



Universitatea Babeș-Bolyai

Facultatea de Biologie și Geologie

Școala doctorală „*Biologie integrativă*”

Analiza complexă a caracterelor de rezistență și a compoziției genomice la hibridii somatici dintre *Solanum tuberosum* și *Solanum chacoense*, cu sau fără deficiență în sistemul reparator ADN

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător de doctorat

Prof. Dr. Rákosy-Tican Elena

Doctorand

Imola Erdelyi-Molnár

Cluj Napoca

2017

Cuprins

I. INTRODUCERE	3
I.1. Hibridi somatici între <i>Solanum chacoense</i> și cartoful cultivat	4
II. OBIECTIVELE TEZEI.....	6
III. DETERMINAREA CONSTITUȚIEI GENETICE A HIBRIZILOR SOMATICI UTILIZÂND METODE CLASICE ȘI MODERNE DE CITOGENETICĂ	7
IV. IDENTIFICAREA HIBRIZILOR SOMATICI CARE CONȚIN GENELE CE CODIFICĂ LEPTINELE UTILIZÂND MARKERI MOLECULARI.....	9
IV.1. Analizele RAPD	10
IV.2. Designul markerului SCAR.....	12
V. ANALIZELE BIOCHIMICE ALE HIBRIZILOR SOMATICI DE SOLANUM ȘI A DESCENDENȚILOR BACK-CROSS	13
V.1. Determinarea glicoalcaloizilor steroizi prin metoda HPLC	13
V.2. Determinarea conținutului chimic total cu metoda FTIR	14
VI. REZISTENȚA ȘI RĂSPUNSUL DE APĂRARE AL HIBRIZILOR SOMATICI ȘI A DESCENDENȚILOR RETROÎNCRUCIȘAȚI FAȚĂ DE GÂNDACUL DE COLORADO	15
VI.1. Gândacul de Colorado	15
VI.2. Răspunsul de apărare al plantelor la atacul erbivorelor.....	18
VII. EFECTELE STRESULUI HIDRIC ASUPRA HIBRIZILOR SOMATICI DE SOLANUM ȘI A DESCENDENȚILOR DE RETROÎNCRUCIȘARE	21
VII.1. Stres-selecția <i>in vitro</i> a plantelor tolerante la secetă	22
VII.2. Acumularea de biomasă verde în condiții de stres hidric	23
VIII. CONCLUZII GENERALE	26
IX. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	31
X. LISTA DE PUBLICAȚII.....	35

CUVINTE CHEIE: cartoful cultivat, deficiență MMR, gândacul de Colorado, GISH, glicoalcaloizi, hibrizi somatici, *Solanum chacoense*, stres hidric

I. INTRODUCERE

Cartoful (*Solanum tuberosum* L.) este considerat ca fiind una dintre plantele de cultură cele mai valoroase, în situația în care problemele nutriționale ale populației la nivel global sunt în creștere. În zilele noastre, cartoful este a patra cea mai importantă plantă de cultură din lume, ocupând primul loc în rândul materiilor prime alimentare non-cerealiere de bază cu o producție mondială totală mai mare de 360 de milioane de tone pe an (FAOSTAT 2014). România ocupă locul al șaselea între țările cultivatoare de cartof în Europa, având în 2014 o producție mai mare de 3.5 milioane de tone de cartof (FAOSTAT 2014). Cartoful este cultivat în peste 160 de țări, fiind cunoscute mai mult de 4000 de soiuri (Camire și colab. 2009).

Datorită procesului de domesticire a cartofului, efectuat în scopul creșterii producției și a calitatății tuberculilor, prin selecția de soiuri cu un nivel cât mai redus de metaboliți secundari în tuberculii (Hermanova și colab. 2007), baza genetică a cartofului s-a restrâns. Ca urmare a reducerii fondului genetic al cartofului, susceptibilitatea la factori abiotici (frig, îngheț și secetă), dar și la nenumărați factori biotici a crescut, ceea ce duce la scăderea randamentului producției (Hirsch și colab. 2013).

În prezent, peste 160 de boli și dăunători afectează producția culturii de cartof dintre care mai mult de 50 sunt de natură fungică, 10 sunt de natură bacteriană, 40 sunt provocate de virusuri, iar restul se datorează unor dăunători ai frunzelor sau tuberculilor.

Dezvoltarea rezistenței plantelor gazdă ar putea fi singura soluție pe termen lung pentru combaterea bolilor și dăunătorilor, dar este dificil de realizat, deoarece soiurile de cartof moderne posedă un fond genetic sărac în gene de rezistență, fapt ce nu permite alegerea soiurilor rezistente.

Cele mai multe dintre rudele sălbatice ale cartofului cultivat oferă o rezistență plantelor gazdă la diferite boli și dăunători. Aceste specii sălbatice reprezintă o sursă bogată și diversă de gene rezistente (Hawkes 1990), care ar putea fi utile pentru îmbunătățirea genofondului cartofului.

În ultimele decenii, cultivarea cartofului s-a bazat pe diversificarea fondului genetic al acestuia, prin încorporarea trăsăturilor dorite de la specii sălbatice de *Solanum* (Ross 1986).

Aceasta nouă resursă genetică s-a dovedit a fi utilă în ceea ce privește rezistența la boli și, toleranța la schimbările climatice. Un dezavantaj al procesului de reproducere clasică este faptul că necesită un interval mare de timp. Pentru a obține soiuri utilizabile sunt necesare mai multe cicluri de selecție, care pot dura minimum 10 ani. În numeroase cazuri au fost necesari mai mult de 30 de ani, pentru a obține un nou soi (Gebhardt 2013; Haverkort și colab. 2009).

Hibridarea somatică realizată prin electrofuziune de protoplaste este considerată o metodă alternativă mai rapidă pentru transferul genelor de rezistență de la speciile sălbatice de *Solanum* la cartoful cultivat (Thieme și colab. 2010). Mai mult, această metodă a făcut posibilă depășirea moștenirii exclusiv materne a citoplasmei, facilitând combinarea plastidelor și mitocondriilor de la ambii părinți (Birky 1995). Ca rezultat al hibridării interspecifice, hibridii somatici obținuți pot conține trăsăturile dorite de la speciile sălbatice, dar, de asemenea, ar putea să apară unele proprietăți nedorite, cum ar fi o concentrație ridicată de glicocalcoizi în tuberculi, scăderea calității tuberculilor sau a randamentului productiv. Prin urmare, în cazul hibridilor somatici produși în acest mod, este necesară o caracterizare profundă înainte ca aceștia să fie integrați în programele de ameliorare.

Solanum chacoense este un diploid ($2n=2x=24$), auto-incompatibil, producător de tuberculi aparținând genului *Solanum*. *S. chacoense* a atras atenția amelioratorilor de cartofi datorită rezistenței sale crescute la o gamă largă de agenți patogeni. *S. chacoense* este foarte rezistent la gândacul de Colorado (Colorado potato beetle, CPB) (Sinden și colab. 1986). Rezistența la insecte este atribuită glicocalcoizilor specifici: leptinele, care sunt formele acetilate ale α -solaninei și α -chaconinei. Leptinele sunt sintetizate doar în țesuturile aeriene ale plantelor, ceea ce constituie un avantaj pentru amelioratori, deoarece introgresia genelor pentru sinteza de leptine în cartoful cultivat ar trebui să confere rezistență împotriva mai multor boli, dar fără a crește nivelul de glicocalcoizi în tuberculi.

I.1. Hibridi somatici între *Solanum chacoense* și cartoful cultivat

Cu scopul de a introduce trăsături valoroase de la *S. chacoense*, Thieme și colab. (date nepublicate) și Rakosy și colab. (2004) au produs hibridi somatici și descendenți ai acestora prin încrucșarea cartofului cultivat, soiurile Delikat și Désirée, și *S. chacoense* cu sau fără deficiență a sistemului reparator al ADN-ului (Mismatch Repair - MMR). În ambele cazuri, hibridarea somatică a fost realizată folosind tehnica de electrofuziune a protoplastelor.

Pentru producerea de hibrizi somatici, Thieme și colab. (date nepublicate) au utilizat celule mezofiliene de *S. tuberosum* cv. Delikat și *S. chacoense* GLKS 30138 (S. chc. 138) din colecțiile de cartofi Gross Lüsewitz, IPK Genebank, Germania. Plantele descende BC₁ au fost obținute după retroîncrucișare sexuală a hibridului somatic (SH) 1552/1 cu *S. tuberosum*, soiul Sonate. Plantele BC₂ au fost obținute după retroîncrucișare sexuală BC₁ 1552/1/7 cu *S. tuberosum*, soiul Romanze.

Rakosy și colab. (2004; 2015), au utilizat ca părinți în hibridarea somatică, soiuri de Delikat și Désirée și una dintre accesiunile de *S. chacoense* (PI 458310) (S.chc HL) cu cea mai ridicată producție de leptine, de la NPGS Sturgeon Bay, Statele Unite ale Americii.

S. chacoense cu deficiență MMR a fost obținut prin transformarea genetică mediată de *Agrobacterium tumefaciens*. Pentru transformarea genetică au fost utilizate două tipuri de constructe. Constructul AS conține un fragment de 1 kb al ADNc *AtMSH2* cu orientare antisens. Constructul DN conține secvența de codificare *AtMSH2* cu o mutație punctiformă ce duce la conversia unui codon de glicină, puternic conservat, din poziția 697, într-un codon de acid aspartic (Ispas 2004).

Liniile transgenice AS și DN au fost testate atât fenotipic cât și prin RT-PCR pentru a demonstra prezența genei țintă. În procesul de electrofuziune a protoplastelor pentru a produce hibrizi somatici cu deficiență MMR au fost utilizate o linie de plante transgenice pentru AS și două pentru DN și *S. tuberosum* cv. Delikat (Dk) și Désirée (De). Natura hibridă a plantelor regenerate a fost validată folosind markeri moleculari SSR și RAPD (date nepublicate). Utilizând aceste linii parentale au fost obținuți hibridii somatici cu deficiență MMR. Aceștia constituie un sistem experimental foarte bun pentru studiere rolului sistemului MMR în repararea ADN-ului în timpul recombinării homeoloage. Deficiența MMR crează posibilitatea creșterii introgresiilor și a transferului de material genetic de la *S. chacoense* în germoplasma cartofului cultivat.

II. OBIECTIVELE TEZEI

Genotipurile de cartof obținute prin tehnica hibridării somatice, trebuie să fie caracterizate în scopul de a selecta hibridii somatici care să posede caractere de rezistență, având totodată și proprietățile valoroase ale cartofului cultivat, dar care să nu dețină trăsături nedorite. Ulterior, genotipurile selectate pot fi introduse în programele de ameliorare.

Principalul obiectiv al acestei teze de doctorat a fost acela de a caracteriza hibridii somatici de cartof rezultați prin electrofuziunea între specia sălbatică *S. chacoense* și cartoful cultivat (Rakosy-Tican și colab. 2004; 2015). Această caracterizare a fost necesară pentru a stabili compoziția genetică a hibridilor somatici, dar și pentru a selecta genotipurile de cartof producătoare de leptine care sunt rezistente față de gândacul de Colorado și tolerante la secetă.

Obiectivele specifice ale tezei au fost după cum urmează:

- Investigarea stabilității genetice a hibridilor somatici de tip sălbatic și cu deficiență MMR și a descendenților lor rezultați din retroîncrucișare
- Evaluarea preciziei metodei de citometrie în flux în determinarea nivelului de ploidie
- Determinarea genotipurilor de *Solanum* producătoare de leptine cu ajutorul markerilor RAPD descriși de Bouarte-Medina și colab. (2002) și Ronning și colab. (1999)
- Dezvoltarea markerilor SCAR în determinarea hibridilor somatici care sunt producători eficienți de leptine
- Diferențierea genotipurilor de *Solanum* producătoare de leptine folosind diferite analize biochimice
- Investigarea corelației dintre compoziția chimică și capacitatea de rezistență a genotipurilor de *Solanum* la gândacul de Colorado
- Determinarea genotipurilor rezistente la gândacul de Colorado prin evaluarea atât a proprietăților antibiotice cât și antixenotice ale hibridilor și derivaților acestora
- Identificarea speciilor reactive de oxigen și rolul antocianilor în răspunsul de apărare al plantelor de *Solanum* după rănirea prin lezarea mecanică
- Determinarea genotipurilor de *Solanum* rezistente la secetă folosind metode de stres-selecție *in vitro* și *ex vitro*
- Investigarea efectelor secetei asupra capacității de dezvoltare a plantelor de *Solanum*, a randamentului tuberculilor și a performanței fotosintezei prin procedeele de fenotipare

III. DETERMINAREA CONSTITUȚIEI GENETICE A HIBRIZILOR SOMATICI UTILIZÂND METODE CLASICE ȘI MODERNE DE CITOGENETICĂ

Principalul dezavantaj al hibridării somatice este instabilitatea citogenetică a hibrizilor somatici (Wolters și colab. 1994). Ca urmare a fuziunii protoplastelor, pe lângă hibrizii simetrici cu seturile întregi de cromozomi de la ambele specii de părinți, pot fi observați și hibrizi somatici asimetrici, care au pierdut o parte din materialul genetic al unuia dintre părinți. Pierderile cromozomilor pot fi atribuite diferențelor în gradul de ploidie al nucleelor parentale combinate, sau hibrizii asimetrici ar putea fi chiar rezultatul diferențelor în ciclul celular din țesuturile parentale. În afară de procesele de fuziune a protoplastelor, cultura *in vitro* utilizată pentru regenerare ar putea provoca, de asemenea, eliminarea cromozomilor în plantele hibride (Glimelius și colab. 1991). Din cauza modificărilor excesive în celulele fuzionate, toate plantele regenerare trebuie considerate organisme unice din punct de vedere genetic, de aceea ele trebuie să fie caracterizate separat.

