



Universitatea Babeş-Bolyai
Facultatea de Biologie și Geologie
Școala doctorală „*Biologie integrativă*”

**Influența sistemului reparator ADN în hibrizii somatici
dintre *Solanum tuberosum* + *Solanum chacoense* și editarea
genei *MSH2* în cartof**

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător de doctorat

Prof. Dr. Elena Rákosy-Tican

Doctorand

Enikő Lőrincz-Besenyei

Cluj-Napoca

2020

CUPRINS

CAPITOLUL 1. INTRODUCERE	4
1.1. CARTOFUL ȘI RUDELE SALE SĂLBATICE CA SURSĂ DE GENE DE REZISTENȚĂ	4
CAPITOLUL 2. OBIECTIVELE TEZEI	6
CAPITOLUL 3. MATERIALUL VEGETAL UTILIZAT ÎN TEZĂ	7
CAPITOLUL 4. REZULTATE ȘI DISCUȚII	9
4.1. FENOTIPURI NOI DE CARTOFI CO-INDUSE DE DEFICIENȚA GENEI <i>MSH2</i> ȘI DE HIBRIDARE SOMATICĂ	9
4.1.1. Deficiență în sistemul reparator <i>AND</i> induce fenotip mutant în hibridii somatici de cartof	9
4.1.2. Prezența markerului de selecție <i>NPTII</i> în liniile transgenice de hibridi somatici cu deficiență în sistemul de reparare a ADN	12
4.1.3. Instabilitatea microsateliților în hibridii somatici de cartof	12
4.1.4. Nivelul relativ de transcriere al genelor <i>MSH2</i> și <i>SPO11</i> în hibridii somatici	14
4.1.5. Hibridarea genomică in situ la hibridi somatici, în meioză	17
4.1.6. Rezistența hibridilor somatici deficienți în sistemul reparator ADN la gândacul de Colorado	19
4.2. INDUCEREA DE MUTAȚII ÎN GENA <i>MSH2</i> CU AJUTORUL CRISPR/CAS9	20
4.2.1. Testul clivajului ADN in vitro	20
4.2.2. Editarea genomului fără a utiliza ADN exogen în protoplastele de cartofi	21
4.2.3. Transformarea mediată de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> la cartof	23
CAPITOLUL 5. CONCLUZII GENERALE	26
CUVINTE DE MULȚUMIRE	28
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	29
SUPLIMENT	36
PUBLICAȚII	38

*“We totally missed the possible role of ...
[DNA] repair although ... I later came to realise that
DNA is so precious that probably many distinct
repair mechanisms would exist.”*

(Crick, 1974)

Capitolul 1. Introducere

1.1. Cartoful și rudele sale sălbatice ca sursă de gene de rezistență

Cartoful cultivat (*Solanum tuberosum* L.) este a treia cea mai importantă plantă de cultură după orez și grâu, în ceea ce privește consumul uman (<https://cipotato.org/>).

Cartoful cultivat are un genofond genetic limitat deoarece provine dintr-o populație limitată care a fost adusă în Europa iar datorită domesticirii intensive fondul genetic al cartofului s-a redus (Ghislain și Douches, 2020).

Tuberculi de cartof sunt o sursă dietetică importantă deoarece conțin amidon, antioxidanți, proteine și vitamine care simultan servesc plantei ca și organ de depozitare și propagare vegetativă (Burlingame și colab., 2009).

Cartoful cultivat și rudele sale sălbatice aparțin genului *Solanum*, este cel mai mare gen ce include în jur de 1,500–2,000 de specii (Machida-Hirano, 2015).

Cartofii sălbatici care sunt rudele cartofului cultivat și produc tuberculi se numesc *Solanaceae* sect. *Petota* Dumort. (specii *Solanum* L.) iar rudele care nu produc tuberculi, *Solanum* sect. *Etuberosum* (Bukasov și Kameraz) Child (Hawkes, 1990; Spooner și colab., 1993).

Pe lângă asta, există 199 de cartofi sălbatici (*Solanaceae* sect. *Petota* Dumort) care se găsesc sporadic în 16 țări de la sud-vestul Statelor Unite până în centrul Argentinei și Chile (Hijmans și Spooner, 2001). Speciile sălbatice de cartofi sunt o sursă promițătoare de rezistență pentru cartoful cultivat (Jansky și colab., 2009; Pelletier și colab., 2011).

Aceștia prezintă printre alte trăsături de rezistență, o toleranță bună pentru stressul abiotic precum temperaturile înalte (ex. *S. berthaultii*, *S. chacoense*, and *S. stoloniferum*) (Reynolds și Ewing, 1989; Guedes și colab., 2019). În *S. berthaultii* Hawkes și în *S. bulbocastanum* Dun., au fost găsite gene de rezistență pentru *Phytophthora infestans* (Ewing și colab., 2000; Naess și colab., 2000, 2001; van der Vossen și colab., 2003). *S. brevidens* prezintă rezistență la diferiți viruși (Valkonen și colab., 1994; Rokka și colab., 1998).

S. chacoense prezintă în genofondul lui rezistență la virusul A și Y (PVA și PVY) al cartofului, mană, gândacul de Colorado (CPB), molia cartofului, virusul răsucirii frunzelor de cartof (PRLV) (Brown și Thomas, 1994; Hawkes, 1994) și rezistență la acumularea zaharurilor în tuberculi datorită păstrării la temperaturii scăzute (Leisner și colab., 2018).

Speciile sălbatice de cartofi care sunt rude ale cartofului cultivat prezintă o prioritate pentru conservare deoarece posedă o diversitate genetică ridicată ceea ce este extrem de util pentru a dezvolta noi soiuri de cartof mult mai productive, rezistente cu o valoare nutrițională ridicată (Castañeda-Álvarez și colab., 2016).

Abilitatea de a încrucișa specii sălbatice de cartof cu cartoful cultivat este foarte important (Jansky și colab., 2009). Mai mult decât atât, a încrucișa specii de cartof sălbatic cu cartoful cultivat este foarte dificil, deoarece aceștia posedă incompatibilitate unilaterală și auto-incompatibilitate. Pe lângă asta au și numărul endospermului (endospem balance number –EBN) precum și ploidie diferită (Spooner și colab., 2014). De astfel, hibridarea somatică este utilizată pentru a depăși incompatibilitatea dintre cartofii sălbatici și cei cultivați, de multe ori fiind singura opțiune pentru a introduce gene de rezistență de la speciile sălbatice de cartof în genofondul cartofului cultivat (Xu și colab., 1991; Chen, 2004; Chen și colab., 2008; Thieme și Rakosy-Tican, 2017).

Schimbarea climatică accelerată are un impact major asupra producției de cartof și mult mai multe insecticide și pesticide sunt necesare pentru a controla bolile și dăunătorii cartofului. Dar utilizarea excesivă a pesticidelor chimice poate duce la probleme foarte serioase de mediu și de sănătate (Alyokhin, 2008; Maharijaya și Vosman, 2015). Iernile blânde oferă condiții favorabile supraviețuirii gândacului de Colorado și a altor dăunători.

Capitolul 2. Obiectivele tezei

În scopul de a introduce trăsături valoroase de la rudele sălbatice de cartof în cartoful cultivat, deficiență în sistemul reparator ADN (MMR) a fost introdus în *S. chacoense*. *S. chacoense* cu deficiență în sistemul reparator ADN a fost utilizat în fuziuni somatice cu cartoful cultivat tetraploid (Rakosy-Tican et al., 2004; Rakosy-Tican et al., 2019).

Această lucrare a avut ca scop caracterizarea hibrizilor somatici de cartofi, între *S. tuberosum* și *S. chacoense* cu o deficiență în sistemul reparator ADN. Și pe lângă asta, de a arăta dacă deficiența în sistemul reparator ADN favorizează recombinarea homeologă în meioză a hibrizilor somatici pentru a introduce trăsături de rezistență de la *S. chacoense* în genofondul cartofului.

Următorul pas a fost inducerea mutațiilor cu ajutorul tehnicii de editare a genomului (CRISPR/Cas9) utilizând *Agrobacterium tumefaciens* și livrarea compușilor CRISPR/Cas9 fără a utiliza molecule de ADN exogen, în protoplaste mezofiliene de cartof ca și proof of concept.

Obiectivele specifice ale tezei au fost:

- 1) Analiza hibrizilor pentru fenotipurile mutante, instabilitatea microsateliților (MSI) în plante transgenice și control (părinți), verificarea integrării transgenei, RTq-PCR pentru genele *MSH2* și *SPO11* în hibrizii somatici selectați și părinți.
- 2) Caracterizarea unui hibrid somatic selectat cu metoda GISH pentru recombinarea homeoloagă în meioză, caracterizarea meiocitelor precum și analiza viabilității polenului
- 3) Determinarea rezistenței la gândacul de Colorado al unor hibridi somatici cu sau fără deficiență în sistemul reparator AND și a evidenția introgresia acestui caracter de la *S. chacoense*.
- 4) Producerea de cartof deficient în sistemul reparator ADN cu metoda de editare a genomului (CRISPR/Cas9) prin *Agrobacterium tumefaciens* sau livrarea compușilor CRISPR fără AND străin în protoplastele de cartof. Țelul a fost stabilirea unei metode de editare a genomului pentru ca mai târziu să fie utilizat la editarea altor gene ce confer rezistență cartofului. Sau pentru a elimina din hibrizii somatici transgena ce este integrate, ceea ce este foarte important din cauza reglementărilor legislative.

Capitolul 3. Materialul vegetal utilizat în teză

Pentru a introduce gene de rezistență de la speciile sălbatice de cartof, *S. chacoense*, transformare genetică a fost făcută utilizând *A. tumefaciens*, linia LBA4404 (Rakosy-Tican și colab., 2004; Rakosy-Tican și colab., 2019). Constructul utilizat în această teză pentru transformarea genetică a fost un construct antisens (AS) și un construct dominant negativ (DN) ce au fost deja descrise în această publicație: (Rakosy-Tican și colab., 2019).

Constructul antisens (AS) conține fragmentul 3' 1 kb de la *A. thaliana MSH2* cDNA în orientare antisens (Figura 1) și inhibarea genei *MSH2* este cu o strategie antisens.

Constructul dominant negativ este secvența codificatoare *AtMSH2* (Figura 1), ce conține o mutație punctiformă la poziția 697 unde un codon Asp (aspartate) este convertit în codonul Gly (glycine) (Ispas, 2004) și inhibiția genei *MSH2* este prin inhibare competitivă.

O astfel de mutație în gena *MSH2*, la drojdie a conferit un fenotip puternic dominant negative cu deficiență în sistemul reparator ADN (Nicolaidis și colab., 1998; Studamire și colab., 1999). Statusul transgenic al clonelor este descris în: (Rakosy-Tican și colab., 2004).

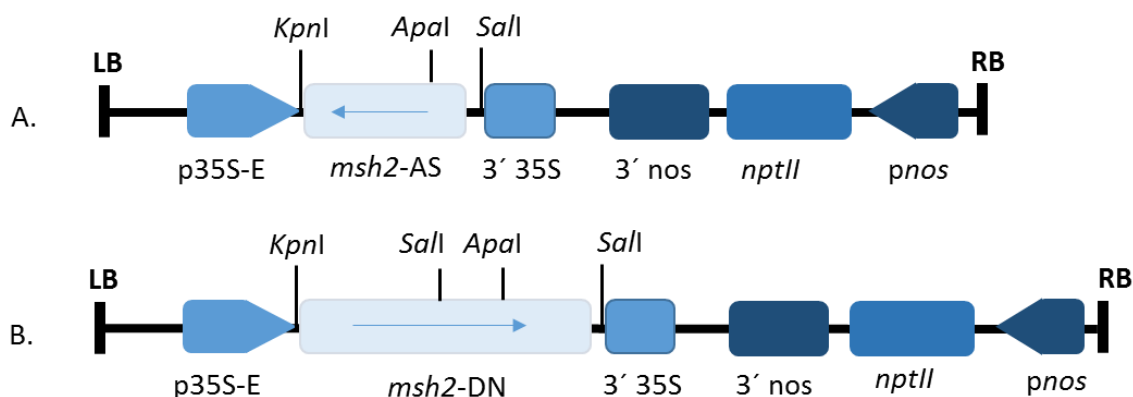


Figura 1. Reprezentarea schematică al plasmidului transformat în *S. chacoense*, (A) T-DNA al plasmidului FRG-*MSH2*-AS, (B) T-DNA al plasmidului FRG-*MSH2*-DN (după Rakosy-Tican și colab., 2019).

Două cultivare de cartof, cv. Delikat (Nordring-Kartoffelzucht – und Vermerungs – GmbH Gross Lüsewitz, Germany) și cv. Désiree (ZPC, Leeuwarden, Netherlands) a fost utilizat pentru a obține hibridi somatici între *S. tuberosum* și planta transgenică în gena *MSH2* (Rakosy-Tican și colab., 2019). Natura hibridă a acestor plante a fost validat cu ajutorul markerilor SSR (Enikoe Loerincz-Besenyei, date nepublicate). În această teză, hibridii soamatici fără transgene sunt notate cu numere (ex. SH 1837/1) sau controalele cu C urmat de un număr (ex. DkC 5; DeC 7).

Cultivarele de cartof, Dk = cv. Delikat și De = cv. Désiree. *S. chacoense* este prescurtat *S. chc* sau *chc*. Hibrizii somatici, ce au fost transformați cu constructul dominant negativ sunt notate astfel: DkDN 5, DkDN 11, DeDN 5 și DeDN 11; cu numere urmate de numărul clonelor.

Când constructul antisens (AS) ca fost utilizat pentru a regenera plante transformate genetic atunci, numărul clonei a urmat DkAS 10 (Rakosy-Tican și colab., 2019).

Hibrizii somatici cu deficiență în sistemul reparatului ADN au fost produși pentru a crește recombinarea homeoloagă și astfel pentru a crește introgresia genelor de rezistență pentru gândacul de Colorado.

Pentru editarea genomului, cartoful tetraploid *S. tuberosum* cv. Delikat a fost utilizat.

