

Załącznik nr 2

Dr Izabela Pawłowicz

Autoreferat

Analiza ekspresji wybranych genów związanych z fotosyntezą oraz wodną homeostazą podczas odpowiedzi kostrzewy trzcinowej (*Festuca arundinacea*) i kostrzewy łąkowej (*F. pratensis*) na stresy abiotyczne (suszę, zasolenie i niską temperaturę)

**Zespół Fizjologii Molekularnej i Cytogenetyki Roślin
Zakład Biologii Stresów Środowiskowych
Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, Poznań**

Poznań 2019

1. Imię i nazwisko.

Izabela Pawłowicz

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- Dyplom magistra biologii, specjalność – biologia molekularna (28.06.1999 r.); Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Praca magisterska pt.: „Transformacja tytoniu konstruktami zawierającymi sekwencje MAR”, wykonana pod kierunkiem dr. Witolda Kaczmarka w Zakładzie Biochemii Biopolimerów Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.
- Dyplom doktora nauk rolniczych, dyscyplina – agronomia (24.02.2005 r.); Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Rozprawa doktorska pt.: „Analiza ekspresji genu kodującego białko dehydrynowe 9.8 kDa w roślinach transgenicznych ziemniaka (*Solanum sogarandinum* i *Solanum tuberosum*)”, wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Tadeusza Rorata.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

- 11.2018 - obecnie – biolog w Zakładzie Biologii Stresów Środowiskowych Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
- 11.2016-11.2017 – asystent w Zakładzie Biologii Stresów Środowiskowych Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
- 06.2005-03.2016 – adiunkt w Zakładzie Biologii Stresów Środowiskowych (wcześniej Pracownia Cytogenetyki i Biologii Molekularnej i Pracownia Cytogenetyki) Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
- 11.1999-02.2005– słuchaczka studium doktoranckiego przy Wydziale Biologii UAM w Poznaniu, wykonanie pracy doktorskiej w Pracowni Genomiki Funkcjonalnej Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm.).

a) tytuł osiągnięcia naukowego / artystycznego

Analiza ekspresji wybranych genów związanych z fotosyntezą oraz wodną homeostazą podczas odpowiedzi kostrzewy trzcinowej (*Festuca arundinacea*) i kostrzewy łąkowej (*F. pratensis*) na stresy abiotyczne (suszę, zasolenie i niską temperaturę)

b) (autor / autorzy, tytuł / tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

- * autor korespondencyjny
- wartość IF (*Impact Factor*) wg JCR dla prac opublikowanych przed 2019 rokiem podano zgodnie z rokiem ich opublikowania; w przypadku prac opublikowanych w roku 2019 podano dostępny IF z roku 2018;
- punktację MNiSW dla poszczególnych publikacji podano wg wykazu uaktualnionego w 2016 r.;

P1. Pawłowicz I*, Masajada K (2019) Aquaporins as a link between water relations and photosynthetic pathway in abiotic stress tolerance in plants. *Gene* 687: 166-172. [IF₂₀₁₈ = 2,498; MNiSW₂₀₁₆ = 20].

P2. Pawłowicz I*, Waśkiewicz A, Perlikowski D, Rapacz M, Ratajczak D, Kosmala A (2018) Remodeling of chloroplast proteome under salinity affects salt tolerance of *Festuca arundinacea*. *Photosynthesis Research* 137: 475-492. [IF₂₀₁₈ = 3,091; MNiSW₂₀₁₆ = 40].

P3. Pawłowicz I*, Rapacz M, Perlikowski D, Gondek K, Kosmala A (2017) Abiotic stresses influence the transcript abundance of PIP and TIP aquaporins in *Festuca* species. *Journal of Applied Genetics* 58:421-435. [IF₂₀₁₇ = 1,756; MNiSW₂₀₁₆ = 20].

P4. Pawłowicz I*, Kosmala A, Rapacz M (2012) Expression pattern of the *psbO* gene and its involvement in acclimation of the photosynthetic apparatus during abiotic stresses in *Festuca arundinacea* and *F. pratensis*. *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 1915-1924. [IF₂₀₁₂ = 1,305; MNiSW₂₀₁₆ = 25].

P5. Pawłowicz I*, Rapacz M (2010). Genotype differences in drought tolerance of photosynthetic apparatus in *Festuca arundinacea* Schreb. are connected with Cu-Zn SOD protein accumulation. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 545: 191-197. [MNiSW₂₀₁₆ = 13].

Summaryczny Impact Factor: 8,65

Łączna liczba punktów MNiSW: 118

Opis indywidualnego wkładu habilitanta w powstanie każdej z wieloautorskich publikacji znajduje się w **Załączniku nr 4** i **Załączniku nr 5** pt.: „Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki” (wersja w języku polskim i języku angielskim).

Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych publikacji, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, znajdują się w **Załączniku nr 6.**

c) omówienie celu naukowego / artystycznego ww. pracy / prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

WSTĘP

Stresy abiotyczne są głównym czynnikiem ograniczającym występowanie roślin w poszczególnych strefach klimatycznych. Temperatura, dostępność wody oraz zasolenie gleby (pojawiające się głównie na obszarach ulegających stepowieniu) mają największy wpływ na ich wzrost i rozwój. Pierwotne uszkodzenia spowodowane działaniem stresów dotyczą zaburzeń w przebiegu procesu fotosyntezy oraz utrzymywania wodnej homeostazy. Gatunki zróżnicowane pod względem tolerancji na dany rodzaj stresu posiadają odmienne wzory ekspresji kluczowych genów kodujących białka biorące udział w regulacji tych procesów. Istotną funkcję w odpowiedzi roślin na dehydratację pełnią akwaporyny - białka błonowe należące do rodziny MIP (ang. Major Intrinsic Proteins) (**Pawłowicz i in. 2018 –P2**). Obecność tych białek w błonach biologicznych zwiększa ich przepuszczalność dla wody, a także innych niskocząsteczkowych substancji. U roślin wyższych akwaporyny klasyfikuje się w sześciu następujących podrodzinach: PIPs (ang. Plasma membrane Intrinsic Proteins), TIPs (ang. Tonoplast Intrinsic Proteins), NIPs (ang. Nodulin-26-like Intrinsic Proteins), SIPs (ang. Small, basic Intrinsic Proteins), GIPs (ang. GlpF-like Intrinsic Proteins) oraz XIPs (ang. uncategorized X intrinsic proteins). Przynależność poszczególnych izoform do danej podrodziny jest związana z ich błonowo-specyficzną akumulacją. W plazmolemie lokalizowane są białka PIPs, NIPs oraz XIPs, w retikulum endoplazmatycznym NIPs i SIPs, a w tonoplaście TIPs. Akwaporyny występują w formie homo- bądź hetero-tetramerów, przy czym każdy monomer tworzy niezależny kanał. Monomery przyjmują tzw. strukturę klepsydry (ang. hourglass-like structure), która jest zbudowana z sześciu transbłonowych α -helis połączonych ze sobą za pomocą pięciu pętli (A do E) (Fujiyoshi i in. 2002). W strukturze białka wyróżnia się dwa konserwatywne motywy: NPA (asparagina-prolina-alanina) oraz tzw. motyw Ar/R (aminokwas aromatyczny/arginina), które uczestniczą w selekcji związków, jakie mogą być transportowane przez kanał (Törnroth-Horsefield i in. 2006). Do najlepiej scharakteryzowanych akwaporyn należą izoformy z podrodziny PIPs i

