

## STRESZCZENIE

Wiroid wrzecionowatości bulw ziemniaka (PSTVd) to nieopłaszczona, jednoniciowa, kuliście zamknięta cząsteczka RNA o długości średnio 359 nukleotydów. RNA PSTVd mimo braku zdolności kodowania białek, wywołuje swoiste objawy chorobowe w roślinach z rodziny psiankowatych. Intensywne badania doprowadziły do dokładnego poznania struktury oraz częściowego zrozumienia replikacji i transportu RNA wiroidowego, jednakże mechanizm patogenności i odpowiedź rośliny na infekcję wiroidową nadal nie zostały w pełni wyjaśnione.

Głównym celem przedstawionej pracy była analiza zmian transkryptomu roślin pomidora zainfekowanych dwoma wariantami PSTVd: PSTVd-M i PSTVd-S23 wywołującymi odpowiednio łagodne i ostre objawy chorobowe. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem metody mikromacierzy na różnych etapach rozwoju objawów chorobowych: (a) przed ich wystąpieniem; (b) we wczesnym okresie ich rozwoju; (c) w pełni ich rozwoju; (d) w późnym okresie na etapie tzw. „zdrowienia”. Dodatkowo, analizę transkryptomu na wczesnym etapie rozwoju objawów chorobowych wykonano wykorzystując metodę sekwencjonowania RNA (RNA-Seq). Przeprowadzona analiza wykazała zmianę ekspresji ponad 3100 genów w roślinach pomidora w badanym czasie rozwoju infekcji, a profil ich regulacji zależał od wariantu PSTVd i etapu infekcji. Całkowita liczba genów regulowanych w ostrej infekcji była 3 razy większa niż w łagodnej infekcji. Ponad 70% wszystkich genów było specyficznie regulowanych w infekcji PSTVd-S23 w przeciwieństwie do infekcji PSTVd-M, dla której tylko 5% było specyficznych. Wariant PSTVd-S23 indukował silniejszą odpowiedź rośliny na infekcję niż PSTVd-M. Etap rozwoju pierwszych objawów (24 dni po inokulacji (dpi)) w infekcji PSTVd-M i późny etap rozwoju objawów (49 dpi) w infekcji PSTVd-S23 to etapy z największą liczbą genów o zmienionej ekspresji. Analiza porównawcza globalnych profili ekspresji genów oraz analiza wybranych grup genów wykazała, że: (a) ekspresja genów związanych z cyklem komórkowym i kodujących kinezyne była obniżona głównie w infekcji ostrej; (b) geny związane z fotosyntezą i chloroplastami były reprimowane w obu infekcjach, ale znacząco większa ich liczba w infekcji PSTVd-S23; (c) geny związane z biosyntezą i szlakiem sygnałowym kwasu salicylowego, kwasu jasmonowego, etylenu, interakcją roślina-patogen, reakcjami obronnymi oraz kodujące kinazy były aktywowane w obu infekcjach, (d) regulacja genów związanych z metabolitami wtórnymi i kodującymi czynniki transkrypcyjne była zależna od wariantu PSTVd i etapu

infekcji. W grupach genów związanych z hormonami, ścianą komórkową, metabolitami wtórnymi, czynnikami transkrypcyjnymi i reakcjami obronnymi obserwowano nieliczne geny o przeciwnym kierunku regulacji w zależności od typu i etapu infekcji.

Zastosowana metoda RNA-Seq potwierdziła dane otrzymane z analizy mikromacierzy i pozwoliła na zidentyfikowanie zdecydowanie większej liczby genów, głównie tych kodujących kinazy, białka PR i R oraz czynniki transkrypcyjne z rodziny AP2/ERF-ERF, GRF, C2H2, WRKY.

Zidentyfikowane w niniejszej pracy geny o zmienionej ekspresji dostarczają cennych spostrzeżeń na temat interakcji pomiędzy wiroidem a rośliną, przyczyniając się do lepszego zrozumienia mechanizmów determinujących patogenność wiroidów. Potwierdzają hipotezę, że stres wywołany wiroidem prowadzi do przejścia od normalnych procesów wzrostu i rozwoju gospodarza-rośliny do zmienionych ścieżek metabolicznych w reakcjach obronnych.

30.03.2020

Ameta Wignyk

## ABSTRACT

Potato spindle tuber viroid (PSTVd) is a naked, single-stranded, and covalently closed circular RNA molecule of 359 nucleotides, on average, in length. Despite that the PSTVd RNA does not encode any proteins, it causes specific disease symptoms in plants from the *Solanaceae* family. The mechanism of pathogenicity and plant's response to viroid infection has not yet been fully explained however, extensive research has led to the precise structure determination and resulted in partial understanding of the replication and transport of viroid RNA.

The main aim of this study was the analysis of transcriptomic changes in tomato leaves infected with two PSTVd variants: PSTVd-M and PSTVd-S23 causing mild and severe disease symptoms, respectively. The investigation was carried out using the microarray methods over a time course of viroid infection development: (a) the pre-symptomatic stage; (b) early symptoms; (c) full spectrum of symptoms and (d) the so-called 'recovery' stage. Additionally, the RNA sequencing (RNA-Seq) method was applied to analyze the transcriptome at the early stage of disease symptoms development. In total, 3197 differentially expressed genes were identified in the infected tomato plants during the studied time of PSTVd infection. Gene expression profile varied depending on the stage of infection and the variants. Overall, in PSTVd-S23 infected plants, the total number of regulated genes was three times higher than in the mild infection caused by PSTVd-M. Over 70% of all genes were specifically regulated only in PSTVd-S23 infection compared to 5% of such genes in PSTVd-M infection. Moreover, the response to PSTVd-S23 was stronger than to PSTVd-M. The stage of the first symptom development (24 days post inoculation (dpi)) in PSTVd-M infection and the stage of late symptoms development (49 dpi) in PSTVd-S23 infection were the stages with the highest number of differentially expressed genes. The comparative analysis of global gene expression profiles as well as the analysis of the selected gene groups showed that: (a) genes related to cell cycle and encoding kinesins were down-regulated mainly in severe infection; (b) genes related to photosynthesis and chloroplast were down-regulated in both infections, but the number of regulated genes in severe infection was significantly higher; (c) genes related to biosynthesis and signaling pathway of salicylic acid, jasmonic acid and ethylene, plant-pathogen interaction, defense reaction, and encoding kinases were up-regulated in both infections; (d) expression of genes related to secondary metabolites and transcription factors depended on the viroid variant and the infection stage.

Only few genes related mainly to hormones, cell wall, secondary metabolites, transcription factors and defense were regulated in the opposite direction depending on the type and stage of infection.

The applied RNA-Seq method not only confirmed the data obtained from the analysis of microarray but it also allowed to identify larger number of regulated genes, especially for kinases, PR and R proteins, or transcription factors of AP2/ERF-ERF, GRF, C2H2, WRKY family.

The altered expression of genes discovered in this study provides a valuable insight into the viroid-host interaction and contributes to a better understanding of mechanisms determining the PSTVd pathogenicity. Our results indicate that viroid infection results in a stimulation of the defence response in plants.

30.03.2020

Amela Wigryk