

## Rozprawa doktorska

# Analizy histochemiczne, ultrastrukturalne i molekularne kultury tkankowej kalusa wyprowadzonego z bielma kiwi *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* A. Chev. (A. Chev.)

Iwona Chłosta

### Streszczenie

Kalus to tkanka przyranna, która powstaje w odpowiedzi na stres, wywoływany głównie przez uszkodzenia mechaniczne. W kulturach *in vitro*, manipulacja kontrolowanymi warunkami może indukować rozwój kalusa z dowolnej żywej tkanki roślinnej. Bielmo to szczególny przykład tkanki zapasowej, która ma potencjał do indukcji kalusa i regeneracji roślin na drodze organogenezy. Jego wyjątkowość wiąże się z tym, że *in planta* nie zaobserwowano odróżnicowania bielma i proliferacji, co umożliwia odpowiednio dobrane warunki kultury. Bielmo cechuje się wyższym poziomem ploidalności w stosunku do zarodka. Tym samym może posłużyć do otrzymywania roślin o wyższej ploidalności w warunkach kultur tkankowych.

*Actinidia chinensis* var. *deliciosa* A. Chev. (A. Chev.), potocznie zwana kiwi, jest heksaploidalną ( $2n = 6x = 174$ ) rośliną uprawną, której owoce są uważane za jedne z najzdrowszych na świecie. Dwupienność, brak dymorfizmu płciowego u młodych roślin oraz przedłużona faza juwenilna są jej kłopotliwymi atrybutami i sprawiają trudności w komercyjnej uprawie. Wybrane techniki molekularne są pomocne we wczesnej identyfikacji płci u *Actinidia*.

W niniejszej pracy przeprowadzono analizy histochemiczne, ultrastrukturalne i molekularne długoterminowej kultury tkankowej kalusa wyprowadzonego z bielma kiwi *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* cv. Hayward. Nadrzędnym celem rozprawy doktorskiej było uzupełnienie brakującej wiedzy na temat wybranych aspektów procesu organogenezy pośredniej u tego gatunku. Wykazano, że w kalusie organogennym (*organogenic callus*, OC) występują struktury określane jako *protuberances* (PT), których obecność poprzedza właściwy proces organogenezy i regeneracji pędów przybyszowych. Wyodrębniono cechy charakterystyczne dla PT, którymi są: kulisty kształt, obecność ziaren skrobi w chloroplastach oraz wyższa, w porównaniu z pozostałymi obszarami OC, ekspresja genów zaangażowanych w metabolizm węglowodanów i biosyntezę metabolitów wtórnych. W dalszym etapie pracy uzyskane z PT regeneranty poddano analizie zawartości jądrowego DNA i wykazano, że około 90% z nich posiadało DNA odpowiadające bielmu, czyli  $3C = 9Cx$ , co potwierdziło ich pochodzenie z tej tkanki i nonaploidalność. Aby zidentyfikować różnice między heksaploidami uzyskanymi z nasion a potwierdzonymi nonaploidami, przeprowadzono analizę wybranych cech morfologicznych. Stwierdzono korelację między stopniem ploidalności a średnimi wymiarami i zagęszczeniem aparatów szparkowych. Jednak wartości pomiarów dla poszczególnych okazów mogły występować w obu grupach badanych poliploidów, co uniemożliwiało jednoznaczne rozróżnienie heksaploidów i nonaploidów. W związku z tym, że owocujące rośliny żeńskie kiwi są pożądane przez hodowców, a oznaczanie płci okazów na wczesnym etapie ich rozwoju jest kluczowe w tradycyjnej uprawie tych roślin, przeprowadzono analizę płci kalusa i regenerantów za pomocą markerów specyficznych dla chromosomu Y. Wyniki ujawniły, że markery te, zastosowane już na etapie kalusa uzyskanego z bielma, pozwalają wiarygodnie przewidzieć płeć roślin, które zregenerują z badanego kalusa.

Badania przeprowadzone w niniejszej rozprawie doktorskiej uzupełniają wiedzę na temat organizacji tkanki kalusowej. Ponadto mogą mieć znaczenie w programach hodowlanych kiwi, a w szczególności tych, które obejmują techniki kultur tkankowych.

**Słowa kluczowe:** transkryptom; RT-qPCR; *protuberances*; nonaploidy; heksaploidy; molekularne markery płci; aparaty szparkowe

Akceptuję treść  
Pr. Popielawski-Chłosta  
Chłosta, 11.04.2022

Anna Chłosta

PhD thesis

**Histochemical, ultrastructural and molecular analyzes  
of *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* A. Chev. (A. Chev.)  
endosperm-derived callus**

*Iwona Chłosta*

**Abstract**

Callus is a wounding tissue that arises in response to stress, especially caused by mechanical injuries. It's formation can be induced from any living plant tissue by moderation of *in vitro* conditions. The endosperm is a specific example of a storage tissue that has the potential to form callus and regenerate plants through organogenesis. It is a unique tissue because *in planta* no dedifferentiation and proliferation of endosperm was observed, however it is possible under certain conditions. The endosperm shows higher ploidy level in relation to the embryo. Thus, it can be used to obtain plants with higher ploidy under controlled conditions in tissue cultures.

*Actinidia chinensis* var. *deliciosa* A. Chev. (A. Chev.), commonly known as kiwifruit, is a hexaploid ( $2n = 6x = 174$ ) crop plant, whose fruit is considered to be one of the most healthy in the world. It's dioecy, lack of sexual dimorphism in young plants and a long juvenile phase result in problematic commercial cultivation. There are, however, some useful molecular methods that help in early gender identification in *Actinidia*.

In this study, the histochemical, ultrastructural and molecular analyses of long-term culture of endosperm-derived callus of the kiwi *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* were performed. The main objective of the doctoral dissertation was to complete the knowledge of the process of indirect organogenesis in this species. The conducted research showed that organogenic callus (OC) has structures called protuberances (PT) which appearance precedes organogenesis and regeneration of adventitious shoots. The characteristic features of PT were distinguished as spherical shape, the presence of starch granules in chloroplasts and enhanced expression of genes in comparison with other areas of OC involved in carbohydrate metabolism and biosynthesis of secondary metabolites. In the next stage of the study, the analysis of nuclear DNA content in PT-derived plants revealed that the DNA content of about 90% of regenerants was corresponding to endosperm tissue, that is  $3C = 9Cx$ , which confirmed their endosperm origin and nonaploidy. In order to identify differences between hexaploids obtained from seeds and confirmed nonaploids the analysis of selected morphological features was performed. The results showed a correlation between ploidy and mean dimensions along with density of the stomata. It was found, however, that the characteristics of the stomata do not allow unequivocal distinction between the individual hexaploid and nonaploid plants as samples with different ploidy showed overlapping measurements. Since fruiting female kiwi plants are sought-after by breeders and the determination of the sex of early-stage specimens is essential in traditional cultivation of these plants, the sex analysis of callus and regenerants was performed using specific Y-chromosome markers. The results revealed that this method is useful at the stage of the endosperm-derived callus and makes it possible to reliably predict the sex of the plants that will regenerate from the tested callus.

The research carried out in this doctoral dissertation completes the knowledge of the organization of callus tissue. In addition, they may play a role in kiwi breeding programs, particularly those involving tissue culture techniques.

**Keywords:** transcriptome; RT-qPCR; protuberances; nonaploids; hexaploids; sex molecular markers; stomata

Acceptuję treść  
i popierałem  
Kłosta, 11.04.2022  
Iwona Chłosta