TIPs. W obrębie podrodziny PIPs wyróżnia się grupy PIP1 i PIP2, które różnią się nieznacznie budową, jak również wydajnością przewodzenia wody (Zelazny i in. 2007; Yaneff i in. 2014; Byrt i in. 2017). Z kolei podrodzina TIPs jest podzielona na pięć grup (TIP1-TIP5) akumulowanych są w różnych typach wakuoli (Reinhardt i in. 2016). W tkankach wegetatywnych najliczniejsze są izoformy TIP1 i TIP2. Zarówno białka PIPs, jak i TIPs tworzą kanały, przez które mogą przenikać cząsteczki wody. Wykazano, że obniżenie ekspresji genów *PIPs* powoduje redukcję przewodnictwa wodnego w liściach (K_{leaf}) i korzeniach (Lp_r) (Prado i in. 2013; Song i in. 2016; Gitto i Fricke 2018). Ponadto, zarówno izoformy PIP1, jak i PIP2 uczestniczą w transporcie dwutlenku węgla przez błony komórkowe, a tym samym biorą udział w regulacji przewodnictwa szparkowego, jak również mezofilowego. Badania wykazały, że geny kodujące akwaporyny podlegają zarówno pozytywnej, jak i negatywnej regulacji w warunkach stresów abiotycznych u wielu gatunków roślin, zarówno jedno-, jak i dwuliściennych (Venkatesh i in. 2013; Hove i in., 2015; Kayum i in. 2017). Profile ekspresji poszczególnych genów były specyficzne dla danego czynnika stresowego. U *Arabidopsis* podczas suszy i zasolenia obserwowano zarówno wzrost, jak i spadek poziomu transkryptu wielu genów kodujących akwaporyny, natomiast podczas hartowania w chłodzie ekspresja większości badanych genów uległa obniżeniu (Jang i in. 2004). Indukowane suszą obniżenie ekspresji genów takich jak *PIP1;5*, *PIP2;2*, *PIP3;2* i *PIP2;4* u *Arabidopsis* (głównie ulegających ekspresji w korzeniach), w początkowej fazie stresu prowadziło do zatrzymania wody w komórkach (Jang i in. 2004; Alexandersson i in. 2005). Natomiast wzmożona ekspresję genów takich jak *JcPIP2* z *Jatropha curcas* (Jang i in. 2013) oraz *AtTIP2;1* z *Arabidopsis* (Oono i in. 2003) obserwowano po ponownym nawodnieniu roślin (faza regeneracji), co było związane z przywróceniem optymalnego uwodnienia tkanek po ustąpieniu stresu. Nadekspresja genów *PIP1* i *PIP2* u wielu gatunków roślin jedno- i dwuliściennych, takich jak *Oryza sativa* (Liu i in. 2013; Ding i in. 2015), *Nicotiana tabacum* (Huet i in. 2012; Zhou i in. 2012; Chang i in. 2016), *Solanum lycopersicum* (Sade i in. 2010; Li i in. 2016; Wang i in. 2017) powodowała zwiększenie poziomu ich tolerancji na suszę i zasolenie. U mutantów obserwowano między innymi szybszy wzrost, lepiej rozwinięty system korzeniowy, szybsze zamykanie aparatów szparkowych w warunkach stresu, a co za tym idzie wolniejszą utratę wody, ulepszony współczynnik WUE (ang. Water Use Efficiency) oraz wyższe przewodnictwo wodne korzeni. Rośliny transgeniczne o zwiększonej tolerancji na suszę charakteryzowały się wyższymi wartościami współczynnika K/Na, wyższym stężeniem jonów wapnia i proliny w tkankach,

wyższą aktywnością enzymów antyoksydacyjnych, obniżoną peroksydacją lipidów oraz obniżonym wyciekami elektrolitów.

Najbardziej wrażliwym na działanie stresów abiotycznych komponentem aparatu fotosyntetycznego jest fotoukład II (PSII). Jest to kompleks zbudowany z wielu podjednostek białkowych zlokalizowany w tylakoidach chloroplastów, w którym zachodzą reakcje fazy jasnej fotosyntezy. Stresy abiotyczne powodują obniżenie jego aktywności, jak również łańcucha transportu elektronów (ang. rozwinięcie skrótu ETC), co z kolei generuje stres fotooksydacyjny w komórkach (Gururani i in. 2012; Roach i in. 2014). Najważniejszym mechanizmem obronnym przed stresem fotooksydacyjnym jest przekształcenie energii świetlnej w termiczną, która następnie w postaci ciepła jest uwalniana przez rośliny do otoczenia. Proces ten nazywany jest dyssypacją energii cieplnej (ang. Non-Photochemical Quenching – NPQ) (Nath i in. 2013; Rochaix i in. 2014), który często występuje podczas hartowania roślin w chłodzie. Nadprodukcja reaktywnych form tlenu (ang. rozwinięcie skrótu ROS) może prowadzić do peroksydacji lipidów. Z kolei peroksydacja lipidowych komponentów PSII może powodować degradację białek wchodzących w jego skład (Li i in. 2018) i jest jedną z głównych przyczyn jego uszkodzeń. U roślin wyższych w budowie centrum katalitycznego PSII, tzw. OEC (ang. Oxygen Evolving Complex) wyróżnia się kompleks manganowy (Mn_4Ca) i związane z nim liczne zewnętrzne i wewnętrzne białka (ang. extrinsic and intrinsic proteins), które pełnią funkcje stabilizacyjną kompleksu (Ifuku i in. 2005; Yi i in. 2009; Bricker i in. 2012). Do dwóch najważniejszych białek zewnętrznych należą: OEE1 (PsbO) oraz OEE2 (PsbP) o masie cząsteczkowej wynoszącej odpowiednio 33 i 24 kDa (Su i in. 2017) akumulowane w świetle tylakoidów. Białko OEE1 (PsbO) nazywane jest również białkiem stabilizującym kompleks manganowy (ang. manganese-stabilizing protein – MSP). Posiada ono silnie zakonserwowaną strukturę i jest syntetyzowane u wszystkich organizmów przeprowadzających fotosyntezę w warunkach tlenowych (De Las Rivas i in. 2004). Z przeprowadzonych badań wynika, że białko OEE1 pełni najistotniejszą funkcję w prawidłowym funkcjonowaniu PSII poprzez utrzymywanie optymalnego stężenia jonów manganu (Bommer i in. 2016), a także wapnia i chloru w centrum aktywnym PSII (Popelkova i in. 2011; Roose i in. 2016). W ten sposób OEE1 pełni rolę białka opiekuńczego (ang. chaperone) (Yamamoto i in. 2016). Białko OEE1 jest kodowane przez jeden gen u *Oryza sativa*, lub przez dwa geny u *Arabidopsis* i *Solanum tuberosum*. U *Arabidopsis* izoforma PsbO1 bierze udział w utrzymywaniu prawidłowej aktywności PSII, podczas gdy izoforma PsbO2 w regulacji fosforylacji białka D1 podczas cyklu naprawczego PSII (Lundin i