Primul pas important în caracterizarea acestora este determinarea nivelului de ploidie. Citometria în flux s-a dovedit a fi o metodă indirectă eficientă pentru a determina cu reproductibilitate ridicată conținutul de ADN și nivelul de ploidie nuclear relativ al diferitelor specii (Ochatt 2006). Numerele reale cromozomiale au fost puternic corelate cu rezultatele obținute în urma analizei citometriei în flux (coeficient de corelație Pearson R^2 : 0.935, $p < 0.05$). Pe baza rezultatelor analizei de regresie liniară, numărul de cromozomi poate fi determinat cu o precizie de ± 4 la măsurătorile citometriei în flux. Majoritatea hibrizilor somatici au fost tetraploizi, stare de ploidie explicată prin faptul că hibrizii au eliminat cromozomi după procesul de fuziune. Prin analiza grupată a hibrizilor somatici, cum ar fi de tip sălbatic și hibrizi cu deficiență MMR, a fost observat faptul că, în cazul hibrizilor fără deficiență MMR, cei mai mulți dintre aceștia aveau genotip pentaploid, în timp ce hibrizii cu deficiență MMR care conțineau gena dominant negativă *AtMSH2* (SH-DN) au fost în mare parte hexaploizi, dar numeroase plante tetraploide au fost de asemenea observate. Hibrizii cu gena *AtMSH2* în orientare antisens (SH-AS) au fost predominant tetraploizi. Această observație sugerează că hibrizii somatici cu gena dominant negativă *AtMSH2* au fost produșii de fuziune cei mai stabili, au eliminat cei mai puțini cromozomi, în timp ce genotipurile SH-AS au fost mai instabili genetic (**Fig. 1**).

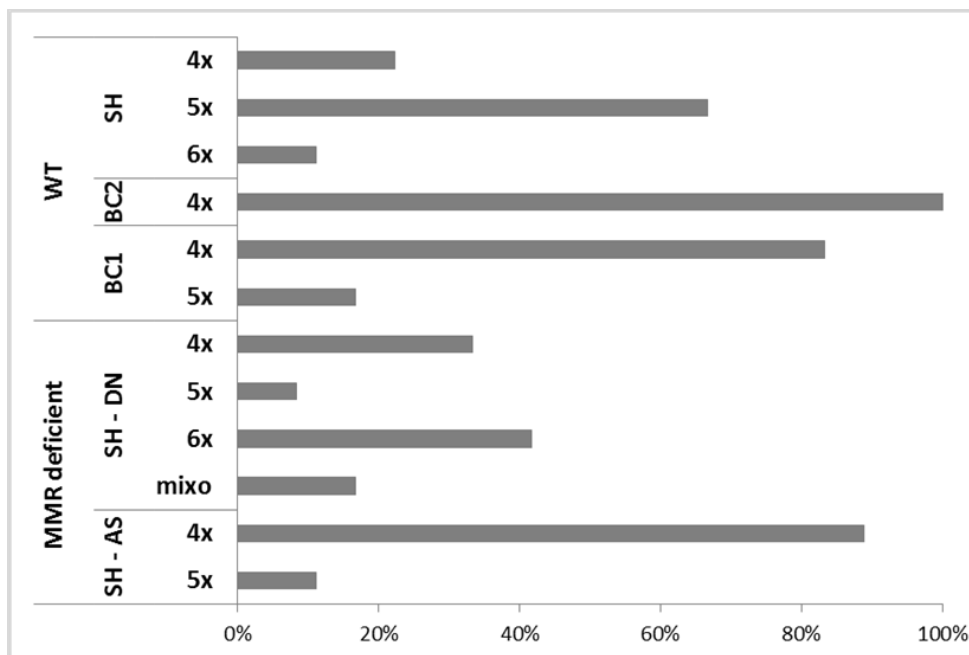


Fig. 1 Procentul de distribuție a nivelului de ploidie la diferite grupe de hibridi somatici (WT- hibridi somatici între *S. tuberosum* și *S. chacoense*, descendenți BC₁- reîncrucișare între hibridi somatici WT + *S. tuberosum*, BC₂ - retroîncrucișare între plante BC₁ și cartoful cultivat; hibridi somatici cu deficiență MMR între *S. tuberosum* și forma transgenică *S. chacoense*: SH-DN - hibridi somatici care conțin gena dominant negativă *AtMSH2*, SH-AS - hibridi somatici cu orientare antisens a genei *AtMSH2*)

Valoarea hibridilor somatici nu a fost diminuată de pierderea cromozomilor, deoarece scopul producției hibridilor a fost de a introduce gene rezistente de la specii sălbatice în fondul genetic al cartofului cultivat. Pentru aceasta, este suficientă integrarea secvenței de ADN țintă prin procese de inserare sau translocare în materialul genetic al speciei *S. tuberosum*, în timp ce, ceilalți cromozomi din specia sălbatică pot fi eliminați fără ca acesta să fie considerat un dezavantaj nici pentru dezvoltarea plantei și nici din punctul de vedere al ameliorării genetice dorite. Eliminarea spontană a cromozomilor poate fi considerată un avantaj din perspectiva agronomilor, deoarece trăsăturile nedorite pot fi ușor și rapid eliminate, fără a necesita retroîncrucișare succesivă a hibridilor obținuți cu plante cultivate, activitate consumatoare de energie și timp.

În cazul hibridilor somatici între *S. tuberosum* și *S. chacoense*, diferențierea genomului parental este foarte dificilă, din cauza relației filogenetice foarte apropiate a speciilor parentale. Aceste specii fac parte din aceeași secțiune *Solanum* (Petota) și de asemenea, din aceeași clasă Clasa 4, care a fost determinată prin analiza secvenței unei singure copii nucleare care leagă gena

ce codifică amidon sintetază I (Spooner și colab. 2008) de cea pentru nitrat reductază (Rodriguez și Spooner 2009).

Compoziția genomică a hibridilor somatici a fost determinată utilizând o procedură de hibridizare genomică *in situ* multicoloră (mcGISH) modificată, descrisă de Jang și Weiss-Schneeweiss (2015), cu etape de spălare puternică post-hibridizare. Condițiile stricte de spălare au contribuit la reducerea fenomenului de co-hibridare, deoarece surplusul de ADN hibridizat a fost spălat. Etapele stricte de spălare, de asemenea, au contribuit la reducerea semnalelor de fond din preparatele cromozomiale, oferind o mai bună vizualizare a semnalelor de intensitate redusă ale cromozomilor. Pentru a verifica eficacitatea tehnicii GISH aplicate, s-au folosit hibridi somatici cu seturi complete de cromozomi parentali (72 cromozomi). Folosind protocolul Jang și Weiss-Schneeweiss (2015) modificat, putem confirma că această tehnică mcGISH a funcționat bine și, prin urmare, s-a reușit determinarea compoziția genomice a hibridilor.

Pe baza rezultatelor noastre, putem concluziona că metoda optimizată aplicată a fost eficientă atât în determinarea cu mare precizie a compoziției genomice a hibridilor somatici, dar din păcate, a fost observat în unele cazuri și fenomenul de co-hibridare. Optimizarea metodei utilizate este necesară pentru a elimina complet fenomenul de co-hibridare. Din păcate, este aproape imposibil de diferențiat cu claritate genomul celor doi părinți din cauza gradului ridicat de similitudine genomică a liniilor parentale și a dimensiunilor mici ale cromozomilor.

IV. IDENTIFICAREA HIBRIZILOR SOMATICI CARE CONȚIN GENELE CE CODIFICĂ LEPTINELE UTILIZÂND MARKERI MOLECULARI

Procedura RAPD este mai simplă și mai rapidă decât alte analize pe bază de marcarea (RFLP), mai mulți loci polimorfici putând fi identificați într-o singură amplificare PCR. Principalul dezavantaj al markerilor RAPD este că ei funcționează ca alele dominante, deci separarea locilor heterozigoți (1 copie) nu este posibilă. Tehnica RAPD este sensibilă la calitatea și concentrația ADN-ului genomic utilizat, la modificările concentrației componentelor PCR sau de variații ale parametrilor PCR. Orice schimbare influențează extrem de mult repetabilitatea rezultatelor obținute.

Pentru a îmbunătăți reproductibilitatea primerilor RAPD, Paran și Michelmore (1993) au dezvoltat un nou marker molecular (SCAR) bazat pe produșii RAPD polimorfi.

IV.1. Analizele RAPD

Markeri RAPD utilizați în acest studiu au fost selectați în scopul de a distinge hibridii somatici producători de leptine, pe baza studiilor realizate de Bouarte-Medina și colab. (2002) și Ronning și colab. (1999). Primerii selectați de Bouarte-Medina și colab. (2002) au recunoscut secvențe de ADN specifice, care au fost legate de sinteza leptinelor, în timp ce, utilizând primerul UBC-370, furnizat de Ronning și colab. (1999), a fost amplificată o secvență de ADN specifică dar care nu a fost linkată cu biosinteza leptinelor.

Din păcate, markerul UBC-370 nu a fost eficace în cazul nostru, deoarece acest marker a amplificat o secvență de ADN cu o lungime de 1500 pb pentru ambele linii parentale (*S. chacoense*, *S. tuberosum*), care ar putea doar să fie utilizat pentru identificarea plantelor non-producătoare de leptine, cum ar fi cartoful cultivat.

Dintre markerii specifici produși de Bouarte-Medina și colab. (2002), doar OPT-20 a prezentat diferențe între liniile parentale. Prin utilizarea markerului RAPD OPT-20, o anumită secvență de ADN cu 250 pb lungime a fost amplificată în cazul *S. chacoense* HL și *S. chacoense* 138, care sunt cunoscute pentru producția leptinelor. Spre deosebire de situația observată în cazul speciei sălbatice, în cazul *S. tuberosum* această bandă specifică nu a fost prezentă pe gelul de agaroză. Bouarte-Medina și colab. (2002) au constatat același produs polimorf după analiza segregării în grup (bulk segregant analysis).

Printre hibridii somatici fără deficiență MMR, markerul OPT-20 a amplificat secvența specifică de lungime de 250 pb numai în cazul SH 1552/1. Acest hibrid a fost retroîncrucișat cu cartoful cultivat iar pe baza analizei RAPD-PCR (**Fig. 2**) a fost evidențiată o segregare de 1:3 a capacității de sinteză a leptinelor, în descendenți.

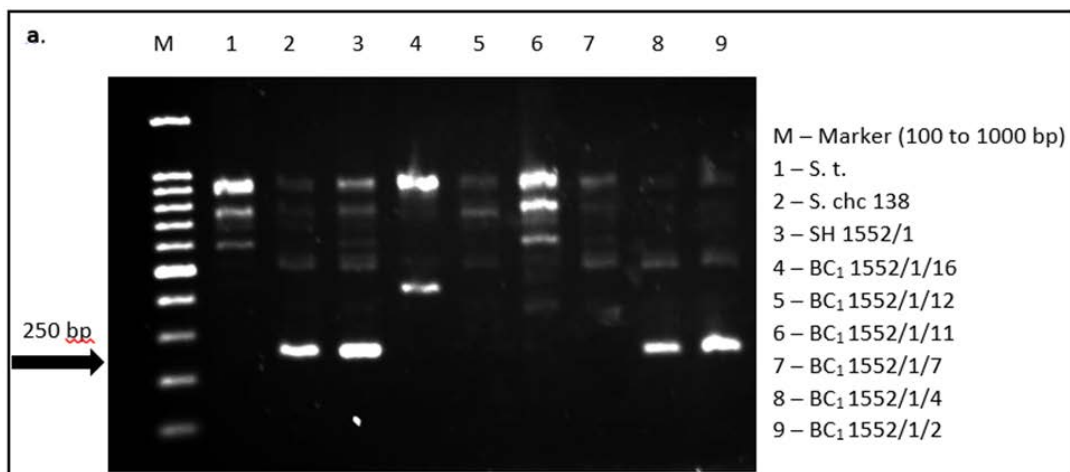


Fig. 2 Selectarea genotipurilor de *Solanum*, hibridi somatici și descendenți (BC₁), producătoare de leptine folosind markerul RAPD OPT-20, ampliconul specific de 250 pb este indicat prin săgeată

BC₁ 1552/1/7 a fost retroîncrucișat cu cartoful cultivat, ceea ce a dus la obținerea a doi descendenți BC₂. Acest BC₁ nu conține secvența de ADN specifică, și, conform așteptărilor, în cazul plantelor BC₂, markerul OPT-20 nu a amplificat secvența de 250 pb. Hibridii somatici cu deficiență MMR s-au comportat mai bine în acest experiment. Treisprezece hibridi somatici cu deficiență MMR conțin secvența de ADN specifică amplificată de markerul RAPD OPT-20 (**Fig. 3**).

