti biljke (Aragón *et al.*, 2021).

Efekat infekcije *B. cinerea* kod *P. phytofirmans* PsJN-inokulisanih biljaka obeležen je smanjenom ekspresijom ath-miR866-3p i povećanom ekspresijom njenog predikovanog targeta kinaze *CRK28* (*cysteine-rich receptor-like protein kinase 28*) koja ima ulogu u antimikrobnom odgovoru. U *A. thaliana* *CRK28* ima ključnu ulogu u integraciji različitih sredinskih signala u cilju regulacije odgovora na stres, naročito onih povezanih sa signalnim putem abscisinske kiseline (Pelagio-Flores *et al.*, 2020). *CRK28* interaguje sa drugim komponentama kako bi se formirao imunološki kompleks PRR koji je neophodan za pokretanje PTI, uključujući produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta – ROS i programiranu ćelijsku smrt. Konstitutivno povećanje ekspresije *AtCRK28* povećava otpornost *A. thaliana* na hemibiotrofni bakterijski patogen *Pseudomonas syringae* patovar DC3000 (Yadeta *et al.*, 2017). Nasuprot tome, kod *crk28* mutanta dolazi do ozbiljnih simptoma bolesti nakon infekcije sojem DC3000 i veće osetljivosti na biotrofne fungalne patogene poput *Golovinomyces orontii* (Zhang *et al.*, 2023; Zeiner *et al.*, 2023). Naši rezultati ukazuju da ath-miR866-3p, čiji je *AtCRK28* predikovani target, može biti uključena u odgovor na patogene poput *B. cinerea*.

U biljkama inficiranim patogenom *B. cinerea*, dve miRNK povećane ekspresije, ath-miR158b i ath-miR858b targetiraju transkripcione faktore koji učestvuju u odgovoru na hipoksiju. Ath-miR158b dovodi do smanjene ekspresije *bHLH94*, transkripcionog faktora koji pripada bHLH familiji, drugoj najvećoj familiji biljnih transkripcionih faktora posle MYB transkripcionih faktora. Pokazano je da je ekspresija *bHLH94* bila smanjena tokom stresa izazvanog poplavama i osmotskog stresa (Pereira-Santana *et al.*, 2017; Nuanlaong *et al.*, 2021). Familija bHLH transkripcionih faktora je naročito važna u signalnim putevima i odgovorima zavisnim od jasmonata, poput sinteze flavonoida i odbrane od herbivora i patogena (Goossens *et al.*, 2016). Ath-miR858b po predikciji targetuje transkripcione faktore MYB familije koji regulišu različite puteve sekundarnog metabolizma. Ekspresija *MYBL2* (eng. *MYB-like 2*) i *MYB20* je bila smanjena, dok je ekspresija *MYB13* i *MYB37* bila povećana u poređenju CBc sa CNI. Ath-miR858 je najčešće povezana sa MYB transkripcionim faktorima specifičnim za flavonoide i učestvuje u otpornosti na nekrotrofne i hemibiotrofne patogene kod *A. thaliana* (Sharma *et al.*, 2016; Camargo-Ramírez *et al.*, 2018).

Nekolicina miRNK identifikovanih u ovoj disertaciji ranije je povezano sa odgovorima na sušu ili stres izazvan poplavama. Ekspresija ath-miR157a-3p je bila povećana i kod neinokulisanih i *P. phytofirmans* PsJN-inokulisanih biljaka nakon infekcije sa *B. cinerea* (Nešić *et al.*, 2025, *supplementary materials (supplementary tables S6)*). Ova miRNK je uočena i tokom suše u biljkama

Medicago sativa (Li *et al.*, 2017). U transkriptomima analiziranim u ovoj tezi, ekspresija targeta ove miRNK, *OHP2* (eng. *ONE-HELIX PROTEIN 2*), je bila smanjena i u CBc i u PBc biljkama. Ovaj gen je neophodan za fotosintezu i značajan tokom prilagođavanja na određene svetlosne uslove (Beck *et al.*, 2017).

Infekcija patogenom *B. cinerea* izmenila je i ekspresiju ath-miR161.1 i ath-miR161.2, kao i njihovih targeta iz familije gena *PPR* (eng. *Pentatricopeptide Repeat*). PPR proteini učestvuju u raznim aspektima RNK metabolizma, a neki od njih imaju važne uloge u odgovorima na biotičke i abiotičke stresove u *A. thaliana* i drugim vrstama (Laluk *et al.*, 2011; Xing *et al.*, 2018).

5.3. Ekstracelularne vezikule Gram-negativnih bakterija

Iako se ranije smatralo da su vezikule čestice prašine danas se zna za njihov značaj tokom intraspecijske i interspecijske komunikacije između ćelija. Tokom poslednjih 25 godina istraživanja ekstracelularnih vezikula su dokazala da ove strukture postoje u svim carstvima, i da njihov sadržaj nije nasumičan već je proizvod selekcije, čime se obezbeđuje željeni odgovor od recipijenta EV (Raposo & Stoorvogel, 2013).

5.3.1. Bioinformatička analiza sRNK asociranih sa OMV

Sadržaj koji transportuju EV čine biomolekuli kao što su DNK, RNK, proteini i mnogi drugi. Pokazano je da ovi molekuli nisu nasumično spakovani u vezikule već prolaze proces selekcije. Kao regulatorni molekuli male RNK predstavljaju idealan način kojim ćelije mogu regulisati ekspresiju svojih gena koji iziskuje manje energije od drugih tipova regulacije (Harfouche *et al.*, 2015). Bakterijske male RNK učestvuju u regulaciji različitih bioloških procesa kao što su energetske metabolizam (metabolizam ugljenika, azota, aminokiselina, gvožđa), quorum sensing, formiranje biofilмова i odgovor na stres (Michaux *et al.*, 2014; Ajam-Hosseini *et al.*, 2024).

S obzirom na dostupnost i razvoj brojnih algoritama i alata za korišćenje podataka iz različitih RNA-seq podataka i činjenicu da je svaki od njih najbolji izbor pod određenim uslovima, izbor odgovarajućeg mapera za dati skup podataka postaje veoma važan zadatak. Većina dosadašnjih studija izvedena je na DNA-seq i RNA-seq podacima, kako na dugim tako i na kratkim sekvencama, ali uglavnom na eukariotskim genomima (Hatem *et al.*, 2013; Baruzzo *et al.*, 2017). U određenoj meri su takve studije sprovedene na prokariotskim genomima, ali uglavnom na DNA-seq i metagenomskim studijama, ili RNAseq kroz razvoj i testiranje određenih alata (Gaur & Chaturvedi, 2017; Thankaswamy-Kosalai *et al.*, 2017). Nijedna studija se nije bavila uporednom analizom različitih alata za poravnanje malih RNK asociranih sa bakterijskim ekstracelularnim vezikulama na bakterijski referentni genom. U okviru ove disertacije je testirano pet mapera poznatih po generalno dobrim performansama, kako bi se specifičan skup sRNK asociranih sa OMV bakterije *A. fischeri* mapirao na referentni genom dostupan u bazama podataka.

Uočene razlike u stopama poravnanja i dodeljivanja, pokrivenosti, srednjem kvalitetu mapiranja - MAPQ, *mismatches* i indeli između pet mapera su bile očekivane, imajući u vidu da svaki algoritam poravnanja ima svoje specifične MAPQ opsega, kao i pozitivno i negativno bodovanje za podudaranja i nepodudaranja u zavisnosti od korišćene matrice bodovanja. Pošto svaki mapper ima specifične prednosti i nedostatke, oni se moraju uzeti u obzir u zavisnosti od karakteristika skupa podataka za koji se koriste. Sličan i očekivan zaključak su doneli i Donato i saradnici 2021. godine, kada su 17 mapera, uključujući i pet koje su testirane u ovoj disertaciji, testirali u pogledu performansi na različitim empirijskim i/simuliranim humanim i mišjim DNA-seq i RNA-seq podacima. Autori su pokazali da je svaki alat davao najbolje rezultate pod određenim uslovima i da se tačnost mapera razlikovala za različite RNAseq podatke. Po ocenama koje su im dodeljene maperi su rangirani u

opadajućem redosledu: najviše za Segemehl i BWA-MEM, zatim BBmap i Minimap2, i na kraju Bowtie2. Pošto su organizmi iz kojih su izvedeni skupovi podataka i referentni genom i eukariotski i različite dužine i složenosti od onih koje su testirani u okviru ove teze ekstrapolacija na naše podatke ne bi bila pouzdana. Međutim, pošto nedostaju informacije za različite mapere korišćene za mapiranje različitih RNA-seq na bakterijske referentne genome, mogli smo se samo osloniti na ove podatke, iako smo svesni ograničenja takve ekstrapolacije.

Kroz poređenje rezultata mapiranja OMV-sRNK *A. fischeri* sa njihovim podrazumevanim podešavanjima, Segemehl bi trebalo izbegavati jer ima najduže vreme mapiranja i najveći stepen višestukog mapiranja. Preostala četiri mapera su pokazala generalno dobre metrike, a prednosti i nedostaci na osnovu na osnovu ukupnih performansi nisu bili potpuno presudni ni u jednom slučaju kada su testirani sa *A. fischeri* genomom i ovim specifičnim podacima OMV-sRNK. Stoga je za ovaj skup podataka bilo neophodno ukrstiti rezultate najmanje dva mapera sa različitim performansama kako bi se izdvojio preklapajući rezultat za dalju analizu. Međutim, dobijen razlike ne treba olako odbaciti, već ih pažljivo razmotriti u biološkom kontekstu, čime se sugeriše pristup *intersect-then-combine* kao najbolji da analizu ovih podataka.