in. 2007). Wykazano, że izoforma PsbO1 może przejmować funkcję izoformy PsbO2 (Lundin i in. 2007). Dodatkową funkcją białka OEE1 może być udział w ochronie PSII przed uszkodzeniami fotooksydacyjnymi (Gururani i in. 2012; Gururani i in. 2013; Roose i in. 2016). Brak ekspresji genu *PsbO1* u mutantów *Arabidopsis*, powodował obniżoną aktywność PSII, podczas gdy u roślin transgeniczných z wyłączoną ekspresją genu *PsbO2* aktywność ta była podwyższona. U roślin *F. pratensis* białko OEE1 ulegało częściowej degradacji podczas hartowania w chłodzie (Kosmala i in. 2009). Podobnie jak w przypadku białka OEE1, funkcją białka OEE2 jest utrzymywanie optymalnego stężenia jonów wapnia i chloru w kompleksie manganowym (Yi i in. 2009; Bricker i in. 2012), co wiąże się ze zmianami konformacyjnymi końca aminowego białka OEE2 (Tomita i in. 2009). U *Arabidopsis* białko OEE2 również jest kodowane przez dwa geny: *PsbP1* i *PsbP2*, przy czym z genu *PsbP2* nie powstaje funkcjonalne białko (Ishihara i in. 2007; Allahverdiyeva i in. 2009).

Do białek chloroplastowych o istotnym znaczeniu w przebiegu fotosyntezy należą lipokaliny, zbudowane z 120-180 aminokwasów. Ich specyficzna struktura trzeciorzędowa pozwala na wiązanie ligandów, którymi są małe, zazwyczaj hydrofobowe cząsteczki, takie jak kwasy tłuszczowe, retinoidy, steroidy oraz feromony (Flower 2000; Flower i in. 2000). Wśród lipokalin wyróżnia się dwie grupy tzw. lipokaliny prawdziwe (ang. true lipocalins) oraz białka lipokalinopodobne (ang. lipocalin-like proteins). Do lipokalin prawdziwych zaliczane są lipokaliny indukowane temperaturą (ang. temperature-induced lipocalins, TIL) akumulowane w plazmolemie, oraz lipokaliny chloroplastowe (ang. chloroplastic lipocalins, CHL) obecne w świetle tylakoidów (Charron 2005). Lipokaliny prawdziwe posiadają w swojej strukturze białkowej trzy kopie motywu SCR (ang. Structurally Conserved Region) oraz antyrównoległą β -harmonijkę (Flower i in. 2000). Do białek lipokalinopodobnych zaliczane są enzymy cyklu ksantofilowego: epoksydaza zeaksantynowa (ZEPs) i wiolaksantyna (VDEs). Ekspresja genów kodujących lipokaliny chloroplastowe jest regulowana przez czynniki abiotyczne (Charron i in. 2008; Levesque-Tremblay i in. 2009; Kjellsen i in. 2010). Rola lipokalin u roślin nie została jak dotąd szczegółowo wyjaśniona. Wysoka akumulacja chloroplastowej lipokaliny w suszy u roślin transgeniczných *Arabidopsis* z nadekspresją genu *AtCHL* powodowała ich wyższą przeżywalność (Levesque-Tremblay i in. 2009). Była ona związana ze zwiększonym poziomem tolerancji na stres oksydacyjny mutantów, u których obserwowano obniżony poziom peroksydacji lipidów w błonach komórkowych w warunkach dehydratacji oraz silnego natężenia światła. Natomiast mutanty typu knock-out posiadały wyższą zawartość hydroksylowych kwasów tłuszczowych, w porównaniu z roślinami typu

dzikiego. Wyższy poziom lipokaliny indukowanej temperaturą (AtTIL) u mutantów *Arabidopsis* z nadekspresją genu *AtTIL* powodował zwiększenie tolerancji na mróz, jak również stres oksydacyjny (Charron i in. 2008).

CEL NAUKOWY I UZYSKANE WYNIKI

W Zespole Fizjologii Molekularnej i Cytogenetyki Roślin Instytutu Genetyki Roślin PAN realizowane są badania dotyczące molekularnych podstaw tolerancji stresów abiotycznych u traw pastewnych z rodzaju *Festuca* (kostrzewy). Rodzaj ten skupia około 500 gatunków o znakomitych właściwościach użytkowych cenionych między innymi w przemyśle nasiennym, szeroko rozpowszechnionych w strefach klimatu umiarkowanego (Hand i in. 2012). Do gatunków o największym znaczeniu gospodarczym należą: *Festuca pratensis* Huds. (kostrzewa łąkowa) o wysokiej zimotrwałości oraz tolerancji na mróz (Kosmala i in. 2009; Jurczyk i in. 2012, 2016) oraz *Festuca arundinacea* Schreb. (kostrzewa trzcinowa) o wysokiej tolerancji na suszę, zasolenie oraz wysoką temperaturę (Gao i in. 2015; Perlikowski i in. 2016; Zhuang i in. 2018). Jak wskazują liczne badania, gatunki te stanowią doskonały model do badań funkcji genów związanych z różnymi typami odpowiedzi roślin na działanie czynników środowiskowych, również ze względu na ich wewnątrzgatunkową zmienność (Kosmala i in. 2009, Bocian i in. 2011).

Badania wchodzące w skład niniejszego osiągnięcia naukowego miały między innymi na celu identyfikację genów zaangażowanych w strategię tolerancji odwodnienia protoplastu u kostrzewy trzcinowej (*F. pratensis*) i kostrzewy łąkowej (*F. arundinacea*).

Dehydratacja protoplastu może być wywoływana działaniem suszy i zasolenia, jak również towarzyszyć stresowi mrozu. Wiąże się ona ze zmianą ekspresji wielu genów. Przeprowadzone badania obejmowały szczegółową analizę ekspresji na poziomie transkryptu i białka wybranych genów kodujących akwaporyny z podrodzin PIPs i TIPs oraz genów kodujących kluczowe białka związane z funkcjonowaniem aparatu fotosyntetycznego podczas suszy, zasolenia oraz niskiej temperatury. Zastosowany układ eksperymentalny polegał na analizie porównawczej ekspresji wyżej wymienionych grup genów u dwóch genotypów danego gatunków *Festuca*, różniących się znacząco poziomem tolerancji na dany rodzaj stresu (Tabela 1). Zastosowanym kryterium wyboru podczas selekcji genotypów z populacji

F. arundinacea był fluorymetryczny pomiar fluorescencji chlorofilu (Pawłowicz i Rapacz 2010 – P5), natomiast genotypów z populacji *F. pratensis* zdolności roślin do odrostu po wymrożeniu (wizualna skala Larsena) oraz stopień uszkodzenia błon komórkowych pod wpływem mrożenia (pomiar wycieku elektrolitów – test T_{EL50}) (Kosmala i in. 2009).