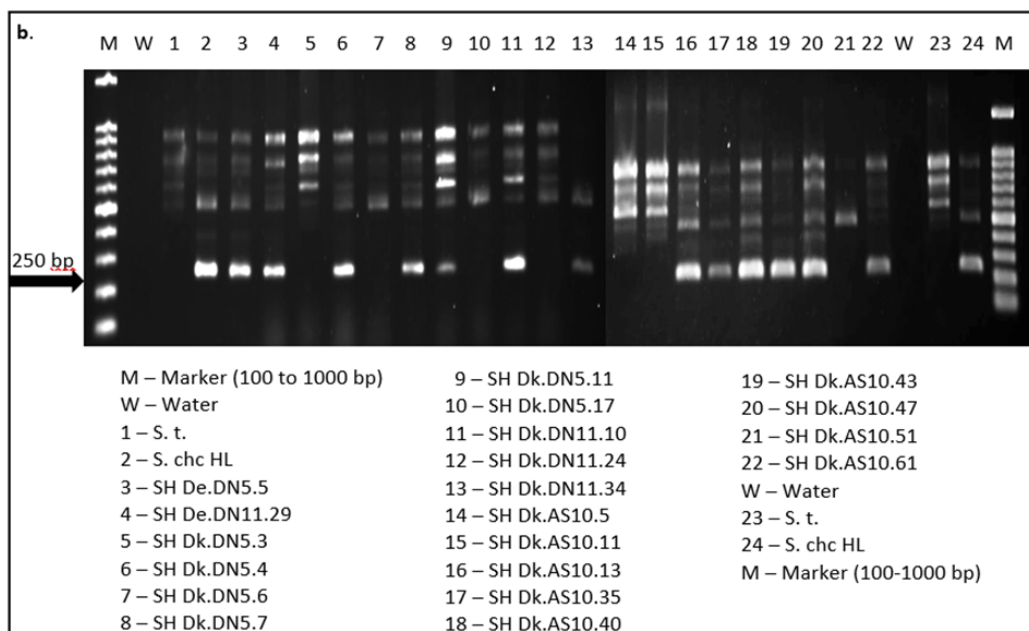


Fig. 3 Selecția hibridilor somatici cu deficiență MMR producătoare de leptine utilizând markerul RAPD OPT-20, ampliconul specific de 250 pb este indicat prin săgeată.

Pe baza rezultatelor obținute, putem concluziona că deficiența în sistemul MMR crește posibilitatea de recombinare homeoloagă în timpul hibridării somatice a speciilor strâns înrudite, ceea ce duce la creșterea transferului de gene de la linia parentală sălbatică. Hibrizii somatici cu gena *AtMSH2* în orientare antisens (AS) posedă secvența de ADN asociată cu sinteza leptinei în proporție mai mare (54.54%) decât hibrizii cu gena mutantă *AtMSH2* dominant negativă (40%).

IV.2. Designul markerului SCAR

Principalul dezavantaj al tehnicii RAPD este reproductibilitatea scăzută, mai ales între diferite laboratoare (Penner și colab. 1993). Avantajul principal al markerilor SCAR se bazează pe stabilitatea lor, au rată ridicată de reproductibilitate și nu în ultimul rând sunt locusuri specifice. Acești markeri sunt adesea folosiți în cartografierea genelor și în selecția asistată de markeri. În scopul de a perfecționa metoda de identificare moleculară a genotipurilor de *Solanum* producătoare de leptine, a fost necesară conversia efectivă de primeri RAPD în marker SCAR.

Secvența ADN cu lungimea de 250 pb specific amplificată de markerul OPT-20 în *S. chacoense* a fost purificată și secvențată, apoi a fost analizată în continuare cu Blast pentru a identifica omologia cu alte secvențe. Numai una dintre secvențele extrase a arătat 88% similaritate cu o secvență de *Solanum pennelli* situată pe cromozomul al 9-lea. Secvențele obținute au fost utilizate în proiectarea și sintetizarea primerilor specifici pentru leptine (191I1, 220I3, 242I4). Din păcate, nici unul dintre markerii SCAR proiectați nu au fost eficienți în identificarea genotipurilor producătoare de leptine. Nici unul dintre primeri nu a recunoscut de secvențele ADN specifice cu excepția cazului în care s-a utilizat ADN de la *S. chacoense*. În cazul 191I1, 220I3 și 242I4 s-au observat anumiți produși de amplificare, în timp ce în cazul 242I2, o secvență de ADN cu lungime de 250 pb a fost recunoscută doar în cartoful cultivat.

Pe viitor, sunt necesare experimente suplimentare pentru a dezvolta un marker specific care să poată recunoaște secvența codificatoare pentru leptine. Scurtarea lungimii primerilor SCAR ar putea crește rata de succes în caz contrar fiind necesară proiectarea de noi markeri.

V. ANALIZELE BIOCHIMICE ALE HIBRIZILOR SOMATICI DE *SOLANUM* ȘI A DESCENDENȚILOR BACK-CROSS

Glicoalcaloizii de cartof sunt considerați a avea un rol indispensabil în sistemul de apărare chimică a plantelor împotriva erbivorelor, dăunătorilor și a agenților patogeni (Bennett și Wallsgrove 1994; Friedman și McDonald 1997). Glicoalcaloizii au un efect antibiotic (Gubarev și colab. 1998), inhibă germinarea sporilor și creșterea fungilor (Fewell și Roddick 1993). Ei au, de asemenea, un efect inhibitor asupra dezvoltării insectelor și totodată un efect repelent împotriva insectelor erbivore (efect antihărănire, antifeedant) (Sanford și colab. 1997; Yencho și colab. 2000). Principalii glicoalcaloizi descriși la cartof, care reprezintă 95% din conținutul total al glicoalcaloizilor, sunt α -solanina și α -chaconina (Friedman 2006; Fewell și Roddick 1997).

Leptinele sunt glicoalcaloizi rari și au putut fi găsiți doar în câteva accesii de *S. chacoense* Bitter (Sinden și colab. 1986; Ronning și colab. 1999). Sunt cunoscute patru tipuri de leptine rezultate prin combinarea a doi agliconi, leptinidină și acetilleptinidină și a două grupe de carbohidrați, chacotrioză și solatrioză. Conținutul mare de leptine reduce capacitatea de hrănire a gândacului de Colorado (Coombs și colab. 2002; Sinden și colab. 1984), având totodată și un efect toxic asupra dezvoltării larvare. Datorită faptului că acești glicoalcaloizi sunt sintetizați numai în țesuturile aeriene ale plantelor, *S. chacoense* este considerată a fi o specie valoroasă, ca sursă de gene rezistență la gândacul de Colorado. Introgresia genelor codificatoare de leptine în germoplasma cartofului cultivat ar putea să înlocuiască tratarea chimică a insectelor, fiind o strategie de apărare naturală și sustenabilă.

În experimentele noastre au fost analizați, utilizând metoda HPLC, glicoalcaloizii steroidici din compoziția plantelor rezultate din hibridarea somatică între cartoful cultivat și *S. chacoense* 138 și descendenții BC₁. În plus, a fost utilizată spectroscopia FTIR pentru a determina diferențele chimice dintre plantele rezistente la gândacul de Colorado și plantele sensibile.

V.1. Determinarea glicoalcaloizilor steroidici prin metoda HPLC

HPLC a devenit, în ultimul timp, principalul instrument de separare analitică a glicoalcaloizilor steroidici. Motivele pentru utilizarea pe scară largă a acestei metode sunt

sensibilitatea ridicată și adaptabilitatea sa la determinări cantitative punctuale ale glicoalcaloizilor.

Separarea glicoalcaloizilor este dificilă din cauza similarității lor structurale și a lipsei de cromofori. În cazul speciei *S. chacoense* a fost detectat un vârf specific la 11.53 minute, pe care l-am considerat ca fiind un glicoalcaloid de tipul leptinei. În plus, nu a fost observat la cromatograf alt vârf specific pentru *S. chacoense* ceea ce probabil se datorează fie concentrației mai mici a celorlalte leptine fie metoda HPLC utilizată nu a fost suficient de sensibilă pentru a le detecta.

Pe baza rezultatelor noastre, putem concluziona că lipsa standardelor pentru leptine și metoda HPLC utilizată nu au fost adecvate pentru a determina prezența acestora în genotipurile de *Solanum* analizate. Un singur glicoalcaloid a fost determinat în extracte care ar putea fi reprezentat de o leptină. S-a putut constata cu siguranță doar faptul că acele genotipuri care au prezentat acest glicoalcaloid specific, la timpul de retenție în jurul valorii de 11.5 minute, au fost rezistente la gândacul de Colorado.

Pe viitor, ne-am dori să analizăm conținutul în glicoalcaloizi al genotipurilor de *Solanum* prin spectroscopie LC-MS, care permite determinarea cu precizie ridicată a compoziției leptinelor din extracte, fără a necesita standarde și permițând analiza cantitativă a acestora.

V.2. Determinarea conținutului chimic total cu metoda FTIR

Spectrometria în infraroșu cu transformare Fourier este o tehnică simplă și rapidă, bazată pe măsurarea unei molecule excitate de radiațiile infraroșii, IR, într-un anumit interval de lungime de undă. Pentru a compara spectrele și pentru a vizualiza gruparea genotipurilor, a fost utilizată metoda analizei componentelor principale (PCA).

În urma analizei PCA, am observat că primii doi factori principali creați (PC) au conservat 89.91% informație din datele originale. Acești doi factori (PC1 și PC2) au fost folosiți pentru a vizualiza modul de grupare (cluster) a genotipurilor analizate pe baza pe compoziției chimice a acestora. În urma analizei PCA am observat că hibrizii somatici, clonele BC și liniile parentale au format clustere bine separate în funcție de capacitatea lor de rezistență la gândacul de Colorado. Astfel, putem concluziona că cele două grupuri au o compoziție chimică diferită și diferența dintre plante afectează capacitatea lor de rezistență față de gândacul de Colorado.

Din datele obținute se poate concluziona că FTIR este o metodă eficientă în determinarea factorilor biochimici care au un mare impact asupra capacității de rezistență a plantelor la gândacul de Colorado. Analiza PCA a demonstrat că hibridii somatici și clonele BC rezistente au compoziție chimică similară cu *S. chacoense*, în timp ce compoziția chimică totală a plantelor sensibile a fost mai asemănătoare cu cea a cartofului cultivat. Pe baza rezultatelor prezentate s-a ajuns la concluzia că benzile specifice identificate sunt probabil legate de conținutul în leptine din plantele analizate, deoarece valorile crescute ale absorbției la anumite lungimi de undă au fost observate numai în cazul plantelor rezistente.

VI. REZISTENȚA ȘI RĂSPUNSUL DE APĂRARE AL HIBRIZILOR SOMATICI ȘI A DESCENDENȚILOR RETROÎNCRUCIȘAȚI FAȚĂ DE GÂNDACUL DE COLORADO

(Molnár *et al.* 2016 ^{a,b})

VI.1. Gândacul de Colorado

Gândacul de Colorado (CPB) este cel mai mare dușman al cartofului cultivat în întreaga lume. Din cauza obiceiurilor distructive de hrănire, CPB poate reduce randamentul producției de cartofi și poate provoca chiar pierderea totală a recoltei (Hare 1990). În ciuda vârstei evolutive relativ tinere a gândacului, el posedă un polimorfism intraspecific ridicat, ceea ce îi conferă o mare plasticitate ecologică și adaptabilitate la diferite schimbări ale factorilor biotici și abiotici (Udalov și Benkovskaya 2011; Hare 1990). Înalta capacitate a gândacului de Colorado de a se adapta rapid la diferite insecticide a încurajat agronomii să caute un alt tip de control. Singura soluție pe termen lung pentru gestionarea CPB ar fi dezvoltarea rezistenței plantelor gazdă. *S. chacoense* a atras atenția agronomilor deoarece posedă o capacitate crescută de rezistență la CPB (Sinden și colab. 1986). Larvele hrănite cu frunze de *S. chacoense* HL, cunoscut pentru sinteza cea mai ridicată de leptine, s-au dezvoltat mai lent, nici unul dintre ele neajungând la stadiul de adult. Frunzele de *S. chacoense* HL s-au dovedit a fi toxice pentru larve. SH 1552/1 utilizat ca părinte de sex feminin, în etapa de retroîncrucișare cu *S. tuberosum* cv. *Sonata* (♂) prezintă o rezistență ridicată la CPB. O singură larvă a supraviețuit 23 de zile, dar nu a ajuns la stadiul de adult. Retroîncrucișarea cartofului cultivat cu SH 1552/1 foarte rezistent a condus la o segregare de 1:3 a capacității de rezistență a descendenților.

Hibridii somatici cu deficiență MMR s-au comportat mai bine în analiza rezistenței (Fig. 4). Din douăzeci de genotipuri analizate doar șapte hibridi s-au comportat în mod similar cu cartoful. Mortalitatea larvelor cauzată de grupul hibridilor rezistenți a fost semnificativ mai mare decât la hrănirea cu plante sensibile. Larvele hrănite cu frunze de la plante rezistente s-au dezvoltat mai lent. Larvele hrănite cu frunze de *S. tuberosum* au ajuns la 9 zile de la eclozare în etapa a patra larvară (L4), în timp ce majoritatea larvelor de pe plantele rezistente s-au dezvoltat doar până la L3 sau L2 (De.DN11.29, Dk .DN5.11, Dk.AS10.40) sau au rămas în prima etapă larvară (Dk.DN5.4, Dk.DN5.7). Larvele hrănite cu plante rezistente au avut nevoie de 13-19 de zile de la eclozare pentru a ajunge la stadiul L4.

