

**Celem przedstawianego projektu jest zglębianie molekularnych mechanizmów odpowiedzi roślin jednoliściennych na stres środowiskowy związany z obecnością fitotoksycznych jonów glinu (aluminium,  $Al^{3+}$ ) w podłożu.** Glin jest najpowszechniejszym metalem występującym w skorupie ziemskiej. Jest zatem składnikiem prawie wszystkich gleb na świecie. W glebach o neutralnym bądź zasadowym pH pozostaje związany w minerałach i nie jest toksyczny, natomiast w warunkach niskiego pH przyjmuje postać fitotoksycznych jonów  $Al^{3+}$ , które wnikają do korzeni i hamują ich wzrost, co przekłada się również na redukcję części nadziemnych rośliny i w efekcie na obniżony plon. Szacuje się, że obecnie ok. 50% obszarów uprawnych na świecie ma kwaśną glebę (pH < 5.5), a w takich warunkach Al jest głównym czynnikiem limitującym plon. **Poznanie mechanizmów molekularnych odpowiedzi roślin na stres związany z toksycznością jonów glinu jest zatem niezwykle istotne i umożliwi wyprowadzanie nowych odmian roślin tolerancyjnych na ten stres.**

Materiałem do badań będzie jęczmień (*Hordeum vulgare* L.), jeden z gatunków modelowych roślin jednoliściennych, który jest czwartym zbożem pod względem areału upraw na świecie i jednym z najwrażliwszych na jony  $Al^{3+}$  gatunków roślin uprawnych. **W ramach pracy planowane jest wyprowadzenie mutantów jęczmienia charakteryzujących się mutacjami w genie *HvSTOP1***, który jest homologiem genu *AtSTOP1* kodującego **kluczowy czynnik transkrypcyjny kontrolujący odpowiedź na jony glinu** u Arabidopsis. W tym celu wykorzystana zostanie platforma *HorTILLUS* – populacja TILLINGowa jęczmienia wyprowadzona w Uniwersytecie Śląskim. Populacja ta zostanie przeanalizowana z wykorzystaniem strategii TILLING w celu identyfikacji roślin niosących nowe, zmutowane allele *HvSTOP1*. Równolegle wyprowadzone zostaną dla tego genu mutanty typu knock-out z wykorzystaniem strategii CRISPR/Cas9 (we współpracy z dr Alesem Pecinką z Czeskiej Akademii Nauk). Wszystkie wygenerowane mutanty zostaną przetestowane w warunkach hydroponicznych pod kątem odpowiedzi na Al. Wpływ glinu na różne parametry systemu korzeniowego (takie jak liczba korzeni seminalnych i bocznych, ich długość, średnica, etc.) oceniany będzie z wykorzystaniem specjalistycznego programu WinRHIZO. Następnie mutanty o zmienionej, w porównaniu do odmiany wyjściowej (WT), odpowiedzi na Al poddane zostaną bardziej szczegółowemu fenotypowaniu obejmującemu m.in. analizy morfologiczne, fizjologiczne i cytologiczne, takie jak ocena częstotliwości podziałów komórkowych w merystemie korzeniowym, analiza cyklu komórkowego z wykorzystaniem cytometru przepływowego, czy ocena poziomu uszkodzeń DNA. **Planowane badania umożliwią analizę funkcjonalną genu *HvSTOP1***. Ponadto, dla wybranych mutantów *stop1* (jednego mutantu TILLING i jednego CRISPR/Cas9) oraz ich odmian wyjściowych przeprowadzona zostanie analiza RNA-seq, która umożliwi poznanie genów regulowanych (bezpośrednio bądź pośrednio) przez czynnik transkrypcyjny STOP1, a przez to **poznane zostaną ścieżki STOP1-zależnej i STOP1-niezależnej regulacji transkrypcyjnej odpowiedzi na Al**. Uzyskane wyniki zostaną porównane z ogólnodostępnymi wynikami RNA-seq otrzymanymi dla Arabidopsis w celu oceny uniwersalności tych ścieżek u roślin jedno- i dwuliściennych, oraz identyfikacji czynników specyficznych dla poszczególnych grup.

**W ramach projektu planujemy również przeprowadzić analizę funkcjonalną jęczmiennych genów *ALSI* oraz *ALS3*, kodujących białka transportowe potencjalnie zaangażowane w transport Al.** Wyprowadzimy mutanty TILLING i CRISPR/Cas9 dla genów *HvALSI.1* i *HvALSI.2*, które zidentyfikowaliśmy w naszych wcześniejszych badaniach transkryptomu jęczmienia wśród genów indukowanych Al. Te dwa paralogi są homologami genu *AtALSI*, kodującego **białko transportowe (ABC transporter) odpowiedzialne za transport jonów  $Al^{3+}$  z cytoplazmy do wakuoli, gdzie ulegają sekwestracji (dezaktywacji)**. W celu analizy funkcjonalnej paralogów *ALSI* zostaną również wyprowadzane podwójne mutanty. Zarówno pojedyncze, jak i podwójne mutanty będą przetestowane w taki sam sposób, jak opisany powyżej dla mutantów *stop1*. Spodziewamy się, że mutanty w tych genach będą nadwrażliwe na badany stres, z uwagi na kumulowanie się jonów Al w cytoplazmie komórek korzeniowych (brak sekwestracji w wakuoli). Kolejny analizowany gen, *HvALS3*, koduje inne **białko transportowe z rodziny ABC**, które, przynajmniej u Arabidopsis, jest **odpowiedzialne za transport jonów Al z korzeni do wyższych, mniej wrażliwych na Al, części rośliny**. W naszych wcześniejszych badaniach zidentyfikowaliśmy szereg mutantów TILLING w genie *HvALS3*. Spodziewaliśmy się, że będą one wrażliwsze na Al niż WT z uwagi na kumulację Al w korzeniu, jednak nie wykazywały one nadwrażliwości. Stworzyliśmy zatem hipotezę, że, być może, jęczmień jest tak wrażliwy na Al m.in. z uwagi na niepoprawne funkcjonowanie mechanizmu umożliwiającego transport Al do części nadziemnych. W ramach projektu planowane jest wyprowadzenie mutantów CRISPR/Cas9 (knock-out) dla genu *HvALS3* i przetestowanie ich odpowiedzi na glin. Jeśli mutanty te również nie będą wrażliwsze na Al niż ich forma wyjściowa, pośrednio potwierdzi to naszą hipotezę. W celu potwierdzenia tej hipotezy, sprawdzimy również zawartość glinu w korzeniach i liściach analizowanych genotypów rosnących w warunkach stresu Al.

W ostatnim etapie projektu, wybrany zostanie mutant *als1*, cechujący się nadwrażliwością na Al, na którym przeprowadzona zostanie **mutagenеза supresorowa mająca na celu zidentyfikowanie mutantów o zniesionej nadwrażliwości na Al**. Otrzymanie mutantów supresorowych umożliwi późniejszą identyfikację genów odpowiedzialnych za zniesienie nadwrażliwości i poznanie nowych elementów ścieżki odpowiedzi na Al.