În bacterii (Rayssiguier și colab., 1989; Zahrt și Maloy, 1997), drojdii (Datta și colab., 1996; Datta și colab., 1997; Negritto și colab., 1997; Chen și Jinks-Robertson, 1999; Nicholson și colab., 2000), celule de mamifere (Wind și colab., 1995; Elliott și Jasin, 2001) și plante (Trouiller și colab., 2006; Lafleuriel și colab., 2007; Tam și colab., 2011; van Marcke și Angenon, 2013), o frecvență mare de recombinare homeoloagă a fost observată între moleculele de ADN homeoloage, când gena *MSH2* a fost eliminată sau suprimată.

Capitolul 4. Rezultate și discuții

4.1. Fenotipuri noi de cartofi co-induse de deficiența genei *MSH2* și de hibridare somatică

Majoritatea studiilor decriptate în **capitolul 4.1** este deja publicată în:

Rakosy-Tican, E., **Lőrincz-Besenyey, E.***, Molnár, I., Thieme, R., Hartung, F., Sprink, T., Antonova, O., Famelaer, I., Angenon, G., Aurori, A., (2019). New Phenotypes of Potato Co-induced by Mismatch Repair Deficiency and Somatic Hybridization. *Frontiers in plant science* 10, 3. doi: 10.3389/fpls.2019.00003 (* prim autor), și în:

Molnár, I., **Besenyey, E.**, Thieme, R., Thieme, T., Aurori, A., Baricz, A., et al. (2017). Mismatch repair deficiency increases the transfer of antibiosis and antixenosis properties against Colorado potato beetle in somatic hybrids of *Solanum tuberosum* + *S. chacoense*. *Pest management science* 73, 1428–1437. doi: 10.1002/ps.4473

4.1.1. Deficiență în sistemul reparator AND induce fenotip mutant în hibridii somatici de cartof

La plantele cu deficiență în gena *MSH2* în *A. thaliana*, acumulare de mutații au fost observate în timpul propagării de la semințe la semințe. În aceste plante au fost observate fenotipuri mutant ca de exemplu plante cu frunze albino, înflorire prematură, sterilitate și plante pitice (Hoffman și colab., 2004).

Pentru analiza fenotipului mutant ce este cauzat de deficiență în sistemul reparator ADN (MMR) și variațiile cauzate de hibridarea somatică, mărimea plantelor, a frunzelor și a intrenodurilor a fost analizată. Instabilitatea microsateliților (MSI) este tiparul deficienței sistemului reparator ADN, doar plantele ce au fenotip mutant și prezintă o instabilitate a microsateliților au fost considerate ca fiind mutații cauzate de MMR, restul mutațiilor au fost considerate ca fiind cauzate de hibridarea somatică și de interacțiunile genetice produse de acesta (Harms, 1983).

Variații fenotipice au fost observate în hibridii somatici produse cu clona transgenică *S. chacoense* AS, DN și cartof cv. Delikat. De multe ori, acești hibridi somatici au prezentat fenotipuri cu creștere mare și fenotipuri pitice (*Figura 3*).

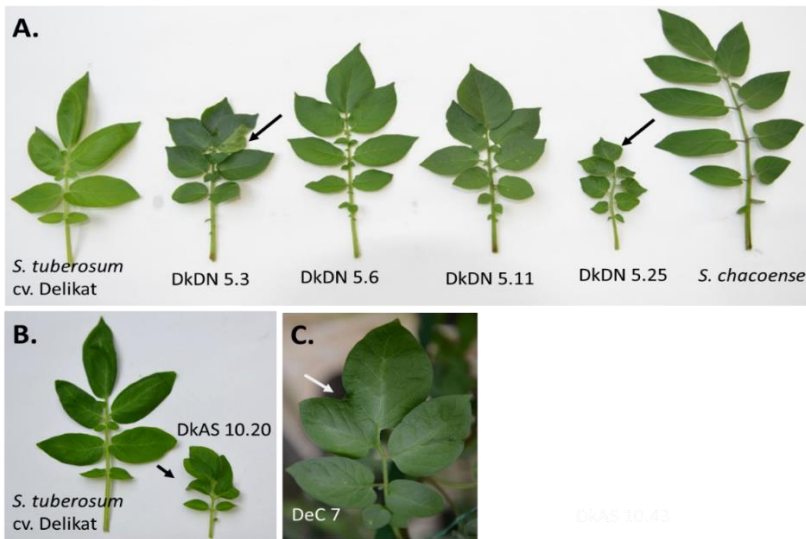


Figura 2. Fenotipurile hibridilor somatici de cartof în comparație cu speciile parentale cv. Delikat și *S. chacoense*. (A) Fenotipurile plantelor crescute în seră (61 de zile), de la stânga la dreapta: cartoful cv. Delikat, hibridii somatici de cartofi cu sistem deficiant în MMR (DkDN 5.3, 5.6, 5.11 și fenotipurile mutante ale hibridului DkDN 5.25), *S. chacoense*. (B) Morfologia fenotipurii mutante DkAS 10.20 care prezintă fenotip pitic, precum și frunze mici și foliole rotunde în comparație cu planta parentală cv. Delikat. (C) Frunze unite în hibridul DeC 7, fără deficiență în sistemul reparator ADN.

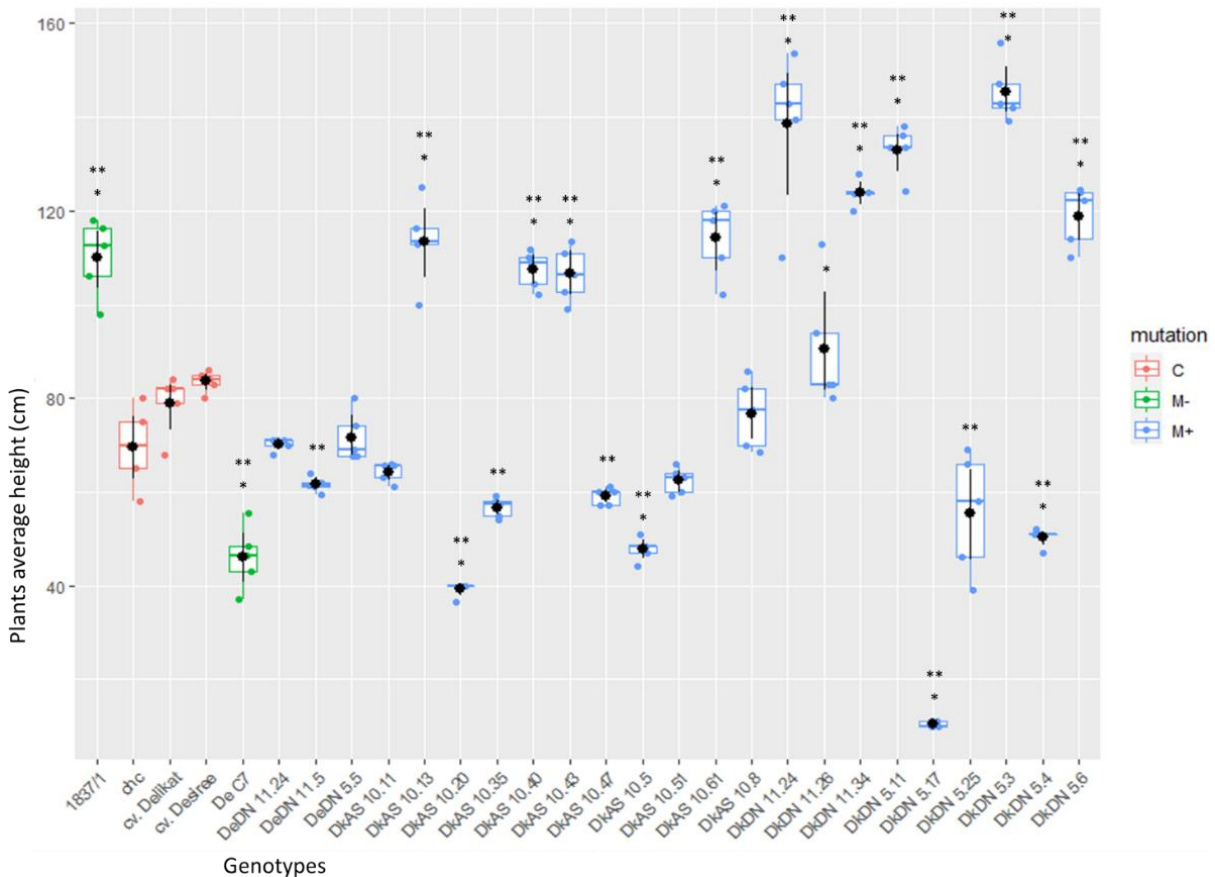


Figura 3. Înălțimea medie (în cm) a hibridilor somatici de cartof (cv. Delikat sau cv. Desiree) + *Solanum chacoense*, cu sau fără deficiență în sistemul reparator ADN, crescute în seră pentru 61 de zile după transferul din *in vitro*. Blocurile reprezintă media, punctele reprezintă valorile, linia orizontală din bloc reprezintă medianul, iar linia verticală reprezintă deviația standard, testul-t, $p < 0,05$, * semnificativ diferit de *S. chacoense*, ** semnificativ diferit de cartof cv. Delikat sau cv. Desiree, * și ** semnificativ diferit față de plantele parentale.

Mai mult decât atât, diferite anomalii au fost observate în morfologia frunzelor, ce au prezentat formă rotundă, frunze mici (*Figura 2*) precum și lipsa dezvoltării florilor în comparație cu plantele control. Fenotipurile pitice pot fi o cauză a mutațiilor în căile de biosinteză a hormonilor sau a receptorilor hormonale (Koorneef și colab., 1985; Vega și colab., 2006).

Un hibrid somatic (DkDN 5.25) ce conține constructul DN, prezintă grana dezorganizată cu schimbări structurale în cloroplaste, are perete celular interior îngroșat în jurul celulelor stomatale, iar aceste modificări merg mână în mână cu modificări semnificative în structura frunzei, acestea având o culoare ușor gri-verzuie și frunze deformate (*Figura 2*).

Recent a fost observat în cazul proteinei mitocondriale MSH1, că o depleție în această genă se asociază cu variegare, frunze încrețite, toleranță la stress abiotic și deficiențe de creștere (Virdi și colab., 2016).

Mai mult decât atât, transcriptomul acestui hibrid (Dk DN 5.25) a fost analizat în comparație cu plantele parentale (cv. Delikat și *S. chacoense*) și este semnificativ diferit față de plantele parentale.

Fenotipuri gigant au fost observate în cazul hibrizilor (DkDN 5.3, 5.6, 5.11; DkDN 11.24 și 11.34), precum și fenotipuri pitice (DkDN 5.4, 5.17 și DkAS 10.20) ce sunt semnificativ diferite față de părinți. Mărimea frunzelor hibrizilor somatici de cartof cu deficiență în sistemul reparator ADN a fost deasemena semnificativ diferită față de plantele parentale.

De asemenea, internozii hibrizilor deficienți în MMR prezintă diferite mărimi. Tuberculi mov închis, mici au fost observate la fenotipurile mutante. Hibrizii somatici ce au constructul DN integrat prezintă MSI în proporție de 82 % (9 genotipuri din 11) și fenotip mutant în proporție de 45 % (5 genotipuri din 11) ce este cauzat de deficiență în sistemul reparator ADN. Pe lângă asta, hibrizii somatici produși cu constructul antisens (AS) prezintă MSI în procent de 11 % (1 din 11 genotypes) și 11% arată fenotip mutant.

Mutația dominant negativă este mult mai efectivă în cazul acestor hibrizi somatici de cartof. Acesta a fost observat și în cazul tomatelor, unde un construct dominat negativ al proteinei AtMSH2-DN a indus creșterea recombinării homeoloage (Tam și colab., 2011).

Câțiva din hibrizii somatici descriși, prezintă fenotip mutant, nu dezvoltă flori sau înflorirea apare mai repede decât la formele parentale.

În tomatele defective în gena *MSH2* au fost observate flori anormale, morfologia stamenului anormală, semințele sterile și cu viabilitate scăzută (Sarma și colab., 2018).

4.1.2. Prezența markerului de selecție *NPTII* în liniile transgenice de hibridi somatici cu deficiență în sistemul de reparare a ADN

Constructul antisens sau cel dominat negativ al genei *AtMSH2*, ce a fost utilizat pentru a obține plante transgenice, a avut markerul de selecție pentru gena de neomicină fosfotransferază (gena *NPTII*). În prezența acestui marker de selecție, plantele transgenice sunt capabile să dezvolte rădăcini, ca orice altă plantă în condiții normale pe mediu ce conține kanamicină.

Toți hibridii somatici ce au sistem de reparare a ADN deficient și prezintă și MSI, au dezvoltat rădăcini pe mediul de selecție. Excepție au făcut hibridul DkDN 11.10 și DkDN 11.26 (*Tabelul I*).

Inactivarea a transgenei a fost observată deja la plante (Broer, 1996). Cu toate acestea, un tratament cu temperaturi ridicate la *Medicago sativa* a dus la pierderea aproape în totalitate a constructului transgenic (95%) și la pierderea rezistenței la fosfinotricină (Walter și colab., 1992). Este foarte probabil că acești hibridi după micropagarile ulterioare să fie pierdut constructul transgenic. Probabil că MMR fiind un stress pentru plantă a contribuit deasemenea la pierderea constructului transgenic.

Mai mult decât atât, pierderea elementului transgenic, crește probabilitatea ca aceste genotipuri să fie introduse în programele de ameliorare și să câștige acceptarea consumatorilor.

4.1.3. Instabilitatea microsateliților în hibridii somatici de cartof

Deficiența în sistemul reparator ADN este foarte puternic corelată cu instabilitatea microsateliților (MSI). Plantele deficiente în sistemul reparator ADN prezintă instabilitate a microsateliților, ca de exemplu deficiențe în gena *MSH2* (Leonard și colab., 2003; Hoffman și colab., 2004; Depeiges și colab., 2005; van Marcke și Angenon, 2013; Rakosy-Tican și colab., 2019), *PMS1* (Xu și colab., 2012), *PMS2* (Chao și colab., 2005), *MSH6* (Jiang și colab., 2020). Instabilitatea microsateliților este rezultatul alunecării sau blocării secvențelor de ADN ce apar când sunt deficiențe în sistemul de reparare al ADN. Aceste instabilități ai microsateliților sunt hotspot-uri de formare a DSBs (Gadgil și colab., 2017).