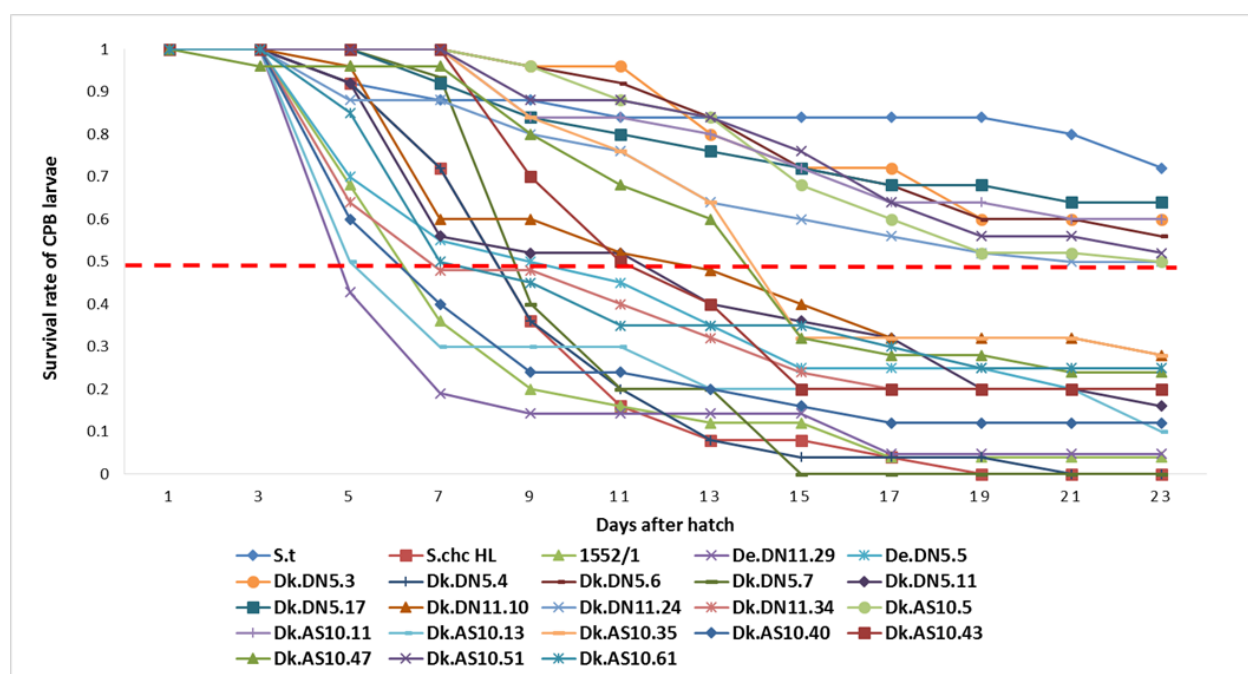


Fig. 4 Procentul de supraviețuire* a larvelor CPB (n=25) hrănite cu hibridi cu deficiență MMR și liniile parentale (*S. tuberosum* (S.t) și *S. chacoense* (S. chc HL)); * valoarea 1 înseamnă că toate larvele au supraviețuit (100%)

Din cauza viabilității scăzute, s-a redus semnificativ numărul de adulți dezvoltați din larve hrănite cu plante rezistente, în contrast cu hrănirea cu hibridii susceptibili. În ceea ce privește hibridii somatici cu deficiență MMR, Dk.DN5.4, Dk.DN5.7 și De.DN11.29, nici una dintre larve hrănite cu frunzele acestora nu a ajuns în stadiul de adult. În cazul hibridilor De.DN5.5 și Dk.AS10.47 adulții au avut fertilitate foarte scăzută, mai mulți gândaci au prezentat malformații vizibile și nu au fost capabili să se reproducă.

Între hibridii rezistenți au fost observate ambele tipuri de plante cu deficiență MMR: DN (7 genotipuri) și AS (6 genotipuri). Trei dintre ei (Dk.DN5.4, Dk.DN5.7 și De.DN11.29) au avut efecte toxice la fel de puternice asupra larvelor precum *S. chacoense* HL. Larvele hrănite cu hibridul De.DN11.29 au ajuns la etapa a doua de dezvoltare larvară, dar nici o larvă nu a atins stadiul trei larvar. Ultimele larve au murit la 29 de zile de la eclozare.

Dk.DN5.4 și Dk.DN5.7 s-au dovedit a fi cele mai rezistente genotipuri: larvele nu au supraviețuit până în ziua 23 în mod similar cu larvele hrănite cu frunze de *S. chacoense* HL. În ziua 13, când 100% din larvele hrănite cu frunze de *S. tuberosum* au ajuns la stadiul L4 cu un indice de dezvoltare larvară, LDI=84, larvele hrănite cu acești doi hibridi și *S. chacoense* HL au LDI=1, ceea ce indică o inhibare intensă a dezvoltării larvare. Aceste larve nu au ajuns la etapa a doua larvară. De asemenea, a fost observată o creștere a mortalității, doar două larve au rămas în viață, în cazul *S. chacoense* HL și Dk.DN5.4 și doar una a supraviețuit până în ziua 13 în cazul Dk.DN5.7.

În al doilea experiment gândacii au trebuit să aleagă între una din liniile parentale (cartof cultivat sau *S. chacoense*) și unul dintre hibridi cu sau fără deficiență MMR, respectiv clonele BC₁. Hibridii somatici și clonele BC₁ care s-au dovedit a fi rezistente în biotestele de laborator, având efecte toxice asupra dezvoltării larvelor CPB, au descurajat, de asemenea, hrănirea gândacilor adulți. În aceste cazuri, gândacii au preferat să consume frunzele de la cartoful cultivat în loc de hibridii somatici sau clone BC₁. S-au observat diferențe semnificative între biomasa consumată de la *S. tuberosum* și hibridii somatici sau clonele BC₁ marcate cu *b* pe **Fig. 5**. Acest lucru presupune o activitate de repelență foarte puternică (**Fig. 5**).

Genotipurile 1552/1, Dk.DN5.4, Dk.DN5.7, Dk.DN5.11 și Dk.AS10.43 au cel mai puternic efect repelent. Gândacii nici nu au gustat aceste genotipuri, date care susțin rezultatele obținute în biotestele de laborator, prezentate anterior.

Printre genotipurile cu efect repelent au putut fi observate ambele tipuri de hibridi somatici, cu sau fără deficiență MMR. Majoritatea hibridilor cu cea mai mare rezistență au deficiență MMR și conțin secvența dominant negativă a genei *AtMSH2*. Aceste rezultate sunt o confirmare a ipotezei că alela mutantă a genei *MSH2* poate concura în mod dominant cele patru alele normale de bază de la cartof, permițând transferul cu o probabilitate mai mare a genelor de rezistență în genofondul cartofului.

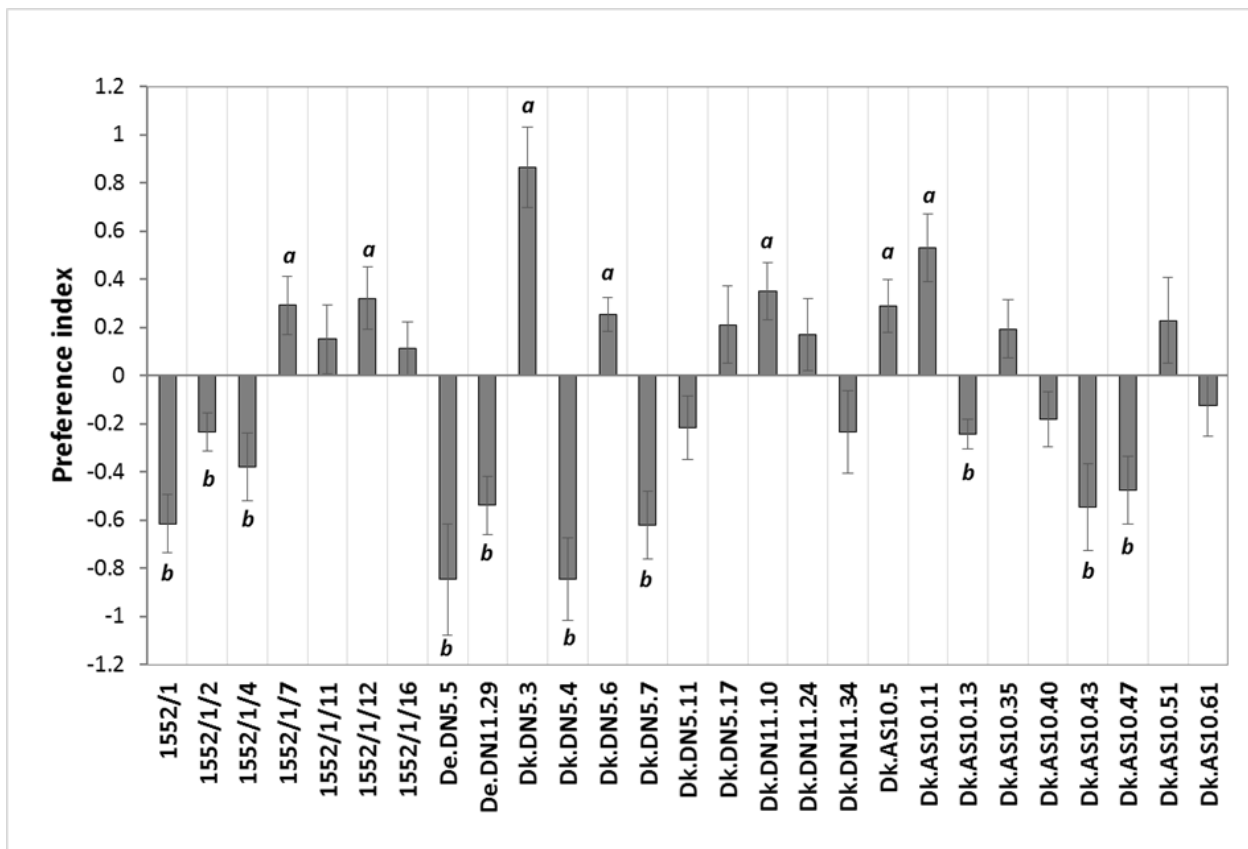


Fig. 5 Media indicilor de preferință (medie \pm SE, n=9) pentru adulții CPB hrăniți pe hibrizi somatici, cu sau fără deficiență MMR și unii descendenți BC₁, comparativ cu *S. tuberosum*. Litera *a* indica efectul fago-stimulent semnificativ mai mare la hibrizi și BC₁ decât *S. tuberosum*, în timp ce genotipurile marcate cu litera *b* corespund plantelor cu efect repelent puternic (cantitatea de frunze consumate a fost semnificativ mai mică decât în cazul lui *S. tuberosum*) (Testul T, $p < 0.05$)

VI.2. Răspunsul de apărare al plantelor la atacul erbivorelor

Speciile reactive de oxigen (ROS) sunt implicate în apărarea plantelor împotriva diferiților agenți patogeni. Anionul superoxid, peroxidul de hidrogen și radicalul hidroxil sunt cele mai frecvente forme generate de ROS. În plante, atacul gândacilor erbivori este în general asociat cu rănirea. Atât în atacul erbivorelor cât și în cazul leziunilor mecanice se induc modificări ca răspuns al plantei la rănire (Kessler și Baldwin 2002). Imediat după rănire, plantele acumulează specii reactive de oxigen.

Rolul speciilor reactive de oxigen în apărarea plantelor împotriva erbivorelor nu este clar, dar importanța ROS în semnalizare, în generarea de răspunsului de apărare este susținut de

numeroase experimente. Cantitatea de ROS acumulată are o corelație pozitivă cu rezistența plantelor împotriva atacurilor (Moloi și van der Westhuisen 2006).

În plante ROS reprezintă un răspuns fiziologic general. În condiții de stres sunt generate cantități mari de ROS, acestea au un rol important în răspunsul de apărare al plantelor, dar, de asemenea, ar putea afecta sănătatea plantelor. Prin urmare, existența unui sistem, care stabilizează concentrația de ROS este esențială. Stabilizarea nivelului ROS după atacul agentului patogen în *Arabidopsis thaliana* este controlată de acidul ascorbic și, de asemenea, prin generarea de antociani (Nagata și colab. 2003), care au un efect de fixare (scavenging) a ROS (Sanz și colab. 1994).

Rănirea, ca metodă experimentală, este utilizată adesea pentru a investiga răspunsurile de apărare ale plantelor împotriva atacurilor erbivorilor (Bruxelles și Roberts 2001). Analiza cantitativă a acumulării H₂O₂ în plantele rănite a fost realizată cu ajutorul reacției de colorare DAB, care produce o colorație maronie la nivelul zonelor de acumulare de H₂O₂ în țesutul plantei.

În experimentele noastre, concentrația de H₂O₂ a variat între 34.5 și 45.5 pM/g FW în frunzele rănite. Acumularea intensă de H₂O₂ a fost observată, după rănire, în cazul *S. chacoense*, 11 hibridi somatici și două clone BC₁ (**Fig. 6**). Ambele tipuri de hibridi somatici cu deficiență MMR (DN și AS) au fost reprezentate în acest grup.

În cazul genotipurilor marcate (*) pe **Fig. 6**, concentrația H₂O₂ produsă a fost semnificativ mai mare decât în frunzele control. În cazul *S. tuberosum*, frunzele rănite au produs o cantitate semnificativ mai mică de H₂O₂ comparativ cu genotipurile marcate.

