

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena J. Rudić

SUPEROKSID-DISMUTAZE KROMPIRA  
(*SOLANUM TUBEROSUM* L.):  
KARAKTERIZACIJA IZOFORMI I EKSPRESIJA  
U USLOVIMA VISOKIH TEMPERATURA

Doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Jelena J. Rudić

SUPEROXIDE DISMUTASES IN POTATO  
(*SOLANUM TUBEROSUM* L.):  
CHARACTERISATION OF ISOFORMS AND  
EXPRESSION UNDER HIGH TEMPERATURE

Doctoral dissertation

Belgrade, 2023

**Mentori:**

---

**dr Ivana Momčilović, naučni savetnik**  
Univerzitet u Beogradu,  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“-  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

---

**dr Dušica Janošević, vanredni profesor**  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

**Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:**

---

**dr Angelina Subotić, naučni savetnik**  
Univerzitet u Beogradu,  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“-  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

---

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

---

**dr Danijel Pantelić, naučni saradnik**  
Univerzitet u Beogradu,  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“-  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

*Ekperimentalni deo doktorske disertacije je urađen u laboratorijama Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja „Viniša Stanković“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu.*

*Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorki dr Tivani Momčilović na osmišljavanju i realizaciji ove doktorske disertacije, stručnim i prijateljskim savetima, strpljenju i podršci tokom svih ovih godina. Hvala Vam na posvećenosti, uloženom trudu i na svemu što ste me naučili.*

*Neizmerno se zahvaljujem svojoj mentorki dr Dušici Janošević na korisnim smernicama koje su doprinele kvalitetu disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Danijelu Panteliću, koji je rukovodio qPCR analizama u okviru ove doktorske disertacije, na pomoći u savladavanju tehnika, interpretaciji rezultata i prijateljskim savetima.*

*Srdačno se zahvaljujem dr Angelini Subotić i dr Tijani Svetić Antić na vremenu izdvojenom za pregledanje disertacije i na dragocenim sugestijama.*

*Zahvaljujem se dr Milanu Dragičeviću i dr Danijelu Panteliću, koji su rukovodili in silico analizama u okviru ove doktorske disertacije, na pomoći pri tumačenju i interpretaciji rezultata.*

*Dr Ani Simonović, koja nas je prerano napustila, neizmerno hvala na saradnji i značajnom doprinosu u pisanju rada proisteklog iz ove doktorske disertacije.*

*Dr Jasmini Ojčići iskreno se zahvaljujem na velikoj pomoći pri sakupljanju uzoraka, kao i na višegodišnjoj uspešnoj saradnji.*

*Zahvaljujem se kolegama sa Odeljenja za fiziologiju biljaka na kolegijalnosti i prijatnoj radnoj atmosferi.*

*Neizmerno hvala prijateljima i porodici na strpljenju i razumevanju. Ipak, najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima, Dragici i Jovi, koji su mi pomogli da istrajem. Bez vaše podrške i motivacije ništa od ovoga ne bi bilo moguće i upravo zbog toga vama posvećujem ovu doktorsku disertaciju. Hvala ☺*

## Superoksid-dismutaze krompira (*Solanum tuberosum* L.): karakterizacija izoformi i ekspresija u uslovima visokih temperatura

### Sažetak

Krompir (*Solanum tuberosum* L.) je među najznačajnijim poljoprivrednim usevima i veoma je osetljiv na visoke temperature. Kao posledica toplotnog stresa dolazi do disbalansa u produkciji i eliminaciji reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) u biljnim ćelijama, odnosno pojave sekundarnog, oksidativnog stresa. Superoksid-dismutaze (SOD) su važni antioksidativni enzimi uključeni u odbranu biljnih ćelija od ROS, a koji do sada nisu detaljno izučeni kod krompira. Rezultati ovog rada su pokazali da *SOD* genska familija krompira obuhvata osam gena (*StCuZnSOD1-3*, *StMnSOD* i *StFeSOD1-4*), čiji su promotorski regioni i egzon-intron struktura transkripata ispitani *in silico*. *In silico* analiza je obuhvatila i fizičko-hemijsku karakterizaciju StSOD proteina, identifikaciju SOD domena, procenu prisustva N-terminalnog signala u peptidima, predikciju subćelijske lokalizacije i tercijarne strukture StSOD, a utvrđeni su i filogenetski odnosi između StSOD i SOD drugih biljnih vrsta. Ekspresija *StSOD* ispitivana je kod komercijalnih sorti krompira gajenih *in vitro* tokom različitih temperaturnih tretmana. Pokazano je da su svih osam *StSOD* gena funkcionalni, kao i da su šest gena visoko ekspimirani. Temperatura od 29 °C je najviše indukovala *StSOD* ekspresiju. Takođe, kod *ex vitro* gajenih biljaka ustanovljena je povećana ekspresija *StSOD* u uslovima toplotnog stresa (30/20°C, dan/noć), i to uglavnom nakon 7. dana tretmana. Zapaženo je da toplotni stres indukuje ekspresiju gena za hloroplastne StSOD (*StCuZnSOD2*, *StFeSOD2* i *StFeSOD3*) u listovima, citosolne (*StCuZnSOD1*) i mitohondrijalne (*StMnSOD*) StSOD u stolonima, dok na ekspresiju *StSOD* u drugim organima nije imao značajnijeg uticaja. Dati rezultati ukazuju da StSOD imaju važnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti ćelija listova i stolona krompira u uslovima visokih temperatura.

**Ključne reči:** krompir, *Solanum tuberosum* L., superoksid-dismutaze, toplotni stres, oksidativni stres, antioksidativni enzimi

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Fiziologija i molekularna biologija biljaka

## **Superoxide dismutases in potato (*Solanum tuberosum* L.): characterisation of isoforms and expression under high temperature**

### **Abstract**

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most important vegetable crops and is very sensitive to high temperatures. Heat stress causes an imbalance in the production and elimination of reactive oxygen species (ROS) in plant cells, leading to secondary oxidative stress. Superoxide dismutases (SODs) are important antioxidant enzymes involved in the defense of plant cells against ROS, which have not been studied in detail in potato so far. The results of this work revealed that the potato *SOD* gene family includes eight genes (*StCuZnSOD1-3*, *StMnSOD* and *StFeSOD1-4*), whose promoter regions and transcript exon-intron structure were examined *in silico*. *In silico* analysis also included physicochemical characterization of the StSOD proteins, identification of the SOD domains, assessment of the N-terminal signal in the peptides, prediction of the subcellular localization and tertiary structure of StSODs, and revealed the phylogenetic relationships between StSODs and SODs of other plant species. The expression of *StSOD* was investigated in commercial potato varieties grown *in vitro* during different temperature treatments. All eight *StSOD* genes were functional, and six genes were highly expressed. A temperature of 29 °C induced *StSOD* expression the most. Also, in *ex vitro* grown plants, an increased expression of *StSOD* was found under heat stress (30/20°C, day/night), mainly after the 7th day of treatment. It was noted that heat stress predominantly induces the expression of genes encoding chloroplast StSODs (*StCuZnSOD2*, *StFeSOD2* and *StFeSOD3*) in leaves, genes encoding cytosolic (*StCuZnSOD1*) and mitochondrial (*StMnSOD*) StSODs in stolons, while it had no significant effect on the expression of *StSODs* in other organs. The obtained results indicate that StSOD plays an important role in the antioxidant protection of potato leaf and stolon cells under high temperature.

**Key words:** potato, *Solanum tuberosum* L., superoxide dismutases, heat stress, oxidative stress, antioxidant enzymes

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Plant Physiology and Molecular Biology

## LISTA SKRAĆENICA

ABA – apscisinska kiselina

ABRE – ABA vezujući elementi (eng. *Ab*scisic Acid *R*esponsive *E*lements)

ANOVA – analiza varijanse

APX – askorbat-peroksidaza

AsA – askorbinska kiselina (vitamin C)

bZIP – eng. *b*asic *L*eucine *Z*ipper *D*omain

C – cistein (Cys)

CAT – katalaze

CCS – bakar-šaperon za SOD (eng. *C*opper *C*haperone for *S*OD)

CDD – baza konzervativnih domena (eng. *C*onserved *D*omain *D*atabase)

cDNK – komplementarni lanac DNK

Ct – prag ciklus (eng. *C*ycle *t*hreshold)

CYC – gen koji kodira protein ciklofilin (eng. *c*yclophilin)

D – asparaginska kiselina (Asp)

DEPC – dietilpirokarbonat

DHAR – dehidroaskorbat-reduktaza

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

E – glutaminska kiselina (Glu)

EDTA – etilendiamintetrasirćetna kiselina

FAD – flavin adenin dinukleotid

GA – giberelini

GO – ontologija gena (eng. *G*ene *O*ntology)

GPOX – gvajakol-peroksidaze

GPX – glutation-peroksidaza

GR – glutation-reduktaza

GSH – glutation

GST – glutation S-transferaza

H – histidin (His)

HSP – protein toplotnog stresa (eng. *H*eat *S*hock *P*rotein)

JA – jasmonat

MAPK – mitogenom aktivirane protein-kinaze (eng. *Mitogen Activated Protein Kinase*)

MDHAR – monodehidroaskorbat-reduktaza

MYB – eng. *Myeloblastosis Related Protein*

MYC – eng. *Myelocytomatosis Related Protein*

N – asparagin (Asn)

NADP – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NADPH-oksidadza – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat-oksidadza

NBT – nitro-plavo tetrazolijum hlorid (eng. *nitro-blue-tetrazolium chloride*)

NDPK2 – nukleozid difosfat-kinaza 2

PAP – protein PEP kompleksa (eng. *PEP-Associated Protein*)

PCD – programirana smrt ćelija (eng. *Programmed Cell Death*)

PCR – lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*)

PEP – RNK-polimeraze kodirane od strane plastida (eng. *Plastid-Encoded RNA Polymerase*)

Por – porfirinski prsten

PpSBP2 – eng. *SQUAMOSA Promoter-Binding-Protein*

PSI – fotosistem I

PSII – fotosistem II

Q – glutamin (Gln)

qRT-PCR – kvantitativni RT-PCR

RBOH – enzimi NAD(P)H-oksidadze (eng. *Respiratory Burst Oxidase Homologue*)

RNK – ribonukleinska kiselina

ROS – reaktivne vrste kiseonika (eng. *Reactive Oxygen Species*)

Rubisco – ribuloza 1,5-bisfosfat-karboksilaza/oksigenaza

SA – salicilna kiselina

60SL36 – gen koji kodira 60S ribozomalni protein

SOD – superoksid-dismutaza

SPL7 – eng. *SQUAMOSA Promoter-Binding-Protein-Like*

SPP – peptidaza u stromi hloroplasta (eng. *Stromal Processing Peptidase*)

TF – transkripcioni faktor

W – triptofan (Trp)

Y – tirozin (Tyr)



## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. ROS i superoksid anjon radikal.....	1
1.1.1. Mesta produkcije ROS u biljnim ćelijama.....	3
1.1.2. Uloge ROS.....	6
1.2. Antioksidativna zaštita biljne ćelije .....	6
1.2.1. Neenzimski antioksidanti.....	7
1.2.2. Antioksidativni enzimi.....	8
1.3. SOD.....	10
1.3.1. FeSOD .....	13
1.3.1.1. Nastanak, otkriće i rasprostranjenost .....	13
1.3.1.2. Struktura proteina i aktivnog mesta .....	13
1.3.1.3. Katalitički mehanizam FeSOD .....	14
1.3.2. MnSOD.....	15
1.3.2.1. Nastanak, otkriće i rasprostranjenost .....	15
1.3.2.2. Struktura proteina i aktivnog mesta .....	16
1.3.3. CuZnSOD .....	17
1.3.3.1. Nastanak, otkriće i rasprostranjenost .....	17
1.3.3.2. Struktura proteina i aktivnog mesta .....	18
1.3.4. Karakterizacija biljnih <i>SOD</i> gena .....	19
1.3.5. Regulacija ekspresije <i>SOD</i> gena.....	20
1.4. Uticaj visoke temperature na biljnu ćeliju.....	23
1.5. Krompir ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) .....	24
1.5.1. Značaj i istorijat gajenja.....	24
1.5.2. Biološka klasifikacija vrste.....	25
1.5.3. Morfološke karakteristike krompira i faze razvića.....	26
1.5.4. Uticaj temperature na rastenje i razviće biljaka krompira .....	27
1.5.5. Uticaj visoke temperature na morfološke, fiziološke i nutritivne karakteristike krtola ...	28
1.5.6. Uticaj visoke temperature na produktivnost krompira .....	29
1.5.7. SOD i toplotna tolerancija krompira.....	29
2. CILJEVI RADA.....	31
3. MATERIJAL I METODE .....	32
3.1. <i>In silico</i> analiza gena i proteina krompira .....	32
3.1.1. Pretraga baza podataka genoma krompira, opis gena i proteina .....	32
3.1.2. Analiza promotora <i>StSOD</i> i predikcija interakcije TF i regulatornih elemenata u <i>StSOD</i> promotorima .....	32

3.1.3. <i>In silico</i> karakterizacija SOD proteina krompira .....	32
3.1.4. Filogenetska analiza SOD krompira .....	33
3.2. Biljni materijal.....	33
3.3. Uspostavljanje kulture <i>in vitro</i> .....	34
3.4. Eksperimenti sa biljkama gajenim <i>in vitro</i> .....	34
3.4.1. Priprema biljnog materijala za ispitivanje uticaja temperature na ekspresiju <i>StSOD</i> gena kod biljaka krompira sorte Désirée .....	34
3.4.2. Ispitivanje aktivnosti StSOD enzima u listovima biljaka sorte Désirée gajenih <i>in vitro</i> ..	35
3.4.2.1. Izolacija proteina iz biljnog materijala.....	35
3.4.2.2. NATIVE-PAGE elektroforeza .....	35
3.4.2.3. Esej za određivanje aktivnosti StSOD .....	36
3.4.3. Eksperiment uticaja temperature i SA na rastenje i razviće biljaka i ekspresiju <i>StSOD</i> gena odabranih sorti krompira gajenih <i>in vitro</i> .....	36
3.5. Eksperiment uticaja temperature na rastenje i razviće biljaka i ekspresiju <i>StSOD</i> gena krompira sorte Désirée gajenog <i>ex vitro</i> .....	36
3.6. Analiza ekspresije gena .....	37
3.6.1. Izolacija RNK iz biljnog materijala krompira .....	37
3.6.2. Određivanje kvantiteta i kvaliteta izolovane RNK .....	38
3.6.3. Tretman dezoksiribonukleazom (DNK-azom) .....	38
3.6.4. Reverzna transkripcija .....	38
3.6.5. Reakcija lančanog umnožavanja (PCR) .....	39
3.6.6. Određivanje nivoa ekspresije gena metodom kvantitativnog PCR (qRT-PCR).....	40
3.6.6.1. Priprema standarda za apsolutnu kvantifikaciju PCR produkata.....	41
3.7. Statistička analiza rezultata .....	42
4. REZULTATI.....	43
4.1. <i>In silico</i> analiza <i>SOD</i> familije gena i SOD proteina krompira .....	43
4.1.1. <i>StSOD</i> geni: struktura i pozicija na hromozomima .....	43
4.1.2. Analiza promotorskih regiona <i>StSOD</i> gena .....	47
4.1.3. Karakteristike StSOD proteina .....	51
4.1.4. Identifikacija proteinskih domena i predikcija prisustva N-terminalnog tranzitnog peptida kod StSOD proteina.....	53
4.1.5. Predikcija tercijarne strukture StSOD proteina .....	54
4.1.6. Subćelijska lokalizacija StSOD proteina .....	58
4.1.7. Filogenetski odnosi StSOD proteina .....	59
4.2. Ispitivanje ekspresije <i>StSOD</i> gena.....	63
4.2.1. Uticaj različitih temperaturnih tretmana na ekspresiju <i>StSOD</i> gena u listovima biljaka sorte Désirée gajenih <i>in vitro</i> .....	63

4.2.2. Uticaj različitih temperaturnih tretmana na aktivnost SOD enzima u listovima biljaka sorte Désirée gajenih <i>in vitro</i> .....	66
4.2.3. Uticaj temperature i SA na ekspresiju <i>StSOD</i> gena i morfologiju biljaka odabranih genotipova krompira gajenih <i>in vitro</i> .....	67
4.2.3.1. Uticaj temperature i SA na preživljavanje eksplantata, rastenje i razviće biljaka krompira .....	67
4.2.3.2. Ekspresija <i>StHSP</i> gena kao pokazatelja (markera) toplotnog stresa.....	70
4.2.3.3. Uticaj različitih temperaturnih tretmana i SA na ekspresiju <i>StSOD</i> gena u listovima biljaka različitih sorti krompira gajenih <i>in vitro</i> .....	72
4.2.4. Ekspresija <i>StSOD</i> gena u različitim organima biljaka krompira gajenih <i>ex vitro</i> .....	74
4.2.5. Uticaj dugotrajnog toplotnog stresa na ekspresiju <i>StSOD</i> gena u različitim organima biljaka krompira gajenih <i>ex vitro</i> .....	77
5. DISKUSIJA .....	79
5.1. <i>In silico</i> analiza <i>SOD</i> familije gena i <i>SOD</i> proteina krompira .....	79
5.1.1. Identifikacija i karakterizacija <i>StSOD</i> gena .....	79
5.1.1.1. Promotorski regioni <i>StSOD</i> gena .....	80
5.1.2. Karakterizacija <i>SOD</i> proteina krompira .....	82
5.1.2.1. <i>StCuZnSOD</i> .....	82
5.1.2.2. <i>Mn-FeSOD</i> .....	83
5.1.2.2.1. <i>StMnSOD</i> .....	83
5.1.2.2.2. <i>StFeSOD</i> .....	84
5.2. Uticaj različitih temperaturnih tretmana na ekspresiju <i>StSOD</i> gena i aktivnost <i>StSOD</i> proteina u listovima biljaka sorte Désirée gajenih <i>in vitro</i> .....	86
5.3. Uticaj temperature i SA na morfologiju biljaka i ekspresiju <i>StSOD</i> gena odabranih genotipova krompira gajenih <i>in vitro</i> .....	87
5.3.1. Uticaj temperature i SA na morfološke parametre biljaka krompira gajenih <i>in vitro</i> .....	87
5.3.2. Ekspresija <i>HSP</i> gena kao potencijalnih pokazatelja (markera) toplotnog stresa.....	88
5.3.3. Uticaj temperature i SA na ekspresiju <i>StSOD</i> gena odabranih genotipova krompira gajenih <i>in vitro</i> .....	89
5.4. Uticaj temperature na ekspresiju <i>StSOD</i> gena u različitim organima biljaka sorte Désirée gajenih <i>ex vitro</i> .....	90
6. ZAKLJUČCI.....	92
7. LITERATURA.....	94
BIOGRAFIJA AUTORA.....	114

## 1. UVOD

Variranje faktora spoljašnje sredine van optimalnog opsega vrednosti može dovesti do abiotičkog stresa, tj. skupa morfo-anatomske, fiziološke i biohemijske promene u biljnom organizmu ili ćelijama, koji značajno redukuje produktivnost poljoprivrednih kultura. Svim faktorima abiotičkog stresa, kao što su niska i visoka temperatura, nedostatak ili višak vode, UV i jonizujuće zračenje, visok salinitet i prisustvo teških metala u zemljištu, zajedničko je da prouzrokuju sekundarni oksidativni stres, koji nastaje usled neravnoteže između produkcije i eliminacije reaktivnih vrsta kiseonika (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS) u biljnim ćelijama. Naime, prekomerna akumulacija ROS i ograničen kapacitet antioksidativnog sistema biljne ćelije za njihovo procesovanje vodi povećanju učestalosti oksidativnih oštećenja biomolekula koje dati molekuli ili joni uzrokuju. U fiziološkim uslovima, ROS se proizvode prvenstveno u hloroplastima i peroksizomima tokom procesa koji zavise od svetlosti, kao i u mitohondrijama, u procesima nezavisnim od svetlosti (Farooq i sar., 2019).

Superoksid-dismutaze (SOD, EC 1.15.1.1) su antioksidativni enzimi koji učestvuju u prvoj liniji odbrane biljnih ćelija od ROS tokom oksidativnog stresa. SOD su holoenzimi koji pored proteinskog dela (apoenzima) sadrže metalne jone kao kofaktore. Kod biljaka postoje tri tipa SOD, sa gvožđem (FeSOD), manganom (MnSOD), bakrom i cinkom (CuZnSOD) u aktivnom centru. Biljne SOD su kodirane jedarnim genima, a nakon sinteze na citoplazmatičnim ribozomima, mogu ostati u citosolu ili se transportuju u različite ćelijske odeljke: hloroplaste, mitohondrije, peroksizome i apoplast. Ekspresija *SOD* gena može biti modulirana tokom različitih faza rasta i razvika biljke, kao i delovanjem faktora spoljašnje sredine, tj. biotičkih i abiotičkih stresora. Kod različitih biljnih vrsta ustanovljeno da faktori abiotičkog stresa, kao što su deficit vode, visok salinitet, teški metali, hipoksija, niska i visoka temperatura, dovode do pojačane ekspresije i aktivnosti SOD (Perl-Treves i Galun, 1991; Hernández i sar., 2000; Oudaira i sar., 2000; Rivero i sar., 2004; Sairam i Dharmar, 2011; Chaoui i El Ferjani, 2014).

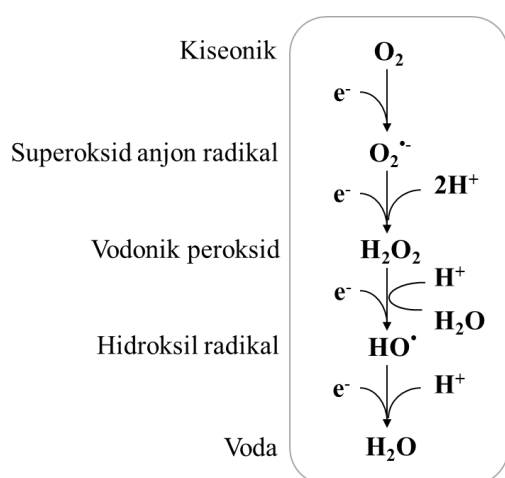
Krompir je među najznačajnijim povrtarskim kulturama, koje se gaje za potrebe ljudske ishrane i izuzetno je osetljiv na povišene temperature. Visoke temperature negativno utiču na rastenje i razvika biljaka krompira, redukuju broj i masu krtola, što se negativno odražava na ukupni i merkantilni prinos (Momčilović i sar., 2021). Ispitivanje mehanizama koji su u osnovi odgovora na delovanje visokih temperatura je od velike važnosti kada se radi o ovoj poljoprivrednoj kulturi. Na ćelijskom nivou, visoke temperature dovode do denaturacije proteina, njihove spontane agregacije i veće fluidnosti membranskog dvosloja. Promene u fluidnosti membrana se odražavaju na njihovu propustljivost, položaj integrisanih membranskih proteina i aktivnost transportnih proteina (Los i Murata, 2004). Usled toplotnog stresa dolazi do remećenja transporta elektrona na membranama hloroplastnih tilakoida i mitohondrija, što za posledicu ima prekomernu produkciju ROS i nastanak oksidativnog stresa. Istraživanjima na transgenim biljkama krompira pokazano je da pojačana ekspresija *SOD* gena doprinosi boljoj toleranciji na visoke temperature i da neki tipovi SOD, poput MnSOD i CuZnSOD, imaju značajnu ulogu u toleranciji krompira na toplotni stres. Naime, ustanovljeno je da pojačana ekspresija *MnSOD* i *CuZnSOD* gena, pojedinačno ili u kombinaciji sa drugim genima, dovodi do povećane otpornosti na stres izazvan visokim temperaturama kod genetički transformisanih biljaka (Waterer i sar., 2010; Kim i sar., 2010.).

### 1.1. ROS i superoksid anjon radikal

Kiseonik (molekulski kiseonik ili dioksigen, O<sub>2</sub>), iako neophodan za život aerobnih organizama, može biti izuzetno toksičan ukoliko je u pobuđenom stanju (singlet) ili nepotpuno redukovan. Vrste kiseonika koje nastaju apsorpcijom energije ili parcijalnom redukcijom O<sub>2</sub> molekula sa jednim, dva ili tri elektrona označavaju se kao ROS. Najzastupljenije ROS u ćeliji su: singlet kiseonik (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), vodonik peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superoksid anjon radikal (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) i hidroksil radikal

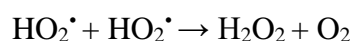
(HO<sup>•</sup>), koje se smatraju ROS u užem smislu (Lin i Deng, 2021). Takođe, u ćelijama su prisutni i alkoksil radikal (RO<sup>•</sup>), peroksil radikal (ROO<sup>•</sup>), hipohlorasta kiselina (HOCl), hipobromna kiselina (HOBr), peroksinitriti (ONOO<sup>-</sup>/ONOOH), karbonatni anjon (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) i azot-dioksid radikal (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>) (Murphy i sar., 2022), koji se smatraju ROS u širem smislu (Lin i Deng, 2021).

Atmosferski kiseonik (molekul kiseonika) u svom elementarnom stanju sadrži dva nesparena elektrona paralelnih spinova u spoljnim molekulskim orbitalama, zbog čega je najčešće nereaktivan sa organskim molekulima. Apsorpcijom određene količine energije, koja je dovoljna da se promeni spin jednog od nesparenih elektrona, kiseonik se aktivira, tj. prelazi u pobuđeno stanje, singlet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (Halliwell, 2006). Kod biljaka singlet kiseonik se često formira u normalnim uslovima u nivou fotosistema i ima ulogu u metaboličkim reakcijama. Takođe, singlet kiseonik može nastati i zbog poremećaja u aktivnosti enzima ili elektron transportnog sistema hloroplasta pri delovanju stresora. Drugi način na koji se može aktivirati molekul kiseonika je redukcijom, pri čemu se formiraju superoksid anjon radikal (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), vodonik peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i hidroksil radikal (HO<sup>•</sup>) (Slika 1.).

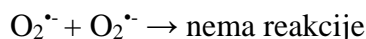


**Slika 1.** Nastanak ROS postupnom redukcijom kiseonika.

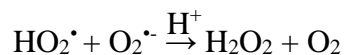
O<sub>2</sub><sup>•-</sup> nastaje redukcijom molekula kiseonika sa jednim elektronom, a u hemijskim reakcijama se ponaša kao jak oksidant i reduktant (Slater i sar., 2008). Reakcijom dismutacije, spontanom ili katalizovanom SOD enzimima, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> se prevodi u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i molekul kiseonika. Do pojave O<sub>2</sub><sup>•-</sup> je došlo najverovatnije pre 2,4 milijarde godina, prilikom tzv. „Velikog događaja oksidacije“ (eng. *The Great Oxidation Event*). Naime, u eri paleoproterozoika došlo je do porasta nivoa kiseonika u Zemljinoj atmosferi i plićim delovima okeana, kao rezultat kiseonične fotosinteze od strane Cyanobacteria (Sheng i sar., 2014). O<sub>2</sub><sup>•-</sup> je relativno mali anjon, rastvorljiv u vodi, gde se solvatacija ostvaruje pomoću četiri molekula vode. Hidroperoksil radikal (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>) je protonovana forma O<sub>2</sub><sup>•-</sup> koja predstavlja slabu kiselinu (pK<sub>a</sub> 4,8). O<sub>2</sub><sup>•-</sup> i HO<sub>2</sub><sup>•</sup> u hemijskom smislu mogu funkcionisati kao oksidanti i reduktanti. Obe forme su podjednako jaka redukciona sredstva, dok je HO<sub>2</sub><sup>•</sup> jače oksidaciono sredstvo u većini reakcija. Kada O<sub>2</sub><sup>•-</sup> preuzme elektron nastaje peroksid dianjon (O<sub>2</sub><sup>2-</sup>), koji je nestabilan i potreban mu je ili H<sup>+</sup> ili metalni jon, kako bi se stabilizovao, te je zbog toga HO<sub>2</sub><sup>•</sup> bolji oksidant od O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. U sredini niske pH vrednosti je dominantna protonovana forma O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>), koja može spontano da se transformiše u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>2</sub>, što je prikazano u sledećoj jednačini:



Pri visokim pH vrednostima rastvora (pH>9), dominantna je O<sub>2</sub><sup>•-</sup> forma, koja je veoma stabilna u ovim uslovima. Dva O<sub>2</sub><sup>•-</sup> se odbijaju zbog jakog negativnog naelektrisanja, stoga ne dolazi do spontane reakcije dismutacije:



Reakcija dismutacije je najbrža kada je pH=pK<sub>a</sub>=4,8, tj. u uslovima u kojima su koncentracije HO<sub>2</sub><sup>•</sup> i O<sub>2</sub><sup>•-</sup> jednake, te HO<sub>2</sub><sup>•</sup> ima ulogu oksidanta, a O<sub>2</sub><sup>•-</sup> reduktanta:

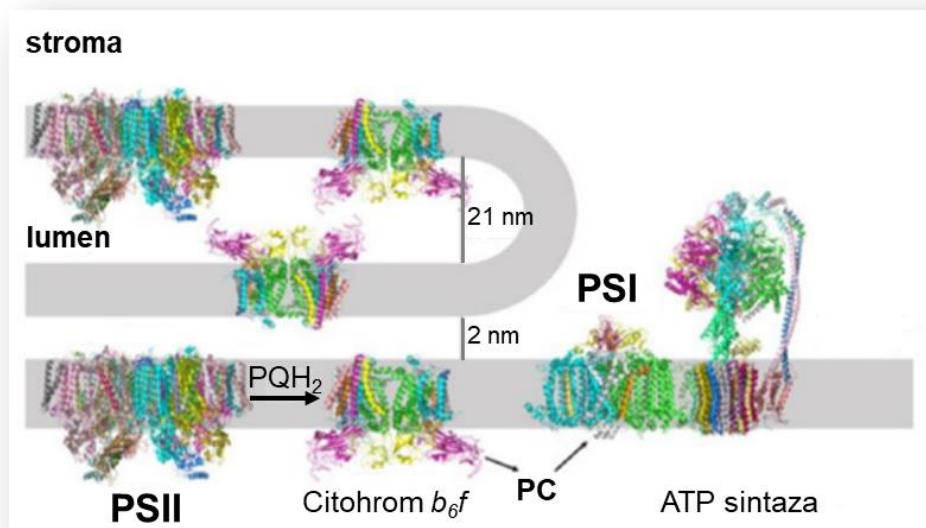


Sa izuzetkom Fe-S proteina (Imlay, 2006), O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ne pokazuje visoku reaktivnost sa ćelijskim biomolekulima poput ugljenih hidrata, nukleinskih kiselina, proteina ili lipida i stoga se ne može označiti kao neselektivni „super“ oksidant (Sheng i sar., 2014). Međutim, dismutacijom O<sub>2</sub><sup>•-</sup> nastaje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koji interaguje sa proteinima, „napadajući“ cisteinske i metioninske aminokiselinske ostatke ili hem prostetičku grupu, kao i sa DNK (Mittler, 2017). Takođe, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> može reagovati sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u Haber-Weiss-ovoj reakciji i generisati visoko reaktivan HO<sup>•</sup> (Kehrer, 2000). HO<sup>•</sup> je reaktivan sa svim biomolekulima uključujući DNK, RNK, lipide i proteine (Mittler, 2017). Kao snažan oksidujući agens, HO<sup>•</sup> u interakciji sa organskim molekulima dovodi do formiranja organskih radikala ili do hidroksilacije organskih molekula. Organski radikali mogu potom reagovati sa molekularnim kiseonikom i dati peroksil radikal (ROO<sup>•</sup>), što dalje može voditi nizu reakcija u kojima će nastajati novi organski radikali (Slater i sar., 2008).

### 1.1.1. Mesta produkcije ROS u biljnim ćelijama

Glavna mesta u biljnim ćelijama u kojima se produkuju ROS su hloroplasti, mitohondrije i peroksizomi (Sharma i sar., 2012; Qi i sar., 2017). Osim intracelularno, ROS se sintetišu i u apoplastu pomoću enzima NAD(P)H oksidaza, koji se nalaze na spoljašnjoj strani plazma membrane.

U hloroplastima su reakcioni centri fotosistema I (eng. *Photosystem I*, PSI) i fotosistema II (eng. *Photosystem II*, PSII), primarna mesta produkcije ROS (Asada, 2006). Ovde ROS uglavnom mogu nastati na dva načina: interakcijom kiseonika sa ekscitiranim hlorofilom u okviru procesa u PSII ili prenosom elektrona sa feredoksina na kiseonik u okviru PSI. Tokom reakcija u PSII nastaje <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, dok u PSI nastaju O<sub>2</sub><sup>•-</sup> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. S obzirom da se PSI nalazi u membranama tilakoida strome, a PSII u membranama tilakoida grana, produkcija ROS se odvija na dva mesta u hloroplastima, u stromi i u lumenu tilakoida grana (**Slika 2.**).



**Slika 2.** Mesta produkcije ROS u hloroplastima. PSI, fotosistem I; PSII, fotosistem II; PQH<sub>2</sub>, plastokinol; PC, plastocijanin. Preuzeto i modifikovano prema Bhaduri i sar. (2020).

Fotosinteza je proces koji uključuje niz sukcesivnih reakcija. Apsorpcija svetlosti i migracija ekscitona su brze reakcije, dok je za prenos elektrona potrebno više vremena. Molekul hlorofila po apsorpciji fotona prelazi u ekscitirano stanje i teži da se brzo oslobodi viška energije predajući elektron primarnim akceptorima. Ukoliko se apsorbuje previše svetlosti, ekscitirani molekul hlorofila ne uspeva da se oslobodi viška energije, te prelazi u triplet stanje (<sup>3</sup>HI) i prenosi energiju alternativnim akceptorima, kao što je kiseonik (Asada, 2006). Primajući dodatnu energiju molekul kiseonika se prevodi u singlet stanje (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), koje je reaktivno. <sup>1</sup>O<sub>2</sub> direktno oksiduje proteine, nezasićene masne kiseline i DNK (Sharma i sar., 2012). Takođe, ukoliko je plastokinonski pul redukovani i ne može primiti elektrone, oni će biti preusmereni na molekule kiseonika. U fiziološkim uslovima, elektroni se transportuju od reakcionih centara PSI i PSII do NADP, koji se redukuje u NADPH, a potom ulazi u Kalvinov ciklus i učestvuje u redukciji CO<sub>2</sub>. Međutim, ukoliko je pul NADP potpuno redukovani, u PSI dolazi do zastoja i „curenja“ elektrona sa feredoksina na molekul kiseonika, koji redukcijom daje O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Asada, 1999; Farooq i sar., 2019).

U mitohondrijama dolazi do produkcije ROS tokom procesa oksidativne fosforilacije. Na unutrašnjoj membrani mitohondrija nalazi se elektron transportni lanac, koji se sastoji od četiri proteinska kompleksa. U kompleksima I i III, može doći do prenosa elektrona na molekul kiseonika i nastanka O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Rhoads i sar., 2006). U kompleksu I, koji ima funkciju NAD(P)H-dehidrogenaze, dolazi do oksidacije NAD(P)H i direktnog prenosa elektrona na ubikinon. Redukovani ubikinon predstavlja glavno redukujuće sredstvo u mitohondrijama. Kompleksi I i II su početni donori elektrona, koji se preko ubikinona prenose na kompleks III, citohrom *c* i kompleks IV. Krajnji akceptor elektrona je kiseonik, koji se pri tome redukuje do molekula vode. U slučaju intenzivnijeg procesa disanja povećava se priliv elektrona u respiratorni elektron transportni lanac, što vodi povećanoj koncentraciji redukovanog ubikinona i nemogućnosti da se oksiduje preko kompleksa III. Usled zastoja u citohromskom putu, elektroni sa redukovanog ubikinona se prenose na kiseonik i parcijalno ga redukuju.

Pored <sup>1</sup>O<sub>2</sub> i O<sub>2</sub><sup>-</sup>, u biljnim ćelijama se produkuje velika količina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Peroksizomi su glavna mesta u biljnim ćelijama u kojima, kao sporedni proizvod metaboličkih reakcija, nastaje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se primarno produkuje u reakciji oksidacije glikolata pomoću enzima glikolat-oksidge (del Río i sar., 2016). Glikolat, koji nastaje oksigenacijom ribuloze-1,5-bisfosfata (Ru-1,5-BP) u hloroplastima,

transportuje se u peroksizome, zatim se oksiduje u gliksilat uz potrošnju molekula kiseonika, pri čemu kao sporedni proizvod nastaje  $H_2O_2$ .

Do produkcije  $H_2O_2$  u peroksizomima dolazi i tokom  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina. Prvi korak u razlaganju masnih kiselina je njihova aktivacija vezivanjem za koenzim A (CoA), nakon čega sledi oksidacija pomoću acil-CoA-oksidade, koji sadrži FAD kao prostetičku grupu (Poirier i sar., 2006). Sa koenzima  $FADH_2$  elektroni se direktno prenose na molekul kiseonika, pri čemu nastaje  $H_2O_2$ .

U peroksizomima, kao sporedni proizvod metaboličkih reakcija nastaje i  $O_2^{\cdot-}$ . Na osnovu analiza rađenih na peroksizomima graška (*Pisum sativum*) i kotiledona lubenice (*Citrullus vulgaris*), utvrđeno je da postoje bar dva mesta u peroksizomima gde mogu nastati  $O_2^{\cdot-}$  (del Río i sar., 2016). Jedno mesto je matriks, gde u reakciji oksidacije hipoksantina i ksantina do urinske kiseline, koju katalizuje enzim ksantin-oksidade, dolazi do redukcije kiseonika i formiranja  $O_2^{\cdot-}$ . Otkriveno je i da enzim urat-oksidade, koji je takođe prisutan u matriksu peroksizoma, doprinosi produkciji  $O_2^{\cdot-}$ . Drugo mesto na kojem nastaju  $O_2^{\cdot-}$  je peroksizomalna membrana, u kojoj se nalazi mali elektron transportni lanac sačinjen od flavoproteina (NADH-zavisna fericijanid-reduktaza) i citohroma *b* (Cyt *b*) (Luster i Donaldson, 1987). Analizom peroksizomalnih membrana *P. sativum*, utvrđeno je da postoje najmanje tri polipeptida (PMP18, PMP29 i PMP32), koji imaju ulogu u produkciji  $O_2^{\cdot-}$  (López-Huertas i sar., 1999). Glavno mesto produkcije  $O_2^{\cdot-}$  je u nivou PMP18, koji verovatno predstavlja Cyt *b*<sub>5</sub> (López-Huertas i sar., 1997). PMP29 predstavlja peroksizomalnu NADPH-zavisnu Cyt P450-reduktazu, dok PMP32 verovatno odgovara monodehidroaskorbat-reduktazi (MDHAR), enzimu askorbat-glutation ciklusa (López-Huertas i sar., 1999).

$O_2^{\cdot-}$  nastaju u endoplazmatičnom retikulumu kao sporedni proizvodi reakcija u kojima učestvuju Cyt P450 i NAD(P)H-zavisne citohrom P450-reduktaze (Das i sar., 2014; Janků i sar., 2019). Enzimi Cyt P450 sadrže hem-tiolat kao kofaktor i kod eukariota su najčešće vezani za endoplazmatični retikulum ili unutrašnju membranu mitohondrija (Werck-Reichhart i Feyereisen, 2000; Pandian i sar., 2020). Oksidacija, koju katalizuje Cyt P450, sastoji se od nekoliko etapa. Reakcija započinje vezivanjem organskog supstrata (R) za hem grupu enzima Cyt P450, nakon čega NAD(P)H-zavisna citohrom P450-reduktaza predaje elektron Cyt P450 i redukuje  $Fe^{3+}$ . Zatim dolazi do vezivanja molekula kiseonika za kompleks Cyt P450-R i nastanka dioksigen kompleksa. NAD(P)H-zavisna citohrom P450-reduktaza predaje još jedan elektron dioksigen kompleksu i nastaje peroksi kompleks (Cyt P450-ROO $^{\cdot-}$ ), koji spontanom razlaganjem oslobađa  $O_2^{\cdot-}$  (Das i sar., 2014; Pandian i sar., 2020).

Osim unutar ćelija, ROS se produkuju i u apoplastu. Enzimi NAD(P)H-oksidade, koji se kod biljaka nazivaju i eng. *Respiratory Burst Oxidase Homologs* (RBOH), nalaze se na spoljašnjoj strani plazma membrane i imaju ključnu ulogu u produkciji  $O_2^{\cdot-}$ . Ovi enzimi su strukturno i funkcionalno homologni NAD(P)H-oksidadama sisara, a njihova uloga je da preuzimaju elektrone od NAD(P)H iz citosola i redukuju kiseonik u apoplastu (Kadota i sar., 2015). Ulaskom  $Ca^{2+}$  iz apoplasta u ćeliju dolazi do aktivacije RBOH, produkcije i akumulacije  $O_2^{\cdot-}$ . Apoplastni  $O_2^{\cdot-}$  potom iniciraju ulazak  $Ca^{2+}$  u susedne ćelije, što predstavlja ROS-posredovani prenos signala i vodi razvoju tolerancije biljaka na stres (Miller i sar., 2009; Novaković i sar., 2018).  $O_2^{\cdot-}$  se dalje konvertuju u  $H_2O_2$  i molekul kiseonika u prisustvu apoplastnih SOD. Drugi mehanizmi kojima nastaju ROS u apoplastu su posredovani enzimima ksantin-dehidrogenazom (Ma i sar., 2016), peroksidazama ćelijskog zida (peroksidaze klase III) (Francoz i sar., 2015) i oksalat-oksidadom (Voothuluru i Sharp, 2013). Enzim ksantin-dehidrogenaza je uključen u produkciju  $O_2^{\cdot-}$ , oksalat-oksidade katalizuje produkciju  $H_2O_2$ , dok peroksidaze klase III mogu učestvovati u produkciji  $H_2O_2$  i  $HO^{\cdot}$ . Naime, osim što katalizuju oksidaciju različitih supstrata koristeći  $H_2O_2$  kao oksidant, peroksidaze klase III u prisustvu reduktanta NADH mogu katalizovati produkciju  $H_2O_2$ , kao i njegovu redukciju do  $HO^{\cdot}$ . Produkcija ROS u apoplastu od strane peroksidaza klase III je značajna za rastenje ćelije (Francoz i sar., 2015). Naime, kada je dovoljno  $H_2O_2$  u apoplastu, peroksidaze katalizuju oksidaciju aromatičnih komponenti ćelijskog zida, što vodi njegovom očvršćavanju. Sa druge strane, redukcijom  $H_2O_2$  nastaje veoma reaktivan  $HO^{\cdot}$ , koji može da raskine kovalentne veze u polimerima ćelijskog zida,



usled čega dolazi do njegovog razmekšavanja. U proces neutralizacije apoplastnih ROS uključeni su enzimi CuZnSOD i askorbat-peroksidaza (APX), kao i askorbat i glutation. Međutim, vanćelijska antioksidativna zaštita je manje efikasna u poređenju sa unutarćelijskom antioksidativnom zaštitom. Na ovaj način je omogućena kontinuirana produkcija apoplastnih ROS, što dalje vodi ROS-posredovanom prenosu signala između susednih biljnih ćelija i razvoju tolerancije biljaka na stres (Novaković i sar., 2018). Na primer, kod breskve (*Prunus persica*), koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u apoplastu iznosi 25 pmol g<sup>-1</sup> u optimalnim fiziološkim uslovima, dok u uslovima biotičkog stresa (infekcija virusom šarke šljive), iznosi približno 50 pmol g<sup>-1</sup> (Diaz-Vivancos i sar., 2006).

### 1.1.2. Uloge ROS

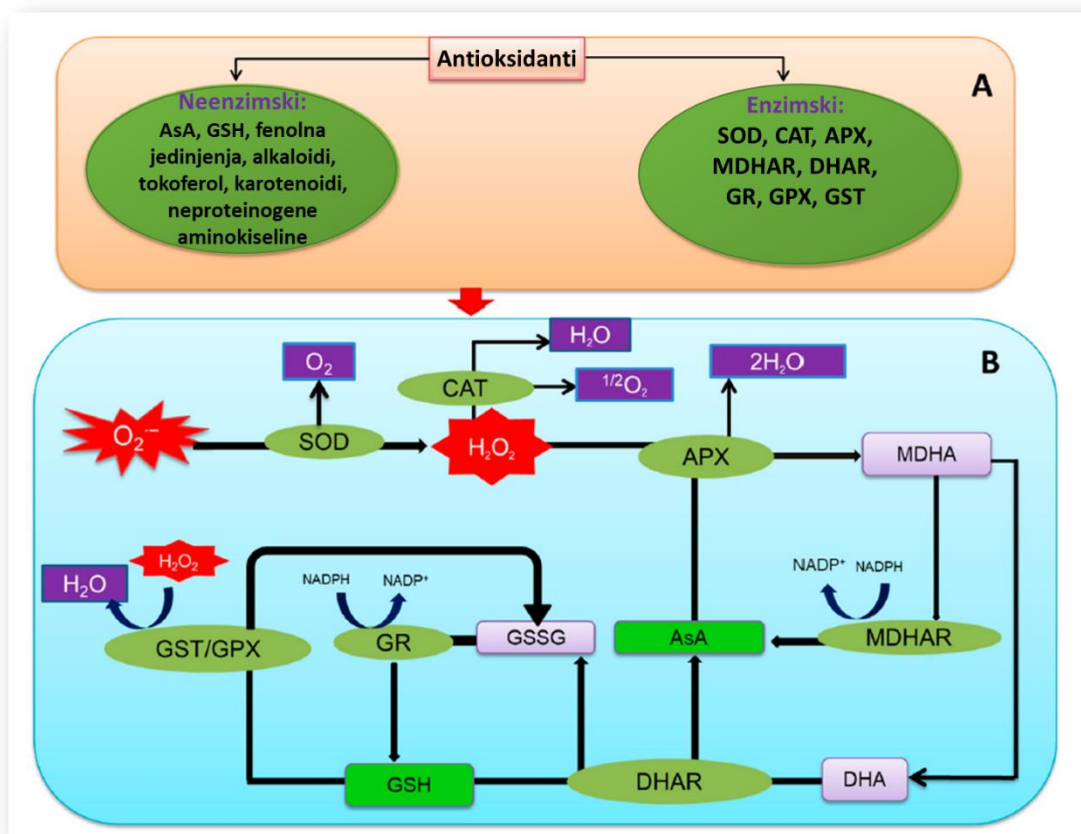
ROS imaju dvostruku ulogu u ćelijama (Miller i sar., 2009). U normalnim fiziološkim uslovima ROS imaju funkciju signalnih molekula i prisutni su u svim biljnim tkivima, a naročito u metabolički aktivnim (Huang i sar., 2019). ROS su uključene u brojne procese razvića poput remodeliranja ćelijskog zida, klijanja semena, rasteanja korena, oplodnje i razvića ploda (Medina i sar., 2021). ROS su značajne u procesu razvića listova, senescenciji i dormanciji. Utvrđeno je da ROS prekidaju dormanciju i indukuju klijanje krtola krompira (Bajji i sar., 2007; Liu i sar., 2017). Apoplastne ROS interagujući sa polisaharidima ćelijskog zida dovode do rearanžmana istog, što za posledicu ima rast ćelije (Podgórska i sar., 2017). Vanćelijske ROS mogu biti uključene u prenos signala u susedne ćelije i tkiva.

Prekomerna akumulacija ROS je toksična po ćeliju zbog oksidativnih oštećenja do kojih dolazi usled interakcije ROS sa ćelijskim makromolekulima (Slater i sar., 2008). Na nivou proteina ROS mogu izazvati modifikacije specifičnih amino kiselina, fragmentaciju peptidnog lanca, promene naelektrisanja proteina, kao i povećanu osetljivost na proteolizu. DNK je izuzetno osetljiva na delovanje ROS, koji dovode do modifikacije nukleotidnih baza i šećernih komponenti nukleotida, kao i do prekida polinukleotidnog lanca. Nastala oštećenja na molekulu DNK, ukoliko se ne poprave, mogu izazvati promene u genetičkom kodu. Na nivou ćelijske membrane, ROS iniciraju lipidnu peroksidaciju, proces u kojem dolazi do oksidativnog oštećenja polinezasićenih masnih kiselina, što dalje vodi smanjenju fluidnosti membrane i povećanju njene propustljivosti. Lipidna peroksidacija takođe izaziva oštećenja membranskih proteina, inaktivaciju receptora, enzima i transportnih proteina (Slater i sar., 2008).

Prekomerna produkcija ROS može dovesti do programirane smrti ćelija (eng. *Programmed Cell Death*, PCD), genetički kontrolisanog procesa kojim se selektivno eliminišu ćelije organizma. PCD služi za kontrolu broja ćelija i održavanje homeostaze tkiva. Takođe, ovim procesom se vrši izolacija i uklanjanje oštećenog biljnog tkiva, čime se omogućava preživljavanje organizma (Petrov i sar., 2015). Mehanizam indukcije PCD često uključuje povećanje nivoa ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), koji imaju ulogu posrednika u prenosu signala stresa (Gechev i sar., 2005). Generalno, za normalno odvijanje osnovnih bioloških procesa, kao što su proliferacija i diferencijacija ćelija, neophodne su ROS u niskim koncentracijama, dok povišene koncentracije ROS mogu biti štetne po ćeliju (Huang i sar., 2019).

## 1.2. Antioksidativna zaštita biljne ćelije

Antioksidanti se definišu kao supstance koje, kada su prisutne i u znatno nižim koncentracijama od supstrata podložnog oksidaciji, značajno usporavaju ili sprečavaju oksidaciju datog supstrata (Halliwell i Gutteridge, 1995). Biljke su tokom evolucije razvile antioksidativni sistem, čija je uloga održavanje redoks homeostaze u biljnoj ćeliji. Antioksidativni sistem sastoji se od neenzimske i enzimске komponente (**Slika 3.**).



**Slika 3.** Antioksidativni sistem biljne ćelije. (A) Neenzimski i enzimski antioksidanti u biljnoj ćeliji. (B) Mehanizam delovanja antioksidanata u reakcijama detoksifikacije ROS. SOD, superoksid-dismutaza; CAT, katalaza; APX, askorbat-peroksidaza; MDHA, monodehidroaskorbat; MDHAR, monodehidroaskorbat-reduktaza; DHA, dehidroaskorbat; DHAR, dehidroaskorbat-reduktaza; AsA, askorbinska kiselina; GSH, glutation; GST, glutation S-transferaza; GPX, glutation-peroksidaza; GSSG, glutation disulfid; GR, glutation-reduktaza. Preuzeto i modifikovano prema Hasanuzzaman i sar. (2020).

### 1.2.1. Neenzimski antioksidanti

Najznačajniji neenzimski antioksidanti obuhvataju jedinjenja male molekulske mase, od kojih su neka rastvorljiva u vodi (askorbinska kiselina, glutation, fenolna jedinjenja), a neka u lipidima (tokoferoli, tokotrienoli i karotenoidi). Ova jedinjenja mogu samostalno delovati u odgovoru biljne ćelije na ROS, ali je efikasnost uklanjanja ROS daleko veća u reakcijama koje katalizuju antioksidativni enzimi (Dumanović i sar., 2021). Sa druge strane, male molekulske mase neenzimskih antioksidanata olakšavaju njihov prolazak kroz ćelijske membrane i pozicioniranje u blizini biomolekula, koji su potencijalne mete ROS.

**Askorbinska kiselina** (AsA, vitamin C) je izuzetno moćan antioksidant i veoma je zastupljen u biljnoj ćeliji, posebno u tkivima i organima koji intenzivno rastu poput meristemskih tkiva, vršnog dela korena, cvetova i mladih plodova (Akram i sar., 2017). Vitamin C se nalazi u svim ćelijskim odeljcima, uključujući i ćelijski zid, a najmanje je prisutan u vakuoli (Das i Roychoudhury, 2014). Ovaj antioksidant je najviše zastupljen u hloroplastima, i to u čak 1000 puta većoj koncentraciji od glutationa (Dumanović i sar., 2021). AsA deluje tako što se direktno vezuje za radikale i neutrališe ih, a može i da učestvuje u enzimskoj reakciji kao koenzim. Naime, u reakciji koju katalizuje APX,

AsA ima ulogu donora dva elektrona, koje predaje  $H_2O_2$ , pri čemu nastaje molekul  $H_2O$ , dok se AsA oksiduje u monodehidroaskorbat (MDHA) (**Slika 3. B**).

**Glutation** (glutaminska kiselina-cistein-glicin,  $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicin, GSH) je takođe veoma zastupljen antioksidant u skoro svim ćelijskim odeljcima i učestvuje u mnogim procesima u ćeliji, uključujući i regulaciju ekspresije gena koji su indukovani stresom (Mullineaux i Rausch, 2005; Sharma i sar., 2012). GSH deluje tako što vezuje ROS i na taj način onemogućava njihovu interakciju sa biomolekulima. Takođe, služi kao redukciono sredstvo u reakciji posredovanoj enzimima glutacion S-transferaza (GST)/glutation-peroksidaza (GPX), kojom se  $H_2O_2$  prevodi u molekul vode (Das i Roychoudhury, 2014). Glavna uloga ovog antioksidanta odnosi se na regeneraciju AsA u okviru askorbat-glutationskog (AsA-GSH) ciklusa, u kojem GSH predstavlja supstrat enzima dehidroaskorbat-reduktaze (DHAR) (**Slika 3. B**).

**Fenolna jedinjenja** predstavljaju najraznovrsniju grupu sekundarnih metabolita kod biljaka (Sakakibara i sar., 2003). Strukturu fenolnih jedinjenja čini aromatični prsten supstituisan sa jednom ili više hidroksilnih (-OH) grupa i u biljnim ćelijama su uglavnom u formi glikozida ili estara. Zbog svoje strukture ova jedinjenja imaju sposobnost da vezuju slobodne radikale i spečavaju ih da interaguju sa biomolekulima (Dumanović i sar., 2021). Pored toga, fenolna jedinjenja imaju sposobnost da redukuju slobodne radikale predajući im elektrone ili protone, a mogu služiti i kao supstrat peroksidazama koje se nalaze u apoplastu ili u vakuoli ćelije (Michalak, 2006; Dumanović i sar., 2021). Ustanovljeno je da se  $H_2O_2$ , koji se nalazi u vakuoli ćelije, može redukovati peroksidazama, koje kao supstrat koriste AsA ili fenolna jedinjenja. Budući da AsA nije toliko zastupljena u vakuoli ćelije, na ovaj način ćelija obezbeđuje efikasnije uklanjanje  $H_2O_2$ .

**Tokoferoli i tokotrienoli** su esencijalne komponente ćelijskih membrana, sa malim razlikama u strukturi. Naime, tokoferoli poseduju zasićene, a tokotrienoli nezasićene izoprenoidne bočne lance. Na osnovu pozicije metil grupe na 2,3-dihidrohromanskom prstenu, tokoferoli i tokotrienoli se klasifikuju u pojedinačna jedinjenja, koja se označavaju grčkim prefiksima  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  (Dumanović i sar., 2021). Tokoferoli su antioksidanti koji nastaju u fotosintetičkim organizmima i zastupljeni su isključivo u zelenim, fotosintetički aktivnim delovima biljke. Antioksidativno delovanje tokoferola u hloroplastima podrazumeva vezivanje („hvatanje“) i hemijsku reakciju sa  $^1O_2$ , čime se postiže očuvanost strukture i funkcije PSII.  $\alpha$ -tokoferol je najzastupljeniji izomer tokoferola i ima najveću antioksidativnu aktivnost u ćeliji. Procenjeno je da jedan molekul  $\alpha$ -tokoferola, u *in vitro* uslovima, može da neutrališe do 220 molekula  $^1O_2$  pre nego što se degraduje (Fukuzawa i sar., 1982; Sharma i sar., 2012). Takođe,  $\alpha$ -tokoferol ima potencijal da neutrališe lipid peroksi radikal, lipid alkil radikal i alkoksi radikal, koji su se formirali tokom oksidacije nezasićenih masnih kiselina (Dumanović i sar., 2021). Na ovaj način  $\alpha$ -tokoferol sputava dalju propagaciju lipidne peroksidacije.

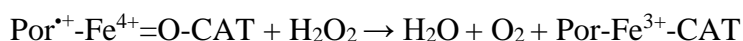
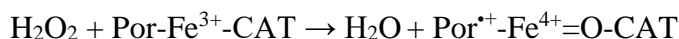
**Karotenoidi** predstavljaju biljne pigmente koji se nalaze u plastidima. U normalnim fiziološkim uslovima, karotenoidi imaju funkciju pomoćnih fotosintetičkih pigmenata, tj. apsorbuju svetlost talasne dužine 450-570 nm kao sastavni deo antena pigmenata PSI i PSII, a potom tu energiju prenose do molekula hlorofila (Das i Roychoudhury, 2014). Pri visokom intenzitetu svetlosti, karotenoidi imaju fotoprotektivnu ulogu, tj. preuzimaju višak energije sa ekscitiranog hlorofila ( $^1HI^*$ ) i oslobađaju je u vidu toplote. Na ovaj način se skraćuje vreme života singleta hlorofila i sprečava se formiranje reaktivnog  $^1O_2$ .

### 1.2.2. Antioksidativni enzimi

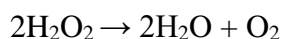
Najznačajniji enzimski antioksidanti su SOD, katalaze (CAT) i peroksidaze (PX). Pored navedenih enzima, važnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti biljne ćelije imaju i MDHAR, DHAR i glutacion-reduktaza (GR).

**SOD** (EC 1.15.1.1) su enzimi koji katalizuju reakciju dismutacije  $O_2^{\bullet-}$  u  $H_2O_2$  i  $O_2$ . SOD su prisutni u većini, ako ne i u svim ćelijskim odeljcima u kojima se generišu ROS, zbog čega se pretpostavlja da SOD imaju centralnu ulogu u odbrani ćelija od oksidativnog stresa (detaljnije opisano u odeljku **1.3.**).

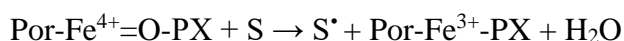
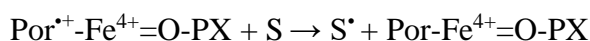
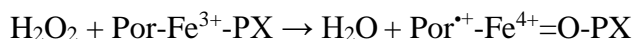
**CAT** (EC 1.11.1.6) predstavljaju enzime sa hem prostetičkom grupom, koji igraju značajnu ulogu u eliminaciji  $H_2O_2$ . Ustanovljeno je da CAT imaju izražen afinitet za  $H_2O_2$ , ali ne i za organske perokside (Dumanović i sar., 2021). Ovi enzimi su prisutni na mestima gde nastaje  $H_2O_2$ , a najviše ih ima u peroksizomima u kojima čine 10-25% ukupnih peroksizomalnih proteina (Reumann i sar., 2004). Ustanovljeno je da su CAT veoma efikasni i da tokom jednog minuta mogu eliminisati  $6 \times 10^6$  molekula  $H_2O_2$  (Dumanović i sar., 2021). Reakcija katalizovana enzimom CAT je predstavljena sledećim jednačinama:



Reakcija eliminacije  $H_2O_2$  prikazana je zbirnom jednačinom:

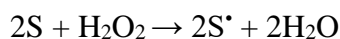


**PX** su enzimi koji katalizuju oksidaciju organskih i neorganskih supstrata uz prevođenje  $H_2O_2$  u molekule  $H_2O$ . Biljne PX su u najvećem broju (>80%) hemoenzimi (Pandey i sar., 2017). Reakcija katalizovana enzimom PX je predstavljena sledećim jednačinama:



S označava supstrat.

Reakcija detoksifikacije  $H_2O_2$  prikazana je zbirnom jednačinom:



**APX** (EC 1.1.11.1) je najznačajnija peroksidaza u antioksidativnom sistemu biljne ćelije. APX je ključna komponenta AsA-GSH ciklusa (**Slika 3. B**) i ima važnu ulogu u regulaciji nivoa  $H_2O_2$  u ćeliji (Sharma i sar., 2012). Enzim APX ima veći afinitet prema  $H_2O_2$  u odnosu na CAT, što ga čini efikasnijim u detoksifikaciji  $H_2O_2$  u uslovima stresa. Pored APX, u AsA-GSH ciklus uključeni su i MDHAR, DHAR i GR (Bartoli i sar., 2017). Na samom početku APX prevodi  $H_2O_2$  u  $H_2O$  i oksiduje AsA do MDHA. Zatim se MDHA može redukovati do AsA uz pomoć enzima MDHAR, koji koristi NADPH kao kofaktor. MDHA može i spontano preći u dehidroaskorbat (DHA), koji ulazi u AsA-GSH ciklus. Redukciju DHA do AsA katalizuje enzim DHAR, koji kao supstrat koristi GSH i oksiduje ga do glutation disulfida (GSSG). Potom se GSSG redukuje do GSH pomoću GR, koja koristi NADPH kao kofaktor.

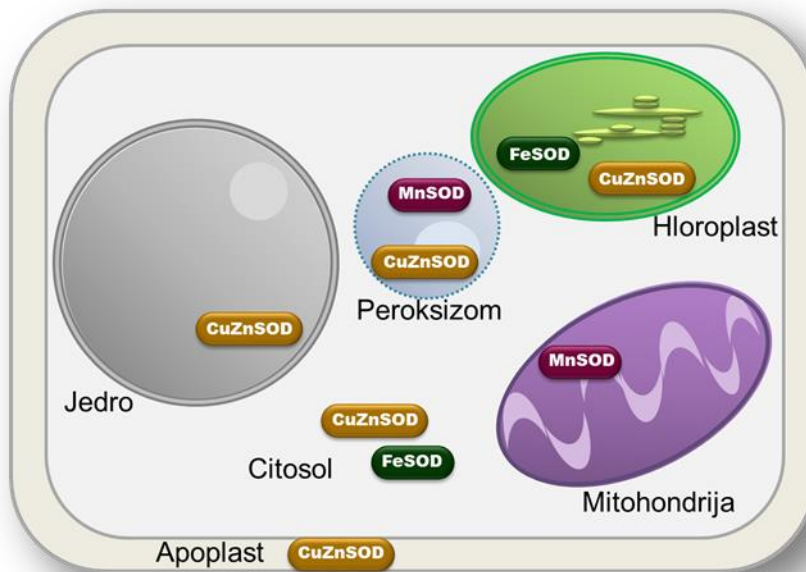
Pored APX, enzimi GPX (EC 1.11.1.9) takođe imaju sposobnost da detoksifikuju  $H_2O_2$ , koristeći GSH ili tioredoksin kao supstrat (Bela i sar., 2015). Ustanovljeno je da enzimi GPX i GST (EC 2.5.1.18) mogu zajedno učestvovati u detoksifikaciji lipidnih hidroperoksida i drugih reaktivnih molekula. Pokazano je da više enzima GST poseduju aktivnost kao GPX i da mogu učestvovati u antioksidativnoj zaštiti ćelije (Gullner i sar., 2018).

