

STRESZCZENIE

Czynniki transkrypcyjne z rodziny *SPL*, *SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE*, stanowią zróżnicowaną funkcjonalnie grupę białek, które kontrolują szereg podstawowych aspektów wzrostu i rozwoju roślin. Ponieważ geny *SPL* są specyficzne dla roślin, stąd konieczne jest zrozumienie ich funkcji wśród przedstawicieli żyjących linii roślin lądowych, aby zrozumieć ich ewolucję. W pierwszej części mojej pracy doktorskiej zajęłam się analizą filogenetyczną w celu zbadania relacji między członkami rodziny *SPL* przedstawicieli wszystkich linii mszaków: dwóch gatunków glików, *Anthoceros agrestis* i *A. punctatus*, wątrobowca *Marchantia polymorpha* i mchu *Physcomitrium patens*, oraz rośliny okrytozałożkowej *Arabidopsis thaliana*. Na podstawie analizy filogenetycznej, białka *SPL* sklasyfikowano w czterech grupach filogenetycznych. Zaobserwowałam ponadto, że członkowie rodziny *SPL* w tej samej grupie posiadają podobne struktury genów i podobny zestaw domen białkowych, co może potencjalnie wskazywać na pełnienie podobnych funkcji. Przeprowadzone badania wykazały, że podobnie jak *M. polymorpha*, przedstawiciele glików również posiadają tylko czterech członków w rodzinie *SPL*, co stanowi najprostszy zestaw genów *SPL* wśród roślin lądowych.

W drugiej części mojej pracy doktorskiej wykorzystałam szereg narzędzi molekularnych w celu określenia funkcji genów *MpSPL3* i *MpSPL4* z modelowego gatunku wątrobowca, *M. polymorpha*. Analiza aktywności transkrypcyjnej promotorów *in planta* badanych genów przy użyciu genu reporterowego β -glukuronidazy w połączeniu z analizą RT-qPCR wykazała, że oba geny ulegają ekspresji zarówno podczas wegetatywnej jak i reprodukcyjnej fazy cyklu życiowego *M. polymorpha*. Następnie, w celu uzyskania roślin z wyłączoną funkcją genu *MpSPL3* lub *MpSPL4* zastosowano podejście CRISPR/Cas9. Otrzymane mutanty $\Delta MpSpl3^{ge}$ charakteryzowały się zredukowaną wielkością i kształtem plech oraz opóźnionym wzrostem w porównaniu do roślin typu dzikiego. Co ciekawe, mutanty $\Delta MpSpl4^{ge}$ wykazały jeszcze silniejszy fenotyp niż rośliny $\Delta MpSpl3^{ge}$, gdyż rośliny te rosły jako masy komórkowe bez charakterystycznej dla *Marchantia* budowy plechy. Ponieważ w przypadku obu genów *MpSPL* utrata ich funkcji spowodowało bardzo silne zaburzenie rozwoju wątrobowca, w kolejnym podejściu zastosowałam sztuczne mikroRNA w celu otrzymania roślin z obniżoną ekspresją badanych genów. W przypadku obu genów, mutanty otrzymane za pomocą sztucznego mikroRNA wykazały opóźnienie wzrostu podczas wegetatywnej fazy cyklu. Co więcej, wytwarzanie gametangioforów zostało

całkowicie zablokowane w przypadku silnie obniżonej ekspresji genu *MpSPL3*, podczas gdy obniżenie ekspresji *MpSPL4* spowodowało opóźnioną produkcję archeonioforów o zmienionej morfologii w porównaniu do roślin typu dzikiego. Dlatego właściwy poziom ekspresji genów *MpSPL3* i *MpSPL4* jest niezbędny dla rozwoju organów rozmnażania płciowego. W celu sprawdzenia efektu nadprodukcji białek *MpSPL3* i *MpSPL4* na rozwój *M. polymorpha*, przygotowałam rośliny transgeniczne z nadekspresją obu genów. Wstępna analiza roślin z nadekspresją genu *MpSPL3* nie wykazała zmian w ich fenotypie podczas wegetatywnej fazy wzrostu w porównaniu do roślin typu dzikiego. Z kolei nadekspresja genu *MpSPL4* spowodowała zmiany w morfologii plech, które były mniejsze i węższe w porównaniu do roślin typu dzikiego oraz wytwarzały powiększone miseczkowate zbiorniki produkujące wegetatywne rozmnożki.

Podsumowując, przedstawione wyniki dają znaczący wgląd w podstawowe funkcje genów *MpSPL3* i *MpSPL4* z rodziny czynników transkrypcyjnych *SPL* u wątrobowca *M. polymorpha*, które są kluczowymi czynnikami kontrolującymi prawidłowy wzrost i rozwój wegetatywnych plech, jak i struktur rozmnażania płciowego u tego wątrobowca.