Acumularea intensă a H₂O₂ ca urmare a rănirii a arătat o corelație ridicată cu capacitatea de rezistență a plantelor la CPB. Cei mai mulți dintre hibridii somatici care s-au dovedit a fi rezistenți la atacurile CPB au produs o concentrație mare de H₂O₂ în timpul stresului mecanic, de rănire.

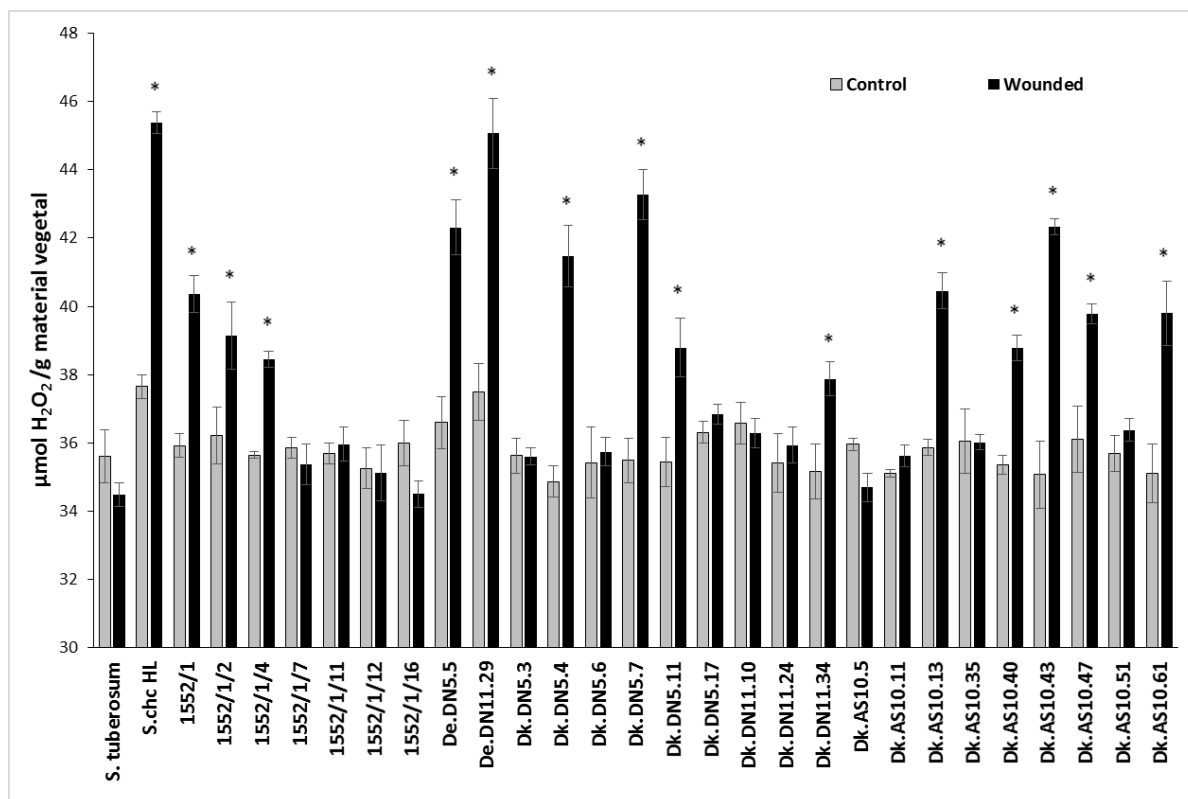


Fig. 6 Evaluarea cantitativă a H₂O₂ la plantele provenite de la hibridii somatici cu și fără deficiență MMR, descendenții lor și liniile parentale rănite (*S. tuberosum*, *S. chacoense*). * - hibridi somatici și clone BC cu diferență semnificativă între plantele rănite și martor (n=5, Testul T, p<0.05)

Speciile reactive de oxigen generate în timpul stresului biotic și abiotic trebuie stabilizate pentru a se evita deteriorarea oxidativă a structurilor celulare, care poate afecta supraviețuirea plantelor. Plantele pot proteja celulele lor prin eliminarea ROS ca urmare a activării unor sisteme antioxidante, cum ar fi: superoxid dismutaza, glutatation peroxidaza, catalaza sau prin producerea de diferiți antioxidanți cum ar fi ascorbatul, flavonoidele, antocianiii, *etc.* (Nagata și colab. 2003). Deoarece, acumularea de antociani durează 1-2 zile după detectarea stresului, acest antioxidant este eficient împotriva radicalilor de lungă durată, cum ar fi H₂O₂ (Nagata și colab. 2003). Nivelurile de bază ale antocianilor au variat între 4.8 și 10 pg/mg FW. Activitatea de captare a radicalilor în plantele rănite crește nivelul antocianilor cu minimum 20%, dar poate ajunge chiar și până la 185% în frunze.

În plus, a fost observată o corelație pozitivă între conținutul de antociani generat și cantitatea de ROS acumulată. În aceste cazuri, atunci când a fost sintetizată o mare cantitate de ROS după stresul mecanic al frunzelor a fost observată de asemenea, producerea unei mari

cantități de antociani. Probabil, acumularea de ROS a fost urmată de sinteza antocianilor în scopul de a stabiliza concentrația ROS din plante.

Pe baza rezultatelor prezentate mai sus, se poate concluziona că acumularea de peroxid de hidrogen indusă de rănire, joacă un rol indispensabil în sistemul de protecție al plantelor și poate fi asociată cu apărarea plantelor împotriva atacului erbivorelor. Bi și Felton (1995) au propus că acumularea ROS afectează interacțiunea plantelor cu organismele erbivore.

Capacitatea de acumulare de H₂O₂ în plante influențează extrem de mult răspunsul lor la atacurile insectelor erbivore. Astfel, plantele analizate în experimentele noastre care au răspuns la stresul mecanic cu o acumulare ridicată de H₂O₂ au posedat atât proprietăți de antibioză cât și de antixenoză împotriva CPB.

În cazul hibrizilor somatici de cartof antocianii au un rol important în eliminarea de radicali liberi, oferind protecție împotriva stresului oxidativ generat în urma leziunii mecanice a frunzelor.

VII. EFECTELE STRESULUI HIDRIC ASUPRA HIBRIZILOR SOMATICI DE *SOLANUM* ȘI A DESCENDENȚILOR DE RETROÎNCRUCIȘARE

Lipsa de apă proaspătă a devenit o problemă în creștere la nivel mondial, ca rezultat al schimbărilor climatice, al creșterii poluării și al populației umane, care a dus la utilizarea excesivă a apei. Cartoful cultivat folosește apă relativ eficient, dar este considerat a fi sensibil la nivele moderate de deficit de apă, care provoacă pierderi de producție. Creșterea perioadelor de secetă, afectează cele mai importante domenii agricole, fapt care motivează agronomii să selecteze soiuri tolerante pentru a evita pierderile de producție agricolă.

În general, stres-selecția plantelor începe cu prescreeningul *in vitro* al plantelor tolerante la secetă urmată de selecția *ex vitro*. Experimentele *ex vitro* imită condițiile existente în mod natural. În calitate de agent de stres în cazul experimentelor de selecție *in vitro* a plantelor tolerante la secetă, este utilizat în mod frecvent polietilen glicolul (PEG) (Hassanpanah 2010; Pino și colab. 2013). Mustața și colab. (în curs de publicare) a observat că un conținut ridicat de prolină în țesuturile stresate are efecte benefice asupra toleranței la stres indusă de deficitului de apă. Prolina este implicată în reducerea fotodistrugerii membranelor tilacoidale prin reducerea producției de ¹O₂ în condiții de secetă (Chaves și colab. 2009).

Caracterizarea fenotipică a stresului hidric în plante ajută la determinarea efectelor morfologice și fiziologice ale stresului indus. Platformele de fenotipare au făcut posibilă monitorizarea dezvoltării plantelor în timpul deficitului de apă prin determinarea acumulării de biomasă, fără efecte fiziologice dăunătoare (Juhász Feher și colab. 2014).

Ca efect al stresului hidric, rata de fotosinteză, precum și acumularea de CO₂ scade în plante (Kaiser 1987; Chaves și colab. 2009). Acest răspuns poate fi atribuit închiderii stomatelor (Cornic 2000).

Scopul cercetării noastre a fost de a evalua toleranța la secetă a hibridilor somatici între cartof și *Solanum chacoense*, respectiv *S. chacoense* cu deficiență MMR și a descendenților retroîncrucișați, folosind stres-selecția *in vitro* pe mediu de cultură suplimentat cu PEG. Răspunsul plantei la stres hidric a fost, de asemenea, evaluat folosind caracterizarea fenotipică și fotosinteza plantelor supuse stresului hidric.

VII.1. Stres-selecția *in vitro* a plantelor tolerante la secetă

În cazul stres-selecției *in vitro*, seceta a fost indusă prin utilizarea a diferitor concentrații de PEG (5% și 15%), care au simulat condițiile de secetă ușoară și severă. În cazul cartofului cultivat și *S. chacoense* HL, doar sistemul radicular s-a dezvoltat normal, în timp ce tulpina lor nu a crescut la fel de eficient comparativ cu plantele control. Pe baza diferențelor morfologice ale plantelor stresate, putem concluziona că unele genotipuri au gestionat deficitul de apă în mod eficient în timpul stresului hidric moderat. În cazul lor, numai numărul de frunze a fost semnificativ mai mic decât în grupul control, ceea ce înseamnă că aceste plante pot tolera starea de secetă moderată. Genotipurile sensibile, au supraviețuit stresului hidric moderat indus, dar ele nu au fost capabile să depășească efectele negative ale deficitului de apă. În acest caz, dacă deficitul de apă ar persista un timp mai îndelungat, plantele ar muri. Tulpinile și sistemul radicular al plantelor au rămas slab dezvoltate, acestea fiind esențiale pentru a supraviețui, iar în multe cazuri, frunzele inferioare și marginile frunzelor superioare s-au uscat.

În al doilea experiment în care plantele au fost expuse la condiții de secetă severă, indusă prin suplimentarea PEG 15% în mediile de cultură, toate genotipurile au fost afectate având lungimea tulpinilor semnificativ mai mică decât în cazul plantelor control. Sistemul radicular al plantelor stresate nu a fost atât de bogat ramificat comparativ cu cel al plantelor martor. O mare parte a genotipurilor analizate nu au avut rădăcinile mai lungi de 0.5 cm.

De asemenea, seceta severă a afectat dezvoltarea sistemului foliar, comparativ cu situația observată în cazul plantelor control. Shao și colab. (2008) au observat că suprafața frunzei a fost afectată în mod negativ în timpul stresului hidric, ceea ce duce la scăderea randamentului culturilor datorită reducerii fotosintezei. De asemenea, a fost observat un grad mai mare de senescență în cazul frunzelor de la plante stresate sever comparativ cu starea de stres moderat. Gradul de acumulare al prolinei în timpul stresului hidric influențează capacitatea de toleranță la stres a plantei. Majoritatea genotipurilor analizate au acumulat o cantitate de prolină semnificativ mai mare (Testul T, $p < 0.05$) ca răspuns la stresul hidric moderat. În schimb, au fost observate diferențe vizibile în ceea ce privește cantitatea de prolină acumulată. Unii hibrizi au acumulat de 7-8 ori mai multă prolină în timpul deficitului de apă, în timp ce alții au acumulat doar de 2-3 ori mai multă decât plantele martor.

În timpul deficitului sever de apă o mare parte (două treimi) dintre plantele supuse stresului nu au fost în măsură să gestioneze eficient resursele, ceea ce le-ar fi ajutat în depășirea efectelor negative ale secetei, prin urmare, aceste genotipuri au devenit sensibile la stres hidric sever.

Grupul tolerant la secetă a acumulat în mod semnificativ mai multă prolină decât genotipurile sensibile (Testul T, $p < 0.05$). Ambele tipuri de hibrizi somatici, cu sau fără deficiență MMR pot fi regăsiți în grupul rezistent la secetă, fapt ce susține ipoteza noastră că hibridarea somatică poate avea o mare influență asupra capacității plantelor de a dezvolta toleranță la secetă. În baza rezultatelor obținute putem concluziona că acumularea prolinei în timpul stresului hidric, a contribuit în mare măsură la capacitatea de toleranță a plantelor. În timpul stresului moderat, plantele rezistente s-au dezvoltat în mod normal, în timp ce în condiții de secetă severă plantele tolerante au fost în măsură să-și dezvolte rădăcini, care sunt esențiale pentru a realiza depozite de apă în condiții naturale. Acumularea prolinei a permis plantelor să supraviețuiască și să se dezvolte relativ bine în perioada de deficit de apă.

VII.2. Acumularea de biomasă verde în condiții de stres hidric

În experimentul nostru, impactul secetei asupra trăsăturilor morfologice ale plantelor stresate a fost determinat comparând acumularea de biomasă între plantele control și plantele stresate în condiții de secetă. Cantități mai mari de pixeli verzi observați la analiza plantelor

indică o suprafață extinsă a lăstarilor, care este direct proporțională cu capacitatea de toleranță la secetă a acestora.

Ca efect al stresului hidric majoritatea plantelor analizate au acumulat semnificativ mai puțină biomasă (ANOVA, $p < 0.05$) decât cele control. Obidiegwu și colab. (2015) au obținut rezultate similare, seceta a afectat în mod negativ dezvoltarea plantelor, ceea ce a dus la reducerea suprafeței foliare și a scăzut randamentul producției de tuberculi precum și cantitatea și calitatea acestora. Stresul provocat de secetă afectează în mod negativ creșterea foliară a plantelor, ceea ce conduce la reducerea randamentului tuberizării.