Pentru a analiza MSI în hibridii somatici și părinți, markeri SSR cromozom specifici au fost utilizați. În total 96 de markeri SSR au fost utilizați (la 12 nu se cunoaște localizarea pe cromozom). În hibridii somatici a fost observat un polimorfism foarte scăzut și doar șase markeri SSR indică instabilitate a microsateliților, ca de exemplu markerii: StI0001, StI0027, StI0046, StI0054,

STM0024 și STG0001. STG0001 prezintă o instabilitate a microsateliților în liniile de hibridi somatici retroîncrucișați, ce au un sistem MMR normal.

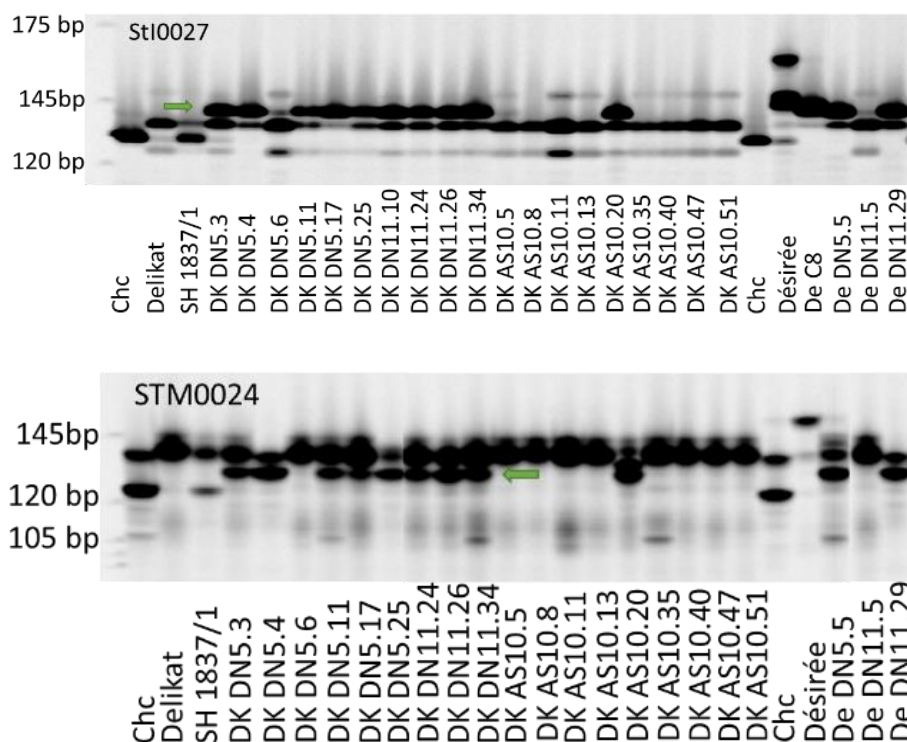


Figura 4. Instabilitatea microsateliților la hibridii somatici dintre *S. tuberosum* + *S. chacoense* ce prezintă deficiență în sistemul de reparare a ADN, în comparație cu părinții și hibridii fără deficiență în MMR (1837/1 și De C8). Markerii SSR StI0027 și STM0024. Benzile specifice ce indică instabilitatea SSR (MSI), sunt markate cu o săgeată verde.

În hibridii dintre orez și orezul sălbatic a fost raportat instabilitate a microsateliților precum și o variație în transcript al diferitelor gene MMR (Dong și colab., 2013). Aceasta indică o relație strânsă între genele MMR și variațiile genomice pe care ele le cauzează. Instabilitatea microsateliților s-a observat pe cromozomii 4, 8, 11 și 12, pentru că ceilalți markeri cromozom specifici nu au prezentat o instabilitate a microsateliților. Acești microsateliți ce au prezentat instabilitate prezintă repetiții de un nucleotid, de patru nucleotizi și un motiv (STM0024) ce are cinci repetiții trinucleotidice și 18 repetiții dinucleotidice, ceea ce reprezintă 3% (1/33), 8% (4/50), și respectiv 1% (1/96).

Această instabilitate apare nu doar în creșterea numărului de benzi ci și în deplasarea poziției principale a benzilor în cazul markerilor STM0024 și StI0027 (Figura 4).

Hibridii somatici cu deficiență în MMR: DkDN: 5.3, 5.4, 5.11, 5.17, 5.25, 11.10, 11.24, 11.34, DeDN: 5.5, 11.29 și DkAS 10.20 prezintă MSI cu toți cei șase markeri SSR markers, pe cromozomii 4, 8, 11, și 12.

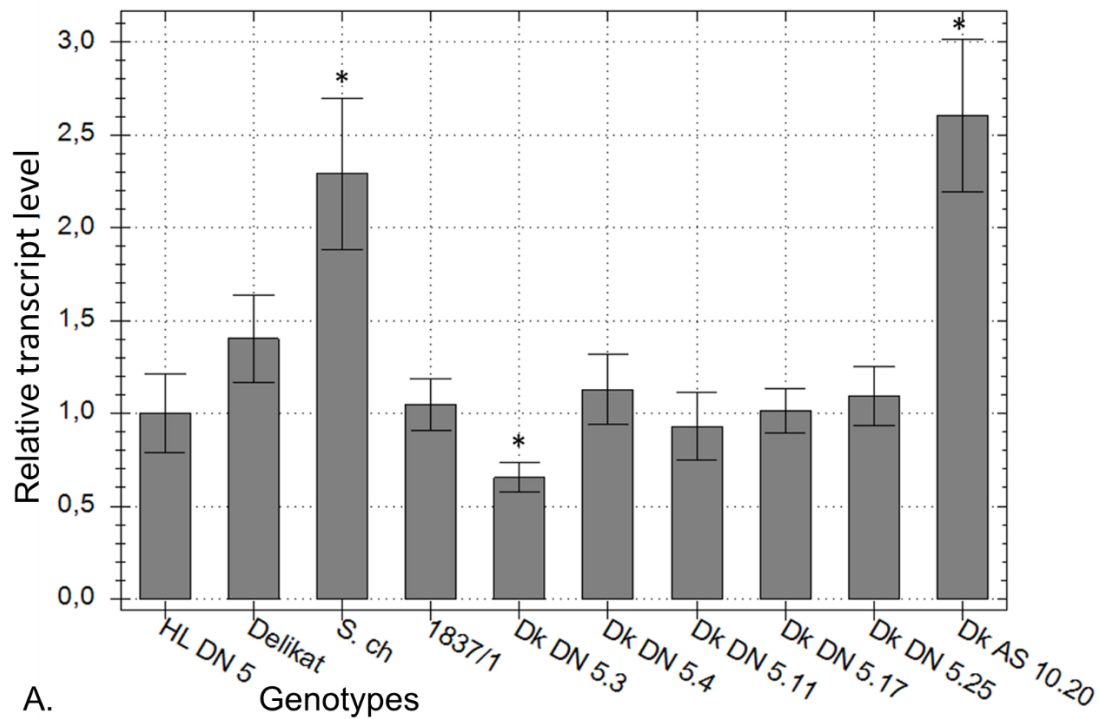
4.1.4. Nivelul relativ de transcriere al genelor *MSH2* și *SPO11* în hibridii somatici

Hibridii somatici cu o deficiență în sistemul reparator ADN au fost analizate pentru acumularea de transcript al genelor *MSH2* și *SPO11* în celule vegetative și generative. Ca și control, planta transgenică *S. chacoense*, HLDN 5 a fost utilizată. În *Figura 5*, nivelul relative de expresie a genei *MSH2* în frunze (**A**) și boboci florali (**B**), fluctuează între probe, comparat cu planta transgenică *S. chacoense* HLDN 5, utilizat ca și control. Mai mult decât atât, unul dintre hibridii cu o deficiență în sistemul reparator ADN, DkDN 5.3 prezintă o expresie redusă a genei *MSH2* în frunze, comparat cu plantele fără deficiență în sistemul reparator ADN și *S. chacoense* ce are sistem reparator ADN deficient ($p = 0.001$, *Figura 5-A*). Părinții, *S. tuberosum* și *S. chacoense* (*S. chc*) ai hibridilor somatici arată o creștere a expresiei genei *MSH2* în frunze, în comparație cu *S. chacoense* (HLDN 5). Aceste date indică ca mutația dominant negativă poate reduce nivelul de transcriere al genei *MSH2* în hibridii somatici. Pe lângă asta hibridul somatic DkAS 10.20, arată o creștere în nivelul de transcriere, aceasta poate fi datorat instabilității genetice al acestui hibrid, ceea ce este evidențiat și prin instabilitatea microsateleților (Rakosy-Tican și colab., 2019).

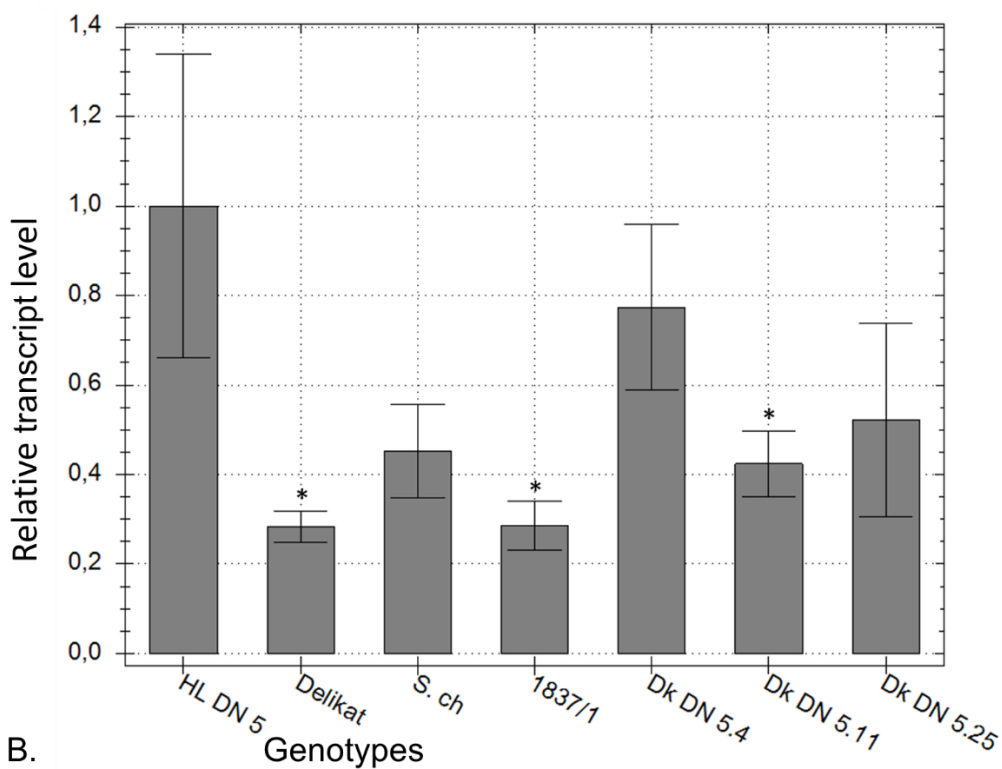
În general, în bobocii florali nivelul de expresie a genei *MSH2* arată o scădere în comparație cu cele din frunze. Aceste date corespund cu cele descrise de până acum în tomate, unde un nivel ridicat al expresiei genei *MSH2* a fost observat în frunze urmat de o scădere a expresiei genei în bobocii florali (Tam și colab., 2009).

În bobocii florali, hibridul somatic cu o deficiență în sistemul reparator ADN, DkDN 5.11, are o expresie a genei *MSH2* statistic semnificativ scăzută ($p = 0.008$). Pe lângă asta, genotipul, DkDN 5.25 prezintă o expresie a genei *MSH2* ușor scăzută, dar ce este statistic nesemnificativă (0.52) comparat cu planta transgenică, *S. chacoense* ($p = 0.07$, *Figura 5-B*).

Liniile parentale, cv. Delikat și *S. chacoense* au o expresie a genei *MSH2* ușor scăzută în boboci florali, pe când în frunze această expresie este ridicată. Mai mult decât atât, *S. chacoense* are o expresie a genei statistic semnificativ crescută în frunze ($p = 0.0001$), iar în bobocii florali este statistic semnificativ scăzută ($p = 0.01$) în comparație cu *S. chacoense* ce are sistemul reparator ADN deficient. Pe lângă asta în cartoful tetraploid, cv. Delikat expresia genei *MSH2* este semnificativ scăzută și are o expresie relativă a genei de 0.28 ($p = 0.001$, *Figura 5-B*).



A.



B.

Figura 5. Analiza RTqPCR a genei *MSH2* gene în hibridii somatici de cartof cu sau fără deficiență în sistemul reparator ADN în comparație cu HLDN 5 - *Solanum chacoense* cu o deficiență în gena *MSH2* și *S. chacoense* sau *S. tuberosum* cv Delikat. (A) RTqPCR în frunze, (B) RTqPCR în boboci; liniile orizontale de pe blocuri reprezintă eroarea standard a mediei replicatelor (\pm SEM). * Semnificativ diferit de HLDN 5 ($p < 0.05$).

Ca și în cazul nostru, silențierea genei *MSH2* în *N. tabacum* și *N. plumbaginifolia*, a dus la variații mari în expresia genei și nici un genotip nu a avut un nivel de expresie 0. Dar totuși, o reducere cu

20-30% în expresia genei a fost deajuns ca să se inducă fenotip mutant, ca de exemplu plante albino și toleranță la ierbicid (van Marcke și Angenon, 2013). Astfel de plante mutante au fost observate și în cazul acestor hibridi, cu toate că nivelul de transcript nu a fost foarte scăzut (capitolul 4.1.4). Acesta poate fi efectul mutației dominant-negative în gena *MSH2* la hibridii somatici de cartof. Cu toate că, acești hibridi somatici nu sunt în totalitate deficienți în gena *MSH2* deoarece cartoful parental tetraploid, cv. Delikat nu este deficitar în sistemul reparator ADN.

Astfel, această semi deficiență este deajuns pentru a induce mutații în genomul hibridilor somatici și de a induce recombinare homeologă între secvențe de ADN homeoloage și subsecvent formarea rupturilor de ADN dublu catenar (DSBs). Aceste DSBs sunt necesare pentru recombinarea meiotică. Expresia relativă a genelor *SPO11* (*SPO11-1* și *SPO11-2*) a fost analizată deoarece sunt esențiale în formarea DSBs, la plante, dar cum ele interacționează este încă neclar (Grelon și colab., 2001; Hartung și colab., 2007; Sprink și Hartung, 2014).