### 1.3. SOD

SOD su enzimi koji učestvuju u prvoj liniji odbrane biljnih ćelija od ROS tokom oksidativnog stresa. McCord i Fridovich (1969) su prvi identifikovali u goveđim eritrocitima enzim čiji je supstrat superoksid anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ). Novootkriveni enzim nazvan je superoksid-dismutaza, a pokazalo se da je identičan eritrokupreinu i hemokupreinu, ranije otkrivenim enzimima nepoznate funkcije. Daljim istraživanjima utvrđeno je da SOD pripadaju grupi metaloenzima, koji se međusobno razlikuju na osnovu metalnog jona prisutnog u aktivnom centru enzima. Naime, SOD su holoenzimi koji pored proteinskog dela (apoenzima) sadrže metalne jone kao kofaktore. U živom svetu postoji više tipova ili metaloformi SOD: CuZnSOD, FeSOD, MnSOD, Mn/FeSOD, NiSOD i CuSOD (Sheng i sar., 2014). CuZnSOD nalaze se kod bakterija i eukariota, dok su FeSOD i MnSOD prisutne kod arheja, bakterija i eukariota (Sheng i sar., 2014). Mn/FeSOD enzimi se uglavnom nalaze kod primitivnijih aerobnih organizama i karakteriše ih sposobnost da kao kofaktor koriste bilo koji od dva metala, Mn ili Fe (Miller, 2012). Zbog ove karakteristike Mn/FeSOD se označavaju i kao kambijalističke (CamSOD), od latinske reči *cambialis* koja znači promenljiv (El Shafey i sar., 2008). NiSOD su otkrivene krajem XX veka. Youn i sar. su 1996. godine izolovali i identifikovali novi tip SOD, NiSOD, u citosolu *Streptomyces* spp. Pored *Streptomyces*, prisustvo *NiSOD* sekvenci ustanovljeno je u genomu filogenetski udaljenih marinskih organizama poput cijanobakterija i zelenih algi (*in silico* analiza) što ukazuje na mogućnost horizontalnog transfera gena (Dupont i sar., 2008; Schmidt i sar., 2009). CuSOD enzimi su otkriveni tek početkom XXI veka, prvo kod *Mycobacterium tuberculosis* (Spagnolo i sar., 2004), a potom kod gljiva i oomiceta (Robinett i sar., 2018). U animalnim ćelijama identifikovani su tandemski ponovci aminokiselinskih sekvenci, koje su slične CuSOD proteinskim sekvencama gljiva. Navedene aminokiselinske sekvence se nalaze u okviru velikih peptida označenih kao eng. *copper-only SOD-repeat proteins*.

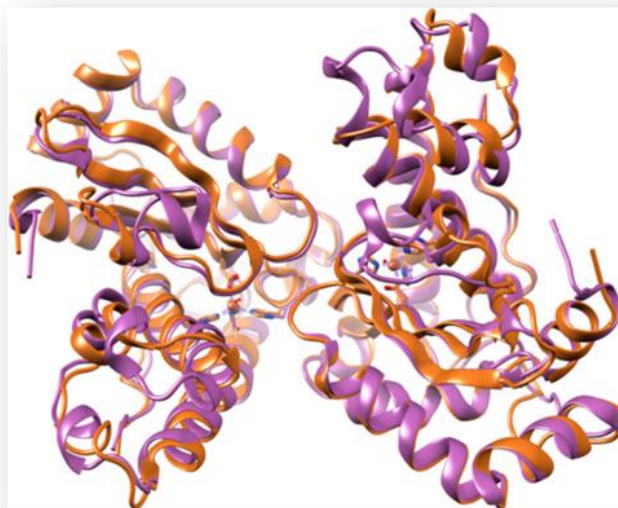
Ustanovljeno je da FeSOD i MnSOD postoje u formi dimera i tetramera. Kod bakterija ovi enzimi uglavnom formiraju dimere, dok se kod arheja javljaju u formi tetramera (Searcy i Searcy, 1981; Kirby i sar., 1981; Ursby i sar., 1999). Biljne FeSOD postoje u formi dimera i tetramera (Alscher i sar., 2002). U eukariotskim ćelijama tetramerne MnSOD mogu se naći u mitohondrijalnom matriksu (Borgstahl i sar., 1992) i peroksizomima (Palma i sar., 1998), dok su citosolne izoforme dimerne (Sheng i sar., 2014.). U eukariotskim ćelijama apoplastne CuZnSOD su tetramerne, dok su ostale uglavnom u formi dimera. Kod nekih biljnih vrsta, kao što su *Oryza sativa* i *Chenopodium murale*, u citosolu i hloroplastima identifikovani su termostabilni CuZnSOD enzimi u formi monomera (Sundaram i sar., 2009).

Kod biljaka su zastupljena tri tipa SOD: FeSOD, MnSOD i CuZnSOD. CuZnSOD se uglavnom nalaze u citoplazmi, peroksizomima, hloroplastima i u apoplastu. FeSOD su lokalizovane prvenstveno u plastidima, a MnSOD u mitohondrijama i peroksizomima (**Slika 4.**).



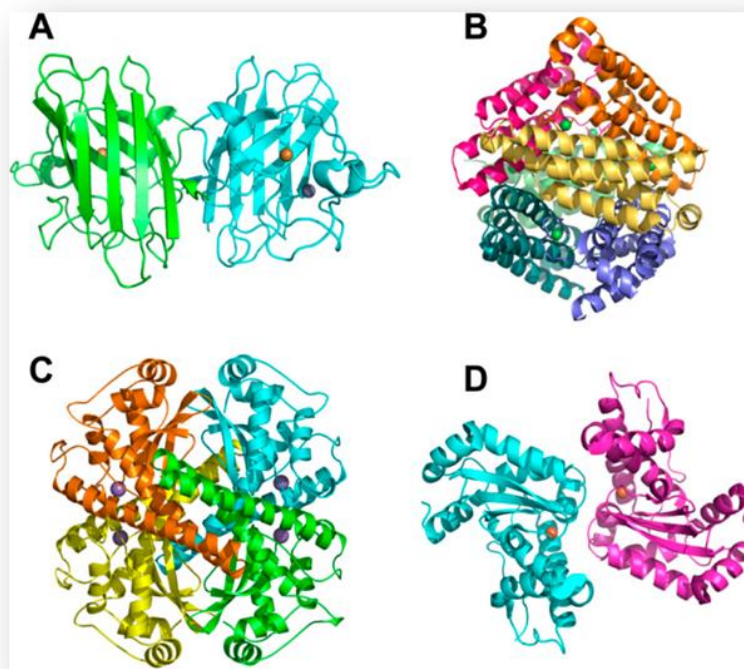
**Slika 4.** Lokalizacija SOD u biljnoj ćeliji.

Velika sličnost u strukturi FeSOD i MnSOD najbolje se može uočiti poređenjem 3D struktura ovih enzima (**Slika 5.**). Kod svih poznatih FeSOD i MnSOD, ustanovljeno je da iste aminokiseline učestvuju u koordinaciji metalnog jona u aktivnom mestu enzima (Sheng i sar., 2014). Budući da su ovi enzimi članovi iste familije proteina, nije iznenađujuće to što postoje Mn-FeSOD enzimi koji mogu vezati bilo koji od ova dva jona.



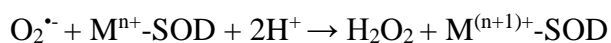
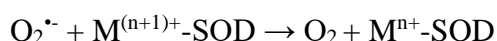
**Slika 5.** Poređenje 3D strukture FeSOD (PDB: 1ISB) i MnSOD (PDB: 1D5N) *Escherichia coli*. Narandžastom bojom prikazan je polipeptidni lanac FeSOD, a ružičastom MnSOD. Preuzeto iz Sheng i sar. (2014).

Sa izuzetkom FeSOD i MnSOD, koje su veoma slične (**Slika 5.**), strukture i aktivna mesta ostalih SOD se veoma razlikuju (**Slika 6.**), što sugerise da su SOD proteini produkti konvergentne evolucije (Sheng i sar., 2014).



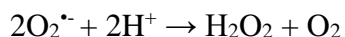
**Slika 6.** Kvaternarna struktura SOD proteina. (A) CuZnSOD *Homo sapiens* (PDB: 1PU0), (B) NiSOD *E. coli* (PDB: 1T6U), (C) MnSOD *Saccharomyces cerevisiae* (PDB: 3LSU) i (D) FeSOD *Anaplasma phagocytophilum* (PDB: 3JS4). Različitim bojama su prikazane monomerne subjedinice. Sfere prikazuju jone metala u aktivnom mestu enzima. Preuzeto iz Sheng i sar. (2014).

Iako se strukturno mogu razlikovati, mehanizam delovanja SOD je sličan. Naime, SOD katalizuju dismutaciju  $O_2^{\cdot-}$  tzv. „ping-pong“ mehanizmom, kojim jedan  $O_2^{\cdot-}$  u prvom koraku redukuje metalni jon, a zatim drugi  $O_2^{\cdot-}$  oksiduje redukovani metalni jon u aktivnom mestu enzima:



M označava metalni jon koji se nalazi u aktivnom mestu enzima: Cu ( $n = 1$ ), Mn ( $n = 2$ ), Fe ( $n = 2$ ).

Reakcija dismutacije prikazana je zbirnom jednačinom:



Na osnovu poređenja jednačina reakcije spontane dismutacije  $O_2^{\cdot-}$  (odjeljak 1.1.) sa SOD-katalizovanom reakcijom, može se zaključiti da je enzimski katalizovana reakcija brža. Naime, spontana dismutacija  $O_2^{\cdot-}$  je reakcija drugog reda, jer zavisi od dva molekula  $O_2^{\cdot-}$  i njena brzina je proporcionalna  $[O_2^{\cdot-}]^2$  (Sheng i sar., 2014). Sa druge strane, SOD-katalizovana reakcija sastoji se od dve reakcije prvog reda, koje zavise samo od koncentracije  $O_2^{\cdot-}$ . Reakcija katalizovana SOD enzimima može da se odigrava brzo čak i pri veoma niskim koncentracijama supstrata. Na taj način SOD može da održi nivo ćelijskog  $O_2^{\cdot-}$  na niskim fiziološkim koncentracijama od približno  $2 \times 10^{-10}$  M (Imlay i Fridovich, 1991; Sheng i sar., 2014).

Produkt reakcije dismutacije,  $H_2O_2$ , koji je takođe ROS, se dalje prevodi delovanjem CAT i PX enzima u molekul  $H_2O$ .

### 1.3.1. FeSOD

#### 1.3.1.1. Nastanak, otkriće i rasprostranjenost

FeSOD smatraju se evolutivno najstarijim tipom SOD. U vreme kada je započela evolucija fotosintetskih cijanobakterija i porast nivoa kiseonika u atmosferi i okeanima, najzastupljeniji metal u životnoj sredini bio je gvožđe u rastvornoj  $Fe^{2+}$  formi. Prelazak iz redukcionog u oksidaciono okruženje, doveo je do prevodjenja gvožđa u oksidovanu, manje rastvornu i dostupnu  $Fe^{3+}$  formu, što je verovatno uslovlilo zamenu i vezivanje  $Mn^{3+}$  za aktivno mesto enzima (Alscher i sar., 2002).

FeSOD proteini nalaze se kod prokariota, u mitohondrijama i citosolu kod primitivnijih eukariota i u plastidima kod viših biljaka. Prvi put su FeSOD identifikovane kod *E. coli* (Yost i Fridovich, 1973), a potom kod drugih bakterija, uključujući i anaerobne (Hatchikian i Henry, 1977). Dugo se smatralo da su FeSOD prisutne samo kod prokariota, sve dok ih Kanematsu i Asada (1979) nisu izolovali iz alge *Euglena gracilis*, a potom Salin i Bridges (1980) nisu utvrdili da su dati enzimi prisutni i kod vrste vaskularnih biljaka *Brassica campestris*. Kasnijim istraživanjima je ustanovljeno prisustvo FeSOD u biljnim vrstama poput pasulja i paradajza (Kwiatowski i Kaniuga, 1984), ginka i žutog lokvanja (Duke i Salin, 1985), limuna (Sevilla i sar., 1984) i paprike (León i sar., 2002; Mateos i sar., 2013). Prisustvo FeSOD utvrđeno je i kod biljaka iz porodica *Rutaceae*, *Rubiaceae* i *Caryophyllaceae* (Droillard i sar., 1989; Daza i sar., 1993; Almansa i sar., 1994), što ukazuje da su dati enzimi mnogo zastupljeniji kod biljaka, nego što se ranije mislilo.

FeSOD su zastupljene u plastidima, ali kod nekoliko biljnih vrsta ustanovljeno je prisustvo enzima u citosolu, i to kod *Vigna unguiculata* (Moran i sar., 2003), *Lotus japonicus* (Rubio i sar., 2007) i *Pogonatum inflexum* (Kanematsu i sar., 2013). Prisustvo ovog SOD u plastidima biljaka i njegovo odsustvo kod životinja i gljiva, dovelo je do pretpostavke da gen za FeSOD potiče od fotosintetičkog endosimbionta (Cyanobacteria) i da se tokom evolucije premestio iz plastidnog u jedarni genom. U prilog ovoj hipotezi navodi se postojanje nekoliko konzervativnih regiona, koji su prisutni u nukleotidnim sekvencama *FeSOD* gena kod biljaka i fotosintetičkih bakterija, ali ih nema kod hemosintetičkih bakterija (Bowler i sar., 1994).

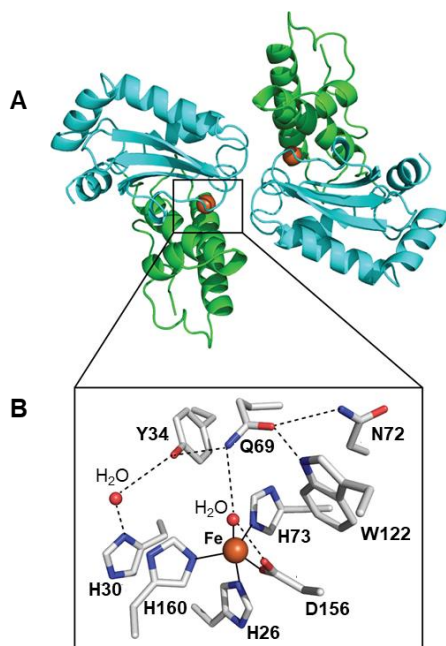
#### 1.3.1.2. Struktura proteina i aktivnog mesta

Biljni FeSOD enzimi mogu biti u formi homodimera, sačinjenih od dve identične subjedinice veličine 18-27 kDa, kao što je utvrđeno kod *B. campestris*, *Nuphar luteum*, *Ginkgo biloba*, *V. unguiculata*, *P. sativum* (Alscher i sar., 2002). Osim dimera, FeSOD enzimi formiraju homotetramere, sačinjene od četiri identične subjedinice (80-90 kDa) i kao takvi su prisutni kod većine vaskularnih biljaka. Pored navedenog, u plastidima genetički transformisanih biljaka duvana identifikovani su FeSOD enzimi heterodimerne strukture, izgrađeni od FSD2 i FSD3 proteinskih subjedinica iz *Arabidopsis thaliana* (Myouga i sar., 2008).

Utvrđeno je da monomeri FeSOD poseduju dva domena (Stallings i sar., 1983). C-terminalni domen sastoji se od tri  $\beta$ -lanca okružena sa dva  $\alpha$ -heliksa, a na trećem  $\beta$ -lancu i petlji su lokalizovana dva Fe-liganda (H160 i D156 kod *E. coli*), koji ulaze u sastav aktivnog mesta (**Slika 7. A**). N-terminalni domen sastoji se od tri  $\alpha$ -heliksa u kojima se nalaze dva Fe-liganda (H26 i H73 kod *E. coli*). U strukturi dimera postoji srednji  $\alpha$ -heliks, koji nije prisutan kod tetramernih formi. Naime, kod tetramera dolazi do produžetka dva glavna heliksa i odgovarajući aminokiselinski ostaci ne ulaze u



sastav petlje, već učestvuju u naslojavanju dva dimera i formiranju tetramerne strukture (Sheng i sar., 2014).

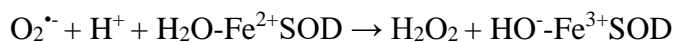


**Slika 7.** FeSOD *E. coli* (PDB: 1ISB). Struktura (A) dimera i (B) aktivnog mesta enzima. Zelenom bojom označen je N-terminalni domen, a plavom C-terminalni domen. Narandžaste sfere predstavljaju metalne jone u aktivnom mestu enzima. Preuzeto i modifikovano prema Sheng i sar. (2014).

Aktivno mesto FeSOD (**Slika 7. B**) sadrži jedan jon  $\text{Fe}^{3+}$  koordinisan u trigonalnu bipiramidu sa tri H i jednim D aminokiselinskim ostatkom (H26, H73, H160 i D156 kod *E. coli*), kao i molekulom OH/H<sub>2</sub>O. Aktivno mesto je stabilizovano mrežom vodoničnih veza formiranih od strane molekula OH/H<sub>2</sub>O sa D156 i Q69, kao i vodoničnom vezom između Q69 i Y34 aminokiselinskih ostataka (Miller, 2004).

### 1.3.1.3. Katalitički mehanizam FeSOD

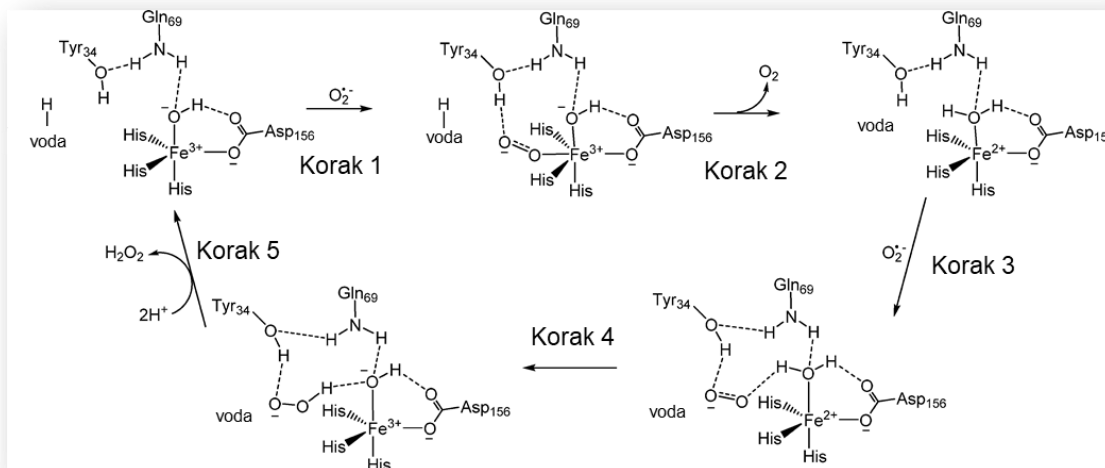
Reakcija katalizovana FeSOD enzimom sastoji se od naizmenične redukcije i oksidacije metalnog jona, zbog čega se naziva „ping-pong“ reakcija. Za svaku od dve polureakcije neophodan je po jedan H<sup>+</sup>. U prvoj polureakciji, donor H<sup>+</sup> je molekul vode iz okruženja, a u drugoj H<sub>2</sub>O ligand.



U prvoj polureakciji H<sup>+</sup> interaguje sa OH<sup>-</sup> ligandom, dolazi do redukcije Fe<sup>3+</sup> i nastanka H<sub>2</sub>O liganda. U drugoj polureakciji, H<sub>2</sub>O ligand daje H<sup>+</sup> za redukciju O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Na **Slici 8.** je prikazan katalitički mehanizam FeSOD *E. coli* u pet koraka.

Da bi se pojasnila katalitička reakcija i sled događaja, prva polureakcija se može podeliti u dva, a druga polureakcija u tri koraka (Sheng i sar., 2014). U prvom koraku dolazi do interakcije O<sub>2</sub><sup>•-</sup> sa Fe<sup>3+</sup>SOD u unutrašnjoj sferi koordinacionog kompleksa aktivnog mesta enzima (**Slika 8.**). Ova vrsta koordinacije sa Fe<sup>3+</sup> ustanovljena je kod drugih malih anjona (N<sub>3</sub><sup>-</sup>, F<sup>-</sup> i OH<sup>-</sup>), stoga se pretpostavlja i za O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

U drugom koraku dolazi do redukcije  $\text{Fe}^{3+}\text{SOD}$  i oslobađanja  $\text{O}_2$ . Prenos elektrona sa  $\text{O}_2^-$  na  $\text{Fe}^{3+}$  se odvija veoma brzo po interakciji, budući da nije detektovan enzim•supstrat intermedijer. Dostavljanje  $\text{H}^+$  iz okolnih molekula vode verovatno se odvija putem mreže vodoničnih veza koje formiraju Gln(Q)69, Tyr(Y)34, His(H)30 i  $\text{OH}^-$  ligand, i koristi se za formiranje  $\text{H}_2\text{O}$  liganda. Po prenosu elektrona nastaje nenaelektrisan dioksigen ( $\text{O}_2$ ), koji ne pokazuje veliku reaktivnost sa  $\text{Fe}^{2+}\text{SOD}$  i brzo napušta aktivno mesto enzima.



**Slika 8.** Katalitički mehanizam FeSOD *E. coli*. Asp, D; Gln, Q; His, H; Tyr, Y. Preuzeto i modifikovano prema Sheng i sar. (2014).

Treći korak podrazumeva uvođenje drugog  $\text{O}_2^-$  i njegovu interakciju sa  $\text{Fe}^{2+}\text{SOD}$  u spoljašnjoj sferi koordinacionog kompleksa aktivnog mesta enzima. Ustanovljeno je da mali anjoni ne interaguju direktno sa  $\text{Fe}^{2+}$ , a razlog je najverovatnije manje naelektrisanje  $\text{Fe}^{2+}$ , kao i uticaj negativno naelektrisanog  $\text{Asp}^-(\text{D})156$  kao dominantnog liganda u  $\text{Fe}^{2+}\text{SOD}$ .

U četvrtom koraku dolazi do redukcije  $\text{O}_2^-$  od strane  $\text{Fe}^{2+}\text{SOD}$  i prve protonizacije peroksid dianjona. Tokom oksidacije  $\text{Fe}^{2+}\text{SOD}$ ,  $\text{H}^+$  iz  $\text{H}_2\text{O}$  liganda se preko mreže vodoničnih veza u aktivnom mestu vezuje za  $\text{O}_2^-$ . Ova dva događaja su povezana, jer se labilni  $\text{H}^+$  iz  $\text{H}_2\text{O}$  liganda nalazi veoma blizu Fe.

Peti korak uključuje protonizaciju hidroperoksida i odlazak  $\text{H}_2\text{O}_2$  iz aktivnog mesta enzima. Smatra se da ovaj korak ograničava brzinu druge polureakcije, koja podrazumeva oksidaciju  $\text{Fe}^{2+}$  i redukciju  $\text{O}_2^-$ , zbog sporog transporta  $\text{H}^+$  unutar aktivnog mesta.

## 1.3.2. MnSOD

### 1.3.2.1. Nastanak, otkriće i rasprostranjenost

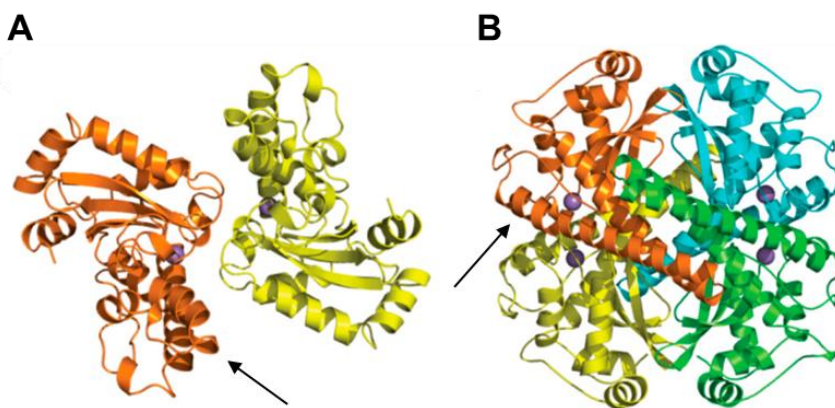
MnSOD proteini su najverovatnije evoluirali od FeSOD zamenom metala u aktivnom mestu enzima. Kod primitivnih anaerobnih bakterija (*Bacteroides fragilis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Propionibacterium shermanii*) identifikovane su kambijalističke Mn/FeSOD (CamSOD), koje karakteriše mogućnost da koriste bilo koji od ova dva metala (Amano i sar., 1990; Meier i sar., 1994). Stoga, postoji mogućnost da su FeSOD i MnSOD mogle nastati od drevne Fe-MnSOD.

MnSOD proteini prvi put su otkriveni kod *E. coli* (Keele i sar., 1970), a potom i kod drugih prokariotskih i eukariotskih organizama. Kod Cyanobacteria i fotosintetičkih protozoa, MnSOD se nalaze u tilakoidnim membranama (Okada i sar., 1979; Kanematsu i Asada, 1979). MnSOD su

pronađene u hloroplastima eukariotske alge *Chlamydomonas reinhardtii* (Allen i sar., 2007), dok su kod viših biljaka uglavnom prisutne u mitohondrijama (Alscher i sar., 2002). Prva MnSOD viših biljaka je izolovana iz listova *P. sativum* (Sevilla i sar., 1980). Odsustvo MnSOD u plastidima viših biljaka sugerise da se *MnSOD* gen fotosintetičkog endosimbionta (Cyanobacteria) izgubio, dok se dati gen mitohondrijalnog endosimbionta zadržao tokom evolucije (Momčilović i Pantelić, 2018). Osim u mitohondrijama, MnSOD proteini detektovani su i u peroksizomima kod nekoliko biljnih vrsta (*P. sativum*, *Dianthus caryophyllus*, *Ricinus communis* i *Cucumis sativus*) (del Río i sar., 2002).

### 1.3.2.2. Struktura proteina i aktivnog mesta

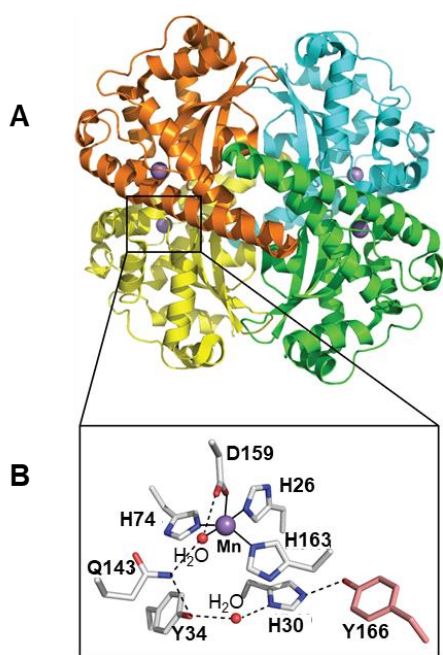
Poređenjem strukture FeSOD i MnSOD ustanovljena je značajna homologija među aminokiselinskim sekvencama, slično prostorno uvijanje proteina, kao i konzervativni aminokiselinski ostaci u aktivnom mestu enzima (Fridovich, 1974). Slično kao FeSOD, MnSOD mogu formirati homodimernu ili homotetramernu strukturu (**Slika 9.**), sa subjedinicama veličine 18-20 kDa. Dimerne MnSOD su otkrivene kod bakterija i većine prokariota, dok su eukariotske forme uglavnom tetramerne.



**Slika 9.** Kvaternarna struktura MnSOD. (A) Dimer *E. coli* (PDB: 1VEW). (B) Tetramer *S. cerevisiae* (PDB: 3LSU). Monomerne subjedinice su označene različitim bojama, a metalni joni u aktivnim mestima enzima prikazani su ljubičastim sferama. Strelice označavaju  $\alpha$ -helikse N-terminalnih domena. Preuzeto i modifikovano prema Sheng i sar. (2014).

Monomeri MnSOD sadrže dva domena (Sheng i sar., 2014). N-terminalni domen je sačinjen od  $\alpha$ -heliksa, dok C-terminalni domen čine  $\alpha$ -heliksi i mala  $\beta$ -ploča. Osnovna razlika između dimernih i tetramernih formi MnSOD leži u strukturi N-terminalnog domena. Kod tetramernih formi, N-terminalni domen sastoji se od dugih  $\alpha$ -heliksa, koji formiraju ukosnicu, dok su kod dimera ovi heliksi znatno kraći (**Slika 9.**).

Struktura aktivnog mesta MnSOD je slična kao kod FeSOD. Aktivno mesto MnSOD (**Slika 10. B**) sadrži jedan  $Mn^{3+}$  koordinisan sa tri H i jednim D aminokiselinskim ostatkom (H26, H74, H163 i D159 kod *H. sapiens*), kao i molekulom  $OH^-/H_2O$ . Aktivno mesto je stabilizovano mrežom vodoničnih veza formiranih od strane molekula  $OH^-/H_2O$  sa D159 i Q143, kao i vodoničnom vezom između Q143 i Y34 aminokiselinskih ostataka. U okviru N-terminalnog domena nalaze se H26 i H74 Mn-ligandi, dok se druga dva liganda (H163 i D159) nalaze u sastavu C-terminalnog domena.



**Slika 10.** MnSOD *H. sapiens* (PDB: 1LUV). Struktura (A) tetramera i (B) aktivnog mesta enzima. Monomerne subjedinice su označene različitim bojama, a metalni joni u aktivnim mestima enzima prikazani su ljubičastim sferama. Preuzeto i modifikovano prema Sheng i sar. (2014).

### 1.3.3. CuZnSOD

#### 1.3.3.1. Nastanak, otkriće i rasprostranjenost

CuZnSOD su evolutivno najmlađe i najzastupljenije biljne SOD, a pretpostavlja se da je njihovoj evoluciji prethodilo zasićenje atmosfere kiseonikom (Alscher i sar., 2002). Pre „Velikog događaja oksidacije“, gvožđe ( $\text{Fe}^{2+}$ ), mangan ( $\text{Mn}^{2+}$ ) i nikel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) su postojali u rastvorljivoj formi u prvobitnim okeanima, dok su cink ( $\text{Zn}^{+}$ ) i bakar ( $\text{Cu}^{+}$ ) bili prisutni u nerastvornim mineralima, koji sadrže sulfide. Kako su okeani postajali više oksidujuća sredina,  $\text{Fe}^{2+}$  se prevodio u nerastvorljive  $\text{Fe}^{3+}$  oksid-hidrokside. U atmosferi potpuno zasićenoj kiseonikom,  $\text{Fe}^{2+}$  postaje nedostupan, a nerastvorni  $\text{Cu}^{+}$  se prevodi u rastvorljivi  $\text{Cu}^{2+}$ , koji počinje da se koristi kao kofaktor enzima (Alscher i sar., 2002). Pretpostavlja se da je CuZnSOD enzim evoluirao nezavisno od ostalih SOD. Poređenjem aminokiselinskih sekvenci tri CuZnSOD kod *A. thaliana*, ustanovljen je 51% identičnosti i 80% sličnosti među sekvencama. Sa druge strane, poređenjem CuZnSOD (CSD1) sa FeSOD (FSD1) proteinskom sekvencom kod *A. thaliana*, procenat identičnosti iznosi samo 14% (Momčilović i Pantelić, 2018).

CuZnSOD je prvi otkriveni tip SOD (McCord i Fridovich, 1969). Sawada i sar. (1972) izolovali su CuZnSOD iz semena biljke *P. sativum* i to je prvi identifikovani SOD protein kod biljaka. Asada i sar. (1974) potvrdili su prisustvo ovih proteina u listovima biljke *Spinacia oleracea*. CuZnSOD mogu biti prisutne u citosolu, plastidima, mitohondrijama, peroksizomima, kao i u apoplastu biljnih ćelija (Momčilović i Pantelić, 2018). CuZnSOD mogu formirati homodimernu ili homotetramernu strukturu. Homodimerne forme se nalaze u citosolu, a homotetramerne u hloroplastima i apoplastu. Hloroplastne CuZnSOD dikotiledonih biljaka pokazuju veliku sličnost u aminokiselinskoj sekvenci koja iznosi 83-98% (Al-Faris i sar., 2022), dok je poređenjem aminokiselinskih sekvenci hloroplastnih i citosolnih CuZnSOD ustanovljena sličnost od 68% (Alscher i sar., 2002). Izuzetak je citosolna izoforma CuZnSOD proteina (MSODC), koja je identifikovana kod jetrenjače *Marchantia paleacea*, za koju je utvrđen visok stepen homologije sa hloroplastnim

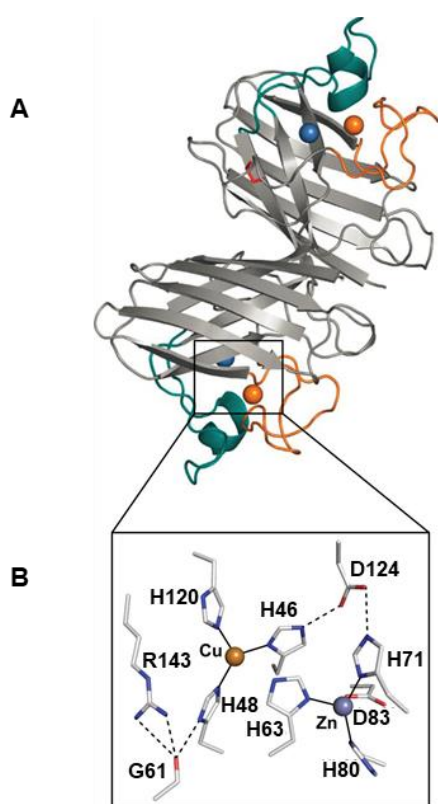
CuZnSOD proteinima (Tanaka i sar., 1996). Budući da je rod *Marchantia* evolutivno veoma star, pretpostavlja se da je MSODC stara forma enzima veoma bliska zajedničkom pretku citosolne i hloroplastne izoforme CuZnSOD (Fink i Scandalios, 2002).

Hloroplastna izoforma CuZnSOD je lokalizovana u stromi hloroplasta (Kanematsu i Asada, 1990). Na osnovu imunocitohemijskih analiza sprovedenih na biljkama spanaća (*S. oleracea*), ustanovljeno je da se hloroplastna izoforma CuZnSOD uglavnom nalazi na delu tilakoidnih membrana koji je u kontaktu sa stromom hloroplasta, u blizini PSI (Ogawa i sar., 1995). Sa druge strane, imunocitohemijskim analizama je citosolna CuZnSOD detektovana i u citosolu, jedru i vanćelijskom prostoru (Ogawa i sar., 1996).

### 1.3.3.2. Struktura proteina i aktivnog mesta

CuZnSOD mogu formirati homodimere ili homotetramere sa subjedinicama veličine 15-17 kDa, ali kod nekih biljnih vrsta (*O. sativa* i *C. murale*) su detektovani termostabilni monomerni CuZnSOD proteini (Kanematsu i Asada, 1989; Sundaram i sar., 2009). Iako je za aktivnost enzima važno prisustvo oba metala,  $\text{Cu}^{2+}$  jon učestvuje u redoks reakcijama i enzim postaje neaktivan ukoliko dođe do njegove eliminacije ili supstitucije drugim metalom (Bordo i sar., 1994; Marino i sar., 1995). Uloga  $\text{Zn}^{2+}$  je pre strukturalna nego funkcionalna, što je potvrđeno istraživanjima u kojima je nakon zamene  $\text{Zn}^{2+}$  drugim metalom ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  ili  $\text{Cu}^{2+}$ ), enzim zadržao aktivnost (Bordo i sar., 1994; Marino i sar., 1995).

Struktura aktivnog mesta CuZnSOD zavisi od oksidacionog stanja  $\text{Cu}^{+/2+}$ . U aktivnom mestu CuZnSOD *H. sapiens* jon bakra u redukovanoj  $\text{Cu}^+$  formi je koordinisan sa tri H (H46, H48 i H120), dok je  $\text{Zn}^{2+}$  koordinisan sa tri H i jednim D (H63, H71, H80 i D83) aminokiselinskim ostatkom (**Slika 11.**).



**Slika 11.** CuZnSOD *H. sapiens* (PDB: 1PU0). Struktura (A) dimera i (B) aktivnog mesta enzima. Sivim strelicama predstavljeni su  $\beta$ -lanci, tamno zelene spirale prikazuju  $\alpha$ -helikse. Narandžaste sfere predstavljaju  $\text{Cu}^+$ , a plave  $\text{Zn}^{2+}$ . Preuzeto i modifikovano prema Sheng i sar. (2014).

Nakon oksidacije,  $\text{Cu}^{2+}$  vezuje H63 aminokiselinski ostatak, kao i molekul vode i postaje pentakoordinisan. Aminokiselinski ostatak D124 je značajan za stabilizaciju aktivnog mesta enzima, jer povezuje dva metala u aktivnom mestu enzima formirajući vodonične veze sa H46 i H71 (**Slika 11.**). U neposrednoj blizini  $\text{Cu}^{2+}$ , nalazi se aminokiselinski ostatak R143, koji je esencijalan za katalitičku aktivnost enzima (Borders i Johansen, 1980). R143 je značajan u elektrostatičkom prepoznavanju, interakciji i stabilizaciji negativno naelektrisanog supstrata ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), kao i u njegovom dopremanju do metalnog jona ( $\text{Cu}^{2+}$ ) u aktivnom mestu enzima (Fisher i sar., 1994; Sheng i sar., 2014). R143 preko vodonične veze sa G61, vezuje Cu-ligand (H48), a takođe gradi i vodoničnu vezu sa aminokiselinom C57, koja ulazi u sastav disulfidnog mosta.

#### 1.3.4. Karakterizacija biljnih SOD gena

Biljne SOD kodirane su jedarnim genima čiji broj varira među biljnim vrstama, od najmanje 4 (*Helianthus annuus*) do najviše 31 gena (*Brassica napus*). U **Tabeli 1.** prikazana je zastupljenost gena koji kodiraju SOD kod različitih biljnih vrsta.

**Tabela 1.** Zastupljenost gena koji kodiraju SOD kod različitih biljnih vrsta.

Biljna vrsta	Ukupno SOD gena	CuZnSOD	FeSOD	MnSOD	Referenca
<i>Helianthus annuus</i>	4	2	/	2	Fernández-Ocaña i sar., 2011
<i>Zostera marina</i>	5	2	2	1	Zang i sar., 2020
<i>Dimocarpus longan</i>	6	3	2	1	Lin i Lai, 2013
<i>Oryza sativa</i>	7	4	2	1	Nath i sar., 2014
<i>Medicago truncatula</i>	7	4*	2	1	Song i sar., 2018
<i>Hordeum vulgare</i>	7	4	2	1	Zhang i sar., 2021
<i>Arabidopsis thaliana</i>	8	3	3	2	Kliebenstein i sar., 1998
<i>Sorghum bicolor</i>	8	5*	2	1	Filiz i sar., 2015.
<i>Setaria italica</i>	8	4	3	1	Wang i sar., 2018
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	8	3*	2	3	Han i sar., 2020
<i>Citrullus lanatus</i>	8	5	2	1	Rehman i sar., 2022
<i>Gossypium raimondii</i>	9	5	2	2	Wang i sar., 2016a
<i>Gossypium arboreum</i>	9	5	2	2	Wang i sar., 2016a
<i>Solanum lycopersicum</i>	9	4*	4	1	Feng i sar., 2016
<i>Cucumis sativus</i>	9	5	3	1	Zhou i sar., 2017
<i>Vitis vinifera</i>	10	6*	2	2	Hu i sar., 2019
<i>Musa acuminata</i>	12	6	2	4	Feng i sar., 2015
<i>Zea mays</i>	13	6	5	2	Liu i sar., 2021
<i>Gossypium hirsutum</i>	18	10	4	4	Wang i sar., 2017
<i>Brassica rapa</i>	18	8	6	4	Verma i sar., 2019
<i>Triticum aestivum</i>	26	17	6	3	Jiang i sar., 2019
<i>Brassica juncea</i>	29	12	10	7	Verma i sar., 2019
<i>Brassica napus</i>	31	14	11	6	Su i sar., 2021

Napomena: zvezdicom su označeni podaci koji uključuju i gene za bakar-šaperon.

Prethodno je smatrano da SOD geni biljaka imaju visoko konzervativnu egzon-intron strukturu, gde citosolni CuZnSOD poseduju sedam introna, hloroplastni CuZnSOD osam, a MnSOD

pet introna (Fink i Scandalios, 2002). Međutim, novija istraživanja su pokazala da egzon-intron struktura *SOD* gena varira kako unutar vrste tako i među biljnim vrstama. Na primer, kod *Zea mays* identifikovano je 6-7 introna u citosolnim *CuZnSOD*, 5-7 introna u hloroplastnim *CuZnSOD*, i 4-5 introna u *MnSOD* (Liu i sar., 2021). Kod *C. sativus*, citosolni *CuZnSOD* sadrže 5-7 introna, a hloroplastni *CuZnSOD* sedam, kao i *MnSOD* (Zhou i sar., 2017).

### 1.3.5. Regulacija ekspresije *SOD* gena

Regulacija ekspresije biljnih *SOD* gena uključuje različite mehanizme koji deluju na transkripcionom, posttranskripcionom, translacionom i posttranslacionom nivou. Najčešće se regulacija odigrava na transkripcionom nivou i obuhvata kompleksnu mrežu transkripcionih faktora (TF) i regulatornih elemenata. TF vezivanjem za specifične konzervativne motive u promotorima gena (*Cis-Regulatorne Elemente*, CRE), aktiviraju ili inhibiraju transkripciju. Kod različitih biljnih vrsta je ustanovljeno da, pored konzervativnih i široko zastupljenih CAAT i TATA-elemenata, promotori *SOD* gena sadrže CRE koji su povezani sa odgovorom biljaka na različite stimuluse (svetlost, fitohormone) i faktore abiotičkog stresa, ili su u vezi sa stadijumima procesa rastenja i razvića biljaka (Wang i sar., 2017; Zhou i sar., 2017; Liu i sar., 2021).

Analizama promotorskih regiona *SOD* gena kod biljke *Vitis vinifera*, ustanovljeno je da TF iz različitih familija (SBP, MYB, WRKY, ERF, CPP, LBD, TCP, HD-ZIP, AP2 i Dof), mogu regulisati ekspresiju *VvSOD* gena (Hu i sar., 2019). U promotorima *SOD* gena kod biljke *Gossypium hirsutum*, identifikovani su CRE koji su povezani sa odgovorom na stres (ARE, MBS, Box-W1, HSE, LTR, WUN motiv i TC ponovci) (Wang i sar., 2017). Različiti CRE povezani sa odgovorom na stres (HSE, MBS, WUN-motiv, TC-ponovci, ARF, EIRE i Box-W1), prisutni su i u promotorima *SOD* gena kod *C. sativus* (Zhou i sar., 2017). Analizom promotora *SOD* gena kod *Z. mays* identifikovano je 2-10 CRE, koji su uključeni u odgovor na abscisinsku kiselinu-ABA (ABRE), dehidraciju (DRE), nisku temperaturu (LTR) i za vezivanje TF iz MYB familije (MBS) (Liu i sar., 2021).

Regulacija ekspresije *SOD* gena na posttranskripcionom nivou podrazumeva utišavanje gena posredovano mikro-RNK (miRNK), alternativno iskrajanje introna i alternativnu poliadenilaciju informacione RNK (iRNK). miRNK predstavljaju familiju malih nekodirajućih regulatornih RNK molekula, veličine 20-24 nukleotida, koji sprečavaju translaciju iRNK ili iniciraju iRNK degradaciju. miRNK učestvuju u utišavanju gena tako što se 5' krajem vezuju za specifična mesta unutar kodirajućeg ili netranslatirajućeg regiona (eng. *Untranslated Regions*, UTR) iRNK. miR398 je jedna od najbolje proučenih miRNK kod biljaka. Pokazano je da kod *A. thaliana* miR398 interaguje sa *CuZnSOD* (*CSD1* i *CSD2*) transkriptima, što rezultuje degradacijom transkripata ili onemogućavanjem translacije (Kumar, 2014). Osim *A. thaliana*, miR398-posredovana posttranskripciona regulacija ekspresije gena ustanovljena je i kod drugih biljnih vrsta, kao što su soja, detelina, kikiriki (Wang i sar., 2016b). Zapaženo je da nivo ekspresije miR398 opada u uslovima stresa soli, hladnoće i dehidracije kod *A. thaliana* (Sunkar i Zhu, 2004), čime se omogućava povećanje nivoa transkripata gena *CSD1* i *CSD2*. Takođe, miR398 učestvuje u kontroli ekspresije *CSD1* i *CSD2* na posttranslacionom nivou posredstvom utišavanja gena za bakar-šaperon (eng. *Copper Chaperone for SOD*, CCS) (Beauclair i sar., 2010). Naime, miR398 inhibira translaciju *CCSI* transkripata, čime se onemogućava sinteza CCS, koji je neophodan za dostavljanje Cu kofaktora do apoenzima i aktivaciju SOD.

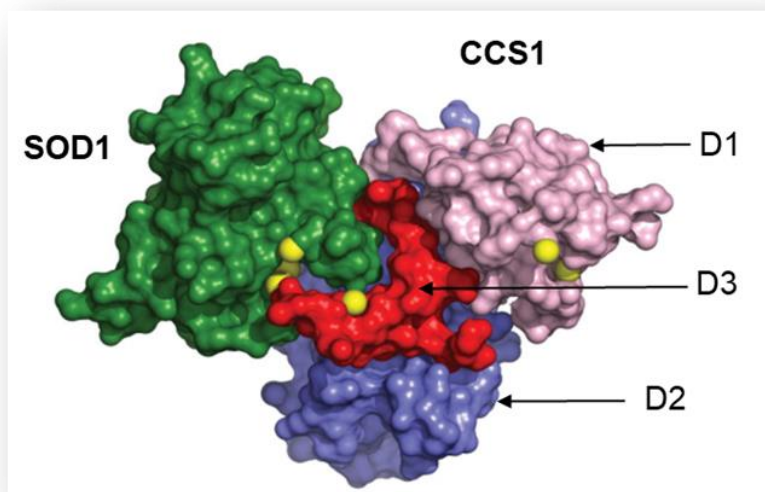
Alternativno splajsovanje transkripata rezultuje različitim izoformama proteina. Kod kalifornijske topole (*Populus trichocarpa*), pronađena su dva transkripta za gen *PthipI-SODC1*, koji se razlikuju u broju baznih parova (Srivastava i sar., 2009). Transkript *hipI-SODC1b* kodira nefunkcionalni protein i sadrži 69 baznih parova više od drugog transkripta, dok kraći transkript *hipI-SODC1s* kodira funkcionalni SOD. Autori pretpostavljaju da dodatne aminokiseline na C-terminusu sprečavaju pravilno prostorno uvijanje proteina *hipI-SODC1b* i samim tim dovode do inaktivacije enzima. Analizom transkripata kod biljke *Gossypium raimondii*, identifikovano je više transkripata

*GrCSD1*, *GrCSD3*, *GrFSD1* i *GrFSD2* gena (Wang i sar., 2017). *GrCSD1*, *GrFSD1* i *GrFSD2* geni imaju po tri transkripta i analizom alternativnog splajsovanja ustanovljeno je da su transkripti formirani: 1) zadržavanjem introna u zrejoj iRNK, 2) alternativnim splajsovanjem na 3' ili 3) alternativnim splajsovanjem na 5' kraju.

Alternativna poliadenilacija je jedan od važnih mehanizama posttranskripcione regulacije ekspresije gena. Pre-informaciona RNK (pre-iRNK) može da sadrži više od jednog signala za poliadenilaciju i taj proces se može odvijati na nekoliko različitih načina, što omogućava formiranje različitih transkripata. Iako ne dolazi do promene u kodirajućim sekvencama, razlike u dužini UTR na 3' kraju mogu uticati na stabilnost iRNK i efikasnost translacije. Korišćenjem EST (eng. *Expressed Sequence Tag*) analize, urađena je identifikacija transkripata *SOD* gena kod *Z. mays* (Katyshev i sar., 2006a). Pretragom EST baze podataka, identifikovan je veliki broj eksprimiranih sekvenci, koje se mogu podeliti u dve grupe: *MnSOD3-1* i *MnSOD3-4*. Ove grupe se razlikuju u dužini netranslatirajućih regiona na 3' kraju, što se može objasniti alternativnom poliadenilacijom pre-iRNK. Alternativna poliadenilacija transkripata *MnSOD* gena utvrđena je i kod vrste *Larix gmelinii* (Katyshev i sar., 2006b). Kod banana identifikovano je 12 *SOD* gena, a 25 transkripata (Feng i sar., 2015). Ustanovljeno je da ovi transkripti, koji kodiraju određeni SOD protein, imaju isti otvoreni okvir čitanja, ali se razlikuju u dužini UTR, što sugerise da su transkripti nastali alternativnom poliadenilacijom, alternativnim splajsovanjem i alternativnom transkripcijom (Feng i sar., 2015).

Budući da su svi biljni SOD proteini kodirani jedarnim genima, sinteza ovih proteina se odvija u citosolu, odakle se transportuju u odgovarajuće organele u kojima dolazi do posttranslacione obrade polipeptida. Transport SOD proteina u hloroplaste odvija se putem specifičnih translokona spoljašnje membrane hloroplasta (eng. *Translocon at the Outer envelope membrane of Chloroplasts*, TOC) i unutrašnje membrane hloroplasta (eng. *Translocon at the Inner envelope membrane of Chloroplasts*, TIC) (Andrès i sar., 2010). Kako bi bili uneseni u stromu hloroplasta, proteini moraju sadržati tranzitnu sekvencu na N-terminusu i biti u odmotanoj formi. Takvi proteini bivaju prepoznati od strane tzv. „kompleksa za navođenje“, čija je uloga da dovedu proteine do TOC-receptora (Jarvis i Kessler, 2014). Kompleks za navođenje čine šaperoni u citosolu (HSP70 i HSP90) i njihovi kofaktori. U transportu proteina kroz međumembranski prostor hloroplasta, tj. do TIC kompleksa, uključeni su HSP70 (Andrès i sar., 2010). Po ulasku u stromu hloroplasta, odgovarajuća peptidaza (eng. *Stromal Processing Peptidase*, SPP) odseca tranzitnu sekvencu, a zatim dolazi do posttranslacione obrade proteina, koja podrazumeva ponovno uvijanje proteina pomoću šaperona strome, vezivanje metala za aktivno mesto i pridruživanja proteinskih subjedinica. Za potpunu funkcionalnost CuZnSOD, neophodna je insercija  $\text{Cu}^+$  i  $\text{Zn}^{2+}$  u aktivno mesto apoenzima, kao i formiranje intramolekulske disulfidne veze, koja doprinosi stabilnoj homodimernoj konformaciji (Boyd i sar., 2020). Sazrevanje CuZnSOD je posredovano metalošaperonima, a Culotta i sar. (1997) prvi su identifikovali proteine LYS7 (*S. cerevisiae*) i CCS (*H. sapiens*), koji imaju ovu ulogu. CCS dostavlja  $\text{Cu}^+$  do aktivnog mesta i katalizuje formiranje disulfidne veze unutar proteinske subjedinice (Boyd i sar., 2018b). Molekul CCS poseduje tri funkcionalna domena (D1, D2 i D3) (**Slika 12.**). D1 se nalazi na N-terminusu, strukturno je homolog Atx1 bakar-šaperonu *S. cerevisiae* i sadrži MxCxxC-motiv koji je uključen u vezivanje  $\text{Cu}^+$ . D2 se naziva „SOD1-like“ domen, jer sadrži osam antiparalelnih  $\beta$ -lanaca, slično kao i SOD1. Funkcija ovog domena je u prepoznavanju i vezivanju SOD apoenzima. D3 je veoma kratak, ali najviše očuvan domen, koji sadrži CxC-motiv uključen u vezivanje  $\text{Cu}^+$ .





**Slika 12.** SOD1•CCS1 heterodimerni kompleks *S. cerevisiae*. D1, D2 i D3 su domeni u okviru CCS. Preuzeto i modifikovano prema Boyd i sar. (2018b).

Prema Boyd i sar. (2020),  $\text{Cu}^+$  se iz D3 doprema do mesta gde dolazi do kontakta SOD1 i CCS pri formiranju heterodimera. Takođe, ustanovljeno je da se interakcija SOD i CCS ostvaruje pomoću  $\beta$ -ukosnice unutar D3. Naime, između aminokiselinskih ostataka C57 (SOD1) i C229 (CCS) dolazi do formiranja disulfidne veze (Lamb i sar., 2001; Fetherolf i sar., 2017). Formiranje ove veze prouzrokuje konformacione promene i „otvaranje“ aktivnog mesta SOD, što dalje omogućava inserciju  $\text{Cu}^+$ . Interakcija CCS i SOD traje vrlo kratko i završava se formiranjem disulfidnog mosta C57-C146 u okviru SOD subjedinice. Novija istraživanja pokazala su da CCS preferira potpuno nezreo SOD (Boyd i sar., 2018b), i da interakcija CCS sa SOD povećava afinitet apoenzima prema  $\text{Zn}^{2+}$  (Boyd i sar., 2018a).

Do sada nisu otkriveni specifični šaperoni koji imaju ulogu u aktivaciji FeSOD i MnSOD enzima. Kuo i sar. (2013) su ustanovili da se u prisustvu šaperonina 20 (CPN20) povećava afinitet apoenzima prema  $\text{Fe}^{2+}$ , zbog čega je pretpostavljeno da CPN20 učestvuje u aktivaciji FeSOD. U aktivaciju MnSOD uključeni su transportni proteini, koji dopremaju  $\text{Mn}^{2+}$  iz citosola u mitohondrijalni matriks. Dati transportni proteini, za razliku od bakar-specifičnih šaperona, nisu specifični za  $\text{Mn}^{2+}$ , već interaguju i sa drugim dvovalentnim jonima (Sheng i sar., 2014). Kod *S. cerevisiae* pronađena su tri tipa transportnih proteina, koji se nalaze na plazma membrani (SMF1), u ćeliji (SMF2) i na unutrašnjoj membrani mitohondrija (MTM) (Hu i sar., 2022). Kod *A. thaliana* identifikovana su dva proteina (AtMTM1 i AtMTM2), koja su homologna  $\gamma$ MTM1 *S. cerevisiae* (Hu i sar., 2021).

Ekspresija različitih *SOD* gena varira u zavisnosti od stadijuma razvića biljke. Kod *A. thaliana* *FSD1* gen je visoko eksprimiran kod mladih biljaka, ali kada se formiraju rozete i započne cvetanje, dolazi do značajnog pada u njegovoj ekspresiji. Sa druge strane, ekspresija *CSD1* i *CSD2* gena je na niskom nivou tokom ranih faza razvića biljke, ali se povećava sa početkom procesa cvetanja (Pilon i sar., 2011). Uočeno je da u početnim fazama razvića biljke dolazi do blagog povećanja ekspresije *FSD1* i *FSD2* gena, što ukazuje da *FSD1* i *FSD2* imaju značajnu ulogu u razviću hloroplasta kod *A. thaliana* (Myouga i sar., 2008). Ekspresija gena je regulisana i uslovima životne sredine, kao što su dostupnost metala, izlaganje faktorima biotičkog i abiotičkog stresa. Dostupnost bakra je jedan od faktora koji utiču na ekspresiju CuZnSOD. Bakar je esencijalni mikronutrijent za većinu živih organizama i kofaktor je više proteina, uključujući CuZnSOD i plastocijanin. U slučaju nedostatka, dolazi do preraspodele bakra radi efikasnijeg korišćenja. Kao što je prethodno pomenuto, familija

*miR398* gena ima ulogu u regulaciji ekspresije *CSD1* i *CSD2* (Yamasaki i sar., 2007). Deficit bakra dovodi do ekspresije *miR398* gena, čiji su transkripti uključeni u razgradnju *CSD1* i *CSD2* transkripata. Dostupna količina bakra se potom preusmerava na plastocijanin, čime se omogućava nesmetano odvijanje fotosinteze. U uslovima deficita bakra suprimirana je ekspresija *CuZnSOD*, a indukovana ekspresija *FeSOD* izoformi *A. thaliana* (Abdel-Ghany i sar., 2005). Mehanizam ove regulacije uključuje TF *SPL7*, koji se pri niskim koncentracijama bakra direktno vezuje za GTAC-motiv u promotoru *miR398* gena i dovodi do njegove ekspresije (Yamasaki i sar., 2009). Autori sugerišu da je *SPL7* glavni regulator homeostaze bakra u ćelijama *A. thaliana*. Takođe, *SPL7* je potreban za ekspresiju i drugih miRNK (*miR397*, *miR408* i *miR857*), važnih za održavanje homeostaze bakra, kao i gena, koji kodiraju transportne proteine bakra. Nasuprot tome, visoke koncentracije bakra indukuju ekspresiju *CuZnSOD* izoformi, a suprimiraju *FeSOD*. Na primeru mahovine *Barbula unguiculata*, ustanovljeno je da pri visokim koncentracijama bakra dolazi do vezivanja TF *PpSBP2* za GTACT-motiv u promotoru *FeSOD* gena, čime se sprečava njegova ekspresija (Nagae i sar., 2008). Kod biljaka *Nicotiana tabacum*, transformisanih *FeSOD* genom *B. unguiculata*, pokazano je da visoke koncentracije bakra suprimiraju ekspresiju ovog gena. Takođe, bakar zaustavlja ekspresiju i *FeSOD* gena *A. thaliana*, kod kojeg je u promotoru identifikovan GTACT-motiv. Na osnovu rezultata, autori su prepostavili da je navedeni mehanizam negativne regulacije *FeSOD* gena očuvan kod kopnenih biljaka (Nagae i sar., 2008). Takođe, ustanovljeno je da  $Fe^{2+}$  suprimira ekspresiju *MnSOD* na transkripcionom i postranslacionom nivou kod *E. coli* (Hu i sar., 2022).

#### 1.4. Uticaj visoke temperature na biljnu ćeliju

Temperatura ima velikog uticaja na procese koji se odvijaju u ćeliji, a takođe može imati uticaja na strukturu ćelijskih organela. Visoka temperatura prouzrokuje denaturaciju proteina, njihovu agregaciju, kao i povećanje fluidnosti ćelijske membrane (Wahid i sar., 2007). Budući da su tilakoidne membrane hloroplasta izuzetno osetljive na delovanje visoke temperature, jedan od prvih indikatora toplotnog stresa je smanjenje fotosintetičke aktivnosti (Kourani i sar., 2022).

Visoka temperatura povećava kinetičku energiju polipeptida, što uslovljava pojačane molekulske vibracije i dovodi do raskidanja vodoničnih veza, narušavanja hidrofobnih interakcija i Van der Valsovih sila unutar molekula. Sve navedeno dovodi do narušavanja nativne konformacije i odmotavanja proteina. Tokom dugotrajnog toplotnog stresa može doći do interakcije denaturisanih proteina i formiranja proteinskih agregata (Levitt, 1980). Ćelijske membrane su veoma osetljive na delovanje visoke temperature. Stabilnost ćelijske membrane zavisi od membranskih lipida, tačnije od zastupljenosti nezasićenih masnih kiselina, koje ulaze u sastav membranskih lipida (Wang i sar., 2020). U uslovima visoke temperature povećava se fluidnost ćelijskih membrana, menja se njihova propustljivost, položaj integrisanih membranskih proteina i aktivnost transportnih proteina (Los i Murata, 2004). Jedna od strategija koja biljkama omogućava adaptaciju na promene temperature je redukcija stepena nezasićenosti membranskih lipida (Zheng i sar., 2011). Pored toga, ustanovljeno je da u uslovima visoke temperature dolazi i do promena u sastavu membranskih lipida.

Visoka temperatura prouzrokuje oštećenja fotosintetičkog aparata, koja uključuju fizičke i hemijske promene na nivou tilakoida, oštećenje kompleksa koji razvija kiseonik (eng. *Oxygen Evolving Complex*, OEC), disocijaciju a/b antena-pigmenata II (eng. *Light Harvesting Complex II*, LHCII) od jezgra fotosistema II i inaktivaciju PSII (Fu i sar., 2012). Sve navedeno dovodi do narušavanja strukture tilakoida grana i intergranalnih lamela, što rezultira deformacijom hloroplasta i narušenim integritetom hloroplastnih membrana. Najosetljivija komponenta fotosintetičkog aparata na delovanje visoke temperature je PSII. Visoke temperature prouzrokuju odvajanje PSII od tilakoidnih membrana, konformacione promene PSII, disocijaciju LHCII kompleksa od PSII i migraciju PSII ka tilakoidima strome (Sundby i sar., 1986). Budući da se toplotni stres i visok intenzitet svetlosti uglavnom pojavljuju istovremeno, razdvajanje LHCII kompleksa od PSII bi mogao predstavljati mehanizam kojim se sprečava prekomerna ekscitacija i dodatno oštećenje PSII

pri visokom intenzitetu svetlosti (Sundby i sar., 1986). Reorganizacija PSII i LCHII kompleksa, do koje dolazi u uslovima toplotnog stresa, važna je radi održavanja efikasne fotosintetičke aktivnosti (Caffarri i sar., 2014). Nosilac reakcionog centra PSII, D1 protein, je izuzetno osetljiv na delovanje visoke temperature i do njegove parcijalne denaturacije dolazi i pri kratkotrajnom izlaganju visokim temperaturama (40 °C, 30 min.) (Fu i sar., 2012).

