

## STRESZCZENIE

### Polimorfizm haplotypów chloroplastowego i mitochondrialnego DNA u wątrobowca *Marchantia polymorpha* sensu lato.

#### Wprowadzenie:

Porostnica wielokształtna (*Marchantia polymorpha* L.) to kompleks złożony z przynajmniej trzech odrębnych genetycznie taksonów o dyskutowanej randze taksonomicznej. Prosta budowa anatomiczna i morfologiczna, stosunkowo niewielkie rozmiary, haploidalna – dominująca faza rozwoju, dostępność genomów referencyjnych i wiele innych cech sprawiają, że *M. polymorpha* jest coraz powszechniej wykorzystywana, jako gatunek modelowy dla roślin lądowych. Pomimo rosnącego zainteresowania tym organizmem wciąż niewiele wiadomo o jego zmienności genetycznej. W badaniach filogenetycznych opartych na zmienności sekwencji DNA zazwyczaj analizowane są pojedyncze próby *M. polymorpha* reprezentujące zwykle jeden z trzech znanych taksonów. Najnowsze badania wskazują, że sekwencje referencyjne genomów organellowych *Marchantia* zdeponowane w późnych latach 80. i na początku 90. zostały błędnie adnotowane taksonomicznie jako *M. polymorpha* a linia kallusowa A-18, z której je sekwencjonowano, została wyprowadzona prawdopodobnie z *Marchantia paleacea* subsp. *diptera* (podrodzaj *Chlamidium*).

#### Cele pracy:

Realizację pracy oparto na następujących pytaniach badawczych:

1. Czy podgatunki *M. polymorpha* charakteryzują się odrębnymi haplotypami chloroplastowego i mitochondrialnego DNA?
2. Czy możliwa jest identyfikacja podgatunków *M. polymorpha* na podstawie wybranych sekwencji organellowego DNA?
3. Które z tych sekwencji są praktycznie przydatne do celów identyfikacyjnych?
4. Czy możliwe jest opracowanie testu identyfikacyjnego opartego na technologii PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) z wykorzystaniem informacji o polimorfizmie wybranych sekwencji?
5. Czy wyniki porównania wybranych sekwencji chloroplastowych i mitochondrialnych wspierają hipotezę o błędnej identyfikacji taksonomicznej linii laboratoryjnej A-18 (Kisiel et al. 2011) wykorzystanej do sekwencjonowania genomów organellowych „*Marchantia polymorpha*” (Ohyama et al. 1986, Oda et al. 1992)?
6. Jeżeli sekwencja referencyjna „*M. polymorpha*” zdeponowana w bazie NCBI (NC\_001319) została uzyskana z linii laboratoryjnej *Marchantia paleacea*, to czym różni

się ta sekwencja od sekwencji *M. polymorpha* subsp. *ruderalis*, taksonu najczęściej wykorzystywanego jako organizm modelowy dla wątrobowców?

7. Czy uzyskane wyniki wspierają hipotezę o hybrydowym pochodzeniu *M. polymorpha* subsp. *ruderalis*, postawioną przez Burgeffa (1943) i Schustera (1992), która zakłada, że podgatunek ten powstał niedawno poprzez hybrydyzacje pomiędzy dwoma pozostałymi podgatunkami?

Odpowiedzi na zadanie pytania starano się uzyskać realizując następujące zadania badawcze:

- A. Sekwencjonowanie wybranych rejonów chloroplastowego i mitochondrialnego DNA u *M. polymorpha* oraz *M. paleacea* :
- cpDNA - geny: *matK*, *rbcL*, *psbA*, *rps4*, *ycf1*; sekwencje międzygenowe: *psbA-trnH*, *rps4-trnT* oraz intron *trnG*<sup>UCC</sup>
  - mtDNA - intron 1 *cox3*, intron *nad5*

Sekwencje uzyskano wykorzystując metodę Sanger (ABI Prism 3010XL).

- B. Porównawcza analiza polimorfizmu uzyskanych sekwencji pomiędzy trzema podgatunkami *M. polymorpha* i *M. paleacea* w celu wykrycia polimorfizmów typu SNP przydatnych do celów identyfikacyjnych.
- C. Opracowanie testu identyfikacyjnego dla niektórych linii laboratoryjnych wykorzystywanych w badaniach genomowych z zastosowaniem metody qPCR-HRM dla najbardziej różnicujących sekwencji.
- D. Sekwencjonowanie genomu chloroplastowego *M. polymorpha* subsp. *ruderalis* i ocena dywergencji pomiędzy genomem *M. polymorpha* (podrodzaj Marchantia) i *M. paleacea* (podrodzaj Chlamidium), jako dwóch gatunków najczęściej wykorzystywanych w badaniach genomowych. Sekwencjonowanie oparto na technologii IonTorrent.