Nici unul dintre acești hibridi somatici nu a prezentat o expresie a genelor *SPO11* scăzută.

Cu toate acestea, datele noastre arată că proteina MSH2 este necesară pentru repararea DSBs deoarece nici una din genele *MSH2* sau *SPO11* nu au nivelul transcriptului scăzut în bobocii floralii, la hibridii somatici cu deficiență în sistemul reparator ADN.

O singură excepție în acest fel este hibridul DkDN 5.11, în care nivelul de transcript al genei *MSH2* este scăzut iar al genei *SPO11* este puțin crescută, dar această creștere nu este statistic semnificativă. Datele noastre sugerează o co-regulare a genelor *MSH2* și *SPO11* în bobocii floralii, ceea ce confirmă faptul că proteina MSH2, joacă un rol important în recombinarea meiotică

Câteva studii indică implicarea MSH2 în meioză (Meyer și colab., 2001; Lloyd și colab., 2007; Tam și colab., 2011; Manhart și Alani, 2016; Sarma și colab., 2018).

O co-regulare între *SPO11* și *MSH2* a fost deja descrisă în *S. cerevisiae* (Meyer și colab., 2001).

Mai mult de atât, un element cis (cis-element) cu excepția unei baze azotate este identică cu regiunea 5' de flancare (flanking region) al secvenței *SPO11* și o deleție în acest element cauzează pierderea inducerii *MSH2* în meioză (Meyer și colab., 2001).

În celule ovariene de șoarece a fost observat că proteina MSH2 joacă un rol important în repararea rupturilor ADN-ului dublu catenar (DSBs) în mod neomolog (NHEJ-non homologous end joining) și împiedică reasamblarea capetelor ADN neomoloage (Smith și colab., 2005).

Pe lângă asta, cercetări științifice făcute la fibroblastele de șoarece suportă rolul proteinelor MMR în repararea rupturilor ADN dublu catenare (DSBs) (Bannister și colab., 2004).

4.1.5. Hibridarea genomică *in situ* la hibrizi somatici, în meioză

Hibridarea genomică *in situ* (GISH) este o modificare a hibridării fluorescente *in situ* (FISH) ce permite distingerea a două genomuri diferite de la specii de plante diferite și permite distingerea cromozomilor parentali. *Solanum chacoense* Bitt. este o rudă foarte apropiată cartofului cultivat, *S. tuberosum*. Ambele specii sunt clasificate în secția *Petota*, a patra cladă (Spooner și colab., 2018).

S. tuberosum ($2n = 4x = 48$) are un genom AAAA, pe când *S. chacoense* ($2n = 2x = 24$) are un genom AA. Prin urmare, genomul acestor plante este foarte omolog și o diferențiere a genomului în condiții standard de GISH nu este posibilă. Genomurile ce au o omologie de 80-85% pot fi diferențiate prin tehnici standard. Pe de altă parte, pentru genomurile ce au o omologie de 90-95%, condițiile GISH trebuie îmbunătățite (Silva și Souza, 2013). Astfel îmbunătățiri consistă în creșterea concentrației ADN-ului ce blochează și evitarea utilizării formamidei (Parokony și colab., 1997; Jang și Weiss-Schneeweiss, 2015).

Aceste optimizări au fost pivotale în hibridii somatici de cartof pentru a diferenția genomurile de *S. tuberosum* și *S. chacoense*. Scopul acestui studiu a fost de a evidenția recombinația homeoloagă sau introgresia genelor de rezistență de la *S. chacoense* în hibridii somatici cu deficiență în sistemul reparator ADN, în stadiile primordiale meiotice.

Este foarte bine cunoscut faptul că proteinele MMR suprimă recombinația dintre două secvențe divergente, pe când recombinația meiotică se bazează pe omologia ADN (Bozza și Pawlowski, 2008).

Pentru analiza GISH, s-a ales hibridul somatic cu deficiență în sistemul reparator ADN, DkDN 5.4 ce prezintă instabilitate a microsateiților, fenotip mutant precum și o rezistență crescută al gândacului de Colorado (*Figura 4, Tabelul 1, supliment*).

DkDN 5.4 prezintă o toxicitate și un efect deterent crescut față de gândacul de Colorado, precum planta parentală, *S. chacoense*. Această evidențiază introgresia acestei caracteristici în genofondul hibridului. Markerii SSR cromozom specifici arată moștenirea unor alele cromozom specifice de la *S. chacoense* și cartof (*Figura 4*). Cu ajutorul GISH, în meiocite a fost posibil evidențierea regiunilor cromosomale de la *S. chacoense*, ce formează chiasma cu *S. tuberosum* (*Figura 6*).

În meioza acestui hibrid somatic, s-au observat multe aberații meiotice, cum ar fi formarea de univalenți în diakineză precum și un număr aberant al cromozomilor. În concordanță cu acestea, anterele acestui hibrid somatic conțin polen stafidit la sfârșitul meiozei.

La tomate diploide, ce au gena *MSH2* silențiată, observații similare s-au făcut, unde majoritatea meiocitelor au prezentat meiocite tetraploide și meiocite tetraploide anormale. Doar puține meiocite au prezentat meioză diploidă normală. Pe lângă aceasta, fertilitatea, viabilitatea polenului și producerea de semințe a fost afectată (Sarma și colab., 2018).

Pe lângă asta, hibridii somatici cu deficiență în sistemul de reparare a ADN au o viabilitate a polenului redusă, ceea ce este statistic semnificativ ($p < 0.05$) față de formele parentale. Sterilitatea este în general afectată la plantele ce au o deficiență în sistemul de reparare a ADN (Hoffman și colab., 2004; Sarma și colab., 2018).

Rezultatele noastre sunt similare cu aceste observații. Prin urmare, meioza aberantă și viabilitatea polenului scăzută este co-indusă de activitatea scăzută a proteinei *MSH2* precum și de hibridare somatică. *MSH2* crește semnificativ recombinarea homeologă, și este posibil ca meioza aberantă să fie o cauză a formării deficitare a heterodimerului cu *MSH7*.

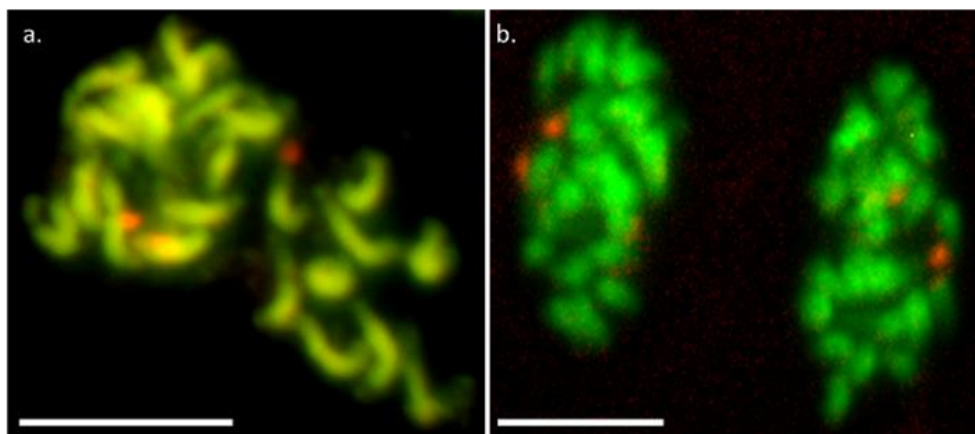


Figura 6. Cromozomi meiotici în hibridul somatic DKDN 5.4; (a) diakineză, (b) anafază I; roșu - *S. chacoense*; verde - *S. tuberosum*; bare 10 μm .

Din câte știm, până în prezent nu a fost raportată o discriminare între doi genomi A de la cartofi, cu excepția hibridilor somatici dintre *S. bulbocastanum* (diploid, 1EBN) și *S. tuberosum* (Iovene și colab., 2007; Rakosy-Tican și colab., 2020). Depășirea barierelor de hibridizare și introgresia genelor de rezistență de la rudele sălbatice sunt de o importanță foarte mare pentru ameliorarea cartofilor. Prin urmare, este foarte importantă urmărirea introgresiei cromozomilor parentali în noul hibrid.

4.1.6. Rezistența hibridilor somatici deficienți în sistemul reparator ADN la gândacul de Colorado

S. chacoense este o plantă înrudită cu cartoful și are în genofond foarte multe gene de rezistență, incluzând rezistență la gândacul de Colorado (Sinden și colab., 1986; Brown și Thomas, 1994; Hawkes, 1994).

Rezistența la gândacul de Colorado este data de abilitatea acestei plante de a produce glicoalcaloizi steroidici (SGA) ce sunt numite leptine (Sinden și colab., 1986; Brown și Thomas, 1994; Hawkes, 1994). Leptinele au o activitate anticolinesterazică, prin urmare o concentrație de un nmol este îndeajuns pentru a avea activitate deterentă și toxică față de gândacul de Colorado (Sinden și colab., 1980; Sinden și colab., 1986; Ronning și colab., 1999; Rangarajan și colab., 2000; Yenko și colab., 2000; Dinkins și Peterson, 2008). Leptinele sunt sintetizate doar în materialul foliar al plantei și sunt absente în tuberculi, de aceea calitatea acestora nu este afectată, acest caracter este important pentru consum și piață (Veilleux și Miller, 1998).

Pentru analiza rezistenței acestor hibridi la gândacul de Colorado, un test de antibioză și antixenoză a fost efectuat. S-a observat că hibridii somatici de cartof cu o deficiență în sistemul reparator ADN prezintă o mai bună rezistență la gândacul de Colorado (*Tabelul 1*). Prin urmare acest caracter din *S. chacoense* a fost introdus eficient în genofondul hibridilor somatici.

Aceste date au fost publicate în:

Molnár, I., **Besenyi, E.**, Thieme, R., Thieme, T., Aurori, A., Baricz, A., et al. (2017). Mismatch repair deficiency increases the transfer of antibiosis and antixenosis properties against Colorado potato beetle in somatic hybrids of *Solanum tuberosum* + *S. chacoense*. *Pest management science* 73, 1428–1437. doi: 10.1002/ps.4473.

4.2. Inducerea de mutații în gena *MSH2* cu ajutorul CRISPR/Cas9

4.2.1. Testul clivajului ADN *in vitro*

Am construit mai multe sgRNA-uri (single guide RNAs) pentru gena *MSH2*, folosind platforma on-line CCTop-CRISPR/Cas9 pentru a prezice efectele posibile “off-target” (Stemmer și colab., 2015; Labuhn și colab., 2018). sgRNA-urile cu efecte posibile “off-target” scăzute au fost utilizate pentru a evalua abilitatea de scindare a fiecărui sgRNA, folosind un test de scindare *in vitro*. Toate sgRNA-urile utilizate în acest studiu au fost construite ca protospacerul să corespundă secvenței țintă de 20 nucleotide în gena *MSH2* și să creeze scindarea ADN-ului la 3 nucleotide în amonte de motivul protospacer adiacent (PAM-protospacer adjacent motif).

Pentru a ținti gena *MSH2* care se găsește pe cromozomul șase al cartofului, am ales șase sgRNAs pentru testul *in vitro* (Figura 7). Pe exonul trei este localizat sgRNA2, pe exonul 4 este localizat sgRNA5 și sgRNA10 și respectiv pe exonul 5 este localizat sg RNA22 (Figura 7).

Următoarele două sgRNAs, sgRNA32 și sgRNA38 sunt localizate pe exonul 12 și respectiv 13 (Figura 7).

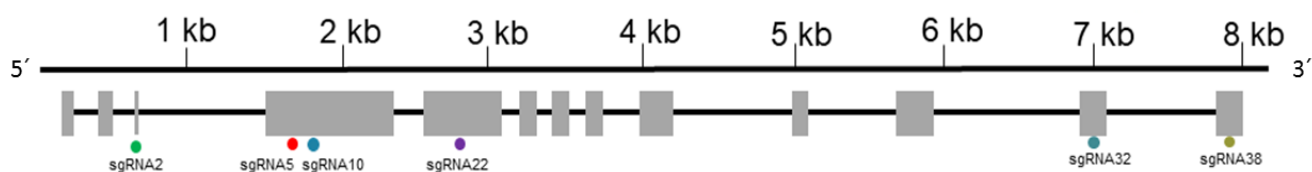


Figura 7. Reprezentarea schematică a genei *MSH2*, cu blocuri gri sunt reprezentate secvențele exonilor iar cu linii negre sunt reprezentate secvențele intronilor. Bulinele reprezintă protospacerul sgRNA-urilor utilizate în experimente.

Toate sgRNA-urile testate au fost capabile de a cliva produsul de PCR al genei *MSH2* de la cartof dar prezentând eficiență diferită *in vitro* (Figura 8). sgRNA2 și sgRNA38 prezintă o eficiență foarte bună, de aceea au fost alese pentru transfecția protoplastelor de cartof și transformarea mediată de *Agrobacterium tumefaciens* în cartof.

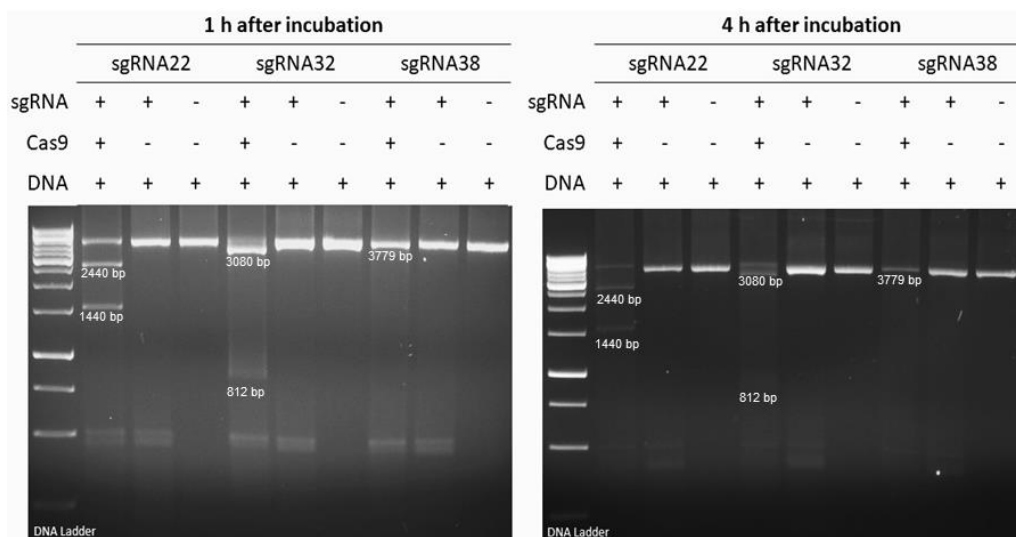


Figura 8. Testarea *in vitro* a sgRNA-urilor după o incubare de 1 oră și 4 ore cu Cas9 și diferite sgRNA-uri.