## **1.5. Krompir (*Solanum tuberosum* L.)**

### **1.5.1. Značaj i istorijat gajenja**

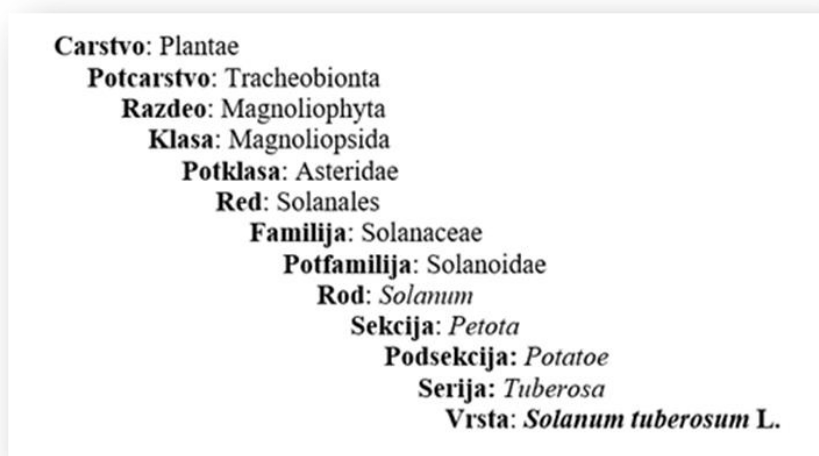
Krompir predstavlja jednu od najznačajnijih ratarsko-povrtarskih kultura koje se gaje za potrebe ljudske ishrane. Gajenje krompira je otpočelo pre više od 7000 godina na Andima u Južnoj Americi, u regionu koji se karakteriše kratkim danom, visokim intenzitetom svetlosti, hladnom klimom i visokom vlažnošću vazduha. Krajem XVI veka počinje uzgoj krompira u Evropi i selektovanje sorti koje daju visok prinos u uslovima dugog dana. Tokom XVIII i XIX veka uzgoj krompira se proširio na ostatak sveta. U početku je krompir gajen kao retka i lekovita biljka, posebno u Španiji, a do masovnije proizvodnje je došlo tek u XIX veku. Najpre je korišćen za ishranu stoke, a kasnije je uveden i u ljudsku ishranu zbog brojnih prednosti u odnosu na druge useve. Naime, krompir je poljoprivredna kultura koja daje veći prinos po jedinici površine u odnosu na žitarice, može duže da se čuva i manje se kvari u odnosu na većinu povrtarskih plodova, nakon konzumiranja brzo dovodi do osećaja sitosti i predstavlja jeftinu hranu. Savremeni uzgoj krompira vezuje se za kraj XVIII veka, kada je počela proizvodnja lokalnih sorti (Bročić i Stefanović, 2012). Početkom XIX veka uvedene su nove sorte, posebno iz Čilea, što je u velikoj meri doprinelo razvoju savremenih sorti krompira. Kako bi se povećala otpornost prema bolestima i štetočinama, tokom XX veka rađena su ukrštanja evropskih sorti sa divljim i kulturnim vrstama iz Južne Amerike. Krompir koji danas poznajemo, rezultat je intenzivne selekcije (XIX vek) i oplemenjivanja (XX vek).

Danas se krompir gaji u 158 zemalja, na preko 18 miliona hektara, sa prosečnim prinosom od 20,74 t/ha (FAO, 2023). Najveći prosečni prinos krompira u 2021. godini zabeležen je u Kuvajtu (51,91 t/ha), na Novom Zelandu (50,82 t/ha) i u SAD (49,07 t/ha). U Evropi zemlje sa najvećim prinosom krompira bile su Irska (45,63 t/ha), Nemačka (43,79 t/ha) i Belgija (43,05 t/ha), dok je u Srbiji prinos krompira za 2021. godinu iznosio 23,26 t/ha. Najveći svetski proizvođači date godine bili su Kina (>94 miliona t) i Indija (>54 miliona t), sa udelom većim od trećine ukupne svetske proizvodnje. Krompir je namirnica koju, na dnevnom nivou, konzumira više od milijardu ljudi. Pored skroba, koji je najzastupljeniji, krtole krompira obiluju proteinima, vitaminima i mineralima. Jedna krtola od 150 g zadovoljava 45% dnevnih ljudskih potreba za unosom vitamina C, 10% vitamina B6, 8% niacina i 6% folata (Patil i sar., 2016).

Osim za ishranu ljudi i stoke, krompir se koristi i kao industrijska biljka. Krtole krompira se prerađuju u alkohol ili skrob, koji imaju primenu u industriji tekstila, papira, kože, farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda (Bročić i Stefanović, 2012). Sa agrotehničkog gledišta, krompir je odličan predusev za većinu poljoprivrednih kultura. Nakon vađenja mladog krompira, zemljište ostaje rastresito i pogodno za naredne useve. Pored svega navedenog, krompir je važan za lokalne zajednice i siromašne zemlje. Za razliku od pirinča, pšenice i kukuruza, krompir nije roba sa kojom se globalno trguje i njegova cena uglavnom zavisi od lokalne ponude i potražnje. Budući da su cene hrane u porastu, FAO (2008) preporučuje krompir kao poljoprivrednu kulturu kojom se može obezbediti globalna sigurnost u snabdevanju hranom.

### 1.5.2. Biološka klasifikacija vrste

Krompir je višegodišnja zeljasta, dikotiledona biljka, koja pripada porodici Solanaceae, rodu *Solanum*, sekciji *Petota*, podsekciji *Potatoe* (Hawkes, 1990) (**Slika 13.**). Sekcija *Petota* obuhvata sedam kultivisanih i 228 divljih vrsta, koje su podeljene u 21 taksonomsku seriju. Rod *Solanum* obuhvata 1500-2000 vrsta, među kojima su i plavi patlidžan (*S. melongena*), paradajz (*S. lycopersicum*) i kokošije grožđe (*S. nigrum*) (Burton, 1989). Podsekcija *Potatoe* predstavlja „pravi krompir“, tj. obuhvata vrste kod kojih se formiraju krtole na podzemnim izdancima (stolonima), a ne na korenovima (Hawkes, 1994). Serija *Tuberosa* obuhvata 54 vrste (divlje i kultivisane), među kojima je i *S. tuberosum* (Hawkes, 1990). Za seriju *Tuberosa* postoje dva centra biodiverziteta divljeg krompira. Jedan je u centralnom Meksiku, a drugi centar obuhvata široku oblast Anda u Venecueli, Kolumbiji, Ekvadoru, Peruu, Boliviji i Argentini.



**Slika 13.** Klasifikacija krompira.

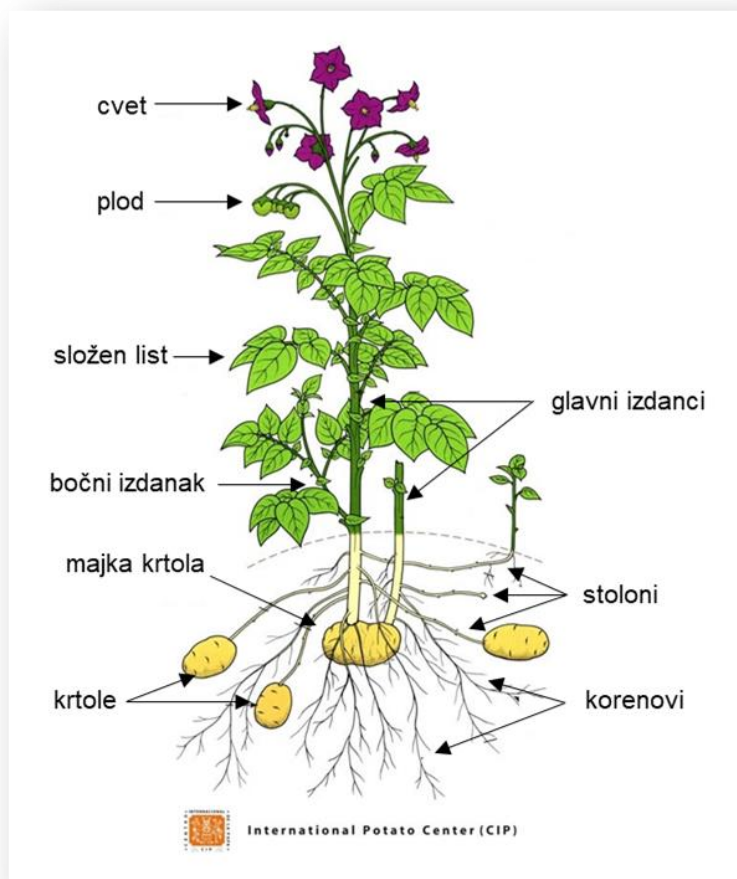
Prema Hawkes (1978), krompir koji je danas poznat pripada vrsti *S. tuberosum* L. Vrsta *S. tuberosum* je podeljena u dve podvrste: *tuberosum* (čileanski krompir) i *andigena* (andski krompir). Podvrsta *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* je prilagođena uslovima dugog dana, hladne klime i osetljiva je na delovanje visoke temperature. Ova podvrsta predstavlja najznačajniju i najrasprostranjeniju kultivisanu podvrstu na kojoj se zasniva gotovo kompletna proizvodnja krompira u svetu (Bročić i Stefanović, 2012). *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* može biti diploid ( $2n=24$ ) ili tetraploid ( $2n=48$ ). Tetraploidni krompir je najčešće gajena povrtarska kultura u svetu, dok se diploidni krompir uzgaja uglavnom u Latinskoj Americi. Prema Hawkes (1990), do tetraploidije kultivisanog *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* je najverovatnije došlo usled ukrštanja dve iste ili srodne diploidne vrste. Kod vrsta roda *Solanum* često dolazi do formiranja gameta sa dupliranim ( $2n$ ) brojem hromozoma, što nakon ukrštanja sa  $2n$  ili  $n$  gametima vodi uvećanju broja hromozoma (Hanneman, 1995). Podvrsta *S. tuberosum* subsp. *andigena* je prilagođena uslovima kratkog dana, gaji se u Centralnoj i Južnoj Americi, a krtole ove podvrste karakterišu duboka okca i pigmentacija (Hawkes, 1990).

Prema Hawkes (1990), podvrsta *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* je nastala prenošenjem biljaka podvrste *S. tuberosum* subsp. *andigena* u uslove dugog dana i njihovom adaptacijom. Naime, Hawkes sugerise da se premeštanje biljnog materijala dogodilo dva puta. Prvi put su indijanska plemena donela podvrstu *S. tuberosum* subsp. *andigena* sa Anda u Čile, a drugi put su to učinili Španci donoseći krompir u Evropu. Tokom selekcije, doneti krompir se adaptirao na sredinske uslove koji vladaju u Evropi, te je svrstan u podvrstu *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*. Takođe, Hawkes tvrdi

da je podvrsta *S. tuberosum* subsp. *andigena* nastala ukrštanjem najprimitivnije kultivisane vrste *S. stenotomum* sa divljom vrstom *S. sparsipilum*. Poreklo modernih sorti krompira i dalje je predmet polemike. Prema mnogim autorima, originalni biljni materijal koji je donet u Evropu pripadao je podvrsti *S. tuberosum* subsp. *andigena*. Ove biljke su kasno cvetale, formirale su krtole i morfološki su bile vrlo slične biljkama iz podvrste *S. tuberosum* subsp. *andigena*. Prema nekim autorima, pretpostavlja se da je polovinom XIX veka, nakon epidemije plamenjače, većina ovog materijala uništena i zamenjena podvrstom *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* iz Čilea (Grun, 1990).

### 1.5.3. Morfološke karakteristike krompira i faze razvića

Krompir je višegodišnja, zeljasta, dikotiledona biljka, koja se uglavnom razmnožava vegetativno, iz krtola. Osim vegetativno, krompir se može razmnožavati generativno, putem semena. Generativno razmnožavanje se uglavnom koristi u selekciji pri stvaranju novih sorti, za dobijanje prve generacije krtola. Morfološke karakteristike biljaka zavise od načina razmnožavanja. Biljke koje se razmnožavaju generativno imaju vretenast koren i jedno stablo, dok biljke koje se razmnožavaju vegetativno imaju žiličast, plitak koren i obrazuju više stabala (Bročić i Stefanović, 2012). Biljke koje se vegetativno razmnožavaju formiraju nadzemna stabla, koja se granaju, te biljka poprima žbunast izgled. Iz bočnih pupoljaka na podzemnom delu stabla obrazuju se tanki, etiolirani modifikovani izdanci, tj. stoloni (Slika 14.). Kada dostigne određenu dužinu, vršni deo stolona zadebljava i tu započinje formiranje krtole, odnosno organa za skladištenje.



**Slika 14.** Morfologija biljke krompira. Preuzeto i modifikovano prema International Potato Center, <http://cipotato.org/potato/how-potato-grows/>.

Listovi krompira su po tipu složeni, neparno perasti, sa vršnim listom, koji vrlo često srasta sa prvim parom listova. Tipičan list krompira sastoji se od primarnih liski, između kojih se nalaze sitnije, sekundarne liske. Takođe, duž lisne drške mogu se nalaziti rudimentarne, tercijarne liske. Cvetovi biljaka krompira su petočlani, dvopolni i organizovani u grozdaste cvasti. Boja cveta varira od bele do ljubičasto-plave, sa žuto obojenim prašnicima. Oprašivanje je uglavnom insektima, a ređe vetrom. Plod krompira je sočna dvodelna bobica u kojoj se nalaze semena.

Rastenje i razviće biljaka krompira iz krtola može se podeliti u nekoliko stupnjeva: klijanje, vegetativni rast biljke, indukcija/inicijacija krtola, nalivanje krtola i sazrevanje (stupanj fiziološke zrelosti). Na svaki razvojni stupanj utiču različiti faktori životne sredine, kao što su temperatura, vlažnost vazduha, intenzitet svetlosti, dostupnost vode i hranljivih materija. U većini regiona u kojima se gaji krompir, temperatura i u nešto manjoj meri dostupnost vode predstavljaju najvažnije faktore od kojih zavise rastenje, razviće i prinos krompira (Levy i Veilleux, 2007).

Stupanj klijanja započinje razvojem izbojka iz okca semenske krtole, koji se potom izdužuje i izlazi na površinu zemlje. U osnovi izbojka pojavljuju se začeci korenova, ali sve dok se u potpunosti ne formira korenov sistem, biljka ne može da usvaja hranjive materije iz zemljišta (Westermann, 1993). U ovom stupnju razvića, semenska krtola predstavlja jedini izvor energije. Proces klijanja traje od 21. do 31. dana nakon sadnje, a stepen klijanja veoma zavisi od temperature. Vegetativni rast je stupanj intenzivnog rasta biljke, koji započinje pojavom klijanca na površini zemljišta, a završava se zametanjem krtola na vrhovima stolona. Tokom ovog stadijuma počinje proces fotosinteze, koji obezbeđuje energiju za rastenje i razviće vegetativnih delova biljke: stablo, listove, grane, korenove i stolone (Westermann, 1993). Zametanju krtola prethodi nekoliko koraka. Prvo dolazi do indukcije i inicijacije stolona, koji izrastaju iz pazušnih pupoljaka na podzemnim nodusima stabla (Vreugdenhil i Struik, 1989). Potom dolazi do izduživanja i grananja stolona, nakon čega sledi inicijacija krtola. U ovom stupnju se zaustavlja longitudinalno rastenje stolona i započinje njihovo debljanje u subapikalnom delu. Nalivanje krtola je stupanj koji može trajati do tri meseca, u zavisnosti od vremena setve, sredinskih uslova i sorte krompira. U ovom stupnju prestaje rast nadzemnog dela biljke i dolazi do uvećanja krtola usled intenzivne akumulacije vode, hranljivih materija i ugljenih hidrata. Fiziološka zrelost krtola je poslednji stupanj u kojem dolazi do smanjenja intenziteta fotosinteze, opadanja listova i sušenja nadzemnog dela biljke, a krtole usporavaju rast i postaju čvršće usled povećanog sadržaja skroba. Ova faza traje oko 15-20 dana.

#### **1.5.4. Uticaj temperature na rastenje i razviće biljaka krompira**

Visoke temperature vazduha i zemljišta imaju štetan uticaj na rastenje i razviće biljaka krompira tako što usporavaju pojavu i rast izbojaka, smanjuju broj stolona, usporavaju i redukuju inicijaciju krtola, redukuju nalivanje krtola i ometaju period mirovanja (Momčilović, 2019). Toplotni stres redukuje broj krtola, prouzrokuje fiziološke poremećaje i deformitete krtola, što vodi lošijem kvalitetu krtola.

Prema nekim istraživanjima, optimalna temperatura za klijanje se kreće u opsegu 22-24 °C (Sale, 1979), odnosno 20-25 °C (Struik, 2007), dok Firman i sar. (1992) navode da je procenat klijavosti najveći na temperaturi do 23 °C. Formiranje vegetativnih organa zavisi od temperaturnih uslova. Temperatura od 25 °C je najpogodnija za rast listova (Struik, 2007) i formiranje stolona (Struik i sar., 1989). Blago povišena temperatura favorizuje grananje stolona, a samim tim povećava broj potencijalnih mesta za pojavu krtola međutim, temperatura iznad 28 °C može delimično ili potpuno sprečiti formiranje stolona (Struik i sar., 1989). Temperatura u opsegu 25-30 °C povoljno deluje na izduživanje stabla i grananje izdanaka (Borah, 1962; Benoit i sar., 1983; Ewing i Struik, 1992). Za formiranje korenovog sistema temperaturni optimum je 15-20 °C, dok temperature iznad 30 °C mogu značajno redukovati dužinu i broj korenova, a dovesti do pojave korenskih dlaka i

zadebljanih korenova (Sattelmacher i sar., 1990a). Visoke temperature u zoni korenova nepovoljno utiču i na transport azota iz korenova u nadzemni deo biljke (Sattelmacher i sar., 1990b).

Zametanju krtola pogoduju temperature do 20 °C, dok više temperature mogu odložiti ovaj proces (Struik, 2007). Utvrđeno je da niže temperature tokom noći imaju izuzetan značaj za inicijaciju krtola. Optimalna temperatura za nalivanje krtola je u opsegu 14-22 °C (Struik, 2007). Izlaganje visokim temperaturama tokom stadijuma fiziološke zrelosti dovodi do odlaganja dormancije, skraćanja perioda mirovanja i prevremenog klijanja (Levy i Veilleux, 2007).

### **1.5.5. Uticaj visoke temperature na morfološke, fiziološke i nutritivne karakteristike krtola**

Visoke temperature mogu dovesti do različitih deformiteta krtola, prevremenog klijanja, obrazovanja sekundarnih krtola, promena na pokožici i do pojave unutrašnjih nekroza (Momčilović i sar., 2021). Sve ove promene odražavaju se na ukupan i merkantilni prinos krompira.

U uslovima visokih temperatura dolazi do redukcije ili zaustavljanja rasta krtola. Nakon perioda stresa, rast krtole se nastavlja (sekundarni rast), što može dovesti do formiranja nepravilnog oblika krtola (Momčilović, 2019). Ukoliko do toplotnog stresa dođe na početku stadijuma nalivanja krtola, obrazovaće se krtola kruškolikog oblika, sa suženjem na bazalnom kraju. Toplotni stres koji se javi kasnije u fazi nalivanja krtola, dovodi do pojave krtola sa suženjem u središnjem delu. Visoka temperatura može prouzrokovati prekomerno izduživanje i grananje stolona, obrazovanje bočnih krtola, kao i razvoj stolona iz okaca novoformiranih krtola (Bodlaender i sar., 1964). Takođe, visoka temperatura može dovesti do pojave sekundarnih krtola, koje se formiraju iz okaca primarne krtole. Visoke temperature mogu dovesti do promena u nivou endogenih hormona (ABA i giberelina-GA), što rezultuje prekidanjem perioda mirovanja i indukovanjem klijanja krtola (Krauss i Marschner, 1982). Nakon perioda visokih temperatura, krtole ponovo ulaze u fazu mirovanja, što rezultuje obrazovanjem čvornovatih krtola, sa redukovanim sadržajem skroba i manjom tržišnom vrednošću (Van den Berd i sar., 1991). Usled delovanja visoke temperature dolazi i do formiranja hrapave pokožice krtola (Ginzberg i sar., 2009). U optimalnim uslovima, novi slojevi peridermisa se u kontinuitetu dodaju, uz odbacivanje starijih slojeva međutim, visoka temperatura indukuje ubrzano razviće peridermisa i akumulaciju suberizovanih ćelija. Sa rastenjem krtola najverovatnije dolazi do pucanja površinskih slojeva peridermisa, pri čemu nastaje karakterističan hrapav izgled krtole. Unutrašnje nekroze su takođe rezultat toplotnog stresa, do kojih dolazi verovatno oksidacijom unutrašnjeg tkiva krtole (Hooker, 1981). Pored svega navedenog, visoka temperatura i suša mogu dovesti do povećane akumulacije glukoze i fruktoze na jednom od krajeva krtole (Thornton i sar., 2010).

Krtole krompira predstavljaju jedan od najvažnijih izvora ugljenih hidrata, a takođe su bogate vitaminima (C i B6), mineralima, vlaknima. Iako je sadržaj proteina u krtolama na niskom nivou (1-1,5% sveže mase), kvalitet proteina je visok u odnosu na druge biljne proteine poput onih u soji i pasulju (McGill i sar., 2013). Pored skroba, koji je glavni sastojak, u krtolama se nalazi saharoza, kao i redukujući šećeri glukoza i fruktoza, čija koncentracija iznosi do 0,33% (Viola i Davies, 1992). Ustanovljeno je da visoka temperatura dovodi do redukcije sadržaja skroba u krtolama. Feng i sar. (2019) utvrdili su da temperaturni tretman od 35 °C tokom tuberizacije smanjuje sadržaj skroba, amiloze i amilopektina u iznosu od 33,70%, 35,88% i 7,85%, tim redom. Krtole krompira sadrže i sekundarne metabolite važne za zdravlje ljudi, kao što su karotenoidi, antocijanini i fenolne kiseline (Fogelman i sar., 2019). Poznato je da karotenoidi i antocijanini imaju antioksidativnu aktivnost i da povoljno utiču na zdravlje ljudi. Na osnovu studije kojom su obuhvaćene tri sorte, ustanovljeno je da visoke temperature ne utiču na ukupan nivo karotenoida u krtolama, ali dovode do promena u zastupljenosti pojedinačnih jedinjenja. Naime, visoka temperatura uticala je na povećanje sadržaja zeaksantina, a redukovala je zastupljenost violaksantina i anteraksantina. Ispitivanjem nivoa

antocijanina, ustanovljeno je da visoka temperatura nema uticaja i da sadržaj glavnih antocijanina (pelargonidin i peonidin) u krtolama ostaje nepromenjen tokom stresa (Fogelman i sar., 2019).

### 1.5.6. Uticaj visoke temperature na produktivnost krompira

Visoke temperature mogu značajno uticati na sve stupnjeve razvića kod krompira, prouzrokujući formiranje manjeg broja krtola, koje su male težine i sa vidljivim deformitetima, što vodi smanjenoj produktivnosti biljaka. Eksperimentalno je potvrđeno da visoke temperature značajno redukuju svežu masu krtola (Hancock i sar., 2014; Lafta i Lorenzen, 1995). Posledice delovanja visoke temperature zavise od stadijuma razvića u kojem se biljke nalaze. Prema Rykaczewska (2015), izlaganje visokoj temperaturi (35 °C/25 °C, dan/noć) u drugoj polovini juna redukovalo je ukupni prinos za 12%. Isti temperaturni tretman je u drugoj polovini jula manje uticao na prinos, ali je prouzrokovao prevremeno klijanje, što je rezultovalo smanjenjem tržišnog prinosa. U drugoj studiji, tretman visokom temperaturom (38 °C/25 °C, dan/noć) u prvoj polovini juna, redukovao je ukupan prinos za čak 20%, što sugerise da su posledice toplotnog stresa veće u ranijim stupnjevima razvića biljke (Rykaczewska, 2017).

Prema Svetskoj meteorološkoj organizaciji (WMO, 2022), poslednjih osam godina (2015-2022) predstavljaju najtoplije godine od kada se sprovode merenja. Prosečna globalna temperatura 2022. godine iznosila je 1,5 °C više u odnosu na preindustrijski period (1850-1900). Povećanje prosečne globalne temperature može imati štetan uticaj i na produktivnost krompira. Visoke letnje temperature u većini kanadskih provincija redukovale su proizvodnju krompira u veoma toploj 2016. godini (Tang i sar., 2018). Na primer, u Ontariju je uočeno smanjenje prinosa za 17,2% u odnosu na 2015. godinu. U našoj zemlji je tokom dve tople godine, 2011. i 2012, zabeležen drastičan pad prinosa krompira (24-26%) u odnosu na umereno toplu 2013. godinu (Momčilović, 2019).

### 1.5.7. SOD i toplotna tolerancija krompira

S obzirom da SOD krompira do sada nisu bile predmet detaljnog ispitivanja, značaj ovih enzima u zaštiti biljaka krompira na delovanje visokih temperatura je uglavnom procenjen na osnovu rezultata genetičke transformacije sa *SOD* genima drugih biljnih vrsta.

Tang i sar. (2006) su kreirali transgene biljke krompira uvođenjem dva gena koji kodiraju antioksidativne enzime, CuZnSOD juke i APX graška, u sortu Atlantic pomoću *Agrobacterium*-posredovane transformacije. Transgeni su bili pod kontrolom stres-inducibilnog promotora *SVPA2*, a genski konstrukti su uključili i sekvencu za tranzitni peptid, neposredno pored *CuZnSOD* i *APX* sekvenci, koja je omogućila ciljani transport CuZnSOD i APX u hloroplaste. Tretman visokom temperaturom (42 °C, 20 h) nije doveo do bilo kakvih vidljivih oštećenja transgenih biljaka krompira i smanjio je fotosintetsku aktivnost (Fv/Fm) za samo 6%, dok su se netransformisane biljke karakterisale vidljivim oštećenjem listova i smanjenjem fotosintetske aktivnosti od 29%. Rezultati ove studije ukazali su da pojačana ekspresija važnih hloroplastnih antioksidativnih enzima, CuZnSOD i APX, može poboljšati toleranciju na visoke temperature toplotno-osetljive sorte krompira Atlantic.

Kim i sar. (2010) su uveli tri gena koji kodiraju CuZnSOD juke, APX graška i nukleozid difosfat kinazu 2 (*NDPK2*) *A. thaliana* u sortu krompira Atlantic. Transgeni su bili pod kontrolom snažnog stres-inducibilnog promotora *SVPA2*. S obzirom da je toplotni stres praćen sekundarnim oksidativnim stresom, pretpostavka autora je bila da slaganje gena (eng. *gene-stacking*) i istovremena ekspresija proteina sa značajnom ulogom u putu transdukcije signala oksidativnog stresa (*NDPK2*) i antioksidativnih enzima (*CuZnSOD* i *APX*) može rezultovati većom toplotnom tolerancijom transgenih biljaka. Zaista, linije transformisane sa sva tri gena pokazale su 8% redukcije u fotosintetskoj aktivnosti (Fv/Fm) po tretmanu visokom temperaturom (42 °C, 24 h), dok je kod



netransformisanih biljaka pad fotosintetske aktivnosti iznosio 88%. Linije transformisane sa dva gena, *CuZnSOD* i *APX*, nisu se mnogo razlikovale u fotosintetskoj aktivnosti od trostrukih transformanata po tretmanu visokom temperaturom (smanjenje ~10%), što ukazuje na značaj hloroplastnih *CuZnSOD* i *APX* u zaštiti fotosintetičkog aparata ćelija krompira tokom toplotnog stresa.

Waterer i sar. (2010) su ispitivali mogućnost da se genetičkom transformacijom krompira poveća tolerancija ove biljne vrste na različite vrste abiotičkog stresa. Autori su koristili *Agrobacterium*-posredovanu transformaciju radi uvođenja gena za MnSOD pšenice, dehidrin 4 ječma, TF DREB/CBF1 uljane repice ili toplotno stabilan protein LEA grupe 3 vlasena (*Bromus inermis*) u genom sorte Désirée. Transgeni su bili pod kontrolom stres-inducibilnog promotora COR78 *A. thaliana* ili konstitutivnog 35S promotora koji su omogućili njihovu pojačanu ekspresiju u transformisanim biljkama. Po izlaganju transformisanih linija krompira toplotnom stresu, koji je uključio tri ciklusa postepenog zagrevanja od 22 °C do 44 °C u kontrolisanoj sredini, biljke transformisane sa MnSOD pokazale su viši nivo toplotne tolerancije u odnosu na kontrolu i biljke transformisane ostalim transgenima.

## 2. CILJEVI RADA

Kako bi se analizirala *SOD* familija gena, *SOD* proteini i ispitao efekat visoke temperature na ekspresiju *SOD* gena krompira, *S. tuberosum* L., postavljeni su sledeći ciljevi:

- *in silico* analiza *SOD* gena krompira, koja obuhvata identifikaciju funkcionalnih gena, analizu promotora i transkripata,
- *in silico* analiza *SOD* proteina krompira, koja obuhvata fizičko-hemijsku karakterizaciju, strukturnu organizaciju proteina, lokalizaciju u ćeliji, terciarnu strukturu i utvrđivanje filogenetskih odnosa *SOD*,
- ispitivanje uticaja različitih temperaturnih tretmana na ekspresiju *SOD* gena kod biljaka krompira sorte Désirée korišćenjem *in vitro* sistema,
- ispitivanje uticaja povišene temperature i salicilne kiseline (SA) na preživljavanje eksplantata<sup>1</sup>, rastenje i razviće biljaka i ekspresiju *SOD* gena u listovima biljaka odabranih sorti (genotipova) krompira gajenih *in vitro*,
- ispitivanje uticaja toplotnog stresa na ekspresiju *SOD* gena u različitim organima biljaka krompira gajenih *ex vitro*.

---

<sup>1</sup> Deo stabla koji se sastoji od jednog nodusa sa pazušnim pupoljkom i/ili listom.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. *In silico* analiza gena i proteina krompira

##### 3.1.1. Pretraga baza podataka genoma krompira, opis gena i proteina

Podaci koji uključuju pristupne brojeve *SOD* gena krompira (*StSOD*), njihovu poziciju na hromozomima, gen-kodirajuće sekvence, kao i sekvence transkripata i proteina, prikupljeni su pretragom genomske baze Spud DB (DM v6.1, <http://spuddb.uga.edu/>) za *S. tuberosum* grupe Phureja duplog monoploidnog klona DM 1-3 516 R44. Podaci o *StHSP* krompira dobijeni su pretragom Ensembl Plants baze (DM v4.04, <https://plants.ensembl.org/index.html>) za *S. tuberosum* grupe Phureja duplog monoploidnog klona DM 1-3 516 R44. Podaci o *StHSP70-2* preuzeti su iz NCBI baze (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Fizičko-hemijska svojstva *SOD* proteina krompira, koja uključuju teorijsku izoelektričnu tačku ( $pI$ ), indeks nestabilnosti, alifatični indeks i molekulsku težinu, dobijena su korišćenjem ProtParam alata (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger i sar., 2005). Za poravnanja aminokiselinskih sekvenci korišćen je softver MultAlin (Corpet, 1988), a za prezentovanje rezultata ESPript server (Robert i Gouet, 2014). Procenat identičnosti izvedenih aminokiselinskih sekvenci određen je korišćenjem UniProt Align alata (The UniProt Consortium, 2023).

##### 3.1.2. Analiza promotora *StSOD* i predikcija interakcije TF i regulatornih elemenata u *StSOD* promotorima

Za analizu promotora *StSOD* korišćeni su regioni od 1000 nukleotida uzvodno i 100 nukleotida nizvodno od mesta početka transkripcije. Identifikacija *cis*-elemenata u promotorskim sekvencama *StSOD* gena urađena je korišćenjem veb-alata PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) (Lescot i sar., 2002).

Predikcija TF, koji se mogu vezati za specifične motive u promotorima *StSOD*, urađena je na veb-platformi PlantRegMap ([http://plantregmap.gao-lab.org/binding\\_site\\_prediction.php](http://plantregmap.gao-lab.org/binding_site_prediction.php)) (Tian i sar., 2020), a na osnovu TF liste *S. tuberosum*, preuzete iz baze TF biljaka PlantTFDB v5.0 (<http://planttfdb.gao-lab.org/download.php>). Zadata vrednost praga za parametar  $p$  iznosila je  $10^{-5}$ , a detektovana mesta vezivanja čija je  $q$ -vrednost  $< 0,05$  korišćena su za dalju obradu podataka (Storey i Tibshirani, 2003). TF su dodatno anotirani pomoću ontologije gena (eng. *Gene Ontology*, GO), koja je preuzeta iz baze TF biljaka PlantTFDB v5.0 (<http://planttfdb.gao-lab.org/index.php>) (Jin i sar., 2017), gde je za svaki TF dat opis bioloških procesa u kojima učestvuje.

##### 3.1.3. *In silico* karakterizacija *SOD* proteina krompira

Određivanje subćelijske lokalizacije *SOD* proteina krompira urađeno je na osnovu komparativne analize korišćenjem različitih alata:

- DeepLoc- 1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?DeepLoc-1.0>) (Armenteros i sar., 2017),
- CELLO v2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) (Yu i sar., 2006),
- Light Attention (LA, <https://embed.protein.properties/>) (Stärk i sar., 2021),
- TargetP2 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TargetP-2.0>) (Armenteros i sar., 2019) i
- PTS1 Predictor (<https://mendel.imp.ac.at/pts1/>) (Neuberger i sar., 2003a i 2003b).

Anotacija Pfam domena (eng. *Protein family*, <https://pfam.xfam.org/>) (Mistry i sar., 2021) postignuta je HMMER v.3.3.2 veb-serverom (<http://hmmer.org/download.html>) (Eddy, 2011) korišćenjem Pfam34 baze podataka (<http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/Pfam/releases/Pfam34.0/>). Urađena je anotacija konzervativnih domena pomoću baze CDD (<https://ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) (Lu i sar., 2020) uz korišćenje veb-servera za pretragu konzervativnih domena (<https://ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) (Marchler-Bauer i Bryant, 2004). Za višestruko poravnanje sekvenci i predikciju tercijarne strukture SOD proteina, korišćene su SOD proteinske sekvence krompira koje su obrađene na osnovu TargetP2 predikcije. Višestruko poravnanje sekvenci urađeno je DECIPHER R softverskim paketom (Wright, 2015), sa podrazumevanim podešavanjima. Procenat sličnosti aminokiselinskih sekvenci je računat kao:

$$\text{(identične pozicije)} / (\text{poravnate pozicije} + \text{intragenski prekidi}) \times 100\%$$

Predikcija tercijarne proteinske strukture je urađena korišćenjem AlphaFold (Jumper i sar., 2021) i UCSF ChimeraX v.1.4 (Pettersen i sar., 2021) softvera.

### 3.1.4. Filogenetska analiza SOD krompira

Filogenetska analiza SOD proteina krompira je urađena na osnovu poređenja sa homolozima iz 18 biljnih vrsta: *A. thaliana*, *Beta vulgaris*, *Capsicum annuum*, *Daucus carota*, *Glycine max*, *Helianthus annuus*, *Nicotiana attenuata*, *Phaseolus vulgaris*, *Solanum lycopersicum*, *Manihot esculenta*, *O. sativa*, *Saccharum spontaneum*, *Z. mays*, *Sorghum bicolor*, *Hordeum vulgare*, *Ananas comosus*, *Musa acuminata* and *Dioscorea rotundata*. Dati skup obuhvatio je komercijalno značajne biljne vrste, dobro proučene model organizme, kao i biljne vrste taksonomski bliske krompiru. Podaci o proteinima odabranih biljnih vrsta preuzeti su iz Ensembl baze podataka (<https://plants.ensembl.org/index.html>, <http://ftp.ensemblgenomes.org/pub/plants/release-49/fasta/>).

Za svaku SOD proteinsku sekvencu krompira odabrano je sedam najbližijih homolognih sekvenci iz različitih biljnih vrsta, koje su dalje korišćene za filogenetsku analizu. Višestruko poravnanje SOD aminokiselinskih sekvenci urađeno je pomoću DECIPHER R softverskog paketa (Wright, 2015). Neinformativna filogenetska mesta uklonjena su u DECIPHER R softverskom paketu korišćenjem eng. *small-sample size* korekcija (Yu i sar., 2015). Dobijeno poravnanje aminokiselinskih sekvenci je iskorišćeno za konstruisanje filogenetskog stabla maksimalne verovatnoće (eng. *maximum likelihood*) korišćenjem LG modela izmene aminokiselina (Le i Gascuel, 2008), preko *phangorn* R paketa (Schliep, 2011). Za procenu stabilnosti klastera primenjen je neparametrijski *bootstrap* od 100 iteracija. Klasteri sa  $>50/100$  *bootstrap* podrškom označeni su crvenim brojevima. Filogenetsko stablo CuZnSOD je ukorenjeno uvođenjem spoljašnje grupe, tj. uvođenjem sekvence, koja je homologna sa analiziranim CuZnSOD sekvencama, ali se tokom evolucije rano odvojila od njih. U tu svrhu je korišćena proteinska sekvencija *S. cerevisiae* (PDB: 1JK9). Sa druge strane, nije pronađena odgovarajuća spoljašnja grupa koja bi se koristila za konstrukciju filogenetskog stabla Mn-FeSOD, stoga je ovo stablo ukorenjeno pomoću srednje vrednosti dve najdivergentnije grupe u odnosu na ukupnu dužinu grana (eng. *midpoint rooted phylogenetic tree*). Ovakav način formiranja filogenetskog stabla pretpostavlja da je divergentnost od korena prema taksonima za obe grane jednaka.

### 3.2. Biljni materijal

U istraživanjima korišćene su tri sorte krompira (*Solanum tuberosum* L.): Agria, Désirée i Kennebec. Bezvirusne semenske krtole odabranih sorti su dobijene od Solanum Komerc-a (Guča, Srbija). Do početka eksperimentalnog rada, krtole su čuvane u hladnoj sobi (5 °C), u mraku.

### 3.3. Uspostavljanje kulture *in vitro*

Radi naklijavanja, krtole odabranih sorti krompira su izložene sobnoj temperaturi u trajanju od dva meseca. Lepo razvijeni izbojci (~2 cm) su korišćeni kao polazni materijal za uspostavljanje kulture *in vitro*. Izbojci krompira su odvajani od krtola i ispirani pod mlazom česemske vode u trajanju od 30 min, nakon čega su površinski sterilisani. Za sterilizaciju izbojaka prvo je korišćen 70% rastvor etanola sa par kapi komercijalnog deterdženta u trajanju od 30 s, potom 20% rastvor komercijalnog preparata natrijum hipohlorita (4% aktivnog hlora) (3 min), nakon čega su ispirani pet puta sterilnom dejonizovanom vodom i osušeni na sterilnom filter papiru. Površinska sterilizacija izbojaka krompira urađena je u sterilnoj atmosferi laminarne komore. Nakon sušenja izbojci su deljeni na jednonodalne odsečke, koji su preneti na modifikovanu Murashige i Skoog (1962) hranljivu podlogu (MS) sa 0,5 mg l<sup>-1</sup> 6-benzilaminopurinom (BAP, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri). BAP je dodat hranljivoj podlozi kako bi stimulisao rast izdanaka u početnoj fazi. Komponente osnovne MS podloge prikazane su u **Tabeli 2**.

**Tabela 2.** Komponente MS hranljive podloge za gajenje biljaka krompira *in vitro*.

MS makroelementi (mg l <sup>-1</sup> )		MS mikroelementi (mg l <sup>-1</sup> )		Vitamini (mg l <sup>-1</sup> )	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	22,3	Vitamin B <sub>1</sub>	0,4
KNO <sub>3</sub>	1900	ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	8,6	Vitamin B <sub>6</sub>	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	Nikotinska kiselina	0,5
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	440	KI	0,83	Glicin	2,0
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	370	CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,025		
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,25	<b>Organske materije (g l<sup>-1</sup>)</b>	
		CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025	Agar	7
		FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,8	Saharoza	30
		Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O	37,3	Myo-inositol	0,1

Iz bočnih pupoljaka jednonodalnih odsečaka (eksplantata) krompira formirali su se izdanci, koji su dalje korišćeni za umnožavanje biljaka krompira. Kulture *in vitro* su rasle u kontrolisanim uslovima na temperaturi 22 ± 1 °C, 16 h fotoperiodu i beloj fluorescentnoj svetlosti gustine fluksa fotona 90 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

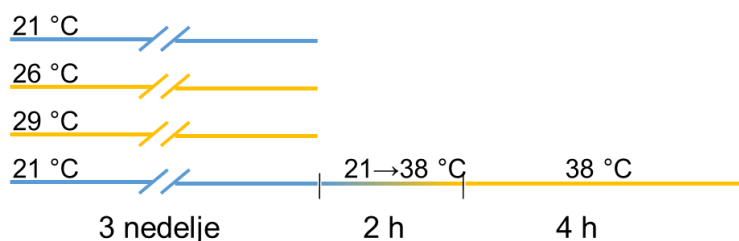
### 3.4. Eksperimenti sa biljkama gajenim *in vitro*

#### 3.4.1. Priprema biljnog materijala za ispitivanje uticaja temperature na ekspresiju *StSOD* gena kod biljaka krompira sorte Désirée

Za ispitivanje uticaja temperature na ekspresiju *StSOD* gena kod biljaka krompira sorte Désirée, korišćeni su eksplantati dužine 10-15 mm, koji su dobijeni fragmentacijom četiri nedelje starih izdanaka biljaka krompira gajenih na osnovnoj MS podlozi. Eksplantati su potom prenošeni na MS medijum u staklenim bočicama zapremine 250 ml, na kojem su gajeni naredne tri nedelje.

*In vitro* kulture sorte Désirée gajene su u komori za gajenje biljaka Fitoclima PLH 1200 (Aralab, Rio de Mouro, Portugal), pri fotoperiodu 16 h, beloj fluorescentnoj svetlosti gustine fluksa fotona 90 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> i na različitim temperaturnim tretmanima: 21 °C (optimalna temperatura za gajenje biljaka krompira), 26 °C i 29 °C, u trajanju od tri nedelje (**Slika 15**). Pored dugotrajnih temperaturnih tretmana, biljke krompira su izložene toplotnom šoku, tj. kratkotrajnom intenzivnom

tretmanu na temperaturi od 38 °C (postepen porast temperature od 21 °C do 38 °C tokom prvih 2 h, 38 °C tokom narednih 4 h).



**Slika 15.** Šematski prikaz eksperimenta uticaja dugotrajnih temperaturnih tretmana (21 °C, 26 °C i 29 °C, 3 nedelje) i toplotnog šoka (38 °C/4 h) na biljke sorte Désirée gajene *in vitro*.

Po završenim temperaturnim tretmanima, sakupljeni su potpuno razvijeni listovi (treći, četvrti i peti list od vrha izdanka), koji su odmah zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na temperaturi od -80 °C. Uzorci su korišćeni za ispitivanje ekspresije *StSOD* gena i određivanje aktivnosti *StSOD* enzima.

### 3.4.2. Ispitivanje aktivnosti *StSOD* enzima u listovima biljaka sorte Désirée gajenih *in vitro*

#### 3.4.2.1. Izolacija proteina iz biljnog materijala

U prvom koraku izolacije proteina, uzorci listova (1 g) (odjeljak 3.4.1.) su mehanički usitnjeni u tečnom azotu u sterilisanim porcelanskim avanima. Usitnjenom materijalu dodato je 1,5 ml/1 g biljnog materijala izolacionog pufera [50 mM Tris-HCl (pH7,8), 2mM EDTA (pH7,8), 10% (v/v) glicerol i 1% (v/v) proteazni inhibitor koktel za biljne proteinske ekstrakte (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri)]. Uzorci su ostavljeni da se odlede na sobnoj temperaturi, a zatim su prebačeni u mikrotube (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i centrifugirani (4 °C, 15 min., 2100 x g). Dobijeni supernatant sadržao je nativni ekstrakt solubilnih proteina listova koji je korišćen je za određivanje aktivnosti *SOD* u daljem radu.

Koncentracija proteina u proteinskim ekstraktima određena je metodom po Bradfordu (Bradford, 1976) uz upotrebu komercijalnog rastvora Bradford reagensa (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets). Uzorci su najpre razblaženi 200 puta u ovom reagensu, a potom su očitavane apsorbance na talasnoj dužini od 595 nm, na spektrofotometru Agilent 8453 UV-visible (Agilent Technologies, Santa Klara, Kalifornija). Koncentracije proteina preračunate su na osnovu standardne krive, koja je kreirana pomoću serije koncentracija proteinskog standarda i apsorbance dobijene za svaku koncentraciju. Kao standard korišćen je albumin goveđeg seruma (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri).

#### 3.4.2.2. NATIVE-PAGE elektroforeza

Za razdvajanje proteina gel-elektroforezom u nenedenurišućim uslovima (NATIVE-PAGE), korišćeni su 10% poliakrilamidni gelovi za razdvajanje i 5% poliakrilamidni gelovi za koncentrovanje uzoraka proteina, debljine 1 mm. Pre nanošenja na gel, uzorci su pomešani sa 2 x Laemli puferom (Laemmli, 1970), u odnosu 1:1 (v/v), inkubirani 20 min. na sobnoj temperaturi i centrifugirani (4 min, 1800 x g). Na gel je naneto 50 µg proteina po uzorku. Razdvajanje proteina urađeno je na aparatu za vertikalnu elektroforezu Criterion Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Herkjuliz, Kalifornija), pri voltaži od 100 V, u trajanju 3,5 h i na temperaturi od 4 °C.

### 3.4.2.3. Esej za određivanje aktivnosti StSOD

Određivanje aktivnosti StSOD enzima je urađeno po modifikovanoj metodi Beauchamp i Fridovich (1971). Po završetku native elektroforeze, gelovi su inkubirani u reakcionoj smeši [50 mM K-P pufer pH(7,8) sa dodatkom 0,1 mM nitro-plavo tetrazolijum hlorida (NBT), 0,03 mM riboflavina, 2 mM N,N,N',N'-tetrametiletan-1,2-diamina (TEMED) i 10 mM EDTA], 30 min., u mraku. Po inkubaciji, gelovi su osvetljeni do pojave ljubičasto-plave boje usled formiranja formazana, dok su na mestima aktivnosti SOD uočene nebojene proteinske trake.

Za identifikaciju različitih StSOD izoformi korišćeni su rastvori inhibitora KCN i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Po završetku native elektroforeze, gelovi sa identičnim uzorcima su inkubirani u 100 mM K-P puferu pH 7,8 (kontrola), K-P puferu sa dodatkom 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i K-P puferu sa dodatkom 3 mM KCN, u trajanju od 30 min. Nakon inkubacije, gelovi su preneti u reakcionu smešu, inkubirani 30 min., u mraku, nakon čega su osvetljeni do pojave ljubičasto-plave boje. Rastvor KCN je korišćen za inhibiciju CuZnSOD, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za inhibiciju CuZnSOD i FeSOD.

### 3.4.3. Eksperiment uticaja temperature i SA na rastenje i razviće biljaka i ekspresiju *StSOD* gena odabranih sorti krompira gajenih *in vitro*

Za ispitivanje uticaja različitih temperaturnih tretmana i SA na preživljavanje eksplantata i morfološke karakteristike biljaka gajenih *in vitro*, korišćeni su eksplantati dužine 10-15 mm, poreklom od izdanaka biljaka koje su četiri nedelje gajene na MS hranljivoj podlozi. Kontrolna grupa eksplantata je postavljena na osnovnu MS podlogu bez dodatka SA, a eksperimentalna grupa eksplantata je postavljena na MS podlogu sa dodatkom  $1 \times 10^{-5}$  M SA. SA je rastvorena u 96% etanolu, a potom dodata MS podlozi pre sterilizacije na temperaturi od 114 °C/25 min.

*In vitro* kulture sorti Agria, Désirée i Kennebec gajene su u komori za gajenje biljaka Fitoclima PLH 1200 (Aralab, Rio de Mouro, Portugal), pri fotoperiodu 16 h, beloj fluorescentnoj svetlosti gustine fluksa fotona  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  i na različitim temperaturnim tretmanima: 21 °C, 26 °C i 29 °C.

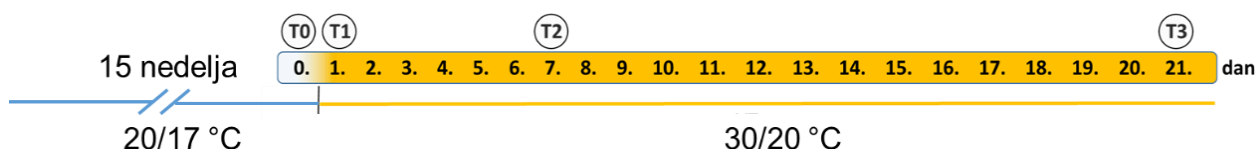
Radi utvrđivanja uticaja visokih temperatura i SA na biljke krompira u uslovima *in vitro*, izmereni su sledeći parametri: procenat preživelih eksplantata, broj listova, visina izdanaka, sveža masa izdanaka, broj korenova, dužina korenova i sveža masa korenova. Procenat preživelih eksplantata dobijen je na osnovu broja eksplantata kod kojih su se razvili izdanci duži od 10 mm. Pri određivanju prosečne dužine korenova uzeta je vrednost najdužeg korena po biljci. Eksperiment je ponovljen tri puta za svaku sortu, sa po četiri ponavljanja po temperaturnom tretmanu (10 eksplantata po ponavljanju).

Potpuno formirani listovi (treći, četvrti i peti list od vrha izdanka), sakupljeni su i odmah zamrznuti u tečnom azotu, a potom čuvani na temperaturi -80 °C. Uzorci su korišćeni za ispitivanje ekspresije *StSOD* i *StHSP* gena.

### 3.5. Eksperiment uticaja temperature na rastenje i razviće biljaka i ekspresiju *StSOD* gena krompira sorte Désirée gajenog *ex vitro*

Efekat temperaturnih tretmana na rastenje i razviće ispitivan je u različitim vremenskim intervalima kod sorte Désirée. U eksperimentu su korišćene aklimatizovane biljke sorte Désirée poreklom iz kulture *in vitro*. Postupak aklimacije je obuhvatio pažljivo odvajanje biljaka sa MS podloge, ispiranje tekućom vodom radi potpunog uklanjanja ostataka hranljive podloge, a potom sadnju. Za sadnju biljnog materijala upotrebljena je smeša komercijalnog supstrata Potgrond H (Klasmann-Deilmann, Nemačka) i perlita Geoflor (Perlite Hellas S. A., Volos, Grčka) u odnosu 3:1

(v/v). Biljke su posađene u polipropilenske saksije (zapremine 2,4 l), sa po dve biljke u svakoj saksiji. Ukupan broj biljaka iznosio je 64. Nakon sadnje biljke su tretirane fungicidnim preparatom RidomilGold MZ 68 WG (Syngenta Crop Protection AG, Bazel, Švajcarska), potom su saksije pokrivene providnom perforiranom PVC folijom i prenete u komoru za gajenje biljaka Fitoclima PLH 1200 (Aralab, Rio de Mouro, Portugal). Posle 10 dana aklimacije je skinuta PVC folija sa saksija i biljke su narednih 15 nedelja nastavile da rastu u kontrolisanim uslovima: vlažnost vazduha 70%, 16h fotoperiod, bela fluorescentna svetlost gustine fluksa fotona  $170 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  i optimalan temperaturni režim za rast i tuberizaciju (20/17 °C, dan/noć). Nakon toga polovina biljnog materijala (32 biljke) je izložena toplotnom stresu 30/20 °C (dan/noć), a druga polovina (32 biljke) je i dalje gajena na optimalnom temperaturnom režimu 20/17 °C naredne tri nedelje. Efekat temperature na biljke krompira u uslovima *ex vitro* praćen je u četiri vremenske tačke: dan pre izlaganja toplotnom stresu (T0), nakon prvog dana (T1), posle sedmog dana (T2) i posle 21. dana toplotnog stresa (T3). Šematski prikaz eksperimenta predstavljen je na **Slici 16**.



**Slika 16.** Šematski prikaz eksperimenta uticaja toplotnog stresa na biljke krompira gajene *ex vitro*. T0-T3 vremenske tačke u kojima su mereni morfološki parametri i sakupljeni uzorci za dalju analizu.

Za ispitivanje ekspresije *StSOD* gena u različitim vremenskim tačkama i organima sorte Désirée, sakupljeni su sledeći biljni organi: listovi različite fiziološke starosti, stoloni (apikalni odsecci dužine 10-15 mm), krtole i korenovi. Analizirani su fiziološki mlađi listovi (treći i četvrti list od vrha izdanka) i fiziološki stariji listovi (sedmi i osmi list od vrha izdanka). Uzorci su odmah zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na temperaturi -80 °C.

### 3.6. Analiza ekspresije gena

#### 3.6.1. Izolacija RNK iz biljnog materijala krompira

Izolacija ukupnih RNK iz biljnog materijala krompira urađena je prema metodi Chomczynski i Sacchi (1987). U analizama je korišćen sledeći biljni materijal: listovi biljaka iz kulture *in vitro* (opisano u odeljcima 3.4.1. i 3.4.3.), listovi, stoloni, krtole i korenovi biljaka gajenih *ex vitro* (opisano u odeljku 3.5.). Odmereno je 300-400 mg biljnog materijala, koji je zatim mehanički usitnjen u tečnom azotu, u sterilisanim porcelanskim avanima i prebačen u sterine Falcon tube. Usitnjenom materijalu dodato je po 3 ml trizola (Invitrogen TRIzol Reagent, Thermo Fischer Scientific, Voltam, Masačusets, SAD). Nakon otapanja homogenat je inkubiran na sobnoj temperaturi 5 min., radi kompletne disocijacije nukleoproteinskih kompleksa, a potom centrifugiran (4 °C, 5 min., 300 x g), kako bi se uklonile nerastvorne komponente (ekstracelularne membrane, polisaharidi i DNK visoke molekulske mase). Dobijeni supernatant prebačen je u 3 sterilne mikrotube zapremine 2 ml, a zatim je u svaku mikrotubu dodato po 200  $\mu\text{l}$  rastvora hloroform-izoamil alkohola (24:1, v/v). Smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 5 min., a zatim centrifugirana (4 °C, 10 min., 12000 x g), radi razdvajanja faza. Nakon centrifugiranja, gornja faza, u kojoj je rastvorena RNK, prebačena je u nove sterilne mikrotube. Rastvorenoj RNK dodato je 250  $\mu\text{l}$  izopropanola i 250  $\mu\text{l}$  rastvora za precipitaciju RNK [0,4 M NaCl, 0,8 M natrijum citrat, 0,8 M HCl u dietilpirokarbonatom (DEPC) tretiranoj vodi]. Uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi 10 min., zatim centrifugirani (4 °C, 10 min., 12000 x g). Nakon centrifugiranja, supernatant je odbačen, a izolovana RNK ostala je na dnu mikrotuba u vidu



peleta. RNK pelet je zatim ispran sa 1 ml 70% etanola, pa centrifugiran (4 °C, 10 min., 7500 x g), nakon čega je etanol odbačen. RNK pelet u otvorenim mikrotubama sušen je u laminarnoj komori (do 10 min.), nakon čega je rastvoren u 40 µl vode tretirane DEPC-om. Tako rastvorena RNK čuvana je na -80 °C do daljeg korišćenja.

### 3.6.2. Određivanje kvantiteta i kvaliteta izolovane RNK

Koncentracija RNK je određena pomoću spektrofotometra NanoPhotometar N60 (Implen, Minhen, Nemačka). Izmerene su apsorbance na 260 nm ( $A_{260}$ , predstavlja maksimum apsorbance baza nukleinskih kiselina), i na 280 nm ( $A_{280}$ , apsorbance aromatičnih aminokiselina proteina). Čistoća RNK određena je na osnovu odnosa apsorbanci  $A_{260}/A_{280}$ , pri čemu se za čiste izolate ovaj odnos kreće u intervalu 1,8-2,1. Integritet RNK procenjen je elektroforetskim razdvajanjem 1 µg RNK na 1,5% agaroznom gelu, sa dodatkom SYBR safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific-Invitrogen, Voltam, Masačusets, SAD) pri voltaži od 80V/40 min. Elektroforeza je urađena na aparatu za horizontalnu elektroforezu Mini-Sub<sup>®</sup> Cell GT Cell (Bio-Rad Laboratories, Herkjuliz, Kalifornija, SAD), a potom su gelovi fotografisani na transiluminatoru iBright<sup>™</sup> FL1500 Imaging Systems (Thermo Fisher Scientific-Invitrogen, Voltam, Masačusets, SAD).

### 3.6.3. Tretman dezoksiribonukleazom (DNK-azom)

Uzorci RNK su tretirani DNKazom I (Dnase I, Thermo Scientific, Voltam, Masačusets, SAD), kako bi se uklonila eventualno zaostala DNK. Sastav reakcione smeše dat je u **Tabeli 3**. Tretman je trajao 30 min. na temperaturi od 37 °C, a zatim je enzimska reakcija zaustavljena dodavanjem 1 µl 50 mM EDTA u reakcionu smešu i inkubacijom 65 °C/10 min. Za tretman DNK-azom korišćena je PCR mašina 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija, SAD).

**Tabela 3.** Sastav pojedinačne reakcione smeše za tretman DNKazom I

Komponente	µl
RNK uzorak (2 µg) u vodi	6,75
10 x reakcioni pufer sa MgCl <sub>2</sub>	1
DNKaza I (1 U µl <sup>-1</sup> )	2
Inhibitor RNKaze RiboLock RI (40 U µl <sup>-1</sup> )	0,25
Ukupno	10

### 3.6.4. Reverzna transkripcija

Za reakciju reverzne transkripcije (RT), prevođenje RNK u komplementarne jednolančane molekule DNK (cDNK), korišćen je Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Voltam, Masačusets). Sastav reakcione smeše, ukupne zapremine 10 µl, je prikazan u **Tabeli 4**. RT reakcija se odvijala u PCR mašini 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija, SAD) u 3 koraka: 25 °C/5 min., 42 °C/60 min. i 70 °C/5 min.

**Tabela 4.** Sastav pojedinačne reakcione smeše za RT-PCR

Komponente	$\mu\text{l}$
RNK iz prethodnog koraka (2 $\mu\text{g}$ )	11
Random heksameri-prajmeri (50 $\mu\text{M}$ )	1
5 x reakcioni pufer	4
Inhibitor RNKaze RiboLock RI (20 U $\mu\text{l}^{-1}$ )	1
dNTP miks (10 mM)	2
Reverzna transkriptaza (200 U $\mu\text{l}^{-1}$ )	1
Ukupno	20

### 3.6.5. Reakcija lančanog umnožavanja (PCR)

Dobijena cDNK je umnožavana PCR reakcijom korišćenjem gen-specifičnih prajmera.

Prajmeri za amplifikaciju *StSOD* transkripata kreirani su pomoću programa Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), dok su prajmeri za *StCuZnSOD2* preuzeti iz rada Tiwari i sar. (2020). Korišćeni prajmeri prikazani su u **Tabeli 5**.

**Tabela 5.** Sekvence prajmera za amplifikaciju *StSOD* transkripata. *f*-forward, *r*-reverse.

Naziv gena	Pristupni broj	Sekvenca prajmera (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)
<i>StCuZnSOD1</i>	Soltu.DM.01G022650	<i>f</i> : TAACAGCAGTGAAGGTGTTTGTG	59,6
		<i>r</i> : TTGTAATGTGGTCCTGTTGACAC	59,1
<i>StCuZnSOD2</i>	Soltu.DM.11G020830	<i>f</i> : TATGTCTACAGGAGCCCATTTC	57,3
		<i>r</i> : GGCATTGGCCACTATGTTTC	57,4
<i>StCuZnSOD3</i>	Soltu.DM.03G010200	<i>f</i> : CAATCCAACGGTGGTACCCAT	60,3
		<i>r</i> : TGAAATTGATATCTCCGCCACCC	60,2
<i>StMnSOD</i>	Soltu.DM.06G011380	<i>f</i> : AATTCAACGGCGGAGGTCAT	60,0
		<i>r</i> : TTTCAACCACCAGGCGCTTA	60,2
<i>StFeSOD1</i>	Soltu.DM.06G012180	<i>f</i> : TGTACACTTTTGAGGGAGAATGA	57,4
		<i>r</i> : GTCCTTGTACATTGTTATTCCACA	57,2
<i>StFeSOD2</i>	Soltu.DM.03G013800	<i>f</i> : CAAAGCAGCCAAATTCAGCAC	59,2
		<i>r</i> : TTCCTCGCTAACTGTTTCTTGTG	59,2
<i>StFeSOD3</i>	Soltu.DM.02G001300	<i>f</i> : CCACCTTATAAGCTCGATGCACT	60,5
		<i>r</i> : TACCTGGGCAGCATCAGAGA	60,3
<i>StFeSOD4</i>	Soltu.DM.06G012170	<i>f</i> : TGGGAGTTACATACTTGAGGCA	58,8
		<i>r</i> : AGAAAATCACCTGTCACTCTTGC	59,2

Prajmeri za amplifikaciju *StHSP* transkripata dizajnirani su pomoću programa Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) i prikazani su u **Tabeli 6**.

**Tabela 6.** Sekvence prajmera za amplifikaciju *StHSP* transkripata. *f*-forward, *r*-reverse.

Naziv gena	Pristupni broj	Sekvenca prajmera (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)
<i>StHSP17.6</i>	PGSC0003DMG400030426	<i>f</i> : TCATGTGTTCAAGGCCGATCT	59,7
	PGSC0003DMG400030339	<i>r</i> : TCCACGCGATGCCACTTAT	59,5
	PGSC0003DMG400030340		
<i>StHSP21</i>	PGSC0003DMG400003219	<i>f</i> : ACGCACTCCTTGGGACATTC	60,3
		<i>r</i> : CGGGAGACTTAAACGAGTGTCAT	60,4
<i>StHSP23.9</i>	PGSC0003DMG400004808	<i>f</i> : CAATTAGAAGCGTGAGCCAGC	59,9
		<i>r</i> : CAGAGCGTTATCGTCCTCCT	59,0
<i>StHSP70-2</i>	PGSC0003DMG400027611	<i>f</i> : AGGCAATCGGTGGTGAATCC	59,9
		<i>r</i> : TTTCTCAAGACCTGAGCCGAA	60,2

Sve PCR reakcije zapremine 20 µl postavljene su prema protokolu za Dream Taq Hot Start Green PCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD). Sastav reakcione smeše prikazan je u **Tabeli 7**.

**Tabela 7.** Sastav reakcione smeše pojedinačne PCR reakcije.

Komponente	µl
cDNK iz prethodnog koraka (50 ng)	0,5
Prajmer F + R (7,5 µM)	1
Dream Taq Hot Start Green Master Mix (2x)	10
PCR voda	8,5
Ukupno	20

Program za PCR umnožavanje uključivao je: inicijalnu denaturaciju (95 °C/3 min.), zatim po 40 ciklusa denaturacije (95 °C/30 s), vezivanja prajmera (60 °C/30 s) i elongacije (72 °C/1 min.), nakon čega je sledila finalna elongacija (72 °C/10 min.) i hlađenje do + 4 °C. Za PCR amplifikaciju korišćen je aparat 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija, SAD).