Prin compararea randamentului tuberizării și a acumulării de biomasă în timpul stresului hidric, am observat că plantele care au suferit mai puțin datorită secetei și au acumulat aproximativ la fel de multă biomasă verde precum plantele control, au fost capabile să dezvolte tuberculi de bună calitate, în timp ce plantele cu creștere foliară redusă au dezvoltat tuberculi de mici dimensiuni.

Fotosinteza este cel mai important proces biologic al plantelor fiind esențială în acumularea de biomasă (Arabzadeh 2013). Stresul produs de secetă s-a dovedit a avea efect negativ pentru creșterea și randamentul cartofului prin afectarea cineticii fluorescenței clorofilei (Jefferies 1992). După ce au fost efectuate măsurători ale fluorescenței clorofilei, la începutul și sfârșitul experimentului de fenotipare, am observat că eficiența cuantică maximă a plantelor stresate nu s-a diminuat în condiții de secetă. În etapa următoare, eficiența fotosintezei a fost evaluată prin calcularea indicelui de performanță (PI), care s-a dovedit a fi mai sensibil ca reacție la secetă decât eficiența cuantică maximă (Cavender-Bares și Bazzaz 2004). Ca și în cazul altor parametri calculați, și în acest caz valoarea PI a plantelor stresate a fost similară cu cea a grupului control în prima investigație, și a fost semnificativ mai mare (Testul T, $p < 0,05$) la a doua măsurătoare. Creșterea indicelui PI la a doua măsurătoare sugerează că plantele analizate au fost în măsură să se adapteze, în timp, la stresul produs de seceta moderată. Prin urmare, în cazul în care acest parametru nu a fost redus în timpul stresului hidric, putem considera că deficitul de apă indus nu a fost suficient de puternic pentru a avea un impact negativ asupra acestei trăsături fiziologice.

Extincția non-fotochimică (NPQ) a fluorescenței clorofilei indică nivelul de disipare a energiei luminii prin fluorescență de re-emisie sau căldură în centrul eliberator de reacție PSII (Fracheboud și Leipner 2003). Nivelurile NPQ la plantele stresate au fost semnificativ mai mari

în stadiul incipient al deficitului de apă (de 2 săptămâni) decât în timpul măsurătorilor ulterioare din etapa finală. Această observație explică diferențele acumulării de biomasă la plantele stresate comparativ cu cele control. O cantitate mare de energie de lumină recoltată a fost pierdută prin extincția non-fotochimică, prin urmare, eficiența fixării carbonului a fost redusă. Extincția non-fotochimică a fost soluția, 'răul necesar' al plantelor pentru a se proteja de fotodistrugere, astfel plantele stresate au putut să supraviețuiască și să își mențină funcțiile vitale fără pierderi apreciable.

Pe baza rezultatelor celei de-a doua măsurători, putem concluziona că plantele stresate s-au adaptat la condițiile de stres induse. Nivelul de extincție non-fotochimică a fost redus, ceea ce a condus la rezultate vizibile în acumularea de biomasă. Fixarea de carbon la plantele stresate a început să se realizeze mai eficient, în unele cazuri nivelul de biomasă a atins sau s-a apropiat de cel al plantelor control.

VIII. CONCLUZII GENERALE

Obiectivul principal al cercetării acestei teze de doctorat a fost de a caracteriza hibridii somatici de *Solanum* dintre cartoful cultivat și *S. chacoense*. Acești hibridi și descendenții lor BC sunt plante cu un material genetic unic, de aceea ele trebuie să fie caracterizate separat, în scopul de a găsi acele genotipuri care posedă trăsături valoroase. Experimentele s-au axat pe determinarea capacității de rezistență a hibridilor somatici și a descendenților acestora la stres biotic și abiotic.

Concluziile specifice pe capitole sunt după cum urmează:

1. Determinarea constituției genetice a hibridilor somatici *Solanum* folosind metode citogenetice clasice și moderne

În primul rând, a fost investigată stabilitatea genetică a hibridilor somatici și back-crossurilor. Nivelul de ploidie al genotipurilor analizate a variat între cel tetraploid și hexaploid. Hibridii somatici au eliminat cromozomi în timpul regenerării, fapt ce poate fi explicat prin incompatibilitatea somatică a speciilor parentale. Majoritatea descendenței și prima generație rezultată din retroîncrucișare (clonele BC₂) au fost tetraploide, prin urmare, putem afirma că hibridii au devenit stabili genetic având un nivel tetraploid. Citometria în flux s-a dovedit a fi un mod simplu și rapid, dar, de asemenea, o tehnică precisă de determinare a gradului de ploidie a hibridilor și clonelor BC. Numărul cromozomilor plantelor de *Solanum* pot fi determinați cu mare precizie utilizând această metodă.

De asemenea, a fost utilizată metoda de hibridizare genomică *in situ* pentru a stabili compoziția genetică a hibridilor somatici. Analizele GISH au relevat faptul că hibridii au eliminat mai mulți cromozomi de la specia sălbatică decât de la cartoful cultivat, ceea ce ar putea fi explicat prin diferențele între nivelul de ploidie sau asincronizarea în procesul mitozei a liniilor parentale.

2. Determinarea hibridilor somatici care posedă genele ce codifică leptine prin utilizarea markerilor moleculari

Analiza RAPD cu markeri specifici pentru leptine, descriși de Bouarte-Medina și colab. (2002) și Ronning și colab. (1999) a fost utilizată pentru a selecta hibridii și clone BC producătoare de leptine. Dintre acești markeri, numai OPT-20 a prezentat polimorfism specific. Pe baza unei analize RAPD-PCR capacitatea de sinteză a leptinei a arătat o segregare de 1:3 în descendență. Dintre hibridii deficienți MMR (20 hibridi) analizați, 13 au dat la amplificare secvența de ADN cu lungime de 250 pb. Hibridii cu gena *AtMSH2* în orientare antisens (AS) posedă secvența specifică de ADN într-o proporție mai mare (54.54%) decât hibridii cu gena mutantă *AtMSH2* dominant negativă (40%).

În experimentele noastre markerul RAPD OPT-20 a fost transformat în markeri SCAR. Din păcate, nici unul dintre markerii SCAR nou proiectați nu au fost eficienți în a recunoaște secvența de ADN specifică în mod exclusiv în genotipurile de *Solanum chacoense* producătoare de leptine.

3. Analizele biochimice ale hibridilor somatici și generațiilor BC

Compoziția glicoalcaloizilor în liniile parentale, hibridii somatici cu sau fără deficiența MMR și clonele BC a fost determinată utilizând metoda HPLC. Toate genotipurile de *Solanum* au sintetizat α -chaconină comună cu timpul de retenție (RT) la 11.7 minute și α -solanină cu RT la 11.2 minute. Pentru că standardele comerciale pentru glicoalcaloizii leptine nu au fost disponibile, determinarea leptinelor nu a fost posibilă. Pe viitor, dorim să analizăm conținutul în glicoalcaloizi al genotipurilor *Solanum* cu spectroscopie LC-MS.

Spectroscopia FTIR a fost efectuată pentru a compara compoziția chimică a hibridilor și clonelor BC cu liniile parentale. Pentru a vizualiza gruparea genotipurilor, s-a folosit analiza componentelor principale. Genotipurile analizate au format grupuri bine separate în funcție de rezistența la gândacul de Colorado, conform celui de al doilea component principal. Spectroscopia FTIR este o metodă fiabilă pentru determinarea factorilor biochimici care au un mare impact asupra capacității de rezistență a plantelor.

4. Capacitatea de rezistență și reacția de apărare a hibrizilor somatici *Solanum* și a descendenților retroîncrușiți la gândacul de Colorado

A fost efectuat un biotest în laborator pentru a evalua efectul antibiozei hibrizilor somatici împotriva CPB. Această monitorizare pe termen lung a fost eficace în selectarea genotipurilor rezistente, care au avut efecte toxice și care au afectat dezvoltarea normală a larvelor CPB. Experimentul "test Choice" a fost utilizat pentru a determina genotipurile de *Solanum* cu proprietăți antixenotice. Pe baza preferinței alimentare a adulților CPB, au fost selectați cu succes hibridii și clonele BC cu efect repelent.

Mai mulți hibridi cu deficiență MMR au fost rezistenți la CPB comparativ cu hibridii de tip sălbatic. Hibridii cu deficiență MMR au avut un efect toxic mai puternic, unii dintre aceștia fiind la fel de toxici ca *S. chacoense*, în aceste cazuri larvele nu au supraviețuit până la maturitate. Procentul de supraviețuire și greutatea medie a larvelor au fost mai reduse în hibridii somatici cu deficiență în sistemul de reparare al ADN-ului. Numai în cazul hibrizilor cu deficiență MMR au apărut adulți de CPB cu malformații vizibile, care nu au putut să se reproducă. Pe baza rezultatelor noastre am ajuns la concluzia că deficiența sistemului de reparare a ADN-ului crește transferul de gene de rezistență de la *S. chacoense* în cartoful cultivat.

Hibridii somatici și descendenții BC cu proprietăți de rezistență au prezentat amplificarea secvenței ADN de 250 pb specifică, care a fost legată de producția de leptine, în analiza RAPD. Prin urmare, capacitatea de rezistență a acestor genotipuri a fost atribuită sintezei leptinelor.

De asemenea a fost utilizată rănirea experimentală pentru a evalua răspunsul de apărare al plantelor de *Solanum* împotriva atacurilor erbivorelor. După lezarea mecanică, s-au acumulat în frunze cantități mari de H₂O₂. Capacitatea de acumulare a H₂O₂ în plante a influențat puternic răspunsul lor la atacurile insectelor erbivore. În cazurile în care plantele au răspuns la rănirea mecanică prin acumularea intensă de H₂O₂ au posedat atât proprietăți de antibioză cât și antixenoză împotriva CPB.

În cazul hibrizilor somatici de cartof, antocianii sintetizați în cantitate ridicată față de martor au un rol important în eliminarea de radicali liberi, fapt ce oferă protecție împotriva stresului oxidativ generat în urma leziunii mecanice a frunzelor.

5. Efectele stresului produs de secetă asupra hibrizilor somatici de *Solanum* și a descendenților BC

Stres-selecția *in vitro* s-a dovedit a fi o metodă eficientă în selectarea genotipurilor de *Solanum* tolerante la secetă moderată și/sau severă. Liniile parentale au fost sensibile la lipsa de apă, dar, în ciuda acestui fapt, s-au observat hibrizi cu sau fără deficiență MMR și clone BC tolerante la secetă. O proporție mai mare de hibrizi somatici cu deficiență MMR au tolerat în mod eficient stresul la secetă severă indusă comparativ cu genotipurile de *Solanum* fără deficiență MMR. În baza rezultatelor obținute am ajuns la concluzia că procesul de hibridare somatică și deficiența în sistemul de repararea a ADN-ului au influențat dezvoltarea de noi proprietăți în hibrizii somatici.

Starea de secetă moderată a afectat în mod negativ dezvoltarea genotipurilor de *Solanum*. După stres-selecția *ex-vitro*, toate genotipurile analizate au tolerat stresul la secetă moderată indusă, dar pe baza randamentului tuberculilor și a modificării acumulării de biomasă, plantele tolerante la secetă au acumulat aproximativ la fel de multă biomasă verde cât plantele control. Aceste genotipuri au fost, de asemenea, în măsură să dezvolte tuberculi de calitate mai bună decât celelalte genotipuri.

Seceta moderată indusă nu a afectat randamentul cuantic maxim al fotosintezei, ceea ce arată că fotosistemul II (PSII) nu a fost deteriorat. Creșterea valorilor indicelui de performanță, după 6 săptămâni de la inițierea condițiilor de stres, sugerează că plantele stresate au fost în măsură să se adapteze în timp la starea de secetă moderată. Extincția non-fotochimică (NPQ) a fost mai mare în stadiul incipient al deficitului de apă, decât ulterior. Reducerea nivelului NPQ a contribuit în timp la creșterea fixării carbonului în plantele stresate, ceea ce a dus la creșterea vizibilă a acumulării de biomasă. Pe baza analizei fotosintezei am ajuns la concluzia că plantele stresate au fost în măsură să se adapteze la starea de stres hidric indus.

Pe baza rezultatelor obținute, am ajuns la concluzia, că hibrizii somatici între *S. tuberosum* și *S. chacoense*, cu sau fără deficiență MMR, precum și descendența lor BC reprezintă un material vegetal valoros pentru ameliorarea cartofului și de asemenea, pentru biologia experimentală. Caracterul unic al acestor genotipuri constă în faptul că aceste plante au fost obținute prin fuziunea a două celule vegetale diferite genetic care determină amestecarea materialului genetic al liniilor-mamă în hibrizi.

A fost utilizată biotehnologia combinatorie care apelează la diferite instrumente biotehnologice (electrofuziunea protoplastelor, transformarea genetică pentru inducerea deficienței MMR) (Rakosy-Tican 2012; Rakosy-Tican și colab. 2013) în scopul creșterii posibilității de integrare a unor gene de rezistență la stres în genofondul cartofului. Au fost astfel obținuți hibridi somatici între cartoful cultivat și *S. chacoense* rezistenți la atacul gândacului de Colorado. Aplicarea deficienței sistemului de reparare a bazelor greșit împerecheate din ADN în procesul de hibridare somatică a fost folosit pentru prima dată de grupul nostru de cercetare pentru a produce hibridi somatici de cartof (Rakosy și colab. 2004; Rakosy și colab. 2015).