4.2.2. Editarea genomului fără a utiliza ADN exogen în protoplastele de cartofi

Ingenieria genetică este o tehnică eficientă de a introduce trăsături agronomice importante pentru îmbunătățirea cartofului. Inducerea mutațiilor în genele țintă utilizând sgRNA sintetizate *in vitro*, preasamblate cu endonuclează Cas9 care împreună formează complexul ribonucleoproteic (RNP) este benefică deoarece se evită integrarea stabilă a ADN-ului străin în genom.

Acest lucru este foarte important datorită reglementărilor legislative. Unele țări tind spre un sistem de reglementare bazat pe procesul de transformare al plantei, cum ar fi Europa, Australia, Noua Zeelandă și India (Friedrichs și colab., 2019).

Pentru ameliorarea plantelor, editarea genomului fără a utiliza ADN străin, este o metodă foarte recentă care încă necesită optimizare pentru a crește eficiența și specificitatea metodei.

Prin urmare, editarea genomului fără a utiliza ADN exogen, necesită optimizarea regenerării culturilor recalcitrante.

Folosind ribonucleoproteinele CRISPR/Cas9 (RNPs) am vizat gena *MSH2* a cartofului. Această genă joacă un rol important în recombinarea și repararea ADN-ului. Pentru a atinge acest obiectiv, am izolat protoplaste mezofiliene de cartof și am făcut transfecții folosind ribonucleoproteine. Pentru izolare și regenerare am utilizat o metodă stabilită deja (Thieme și colab., 2008).

Cu toate acestea, regenerarea protoplastelor de cartof după transfecția cu polietilenglicol și ribonucleoproteine (RNPs) cu nu a fost de succes, deși regenerarea protoplastelor de cartof fără a utiliza RNPs a funcționat foarte bine (Figura 9-E, F). Editarea genomului fără ADN exogen la

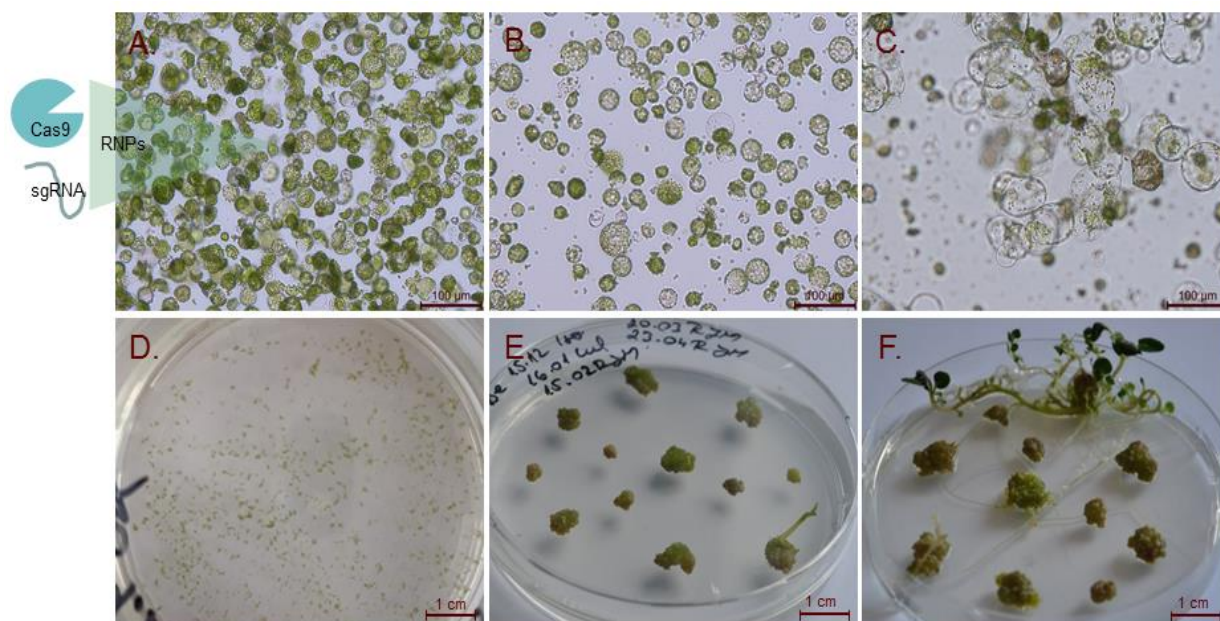


Figura 9. Reprezentarea schematic a transfecției cu ribonucleoproteine (Cas9 și sgRNA) în protoplastele de cartofi pentru a produce plante editate fără transgenă. **(A)** Protoplaste ce sunt transfectate cu RNPs utilizând PEG. **(B)** Protoplaste proaspăt izolate transferate în mediu de regenerare. **(C)** Protoplaste după două săptămâni de la transfecție, peretele celular este refăcut. **(D)** Protoplaste patru săptămâni după transfecție. **(E)** Protoplaste patru luni după izolare. **(F)** Plantule regenerate 5 luni după izolarea protoplastelor.

cartofi cu RNP prin transfecție PEG a fost raportată ca fiind de succes de către alte grupuri de cercetare (Andersson și colab., 2017; González și colab., 2020). Regenerarea protoplastelor după transfecția cu RNPs a fost eficientă (Andersson și colab., 2017; González și colab., 2020) dar s-a utilizat o altă metodă, protoplastele au fost încorporate în alginat după transfecția cu PEG.

După transfecția protoplastelor de cartof, utilizând sgRNA2 și sgRNA38, ADN-ul din protoplaste a fost izolat și regiunile țintă au fost secvențate. Diferite mutații au fost observate 3 nucleotide în amonte de secvența PAM.

În concluzie, metoda de transfecție cu PEG a fost de succes, dar metoda de regenerare a platelor necesită optimizare pentru a putea regenera plante mutante. Pe lângă asta, utilizând un mediu lichid de regenerare este mult mai avantajos, deoarece în oricare din pașii de cultivare diferite intervenții se pot face, fără a deranja protoplastele, iar aceasta nu ar fi posibilă dacă ar fi incorporate în alginat.

4.2.3. Transformarea mediată de *Agrobacterium tumefaciens* la cartof

În acest studiu, transformarea mediată de *Agrobacterium* a fost efectuată utilizând vectorul binar pDECas9 T-DNA (Fauser și colab., 2014) pentru a introduce endonucleaza Cas9 și sgRNA în plante. Odată pătrunse în plantă, componentele vectorului T-DNA binar sunt exprimate și T-DNA se integrează în genomul plantei rezultând plante transformate genetic.

Utilizând tulpina de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101-pMP90RK și vectorul binar pDECas9 și sgRNA țintind exonul 3 și 13 a genei *MSH2* al cartofului, am reușit să obținem cinci linii transgenice cu sgRNA2. Cu ajutorul sgRNA38, nu am reușit să regenerăm nicio planta, calusurile regenerate nu au dezvoltat plante, chiar dacă în primele stadii au regenerat normal.

Pentru experimentul de transformare genetică am utilizat internozi de cartofi a căror regenerare a fost de success. Cele cinci linii transgenice de cartof, regenerate ce au țintit mutarea exonului 3 (DksgRNA2), au fost secvențate pentru a verifica dacă mutații au apărut din urma transformării genetice. În două linii transgenice, modificări în secvența țintă au fost observate, iar în celelalte trei linii transgenice nu a fost detectată nicio mutație în regiunea țintă. În exonul 3 o deleție de trei nucleotide a fost observată în amonte de motivul PAM, această deleție schimbă cadrul de citire (ORF) al genei *MSH2* (Figure 10). În cea de-a doua linie, o substituție a fost observată, ca și în cazul exonului 13, ce a fost transformat utilizând constructul ce conține sgRNA38 (Figure 10).

Nu a fost posibil regenerarea plantelor după co-cultura cu *A. tumefaciens*, ce a avut transgena sgRNA38 pentru a produce mutații în exonul 13. Calusurile obținute au murit înainte ca plantulele să fi regenerat. Cu toate acestea, dintr-un calus salvat, ADN-ul a fost izolat și secvențat în regiunea țintă și s-a găsit o substituție. Această substituție modifică cadrul proteinei MSH2 într-o regiune puternic conservată, în regiunea terminală C (Figura 7) care este un domeniu de legare a ATP/ADP.

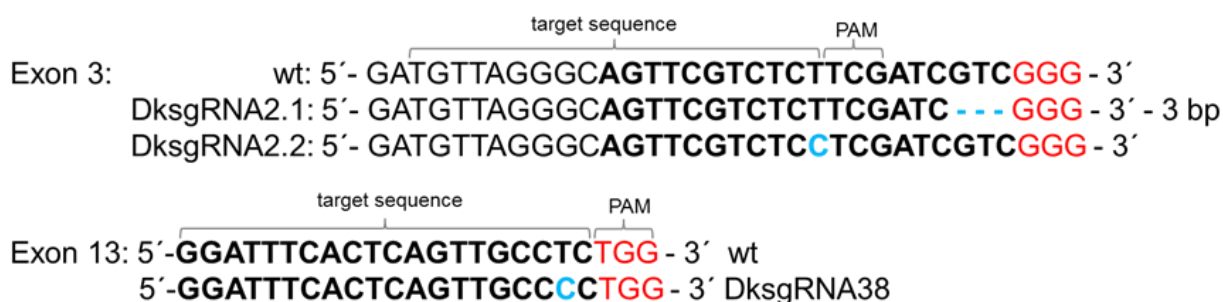


Figure 10. Mutații în exonul 3 (DksgRNA2) și 13 (DksgRNA38) a genei *MSH2* în genotipurile regenerate după transformarea *A. tumefaciens*, determinat prin secvențare.

Domeniul de legare ATP/ADP este necesară pentru corectarea nepotrivirilor și pentru legarea de bazele nepotrivite din ADN (Bowers și colab., 1999; Dufner și colab., 2000). Mai mult decât atât, o mutație în domeniul de legare a ATP/ADP, la șoarece se asociază cu proliferare tumorală (Lin și colab., 2004). Formarea complexul MutS-DNA este dependent de ATP (Iyer și colab., 2006). Este posibil ca în plante, pierderea domeniului de legare a ATP a acestei proteine nu este compatibilă cu viața. Aceasta poate explica de ce nu a fost posibilă regenerarea plantelor cu mutații în acest domeniu. În timpul regenerării, fenotipuri mutante au fost observate după inducerea de mutații în exonul 3 (DksgRNA2). Aceste fenotipuri mutante s-au rezumat la plantule albino deformat (Figura 11). De la aceste plantule nu a fost posibilă regenerarea de plante viabile.

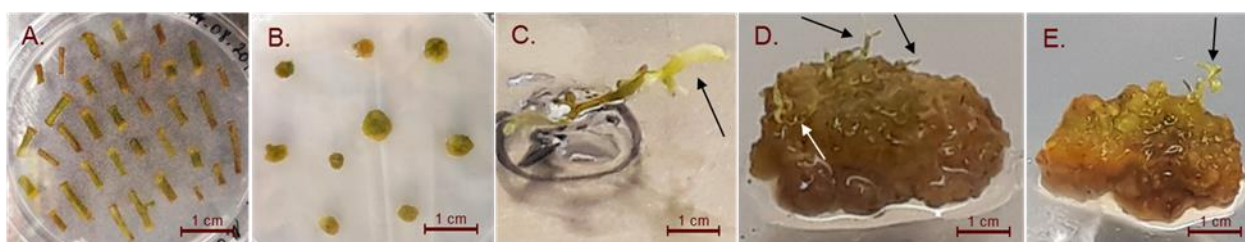


Figura 11. Editarea cartofului cu CRISPR/Cas9, cu ajutorul *Agrobacterium*, țintind gena *MSH2* în exonul 3 (A) inducere de calus, (B) regenerarea calusului, (C-E) fenotipuri mutante de cartofi obținute în timpul regenerării.

Având în vedere că suprimarea genei *MSH2* duce la o frecvență crescută a mutațiilor în genom, ce constă în apariția inserțiilor și delețiilor (indels) și a mutațiilor în SNV (single nucleotide variant), acesta ar putea explica apariția fenotipului mutant la cartof în timpul procesului de regenerare (Belfield et al., 2018). Himere albinotice au fost observate în plante de cartofi editate, unde meristemul apical a fost complet alb, fără frunze adevărate (Figura 11-C, D) și cu frunze albino (Figura 11-E).

Aceste date corespund cu cele observate în *N. tabacum* și *N. plumbaginifolia* unde gena *MSH2* a fost silențiată. În acest caz, secțiuni mari și albe au fost observate la primele perechi de frunze, ceea ce a apărut mult mai rar în cotiledoane (van Marcke și Angenon, 2013). Mai mult decât atât, creștere pleiotropică, defecte de dezvoltare cum ar fi muguri nedezvoltate, muguri fără frunze, fenotip steril și diviziunea celulară scăzută au fost observate în mușchi la *Physcomitrella patens* care au avut o mutație în gena *MSH2* (Trouiller și colab., 2006).

Editarea genomului cu *A. tumefaciens* este cea mai convenabilă și utilizată tehnică de editare a genomului la multe specii. Cu toate acestea, în cartofi este o provocare din cauza integrării

transgenei și a propagării clonale. Pentru eliminarea transgeni, în mod normal plantele se autoîncrucișează, dar multe soiuri de cartofi sunt incompatibile cu autoîncrucișarea.

Dezvoltarea unei tehnici de editare a genomului fără ADN exogen este crucială pentru cartof. În acest studiu, am arătat că editarea genomului folosind *A. tumefaciens* și editarea genomului fără ADN exogen sunt ambele metode fiabile pentru transformarea cartofului. Cu toate acestea, editarea genomului fără ADN prezintă un avantaj față de transformarea mediată de *Agrobacterium*, dar sunt necesare optimizări ale regenerării plantelor.