Veličina amplikona proverena je nakon elektroforeze, koja je rađena na aparatu za horizontalnu elektroforezu Mini-Sub<sup>®</sup> Cell GT Cell (Bio-Rad Laboratories, Herkujuliz, Kalifornija, SAD). Po završetku PCR reakcije, uzorci i DNK marker GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Fermentas, Voltam, Masačusets) su naneti na 2% agarozni gel, koji je nakon elektroforeze slikan na transiluminatoru iBright<sup>™</sup> FL1500 Imaging Systems (Thermo Fisher Scientific-Invitrogen, Voltam, Masačusets, SAD). Dužina svakog fragmenta određena je softverski (iBright Analysis Software v1.6.0).

### 3.6.6. Određivanje nivoa ekspresije gena metodom kvantitativnog PCR (qRT-PCR)

Nivo ekspresije analiziranih gena određivan je metodom qRT-PCR, korišćenjem reakcione smeše Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD) i aparata Applied Biosystems QuantStudio<sup>™</sup> 3 Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD). Reakcione smeše, ukupne zapremine 10 µl, sadržale su po 1 µl odgovarajuće cDNK, koja je dobijena nakon reverzne transkripcije. Sastav reakcione smeše je prikazan u **Tabeli 8**. Svi uzorci su nanesti na ploču u triplicatima.

**Tabela 8.** Sastav reakcione smeše pojedinačne qRT-PCR reakcije.

Komponente	$\mu\text{l}$
cDNK (100 ng)	1
Prajmer F + R (7,5 $\mu\text{M}$ )	0,4
SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2x)	5
PCR voda	3,6
Ukupno	10

Kao endogene kontrole (geni sa konstitutivnom ekspresijom) korišćeni su *60SL36* i *CYC*, a prajmeri koji su korišćeni za amplifikaciju *60SL36* i *CYC* transkripata prikazani su u **Tabeli 9**.

**Tabela 9.** Sekvence prajmera za amplifikaciju *60SL36* i *CYC* transkripata. *f*-forward, *r*-reverse.

Naziv gena	Pristupni broj	Sekvenca prajmera (5' → 3')	Tm (°C)
<i>60SL36</i>	PGSC0003DMT400000483	<i>f</i> : GGGAAGTAGCTGGTTTTGCAC	59,7
		<i>r</i> : TCCAGTAGCCCTCATTTTACGG	59,8
<i>CYC</i>	AF126551.1	<i>f</i> : CTCTTCGCCGATACCACTCC	60,0
		<i>r</i> : TCACACGGTGGAAGGTTGAG	59,9

Program za qRT-PCR analizu sastojao se iz inicijalne denaturacije (95 °C/10 min.), 40 ciklusa denaturacije (95 °C/15 s), 40 ciklusa vezivanja prajmera/elongacije (60 °C/1 min.) i analize krive topljenja.

Relativna ekspresija *StSOD* i *StHSP* gena određena je  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  metodom (Livak i Schmittgen, 2001), prema kojoj su Ct vrednosti za gene od interesa normalizovane prema Ct vrednostima kontrolnih gena (*60SL36* i *CYC*) i kalibratora. Apsolutne vrednosti ekspresije *StSOD* gena normalizovane su prema aritmetičkoj sredini faktora normalizacije dobijenih na osnovu podataka o apsolutnoj ekspresiji svakog kontrolnog gena pojedinačno, *60SL36* i *CYC* (Klatte i Bauer, 2009).

### 3.6.6.1. Priprema standarda za apsolutnu kvantifikaciju PCR produkata

Apsolutna kvantifikacija PCR produkata ispitivanih gena dobijena je na osnovu serije razblaženja cDNK poznatih koncentracija ( $10^9$ - $10^2$  kopija DNK/1  $\mu\text{l}$ ). Standardi za qRT-PCR pripremljeni su tako što je cDNK umnožena u PCR reakciji, korišćenjem aparata 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija, SAD), a potom razdvojena elektroforetski na 1,5 % agaroznom gelu, na aparatu za horizontalnu elektroforezu Mini-Sub<sup>®</sup> Cell GT Cell (Bio-Rad Laboratories, Herkjuliz, Kalifornija, SAD). Trake na gelu detektovane su pomoću transiluminatora iBright<sup>™</sup> FL1500 Imaging Systems (Thermo Fisher Scientific-Invitrogen, Voltam, Masačusets, SAD). Ekstrakcija sa gela i prečišćavanje PCR produkata urađeni su pomoću GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD) prema sledećoj proceduri: isecanje traka iz gela i prebacivanje u sterilne mikrotube, dodavanje vezujućeg pufera (eng. *Binding buffer*) u odnosu 1:1 (m/v), inkubacija u vodenom kupatilu (60 °C) do rastvaranja gela, dodavanje 100% izopropanola u odnosu 1:2 (v/v), vorteksovanje sadržaja u mikrotubama (5 s), nanošenje uzoraka na kolone za prečišćavanje (eng. *Purification column*), centrifugiranje (60 s, 10000 x g), odbacivanje filtrata, dodavanje na vrh kolone po 700  $\mu\text{l}$  pufera za ispiranje (eng. *Wash buffer*), centrifugiranje (60 s, 10000 x g), odbacivanje filtrata, ponovno centrifugiranje (60 s, 10000 x g), prebacivanje filter kolona u nove sterilne mikrotube, dodavanje po 50  $\mu\text{l}$  elucionog pufera (eng. *Elution buffer*) i centrifugiranje (60 s, 10000 x g).

Koncentracija prečišćenih PCR produkata ispitivanih gena određena je spektrofotometrijski na aparatu NanoPhotometar N60 (Implen, Minhen, Nemačka). Podaci o broju DNK kopija u PCR produktima dobijeni su u programu EndMemo (<http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php>). Na osnovu datih podataka pripremljene su serije razblaženja ( $10^9$ - $10^2$  kopija dsDNK/1  $\mu$ l) za svaki genski transkript. Dobijena razblaženja korišćena su kao standardi u qRT-PCR analizama.

### 3.7. Statistička analiza rezultata

Za analizu morfoloških parametara biljaka gajenih *in vitro* korišćen je program STATISTICA 10 (StatSoft, Inc., 1984–2011, Tulsa, OK, SAD). Sprovedena je trofaktorijska analiza varijanse sa faktorima: temperatura, SA i sorta, nakon čega su podaci eksperimentalnog istraživanja podvrgnuti *post-hoc* analizi Njuman-Kelovim (Newman-Keul's) testom za utvrđivanje homogenih grupa na nivou značajnosti  $p < 0,05$ .

Statistička analiza podataka dobijenih qRT-PCR metodom urađena je pomoću programa IBM SPSS Statistics for Macintosh v. 25 (IBM, Armark, Njujork, SAD). Lavinov (Levene's) test je korišćen za testiranje homogenosti varijanse skupa eksperimentalnih podataka dobijenih qRT-PCR analizama. Jednofaktorijska analiza varijanse urađena je radi višestrukog poređenja srednjih vrednosti, nakon čega je vršena *post-hoc* analiza Tukijevim (Tukey's) HSD (u slučaju homogene varijanse) ili Danetovim (Dunnett's) T3 (u slučaju nehomogene varijanse) testom radi definisanja homogenih grupa srednjih vrednosti na nivou značajnosti od 0,05.

## 4. REZULTATI

### 4.1. *In silico* analiza *SOD* familije gena i *SOD* proteina krompira

Podaci o proučavanju *StSOD* gena preuzeti su iz Spud DB baze podataka genoma duplog monoploidnog klon krompira iz grupe Phureja DM 1-3 516 R44 (v6.1). *In silico* analiza *StSOD* gena obuhvatila je: identifikaciju CRE u promotorima, pretragu TF koji se mogu vezati za specifične motive u promotorima i određivanje egzon-intron strukture transkripata. *In silico* analiza *StSOD* proteina obuhvatila je: fizičko-hemijsku karakterizaciju *StSOD*, identifikaciju *SOD* domena, predikcije prisustva N-terminalnog signala i subćelijske lokalizacije proteina, određivanje terciarne strukture proteina, kao i utvrđivanje filogenetskih odnosa između *StSOD* i *SOD* drugih biljnih vrsta.

#### 4.1.1. *StSOD* geni: struktura i pozicija na hromozomima

Pretragom Spud DB DM v6.1 baze podataka, pronađeno je jedanaest potencijalnih nukleotidnih sekvenci *SOD* gena krompira. Dve sekvence gena, Soltu.DM.10G011570 i Soltu.DM.06G013120, isključene su iz daljih analiza, jer je utvrđeno da ne kodiraju funkcionalne *StSOD* proteine potpune dužine, već ~100 aminokiselina duge polipeptide koji imaju sličnosti sa sekvencama *StSOD*. Izvedena aminokiselinska sekvenca Soltu.DM.06G013120.1 je u Spud DB označena kao potencijalna MnSOD sekvenca i ustanovljeno je da sadrži samo C-terminalni Gvožđe/Mangan *SOD* domen (PF02777). Aminokiselinska sekvenca Soltu.DM.10G011570.1 je u Spud DB označena kao potencijalna FeSOD sekvenca, ali nije ustanovljeno da sadrži karakteristične *SOD* domene. Na **Slici 17**, je prikazano poređenje izvedenih aminokiselinskih sekvenci *StMn-FeSOD* sa nepotpunim aminokiselinskim sekvencama.

```

Soltu.DM.06G011380.1 .....MALR TLVSRRTLAAGLGRFRQQLRGVQT.FSTIPDLPLYD
Soltu.DM.06G012180.3 .MAATASANSLTSAFLPPQGLNGSSKSLQWRTQKLQKQFGRKSDSATITAKFDLNSPPYP
Soltu.DM.03G013800.4 MMAAAIASVTLFSPFLPSPGFHESCLSLNWRHKKQLARKAGPVKVTAKFELNPPYP
Soltu.DM.06G012170.4 .....MEAGFHAKIELQPPYP
Soltu.DM.02G001300.1 .....MSWCCCNRLSTSSSVTSDLWRQFNVP CRISNVGLRQKR.SVSAAYGLKTPPYK
Soltu.DM.06G013120.1 .....
Soltu.DM.10G011570.1 .....
consensus>50 .....v.a.f.l..ppy.

Soltu.DM.06G011380.1 Y.....GALEPAISGDIMQLHHQKHHQTYYITNYNKALE..Q
Soltu.DM.06G012180.3 M.....DALEPHMSRRTTFEYHWGKHHRAYVDNLNKQIEGTE
Soltu.DM.03G013800.4 MFVLEFTTLGPRVFRKEPLYLREVVNALEPHMSRRTTFEYHWGKHHRAYVDNLNKQIVGTE
Soltu.DM.06G012170.4 M.....DALEPHMSRRTLEIHWGKHHRAYVDNLNKQIDGTE
Soltu.DM.02G001300.1 L.....DALEPYMSQSMVEIHWGDHHRGYVESLNKQIEKND
Soltu.DM.06G013120.1 .....
Soltu.DM.10G011570.1 .....MEYINTGNLLR...KERKRIFKVDKSEDKKLA
consensus>50 m.....dalep.ms.....e.hwgkhhrr.yvndlnkqie...e

Soltu.DM.06G011380.1 LHD AISKGDAPT VAKLHSAI..K FNGGGHI..NHSIFWNNLAPVSEGGGEP..KSSLGWA I
Soltu.DM.06G012180.3 L.DGKTLEDI IILVTYNGGAPLPAFNNAQA WNHQFFWESMKP...NGGGEPP..SGELLE I
Soltu.DM.03G013800.4 L.DELTLEDI IILITYNQGNLPPFNNAQA WNHQFFWESMKP...GGGGEPP..SGELLE I
Soltu.DM.06G012170.4 L.HGKTLKDI ILLITYNNGSPLPFNNAQA WNHQFFWESMKP...NGGGEPP..SGELLE I
Soltu.DM.02G001300.1 IFYGCIMDELIKLTYNNGNPLPEFSDAAQVWNHDFWESMKP...GGGDIP..KGLLQ I
Soltu.DM.06G013120.1 .....MINRPTLCLLFPANEEAGGEP LKSSLGWA I
Soltu.DM.10G011570.1 LVEPTNAENPLVLSYTCSYCILKPLLAECNNSWYIWGENPLIDWFNDSEI VDDLV I
consensus>50 l.d..tled...vtyn.g..lp.fnnaaq.wnhqffwesm.P...gggepp..gell..I

```

Nastavak **Slike 17**, na strani 44.

```

      130      140      150      160      170
Soltu.DM.06G011380.1 DT.NFGSLEALVKKMN AEGAA LQGSGWVWLGVDK.....ELKRLVVETTA
Soltu.DM.06G012180.3 NR.DFGSYDTFVKFK AAAAATQFGSGWAWLAYKP.....EDKRLALVKTLP
Soltu.DM.03G013800.4 NR.DFGSFEAFVKFK AAAAATQFGSGWAWLAYKANRLDVGNASNPHPSD EDKRLVIVKTLP
Soltu.DM.06G012170.4 NR.DFGSYDTFVKFK AAAAATQFGSGWAWLAYKP.....EDKRLALVKTLP
Soltu.DM.02G001300.1 DK.DFGSFTIFKDKF IEAALT LFGSGWVWLVLSR.....EKKRLAIKITS
Soltu.DM.06G013120.1 ETYNFGSLKTLVKKMN AEGAA LQGGRSHFLFL.....RLCWSAYVPAN
Soltu.DM.10G011570.1 GS.TPGVVRVTWPQFI FA.....L.....L.....L.....L.....L.....
consensus>50
n..dfGsyetfvkfkf.aaaat.fgsgw.wl.....edk.la.vkt.

      180      190      200      210      220
Soltu.DM.06G011380.1 N.QDPLVSKGANLV PLLGIDVWE HAYYLQYKKNVVRP DY LKNIW.KVITWKYANDVYENEC
Soltu.DM.06G012180.3 NAENPLV...LGYT PLLTIDVWE HAYYLDFFNRRRP DY ISIFMEKLVSWEAVNSRLKAAAT
Soltu.DM.03G013800.4 NAVNPLV...WDYS PLLTIDVWE HAYYLDFFNRRRP DY ISIFMEKLVSWEAVSSRLEAAQ
Soltu.DM.06G012170.4 NAENPLV...LGYTSFPETYLNS LNSTTSFACRIADLITYLSLWRNSYHGKQSVLGSKQ
Soltu.DM.02G001300.1 NAVNPLV...WNDI PLIGLDLWE HAYYLDYKKNDKANY VNVFMNHLVSWDAAALGRMARAQ
Soltu.DM.06G013120.1 QAQD...CNLV PLLGIDVWE HYYLQMI.....L.....L.....L.....L.....L.....
Soltu.DM.10G011570.1 .....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....
consensus>50
naqnplv...n..pll.idvwe.hayyldf.n...dy.....vsw.....l....

Soltu.DM.06G011380.1 P.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....
Soltu.DM.06G012180.3 AP.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....
Soltu.DM.03G013800.4 AQAAREKEEERKKREEEYQAGNEIREMYVETTDSEAD
Soltu.DM.06G012170.4 QQLELLSRKTERMKRQI.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....
Soltu.DM.02G001300.1 AFVNLGEPKIPVA.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....
Soltu.DM.06G013120.1 .....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....
Soltu.DM.10G011570.1 .....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....
consensus>50
.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....L.....

```

**Slika 17.** Poravnanje izvedenih aminokiselinskih sekvenci StMn-FeSOD. Nepotpune aminokiselinske sekvence su označene ljubičastom bojom. Identični regioni su zasenčeni crvenom bojom, a slični regioni su uokvireni.

Pored navedenih, u Spud DB DM v6.1 bazi podataka pronađena je i nukleotidna sekvenca gena za bakar-šaperon (Soltu.DM.08G026370), koja kodira protein u čijoj strukturi se nalazi Bakar/Cink SOD domen (SODC) (Pfam: PF00080). S obzirom da u aktivnom mestu ovog proteina nedostaju aminokiselinski ostaci od krucijalog značaja za superoksid-dismutaznu aktivnost, takav protein nije okarakterisan kao StCuZnSOD, a nukleotidna sekvenca gena koja ga kodira nije dalje analizirana. Na **Slici 18.** prikazano je poređenje izvedenih aminokiselinskih sekvenci StCuZnSOD sa sekvencom bakar-šaperona.

```

Soltu.DM.01G022650.1 .....
Soltu.DM.03G010200.1 .....
Soltu.DM.11G020830.1 .....
Soltu.DM.08G026370.1 MAFLRSIVTAKTTAIAAAIPAAAFVSSISSSSSQFERPSKNLKFGSISSSNPILQLSFA
consensus>50

Soltu.DM.01G022650.1 .....
Soltu.DM.03G010200.1 .....
Soltu.DM.11G020830.1 .....
Soltu.DM.08G026370.1 KNLQKTSPPSALHMETPSSNHQTSSDNGVVLPPELLTEFMVDMSCQGCVNAAVAKSKLQIVVEG
consensus>50

Soltu.DM.01G022650.1 .....
Soltu.DM.03G010200.1 .....
Soltu.DM.11G020830.1 .....
Soltu.DM.08G026370.1 FLYPISSSSPNINSSFHGVSILNVKSNFRQSLTLYAVNTPKPLTVFAATKRAVAVLKGNNSN
consensus>50

Soltu.DM.01G022650.1 .....
Soltu.DM.03G010200.1 .....
Soltu.DM.11G020830.1 .....
Soltu.DM.08G026370.1 VSGTTLFTODGDAPTTVNGNISGLKPCTHGFHVAHAGDITNGCMSTGPHYNPAGKEHGAP
consensus>50

Soltu.DM.01G022650.1 .....
Soltu.DM.03G010200.1 .....
Soltu.DM.11G020830.1 .....
Soltu.DM.08G026370.1 EDEVRHGDLGNITVGEDGTA SFTITDQQIPLTGSQSIIGRAVVVHADPDDLGGKGGHELSS
consensus>50

Soltu.DM.01G022650.1 .....
Soltu.DM.03G010200.1 .....
Soltu.DM.11G020830.1 .....
Soltu.DM.08G026370.1 KSTGNAGGRIACGIIGLQG.....
consensus>50

```

**Slika 18.** Poravnanje izvedenih aminokiselinskih sekvenci StCuZnSOD (Soltu.DM.01G022650.1, Soltu.DM.03G010200.1 i Soltu.DM.11G020830.1) sa Soltu.DM.08G026370.1 aminokiselinskom sekvencom bakar-šaperona (označena ljubičastom bojom). Identični regioni su zasenčeni crvenom bojom, slični regioni su uokvireni, a zelenom bojom su zasenčene aminokiseline značajne za SOD aktivnost.

Preostalih osam *StSOD* gena kodiraju StSOD proteine pune dužine, od kojih tri kodiraju StCuZnSOD, jedan StMnSOD i četiri StFeSOD (**Tabela 10.**). *StSOD* geni raspoređeni su na pet od 12 hromozoma (hr.), pri čemu se najviše gena nalazi na hr.06 (*StMnSOD*, *StFeSOD1* i *StFeSOD4*), dva gena su na hr.03 (*StCuZnSOD3* i *StFeSOD2*), dok se po jedan *StSOD* gen nalazi na hr.01 (*StCuZnSOD1*), hr.02 (*StFeSOD3*) i hr.11 (*StCuZnSOD2*).

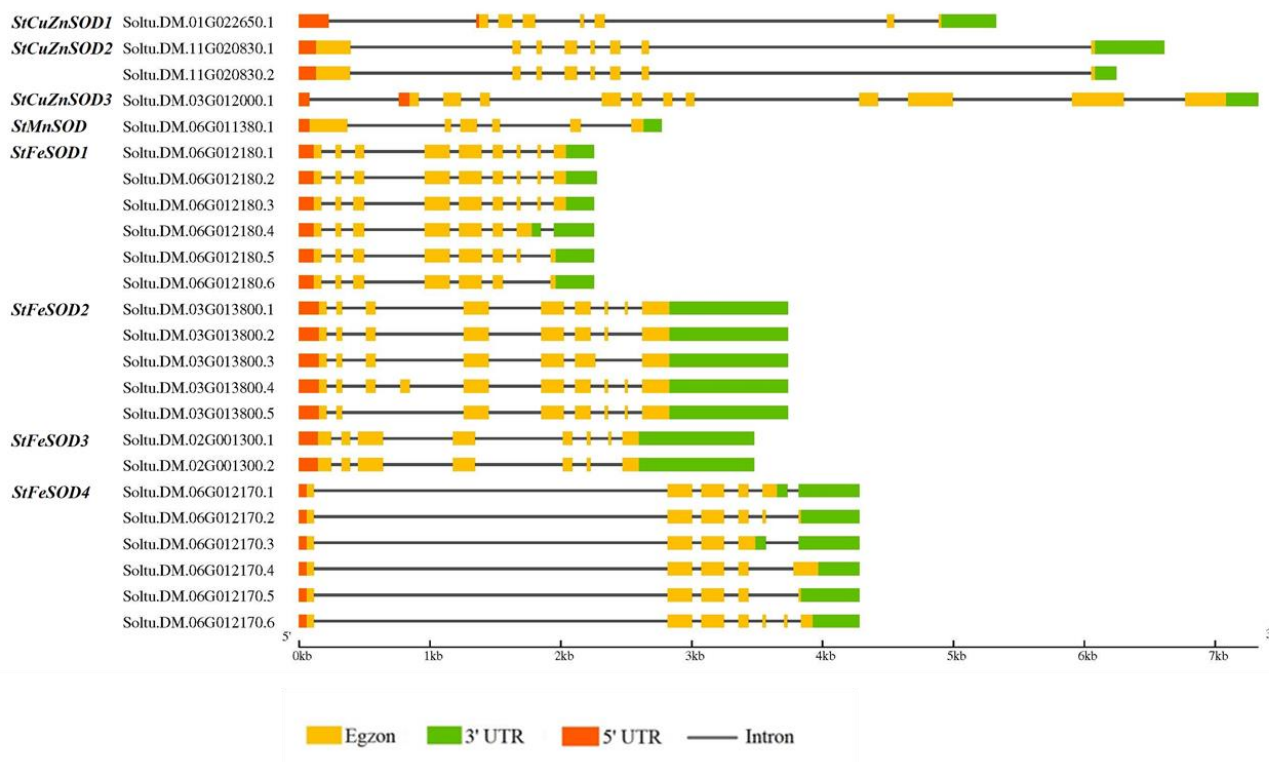


**Tabela 10.** Karakteristike *StSOD* gena i njihovih produkata.

Naziv gena	Pristupni broj gena	Pozicija na hromozomu	Pristupni broj transkripta	Veličina transkripta (bp)	Veličina proteina (ak)	Izoelektrična tačka (pI)	Indeks nestabilnosti	Alifatični indeks	Molekulska težina (kDa)
<i>StCuZnSOD1</i>	Soltu.DM.01G022650	hr.01: 61,097,981-61,103,305	Soltu.DM.01G022650.1*	459	152	5.28	32.24	80.20	15.3
<i>StCuZnSOD2</i>	Soltu.DM.11G020830	hr.11: 40,784,322-40,790,930	Soltu.DM.11G020830.1*	648	215	6.34	24.76	87.95	22.1
		hr.11: 40,784,322-40,790,564	Soltu.DM.11G020830.2	645	214	6.34	24.25	88.36	22.1
<i>StCuZnSOD3</i>	Soltu.DM.03G010200	hr.03: 28,151,770-28,156,700	Soltu.DM.03G010200.1*	498	165	6.78	18.64	88.61	16.8
<i>StMnSOD</i>	Soltu.DM.06G011380	hr.06: 34,521,324-34,524,092	Soltu.DM.06G011380.1*	687	228	7.13	35.60	91.14	25.3
<i>StFeSOD1</i>	Soltu.DM.06G012180	hr.06: 36,014,174-36,016,425	Soltu.DM.06G012180.1	747	248	6.31	33.40	70.56	27.8
		hr.06: 36,014,151-36,016,425	Soltu.DM.06G012180.2	753	250	6.60	33.86	70.00	28.1
		hr.06: 36,014,174-36,016,425	Soltu.DM.06G012180.3*	759	252	6.60	34.62	70.99	28.3
		hr.06: 36,014,174-36,016,425	Soltu.DM.06G012180.4	729	242	7.77	35.05	75.08	26.9
		hr.06: 36,014,174-36,016,425	Soltu.DM.06G012180.5	681	226	5.96	35.28	74.38	25.1
		hr.06: 36,014,174-36,016,425	Soltu.DM.06G012180.6	654	217	6.52	35.44	70.74	24.1
<i>StFeSOD2</i>	Soltu.DM.03G013800	hr.03: 36,413,200-36,416,935	Soltu.DM.03G013800.1	915	304	5.56	41.47	73.26	34.7
		hr.03: 36,413,200-36,416,935	Soltu.DM.03G013800.2	891	296	5.49	41.99	73.58	33.7
		hr.03: 36,413,200-36,416,935	Soltu.DM.03G013800.3	897	298	5.83	40.95	72.11	33.8
		hr.03: 36,413,200-36,416,935	Soltu.DM.03G013800.4*	987	328	5.69	40.11	76.19	37.6
		hr.03: 36,413,200-36,416,935	Soltu.DM.03G013800.5	840	279	5.20	42.01	73.87	31.9
<i>StFeSOD3</i>	Soltu.DM.02G001300	hr.02: 7,378,597-7,382,073	Soltu.DM.02G001300.1*	777	258	6.07	42.61	85.04	29.6
		hr.02: 7,378,597-7,382,073	Soltu.DM.02G001300.2	753	250	5.96	43.46	85.80	28.5
<i>StFeSOD4</i>	Soltu.DM.06G012170	hr.06: 36,008,330-36,012,608	Soltu.DM.06G012170.1	603	200	5.58	31.53	82.00	22.5
		hr.06: 36,008,330-36,012,608	Soltu.DM.06G012170.2	540	179	5.81	33.93	78.60	20.2
		hr.06: 36,008,330-36,012,608	Soltu.DM.06G012170.3	549	182	6.29	30.48	76.26	20.4
		hr.06: 36,008,330-36,012,608	Soltu.DM.06G012170.4*	684	227	7.85	39.93	73.17	25.6
		hr.06: 36,008,330-36,012,608	Soltu.DM.06G012170.5	513	170	6.12	35.64	74.18	19.1
		hr.06: 36,008,330-36,012,608	Soltu.DM.06G012170.6	633	210	5.89	31.93	77.71	23.8

Napomena: \* označavaju reprezentativne transkripte prema Spud DB DM v6.1 bazi podataka; bp, bazni parovi; ak, aminokiseline; kDa, kilo Dalton.

Zapaženo je da se analizirani *StSOD* geni razlikuju po broju transkripata, te tako *StCuZnSOD1*, *StCuZnSOD3* i *StMnSOD* geni imaju po jedan transkript, dok ostali geni imaju veći broj alternativnih transkripata: dva (*StCuZnSOD2* i *StFeSOD3*), pet (*StFeSOD2*) i šest transkripata (*StFeSOD1* i *StFeSOD4*). Poređenjem egzon-intron strukture datih transkripata *StSOD* gena (Slika 19.), ustanovljeno je da transkripti *StSOD* gena sadrže 4-9 introna i 5-10 egzona. Osim u broju, transkripti se razlikuju i u dužini egzona i introna, kao i u dužini 5' i 3'UTR. Uočeno je da kod transkripata *StFeSOD1* i *StFeSOD2* gena postoji sličan obrazac egzon-intron organizacije, što nije slučaj između transkripata ostalih *StSOD* gena.



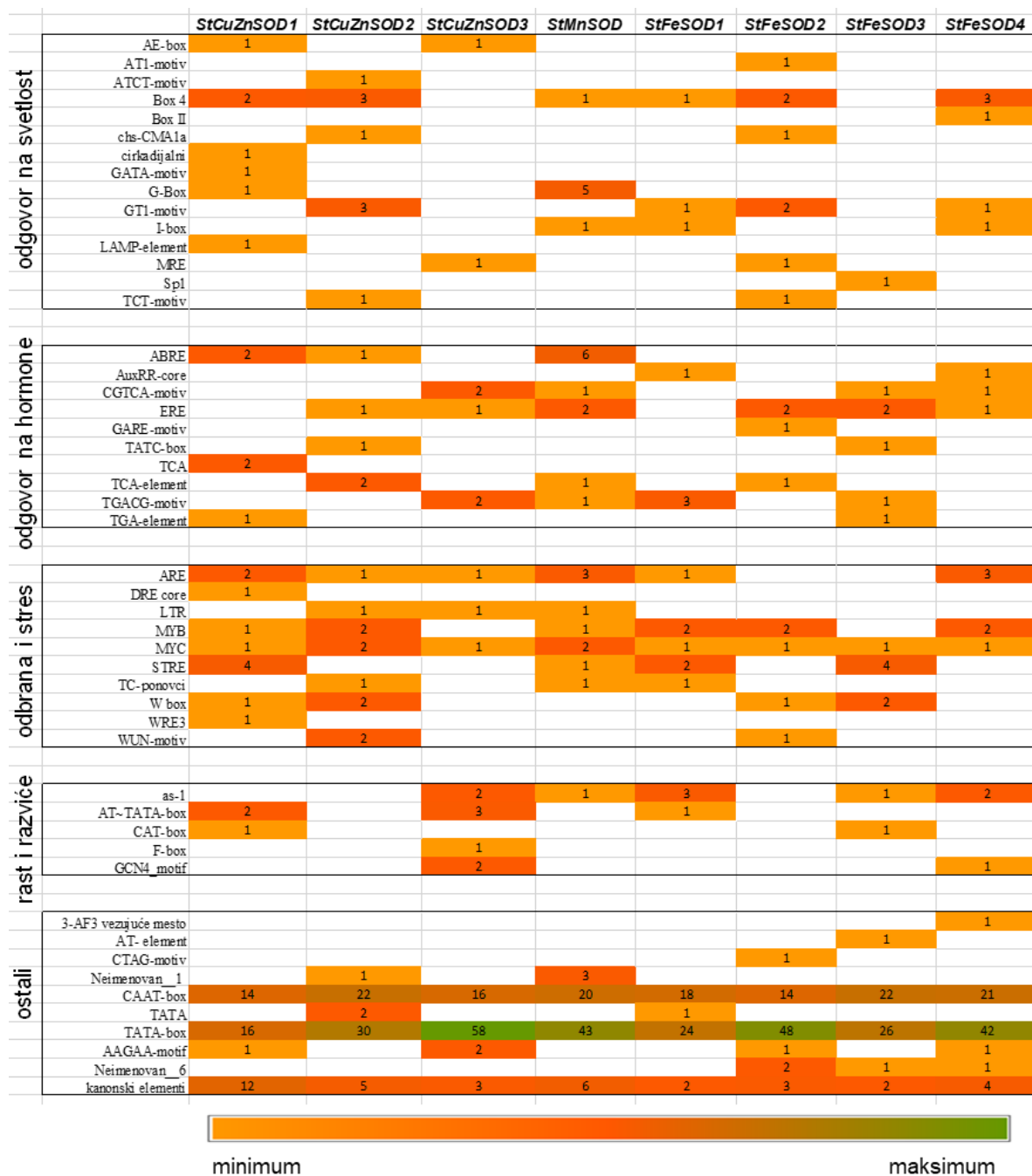
**Slika 19.** Egzon-intron struktura *StSOD* transkripata. Egzoni su predstavljeni žutom bojom, 5'UTR narandžastom, 3'UTR zelenom bojom, a introni su prikazani linijama. Za prikazivanje egzon-intron strukture transkripata *StSOD* korišćen je veb-server GSDS (Hu i sar., 2015).

#### 4.1.2. Analiza promotorskih regiona *StSOD* gena

Analiza promotorskih regiona *StSOD* gena urađena je radi identifikacije CRE, koji su značajni za regulaciju transkripcije datih gena delujući u blizini ili u okviru samog gena. Pored toga, identifikovani su i TF iz različitih familija sa potencijalnim mestima vezivanja u promotorskim regionima *StSOD* gena.

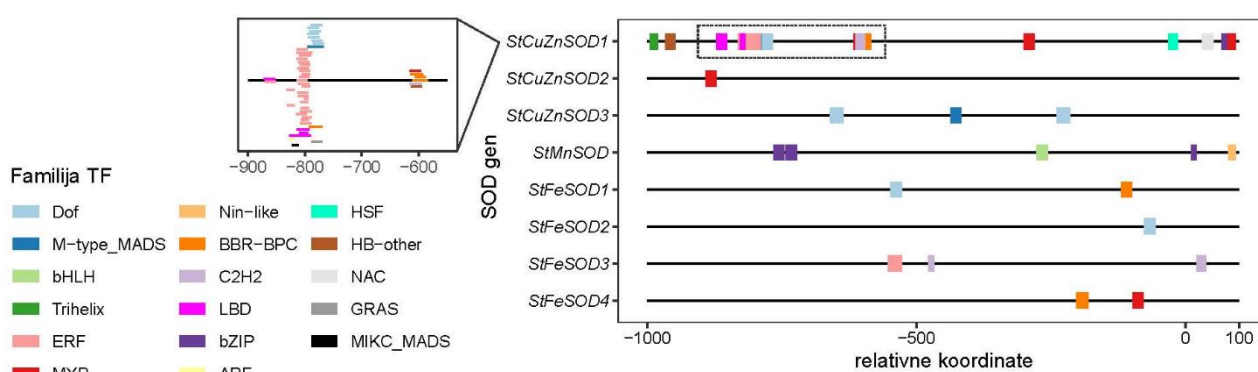
Korišćenjem veb-alata PlantCARE identifikovani su različiti CRE, koji su grupisani na osnovu uloge u odgovoru biljaka na različite stimuluse i predstavljeni su toplotnom mapom (eng. *heat map*) (Slika 20.). Među CRE, koji su uključeni u odgovor biljaka na faktore stresa, uočeno je da su oni koji su uključeni u odgovor na nisku temperaturu (LTR, STRE i MYC) prisutni u svim analiziranim promotorima *StSOD* gena. U promotorima većeg broja gena (*StCuZnSOD1-3*, *StMnSOD*, *StFeSOD1* i *StFeSOD4*), identifikovani su CRE uključeni u anaerobnu indukciju (ARE). Takođe, u promotorima većine gena (*StCuZnSOD1-2*, *StMnSOD*, *StFeSOD1-2* i *StFeSOD4*), identifikovani su CRE uključeni u vezivanje MYB TF. Osim navedenih, identifikovani su CRE uključeni u odgovor na biljne hormone: ABA (ABRE), metil-jasmonat (CGTCA- i TGACG-motiv),

GA (TATC-box i GARE-motiv), SA (TCA i TCA-element), auksine-AUX (TGA-element i AuxRR-core) i etilen (ERE). Najzastupljeniji su CRE koji su uključeni u odgovor biljaka na etilen i prisutni su u promotorima kod čak šest *StSOD* gena (*StCuZnSOD2-3*, *StMnSOD* i *StFeSOD2-4*), dok su najmanje zastupljeni CRE uključeni u odgovor biljaka na ABA i GA, koji su identifikovani u promotorima tri *StSOD* gena (*StCuZnSOD2*, *StFeSOD2* i *StFeSOD3*). Pored navedenih, u promotorskim regionima *StSOD* gena prisutni su i CRE značajni za procese rastenja i razvića, kao i oni koji su uključeni u odgovor na svetlost. Za nekoliko identifikovanih CRE poput ABRE, DRE i MYB, poznato je da su povezani sa regulacijom aktivnosti gena u odgovoru na abiotički stres kod biljaka (Nakashima i sar., 2009). Prisustvo ovih CRE u promotorima *StSOD* gena sugerira moguću ulogu datih *StSOD* u odgovoru biljaka krompira na abiotičke stresore.



Slika 20. Zastupljenost CRE u promotorskim regionima *StSOD* gena.

Korišćenjem veb-platforme PlantRegMap ustanovljena je mogućnost vezivanja TF iz 17 familija za analizirane promotore *StSOD* gena (**Slika 21.**). Uočeno je da promotor *StCuZnSOD1* gena poseduje najviše mesta vezivanja za TF iz čak 15 familija, a posebno se izdvaja mali region ovog promotora, udaljen ~800 nukleotida uzvodno od početka transkripcije, koji poseduje mesta vezivanja za TF iz osam različitih familija: Dof, M-type\_MADS, ERF, BBR-BPC, LBD, ARF, GRAS i MIKC\_MADS. U promotoru *StCuZnSOD2* gena nalazi se samo jedno mesto za koje se mogu vezati TF iz MYB familije, dok su u promotoru *StCuZnSOD3* gena prisutna dva mesta vezivanja za TF iz Dof i jedno za TF iz M-type\_MADS familije. Ustanovljeno je da promotor *StMnSOD* gena sadrži tri mesta vezivanja za TF iz bZIP familije i po jedno mesto vezivanja za TF iz bHLH i Nin-like familije. Među ispitivanim *StFeSOD* genima uočeno je da promotor *StFeSOD3* gena sadrži najveći broj mesta vezivanja TF i to iz različitih familija (tri iz C2H2 i jedno iz ERF familije TF), dok se najmanji broj mesta vezivanja TF nalazi u promotoru *StFeSOD2* gena (jedno iz Dof familije). Promotori *StFeSOD1* i *StFeSOD4* gena sadrže po dva mesta za vezivanje TF, od kojih je jedno mesto vezivanja TF iz BBR-BPC familije, dok je drugo mesto vezivanja iz Dof, odnosno MYB familije TF.

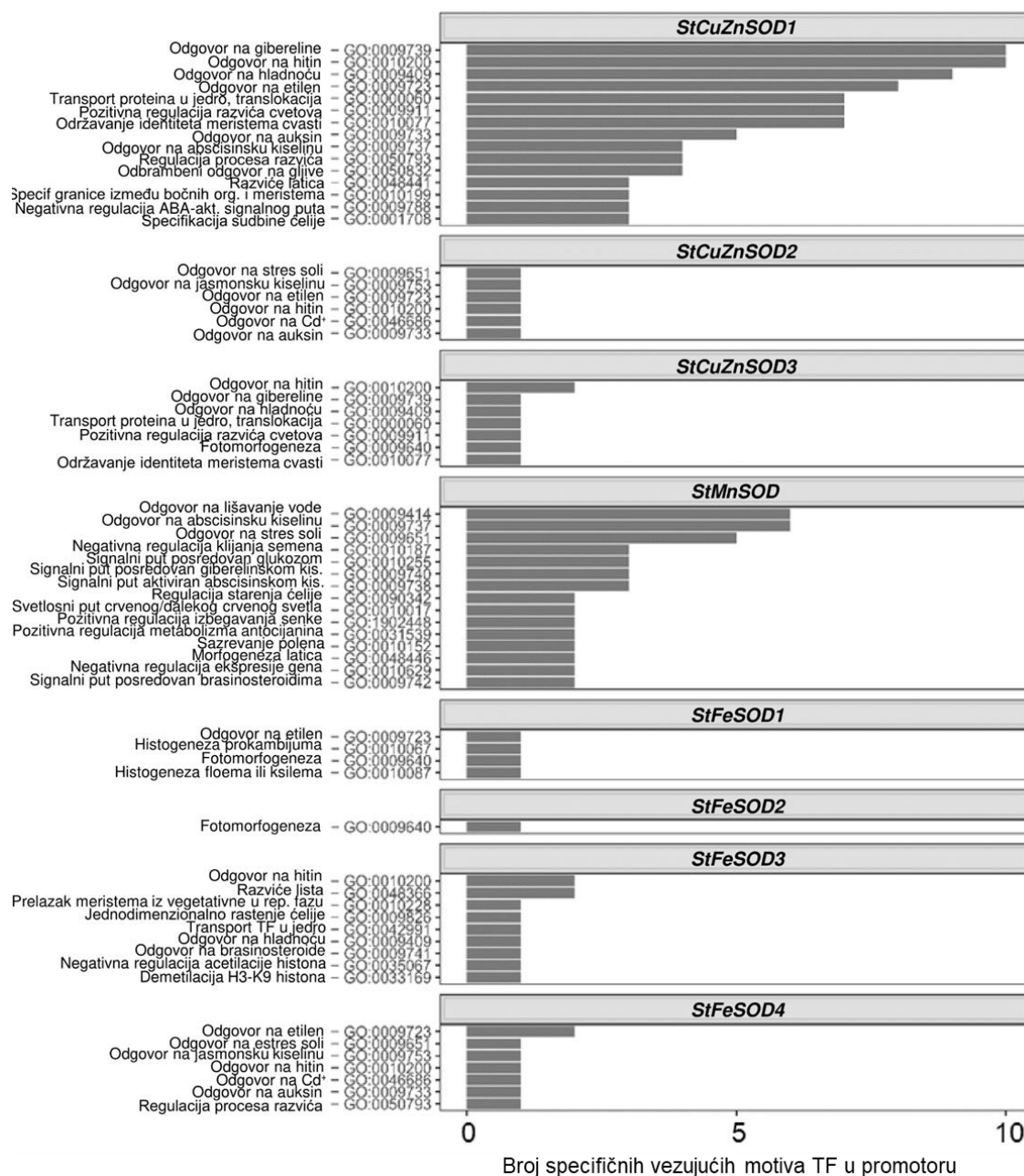


**Slika 21.** Pretpostavljena mesta vezivanja TF iz različitih familija za promotore *StSOD* gena. *In silico* analizom je obuhvaćen region od 100 nukleotida nizvodno i 1000 nukleotida uzvodno od mesta početka transkripcije. TF, transkripcioni faktori. Preuzeto i modifikovano prema Rudić i sar. (2022a).

Na **Slici 22.** prikazane su GO anotacije za TF iz različitih, prethodno identifikovanih familija, kao i broj specifičnih motiva, u okviru analiziranih promotorskih regiona *StSOD* gena, za koje se dati TF vezuju. GO termini i biološki procesi u kojima učestvuju TF, preuzeti su iz baze transkripcionih faktora biljaka (PlantTFDB v5.0). Neinformativni GO termini, koji se odnose se na biološke procese poput regulacije transkripcije, a zastupljeni su kod svih ili kod većine familija TF, nisu uzeti u razmatranje. Na osnovu informacija o biološkim procesima u kojima posreduju TF, izvedene su pretpostavke o regulaciji ekspresije *StSOD* gena.

Zapaženo je da među analiziranim promotorskim regionima *StSOD* gena postoje variranja u broju specifičnih motiva za koje se vezuju TF. Promotorski region *StCuZnSOD1* gena sadrži najviše specifičnih motiva (3-10), nešto manji broj (2-6) nalazi se u promotoru *StMnSOD* gena, dok promotori preostalih šest *StSOD* gena sadrže 1-2 motiva. U okviru promotorskog regiona *StCuZnSOD1* gena najbrojniji su motivi za koje se vezuju TF uključeni u odgovor na GA. Takođe, promotor *StCuZnSOD1* gena sadrži motive za koje se vezuju TF, koji posreduju u različitim biološkim procesima navedenim na **Slici 22**, na osnovu čega se može pretpostaviti da je dati gen regulisan u odgovoru biljaka na stres (niska temperatura, gljivična infekcija), biljne hormone (GA, etilen, AUX, ABA), kao i tokom procesa razvića. *StCuZnSOD2* gen u svom promotoru sadrži motiv za koji mogu da se vežu TF iz familije MYB, a koji posreduju u odgovoru biljaka na različite biljne hormone (JA, etilen, AUX), jone  $Cd^{2+}$  i stres solima. Na osnovu bioloških procesa u kojima učestvuju TF koji se vezuju za specifične motive u promotorskom regionu *StCuZnSOD3* gena, može se pretpostaviti da je dati gen regulisan u odgovoru biljaka na GA, niske temperature, proces cvetanja i

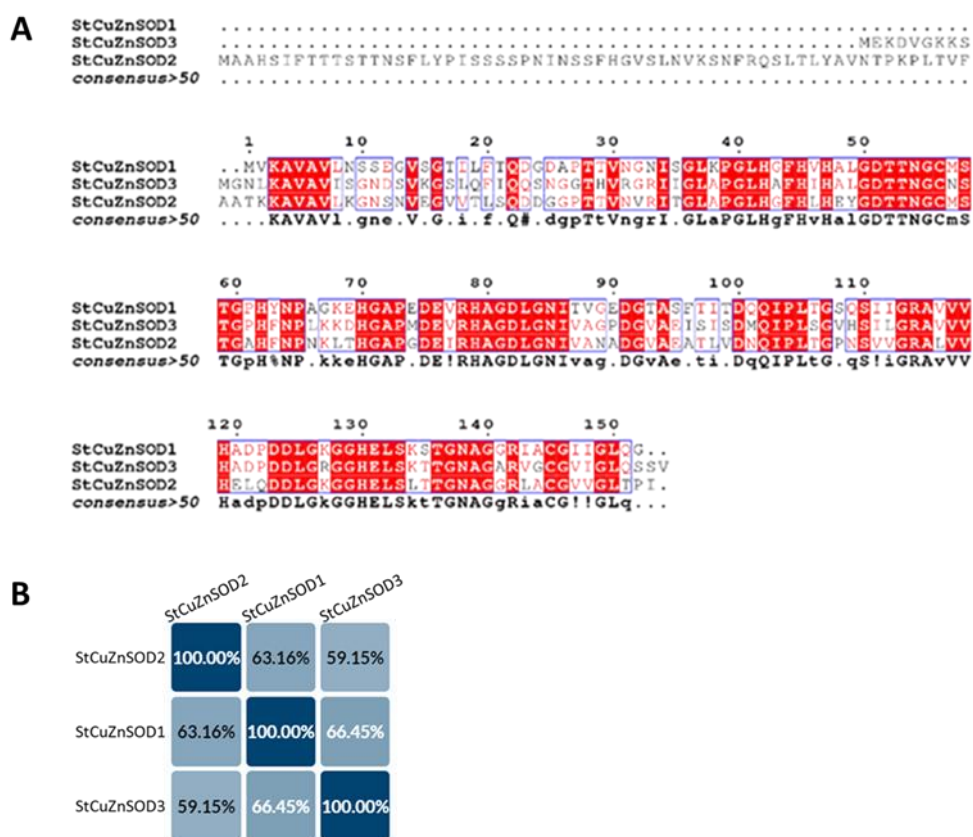
fotomorfogenezu. Promotorski region *StMnSOD* gena sadrži specifične motive koje prepoznaju TF uključeni u različite biološke procese, kao što su odgovor na biljne hormone (ABA, GA, brasinosteroid-*BR*), stres solima, signalni put posredovan glukozom, giberelinskom kiselinom i *BR*, kao i tokom sazrevanja polena, morfogeneze latica cveta i drugih procesa. Na osnovu bioloških procesa u kojima učestvuju TF koji se vezuju za promotore *StFeSOD1* i *StFeSOD2* gena, može se pretpostaviti da su oba gena regulisana tokom procesa fotomorfogeneze, dok je *StFeSOD1* gen dodatno regulisan u odgovoru na etilen i tokom formiranja provodnog biljnog tkiva. Prema biološkim procesima u kojima posreduju TF koji se vezuju za specifične motive u promotoru *StFeSOD3* gena, može se pretpostaviti da je dati gen regulisan u odgovoru na *BR*, niske temperature, tokom formiranja listova, dok se regulacija ekspresije *StFeSOD4* gena postiže u odgovoru na biljne hormone (*JA*, etilen, *AUX*), jone  $Cd^{2+}$ , kao i tokom procesa razvića.



**Slika 22.** GO anotacije za TF iz različitih familija koji se potencijalno vezuju za specifične motive u promotorima *StSOD* gena. Prikazani su značajniji GO termini, biološki procesi (npr. odgovor na različite faktore stresa i biljne hormone), kao i broj specifičnih vezujućih motiva u promotorima. Neinformativni GO termini i biološki procesi su izostavljeni. Preuzeto i modifikovano prema Rudić i sar. (2022a).

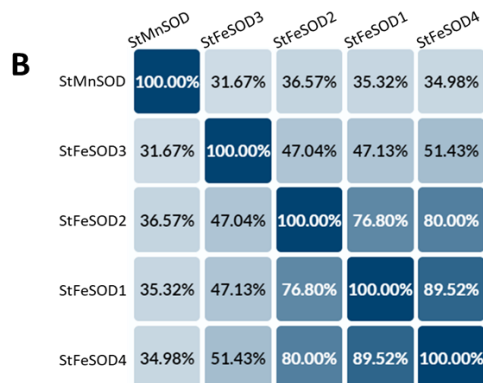
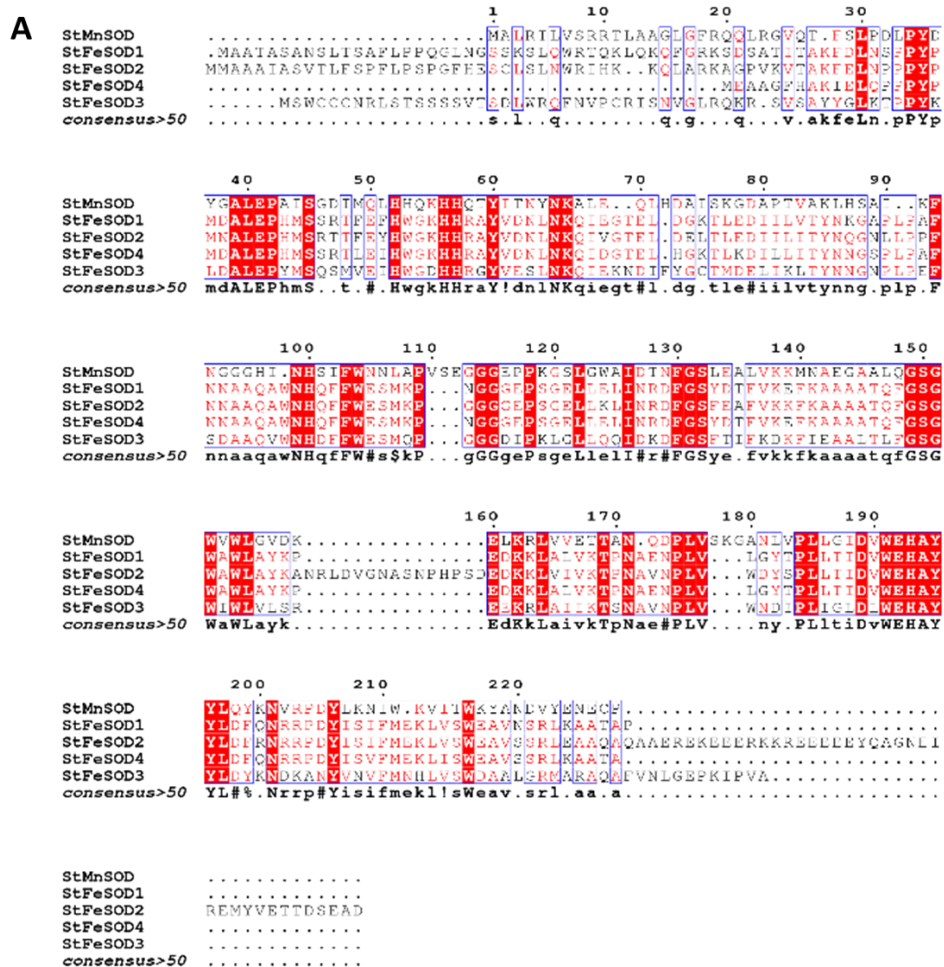
### 4.1.3. Karakteristike StSOD proteina

Fizičko-hemijska svojstva StSOD proteinskih subjedinica, koja podrazumevaju dužinu polipeptidnog lanca, teorijsku izoelektričnu tačku ( $pI$ ), indeks nestabilnosti, alifatični indeks i molekulsku težinu, prikazana su u **Tabeli 10**. Među analiziranim StSOD proteinima ustanovljeno je da broj aminokiselina (ak) koji ulazi u sastav jednog polipeptidnog lanca varira od najmanje 152 ak (StCuZnSOD1) do najviše 328 ak (StFeSOD2). Na osnovu poravnanja StCuZnSOD aminokiselinskih sekvenci ustanovljen je visok procenat identičnosti od 59,15% do 66,45% (**Slika 23**).



**Slika 23.** Poravnanja (A) i procenat identičnosti (B) StCuZnSOD aminokiselinskih sekvenci. Identični regioni su zasenčeni crvenom bojom, a slični regioni su uokvireni.

Poravnanja većine StFeSOD aminokiselinskih sekvenci pokazuju izuzetno visok procenat identičnosti: 89,52% (StFeSOD1 i StFeSOD4), 80% (StFeSOD2 i StFeSOD4) i 76,80% (StFeSOD1 i StFeSOD2) (**Slika 24**). Nešto niži procenat identičnosti aminokiselinskih sekvenci ustanovljen je između StFeSOD3 i StFeSOD4 (51,43%) i između StFeSOD1 i StFeSOD3 (47,13%). Procenat identičnosti StMnSOD i StFeSOD aminokiselinskih sekvenci iznosi od 31,67% do 36,57%. Poravnanja aminokiselinskih sekvenci (**Slike 23** i **24**) su urađena na osnovu StSOD sekvenci koje su predložene od strane Spud DB kao reprezentativne, sa izuzetkom StFeSOD2 i StFeSOD4, gde su umesto reprezentativnih aminokiselinskih sekvenci odabrane Soltu.DM.03G013800.1 (StFeSOD2) i Soltu.DM.06G012170.6 (StFeSOD4), jer sadrže potpune, neizmenjene regione (detaljnije opisano u odeljku **4.1.5**).



**Slika 24.** Poravnanja (A) i procenat identičnosti (B) StMnSOD i StFeSOD aminokiselinskih sekvenci. Identični regioni su zasenačeni crvenom bojom, a slični regioni su uokvireni.

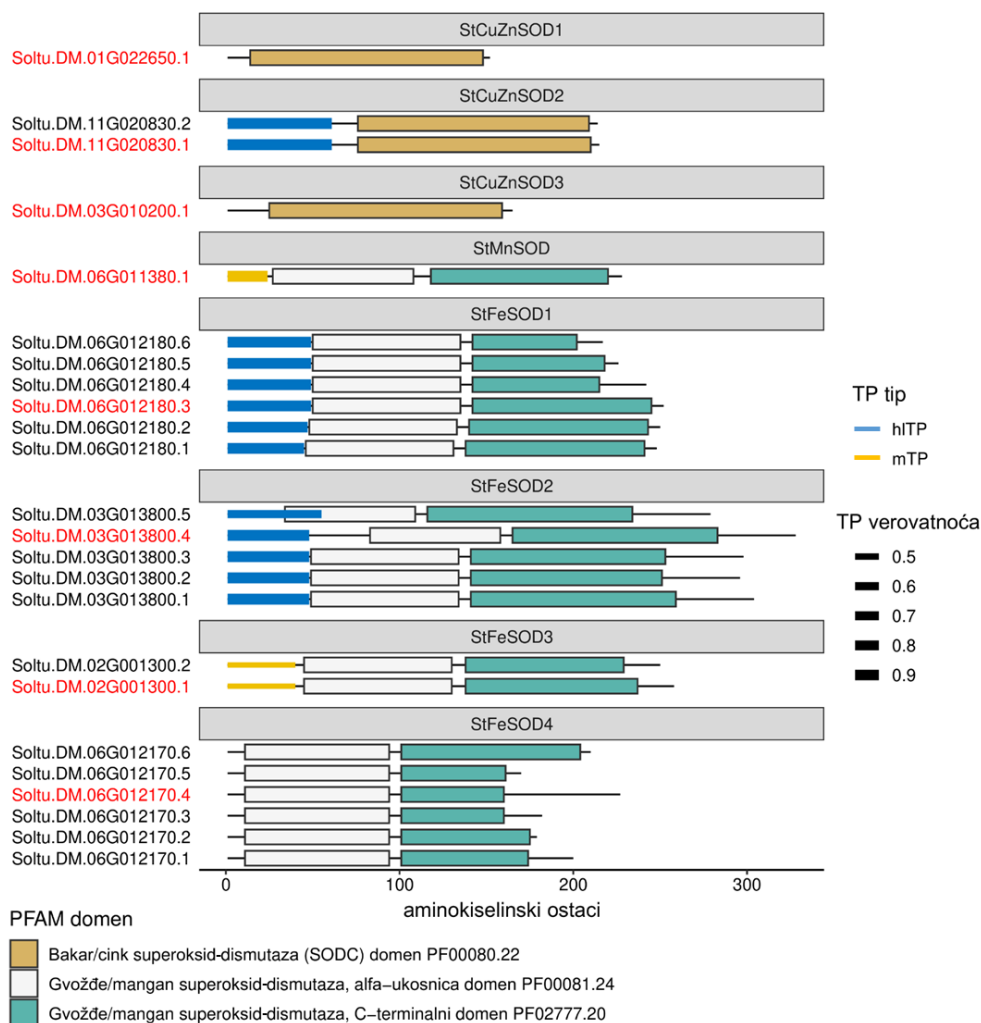
Na osnovu teorijske *pI* vrednosti uočeno je da većina StSOD polipeptida ima kisela svojstva, dok StMnSOD, StFeSOD1 i StFeSOD4 ispoljavaju blago bazne osobine (Tabela 10.). Vrednosti indeksa nestabilnosti, pokazatelja stabilnosti proteinskih subjedinica u uslovima *in vitro*, kod većine StSOD su <40, što ukazuje da su potencijalno stabilne. Izuzetak su StFeSOD2 i StFeSOD3 sa nešto višim indeksom nestabilnosti, koji iznosi 41,3 za StFeSOD2 i 43,03 za StFeSOD3. Na osnovu vrednosti alifatičnog indeksa, pokazatelja termostabilnosti proteinskih subjedinica, uočeno je da StMnSOD pokazuje najveću termostabilnost (91,14) u odnosu na ostale StSOD. Sa druge strane, StFeSOD1, sa prosečnom vrednošću alifatičnog indeksa 71,96, pokazuje najmanju termostabilnost u poređenju sa ostalim StSOD. Molekulske težine analiziranih StSOD nalaze se u opsegu 15,3-37,6 kDa.

#### 4.1.4. Identifikacija proteinskih domena i predikcija prisustva N-terminalnog tranzitnog peptida kod StSOD proteina

Radi sagledavanja strukturne organizacije StSOD proteina urađena je anotacija proteinskih domena, kao i predikcija prisustva N-terminalnog tranzitnog peptida (**Slika 25.**). Proteinski domeni identifikovani su pomoću HMMER/Pfam34 pretrage, a za predikciju prisustva N-tranzitnih peptida korišćen je veb-alat TargetP2.

Na osnovu dobijenih rezultata, uočeno je da u strukturi StCuZnSOD proteina postoji Bakar/Cink SOD domen (SODC) (PF00080.22) karakterističan za ovu klasu proteina, dok se kod StMnSOD i StFeSOD proteina nalaze dva specifična Gvožđe/Mangan SOD domena (PF00081.24 i PF02777.20) (**Slika 25.**). Proteinski domen PF00081.24 je N-terminalni domen, sačinjen od dva antiparalelna  $\alpha$ -heliksa koji formiraju ukosnicu, dok je PF02777.20 C-terminalni domen, koji čine tri antiparalelne  $\beta$ -ploče sa četiri  $\alpha$ -heliksa (Knapp i sar., 1999).

Rezultati dobijeni putem veb-alata TargetP2 predviđaju da se hloroplastni tranzitni peptid (hlTP) nalazi kod StCuZnSOD2, StFeSOD1 i StFeSOD2 proteina, dok je mitohondrijalni tranzitni peptid (mTP) zastupljen kod StMnSOD. Prema TargetP2, StFeSOD3 takođe poseduje mTP, ali sa malom verovatnoćom da ovaj peptid zaista obavlja funkciju mitohondrijalnog tranzitnog peptida.



**Slika 25.** Proteinski domeni i predikcija prisustva N-terminalnih tranzitnih peptida. Reprezentativne proteinske sekvence su obeležene crvenom bojom. TP, tranzitni peptid; hlTP, hloroplastni tranzitni peptid; mTP, mitohondrijalni tranzitni peptid. Preuzeto i modifikovano prema Rudić i sar. (2022a).



#### 4.1.5. Predikcija tercijarne strukture StSOD proteina

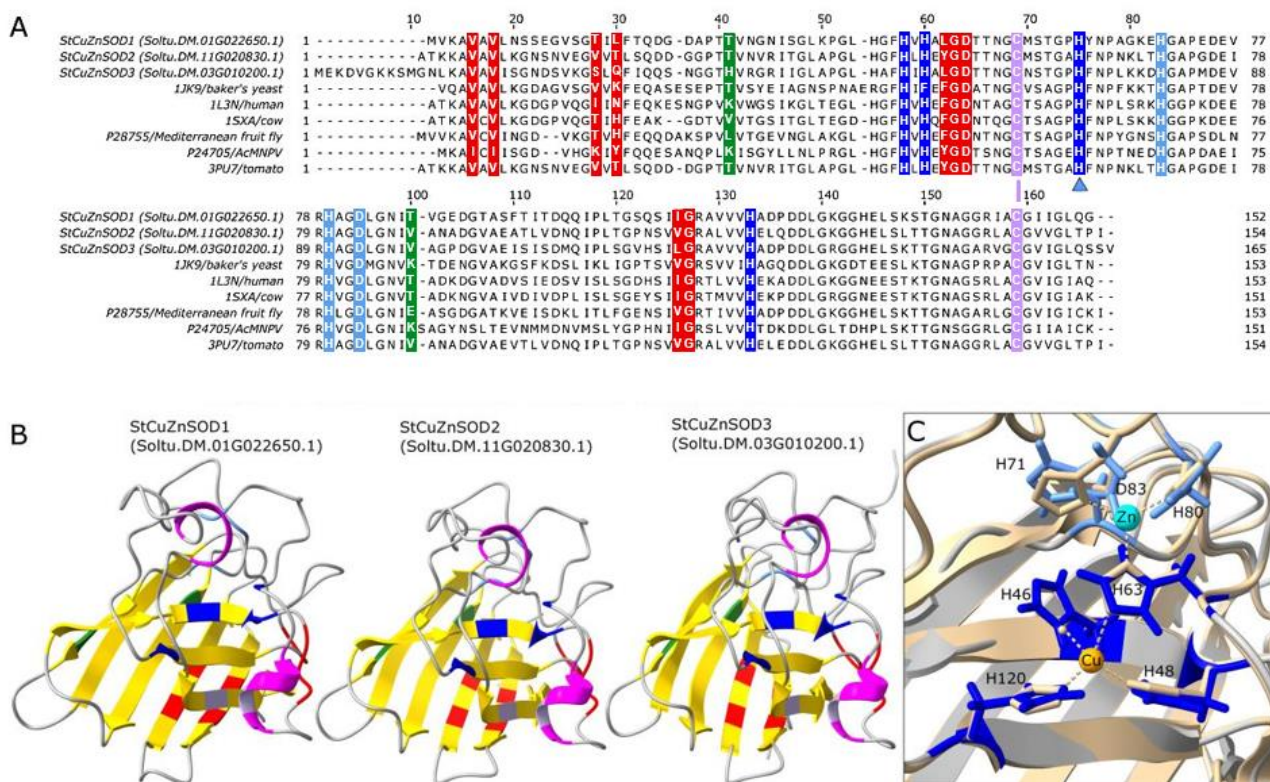
Predikcija tercijarne strukture StSOD proteina urađena je upotrebom AlphaFold i UCSF ChimeraX v.1.4 softvera. Kvalitet tako dobijenih struktura StSOD proteina proveren je ispitivanjem stereohemijskih osobina korišćenjem Ramačandran dijagrama. Ustanovljeno je da AlphaFold modele StSOD karakteriše visok procenat aminokiselina u energetski favorizovanim regionima (prosečno 96,99%), nizak procenat u energetski nedozvoljenim regionima (prosečno 0,42%) i nizak nivo neslaganja (prosečno 1) (**Tabela 11.**). Među dobijenim tercijarnim strukturama najveći procenat aminokiselina u energetski nedozvoljenim regionima ustanovljen je kod StCuZnSOD3. Međutim, većina ovih aminokiselina (75%) se nalazi u regionu koji obuhvata prvih 12 aminokiselina na N-terminusu i nije uključen u formiranje sekundarnih struktura proteina poput  $\alpha$ -heliksa i  $\beta$ -ploča.