Izbor mapera je i dalje otvoreno pitanje jer performanse zavise ne samo od algoritamskog dizajna i matrica bodovanja, već i od specifičnih karakteristika skupa podataka, kao što su dužina čitanja, veličina genoma i raspodela ponavljanja. Stoga je odabir optimalnog mapera za analizu bakterijskih sRNK od ključnog značaja. Uzimajući u obzir to da detekcija sRNK asociranih sa OMV zavisi od njihovog mapiranja na referentni genom, i na raznovrsnost dostupnih mapera, važno je da se izbor mapera ne vrši proizvoljno, već da se razmotri koji je mapper ili kombinacija mapera najpogodnija za konkretan skup podataka i referentni genom. Takav pristup doprinosi unapređenju detekcije biološki značajnih sRNK asociranih sa OMV, zasnovanom na mapiranju na referentni genom.

5.3.2. Analiza sRNK asociranih sa OMV soja *P. phytofirmans* PsJN

Nakon NGS sekvenciranja, male RNK iz OMV i ćelija *P. phytofirmans* PsJN mapirane su na referentni genom korišćenjem četiri alata za mapiranje BBmap, Minimap2, Bowtie2 i BWA. Poređenjem procenta mapiranih sekvenci (tabela 4.6) na referentni genom izdvojio se BWA mapper koji je mapirao ubedljivo najveći broj sekvenci.

Bioinformatička analiza sekvenci malih RNK koje su asocirane sa OMV soja *P. phytofirmans* PsJN pokazala je da se one značajno razlikuju od populacije sRNK koje se nalaze unutar bakterijskih ćelija *P. phytofirmans* PsJN. Ovi rezultati pokazuju da pakovanje ovih biomolekula u OMV nije nasumičan proces, već rezultat selekcije.

Među sekvencama sRNK iz *P. phytofirmans* PsJN-OMV izolata uočava se značajan broj onih sa dužinama manjim od 40nt. Pristupom SE50 detektovane su i sRNK dužina oko 20nt. Iako bakterijske male regulatorne RNK mogu biti i dužina do 200nt pa i više, u novijim istraživanjima poklanja se pažnja i prokariotskim sRNK koje su po dužini slične eukariotskim mikro RNK (Kang *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2018). Neki autori pretpostavljaju da ove sRNK u bakterijskim EV mogu delovati analogno miRNK eukariota i da mogu modulirati ekspresiju gena domaćina (Yu *et al.*, 2022).

Rezultati ove disertacije ukazuju da je sRNK populacija obogaćena u OMV većinom potiče sa lokusa sa koji kodiraju za proteine, dok je znatno manji broj sRNK poreklom sa rRNK i tRNK lokusa (slika 4.21-23). Slična zastupljenost lokusa sa kojih OMV-sRNK vode poreklo uočena je i za OMV-sRNK bakterije *A. fischeri* i *Xantomonas* (Tang *et al.*, 2020; Banović Đeri *et al.*, 2024). Sa druge strane, Diallo i saradnici su analizirali OMV-sRNK *E. coli* i pokazali da je najveća zastupljenost sRNK poreklom od rRNK lokusa. Koeppen i saradnici su sekvenciranjem sRNK asociranih sa OMV

Pseudomonas aeruginosa pokazali da su sRNK poreklom od iRNK i rRNK lokusa podjednako zastupljene, i u većem broju od sRNK poreklom od tRNK (Koeppen *et al.*, 2016; Diallo *et al.*, 2022). Ghosal i saradnici su sekvenciranjem RNK asociranih sa OMV *E. coli* MG1655 pokazali da su RNK koje se nalaze u okviru OMV frakcije dužina do 60 nukleotida, a da je najzastupljenija populacija RNK dužina između 15 i 40 nukleotida. RNK asocirane sa OMV su pretežno tRNK fragmenti – tRF, a manji udeo vodi poreklo od rRNK (Ghosal *et al.*, 2015). Resch i saradnici su 2016. godine sekvencirali RNK asocirane sa membranskim vezikulama (MV) Gram-pozitivne bakterije *Streptococcus pyogenes*. Njihovi rezultati su pokazali da većina MV-RNK *S. pyogenes* potiču od rRNK i tRNK. RNK sa velikom zastupljenošću u MV su mapirane unutar gena za cink-responsivni represor adhezivne kompetencije – *adcR*, anaerobnu ribonukleozid-trifosfat reduktazu – *nrdG*, subjedinicu A egzonukleaze-helikaze - *rexA*, i endonukleazu tip 1 – *hsdR* (Resch *et al.*, 2016).

Iz navedenog se može zaključiti da različite bakterijske vrste i sojevi imaju različitu zastupljenost tipa lokusa sa koga OMV-sRNK vode poreklo. Osim toga, različite pripreme biblioteka i načini sekvenciranja možda mogu doprineti postojanju ovih razlika. Ipak, povećana zastupljenost određenih sRNK u OMV potvrđuje pretpostavku da se bakterijske sRNK selektivno pakuju u OMV, što ukazuje na njihovu moguću ulogu u inter- i intra-specijskoj komunikaciji.

Mehanizmi selekcije sRNK u OMV još uvek nisu poznati. Kod eukariota većina RNK se transportuje iz nukleusa do specifične ćelijske lokalizacije uz pomoć RNK-vezujućih proteina (O'Brien *et al.*, 2020). Pored RNK-vezujućih proteina, za pakovanje RNK u EV mogu biti zaslužne i sekundarne strukture RNK. U eksperimentima rađenim na sisarskim EV je pokazano da čak 25% proteinskog sastava EV čine RNK-vezujući proteini (O'Brien *et al.*, 2020). Zanimljivo bi bilo uraditi proteomsku studiju OMV, ali se na osnovu podataka iz eukariotskih EV može pretpostaviti da RNK-vezujući proteini, kao što je Hfq, mogu imati u ulogu u selekciji i transportu malih RNK u OMV.

Uloga malih RNK asociranih sa bakterijskim vezikulama veoma je malo ispitana. Najintrigantnije je njihovo moguće učešće u patogenoj ili komensalnoj interakciji bakterija sa domaćinom, na koju ukazuju neka istraživanja.

Koeppen i saradnici su 2016. godine po prvi put uspeali da detektuju transport male RNK upakovane u OMV patogene bakterije *P. aeruginosa* u humane epitelne ćelije disajnih puteva. Mala RNK sRNA52320 reguliše imunske odgovore kako u humanim ćelijama tako i u plućima miševa. Ova mala RNK, poreklom od tRNK metionina, smanjuje LPS-indukovanu i OMV-indukovanu sekreciju IL-8 u humanim epitelnim ćelijama disajnih puteva. Ona ublažava OMV-indukovanu sekreciju KC citokina i infiltraciju neutrofila, koji uništavaju bakterijske ćelije, u plućima miševa. Sličan način delovanja ostvaruju i sR-2509025 i sR-989262 upakovane u OMV *Helicobacter pylori* (Zhang *et al.*, 2020). Pokazano je da se ove male RNK isporučuju u ćelije adenokarcinoma želuca gde dovode do smanjenja OMV-indukovane sekrecije IL-8.

Uloga OMV-sRNK vrlo je slabo istraživana u međućelijskoj komunikaciji unutar jedne bakterijske populacije ili između različitih vrsta u zajednici mikroorganizama. Ipak, poznato je da bakterijske EV učestvuju u prenosu drugih biomolekula koji služe za koordinaciju grupnog ponašanja ili za borbu protiv kompetitora (Li *et al.*, 1998; Shao *et al.*, 2024). Može se pretpostaviti da i male RNK koje nose EV utiču na regulaciju procesa u recipijentnim mikrobnim ćelijama. Jedan od najvažnijih načina koordinacije ćelija u bakterijskoj populaciji je kvorum sensing. Ovim mehanizmom ćelijske komunikacije kontroliše se formiranje biofilma, bioluminescencija i proizvodnja faktora virulencije. Neke od sRNK uključene su u kontrolu QS utičući na ekspresiju QS regulatornih faktora. Među najzastupljenijim sRNK u *P. phytofirmans* PsJN-OMV nalazi se i sRNK sa lokusa Bphyt_0507 čiji je predikovani target transkripcioni regulator iz LuxR familije, koja je uključena u QS. Među predikovanim targetima ostalih sRNK nalaze se i transkripcioni regulatori iz LusR familije globalnih regulatora koji upravljaju različitim procesima, uključujući metabolizam,

kvorum sensing, pokretljivost, virulenciju i interakciju sa biljkom domaćinom. Dalja istraživanja pokazaće da li se ove male RNK isporučuju drugim bakterijskim ćelijama u populaciji putem OMV i tako ostvaruju svoj uticaj na QS i ostale procese.

GO analiza predikovanih targeta sRNK asociiranih sa *P. phytofirmans* PsJN-OMV je pokazala visoku zastupljenost gena koji kodiraju za membranske proteine i gena uključenih u transmembranski transport. Ovi proteini imaju važnu ulogu u adaptaciji mikroorganizama na različite sredinske uslove, kao i u patogenezi i antimikrobnoj rezistenciji (Özkan *et al.*, 2024). Transmembranski transport je osnovni mehanizam koji omogućava bakterijama da komuniciraju prenošenjem signalnih molekula. Među predikovanim targetima nalaze se i receptori uključeni u percepciju signala, kao što je MCP – eng. *methyl accepting chemotaxis sensory transducer* Bphyt_0218. Hemotaksija je veoma važna za održanje bakterijskih populacija. Detekcijom signala pomoću MCP-a i naknadnim prilagođavanjem pokretljivosti, bakterije mogu da lociraju i kolonizuju mikrookruženja bogata hranljivim materijama, što je ključno i za simbiotske odnose i za patogenezu (Salah Ud-Din & Roujeinikova, 2017).

Treba napomenuti da trenutno dostupnim alatima za predikciju targeta bakterijskih sRNK nije moguće pouzdano predvideti da li bi njihov uticaj na ekspresiju predikovanih ciljnih gena bio inhibirajući ili aktivirajući. Dalja istraživanja koja bi uključivala testiranje ulaska OMV-sRNK u recipijentne bakterijske ili biljne ćelije, eksperimentalnu potvrdu targeta, kao i poređenje zastupljenosti različitih OMV-sRNK u kulturi bakterija koje su rasle u prisustvu ili odsustvu eksudata korena, približiće nas boljem razumevanju uloge OMV i sa njima asociiranih sRNK u uspostavljanju kolonizacije korena i održavanju mutualističkog odnosa.

