

Streszczenie

Rodzaj *Fagopyrum* to grupa roślin dwuliściennych należąca do rodziny rdestowatych. Rodzaj obejmuje 22 gatunki, zarówno jednoroczne, jak i wieloletnie, które rosną głównie na wyżynach euroazjatyckich. Najważniejszymi uprawianymi gatunkami są gryka zwyczajna (*F. esculentum*, zwana również słodką gryką) i gryka tatarska (*F. tataricum*, zwana również gorzką gryką). Do głównych przyczyn ograniczonej powszechności uprawy gryki w Polsce i Europie należą niskie plony, różnice w nawykach żywieniowych oraz ograniczona świadomość producentów żywności i konsumentów dotycząca wartości odżywczej oraz innych korzystnych właściwości gryki. Biotechnologia oparta na protoplastach i systemy regeneracji roślin stanowią obiecujące podejście do przezwyciężenia tych ograniczeń, ułatwiając badanie przeprogramowania komórkowego, totipotencji i hybrydyzacji somatycznej w kontrolowanych warunkach. Niniejsza rozprawa doktorska koncentruje się na *F. tataricum* i *F. esculentum* jako systemach modelowych do badania rozwoju protoplastów, procesów morfogenezy oraz *de novo* rekonstrukcji ściany komórkowej komórek hybrydowych *F. esculentum* (+) *F. tataricum*, zajmując się krytycznymi lukami w tych procesach. Badania miały na celu optymalizację izolacji protoplastów i warunków hodowli poprzez ocenę materiału źródłowego, metod immobilizacji i dodatków do podłoża hodowlanych; zwiększenie regeneracji roślin poprzez morfogenezę za pośrednictwem cytokininy; scharakteryzowanie dynamiki rekonstrukcji ściany komórkowej *de novo* w komórkach rodzicielskich, a także w komórkach hybrydowych uzyskanych poprzez elektrofuzję protoplastów; oraz określenie roli regulatorów fenolowych w procesach rozwojowych.

Wyniki badań, szczegółowo opisane w czterech publikacjach naukowych, podkreśliły, w jaki sposób warunki hodowli bezpośrednio wpływają na zachowanie i regenerację komórek. Wykazano, że kalus morfogeniczny *F. tataricum* i kalus embriogeny *F. esculentum* stanowią lepsze źródła protoplastów w porównaniu z hipokotylami siewek, zapewniając wyższą wydajność izolacji. Unieruchomienie wyizolowanych protoplastów w matrycy agarowej o niskiej temperaturze topnienia, hodowanych w podłożu uzupełnionym o α -fitosulfokinę, zwiększyło podział komórek, tworzenie kolonii i późniejszy rozwój mikrokalusów. Co najważniejsze, w fazie regeneracji typy i stężenia cytokinin były krytyczne dla osiągnięcia morfogenezy, przy czym thidiazuron przyspieszał somatyczną embriogenezę u *F. esculentum*, co prowadziło do regeneracji całej rośliny w ciągu dwóch miesięcy; podczas gdy połączenie benzyloaminopuryny i kinetyny promowało zarówno somatyczną embriogenezę, jak i organogenezę u *F. tataricum*, co dawało zregenerowane rośliny w ciągu trzech miesięcy.

Nowy protokół elektrofuzji skutecznie umożliwił tworzenie komórek hybrydowych *F. esculentum* (+) *F. tataricum*, które zostały zebrane zgodnie ze zoptymalizowaną metodą sortowania, umożliwiając analizę porównawczą regeneracji ściany komórkowej. Immunolokalizacja składników ściany komórkowej wykazała, że *de novo* rekonstrukcja ściany komórkowej w komórkach hybrydowych i rodzicielskich następuje w ciągu 48 godzin. Zaobserwowano również specyficzną dla gatunku dynamikę białek arabinogalaktanowych, ekstensyny, ksyloglukanu i pektyn, przy czym komórki hybrydowe wykazywały wzorce podobne do rodzicielskich, z wyjątkiem opóźnionego odkładania metyloestryfikowanego homogalakturonanu u *F. esculentum*, co sugeruje potencjalną rozbieżność w metabolizmie pektyny podczas wczesnego etapu rekonstrukcji ściany komórkowej.

Ostatnie badania wykazały że kontrolowanie zawartości fenoli i flawonoidów za pomocą inhibitorów amoniakolizacji L-fenylalaniny (AIP, AOPP, OBHA) i adsorbentu (PVP) bezpośrednio wpływają na reakcje protoplastów oraz wzrost i regenerację kalusa *F. tataricum*. Niskie stężenia AIP i PVP sprzyjają tworzeniu kolonii komórkowych podczas hodowli protoplastów i regeneracji roślin diploidalnych, podczas gdy AOPP i OBHA dają zarówno rośliny diploidalne, jak i tetraploidalne. Z drugiej strony regeneracja roślin z proembriogennych kompleksów komórkowych o wyższych stężeniach AIP wykazała zmniejszony stres oksydacyjny, stosunek glutationu do utlenionego glutationu i zwiększoną ekspresję genów związanych z embriogenezą, podczas gdy PVP głównie adsorbował związki fenolowe, zmieniając dostępność składników odżywczych.

Poza rozwijaniem wiedzy teoretycznej w zakresie biotechnologii roślin, rozprawa dostarcza przełomowych spostrzeżeń na temat technologii protoplastów, łącząc warunki hodowli z odpowiedziami komórkowymi i efektami regeneracji. Ustanawia również pierwszy powtarzalny protokół dla produkcji komórek hybrydowych *Fagopyrum* i opisuje molekularne i metaboliczne podstawy ograniczeń regeneracji zależnej od związków fenolowych.