**Tabela 11.** Evaluacija StSOD AlphaFold modela.

Protein	Pristupni broj transkripta	Energetski favorizovani regioni (%)	Energetski nedozvoljeni regioni (%)	Nivo neslaganja
StCuZnSOD1	Soltu.DM.01G022650.1	98,67	0,00	0,95
StCuZnSOD2	Soltu.DM.11G020830.1	98,03	0,00	0,00
StCuZnSOD3	Soltu.DM.03G010200.1	92,02	2,45	0,00
StMnSOD	Soltu.DM.06G011380.1	98,51	0,00	0,95
StFeSOD1	Soltu.DM.06G012180.3	98,01	0,00	0,93
StFeSOD2	Soltu.DM.03G013800.1	97,24	0,39	0,49
StFeSOD3	Soltu.DM.02G001300.1	95,83	0,00	2,58
StFeSOD4	Soltu.DM.06G012170.6	97,60	0,48	2,11

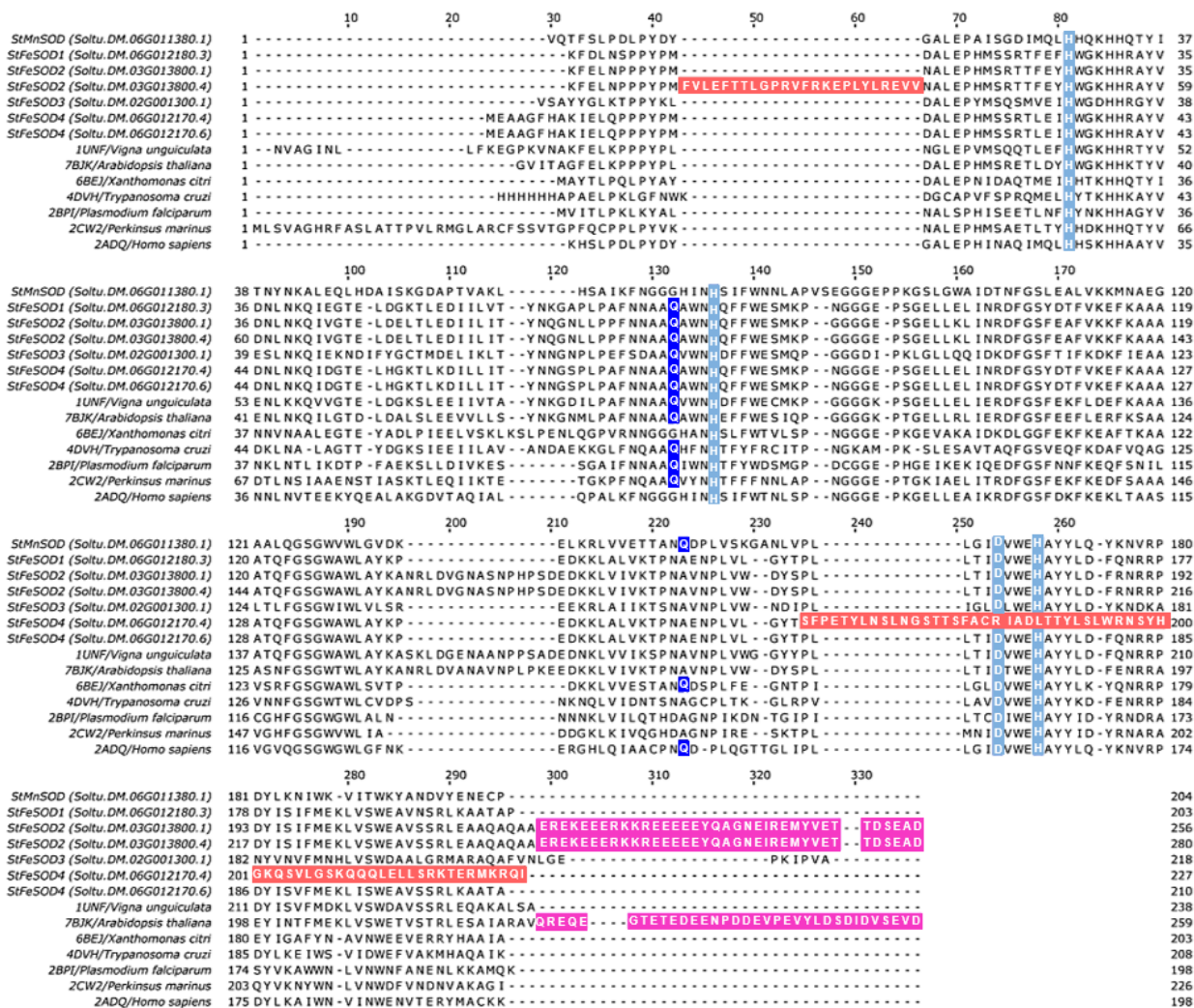
Nakon procene kvaliteta dobijenih StSOD tercijarnih struktura, urađeno je poređenje sa 3D strukturama SOD, koje su preuzete iz Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/>). Za poravnanja su korišćene StSOD aminokiselinske sekvence, koje su prema SpudDB bazi podataka genoma označene kao reprezentativne. U slučajevima kada jedan gen ima više alternativnih transkripata, transkript koji kodira kompletan polipeptid označava se kao reprezentativan, a aminokiselinska sekvencija koju kodira takav transkript predstavlja reprezentativnu sekvencu.

Na osnovu poređenja, ustanovljeno je da postoji velika sličnost između predviđenih StCuZnSOD tercijarnih struktura sa PDB strukturama (**Slika 26. B i C**). Motiv grčkog ključa, koji je karakterističan za eukariotske (E-klasa) CuZnSOD, jasno opisuje dobijene StCuZnSOD tercijarne strukture (**Slika 26. B**). Konzervativni aminokiselinski ostaci uključeni u formiranje E-klase dimera (označeno crvenom bojom na **Slici 26.**) lokalizovani su u  $\beta$ 1- i  $\beta$ 2-lancima (označeno od N-terminalnog kraja) i u petljama, koje povezuju  $\beta$ 4- sa  $\beta$ 5-lancem i  $\beta$ 6- sa  $\beta$ 7-lancem. Motiv grčkog ključa formiraju  $\beta$ 3- $\beta$ 6-lanci. Mesto vezivanja metalnih jona u StCuZnSOD proteinu sastoji se od šest konzervativnih aminokiselina H i jedne konzervativne aminokiseline D. Mesto vezivanja jona  $\text{Cu}^{2+}$  sastoji se od 4 ostatka aminokiseline H, pri čemu je jedan od datih ostataka aminokiseline H uključen i u vezivanje jona  $\text{Zn}^{2+}$  (**Slika 26. A i C**). Dva ostatka aminokiseline H, koja su uključena u vezivanje jona  $\text{Cu}^{2+}$ , nalaze se u  $\beta$ 4-lancu (H46 i H48 kod StCuZnSOD2), dok je treći ostatak aminokiseline H lokalizovan u  $\beta$ 7-lancu (H120 kod StCuZnSOD2). Aminokiselinski ostaci, koji čine mesto vezivanja jona  $\text{Zn}^{2+}$ , kao i ostatak aminokiseline H koji je zajednički za vezivanje oba metalna jona, nalaze se u petlji koja povezuje  $\beta$ 4- sa  $\beta$ 5-lancem (H63, H71, H80 i D83 kod StCuZnSOD2). Na osnovu poravnanja predviđene tercijarne strukture StCuZnSOD2 proteina sa eksperimentalno određenom CuZnSOD strukturom iz taksonomski bliske biljne vrste *S. lycopersicum* (PDB: 3PU7), ustanovljena je konzervativna orijentacija aminokiselinskih ostataka, koje čine aktivno mesto enzima (**Slika 26. C**).



**Slika 26.** Predikcija tercijarne strukture StCuZnSOD proteina. (A) Poravnanje CuZnSOD aminokiselinskih sekvenci krompira i drugih organizama. Konzervativni aminokiselinski ostaci uključeni u formiranje E-klase dimera označeni su crvenom, dok su zelenom bojom obeleženi aminokiselinski ostaci uključeni u formiranje P-klase dimera. Aminokiselinski ostaci koji čine mesto vezivanja jona  $\text{Cu}^{2+}$  obeleženi su tamno plavom, a aminokiselinski ostaci uključeni u vezivanje jona  $\text{Zn}^{2+}$  označeni su svetlo plavom bojom. Plava strelica prikazuje aminokiselinski ostatak koji je uključen u vezivanje  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ . Cisteinski ostaci koji grade disulfidni most (linija) prikazani su ljubičastom bojom. (B) AlphaFold model StSOD proteina: žute strelice predstavljaju  $\beta$ -lance, ružičasta boja  $\alpha$ -helikse, linijama su prikazani nestrukturirani delovi polipeptidnog lanca, dok su specifični aminokiselinski ostaci označeni kao na A. (C) Mesto vezivanja metalnog jona kod StCuZnSOD2 proteina određeno je poravnanjem predviđene tercijarne strukture StCuZnSOD2 (siva boja) sa eksperimentalno određenom CuZnSOD strukturom 3PU7 *S. lycopersicum* (bež boja). Pozicija metalnog jona i koordinate su određeni na osnovu 3PU7 strukture. StCuZnSOD2 aminokiselinski ostaci koji čine mesta vezivanja  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  obojeni su plavom i svetlo plavom bojom. Preuzeto iz Rudić i sar. (2022a).

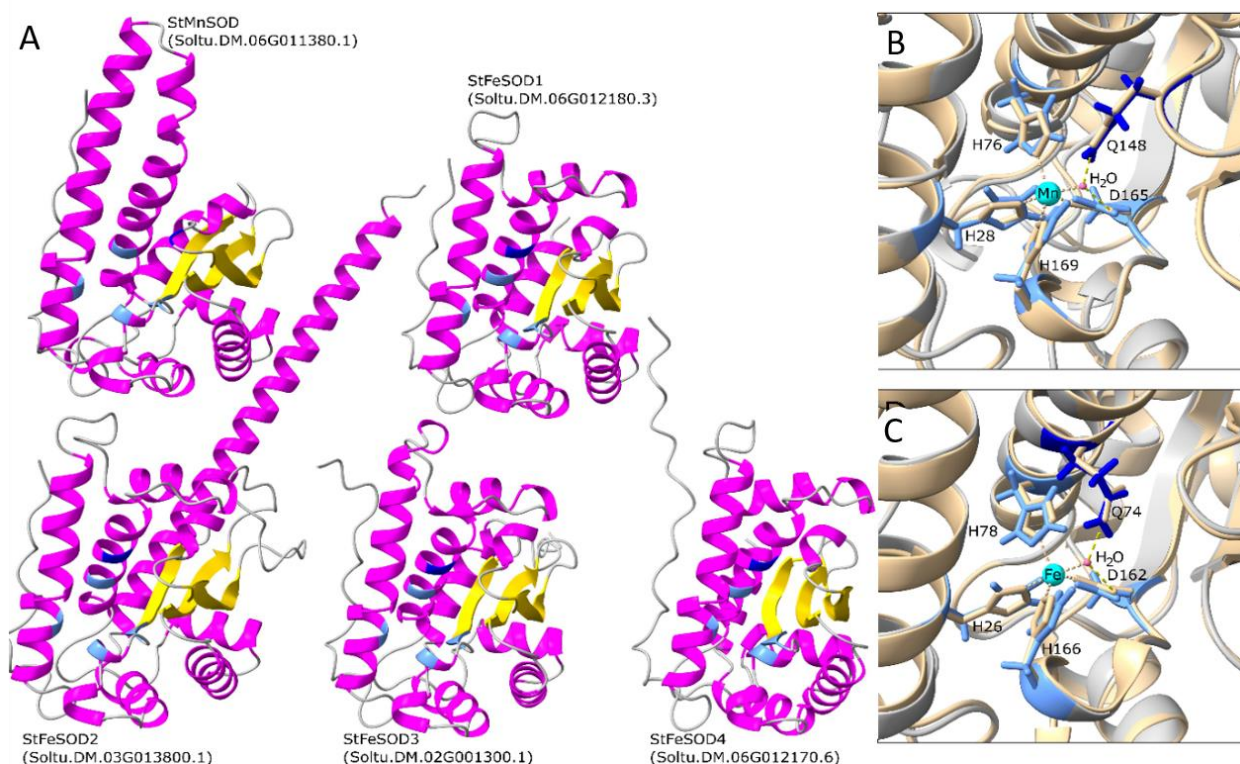
Poravnanjem reprezentativnih Mn-FeSOD aminokiselinskih sekvenci ustanovljeno je da dve sekvence, Soltu.DM.03G013800.4 (StFeSOD2) i Soltu.DM.06G012170.4 (StFeSOD4), sadrže izmenjene regione, koji su označeni crvenom bojom (Slika 27.).



**Slika 27.** Poravnanje Mn-FeSOD aminokiselinskih sekvenci krompira i drugih organizama. Aminokiselinski ostaci koji su uključeni u vezivanje jona obeleženi su svetlo plavom bojom, dok su aminokiselinski ostaci koji grade vodonične veze sa molekulom vode prikazani plavom bojom. Anotacija je zasnovana na PDB strukturama: 2ADQ, 1UNF i 7BJK. Izmenjeni regioni koji se nalaze u okviru StFeSOD2 (Soltu.DM.03G013800.4) i StFeSOD4 (Soltu.DM.06G012170.4) aminokiselinskih sekvenci obeležen je crvenom bojom. Dugi C-terminalni region u okviru StFeSOD2 sekvenci (Soltu.DM.03G013800.1 i Soltu.DM.03G013800.4), kao i 7BJK *A. thaliana*, obeležen je ružičastom bojom. Preuzeto iz Rudić i sar. (2022a).

U reprezentativnoj sekvenci StFeSOD2 proteina neuobičajeni region sastoji se od 24 aminokiseline na N-terminalnom kraju, dok se u reprezentativnoj sekvenci StFeSOD4 takav region nalazi na C-terminalnom kraju i čine ga 63 aminokiseline. Takođe, uočeno je da u reprezentativnoj sekvenci StFeSOD4 proteina na C-terminalnom kraju nedostaju dve konzervativne aminokiseline (D i H), koje su značajne za vezivanje metalnog jona, što ukazuje da je ova izoforma StFeSOD4 verovatno nefunkcionalna. Stoga, za predikciju tercijarne strukture, umesto sekvenci koje su predložene od strane Spud DB kao reprezentativne, odabrane su Soltu.DM.03G013800.1 (StFeSOD2) i Soltu.DM.06G012170.6 (StFeSOD4), jer sadrže potpune, neizmenjene regione.

Na osnovu dobijenih AlphaFold modela tercijarne strukture Mn-FeSOD uočeno je da se kod StFeSOD1-4 domen  $\alpha$ -ukosnica sastoji od tri kraća  $\alpha$ -heliksa (~100 aminokiselina), dok se kod StMnSOD dati domen sastoji od dva duga  $\alpha$ -heliksa (**Slika 28. A**). C-terminalni domen svih pet analiziranih Mn-FeSOD sadrži antiparalelnu  $\beta$ -ploču sa tri  $\beta$ -lanca, koje okružuju  $\alpha$ -heliksi. Na C-terminalnom kraju kod StFeSOD2 prisutan je i jedan dugačak, negativno naelektrisan region bogat ostacima aminokiselina E/D, koji se nalazi odmah iza C-terminalnog domena (**Slika 27.**).



**Slika 28.** Predikcija tercijarne strukture StMnSOD i StFeSOD. (A) AlphaFold model StMnSOD i StFeSOD proteina: žute strelice predstavljaju  $\beta$ -lance, ružičaste spirale  $\alpha$ -helikse, linijama su prikazani nestrukturisani delovi polipeptidnog lanca, dok su specifični aminokiselinski ostaci označeni kao na **Slici 27**. (B) Mesto vezivanja metalnog jona kod StMnSOD određeno je poravnanjem predviđene tercijarne strukture StMnSOD (siva boja) sa eksperimentalno određenom MnSOD strukturom 2ADQ *H. sapiens* (bež boja). Pozicija metalnog jona i koordinate su određeni na osnovu 2ADQ strukture. StMnSOD aminokiselinski ostaci koji čine mesta vezivanja jona obojeni su svetlo plavom bojom. Molekul vode stabilizovan je vodoničnim vezama koje su prikazane žutom bojom. (C) Mesto vezivanja metalnog jona kod StFeSOD1 određeno je poravnanjem predviđene tercijarne strukture StFeSOD1 (siva boja) sa eksperimentalno određenom FeSOD strukturom 7BJK *A. thaliana* (bež boja). Pozicija metalnog jona i koordinate su određeni na osnovu 7BJK strukture. StFeSOD1 aminokiselinski ostaci koji čine mesta vezivanja jona obojeni su svetlo plavom bojom. Molekul vode stabilizovan je vodoničnim vezama koje su prikazane žutom bojom. Preuzeto iz Rudić i sar. (2022a).

Mesto vezivanja metalnog jona u Mn-FeSOD sastoji se od tri konzervativna ostatka aminokiseline H i jednog konzervativnog ostatka aminokiseline D (H28, H76, H169 i D165 kod StMnSOD). Aminokiseline H28 i H76 nalaze se u prvom i poslednjem  $\alpha$ -heliksu u okviru  $\alpha$ -ukosnica domena, dok se na C-terminalnom domenu nalaze aminokiseline D165 i to na kraju  $\beta$ 3-lanca i H169 na kratkom heliksu iza  $\beta$ 3-lanca. Metalni jon u katalitičkom centru Mn-FeSOD je pentakoordinisan od strane molekula vode i ostataka četiri navedene aminokiseline. Molekul vode stabilizovan je vodoničnim vezama koje gradi sa ostacima aminokiselina D i Q. Kod StFeSOD ostatak aminokiseline Q nalazi se u poslednjem  $\alpha$ 3-heliksu u okviru  $\alpha$ -ukosnica domena, dok se kod StMnSOD dati aminokiselinski ostatak nalazi u zavojnici, koja povezuje  $\beta$ 2- i  $\beta$ 3-lanac u okviru C-terminalnog

domena. Na osnovu aminokiselinskog poravnanja pretpostavljenog aktivnog mesta StMnSOD proteina sa eksperimentalno određenim aktivnim mestom MnSOD *H. sapiens* (PDB: 2ADQ, **Slika 28. B**), kao i aminokiselinskim poravnanjem pretpostavljenog aktivnog mesta StFeSOD1 sa eksperimentalno određenim aktivnim mestom FeSOD *A. thaliana* (PAP9, PDB: 7BJK, **Slika 28. C**), ustanovljena je konzervativna orijentacija aminokiselinskih ostataka u aktivnim mestima oba analizirana enzima.

#### 4.1.6. Subćelijska lokalizacija StSOD proteina

Za predikciju subćelijske lokalizacije StSOD proteina korišćena su četiri veb-alata: TargetP2, DeepLoc, CELLO i LA (**Tabela 12.**). Pored navedenih alata, korišćen je i PTS1 Predictor za identifikaciju peroksizomalne target sekvence u StCuZnSOD3 proteinu.

**Tabela 12.** Predikcija subćelijske lokalizacije StSOD proteina korišćenjem različitih veb-alata.

Naziv gena	Pristupni broj transkripta	TargetP2	DeepLoc	CELLO	LA	PTS1 Predictor
<i>StCuZnSOD1</i>	Soltu.DM.01G022650.1	o	c	c	c	
<i>StCuZnSOD2</i>	Soltu.DM.11G020830.1	hl	hl	hl	hl	
	Soltu.DM.11G020830.2	hl	hl	hl	hl	
<i>StCuZnSOD3</i>	Soltu.DM.03G010200.1	o	p	c	p	nije p
<i>StMnSOD</i>	Soltu.DM.06G011380.1	m	m	m	m	
<i>StFeSOD1</i>	Soltu.DM.06G012180.1	hl	hl	hl	hl	
	Soltu.DM.06G012180.2	hl	hl	hl	hl	
	Soltu.DM.06G012180.3	hl	hl	hl	hl	
	Soltu.DM.06G012180.4	hl	hl	hl	hl	
	Soltu.DM.06G012180.5	hl	hl	hl	hl	
	Soltu.DM.06G012180.6	hl	hl	hl	hl	
<i>StFeSOD2</i>	Soltu.DM.03G013800.1	hl	hl	hl	hl	
	Soltu.DM.03G013800.2	hl	hl	hl	hl	
	Soltu.DM.03G013800.3	hl	hl	hl, c	hl	
	Soltu.DM.03G013800.4	hl	hl	hl	hl	
	Soltu.DM.03G013800.5	hl	hl	hl	m	
<i>StFeSOD3</i>	Soltu.DM.02G001300.1	m	hl	hl	m	
	Soltu.DM.02G001300.2	m	hl	hl	m	
<i>StFeSOD4</i>	Soltu.DM.06G012170.1	o	m	hl, c	m	
	Soltu.DM.06G012170.2	o	m	hl, c	c	
	Soltu.DM.06G012170.3	o	m	hl, c, m	c	
	Soltu.DM.06G012170.4	o	m	j, m	m	
	Soltu.DM.06G012170.5	o	m	hl, c, m	m	
	Soltu.DM.06G012170.6	o	m	hl	c	

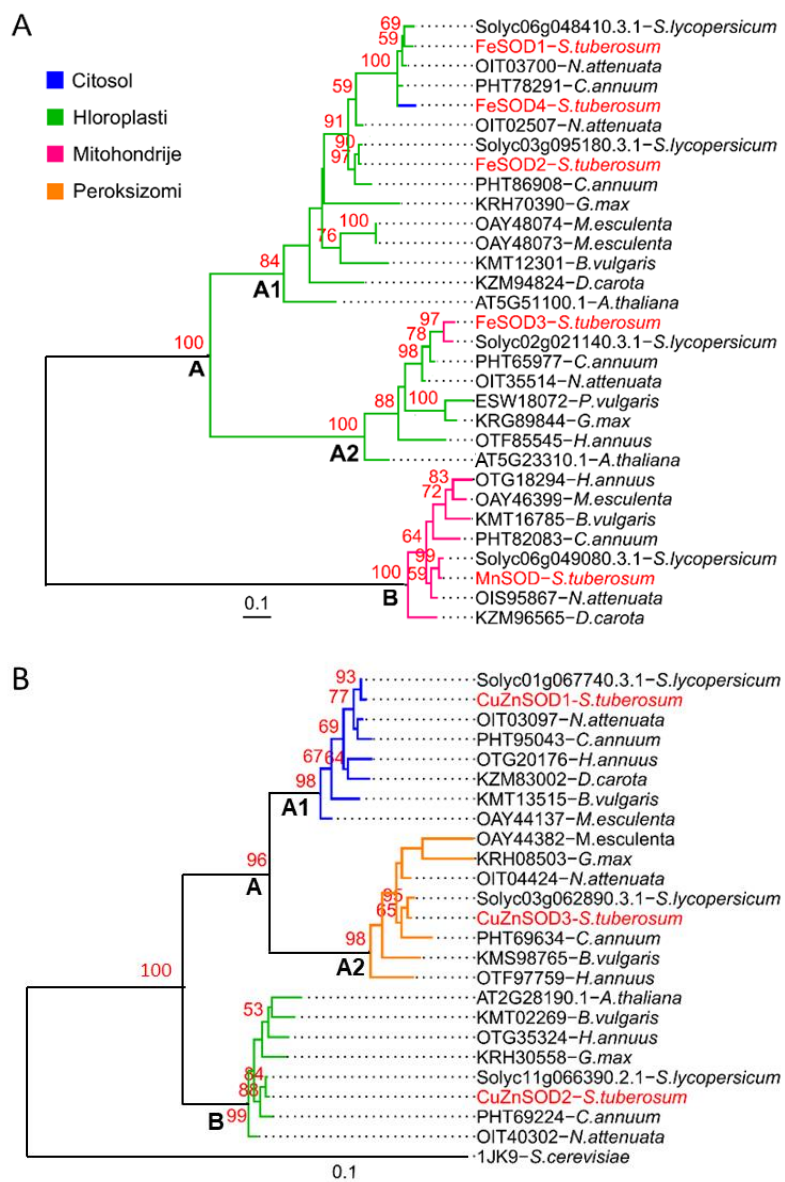
Napomena: c, citosol; hl, hloroplasti; p, peroksizomi; m, mitohondrije; j, jedro; o, ostalo.

Na osnovu rezultata dobijenih korišćenjem različitih veb-alata za predikciju subćelijske lokalizacije StSOD proteina, utvrđeno je da su StCuZnSOD2, StFeSOD1 i StFeSOD2 najverovatnije lokalizovani u hloroplastima, StMnSOD u mitohondrijama, a StCuZnSOD1 u citosolu (**Tabela 12.**). Za preostala tri StSOD proteina nisu dobijena jednaka predviđanja. Prema CELLO, StCuZnSOD3 protein se može naći u citosolu, dok DeepLoc i LA predviđaju da je dati protein lokalizovan u peroksizomima. Kako bi se razjasnilo da li je StCuZnSOD3 protein prisutan u peroksizomima, upotrebljen je veb-alat PTS1 Predictor, koji omogućava identifikaciju signala za transport proteina u peroksizome. Prema PTS1 Predictor, StCuZnSOD3 protein se najverovatnije ne nalazi u peroksizomima. Na osnovu rezultata dobijenih korišćenjem TargetP2 i LA, StFeSOD3 protein se najverovatnije nalazi u mitohondrijama, dok se prema DeepLoc i CELLO dati protein najverovatnije nalazi u hloroplastima. Najraznovrsnije predikcije subćelijske lokalizacije dobijene su za StFeSOD4 protein. Rezultati dobijeni korišćenjem DeepLoc, CELLO i LA predviđaju da je StFeSOD4 protein lokalizovan u mitohondrijama, hloroplastima, citosolu i jedru. Sa druge strane, veb-alatom TargetP2

nije identifikovano prisustvo tranzitnih peptida kod StFeSOD4 proteina, što ukazuje da ovaj protein najverovatnije nije prisutan u hloroplastima i mitohondrijama, već u citosolu ili u nekoj drugoj ćelijskoj organeli.

#### 4.1.7. Filogenetski odnosi StSOD proteina

Filogenetski odnosi StSOD proteina su procenjeni na osnovu poređenja aminokiselinskih sekvenci datih proteina sa sekvencama homolognih proteina iz 18 drugih biljnih vrsta. Posle polazne analize, filogenetska stabla za Mn-FeSOD i CuZnSOD su formirana nezavisno, zato što su ove dve grupe proteina, iako imaju neke zajedničke osobine, ipak suviše udaljene (**Slika 29.**). Sve analizirane StSOD proteinske sekvence su formirale sestrinske klade sa homolognim sekvencama *S. lycopersicum*, što ukazuje da su ove dve biljne vrste filogenetski jako bliske.



**Slika 29.** Filogenetska stabla maksimalne verovatnoće za Mn-FeSOD (**A**) i CuZnSOD (**B**). Za procenu stabilnosti klastera primenjen je neparametrijski „*bootstrap*“ od 100 iteracija. Klasteri sa >50/100 „*bootstrap*“ podrškom označeni su crvenim brojevima. Različite boje klada na filogenetskim stablima, označavaju pretpostavljenu subćelijsku lokalizaciju aminokiselinskih sekvenci na osnovu algoritma LA.

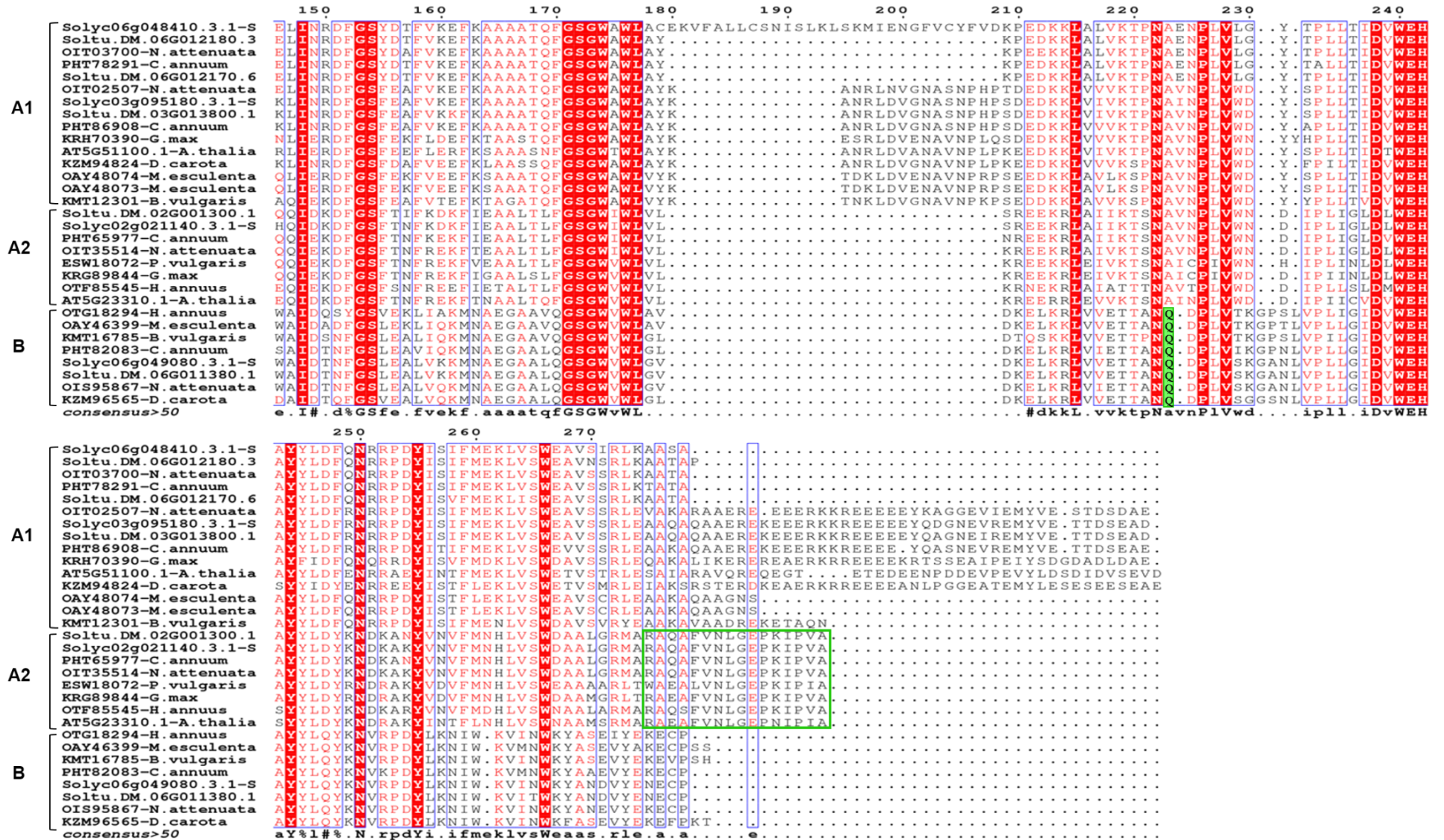
Filogenetsko stablo Mn-FeSOD aminokiselinskih sekvenci ukorenjeno je pomoću srednje vrednosti dve najdivergentnije grupe u odnosu na ukupnu dužinu grana (eng. *midpoint rooted phylogenetic tree*) zato što nije bilo moguće pronaći dobru spoljašnju grupu, tj. dovoljno udaljenu proteinsku sekvencu koja je homologna sa svim ispitivanim Mn-FeSOD. Na osnovu dobijenog Mn-FeSOD filogenetskog stabla ustanovljeno je da postoje dve filogenetski veoma udaljene klade: A i B (**Slika 29. A**). Klada A je formirana grupisanjem StFeSOD aminokiselinskih sekvenci sa homolognim FeSOD sekvencama. Zajednička karakteristika aminokiselinskih sekvenci grupisanih u kladu A je položaj aminokiseline Q, koja ima ulogu u stabilizaciji molekula vode unutar aktivnog mesta enzima. Naime, kod svih FeSOD proteinskih sekvenci ustanovljeno je da se ostatak date aminokiseline nalazi u okviru  $\alpha$ -ukosnica domena (osenčeno zelenom bojom na **Slici 30.**). Klada A sadrži potklade A1 i A2. U potkladi A1 se nalaze proteinske sekvence StFeSOD1, StFeSOD2, StFeSOD4 i njihovi homolozi. Poravnanjem aminokiselinskih sekvenci grupisanih u potkladu A1, uočeno je da sekvence, poput PAP9 (AT5G51100.1) *A. thaliana* i StFeSOD2, sadrže na C-terminalnom kraju region bogat ostacima aminokiseline E/D, koji je karakterističan za proteine PEP kompleksa (eng. *PEP-Associated Proteins*, PAP). Filogenetska bliskost date PEP-SOD (PAP9 *A. thaliana*) i SOD koje nisu PEP ukazuje da su, osim karakterističnog proširenja C-terminalnog kraja, druge karakteristike sekvenci očuvane u PEP-SOD. Potklada A2 sadrži StFeSOD3 proteinsku sekvencu i njene homologe. Poravnanjem proteinskih sekvenci grupisanih u potkladu A2, uočeno je da date sekvence sadrže karakterističan konzervativni niz od 16 aminokiselina ([RW]A[QE][AS][FL]VNLGEPKIP[VI]A) iza C-terminalnog domena (uokvireno zelenom bojom na **Slici 30.**). Na osnovu eksperimentalnih podataka za *A. thaliana* (AT5G51100.1, Q9LU64 i AT5G23310.1, Q9FMX0), može se pretpostaviti da se proteinske sekvence u okviru potklada A1 i A2 nalaze u hloroplastima. Međutim, na osnovu predikcije subćelijske lokalizacije korišćenjem veb-alata LA, predviđeno je da se proteinske sekvence StFeSOD3 krompira i SlSOD7 (Solyc02g021140.3.1) paradajza, nalaze u mitohondrijama, dok je za StFeSOD4 proteinsku sekvencu procenjeno da se nalazi u citosolu. Klada B je formirana grupisanjem StMnSOD i homolognih MnSOD proteinskih sekvenci, za koje je ustanovljeno da sadrže mTP. Poravnanjem datih sekvenci utvrđeno je da se ostatak aminokiseline Q, koja ima ulogu u stabilizaciji molekula vode unutar aktivnog mesta enzima, nalazi u okviru C-terminalnog domena (osenčeno zelenom bojom na **Slici 30.**).

Filogenetsko stablo CuZnSOD je ukorenjeno uvođenjem spoljašnje grupe, tj. homolognom CuZnSOD proteinskom sekvencom *S. cerevisiae* (PDB: 1JK9) (**Slika 29. B**). Filogenetsko stablo CuZnSOD sastoji se od dve klade: A i B (**Slika 29. B**). Kladu A čine potklade A1 i A2. U potkladi A1 su grupisane StCuZnSOD1 i homologne proteinske sekvence, dok su u potkladi A2 grupisane StCuZnSOD3 proteinska sekvenca i njeni homolozi. Klada B sastoji se od StCuZnSOD2 i homolognih proteinskih sekvenci. Ovakvo grupisanje proteinskih sekvenci izgleda da je u vezi sa subćelijskom lokalizacijom proteina, odnosno u svakom od tri klastera su grupisane sekvence CuZnSOD, koje su lokalizovane u različitim ćelijskim odeljcima: hloroplastima, citosolu i peroksizomima. Na osnovu filogenetskog stabla je ustanovljeno da su citosolna StCuZnSOD1 i peroksizomalna StCuZnSOD3 filogenetski bliže izoforme enzima u odnosu na hloroplastnu StCuZnSOD2. Sve tri StCuZnSOD proteinske sekvence formiraju sestrinske klade sa homolognim sekvencama *S. lycopersicum*.

		1	10	20	30	40
A1	Solyc06g048410.3.1-S	.....	.....	.....	.....	.....
	Soltu_DM.06G012180.3	.....	.....	.....	.....	.....
	OIT03700-N.attenuata	.....	.....	.....	.....	.....
	PHT78291-C.annuum	.....	.....	.....	.....	.....
	Soltu_DM.06G012170.6	.....	.....	.....	.....	.....
	OIT02507-N.attenuata	.....	.....	.....	.....	.....
	Solyc03g095180.3.1-S	.....	.....	.....	.....	.....
	Soltu_DM.03G013800.1	.....	.....	.....	.....	.....
	PHT86908-C.annuum	.....	.....	.....	.....	.....
	KRH70390-G.max	.....	.....	.....	.....	.....
A2	AT5G51100.1-A.thalia	.....	.....	.....	.....	.....
	KZM94824-D.carota	.....	.....	.....	.....	.....
	OAY48074-M.esculenta	.....	.....	.....	.....	.....
	OAY48073-M.esculenta	.....	.....	.....	.....	.....
	KMT12301-B.vulgaris	.....	.....	.....	.....	.....
	Soltu_DM.02G001300.1	.....	.....	.....	.....	.....
	Solyc02g021140.3.1-S	.....	.....	.....	.....	.....
	PHT65977-C.annuum	.....	.....	.....	.....	.....
	OIT35514-N.attenuata	.....	.....	.....	.....	.....
	ESW18072-P.vulgaris	.....	.....	.....	.....	.....
B	KRG89844-G.max	.....	.....	.....	.....	.....
	OTF85545-H.annuus	.....	.....	.....	.....	.....
	AT5G23310.1-A.thalia	.....	.....	.....	.....	.....
	OTG18294-H.annuus	.....	.....	.....	.....	.....
	OAY46399-M.esculenta	.....	.....	.....	.....	.....
	KMT16785-B.vulgaris	.....	.....	.....	.....	.....
	PHT82083-C.annuum	.....	.....	.....	.....	.....
	Solyc06g049080.3.1-S	.....	.....	.....	.....	.....
	Soltu_DM.06G011380.1	.....	.....	.....	.....	.....
	OIS95867-N.attenuata	.....	.....	.....	.....	.....
KZM96565-D.carota	.....	.....	.....	.....	.....	
consensus>50						
		50	60	70	80	90
A1	Solyc06g048410.3.1-S	D L I P P P Y P M D A L E P P H M S S R T F E F H W G K H H R A Y V D N I N K Q I D G T E L D G K T L E D I I L V T Y N N G A P L P A F N N A A Q A W N H Q F F W E S M K P . . . N G G G E P S G E L L				
	Soltu_DM.06G012180.3	D L N S P P Y P M D A L E P P H M S S R T F E F H W G K H H R A Y V D N I N K Q I D G T E L D G K T L E D I I L V T Y N N G A P L P A F N N A A Q A W N H Q F F W E S M K P . . . N G G G E P S G E L L				
	OIT03700-N.attenuata	E L Q P P P Y P M D A L E P P H M S S R T F E F H W G K H H R A Y V D N I N K Q I D G T E L D G K T L E D I I L V T Y N N G A P L P A F N N A A Q A W N H Q F F W E S M K P . . . N G G G E P S G E L L				
	PHT78291-C.annuum	E L Q P P P Y P M D A L E P P H M S S R T F E F H W G K H H R A Y V D N I N K Q I D G T E L D G K T L E D I I L V T Y N N G A P L P A F N N A A Q A W N H Q F F W E S M K P . . . N G G G E P S G E L L				
	Soltu_DM.06G012170.6	E L Q P P P Y P M D A L E P P H M S S R T F E F H W G K H H R A Y V D N I N K Q I D G T E L D G K T L E D I I L V T Y N N G A P L P A F N N A A Q A W N H Q F F W E S M K P . . . N G G G E P S G E L L				
	OIT02507-N.attenuata	E L T P P P Y P M N A L E P P H M S S R T F E F H W G K H H R A Y V D N I N K Q I D G T E L D G M T L E D I I L V T Y N N G A P L P A F N N A A Q A W N H Q F F W E S M K P . . . N G G G E P S G E L L				
	Solyc03g095180.3.1-S	E L N P P P Y P M N A L E P P H M S S R T F E F H W G K H H R A Y V D N I N K Q I D G T E L D E L T L E D I I L V T Y N N G A P L P A F N N A A Q A W N H Q F F W E S M K P . . . N G G G E P S G E L L				
	Soltu_DM.03G013800.1	E L N P P P Y P M N A L E P P H M S S R T F E F H W G K H H R A Y V D N I N K Q I D G T E L D E L T L E D I I L V T Y N N G A P L P A F N N A A Q A W N H Q F F W E S M K P . . . N G G G E P S G E L L				
	PHT86908-C.annuum	E L N P P P Y P M N A L E P P H M S S R T F E F H W G K H H R A Y V D N I N K Q I D G T E L D E L T L E D I I L V T Y N N G A P L P A F N N A A Q A W N H Q F F W E S M K P . . . N G G G E P S G E L L				
	KRH70390-G.max	E L K P P P Y P L D A L E P P H M S S R T F E F H W G K H H R A Y V D N I N K Q I D G T E L D G N S L E N T I V T Y N N G A P L P A F N N A A Q A W N H Q F F W E S M K P . . . N G G G E P S G E L L				
A2	AT5G51100.1-A.thalia	E L K P P P Y P L D A L E P P H M S S R T F E F H W G K H H R A Y V D N I N K Q I D G T E L D G N S L E N T I V T Y N N G A P L P A F N N A A Q A W N H Q F F W E S M K P . . . N G G G E P S G E L L				
	KZM94824-D.carota	E L K P P P Y P L N A L E P P H M S S R T F E F H W G K H H R A Y V D N I N K Q I D G T E L D G L T L E G V V L V S Y N K G D I L P A F N N A A Q A W N H Q F F W E S M A B . . . G G G G K P S G D L L				
	OAY48074-M.esculenta	E L K P P P Y P L N A L E P P H M S S R T F E F H W G K H H R A Y V D N I N K Q I D G T E L D S K P L E D V V I A T Y N N G D V L P A F N N A A Q A W N H E F F W G C M K P . . . C G G G K P S G E L L				
	OAY48073-M.esculenta	E L K P P P Y P L N A L E P P H M S S R T F E F H W G K H H R A Y V D N I N K Q I D G T E L D S K P L E D V V I A T Y N N G D V L P A F N N A A Q A W N H E F F W G C M K P . . . C G G G K P S G E L L				
	KMT12301-B.vulgaris	D L K P P P Y P F D A L E P P H M S S R T F E F H W G K H H R A Y V D N I N K Q I D G T E L D G L P L E E V V R I T Y N K G D V L P S F N N A A Q A W N H E F F W E S M K P . . . S G G G K P S G E L L				
	Soltu_DM.02G001300.1	G L K T P P Y P K L D A L E P P Y M S Q S M V E I H W G E H H R G Y V E S I N K Q I E K N D I F Y G C T M E Q L I K L T Y N N G N P L P E F S D A A Q V W N H D F F W E S M O P . . . G G G D M P K L G L L				
	Solyc02g021140.3.1-S	G L K T P P Y P K L D A L E P P Y M S Q S M V E I H W G E H H R G Y V E A I N K Q L E K N D I L Y G C T M E E L I R V T Y N N G N P L P E F A H A A Q V W N H D F F W E S M O P . . . G G G D M P K L G L L				
	PHT65977-C.annuum	G L K T P P Y P K L D A L E P P Y M S Q S M V E I H W G E H H R G Y V E A I N K Q L E K N D I L Y G C T M E E L I R V T Y N N G N P L P E F A H A A Q V W N H D F F W E S M O P . . . G G G D M P K L G L L				
	OIT35514-N.attenuata	G L K T P P Y P K L D A L E P P Y M S Q S M V E I H W G E H H R G Y V E A I N K Q L E K N D I L Y G C T M E E L I R V T Y N N G N P L P E F A H A A Q V W N H D F F W E S M O P . . . G G G D M P K L G L L				
	ESW18072-P.vulgaris	G L T T P P Y P E L D A L E P P Y M S K R T I D M H W G E Y H Q N F I E G I N K Q L E K D I L Y G Y T L D E L I R V T Y N N G N P L P E F N N A A Q V W N H D F F W E S M O P . . . G G G D M P K L G L L				
B	KRG89844-G.max	S L K P P P Y P F D A L E P P Y M S K R T L E V H W G E H H R G Y V E S I N K Y L G K D I L Y G Y T L D E L I R V T Y N N G N P L P E Y N V A A Q V W N H D F F W E S M O P . . . G G G N L P I L G L L				
	OTF85545-H.annuus	G L K T P P Y P L D A L E P P Y M S R R T L E V H W G K H H R G Y V D N I N K Q L G K D R L Y G Y T M E E L I K A T Y N N G N P L P E F N N A A Q V Y N H D F F W E S M O P . . . G G G D P P Q K G V L				
	AT5G23310.1-A.thalia	S L P D L A D Y G A L E P A I S G E I M Q L H H Q K H H Q T Y I T Y N N K A L E Q L D . . . D A I A K G D A S T A V K L Q S A I K F N G G G H V . N H S I F W K N I A B T K E G G G E P P H G S S L G				
	OTG18294-H.annuus	S L P D L A D Y G A L E P A I S G E I M Q L H H Q K H H Q T Y I T Y N N K A L E Q L D . . . D A I A K G D A S T A V K L Q S A I K F N G G G H V . N H S I F W K N I A B T K E G G G E P P H G S S L G				
	OAY46399-M.esculenta	S L P D L A D Y G A L E P A I S G E I M Q L H H Q K H H Q T Y I T Y N N K A L E Q L D . . . D A I A K G D A S T A V K L Q S A I K F N G G G H V . N H S I F W K N I A B T K E G G G E P P H G S S L G				
	KMT16785-B.vulgaris	S L P D L A D Y G A L E P A I S G E I M Q L H H Q K H H Q T Y I T Y N N K A L E Q L D . . . D A I A K G D A S T A V K L Q S A I K F N G G G H V . N H S I F W K N I A B T K E G G G E P P H G S S L G				
	PHT82083-C.annuum	S L P D L A D Y G A L E P A I S G E I M Q L H H Q K H H Q T Y I T Y N N K A L E Q L D . . . D S I N K G D S P T A V A K L G A I K F N G G G H I . N H S V F W N N I A B T R E G G G E P P K G S S L G				
	Solyc06g049080.3.1-S	S L P D L A D Y G A L E P A I S G E I M Q L H H Q K H H Q T Y I T Y N N K A L E Q L H . . . D A I S K G D A P T V A K L H S A I K F N G G G H I . N H S I F W N N I A B V S E G G G E P P K G S S L G				
	Soltu_DM.06G011380.1	S L P D L A D Y G A L E P A I S G E I M Q L H H Q K H H Q T Y I T Y N N K A L E Q L H . . . D A I S K G D A P T V A K L H S A I K F N G G G H I . N H S I F W N N I A B V S E G G G E P P K G S S L G				
	OIS95867-N.attenuata	S L P D L A D Y G A L E P A I S G E I M Q L H H Q K H H Q T Y I T Y N N K A L E Q L H . . . D A I S K G D A P T V A K L H S A I K F N G G G H I . N H S I F W N N I A B V S E G G G E P P K G S S L G				
KZM96565-D.carota	T L P D L A D Y G A L E P A I S G E I M K L H H Q K H H Q T Y V T N N K A L E Q L D . . . A A V S R S D S T S I A K L H A A L K F N G G G H I . N H S I F W K N I A B V A E G G G E P P K G S S I G					
consensus>50						
		L . . p p y . l d a l # p . m s . . . t l e . h w g k h h r . % i d n l n k q i e . . d . l . g . t l e d . i . v t y n k g n . l p . % n n a a q v w n h q f f w e s m . P . . . g g g e . P . g . l l				

Nastavak Slike 30. na strani 62.





Slika 30. Poravnanja Mn-FeSOD proteinskih sekvenci korišćenih za kreiranje filogenetskog stabla. Identični regioni su zasenčeni crvenom bojom, a slični regioni su uokvireni.

## 4.2. Ispitivanje ekspresije *StSOD* gena

*In silico* analizom nukleotidnih sekvenci gena preuzetih iz Spud DB baze podataka genoma duplog monoploidnog klona krompira iz grupe Phureja DM 1-3 516 R44 (v6.1), ustanovljeno je postojanje osam *StSOD* gena. Kako bi se proverilo da li su identifikovani geni funkcionalni, dizajnirani su prajmeri (odjeljak 3.6.5.) i potom je ispitivana ekspresija *StSOD* gena u tetraploidnim genotipovima komercijalnih sorti *S. tuberosum*. U slučajevima gde postoji više transkripata jednog gena, prajmeri su kreirani tako da budu zajednički za sve transkripte tog gena.

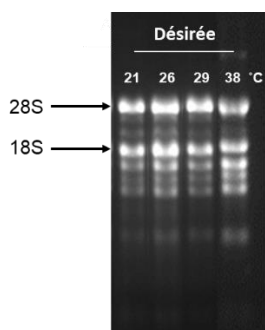
Uticaj temperature na ekspresiju *StSOD* gena najpre je proučavan u listovima *in vitro* gajenih biljaka sorte Désirée. Osim što je česta model sorta i najrasprostranjenija kultivisana sorta krompira u Srbiji, Désirée je i relativno termotolerantna sorta (Demirel i sar., 2020), te je stoga odabrana za polazna ispitivanja. U istraživanjima su primenjeni dugotrajni tretmani optimalnom temperaturom za *in vitro* gajenje biljaka krompira (21 °C, 3 nedelje), povišenom (26 °C, 3 nedelje) i visokom temperaturom (29 °C, 3 nedelje), kao i kratkotrajni tretman ekstremno visokom temperaturom, tj. toplotni šok (38 °C, 4 h). Kako bi se ustanovilo da li su slični obrasci ekspresije *StSOD* gena prisutni i u drugim sortama (genotipovima) krompira, ispitivanja su obuhvatila sorte Agria i Kennebec. S obzirom da literaturni podaci ukazuju na značaj egzogene primene SA u indukciji tolerancije biljaka krompira na abiotički stres (Elwan i sar., 2018; López-Delgado i sar., 2018; Mostafa i sar., 2019), ispitivan je uticaj SA na ekspresiju *StSOD* gena i na morfološke osobine biljaka tokom različitih temperaturnih tretmana. Takođe, ispitivana je i ekspresija gena koji kodiraju HSP proteine, pokazatelje toplotnog stresa.

Pored navedenog, uticaj visokih temperatura na ekspresiju *StSOD* gena ispitivan je i u *ex vitro* uslovima tokom dugotrajnog toplotnog stresa (30/20°C, dan/noć). Efekat visoke temperature na ekspresiju *StSOD* gena ispitivan je u različitim biljnim organima, uključujući listove različite fiziološke starosti, stolone, korenove i krtole, kako bi se ustanovilo da li postoji razlika u organ-specifičnoj ekspresiji.

### 4.2.1. Uticaj različitih temperaturnih tretmana na ekspresiju *StSOD* gena u listovima biljaka sorte Désirée gajenih *in vitro*

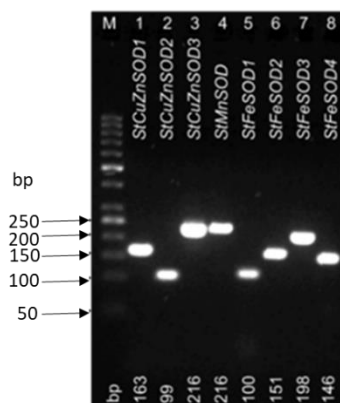
Polazna ispitivanja uticaja temperature na ekspresiju *StSOD* gena su urađena u listovima *in vitro* gajenih biljaka sorte Désirée. Biljke su izložene optimalnoj temperaturi za gajenje krompira (21 °C, 3 nedelje), dugotrajnim tretmanima blago povišenom (26 °C, 3 nedelje) i visokom temperaturom (29 °C, 3 nedelje) i tretmanu toplotnog šoka (38 °C, 4 h).

Po izolaciji iz biljnog materijala, urađena je kvantifikacija i provera kvaliteta RNK spektrofotometrijski i na osnovu dobijenih vrednosti odnosa apsorbanaci  $A_{260}/A_{280}$  (~2), utvrđeno je da su izolati RNK bili „čisti“, bez značajne kontaminacije. Kvalitet izolovane RNK potvrđen je i elektroforetskim razdvajanjem RNK na 1,5% agaroznom gelu (**Slika 31.**).



**Slika 31.** Provera kvaliteta izolovane RNK iz listova biljaka gajenih *in vitro*.

Za analizu ekspresije *StSOD* gena su korišćeni prajmeri prikazani u odeljku 3.6.5. (Tabela 5.). Provera specifičnosti prajmera za *StSOD* transkripte i određivanje veličine dobijenih amplikona urađeni su elektroforetski na 2% agaroznom gelu uz upotrebu DNK markera (GeneRuler 50 bp). U slučajevima gde jedan gen ima više transkripata, prajmeri su dizajnirani tako da budu zajednički za sve transkripte tog gena. Na osnovu dobijenih rezultata ustanovljeno je da su korišćeni prajmeri specifični i da su dali produkte čija je veličina približna očekivanoj (Slika 32. i Tabela 13.).



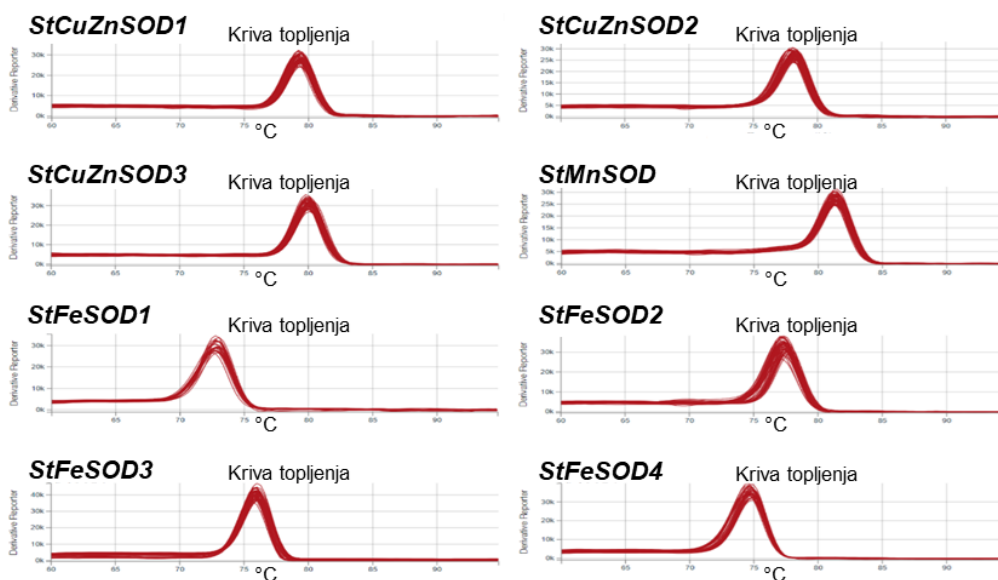
**Slika 32.** Provera specifičnosti prajmera ispitivanih *StSOD* gena i određivanje veličine dobijenih amplikona. M, DNK marker; bp, bazni parovi.

**Tabela 13.** Veličina dobijenih amplikona korišćenjem dizajniranih prajmera.

Naziv prajmera	Očekivana veličina amplikona (bp)	Dobijena veličina amplikona (bp)
<i>StCuZnSOD1</i>	168	163
<i>StCuZnSOD2</i>	103	99
<i>StCuZnSOD3</i>	231	216
<i>StMnSOD</i>	231	216
<i>StFeSOD1</i>	109	100
<i>StFeSOD2</i>	159	151
<i>StFeSOD3</i>	210	198
<i>StFeSOD4</i>	150	146

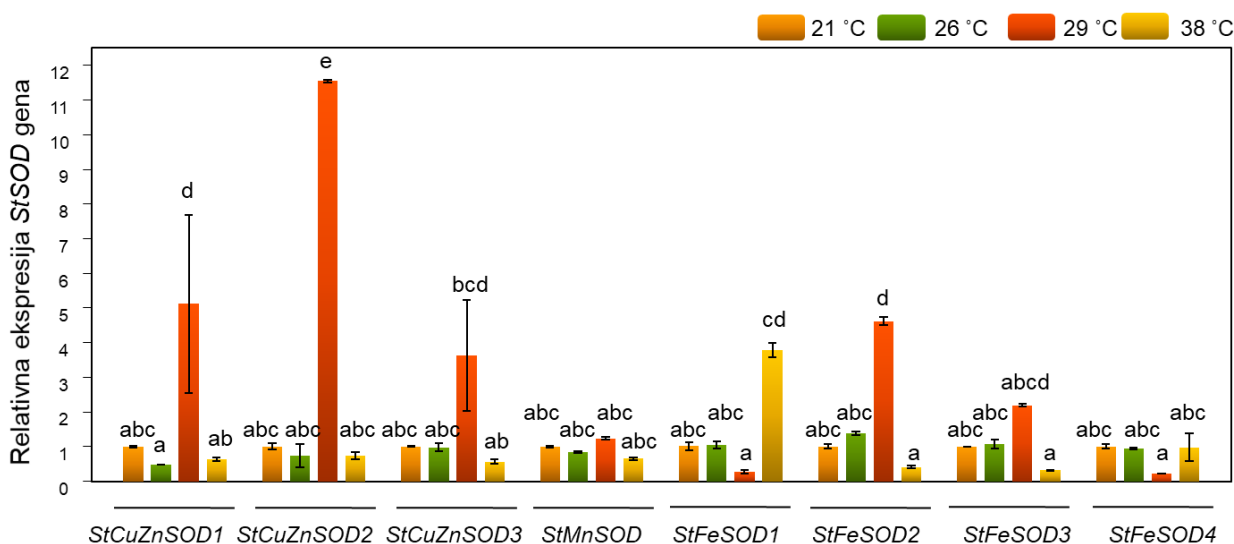
Napomena: bp, bazni parovi.

Za svaku qRT-PCR reakciju urađena je na kraju analiza topljenja produkata amplifikacije, čime je dodatno testirana efikasnost dizajniranih prajmera (Slika 33.). Na osnovu dobijenih rezultata uočeno je da svi specifični produkti PCR reakcije imaju isti oblik i poziciju krive topljenja, kao i da nisu zapažene krive topljenja nespecifičnih produkata, što ukazuje na to da su korišćeni prajmeri bili specifični za transkripte *StSOD* gena u qRT-PCR reakcijama.



**Slika 33.** Zbirne krive topljenja produkata qRT-PCR amplifikacije.

Rezultati ekspresije *StSOD* gena tokom različitih temperaturnih tretmana, dobijeni qRT-PCR metodom, normalizovani su prema aritmetičkoj sredini kontrolnih gena (*60SL36* i *CYC*) i preračunati korišćenjem  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metode. Na osnovu rezultata prikazanih na **Slici 34.** uočava se da su svi identifikovani *StSOD* geni eksprimirani u listovima *in vitro* gajenih biljaka sorte Désirée. Tretman toplotnog šoka (38 °C, 4 h) indukovao je 3,7 puta veću ekspresiju jedino *StFeSOD1* gena u odnosu na ekspresiju pri optimalnoj temperaturi (21 °C), dok je tretman dugotrajnim toplotnim stresom (29 °C, 3 nedelje) prouzrokovao povećanje nivoa ekspresije više *StSOD* gena i to: 5 puta veću ekspresiju *StCuZnSOD1*, 11,4 puta *StCuZnSOD2* i 4,6 puta veću ekspresiju *StFeSOD2* gena u odnosu na ekspresiju u optimalnim temperaturnim uslovima. Dugotrajni tretman blago povišenom temperaturom (26 °C, 3 nedelje) nije imao uticaja na ekspresiju *StSOD* gena kod biljaka krompira sorte Désirée.