5.3.3. Interakcija OMV soja *P. phytofirmans* PsJN sa klijancima *A. thaliana* i *S. lycopersicum*

Interakcija između biljaka i bakterija koje su s njima asociirane je složen proces, a ekstracelularne vezikule predstavljaju jedan od novih i još uvek nedovoljno istraženih učesnika. Pokazano je da bakterijske ekstracelularne vezikule utiču na eukariotske ćelije. OMV veoma virulentnog soja *E. coli* prenose faktore virulencije koji se oslobađaju u humanim ćelijama i indukuju inflamatorni odgovor i apoptozu ćelija domaćina (Kunsmann *et al.*, 2015). Za razliku od ostalih metoda sekrecije, OMV patogenima omogućavaju transport virulentnih molekula u većoj koncentraciji, kao i zaštitu svog sadržaja od razgradnje proteazama domaćina (Zhao *et al.*, 2025). Takođe, patogene bakterije koriste sposobnost pakovanja virulentnih molekula u OMV kako bi istovremeno napale domaćina sa više različitih faktora virulencije (Zhao *et al.*, 2025). Iako su OMV koje proizvode gram-negativne patogene i komensalne bakterije u poslednje vreme privukle značajnu pažnju kod ljudi, svojstva i uloga OMV korisnih bakterija u komunikaciji sa biljkama je slabo istražena. Dugo se sumnjalo u razmenu EV između biljnih ćelija i njihove okoline, jer su pore u ćelijskom zidu biljaka znatno manje od prečnika EV (Carpita *et al.*, 1979). Međutim, kada su detektovane ekstracelularne vezikule biljnog porekla, zaključeno je da je uprkos veličini pora ćelijskog zida njihov transport omogućen. Takođe, enzimi koji razgrađuju ćelijski zid, kao što su celulaza, ksilanaza, pektin liaza, i lipaze, pronađeni su u asocijaciji sa bakterijskim vezikulama (Sidhu *et al.*, 2008; Feitosa-Junior *et al.*, 2019). Oslobađanje ovih komponenti može olakšati prolazak EV kroz ćelijski zid. OMV koje proizvode i patogene i korisne bakterije nose imunogene molekule i mogu izazvati imunološke odgovore kod biljaka, pripremajući biljke za bakterijske i fungalne infekcije (Bahar *et al.*, 2016; McMillan *et al.*, 2021; Janda *et al.*, 2023). Sa druge strane, OMV koje proizvode neki fitopatogeni, kao što je *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* imaju imunosupresivno dejstvo čime olakšavaju infekciju i širenje patogena (Wu *et al.*, 2024). Ovaj fitopatogen sekretuje OMV koje prenose malu RNK Xosr001 i u ćelijama pirinča inhibira transkripciju OsJMT1 čime se suprimira endogena akumulacija metil jasmonata i zatvaranje stoma, što omogućava ulazak patogena u biljku (Wu *et al.*, 2024). Primećeni su i drugi načini na koje delovanje OMV podržava širenje

patogena, na primer blokiranjem vezivanja bakterija za površine čime se povećava kretanje bakterija unutar ksilema i olakšava kolonizacija biljke (Ionescu *et al.*, 2014). Iako ovi efekti naglašavaju važnu ulogu OMV u interakciji bakterija i biljaka, veoma su oskudna istraživanja kako OMV prenose signale i isporučuju efektorne molekule. Jedino detaljno istraživanje ove teme sprovedi su Tran i saradnici 2022. godine. Oni su pokazali integraciju OMV patogene bakterije *Xanthomonas campestris* u plazma membranu ćelija *A. thaliana*.

Što se tiče korisnih rizosfernih i endofitnih bakterija, mehanizam putem kojeg OMV stupaju u interakciju sa biljnim ćelijama ostaje nejasan. Neka od ranijih istraživanja su sugerisala da OMV korisnih bakterija direktno stupaju u kontakt sa biljnim ćelijama i isporučuju svoj sadržaj na površinu biljnih ćelija ili unutar njih tokom uspostavljanja ili održavanja simbioze. Nod faktori, signalni molekuli bakterija koji su ključni za uspostavljanje simbioze između rizobija i leguminoza, pronađeni su u izolatima OMV koje proizvode *Rhizobium etli* CE3 kada se gaji u medijumu sa dodatkom flavonoida naringenina odnosno u uslovima koji imitiraju simbiozu (Taboada *et al.*, 2019). Autori sugerišu da OMV mogu poslužiti kao transportno sredstvo za Nod faktore, štiteći ih od razgradnje i omogućavajući njihovu primenu ne epidermalne ćelije korena u koncentrisanijem obliku u odnosu na Nod faktore koji nisu upakovani u OMV. OMV koje proizvode rizobije u uslovima koji imitiraju simbiozu izazvali su značajnu deformaciju korenskih dlačica, povećali ekspresiju gena za nodulaciju i smanjili ekspresiju odbrambenih gena (Taboada *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2022). Do danas, direktni kontakt rizobijskih OMV sa površinom biljnih ćelija nije primećen, a mehanizam interakcije bakterijskih vezikula sa korenskim dlačicama leguminoza nije razjašnjen.

Naši rezultati ukazuju da OMV koje proizvodi rizosferna nerizobijalna bakterija *P. phytofirmans* PsJN direktno stupaju u kontakt sa epidermalnim ćelijama korena. Prvobitno je ovaj kontakt primećen nakon inkubacije korenova *A. thaliana* i *S. lycopersicum* sa OMV koje su obeležene bojom koja se vezuje za lipide Vybrant™ DiD. Kako bi se utvrdilo da li su OMV prisutne samo na površini ćelija korena ili se fuzionišu sa membranama epidermalnih ćelija, korišćena je boja Rhodamine-R18 koja pokazuje fluorescentni signal samo nakon fuzije membrana (Bomberger *et al.*, 2009). Intenzivan crveni signal je detektovan u epidermalnim ćelijama korenova što ukazuje na to da su se membrane OMV fuzionisale sa ćelijskim membranama biljaka. Ova fuzija može uključivati plazma membranu ili membrane nekih intracelularnih kompartmenta nakon endocitoze vezikula. Fuzija patogenih OMV sa plazma membranom eukariotskih ćelija domaćina ranije je primećena kod humanih i biljnih ćelija (Rompikuntal *et al.*, 2012; Tran *et al.*, 2022). Ako R18 signali koje smo uočili potiču od fuzije *P. phytofirmans* PsJN-OMV sa plazma membranama biljnih ćelija, sadržaj OMV bi bio isporučen u citoplazmu epidermalnih ćelija, dok bi se membrane OMV integrisale u plazma membranu. Sam događaj integracije modifikuje pakovanje lipida u membrani čime se menjaju njena fizičko-hemijska svojstva, što dalje utiče na ćelijske procese (Tran *et al.*, 2022). Autori ovog rada su sugerisali da ovaj mehanizam igra ključnu ulogu u interakcijama između mikroorganizama i biljnih ćelija nezavisno od MAMP. Nivo zasićenosti lipida je važan faktor koji utiče na rigidnost i fluidnost membrane. Biljne plazma membrane su bogate nezasićenim masnim kiselinama kako bi održala fluidnost neophodna za funkcionisanje biljnih ćelija (Reszcyńska & Hanaka, 2020). Sa druge strane, nivo zasićenosti membrane OMV je znatno viši što doprinosi povećanoj rigidnosti membrane, neophodnoj za formiranje i stabilnost vezikula (Tashiro *et al.*, 2011). Dakle fuzija membrana OMV sa biljnim membranama menja nivo zasićenosti i simetrije fosfolipida u biljnoj plazma membrani, što rezultira povećanom uređenošću lipida i gustine pakovanja (Tran *et al.*, 2022). Povećanje uređenosti lipida i kompartmentalizacija membrana smatraju se ključnim za formiranje signalnih kompleksa na biljnoj plazma membrani kao odgovor na abiotičke i biotičke stimuluse iz okoline (Huang *et al.*, 2019a; Tran *et al.*, 2020; Ke *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2021). Visoki stepen uređenosti nanodomena na površini biljnih ćelija je ključan za signalnu transdukciju tokom interakcija biljaka i patogena (Bücherl *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2019b). Tran i saradnici (2022) su pokazali da je integracija OMV u biljnu plazma membranu zavisna od nanodomena koji sadrže fitosteroles i remorine u membrani

recipijenta. Sa druge strane, integracija OMV izaziva grupisanje remorin proteina i pojačava formiranje nanodomena, uspostavljajući povratnu spregu koja dovodi do povećane kompartmentalizacije plazma membrane što na kraju rezultuje pokretanjem imunskog odgovora. U pomenutoj studiji nije uočena endocitoza OMV, već su njihove membrane ostale umetnute u biljnu plazma membranu.

Međutim, osim fuzije vezikula s plazma membranom, postoje i drugi mogući putevi ulaska OMV i isporuke njihovog sadržaja u recipijentsku ćeliju, uključujući klatrin-zavisnu i klatrin-nezavisnu endocitozu (O'Donoghue & Krachler, 2016). Način ulaska zavisi od sastava OMV i njihovih površinskih karakteristika, koje se razlikuju među vrstama ili sojevima i menjaju pod uticajem faktora iz okoline i signala iz organizama sa kojim interaguju (McBroom & Kuehn, 2007; O'Donoghue & Krachler, 2016; Taboada *et al.*, 2019). Pored toga, vezikule koje proizvode iste ćelije pod istim uslovima nisu homogene, već variraju po veličini i karakteristikama (Ñahui Palomino *et al.*, 2021). Ukoliko se *P. phytofirmans* PsJN-OMV internalizuju u biljne ćelije putem endocitoze, posmatrani R18 signali mogli bi poticati od fuzije OMV membrana sa membranama unutarćelijskih kompartamenta. Ovakav način ulaska takođe bi omogućio isporuku njihovog sadržaja i interakciju sa ćelijskim komponentama *A. thaliana*. Slični mehanizmi opisani su i u drugim sistemima. Na primer, Cañas i saradnici (2016) su pokazali da OMV obeležene sa R18, poreklom od probiotskih i komensalnih sojeva *E. coli* ulaze u epitelne ćelije ljudskih creva preko klatrin-zavisne endocitoze. Ovaj način ulaska opisan je i za OMV patogenih bakterija (Parker *et al.*, 2010), dok je klatrin-nezavisna endocitoza, takođe pokazana tokom interakcije OMV periodontalnog patogena sa humanim ćelijama (Furuta *et al.*, 2009).

