

## Streszczenie

---

Głównym celem projektu była identyfikacja cząsteczek mikroRNA zaangażowanych w rozmnażanie płciowe wątrobowca - *Marchantia polymorpha*. *Marchantia* jest rośliną rozdzielнопłciową, która wytwarza na plechach żeńskich rodniostany (=archegoniofory), zawierające rodnie (=archegonia) a na plechach męskich plemniostany (=anteridiofory), zawierające plemniki (=anteridia). Podobnie jak kwiaty roślin naczyniowych, archegoniofory i anteridiofory są organami zaangażowanymi w rozmnażanie generatywne. MikroRNA (miRNA) reprezentują endogenną klasę niekodujących małych RNA, o długości 18-24 nukleotydów (Reinhart i in. 2002; Carrington i Ambros 2003; Bartel 2009). Odgrywają one ważną rolę w regulacji ekspresji genów (Bartel 2009; J. Wang, Mei i Ren 2019; Yamamoto i in. 2019) na poziomie potranskrypcyjnym poprzez cięcie i degradację mRNA lub blokowanie procesu translacji. U roślin wyższych, istotną częścią procesu rozmnażania jest kwitnienie. Wykazano, że rola cząsteczek miRNA w precyzyjnej regulacji czasu kwitnienia jest kluczowa. Łącznie wykazano, że co najmniej jednaście różnych rodzin miRNA wpływa na różne etapy kwitnienia i rozwoju kwiatów u roślin, a są to rodziny takie jak: miR156, miR159, miR160, miR164, miR166/165, miR167, miR169, miR172, miR319, miR390 i miR399 (Nag i Jack 2010; Hong i Jackson 2015; Samad i in. 2017).

Do tej pory zidentyfikowano mikrotranskryptom dwóch gatunków wątrobowców: *Pellia endiviifolia* i *M. polymorpha* (Alaba i in. 2015 ; Tsuzuki i in. 2016 ; Lin i in. 2016; Bowman i Lin 2018).

W *M. polymorpha* występuje dziewięć zakonserwowanych ewolucyjnie rodzin miRNA (miR160, miR166, miR171, miR319/miR159, miR390, miR408, miR529/miR156, miR530/1030 i miR536), które są wspólne dla roślin lądowych. Ponadto w *Marchantia*, poznano docelowe mRNA dla tych miRNA (Lin i in. 2016; Tsuzuki i in. 2016; Bowman i Lin 2018).

W tej pracy doktorskiej przeprowadziłam głębokie sekwencjonowanie małych cząsteczek RNA (sRNA NGS) w celu zidentyfikowania zestawu miRNA specyficznych tylko dla wątrobowców (czyli według obecnego stanu wiedzy, występujących tylko u *Marchantia* i *Pellia*). Kolejnym krokiem było zbadanie ich potencjalnej roli w rozmnażaniu generatywnym *Marchantia*. Analiza bioinformatyczna eksperymentu NGS pozwoliła nam scharakteryzować rodziny miRNA specyficzne dla wątrobowców (czyli wspólne dla *Pellia* i *Marchantia*), które ulegają zróżnicowanej ekspresji w czterech rodzajach plechy *Marchantia*: w męskich i żeńskich plechach wegetatywnych, anteridioforach oraz archegonioforach. Te rodziny to: miR8190, miR8170, miR8166, miR8178, miR8189 oraz miR8163 (=Mpo-miR11737ab). Poziom ekspresji wybranych rodzin miRNA dodatkowo potwierdzono techniką northern blot. Stosując tę technikę, potwierdzono również poziom wcześniej opisanych zakonserwowanych miRNA obecnych w *Marchantia*, a także dwa miRNA specyficzne dla *Marchantia*: Mpo-miR11796 i Mpo-miR11887. Następnie wykonano głębokie sekwencjonowanie degradomu *Marchantia*, które pozwoliło mi znaleźć docelowe mRNA dla wybranych „wątrobowcowo-specyficznych” rodzin miRNA. Spośród wszystkich analizowanych cząsteczek miRNA szczególną uwagę zwraca Mpo-miR11889, który w tej pracy został przedstawiony bardziej szczegółowo. MiR11889 ulega ekspresji na wykrywalnym poziomie tylko w plemniach *Marchantia*. Jego docelowym mRNA jest transkrypt genu fosfatazy o podwójnej specyficzności DUSP12 (MpDUSP12). Jak dotąd potencjalna funkcja białek DUSP12 w roślinach jest nieznana. Mutanty CRISPR/Cas9  $\Delta$ MIR11889<sup>9e</sup> roślin męskich wykazują zaburzenia odnośnie lokalizacji plemni w anteridioforach *Marchantia*. Mutanty z nadekspresją białka MpDUSP12 wykazują podobne nieprawidłowości w rozmieszczeniu plemni. Eksperymenty zapłodnienia z użyciem roślin męskich i żeńskich  $\Delta$ MIR11889<sup>9e</sup> wykazały, że wzrost poziomu MpDUSP12 w *Marchantia* radykalnie obniża wydajność tworzenia sporangium i prawidłowy

rozwój sporofitu i sporów. Wyniki pracy zwracają uwagę na istotną rolę fosfatazy DUSP12 w rozmnażaniu generatywnym wątrobowców.

**Słowa kluczowe:**

*Marchantia polymorpha*, wątrobowce, miRNA, rozmnażanie płciowe, archegoniofory, anteridiofory