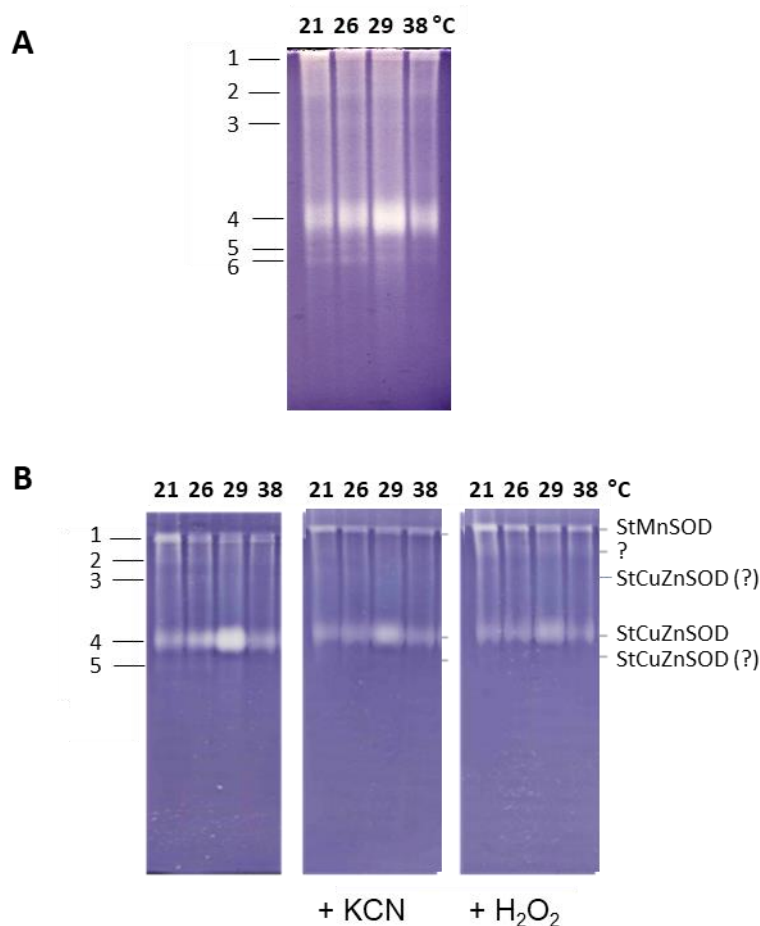


**Slika 34.** Uticaj različitih temperaturnih tretmana na relativnu ekspresiju *StSOD* gena u listovima *in vitro* gajenih biljaka sorte Désirée. Ekspresija *StSOD* gena analizirana je qRT-PCR metodom, normalizovana prema aritmetičkoj sredini kontrolnih gena (*60SL36* i *CYC*) i preračunata korišćenjem  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metode. Rezultati na graficima predstavljaju srednje vrednosti tri biološka ponavljanja  $\pm$  standardna greška.

#### 4.2.2. Uticaj različitih temperaturnih tretmana na aktivnost SOD enzima u listovima biljaka sorte Désirée gajenih *in vitro*

Nakon ispitivanja ekspresije *StSOD* gena, praćena je aktivnost StSOD enzima u listovima biljaka izloženih dugotrajnim temperaturnim tretmanima (21 °C, 26 °C i 29 °C, 3 nedelje) i kratkotrajnom toplotnom šoku (38 °C, 4 h). Za identifikaciju različitih tipova StSOD korišćeni su inhibitori (3 mM KCN i 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Na osnovu eseja za određivanje aktivnosti StSOD, detektovana je jedna intenzivna traka i pet traka slabijeg intenziteta (**Slika 35. A**). Traka broj 4 je najizraženija pri svim temperaturnim tretmanima, a posebno pri dugotrajnom tretmanu visokom temperaturom. Zanimljivo je da kratkotrajni tretman (toplotni šok) nije doveo do povećanja aktivnosti ovog enzima.



**Slika 35.** Esej aktivnosti StSOD izolovanih iz listova *in vitro* gajenih biljaka sorte Désirée. Biljke su izložene temperaturama od 21 °C, 26 °C, 29 °C u trajanju od tri nedelje, ili 38 °C tokom 4 h. (**A**) Aktivnost svih StSOD. (**B**) Identifikacija različitih StSOD korišćenjem selektivnih inhibitora KCN (3 mM) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mM).

Identifikacija različitih izoformi SOD urađena je korišćenjem selektivnih inhibitora KCN i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Slika 35. B**). Poznato je da KCN inhibira CuZnSOD, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibira CuZnSOD i FeSOD, dok dati inhibitori nemaju efekta na aktivnost MnSOD. Budući da se proteinska traka 1 uočava na svim gelovima, može se pretpostaviti da ona pripada MnSOD. Traka broj 2 je veoma slabo uočljiva na gelovima koji su inkubirani u puferima sa selektivnim inhibitorima i ne može se sa sigurnošću utvrditi kojem tipu SOD pripada. Proteinska traka 3 se veoma slabo uočava na gelu koji nije tretiran inhibitorima, ali se ne primećuje na drugim gelovima. Stoga, može se pretpostaviti da ova traka

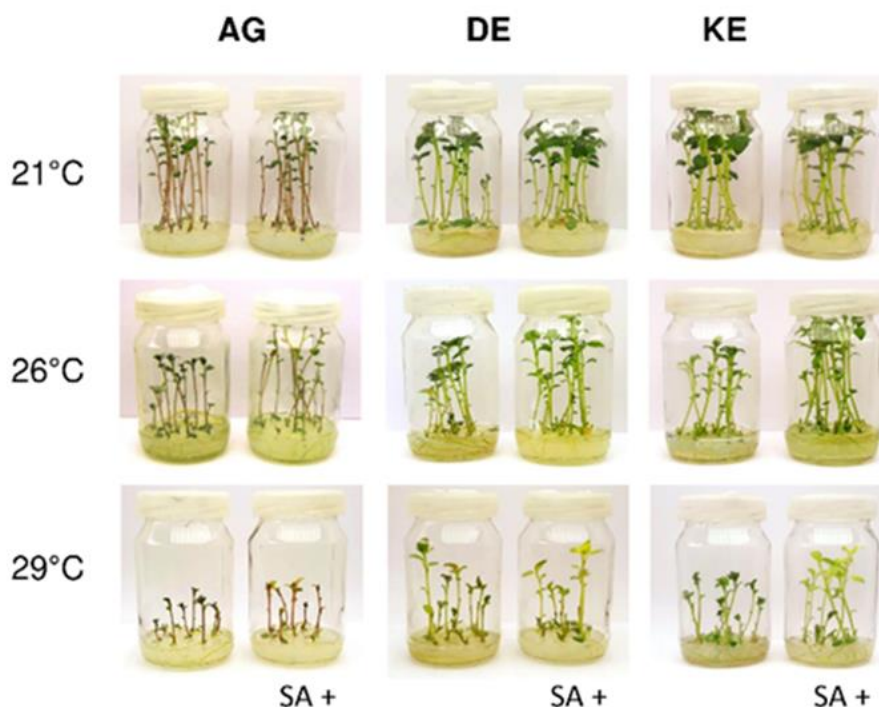
verovatno pripada CuZnSOD izoformi. Traka broj 4 je najintenzivnija, ali se zapaža da na gelovima inkubiranim sa inhibitorima, njen intenzitet opada. KCN i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nisu u potpunosti inhibirali, ali su suprimirali aktivnost ovog enzima i zato se pretpostavlja da ova proteinska traka najverovatnije pripada CuZnSOD. Usled velike zastupljenosti i aktivnosti ove izoforme, primenjene koncentracije inhibitora verovatno nisu bile dovoljne za njenu potpunu inhibiciju. Traka broj 5 se slabije uočava na gelovima koji su tretirani KCN i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u odnosu na gel koji nije tretiran inhibitorima, na osnovu čega se može pretpostaviti da ova traka verovatno pripada CuZnSOD izoformi.

Poređenjem rezultata analize aktivnosti SOD (**Slika 35.**) i ekspresije *StSOD* gena (**Slika 34.**), može se pretpostaviti da enzim koji pokazuje najveću aktivnost u uslovima dugotrajnog toplotnog stresa (proteinska traka 4) predstavlja visoko ekspimiranu citosolnu ili hloroplastnu izoformu CuZnSOD (*StCuZnSOD1* ili *StCuZnSOD2*).

#### 4.2.3. Uticaj temperature i SA na ekspresiju *StSOD* gena i morfologiju biljaka odabranih genotipova krompira gajenih *in vitro*

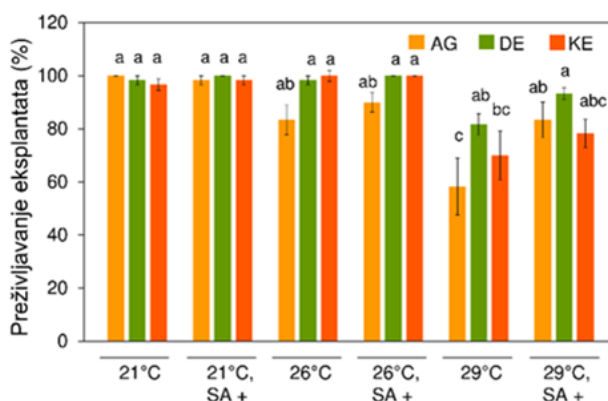
##### 4.2.3.1. Uticaj temperature i SA na preživljavanje eksplantata, rastenje i razviće biljaka krompira

Ispitivanje uticaja dugotrajnih tretmana povišenom i visokom temperaturom (26 °C i 29 °C, 3 nedelje) i egzogene primene SA na preživljavanje eksplantata i morfološke karakteristike *in vitro* kultura krompira urađeno je kod sledećih sorti krompira: Agria, Désirée i Kennebec. Kontrolna grupa biljaka je gajena na temperaturi od 21 °C (**Slika 36.**).



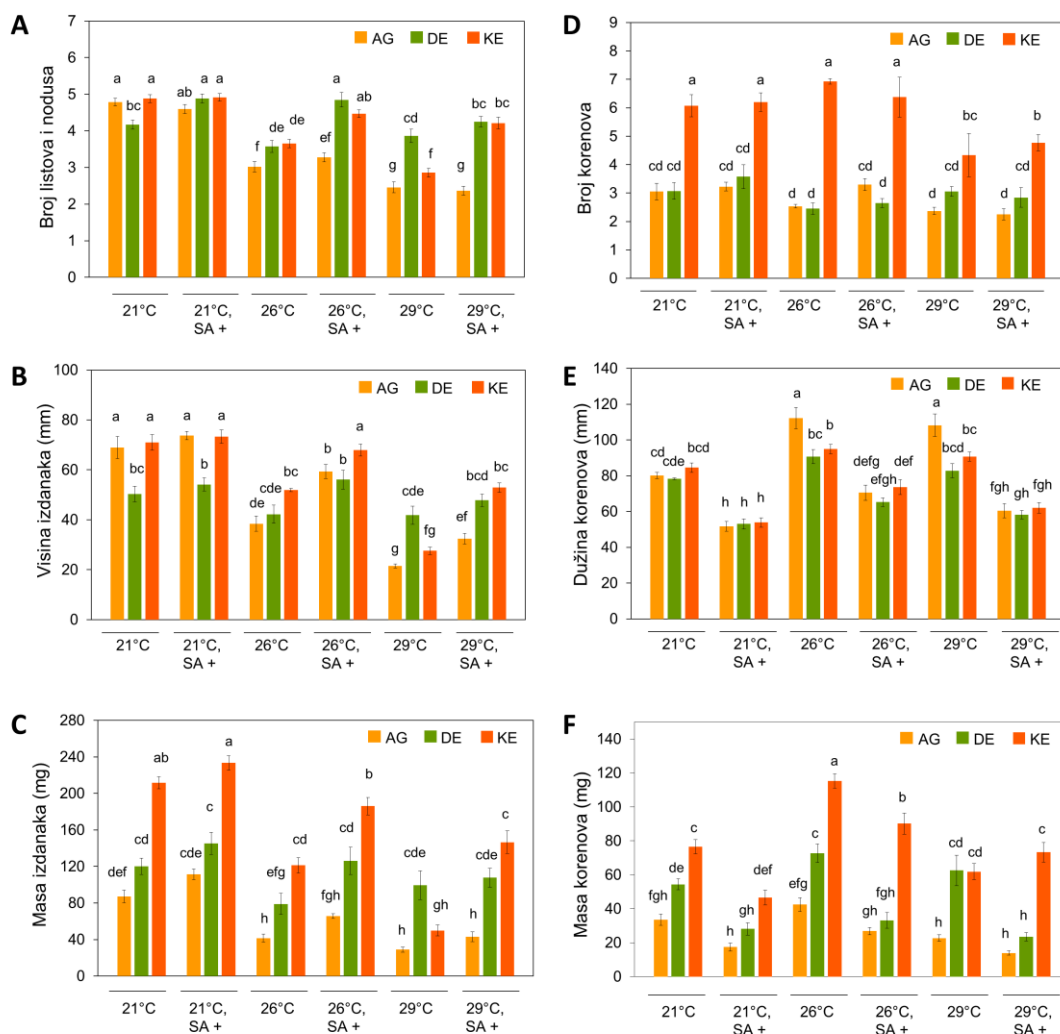
**Slika 36.** Uticaj temperature i SA na rastenje i preživljavanje eksplantata biljaka krompira gajenih *in vitro*. Korišćeni su dugotrajni tretmani blago povišenom (26 °C, 3 nedelje) i visokom temperaturom (29 °C, 3 nedelje). Kontrolna grupa biljaka gajena je na temperaturi 21 °C. Izdanci su se formirali iz bočnih pupoljaka jednonodalnih odsečaka biljaka krompira, koji su postavljeni na osnovnu MS podlogu bez dodatka (bočica levo) ili sa dodatkom 1 x 10<sup>-5</sup>M SA (bočica desno). Preuzeto iz Rudić i sar. (2022b).

Ispitivani faktori (SA, temperatura i sorta) značajno su uticali na preživljavanje eksplantata. Značajne interakcije između faktora sorta:temperatura [ $F(4, 36)=3,204, p<0,05$ ] i temperatura:SA [ $F(2, 36)=4,572, p<0,05$ ] sugerišu na različit efekat temperaturnih tretmana na preživljavanje sorti krompira, kao i na različit efekat egzogene primene SA na preživljavanje eksplantata u različitim temperaturnim uslovima. Visoka stopa preživljavanja ustanovljena je kod sve tri ispitivane sorte krompira na temperaturi od 21 °C i 26 °C, dok egzogena primena SA nije imala uticaja pri ovim temperaturnim tretmanima (**Slika 37.**). Tretman visokom temperaturom (29 °C) značajno je redukovao stopu preživljavanja eksplantata dve sorte, Agria i Kennebec, dok na preživljavanje eksplantata sorte Désirée nije imao uticaja. Egzogena primena SA pri temperaturi od 29 °C jedino je imala pozitivan uticaj na stopu preživljavanja kod sorte Agria. Nekroze eksplantata su retko uočene, dok su eksplantati kod kojih je došlo do zastoja u razviću učestaliji, što je imalo uticaja na broj biljaka koje su se razvile u uslovima visoke temperature (29 °C).



**Slika 37.** Uticaj temperature i SA na rastenje i preživljavanje eksplantata biljaka krompira gajenih *in vitro*. Procenat preživelih eksplantata određen je na osnovu broja eksplantata kod kojih su se razvili izdanci >10mm. Procenat preživelih eksplantata je prikazan kao srednja vrednost tri ponovljena eksperimenta ± standardna greška. Vrednosti označene različitim slovima se statistički razlikuju na nivou značajnosti  $p<0,05$  što je ustanovljeno *post-hoc* Njuman-Kelsovim (Newman-Keuls) testom. AG, Agria; DE, Désirée; KE, Kennebec; SA +, tretman SA. Preuzeto i modifikovano prema Rudić i sar. (2022b).

Radi ispitivanja uticaja dugotrajnih temperaturnih tretmana i egzogene primene SA na morfološke karakteristike odabranih sorti krompira gajenih *in vitro*, mereni su sledeći parametri: broj listova i nodusa, visina izdanaka, sveža masa izdanaka, broj korenova, dužina korenova i sveža masa korenova. Na osnovu statističke analize ustanovljeno je da sva tri ispitivana faktora (SA, temperatura i sorta) imaju značajan uticaj na razviće listova. Značajna interakcija između sva tri faktora sorta:temperatura:SA, ukazuje da se uticaj SA na razviće listova i nodusa [ $F(4, 36)=5,690, p<0,001$ ], visinu izdanaka [ $F(4, 36)=2,644, p<0,05$ ] i svežu masu izdanaka [ $F(4, 36)=4,250, p<0,01$ ], razlikuje među sortama, kao i u različitim temperaturnim uslovima. Dugotrajni tretman na temperaturi od 26 °C značajno je redukovao broj listova i nodusa kod sve tri ispitivane sorte krompira, dok je tretman na temperaturi od 29 °C redukovao njihov broj samo kod sorti Agria i Kennebec, u odnosu na kontrolne uslove (**Slika 38. A**). Egzogena primena SA nije imala značajnog efekta na broj listova kod sorte Agria tokom primenjenih temperaturnih tretmana, dok je kod sorte Désirée stimulisala njihovo formiranje na temperaturi od 21°C i 26 °C, kao i kod sorte Kennebec u uslovima blago povišene i visoke temperature (26 °C i 29 °C).



**Slika 38.** Uticaj temperature i SA na morfološke karakteristike biljaka krompira gajenih *in vitro*. Mereni su sledeći morfološki parametri: **(A)** broj listova i nodusa, **(B)** visina izdanaka, **(C)** sveža masa izdanaka, **(D)** broj korenova, **(E)** dužina korenova i **(F)** sveža masa korenova. Rezultati na graficima predstavljaju srednje vrednosti tri ponovljena eksperimenta  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim slovima se statistički razlikuju na nivou značajnosti  $p < 0,05$  što je ustanovljeno *post-hoc* Njuman-Kelsovim (Newman-Keuls) testom. AG, Agria; DE, Désirée; KE, Kennebec; SA +, tretman SA. Preuzeto i modifikovano prema Rudić i sar. (2022b).

Rezultati prikazani na **Slici 38. B** pokazuju da tretman SA nije imao efekta na visinu izdanaka u kontrolnim uslovima (21 °C), dok je stimulisao rast izdanaka tokom dugotrajnog izlaganja blago povišenoj temperaturi (26 °C) kod sve tri ispitivane sorte krompira. Primena SA tokom dugotrajnog tretmana visokom temperaturom (29 °C) nije imala uticaja na visinu izdanaka sorte Désirée, dok je kod druge dve sorte ispoljila pozitivan efekat. Uočeno je da oba dugotrajna temperaturna tretmana nemaju uticaja na rast izdanaka sorte Désirée, ali redukuju visinu izdanaka kod sorti Agria i Kennebec. Na osnovu rezultata prikazanih na **Slici 38. C**, ustanovljeno je da u kontrolnoj grupi biljaka egzogena primena SA nema efekta na svežu masu izdanaka ispitivanih sorti. Pozitivan efekat tretmana SA na svežu masu izdanaka uočen je kod sorte Kennebec tokom dugotrajnih tretmana blago povišenom i visokom temperaturom, kao i kod sorte Désirée u uslovima dugotrajnog tretmana blago povišenom temperaturom. Sveža masa izdanaka biljaka krompira sorti Agria i Kennebec, koje su gajene u uslovima dugotrajnih tretmana blago povišenom i visokom temperaturom, je manja u poređenju sa izdancima iz kontrolne grupe. Sa druge strane, na svežu masu izdanaka biljaka sorte



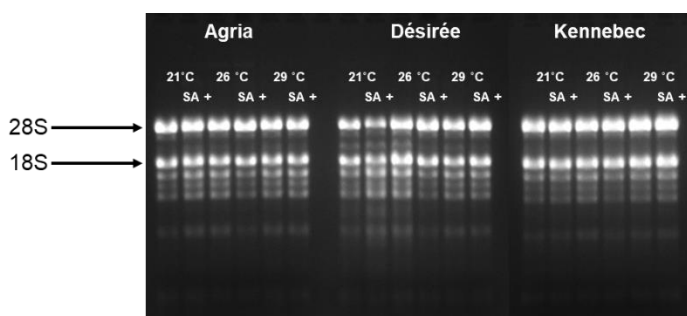
Désirée negativno se odrazio dugotrajni tretman blago povišenom temperaturom, dok dugotrajni tretman visokom temperaturom nije imao značaja.

Rezultati predstavljeni na **Slici 38. D** pokazuju da sorta Kennebec formira najveći broj korenova pri svim temperaturnim tretmanima u odnosu na druge dve sorte, kod kojih je broj formiranih korenova približno jednak. Značajne interakcije između faktora sorta:temperatura [F(4, 36)=6,743, p<0,001] sugerišu na različit efekat temperaturnih tretmana na broj korenova kod ispitivanih sorti krompira. Pored toga, ustanovljeno je da egzogena primena SA nema uticaja na broj korenova kod ispitivanih sorti pri primenjenim temperaturnim tretmanima. Dugotrajni tretmani blago povišenom (26 °C) i visokom temperaturom (29 °C) ne ispoljavaju efekat na broj korenova kod sorti Agria i Désirée, dok je kod sorte Kennebec uočeno da tretman visokom temperaturom redukuje njihov broj u poređenju sa brojem korenova iz kontrolne grupe. Tretman SA se značajno negativno odrazio na izduživanje korenova kod ispitivanih sorti [F(1, 36)=333,591, p<0,001] (**Slika 38. E**), dok dugotrajni tretmani blago povišenom i visokom temperaturom nisu imali efekta na njihov rast, osim kod sorte Agria gde je došlo do izduživanja korenova u odnosu na kontrolnu grupu (21 °C), na šta ukazuje i manji značaj interakcije između faktora sorta:temperatura [F(4, 36)=2,704, p<0,05]. Na osnovu rezultata prikazanih na **Slici 38. F**, zapaža se da ispitivane sorte krompira različito reaguju na tretman SA pri različitim temperaturnim tretmanima, što pokazuje i značajna interakcija između sva tri ispitivana faktora sorta:tretman:SA [F(4, 36)=4,778, p<0,01]. SA nema uticaja na svežu masu korenova jedino kod sorte Agria, dok kod sorte Désirée ispoljava negativan efekat tokom dugotrajnih temperaturnih tretmana (26 °C i 29 °C), kao i u kontrolnim uslovima. Takođe, negativan efekat SA na svežu masu korenova utvrđen je kod sorte Kennebec tokom dugotrajnog tretmana blago povišenom temperaturom i u kontrolnim uslovima. Dugotrajni temperaturni tretmani nemaju uticaja na svežu masu korenova sorte Agria, dok dugotrajni tretman blago povišenom temperaturom dovodi do povećanja njihove mase kod sorti Désirée i Kennebec, u odnosu na kontrolu.

#### 4.2.3.2. Ekspresija *StHSP* gena kao pokazatelja (markera) toplotnog stresa

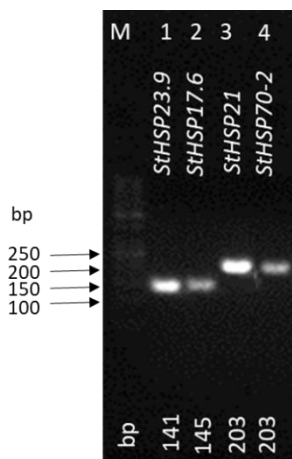
Kako bi se ustanovilo da li dugotrajni tretmani povišenom ili visokom temperaturom prouzrokuju toplotni stres kod tretiranih biljaka, urađena je i analiza ekspresije *StHSP* gena. Ispitivanje je sprovedeno u listovima tri sorte krompira (Agria, Désirée i Kennebec), u kontrolnom (21 °C, 3 nedelje) i dugotrajnim tretmanima blago povišenom (26 °C, 3 nedelje) i visokom temperaturom (29 °C, 3 nedelje).

Po izolaciji iz biljnog materijala, urađena je kvantifikacija i provera kvaliteta RNK spektrofotometrijski i na osnovu dobijenih vrednosti odnosa apsorbanci  $A_{260}/A_{280}$  (~2), utvrđeno je da su izolati RNK bili „čisti“, bez značajne kontaminacije. Kvalitet izolovane RNK potvrđen je i elektroforetskim razdvajanjem RNK na 1,5% agaroznom gelu (**Slika 39.**).



**Slika 39.** Provera kvaliteta izolovane RNK iz listova biljaka gajenih *in vitro* tokom različitih temperaturnih tretmana. SA +, tretman SA.

Za analizu ekspresije *StHSP* gena su korišćeni prajmeri dati u odeljku 3.6.5. (Tabela 6.). Provera specifičnosti prajmera za amplifikaciju *StHSP* transkripata i određivanje veličine dobijenih amplicona urađeni su elektroforetski na 2% agaroznom gelu uz upotrebu DNK markera (GeneRuler 50 bp). U slučajevima gde više gena kodiraju isti StHSP protein, prajmeri su dizajnirani tako da budu zajednički za sve transkripte tih gena. Na osnovu dobijenih rezultata ustanovljeno je da su korišćeni prajmeri specifični i da su dali produkte čija je veličina približna očekivanoj (Slika 40. i Tabela 14.).



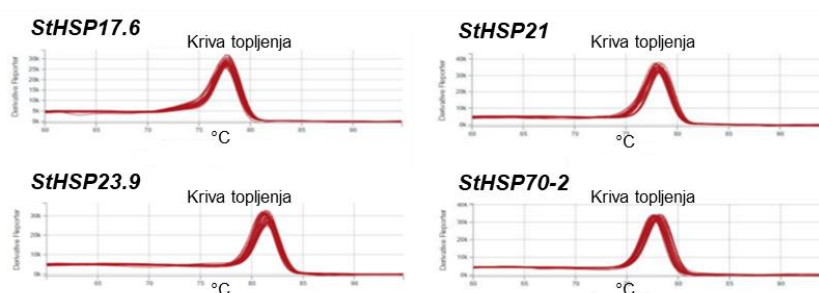
**Slika 40.** Provera specifičnosti prajmera ispitivanih *StHSP* gena i određivanje veličine dobijenih amplicona. M, DNK marker; bp, bazni parovi.

**Tabela 14.** Veličina dobijenih amplicona korišćenjem dizajniranih prajmera.

Naziv prajmera	Očekivana veličina amplicona (bp)	Dobijena veličina amplicona (bp)
<i>StHSP17.6</i>	138	145
<i>StHSP21</i>	205	203
<i>StHSP23.9</i>	137	141
<i>StHSP70-2</i>	200	203

Napomena: bp, bazni parovi.

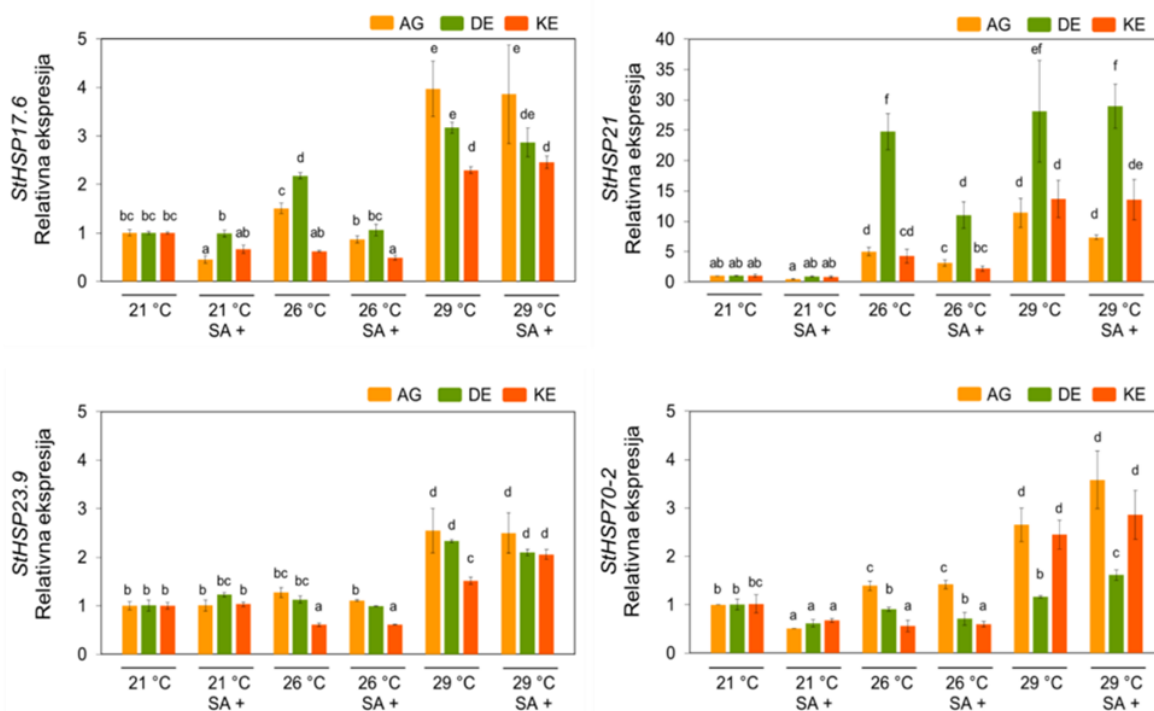
Za svaku qRT-PCR reakciju urađena je na kraju analiza topljenja produkata amplifikacije, čime je dodatno testirana efikasnost korišćenih prajmera (Slika 41.). Na osnovu dobijenih rezultata uočeno je da svi specifični produkti PCR reakcije imaju isti oblik i poziciju krive topljenja i ne uočavaju se krive topljenja nespecifičnih produkata, što ukazuje na to da su korišćeni prajmeri bili specifični za transkripte *StHSP* gena u qRT-PCR reakcijama.



**Slika 41.** Zbirne krive topljenja produkata qRT-PCR amplifikacije.

Rezultati ekspresije *StHSP* gena tokom različitih temperaturnih tretmana, dobijeni qRT-PCR metodom, normalizovani su prema aritmetičkoj sredini kontrolnih gena (*60SL36* i *CYC*) i preračunata korišćenjem  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metode.

Na osnovu rezultata ustanovljeno je da dugotrajni tretman visokom temperaturom (29 °C, 3 nedelje), indukuje ekspresiju svih ispitivanih *StHSP* gena, a posebno *StHSP21* (Slika 42.). Toplotni stres je indukovao 11 puta veću ekspresiju *StHSP21* kod sorte Agria, čak 28 puta kod Désirée i 13 puta kod sorte Kennebec u odnosu na kontrolu.



**Slika 42.** Uticaj temperature i SA na relativnu ekspresiju *StHSP* gena u listovima biljaka krompira gajenih *in vitro*. Prikazana je relativna ekspresija *StHSP* gena, koja je preračunata korišćenjem  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metode. Rezultati na graficima predstavljaju srednje vrednosti tri biološka ponavljanja  $\pm$  standardna greška. AG, Agria; DE, Désirée; KE, Kennebec; SA +, tretman SA. Preuzeto i modifikovano prema Rudić i sar. (2022b).

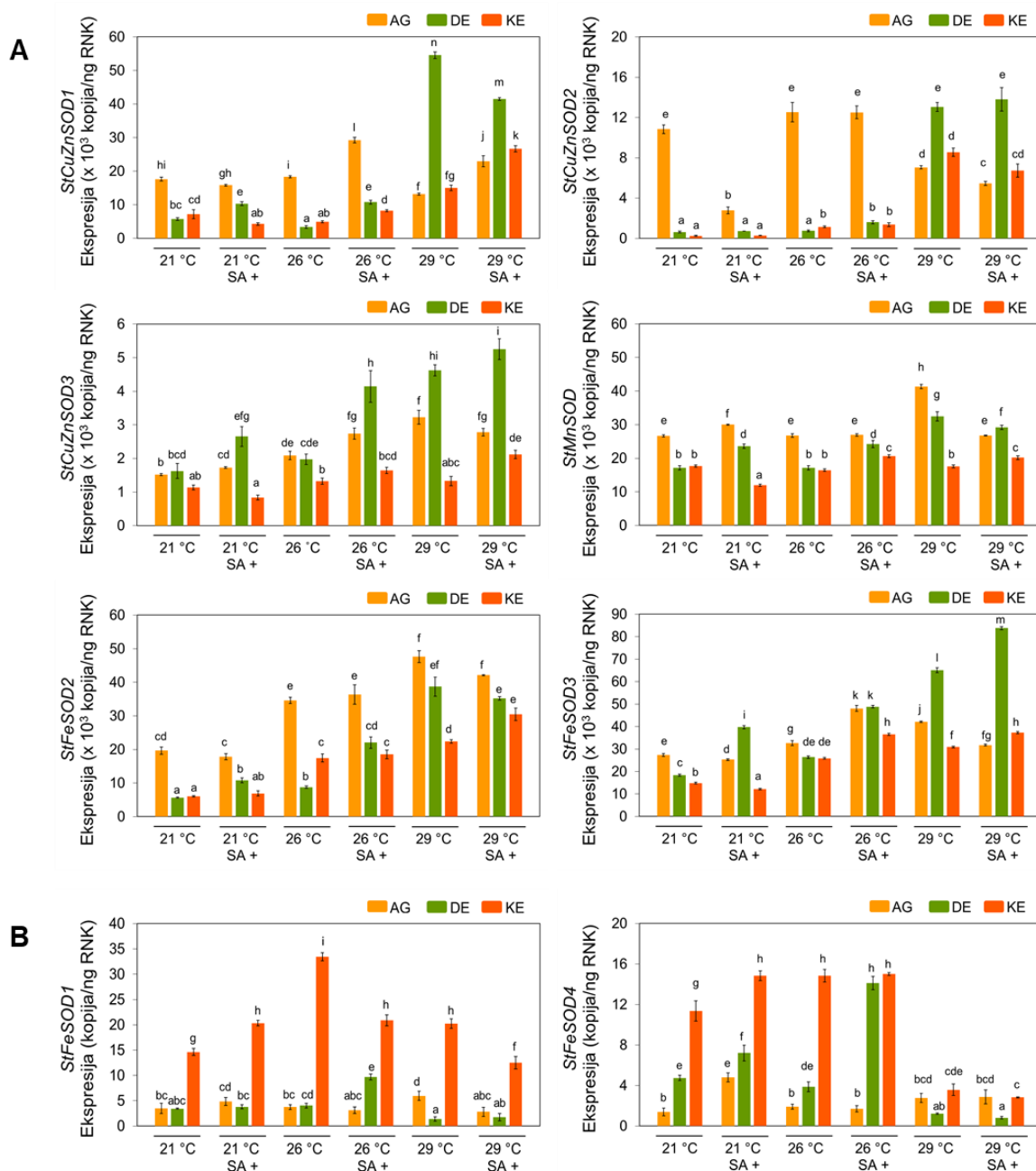
Dugotrajni tretman blago povišenom temperaturom (26 °C) indukovao je ekspresiju *StHSP21* gena kod svih ispitivanih sorti, a najviše kod sorte Désirée (24,5 puta više u odnosu na kontrolu). Takođe, pri ovom temperaturnom tretmanu došlo je do indukcije i *StHSP17.6* gena kod sorte Désirée.

Egzogeno primenjena SA uglavnom nije imala uticaja na povećanje ekspresije ispitivanih gena, sa izuzetkom *StHSP70-2*, gde je pri dugotrajnom tretmanu visokom temperaturom došlo do blage indukcije kod sorte Désirée.

#### 4.2.3.3. Uticaj različitih temperaturnih tretmana i SA na ekspresiju *StSOD* gena u listovima biljaka različitih sorti krompira gajenih *in vitro*

Ispitivanja uticaja dugotrajnih temperaturnih tretmana (26 °C i 29 °C, 3 nedelje) i egzogene primene SA na ekspresiju *StSOD* gena su urađena u listovima *in vitro* gajenih biljaka odabranih sorti krompira (Agria, Désirée i Kennebec). *In vitro* kulture gajene su tri nedelje na tretmanima blago povišenom (26 °C) i visokom temperaturom (29 °C), dok je kontrolna grupa biljaka gajena na temperaturi od 21 °C.

Nivoi ekspresije *StSOD* gena tokom različitih temperaturnih tretmana određeni su qRT-PCR metodom, na osnovu dobijenih apsolutnih vrednosti broja transkripata, koje su normalizovane prema kontrolnim genima (*60SL36* i *CYC*). Metodom qRT-PCR utvrđeno je da kod ispitivanih sorti dolazi do ekspresije svih *StSOD*, ali su uočene značajne razlike u nivou ekspresije pojedinih gena (**Slika 43.**).



**Slika 43.** Apsolutni broj kopija transkripata visoko (**A**) i nisko (**B**) ekspimiranih *StSOD* gena u listovima biljaka krompira gajenih *in vitro*, pri različitim temperaturnim tretmanima uz primenu SA. Ispitivane sorte su: Agria (AG), Désirée (DE) i Kennebec (KE). Apsolutne vrednosti broja transkripata su normalizovane prema kontrolnim genima (*60SL36* i *CYC*). Rezultati na graficima predstavljaju srednje vrednosti tri biološka ponavljanja  $\pm$  standardna greška. Preuzeto i modifikovano prema Rudić i sar. (2022a).

Šest gena (*StCuZnSOD1*, *StCuZnSOD2*, *StCuZnSOD3*, *StMnSOD*, *StFeSOD2* i *StFeSOD3*) je pokazalo visok nivo ekspresije, od najmanje 200 kopija *StCuZnSOD2* transkripata/ng RNK kod sorte Kennebec, do najviše  $65 \times 10^3$  kopija *StFeSOD3* transkripata/ng RNK kod sorte Désirée (**Slika 43.**).

Geni *StFeSOD1* i *StFeSOD4* su slabo eksprimirani, sa najviše 33,4 kopije *StFeSOD1* transkripata/ng RNK kod sorte Kennebec.

Na osnovu rezultata uočeno je da dugotrajni temperaturni tretmani blago povišenom (26 °C) i visokom (29 °C) temperaturom indukuju ekspresiju *StFeSOD2* i *StFeSOD3* gena kod svih ispitivanih sorti (**Slika 43. A**). Sa druge strane, ekspresija preostalih gena je genotip-specifična. U slučaju *StCuZnSOD1* i *StCuZnSOD2* gena ustanovljeno je da visoka temperatura (29 °C) indukuje ekspresiju ovih gena kod sorti Désirée i Kennebec, dok kod sorte Agria dolazi do pada u zastupljenosti njihovih transkripata. U uslovima blago povišene temperature došlo je do male promene u zastupljenosti transkripata ova dva gena. Dugotrajni tretman visokom temperaturom (29 °C) indukovao je ekspresiju *StCuZnSOD3* i *StMnSOD* gena kod sorti Agria i Désirée, dok nije imao efekta na ekspresiju ovih gena kod sorte Kennebec. Dugotrajni tretman temperaturom od 26 °C nije imao značajnijeg uticaja na ekspresiju ovih gena, izuzev blagog porasta nivoa ekspresije *StCuZnSOD3* gena kod sorte Agria.

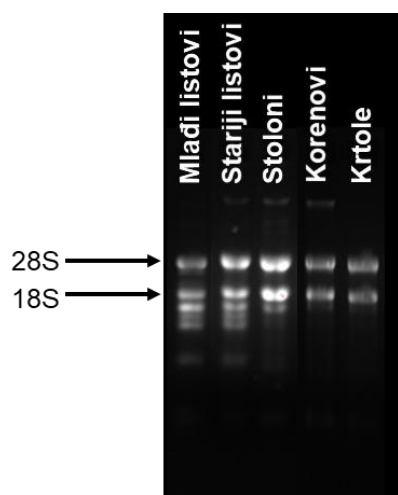
Tretman visokom temperaturom (29 °C) indukovao je ekspresiju *StFeSOD1* gena kod sorti Agria i Kennebec, dok nije imao uticaja na ekspresiju ovog gena kod sorte Désirée (**Slika 43. B**). Blago povišena temperatura (26 °C) indukovala je ekspresiju ovog gena samo kod sorte Kennebec, dok nije imala uticaja kod ostalih ispitivanih sorti. Dugotrajni tretman visokom temperaturom (29 °C) redukovao je ekspresiju *StFeSOD4* gena kod sorti Désirée i Kennebec, dok nije imao efekta na njegovu ekspresiju kod sorte Agria. Sa druge strane, temperatura od 26 °C indukovala je ekspresiju datog gena samo kod sorte Kennebec, ali nije imala efekta kod druge dve sorte.

Na osnovu rezultata prikazanih na **Slici 43**, egzogena primena SA je u većini slučajeva imala mali uticaj na ekspresiju ispitivanih gena. Efekat SA na ekspresiju *StSOD* u uslovima visoke temperature (29 °C) zavisi od genotipa. Na primer, u slučaju *StCuZnSOD1* zapaženo je da egzogena SA indukuje ekspresiju ovog gena kod sorti Agria i Kennebec, dok suprimira njegovu ekspresiju kod sorte Désirée. Sa druge strane, u slučaju *StFeSOD3*, primena SA je indukovala ekspresiju ovog gena kod sorti Désirée i Kennebec, a redukovala ekspresiju datog gena kod sorte Agria. Na temperaturi od 26 °C uočeno je da egzogena SA indukuje ekspresiju *StCuZnSOD1* i *StFeSOD3* gena kod sve tri ispitivane sorte, dok je ekspresija ostalih *StSOD* genotip-specifična.

#### 4.2.4. Ekspresija *StSOD* gena u različitim organima biljaka krompira gajenih *ex vitro*

Ekspresija *StSOD* gena ispitivana je u različitim organima biljaka krompira sorte Désirée, koje su gajene *ex vitro* na temperaturi povoljnoj za rast i tuberizaciju biljaka krompira (20/17 °C, dan/noć) u trajanju od 15 nedelja. Ispitivanja su obuhvatila sledeće organe biljaka krompira: fiziološki mlade i starije listove, stolone, korenove i krtole.

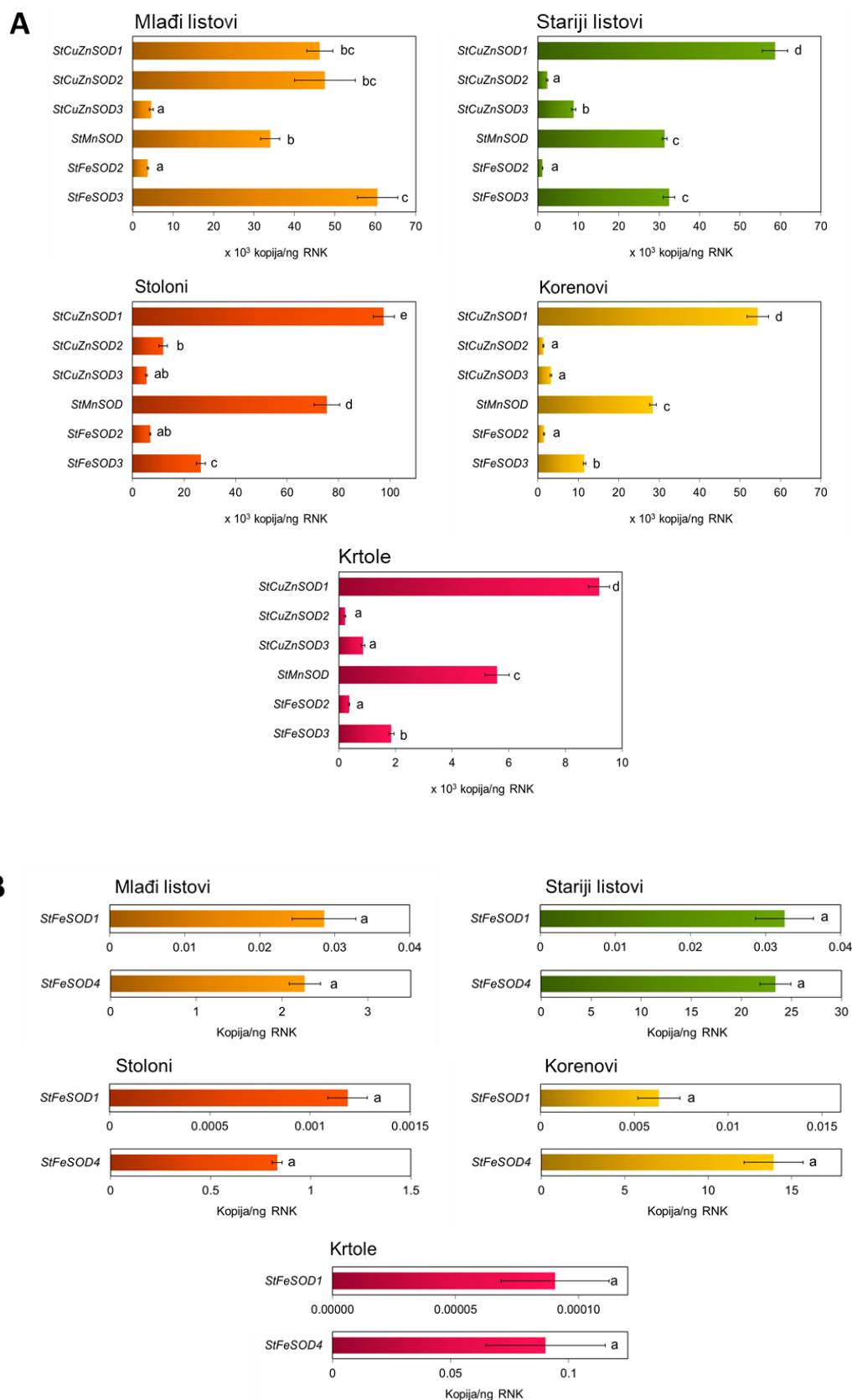
Po izolaciji iz biljnog materijala, urađena je kvantifikacija i provera kvaliteta RNK spektrofotometrijski i na osnovu dobijenih vrednosti odnosa apsorbanci  $A_{260}/A_{280}$  ( $\sim 2$ ), utvrđeno je da su izolati RNK bili „čisti“, bez značajne kontaminacije. Kvalitet izolovane RNK potvrđen je i elektroforetskim razdvajanjem RNK na 1,5% agaroznom gelu (**Slika 44**).



**Slika 44.** Provera kvaliteta izolovane RNK iz različitih biljnih organa sorte Désirée gajene *ex vitro* na temperaturi povoljnoj za rast i tuberizaciju biljaka krompira (20/17 °C, dan/noć).

Nivoi ekspresije *StSOD* gena u različitim biljnim organima određeni su qRT-PCR metodom, na osnovu dobijenih apsolutnih vrednosti broja transkripata, koje su normalizovane prema kontrolnim genima (*60SL36* i *CYC*). Rezultati prikazani na **Slici 45.** pokazuju da u ispitivanim biljnim organima sorte Désirée gajene *ex vitro* dolazi do ekspresije svih *StSOD* gena, ali usled izraženih razlika u nivou njihove ekspresije, dati geni su grupisani u kategorije visoko (**Slika 45. A**) i nisko eksprimiranih gena (**Slika 45. B**).

Grupa visoko eksprimiranih gena obuhvata *StCuZnSOD1*, *StCuZnSOD2*, *StCuZnSOD3*, *StMnSOD*, *StFeSOD2* i *StFeSOD3*. U okviru ove grupe, ustanovljeno je da tri gena (*StCuZnSOD1*, *StMnSOD* i *StFeSOD3*) pokazuju viši nivo ekspresije u odnosu na sve ostale ispitivane *StSOD* gene u svim ispitivanim biljnim organima. U povoljnim temperaturnim uslovima za rasteenje i tuberizaciju krompira (20/17 °C, dan/noć), gen sa najvišim nivoom ekspresije je *StCuZnSOD1*, osim u slučaju mlađih listova, gde je pored njega i *StFeSOD3* pokazao zavidan nivo ekspresije ( $60,5 \times 10^3$  kopija/ng RNK). *StMnSOD* je svuda pokazao visok nivo ekspresije, a najviši u stolonima ( $75,5 \times 10^3$  kopija/ng RNK). *StCuZnSOD2* gen je najviše eksprimiran u mlađim listovima ( $47,5 \times 10^3$  kopija/ng RNK), dok se u drugim organima karakterisao nižim nivoom ekspresije. Geni *StCuZnSOD3* i *StFeSOD2* su se karakterisali nižim nivoom ekspresije u odnosu na ostale gene (do  $9 \times 10^3$  kopija transkripata/ng RNK). Grupa nisko eksprimiranih gena obuhvata *StFeSOD1* i *StFeSOD4*, kod kojih se broj transkripata gena kreće do 25 kopija/ng RNK. Nivoi ekspresije *StFeSOD1* i *StFeSOD4* su najviši u starijim listovima i iznose  $3,2 \times 10^{-2}$  kopija/ng RNK, odnosno 23,4 kopije/ng RNK. Na osnovu dobijenih rezultata, ustanovljeno je da su *StSOD* geni najslabije eksprimirani u krtolama.

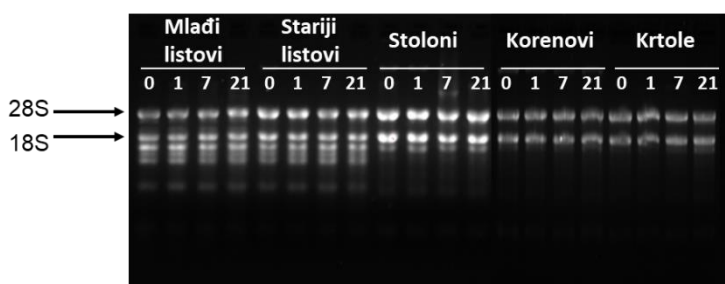


**Slika 45.** Apsolutni broj kopija transkripata visoko (A) i nisko (B) eksprimiranih *StSOD* gena po 1 ng RNK u različitim biljnim organima sorte Désirée gajene *ex vitro* na temperaturi povoljnoj za rast i tuberizaciju biljaka krompira (20/17 °C, dan/noć) u trajanju od 15 nedelja. Apsolutne vrednosti broja transkripata su normalizovane prema kontrolnim genima (*60SL36* i *CYC*). Rezultati na graficima predstavljaju srednje vrednosti tri biološka ponavljanja ± standardna greška.

#### 4.2.5. Uticaj dugotrajnog toplotnog stresa na ekspresiju *StSOD* gena u različitim organima biljaka krompira gajenih *ex vitro*

Ekspresija *StSOD* gena ispitivana je u različitim biljnim organima sorte Désirée gajene *ex vitro* u uslovima toplotnog stresa (30/20 °C). Ispitivanja su urađena u sledećim biljnim organima: fiziološki mlađi i stariji listovi, stoloni, korenovi i krtole. Efekat temperature na biljke krompira praćen je u četiri vremenske tačke: (0) dan pre toplotnog stresa, (1) nakon prvog dana, (7) posle sedmog dana i (21) posle 21. dana dugotrajnog toplotnog stresa.

Po izolaciji iz biljnog materijala, urađena je kvantifikacija i provera kvaliteta RNK spektrofotometrijski i na osnovu dobijenih vrednosti odnosa apsorbanci  $A_{260}/A_{280}$  (~2), utvrđeno je da su izolati RNK bili „čisti“, bez značajne kontaminacije. Kvalitet izolovane RNK potvrđen je i elektroforetskim razdvajanjem RNK na 1,5% agaroznom gelu (**Slika 46.**).

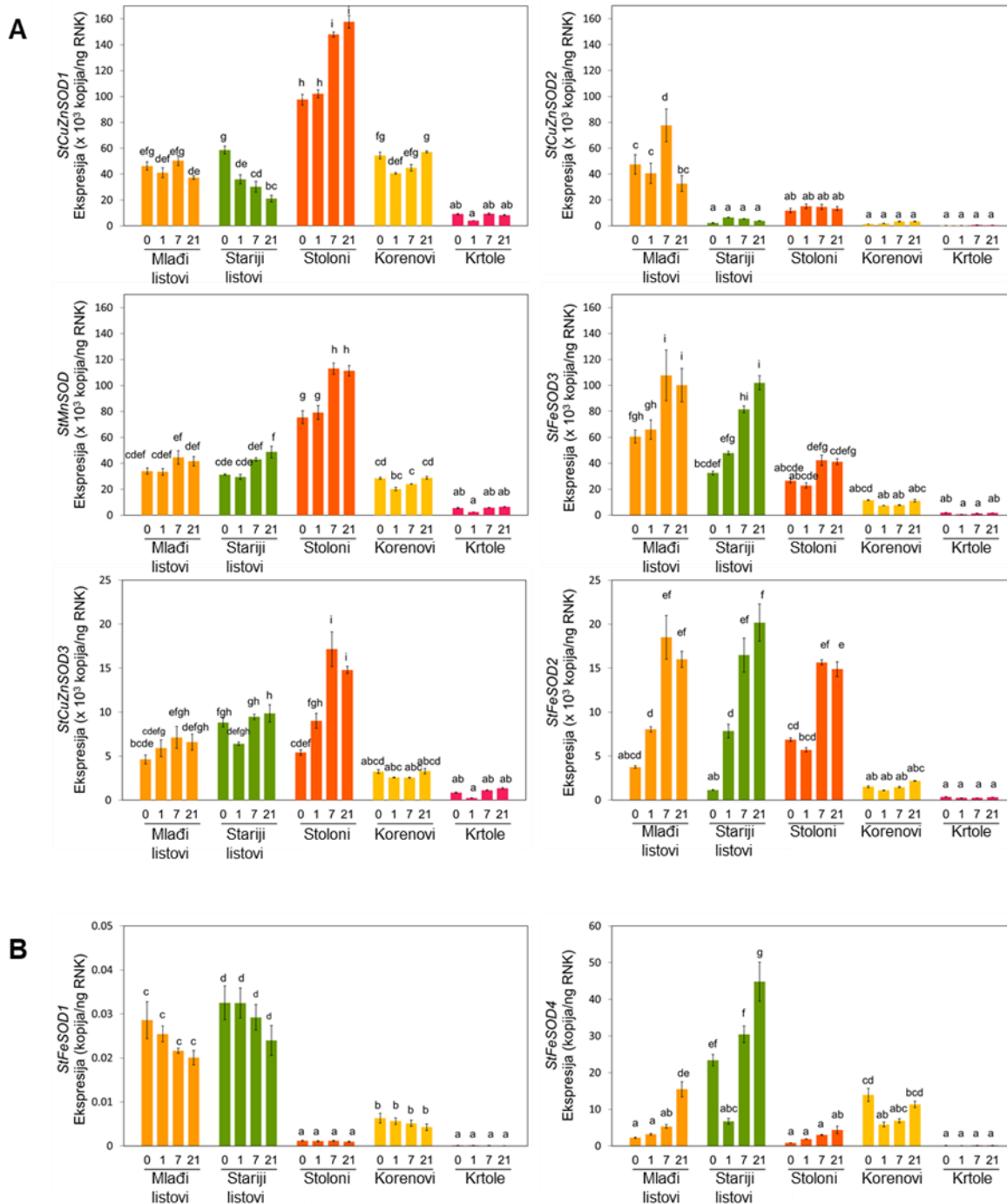


**Slika 46.** Provera kvaliteta izolovane RNK iz različitih biljnih organa sorte Désirée gajene *ex vitro* tokom dugotrajnog toplotnog stresa (30/20 °C) u različitim vremenskim tačkama. Efekat temperature praćen je u četiri vremenske tačke: (0) dan pre izlaganja toplotnom stresu, (1) prvi dan, (7) sedmi dan i (21) 21. dan toplotnog stresa.

Nivoi ekspresije *StSOD* gena u različitim biljnim organima i različitim vremenskim tačkama određeni su qRT-PCR metodom, na osnovu dobijenih apsolutnih vrednosti broja transkripata, koje su normalizovane prema kontrolnim genima (*60SL36* i *CYC*). Na osnovu dobijenih rezultata, uočene su razlike u nivoima ekspresije *StSOD* gena (**Slika 47.**) i ustanovljeno je da su *StFeSOD1* i *StFeSOD4* geni najslabije ekspimirani, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim analizom ekspresije *StSOD* u listovima *in vitro* gajenih biljaka.

*StCuZnSOD1* i *StCuZnSOD3* transkripti su najzastupljeniji u stolonima, a njihov broj se značajno povećao sedmog dana toplotnog stresa. Ustanovljeno je da sedmog i 21. dana tretmana dolazi do 3, odnosno 2,7 puta veće ekspresije *StCuZnSOD3* gena u stolonima, u odnosu na dan pre izlaganja toplotnom stresu. Najviši nivo ekspresije *StCuZnSOD2* gena detektovan je kod mlađih listova sedmog dana tretmana, nakon čega sledi nagli pad broja transkripata. Kod stolona je detektovan najviši nivo ekspresije *StMnSOD* gena, koji je dostigao maksimum sedmog dana tretmana, zatim je počeo da opada, a sličan trend je uočen i kod listova. Toplotni stres prouzrokovao je povećanje ekspresije *StFeSOD2* i *StFeSOD3* gena u listovima i stolonima. Kod mlađih listova došlo je do 4,9 i 4,2 puta veće ekspresije *StFeSOD2* gena sedmog i 21. dana tretmana, u odnosu na dan pre izlaganja toplotnom stresu. U starijim listovima povećana ekspresija ovog gena je uočena prvog, sedmog i 21. dana tretmana i iznosi 7, 14 i 17,5 puta više u odnosu na dan pre izlaganja toplotnom stresu. U stolonima je nakon sedmog i 21. dana tretmana zabeležena dva puta veća ekspresija *StFeSOD2* u odnosu na dan pre izlaganja toplotnom stresu. Povećan nivo ekspresije *StFeSOD3* gena utvrđen je u mlađim listovima i stolonima nakon sedmog i 21. dana tretmana, dok je u starijim listovima ustanovljeno kontinuirano povećanje ekspresije.





**Slika 47.** Apsolutni broj kopija transkripata visoko (A) i nisko (B) ekspimiranih *StSOD* gena u različitim organima sorte Désirée gajene *ex vitro* tokom dugotrajnog tretmana visokom temperaturom (30/20 °C, dan/noć). Efekat temperature praćen je u četiri vremenske tačke: (0) dan pre tretmana visokom temperaturom, (1) prvi dan, (7) sedmi dan i (21) 21. dan tretmana visokom temperaturom. Apsolutne vrednosti broja transkripata su normalizovane prema kontrolnim genima (*60SL36* i *CYC*). Rezultati na graficima predstavljaju srednje vrednosti tri tehnička ponavljanja  $\pm$  standardna greška.

*StFeSOD1* transkripti su najzastupljeniji u listovima, ali je pokazano da njihov broj opada u uslovima toplotnog stresa. Povećan nivo ekspresije *StFeSOD4* gena utvrđen je nakon 21. dana tretmana u mlađim (6,8 puta više u odnosu na dan pre izlaganja toplotnom stresu) i fiziološki starijim listovima.

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. *In silico* analiza SOD familije gena i SOD proteina krompira

#### 5.1.1. Identifikacija i karakterizacija *StSOD* gena

Iako su ispitivanja *SOD* familije gena do sada sprovedena na preko dvadeset biljnih vrsta (**Tabela 1.**), nijedno istraživanje nije urađeno na važnoj kulturnoj vrsti *S. tuberosum* L. Stoga je prvi cilj ovog rada detaljna *in silico* analiza *SOD* familije gena krompira, odnosno identifikacija i karakterizacija *StSOD* gena. U Spud DB bazi podataka genoma krompira pronađeno je jedanaest sekvenci gena koje su bile označene kao *SOD*. Ustanovljeno je da dve sekvence gena (*Soltu.DM.10G011570* i *Soltu.DM.06G013120*) kodiraju kratke (~100 ak), nefunkcionalne *StSOD*, usled čega su isključene iz daljih analiza. Ove sekvence bi se mogle smatrati pseudogenima. Zhou i sar. (2017) su ustanovili postojanje jednog takvog *SOD* pseudogena kod *C. sativus*. Naime, autori su utvrdili da se *CsFSD3* gen, iako kodira polipeptid dužine 377 ak, ne ekspirira ni u jednom biljnom organu, ni u različitim uslovima abiotičkog stresa. U Spud DB bazi podataka genoma krompira pronađena je i jedna sekvenca gena za bakar-šaperon (*Soltu.DM.08G026370*), koja kodira protein sa karakterističnim Bakar/Cink SOD domenom (PF00080), ali bez aminokiselinskih ostataka u aktivnom mestu koji su značajni za obavljanje CuZnSOD funkcije. Usled nedostatka krucijalnih aminokiselina, ovaj protein nije okarakterisan kao CuZnSOD, niti je nukleotidna sekvenca koja ga kodira dalje analizirana. Sveobuhvatnom *in silico* studijom identifikovano je osam nukleotidnih sekvenci označenih kao: *StCuZnSOD1*, *StCuZnSOD2*, *StCuZnSOD3*, *StMnSOD*, *StFeSOD1*, *StFeSOD2*, *StFeSOD3* i *StFeSOD4*, za koje je ustanovljeno da kodiraju potpune polipeptide. Na osnovu dosadašnjih literaturnih podataka (**Tabela 1.**), broj *SOD* gena prisutnih u genomu pojedinih biljnih vrsta kreće se od najmanje četiri (*H. annuus*) do najviše 31 (*B. napus*). Kod većine ispitivanih biljnih vrsta najmanje su zastupljeni geni koji kodiraju MnSOD (1 ili 2 gena u najvećem broju slučajeva), a najbrojniji su CuZnSOD geni, čiji broj varira od dva (*H. annuus*) do 17 (*T. aestivum*). Osam *SOD* gena, i to tri CuZnSOD (*SlSOD1-3*), jedan MnSOD (*SlSOD9*) i četiri FeSOD (*SlSOD5-8*), identifikovani su i u genomu krompiru srodne vrste *S. lycopersicum* (Feng i sar., 2016). Međutim, autori su u CuZnSOD gene uvrstili i gen za bakar-šaperon (*SlSOD4*).

*StSOD* geni se nalaze na pet od 12 hromozoma, sa dva gena na hromozomu 3 i tri gena na hromozomu 6 (**Slika 48.**). Geni *StFeSOD1* i *StFeSOD4* se nalaze na istom hromozomu (hr.06), na međusobnoj udaljenosti od samo 1566 bp i imaju visok procenat identičnosti (89,52%) na nivou proteina (**Slika 24. B**), što prema definiciji predstavlja tandemski ponovljene gene (Cannon i sar., 2004). Takođe, visok procenat identičnosti na nivou aminokiselinskih sekvenci (76,80%) utvrđen je između *StFeSOD1* i *StFeSOD2* gena (**Slika 24. B**), ali s obzirom da se ovi geni nalaze na različitim hromozomima (hr.06 i 03), mogu se smatrati segmentalnim duplikacijama gena.



**Slika 48.** Pozicija *StSOD* gena na hromozomima. Za prikazivanje pozicije gena korišćen je veb-alat MG2C v2.1 (Chao i sar., 2021).