Tabela 1 Nazwy i skróty genotypów *F. arundinacea* i *F. pratensis* o zróżnicowanej tolerancji na suszę, zasolenie i niską temperaturę użytych jako materiał badawczy

Stres	Genotyp o niskim poziomie tolerancji stresu (ang. low-stress tolerant genotype)	Genotyp o wysokim poziomie tolerancji stresu (ang. high-stress tolerant genotype)	Gatunek
Susza	LDT (Fa31 i Fa60)	HDT (Fa35 i Fa45)	<i>Festuca arundinacea</i>
Zasolenie	LST (Fa14)	HST (Fa18)	<i>Festuca arundinacea</i>
Niska temperatura	LFT (Fp13)	HFT (Fp37)	<i>Festuca pratensis</i>

Klony poszczególnych genotypów umieszczono w doniczkach, a następnie poddano je działaniu suszy (*F. arundinacea*) (Kosmala i in. 2012; Pawłowicz i in. 2012 – P4), zasolenia (*F. arundinacea*) (Pawłowicz i in. 2018 – P2) oraz niskiej temperatury (*F. pratensis*) (Kosmala i in. 2012; Pawłowicz i in. 2012 – P4). Dla uzyskania deficytu wody rośliny nie były podlewane przez okres 11 dni. Następnie były one ponownie nawadniane (rehydratacja), w celu oceny ich potencjału do regeneracji po ustąpieniu stresu. Podczas stresu solnego rośliny podlewano 250 mM roztworem NaCl przez 11 (Pawłowicz i in. 2012 – P4) bądź 24 dni (Pawłowicz i in. 2018 – P2). Warunki wzrostu roślin w czasie suszy i zasolenia były następujące: temperatura – 22/17 °C, fotoperiod – 16 h dzień, światło – 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Relatywna wilgotność powietrza w czasie suszy wynosiła 30%, a podczas zasolenia 60%. Podczas stresu niskiej temperatury (hartowanie w chłodzie), zastosowano następujące warunki wzrostu roślin: 7-dniowe pre-hartowanie (temperatura – 12 °C fotoperiod – 8 h dzień, światło 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), poprzedziło okres 21-dniowego hartowania w chłodzie (temperatura – 4/2 °C, fotoperiod – 10 h dzień, światło – 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD). Próby do analiz zbierano w warunkach optymalnego wzrostu (kontrola), podczas stresu (punkty czasowe) oraz po 10 dniach nawadniania w przypadku stresu suszy.

W trakcie eksperymentów prowadzono następujące pomiary parametrów fizjologicznych w liściach: relatywnej zawartości wody w tkankach (ang. Relative Water Content – RWC), wycieku elektrolitów (ang. Electrolyte Leakage – EL), wymiany gazowej oraz fluorescencji chlorofilu. Ich celem było określenie różnic w reakcji fizjologicznej wybranych genotypów na dany rodzaj stresu, co mogłoby być związane z odmiennym przebiegiem reakcji metabolicznych w liściach. W warunkach suszy wykonano analizy fizjologiczne dla dwóch genotypów o wysokim poziomie tolerancji (Fa35 i Fa45) oraz dwóch o znacząco niższym poziomie tolerancji (Fa31 i Fa60), które następnie zostały wykorzystane w dwóch niezależnych eksperymentach (Kosmala i in. 2012; **Pawłowicz i in. 2012 – P4**).

W normalnych warunkach wzrostu badane genotypy *F. arundinacea* posiadały zbliżony poziom RWC. Natomiast obserwowana w warunkach suszy utrata wody zawartej w liściach była szybsza u genotypów LDT (Fa35 i Fa60) w porównaniu do genotypów HDT (Fa31 i Fa45). Największe różnice pomiędzy genotypami Fa31 i Fa35 zanotowano w 6 dniu stresu (**Pawłowicz i in. 2012 – P4**), natomiast pomiędzy Fa60 i Fa45 w 11 dniu stresu (Kosmala i in. 2012). Po ponownym nawodnieniu roślin (rehydratacji), poziom RWC powrócił do wartości początkowych u wszystkich badanych genotypów z wyjątkiem Fa35, gdzie pozostał na nieco obniżonym poziomie.

Podobnie, w suszy obserwowano znaczący wzrost wycieku elektrolitów (EL) u badanych roślin w porównaniu do warunków kontrolnych, z wyjątkiem genotypu Fa45. Wyższe wartości EL zanotowano dla genotypów LDT. Najbardziej znaczące różnice między genotypami Fa35 i Fa31 miały miejsce w 6 dniu stresu, natomiast między genotypami Fa60 i Fa45 w 9 i 11 dniu stresu. Najwyższe wartości EL odnotowano dla genotypu Fa35 w zaawansowanej fazie suszy. Po rehydratacji poziom RWC u genotypu Fa35 był nieznacznie wyższy w stosunku do ostatniego dnia suszy, natomiast u pozostałych genotypów obniżył się do poziomu kontrolnego. Spadek wartości EL u genotypów Fa31 oraz Fa60 wskazywał na ich znakomity potencjał do naprawy uszkodzeń błon komórkowych u genotypu LDT w fazie rehydratacji.

Pomiar fluorescencji chlorofilu również wykazał znaczące różnice pomiędzy badanymi genotypami, ale tylko w warunkach stresu. Genotypy Fa60 i Fa45 różniły się między innymi wartościami ABS/CS (ang. light energy absorption), TRo/CS (ang. trapped energy flux per CS) oraz ETo/CS (ang. electron transport flux per CS). Podwyższone w porównaniu do kontroli wartości parametrów ABS/CS oraz TRo/CS obserwowano u genotypu Fa45 w 3 i 6 dniu suszy. Susza nie wywołała zmian w poziomie ABS/CS u genotypu Fa60, jednakże uległ

on obniżeniu po powtórным nawodnieniu roślin. Wartość parametru ET_o/CS wzrosła u genotypu Fa45 pomiędzy kontrolą a 3 dniem suszy, natomiast obniżyła się ona u genotypu Fa60 w 9 i 11 dniu stresu. Uzyskane wyniki wskazują na znaczne zaburzenia integralności fotoukładu II (PSII) u genotypu Fa60 podczas deficytu wodnego. W trakcie suszy genotyp Fa31 osiągnął niższą wartość parametru DIo/CS (ang. energy dissipation from PSII reaction centers) w stosunku do genotypu Fa35 (Pawłowicz i in. 2012 – P4). Ponadto, u obu genotypów podczas stresu nastąpił spadek wartości frakcji OEC (ang. fraction OEC), przy czym był on większy u genotypu Fa35. W zaawansowanej suszy (dzień 11) zarówno u genotypu LDT (Fa60), jak i HDT (Fa45) nastąpiło znaczące obniżenie analizowanych parametrów wymiany gazowej w porównaniu z fazą regeneracji (Kosmala i in. 2012). Niższy poziom asymilacji dwutlenku węgla (P_n) oraz transpiracji (E) podczas stresu obserwowano u genotypu Fa60. Natomiast w fazie regeneracji u genotypu tego odnotowano wyższe wartości E i g_s co mogło to być związane z bardziej intensywnym uwodnieniem tkanek.

