



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ "ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ"



БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ



КАТЕДРА "ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И МОЛЕКУЛЯРНА БИОЛОГИЯ"

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за придобиване на
образователната и научна степен „доктор“

„Идентифициране на специфични взаимодействия между Potato Spindle
Tuber Viroid и два български сорта пипер“

от

НИКОЛ СЛАВЕВА ХАДЖИЕВА

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Докторска програма: „Молекулярна биология“

Научен ръководител:

Доц. д-р Марияна Гозманова

Пловдив, 2023

Дисертационният труд съдържа 121 страници, 7 таблици, 33 фигури и 240 литературни източника.

Докторантът има публикувани общо 3 статии по тематиката на дисертационния труд, две, от които са публикувани в списания с импакт фактор и една в списание без импакт фактор.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на катедрен съвет на катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“ при Биологически факултет на ПУ „П. Хилендарски“, проведен на 06.02.2023 г.

Откритото заключително заседание на научното жури ще се състои на 12.05.2023 от 12:00 часа в Биологически факултет (гр. Пловдив ул. Тодор Самодумов 2).

Материалите по защитата са предоставени за свободен достъп на интересуващите се в библиотеката на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Автор: Никол Славева Хаджиева

Заглавие: Идентифициране на специфични взаимодействия между Potato Spindle Tuber Viroid и два български сорта пипер

Пловдив, 2023 г.

УВОД

Растенията са обект на действие на разнообразни фактори на средата. Сред абиотичните фактори са радиация, засоляване, наводнения, суша, екстремни температури, тежки метали, а към биотичните фактори спадат вируси, вироиди, бактерии, гъби, насекоми, нематоди и тревопасни животни. Когато множество организми взаимодействат с едно растение, това може да доведе до антагонистични или синергични ефекти. Отговорите на растенията на различните типове стрес са много сложни и включват промени на транскриптомно, клетъчно и физиологично ниво. Разбирането на многопластовото регулиране, което растенията използват, за да управляват взаимоотношенията с тяхната биотична среда е от фундаментално значение за разработване на устойчиви на стрес културни растения. Като част от сложната мрежа от взаимосвързани пътища за клетъчна защита, РНК контрол и развитие при растенията, оперира РНК заглушаването. Този механизъм представлява уникален тип гена регулация, базирана на специфичност по отношение на РНК мишената. Посредством къси регулаторни РНК молекули той модулирана генната експресия и по този начин повлиява имунитета на растението.

Вироидите са най- малките растителни РНК патогени. Инфекциите, които причиняват по културните видове водят до сериозни икономически загуби, свързани с редуция в добивите им или загуба на цялата реколта. В защитният отговор към виroidна инфекция, растенията включват различни пътища и регулаторни мрежи. Ендогенно експресираниите микро РНК молекули са фин механизъм за регулация на експресионните нива на специфични иРНК посредством дестабилизация или транслационна инхибиция. Свързаните с виroidната инфекция промени в нивата на микро РНК, а оттам и на регулираните от тях прицелни гени биха допринесли за развитие на по-ефективна борба както и разработването на стратегии за защита от виroidните инфекции.

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Литературния обзор разглежда виroidите като инфекциозни агенти, техния жизнен цикъл и взаимодействията им с техните гостоприемници. Основните акценти са:

1. Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd), причинител на вретеновидост по картофените грудки като инфекциозен агент върху представители на сем. *Solanaceae*
2. Виroid- индуциран РНК сайлънсинг като антивирусен защитен механизъм; характеристика и биогенеза на малки интерфериращи РНК
3. Биогенеза и роля на микроРНК в PSTVd специфичния отговор
4. Широко-машабни експресионни анализи на различни патосистеми с участие на пипер

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящата работа е да се идентифицират специфични взаимодействия между Potato Spindle Tuber Viroid и два български сорта пипер.

Във връзка с изпълнението на целта бяха поставени следните **задачи**:

1. Провеждане на биотестове с PSTVd *in vitro* транскрипт върху български сортове пипер Куртовска капия и Джулюнска шипка, показали PSTVd - специфичен фенотип.
2. Изолиране на тотална РНК от листни проби на контролни и PSTVd инфектирани растения на двата сорта.
3. Провеждане на новогенерационно секвениране на на библиотеки от малки РНК и иРНК, изготвени от контролни и PSTVd инфектирани растения на двата сорта.
4. Провеждане на биоинформатичен анализ на получените от секвенирането данни за откриване на диференциално експресирани микро РНК гени и белтък-кодиращи гени.
5. Провеждане на експресионен анализ посредством RT-qPCR на селектираните диференциално експресирани протеин- кодиращи гени и микро РНК гени.
6. Провеждане на генно- онтологичен анализ на намерените диференциално експресирани протеин-кодиращи гени.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

1.1. Растителен материал

За целите на експерименталната работа са селектирани българските сортове пипер - Джулюнска шипка (ДШ) и Куртовска капия (КК) (*Capsicum annuum L.*), от които ДШ показва най-силно изразен PSTVd фенотип като завиване на листа и малформации в проведените предварителни биотестове.

1.2 PSTVd виroidен изолат

За целите на проучването бе използван вириод PSTVd, изолат KF440-2.

2. Методи

1. Биотестове върху подобрите български сортове пипер с *in vitro* синтезирана PSTVd (+) РНК

2. Изолиране на тотална РНК от листни проби на двата сорта на етап 28 и 43 dpi

3. Количествен и качествен анализ на тотална РНК, посредством спектрофотометрично измерване и електрофоретично разделяне върху агарозен гел

4. Новогенерационно секвениране на малки РНК и иРНК

4.1 Секвениране от ново поколение на малки РНК от компанията, проведено от компанията Masrogen Inc. Корея.

Подготвени и секвенирани са две библиотеки (контролни и инфектирани) за всеки сорт (КК и ДШ). Секвенирани са еднопосочни прочити с дължина 50 нд.

4.2 Новогенерационен анализ на иРНК върху Illumina HiSeq 2000 платформа, проведено от компанията Novogene Technology Co., Ltd (Пекин, Китай).

Секвенирани са двупосочни прочити с дължина 150 нд. Подготвени и секвенирани са общо четири библиотеки от контролни и инфектирани проби за всеки сорт (КК и ДШ).

5. Синтез на комплементарна ДНК

6. Стандартна полимеразна верижна реакция (ПСР) за специфична амплификация на PSTVd или гени от пипер

7. Количествен анализ на относителната генна експресия

В настоящото проучване е проведен RT-qPCR с флуоресцентно багрило *SYBR Green I*. За нормализация на експресията са използвани конститутивните гени: EF1 α и U6. Оценка на експресията на изследваните гени е проведена посредством метода „2- $\Delta\Delta C_t$ “, описан от Livak и Schmittgen.

7.1 RT-qPCR за анализ на експресионните нива на миРНК гени

Stem-loop и прав/обратен праймери са създадени за следните миРНК гени: can-miR482a-3p, stu-miR6024-3p, can-miR398c-3p, can-miR408a, can-miR408-3p, can-miR397a-5p, and can-miR397b, съгласно протокола на Chen и неговите сътрудници (2005).

7.2 RT- qPCR за анализ на експресионните нива на белтък-кодиращи гени

Създадени са праймерни двойки за следните шест белтък-кодиращи гени: CA02g15240 (auxin-repressed 12.5 kDa protein-like isoform), CA10g00480 (NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase [*POR*]), CA07g02110 (polygalacturonase-inhibiting protein [*PGIP*]), CA07g11190 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase [*ACO*]), CA02g26610 (S-

adenosylmethionine decarboxylase proenzyme [*SAMDC*]), и CA09g02410 (phenylalanine ammonia-lyase [*PAL*]).

8. Биоинформатични анализи

6.1 Новогенерационно секвениране на малки РНК и иРНК

Получените от новогенерационното секвениране прочити са процесирани чрез *in-house* workflow в Galaxy платформата (FastQC (Galaxy version 0.73) и TrimGalore (Galaxy version 0.6.7) под ръководството на проф. д-р В. Баев.

PSTVd специфичните малки РНК са идентифицирани чрез картиране на прочити към PSTVd KF440-2.

Идентифицирането на консервативните миРНК, е направено чрез сравняване на прочитите от секвенирането с локална база данни, която съдържа миРНК за *Solanaceae* от miRBase 21.0 и публикуваните за пипер миРНК от Hwang et al, 2013 и Qin et al 2014.

За диференциалния експресионен анализ е използван DESeq2 package (Galaxy version 2.11.40). Пречистените прочити от новогенерационното секвениране на иРНК са картирани към Zunla 1 v.2.0 референтен геном в Galaxy платформа чрез HISAT2 (Galaxy version 2.2.1). Броят на генните транскрипти е определен в съответствие с анотираните транскрипти за пипер. ДЕГ, селектирани за по-нататъшен анализ са подбрани при $|\log_2FC| \geq 1$ и $p < 0.05$.

ГО обогатяващият анализ е извършен чрез g:Profiler за избраните гени. Инструментът е достъпен на сървър g:GOSl с g:SCS- метод за корекция на множество тестове, използващ gSCS праг на значимост (0.05).

Данните от проведеното новогенерационно секвениране на малки РНК са депозирани в NCBI Sequence Read Archive(SRA) база данни: (<https://dataview.ncbi.nlm.nih.gov/object/PRJNA631129?reviewer=l0686rrde7fsor65p7j623vad>), докато данните от новогенерационното секвениране на иРНК са депозирани под номер за достъп: PRJNA762255 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA762255>).

РЕЗУЛТАТИ

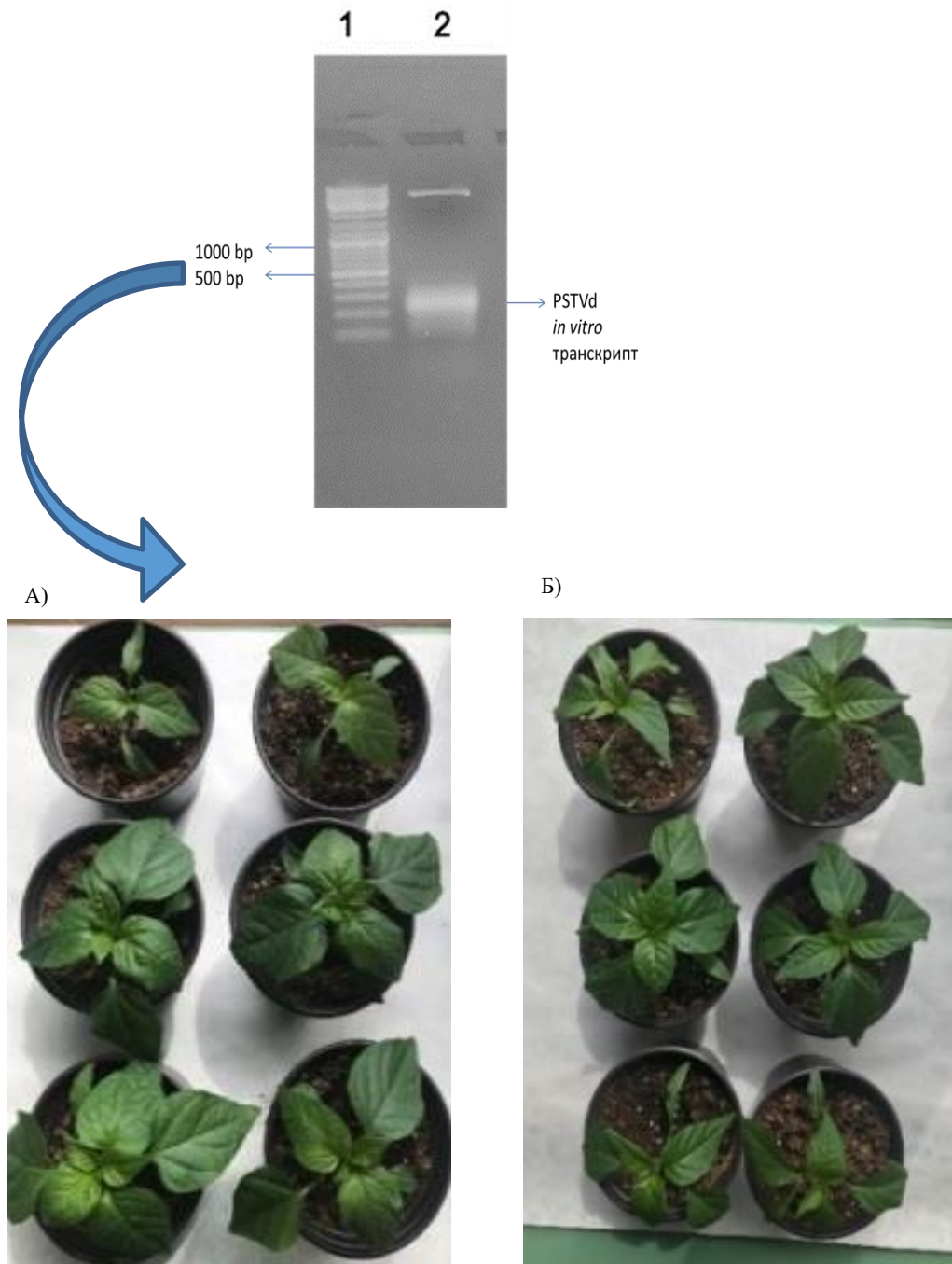
1. Провеждане на биотестове с PSTVd върху пипер

1.1 Синтез на *in vitro* PSTVd транскрипт

PSTVd *in vitro* транскрипта е синтезиран съгласно протокола, детайлно описан в М&М., използвайки плазмид рН106. За да се провери количеството и качеството на *in vitro* PSTVd транскрипта беше проведена агарозна гел електрофореза (Фиг. 1). Анализът показва, че получения транскрипт е с добро качество и може да се използва за провеждане на биотестовите върху пипер.