U ovom trenutku teško je pretpostaviti da li bi sadržaj koji nose OMV nerizobijalnih PGPB mogao da pokrene signalne događaje u ćelijama korenova, a ako bi mogao koji molekuli bi bili uključeni. Prepoznavanje nerizobijalnih bakterija koje podstiču rastenje biljaka (PGPB) verovatno uključuje preklapanje puteva simbioze i imuniteta, pri čemu biljke balansiraju pozitivne i antagonističke signale kako bi odredile kompatibilnost i uzajamnu korist. Za razliku od simbioze rizobija i mahunarki, gde su Nod faktori i LysM receptori dobro definisani, signalni molekuli koji stoje iza mutualističkih interakcija između biljaka i nerizobijalnih PGPB još uvek se razjašnjavaju.

Kolonizacija korena biljaka od strane korisnih rizosfernih bakterija se odvija kroz proces koji podrazumeva dinamičnu hemijsku komunikaciju između biljke i PGPB. Interakcije sa korisnim ili patogenim mikroorganizmima izazivaju različite imunske i metaboličke odgovore u korenu što dovodi do podsticanja ili suzbijanja kolonizacije. Da li i na koji način OMV učestvuju u ovom složenom procesu ostaje otvoreno i intrigantno pitanje. Rezultati predstavljeni u okviru ove disertacije predstavljaju osnovu za buduće proučavanje potencijalne uloge OMV u ranim fazama kolonizacije i uspostavljanju simbiotskih odnosa. Dok je biomedicinski potencijal OMV prepoznat tokom prošle dve decenije i uloženi su značajni naponi da se vezikule mikroorganizama iskoriste u terapijske svrhe, mnogi aspekti njihove uloge u interakcijama biljka-mikroorganizam i dalje ostaju nejasni. Zbog toga bi produbljivanje razumevanja ovih interakcija moglo doprineti korišćenju PGPB i njihovih EV u razvoju ekološki prihvatljivih rešenja u prevazilaženju izazova životne sredine i daljoj primeni u okviru održive poljoprivrede.

6. Zaključci

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj tezi, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Bakterijski soj *P. phytofirmans* PsJN izaziva indukovanu sistemsku rezistenciju ISR kod *A. thaliana* zaraženih patogenom *B. cinerea*.
2. Komparativna transkriptomska analiza je pokazala da *P. phytofirmans* PsJN izaziva diferencijalnu ekspresiju gena *A. thaliana* uključenih u odgovore na abiotički i biotički stres.
3. U korenu *A. thaliana*, *P. phytofirmans* PsJN je pretežno smanjio ekspresiju gena povezanih sa percepcijom mikroorganizama, signalnim putevima i imunskim odgovorom, što ukazuje da je ovaj soj lokalno izazvao slabljenje odbrambenih reakcija biljke kako bi olakšao kolonizaciju i održavanje mutualističkog odnosa sa *A. thaliana*.
4. U listovima *A. thaliana*, povećana ekspresija gena povezanih sa odbranom, pre infekcije sa *B. cinerea*, u kombinaciji sa zaštitnim efektom *P. phytofirmans* PsJN koji je evidentan u kasnijim fazama infekcije, sugerise da bakterijska inokulacija priprema biljke za pojačan sistemski imunski odgovor na napad patogena.
5. Uporednom analizom dostupnih alata za mapiranje pokazano je da je za OMV-sRNK analizu potrebno isprobati više različitih alata, uporediti dobijene metrike, a zatim se odlučiti za najpogodniji mapper ili pak kombinaciju više mapera kako bi se što preciznije uradila analiza.
6. Analiza OMV-sRNK poreklom od soja *P. phytofirmans* PsJN je pokazala da se sRNK asocirane sa OMV razlikuju od populacije sRNK koje se nalaze unutar bakterijskih ćelija, što ukazuje da pakovanje ovih biomolekula u OMV nije nasumičan proces, već rezultat selekcije.
7. Predikovani targeti sRNK obogaćenih u *P. phytofirmans* PsJN-OMV ukazuju na njihovu potencijalnu ulogu u regulaciji gena uključenih u transmembranski transport i međućelijsku komunikaciju.
8. *P. phytofirmans* PsJN produkuje OMV koje direktno dolaze u kontakt sa korenima *A. thaliana* i *S. lycopersicum*, i fuzionišu se sa membranama njihovih epidermalnih ćelija.

7. Literatura

- Agrios George N, 2008. *Plant pathology*. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Ahmadi Badi Sara, Bruno Stefania Paola, Moshiri Arfa, Tarashi Samira, Siadat Seyed Davar, Masotti Andrea, 2020. Small RNAs in Outer Membrane Vesicles and Their Function in Host-Microbe Interactions. *Frontiers in Microbiology* **11**, 1209.
- Ait Barka E, Eullaffroy P, Clément C, Vernet G, 2004. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports* **22**, 608–614.
- Ajam-Hosseini M, Akhoondi F, Parvini F, Fahimi H, 2024. Gram-negative bacterial sRNAs encapsulated in OMVs: an emerging class of therapeutic targets in diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **13**, 1305510.
- Aragón W, Formey D, Aviles-Baltazar NY, Torres M, Serrano M, 2021. Arabidopsis thaliana Cuticle Composition Contributes to Differential Defense Response to *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Plant Science* **12**, 738949.
- Bahar O, Mordukhovich G, Luu DD *et al.*, 2016. Bacterial Outer Membrane Vesicles Induce Plant Immune Responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® **29**, 374–384.
- Baldrich P, Rutter BD, Karimi HZ, Podicheti R, Meyers BC, Innes RW, 2019. Plant Extracellular Vesicles Contain Diverse Small RNA Species and Are Enriched in 10- to 17-Nucleotide “Tiny” RNAs. *The Plant Cell* **31**, 315–324.
- Banović Đeri B, Nešić S, Vičić I, Samardžić J, Nikolić D, 2024. Benchmarking of five NGS mapping tools for the reference alignment of bacterial outer membrane vesicles-associated small RNAs. *Frontiers in Microbiology* **15**, 1401985.
- Baruzzo G, Hayer KE, Kim EJ, Di Camillo B, FitzGerald GA, Grant GR, 2017. Simulation-based comprehensive benchmarking of RNA-seq aligners. *Nature Methods* **14**, 135–139.
- Beck J, Lohscheider JN, Albert S *et al.*, 2017. Small One-Helix Proteins Are Essential for Photosynthesis in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Bessire M, Chassot C, Jacquat A *et al.*, 2007. A permeable cuticle in Arabidopsis leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. *The EMBO Journal* **26**, 2158–2168.
- Bi K, Liang Y, Mengiste T, Sharon A, 2023. Killing softly: a roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Trends in Plant Science* **28**, 211–222.
- Blenkiron C, Simonov D, Muthukaruppan A *et al.*, 2016. Uropathogenic *Escherichia coli* Releases Extracellular Vesicles That Are Associated with RNA (E Cascales, Ed.). *PLOS ONE* **11**, e0160440.
- Bomberger JM, MacEachran DP, Coutermarsh BA, Ye S, O'Toole GA, Stanton BA, 2009. Long-Distance Delivery of Bacterial Virulence Factors by *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Vesicles (FM Ausubel, Ed.). *PLoS Pathogens* **5**, e1000382.
- Book AJ, Gladman NP, Lee S-S, Scalf M, Smith LM, Vierstra RD, 2010. Affinity Purification of the Arabidopsis 26 S Proteasome Reveals a Diverse Array of Plant Proteolytic Complexes. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 25554–25569.
- Bossi L, Figueroa-Bossi N, 2016. Competing endogenous RNAs: a target-centric view of small RNA regulation in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **14**, 775–784.
- Briaud P, Carroll RK, 2020. Extracellular Vesicle Biogenesis and Functions in Gram-Positive Bacteria (AR Richardson, Ed.). *Infection and Immunity* **88**, e00433-20.

- Brusamarello-Santos LCC, Pacheco F, Aljanabi SMM *et al.*, 2012. Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and Soil* **356**, 113–125.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, 2015. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Wiley.
- Bücherl CA, Jarsch IK, Schudoma C *et al.*, 2017. Plant immune and growth receptors share common signalling components but localise to distinct plasma membrane nanodomains. *eLife* **6**.
- Buck AH, Coakley G, Simbari F *et al.*, 2014. Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nature Communications* **5**, 5488.
- Bushnell B, 2017. BBMap: A Fast, Accurate, Splice-Aware Aligner. In: *Report Number: LBNL-7065E*. Research Org.: Ernest Orlando Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA (US),.
- Cai Q, Qiao L, Wang M *et al.*, 2018. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science* **360**, 1126–1129.
- Camargo-Ramírez R, Val-Torregrosa B, San Segundo B, 2018. MiR858-Mediated Regulation of Flavonoid-Specific MYB Transcription Factor Genes Controls Resistance to Pathogen Infection in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **59**, 190–204.
- Cañas M-A, Giménez R, Fábrega M-J, Toloza L, Baldomà L, Badia J, 2016. Outer Membrane Vesicles from the Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and the Commensal ECOR12 Enter Intestinal Epithelial Cells via Clathrin-Dependent Endocytosis and Elicit Differential Effects on DNA Damage (A Omri, Ed.). *PLOS ONE* **11**, e0160374.
- Cao J-Y, Xu Y-P, Cai X-Z, 2020. Integrated miRNAome and Transcriptome Analysis Reveals Argonaute 2-Mediated Defense Responses Against the Devastating Phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Plant Science* **11**, 500.
- Carpita N, Sabulase D, Montezinos D, Delmer DP, 1979. Determination of the Pore Size of Cell Walls of Living Plant Cells. *Science* **205**, 1144–1147.
- Cartieaux F, Contesto C, Gallou A *et al.*, 2008. Simultaneous Interaction of *Arabidopsis thaliana* with *Bradyrhizobium* Sp. Strain ORS278 and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Leads to Complex Transcriptome Changes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® **21**, 244–259.
- Chandrasekaran M, Paramasivan M, 2024. Plant growth-promoting bacterial (PGPB) mediated degradation of hazardous pesticides: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation* **190**, 105769.
- Chargaff E, 1945. CELL STRUCTURE AND THE PROBLEM OF BLOOD COAGULATION. *Journal of Biological Chemistry* **160**, 351–359.
- Chassot C, Nawrath C, Métraux J, 2007. Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *The Plant Journal* **49**, 972–980.
- Chen T, Duan L, Zhou B *et al.*, 2017. Interplay of Pathogen-Induced Defense Responses and Symbiotic Establishment in *Medicago truncatula*. *Frontiers in Microbiology* **8**, 973.
- Chen C, Wang M, Zhu J *et al.*, 2022. Long-term effect of epigenetic modification in plant–microbe interactions: modification of DNA methylation induced by plant growth-promoting bacteria mediates promotion process. *Microbiome* **10**, 36.