Pomiary parametrów fizjologicznych przeprowadzone w warunkach zasolenia również pokazały różnice w odpowiedzi genotypów Fa18 (HST) i Fa14 (LST) na stres. Przede wszystkim genotypy te różniły się znacząco stopniem akumulowania jonów sodu. W pierwszej fazie stresu (pomiędzy 6 i 9 dniem) stężenie jonów sodu było niższe u genotypu HST, w porównaniu z LST. Natomiast stężenie jonów potasu było niższe u genotypu HST przez cały czas trwania stresu. U genotypu LST obserwowano wzrost poziomu K^+ w zaawansowanej fazie stresu (pomiędzy 19 a 24 dniem). W konsekwencji wartość współczynnika K/Na była znacząco niższa u genotypu HST, zarówno przed stresem, jak również w jego zaawansowanej fazie (dzień 24). Podobnie, akumulację jonów magnezu w stresie obserwowano tylko u genotypu LST. Natomiast warunki stresu (zaburzenia gospodarki jonowej) spowodowały drastyczny spadek stężenia jonów wapnia pomiędzy 15 a 19 dniem stresu u genotypu HST. Pokazuje to, że reakcja genotypu HST była charakterystyczna dla halofitów, które dzięki wydajnemu systemowi usuwania nadmiaru jonów (SOS, ang. Salt Overly Sensitive) mogą utrzymywać odpowiednio niską zawartość jonów w komórkach. W czasie trwania stresu u obu genotypów nastąpiło stopniowe obniżenie się RWC, przy czym szybszą utratą wody charakteryzował się genotyp LST. Wraz z akumulacją jonów nastąpiło obniżenie parametrów wymiany gazowej (g_s , E , P_n) u obu genotypów. W zaawansowanej fazie stresu przewodnictwo szparkowe (g_s) było nieco wyższe u genotypu LST. Badane genotypy różniły się znacząco podczas stresu solnego (9 dzień) wewnątrzkomórkową zawartością dwutlenku węgla (C_i), którego wyższy poziom obserwowano u genotypu LST.

Akumulacja jonów Na^+ i Cl^- miała również wpływ na fotochemiczną aktywność fotoukładu II PSII. W początkowej fazie stresu nastąpił wzrost wartości ABS/RC (ang. energy flows for absorption), TRo/RC (ang. trapping), oraz ETo/RC (ang. electron transport), osiągając najwyższe wartości w 6 dniu stresu, po czym w następnych dniach stresu nastąpił ich spadek do poziomu kontrolnego, co wskazywało na zaburzenia w transporcie elektronów podczas stresu.

U badanych genotypów *F. pratensis* obserwowano odmienną reakcję aparatu fotosyntetycznego na niską temperaturę (Pawłowicz i in. 2012 – P4). Pod wpływem hartowania w chłodzie ($4/2^\circ\text{C}$, dzień/noc) u obu genotypów obserwowano spadek wartości F_v/F_m (maximum quantum efficiency of PSII photochemistry). Spadek ten był szybszy i bardziej znaczący u genotypu Fp13 (LFT). W warunkach kontrolnych genotyp Fp37 osiągnął wyższe wartości DIO/CS, natomiast podczas stresu nastąpił jego istotny wzrost u genotypu Fp13. W ostatniej fazie hartowania (21 dzień) wartości F_v/F_m i DIO/CS były identyczne dla obu genotypów. Niska temperatura nie spowodowała zmian w wartości parametru (ang. fraction OEC), a zatem można wnioskować, że centrum aktywne fotoukładu II pozostawało stabilne w warunkach stresu. Znacząco niższe wartości F_v/F_m u genotypu Fp13 w 7 i 11 dniu hartowania w chłodzie wskazywały to większą podatność genotypu LST na fotoinhibicję indukowaną niską temperaturą.

Kolejnym etapem badań była analiza ekspresji wybranych genów związanych z fotosyntezą oraz transportem wody na poziomie transkryptu i białka metodą RT-qPCR i Western blot podczas stresów abiotycznych.

Pierwsza analiza dotyczyła genu *PsbO* kodującego białko OEE1 (PsbO) u genotypów Fa35 i Fa31 w warunkach suszy oraz Fp13 i Fp37 podczas hartowania w chłodzie (Pawłowicz i in. 2012 – P4). Wykazała ona wzrost poziomu transkryptu *PsbO* w warunkach suszy u genotypu HDT. Podniesiony poziom ekspresji utrzymywał się również po rehydratacji. U genotypu LDT nieznaczny wzrost poziomu transkryptu miał miejsce w 8 dniu stresu, po czym powrócił on do poziomu kontrolnego, po ponownym nawodnieniu roślin. Natomiast podczas stresu nastąpił postępujący spadek poziomu akumulacji białka u obu genotypów. Największe różnice między-genotypowe obserwowano w 8 dniu stresu, kiedy poziom białka OEE1 był znacząco niższy u genotypu HDT. Po rehydratacji poziom białka pozostawał na obniżonym poziomie w stosunku do poziomu kontrolnego.

Pod wpływem hartowania w chłodzie poziom transkryptu genu *PsbO* obniżył się u genotypu LFT. Natomiast w 21 dniu hartowania obserwowano jego istotny wzrost (ale nie był on istotny). U genotypu HFT po nieznacznym spadku poziomu transkryptu *PsbO* drugim dniu stresu, nastąpił jego wzrost w kolejnych dniach hartowania. W warunkach kontrolnych poziom białka był wyższy u genotypu HFT. Podobnie u genotypu HDT obserwowano akumulację białka po dłuższym czasie hartowania w chłodzie. **Na podstawie uzyskanych wyników można spekulować, że białko OEE1 pełni odmienną funkcję w stabilizacji PSII w suszy i w niskiej temperaturze. Podczas hartowania w chłodzie zmiany ekspresji genu *PsbO* były skorelowane z wydajnością fotosyntetyczną PSII. Natomiast u genotypów *F. arundinacea* wysoki stopień degradacji białka OEE1 wpływał na destabilizację kompleksu OEC podczas suszy.**

W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę poziomu akumulacji transkryptu podczas stresów abiotycznych dla czterech genów kodujących akwaporyny u genotypów Fa60 i Fa45 oraz Fp13 i Fp37 metodą RT-qPCR (Pawłowicz i in. 2017 – P3). Białka te należały do podrodziny PIP (PIP1;2 i PIP2;2) oraz TIP (TIP1;1 i TIP2;1). **Była to pierwsza analiza zmian ekspresji genów kodujących akwaporyny w odpowiedzi na stresy abiotyczne u gatunków z rodzaju *Festuca*.** U gatunków tych rodzina MIP nie została jak dotąd scharakteryzowana i nie jest znana liczba genów wchodzących w jej skład. Do analizy zostały wybrane geny z podrodziny PIP i TIP ze względu na to, że jak wynika z danych literaturowych są one zaangażowane w regulację przewodnictwa wody i dwutlenku węgla. **Analiza profili transkrypcyjnych tych genów podczas suszy, zasolenia oraz hartowania w chłodzie miała na celu określenie ich potencjalnej funkcji w mechanizmie tolerancji stresów abiotycznych u analizowanych gatunków *Festuca*.** W trakcie analiz okazało się, że w liściach obu gatunków gen *TIP2;1* ulegał ekspresji na poziomie niemożliwym do oznaczenia metodą RT-qPCR.

W warunkach suszy obserwowano spadek akumulacji transkryptu genów *PIP1;2* oraz *TIP1;1* u obu analizowanych genotypów. U genotypu LDT poziom transkryptu genu *PIP1;2* był obniżony przez cały okres suszy, podczas gdy u genotypu HDT miał on miejsce jedynie w 9 dniu stresu. Po ponownym nawodnieniu roślin poziom transkrypt *PIP1;2* u genotypu LDT powrócił do poziomu kontrolnego. W przypadku obu genotypów poziom transkryptu genu *TIP1;1* obniżył się w zaawansowanym stadium suszy (dzień 9 u genotypu LDT oraz dzień 11 u genotypu HDT). Natomiast w fazie regeneracji po stresie (RE) obserwowano znaczący

wzrost akumulacji transkryptu *TIP1;1* u genotypu LDT, podczas gdy u HDT utrzymywał się na poziomie kontrolnym. Warunki suszy nie wpłynęły na poziom transkryptu genu *PIP2;1* u genotypu LDT, podczas gdy u genotypu HDT nastąpił jego znaczny spadek w 11 dniu suszy. W fazie regeneracji u genotypu LDT zaobserwowano istotny wzrost poziomu transkryptu genu *PIP2;1*.