1.2 Механична инокулация на PSTVd върху два български сорта пипер

Проведени са биотестове върху селектираните сортове Куртовска капия (КК) и Джулунска шипка (ДШ) и инфекцията е проследявана на 14, 28 и 43 дни след инокулация (dpi), подобно на периодите, при които се изследва PSTVd инфекция при домати.



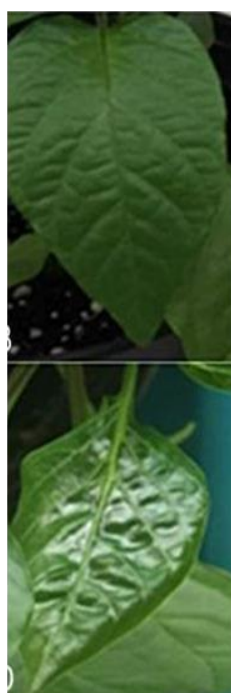
Фиг. 1: Инокулиране с PSTVd на пипер сорт КК (А); пипер сорт ДШ (Б) на етап втори истински лист. В горната част на фигурата е представен разделения чрез агарозна гел електрофореза PSTVd *in vitro* транскрипт.

Развитието на PSTVd специфична симптоматика в двата сорта на 28 и 43 dpi е представена на Фиг. 2 (А и Б).

А



Б

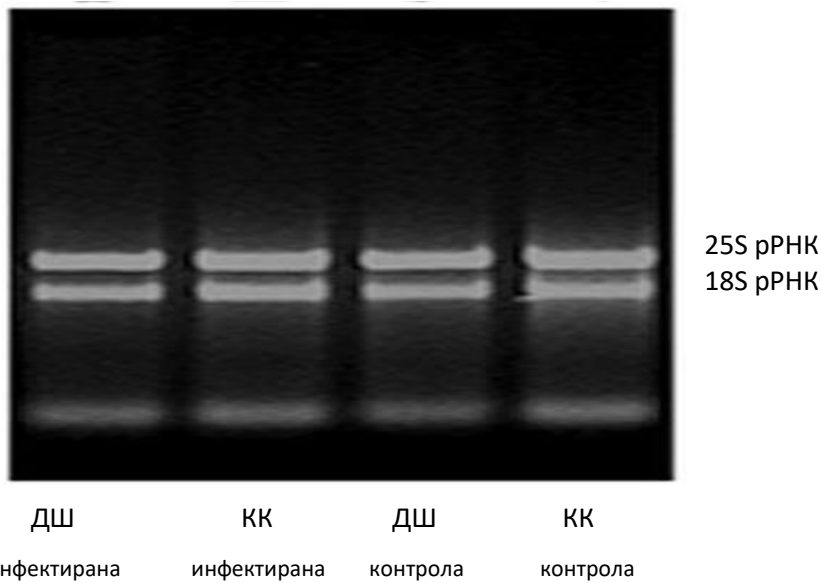


Фиг. 2: Сравнителен фенотипен анализ между контролни и *PSTVd* инфектирани растения ДШ (А) и КК (Б) на етап 28 dpi и 43 dpi като контролните растения са представени на първия ред, а инфектираните на втория ред.

2. Анализ на количеството и качеството на изолираната тотална РНК от КК и ДШ

Събрани са листа от пет индивидуални растения от всяка експериментална група (здрави и инфектирани растения от двата сорта) и е направен пул за екстракция на тотална РНК. Изолирането на РНК от пипер се затруднява заради присъствието на полизахариди и полифеноли. За преодоляване на тези ограничения, растенията бяха затъмнявани от предходния ден. Изолирането на РНК е провеждано с Qiazol лизис реагент и последващо пречистване върху колонка на Nucleospin miРНК kit (Masherey-Nagel). Тотална РНК е изолирана и анализирана количествено и качествено както на 28, така и 43dpi.

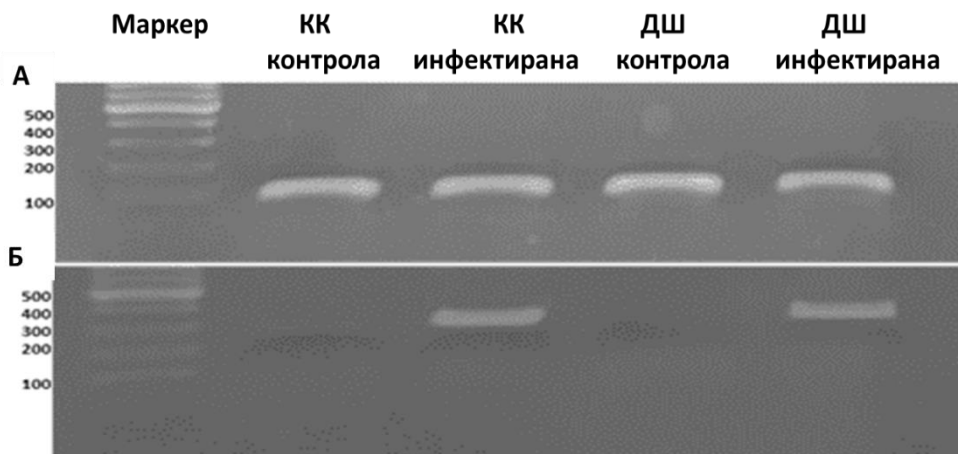
Изолираната РНК е анализирана посредством Bioanalyzer 2100 (Agilent) за характеризиране нейната интактност. Генерирана е електроферограма и гел-подобно изображение, което показва концентрацията на РНК и съотношението между 18 и 25S субединиците. Приложен е RIN софтуерен алгоритъм, който класифицира интегритета на еукариотната тотална РНК по скала от 1 до 10, като 1 е РНК с най-деградирания профил, а 10 е с най- интактния профил. Резултатите от анализа на РНК пробите с Bioanalyzer 2100, показват RIN стойностите >6, което съответства на високото качество на изолираната РНК, което е важно условие за получаването на достоверни данни за генната експресия. Данните получени от Bioanalyzer 2100 са потвърдени от проведената агарозна гел електрофореза (Фиг. 3).



Фиг. 3: Електрофоретичен профил на тотална РНК обогатена на малки РНКи, върху 1% агарозен гел, изолирана от PSTVd инфектирани и контролни растения ДШ и КК на 28 ден след инокулация. Представените РНК са пулове от поне три индивидуални растения.

3. PCR анализ за установяване на успешна PSTVd инфекция в КК и ДШ

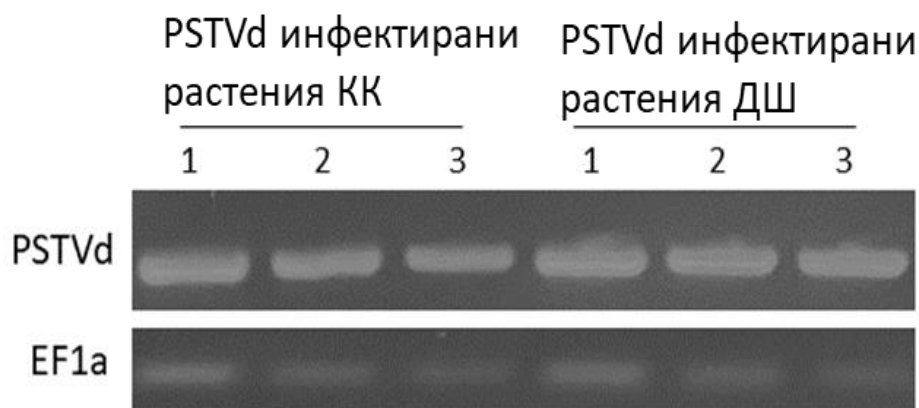
Комплементарна ДНК получена с PSTVd Rev праймер, е използвана като матрица в конвенционален PCR с PSTVd специфични праймери. Установено е присъствие на специфичен фрагмент с размер 360нд, съответстващ на PSTVd (+) веригата в PSTVd инокулираните растения от двата сорта пипер. Получените резултати доказват успешна PSTVd инфекция (Фиг. 4).



Фиг. 4: Детекция на PSTVd (+) верига в здрави и инфектирани растения КК и ДШ, посредством RT-PCR (Б), като позитивна контрола е използван конститутивно експресирания ген EF1a (А).

4. Анализ на титъра на PSTVd в двата сорта пипер

За проучване титъра на PSTVd в двата сорта е използван полуколичествен RT-PCR. Реакцията е проведена при ненасищащи PCR условия (28 цикъла), като е използвана комплементарна ДНК (разредена 2, 3 и 4 пъти) и праймери за амплификация на PSTVd (+) веригата и на референтния ген EF1a. Резултатите от проведения RT-PCR показват по-висока акумулация на PSTVd в инфектираните растения ДШ в сравнение с КК (Фиг. 5).

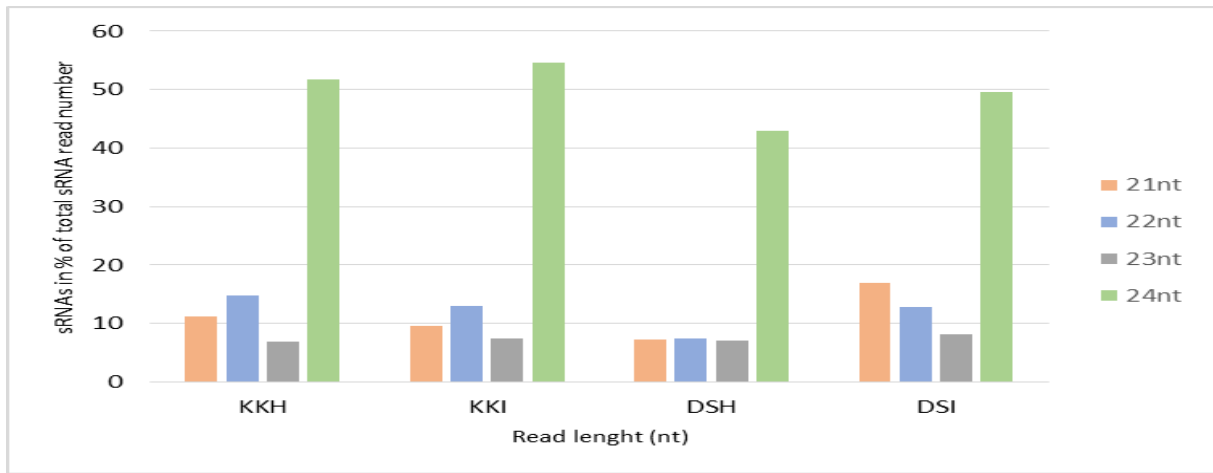


Фиг. 5: Полуколичествен RT-PCR анализ за детекция на относителните акумулационни нива на PSTVd (+) веригата в инфектирани растения от КК и ДШ.

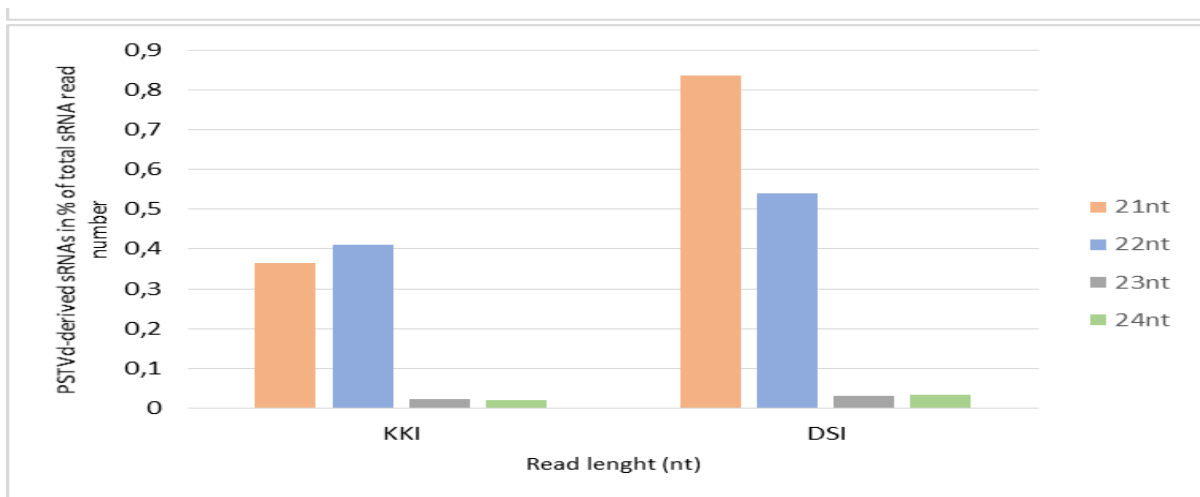
5. Новогенерационно секвениране на малки РНК в КК и ДШ, инфектирани с PSTVd

Извършено е секвениране от ново поколение на малки РНК с цел изучаване на профила на тези регулаторни РНК в отговор на PSTVd инфекцията в пипер. Анализът е проведен на етап 28 dpi, когато се предполага, че се осъществяват молекулните промени, водещи до развитието на слаба симптоматика, видима през късната фаза на инфекцията (43dpi). Получените сурови данни са обработени с цел премахване на адапторите, филтриране на прочитите, кореспондиращи с рибозомални РНК, премахване на прочити с неизвестни бази (Ns). Получени бяха 62,078,305 чисти прочита за ККК; 59,524,663 за ККИ; 51,075,609 за ДШК; и 49,176,658 за ДШИ.

