

Charakterystyka funkcjonalna miRNA specyficznych dla wątrobowców w rozwoju narządów płciowych *Marchantia polymorpha*

Bharti Aggarwal
Zakład Ekspresji Genów
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Biologii

STRESZCZENIE

Prawidłowe formowanie organów generatywnych oraz sukces reprodukcyjny wymagają precyzyjnej kontroli procesów rozwojowych na wszystkich etapach cyklu życiowego rośliny. Procesy te opierają się na złożonych sieciach zależności genetycznych, które są w bardzo małym stopniu poznane u roślin niższych. U wątrobowców zidentyfikowano dziewięć konserwatywnych miRNA, obecnych u wszystkich roślin lądowych, oraz zestaw miRNA specyficznych dla tej grupy roślin. Rola wątrobowcowo-specyficznych miRNA w *Marchantia polymorpha* pozostaje w dużej mierze niezbadana. Niektóre z nich wykazują zróżnicowane wzorce ekspresji w organach generatywnych *Marchantia*. W celu zbadania ich roli w rozmnażaniu płciowym przeprowadziłam analizy eksperymentalne wzorców ekspresji różnych miRNA specyficznych dla wątrobowców i wybrałam dwa miRNA do dalszych badań.

Jeden z badanych miRNA, MpmiR11887, wykazywał wyjątkowo wysoką ekspresję w męskich gametangioforach – anteridioforach. Analizy baz danych genomowych oraz badania eksperymentalne wykazały, że gen MpMIR11887 stanowi niezależną jednostkę transkrypcyjną. Co więcej, pre-MpmiR11887 znajduje się tuż za krótkim ORF-em kodującym potencjalne białko o długości 65 aminokwasów, którego funkcja pozostaje nieznana, choć może ono reprezentować miPeP. Barwienie histochemiczne GUS ujawniło, że promotor MpMIR11887 jest aktywny głównie w męskich organach generatywnych, tj. młodych anteridiach oraz komórkach spermatogenicznych anteridioforów, a słabiej w archegoniach. Rośliny te również charakteryzowały się wcześniejszym rozwojem anteridioforów z większymi dyskami anteridialnymi oraz

większymi dojrzałymi anteridiami. Wyniki te wskazują, że MpmiR11887 bierze udział w regulacji rozwoju anteroidalnych dysków i anteridiów.

Drugi z tych miRNA, MpmiR11796, wykazywał zróżnicowaną ekspresję w organach wegetatywnych i generatywnych *Marchantia*, z wyraźnie wysoką akumulacją w żeńskich gametangioforach – archegonioforach. Analizy baz danych genomowych oraz eksperymenty 5'-RLM i 3'-RACE wykazały, że gen *MpMIR11796* stanowi niezależną jednostkę transkrypcyjną pozbawioną intronów, częściowo nakładającą się z genem kodującym białko. Za pomocą histochemicznego barwienia GUS zaobserwowano silną aktywność promotora genu *MpMIR11796* w ryzoidach języczkowych, znajdujących się w ramionach i nóżkach rodniostanów osobników żeńskich. Ponadto męskie osobniki z nokautem genu *MpMIR11796* ($\Delta mpmir11796ko$), uzyskane metodą CRISPR/Cas9, wytwarzały mniej ryzoidów podczas rozwoju gemm, natomiast rośliny żeńskie $\Delta mpmir11796ko$ wykazywały zmniejszone rozmiary plechy i archegonioforów, skrócenie nóżki, zmniejszoną liczbę ryzoidów języczkowych oraz zaburzenia w rozwoju komórki jajowej. Doświadczenia nad krzyżowaniem zmutowanych osobników wykazały także poważne zaburzenia w wytwarzaniu gametangioforów oraz w rozwoju gamet w kolejnym pokoleniu. Obserwacje te wskazują, że MpmiR11796 odgrywa ważną rolę w ogólnym rozwoju *Marchantii*, a w szczególności w rozwoju struktur i funkcjonowaniu organów rozrodczych.

Analizy danych transkryptomicznych i degradomowych pozwoliły na identyfikację potencjalnych docelowych mRNA dla MpmiR11796 i MpmiR11887.