- Choi J-W, Kwon T-Y, Hong S-H, Lee H-J, 2018. Isolation and Characterization of a microRNA-size Secretable Small RNA in *Streptococcus sanguinis*. *Cell Biochemistry and Biophysics* **76**, 293–301.
- Chow FW-N, Koutsovoulos G, Ovando-Vázquez C *et al.*, 2019. Secretion of an Argonaute protein by a parasitic nematode and the evolution of its siRNA guides. *Nucleic Acids Research* **47**, 3594–3606.
- Colignon B, Dieu M, Demazy C *et al.*, 2017. Proteomic Study of SUMOylation During *Solanum tuberosum*–*Phytophthora infestans* Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® **30**, 855–865.
- Compant S, Cassan F, Kostić T *et al.*, 2025. Harnessing the plant microbiome for sustainable crop production. *Nature Reviews Microbiology* **23**, 9–23.
- Compant S, Sessitsch A, Mathieu F, 2012. The 125th anniversary of the first postulation of the soil origin of endophytic bacteria – a tribute to M.L.V. Galippe. *Plant and Soil* **356**, 299–301.
- Conn SJ, Hocking B, Dayod M *et al.*, 2013. Protocol: optimising hydroponic growth systems for nutritional and physiological analysis of *Arabidopsis thaliana* and other plants. *Plant Methods* **9**, 4.
- Couch Y, Buzàs EI, Di Vizio D *et al.*, 2021. A brief history of nearly EV-erything – The rise and rise of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* **10**, e12144.
- Crawford N, 1971. The Presence of Contractile Proteins in Platelet Microparticles Isolated from Human and Animal Platelet-free Plasma. *British Journal of Haematology* **21**, 53–69.
- Dellar ER, Hill C, Melling GE, Carter DRF, Baena-Lopez LA, 2022. Unpacking extracellular vesicles: RNA cargo loading and function. *Journal of Extracellular Biology* **1**, e40.
- Desrut A, Thibault F, Mercado-Blanco J, Coutos-Thévenot P, Vriet C, 2021. Transcriptional regulation of plant sugar transporter genes by beneficial rhizobacteria. *Journal of Plant Interactions* **16**, 443–451.
- Devos S, Van Oudenhove L, Stremersch S *et al.*, 2015. The effect of imipenem and diffusible signaling factors on the secretion of outer membrane vesicles and associated Ax21 proteins in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in Microbiology* **6**.
- Diallo I, Ho J, Lalaouna D, Massé E, Provost P, 2022. RNA Sequencing Unveils Very Small RNAs With Potential Regulatory Functions in Bacteria. *Frontiers in Molecular Biosciences* **9**, 914991.
- Dodds PN, Rathjen JP, 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**, 539–548.
- Donato L, Scimone C, Rinaldi C, D’Angelo R, Sidoti A, 2021. New evaluation methods of read mapping by 17 aligners on simulated and empirical NGS data: an updated comparison of DNA- and RNA-Seq data from Illumina and Ion Torrent technologies. *Neural Computing and Applications* **33**, 15669–15692.
- Durand M, Porcheron B, Hennion N, Maurousset L, Lemoine R, Pourtau N, 2016. Water Deficit Enhances C Export to the Roots in *Arabidopsis thaliana* Plants with Contribution of Sucrose Transporters in Both Shoot and Roots. *Plant Physiology* **170**, 1460–1479.
- Effah CY, Ding X, Drokow EK, Li X, Tong R, Sun T, 2024. Bacteria-derived extracellular vesicles: endogenous roles, therapeutic potentials and their biomimetics for the treatment and prevention of sepsis. *Frontiers in Immunology* **15**, 1296061.

- Ellinger E, Chauvier A, Romero RA, Liu Y, Ray S, Walter NG, 2023. Riboswitches as therapeutic targets: promise of a new era of antibiotics. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **27**, 433–445.
- Fanai A, Bohia B, Lalremruati F *et al.*, 2024. Plant growth promoting bacteria (PGPB)-induced plant adaptations to stresses: an updated review. *PeerJ* **12**, e17882.
- Fatima U, Anjali A, Senthil-Kumar M, 2022. AtSWEET11 and AtSWEET12: the twin traders of sucrose. *Trends in Plant Science* **27**, 958–960.
- Faust K, Raes J, 2012. Microbial interactions: from networks to models. *Nature Reviews Microbiology* **10**, 538–550.
- Feitosa-Junior OR, Stefanello E, Zaini PA *et al.*, 2019. Proteomic and Metabolomic Analyses of *Xylella fastidiosa* OMV-Enriched Fractions Reveal Association with Virulence Factors and Signaling Molecules of the DSF Family. *Phytopathology®* **109**, 1344–1353.
- Furuta N, Tsuda K, Omori H, Yoshimori T, Yoshimura F, Amano A, 2009. *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles Enter Human Epithelial Cells via an Endocytic Pathway and Are Sorted to Lysosomal Compartments. *Infection and Immunity* **77**, 4187–4196.
- Gaur P, Chaturvedi A, 2017. A Survey of Bioinformatics-Based Tools in RNA-Sequencing (RNA-Seq) Data Analysis. In: Wei D-Q,, Ma Y,, Cho WCS,, Xu Q,, Zhou F, eds. *Translational Bioinformatics and Its Application*. Translational Medicine Research. Dordrecht: Springer Netherlands, 223–248.
- Ghosal A, Upadhyaya BB, Fritz JV *et al.*, 2015. The extracellular RNA complement of *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen* **4**, 252–266.
- Ghozlan MH, EL-Argawy E, Tokgöz S, Lakshman DK, Mitra A, 2020. Plant Defense against Necrotrophic Pathogens. *American Journal of Plant Sciences* **11**, 2122–2138.
- Glick BR, 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research* **169**, 30–39.
- Gnopo YMD, Putnam D, 2020. A lipid mixing assay to accurately quantify the fusion of outer membrane vesicles. *Methods* **177**, 74–79.
- Goossens J, Mertens J, Goossens A, 2016. Role and functioning of bHLH transcription factors in jasmonate signalling. *Journal of Experimental Botany*, erw440.
- Gujrati V, Kim S, Kim S-H *et al.*, 2014. Bioengineered Bacterial Outer Membrane Vesicles as Cell-Specific Drug-Delivery Vehicles for Cancer Therapy. *ACS Nano* **8**, 1525–1537.
- Hardoim PR, Van Overbeek LS, Berg G *et al.*, 2015. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **79**, 293–320.
- Hardoim PR, Van Overbeek LS, Elsas JDV, 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* **16**, 463–471.
- Harfouche L, Haichar FEZ, Achouak W, 2015. Small regulatory RNA s and the fine-tuning of plant–bacteria interactions. *New Phytologist* **206**, 98–106.
- Hatem A, Bozdağ D, Toland AE, Çatalyürek ÜV, 2013. Benchmarking short sequence mapping tools. *BMC Bioinformatics* **14**, 184.
- He B, Wang H, Liu G *et al.*, 2023. Fungal small RNAs ride in extracellular vesicles to enter plant cells through clathrin-mediated endocytosis. *Nature Communications* **14**, 4383.