Анализът на получените библиотеки от малки РНК на двата сорта контролни и инфектирани растения показва, че размерът на малките РНК в библиотеките варира от 18 до 30 нд, като основната част от тях са с 21–24 нд дължина (Фиг. 6).



Фиг. 6: Разпределение на малки РНК в анализирани библиотеки на контролни и инфективни проби на КК и ДШ на етап 28 дни. Всеки клас малки РНК е представен в % от общия брой на малките РНК прочити.

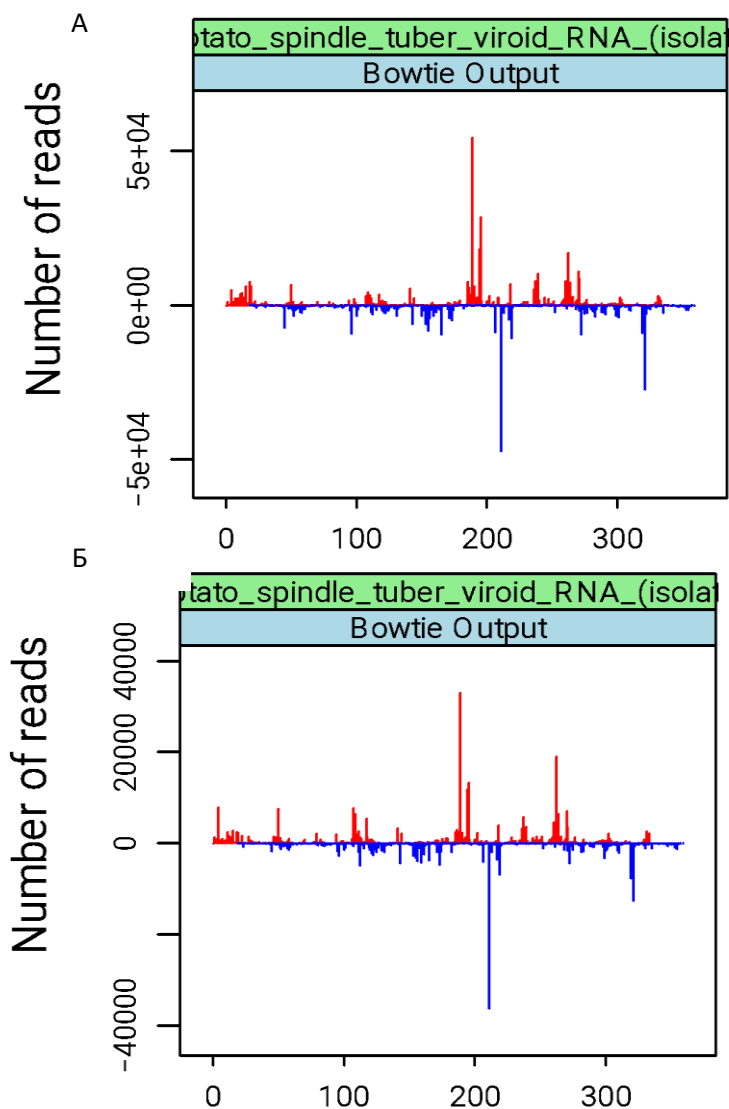


Фиг. 7: Разпределение по размер на 21, 22, 23 и 24нд PSTVd-специфични РНК в анализирани библиотеки на ДШИ и ККИ на 28 дни. Всеки клас PSTVd-специфични РНК е представен в % от общия брой на малки РНК прочити.

Намерено беше, че преобладаващият по размер клас във всички библиотеки е този от 24 нд. Анализът на PSTVd специфичните РНК, детектирани в ДШИ и ККИ библиотеките показва, че те представляват малък процент от общия брой прочити, но произлизат и от двете PSTVd вериги. В ДШИ, PSTVd-специфичните малки РНК с дължина 21 нд са 0.83% от общия брой прочити, докато в ККИ те съставляват само 0.36%. Класът на 22 нд малки РНК са еднакво представени в ДШИ (0.54%) и ККИ (0.41%) (Фиг. 7).

5.1 Картиране малки РНК върху референтен геном на PSTVd

Проведено е картиране на малките РНК от библиотеки на инфектираните растения пипер от сорт КК и ДШ върху референтния PSTVd KF 440-2 геном (Фиг. 8).



Фиг. 8: Плот-диаграма показваща количеството на картираните секвенции върху референтния геном на PSTVd (KF440-2) за сорт КК (А) и ДШ (Б).

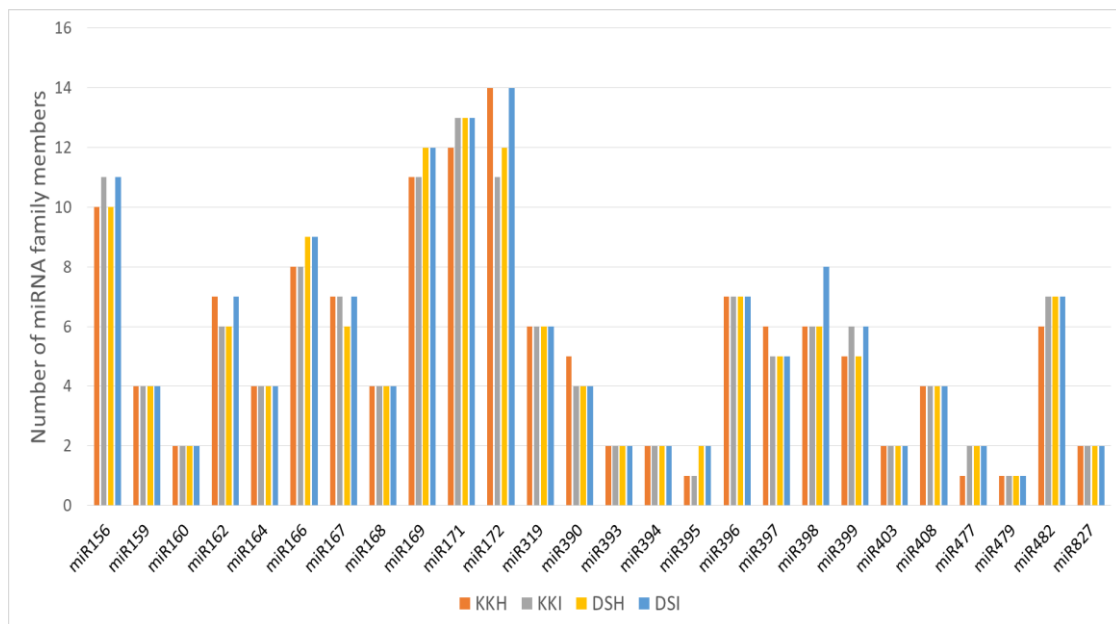
Анализът показва разпределение на прочитите върху цялата дължина на (+) и (-) веригите на PSTVd. Броят на генерираните PSTVd специфични малки РНК от двете вериги са съизмерими, което показва, че вирида се реплицира в растенията и двете му вериги са достъпни за ензимната система на РНК заглушаването.

Анализът на пиковете върху плот- диаграмата показва, че определени позиции от генома на PSTVd продуцират значително повече PSTVd специфични малки РНК в сравнение с други (Фиг. 8). При сравнение на плот диаграмите генерирани за двата сорта КК и ДШ не бяха открити разлики обвързани със сортова специфичност. Най-голяма продукция на PSTVd-малки РНК и

при двата сорта беше намерена в регионите 180-220нд и 250-270нд, които покриват терминалния десен и ляв домен на PSTVd (Фиг. 8). Този факт предполага, че тази част от вириодния геном е по-достъпна за нуклеазите на гостоприемника.

5.2 Консервативни миРНК и техните фамилии, променени в отговор на PSTVd инфекция

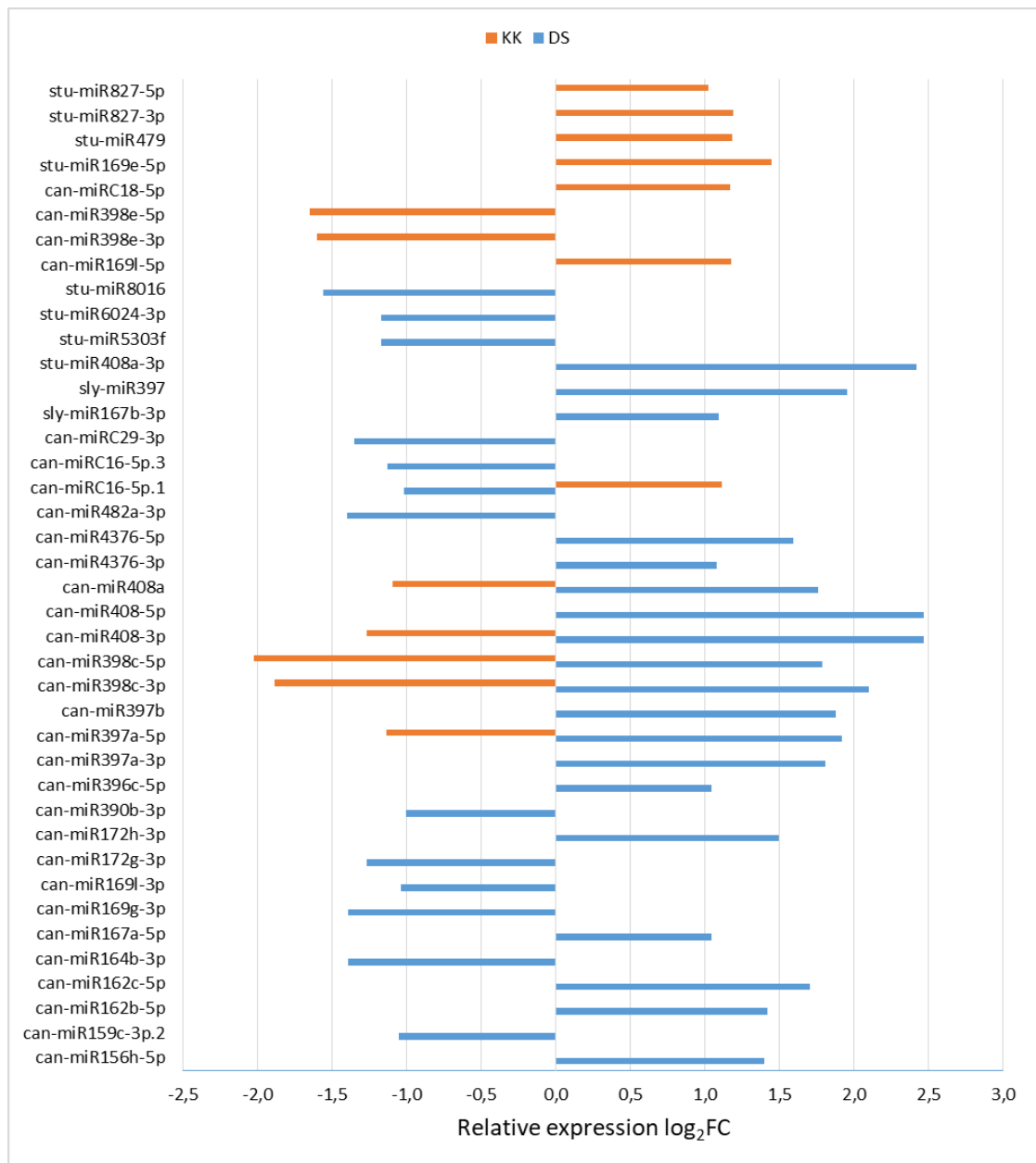
Идентифицираните миРНК от всички четири библиотеки на инфектирани и контролни проби на КК и ДШ са класифицирани в съответните миРНК семейства. В пробата ККК са открити 217 миРНК, принадлежащи на 71 фамилии; в ККИ, 210 миРНК, принадлежащи към 69 семейства; ДШК, 209 миРНК отнасящи се към 66 фамилии; ДШИ 217 миРНК от 66 семейства (Фиг. 9). Намерено беше, че семействата на miR166, miR169 и miR395, присъстват с повече членове в ДШ библиотеките, в сравнение с КК библиотеките. Повече членове на miR156 и miR399 преобладават в библиотеките на инфектираните растения, в сравнение с библиотеките на здравите растения и при двата сорта (Фиг. 9).



Фиг. 9: Консервативни миРНК и техните фамилии, идентифицирани в четирите малки РНК библиотеки от КК и ДШ.

5.3 МикроРНК гени с противоположни профили на експресия в отговор на PSTVd инфекция

Промените в експресията на миРНК в PSTVd-инфектираните растения на 28 dpi, сравнени с контролите са изчислени за всеки сорт чрез DEseq2 package (Love et al., 2014) (Фиг. 10). С $|\log_2FC| \geq 1$ са идентифицирани 14 диференциално експресирани миРНК в КК и съответно 32 в ДШ (Фиг. 10).



Фиг. 10: Диференциално експресирани микроРНК с $|\log_2FC| \geq 1$ и $p < 0.05$ между ККИ и ККК, и между ДШИ и ДШК на етап 28 dpi.

Сред диференциално експресираните миРНК в КК в отговор на PSTVd, броят на миРНК с повишена експресия е съизмерима с този на миРНК показващи понижена експресия (Фиг. 10). Най-голяма редуция в експресията се наблюдава при миРНК, принадлежащи към миРНК398 семейството (miR-398c-5p, miR-398c-3p, и miR-398e-3p), както и в can-miR408-3p и can-miR397a-5p. Значително повишение в експресионните нива беше отчето при stu-miR169e-5p, слабо повишение в експресията е намерено и при две специфични за пипер миРНК (miRC16 and miRC18) (Фиг. 10).