Prema podacima iz literature, utvrđeno je da su kod biljnih SOD pretežno zastupljene segmentalne duplikacije gena, poput *OsCSD2* i *OsCSD3* gena kod *O. sativa* (Yadav i sar., 2019), *SbSOD2* i *SbSOD5* kod *S. bicolor* (Filiz i sar., 2015), *GrMSD1* i *GrMSD2* kod *G. raimondii*, *AtMSD1* i *AtMSD2*, *AtFSD1* i *AtFSD2* kod *A. thaliana* (Wang i sar., 2016a), *SISOD5* i *SISOD6* kod *S. lycopersicum* (Feng i sar., 2016), *ZmCSD2*, *ZmCSD5* i *ZmCSD6*, *ZmFSD2* i *ZmFSD3* kod *Z. mays* (Liu i sar., 2021), *SiCSD1* i *SiCSD3*, *SiFSD1* i *SiFSD3* kod *S. italica* (Wang i sar., 2018), *VvMSD1* i *VvMSD2* kod *V. vinifera* (Hu i sar., 2019). Iako su segmentalne duplikacije gena učestalije, kod nekih biljnih vrsta ustanovljeni su tandemski ponovljeni geni, kao što su *SISOD5* i *SISOD8* geni kod *S. lycopersicum* (Feng i sar., 2016) ili *VvCSD4* i *VvCSD5* geni kod *V. vinifera* (Hu i sar., 2019). Na osnovu podataka iz literature i rezultata prikazanih u ovom radu, ustanovljeno je da se kod krompira i paradajza, filogenetski srodnih biljnih vrsta (**Slika 29. A**), tandemski ponovljeni *FeSOD* geni nalaze na hromozomu 6 (*StFeSOD1* i *StFeSOD4*; *SISOD5* i *SISOD8*), a segmentalno duplicirani *FeSOD* geni na hromozomima 3 i 6 (*StFeSOD1* i *StFeSOD2*; *SISOD5* i *SISOD6*). Budući da je procenat sličnosti na nivou proteinskih sekvenci viši između tandemski ponovljenih gena u odnosu na segmentalno duplicirane gene kod obe biljne vrste, kao i da geni na hromozomu 3 nemaju tandemski ponovak (Feng i sar., 2016), može se zaključiti da je događaj segmentalne duplikacije verovatno prethodio tandemskoj duplikaciji gena. Ukoliko je pretpostavljeni sled događaja ispravan, to znači da su *StFeSOD1* krompira i *SISOD5* paradajza predački geni, koji su se prvo duplicirali na susednom hromozomu (hr.03), a potom u okviru istog hromozoma (hr.06). U svakom slučaju, tandemska duplikacija *StFeSOD* gena je evolutivno skorašnji događaj karakterističan bilo za rod *Solanum* ili familiju Solanaceae.

Broj introna u *StSOD* transkriptima se kreće od četiri do devet, slično kao i kod drugih biljnih vrsta. Na primer, kod *A. thaliana* broj introna iznosi 5-8 (Yadav i sar., 2019), a kod *S. lycopersicum* 4-8 (Feng i sar., 2016). Egzon-intron struktura se veoma razlikuje među transkriptima različitih *StSOD* gena, čak i kod tandemski ponovljenih gena *StFeSOD1* i *StFeSOD4*. Transkripti različitih *StSOD* gena se razlikuju u broju i veličini egzona i introna, kao i u dužini UTR regiona. Razlike u egzon-intron strukturi transkripata mogu nastati mehanizmima alternativnog splajsovanja: preskakanjem kompletnog egzona (eng. *exon skipping*), međusobnim isključivanjem egzona (eng. *mutually exclusive exons*), zadržavanjem kompletnog introna (eng. *intron retention*) i produžavanjem egzona (eng. *exon extension*) korišćenjem alternativnih 5' i 3' mesta splajsovanja u intronima (Shang i sar. 2017). Alternativno splajsovanje, kao najčešće korišćeni mehanizam alternativne obrade pre-iRNK, uključen je u regulaciju ekspresije *SOD* gena (Srivastava i sar., 2009), što je i eksperimentalno potvrđeno kod *O. sativa* (Feng i sar., 2006). S obzirom da se transkripti *StFeSOD2* i *StFeSOD3* gena razlikuju samo u broju i veličini egzona i introna, može se zaključiti da su oni rezultat alternativnog splajsovanja pre-iRNK. Interesantno, transkripti *StFeSOD1* i *StFeSOD4* gena se razlikuju u broju i veličini egzona i introna, kao i u dužini 3'-UTR regiona, što može biti rezultat alternativnog splajsovanja i alternativne poliadenilacije. Transkripti *StCuZnSOD2* gena imaju identične otvorene okvire čitanja, ali se razlikuju u dužini 3'-UTR, što može biti rezultat alternativne poliadenilacije.

#### 5.1.1.1. Promotorski regioni *StSOD* gena

Analiza promotorskih regiona urađena je kako bi se stekao uvid u regulaciju transkripcije *StSOD* gena. Veb-alatom PlantCARE identifikovani su različiti CRE u promotorskim regionima, dok su PlantRegMap alatom identifikovani TF iz različitih familija sa potencijalnim mestima vezivanja u promotorima *StSOD* gena. CRE koji učestvuju u odgovoru biljaka na različite faktore stresa i biljne hormone identifikovani su kod svih ispitivanih *StSOD*, što sugeriše da ovi geni imaju važnu ulogu u procesu rasteanja i razvića biljaka krompira i mogu biti uključeni u odgovor na različite stimulse. U promotorima čak šest *StSOD* gena identifikovani su CRE za koje se mogu vezati TF iz MYB familije, a poznato je na osnovu literaturnih podataka, da neki TF iz ove familije, poput AtMYB68, OsMYB55 i TaMYB80, imaju ulogu u termotoleranciji biljaka (El-kereamy i sar., 2012; Zhao i sar., 2017).

TF koji se potencijalno vezuju za promotore *StSOD* gena identifikovani su pomoću veb-platforme PlantRegMap, a na osnovu TF liste *S. tuberosum*, preuzete iz PlantTFDB v5.0 (**Slika 21.**). Identifikovani TF potom su dodatno anotirani na osnovu GO, preuzete iz PlantTFDB v5.0, čime je za svaki TF dat opis bioloških procesa u kojima učestvuje (**Slika 22.**). Promotorski region *StCuZnSOD1* gena karakteriše se velikim brojem potencijalnih mesta za vezivanje TF, od kojih se neka i preklapaju poput mesta za vezivanje TF iz ERF, Dof i LBD familije. *StCuZnSOD1* gen je jedini *StSOD* u čijem promotoru je identifikovan motiv za vezivanje TF iz HSF familije, HSE (eng. *Heat Stress Elements*) (**Slika 21.**). HSF familiji pripadaju TF koji igraju glavnu ulogu u odgovoru biljnih ćelija na toplotni stres. Pored značaja u odgovoru na visoke temperature, navedeni TF su važni i u odgovoru na druge faktore abiotičkog stresa (Guo i sar., 2016). U promotoru ovog gena identifikovani su motivi za vezivanje TF iz ERF familije, koji imaju ulogu u aklimaciji na uslove visoke temperature, kao i motivi za vezivanje TF iz Dof, GRAS i MYB familije, koji imaju ulogu u odgovoru na SA (Rudić i sar., 2022a). Na osnovu identifikacije TF (**Slika 21.**) i GO anotacija TF (**Slika 22.**), ustanovljeno je da TF, koji se vezuju za motive unutar promotorskog regiona *StCuZnSOD1* gena, imaju ulogu u odgovoru biljaka krompira na različite faktore stresa (toplotni stres, niska temperatura, gljivične infekcije) i biljne hormone, a takođe imaju funkciju u transportu proteina u jedro i u regulaciji procesa razvića. Sve navedeno sugeruje da citosolna *StCuZnSOD1* ima ulogu u različitim signalnim putevima, najverovatnije preko kontrole nivoa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koji je dobro poznat signalni molekul.

U promotorskim regionima *StCuZnSOD2* i *StFeSOD2* gena je identifikovano samo po jedno potencijalno mesto vezivanja TF, dok su u promotorima ostalih *StSOD* gena identifikovana dva do četiri mesta. U promotorima *StCuZnSOD2* i *StFeSOD4* gena identifikovana su mesta za vezivanje TF iz MYB familije (**Slika 21.**), koja predstavlja jednu od najvećih familija TF kod biljaka. Kako je ranije pomenuto, pojedini TF iz MYB familije pored uloge u regulaciji različitih procesa u ćeliji, a koji se tiču rasteња i razvića, mogu biti uključeni i u odgovor biljaka na toplotni stres. El-kereamy i sar. (2012) utvrdili su da je *OsMYB55* značajan u termotoleranciji biljaka pirinča, što je kasnije potvrđeno i kod biljaka kukuruza koje su transformisane *OsMYB55* genom (Casaretto i sar., 2016). Takođe, u promotorima pojedinih *StCuZnSOD* gena (*StCuZnSOD1*, *StCuZnSOD3*, *StMnSOD*, *StFeSOD1* i *StFeSOD2*) identifikovana su potencijalna mesta za vezivanje TF iz familija M-type MADS, bZIP, Dof, ERF, koji takođe mogu imati ulogu u odgovoru biljaka na toplotni stres (Zhang i sar., 2013; Islam i sar., 2020; Waqas i sar., 2020). Charfeddine i sar. (2015) utvrdili su da više TF iz ERF familije, kao što su StERF147, StERF169, StERF120 i StERF110, imaju ulogu u odgovoru biljaka krompira na toplotni stres. Budući da su TF grupisani u familije samo na osnovu njihovih karakterističnih DNK-vezujućih domena, time se ne može steći potpuni uvid o biološkim procesima u kojima oni učestvuju. Zbog toga je urađena GO anotacija kako bi se ustanovilo u kojim biološkim procesima učestvuju TF. Rezultati su pokazali da nijedan od *in silico* identifikovanih TF ne učestvuje u odgovoru biljaka krompira na visoku temperaturu. Na osnovu ovih rezultata može se reći da je specifičnu ulogu TF u ekspresiji *StSOD* u uslovima visoke temperature, neophodno ustanoviti eksperimentalnim putem.

Kako bi se stekao što bolji uvid u regulaciju transkripcije *StSOD* gena, za analizu promotorskih regiona korišćen je i veb-alat PlantCARE i utvrđeno je da postoje velika odstupanja u dobijenim rezultatima. Na primer, pomoću PlantRegMap platforme identifikovana su potencijalna mesta vezivanja TF iz MYB familije u promotorima tri gena (*StCuZnSOD1-2* i *StFeSOD4*) (**Slika 21.**), dok veb-alat PlantCARE procenjuje da CRE za vezivanje TF iz MYB familije postoje u promotorima čak 6 gena (**Slika 20.**). PlantCARE je dve decenije stariji alat, koji prepoznaje veliki broj CRE u promotorima *StSOD* na osnovu baze u kojoj su deponovani CRE prisutni u genima različitih biljnih vrsta, dok PlantRegMap preciznije detektuje mesta za koja se mogu vezati TF koji se odnose samo na *S. tuberosum*. Budući da PlantRegMap vrši identifikaciju mesta vezivanja na osnovu liste TF deponovane u bazi podataka (PlantTFDB v5.0), postoji verovatnoća da TF lista nije potpuna, što sugeruje da PlantRegMap, iako je savremenija platforma možda ne identifikuje sve TF koji se mogu vezati za promotore *StSOD* gena, već samo one deponovane u bazi za *S. tuberosum*. Na

osnovu svega navedenog, može se konstatovati da je za kompletan uvid u regulaciju transkripcije *StSOD* gena potrebno više eksperimentalno potvrđenih rezultata o njihovim promotorima i CRE.

## 5.1.2. Karakterizacija SOD proteina krompira

### 5.1.2.1. StCuZnSOD

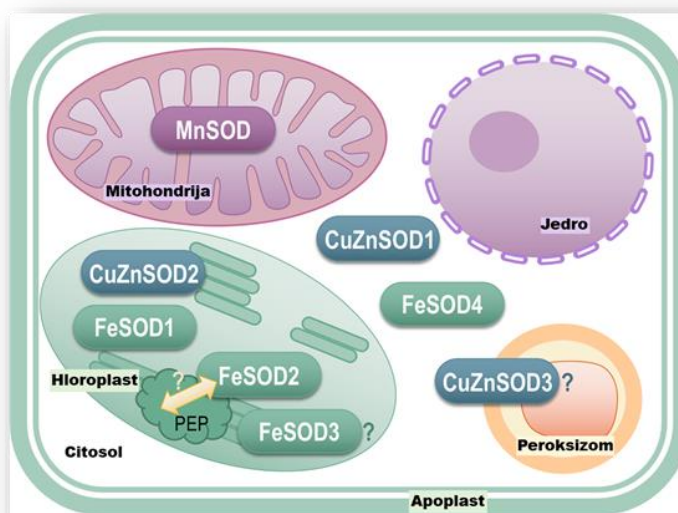
Na osnovu poređenja primarne strukture, pozicije ključnih aminokiselinskih ostataka, organizacije proteinskih domena, tercijarne i kvaternarne strukture eukariotskih CuZnSOD, ustanovljeno je da su ovi proteini konzervativni i da su se malo menjali tokom evolucije (Perry i sar., 2010). StCuZnSOD proteini imaju sve karakteristike eukariotskih CuZnSOD, među kojima su Bakar/Cink SOD domen (PF00080.22) (**Slika 25.**) i konzervativni aminokiselinski ostaci, koji su uključeni u formiranje E-dimera i mesta za vezivanje metalnog jona (**Slika 26. A**). Osim toga, StCuZnSOD formiraju motiv grčkog ključa, koji je takođe karakterističan za eukariotske CuZnSOD proteine (**Slika 26. B**).

Prethodno je, na osnovu NATIVE-PAGE eseja aktivnosti enzima i imunoblot analize, detektovano najmanje šest CuZnSOD izoformi kod krompira (Momčilović i sar., 2014). U ovom radu su *in silico* analizom identifikovane tri izoforme StCuZnSOD proteina, koje se na osnovu predikcije subćelijske lokalizacije nalaze u različitim ćelijskim odeljcima: citosolu, hloroplastima i možda peroksizomima. Budući da su, izuzev sorte Agria, u pomenutom radu ispitivane druge sorte krompira, detekcija većeg broja CuZnSOD mogla bi se pripisati posttranslacionim modifikacijama StCuZnSOD (Yamakura i Kawasaki, 2010) ili alelnim polimorfizmima *StCuZnSOD*.

Pre ispitivanja ekspresije i aktivnosti SOD proteina u uslovima visokih temperatura, procenjena je njihova termostabilnost na osnovu vrednosti alifatičnog indeksa (**Tabela 1.**). Ustanovljeno je da bi StCuZnSOD proteinske subjedinice trebalo da pokažu stabilnost tokom izlaganja visokim temperaturama. Prosečna vrednost alifatičnog indeksa za StCuZnSOD je 85,59, što je više od vrednosti indeksa za StFeSOD (76,35), ali je niže od vrednosti indeksa za StMnSOD (91,14). Alifatični indeks predstavlja faktor termostabilnosti globularnih proteina (Ikai, 1980). Pored toga, CuZnSOD proteinske subjedinice, za razliku od ostalih SOD, formiraju stabilnu strukturu grčkog ključa, koja podržava aktivno mesto enzima i formiranje dimera, a dodatno je ojačana disulfidnim mostom (**Slika 26. A i B**) (Perry i sar., 2010).

Biljne CuZnSOD su lokalizovane u različitim ćelijskim odeljcima, poput citosola, plastida, peroksizoma, a postoji mogućnost da se nalaze i u vanćelijskom prostoru (Alscher i sar., 2002). Na osnovu veb-alata koji su korišćeni, procenjeno je da se StCuZnSOD1 proteini najverovatnije nalaze u citosolu, a StCuZnSOD2 u hloroplastima (**Tabela 12, Slike 25. i 49.**). Kada je u pitanju StCuZnSOD3, tu postoje nedoumice. DeepLoc veb-alat procenjuje da se StCuZnSOD3 nalazi u peroksizomima (verovatnoća 0,495), kao i u citosolu (verovatnoća 0,396). Veb-alat LA takođe procenjuje da se StCuZnSOD3 nalazi u peroksizomima, ali veb-alatom PTS1 Predictor nije identifikovana karakteristična peroksizomalna target sekvenca (**Tabela 12.**). Sa druge strane, CELLO sugeriše da su StCuZnSOD3 proteini najverovatnije lokalizovani u citosolu. S obzirom da većina peroksizomalnih proteina sadrži karakterističan target signal (PTS1), koji predstavlja tripeptid na C-terminalnom kraju (Reumann i sar., 2018), upoređeni su C-terminalni tripeptidi StCuZnSOD3 proteina sa PTS1 signalima proteina za koje se zna da su lokalizovani u peroksizomima. Rezultati su pokazali da C-terminalni tripeptid StCuZnSOD3 proteina ne pripada biljnim PTS1 tripeptidima [SA][RK][LMI], tj. peroksizomalnim tranzitnim peptidima. Pored PTS1 motiva, kod biljaka je prisutan i alternativni N-terminalni motiv ([RK][LVIQ]<sub>x2</sub>[LVIHQ][LSGAK]<sub>x</sub>[HQ][LAF]) (Reumann i sar., 2018), koji je važan za transport u peroksizome, ali ni ovaj motiv nije identifikovan kod StCuZnSOD3 proteina. Međutim, rezultati filogenetske analize su pokazali da je StCuZnSOD3

proteinska sekvenca grupisana u potkladu sa peroksizomalnim CuZnSOD proteinskim sekvencama iz različitih biljnih vrsta (**Slika 29. B**).



**Slika 49.** Procenjena lokalizacija StSOD u ćeliji. Preuzeto i modifikovano prema Rudić i sar. (2022a).

Na osnovu poređenja aminokiselinskih sekvenci ustanovljeno je da se CuZnSOD proteini značajno razlikuju od Mn-FeSOD proteina i da imaju vrlo malo zajedničkih osobina, što može značiti da je evolucija CuZnSOD najverovatnije tekla nezavisno (Sheng i sar., 2014). Usled značajnih razlika u proteinskim sekvencama između SOD proteina, filogenetski odnosi su prikazani kao dva nezavisna filogenetska stabla (**Slika 29.**). Iako među CuZnSOD proteinima postoji visok stepen homologije, a pogotovo među biljnim CuZnSOD (**Slika 26. A**), ipak postoje karakteristike po kojima se razlikuju hloroplastne od citosolnih izoformi proteina, što ih razdvaja u dve klade (Filiz i sar., 2015; Feng i sar., 2016). Citosolna StCuZnSOD1 je zajedno sa peroksizomalnom StCuZnSOD3 i homolognim sekvencama iz različitih biljnih vrsta grupisana u kladu A, dok su hloroplastna StCuZnSOD2 i homologne CuZnSOD sekvence drugih biljnih vrsta grupisane u kladu B (**Slika 29. B**). Na osnovu filogenetske analize je ustanovljeno da su citosolne i peroksizomalne StSOD proteinske sekvence filogenetski bliže u odnosu na hloroplastne.

### 5.1.2.2. Mn-FeSOD

Geni koji kodiraju za MnSOD i FeSOD proteine najverovatnije vode poreklo od zajedničkog, predačkog gena (Perry i sar., 2010). U literaturi se često koristi termin Mn-FeSOD usled postojanja velike sličnosti između aminokiselinskih sekvenci, sekundarne i tercijarne strukture MnSOD i FeSOD. Na osnovu rezultata ustanovljeno je da StMnSOD i StFeSOD u svojoj strukturi poseduju karakteristične konzervativne SOD domene: PF00081.24 i PF02777.20 (**Slika 25.**). Proteinski domen PF00081.24 se nalazi na N-terminusu i sačinjen od dva antiparalelna  $\alpha$ -heliksa koji formiraju ukosnicu, dok je PF02777.20 C-terminalni domen, koji čine tri antiparalelne  $\beta$ -ploče sa četiri  $\alpha$ -heliksa.

#### 5.1.2.2.1. StMnSOD

Rezultati ovog rada ukazuju na prisustvo jednog MnSOD kod krompira. Rezultati *in silico* analize, koja je obuhvatila predikciju subćelijske lokalizacije, predikciju prisustva N-terminalnog

tranzitnog peptida i utvrđivanje filogenetskih odnosa između StSOD i SOD drugih biljnih vrsta (**Tabela 12, Slike 25. i 29.**), sugerišu da sekvenca transkripta Soltu.DM.06G011380.1 najverovatnije kodira StMnSOD. Prisustvo jedne MnSOD kod krompira je u skladu sa prethodnim rezultatima Momčilović i sar. (2014). Kako je ranije pomenuto, biljni MnSOD proteini se primarno nalaze u mitohondrijama kod viših biljaka, pa se često označavaju i kao mitohondrijalna SOD.

Iako su StMnSOD i StFeSOD veoma slični, ipak su uočene određene razlike u strukturi, do kojih se došlo poređenjem StMnSOD i StFeSOD1-4 aminokiselinskih sekvenci sa MnSOD i FeSOD proteinskim sekvencama drugih vrsta (**Slika 27.**). Poravnanjem aminokiselinskih sekvenci ustanovljeno je da se aminokiselinski ostatak glutamina (Q), koji ima ulogu u stabilizaciji molekula vode u okviru mesta vezivanja metalnog jona, nalazi na konsenzus poziciji 223 u sekvenci MnSOD *S. tuberosum*, *H. sapiens* (PDB: 2ADQ) i *Xanthomonas citri* (PDB: 6BEJ). Sa druge strane, ostaci aminokiseline Q se nalaze na konsenzus poziciji 132 u okviru FeSOD aminokiselinskih sekvenci prikazanih na **Slici 27.** Važno je napomenuti da ovaj Q ostatak, iako se nalazi na udaljenim mestima u polipeptidnim lancima StMnSOD i StFeSOD, ima sličnu poziciju u okviru aktivnog centra oba proteina kada oni zauzmu svoju funkcionalnu konformaciju (petlja koja povezuje  $\beta$ 2- i  $\beta$ 3-lanac u StMnSOD na **Slici 28. B**, ili  $\alpha$ 3-heliks u StFeSOD na **Slici 28. C**). Međutim, ta mala razlika u poziciji Q ostatka u aktivnom centru StMnSOD i StFeSOD ima uticaja na fino podešavanje redoks potencijala (eng. *redox potential tuning*) metalnog jona i određuje da li će se Fe ili Mn vezati za enzim.

Pored toga, ustanovljeno je da se StMnSOD i StFeSOD razlikuju i u strukturi N-terminalnih domena. Kod StMnSOD proteina ovaj domen se sastoji od dva duža  $\alpha$ -heliksa koji formiraju ukosnicu i dosta je sličan sa domenom MnSOD *H. sapiens* (Quint i sar., 2006). Postoje indicije da tetramere formiraju MnSOD proteini koji na N-terminusu imaju  $\alpha$ -ukosnica domen sačinjen od dva heliksa. Ova pretpostavka se zasniva na interakciji  $\alpha$ -ukosnica domena iz dijagonalno postavljenih monomera, čiji heliksi okružuju tetramer i poput štipaljke drže dimere povezanim (Sheng i sar., 2013).

Iako razlike u aminokiselinskoj sekvenci između MnSOD i FeSOD proteina nisu velike, na filogenetskom stablu su ovi tipovi SOD proteina jasno razdvojeni (**Slika 29. A**). Proteinska sekvenca StMnSOD grupisana je u kladu B sa ostalim MnSOD, dok su proteinske sekvence StFeSOD1-4 grupisane u kladu A. Na osnovu filogenetskog stabla, zapaža se da je proteinska sekvenca StMnSOD filogenetski najbliža sekvencama MnSOD *S. lycopersicum*, *C. annuum* i *N. attenuata*, što je potpuno očekivano, s obzirom da krompir i navedene biljne vrste pripadaju istoj porodici *Solanaceae*.

#### 5.1.2.2.2. StFeSOD

Na osnovu analize aminokiselinske sekvence, kod svih StFeSOD identifikovani su karakteristični konzervativni Gvožđe/Mangan SOD domeni: N-terminalni PF00081 i C-terminalni PF02777. Analizom transkripata četiri *StFeSOD* gena, ustanovljeno je da, u slučaju *StFeSOD2* i *StFeSOD4* gena, postoje transkripti koji imaju izmenjene određene regione. Transkript Soltu.DM.03G013800.4 kodira StFeSOD2 izoformu, koja sadrži neuobičajenu sekvencu od 24 aminokiselinska ostatka na N-terminalnom kraju (**Slika 27.**). Transkript Soltu.DM.06G012170.4 kodira StFeSOD4 izoformu sa izmenjenim C-terminalnim krajem, odnosno u pitanju je region od 63 aminokiselinska ostatka kojem nedostaju ostaci aminokiseline H i D, neophodni za vezivanje metalnog jona (**Slika 27.**). Na osnovu pretpostavke iznesene u odeljku **5.1.1**, prema kojoj su *StFeSOD2* i *StFeSOD4* geni najverovatnije rezultat duplikacije *StFeSOD1* gena, nije iznenađujuće što su izmenjeni regioni identifikovani upravo u ovim proteinima. Zapravo, ovi rezultati ukazuju da duplikacije dovode do fleksibilnije alternativne obrade transkripata, što je u slučaju ova dva gena rezultovalo pojavom neuobičajenih regiona kod pojedinih izoformi. Iako sadrži izmenjeni N-terminalni region, protein kodiran Soltu.DM.03G013800.4 transkriptom, može biti potpuno funkcionalan. Sa druge strane, protein kodiran Soltu.DM.06G012170.4 transkriptom ne sadrži ključne aminokiselinske ostatke u aktivnom mestu i verovatno nije funkcionalan. Budući da

*StFeSOD4* ima još pet transkripata koji ne poseduju izmenjene regione, ovaj gen verovatno kodira i funkcionalne polipeptide.

Kao što je prikazano na **Slikama 25. i 27.**, struktura *StFeSOD2* aminokiselinskih sekvenci se razlikuje od ostalih *StFeSOD* po dužem C-terminalnom regionu, sačinjenom od 36 aminokiselinskih ostataka, među kojima su najviše zastupljeni ostaci aminokiseline E/D. Sličan region identifikovan je na C-terminalnom kraju *FeSOD* proteina *A. thaliana*: FSD2/PAP9 (PDB:7BJK) (**Slika 27.**), za koji su Favier i sar. (2021) ustanovili da ulazi u sastav PEP kompleksa. RNK-polimeraze kodirane od strane plastida (eng. *Plastid-Encoded RNA Polymerase*, PEP) su enzimi neophodni za pravilnu ekspresiju plastidnih gena tokom biogeneze hloroplasta. PEP kompleks se sastoji od subjedinica, od kojih su neke kodirane plastidnim genomom (PEP), a neke (eng. *PEP-Associated Protein*, PAP) kodiraju jedarni geni. U sastav PEP kompleksa kod *A. thaliana* ulaze dva *FeSOD* proteina: PAP9 i PAP4. Ustanovljeno je da ovi proteini najverovatnije imaju ulogu u oksidativnoj zaštiti hloroplasta koji još uvek nisu potpuno diferencirani i funkcionalno zreli (Favier i sar., 2021). Nakon što se hloroplast formira i postane potpuno fotosintetički aktivan, aktivnost PEP kompleksa se značajno smanjuje. Takođe, autori sugerišu da je C-terminalno proširenje karakteristika FSD2/PAP9 proteina i da može predstavljati PEP tranzitni peptid. Na osnovu svega navedenog može se pretpostaviti da, poput PAP9 proteina, *StFeSOD2* protein ima važnu ulogu u oksidativnoj zaštiti hloroplasta na samom početku fotosintetske aktivnosti. Za razliku od PAP9, u kojem je C-terminalni region neuređen, u ovom radu je ustanovljeno da C-terminalni region *StFeSOD2* (Soltu.DM.03G013800.1) proteina zauzima  $\alpha$ -heliks konformaciju (**Slika 28.**). Filogenetska bliskost PEP-SOD (AT5G51100.1 *A. thaliana*) i SOD koje ne ulaze u sastav PEP kompleksa, ukazuje da su, osim karakterističnog proširenja C-terminalnog kraja, druge karakteristike sekvenci očuvane u PEP-SOD proteinima (**Slika 29. A**).

Biljni *FeSOD* proteini se prevashodno nalaze u hloroplastima, mada su prisutni i u drugim delovima ćelije, poput citosola i peroksizoma (Momčilović i Pantelić, 2018; Corpas i sar., 2020). Na osnovu veb-alata korišćenih za predikciju subćelijske lokalizacije i predikciju prisustva N-terminalnog tranzitnog peptida, ustanovljeno je da se *StFeSOD1* i *StFeSOD2* najverovatnije nalaze u hloroplastima (**Tabela 12, Slike 25. i 49.**). Pozicija *StFeSOD3* u biljnim ćelijama nije jasno definisana *in silico* analizom i u zavisnosti od korišćenog veb-alata, procenjuje se da ovaj protein može biti prisutan u hloroplastima (DeepLoc i CELLO) ili u mitohondrijama (TargetP2 i LA) (**Tabela 12.**).

Na osnovu filogenetske analize, uočeno je da proteinska sekvenca *StFeSOD3 S. tuberosum* formira sestrinsku kladu sa sekvencom *SISOD7 S. lycopersicum* u potkladi A2. Veb-alatom LA je predviđeno da se proteinske sekvence u potkladi A2 nalaze u hloroplastima međutim, za proteinske sekvence *StFeSOD3* i *SISOD7* se predviđa da se nalaze u mitohondrijama. Veb-alatom TargetP2 je takođe predviđeno da se *StFeSOD* nalazi u mitohondrijama. Sa druge strane, veb-alatom ProtComp9.0 za predikciju subćelijske lokalizacije *SISOD* proteina paradajza, utvrđeno je da se *SISOD7* proteinska sekvenca najverovatnije nalazi u hloroplastima (Feng i sar., 2016). Budući da samo primitivne eukariote u mitohondrijama sadrže *FeSOD* (Sienkiewicz i sar., 2004), može se pretpostaviti da se *StFeSOD3* proteini ipak nalaze u hloroplastima. Najviše različitih predikcija subćelijske lokalizacije na osnovu korišćenih veb-alata je ustanovljeno za *StFeSOD4*. U zavisnosti od korišćenog veb-alata, ovaj protein bi se mogao naći u citosolu, hloroplastima, mitohondrijama i/ili jedru (**Tabela 12.**). Na **Slici 25.** može se uočiti da je N-terminalni region ispred  $\alpha$ -ukosnica domena veoma kratak, otuda ukoliko bi i postojao tranzitni peptid, morao bi da se preklopi sa  $\alpha$ -ukosnica domenom, što nije verovatno. Na osnovu toga, moglo bi se reći da se *StFeSOD4* protein najverovatnije nalazi u citosolu. Ova konstatacija se može dodatno potkrepiti polazeći od tvrdnje da *StFeSOD4* gen najverovatnije predstavlja tandemski ponovak *StFeSOD1* gena. Budući da *StFeSOD1* kodira protein sa hloroplastnim N-tranzitnim peptidom, postoji mogućnost da se sekvenca za tranzitni peptid zadržala u segmentno dupliranom genu (*StFeSOD2*), a izgubila u tandemski ponovljenom genu (*StFeSOD4*).



Zanimljivo je da nijednim od korišćenih veb-alata nije predviđeno prisustvo StSOD u apoplastu. Literaturni podaci ukazuju da, ukoliko su u apoplastu prisutne SOD, onda su to obično CuZnSOD izoforme (Alscher i sar., 2002). Sa druge strane, identifikovana je MnSOD (MSD2) u apoplastu *A. thaliana* (Chen i sar., 2022). Na osnovu predikcije subćelijske lokalizacije ustanovljeno je da se u apoplastu nekih biljnih vrsta, poput *C. sativus*, mogu naći FeSOD (Zhou i sar., 2017). Poput krompira, prisustvo apoplastnih SOD nije potvrđeno *in silico* analizom ili eksperimentalnim putem u velikom broju drugih biljnih vrsta.

## 5.2. Uticaj različitih temperaturnih tretmana na ekspresiju *StSOD* gena i aktivnost StSOD proteina u listovima biljaka sorte Désirée gajenih *in vitro*

Na rasteenje i razviće biljaka krompira utiče veliki broj faktora spoljašnje sredine među kojima se, kao jedan od najznačajnijih, izdvaja temperatura (Levy i Veilleux, 2007). Na osnovu dosadašnjih literaturnih podataka ustanovljeno je da optimalna temperatura za rasteenje i razviće nadzemnog dela biljaka krompira iznosi 20-25 °C, dok se obrazovanje krtola odvija na nižim temperaturama, čiji je opseg 15-20 °C (Van Dam i sar., 1996; Struik 2007). S obzirom da potiče iz hladnih predela, krompir je veoma osetljiv na visoke temperature međutim, nivo osetljivosti varira među različitim genotipovima (Ahn i sar., 2004; Singh i sar., 2016). Početna ispitivanja analize ekspresije *StSOD* gena sprovedena su u uslovima *in vitro*, na biljkama sorte Désirée, koja je u literaturi okarakterisana kao umereno termotolerantna (Demirel i sar., 2020). U ispitivanjima su biljke izložene optimalnoj temperaturi za gajeenje krompira (21 °C, 3 nedelje), dugotrajnim tretmanima blago povišenom (26 °C, 3 nedelje) i visokom temperaturom (29 °C, 3 nedelje) i toplotnom šoku (38 °C, 4 h). Na osnovu rezultata relativne ekspresije (**Slika 34.**), utvrđeno je da su svih osam gena, koji su obuhvaćeni *in silico* analizom, ekspimirani u listovima sorte Désirée, a time je potvrđeno da su identifikovani geni funkcionalni. Ustanovljeno je da dugotrajni toplotni stres (29 °C) dovodi do značajnog povećanja nivoa ekspresije više *StSOD* gena (*StCuZnSOD1*, *StCuZnSOD2* i *StFeSOD2*), dok je toplotni šok (38 °C) indukovao ekspresiju samo *StFeSOD1* gena. Na osnovu dobijenih rezultata, ustanovljeno je da kratkotrajni intenzivni tretman visokom temperaturom (38 °C, 4 h) nema velikog uticaja na indukciju ekspresije ispitivanih gena, što sugerise da SOD nisu deo ranog (brzog) odgovora biljaka krompira na toplotni stres poput HSP.

Nakon što je utvrđeno da je svih osam *StSOD* gena funkcionalno, ispitana je aktivnost StSOD enzima. Na osnovu eseja enzimske aktivnosti, identifikovano je šest aktivnih StSOD izoformi u listovima biljaka sorte Désirée gajenih *in vitro* (**Slika 35. A**), što je u saglasnosti sa postojanjem šest visoko ekspimiranih *StSOD*, ustanovljenih analizom ekspresije gena (odjeljak 4.2.3.3.). Od ukupnog broja izoformi, samo su dve pokazale visok nivo zastupljenosti i aktivnosti (proteinske trake 1 i 4). Ostale su bile slabije aktivnosti i teško ih je bilo detektovati na gelu, te se može pretpostaviti da produkte nisko ekspimiranih *StFeSOD1* i *StFeSOD4* nije ni bilo moguće detektovati korišćenim esejom. Interesantno je da pri dugotrajnom toplotnom stresu (29 °C) dolazi do značajnog povećanja aktivnosti SOD izoforme u okviru proteinske trake 4, dok toplotni šok i blago povišena temperatura nisu imali uticaja na aktivnost ove izoforme. Na osnovu selektivne inhibicije sa KCN i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pretpostavljeno je da data proteinska traka predstavlja StCuZnSOD, iako potpuna inhibicija nije bila moguća usled velike zastupljenosti i aktivnosti SOD enzima u okviru trake. S obzirom da je ustanovljeno da se pri dugotrajnom toplotnom stresu (29 °C) *StCuZnSOD1* i *StCuZnSOD2* karakterišu daleko višom ekspresijom u odnosu na ostale *StSOD* (odjeljak 4.2.1.), može se pretpostaviti da proteinska traka 4 verovatno predstavlja citosolnu (*StCuZnSOD1*) ili hloroplastnu (*StCuZnSOD2*) izoformu CuZnSOD. S obzirom da se proteinske trake 3 i 5 izuzetno slabo uočavaju na gelovima tretiranim inhibitorima, pretpostavlja se da i ove trake takođe predstavljaju StCuZnSOD izoforme. Na osnovu selektivne inhibicije sa KCN i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> identifikovana je jedna StMnSOD (proteinska traka 1), ali nije bilo moguće identifikovati StFeSOD izoforme. Na osnovu rezultata prethodnih studija, broj identifikovanih SOD izoformi krompira iznosio je 3-11 (Santos i sar., 1999; Rojas-Beltran i sar., 2000; Martinez i sar., 2001; Fidalgo i sar., 2004; Rahnama i Ebrahimzadeh, 2006; Queirós i sar.,

2011). Variranja u broju detektovanih SOD izoformi su verovatno rezultat različitih faktora poput sorte/genotipa koji je predmet istraživanja, uslova u kojima se gaje biljke krompira, kao i protokola za ispitivanje aktivnosti SOD.

### **5.3. Uticaj temperature i SA na morfologiju biljaka i ekspresiju *StSOD* gena odabranih genotipova krompira gajenih *in vitro***

#### **5.3.1. Uticaj temperature i SA na morfološke parametre biljaka krompira gajenih *in vitro***

Na osnovu rezultata dobijenih analizom ekspresije *StSOD* gena u listovima biljaka sorte Désirée gajenih *in vitro*, ustanovljena je pojačana ekspresija više gena pri dugotrajnom tretmanu na temperaturi od 29 °C, stoga je ovaj tretman odabran za dalja ispitivanja. Kako bi se ustanovila gornja granica optimalnih temperaturnih uslova za rastenje i razviće biljaka krompira *in vitro*, odabran je i dugotrajni tretman na temperaturi od 26 °C.

Ustanovljeno je da se dugotrajni tretman visokom temperaturom (29 °C) negativno odrazio na rastenje i razviće izdanaka *in vitro* gajenih biljaka sorti Agria i Kennebec, dok nije imao značajnijeg uticaja na sortu Désirée (Slike 36, 37. i 38. A-C). S obzirom da je Désirée okarakterisana kao umereno termotolerantna (Demirel i sar., 2020), a Agria i Kennebec kao sorte osetljive na povišene temperature (Tang i sar., 2018; Demirel i sar., 2020), rezultati dobijeni u ovom radu korišćenjem *in vitro* sistema su to potvrdili. Interesantno, dugotrajni tretman blago povišenom temperaturom (26 °C) je takođe smanjio broj listova, visinu i svežu masu izdanaka kod biljaka sorti Agria i Kennebec, što sugeriše da je temperatura 26 °C iznad optimalnog opsega za rastenje i razviće izdanaka pomenutih sorti. Ustanovljeno je da dugotrajni tretmani blago povišenom i visokom temperaturom nisu imali uticaja na broj korenova, osim u slučaju sorte Kennebec gde je toplotni stres redukovao njihovu brojnost u odnosu na kontrolu (Slika 38. D). Navedeni temperaturni tretmani nisu imali uticaja na dužinu korenova kod sorti Désirée i Kennebec, ali su stimulisali njihovo izduživanje kod sorte Agria (Slika 38. E). Uočeno je da toplotni stres nije uticao na svežu masu korenova ispitivanih sorti, dok je dugotrajni tretman blago povišenom temperaturom prouzrokovao povećanje njihove mase kod sorti Désirée i Kennebec u odnosu na kontrolu (Slika 38. F). Na osnovu dobijenih rezultata, ustanovljeno je da se optimalne temperature za rastenje i razviće izdanaka i korenova biljaka krompira razlikuju, kao i da zavise od sorte/genotipa krompira.

Na osnovu podataka iz literature, ustanovljen je pozitivan efekat egzogene primene SA na biljke krompira u uslovima abiotičkog stresa (Elwan i sar., 2018; López-Delgado i sar., 2018; Mostafa i sar., 2019). Elwan i sar. (2018) su pokazali da SA pospešuje rastenje biljaka krompira sorte Proventa i linije 97-980, kao i proces tuberizacije tokom stresa solima u uslovima *in vitro*. Kod biljaka krompira sorte Granate, gajenih u plasteniku, primenom egzogene SA postignuta je bolja tolerancija na hladnoću (López-Delgado i sar., 2018), dok je kod biljaka sorte Spunta, gajenih u polju, primena SA pokazala pozitivan efekat na prinos u uslovima deficita vode (Mostafa i sar., 2019). U ovom radu je pokazano da egzogena primena SA tokom dugotrajnih tretmana blago povišenom i visokom temperaturom u uslovima *in vitro*, nije imala značajnog uticaja na preživljavanje eksplantata, osim u slučaju sorte Agria, gde je u uslovima dugotrajnog toplotnog stresa indukovala 30% više preživelih eksplantata, nego što je zabeleženo na istom temperaturnom tretmanu bez SA. S obzirom da na temperaturi od 26 °C eksplantati ispitivanih sorti imaju visoku stopu preživljavanja (Slika 37.), u takvim okolnostima SA nije mogla da ispolji svoj potencijalno zaštitni uticaj. Ustanovljeno je da egzogena SA pospešuje rastenje izdanaka u uslovima blago povišene temperature (26 °C) kod sve tri ispitivane sorte, dok je njen efekat u uslovima toplotnog stresa (29 °C) zavisao od genotipa. Na primer, SA je indukovala rastenje izdanaka sorti Agria i Kennebec, dok nije imala uticaja na izdanke sorte Désirée. Zaštitni efekat egzogene SA na rastenje i razviće izdanaka u uslovima visoke temperature (26 °C i 29 °C) zapaža se samo kod sorte Kennebec. Sa druge strane, egzogena primena SA nije uticala na broj korenova, dok je redukovala njihovu dužinu kod svih ispitivanih sorti, tokom

odabranih temperaturnih tretmana. Dobijeni rezultati ukazuju da SA ispoljava različit uticaj na izdanke i korenove biljaka krompira. Koncentracija  $1 \times 10^{-5}$  M SA, koja je primenjena u ovom radu, odabrana je na osnovu podataka iz literature (López-Delgado i sar., 2004), u kojima je pokazano da  $1 \times 10^{-5}$  M SA pospešuje preživljavanje eksplantata krompira u uslovima visokih temperatura. Međutim, rezultati prikazani u ovom radu sugerišu da ova koncentracija SA ( $1 \times 10^{-5}$  M) nije optimalna za ispitivane sorte i da je možda zbog toga imala inhibitorni efekat na rastenje korenova biljaka krompira. Na osnovu podataka iz literature, ustanovljeno je da niske koncentracije ( $<5 \times 10^{-5}$  M) egzogene SA pospešuju razviće adventivnih korenova kod biljaka *A. thaliana*, dok više koncentracije ( $>5 \times 10^{-5}$  M) deluju inhibitorno na rastenje i razviće korenova (Pasternak i sar., 2019). SA utiče na proces rastenja i razvića korenova verovatno putem modulacije biosinteze i transporta AUX. Naime, ustanovljeno je da pri visokim koncentracijama SA dolazi do redukcije pula AUX, dok niske koncentracije SA povećavaju sadržaj AUX u vršnim delovima korena *A. thaliana* (Pasternak i sar., 2019). Na osnovu svega navedenog, postoji mogućnost da je koncentracija SA korišćena u ovom radu ( $1 \times 10^{-5}$  M) verovatno bila suviše visoka, te je zbog toga imala negativan uticaj na rastenje i razviće korenova biljaka krompira.

### 5.3.2. Ekspresija *HSP* gena kao potencijalnih pokazatelja (markera) toplotnog stresa

Kako bi se dodatno proverilo da li odabrani temperaturni tretmani ( $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $29 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 3 nedelje), predstavljaju toplotni stres za izabrane genotipove krompira, ispitana je ekspresija *HSP* gena. *HSP* predstavljaju dobre pokazatelje toplotnog stresa i do indukcije njihove sinteze dolazi 20-30 minuta po izlaganju biljaka visokim temperaturama (Cooper i Ho, 1983; Lin i sar., 1984). *HSP* imaju funkciju molekularnih šaperona, koji u uslovima toplotnog stresa interaguju sa toplotno denaturisanim proteinima i time sprečavaju njihovu agregaciju, omogućavaju ponovno uspostavljanje funkcionalne konformacije denaturisanih proteina ili su uključeni u razgradnju proteinskih agregata (Richter i sar., 2010). Klasa *HSP* malih molekularskih masa-sHSP (12-40 kDa) predstavlja prvu liniju odbrane ćelije kada, usled toplotnog stresa, započne toplotna denaturacija proteina (Hilton i sar., 2013). sHSP karakteriše visok afinitet prema proteinima čija je konformacija narušena, ali budući da nemaju kapacitet za samostalnu reparaciju denaturisanih proteina, neophodno je da se uključe ATP zavisni *HSP*, poput *HSP70* kako bi se izvršila renaturacija proteina. Prema literaturnim podacima, tokom toplotnog stresa dolazi do uzajamnog delovanja sHSP i drugih *HSP*, tako što se prvo sHSP vežu za denaturisane proteine, stabilizuju ih i sprečavaju formiranje agregata, a potom se uključuju ostali *HSP* koji uspostavljaju pravilnu konformaciju denaturisanih proteina (Wang i sar., 2004). U biljnim ćelijama sHSP imaju važnu ulogu u termotoleranciji i predstavljaju najzastupljeniju klasu molekularnih šaperona. U ovom radu ispitivana je ekspresija *StHSP17.6*, *StHSP21*, *StHSP23.9* i *StHSP70-2* u uslovima dugotrajnih tretmana blago povišenom ( $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 3 nedelje) i visokom ( $29 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 3 nedelje) temperaturom.

Utvrđeno je da dugotrajni tretman visokom temperaturom ( $29 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) indukuje ekspresiju svih ispitivanih sHSP gena, a najviše *StHSP21*. Indukcija ovih gena pri dugotrajnom tretmanu visokom temperaturom jasno ukazuje da temperatura od  $29 \text{ }^{\circ}\text{C}$  predstavlja toplotni stres za biljke krompira. Interesantno, neki od markera, *StHSP21* i *StHSP17.6* kod sorte Désirée, su indukovani i pri dugotrajnom tretmanu povišenom temperaturom, što ukazuje da i temperatura od  $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$  izaziva eng. *Heat-Shock Response* (HSR) biljaka krompira i da taj odgovor zavisi od ispitivane sorte/genotipa.

Ustanovljeno je da SA ( $1 \times 10^{-5}$  M) u većini slučajeva nije indukovala ekspresiju *StHSP* gena kod ispitivanih sorti. Tretman SA tokom dugotrajnog tretmana visokom temperaturom indukovao je blago povećanje nivoa ekspresije *StHSP70-2* gena kod sorte Désirée i *StHSP23.9* gena kod sorte Kennebec. Dobijeni rezultati sugerišu da egzogena SA, u koncentraciji koja je korišćena u ovom eksperimentu, nema značajnijeg uticaja na ekspresiju *StHSP*.

### 5.3.3. Uticaj temperature i SA na ekspresiju *StSOD* gena odabranih genotipova krompira gajenih *in vitro*

Ispitivanjem uticaja visoke temperature i SA na ekspresiju *StSOD* gena kod odabranih sorti krompira (Agria, Désirée i Kennebec), ustanovljeno je da su dati geni eksprimirani kod sve tri sorte, ali su uočene značajne razlike u nivou ekspresije pojedinih gena. Na osnovu toga, izvršena je podela na visoko i nisko eksprimirane. Grupa visoko eksprimiranih gena obuhvata: *StCuZnSOD1*, *StCuZnSOD2*, *StCuZnSOD3*, *StMnSOD*, *StFeSOD2* i *StFeSOD3*, kod kojih se broj transkripata kretao od nekoliko hiljada do 80.000 kopija/ng RNK. Nasuprot, grupa nisko eksprimiranih gena obuhvatila je *StFeSOD1* i *StFeSOD4*, sa značajno manjim brojem transkripata, od jedne do 33,4 kopije/ng RNK (Slika 43. B).

Na osnovu rezultata ustanovljeno je da su u uslovima visoke temperature svi *StCuZnSOD* geni visoko eksprimirani kod ispitivanih sorti krompira. Dugotrajni toplotni stres indukovao je povećanu ekspresiju *StCuZnSOD1* gena kod sorte Désirée (9,4 puta više u odnosu na kontrolu) i sorte Kennebec (2 puta više u odnosu na kontrolu), dok je kod toplotno-osetljive sorte Agria redukovao njegovu ekspresiju. Sličan obrazac se uočava u slučaju delovanja toplotnog stresa na ekspresiju *StCuZnSOD2* gena, gde je kod sorti Désirée i Kennebec došlo do značajnog povećanja nivoa ekspresije (20,8 i 33,3 puta više transkripata/ng RNK u odnosu na kontrolu), dok je kod sorte Agria zabeležen pad. *StCuZnSOD3* gen je najslabije eksprimiran kod ispitivanih sorti u odnosu na druge *StCuZnSOD*, ali je utvrđeno da dugotrajni temperaturni tretman visokom temperaturom (29 °C) indukuje njegovu ekspresiju kod sorti Agria i Désirée, dok temperatura od 26 °C dovodi do blagog porasta nivoa ekspresije datog gena samo kod sorte Agria. Budući da je prethodno ustanovljeno da *StCuZnSOD1* kodira citosolnu, *StCuZnSOD2* hloroplastnu, a *StCuZnSOD3* najverovatnije peroksizomalnu *StSOD*, može se reći da ovi visoko eksprimirani geni igraju važnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti ćelija listova krompira.

Ekspresija *StMnSOD* gena kod ispitivanih sorti krompira je konstitutivna i stabilna tokom primenjenih temperaturnih tretmana, izuzev blago povećane indukcije ekspresije u uslovima toplotnog stresa kod sorti Agria i Désirée. Jedan od faktora koji utiču na osetljivost biljaka krompira na toplotu je možda relativno slaba ekspresija *StMnSOD* gena u uslovima visoke temperature, što vodi nedovoljnoj antioksidativnoj zaštiti mitohondrija, a time i biljnih ćelija. Waterer i sar. (2010) su pokazali da genetički transformisane biljke krompira, kod kojih dolazi do prekomerne ekspresije *MnSOD* proteina iz pšenice, pokazuju bolju toleranciju na toplotni stres (44 °C) u odnosu na one koje nisu transformisane.

Ustanovljeno je da dugotrajni temperaturni tretmani indukuju povećanu ekspresiju *StFeSOD2* i *StFeSOD3* gena kod sve tri ispitivane sorte krompira. Na osnovu predikcije subćelijske lokalizacije, dati proteini se nalaze u hloroplastima, što ukazuje na značajnu ulogu ovih proteina u zaštiti fotosintetičkog aparata u uslovima visokih temperatura. Uočeno je da nisko eksprimirani geni (*StFeSOD1* i *StFeSOD4*), imaju nešto veću ekspresiju kod sorte Kennebec u odnosu na ostale sorte, a posebno tokom dugotrajnog tretmana na temperaturi od 26 °C, što može ukazati na zaštitnu ulogu ovih gena u uslovima blago povišenih temperatura.

Na osnovu prikazanih rezultata, ustanovljeno je da se toplotno-osetljiva sorta Agria i relativno termotolerantna sorta Désirée najviše razlikuju u nivou ekspresije *StCuZnSOD1* i *StCuZnSOD2* gena, koji su u uslovima dugotrajnog toplotnog stresa 9,4 i 20,8 puta više eksprimirani kod sorte Désirée. Takođe, zapaženo je da se sorta Kennebec razlikuje od druge dve sorte u većoj zastupljenosti transkripata *StFeSOD1* i *StFeSOD4* gena, dok je ekspresija ostalih *StSOD* gena na nešto nižem nivou.

Ustanovljeno je da egzogena primena SA uglavnom ima blagi uticaj na ekspresiju *StSOD* gena kod ispitivanih sorti. Pozitivan efekat SA na ekspresiju svih *StSOD* gena uočen je samo kod termotolerantne sorte Désirée, tokom dugotrajnog tretmana blago povišenom temperaturom. Kod sorte Agria egzogena primena SA izazvala je značajan pad nivoa ekspresije *StCuZnSOD2* gena u

kontrolnim uslovima. Iako literaturni podaci ukazuju na pozitivan efekat SA na ekspresiju *SOD* gena, u ovoj studiji to nije potvrđeno. Feng i sar. (2015) indukovali su ekspresiju većine *SOD* gena kod *M. acuminata* cv. *Tianbaojiao* egzogenom primenom  $1 \times 10^{-4}$  M SA. Li i sar. (2019) postigli su povećanu aktivnost i ekspresiju *StSOD* gena kod biljaka krompira sorte Zaodabai, folijarnom aplikacijom  $6 \times 10^{-4}$  M SA. Na osnovu rezultata prikazanih u ovom radu, postoji mogućnost da je primenjena koncentracija SA ( $1 \times 10^{-5}$  M) bila suviše niska da stimuliše ekspresiju osam *StSOD* gena kod ispitivanih sorti/genotipova krompira pri različitim temperaturnim tretmanima.

#### 5.4. Uticaj temperature na ekspresiju *StSOD* gena u različitim organima biljaka sorte Désirée gajenih *ex vitro*

Za ispitivanje uticaja temperature na ekspresiju *StSOD* gena u različitim vegetativnim organima krompira (fiziološki mlađi i stariji listovi, stoloni, korenovi i krtole) korišćenjem *ex vitro* model sistema, odabrane su biljke sorte Désirée, koja je česta model sorta i najrasprostranjenija kultivisana sorta u Srbiji. Ustanovljeno je da pri optimalnom temperaturom režimu za rastenje izdanaka i tuberizaciju krompira (20/17 °C, dan/noć), dolazi do ekspresije svih *StSOD* gena u svakom od ispitivanih organa. Ustanovljeno je da postoji velika razlika u nivou ekspresije pojedinih *StSOD* gena, te je izvršena podela na visoko (*StCuZnSOD1*, *StCuZnSOD2*, *StCuZnSOD3*, *StMnSOD*, *StFeSOD2* i *StFeSOD3*) i nisko (*StFeSOD1* i *StFeSOD4*) eksprimirane gene, koja je u potpunosti odgovarala podeli ustanovljenoj korišćenjem *in vitro* sistema (Slika 45.). *StCuZnSOD1* je gen sa najvišim nivoom ekspresije, koji iznosi čak  $97,5 \times 10^3$  kopija/ng RNK u stolonima. Pored *StCuZnSOD1*, ustanovljeno je da su *StMnSOD* i *StFeSOD3* takođe visoko eksprimirani u ispitivanim biljnim organima. *StMnSOD* je jedina mitohondrijalna SOD i krucijalna je u eliminaciji ROS u ovim organelama, te je sasvim razumljivo zbog čega je ekspresija *StMnSOD* gena na tako visokom nivou (posebno u organima čije ćelije ne sadrže funkcionalne hloroplaste). *StFeSOD3* je najviše eksprimiran u poređenju sa ostalim *StFeSOD*, a njegova ekspresija je značajno indukovana u mlađim listovima, što je očekivano budući da je *StFeSOD3* hloroplastna SOD. Osim navedenih, u mlađim listovima je visoko eksprimiran *StCuZnSOD2*, dok je u drugim organima njegova ekspresija bila na nižem nivou. *StCuZnSOD3* i *StFeSOD2* geni su se karakterisali nižim nivoom ekspresije u ispitivanim organima, u odnosu na ostale gene. Zapaženo je da su geni koji kodiraju hloroplastne *StSOD* (*StCuZnSOD2*, *StFeSOD2* i *StFeSOD3*) više eksprimirani u mlađim nego u starijim listovima pri optimalnom temperaturnom režimu za rastenje izdanaka i tuberizaciju krompira. To može biti posledica povećane produkcije  $O_2^{\cdot-}$  u mladim listovima usled povećane metaboličke aktivnosti, što dalje vodi višem nivou SOD (Rabinowitch i Fridowich, 1983), dok tokom senescencije listova dolazi do značajnog pada u zastupljenosti SOD (Dhindsa i sar., 1981). Budući da senescenciju listova karakteriše degradacija hloroplasta, verovatno usled toga dolazi do utišavanja gena koji kodiraju hloroplastne *StSOD*.

Efekat toplotnog stresa (30/20 °C, dan/noć) praćen je u različitim organima i različitim vremenskim tačkama: dan pre izlaganja toplotnom stresu, prvog, sedmog i 21. dana dugotrajnog toplotnog stresa (Slika 47.). Od osam ispitivanih gena, najviše su eksprimirani: *StCuZnSOD1*, *StCuZnSOD2*, *StMnSOD* i *StFeSOD3* geni. Može se primetiti da nakon prvog dana toplotnog stresa kod većine ispitivanih gena ne dolazi do indukcije ekspresije. U nekim organima čak dolazi do pada u nivou ekspresije, kao na primer *StCuZnSOD1*, *StCuZnSOD3*, *StFeSOD4*, u starijim listovima. Međutim, interesantno je da u mnogim organima dolazi do povećane ekspresije *StSOD* posle sedmog dana toplotnog stresa. U stolonima, na primer, indukovana je ekspresija čak pet gena (*StCuZnSOD1*, *StCuZnSOD3*, *StMnSOD*, *StFeSOD2* i *StFeSOD3*). U najmlađim listovima nakon sedmog dana tretmana indukovana je ekspresija tri gena (*StCuZnSOD2*, *StFeSOD3* i *StFeSOD2*), dok je u najstarijim listovima indukovana ekspresija *StFeSOD3* i *StFeSOD2* gena. Na osnovu navedenih rezultata, pretpostavljeno je da indukcija *StSOD* gena najverovatnije nije deo ranog (brzog) odgovora biljaka krompira na delovanje visokih temperatura.

Uočeno je da toplotni stres uglavnom indukuje ekspresiju hloroplastnih *StSOD* (*StCuZnSOD2*, *StFeSOD2* i *StFeSOD3*) u listovima, citosolne *StCuZnSOD1* i mitohondrijalne *StMnSOD* u stolonima, dok na ekspresiju *StSOD* gena u ostalim ispitivanim organima nije imao značajnijeg uticaja. Dati rezultati ukazuju da *StCuZnSOD1*, *StCuZnSOD2*, *StMnSOD*, *StFeSOD2* i *StFeSOD3* geni imaju važnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti ćelija listova i stolona krompira u uslovima visokih temperatura.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- *In silico* analizom je identifikovano osam *StSOD* gena (*StCuZnSOD1-3*, *StMnSOD* i *StFeSOD1-4*), a analizom ekspresije qRT-PCR metodom je ustanovljeno da su dati geni funkcionalni u ispitivanim sortama krompira.
- *StCuZnSOD1-3*, *StMnSOD*, *StFeSOD2* i *StFeSOD3* su visoko eksprimirani geni, dok se *StFeSOD1* i *StFeSOD4* karakterišu niskim nivoom ekspresije kod ispitivanih sorti krompira.
- Na osnovu pozicije na hromozomima i procenta identičnosti izvedenih aminokiselinskih sekvenci, utvrđeno je da *StFeSOD1* i *StFeSOD4* predstavljaju tandemski ponovljene gene, a *StFeSOD1* i *StFeSOD2* segmentalno ponovljene gene.
- *StCuZnSOD* imaju sve karakteristike eukariotskih *CuZnSOD* sa pretpostavljenom lokalizacijom u citosolu (*StCuZnSOD1*), hloroplastima (*StCuZnSOD2*) i peroksizomima (*StCuZnSOD3*).
- *StMnSOD* i *StFeSOD* u svojoj strukturi poseduju karakteristične konzervativne Mn-FeSOD domene na N-terminusu (PF00081.24) i C-terminusu (PF02777.20), ali se razlikuju u poziciji Q ostatka u aktivnom mestu što određuje specifičnost enzima za vezivanje Mn ili Fe jona.
- *StFeSOD2* pokazuje visok nivo sličnosti sa FSD2/PAP9 proteinom *A. thaliana* u strukturi C-terminalnog regiona, zbog čega se pretpostavlja da ovaj protein može imati sličnu funkciju kao FSD2/PAP9, a to je oksidativna zaštita nezrelih hloroplasta.
- Na osnovu *in silico* predikcije subćelijske lokalizacije, kao i sveobuhvatnih razmatranja o strukturi *StFeSOD* proteina i nastanku pojedinih formi putem duplikacije gena, može se zaključiti da je *StFeSOD4* najverovatnije citosolni protein, dok su *StFeSOD1*, *StFeSOD2* i *StFeSOD3* hloroplastni proteini.
- Tretman blago povišenom temperaturom (26 °C) ima negativan uticaj na rastenje i razviće izdanaka biljaka sorti Agria i Kennebec, dok tretman visokom temperaturom (29 °C) nema efekta na rast izdanaka sorte Désirée, što je u skladu sa prethodnim nalazima u kojima je Désirée okarakterisan kao relativno toplotno-tolerantan genotip. Budući da odabrani temperaturni tretmani uglavnom nisu imali uticaja na broj, dužinu i svežu masu korenova, može se zaključiti da optimalni uslovi za rastenje i razviće izdanaka i korenova biljke ne moraju biti u istom temperaturnom opsegu, kao i da zavise od sorte/genotipa krompira.
- Egzogeno primena SA u koncentraciji od  $1 \times 10^{-5}$  M pri dugotrajnom tretmanu blago povišenom temperaturom (26 °C) uglavnom ispoljava pozitivan efekat na rastenje izdanaka, dok u uslovima visoke temperature (29 °C), efekat SA zavisi od genotipa krompira. Sa druge strane, tokom datih temperaturnih tretmana, SA nema uticaja na broj korenova, ali suprimira njihovo izduživanje, što ukazuje da SA ima različit efekat na nadzemni i podzemni deo biljaka krompira.

- Sorta/genotip Désirée karakterisala se najvišim nivoom ekspresije čak pet od šest visoko eksprimiranih *StSOD* gena u uslovima dugotrajnog toplotnog stresa (29 °C) *in vitro*, što ukazuje da se bolja toplotna tolerancija ove sorte u odnosu na sorte Agria i Kennebec može delom objasniti efikasnijom antioksidativnom zaštitom.
- Analizom ekspresije *StFeSOD* gena je utvrđeno da dugotrajni temperaturni tretmani povišenom (26 °C) i visokom temperaturom (29 °C) indukuju ekspresiju *StFeSOD2* i *StFeSOD3* gena kod sve tri ispitivane sorte krompira u uslovima *in vitro*. Budući da je pretpostavljeno da se *StFeSOD2* i *StFeSOD3* proteini nalaze se u hloroplastima, može se zaključiti da produkti navedenih *StFeSOD* imaju važnu ulogu u zaštiti fotosintetičkog aparata u uslovima oksidativnog stresa prouzrokovanog visokom temperaturom.
- Egzogeno primena SA u koncentraciji od  $1 \times 10^{-5}$  M uglavnom nije imala velikog uticaja na ekspresiju *StSOD* gena, sa izuzetkom sorte Désirée u dugotrajnom tretmanu blago povišenom temperaturom (26 °C) gde je ustanovljen snažan stimulatorni efekat SA na ekspresiju svih *StSOD*.
- *StCuZnSOD1*, *StMnSOD* i *StFeSOD3* su najviše eksprimirani geni u različitim vegetativnim organima biljaka sorte Désirée gajenih *ex vitro* u optimalnim temperaturnim uslovima, te se može reći da produkti datih gena predstavljaju i najznačajnije SOD komponente antioksidativnog sistema u ćelijama ove sorte krompira.
- Geni koji kodiraju hloroplastne *StSOD* su visoko eksprimirani u mlađim (*StCuZnSOD2* i *StFeSOD3*) i starijim listovima (*StFeSOD3*), dok su geni koji kodiraju citosolne i mitohondrijalne *StSOD* (*StCuZnSOD1* i *StMnSOD*) visoko eksprimirani u stolonima i korenovima biljaka sorte Désirée gajenih *ex vitro* u optimalnim temperaturnim uslovima.
- Dugotrajni toplotni stres (30/20 °C, dan/noć) je indukovao ekspresiju gena za hloroplastne *StSOD* (*StCuZnSOD2*, *StFeSOD2* i *StFeSOD3*) u listovima, a citosolne (*StCuZnSOD1*) i mitohondrijalne (*StMnSOD*) *StSOD* u stolonima kod *ex vitro* gajenih biljaka sorte Désirée, što ukazuje da *StSOD* imaju važnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti ćelija listova i stolona krompira u uslovima visokih temperatura.