După caracterizarea minuțioasă a hibridilor și a clonelor BC cu ajutorul unor metode citologice, moleculare, biochimice urmate de aplicarea biotestestelor și a testelor de repelență față de CPB au fost selectate genotipuri rezistente la acest pest. Mai mulți hibridi cu deficiență MMR au avut rezistență la CPB comparativ cu hibridii de tip sălbatic. Rezultatele noastre au confirmat potențialul biotehnologiei combinatorii, transformarea genetică pentru inducerea deficienței de reparare a ADN-ului a determinat creșterea recombinării homeoloage între cele două specii înrudite precum și creșterea ratei de transfer de gene de rezistență în cartof cultivat.

Mai mult decât atât, hibridii somatici, cu sau fără MMR au fost expuși la diferite condiții de secetă cu scopul de a selecta plantele tolerante la secetă, prin utilizarea metodelor de stres-selecție *in vitro* și *ex vitro*. În ciuda sensibilității speciilor parentale la secetă, unii hibridi somatici, cea mai mare parte dintre genotipuri cu deficiență MMR, au fost toleranți la stresul indus de secetă. Acest rezultat relevă un nou rol al conceptului de biotehnologie combinatorie, deoarece această strategie ar putea fi importantă în formarea de noi caractere de rezistență în timpul procesului de hibridare somatică.

Au fost selectați în total cinci hibridi somatici cu și unul fără deficiență MMR și, de asemenea, o singură linie BC₁, care au combinat toate trăsăturile de rezistență testate. Aceste genotipuri ar putea fi, de asemenea, rezistente și la alți factori biotici sau abiotici de stres, deoarece plantele folosesc aceleași căi de semnalizare pentru activarea reacțiilor de apărare, la diferite tipuri de stres. Prin urmare, expunerea la un stres ușor declanșează răspunsul imun ale plantei și contribuie la îmbunătățirea capacității lor de rezistență față de o serie de factori de stres (Foyer și colab. 2016).

Aceste rezultate deschid noi posibilități pentru integrarea în programele de ameliorare a acestor linii de hibridi somatici.

IX. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Arabzadeh N (2013). The impact of drought stress on photosynthetic quantum yield in *Haloxylon aphyllum* and *Haloxylon persicum*. African Journal of Plant Science, 7(6): 185–189
2. Bennett RH and Wallsgrove RM (1994). Secondary metabolites in plant defense-mechanisms. New Phytol., 127: 617–633
3. Bi JL and Felton GW (1995). Foliar oxidative stress and insect herbivory: Primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. J. Chem. Ecol., 21: 1511–1530
4. Birky CW (1995). Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 92(25): 11331–11338
5. Bouarte-Medina T, Fogelman E, Chani E, Miller A, Levin I, Levy D and Veilleux R (2002). Identification of molecular markers associated with leptine in reciprocal backcross families of diploid potato. Theoretical and Applied Genetics, 105(6): 1010–1018
6. Camire ME, Kubow S and Donnelly DJ (2009). Potatoes and human health. Critical Reviews of Food and Science Nutrition, 49: 823–840
7. Cavender-Bares J and Bazzaz FA (2004). From leaves to ecosystems: Using chlorophyll fluorescence to assess photosynthesis and plant function in ecological studies. In: Chlorophyll a fluorescence: A signature of photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration, Springer, Dordrecht, Netherlands, 19: 735–755
8. Chaves MM, Fexas J and Pinhero C (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms. Annals of Bot., 103: 551–560
9. Coombs JJ, Douches DS, Li WB, Grafius EJ, and Pett WL (2002). Combining engineered (Bt-cry3a) and natural resistance mechanism in potato for control of Colorado potato beetle. J. Am. Soc. Hortic. Sci., 127: 62–68
10. Cornic G (2000). Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture - not by affecting ATP synthesis. Trends Plant Sci., 5: 187–188
11. De Bruxelles GL and Roberts MR (2001). Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. Crit. Rev.Plant Sci., 20: 487–521
12. FAOSTAT (2014). Food and agriculture organization of the United Nations. Retrieved 2016 June 9 from <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
13. Feher-Juhász E, Majer P, Sass L, Lantos Cs, Csisar J, Turoczy Z, Mihaly R, Mai A, Horvath VG, Vass I and Pauk J (2014). Phenotyping shows improved physiological traits and seed yield of transgenic wheat plants expressing the alfalfa aldose reductase under permanent drought stress. Acta Physiol. Plant., 36: 663–673
14. Fewell AM and Roddick JG (1993). Interactive antifungal activity of the glycoalkaloids a-solanine and a-chaconine. Phytochemistry, 33: 323–328
15. Fewell AM and Roddick JG (1997). Potato glycoalkaloid impairment of fungal development. Mycological Research, 101: 597–603

16. Foyer CH, Rasool B, Davey JB and Hancock RD (2016). Cross-tolerance to biotic and abiotic stresses in plants: a focus on resistance to aphid infestation. *J. Exp. Bot.*, 67(7): 2025–2037
17. Fracheboud Y and Leipner J (2003). The application of chlorophyll fluorescence to study light, temperature, and drought stress. In: *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 125–150
18. Friedman M (2006). Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 8655–8681
19. Friedman M and McDonald GM (1997). Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety, and plant physiology. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 16: 55–132
20. Gebhardt C (2013). Bridging the gap between genome analysis and precision breeding in potato. *Trends in Genetics*, 29(4): 248–256
21. Glimelius K, Fahleson J, Landgren M, Sjödin C and Sundberg E (1991). Gene transfer *via* somatic hybridization in plants. *Trends Biotechnol.*, 9(1): 24–30
22. Gubarev MI, Enioutina EY, Taylor JL, Visic DM and Daynes RA (1998). Plant-derived glycoalkaloids protect mice against lethal infection with *Salmonella typhimurium*. *Phytother. Res.*, 12: 79–88
23. Hare JD (1990). Ecology and management of the Colorado potato beetle. *Annual Rev. Entomol.*, 35: 81–100
24. Hassanpanah D (2010). Evaluation of potato advanced cultivars against water deficit stress under *in vitro* and *in vivo* condition. *Biotechnology*, 9: 164–169
25. Haverkort AJ, Struik PC, Visser RGF and Jacobsen E (2009). Applied biotechnology to combat Late blight in potato caused by *Phytophthora infestans*. *Potato Research*, 52(3): 249–264
26. Hawkes JG (1990). *The potato: Evolution, biodiversity and genetic resources*. Belhaven Press, Oxford, London, UK, 24–143
27. Hermanova V, Bárta J and Čurn V (2007). Wild potato species: Characterization and biological potential for potato breeding. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 43: 73–81
28. Hirsch CN, Hirsch CD, Felcher K, Coombs J, Zarka D and VanDeynze A (2013). Retrospective view of North American potato (*Solanum tuberosum* L.) breeding in the 20th and 21st centuries. *G3 (Bethesda)*, 3: 1003–1013
29. Ispas G (2004). Role of the mismatch repair protein *MSH2* in maintenance of genome stability in plants. PhD thesis, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium, 34–79
30. Jang TS and Weiss-Schneeweiss H (2015). Formamide-free genomic *in situ* hybridization allows unambiguous discrimination of highly similar parental genome in diploid hybrids and allopolyploids. *Cytogen. Genome Res.*, 146(4): 325–331
31. Jefferies RA (1992). Effect of drought on chlorophyll fluorescence in potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant water status and the kinetics of chlorophyll fluorescence. *Pot. Res.*, 35:25–34

32. Kaiser WM (1987). Effect of water stress on photosynthesis. *Physiol. Plant.*, 71: 142–149
33. Kessler A and Baldwin IT (2002). Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Rev. Plant Biol.*, 53: 299–328
34. Molnár I, Besenyi E, Thieme R, Thieme T, Aurori A, Baricz A, Banciu HL and Rakosy-Tican E (2016a). Mismatch repair deficiency increases the transfer of antibiosis and antixenosis properties against Colorado potato beetle in the somatic hybrids *Solanum tuberosum* (+) *S. chacoense*, *Pest Management Science*, Accepted Author Manuscript. doi:10.1002/ps.4473
35. Molnár I, Mustață RA and Rakosy-Tican E (2016b). Reactive oxygen species and anthocyanin are involved in plant response to wounding as part of insect feeding – the case of the somatic hybrids *Solanum tuberosum* + *Solanum chacoense*, *Studia UBB Biologia*, 61(2) - Accepted Author Manuscript
36. Moloi MJ and van der Westhuizen A (2006). The reactive oxygen species are involved in resistance response of wheat to the Russian wheat aphid. *J. Plant Physiol.*, 163: 1118–1125
37. Nagata T, Tudoriki S, Masumizu T, Suda I, Furuta S, Du Z and Kikuchi S (2003). Levels of active oxygen species are controlled by ascorbic acid and anthocyanin in *Arabidopsis*. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 2992–2999
38. Obidiegwu J, Bryan GJ, Jones HG and Prashar A (2015). Coping with drought stress and adaptive responses in potato and perspectives for improvement. *Front. Plan. Sci.*, 6: 542–565
39. Ochatt SJ (2006). Flow cytometry (ploidy determination, cell cycle analysis, DNA content per nucleus). *Medicago truncatula* handbook, 1–13
40. Paran I and Michemore RW (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 85(8): 985–993
41. Penner GA, Chong J, Wight CP, Molnar SJ, Fedak G (1993). Identification of an RAPD marker for the crown rust resistance gene Pc68 in oats. *Genome*, 36(5): 818–820
42. Pino MT, Avila A, Molina A, Jeknic Z and Chen THH (2013). Enhanced *in vitro* drought tolerance of *Solanum tuberosum* and *Solanum commersonii* plants overexpressing the *ScCBF1* gene. *Ciencia e Investigacion Agraria*, 40:171–184
43. Rakosy-Tican E (2012). Combining different biotechnological tools for better introgression of resistance genes into crops: the case of potato. *Journal of Biotechnology*, 161(S1): 18
44. Rakosy-Tican E and Aurori A (2015). Green fluorescent protein (GFP) supports the selection based on callus vigorous growth in the somatic hybrids *Solanum tuberosum* L. + *S. chacoense* Bitt. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37: 201–206
45. Rakosy-Tican E, Molnar I, Thieme R and Taoutaou A (2013). New data supporting combinatorial biotechnology towards potato resistant to its most voracious pest Colorado potato beetle. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(S1): 42–43

46. Rakosy-Tican L, Aurori A, Aurori CM, Ispas G and Famelaer I (2004). Transformation of wild *Solanum* species resistant to late blight by using reporter gene *GFP* and *MSH2* genes. *Plant Breeding and Seed Science* (Warszawa), 50: 119–128
47. Rodriguez F and Spooner DM (2009). Nitrate reductase phylogeny of potato (*Solanum* sect. *Petota*) genomes with emphasis on the origins of the polyploid species. *Syst. Bot.*, 34: 207–219
48. Ronning CM, Stommel JR, Kowalski SP, Sanford LL, Kobayashi RS and Pineada O (1999). Identification of molecular markers associated with leptine production in a population of *Solanum chacoense* Bitter. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(1): 39–46
49. Ross H (1986). Potato breeding: problems and perspectives. *Adv. Plant Breed.*, Hamburg and Berlin, Germany, 13(Suppl): 112–125
50. Sanford LL, Kobayashi RS, Deahl KL and Sinden SL (1997). Diploid and tetraploid *Solanum chacoense* genotypes that synthesize leptine glycoalkaloids and deter feeding by Colorado potato beetle. *Am. Potato J.*, 74: 15–21
51. Sanz MJ, Ferrandiz ML, Cejudo M, Terencio MC, Gil B, Bustos G, Ubeda A, Gunasegaran R and Alcaraz MJ (1994). Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. *Xenobiotica*, 24: 689–699
52. Sinden SL, Sanford LL and Webb RE (1984). Genetic and environmental control of potato glycoalkaloids. *Am. Potato J.*, 61: 141–156
53. Sinden SL, Sanford LL, Cantelo WW and Deahl KL (1986). Leptine glycoalkaloids and resistance to the Colorado potato beetle (Coleoptera: *Chrysomelidae*) in *Solanum chacoense*. *Environ. Entomol.*, 15: 1057–1062
54. Spooner DM, Rodriguez A, Polgar Z, Ballard HE Jr and Jansky SH (2008). Genomic origins of potato polyploids: *GBSSI* gene sequencing data. *Plant Genome* (Suppl. Crop Sci.), 48 (S1): 27–36
55. Thieme R, Rakosy-Tican L, Nachtigall M, Schubert J, Hammann T, Antonova O, Gavrilenko T, Heimbach and Thieme T (2010). Characterization of the multiple resistance traits of somatic hybrids between *Solanum cardiophyllum* Lindl. and two commercial potato cultivars, *Plant Cell Rep.*, 29: 1187–1201
56. Udalov MB and Benkovskaya GV (2011). Population genetics of the Colorado potato beetle: from genotype to phenotype. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 1(4): 321–333
57. Wolters AMA, Schoenmakers HCH and Koorneef M (1995). Chloroplast and mitochondrial DNA composition of triploid and tetraploid somatic hybrids between *Lycopersicon sculentum* and *Solanum tuberosum*. *Theor. Appl. Genet.*, 90: 285–293
58. Yencho GC, Kowalski SP, Kennedy GG and Sanford LL (2000). Segregation of leptine glycoalkaloids and resistance to Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* (Say)) in F2 *Solanum tuberosum* (4x) x *S. chacoense* (4x) potato progenies. *Am. J. Potato Res.*, 77: 167–178