В PSTVd инфектираните растения ДШ, е наблюдаван значителен брой миРНК с повишена експресия (19 от 32) (Фиг. 10). Към тези миРНК се отнасят няколко члена на miR408 семейството

(can-miR408-3p, can-miR408a, и stu-miR408a-3p) и miR397 фамилията (can-miR397b, can-miR397a-5p, и sly-miR397). миРНК, показващи понижена експресия в ДШ са can-miR482a-3p, can-miR164b-3p, can-miR172g-3p, и stu-miR6024-3p. Специфичните за пипер миРНК, miRC16, също имат слабо понижаване на експресията в ДШ.

5.4 Валидиране на подобрени миРНК гени, показали противоположен експресионен профил между двата сорта

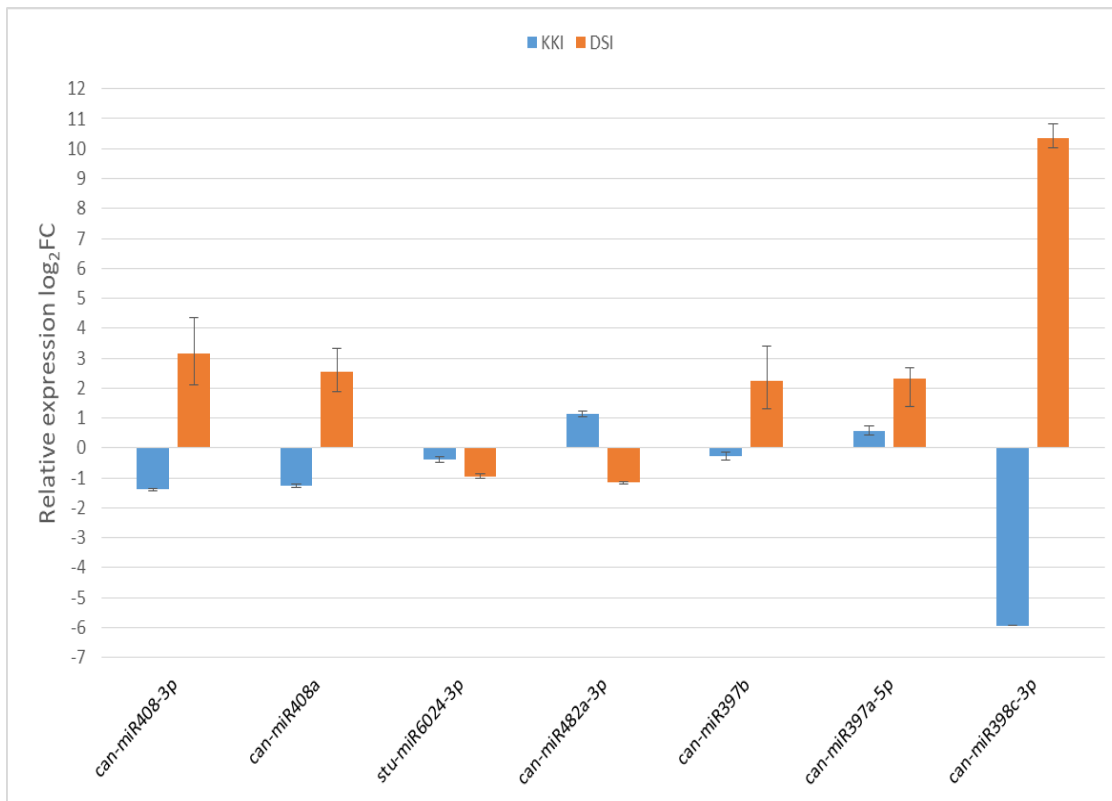
От диференциално експресирани миРНК с брой прочити ≥ 100 и показали противоположен профил между двата сорта са подобрени седем миРНК за валидиране чрез RT-qPCR. В Таблица 1 са представени нуклеотидните последователности на тези миРНК и тяхната експресия $|\log_2 FC| \geq 1$, съгласно проведеното новогенерационно секвениране на малки РНК.

миРНК	миРНК нукл. послед.	сорт	Брой прочити	Log2 FC
can-miR408a	TGCACTGCCTCTTCCC TGGCT	ДШ	20837.23	1.75
		КК	10418.59	-1.09
can-miR408-3p	TGCACAGCCTCTTCCC TGGCT	ДШ	4818.88	2.46
		КК	2004.02	-1.26
can-miR398c-3p	TGTGTTCTCAGGTCGC CCCTG	ДШ	22962.56	2.10
		КК	20220.60	-1.88
can-miR397a-5p	TCATTGAGTGCAGCG TTGATG	ДШ	3598.06	1.91
		КК	2378.80	-1.13
stu-miR6024-3p	TTTTAGCAAGAGTTGT TTTCCC	ДШ	3953.11	-1.17
can-miR397b	ATTGAGTGCAGCGTT GATGAC	ДШ	5437.95	1.87
can-miR482a-3p	TTTCCAATTCCACCCA TTCCTA	ДШ	2846.59	-1.40

Таблица 1: Списък на подобрените за валидиране чрез RT-qPCR диференциално експресирани миРНК с противоположен профил между двата сорта

Резултатите от RT-qPCR показват сортово-специфична динамика и потвърждават данните от новогенерационното секвениране на малки РНК. В отговор на PSTVd инфекцията, can-miR398c-3p, can-miR408a can-miR408-3p, can-miR397b, и can-miR397a-5p имат повишена експресия в ДШ и понижена в КК (Фиг. 11), докато can-miR482a-3p показва редукция в експресията в ДШ и повишение в експресията в КК. Единствената

миРНК, за която не беше потвърдена сортова специфичност е *stu-miR6024-3p*. За нея беше отчетена понижена експресия и в двата сорта.



Фиг. 11: Експресионен анализ на *can-miR408-3p*, *can-miR408a*, *stu-miR6024-3p*, *can-miR482a-3p*, *can-miR397b*, *can-397a-5p*, и *can-miR398c-3p* посредством RT-qPCR в КК и ДШ на етап 28dpi.

6. Новогенерационно секвениране на иРНК от КК и ДШ, инфектирани с PSTVd

Във връзка с провеждането на новогенерационното секвениране на иРНК са създадени четири библиотеки: ДШ контрола; ДШ инфектирана; КК контрола; КК инфектирана. Проведеното новогенерационно секвениране на иРНК генерира над 173 М прочита.

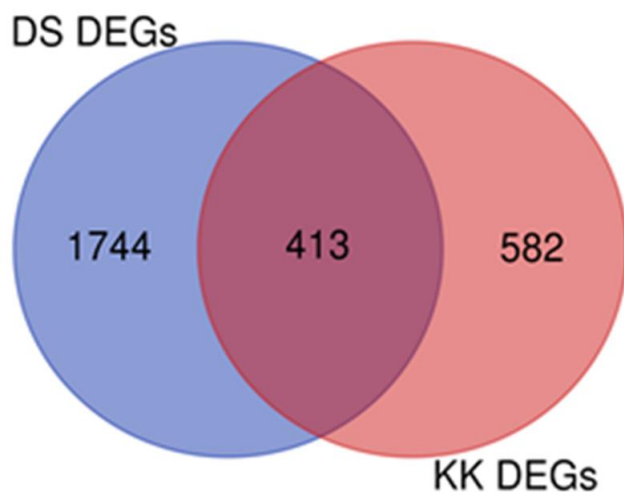
6.1 Диференциално експресирани белтък-кодиращи гени в отговор на PSTVd инфекция в КК и ДШ

За сравнителен анализ на експресията по двойки между контролни и PSTVd-инфектирани растения е използван DESeq2 метода. Анализът идентифицира 998 диференциално експресирани гени (ДЕГ) в растения КК, от които 43.5% са с понижена експресия и 56.5% с повишена експресия, и 2161 ДЕГ в растения ДШ, от които 62.3% са с понижена експресия и 37.7% с повишена експресия (Фиг. 12).



Фиг. 12: Гени с повишена и понижена експресия в сортове тикер КК и ДШ в отговор на PSTVd инфекция на 43 ден след инокулация.

Вен диаграмата на ДЕГ в двата сорта, показва че броят на ДШ-специфични ДЕГ е два пъти повече от намерените КК- специфични ДЕГ, в отговор на виридна инфекция (Фиг.13).

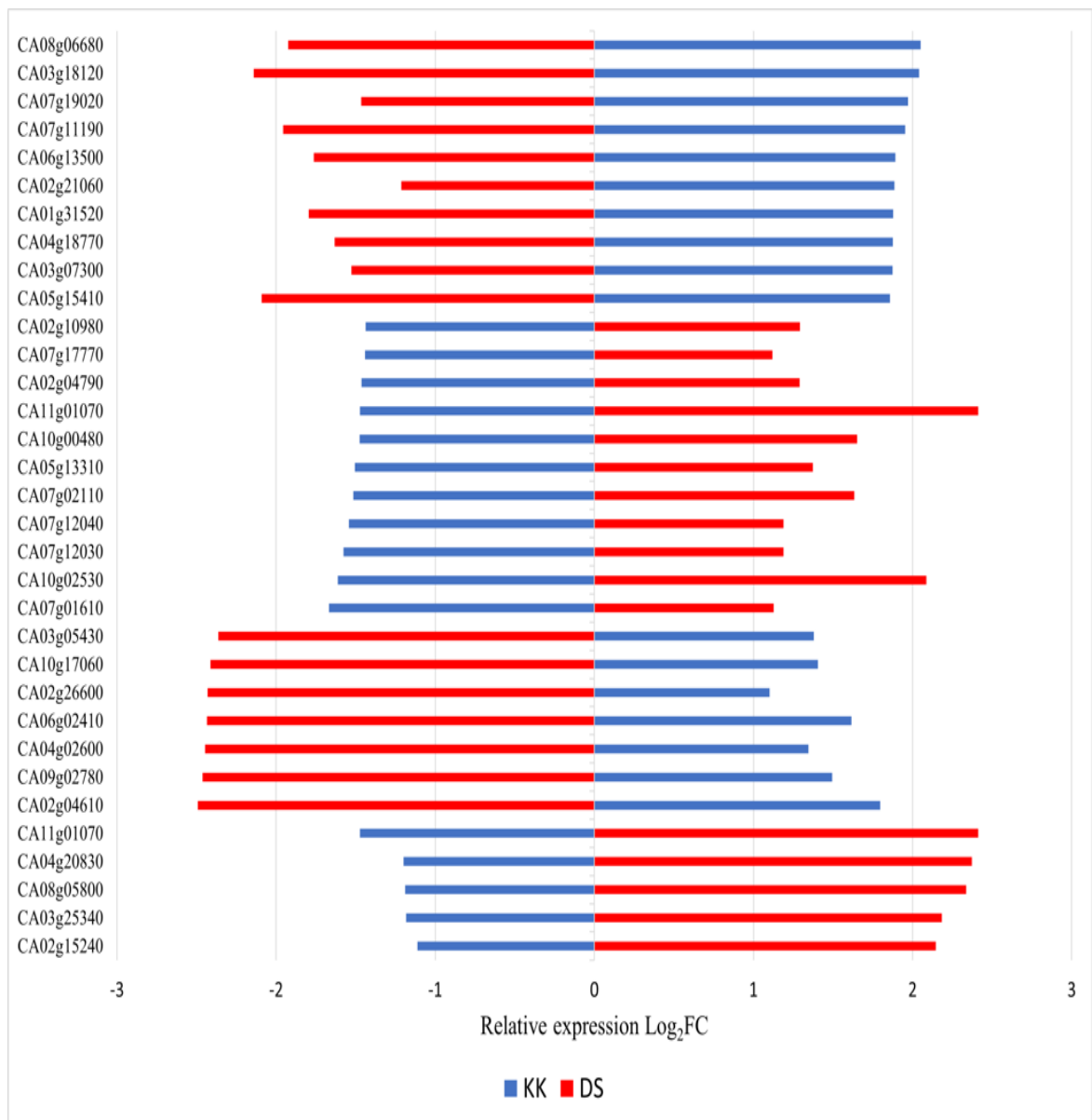


Фиг. 13: Вен диаграма, представяща общи и специфични ДЕГ за КК и ДШ, в отговор на PSTVd инфекция на 43 ден след инокулация.

От ДЕГ в ДШ, 1346 гена са с понижена експресия, а 564 гена са с повишена експресия в ДШ. При КК, 434 гена са с понижена експресията, а 815 гена са с повишена експресия. 413 от гените, идентифицирани в двата сорта, са припокриващи се ДЕГ (Фиг. 13).

6.2 ДЕГ, проявяващи противоположни модели на експресия в КК и ДШ, в отговор на PSTVd инфекция

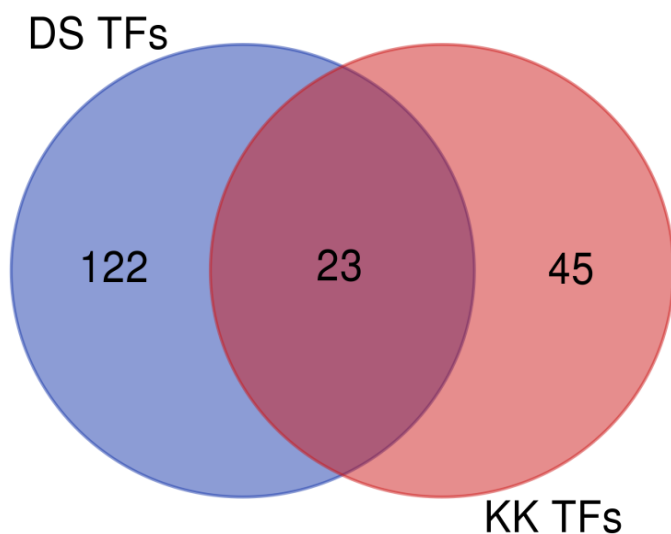
Анализът на 413 общи ДЕГ, показва, че 224 ДЕГ проявяват противоположни модели на експресия в двата сорта. Част от тези ДЕГ, с противоположен профил на експресия са представени на Фиг. 14.



