

Silencing of the Mismatch Repair gene *MSH2* to increase genetic diversity in Solanaceae

Thesis submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor (PhD) in Bio-Engineering Sciences by

Inke Van Marcke

Promoter: Prof. Dr. ir. Geert Angenon

ABSTRACT

Currently, the world population is estimated to be more than 7 billion and it is continuously increasing. Agricultural innovations and plant breeding have made it possible to increase crop yields to feed the ever growing population. However, to cope with the future predicted population increase, combined with global climate change, even greater efforts will be necessary to further increase crop yields. The productivity of crops will have to be increased by improving stress tolerance, disease resistance, nutrient utilization, etc.

In this PhD project, we wanted to apply Mismatch Repair (MMR) deficiency in Solanaceae to induce genomic instability and increase genetic variability. Therefore, we have decided to target the *MSH2* gene, which encodes a key protein in the MMR mechanism with an artificial microRNA (amiRNA).

Based on the available *MSH2* genomic sequences from *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* (tobacco), *Petunia hybrida* and *Oryza sativa* (rice), a part of the sequence from *Solanum tuberosum* (potato) was obtained. With these sequences, we developed a general silencing construct that can be applied in all Solanaceae. The silencing construct was introduced in the model species *N. tabacum* and *N. plumbaginifolia* genomes by *Agrobacterium* mediated transformation. The level of silencing reached was determined by quantitative RT-PCR analysis. The residual transcript levels fluctuated strongly, but it was possible to identify lines with a significantly decreased *MSH2* expression, ranging between 0.10 and 0.60.

Transgenic lines with the strongest silencing levels were selected and their genomic stability was analyzed at two levels. Phenotypic stability was assessed by screening for altered phenotypes in succeeding generations of *N. tabacum* and *N. plumbaginifolia*. It was possible to identify some mutant phenotypes, like morphological and developmental abnormalities, chimeric albinos, or plants with callus-like tissue. But the mutant phenotypes only appeared at low frequencies, true albino mutant could not be found after the propagation of five generations, and the mutant phenotypes were not transmitted to progeny. Furthermore, at the genetic level, *N. tabacum* silencing lines were

screened for microsatellite instability; i.e. the insertion or deletion of a repeat unit in tandem repeats of short nucleotide motifs. A total of 2474 alleles were screened, however, no repeat length polymorphisms could be detected.

Finally, a large-scale screening was performed on a population of MMR-deficient *N. tabacum* plants to select for a specific, new trait, i.e. resistance to the herbicide chlorsulfuron. Plants that survived the chlorsulfuron treatment could be found at low frequencies. But this resistance was again not transmitted to the progeny.

The level of silencing of the *MSH2* gene with an amiRNA in *Nicotiana* plants was sufficient to induce spontaneous mutations. However, these mutations only arise somatically and they are not inherited by the progeny. DNA repair is extremely important in meristematic and germline cells, since mutations in these cells can be transmitted to succeeding generations. Therefore, to induce genetic instability in these cells, it will be necessary to increase the level of silencing of the *MSH2* gene.

SAMENVATTING

De totale wereldbevolking wordt momenteel geschat op meer dan 7 miljard en dit aantal blijft stijgen. Innovaties in landbouwtechnieken en plantenveredeling hebben ervoor gezorgd dat de voedselproductie ook sterk gestegen is om de bevolking van voedsel te voorzien. Er is echter een nog sterkere stijging in de voedselproductie nodig om aan de verder stijgende wereldbevolking in combinatie met de klimaatveranderingen tegemoet te komen. De productiviteit van de gewassen zal verder verhoogd moeten worden door nieuwe variëteiten te ontwikkelen met verhoogde stress-tolerantie, ziekteresistentie, nutriënt-opname, enz.

In dit doctoraatsonderzoek hebben we getracht om Mismatch Repair (MMR) deficiëntie toe te passen om genetische instabiliteit te induceren en zo de genetische variabiliteit te verhogen. Hiervoor hebben we de expressie van het *MSH2* gen, dat voor een sleutelproteïne in het MMR mechanisme codeert, onderdrukt door middel van een artificieel microRNA (amiRNA).

De beschikbare *MSH2* sequenties van *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* (tabak), *Petunia hybrida* en *Oryza sativa* (rijst) werden gebruikt om een deel van de sequentie van *Solanum tuberosum* (aardappel) te identificeren. Met deze sequenties kon een algemeen silencing construct ontwikkeld worden, dat kan gebruikt worden in alle Solanaceae. Dit construct werd geïntroduceerd in het genoom van *N. tabacum* en van *N. plumbaginifolia* door middel van *Agrobacterium*

gemedieerde transformatie. Het niveau van silencing werd bepaald met kwantitatieve RT-PCR analyse. De residuele transcript niveaus varieerden sterk, maar toch was het mogelijk om enkele lijnen te identificeren die een significant verlaagde *MSH2* expressie vertoonden, variërend tussen 0.10 en 0.60.

De transgene lijnen, die de sterkste silencing vertoonden, werden geselecteerd en in deze lijnen werd de genomische stabiliteit geanalyseerd op twee niveaus.

De fenotypische stabiliteit werd bepaald door te screenen naar gewijzigde fenotypes in opeenvolgende generaties van *N. tabacum* en *N. plumbaginifolia*. Mutante fenotypes, zoals morfologische afwijkingen, verstoorde ontwikkelingen, chimere albino's of planten met callus-achtig weefsel werden geobserveerd. Maar deze mutanten konden slechts aan lage frequenties gevonden worden; volledige albino's werden niet gevonden na vijf generaties en overerving van de mutante fenotypes was niet zichtbaar. Verder werd de genetische stabiliteit bepaald door te screenen naar microsatelliet instabiliteit; de insertie of deletie van een repeat eenheid in tandem repeats van korte motieven van nucleotiden. In totaal werden 2474 allelen onderzocht, er kon echter geen enkele verandering in de repeat lengte geobserveerd worden.

Tot slot werd een populatie van MMR-deficiënte *N. tabacum* planten op grote schaal gescreend voor de ontwikkeling van een specifieke, nieuwe eigenschap, resistentie tegen het herbicide chloresulfuron. Planten die de chloresulfuron behandeling overleefden, konden geobserveerd worden aan lage frequenties. Maar deze resistentie werd eveneens niet doorgegeven aan de nakomelingen.

Het niveau van silencing van het *MSH2* gen dat veroorzaakt werd door het amiRNA was voldoende om spontane mutaties te induceren. Maar deze mutaties ontstonden enkel in somatische cellen en werden dus niet overgeërfd naar de nakomelingen. Het herstel van DNA is enorm belangrijk in meristematische cellen en in de kiembaan. Mutaties in deze cellen kunnen immers doorgegeven worden naar volgende generaties. Het is daarom noodzakelijk om het niveau van de silencing van het *MSH2* gen verder te verhogen om genetische instabiliteit in deze cellen te induceren.