X. LISTA DE PUBLICAȚII

Articole ISI:

1. **Molnár I**, Besenyei E, Thieme R, Thieme T, Aurori A, Baricz A, Banciu HL and Rakosy-Tican E (2016). Mismatch repair deficiency increases the transfer of antibiosis and antixenosis properties against Colorado potato beetle in the somatic hybrids *Solanum tuberosum* (+) *S. chacoense*, Pest Management Science, Accepted Author Manuscript. doi:10.1002/ps.4473. **IF: 2.811**
2. Cruceriu D, **Molnár I**, Diaconeasa ZM, Aurori A, Socaciu C, Rakosy-Tican E (2016). *In vitro* culture as a stressful factor triggers different physiological responses in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. bulbocastanum*, Notulae Botanicae Horti Agrobotanici, Accepted Author Manuscript. **IF: 0.71**
3. Rakosy-Tican E, Thieme R, Nachtigall M, **Molnár I** and Dénes TÉ (2015). The recipient potato cultivar influences the genetic makeup of the somatic hybrids between five potato cultivars and one cloned accession of sexually incompatible species *Solanum bulbocastanum* Dun, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 122: 395–407. **IF: 2.39**
4. Rigó K, Majoros G, Szekeres S, **Molnár I**, Jablonszky M, Majláthová V, Majláth I and Földvári G (2016). Identification of *Hepatozoon erhardovae* Krampitz, 1964 from bank voles (*Myodes glareolus*) and fleas in Southern Hungary, Parasitology Research, 115(6): 2409–2413. **IF: 2.027**
5. Baricz A, Cristea A, Muntean V, Teodosiu G, Andrei A-S, **Molnár I**, Alexe M, Rakosy-Tican E and Banciu HL (2015). Culturable diversity of aerobic halophilic archaea (Fam. *Halobacteriaceae*) from hypersaline, meromictic Transylvanian lakes, Extremophiles, 19(2): 525–537. **IF: 2.346**
6. **Molnár I**, Papp J, Simon A and Anghel SD (2013). Deactivation of *Streptococcus mutans* biofilms on a tooth surface using He dielectric barrier discharge at atmospheric pressure, Plasma Science and Technology, 15(6): 535–541. **IF: 0.74**

Abstracte ISI:

1. **Molnár I**, Taoutaou A and Rakosy-Tican E (2013). Detection of leptine glycoalkaloids by using FTIR and RAPD markers in *Solanum* somatic hybrids, *Current Opinion in Biotechnology*, 24(S1): 133–134. **IF: 7.89**
2. Rakosy-Tican E, **Molnár I**, Thieme R and Taoutaou A (2013). New data supporting combinatorial biotechnology towards potato resistant to its most voracious pest Colorado potato beetle, *Current Opinion in Biotechnology*, 24(S1): 42–43. **IF: 7.89**

Articole B+

1. **Molnár I**, Mustață RA and Rakosy-Tican E (2016). Reactive oxygen species and anthocyanin are involved in plant response to wounding as part of insect feeding – the case of the somatic hybrids *Solanum tuberosum* + *Solanum chacoense*, *Studia UBB Biologia*, 61(2) - Accepted Author Manuscript
2. Rakosy-Tican E, Thieme R, Aurori A, **Erdelyi-Molnár I**, Besenyei E, Mustață AR, Măgineanu AM and Cruceriu D (2016). The application of combinatorial biotechnology in improving potato resistance to biotic and abiotic stress, *Studia UBB Biologia*, 61(1): 79–88
3. Dénes TÉ, **Molnár I**, Rákosy-Tican E (2015). New insights in the interaction between cultivated potato and *Phytophthora infestans*, *Studia UBB Biologia*, 60(1):165–175
4. Mărgineanu A-M, **Erdelyi-Molnár I**, Rakosy-Tican E (2015). Comparative study of trichomes in three parental *Solanum* species and their somatic hybrids, cultivated in greenhouse or phytotron, *Studia UBB Biologia*, 60(1):57–67
5. Mustață RA, **Molnár I**, Dénes TÉ, Rákosy-Tican E (2014). *In vitro* stress selection of marker free transgenic potato lines in order to produce potato resistant to both PVY and drought stress, *Studia UBB Biologia*, 59(2): 35–46
6. Mărgineanu A-M, **Erdelyi-Molnár I**, Rakosy-Tican E (2014). Trichomes types analysis and their density in parental species *Solanum tuberosum* and *S. chacoense* and their derived somatic hybrids, *Analele Științifice ale Universității „Al. I. Cuza”*, 60(2): 33–42

Alte articole

1. **Molnár I** (2015). Burgonya szomatikus hibridek rezisztencia vizsgálata Colorado bogárral szemben, *Intelligens háló*, 103–111
2. **Molnár I**, Dénes TE, Kruppa K, Szakács E, Lángné-Molnár M (2014). Molekuláris citogenetikai vizsgálatok burgonya fajhibrideken, *Martonvásár*, 28–29

Participări la conferințe

1. **Erdelyi-Molnár I**, Besenyei E, Rakosy Tican E (2016). Antibiosis and antixenosis properties of somatic hybrids and backcross progenies (*S. chacoense* + *S. tuberosum*) to the Colorado potato beetle, Asociația Română de culturi de țesuturi și celule vegetale, Cluj-Napoca, Romania
2. Cruceriu D, **Erdelyi-Molnár I**, Sconta Z, Margineanu AM, Aurori A, Rakosy-Tican E (2016). Characterization of several resistance mechanisms in somatic hybrids between *Solanum bulbocastanum* and the cultivar *tuberosum* ‘Rasant’. International Symposium “Young Researchers in BioSciences”, Cluj-Napoca, Romania
3. Mustăța RA, **Molnár I**, Denes TE, Aurori A, Rakosy-Tican E (2016). *In vitro* analysis for drought tolerance of different transgenic potato lines resistant to PVY, Asociația Română de culturi de țesuturi și celule vegetale, Cluj-Napoca, Romania
4. Rákosy-Tican E, Thieme R, Aurori A, **Molnár I**, Dénes TE, Besenyei E, Marginean AM, Cruceriu D, Mustata RA (2016). The application of combinatorial biotechnology in improving potato resistance to biotic and abiotic stress, Asociația Română de culturi de țesuturi și celule vegetale, Cluj Napoca, Romania
5. Dénes TÉ, **Molnár I**, Mustăța RA, Vass I, Cseri A, Vass I, Rákosy-Tican E (2016). Photosynthetic response under long-term drought stress in somatic hybrids between potato and *Solanum bulbocastanum*, Asociația Română de culturi de țesuturi și celule vegetale, Cluj Napoca, Romania
6. Cruceriu D, Aurori A, **Molnár I**, Diaconeasa Z, Socaciu C, Rakosy-Tican E (2016). Physiological effects of the *in vitro* culture on explants belonging to *Solanum*, Asociația Română de culturi de țesuturi și celule vegetale, Cluj-Napoca, Romania

7. Dénes T^É, Mustata AR, Taoutaou A, **Molnár I**, Rákósy-Tican E (2015). Histochemical localization of molecules involved in oxidative burst in *Solanum bulbocastanum* + *Solanum tuberosum* somatic hybrids infected by agro-infiltration with late blight effectors, Pannonian Plant Biotechnology Workshop; "Integration fundamental research into the practical agriculture", Ljubljana, Slovenia
8. Margineanu AM, **Erdelyi-Molnár I**, Rakósy-Tican E (2015). Correlation between trichome density and Colorado beetle resistance in the somatic hybrids between potato and *S. chacoense*, Pannonian Plant Biotechnology Association Conference „Integration fundamental research into the practical agriculture Progress and Perspectives, Ljubljana, Slovenia
9. Rakósy-Tican E, Thieme R, Nachtigall M, Hammann T, Denes TE, **Erdelyi-Molnár I** (2015). Somatic hybridization between *Solanum bulbocastanum* and potato – the influence of recipient cultivar, somatic incompatibility and stacking of two late blight resistance genes, Pannonian Plant Biotechnology Association Conference Integration fundamental research into the practical agriculture Progress and Perspectives”, Ljubljana, Slovenia
10. Margineanu AM, **Erdelyi-Molnár I**, Besenyei E, Rakósy-Tican E (2015). Trichome density and Colorado Potato Beetle choice test, performed in somatic hybrids between two potato cultivars and *Solanum chacoense*, International Symposium "Young Researchers in BioSciences", Cluj-Napoca, Romania
11. Rákósy-Tican E, **Molnár I**, Dénes T^É, Cseri A, Mustata R, Vass I (2015). Integrating phenotyping for drought tolerance into biotechnological potato improvement for multiple resistance traits, Plant Phenotyping Symposium, Barcelona, Spain
12. Cruceriu D, **Erdelyi-Molnár I**, Sconta Z, Aurori A, Socaciu C, Rakósy-Tican E (2015). Cultura *in vitro*: factor stresat pentru explantele vegetale, Conferinta Nationala Anuala de Comunicari stiintifice, Bistrita, Romania
13. **Molnár I**, Boitor R, Thieme R, Thieme T, Rakósy-Tican E (2014). The evaluation of resistance to Colorado potato beetle and detection of glycoalkaloid content by using Fourier transform infrared spectroscopy in *Solanum tuberosum* + *Solanum chacoense* somatic hybrids, PPBA, Mosonmagyaróvár, Hungary

14. Mustata AR, **Molnár I**, Rakosy-Tican E (2014). The evaluation of proline, plant regeneration and viability after *in vitro* stress selection sustains drought resistance in potato marker-free transgenic lines carrying PVYCP intron containing hairpin construct, PPBA, Mosonmagyaróvár, Hungary
15. Mărgineanu AM, **Molnár I**, Rakosy-Tican E (2014). Trichomes types and their density in parental species *Solanum tuberosum* and *S. chacoense* and their derived somatic hybrids PPBA, Mosonmagyaróvár, Hungary
16. Dénes TÉ, **Molnár I**, Kruppa K, Szakács É, Lángné-Molnár M, Rákosy-Tican E (2014). The ploidy and genome composition of *Solanum tuberosum* and *Solanum bulbocastanum* somatic hybrids and their derived backcross progenies, PPBA, Mosonmagyaróvár, Hungary
17. **Molnár I**, Thieme R, Rakosy-Tican E (2014). Resistance analysis of *Solanum* somatic hybrids to Colorado potato beetle, Conference Young Researchers In Bioscience, Cluj Napoca, Romania
18. Mustata AR, **Molnár I**, Rakosy-Tican E (2014). Inducing in vitro drought resistance to marker-free, transgenic potato lines, Conference Young Researchers In Bioscience, Cluj Napoca, Romania
19. Dénes TÉ, **Molnár I**, Kruppa K, Molnár-Lángné M, Thieme R, Rákosy-Tican E (2014). Cytological analysis the genome composition of somatic hybrids and backcross progenies between cultivated potato and *Solanum bulbocastanum*, Conference Young Researchers In Bioscience, Cluj Napoca, Romania
20. Rakosy-Tican E, **Molnár I**, Thieme R, Thieme T (2014). Mismatch repair deficiency increases the resistance to Colorado potato beetle of the somatic hybrids *S. chacoense* + potato, 19th Triennial Conference of EAPR, Brussels, Belgium
21. Thieme R, Rakosy-Tican E, **Molnár I**, Thieme T (2014). Wild species as genetic resources of resistance to Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*), 19th Triennial Conference of EAPR, Brussels, Belgium
22. **Molnár I**, Taoutaou A, Rakosy-Tican E (2013). Detection of leptine glycoalkaloids by using FTIR and RAPD markers in *Solanum* somatic hybrids, Eurobiotech Conference, Bratislava, Slovakia

23. Rakosy-Tican E, **Molnár I**, Thieme R, Taoutaou A (2013). New data supporting combinatorial biotechnology towards potato resistant to its most voracious pest Colorado potato beetle. Eurobiotech Conference, Bratislava, Slovakia
24. **Molnár I**, Thieme R, Rakosy-Tican E (2013). The evaluation of resistance to Colorado potato beetle and linked RAPD markers in *Solanum tuberosum* + *Solanum chacoense* somatic hybrids, VIPCA Conference on Plant Diseases and Resistance Mechanisms, Vienna, Austria
25. Rakosy-Tican E, **Molnár I**, Mustata R, Taoutaou A, Thieme R (2013). Combining different biotechnological tools for better introgression of resistance traits in potato, PPBA, Plants for the future Conference, Cluj Napoca, Romania
26. Dénes TÉ, **Molnár I**, Rákosy-Tican E (2013). Cytogenetic analysis of somatic hybrids and backcross progenies between potato and *Solanum bulbocastanum*, PPBA, Plants for the future Conference, Cluj Napoca, Romania
27. **Molnár I**, Rakosy-Tican E (2012). Cytogenetic analysis of the somatic hybrids of *Solanum tuberosum* and late blight resistant *Solanum bulbocastanum*, PPBA, Debrecen, Hungary
28. Speth H, **Molnár I**, Rakosy-Tican E (2012). Screening of the somatic hybrids potato + *Solanum chacoense* for their resistance to Colorado potato beetle by using the choice test, PPBA, Debrecen, Hungary