Capitolul 5. Concluzii generale

Am dovedit că nivelul de transcriere al genei *MSH2* în hibridii somatici cu deficiență în sistemul de reparare ADN (MMR) a fost mult mai scăzut decât în cazul plantelor de tip sălbatic, ceea ce explică deficiența de MMR.

În mugurii florali al hibridilor somatici s-a arătat că proteinele inițiatore a recombinării meiotice, SPO11 sunt co-reglate cu *MSH2*, ceea ce indică rolul *MSH2* în meioză.

Cu toate acestea, am arătat că această semi-deficiență la hibridii somatici este suficientă pentru a induce mutații în genomul hibridilor și pentru a crește recombinarea homeologă între secvențele homeologe.

Am dovedit recombinarea homeoloagă între *S. chacoense* și *S. tuberosum*, în meioza timpurie, la hibridul somatic DkDN 5.4, unde apare un cromozom de tip Y, indicând formarea chiasmei între cromozomii heterologi.

Pe lângă asta, meioză aberantă și viabilitatea polenului foarte scăzută a fost observată la hibridii somatici deficienți în MMR. Toate aceste caracteristici corespund modelului deficienței MMR.

Testând hibridii somatici pentru integrarea transgenei, după șapte ani de când au fost produși, s-a demonstrat că din 22 de hibridi somatici testați, 13 au pierdut transgena (*NPTII*). Aceasta este o caracteristică foarte utilă, deoarece aceste plante ar putea fi folosite ca material pentru ameliorare. De exemplu, hibridul DkDN 11.10 are rezistență la gândacul de Colorado, dar nu mai conține transgena.

S-a demonstrat că hibridii somatici cu deficiență în MMR sunt mai rezistente la gândacul de Colorado, decât cartoful cultivat (Molnár și colab., 2017). Mai mult decât atât, hibridul somatic DkDN 5.4 a arătat o rezistență puternică la gândacul de Colorado, similar cu *S. chacoense*.

Analiza fenotipică a hibridilor somatici cu deficiență în MMR a relevat o frecvență ridicată a fenotipurilor mutante precum: plante pitice, frunze mici și unite, înflorire timpurie, fără formare de flori și viabilitate scăzută a polenului, iar acestea nu pot fi explicate doar prin natura lor hibridă.

Aici am descris, o metodă eficientă de editare a genomului fără ADN exogen, precum și o transformare cu CRISPR/Cas9 folosind *A. tumefaciens*.

Cu ajutorul acestei tehnici am reușit să inactivăm parțial gena *MSH2*, obținând plante de cartof cu fenotip mutant. Pentru editarea genomului, sunt necesare și alte optimizări pentru a crește eficiența plantelor transformate și regenerarea plantelor din protoplastele de cartofi.

Editarea genomului fără ADN exogen oferă o perspectivă foarte bună pentru a crește rezistența cartofului la stresul biotic și abiotic asociat cu trăsăturile monogene.

Având în vedere trăsăturile poligenice, preconizăm utilitatea inducerii deficienței în sistemul reparator ADN, pentru dobândirea unei variabilități genetice necesare în plantele vizate, prin creșterea mutațiilor și recombinarea homeologă.

Cuvinte de mulțumire

În primul rând, aș dori să mulțumesc Prof. Dr. Elena Rakosy pentru includerea mea în grupul ei de cercetare. Aș dori să-mi exprim recunoștința mea sinceră pentru sprijinul acordat pe perioada studiului meu de doctorat și de cercetare. Coordonarea ei m-a ajutat să fac și să scriu această teză de doctorat.

În afară de asta, îi sunt foarte recunoscătoare lui Dr. Frank Hartung pentru că a permis să-mi petrec o perioadă de bursă îndelungată muncind în laboratorul său. Aș dori să mulțumesc lui Dr. Thorben Sprink pentru mentoratul excepțional acordat în timpul bursei mele de lungă durată și în timpul activității mele de cercetare.

Îi sunt foarte recunoscătoare lui Dr. Björn Krenz, care este de fapt liderul meu. Mulțumesc pentru discuțiile constructive și motivația acordată în timpul activității mele de cercetare.

Doresc să mulțumesc lui Katrin Schulze și Astrid Bruchmüller pentru sfaturile și ajutorul acordat în laborator. Aș dori să mulțumesc grupului de bioinformatică de la Institutul Julius-Kühn pentru ajutorul acordat în analiza transcriptomului.

Multe mulțumiri merg la toți colegii mei de la Julius-Kühn Institut, Universitatea Babes-Bolyai și DSMZ.

Pe lângă aceasta, aș dori să mulțumesc colaboratorilor noștri: Dr. Ramona Thieme, Dr. Gabriella Linc și Dr. Thomas Thieme.

Mulțumesc mentorilor, pentru educația excelentă acordată, într-un mediu științific stimulat. Apreciez discuțiile constructive și sprijinul acordat în realizarea muncii mele.

Doresc să mulțumesc unchiului meu Dr. Nagy-Toth Ferenc pentru că m-a îndrumat pe căile cercetării științifice.

La final, dar nu în ultimul rând, doresc să mulțumesc părinților mei și soțului meu pentru tot sprijinul și motivația, pe care mi-le dau. Multe mulțumiri merg la părinții mei adoptivi, Karin și Jürgen Ruprecht.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- Alyokhin, A. (2008). Colorado potato beetle management on potatoes: current challenges and future prospects. *Fruit, Vegetable Cereal Sci Biotechnol*, 10–19.
- Andersson, M., Turesson, H., Nicolia, A., Fält, A.-S., Samuelsson, M., and Hofvander, P. (2017). Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep* 36, 117–128. doi: 10.1007/s00299-016-2062-3
- Bannister, L. A., Waldman, B. C., and Waldman, A. S. (2004). Modulation of error-prone double-strand break repair in mammalian chromosomes by DNA mismatch repair protein Mlh1. *DNA Repair (Amst)* 3, 465–474. doi: 10.1016/j.dnarep.2004.01.001
- Belfield, E. J., Ding, Z. J., Jamieson, F. J. C., Visscher, A. M., Zheng, S. J., Mithani, A., et al. (2018). DNA mismatch repair preferentially protects genes from mutation. *Genome Res* 28, 66–74. doi: 10.1101/gr.219303.116
- Bowers, J., Sokolsky, T., Quach, T., and Alani, E. (1999). A mutation in the MSH6 subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* MSH2-MSH6 complex disrupts mismatch recognition. *J Biol Chem* 274, 16115–16125. doi: 10.1074/jbc.274.23.16115
- Bozza, C. G., and Pawlowski, W. P. (2008). The cytogenetics of homologous chromosome pairing in meiosis in plants. *Cytogenet Genome Res* 120, 313–319. doi: 10.1159/000121080
- Broer, I. (1996). Stress inactivation of foreign genes in transgenic plants. *Field Crops Research* 45, 19–25. doi: 10.1016/0378-4290(95)00055-0
- Brown, C. R., and Thomas, P. E. (1994). Resistance to potato leafroll virus derived from *Solanum chacoense*: characterization and inheritance. *Euphytica* 74, 51–57. doi: 10.1007/BF00033767
- Burlingame, B., Mouillé, B., and Charrondière, R. (2009). Nutrients, bioactive non-nutrients and anti-nutrients in potatoes. *Journal of Food Composition and Analysis* 22, 494–502. doi: 10.1016/j.jfca.2009.09.001
- Castañeda-Álvarez, N. P., Khoury, C. K., Achicanoy, H. A., Bernau, V., Dempewolf, H., Eastwood, R. J., et al. (2016). Global conservation priorities for crop wild relatives. *Nat Plants* 2, 16022. doi: 10.1038/nplants.2016.22
- Chao, Q., Sullivan, C. D., Getz, J. M., Gleason, K. B., Sass, P. M., Nicolaides, N. C., et al. (2005). Rapid generation of plant traits via regulation of DNA mismatch repair. *Plant Biotechnol J* 3, 399–407. doi: 10.1111/j.1467-7652.2005.00133.x
- Chen, Q. (2004). Interspecific crossability and cytogenetic analysis of sexual progenies of Mexican wild diploid 1EBN species *Solanum pinnatisectum* and *S. cardiophyllum*. *American Journal of Potato Research* 81, 159–169. doi: 10.1007/BF02853614
- Chen, Q., Li, H. Y., Shi, Y. Z., Beasley, D., Bizimungu, B., and Goettel, M. S. (2008). Development of an effective protoplast fusion system for production of new potatoes with disease and insect resistance using Mexican wild potato species as gene pools. *Can. J. Plant Sci.* 88, 611–619. doi: 10.4141/CJPS07045
- Chen, W., and Jinks-Robertson, S. (1999). The role of the mismatch repair machinery in regulating mitotic and meiotic recombination between diverged sequences in yeast. *Genetics* 151, 1299–1313.
- Crick, F. (1974). The double helix: a personal view. *Nature* 248, 766–769.
- Datta, A., Adjiri, A., New, L., Crouse, G. F., and Jinks Robertson, S. (1996). Mitotic crossovers between diverged sequences are regulated by mismatch repair proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 1085–1093. doi: 10.1128/mcb.16.3.1085

- Datta, A., Hendrix, M., Lipsitch, M., and Jinks-Robertson, S. (1997). Dual roles for DNA sequence identity and the mismatch repair system in the regulation of mitotic crossing-over in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 9757–9762. doi: 10.1073/pnas.94.18.9757
- Depeiges, A., Farget, S., Degroote, F., and Picard, G. (2005). A new transgene assay to study microsatellite instability in wild-type and mismatch-repair defective plant progenies. *Plant Science* 168, 939–947. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.11.006
- Dinkins, C. L. P., and Peterson, R. K. D. (2008). A human dietary risk assessment associated with glycoalkaloid responses of potato to Colorado potato beetle defoliation. *Food and Chemical Toxicology* 46, 2837–2840. doi: 10.1016/j.fct.2008.05.022
- Dong, Z., Wang, H., Dong, Y., Wang, Y., Liu, W., Miao, G., et al. (2013). Extensive microsatellite variation in rice induced by introgression from wild rice (*Zizania latifolia* Griseb.). *PLoS ONE* 8, e62317. doi: 10.1371/journal.pone.0062317
- Dufner, P., Marra, G., Räschle, M., and Jiricny, J. (2000). Mismatch recognition and DNA-dependent stimulation of the ATPase activity of hMutSalpha is abolished by a single mutation in the hMSH6 subunit. *J Biol Chem* 275, 36550–36555. doi: 10.1074/jbc.M005987200
- Elliott, B., and Jasin, M. (2001). Repair of double-strand breaks by homologous recombination in mismatch repair-defective mammalian cells. *Mol Cell Biol* 21, 2671–2682. doi: 10.1128/MCB.21.8.2671-2682.2001
- Ewing, E. E., Šimko, I., Smart, C. D., Bonierbale, M. W., Mizubuti, E. S.G., May, G. D., et al. (2000). Genetic mapping from field tests of qualitative and quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in a population derived from *Solanum tuberosum* and *Solanum berthaultii*. *Mol Breeding* 6, 25–36. doi: 10.1023/A:1009648408198
- Fausser, F., Schiml, S., and Puchta, H. (2014). Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 79, 348–359. doi: 10.1111/tpj.12554
- Friedrichs, S., Takasu, Y., Kearns, P., Dagallier, B., Oshima, R., Schofield, J., et al. (2019). An overview of regulatory approaches to genome editing in agriculture. *Biotechnology Research and Innovation* 3, 208–220. doi: 10.1016/j.biori.2019.07.001
- Gadgil, R., Barthelemy, J., Lewis, T., and Leffak, M. (2017). Replication stalling and DNA microsatellite instability. *Biophys Chem* 225, 38–48. doi: 10.1016/j.bpc.2016.11.007
- Ghislain, M., and Douches, D. S. (2020). “The Genes and Genomes of the Potato,” in *The potato crop: Its agricultural, nutritional and social contribution to humankind*, eds. H. A. Campos, and O. Ortiz (Cham, Switzerland: Springer), 139–162.
- González, M. N., Massa, G. A., Andersson, M., Turesson, H., Olsson, N., Fält, A.-S., et al. (2020). Reduced enzymatic browning in potato tubers by specific editing of a polyphenol oxidase gene via ribonucleoprotein complexes delivery of the CRISPR/Cas9 system. *Front. Plant Sci.* 10, 117. doi: 10.3389/fpls.2019.01649
- Grelon, M., Vezon, D., Gendrot, G., and Pelletier, G. (2001). AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J* 20, 589–600. doi: 10.1093/emboj/20.3.589
- Guedes, M. L., Haynes, K. G., Vinyard, B. T., and Pinto, C. A. B. P. (2019). Heat tolerance in diploid wild potato species *in vitro*. *Am. J. Pot Res* 96, 294–302. doi: 10.1007/s12230-019-09716-9
- Harms, C. T. (1983). Somatic incompatibility in the development of higher plant somatic hybrids. *The Quarterly Review of Biology* 58, 325–353. doi: 10.1086/413384
- Hartung, F., Wurz-Wildersinn, R., Fuchs, J., Schubert, I., Suer, S., and Puchta, H. (2007). The catalytically active tyrosine residues of both SPO11-1 and SPO11-2 are required for meiotic