Фиг. 14: ДЕГ с $|\log_2FC| \geq 1$, проявяващи противоположни модели на експресия в двата сорта типер в отговор на PSTVd инфекция, съгласно данните от новогенерационно секвениране на uPHK.

6.3 Диференциално експресирани транскрипционни фактори, идентифицирани в двата сорта, в отговор на PSTVd инфекция

Сред припокриващите се ДЕГ, са идентифицирани 23 транскрипционни фактора (ТФ) (Фиг. 15), по-голямата част от които показват промяна в експресията в противоположна посока (Таб. 2).



Фиг. 15 : Вен диаграма, представяща броя на ДЕ ТФ (PlantRegMap/PlantTFDB v5.0).

Номер за достъп	брой прочити в ДШ	Log2FC ДШ	брой прочити в КК	Log2FC КК	име на гена
CA02g26670	3311.00	-2.30	5504.44	-1.31	CONSTANS protein
CA02g07170	223.52	-2.27	1791.25	-1.51	Myb-like DNA-binding protein%2C putative
CA08g16870	458.66	-2.25	165.18	1.03	Zinc-finger DNA binding protein
CA02g22440	331.70	-2.22	76.41	-1.42	protein RADIALIS-like 1-like [Glycine max]
CA08g08650	620.32	-2.15	308.82	1.58	homeobox-leucine zipper protein ATHB-7-like isoform 1 [Solanum lycopersicum]
CA09g11950	128.57	-1.97	82.94	1.04	NtWRKY1
CA02g07270	83.25	-1.91	61.83	1.41	Homeodomain leucine-zipper 1
CA10g02900	175.04	-1.91	165.96	-1.15	Golden 2-like 2 transcription factor
CA02g01800	349.24	-1.68	312.75	1.06	WRKY transcription factor 26
CA07g21470	137.43	-1.61	70.39	-1.12	Salicylic acid-induced protein 19
CA05g04410	1005.68	-1.59	967.21	1.28	NAC transcription factor
CA10g20490	29.72	-1.51	105.26	1.22	CCAAT-binding transcription factor
CA03g36090	96.11	-1.36	424.16	-1.54	DNA binding protein%2C putative
CA02g30960	15.09	-1.24	69.61	1.45	probable WRKY transcription factor 45-like [Solanum tuberosum]
CA03g06220	195.40	-1.15	131.81	1.21	Basic helix-loop-helix protein
CA10g20440	235.88	-1.12	267.01	1.29	Heat shock factor protein%2C putative
CA04g17180	88.32	1.08	52.09	-1.11	Transcription factor bHLH
CA02g26690	390.86	1.09	28.32	-1.21	CONSTANS protein
CA10g06890	20.48	1.25	65.22	1.44	WRKY transcription factor 6
CA11g16170	998.41	1.40	586.89	1.06	BEL5 protein
CA04g16680	36.63	1.45	88.77	1.41	R2R3-MYB transcription factor MYB1.1

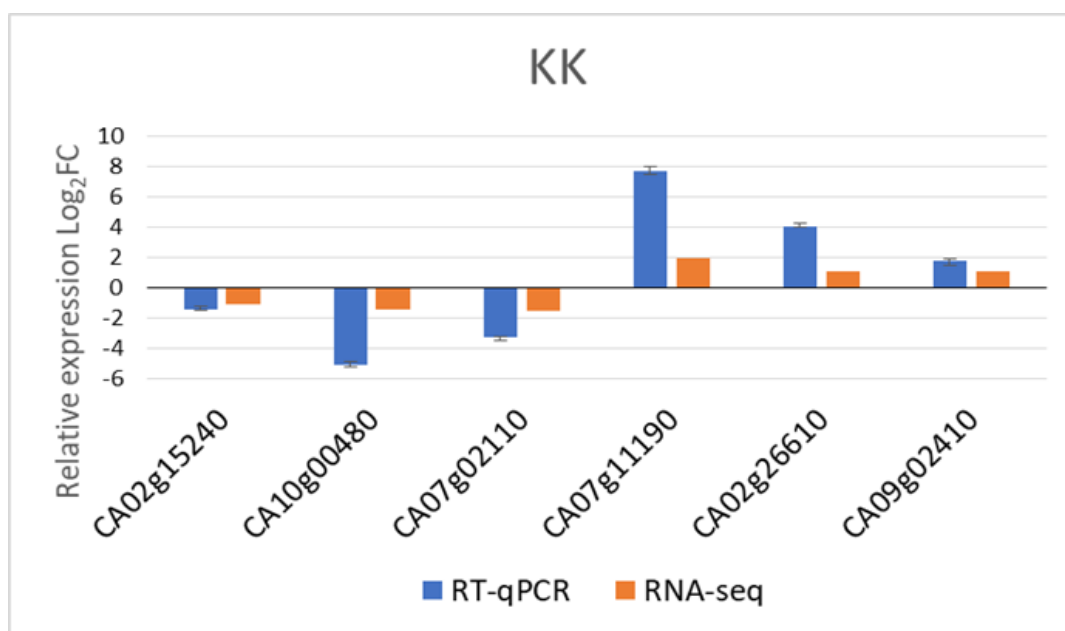
CA04g19220	132.97	2.22	44.93	1.15	Tuber-specific and sucrose-responsive element binding factor
CA11g01070	1508.63	2.41	178.09	-1.47	zinc finger protein CONSTANS-LIKE 16-like [Solanum lycopersicum]

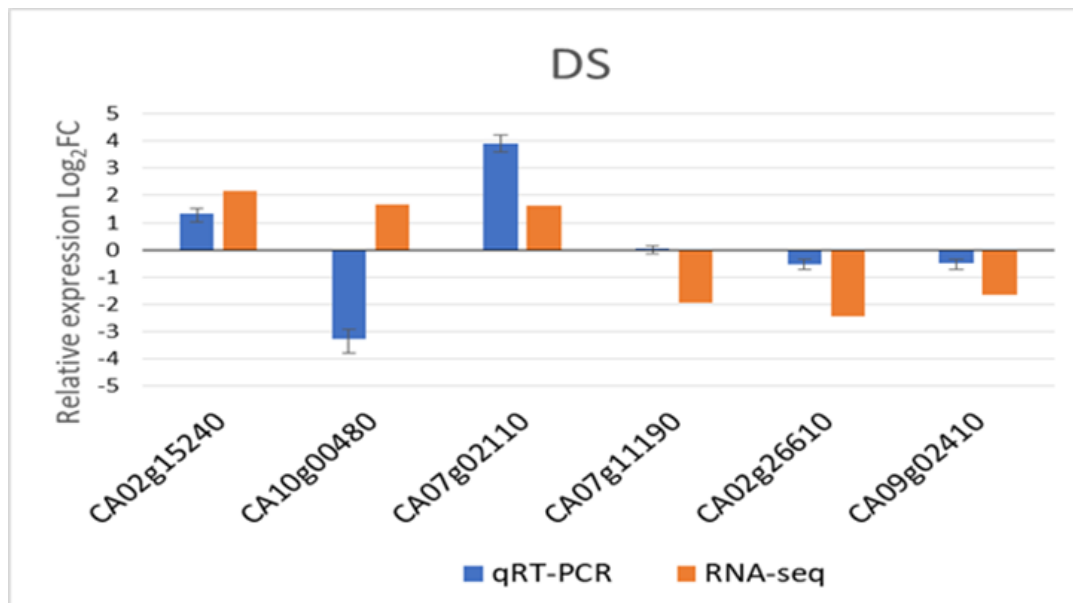
Таблица 2. ДЕ ТФ в КК и ДШ с номера за достъп в базата данни SOL Genomics Network, брой прочити и експресия, представена като $|\log_2FC| \geq 1$.

Преобладаващата част от ДШ-специфични ТФ са с понижена експресия, докато повечето от КК-специфичните ТФ са с повишена експресия (информацията е представена в допълнителни таблици, приложени към електронния вариант на дисертацията).

6.4 Сравнителен експресионен анализ на подобрани припокриващи се ДЕГ, в отговор на PSTVd инфекция

Сред всички припокриващи се ДЕГ, показващи противоположни експресионни модели в двата сорта, шест гена са селектирани за валидиране чрез количествен RT-qPCR. Сред тези шест гена, CA02g15240 (auxin-repressed 12.5 kDa protein-like isoform), CA10g00480 (NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase [POR]), и CA07g02110 (polygalacturonase-inhibiting protein [PGIP]), показват понижена експресия в инфектираните КК и повишена експресия в инфектираните растения ДШ, докато CA07g11190 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase [ACO]), CA02g26610 (S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme [SAMDC]), и CA09g02410 (phenylalanine ammonia-lyase [PAL]) показват повишаване на експресията в КК и понижаване в ДШ в резултат на инфекцията, според данните от новогенерационното секвениране на иРНК. Проведеният RT-qPCR анализ потвърждава профилите на генна експресия в инфектираната КК и показва, че CA10g00480, CA02g26610 и CA07g11190 претърпяват най-значителна промяна в експресията. В инфектираните растения от сорт ДШ, два гена (CA10g00480 и CA07g11190) показваха различия в сравнение с данните от иРНК-секвениране от ново поколение (Фиг. 16). RT-qPCR анализа показва, че CA10g00480 и CA07g02110 гените променят своята експресия в най-голяма степен в отговор на PSTVd инфекция (Фиг. 16).





Фиг. 16: Анализ на експресионния профил на селектирани гени, чрез RT-qPCR и RNA-seq анализ, в растения от сорт КК и ДШ, на 43 дни.

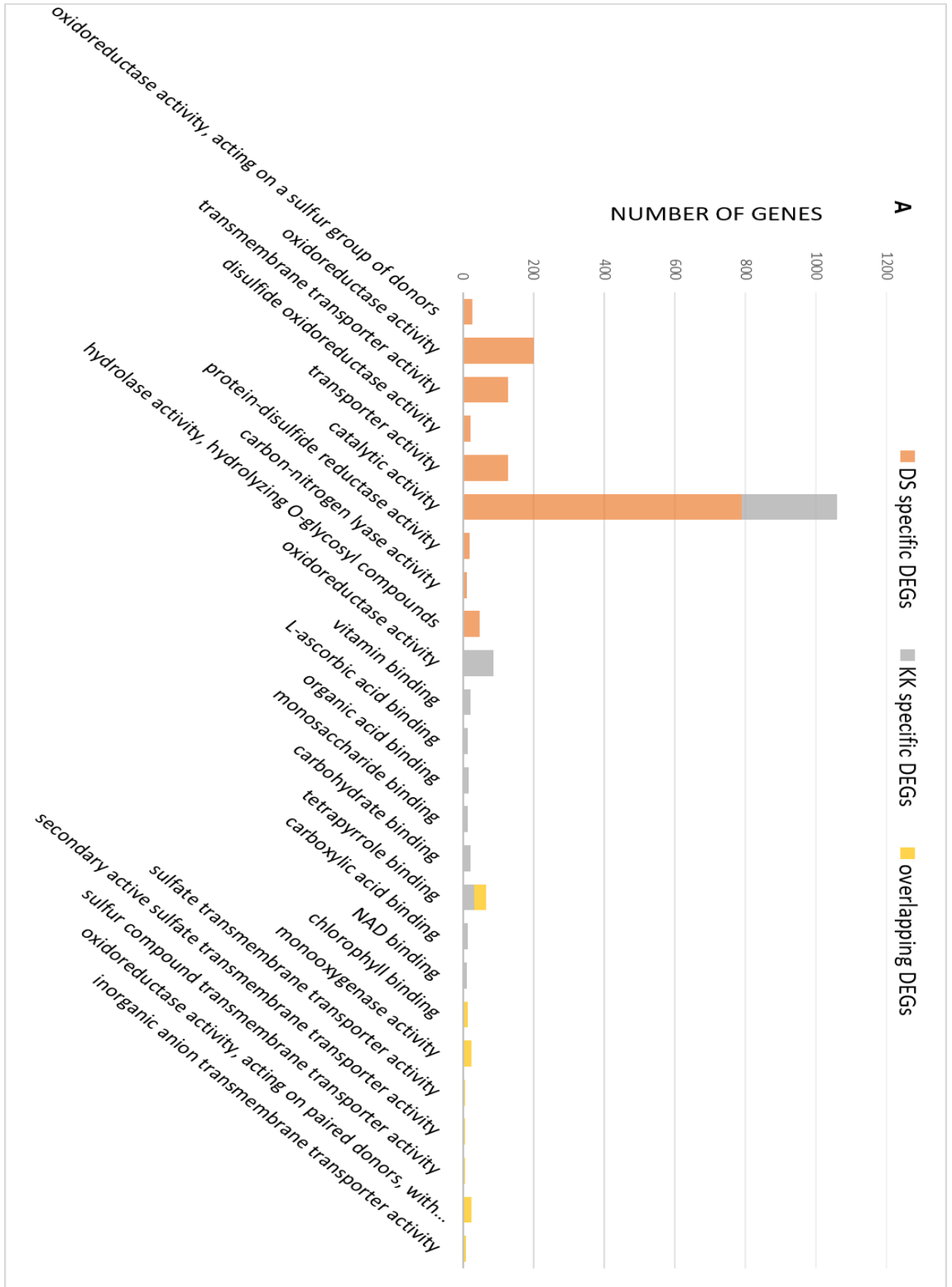
6.5 Генно-онтологичен анализ (ГО) на припокриващите се и сортово-специфични ДЕГ в двата сорта пипер