W warunkach kontrolnych genotypy HDT i LDT różniły się znacząco poziomem transkryptu badanych genów. Wyższy poziom transkryptu genu *PIP2;1* zanotowano u genotypu HDT oraz LST, genu *PIP1;2* u genotypu HST, a *TIP1;1* u genotypu LST. Natomiast w warunkach wysokiego zasolenia nastąpiły zmiany w ekspresji genów *PIP1;2* i *TIP1;1* u genotypu HST. Poziom transkryptu genu *PIP1;2* uległ obniżeniu w 9 dniu stresu, natomiast poziom gen *TIP1;1* wzrósł w 6 dniu stresu.

Podczas stresu niskiej temperatury odnotowano spadek akumulacji transkryptu genów *PIP1;2*, *PIP2;1* oraz *TIP1;1* u obu genotypów. Był on najbardziej znaczący (niemalże czterokrotny) w przypadku genu *TIP1;1* u genotypu LFT. W przypadku genu *PIP1;2* obniżenie poziomu transkryptu nastąpiło w sposób stopniowy, podczas gdy akumulacja pozostałych genów była niższa już w pierwszych dniach aklimatyzacji w chłodzie, w porównaniu do kontroli. W 7 dniu hartowania w chłodzie obserwowano lekki wzrost poziomu transkryptu wszystkich analizowanych genów w porównaniu do dnia piątego. U genu *PIP1;2* w 7 dniu stresu poziom transkryptu był identyczny z kontrolą, podczas gdy poziom transkryptu *PIP2;1* i *TIP1;1* pozostawał nieco niższy. Genotypy różniły się znacząco poziomem transkryptu genów *PIP2;1* i *TIP1;1* w warunkach kontrolnych, przy czym w obu przypadkach był on wyższy u genotypu LFT. Podobnie, podczas stresu niższy poziom wykazywał genotyp o większej tolerancji na stres. W przypadku stresu suszy różnice między genotypami obserwowano w przypadku genu *PIP2;1*, podczas zasolenia u genu *PIP1;2*, natomiast podczas aklimatyzacji w chłodzie u genów *PIP2;1* i *TIP1;1*.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że, ekspresja genów akwaporyn podlegała regulacji indukowanej działaniem bodźców środowiskowych u obu analizowanych gatunków z rodzaju *Festuca*. Profile transkrypcyjne analizowanych genów akwaporyn były specyficzne gatunkowo i różniły się w zależności od działającego na roślinę bodźca stresowego. Wykazano również pewną korelację pomiędzy zmianami w poziomie akumulacji transkryptu u poszczególnych genotypów a ich poziomem tolerancji na stres. Największy spadek akumulacji transkryptu genu *PIP1;2* oraz *TIP1;1* u genotypu HDT miał miejsce kiedy jednocześnie obserwowano u niego największy spadek RWC. Ponadto, znaczące obniżenie

akumulacji transkryptu genu *PIP2;1* w zaawansowanej suszy (9 i 11 dzień stresu) u genotypu HDT mogłoby być związane z obniżoną asymilacją dwutlenku węgla. Co więcej wyższy w stosunku do kontrolnego poziom transkryptu *PIP2;1* obserwowany u genotypu LDT po rehydratacji miał odzwierciedlenie w większym otwarciu aparatów szparkowych w fazie regeneracji. Można zatem wnioskować, że spadek akumulacji transkryptu genów *PIP1;2* i *PIP2;1* podczas zaawansowanej suszy może być związany z redukcją wodnej przepuszczalności membran, co zapobiega utracie wody z tkanek roślin podczas stresu. Natomiast zwiększony poziom transkryptu *PIP2;1* w fazie ponownego nawodnienia w porównaniu do warunków kontrolnych u genotypu LDT mogła przyczynić się do bardziej wydajnej absorpcji wody z podłoża, i tym samym ułatwić szybsze osiągnięcie wodnej homeostazy po ustaniu stresu. Interesujące jest to, że spadek transkryptu genu *PIP1;2* obserwowano u obu genotypów także podczas hartowania roślin w chłodzie, podczas gdy nie był on regulowany w odpowiedzi na zasolenie. Ekspresja genów *PIP1;2* i *TIP1;1* była silnie skorelowana z poziomem tolerancji na zasolenie badanych roślin.

Kolejnym celem prowadzonych badań było poszukiwanie kluczowych komponentów metabolizmu chloroplastów, które warunkują tolerancję na zasolenie u roślin *F. arundinacea* (Pawłowicz i in. 2018 – P2).

Przeprowadzono analizę porównawczą proteomu chloroplastowego w warunkach kontrolnych oraz w warunkach wysokiego zasolenia gleby (24 dni stresu) z zastosowaniem dwukierunkowej elektroforezy (2-DE) w połączeniu ze spektrometrią mas (MS). W przypadku 12 białek, poziom ich akumulacji wzrastał lub ulegał obniżeniu w warunkach stresu w porównaniu do warunków kontrolnych. Pośród nich znalazły się dwa białka OEE (ang. Oxygen-Evolving Enhancer proteins): OEE1 i OEE2, plastydowa aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu (pFBA), oraz chloroplastowa lipokalina (CHL). Poziom białka OEE1 uległ obniżeniu pod wpływem zasolenia u genotypu LST w stosunku do warunków kontrolnych, podczas gdy u genotypu HST jego akumulacja była indukowana stresem. Jakkolwiek wyższą akumulację OEE1 w stresie odnotowano u genotypu LST. Białko OEE2 zostało zidentyfikowane wyłącznie u genotypu LST, przy czym jego poziom wzrastał pod wpływem zasolenia. Białko to było reprezentowane przez dwie plamki w rozdziale 2-DE, co może oznaczać, że uległo ono podczas stresu częściowej degradacji lub u badanych genotypów obecne były jego dwie izoformy.

Poziom akumulacji białek pFBA oraz CHL wzrastał znacząco podczas stresu u genotypu HST, podczas gdy u genotypu LST pozostawał na poziomie kontrolnym. Jednocześnie poziom CHL w kontroli był znacząco niższy u genotypu HST. Wskazuje to, że białko to może pełnić funkcje ochronne dla PSII w warunkach zasolenia. Hipotezę tę potwierdzają pomiary parametrów fluorescencji chlorofilu, które wskazują na większą efektywność OEC u genotypu HST podczas stresu.