- double-strand break induction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 3090–3099. doi: 10.1105/tpc.107.054817
- Hawkes, J. G. (1990). *The potato: Evolution, biodiversity and genetic resources*. London: Belhaven.
- Hawkes, J. G. (1994). Origins of cultivated potatoes and species relationships . In: Bradshaw, J. E. and Mackay, G. R. (eds) *Potato Genetics*, pp. 3-42, CAB International, Wallingford.
- Hijmans, R. J., and Spooner, D. M. (2001). Geographic distribution of wild potato species. *Am. J. Bot.* 88, 2101–2112. doi: 10.2307/3558435
- Hoffman, P. D., Leonard, J. M., Lindberg, G. E., Bollmann, S. R., and Hays, J. B. (2004). Rapid accumulation of mutations during seed-to-seed propagation of mismatch-repair-defective *Arabidopsis*. *Genes Dev* 18, 2676–2685. doi: 10.1101/gad.1217204
<https://cipotato.org/>.
- Iovene, M., Savarese, S., Cardi, T., Frusciante, L., Scotti, N., Simon, P. W., et al. (2007). Nuclear and cytoplasmic genome composition of *Solanum bulbocastanum* (+) *S. tuberosum* somatic hybrids. *Genome* 50, 443–450. doi: 10.1139/G07-024
- Ispas, G. (2004). *Role of the mismatch repair protein MSH2 in maintenance of genome stability in plants*.
- Iyer, R. R., Pluciennik, A., Burdett, V., and Modrich, P. L. (2006). DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev* 106, 302–323. doi: 10.1021/cr0404794
- Jang, T.-S., and Weiss-Schneeweiss, H. (2015). Formamide-free genomic *in situ* hybridization allows unambiguous discrimination of highly similar parental genomes in diploid hybrids and allopolyploids. *Cytogenet Genome Res* 146, 325–331. doi: 10.1159/000441210
- Jansky, S. H., Simon, R., and Spooner, D. M. (2009). A test of taxonomic predictivity: resistance to the Colorado potato beetle in wild relatives of cultivated potato. *J Econ Entomol* 102, 422–431. doi: 10.1603/029.102.0155
- Jiang, M., Wu, X., Song, Y., Shen, H., and Cui, H. (2020). Effects of OsMSH6 mutations on microsatellite stability and homeologous recombination in rice. *Front Plant Sci* 11, 220. doi: 10.3389/fpls.2020.00220
- Koorneef, M., Elgersma, A., Hanhart, C. J., Loenen-Martinet, E. P., Rijn, L., and Zeevaart, J. A. D. (1985). A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 65, 33–39. doi: 10.1111/j.1399-3054.1985.tb02355.x
- Labuhn, M., Adams, F. F., Ng, M., Knoess, S., Schambach, A., Charpentier, E. M., et al. (2018). Refined sgRNA efficacy prediction improves large- and small-scale CRISPR-Cas9 applications. *Nucleic Acids Res* 46, 1375–1385. doi: 10.1093/nar/gkx1268
- Lafleuriel, J., Degroote, F., Depeiges, A., and Picard, G. (2007). Impact of the loss of AtMSH2 on double-strand break-induced recombination between highly diverged homeologous sequences in *Arabidopsis thaliana* germinal tissues. *Plant Mol Biol* 63, 833–846. doi: 10.1007/s11103-006-9128-5
- Leisner, C. P., Hamilton, J. P., Crisovan, E., Manrique-Carpintero, N. C., Marand, A. P., Newton, L., et al. (2018). Genome sequence of M6, a diploid inbred clone of the high-glycoalkaloid-producing tuber-bearing potato species *Solanum chacoense*, reveals residual heterozygosity. *Plant J* 94, 562–570. doi: 10.1111/tpj.13857
- Leonard, J. M., Bollmann, S. R., and Hays, J. B. (2003). Reduction of stability of *Arabidopsis* genomic and transgenic DNA-repeat sequences (microsatellites) by inactivation of AtMSH2 mismatch-repair function. *Plant Physiol* 133, 328–338. doi: 10.1104/pp.103.023952

- Lin, D. P., Wang, Y., Scherer, S. J., Clark, A. B., Yang, K., Avdievich, E., et al. (2004). An Msh2 point mutation uncouples DNA mismatch repair and apoptosis. *Cancer Res* 64, 517–522. doi: 10.1158/0008-5472.can-03-2957
- Lloyd, A. H., Milligan, A. S., Langridge, P., and Able, J. A. (2007). TaMSH7: a cereal mismatch repair gene that affects fertility in transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Plant Biol* 7, 67. doi: 10.1186/1471-2229-7-67
- Machida-Hirano, R. (2015). Diversity of potato genetic resources. *Breeding science* 65, 26–40. doi: 10.1270/jsbbs.65.26
- Maharijaya, A., and Vosman, B. (2015). Managing the Colorado potato beetle; the need for resistance breeding. *Euphytica* 204, 487–501. doi: 10.1007/s10681-015-1467-3
- Manhart, C. M., and Alani, E. (2016). Roles for mismatch repair family proteins in promoting meiotic crossing over. *DNA Repair (Amst)* 38, 84–93. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.11.024
- Meyer, C., Scheller, J., and Kramer, W. (2001). Transcription of mutS- and mutL-homologous genes during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of a regulatory cis-element for meiotic induction of MSH2. *Mol Genet Genomics* 265, 826–836. doi: 10.1007/s004380100477
- Molnár, I., Besenyei, E., Thieme, R., Thieme, T., Aurori, A., Baricz, A., et al. (2017). Mismatch repair deficiency increases the transfer of antibiosis and antixenosis properties against Colorado potato beetle in somatic hybrids of *Solanum tuberosum* + *S. chacoense*. *Pest Manag Sci* 73, 1428–1437. doi: 10.1002/ps.4473
- Naess, S. K., Bradeen, J. M., Wielgus, S. M., Haberlach, G. T., McGrath, J. M., and Helgeson, J. P. (2000). Resistance to late blight in *Solanum bulbocastanum* is mapped to chromosome 8. *Theor Appl Genet* 101, 697–704. doi: 10.1007/s001220051533
- Naess, S. K., Bradeen, J. M., Wielgus, S. M., Haberlach, G. T., McGrath, J. M., and Helgeson, J. P. (2001). Analysis of the introgression of *Solanum bulbocastanum* DNA into potato breeding lines. *Mol Genet Genomics* 265, 694–704. doi: 10.1007/s004380100465
- Negritto, M. T., Wu, X., Kuo, T., Chu, S., and Bailis, A. M. (1997). Influence of DNA sequence identity on efficiency of targeted gene replacement. *Mol Cell Biol* 17, 278–286. doi: 10.1128/mcb.17.1.278
- Nicholson, A., Hendrix, M., Jinks-Robertson, S., and Crouse, G. F. (2000). Regulation of mitotic homeologous recombination in yeast. Functions of mismatch repair and nucleotide excision repair genes. *Genetics* 154, 133–146.
- Nicolaides, N. C., Littman, S. J., Modrich, P., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). A naturally occurring hPMS2 mutation can confer a dominant negative mutator phenotype. *Mol Cell Biol* 18, 1635–1641. doi: 10.1128/MCB.18.3.1635
- Parokonny, A. S., Marshall, J. A., Bennett, M. D., Cocking, E. C., Davey, M. R., and Power, J. B. (1997). Homoeologous pairing and recombination in backcross derivatives of tomato somatic hybrids [*Lycopersicon esculentum* (+) *L. peruvianum*]. *Theor Appl Genet* 94, 713–723. doi: 10.1007/s001220050470
- Pelletier, Y., Horrgan, F. G., and Pompon, J. (2011). Potato resistance to insects. *The Americas Journal of Plant Science and Biotechnology*, 37–52.
- Rakosy-Tican, E., Lörincz-Besenyei, E., Molnár, I., Thieme, R., Hartung, F., Sprink, T., et al. (2019). New phenotypes of potato co-induced by Mismatch repair deficiency and somatic hybridization. *Front Plant Sci* 10, 3. doi: 10.3389/fpls.2019.00003
- Rakosy-Tican, E., Thieme, R., König, J., Nachtigall, M., Hammann, T., Denes, T.-E., et al. (2020). Introgression of two broad-spectrum late blight resistance genes, Rpi-Blb1 and Rpi-Blb3, from

- Solanum bulbocastanum* Dun plus race-specific R genes into potato pre-breeding lines. *Front Plant Sci* 11, 699. doi: 10.3389/fpls.2020.00699
- Rakosy-Tican, L., Aurori, A., Aurori, M. C., 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*, 119–127.
- Rangarajan, A., Miller, A. R., and Veilleux, R. E. (2000). Leptine glycoalkaloids reduce feeding by Colorado potato beetle in diploid *Solanum* sp. Hybrids. *J. AMER. SOC. HORT. SCI.* 2000, 689–693.
- Rayssiguier, C., Thaler, D. S., and Radman, M. (1989). The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* 342, 396–401. doi: 10.1038/342396a0
- Reynolds, M. P., and Ewing, E. E. (1989). Heat tolerance in tuber bearing *Solanum* species: A protocol for screening. *American Potato Journal* 66, 63–74. doi: 10.1007/BF02854425
- Rokka, V.-M., Lapitan, N. L. V., Knudson, D. L., and Pehu, E. (1998). Fluorescence *in situ* hybridization of potato somatohaploids and their somatic hybrid donors using two *Solanum brevidens* specific sequences. *AFSci* 7, 31–38. doi: 10.23986/afsci.72853
- Ronning, C. M., Stommel, J. R., Kowalski, S. P., Sanford, L. L., Kobayashi, R. S., and Pineada, O. (1999). Identification of molecular markers associated with leptine production in a population of *Solanum chacoense* Bitter. *Theor Appl Genet* 98, 39–46. doi: 10.1007/s001220051037
- Sarma, S., Pandey, A. K., Sharma, K., Ravi, M., Sreelakshmi, Y., and Sharma, R. (2018). MutS-Homolog2 silencing generates tetraploid meiocytes in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Direct* 2, e00017. doi: 10.1002/pld3.17
- Silva, G. S., and Souza, M. M. (2013). Genomic *in situ* hybridization in plants. *Genet Mol Res* 12, 2953–2965. doi: 10.4238/2013.August.12.11
- Sinden, S. L., Sanford, L. L., Cantelo, W. W., and Deahl, K. L. (1986). Leptine glycoalkaloids and resistance to the Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) in *Solanum chacoense*. *Environmental Entomology* 15, 1057–1062. doi: 10.1093/ee/15.5.1057
- Sinden, S. L., Sanford, L. L., and Osman, S. F. (1980). Glycoalkaloids and resistance to the Colorado potato beetle in *Solanum chacoense* Bitter. *American Journal of Potato Research* 57, 331–343. doi: 10.1007/BF02854028
- Smith, J. A., Waldman, B. C., and Waldman, A. S. (2005). A role for DNA mismatch repair protein Msh2 in error-prone double-strand-break repair in mammalian chromosomes. *Genetics* 170, 355–363. doi: 10.1534/genetics.104.039362
- Spooner, D. M., Ghislain, M., Simon, R., Jansky, S. H., and Gavrilenko, T. (2014). Systematics, diversity, genetics, and evolution of wild and cultivated potatoes. *Bot. Rev.* 80, 283–383. doi: 10.1007/s12229-014-9146-y
- Spooner, D. M., Ruess, H., Arbizu, C. I., Rodríguez, F., and Solís-Lemus, C. (2018). Greatly reduced phylogenetic structure in the cultivated potato clade (*Solanum* section *Petota* pro parte). *Am J Bot* 105, 60–70. doi: 10.1002/ajb2.1008
- Spooner, D. M., T., R. C., and J., L. E. L. (1993). Synonymy within wild potatoes (*Solanum* sect. *Petota*: Solanaceae): the case of *Solanum andreanum*. *Systematic Botany* 18, 209. doi: 10.2307/2419398
- Sprink, T., and Hartung, F. (2014). The splicing fate of plant SPO11 genes. *Front Plant Sci* 5, 214. doi: 10.3389/fpls.2014.00214
- Stemmer, M., Thumberger, T., Del Sol Keyer, M., Wittbrodt, J., and Mateo, J. L. (2015). CCTop: an intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool. *PLoS ONE* 10, e0124633. doi: 10.1371/journal.pone.0124633

- Studamire, B., Price, G., Sugawara, N., Haber, J. E., and Alani, E. (1999). Separation-of-function mutations in *Saccharomyces cerevisiae* MSH2 that confer mismatch repair defects but do not affect nonhomologous-tail removal during recombination. *Mol Cell Biol* 19, 7558–7567. doi: 10.1128/MCB.19.11.7558
- Tam, S. M., Hays, J. B., and Chetelat, R. T. (2011). Effects of suppressing the DNA mismatch repair system on homeologous recombination in tomato. *Theor Appl Genet* 123, 1445–1458. doi: 10.1007/s00122-011-1679-4
- Tam, S. M., Samipak, S., Britt, A., and Chetelat, R. T. (2009). Characterization and comparative sequence analysis of the DNA mismatch repair MSH2 and MSH7 genes from tomato. *Genetica* 137, 341–354. doi: 10.1007/s10709-009-9398-3
- Thieme, R., and Rakosy-Tican, E. (2017). “Somatic Cell Genetics and Its Application in Potato Breeding,” in *The Potato Genome*, eds. S. Kumar Chakrabarti, C. Xie, and J. Kumar Tiwari (Cham: Springer International Publishing), 217–268.
- Thieme, R., Rakosy-Tican, E., Gavrilenko, T., Antonova, O., Schubert, J., Nachtigall, M., et al. (2008). Novel somatic hybrids (*Solanum tuberosum* L.+*Solanum tarnii*) and their fertile BC1 progenies express extreme resistance to potato virus Y and late blight. *Theor Appl Genet* 116, 691–700. doi: 10.1007/s00122-007-0702-2
- Trouiller, B., Schaefer, D. G., Charlot, F., and Nogu e, F. (2006). MSH2 is essential for the preservation of genome integrity and prevents homeologous recombination in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic Acids Res* 34, 232–242. doi: 10.1093/nar/gkj423
- Valkonen, J. P. T., Xu, Y.-S., Pulli, S., Pehu, E., and Rokka, V.-M. (1994). Transfer of resistance to potato leafroll virus, potato virus Y and potato virus X from *Solarium brevidens* to *S. tuberosum* through symmetric and designed asymmetric somatic hybridisation. *Annals of Applied Biology* 124, 351–362. doi: 10.1111/j.1744-7348.1994.tb04139.x
- van der Vossen, E., Sikkema, A., Hekkert, B. t. L., Gros, J., Stevens, P., Muskens, M., et al. (2003). An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *The Plant Journal* 36, 867–882. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01934.x
- van Marcke, I., and Angenon, G. (2013). Genomic stability in *Nicotiana* plants upon silencing of the mismatch repair gene MSH2. *Plant Biotechnol Rep* 7, 467–480. doi: 10.1007/s11816-013-0285-0
- Vega, E. S., Bamberg, B. J., and Palta, P. J. (2006). Gibberellin-deficient dwarfs in potato vary in exogenous GA 3 response when the gal allele is in different genetic backgrounds, 357–363.
- Veilleux, R. E., and Miller, A. R. (1998). Hybrid breakdown in the F1 between *Solanum chacoense* and *S. phureja* and gene transfer for leptine biosynthesis. *jashs* 123, 854–858. doi: 10.21273/JASHS.123.5.854
- Virdi, K. S., Wamboldt, Y., Kundariya, H., Laurie, J. D., Keren, I., Kumar, K. R. S., et al. (2016). MSH1 is a plant organellar DNA binding and thylakoid protein under precise spatial regulation to alter development. *Mol Plant* 9, 245–260. doi: 10.1016/j.molp.2015.10.011
- Walter, C., Broer, I., Hillemann, D., and P uhler, A. (1992). High frequency, heat treatment-induced inactivation of the phosphinothricin resistance gene in transgenic single cell suspension cultures of *Medicago sativa*. *Mol Gen Genet* 235, 189–196. doi: 10.1007/BF00279360
- Wind, N. de, Dekker, M., Berns, A., Radman, M., and te Riele, H. (1995). Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell* 82, 321–330. doi: 10.1016/0092-8674(95)90319-4