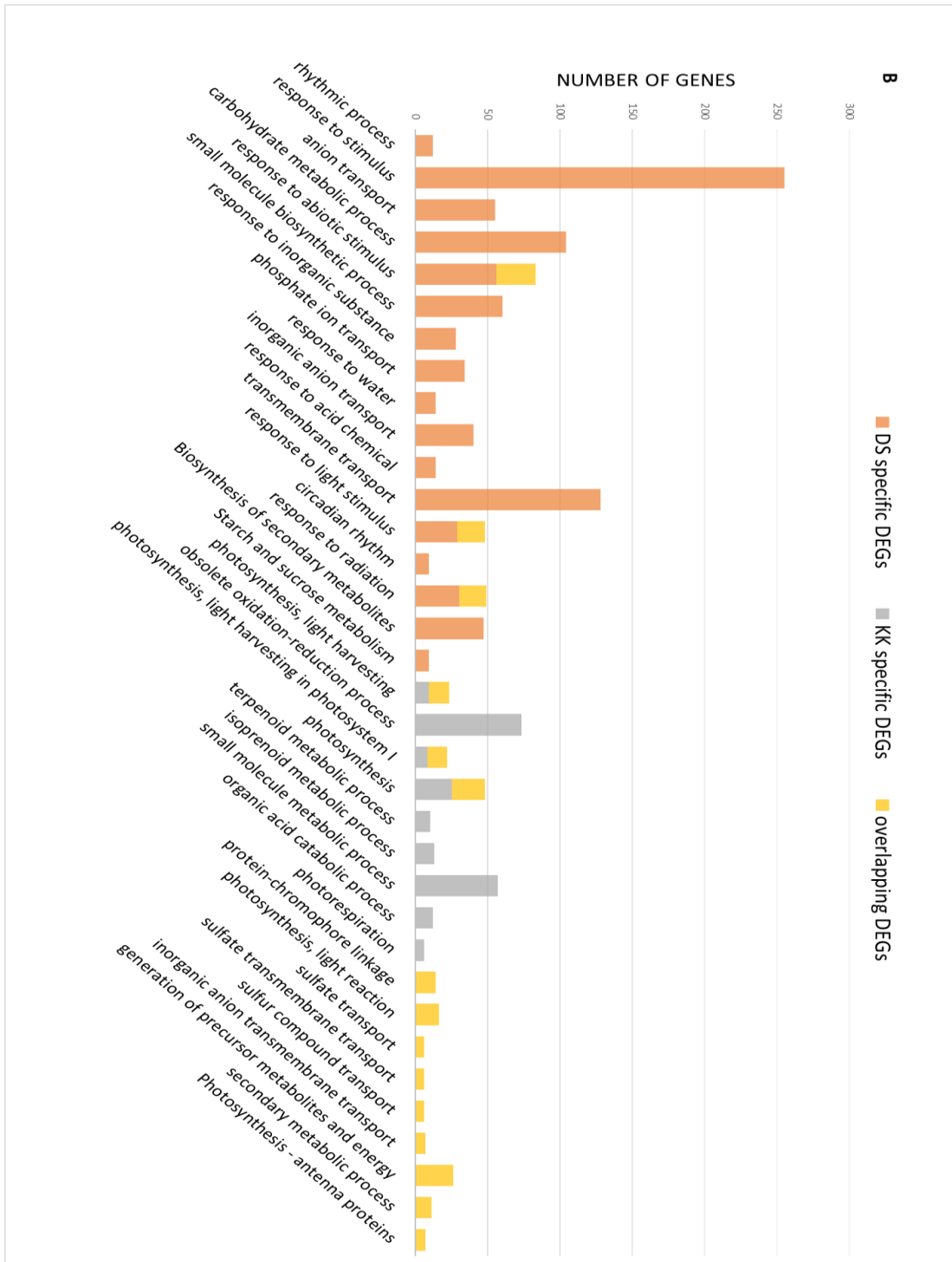
ГО анализ на припокриващите се и сортово-специфичните ДЕГ, извършен чрез g:Profiler, има за цел да свърже ДЕГ със специфични биологични процеси (БП), молекулна функция (МФ), или клетъчни компоненти (КК). Намерено беше, че припокриващите се ДЕГ включват осем МФ ГО категории, най-изобилната, от които е хлорофил-свързваща, тетрапирол-свързваща, оксидоредуктазна и монооксидогеназна активност (Фиг. 17А). Сред двадесетте КК ГО категории, са пластиди, хлоропласти, обвивки, органелни обвивки, пластоглобули, фотосистема I и II (Фиг. 17С), а четиринадесетте БП ГО категории, включват фотосинтеза, светосъбиращи комплекси на фотосистема I, генериране на прекурсорни метаболити и енергия, отговор към стимули и транспорт (Фиг. 17Б).

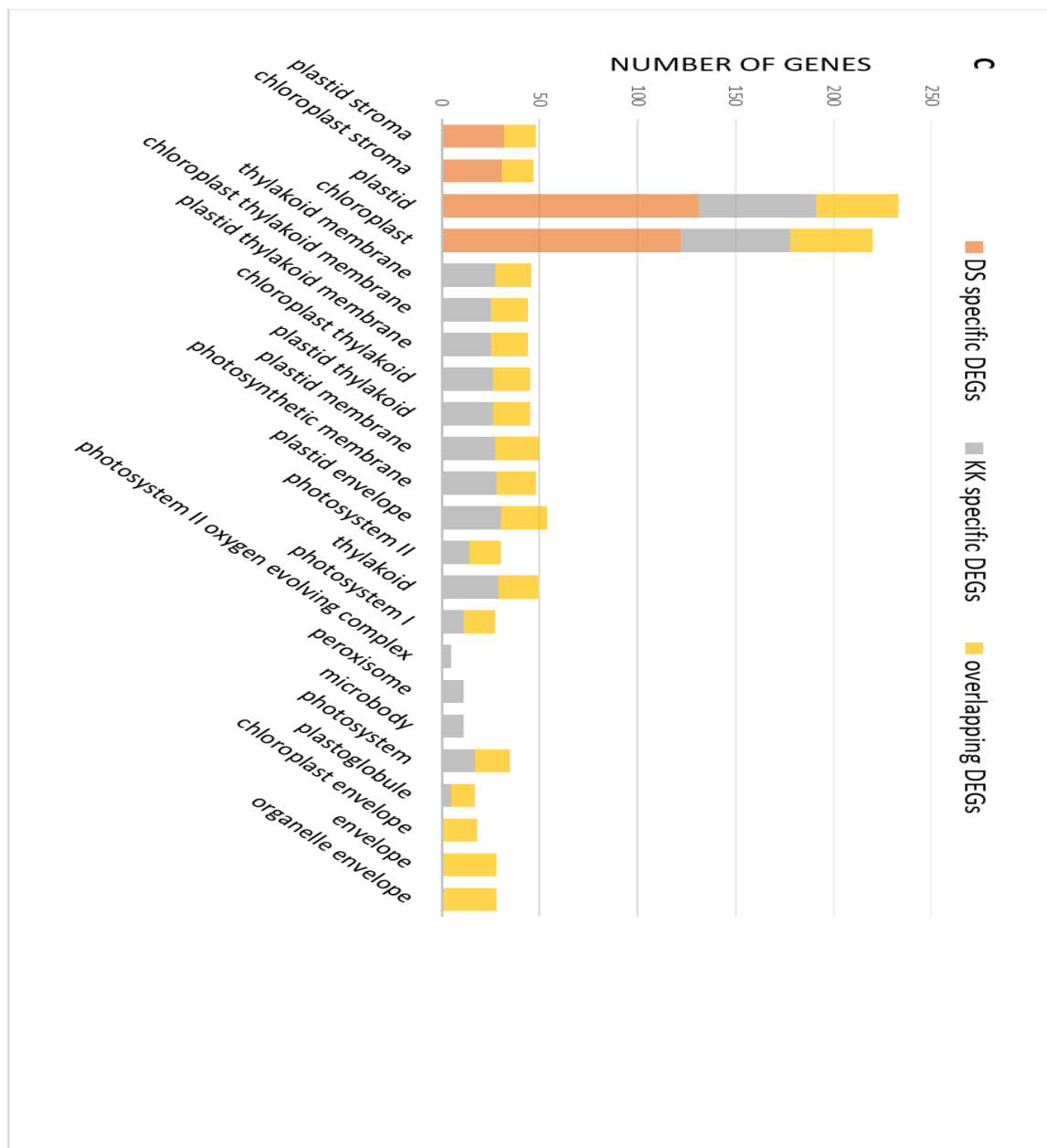
ДШ-специфични ДЕГ, включват девет МФ ГО категории, като каталитична, оксидоредуктазна трансмембранна транспортерна активност и четири КК ГО категории, сред които пластидите и хлоропластите са преобладаващи (Фиг. 17 А, С); Сред седемнадесетте БП ГО категории са отговор към стимули, трансмембранен транспорт, карбохидратни метаболитни процеси, биосинтетични процеси на малки молекули, биосинтеза на вторични метаболити, скорбелени и захарозни метаболити (Фиг. 17 Б).

КК-специфичните ДЕГ включват 10 МФ ГО категории, между които са каталитична, оксидоредуктазна активност, свързване на витамини, тетрапирол-свързваща активност (Фиг. 17 А); 18 КК ГО категории, най-изобилни, от които са: пластиди, хлоропласти, обвивка на пластиди и тилакоидни мембрани (Фиг. 17 С); и 9 БП ГО категории, включващи оксидоредуктазни процеси, метаболитни процеси за малки молекули, фотосинтеза, фотодишане (Фиг. 17 Б).

Намерено беше, че и в двата сорта, гените с понижена експресия принадлежат към категориите БП ГО- фотосинтеза и отговор към стимули. Гените с повишена експресия в отговор на PSTVd инфекцията в ДШ бяха обособени в категорията БП ГО- защитен отговор, докато гените с увеличена експресия в КК бяха включени в БП ГО категория-оксидоредуктазни процеси и отговор към стимули (информацията е представена в допълнителни таблици приложени към електронния вариант на дисертацията).

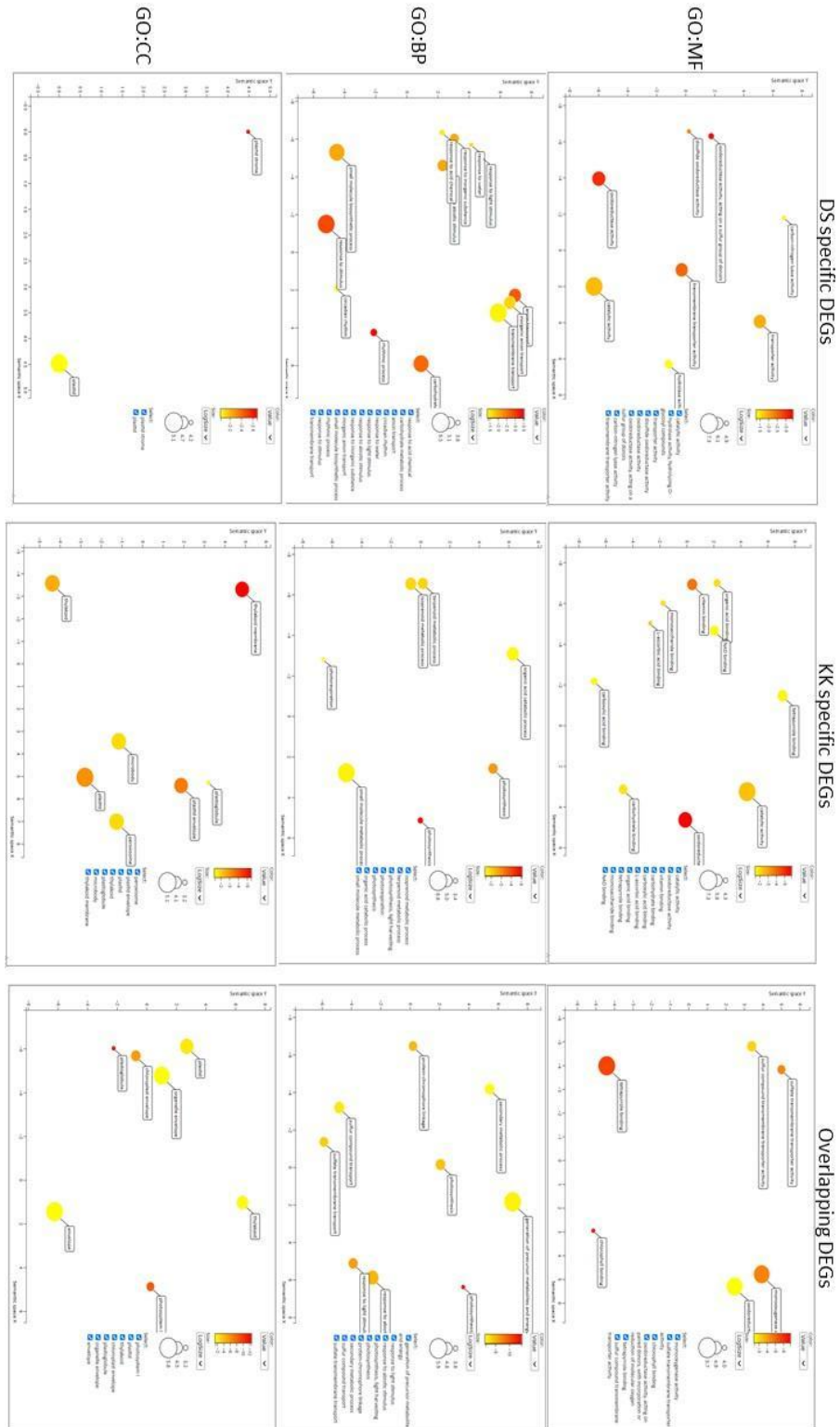






Фиг. 17: Генно-онтологичен анализ на ДЕГ в двата сорта тигер базиран на *g:Profiler* ($adj\ p < 0.05$). Групирането по ГО категориите молекулна функция (A), биологични процеси (B), клетъчни компоненти (C) е представено за ДШ-специфични, КК-специфични и припокриващи се ДЕГ,

Функционално обогатените ГО категории са обединени и чрез веб-софтуер REVIGO <http://revigo.irb.hr/>, като са приложени параметрите по подразбиране (Фиг. 16) (Supek et al., 2011).