- Hoe C-H, Raabe CA, Rozhdestvensky TS, Tang T-H, 2013. Bacterial sRNAs: Regulation in stress. *International Journal of Medical Microbiology* **303**, 217–229.
- Hou Y, Zhai Y, Feng L *et al.*, 2019. A Phytophthora Effector Suppresses Trans-Kingdom RNAi to Promote Disease Susceptibility. *Cell Host & Microbe* **25**, 153-165.e5.
- Huang D, Sun Y, Ma Z *et al.*, 2019a. Salicylic acid-mediated plasmodesmal closure via Remorin-dependent lipid organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 21274–21284.
- Huang C-Y, Wang H, Hu P, Hamby R, Jin H, 2019b. Small RNAs – Big Players in Plant-Microbe Interactions. *Cell Host & Microbe* **26**, 173–182.
- Ionescu M, Zaini PA, Baccari C, Tran S, Da Silva AM, Lindow SE, 2014. *Xylella fastidiosa* outer membrane vesicles modulate plant colonization by blocking attachment to surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**.
- Issa A, Esmaeel Q, Sanchez L *et al.*, 2018. Impacts of Paraburkholderia phytofirmans Strain PsJN on Tomato (Lycopersicon esculentum L.) Under High Temperature. *Frontiers in Plant Science* **9**.
- Janda M, Rybak K, Krassini L *et al.*, 2023. Biophysical and proteomic analyses of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 extracellular vesicles suggest adaptive functions during plant infection (R Kahmann, H Jin, Eds.). *mBio*.
- Jayaswall K, Mahajan P, Singh G *et al.*, 2016. Transcriptome Analysis Reveals Candidate Genes involved in Blister Blight defense in Tea (Camellia sinensis (L) Kuntze). *Scientific Reports* **6**, 30412.
- Jayawardena RS, Purahong W, Zhang W *et al.*, 2018. Biodiversity of fungi on Vitis vinifera L. revealed by traditional and high-resolution culture-independent approaches. *Fungal Diversity* **90**, 1–84.
- Jose J, Ghantasala S, Roy Choudhury S, 2020. Arabidopsis Transmembrane Receptor-Like Kinases (RLKs): A Bridge between Extracellular Signal and Intracellular Regulatory Machinery. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 4000.
- Jung J, Ahn S, Kim D-H, Riu M, 2024. Triple interactions for induced systemic resistance in plants. *Frontiers in Plant Science* **15**, 1464710.
- Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ, 1996. Bacteriolytic effect of membrane vesicles from Pseudomonas aeruginosa on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *Journal of Bacteriology* **178**, 2767–2774.
- Kang S-M, Choi J-W, Lee Y, Hong S-H, Lee H-J, 2013. Identification of microRNA-Size, Small RNAs in Escherichia coli. *Current Microbiology* **67**, 609–613.
- Ke M, Ma Z, Wang D *et al.*, 2021. Salicylic acid regulates PIN2 auxin transporter hyperclustering and root gravitropic growth via Remorin-dependent lipid nanodomain organisation in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist* **229**, 963–978.
- King E, Wallner A, Rimbault I *et al.*, 2019. Monitoring of Rice Transcriptional Responses to Contrasted Colonizing Patterns of Phytobeneficial Burkholderia s.l. Reveals a Temporal Shift in JA Systemic Response. *Frontiers in Plant Science* **10**, 1141.
- Koeppen K, Hampton TH, Jarek M *et al.*, 2016. A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through sRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles (M Whiteley, Ed.). *PLOS Pathogens* **12**, e1005672.

- Kuerban K, Gao X, Zhang H *et al.*, 2020. Doxorubicin-loaded bacterial outer-membrane vesicles exert enhanced anti-tumor efficacy in non-small-cell lung cancer. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **10**, 1534–1548.
- Kulp AJ, Sun B, Ai T *et al.*, 2015. Genome-Wide Assessment of Outer Membrane Vesicle Production in *Escherichia coli* (E Cascales, Ed.). *PLOS ONE* **10**, e0139200.
- Kunsmann L, Rüter C, Bauwens A *et al.*, 2015. Virulence from vesicles: Novel mechanisms of host cell injury by *Escherichia coli* O104:H4 outbreak strain. *Scientific Reports* **5**.
- Lakshmanan V, Castaneda R, Rudrappa T, Bais HP, 2013. Root transcriptome analysis of *Arabidopsis thaliana* exposed to beneficial *Bacillus subtilis* FB17 rhizobacteria revealed genes for bacterial recruitment and plant defense independent of malate efflux. *Planta* **238**, 657–668.
- Laluk K, AbuQamar S, Mengiste T, 2011. The *Arabidopsis* Mitochondria-Localized Pentatricopeptide Repeat Protein PGN Functions in Defense against Necrotrophic Fungi and Abiotic Stress Tolerance. *Plant Physiology* **156**, 2053–2068.
- Langin G, González-Fuente M, Üstün S, 2023. The Plant Ubiquitin–Proteasome System as a Target for Microbial Manipulation. *Annual Review of Phytopathology* **61**, 351–375.
- Langmead B, Salzberg SL, 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* **9**, 357–359.
- Leandro MR, Rangel PL, Dos Santos TC *et al.*, 2019. Colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Herbaspirillum seropedicae* promotes its growth and changes its proteomic profile. *Plant and Soil* **443**, 429–447.
- Leitão AL, Costa MC, Gabriel AF, Enguita FJ, 2020. Interspecies Communication in Holobionts by Non-Coding RNA Exchange. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 2333.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C, 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**, 583–593.
- Li H, 2013. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM.
- Li H, 2018. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics* **34**, 3094–3100.
- Li Z, Clarke AJ, Beveridge TJ, 1998. Gram-Negative Bacteria Produce Membrane Vesicles Which Are Capable of Killing Other Bacteria. *Journal of Bacteriology* **180**, 5478–5483.
- Li S, Ji R, Dudler R *et al.*, 2013. Wheat gene TaS3 contributes to powdery mildew susceptibility. *Plant Cell Reports* **32**, 1891–1901.
- Li D, Li Z, Wu J *et al.*, 2022. Analysis of Outer Membrane Vesicles Indicates That Glycerophospholipid Metabolism Contributes to Early Symbiosis Between *Sinorhizobium fredii* HH103 and Soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions®* **35**, 311–322.
- Li G, Pu S, You L *et al.*, 2025. Innovative Strategies in Oncology: Bacterial Membrane Vesicle-Based Drug Delivery Systems for Cancer Diagnosis and Therapy. *Pharmaceutics* **17**, 58.
- Li Y, Wan L, Bi S *et al.*, 2017. Identification of Drought-Responsive MicroRNAs from Roots and Leaves of Alfalfa by High-Throughput Sequencing. *Genes* **8**, 119.
- Liu Z, Hartman S, Van Veen H *et al.*, 2022. Ethylene augments root hypoxia tolerance via growth cessation and reactive oxygen species amelioration. *Plant Physiology* **190**, 1365–1383.

- Lo K-J, Wang M-H, Ho C-T, Pan M-H, 2024. Plant-Derived Extracellular Vesicles: A New Revolutionization of Modern Healthy Diets and Biomedical Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **72**, 2853–2878.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R, 2003. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense[W]. *The Plant Cell* **15**, 165–178.
- Ma Z, Liu X, Nath S *et al.*, 2021. Formin nanoclustering-mediated actin assembly during plant flagellin and DSF signaling. *Cell Reports* **34**, 108884.
- Magaña G, Harvey C, Taggart CC, Rodgers AM, 2023. Bacterial Outer Membrane Vesicles: Role in Pathogenesis and Host-Cell Interactions. *Antibiotics* **13**, 32.
- Mahendran G, Jayasinghe OT, Thavakumaran D, Arachchilage GM, Silva GN, 2022. Key players in regulatory RNA realm of bacteria. *Biochemistry and Biophysics Reports* **30**, 101276.
- Mayak S, Tirosh T, Glick BR, 2004. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 565–572.
- Mazuecos-Aguilera I, Anta-Fernández F, Crespo-Barreiro A, Martínez-Quesada A, Lombana-Larrea L, González-Andrés F, 2025. Plant growth-promoting rhizobacteria enhanced induced systemic resistance of tomato against *Botrytis cinerea* phytopathogen. *Frontiers in Plant Science* **16**, 1570986.
- McBroom AJ, Kuehn MJ, 2007. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Molecular Microbiology* **63**, 545–558.
- McMillan HM, Zebell SG, Ristaino JB, Dong X, Kuehn MJ, 2021. Protective plant immune responses are elicited by bacterial outer membrane vesicles. *Cell Reports* **34**, 108645.
- Michaux C, Verneuil N, Hartke A, Giard J-C, 2014. Physiological roles of small RNA molecules. *Microbiology* **160**, 1007–1019.
- Micoli F, MacLennan CA, 2020. Outer membrane vesicle vaccines. *Seminars in Immunology* **50**, 101433.
- Miotto-Vilanova L, Jacquard C, Courteaux B *et al.*, 2016. Burkholderia phytofirmans PsJN Confers Grapevine Resistance against *Botrytis cinerea* via a Direct Antimicrobial Effect Combined with a Better Resource Mobilization. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Moriano-Gutierrez S, Bongrand C, Essock-Burns T, Wu L, McFall-Ngai MJ, Ruby EG, 2020. The noncoding small RNA SsrA is released by *Vibrio fischeri* and modulates critical host responses (L Teixeira, Ed.). *PLOS Biology* **18**, e3000934.
- Mukherjee A, 2022. What do we know from the transcriptomic studies investigating the interactions between plants and plant growth-promoting bacteria? *Frontiers in Plant Science* **13**, 997308.
- Murashige T, Skoog F, 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–497.
- Ñahui Palomino RA, Vanpouille C, Costantini PE, Margolis L, 2021. Microbiota–host communications: Bacterial extracellular vesicles as a common language (J Oh, Ed.). *PLOS Pathogens* **17**, e1009508.
- Narunsky A, Higgs GA, Torres BM *et al.*, 2024. The discovery of novel noncoding RNAs in 50 bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* **52**, 5152–5165.