Dla genów kodujących wyżej wymienione białka przeprowadzona została również analiza ekspresji na poziomie transkryptu w warunkach stresu solnego za pomocą reakcji RT-qPCR. Poziom transkryptu został oznaczony w czterech punktach czasowych, które były następujące: kontrola, oraz 9, 19 i 24 dniu stresu. Długotrwały stres solny powodował obniżenie poziomu transkryptu genów *PsbO1*, *PsbO2* oraz *pFBA*, natomiast indukował akumulację transkryptu genu *CHL* u obu genotypów. Zarówno w przypadku genu *OEE1*, jak i *OEE2* poziom transkryptu w warunkach kontrolnych był wyższy u genotypu LST. Spadek akumulacji transkryptu genu *OEE1* (*PsbO1*) u genotypu LST miał miejsce pomiędzy 9 a 19 dniem stresu. W przypadku genotypu HST nieznaczny wzrost poziomu transkryptu nastąpił w 9 dniu stresu, po czym w dalszych dniach stresu nastąpiło jego obniżenie. U genotypu LST obserwowano stopniowy spadek poziomu transkryptu *OEE2* (*PsbO2*) od rozpoczęcia stresu do dnia 19, po czym wzrósł on nieznacznie w 24 dniu stresu, jednakże pozostał na obniżonym poziomie w stosunku do kontroli. U genotypu HST zmiany w poziomie akumulacji transkryptu *OEE2* nastąpiły dopiero podczas zaawansowanej fazy stresu (dzień 24), kiedy nastąpił jego delikatny spadek. Poziom transkryptu *pFBA* obniżył się u genotypu LST pomiędzy 9 a 19 dniem stresu, podczas gdy u genotypu HST spadek miał miejsce w początkowej fazie stresu (pomiędzy kontrolą a 9 dniem). W przeciwieństwie do wyżej wymienionych genów akumulacja transkryptu *CHL* przebiegała w odmienny sposób. Długotrwały stres powodował wzrost poziomu transkryptu u obu analizowanych genotypów. U genotypu LST wzrost akumulacji transkryptu obserwowano pomiędzy kontrolą a 9 dniem stresu, natomiast u genotypu HST w fazie późniejszej, tj. między 19 i 24 dniem stresu.

Białko OEE2 zostało zidentyfikowane za pomocą MS tylko u genotypu LST i jego akumulacja zwiększyła się nieznacznie podczas stresu solnego, w porównaniu do warunków kontrolnych. Nie wykazano zatem związku pomiędzy jego akumulacją i zwiększaniem przez roślinę tolerancji na zasolenie. Jego rola w stresie pozostaje do wyjaśnienia. Stres solny indukował również wzrost akumulacji białka pFBA u genotypu HST. Ponieważ ekspresja

genu *pFBA* na poziomie transkryptu była regulowana w bardzo niewielkim stopniu, uważa się że różnice w poziomie białka mogła wynikać z modyfikacji potranslacyjnych. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze badania przeprowadzone na mieszańcach *L. multiflorum*/*F. arundinacea*, u których akumulację aldolazy obserwowano podczas stresu suszy i niskiej temperatury (Perlikowski i in. 2016; Augustyniak i in. 2018), u genotypów o większym poziomie tolerancji stresu. Poziom akumulacji chloroplastowej lipokaliny wzrastał znacząco w warunkach zasolenia u genotypu HST, natomiast u LST pozostawał taki jak w warunkach kontrolnych. Indukowany stresem wzrost poziomu transkryptu genu *CHL* obserwowano u obu genotypów. Z naszych wcześniejszych badań wynika, że zmiany w poziomie białka CHL następowały również pod wpływem suszy (Kosmala i in. 2012). Deficyt wodny powodował obniżenie poziomu białka u dwóch analizowanych genotypów: o wysokim poziomie tolerancji suszy (HDT), oraz o niskim poziomie tolerancji suszy (LDT). Wzrost poziomu ekspresji genu (zarówno na poziomie transkryptu, jak i białka) *CHL* u genotypu HST był skorelowany ze zwiększoną wartością parametru DIO/CS, który wskazywał na dyssypację energii cieplnej przez fotoukład II (NPQ).

Najważniejsze osiągnięcia poznawcze prowadzonych badań:

1. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że białko OEE1 pełni odmienną funkcję w stabilizacji PSII w suszy i w niskiej temperaturze. Podczas hartowania w chłodzie zmiany ekspresji genu *OEE1* były skorelowane z wydajnością fotosyntetyczną PSII u *F. pratensis*. Natomiast u genotypów *F. arundinacea* wysoki stopień degradacji białka OEE1 wpływał na destabilizację kompleksu OEC podczas suszy.
2. Obniżony poziom transkryptu genu *PIP1;2* w zaawansowanej suszy był skorelowany z obniżoną wydajnością fotosyntezy oraz wymiany gazowej u genotypu LDT. Wskazuje to na udział tego genu w regulacji fazy jasnej fotosyntezy.
3. Wyższy poziom transkryptu genów *PIP1;2* i *TIP1;1* w fazie regeneracji po stresie w porównaniu do poziomu kontrolnego u *F. arundinacea* wskazuje, że geny te mogą być zaangażowane w wydajne uzupełnienie wody po ustaniu stresu suszy.
4. Nabywaniem tolerancji na mróz u roślin *F. pratensis* podczas procesu hartowania w chłodzie było związane z obniżeniem się poziomu transkryptu genów *PIP* i *TIP*.

5. Akumulacja lipokaliny chloroplastowej u *F. arundinacea* jest pozytywnie skorelowana z tolerancją na zasolenie.

Badania wchodzące w skład niniejszego osiągnięcia zostały wykonane w ramach realizacji projektu własnego NCN - N N303 807640 (2011-2015) pt.: „Analiza zmian w ekspresji genów akwaporyn pod wpływem stresu dehydratacyjnego u wybranych gatunków z rodzaju *Festuca*” [Załącznik nr 4I, II.4].

Dalsze badania będą dotyczyły analizy funkcji genów, których ekspresja, jak wykazały wcześniejsze badania, jest związana z tolerancją stresów abiotycznych, z wykorzystaniem metody CRISPR/CAS (złożony projekt NAWA: „Targeted mutagenesis of *Lolium genome mediated by RNA-guided Cas9 endonuclease system*”). Do genów pozostających w kręgu mojego zainteresowania znajdują się geny kodujące lipokaliny, których funkcję w warunkach stresów abiotycznych u gatunków *Festuca* chciałabym wyjaśnić.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych).

Pracę naukową rozpocząłam w listopadzie 1999 r. jako słuchaczka Studium Doktoranckiego przy Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Realizowałam ją w Pracowni Genomiki Funkcjonalnej Instytutu Genetyki Roślin PAN kierowanej przez prof. dr. hab. Tadeusza Rorata. Badania prowadzone przez Zespół prof. Rorata miały na celu identyfikację genów warunkujących mrozoodporność u gatunków z rodzaju *Solanum* oraz analizę ich funkcji. Istotną grupą genów, których ekspresja była indukowana podczas hartownia w chłodzie u gatunku dzikiego zimniaka, *Solanum sogarandinum*, były geny kodujące dehydryny. Dehydryny należą do II grupy białek LEA (ang. Late Embriogenesis Abundant) i są akumulowane w tkankach wegetatywnych w odpowiedzi na czynniki abiotyczne powodujące dehydratację komórek, takie jak susza, zasolenie i niska temperatura (Pawłowicz 2004). Uważa się, że ich główną rolą jest stabilizowanie błon komórkowych oraz innych białek podczas stresu, jak również mogą pełnić funkcję krioprotekcyjną oraz wiązać jony metali ciężkich akumulowane w roślinach (Yu i in. 2018). Analiza funkcji genu *Ssci18* (*S. sogarandinum* cold induced) kodującego dehydrynę o masie cząsteczkowej 9.8 kD (10 kD) w rozwoju roślin oraz w warunkach stresów abiotycznych stała się przedmiotem realizowanej przeze mnie pracy doktorskiej. W celu zwiększenia syntezy białka DHN10 u uprawnego gatunku ziemniaka, *S. tuberosum* została przeprowadzona jego transformacja