## 7. LITERATURA

- Abdel-Ghany, S. E., Müller-Moulé, P., Niyogi, K. K., Pilon, M., & Shikanai, T. (2005). Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *The Plant Cell*, 17(4), 1233-1251.
- Ahn, Y. J., Claussen, K., & Zimmerman, J. L. (2004). Genotypic differences in the heat-shock response and thermotolerance in four potato cultivars. *Plant Science*, 166(4), 901-911.
- Akram, N. A., Shafiq, F., & Ashraf, M. (2017). Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 8: 613, 1-17.
- Al-Faris, M., Abu-Romman, S., & Odat, N. (2022) Cloning, sequence analysis and expression profile of a chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase gene from lentil. *International Journal of Agriculture & Biology*, 28(3), 197-204.
- Allen, M. D., Kropat, J., Tottey, S., Del Campo, J. A., & Merchant, S. S. (2007). Manganese deficiency in *Chlamydomonas* results in loss of photosystem II and MnSOD function, sensitivity to peroxides, and secondary phosphorus and iron deficiency. *Plant Physiology*, 143(1), 263-277.
- Almansa, M. S., del Río, L. A., & Sevilla, F. (1994). Characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a higher plant, *Citrus limonum*. *Physiologia Plantarum*, 90(2), 339-347.
- Alscher, R. G., Erturk, N., & Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1331-1341.
- Amano, A., Shizukuishi, S., Tamagawa, H., Iwakura, K., Tsunasawa, S., & Tsunemitsu, A. (1990). Characterization of superoxide dismutases purified from either anaerobically maintained or aerated *Bacteroides gingivalis*. *Journal of Bacteriology*, 172(3), 1457-1463.
- Andrès, C., Agne, B., & Kessler, F. (2010). The TOC complex: preprotein gateway to the chloroplast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1803(6), 715-723.
- Armenteros, J. J. A., Salvatore, M., Emanuelsson, O., Winther, O., von Heijne, G., Elofsson, A., & Nielsen, H. (2019). Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Science Alliance*, 2(5): e201900429, 1-14.
- Armenteros, J. J. A., Sønderby, C. K., Sønderby, S. K., Nielsen, H., & Winther, O. (2017). DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics*, 33(21), 3387-3395.
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 601-639.
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141(2), 391-396.
- Asada, K., Kiso, K., & Yoshikawa, K. (1974). Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination. *Journal of Biological Chemistry*, 249(7), 2175-2181.

- Bajji, M., M'Hamdi, M., Gastiny, F., Rojas-Beltran, J. A., & Du Jardin, P. (2007). Catalase inhibition accelerates dormancy release and sprouting in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 11(2), 121-131.
- Bartoli, C. G., Buet, A., Gergoff Grozeff, G., Galatro, A., & Simontacchi, M. (2017). Ascorbate-glutathione cycle and abiotic stress tolerance in plants. In: M. Hossain, S. Munné-Bosch, D. Burritt, P. Diaz-Vivancos, M. Fujita & A. Lorence (Eds.) *Ascorbic Acid in Plant Growth, Development and Stress Tolerance* (pp. 177-200). Springer, Cham.
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276–287.
- Beauclair, L., Yu, A., & Bouché, N. (2010). microRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 62(3), 454-462.
- Bela, K., Horváth, E., Gallé, Á., Szabados, L., Tari, I., & Csiszár, J. (2015). Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Journal of Plant Physiology*, 176, 192-201.
- Benoit, G. R., Stanley, C. D., Grant, W. J., & Torrey, D. B. (1983). Potato top growth as influenced by temperatures. *American Potato Journal*, 60, 489-501.
- Bhaduri, S., Singh, S. K., Cohn, W., Hasan, S. S., Whitelegge, J. P., & Cramer, W. A. (2020). A novel chloroplast super-complex consisting of the ATP synthase and photosystem I reaction center. *PloS ONE*, 15(8): e0237569, 1-13.
- Bodlaender, K. B. A., Lugt, C., & Marinus, J. (1964). The induction of second-growth in potato tubers. *European Potato Journal*, 7, 57-71.
- Borah, M. N. (1962). Growth of the potato as influenced by temperature. *Indian Journal of Plant Physiology*, 5, 53-72.
- Borders Jr, C. L., & Johansen, J. T. (1980). Identification of ARG-143 as the essential arginyl residue in yeast Cu, Zn superoxide dismutase by use of a chromophoric arginine reagent. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 96(3), 1071-1078.
- Bordo, D., Djinovic, K., & Bolognesi, M. (1994). Conserved patterns in the Cu, Zn superoxide dismutase family. *Journal of Molecular Biology*, 238(3), 366-386.
- Borgstahl, G. E., Parge, H. E., Hickey, M. J., Beyer Jr, W. F., Hallewell, R. A., & Tainer, J. A. (1992). The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell*, 71(1), 107-118.
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D., & Asada, K. (1994). Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(3), 199-218.
- Boyd, S. D., Calvo, J. S., Liu, L., Ullrich, M. S., Skopp, A., Meloni, G., & Winkler, D. D. (2018a). The yeast copper chaperone for copper-zinc superoxide dismutase (CCS1) is a multifunctional chaperone promoting all levels of SOD1 maturation. *Journal of Biological Chemistry*, 294(6), 1956-1966.
- Boyd, S. D., Liu, L., Bulla, L., & Winkler, D. D. (2018b). Quantifying the Interaction between Copper-Zinc Superoxide Dismutase (Sod1) and its Copper Chaperone (Ccs1). *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 11(4): 473, 1-14.

- Boyd, S. D., Ullrich, M. S., Skopp, A., & Winkler, D. D. (2020). Copper sources for Sod1 activation. *Antioxidants*, 9(6): 500, 1-14.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bročić, Z., & Stefanović R. (2012). *Krompir, proizvodnja, ekonomika i tržište*, monografija, 408 pp. Beograd: Poljoprivredni fakultet, Zemun.
- Burton, W.G. (1989). Post-harvest physiology. In: *The potato* (pp. 423-522). Harlow: Longman Scientific and Technical.
- Caffarri, S., Tibiletti, T., C Jennings, R., & Santabarbara, S. (2014). A comparison between plant photosystem I and photosystem II architecture and functioning. *Current Protein and Peptide Science*, 15(4), 296-331.
- Cannon, S. B., Mitra, A., Baumgarten, A., Young, N. D., & May, G. (2004). The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 4(1), 1-21.
- Casaretto, J. A., El-kereamy, A., Zeng, B., Stiegelmeier, S. M., Chen, X., Bi, Y. M., & Rothstein, S. J. (2016). Expression of *OsMYB55* in maize activates stress-responsive genes and enhances heat and drought tolerance. *BMC Genomics*, 17(1), 1-15.
- Chao, J., Li, Z., Sun, Y., Aluko, O. O., Wu, X., Wang, Q., & Liu, G. (2021). MG2C: A user-friendly online tool for drawing genetic maps. *Molecular Horticulture*, 1(1), 1-4.
- Chaoui, A., & El Ferjani, E. (2014). Heavy metal-induced oxidative damage is reduced by  $\beta$ -estradiol application in lentil seedlings. *Plant Growth Regulation*, 74(1), 1-9.
- Charfeddine, M., Saïdi, M. N., Charfeddine, S., Hammami, A., & Gargouri Bouzid, R. (2015). Genome-wide analysis and expression profiling of the ERF transcription factor family in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Molecular Biotechnology*, 57, 348-358.
- Chen, H., Lee, J., Lee, J. M., Han, M., Emonet, A., Lee, J., Jia, X., & Lee, Y. (2022). MSD2, an apoplasmic Mn-SOD, contributes to root skotomorphogenic growth by modulating ROS distribution in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 317: 111192.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159.
- Cooper, P., & Ho, T. H. D. (1983). Heat shock proteins in maize. *Plant Physiology*, 71(2), 215-222.
- Corpas, F. J., González-Gordo, S., & Palma, J. M. (2020). Plant peroxisomes: A factory of reactive species. *Frontiers in Plant Science*, 11: 853.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, 16(22), 10881-10890.
- Culotta, V. C., Klomp, L. W. J., Strain, J., Casareno, R. L. B., Krems, B., & Gitlin, J. D. (1997). The copper chaperone for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(38), 23469-23472.
- Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2: 53, 1-13.

- Daza, M. C., Sandalio, L. M., Quijano-Rico, M., & del Río (1993). Isoenzyme pattern of superoxide dismutase in coffee leaves from cultivars susceptible and resistant to the rust *Hemileia vastatrix*. *Journal of Plant Physiology*, 141(5), 521-526.
- del Río, L. A., & López-Huertas, E. (2016). ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Plant and Cell Physiology*, 57(7), 1364-1376.
- del Río, L. A., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Gomez, M., & Barroso, J. B. (2002). Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1255-1272.
- Demirel, U., Morris, W. L., Ducreux, L. J. M., Yavuz, C., Asim, A., Tindas, I., Campbell, R., Morris, J. A., Verrall, S. R., Hedley, P. E., Gokce, Z. N. O., Caliskan, S., Aksoy, E., Caliskan, M. E., Taylor, M. A., & Hancock, R. D. (2020). Physiological, biochemical, and transcriptional responses to single and combined abiotic stress in stress-tolerant and stress-sensitive potato genotypes. *Frontiers in Plant Science*, 11: 169, 1-21.
- Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P., & Thorpe, T. A. (1981). Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 32(1), 93-101.
- Diaz-Vivancos, P., Rubio, M., Mesonero, V., Periago, P. M., Ros Barceló, A., Martínez-Gómez, P., & Hernández, J. A. (2006). The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term plum pox virus infection. *Journal of Experimental Botany*, 57(14), 3813-3824.
- Droillard, M. J., Bureau, D., Paulin, A., & Daussant, J. (1989). Identification of different classes of superoxide dismutase in carnation petals. *Electrophoresis*, 10(1), 46-48.
- Duke, M. V., & Salin, M. L. (1985). Purification and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Ginkgo biloba*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 243(1), 305-314.
- Dumanović, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kuča, K., & Jačević, V. (2021). The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: A concise overview. *Frontiers in Plant Science*, 11: 552969.
- Dupont, C. L., Neupane, K., Shearer, J., & Palenik, B. (2008). Diversity, function and evolution of genes coding for putative Ni-containing superoxide dismutases. *Environmental Microbiology*, 10(7), 1831-1843.
- Eddy, S. R. (2011). Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Computational Biology*, 7(10): e1002195, 1-16.
- El Shafey, H. M., Ghanem, S., Merkamm, M., & Guyonvarch, A. (2008). *Corynebacterium glutamicum* superoxide dismutase is a manganese-strict non-cambialistic enzyme *in vitro*. *Microbiological Research*, 163(1), 80-86.
- El-kereamy, A., Bi, Y. M., Ranathunge, K., Beatty, P. H., Good, A. G., & Rothstein, S. J. (2012). The rice R2R3-MYB transcription factor OsMYB55 is involved in the tolerance to high temperature and modulates amino acid metabolism. *PLoS ONE*, 7(12): e52030.
- Elwan, M. W. M.; Elhamahmy, M. A. M., & Mohamed, F. H. (2018). Physiological effect of potato genotypes and salicylic acid on plantlets growth and microtuber production under salt stress. *Hortscience Journal of Suez Canal University*, 7(2), 7-14.

- Ewing, E. E., & Struik, P. C. (1992). Tuber formation in potato: induction, initiation, and growth. *Horticultural Reviews*, 14, 89-198.
- FAO (2008). International year of potato 2008. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations 2008. <http://www.fao.org/potato-2008/en/aboutiyp/index.html>.
- FAO (2023). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Pristupljeno 10. januara 2023.
- Farooq, M. A., Niazi, A. K., Akhtar, J., Akhtar, J., Saifullah, Farooq, M., Souri, Z., Karimi, N., & Rengel, Z. (2019). Acquiring control: the evolution of ROS-induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 141, 353-369.
- Favier, A., Gans, P., Boeri Erba, E., Signor, L., Muthukumar, S. S., Pfannschmidt, T., Blanvillain, R., & Cobessi, D. (2021). The plastid-encoded RNA polymerase-associated protein PAP9 is a superoxide dismutase with unusual structural features. *Frontiers in Plant Science*, 12: 668897, 1-15.
- Feng, K., Yu, J., Cheng, Y., Ruan, M., Wang, R., Ye, Q., Zhou, G., Li, Z., Yao, Z., Yang, Y., Zheng, Q., & Wan, H. (2016). The *SOD* gene family in tomato: identification, phylogenetic relationships, and expression patterns. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1279.
- Feng, P. B., Wang, Y. N., Mu, Y., Un, J. B., Kang, J. H., Wu, N., & Lu, X. L. (2019). Effect of high temperature on potato starch content, amylase activity and yield. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 32(6), 1253-1258.
- Feng, W., Hongbin, W., Bing, L., & Jinfa, W. (2006). Cloning and characterization of a novel splicing isoform of the iron-superoxide dismutase gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports*, 24(12), 734-742.
- Feng, X., Lai, Z., Lin, Y., Lai, G., & Lian, C. (2015). Genome-wide identification and characterization of the superoxide dismutase gene family in *Musa acuminata* cv. Tianbaojiao (AAA group). *BMC Genomics*, 16: 823, 1-16.
- Fernández-Ocaña, A., Chaki, M., Luque, F., Gómez-Rodríguez, M. V., Carreras, A., Valderrama, R., Begara-Morales, C., Hernández, L. E., Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2011). Functional analysis of superoxide dismutases (SODs) in sunflower under biotic and abiotic stress conditions. Identification of two new genes of mitochondrial Mn-SOD. *Journal of Plant Physiology*, 168(11), 1303-1308.
- Fetherolf, M. M., Boyd, S. D., Taylor, A. B., Kim, H. J., Wohlschlegel, J. A., Blackburn, N. J., Hart, P. J., Winge, D. R., & Winkler, D. D. (2017). Copper-zinc superoxide dismutase is activated through a sulfenic acid intermediate at a copper ion entry site. *Journal of Biological Chemistry*, 292(29), 12025-12040.
- Fidalgo, F., Santos, A., Santos, I., & Salema, R. (2004). Effects of long-term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. *Annals of Applied Biology*, 145(2), 185-192.
- Filiz, E., & Tombuloğlu, H. (2015). Genome-wide distribution of superoxide dismutase (SOD) gene families in *Sorghum bicolor*. *Turkish Journal of Biology*, 39(1), 49-59.
- Fink, R. C., & Scandalios, J. G. (2002). Molecular evolution and structure–function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other

- eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 399(1), 19-36.
- Firman, D. M., O'Brien, P. J., & Allen, E. J. (1992). Predicting the emergence of potato sprouts. *The Journal of Agricultural Science*, 118(1), 55-61.
- Fisher, C. L., Cabelli, D. E., Tainer, J. A., Hallewell, R. A., & Getzoff, E. D. (1994). The role of arginine 143 in the electrostatics and mechanism of Cu, Zn superoxide dismutase: computational and experimental evaluation by mutational analysis. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 19(1), 24-34.
- Fogelman, E., Oren-Shamir, M., Hirschberg, J., Mandolino, G., Parisi, B., Ovadia, R., Tanami, Z., Faigenboim, A., & Ginzberg, I. (2019). Nutritional value of potato (*Solanum tuberosum*) in hot climates: anthocyanins, carotenoids, and steroidal glycoalkaloids. *Planta*, 249(4), 1143-1155.
- Francoz, E., Ranocha, P., Nguyen-Kim, H., Jamet, E., Burlat, V., & Dunand, C. (2015). Roles of cell wall peroxidases in plant development. *Phytochemistry*, 112, 15-21.
- Fridovich, I. (1974). Superoxide dismutases. In: Meister A. (Eds.) *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 41, 35-97.
- Fu, J., Momcilovic, I., & Prasad, P. (2012). Molecular bases and improvement of heat tolerance in crop plants. In: S. Josipovic & E. Ludwig (Eds.) *Heat Stress: Causes, Prevention and Treatments* (pp. 185-214). New York: Nova Science Publishers.
- Fukuzawa, K., Tokumura, A., Ouchi, S., & Tsukatani, H. (1982). Antioxidant activities of tocopherols on Fe<sup>2+</sup>-ascorbate-induced lipid peroxidation in lecithin liposomes. *Lipids*, 17(7), 511-513.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: J. M. Walker (Ed.) *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571-607). Totowa: Humana Press.
- Gechev, T., Minkov, I., & Hille, J. (2005). Hydrogen peroxide-induced cell death in Arabidopsis: transcriptional and mutant analysis reveals a role of an oxoglutarate-dependent dioxygenase gene in the cell death process. *IUBMB Life*, 57(3), 181-188.
- Ginzberg, I., Barel, G., Ophir, R., Tzin, E., Tanami, Z., Muddarangappa, T., de Jong, W., & Fogelman, E. (2009). Transcriptomic profiling of heat-stress response in potato periderm. *Journal of Experimental Botany*, 60(15), 4411-4421.
- Grun, P. (1990). The evolution of cultivated potatoes. *Economic Botany*, 44(3), 39-55.
- Gullner, G., Komives, T., Király, L., & Schröder, P. (2018). Glutathione S-transferase enzymes in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1836.
- Guo, M., Liu, J. H., Ma, X., Luo, D. X., Gong, Z. H., & Lu, M. H. (2016). The plant heat stress transcription factors (HSFs): structure, regulation, and function in response to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7: 114.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141(2), 312-322.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology & Medicine*, 18(1), 125-126.

- Han, L. M., Hua, W. P., Cao, X. Y., Yan, J. A., Chen, C., & Wang, Z. Z. (2020). Genome-wide identification and expression analysis of the *superoxide dismutase* (SOD) gene family in *Salvia miltiorrhiza*. *Gene*, 742: 144603.
- Hancock, R. D., Morris, W. L., Ducreux, L. J. M., Morris, J. A., Usman, M., Verrall, S. R., Fuller, J., Simpson, C. G., Zhang, R., Hedley, P. E., & Taylor, M. A. (2014). Physiological, biochemical and molecular responses of the potato (*Solanum tuberosum* L.) plant to moderately elevated temperature. *Plant, cell & environment*, 37(2), 439-450.
- Hanneman, Jr, R. E. (1995). Ecology and reproductive biology of potato: the potential for and the environmental implications of gene spread. In: R. J. Fredrick, I. Virgin & E. Lindarte (Eds.) *Environmental Concerns with Transgenic Plants in Centers of Diversity: Potato as a model* (pp. 19-38). Proceedings from a regional workshop, Parque National Iguazu, Argentina. Stockholm, Sweden: Biotechnology Advisory Commission and San Jose, Costa Rica: Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Parvin, K., Bhuiyan, T. F., Anee, T. I., Nahar, K., Hossen, S., Zulfiqar, F., Alam, M., & Fujita, M. (2020). Regulation of ROS metabolism in plants under environmental stress: A review of recent experimental evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22): 8695, 1-42.
- Hatchikian, E. C., & Henry, Y. A. (1977). An iron-containing superoxide dismutase from the strict anaerobe *Desulfovibrio desulfuricans* (Norway 4). *Biochimie*, 59(2), 153-161.
- Hawkes, J. G. (1990). *The potato: Evolution, biodiversity and genetic resources*, 259 pp. London: Belhaven Press.
- Hawkes, J.G. (1978). Biosystematics of the potato. In: P.M. Harris (Ed.) *The Potato Crop: The Scientific Basis for Improvement* (pp. 15-69). Chapman & Hall, London, U.K.
- Hawkes, J.G. (1994). Origins of cultivated potatoes and species relationships. In: J.E. Bradshaw and G.R. Mackay (Eds.) *Potato genetics* (pp. 3-42). Wallingford: CAB International.
- Hernández, J. A., Jiménez, A., Mullineaux, P., & Sevilla, F. (2000). Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant, Cell & Environment*, 23(8), 853-862.
- Hilton, G. R., Lioe, H., Stengel, F., Baldwin, A. J., & Benesch, J. L. P., (2013). Small heat-shock proteins: paramedics of the cell. In: S. Jackson (Ed.) *Molecular Chaperones, Topics in Current Chemistry*, vol 328 (pp. 69-98). Berlin: Springer.
- Hooker, W. J. (1981). Internal heat necrosis. In: W. J. Hooker (Ed.) *Compendium of Potato Diseases* (pp. 11-12). Saint Paul: American Phytopathological Society Press.
- Hu, B., Jin, J., Guo, A. Y., Zhang, H., Luo, J., & Gao, G. (2015). GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31(8), 1296-1297.
- Hu, S. H., & Jinn, T. L. (2022). Impacts of Mn, Fe, and oxidative stressors on MnSOD activation by AtMTM1 and AtMTM2 in *Arabidopsis*. *Plants*, 11(5): 619, 1-14.
- Hu, S. H., Lin, S. F., Huang, Y. C., Huang, C. H., Kuo, W. Y., & Jinn, T. L. (2021). Significance of AtMTM1 and AtMTM2 for Mitochondrial MnSOD Activation in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 12: 690064, 1-15.

- Hu, X., Hao, C., Cheng, Z. M., & Zhong, Y. (2019). Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the grapevine superoxide dismutase (SOD) family. *International Journal of Genomics*, 2019: 7350414, 1-13.
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D. X., Yi, M., & Zhao, Y. (2019). Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 10: 800, 1-10.
- Ikai, A. (1980). Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *The Journal of Biochemistry*, 88(6), 1895-1898.
- Imlay, J. A. (2006). Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Molecular microbiology*, 59(4), 1073-1082.
- Imlay, J. A., & Fridovich, I. (1991). Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 266(11), 6957-6965.
- Islam, M. M., Sandhu, J., Walia, H., & Saha, R. (2020). Transcriptomic data-driven discovery of global regulatory features of rice seeds developing under heat stress. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 2556-2567.
- Janků, M., Luhová, L., & Petřivalský, M. (2019). On the origin and fate of reactive oxygen species in plant cell compartments. *Antioxidants*, 8(4): 105, 1-15.
- Jarvis, P., & Kessler, F. (2014). Mechanisms of chloroplast protein import in plants. In: S. M. Theg & F. A. Wollman (Eds.) *Plastid Biology, Advances in Plant Biology* 5 (pp. 241-270). New York: Springer.
- Jiang, W., Yang, L., He, Y., Zhang, H., Li, W., Chen, H., Ma, D., & Yin, J. (2019). Genome-wide identification and transcriptional expression analysis of superoxide dismutase (SOD) family in wheat (*Triticum aestivum*). *PeerJ*, 7: e8062, 1-26.
- Jin, J., Tian, F., Yang, D. C., Meng, Y. Q., Kong, L., Luo, J., & Gao, G. (2017). PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D1040-D1045.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., & Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583-589.
- Kadota, Y., Shirasu, K., & Zipfel, C. (2015). Regulation of the NADPH oxidase RBOHD during plant immunity. *Plant and Cell Physiology*, 56(8), 1472-1480.
- Kanematsu, S., & Asada, K. (1979). Ferric and manganic superoxide dismutases in *Euglena gracilis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 195(2), 535-545.
- Kanematsu, S., & Asada, K. (1989). CuZn-superoxide dismutases in rice: occurrence of an active, monomeric enzyme and two types of isozyme in leaf and non-photosynthetic tissues. *Plant and Cell Physiology*, 30(3), 381-391.



- Kanematsu, S., & Asada, K. (1990). Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. *Plant and Cell Physiology*, 31(1), 99-112.
- Kanematsu, S., Okayasu, M., & Ueno, S. (2013). Atypical cytosol-localized Fe-superoxide dismutase in the moss *Pogonatum inflexum*. *Bull. Minamikyushu University* 43A, 23-31.
- Katyshev, A. I., Konstantinov, Y. M., & Kobzev, V. F. (2006b). Characterization of Mn- and Cu/Zn-containing superoxide dismutase gene transcripts in *Larix gmelinii*. *Molecular Biology*, 40(2), 327-329.
- Katyshev, A. I., Rogozin, I. B., & Konstantinov, Y. M. (2006a) Identification of new superoxide dismutase transcripts in plants by EST analysis: Alternative polyadenylation and splicing events. In: *Proceedings of the Fifth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure* (pp. 61-64). Novosibirsk, Russia.
- Keele, B. B., McCord, J. M., & Fridovich, I. (1970). Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B: a new manganese-containing enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 245(22), 6176-6181.
- Kehrer, J. P. (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1), 43-50.
- Kim, M. D., Kim, Y. H., Kwon, S. Y., Yun, D. J., Kwak, S. S., & Lee, H. S. (2010). Enhanced tolerance to methyl viologen-induced oxidative stress and high temperature in transgenic potato plants overexpressing the *CuZnSOD*, *APX* and *NDPK2* genes. *Physiologia Plantarum*, 140(2), 153-162.
- Kirby, T. W., Lancaster Jr, J. R., & Fridovich, I. (1981). Isolation and characterization of the iron-containing superoxide dismutase of *Methanobacterium bryantii*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 210(1), 140-148.
- Klatte, M., & Bauer, P. (2009). Accurate real-time reverse transcription quantitative PCR. In: T. Pfanschmidt (Ed.) *Plant Signal Transduction Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology* (pp. 61-77). Totowa: Humana Press.
- Kliebenstein, D. J., Monde, R. A., & Last, R. L. (1998). Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant physiology*, 118(2), 637-650.
- Knapp, S., Kardinahl, S., Hellgren, N., Tibbelin, G., Schäfer, G., & Ladenstein, R. (1999). Refined crystal structure of a superoxide dismutase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* at 2.2 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 285(2), 689-702.
- Kourani, M., Mohareb, F., Rezwani, F. I., Anastasiadi, M., & Hammond, J. P. (2022). Genetic and physiological responses to heat stress in *Brassica napus*. *Frontiers in Plant Science*, 13: 832147, 1-20.
- Krauss, A., & Marschner, H. (1982). Influence of nitrogen nutrition, daylength and temperature on contents of gibberellic and abscisic acid and on tuberization in potato plants. *Potato Research*, 25, 13-21.
- Kumar, R. (2014). Role of microRNAs in biotic and abiotic stress responses in crop plants. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(1), 93-115.
- Kuo, W. Y., Huang, C. H., & Jinn, T. L. (2013). Chaperonin 20 might be an iron chaperone for superoxide dismutase in activating iron superoxide dismutase (FeSOD). *Plant signaling & behavior*, 8(2): e23074, 1-4.

- Kwiatowski, J., & Kaniuga, Z. (1984). Evidence for iron-containing superoxide dismutase in leaves of *Lycopersicon esculentum* and *Phaseolus vulgaris*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 6(4), 197-202.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680.
- Lafta, A. M., & Lorenzen, J. H. (1995). Effect of high temperature on plant growth and carbohydrate metabolism in potato. *Plant Physiology*, 109(2), 637-643.
- Lamb, A. L., Torres, A. S., O'Halloran, T. V., & Rosenzweig, A. C. (2001). Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone. *Nature Structural Biology*, 8(9), 751-755.
- Le, S. Q., & Gascuel, O. (2008). An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1307-1320.
- León, A. M., Palma, J. M., Corpas, F. J., Gómez, M., Romero-Puertas, M. C., Chatterjee, D., Mateos, R. M., del Río, L. A., & Sandalio, L. M. (2002). Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(10), 813-820.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P., & Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 325-327.
- Levitt, J. (1980). *Responses of Plants to Environmental Stress, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses*, 497 pp. New York: Academic Press.
- Levy, D., & Veilleux, R. E. (2007). Adaptation of potato to high temperatures and salinity-a review. *American journal of potato research*, 84(6), 487-506.
- Li, Q., Wang, G., Wang, Y., Yang, D., Guan, C., & Ji, J. (2019). Foliar application of salicylic acid alleviate the cadmium toxicity by modulation the reactive oxygen species in potato. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 172, 317-325.
- Lin, C. Y., Roberts, J. K., & Key, J. L. (1984). Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings: synthesis and accumulation of heat shock proteins and their cellular localization. *Plant Physiology*, 74(1), 152-160.
- Lin, Q., & Deng, Y. (2021). Is sulfate radical a ROS?. *Environmental Science & Technology*, 55(22), 15010-15012.
- Lin, Y. L., & Lai, Z. X. (2013). Superoxide dismutase multigene family in longan somatic embryos: a comparison of CuZn-SOD, Fe-SOD, and Mn-SOD gene structure, splicing, phylogeny, and expression. *Molecular Breeding*, 32(3), 595-615.
- Liu, B., Zhao, S., Tan, F., Zhao, H., Wang, D. D., Si, H., & Chen, Q. (2017). Changes in ROS production and antioxidant capacity during tuber sprouting in potato. *Food Chemistry*, 237, 205-213.
- Liu, J., Xu, L., Shang, J., Hu, X., Yu, H., Wu, H., Lv, W., & Zhao, Y. (2021). Genome-wide analysis of the maize superoxide dismutase (SOD) gene family reveals important roles in drought and salt responses. *Genetics and Molecular Biology*, 44(3), 1-12.

- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- López-Delgado, H. A., Martínez-Gutiérrez, R., Mora-Herrera, M. E., & Torres-Valdés, Y. (2018). Induction of freezing tolerance by the application of hydrogen peroxide and salicylic acid as tuber-dip or canopy spraying in *Solanum tuberosum* L. plants. *Potato Research*, 61(3), 195-206.
- López-Delgado, H. A., Mora-Herrera, M.E., Zavaleta-Mancera, H.A., Cadena-Hinojosa, M., & Scott, I.M. (2004). Salicylic acid enhances heat tolerance and potato virus X (PVX) elimination during thermotherapy of potato microplants. *American Journal Potato Research* 81(3), 171–176.
- López-Huertas, E., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., & del Río, L. A. (1999). Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *Biochemical Journal*, 337(3), 531-536.
- López-Huertas, E., Sandalio, L. M., Gómez, M., & del Río, L. A. (1997). Superoxide Radical Generation in Peroxisomal Membranes: Evidence for the Participation of the 18-kDa Integral Membrane Polypeptide. *Free radical research*, 26(6), 497-506.
- Los, D. A., & Murata, N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1666(1-2), 142-157.
- Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yang, M., Zhang, D., Zheng, C., Lanczycki, C. J., & Marchler-Bauer, A. (2020). CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids rResearch*, 48(D1), D265-D268.
- Luster, D. G., & Donaldson, R. P. (1987). Orientation of electron transport activities in the membrane of intact glyoxysomes isolated from castor bean endosperm. *Plant Physiology*, 85(3), 796-800.
- Ma, X., Wang, W., Bittner, F., Schmidt, N., Berkey, R., Zhang, L., King, H., Zhang, Y., Feng, J., Wen, Y., Tan, L., Li, Y., Zhang, Q., Deng, Z., Xiong, X., & Xiao, S. (2016). Dual and opposing roles of xanthine dehydrogenase in defense-associated reactive oxygen species metabolism in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 28(5), 1108-1126.
- Marchler-Bauer, A., & Bryant, S. H. (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Research*, 32(suppl\_2), W327-W331.
- Marino, M., Galvano, M., Cambria, A., Polticelli, F., & Desideri, A. (1995). Modelling the three-dimensional structure and the electrostatic potential field of two Cu, Zn superoxide dismutase variants from tomato leaves. *Protein Engineering, Design and Selection*, 8(6), 551-556.
- Martinez, C. A., Loureiro, M. E., Oliva, M. A., & Maestri, M. (2001). Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. *Plant Science*, 160(3), 505-515.
- Mateos, R. M., Jiménez, A., Román, P., Romojaro, F., Bacarizo, S., Leterrier, M., Gómez, M., Sevilla, F., del Río, L. A., Corpas, F. J., & Palma, J. M. (2013). Antioxidant systems from pepper (*Capsicum annuum* L.): involvement in the response to temperature changes in ripe fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 9556-9580.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.

- McGill, C. R., Kurilich, A. C., & Davignon, J. (2013). The role of potatoes and potato components in cardiometabolic health: a review. *Annals of Medicine*, 45(7), 467-473.
- Medina, E., Kim, S. H., Yun, M., & Choi, W. G. (2021). Recapitulation of the function and role of ROS generated in response to heat stress in plants. *Plants*, 10(2): 371, 1-13.
- Meier, B., Sehn, A. P., Schininá, M. E., & Barra, D. (1994). *In vivo* incorporation of copper into the iron-exchangeable and manganese-exchangeable superoxide dismutase from *Propionibacterium shermanii*. Amino acid sequence and identity of the protein moieties. *European Journal of Biochemistry*, 219(1-2), 463-468.
- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4), 523-530.
- Miller, A. F. (2004). Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(2), 162-168.
- Miller, A. F. (2012). Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS letters*, 586(5), 585-595.
- Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M. A., Shulaev, V., Dangl, J. L., & Mittler, R. (2009). The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling*, 2(84): ra45.
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L., Tosatto, S.C.E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J., Finn, R. D., & Bateman, A. (2021). Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D412-D419.
- Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11-19.
- Momčilović, I. (2019). Effects of heat stress on potato productivity and nutritive quality. *Hrana i ishrana*, 60(2), 43-48.
- Momčilović, I., & Pantelić, D. (2018). Plant superoxide dismutases: Important players in abiotic stress tolerance. In: S. Magliozzi (Ed.) *Superoxide Dismutase: Structure, Synthesis and Applications* (pp. 45-100). New York: Nova Science Publishers.
- Momčilović, I., Fu, J., Pantelić, D., Rudić, J., & Bročić, Z. (2021). Impact of heat stress on potato: plant responses and approaches to tolerance improvement. In: P. M. Villa (Ed.) *The Potato Crop: Management, Production, and Food Security* (pp. 91-122). New York: Nova Science Publishers.
- Momčilović, I., Pantelić, D., Hfidan, M., Savić, J., & Vinterhalter, D. (2014). Improved procedure for detection of superoxide dismutase isoforms in potato, *Solanum tuberosum* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(8), 2059-2066.
- Moran, J. F., James, E. K., Rubio, M. C., Sarath, G., Klucas, R. V., & Becana, M. (2003). Functional characterization and expression of a cytosolic iron-superoxide dismutase from cowpea root nodules. *Plant Physiology*, 133(2), 773-782.
- Mostafa, A. A., Sarwat, M. I., Salama, D. A., & Sallam, H. A. (2019). Effect of ascorbate, salicylate and silicate on potato plant under water deficit stress conditions. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, 27(1), 1-15.
- Mullineaux, P. M., & Rausch, T. (2005). Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynthesis Research*, 86(3), 459-474.

- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murphy, M. P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C. J., Davies, K. J., Davies, M. J., Dick, T. P., Finkel, T., Forman, H. J., Janssen-Heinigen, Y., Gems, D., Kagan, V. E., Kalyanaraman, B., Larsson, N. G., Milne, G. L., Nyström, T., Poulsen, H. E., Radi, R., Remmen, H. V., Schumacker, P. T., Thornalley, P. J., Toyokuni, S., Winterbourn, C. C., Yin, H., & Halliwell, B. (2022). Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature Metabolism*, 4(6), 651-662.
- Myouga, F., Hosoda, C., Umezawa, T., Iizumi, H., Kuromori, T., Motohashi, R., Shono, Y., Nagata, N., Ikeuchi, M., & Shinozaki, K. (2008). A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20(11), 3148-3162.
- Nagae, M., Nakata, M., & Takahashi, Y. (2008). Identification of negative cis-acting elements in response to copper in the chloroplastic iron superoxide dismutase gene of the moss *Barbula unguiculata*. *Plant Physiology*, 146(4), 1687-1696.
- Nakashima, K., Ito, Y., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiology*, 149(1), 88-95.
- Nath, K., Kumar, S., Poudyal, R. S., Yang, Y. N., Timilsina, R., Park, Y. S., Nath, J., Chauhan, P. S., Pant, B., & Lee, C. H. (2014). Developmental stage-dependent differential gene expression of superoxide dismutase isoenzymes and their localization and physical interaction network in rice (*Oryza sativa* L.). *Genes & Genomics*, 36(1), 45-55.
- Neuberger, G., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., Hartig, A., & Eisenhaber, F. (2003a). Motif refinement of the peroxisomal targeting signal 1 and evaluation of taxon-specific differences. *Journal of Molecular Biology*, 328(3), 567-579.
- Neuberger, G., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., Hartig, A., & Eisenhaber, F. (2003b). Prediction of peroxisomal targeting signal 1 containing proteins from amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology*, 328(3), 581-592.
- Novaković, L., Guo, T., Bacic, A., Sampathkumar, A., & Johnson, K. L. (2018). Hitting the wall—Sensing and signaling pathways involved in plant cell wall remodeling in response to abiotic stress. *Plants*, 7(4): 89, 1-25.
- Ogawa, K. I., Kanematsu, S., & Asada, K. (1996). Intra- and extra-cellular localization of “cytosolic” CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. *Plant and Cell Physiology*, 37(6), 790-799.
- Ogawa, K. I., Kanematsu, S., Takabe, K., & Asada, K. (1995). Attachment of CuZn-superoxide dismutase to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PSI) in spinach chloroplasts: detection by immuno-gold labeling after rapid freezing and substitution method. *Plant and Cell Physiology*, 36(4), 565-573.
- Oidaira, H., Sano, S., Koshihara, T., & Ushimaru, T. (2000). Enhancement of antioxidative enzyme activities in chilled rice seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 156(5-6), 811-813.
- Okada, S., Kanematsu, S., & Asada, K. (1979). Intracellular distribution of manganese and ferric superoxide dismutases in blue-green algae. *FEBS Letters*, 103(1), 106-110.

- Palma, J. M., López-Huertas, E., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Gómez, M., & del Río, L. A. (1998). Peroxisomal manganese superoxide dismutase: purification and properties of the isozyme from pea leaves. *Physiologia Plantarum*, 104(4), 720-726.
- Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., & Dwivedi, U. N. (2017). A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochemistry Analytical Biochemistry*, 6(1): 308, 1-16.
- Pandian, B. A., Sathishraj, R., Djanaguiraman, M., Prasad, P. V., & Jugulam, M. (2020). Role of cytochrome P450 enzymes in plant stress response. *Antioxidants*, 9(5): 454, 1-15.
- Pasternak, T., Groot, E. P., Kazantsev, F. V., Teale, W., Omelyanchuk, N., Kovrizhnykh, V., Palme, K., & Mironova, V. V. (2019). Salicylic acid affects root meristem patterning via auxin distribution in a concentration-dependent manner. *Plant Physiology*, 180(3), 1725-1739.
- Patil, V. U., Sundaresha, S., Kawar, P. G., & Bhardwaj, V. (2016). *Biology of Solanum tuberosum L. (Potato): Series of Crop Specific Biology Documents*, 40 pp. New Delhi: Ministry of Environment, Forest and Climate change.
- Perl-Treves, R., & Galun, E. (1991). The tomato Cu, Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Molecular Biology*, 17(4), 745-760.
- Perry, J. J. P., Shin, D. S., Getzoff, E. D., & Tainer, J. A. (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(2), 245-262.
- Petrov, V., Hille, J., Mueller-Roeber, B., & Gechev, T. S. (2015). ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6: 69, 1-16.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, 30(1), 70-82.
- Pilon, M., Ravet, K., & Tapken, W. (2011). The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(8), 989-998.
- Podgórska, A., Burian, M., & Szal, B. (2017). Extra-cellular but extra-ordinarily important for cells: Apoplastic reactive oxygen species metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1353, 1-20.
- Poirier, Y., Antonenkov, V. D., Glumoff, T., & Hiltunen, J. K. (2006). Peroxisomal  $\beta$ -oxidation—a metabolic pathway with multiple functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(12), 1413-1426.
- Qi, J., Wang, J., Gong, Z., & Zhou, J. M. (2017). Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 38(39), 92-100.
- Queirós, F., Rodrigues, J. A., Almeida, J. M., Almeida, D. P. F., & Fidalgo, F. (2011). Differential responses of the antioxidant defence system and ultrastructure in a salt-adapted potato cell line. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(12), 1410-1419.
- Quint, P., Reutzel, R., Mikulski, R., McKenna, R., & Silverman, D. N. (2006). Crystal structure of nitrated human manganese superoxide dismutase: mechanism of inactivation. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(3), 453-458.

- Rabinowitch, H. D., & Fridovich, I. (1983). Superoxide radicals, superoxide dismutases and oxygen toxicity in plants. *Photochemistry and Photobiology*, 37(6), 679-690.
- Rahnama, H., & Ebrahimzadeh, H. (2006). Antioxidant isozymes activities in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) under salt stress. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 17(3), 225-230.
- Rehman, S., Rashid, A., Manzoor, M. A., Li, L., Sun, W., Riaz, M. W., Li, D., & Zhuge, Q. (2022). Genome-Wide Evolution and Comparative Analysis of Superoxide Dismutase Gene Family in Cucurbitaceae and Expression Analysis of *Lagenaria siceraria* Under Multiple Abiotic Stresses. *Frontiers in Genetics*, 12: 784878.
- Reumann, S., & Chowdhary, G. (2018). Prediction of peroxisomal matrix proteins in plants. In: A. A. del Río & M. Schrader (Eds.) *Proteomics of Peroxisomes: Identifying Novel Functions and Regulatory Networks* (pp. 125-138). Springer, Singapore.
- Reumann, S., Ma, C., Lemke, S., & Babujee, L. (2004). AraPeroX. A database of putative Arabidopsis proteins from plant peroxisomes. *Plant Physiology*, 136(1), 2587-2608.
- Rhoads, D. M., Umbach, A. L., Subbaiah, C. C., & Siedow, J. N. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiology*, 141(2), 357-366.
- Richter, K., Haslbeck, M., & Buchner, J. (2010). The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular Cell*, 40(2), 253-266.
- Rivero, R. M., Ruiz, J. M., & Romero, L. (2004). Oxidative metabolism in tomato plants subjected to heat stress. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79(4), 560-564.
- Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W320-W324.
- Robinett, N. G., Peterson, R. L., & Culotta, V. C. (2018). Eukaryotic copper-only superoxide dismutases (SODs): A new class of SOD enzymes and SOD-like protein domains. *Journal of Biological Chemistry*, 293(13), 4636-4643.
- Rojas-Beltran, J. A., Dejaeghere, F., Kotb, M. A. A., & Jardin, P. D. (2000). Expression and activity of antioxidant enzymes during potato tuber dormancy. *Potato Research*, 43(4), 383-393.
- Rubio, M. C., Becana, M., Sato, S., James, E. K., Tabata, S., & Spaink, H. P. (2007). Characterization of genomic clones and expression analysis of the three types of superoxide dismutases during nodule development in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(3), 262-275.
- Rudić, J., Dragičević, M. B., Momčilović, I., Simonović, A. D., & Pantelić, D. (2022a). In Silico study of superoxide dismutase gene family in potato and effects of elevated temperature and salicylic acid on gene expression. *Antioxidants*, 11(3): 488, 1-32.
- Rudić, J., Pantelić, D., Oljača, J., & Momčilović, I. (2022b). Effects of elevated temperature and salicylic acid on heat shock response and growth of potato microplants. *Horticulturae*, 8(5), 372, 1-16.
- Rykaczewska, K. (2015). The effect of high temperature occurring in subsequent stages of plant development on potato yield and tuber physiological defects. *American Journal of Potato Research*, 92(3), 339-349.
- Rykaczewska, K. (2017). Impact of heat and drought stresses on size and quality of the potato yield. *Plant, Soil and Environment*, 63(1), 40-46.

- Sairam, R. K., Dharmar, K., Lekshmy, S., & Chinnusamy, V. (2011). Expression of antioxidant defense genes in mung bean (*Vigna radiata* L.) roots under water-logging is associated with hypoxia tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 735-744.
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., & Kanazawa, K. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 571-581.
- Sale, P. J. M. (1979). Growth of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) to the small tuber stage as related to soil temperature. *Australian Journal of Agricultural Research*, 30(4), 667-675.
- Salin, M. L., & Bridges, S. M. (1980). Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Brassica campestris*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 201(2), 369-374.
- Santos, I., Almeida, J., & Salema, R. (1999). The influence of UV-B radiation on the superoxide dismutase of maize, potato, sorghum, and wheat leaves. *Canadian Journal of Botany*, 77(1), 70-76.
- Sattelmacher, B., Marschner, H., & Kühne, R. (1990a). Effects of the temperature of the rooting zone on the growth and development of roots of potato (*Solanum tuberosum*). *Annals of Botany*, 65(1), 27-36.
- Sattelmacher, B., Marschner, H., & Kühne, R. (1990b). Effects of root zone temperature on root activity of two potato (*Solanum tuberosum* L.) clones with different adaptation to high temperature. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 165(2-3), 131-137.
- Sawada, Y., Ohyama, T., & Yamazaki, I. (1972). Preparation and physicochemical properties of green pea superoxide dismutase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 268(2), 305-312.
- Schliep, K. P. (2011). phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, 27(4), 592-593.
- Schmidt, A., Gube, M., Schmidt, A., & Kothe, E. (2009). *In silico* analysis of nickel containing superoxide dismutase evolution and regulation. *Journal of Basic Microbiology*, 49(1), 109-118.
- Searcy, K. B., & Searcy, D. G. (1981). Superoxide dismutase from the archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 670(1), 39-46.
- Sevilla, F., del Río, L. A., & Hellin, E. (1984). Superoxide dismutases from a citrus plant: presence of two iron-containing isoenzymes in leaves of lemon trees (*Citrus limonum* L.). *Journal of Plant Physiology*, 116(5), 381-387.
- Sevilla, F., Lopez-Gorge, J., Gomez, M., & del Río, L. A. (1980). Manganese superoxide dismutase from a higher plant: purification of a new Mn-containing enzyme. *Planta*, 150(2), 153-157.
- Shang, X., Cao, Y., & Ma, L. (2017). Alternative splicing in plant genes: a means of regulating the environmental fitness of plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2): 432, 1-18.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012: 217037, 1-26.



- Sheng, Y., Abreu, I. A., Cabelli, D. E., Maroney, M. J., Miller, A. F., Teixeira, M., & Valentine, J. S. (2014). Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chemical Reviews*, 114(7), 3854-3918.
- Sheng, Y., Durazo, A., Schumacher, M., Gralla, E. B., Cascio, D., Cabelli, D. E., & Valentine, J. S. (2013). Tetramerization reinforces the dimer interface of MnSOD. *PLoS ONE*, 8(5): e62446, 1-11.
- Sienkiewicz, N., Daher, W., Dive, D., Wrenger, C., Viscogliosi, E., Wintjens, R., Jouin, H., Capron, M., Müller, S., & Khalife, J. (2004). Identification of a mitochondrial superoxide dismutase with an unusual targeting sequence in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 137(1), 121-132.
- Singh, A., Kaushal, N., Sharma, R., Bhardwaj, V., Singh, B., & Singh, R. (2016). Effect of elevated temperature on *in vitro* microtuberization of potato genotypes with different thermotolerance levels. *Vegetos-An International Journal of Plant Research*, 29(3), 6-9.
- Slater, A., Scott, N., & Fowler, M. (2008). *Plant biotechnology: the genetic manipulation of plants* (2<sup>nd</sup> edition). New York: Oxford University Press.
- Song, J., Zeng, L., Chen, R., Wang, Y., & Zhou, Y. (2018). In silico identification and expression analysis of superoxide dismutase (SOD) gene family in *Medicago truncatula*. *3 Biotech*, 8(8): 348, 1-12.
- Spagnolo, L., Törö, I., D'orazio, M., O'Neill, P., Pedersen, J. Z., Carugo, O., Rotilio, G., Battistoni, A., & Djinović-Carugo, K. (2004). Unique features of the *sodC*-encoded superoxide dismutase from *Mycobacterium tuberculosis*, a fully functional copper-containing enzyme lacking zinc in the active site. *Journal of Biological Chemistry*, 279(32), 33447-33455.
- Srivastava, V., Srivastava, M. K., Chibani, K., Nilsson, R., Rouhier, N., Melzer, M., & Wingsle, G. (2009). Alternative splicing studies of the reactive oxygen species gene network in *Populus* reveal two isoforms of high-isoelectric-point superoxide dismutase. *Plant Physiology*, 149(4), 1848-1859.
- Stallings, W. C., Powers, T. B., Patridge, K. A., Fee, J. A., & Ludwig, M. L. (1983). Iron superoxide dismutase from *Escherichia coli* at 3.1-Å resolution: a structure unlike that of copper/zinc protein at both monomer and dimer levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(13), 3884-3888.
- Stärk, H., Dallago, C., Heinzinger, M., & Rost, B. (2021). Light attention predicts protein location from the language of life. *Bioinformatics Advances*, 1(1): vbab035, 1-8.
- Storey, J. D., & Tibshirani, R. (2003). Statistical significance for genomewide studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(16), 9440-9445.
- Struik, P. C. (2007). Responses of the potato plant to temperature. In: D. Vreugdenhil, J. E. Bradshaw, C. Gebhardt, F. Govers, D. K. L. Mackerron, M. A. Taylor & H. A. Ross (Eds.) *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives* (pp. 367-393). Amsterdam: Elsevier B. V.
- Struik, P. C., Geertsema, J., & Custers, C. H. M. (1989). Effects of shoot, root and stolon temperature on the development of the potato (*Solanum tuberosum* L.) plant. II. Development of stolons. *Potato Research*, 32(2), 143-149.
- Su, W., Raza, A., Gao, A., Jiao, Z., Zhang, Y., Hussain, M. A., Mehmood, S. S., Cheng, Y., Lv, Y., & Zou, X. (2021). Genome-wide analysis and expression profile of superoxide dismutase

- (SOD) gene family in rapeseed (*Brassica napus* L.) under different hormones and abiotic stress conditions. *Antioxidants*, 10(8): 1182, 1-21.
- Sundaram, S., Khanna, S., & Khanna-Chopra, R. (2009). Purification and characterization of thermostable monomeric chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase from *Chenopodium murale*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15(3), 199-209.
- Sundby, C., Melis, A., Mäenpää, P., & Andersson, B. (1986). Temperature-dependent changes in the antenna size of Photosystem II. Reversible conversion of Photosystem II $\alpha$  to Photosystem II $\beta$ . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 851(3), 475-483.
- Sunkar, R., & Zhu, J. K. (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(8), 2001-2019.
- Tanaka, K., Takio, S., Yamamoto, I. & Satoh, T. (1996). Purification of the cytosolic CuZn-superoxide dismutase (CuZn-SOD) of *Marachantia paleacea* var. diptera and its resemblance to CuZn-SOD from chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 37(4), 523-529.
- Tang, L., Kwon, S. Y., Kim, S. H., Kim, J. S., Choi, J. S., Cho, K. Y., Sung, C. K., Kwak, S. S. & Lee, H. S. (2006). Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. *Plant Cell Reports*, 25, 1380-1386.
- Tang, R., Niu, S., Zhang, G., Chen, G., Haroon, M., Yang, Q., Rajora, O. P., & Li, X. Q. (2018). Physiological and growth responses of potato cultivars to heat stress. *Botany*, 96(12), 897-912.
- The UniProt Consortium (2023). UniProt: the universal protein knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D523-D531.
- Thornton, M., Buhrig, W., & Olsen, N. (2010). The relationship between soil temperature and sugar ends in potato. *Potato Research*, 53(4), 289-296.
- Tian, F., Yang, D. C., Meng, Y. Q., Jin, J., & Gao, G. (2020). PlantRegMap: charting functional regulatory maps in plants. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D1104-D1113.
- Tiwari, J. K., Buckseth, T., Devi, S., Varshney, S., Sahu, S., Patil, V. U., Zinta, R., Ali, N., Moudgil, V., Singh, R. K., Rawat, S., Dua, V. K., Kumar, D., Kumar, M., Chakrabarti, S. K., Rao, A. R., & Rai, A. (2020). Physiological and genome-wide RNA-sequencing analyses identify candidate genes in a nitrogen-use efficient potato cv. Kufri Gaurav. *Plant Physiology and Biochemistry*, 154, 171-183.
- Ursby, T., Adinolfi, B. S., Al-Karadaghi, S., De Vendittis, E., & Bocchini, V. (1999). Iron superoxide dismutase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: analysis of structure and thermostability. *Journal of Molecular Biology*, 286(1), 189-205.
- Van Dam, J., Kooman, P. L., & Struik, P. C. (1996). Effects of temperature and photoperiod on early growth and final number of tubers in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Research*, 39(1), 51-62.
- Van den Berd, J. H., Vreugdenhil, D., Ludford, P. M., Hillman, L. L., & Ewing, E. E. (1991). Changes in starch, sugar, and abscisic acid contents associated with second growth in tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) one-leaf cuttings. *Journal of Plant Physiology*, 139(1), 86-89.

- Verma, D., Lakhanpal, N., & Singh, K. (2019). Genome-wide identification and characterization of abiotic-stress responsive SOD (*superoxide dismutase*) gene family in *Brassica juncea* and *B. rapa*. *BMC Genomics*, 20(1): 227, 1-18.
- Viola, R., & Davies, H. V. (1992). A microplate reader assay for rapid enzymatic quantification of sugars in potato tubers. *Potato Research*, 35(1), 55-58.
- Voothuluru, P., & Sharp, R. E. (2013). Apoplastic hydrogen peroxide in the growth zone of the maize primary root under water stress. I. Increased levels are specific to the apical region of growth maintenance. *Journal of Experimental Botany*, 64(5), 1223-1233.
- Vreugdenhil, D., & Struik, P. C. (1989). An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*). *Physiologia Plantarum*, 75(4), 525-531.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and experimental botany*, 61(3), 199-223.
- Wang, L., Ma, K. B., Lu, Z. G., Ren, S. X., Jiang, H. R., Cui, J. W., Chen, G., Teng, N. J., Lam, H. M., & Jin, B. (2020). Differential physiological, transcriptomic and metabolomic responses of *Arabidopsis* leaves under prolonged warming and heat shock. *BMC Plant Biology*, 20(1): 86, 1-15.
- Wang, T., Song, H., Zhang, B., Lu, Q., Liu, Z., Zhang, S., Guo, R., Wang, C., Zhao, Z., Liu, J., & Peng, R. (2018). Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of superoxide dismutase (SOD) genes in foxtail millet (*Setaria italica* L.). *3 Biotech*, 8(12): 486, 1-11.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9(5), 244-252.
- Wang, W., Xia, M. X., Chen, J., Yuan, R., Deng, F. N., & Shen, F. F. (2016b). Gene expression characteristics and regulation mechanisms of superoxide dismutase and its physiological roles in plants under stress. *Biochemistry (Moscow)*, 81(5), 465-480.
- Wang, W., Xia, M., Chen, J., Deng, F., Yuan, R., Zhang, X., & Shen, F. (2016a). Genome-wide analysis of superoxide dismutase gene family in *Gossypium raimondii* and *G. arboreum*. *Plant Gene*, 6, 18-29.
- Wang, W., Zhang, X., Deng, F., Yuan, R., & Shen, F. (2017). Genome-wide characterization and expression analyses of superoxide dismutase (SOD) genes in *Gossypium hirsutum*. *BMC Genomics*, 18(1): 376, 1-25.
- Waqas, M., Shahid, L., Shoukat, K., Aslam, U., Azeem, F., & Atif, R. M. (2020). Role of DNA-binding with one finger (Dof) transcription factors for abiotic stress tolerance in plants. In: S. H. Wani (Ed.) *Transcription Factors for Abiotic Stress Tolerance in Plants* (pp. 1-14). Elsevier International.
- Waterer, D., Benning, N. T., Wu, G., Luo, X., Liu, X., Gusta, M., McHughen, A. & Gusta, L. V., (2010). Evaluation of abiotic stress tolerance of genetically modified potatoes (*Solanum tuberosum* cv. Desiree). *Molecular Breeding*, 25(3), 527-540.
- Werck-Reichhart, D., & Feyereisen, R. (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology*, 1(6), 1-9.
- Westermann, D. T. (1993). Fertility Management. In: R. C. Rowe (Ed.), *Potato Health Management* (pp.77-86). St. Paul: The American Phytopathological Society Press.

- WMO-World Meteorological Organization. WMO Provisional State of the Global Climate (2022). [https://library.wmo.int/doc\\_num.php?explnum\\_id=11359](https://library.wmo.int/doc_num.php?explnum_id=11359).
- Wright, E. S. (2015). DECIPHER: harnessing local sequence context to improve protein multiple sequence alignment. *BMC Bioinformatics*, 16: 322, 1-14.
- Yadav, S., Gill, S. S., Passricha, N., Gill, R., Badhwar, P., Anjum, N. A., Francisco, J. B. J., & Tuteja, N. (2019). Genome-wide analysis and transcriptional expression pattern-assessment of superoxide dismutase (SOD) in rice and *Arabidopsis* under abiotic stresses. *Plant Gene*, 17(4): 100165.
- Yamakura, F., & Kawasaki, H. (2010). Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(2), 318-325.
- Yamasaki, H., Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M., Kobayashi, Y., Shikanai, T., & Pilon, M. (2007). Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(22), 16369-16378.
- Yamasaki, H., Hayashi, M., Fukazawa, M., Kobayashi, Y., & Shikanai, T. (2009). *SQUAMOSA* promoter binding protein-like7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21(1), 347-361.
- Yost, F. J., & Fridovich, I. (1973). An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 248(14), 4905-4908.
- Youn, H. D., Kim, E. J., Roe, J. H., Hah, Y. C., & Kang, S. O. (1996). A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochemical Journal*, 318(3), 889-896.
- Yu, C. S., Chen, Y. C., Lu, C. H., & Hwang, J. K. (2006). Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 64(3), 643-651.
- Yu, Y. K., Capra, J. A., Stojmirović, A., Landsman, D., & Altschul, S. F. (2015). Log-odds sequence logos. *Bioinformatics*, 31(3), 324-331.
- Zang, Y., Chen, J., Li, R., Shang, S., & Tang, X. (2020). Genome-wide analysis of the superoxide dismutase (SOD) gene family in *Zostera marina* and expression profile analysis under temperature stress. *PeerJ*, 8: e9063, 1-18.
- Zhang, X., Rerksiri, W., Liu, A., Zhou, X., Xiong, H., Xiang, J., Chen, X., & Xiong, X. (2013). Transcriptome profile reveals heat response mechanism at molecular and metabolic levels in rice flag leaf. *Gene*, 530(2), 185-192.
- Zhang, X., Zhang, L., Chen, Y., Wang, S., Fang, Y., Zhang, X., Wu, Y., & Xue, D. (2021). Genome-wide identification of the SOD gene family and expression analysis under drought and salt stress in barley. *Plant Growth Regulation*, 94(1), 49-60.
- Zhao, Y., Tian, X., Wang, F., Zhang, L., Xin, M., Hu, Z., Yao, Y., Ni, Z., Sun, Q., & Peng, H. (2017). Characterization of wheat MYB genes responsive to high temperatures. *BMC Plant Biology*, 17(1): 208, 1-14.
- Zheng, G., Tian, B. O., Zhang, F., Tao, F., & Li, W. (2011). Plant adaptation to frequent alterations between high and low temperatures: remodelling of membrane lipids and maintenance of unsaturation levels. *Plant, Cell & Environment*, 34(9), 1431-1442.
- Zhou, Y., Hu, L., Wu, H., Jiang, L., & Liu, S. (2017). Genome-wide identification and transcriptional expression analysis of cucumber superoxide dismutase (SOD) family in response to various abiotic stresses. *International Journal of Genomics*, 2017: 7243973, 1-14.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Jelena J. Rudić rođena je 9. septembra 1983. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2002/2003. godine na studijskoj grupi Biologija, izborna oblast Primenjena genetika. Osnovne akademske studije je završila sa prosečnom ocenom 8,79 i ocenom 10 iz diplomskog rada. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Fiziologija i molekularna biologija biljaka, upisala je školske 2013/2014.

U periodu 2013-2017. je učestvovala kao volonter na nacionalnom projektu: „Razvoj i primena proteinskih markera u odabiru sorti krompira otpornih prema visokim temperaturama“, pod rukovodstvom dr Ivane Momčilović. Od jula 2017. je zaposlena kao istraživač pripravnik na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju i saradnik na projektu: „Razvoj i primena biotehnoških postupaka u dobijanju zdravog sadnog materijala ukrasnih biljaka“, pod rukovodstvom dr Angeline Subotić. U zvanje istraživač saradnik izabrana je jula 2020. U periodu 2020-2022. je učestvovala u realizaciji međunarodnog projekta naučno-tehnološke saradnje između R. Srbije i R. Slovenije: „Screening of potato breeding clones suitable for cultivation in Slovenia and Serbia for resistance to pathogens, drought and heat stress“.

U toku svog naučno-istraživačkog rada, Jelena Rudić je koautor više naučnih radova u domaćim i međunarodnim časopisima, uključujući i šest radova u časopisima sa SCI liste, od kojih su dva proistekla iz doktorske disertacije. Takođe, koautor je jednog poglavlja u knjizi. Jelena Rudić je član Društva za fiziologiju biljaka Srbije (DFBS) i Federacije evropskih društava za biologiju biljaka (FESPB).

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: **Јелена Ј. Рудић**

Број индекса: Б3019/2013

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

**Супероксид-дисмутазе кромпира (*Solanum tuberosum* L.): карактеризација изоформи и експресија у условима високих температура**

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

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

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

Име и презиме аутора: **Јелена Ј. Рудић**

Број индекса: **Б3019/2013**

Студијски програм: **Биологија**

Наслов рада: **Супероксид-дисмутаза кромпира (*Solanum tuberosum* L.): карактеризација изоформи и експресија у условима високих температура**

Ментори: **др Ивана Момчиловић, научни саветник**  
**др Душица Јаношевић, ванредни професор**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

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

**Супероксид-дисмутазе кромпира (*Solanum tuberosum* L.): карактеризација изоформи и експресија у условима високих температура**

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.