- Neophytou K, Martínez-Ugalde I, Fenton TM *et al.*, 2025. An Argonaute protein traffics from nematode to mouse and is a vaccine against parasitic nematodes. *EMBO Reports* **27**, 311–340.
- Nešić S, Bosnić D, Samardžić J, Nikolić I, Aziz A, Nikolić D, 2025. Paraburkholderia phytofirmans PsJN triggers local and systemic transcriptional reprogramming in Arabidopsis thaliana and increases resistance against Botrytis cinerea. *Frontiers in Plant Science* **16**.
- Ng CY, Kee LT, Al-Masawa ME *et al.*, 2022. Scalable Production of Extracellular Vesicles and Its Therapeutic Values: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 7986.
- Nie P, Li X, Wang S, Guo J, Zhao H, Niu D, 2017. Induced Systemic Resistance against Botrytis cinerea by Bacillus cereus AR156 through a JA/ET- and NPR1-Dependent Signaling Pathway and Activates PAMP-Triggered Immunity in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Nitzan M, Rehani R, Margalit H, 2017. Integration of Bacterial Small RNAs in Regulatory Networks. *Annual Review of Biophysics* **46**, 131–148.
- Niu D, Lii YE, Chellappan P *et al.*, 2016. miRNA863-3p sequentially targets negative immune regulator ARLPKs and positive regulator SERRATE upon bacterial infection. *Nature Communications* **7**, 11324.
- Niu D-D, Liu H-X, Jiang C-H *et al.*, 2011. The Plant Growth–Promoting Rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 Induces Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana* by Simultaneously Activating Salicylate- and Jasmonate/Ethylene-Dependent Signaling Pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® **24**, 533–542.
- Nuanlaong S, Wuthisuthimathavee S, Suraninpong P, 2021. Lysigenous aerenchyma formation: responsiveness to waterlogging in oil palm roots. *Biologia plantarum* **65**, 167–176.
- Nunez EA, Wallis J, Gershon MD, 1974. Secretory processes in follicular cells of the bat thyroid. III. The occurrence of extracellular vesicles and colloid droplets during arousal from hibernation. *American Journal of Anatomy* **141**, 179–201.
- O’Brien K, Breyne K, Ughetto S, Laurent LC, Breakefield XO, 2020. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **21**, 585–606.
- O’Donoghue EJ, Krachler AM, 2016. Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells: MicroReview - OMV entry into host cells. *Cellular Microbiology* **18**, 1508–1517.
- Oldroyd GED, 2013. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 252–263.
- Otto C, Stadler PF, Hoffmann S, 2014. Lacking alignments? The next-generation sequencing mapper segemehl revisited. *Bioinformatics* **30**, 1837–1843.
- Özkan M, Yılmaz H, Ergenekon P, Erdoğan EM, Erbakan M, 2024. Microbial membrane transport proteins and their biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **40**, 71.
- Paes De Melo B, Carpinetti PDA, Fraga OT *et al.*, 2022. Abiotic Stresses in Plants and Their Markers: A Practice View of Plant Stress Responses and Programmed Cell Death Mechanisms. *Plants* **11**, 1100.
- Parker H, Chitcholtan K, Hampton MB, Keenan JJ, 2010. Uptake of *Helicobacter pylori* Outer Membrane Vesicles by Gastric Epithelial Cells. *Infection and Immunity* **78**, 5054–5061.

- Pelagio-Flores R, Muñoz-Parra E, Barrera-Ortiz S *et al.*, 2020. The cysteine-rich receptor-like protein kinase CRK28 modulates Arabidopsis growth and development and influences abscisic acid responses. *Planta* **251**, 2.
- Pereira-Santana A, Alvarado-Robledo EJ, Zamora-Briseño JA *et al.*, 2017. Transcriptional profiling of sugarcane leaves and roots under progressive osmotic stress reveals a regulated coordination of gene expression in a spatiotemporal manner (J-S Zhang, Ed.). *PLOS ONE* **12**, e0189271.
- Pinedo I, Ledger T, Greve M, Poupin MJ, 2015. Burkholderia phytofirmans PsJN induces long-term metabolic and transcriptional changes involved in Arabidopsis thaliana salt tolerance. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Pita T, Feliciano JR, Leitão JH, 2020. Extracellular RNAs in Bacterial Infections: From Emerging Key Players on Host-Pathogen Interactions to Exploitable Biomarkers and Therapeutic Targets. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 9634.
- Poria V, Singh S, Nain L, Singh B, Saini JK, 2021. Rhizospheric Microbial Communities: Occurrence, Distribution, and Functions. In: Nath M., Bhatt D., Bhargava P., Choudhary DK, eds. *Microbial Metatranscriptomics Belowground*. Singapore: Springer Singapore, 239–271.
- Poupin MJ, Greve M, Carmona V, Pinedo I, 2016. A Complex Molecular Interplay of Auxin and Ethylene Signaling Pathways Is Involved in Arabidopsis Growth Promotion by Burkholderia phytofirmans PsJN. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Poupin MJ, Timmermann T, Vega A, Zuñiga A, González B, 2013. Effects of the Plant Growth-Promoting Bacterium Burkholderia phytofirmans PsJN throughout the Life Cycle of Arabidopsis thaliana (BA Vinatzer, Ed.). *PLoS ONE* **8**, e69435.
- Raposo G, Stoorvogel W, 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology* **200**, 373–383.
- Rekha K, Kumar RM, Ilango K, Rex A, Usha B, 2018. Transcriptome profiling of rice roots in early response to *Bacillus subtilis* (RR4) colonization. *Botany* **96**, 749–765.
- Ren B, Wang X, Duan J, Ma J, 2019. Rhizobial tRNA-derived small RNAs are signal molecules regulating plant nodulation. *Science* **365**, 919–922.
- Resch U, Tsatsaronis JA, Le Rhun A *et al.*, 2016. A Two-Component Regulatory System Impacts Extracellular Membrane-Derived Vesicle Production in Group A Streptococcus (EP Greenberg, Ed.). *mBio* **7**, e00207-16.
- Reszczyńska E, Hanaka A, 2020. Lipids Composition in Plant Membranes. *Cell Biochemistry and Biophysics* **78**, 401–414.
- Rompikuntal PK, Thay B, Khan MK *et al.*, 2012. Perinuclear Localization of Internalized Outer Membrane Vesicles Carrying Active Cytolethal Distending Toxin from Aggregatibacter actinomycetemcomitans (SR Blanke, Ed.). *Infection and Immunity* **80**, 31–42.
- Rudnicka M, Noszczyńska M, Malicka M, Kasperkiewicz K, Pawlik M, Piotrowska-Seget Z, 2022. Outer Membrane Vesicles as Mediators of Plant–Bacterial Interactions. *Frontiers in Microbiology* **13**, 902181.
- Salah Ud-Din AIM, Roujeinikova A, 2017. Methyl-accepting chemotaxis proteins: a core sensing element in prokaryotes and archaea. *Cellular and Molecular Life Sciences* **74**, 3293–3303.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW, 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**, 671–675.

- Schulz E, Goes A, Garcia R *et al.*, 2018. Biocompatible bacteria-derived vesicles show inherent antimicrobial activity. *Journal of Controlled Release* **290**, 46–55.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O *et al.*, 2003. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research* **13**, 2498–2504.
- Shao X, Li C, Qian J *et al.*, 2024. Extracellular vesicle-derived miRNA-mediated cell-cell communication inference for single-cell transcriptomic data with miRTalk.
- Sharma M, Fuertes D, Perez-Gil J, Lois LM, 2021. SUMOylation in Phytopathogen Interactions: Balancing Invasion and Resistance. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **9**, 703795.
- Sharma D, Tiwari M, Pandey A, Bhatia C, Sharma A, Trivedi PK, 2016. MicroRNA858 Is a Potential Regulator of Phenylpropanoid Pathway and Plant Development. *Plant Physiology* **171**, 944–959.
- Shekhawat K, Fröhlich K, García-Ramírez GX, Trapp MA, Hirt H, 2022. Ethylene: A Master Regulator of Plant–Microbe Interactions under Abiotic Stresses. *Cells* **12**, 31.
- Shekhawat K, Saad MM, Sheikh A *et al.*, 2021. Root endophyte induced plant thermotolerance by constitutive chromatin modification at heat stress memory gene loci. *EMBO reports* **22**, e51049.
- Sidhu VK, Vorhölter F-J, Niehaus K, Watt SA, 2008. Analysis of outer membrane vesicle associated proteins isolated from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *BMC Microbiology* **8**.
- Soares FS, Rangel De Souza ALS, De Souza SA *et al.*, 2024. Fine-Tuning of *Arabidopsis thaliana* Response to Endophytic Colonization by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 Revealed by Transcriptomic Analysis. *Plants* **13**, 1719.
- Song Y, Wilson AJ, Zhang X-C *et al.*, 2021. FERONIA restricts *Pseudomonas* in the rhizosphere microbiome via regulation of reactive oxygen species. *Nature Plants* **7**, 644–654.
- Soto MJ, Domínguez-Ferreras A, Pérez-Mendoza D, Sanjuán J, Olivares J, 2009. Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cellular Microbiology* **11**, 381–388.
- Storz G, Opdyke JA, Zhang A, 2004. Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Current Opinion in Microbiology* **7**, 140–144.
- Sun Y, Cheng Z, Glick BR, 2009. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *FEMS Microbiology Letters* **296**, 131–136.
- Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu J-K, 2007. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends in Plant Science* **12**, 301–309.
- Suri K, D’Souza A, Huang D, Bhavsar A, Amiji M, 2023. Bacterial extracellular vesicle applications in cancer immunotherapy. *Bioactive Materials* **22**, 551–566.
- Taboada H, Dunn MF, Meneses N *et al.*, 2019. Qualitative changes in proteins contained in outer membrane vesicles produced by *Rhizobium etli* grown in the presence of the nod gene inducer naringenin. *Archives of Microbiology* **201**, 1173–1194.
- Tang D, Chen X, Jia Y *et al.*, 2020. Genome-wide screen and functional analysis in *Xanthomonas* reveal a large number of mRNA-derived sRNAs, including the novel RsmA-sequester RsmU. *Molecular Plant Pathology* **21**, 1573–1590.