Фиг. 18: Генно-онтологичен анализ, проведен чрез REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>). X-оста изразява p -стойността от \log_{10} на всяка ГО категория, докато y-оста представя логаритмично честотата на ГО категорията в аотираната ГО база данни.

ОБСЪЖДАНЕ

Ефекта на PSTVd инфекцията върху различни растителни видове и сортове от сем. *Solanaceae* (домат, картоф, *Solanum laxum* и др.) е изследван посредством широко-машабни експресионни генни анализи (Li et al., 2016), (Kang et al., 2020). Молекулните основи на отговора на пипер (*Capsicum annuum* L.) към PSTVd инфекция е все още недостатъчно изследван, което насърчи използването на два български сорта пипер като експериментална система за изследване на взаимоотношенията PSTVd- пипер. Селекцията на двата сорта се основаваше на селскостопанската им значимост и развитието на PSTVd- специфичен фенотип (Apostolova et al., 2021).

Посредством новогенерационно секвениране на малки РНК в отговор на PSTVd инфекция в инфектираните проби от пипер на двата сорта, използвани в това изследване, са идентифицирани >200 присъстващи миРНК, принадлежащи към > 60 семейства. Установени са няколко консервативни миРНК: *cap-miR397*, *cap-miR398*, *cap-miR408*, и *cap-miR482*, които показват сортово-специфична експресия, в отговор на PSTVd инфекция на 28 ден след инокулация. Във всички библиотеки (здравни и инфектирани на двата сорта) най-голямо изобилие показват 24 нд малки РНК, което съпада с резултатите представени от Hwang и неговите колеги (2013), които докладват за най-застъпено присъствие на 24 нд малки РНК в различните органи на пипер.

Картирането на малки РНК към PSTVd KF440-2 генома, показва, че преобладават малки РНК с дължина 21 нд и 22 нд в PSTVd инфектираните проби на двата сорта. В PSTVd инфектираната ДШ, 21нд малки РНК са два пъти повече, отколкото в PSTVd инфектираната КК (Apostolova et al., 2021). Сортово- специфични разлики в моделите на акумулиране на PSTVd-специфични 21 нд и 22 нд малки РНК е докладвано и при домати (сортове “Rutger” и “Moneymaker”) (Wang et al., 2011). Наличието на тези малки интерфериращи РНК в PSTVd инфектираните сортове пипер предполага тяхното активно участие в защитата на растенията чрез РНК заглушаване, подобно на това докладвано при домати (Papaefthimiou, 2001) както и в развитие на PSTVd специфичния фенотип (Tsushima et al., 2015).

В настоящото изследване, няколко миРНК *cap-miR398c-3p*, *cap-miR408a* *cap-miR408-3p*, *cap-miR397b*, и *cap-miR397a-5p*, *cap-miR482a-3p* показаха противоположни експресионни профили в двата сорта пипер, в отговор на PSTVd инфекция. Доказано е при растенията, че *miR398* участва в отговора към абиотичен стрес и резистентност към заболявания, тъй като повлиява гени от семейството на супероксид дисмутаза (SOD): шаперона (CCSD), медно-цинковата СОД (CSD) и транскрипционните фактори (SOX) (Zhu et al., 2011), (Lu et al., 2011). Нашите експресионни анализи показват, че *cap-miR398c-3p* е индуцирана в PSTVd-инфектирана ДШ и потисната в КК (Фиг. 27, 28). Това предполага, че при пипер съществува сортова

специфичност по отношение на участието на miR398 в защитен отговор към PSTVd (Zhu et al., 2011). Сортова-специфичност по отношение на PSTVd отговора намираме и за can-miR482, чиято експресия е потисната в ДШ на 28 dpi, и слабо повишена в КК. МиРНК, принадлежащи към миРНК482/2118 суперсемејството, миРНК 6019, миРНК 6024, миРНК 6027, регулират гени, кодиращи NB-LRR белтъци, които са основния клас гени, осигуряващи резистентност (R- гени) при домати, картоф и *N. benthamiana* (Zhai et al., 2011; Li et al., 2012; Shivaprasad et al., 2012; Zhang et al., 2016, Kim, 2019). МиРНК 482 модулира резистентността при картоф, чрез потискане експресията на NBS-LRR гени, при инфекция от *Verticillium dahlia* (Yang et al., 2015) Подобен отговор се наблюдава при инфекция на домати с *Fusarium oxysporum* (Yang et al., 2021) (Ouyang et al., 2014). Един от начините на действие, чрез който микро РНК модулират NBS-LRR гени, е чрез специфични 22-нд миРНК, които задействат биогенезата на вторични малки интерфериращи РНК, означавани като фази РНК, и така увеличат ефективността на заглушаване на техните цели (Ding and Itaya, 2007), (Eamens et al., 2014). Доказано е че, miR482 причинява разцепване на NBS-LRR гена и последващо производство на вторични малки РНК в различни растения като картофи, домати и тютюн (Yang et al., 2021). Ouyang и неговите сътрудници (2014) представят сортово-специфична динамика на miR482, базирана на сравнителен миРНК анализ при сортовете домати Moneymaker (чувствителен към *Fusarium oxysporum*) и Motelle (резистентен към *F. oxysporum*). Те доказват нарушена резистентност към *F. oxysporum* при домати Moneymaker поради инхибиращия ефект на миРНК, sly-miR482f и sly-miR5300, върху NB домен- съдържащите протеини. Гена за резистентност R3a в картофите е прицелен на семейство miR482 и води до получаването на фази РНК. Обратно, при домати R3a хомологът I2 е таргет на miR6024. Следователно, еволюцията на семействата на гени, осигуряващи резистентност може да се дължи на регулация, упражнявана от различни микро РНК (Yang et al., 2021).

Can-miR397a-5p и can-miR408 са с повишена експресия в ДШ и с понижена такава в КК на 28 dpi (Фиг. 28). Предполагаеми таргети на членовете на can-miR397 и can-miR408 семействата включват Laccase-like гените (Hwang et al., 2013). Тези гени кодират laccases multi-copper oxidases, които участват в лигниновата и флавоноидната биосинтеза и пътищата за деградация на антоцианини, които вземат участие в адаптацията към стрес (Janusz et al., 2020). Наши изследвания показват, че laccase 4-like и laccase 7-like гените от пипер са обратно пропорционално повлияни от Can-miR397a-5p при двата сорта пипер (Apostolova et al, 2021).

От получените резултати можем да заключим, че фенотипните промени наблюдавани при пипер и други представители на сем. *Solanaceae* по време на инфекция с PSTVd са придружени от промени в експресията на микроРНК и техните целеви гени (Flores et al., 2012).

Широкомасщабни анализи на PSTVd инфектирани растения показват значителни промени в експресионните профили на белтък-кодиращи гени, свързани с хормоналната биосинтеза (Milanovic et al., 2018) и сигнализация (Owens et al., 2012), организацията на клетъчната стена

(Itaya et al., 2002) и биогенеза и формиране на хлоропластите. Симптомите, като епинастии и забавяне в растежа в резултат на PSTVd инфекция се асоциират с промени в нивата на гиберелини, ауксини и брасиностероиди. Белтъците от фамилията DRM1/ARPs, участват в медиацията от ауксин сигналния път. Все повече доказателства сочат, че DRM1/ARP участват в отговора на абиотичния или биотичния стрес и може да са медиатори в отговора към патогените и процесите на растеж/развитие на растенията (Souza et al., 2019). В повечето случаи на заболявания, свързани с патогени (напр. заболяване, причинено от гъбичния патоген *Fusarium oxysporum* и инфекция с нематоди) (De Souza et al., 2019) (Kidd et al., 2011), ауксиновата сигнализация е свързана с чувствителността към заболяване и много по-рядко с резистентност към заболяване. Ролята на ауксина при PSTVd-индуцирана защита в растенията е докладвана от няколко изследователски групи. Zheng и колеги съобщават за значителни промени в нивото на експресия на 83 гена при домати, свързани с ауксиновата биогенеза и сигнализация. Понижена експресия на гени, свързани с ауксин, е докладвана в заразени с PSTVd растения от сорта картоф „Safari“ (Katsarou et al., 2016) и сорта домати „Rutgers“ (Wiesyk et al., 2018). Съобщава се, че други гени, участващи в ауксиновия сигналния път (напр. ASK2, участващ в убиквитин-медирана протеолиза; IAA3/SHY2, ген, кодиращ транскрипционен фактор; и IAR1, участващ в ауксиновата хомеостаза), са с повишена експресия в PSTVd-инфектирания сорт домати „Rutgers“ (Owens et al., 2012). Променените нива на индол-3-оцетна киселина (ИОК) в PSTVd-инфектиран домати, сорт ‘Moneymaker’ се свързват със загубата на апикална доминантност (Bagherian et al., 2016). Органно-специфични промени в нивата на ендогенната ИОК в PSTVd-инфектираните грудки на картоф, сорт ‘Désirée’ се свързват с промяна в експресията на гени, участващи в метаболизма на ИОК (Milanovic et al., 2019).

Транскриптомният анализ на PSTVd инфектирани КК и ДШ растения показва диференциална генна експресия в резултат на инфекцията, като някои от гените, проявяват противоположни експресионни профили между двата сорта (Фиг. 31) Преобладаващата част от гените в ДШ са с понижена експресия, в сравнение с гените в КК, което би могло да обясни по-силно изявените PSTVd симптоми в ДШ.

Анализът на функционално обогатяване сред диференциално експресирани гени, показва че повечето от тях с понижена експресия в двата сорта участват във фотосинтезата. Гените с повишена експресия в ДШ, принадлежат към биологични процеси, участващи в защитния отговор. Експресията на шест диференциално експресирани гени в двата сорта с противоположни експресионни профили беше валидирана, чрез RT-qPCR (Фиг. 33). Сред селектираните гени са такива, които участват във фотосинтезата, хормонална сигнализация и защитните пътища. В проведени от нас анализи беше установена промяна в експресията на ауксин-свързани гени, в инфектираните с PSTVd сортове пипер. CA02g15240 (auxin-repressed 12.5 kDa protein-like isoform) в отговор на PSTVd показва сортово-специфична експресия, което предполага участие на хормонален контрол върху вирионната инфекция. Повишената експресия

на CA02g15240 в растенията от сорт ДШ, може да бъде асоциирано с по-високата чувствителност на сорта към инфекцията, и респективно по-силната симптоматика в ДШ.

Доказано е, че PSTVd инфекцията води до промяна в експресията на три гена, участващи в етиленовата биосинтеза, SAMDC, aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (ACS), и ACO (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Oxidase) в домати (Owens et al., 2012), (Wiesyk et al., 2018). SAMDC проявява динамика в експресията, докато ACO показва повишаване на експресията с напредване на PSTVd инфекцията (Moeder et al. 2002). Известно е, че вирусната инфекция се свързва с повишена синтеза на етилен, което предполага, че ACO гените участват в отговора срещу тези инфекциозни агенти. Докладвано е, високо натрупване на ST-ACO1 транскрипти в картофите в следствие на PVA (картофен вирус А) инфекция (Nie et al. 2002), и NA-ACO1 и NA-ACO3 при инфекция на тютюн с TMV (Kim et al. 1998). В листата на *Nicotiana benthamiana*, заразени с гъбичния патоген, *Colletotrichum orbiculare*, са детектирани силно повишени нива на NB-ACO1 (Shan and Goodwin 2006). По подобен начин, натрупване на ACO генни транскрипти е отбелязано при други взаимодействия между патогенни гъби и растения (Chen et al. 2003; Lahey et al. 2007; Iwai et al. 2006). Проучванията върху заглушени от NB-ACO1 растения показват, че ACO генът не само се индуцира от патогенна атака, но играе важна роля при появата на некротрофия по време на развитието на гъбична инфекция (Shan and Goodwin 2006)(Rudus et al., 2013). Проведени експерименти върху трансгенните домати растения, свързекспресиращи VvACO1 и VvACO3, докладват нормален морфологичен растеж, докато най-ниски ензимни активности на ACO се наблюдават в трансгенни линии на домати със свързекспресия на VvACO2, които показват и вджуджечаване (Tao et al., 2013). В нашите експерименти експресията на CA07g11190 (ACO) е повишена в инфектираните КК растения, което предполага, че PSTVd индуцира продукцията на етилен, което води до повишаване на толерантността към стрес в тези растения. В допълнение, SAMDC също е ключов ензим, участващ в биосинтезата на основни класове полиамини, (ПА), които упражняват плейотропни ефекти (Mo et al., 2016) (Ji et al., 2019). Трансгенни картофи, в които експресията на SAMDC е редуцирана, а нивата на ПА са понижени, проявяват специфичен фенотип, описван с малки листа и забавяне в кореновия растеж (Kumar et al., 1996). В тази връзка възможна причина за по-изразения фенотип при ДШ би могла е понижената експресия SAMDC. Полиамините изпълняват ролята на регулатори в йонната хомеостаза, което вероятно е свързано с функционалното обогатяване на ДЕГ специфичните за ДШ, в ГО категорията „Биологични процеси“ - трансмембранен транспорт и анионен транспорт. Съгласно ГО анализа на ДЕГ в ДШ са детектирани няколко гена с редуцирана експресия, участващи в метаболизма на фенилпропаноидната и канелена киселина. Един от тях е ортолог на PAL, който участва в метаболизма на фенилпропаноиди и допринася за резистентността към вируси, чрез индуциране акумулацията на салицилова киселина (СК) (Yuan et al., 2019) (Chen et al., 2006). Описано е, че при сайлънсинг на CaPAL1, растенията пипер показват понижени нива на СК и понижена експресия на CaPR1, поради което проявяват по-голяма чувствителност към

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* (Kim et al., 2014). Инфекция, със силно вирулентен щам на PSTVd, води до редуция в експресията на PAL в домати растения (Wiesyk et al., 2018). Заглушаването на PAL може да повлияе на растежа и развитието на растенията. Например, инхибирането на експресията на PAL в тютюна, може да доведе до забавяне на растежа, промени в структурата на листата, промени в морфологията и пигмента на венчелистчетата и намалена жизнеспособност на полениите (Mo et al., 2022). CA09g02410 (PAL) в ДШ проявява понижена експресия, което може да е причина за появата на по-силно изразената PSTVd симптоматика.