- Xu, J., Li, M., Chen, L., Wu, G., and Li, H. (2012). Rapid generation of rice mutants *via* the dominant negative suppression of the mismatch repair protein OsPMS1. *Theor Appl Genet* 125, 975–986. doi: 10.1007/s00122-012-1888-5
- Xu, Y. S., Pehu, E., Malone, R., and Jones, M. G. (1991). Plant regeneration from protoplasts of *Solanum* species with potential agricultural value (*S. hjertingii*, *S. polyadenium*, *S. capsicibaccatum*). *Plant Cell Rep* 9, 520–522. doi: 10.1007/BF00232110
- Yencho, G. C., Kowalski, S. P., Kennedy, G. G., and Sanford, L. L. (2000). Segregation of leptine glycoalkaloids and resistance to Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* (Say)) in F2 *Solanum tuberosum* (4x) × *S. chacoense* (4x) potato progenies. *Am. J. Pot Res* 77, 167–178. doi: 10.1007/BF02853941
- Zahrt, T. C., and Maloy, S. (1997). Barriers to recombination between closely related bacteria: MutS and RecBCD inhibit recombination between *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 9786–9791.

Tabelul 1: Tabel ce rezumă gradul de ploidie, prezența transgenei *NPTII*, antibioza, antixenoza și MSI în hibrizi somatici și părinți.

Somatic hybrids or parents	Clone	Ploidy	Presence of the <i>NPTII</i> gene	MSI	Antibiosis	Antixenosis
<i>S. tuberosum</i> cv Desiree	Parent	4x	-	-	-	-
<i>S. tuberosum</i> cv Delikat	Parent	4x	-	-	-	-
<i>S. chacoense</i> HL	Parent	2x	-	-	++	++
<i>S. chacoense</i> HL AS 10	Transgenic line	4x	ND	-	ND	ND
<i>S. chacoense</i> HL DN 5	Transgenic line	2x	ND	-	ND	ND
<i>S. chacoense</i> HL DN 11	Transgenic line	2x	ND	ND	ND	ND
cv Delikat + <i>S. chacoense</i> HL AS 10	DKAS 10.5	4 x	-	-	-	-
	DKAS 10.8	4x	-	-	ND	ND
	DKAS 10.11	4x mixo	-	-	-	-
	DKAS 10.13	4x	ND	-	+	+
	DKAS 10.20	4x-6x mixo	+	+	-	-
	DKAS 10.35	5x	-	-	+	-
	DKAS 10.40	4x	-	-	+	+
	DKAS 10.43	4x	-	ND	+	+
	DKAS 10.47	4x	-	-	+	+
	DKAS 10.51	4x	ND	-	-	-
	DKAS 10.61	4x	-	ND	+	+
cv Delikat + <i>S. chacoense</i> HL DN 5	DKDN 5.3	6x	+	+	-	-
	DKDN 5.4	Nd	+	+	++	++
	DKDN 5.6	4x	-	-	-	-
	DKDN 5.7	4x-6x mixo	-	ND	++	++
	DKDN 5.11	6x	+	+	+	+
	DKDN 5.17	6x	+	+	-	-
	DKDN 5.25	6x-8x mixo	+	+	ND	ND
cv Delikat + <i>S. chacoense</i> HL DN 11	DKDN 11.10	4x-6x mixo	-	+	+	-
	DKDN 11.24	6x	+	+	-	-
	DKDN 11.26	7x	-	+	ND	ND
	DKDN 11.34	5x	+	+	+	+
cv Desiree + <i>S. chacoense</i> HL DN 5	DeDN 5.5	4x	+	+	+	+
cv Desiree + <i>S. chacoense</i> HL DN 11	DeDN 11.5	4x	ND	-	ND	ND
	DeDN 11.24	6x	ND	ND	ND	ND
	DeDN 11.29	Nd	ND	+	++	+
cv Desiree + <i>S. chacoense</i> HL	DeC8	5x-6x mixo	-	-	ND	ND

Note: AS-antisens, DN- *MSH2* genă dominant-negativă. ND – ne determinat, + = da, - = nu.

Tabelul 2. Fenotip mutant, înflorire, viabilitatea polenului și MSI în hibrizii somatici (Rakosy-Tican et al., 2019).

Somatic hybrid	Mutant phenotype	Flowers	Pollen viability %	SSR instability (MSI)
DkDN 5.3	Very small leaves, tall plants, produce stolons as <i>S. chacoense</i>	+	12	+
DkDN 5.4	Dark purple tubers of variable size, produce stolons as <i>S. chacoense</i> , curled leaves	+	19	+
DkDN 5.6	Gigantism, large leaves	+	22	-
DkDN 5.7	Stunted growth, deformed leaves, early flowering	+	ND	ND
DkDN 5.11	Large leaves, early flowering	+	ND	+
DkDN 5.17	Dwarf, bushy with small leaves, deformed small tubers	-	ND	+
DkDN 5.25	Deformed leaves, grey-green color, mutant chloroplasts	+	ND	+
DkDN 11.10	Early dehiscent flower, curled leaves	+	ND	+
DkDN 11.26	Deformed large leaves	+	2.4	+
DkDN 11.34	Gigantic growth, large deep green leaves, early flowering	+	43	+
DkAS 10.5	Dwarf plants	+	ND	-
DkAS 10.8	Deformed, pale green leaves	-	ND	-
DkAS 10.20	Dwarf, bushy, round shape small leaflets	-	ND	+
DkAS 10.40	Gigantic leaves	+	49	-
DeC 7	Dwarf, large, conjoined leaflets	-	ND	ND
DeDN 5.5	Stunted growth, large leaves	+	ND	+
DeDN 11.5	Tall plants with large leaves	+	21	-

Note: AS-antisens, DN- *MSH2* genă dominant-negativă. ND – ne determinat, + = da, - = nu.

ISI articles from the results of this thesis:

1. Rakosy-Tican, E. *, **Lörincz-Besenyei, E.***, Molnár, I.*, Thieme, R.*, Hartung, F., Sprink, T., Antonova, O., Famelaer, I., Angenon, G., and Aurori, A.* (2019). New Phenotypes of Potato Co-induced by Mismatch Repair Deficiency and Somatic Hybridization. *Front Plant Sci* 10, 3. doi: 10.3389/fpls.2019.00003. **IF: 4.402. *equal contribution**
2. Molnár, I., **Besenyei, E.**, Thieme, R., Thieme, T., Aurori, A., Baricz, A., Banciu, H.L., and Rakosy-Tican, E. (2017). 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**

Other ISI articles:

1. Cristea, V., **Besenyei, E.**, Jarda, L., Farkas, A., Marcu, D., Clapa, D., Halmagyi, A. and Butiuc-Keul, A. (2019). *In Situ* Genetic Variability and Micropropagation of *Cerastium banaticum* (Rochel) Heuff. (Caryophyllaceae)– a Rare and Endemic Species from Romania, *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 61/1: 53– 62. **IF=1.111**

Article B+ from the results of this thesis:

1. Rakosy-Tican, E., Thieme, R., Aurori, A., Erdelyi-Molnár, I., **Besenyei, E.**, Mustață, A.R., Măgineanu, A.M. 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.

Other B+ articles:

1. Marcu, D., **Besenyei E.**, Cristea V., (2014) Radiosensitivity of maize to gamma radiation based on physiological responses, *Muzeul Olteniei Craiova. Oltenia. Studii și comunicări. Științele Naturii*. Tom. 30, No. 1/2014, ISSN 1454-6914.
2. Marcu, D., Halmagyi, A., **Besenyei, E.**, Clapa, D., Fira, A., Cristea, V., (2014) *In vitro* conservation of *Achillea pyrenaica* Sibth. ex Godr., a pyrenean endemic species, *Muzeul Olteniei Craiova. Oltenia. Studii și comunicări. , Științele Naturii*. Tom. 30, No. 2/2014 ISSN 1454-6914 55.

Conference participation from the results of this thesis:

1. **Lörincz-Besenyei, E.**, Metje, J., Hartung, F. and Sprink, T., (2017) DNA-free genome editing in potato, 10th Young Scientist Meeting, Siebeldingen, Germany, November 08-10, 2017, Vol. 192 (08.11.2017), pg.60.
2. Rakosy-Tican, E., Molnar, I., Thieme, R., Aurori, A., **Besenyei, E.**, Denes, T., Thieme, T., Molnar-Lang, M. and Vass, I. (2017) A new potato for a new climate- using different

- biotechnological tools to improve multiple resistance traits, 20th EAPR Triennial Conference 09.07-14.07.2017, Versailles.
3. **Besenyei, E.**, Sprink, T., Hartung, F. and Rakosy-Tican, E., (2017) Neue Kartoffel Sorten für den Umwelt, DBU Fachkolloquium, Umweltschutz im 21 Jahrhundert, Julius-Kühn Institut, Quedlinburg 4-06.05. 2017.
 4. Rakosy-Tican, E., Molnar, I., Thieme, R., Aurori, A., **Besenyei, E.**, Thieme, T. and Vass, I. (2017) New potato crop for a new climate – the application of complex biotechnological tools to improve resistance to biotic and abiotic stress, 2nd Agriculture and Climate Change Conference 26–28 March 2017, Sitges, Spain.
 5. **Besenyei, E.**, Linc, G. and Rakosy-Tican, E. (2016) Effects of DNA mismatch repair (MMR) system deficiency on homeologous recombination in meiosis, in potato somatic hybrids, Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2016 Congress, Prague 26-30 June.
 6. Rákosy-Tican, E., Thieme, R., Aurori, A., Molnár, I., Dénes, T.E., **Besenyei, E.**, Marginean, A.M., Cruceriu, D. and Mustata, R.A., (2016) The application of combinatorial biotechnology in improving potato resistance to biotic and abiotic stress, Asociația Română de culturi de țesuturi și celule vegetale (ARCTV), Cluj Napoca, Romania.
 7. Molnár, I., **Besenyei, E.**, Thieme, R., Thieme, T. and Rákosy-Tican, E. (2016) Antibiosis and antixenosis properties of somatic hybrids and backcross progenies (*S. chacoense*+ *S. tuberosum*) to the Colorado potato beetle, ARCTV, Cluj-Napoca, Romania. Asociația Română de culturi de țesuturi și celule vegetale, Cluj-Napoca, Romania
 8. **Besenyei, E.**, Linc, G. and Rakosy-Tican, E. (2016) Homeológ rekombináció burgonya szomatikus hibridekben a DNS javító rendszer (MMR) gátlásakor, XXII. Növénynevelési Tudományos Nap, Magyar Tudományos Akadémia (Hungarian Academy of Sciences).
 9. **Besenyei E.**, Rákosy-Tican E., Thieme R., Antonova O. and Thieme T., (2015) The analysis of microsatellite instability in MMR deficient somatic hybrids between potato and *Solanum chacoense*, Annual Conference of the German Genetics Society, Book of abstracts p.93, 28-30 September, Kiel.
 10. Margineanu A., Molnar I., **Besenyei E.** and Rakosy-Tican E., (2015) Trichome density and Colorado potato beetle choice test, performed in somatic hybrids between two potato cultivars and *Solanum chacoense*, Young Researchers in Biosciences, Cluj-Napoca.
 11. **Besenyei E.**, Rákosy-Tican E., Thieme R. and Thieme T. (2015) The analysis of Colorado potato beetle resistance in MMR deficient somatic hybrids between potato and high leptine producer *Solanum chacoense*, The Pannonian Plant Biotechnology Association (PPBA) Conference, Book of abstracts p. 41, 8-10 June, Ljubljana, Slovenia.
 12. **Besenyei E.**, Cristea V. and Keul A. (2011) Micropropagation of *Cerastium banaticum* (Roch.) Heuff. (Caryophyllaceae), an endangered species from Romania, 10th Hungarian Scientific Student Conference in Vojvodina, 26th November.

Other conference participation:

1. **Lörincz-Besenyei, E.**, Mehdi, R., Sprink, T., Sonnewald, U. and Krenz, B. (2020) Developing a viral based genome editing tool for editing, Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2020 (postponed to 2021 due COVID-19) Congress, Turin, Italy (**Awardee of the FESPB Support Grant**).
2. **Lörincz-Besenyei, E.**, Metje-Sprink, J., Sprink, T., Sonnewald, U. and Krenz, B., (2019) Inducing mutations in potato *via* genome editing in demand of climate change, COST Action 1st PlantEd Conference, Plant Genome Editing - State of the Art 5th – 7th November 2019 Novi Sad, Serbia-Abstract book pg 61.
3. **Lörincz-Besenyei, E.**, Mehdi, R., Sprink, T., Sonnewald, U. and Krenz, B., (2019) Tomato bushy stunt virus (TBSV) based ribonucleoproteins (RNPs) delivery in potato, 51.

Jahrestreffen des Arbeitskreises "Viruskrankheiten der Pflanzen", 25. bis 26. März 2019, Göttingen, pg.18.

4. **Lörincz-Besenyi, E.**, Sprink, T., Metje, J., Sonnewald, U. and Krenz, B., (2018) Potato improvement by genome editing, Nr. 200 (2018): 11th Young Scientists Meeting 2018, 14th-16th November in Braunschweig - Abstracts –pg.70.