- Tanovic B, Hrustic J, Mihajlovic M, Grahovac M, Delibasic G, Vukša P, 2011. Botrytis cinerea control and the problem of fungicide resistance. *Pesticidi i fitomedicina* **26**, 99–110.
- Tashiro Y, Inagaki A, Shimizu M *et al.*, 2011. Characterization of Phospholipids in Membrane Vesicles Derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **75**, 605–607.
- Thankaswamy-Kosalai S, Sen P, Nookaew I, 2017. Evaluation and assessment of read-mapping by multiple next-generation sequencing aligners based on genome-wide characteristics. *Genomics* **109**, 186–191.
- Thimm O, Bläsing O, Gibon Y *et al.*, 2004. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal* **37**, 914–939.
- Thomas J, Kim HR, Rahmatallah Y *et al.*, 2019. RNA-seq reveals differentially expressed genes in rice (*Oryza sativa*) roots during interactions with plant-growth promoting bacteria, *Azospirillum brasilense* (J-S Zhang, Ed.). *PLOS ONE* **14**, e0217309.
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB, 1997. Subcellular localization of H₂ O₂ in plants. H₂ O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. *The Plant Journal* **11**, 1187–1194.
- Timmermann T, Poupin MJ, Vega A, Urrutia C, Ruz GA, González B, 2019. Gene networks underlying the early regulation of Paraburkholderia phytofirmans PsJN induced systemic resistance in Arabidopsis (E-M Lai, Ed.). *PLOS ONE* **14**, e0221358.
- Timmusk S, Wagner EGH, 1999. The Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* Induces Changes in *Arabidopsis thaliana* Gene Expression: A Possible Connection Between Biotic and Abiotic Stress Responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® **12**, 951–959.
- Tran TM, Chng C-P, Pu X *et al.*, 2022. Potentiation of plant defense by bacterial outer membrane vesicles is mediated by membrane nanodomains. *The Plant Cell* **34**, 395–417.
- Tran TM, Ma Z, Triebl A *et al.*, 2020. The bacterial quorum sensing signal DSF hijacks *Arabidopsis thaliana* sterol biosynthesis to suppress plant innate immunity. *Life Science Alliance* **3**, e202000720.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO, 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* **9**, 654–659.
- Van De Mortel JE, De Vos RCH, Dekkers E *et al.*, 2012. Metabolic and Transcriptomic Changes Induced in Arabidopsis by the Rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* SS101. *Plant Physiology* **160**, 2173–2188.
- Van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ, 1998. SYSTEMIC RESISTANCE INDUCED BY RHIZOSPHERE BACTERIA. *Annual Review of Phytopathology* **36**, 453–483.
- Vandenkoornhuyse P, Quaiser A, Duhamel M, Le Van A, Dufresne A, 2015. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist* **206**, 1196–1206.
- Veronese P, Nakagami H, Bluhm B *et al.*, 2005. The Membrane-Anchored *BOTRYTIS-INDUCED KINASE1* Plays Distinct Roles in *Arabidopsis* Resistance to Necrotrophic and Biotrophic Pathogens. *The Plant Cell* **18**, 257–273.
- Vogel J, Luisi BF, 2011. Hfq and its constellation of RNA. *Nature Reviews Microbiology* **9**, 578–589.

- Vogel J, Sharma CM, 2005. How to find small non-coding RNAs in bacteria. *Biological Chemistry* **386**, 1219–1238.
- Voisin D, Nawrath C, Kurdyukov S *et al.*, 2009. Dissection of the Complex Phenotype in Cuticular Mutants of Arabidopsis Reveals a Role of SERRATE as a Mediator (GP Copenhaver, Ed.). *PLoS Genetics* **5**, e1000703.
- Wang M, Weiberg A, Lin F-M, Thomma BPHJ, Huang H-D, Jin H, 2016. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants* **2**, 16151.
- Wang Q, Yang R, Peng W *et al.*, 2021. Tea Plants With Gray Blight Have Altered Root Exudates That Recruit a Beneficial Rhizosphere Microbiome to Prime Immunity Against Aboveground Pathogen Infection. *Frontiers in Microbiology* **12**, 774438.
- Wei J, Zhou Q, Zhang J, Wu M, Li G, Yang L, 2024. Dual RNA-seq reveals distinct families of co-regulated and structurally conserved effectors in Botrytis cinerea infection of Arabidopsis thaliana. *BMC Biology* **22**, 239.
- Wiggins G, Thomas J, Rahmatallah Y *et al.*, 2022. Common gene expression patterns are observed in rice roots during associations with plant growth-promoting bacteria, Herbaspirillum seropedicae and Azospirillum brasilense. *Scientific Reports* **12**, 8827.
- Witzel K, Üstün S, Schreiner M, Grosch R, Börnke F, Ruppel S, 2017. A Proteomic Approach Suggests Unbalanced Proteasome Functioning Induced by the Growth-Promoting Bacterium Kosakonia radicincitans in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* **8**, 661.
- Wu Y, Wang S, Wang P *et al.*, 2024. Suppression of host plant defense by bacterial small RNAs packaged in outer membrane vesicles. *Plant Communications* **5**, 100817.
- Xie J, Li Q, Haesebrouck F, Van Hoecke L, Vandenbroucke RE, 2022. The tremendous biomedical potential of bacterial extracellular vesicles. *Trends in Biotechnology* **40**, 1173–1194.
- Xing H, Fu X, Yang C *et al.*, 2018. Genome-wide investigation of pentatricopeptide repeat gene family in poplar and their expression analysis in response to biotic and abiotic stresses. *Scientific Reports* **8**, 2817.
- Yadeta KA, Elmore JM, Creer AY *et al.*, 2017. A Cysteine-Rich Protein Kinase Associates with a Membrane Immune Complex and the Cysteine Residues Are Required for Cell Death. *Plant Physiology* **173**, 771–787.
- Yáñez-Mó M, Siljander PR -M., Andreu Z *et al.*, 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles* **4**, 27066.
- Yu Y, Gui Y, Li Z, Jiang C, Guo J, Niu D, 2022. Induced Systemic Resistance for Improving Plant Immunity by Beneficial Microbes. *Plants* **11**, 386.
- Yu K, Liu Y, Tichelaar R *et al.*, 2019a. Rhizosphere-Associated Pseudomonas Suppress Local Root Immune Responses by Gluconic Acid-Mediated Lowering of Environmental pH. *Current Biology* **29**, 3913-3920.e4.
- Yu K, Pieterse CMJ, Bakker PAHM, Berendsen RL, 2019b. Beneficial microbes going underground of root immunity. *Plant, Cell & Environment* **42**, 2860–2870.
- Zahid A, Ismail H, Wilson JC, Grice ID, 2025. Bioengineering Outer-Membrane Vesicles for Vaccine Development: Strategies, Advances, and Perspectives. *Vaccines* **13**, 767.

- Zeiner A, Colina FJ, Citterico M, Wrzaczek M, 2023. CYSTEINE-RICH RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASES: their evolution, structure, and roles in stress response and development (K-J Dietz, Ed.). *Journal of Experimental Botany* **74**, 4910–4927.
- Zhang M, Kong X, 2022. How plants discern friends from foes. *Trends in Plant Science* **27**, 107–109.
- Zhang Y, Tian H, Chen D *et al.*, 2023. Cysteine-rich receptor-like protein kinases: emerging regulators of plant stress responses. *Trends in Plant Science* **28**, 776–794.
- Zhang H, Zhang Y, Song Z *et al.*, 2020. sncRNAs packaged by *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles attenuate IL-8 secretion in human cells. *International Journal of Medical Microbiology* **310**, 151356.
- Zhao X, Wei Y, Bu Y, Ren X, Dong Z, 2025. Review on bacterial outer membrane vesicles: structure, vesicle formation, separation and biotechnological applications. *Microbial Cell Factories* **24**.
- Zhou F, Emonet A, Dénervaud Tendon V *et al.*, 2020. Co-incidence of Damage and Microbial Patterns Controls Localized Immune Responses in Roots. *Cell* **180**, 440-453.e18.
- Zhu J-K, 2016. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell* **167**, 313–324.
- Zhu Q-H, Fan L, Liu Y, Xu H, Llewellyn D, Wilson I, 2013. miR482 Regulation of NBS-LRR Defense Genes during Fungal Pathogen Infection in Cotton (J Zhang, Ed.). *PLoS ONE* **8**, e84390.
- Zhu L, Qian N, Sun Y, Lu X, Duan H, Qian L, 2021a. *Pseudomonas fluorescens* DN16 Enhances Cucumber Defense Responses Against the Necrotrophic Pathogen *Botrytis cinerea* by Regulating Thermospermine Catabolism. *Frontiers in Plant Science* **12**, 645338.
- Zhu L, Wang S, Duan H, Lu X, 2021b. Foliar pathogen-induced assemblage of beneficial rhizosphere consortia increases plant defense against *Setosphaeria turcica*. *Frontiers in Bioscience-Landmark* **26**, 543.

BIOGRAFIJA

Sofija (Branislav) Nešić je rođena 26.09.1992. u Beogradu. U Zemunu je završila osnovnu školu „Majka Jugovića“ i Zemunsku gimnaziju. Osnovne studije je upisala 2011. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija i fiziologija, a diplomirala je 2017. godine. Na istom fakultetu je završila master akademske studije 2018. godine, modul Molekularna biologija i fiziologija, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija biljaka. Master rad pod nazivom „Uticaj silicijuma na prevazilaženje deficita gvožđa kod ječma (*Hordeum vulgare*)“ je uradila u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom dr Dragane Nikolić. Na istom fakultetu upisuje i doktorske studije 2018. godine, studijski program Biologija, modul Fiziologija i molekularna biologija biljaka, pod mentorstvom dr Dragane Nikolić. Od februara 2019. godine je zaposlena u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Učestvovala je na nacionalnom projektu „Molekularni mehanizmi odgovora biljaka na abiotički stres-uloga transkripcionih faktora i malih RNK i analiza genetičkog diverziteta biljnih kultura od interesa za poljoprivredu i biotehnologiju (173005)“, projektu IDEJE “*Exploring Bacterial OMV (Outer Membrane Vesicles)-sRNAs Mediated Interkingdom Communication with Plants and Fungi*”, Fonda za Nauku, Republike Srbije i projektu Dokaz koncepta, „Uspostavljanje testa za molekularnu detekciju i patotipizaciju virusa blagog šarenila paprike (*Pepper Mild Mottle virus*)“, Fond za inovacionu delatnost Republike Srbije. Autor je ili koautor četiri naučna rada u međunarodnim vodećim časopisima iz M21 kategorije (dva M21a, dva M21), jednog preprinta i 16 saopštenja na naučnim skupovima.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: **Sofija Nešić**

Broj indeksa: **B3013/2018**

Izjavljujem da je doktorska disertacija pod naslovom

Molekularne osnove interakcija korisnih endofitnih bakterija sa *Arabidopsis thaliana*

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: **Sofija Nešić**

Broj indeksa: **B3013/2018**

Studijski program: **Biologija**

Naslov rada: **Molekularne osnove interakcija korisnih endofitnih bakterija sa *Arabidopsis thaliana***

Mentori: **dr Dragana Nikolić, dr Milorad Vujičić**

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Molekularne osnove interakcija korisnih endofitnih bakterija sa *Arabidopsis thaliana*

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.