Нарушенията, наблюдавани във фотосинтезата на PSTVd-инфектираните растения се свързва с потискането на гените, участващи в хлоропластната биогенеза и функция, като POR3, Cab4, Cab5, и хлоропластните карбоанхидразни гени (Itaya et al., 2002). Доказано е, че голям брой от гените, включени във фотореакциите са с понижена експресия като броят на потиснатите гени в домати, варира в зависимост от PSTVd щама и периода след инокулация. В потвърждение на докладваните данни, ние установихме понижение в експресията на POR гена и в двата сорта пипер, съгласно RT-qPCR. В допълнение, новогенерационното секвениране на иРНК показва понижени нива на иРНК на други гени, участващи в хлорофилната биосинтеза (CA04g17210, CA08g13530, CA05g01250, CA10g22340) и Chl a/b свързващи протеини (CA02g12070, CA07g10990, CA10g02050, CA03g29950, CA06g18800, CA09g14040) в PSTVd инфектирани КК и ДШ, които заедно допринасят за развитие на специфични PSTVd симптоми, като хлорози на по-късни етапи на инфекцията.

Множество ДШ-специфични ДЕГ се свързват с ГО категорията „Биологични процеси“ – отговор към стимули. Polygalacturonase inhibiting proteins (PGIPs), реагират на множество стимули, чрез модифициране експресионните нива на гени, участващи в няколко метаболитни пътища, укрепващи клетъчната стена и водещи до повишаване резистентността към определени гъбни патогени (Janni et al., 2008), (Kalunke et al., 2015), (Wang et al., 2013). PGIP гените участват в основни биологични процеси като развитие на цвета (Gamboa et al., 2001) и отговор към стимули (Wang et al., 2013; Ahsan et al., 2005; Cheng et al., 2008; Federici et al., 2006)). Доказано е, че свърхекспресията на PGIP в домати (*Lycopersicon esculentum*) (Powell et al., 2007) и тютюн (*Nicotiana tabacum*) (Joubert et al., 2006) повишава устойчивостта към *Botrytis cinerea* инфекция, докато понижената експресия- повишава чувствителността към *B. cinerea* (Ferrari et al., 2007). (Zhang et al., 2016). Хетероложна експресия на MdPGIP1 ген от *Malus domestica* в тютюн води до инхибиране на PGs от *Colletotrichum lupini*, *Botryosphaeria obtusa* и *Diaporthe ambigua* (Oelofse et al., 2006). В трансгенен тютюн, хетероложната експресия на CaPGIP1 от *Capsicum annuum*, води до повишена резистентност към *Alternaria alternata* и *Colletotrichum nicotianae* PG, със значително намаляване на броя на местата на инфекция, лезиите и средния им размер върху листата (Wang et al., 2013). Получените данни за експресията на CA07g02110 (PGIP) показаха противоположен профил на експресия в двата анализирани сорта пипер (Фиг. 33). Необходимо е ролята му в

сортово-специфичния отговор на пипер да бъде по-подробно анализирана за пълното разбиране на неговата индукция в отговор на PSTVd инфекция.

Множество гени, кодиращи ТФ са показвали диференциална експресия в PSTVd-инфектирани сортове домати и картофи (Zheng et al., 2017), (Katsarou et al., 2016), (Bao et al., 2019). Данните в настоящото изследване установяват голям брой ДЕ ТФ и в двата инфектирани с PSTVd сорта пипер. Най-изобилните и с най-голямо повишение в експресията ДЕ ТФ, специфични ДШ са: CA10g14960 (MYB TF), CA04g17920 (C2H2-type zinc finger protein), CA02g04730 (nuclear transcription factor Y subunit A-7-like [NF-YA7-like]), CA02g01120 (Dof3 protein), и CA09g07450 (ethylene-responsive element binding factor [ERF]). В сорт КК, най-голяма промяна показват ДЕГ, кодиращи следните ТФ: CA01g00510 (TT2-like MYB TF), CA09g08120 (WRKY71), CA10g18410 (homeodomain [HD]-related), CA11g12710 (WRKY75-like), CA11g14620 (Myb4-like), CA05g00840 (heat stress transcription factor B-3-like [HsfB3-like]), CA02g05780 (APETALA2 [AP2]/ERF domain-containing TF), и CA03g35110 (DNA-binding protein homolog). Хомоложни транскрипти на MYB гени са идентифицирани в пипер. Те са прицелни гени на миРНК семействата: can-miR159 и can-miR319. Транскрипционните фактори GRF, F-box, TCP и NAM са потенциални прицелни гени на can-miR396, can-miR394, can-miR319 и can-miR164 (Hwang et al., 2013). Това предполага нататъшното задълбочено дешифриране на участието на миРНК в регулацията на ТФ и последващите във веригата белтък-кодиращи гени, медиращи отговора на пипер към PSTVd.

Сред припокриващите се ДЕ ТФ, повишена експресия проявява генът CA11g16170, кодиращ BEL-5 транскрипт. Повишената експресия на BEL-5 хомоложния ген в картофи, потиска синтеза на ГК при PSTVd инфекция, с което повлиява формирането на грудки (Katsarou et al., 2016). Това налага по-обстойно анализиране ролята на CA11g16170, кодиращ BEL-5 в метаболизма на ГК при пипер.

В настоящото изследване откриваме дванайсет общи ДЕ гена за ТФ, принадлежащи към осем генни фамилии, т.е. C2H2 (CA08g16870), HD-ZIP (CA08g08650, CA02g07270), WRKY (CA09g11950, CA02g01800, CA02g30960), NAC (CA05g04410), NF-YA (CA10g20490), bHLH (CA03g06220, CA04g17180), HSF (CA10g20440), и CO-like (CA02g26690, CA11g01070), които показват противоположни експресионни профили в двата сорта пипер. Изясняване на специфичната роля на всеки един от тях в отговор на пипер към PSTVd инфекция предстои да бъде дешифрирана в бъдещи експерименти.

В заключение, транскриптомният анализ на двата сорта пипер, инфектирани с PSTVd, показва диференциално експресирани гени в гостоприемника, които колективно детерминират включването на сортово-специфичен отговор спрямо патогена. Наблюдаваният сортово-специфичен отговор най-вероятно се дължи на различия в контрола на генната експресия, свързан с ограничаване на системно разпространение на вириода. Получените резултати допринасят за по-доброто разбиране на молекулярните механизми, контролиращи взаимодействията между

вириона и неговия гостоприемник и могат да бъдат приложени в разработването на стратегии за контрол на PSTVd инфекцията сред икономически важни селскостопански култури.

ИЗВОДИ

На базата на проведените изследвания в настоящата дисертация могат да се направят следните изводи:

1. Проведените биотестове с PSTVd KF440-2 върху ДШ и КК, показаха развитие на PSTVd-специфичен фенотип на етап 43 ден след инокулация, като наблюдаваната симптоматика е по-ясно изразена в ДШ в сравнение с КК.
2. Намерено е по-високо ниво на акумулация на PSTVd (+) РНК в ДШ, което би могло да обясни по-силно изразената PSTVd симптоматика в този сорт.
3. Разпределение на PSTVd специфични РНК в анализирани библиотеки на ДШ и КК показва, два пъти повече прочити с дължина 21нд в ДШИ в сравнение с ККИ.
4. Посредством новогенерационното секвениране на малки РНК бяха идентифицирани 14 диференциално експресирани миРНК в КК и съответно 32 в ДШ, в отговор на PSTVd инфекция.
5. Експресионният анализ посредством RT-qPCR на подбрани ДЕ миРНК, общи за двата сорта, с противоположен експресионен профил, предполага сортово-специфичен отговор към PSTVd инфекция.
6. Новогенерационно секвениране на иРНК в анализирани библиотеки пипер показва три пъти повече специфични ДЕГ в ДШ в сравнение с КК.
7. От припокриващите се ДЕГ, 224 проявяват противоположни профили на експресия в двата сорта и се предполага, че колективно детерминират включването на сортово-специфичен отговор спрямо PSTVd.
8. Идентифицирани са 23 транскрипционни фактора сред припокриващите се ДЕГ. Дванадесет от припокриващите се ДЕ гена за ТФ, показват противоположни експресионни профили в двата сорта пипер.
9. Генно-онтологичният анализ на припокриващите се ДЕГ представя включването на гените в: 14 ГО категории биологични процеси, основен от които е фотосинтеза; 8 ГО категории- молекулни функции, най-изобилната от които е хлорофил-свързваща активност и 20 ГО категории- клетъчни и, сред които преобладаващ са пластидите.
10. Генно-онтологичният анализ на специфичните ДЕГ в двата сорта, показва, че гените с понижена експресия принадлежат към ГО категориите БП - фотосинтеза и отговор към стимули, а гените с повишена експресия в отговор на PSTVd инфекцията в ДШ са обособени в ГО категорията БП - защитен отговор, докато тези с увеличена експресия в КК са включени в ГО категорията БП-оксидоредуктазни процеси и отговор към стимули.

НАУЧНИ И НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

- За пръв път са изследвани молекулните взаимодействия между PSTVd и два сорта български пипер чрез широко-машабни експресионни анализи на малки РНК и иРНК.
- За първи път са идентифицирани диференциално експресирани миРНК и диференциално експресирани белтък-кодиращи гени в сортовете пипер КК и ДШ, които колективно детерминират включването на сортово-специфичен отговор спрямо PSTVd.
- Описаните молекулни взаимодействия между PSTVd и пипер предполагат участието им в модулиране на виroidното разпространение, репликация, и развитие на виroid-специфична симптоматика, с което могат да допринесат в развитието на стратегиите за подобряването на контрола на PSTVd инфекцията сред селскостопански култури.
- Резултатите от проведеното широкомащабното секвениране на иРНК, получени от инфектирани и контролни растения пипер са анотирани в биобаза данни NCBI с номер за достъп: PRJNA762255 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA762255>
- Резултатите от широкомащабното секвениране на малки РНК по настоящата дисертация са анотирани в био база данни NCBI SRA: <https://dataview.ncbi.nlm.nih.gov/object/PRJNA631129?reviewer=10686rrde7fsor65p7j623vadd>

ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Hadjieva N., Apostolova E., Baev V., Yahubyan G., Gozmanova M. Transcriptome Analysis Reveals Dynamic Cultivar-dependent Patterns of Gene Expression in Potato Spindle Tuber Viroid-infected Pepper, *Plants, MDPI, Special Issue "High-Throughput Sequencing Applied to Plant Virus and Viroid Detection"* *Plants* 2021, 10, 2687. <https://doi.org/10.3390/plants10122687> . Q1, IF (2021) 3.935
2. Apostolova E., N Hadjieva, D. Ivanova, G. Yahubyan, V. Baev, M. Gozmanova. MicroRNA expression dynamics reshape the cultivar-specific response of pepper (*Capsicum annuum* L.) to potato spindle tuber viroid (PSTVd) infection, *Scientia Horticulturae*, Volume 278, 2021, 109845, ISSN 0304-4238, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109845>. Q1, IF (2021) 3.463
3. Apostolova E., Hadjieva N., Ivanova D., Tomlekova N., Yahubyan G., Baev V., Gozmanova M. Characterization of small rnas in the pstvd-induced response of two bulgarian pepper cultivars, *Научни трудове на Съюза на учените в България – Пловдив. Серия В. Техника и технологии. Том XVIII, ISSN 1311 -9419 (Print); ISSN 2534-9384 (Online), 2020. Scientific Works of the Union of Scientists in Bulgaria - Plovdiv. Series C. Technics and Technologies. Vol. XVIII, ISSN 1311 -9419 (Print); ISSN 2534-9384 (Online), 2020.* <https://usb-plovdiv.org/scientific-works/>

ЛИТЕРАТУРА Пълен списък с цитираните литературни източници може да бъде намерен в дисертационния труд.