

Brasinosteroidy (BR) są sterolowymi hormonami roślinnymi. Badania prowadzone u gatunku modelowego *Arabidopsis thaliana* z wykorzystaniem mutantów cechujących się zaburzeniami w metabolizmie tych fitohormonów wykazały, że BR regulują szeroki zakres procesów w cyklu rozwojowym roślin. Analizy tych mutantów wykazały, że zaburzenia metabolizmu BR prowadzą do obniżonego wzrostu (karłowości lub półkarłowości) oraz zmian pokroju roślin. Podjęcie realizowanej w tym projekcie tematyki badawczej wynika z kilku przedstawionych poniżej przesłanek. Procesy biosyntezy i odpowiedzi komórkowej na BR zostały scharakteryzowane w największym stopniu u *A. thaliana*, jednocześnie są one poznane w znacznie mniejszym zakresie u gatunków uprawnych, w tym zbóż. W przypadku jęczmienia (*Hordeum vulgare*) dopiero w ostatnich latach zidentyfikowaliśmy kilka genów, które kodują enzymy zaangażowane w biosyntezę BR, jednak przebieg tego procesu pozostaje nie w pełni wyjaśniony. W ostatnich badaniach określiliśmy również reakcje fizjologiczne półkarłowych mutantów jęczmienia, cechujących się defektami w metabolizmie BR, na stres niedoboru wody. Co istotne, mutanty te wykazały podwyższoną tolerancję na ten stres. Jednak genetyczne mechanizmy odpowiedzialne za regulację reakcji roślin na suszę i udział BR w tych procesach pozostają słabo poznane (nawet u *A. thaliana*). Biorąc pod uwagę powyższe przesłanki, **do celów tego projektu należą:**

- 1) Identyfikacja genów odpowiedzialnych za półkarłowy, zależny od BR fenotyp mutantów jęczmienia, które zostały zidentyfikowane i wyselekcjonowane podczas naszych wcześniejszych eksperymentów
- 2) Analiza funkcjonalna zidentyfikowanych przez nas genów *HvCPII*, *HvSTE1* i *HvDWF5* kodujących enzymy potencjalnie zaangażowane we wczesne etapy biosyntezy BR u jęczmienia
- 3) Analiza globalnego profilu ekspresji genów (profilowanie transkryptomu) u zidentyfikowanych przez nas półkarłowych mutantów jęczmienia, które cechują się zaburzeniami metabolizmu BR, w warunkach optymalnego nawodnienia oraz podczas stresu niedoboru wody
- 4) Określenie profilu akumulacji metabolitów u półkarłowych mutantów jęczmienia, które cechują się zaburzeniami metabolizmu BR, w warunkach optymalnego nawodnienia oraz podczas stresu suszy.

Projekt będzie realizowany z zastosowaniem najnowszych technik badawczych i we współpracy międzynarodowej z naukowcami reprezentującymi Lund University (Szwecja), Palacký University (Czechy) i Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (Francja). Identyfikacja genów odpowiedzialnych za fenotyp półkarłowych mutantów jęczmienia będzie wykonana z zastosowaniem najnowocześniejszej techniki sekwencjonowania DNA - NGS (ang. *Next Generation Sequencing*). W tych badaniach sekwencjonowaniu podlegać będą eksomy (ang. *Exome capture*), które stanowią kodującą część genomu. Ta metodyka jest szczególnie przydatna w określaniu genetycznego podłoża cech u gatunków, których genomy mają duże rozmiary (jak w przypadku jęczmienia), ponieważ umożliwi specyficzną analizę sekwencji kodujących, które stanowią niewielką część genomu. Mutanty, które stanowią materiał badań zostały przez nas wyselekcjonowane podczas wielkoskalowego eksperymentu fenotypowania, scharakteryzowane fizjologicznie i podzielone na grupy alleliczności (w każdej grupie mutacje dotyczą tego samego genu), co stanowi istotny wkład w dalsze analizy, które prowadzone będą we współpracy z Lund University.

Analiza funkcjonalna genów *HvCPII*, *HvSTE1* i *HvDWF5* prowadzona będzie z użyciem techniki TILLING (*Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*). Materiałem tych badań będzie populacja HorTILLUS, która została stworzona w Katedrze Genetyki Uniwersytetu Śląskiego i stanowi ważną w skali europejskiej platformę do analizy funkcjonalnej genów jęczmienia. Badanie ma na celu identyfikację serii alleli (wersji) badanych genów. W celu zwiększenia efektywności badań wytypowano z użyciem metod bioinformatycznych odpowiednie fragmenty tych genów do analiz funkcjonalnych. Zidentyfikowane mutanty będą stanowić materiał do analiz zawartości endogennych BR w celu potwierdzenia roli badanych genów w biosyntezie BR. Analizy akumulacji BR będą wykonane z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (UHPLC) i spektrometrii mas (MS/MS) we współpracy z Palacký University.

Materiałem do analizy globalnego profilu ekspresji genów (profilowanie transkryptomów) oraz profilu akumulacji metabolitów będą linie półkarłowych mutantów jęczmienia, które cechują się zaburzeniami metabolizmu BR oraz odmiana referencyjna. W tych eksperymentach rośliny tych genotypów będą wzrastały w warunkach optymalnego nawodnienia (kontrola) oraz w warunkach niedoboru wody. Analizy globalnego profilu ekspresji będą wykonane przy użyciu nowoczesnej techniki molekularnej wysokoprzepustowego sekwencjonowania RNA (RNA-Seq). Profil akumulacji metabolitów będzie określany przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (UHPLC) i spektrometrii mas (MS/MS) we współpracy z Institut de Biologie Moléculaire des Plantes. Wyniki eksperymentów profilowania transkryptomów oraz określenie profilu akumulacji metabolitów umożliwią wgląd w mechanizmy genetycznej i biochemicznej regulacji reakcji na stres suszy, co jest istotne dla zrozumienia tego ważnego procesu fizjologicznego u roślin, szczególnie zbóż. Co więcej, zestawienie danych dotyczących transkryptomów i akumulacji metabolitów u badanych mutantów względem odmiany referencyjnej umożliwi również określenie roli BR w regulacji tego mechanizmu.