## Metody:

W celu zbadania polimorfizmu haplotypów organellowego DNA sekwencjonowano osiem rejonów organellowego DNA (sześć chloroplastowych i dwa mitochondrialne). Uzyskano sekwencje dla 27 prób *M. polymorpha* głównie z Europy oraz 4 prób *M. paleacea* z Japonii. Uzyskane sekwencje analizowano za pomocą programu Geneious 9, poszukując diagnostycznych różnic pomiędzy badanymi taksonami. Aby określić stopień zmienności sekwencji obliczono parametry zmienności nukleotydowej ( $\pi$ ) w obrębie kompleksu oraz odległość genetyczną ( $p$ ) pomiędzy wszystkimi badanymi taksonami wykorzystując program Mega 7. Podobieństwo sekwencji zobrazowano metodą największej wiarygodności (Maximum Likelihood). Genom chloroplastowy *M. polymorpha* subsp. *ruderalis* sekwencjonowano za pomocą systemu nowej generacji (IonTorrent PGM). Analizę bioinformatyczną od kontroli jakości, składanie genomu i adnotację, po porównaniu z genomem referencyjnym wykonano w programie Geneious 9. Test identyfikacyjny oparty na analizie krzywej topnienia produktu PCR w czasie rzeczywistym opracowano na podstawie wyników sekwencjonowania markerów chloroplastowego DNA. Docelowe rejony amplifikowane były za pomocą urządzenia CFX96 Touch™ Real-Time PCR

Detection System (Bio-Rad) i analizowane w dedykowanym programie Precision Melt Analysis (Bio-Rad).

### **Wyniki:**

1. Wykryto trzy haplotypy chloroplastowego DNA (MA, MB, MC), specyficzne dla każdego z trzech badanych taksonów *M. polymorpha* oraz jeden haplotyp dla (MP) dla *M. paleacea*.
2. W rejonach mitochondrialnego DNA nie wykryto polimorfizmu w obrębie kompleksu *M. polymorpha* ani u *M. paleacea*.
3. Stwierdzono znaczące różnice (0,0197-0,0207) w badanych sekwencjach cpDNA oraz mtDNA pomiędzy haplotypami *M. polymorpha* sensu lato i sekwencjami referencyjnymi (NC\_001319, NC\_001660).
4. W wyniku sekwencjonowania pełnego genomu chloroplastowego *M. polymorpha* subsp. *ruderalis* uzyskano sekwencję o długości 120 457 pz, zawierającą 133 geny, w tym 88 geny kodujące białka, 4 rybosomalne RNA (rRNA występujące w dwóch kopiach) oraz 37 geny transportującego RNA w tym 32 unikalne (tRNA).
5. Porównanie pełnej sekwencji genomu chloroplastowego *M. polymorpha* subsp. *ruderalis* i sekwencji referencyjnej (NC\_001319) wykazało brak rearanzacji genów oraz zróżnicowanie sekwencyjne na poziomie ogólnym (0,0256) i mniejsze (0,0184) w sekwencjach genowych.
6. Analiza qPCR-HRM dla amplifikowanego fragmentu genu *ycf1* wykazała znacząco wyższą temperaturę topnienia produktu PCR dla haplotypu MC (75,23°C) w porównaniu do średnich temperatury pozostałych haplotypów. Temperatury te wynosiły MA: 74,67°C, MB: 74,74 °C i MP: 74,61°C.

### **Wnioski:**

1. Istnienie trzech haplotypów chloroplastowego DNA w obrębie *M. polymorpha*, koreluje z podziałem kompleksu na trzy genetycznie zróżnicowane taksony.
2. Różnice pomiędzy sekwencjami haplotypów *M. polymorpha*, a sekwencjami referencyjnymi potwierdzają hipotezę o błędnej identyfikacji kalusowej linii

laboratoryjnej A-18 użytej do sekwencjonowania genomów organellowych. Linia ta prawdopodobnie została wyprowadzona z *M. paleacea* (podrodzaj Chlamidium).

3. Cztery z sześciu sekwencji cpDNA indywidualnie posiadały wystarczającą siłę dyskryminacyjną do identyfikacji wszystkich trzech taksonów *M. polymorpha*.
4. Porównanie sekwencji genomu chloroplastowego *M. polymorpha* subsp. *ruderalis* i sekwencji referencyjnej (NC\_001319) potwierdza hipotezę o błędnej identyfikacji linii laboratoryjnej A-18.
5. Stosunkowo niewielkie różnice między porównywanymi genomami potwierdzają wolne tempo ewolucji genomów chloroplastowych u Marchantiopsida, a kolejność genów i ich orientacja są cechami silnie konserwatywnymi u tej grupy roślin lądowych.
6. Analiza qPCR-HRM dla amplifikowanego fragmentu genu *ycf1* pozwala odróżnić próby *M. polymorpha* subsp. *ruderalis* od innych taksonów z kompleksu oraz od *M. paleacea*.
7. Odrębność haplotypów, dziedziczonego prawdopodobnie w linii matczynej, cpDNA nie potwierdza hipotezy o hybrydowym pochodzeniu *M. polymorpha* subsp. *ruderalis*.