genem *Dhn10* za pomocą *Agrobacterium tumefaciens* z zastosowaniem indukowanego chłodem promotora glukozylotransferazy (GT). Badania wykazały, że ekspresja genu *Dhn10* u *S. sogarandinum* i *S. tuberosum* jest organospecyficzna oraz regulowana przez czynniki kierujące wzrostem i rozwojem. Akumulacja białka DHN10 w nadziemnych częściach roślin następowała pod wpływem suszy, jak również stresu fotooksydacyjnego u obu gatunków ziemniaka. Transgen GT::DHN10 ulegał ekspresji tylko na poziomie transkryptu w roślinach transgenicznym *S. tuberosum* (Pawłowicz i in. 2004). A zatem zastosowanie promotora GT do ekspresji genu *Dhn10* nie pozwoliło na zwiększenie poziomu DHN10 u mutantów ziemniaka uprawnego, zarówno w warunkach kontrolnych, jak i podczas hartowania w chłodzie. Badania te wykonałam w ramach realizacji projektu zamawianego pt.: „Wpływ zwiększonego poziomu ekspresji genów kodujących białka hydrofilowe na odporność ziemniaka (*S. tuberosum*) na niskie temperatury” w ramach projektu zamawianego pt. „Wykorzystanie genetycznych i molekularnych podstaw rozmnażania i odporności roślin na stresy środowiskowe dla poprawy właściwości roślin uprawnych” [Załącznik nr 4I.1.1.], oraz projektu promotorskiego pt.: „Przygotowanie transgenów złożonych z promotora genu glukozylo-transferazy (GT) i 35S-CaMV oraz sekwencji DNA kodującej dehydrynę DHN10 pochodzącą z klonu cDNA Ssci18 (*Dhn10*). Otrzymanie konstruktów pBI-GT-DHN i pBI-35S-DHN oraz wprowadzenie ich do *Agrobacterium tumefaciens* (szczep LBA 4404)” [Załącznik nr 4I.1.2].

Przygotowany przeze mnie transgen GT::DHN10 został również wykorzystany do transformacji ogórka (*Cucumis sativus* L.), w celu analizy potencjalnej roli dehydryny DHN10 w nabywaniu mrozoodporności (Yin i in. 2004). Analizy wykazały, że podobnie jak u ziemniaka, w transgenicznym roślina ogórka obserwowano jedynie akumulację transkryptu transgenu GT::DHN10. U jednej z analizowanych linii transgenicznych obserwowano zwiększony poziom mrozoodporności, w porównaniu z formą dziką.

Badania kontynuowałam w Pracowni Cytogenetyki i Biologii Molekularnej, kierowanej w latach 2005-2012 przez prof. dr hab. Zbigniewa Zwierzykowskiego, a od roku 2012 przez dr. hab. Arkadiusza Kosmałę (obecnie Zespół Fizjologii Molekularnej i Cytogenetyki Roślin). Podejmowana przez Zespół tematyka dotyczy poznania molekularnych mechanizmów tolerancji stresów abiotycznych u traw pastewnych z rodzaju *Lolium* i *Festuca*. W badaniach wykorzystywane są dwa gatunki *Festuca*: *F. arundinacea* (tolerancja suszy i zasolenia) oraz

F. pratensis (mrozoodporność) oraz formy introgresywne *Lolium/Festuca*, jako modele uruchamiające w stresie odmienne strategie jego tolerancji. Badania dotyczą analizy ekspresji genów kodujących enzymy cyklu Calvina (kinaza fosfoglicerynianowa, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanowa), a także funkcjonowania w stresie systemu antyoksydacyjnego. Realizowane są również prace dotyczące udziału tlenu azotu w sygnalizacji komórkowej podczas stresu suszy. Dowiedziono, że istotny udział w tolerancji stresów abiotycznych związanych z dehydratacją protoplastu ma aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanowa, której akumulację obserwowano podczas suszy, zasolenia, jak również podczas hartowania w chłodzie u genotypów o wysokiej tolerancji na stres (Perlikowski i in. 2014; Augustyniak i in. 2018; **Pawłowicz i in. 2018**). Jej proponowana rola podczas suszy jest związana z nie-szparkową regulacją fotosyntezy.

W Zespole podjęto również badania na temat molekularnych podstaw odporności różnych gatunków z rodzaju *Poaceae* na patogeny. U mieszańców introgresywnych *L. multiflorum/F. arundinacea* o zróżnicowanej strukturze genomowej wyselekcjonowano dwie formy: odporną i wrażliwą na *Microdochium nivale*. Następnie przeprowadzono analizę biochemiczną w celu zidentyfikowania roślinnych komponentów komórkowych warunkujących tę odporność (**Płazek i in. 2017**). Badania wykazały, że w przypadku mieszańców *Lolium/Festuca* kluczowe znaczenie miała wysoka zawartość rozpuszczalnych aminokwasów oraz obniżony poziom kwasu abscysynowego (ABA) i jasmonowego (JA) w nadziemnych częściach roślin.

Przeprowadzono również analizę komponentów białkowych, warunkujących odporność żyta (*Secale cereale* L.) na fuzariozę kłosów (Perlikowski D., Wiśniewska H., Góral T., Ochodźki P., Majka M., **Pawłowicz I.**, Kosmala A. (2018). Identification of proteomic components associated with resistance to *Fusarium* head blight in rye (*Secale cereale* L.). *The Plant Pathology Journal*, w recenzjach). Badania prowadzono przy wykorzystaniu (i) 2-D elektroforezy, w celu profilowania akumulacji białek ziarna po inokulacji i w warunkach kontrolnych oraz (ii) spektrometrii mas, w celu identyfikacji białek o różnym poziomie akumulacji między badanymi odmianami żyta. Wykazano związek pomiędzy poziomem odporności na fuzariozę, a akumulacją dwóch inhibitorów alfa-amylazy (NCBI: AAV39517 i ABO45988). Oba inhibitory charakteryzowały się stosunkowo wysokim stopniem akumulacji u odmian odpornych żyta, zarówno po inokulacji, jak i w warunkach kontrolnych. Ponadto, analizy aktywności alfa-amylazy wskazały na wyższy poziom aktywności tego enzymu u

odmian podatnych na fuzariozę kłosów, a więc u tych, u których nie stwierdzono akumulacji zidentyfikowanych inhibitorów amylazy po inokulacji *F. culmorum*.

Ponadto, wykonałam analizę poziomu transkryptu genu *FUM1* zaangażowanego w syntezę fumonizyn (mikotoksyn) u różnych szczepów *Fusarium proliferatum* metodą RT-qPCR (Górna i in. 2016). Wykazała ona, że pod wpływem dodania do hodowli grzybowej ekstraktów z roślin gospodarzy (m.in. ananasa, kukurydzy, szparaga) obserwowano znaczną akumulację transkryptu *FUM1*, podczas gdy ekstrakt z czosnku obniżał jego poziom.

Szczegółowy wykaz mojego dorobku naukowego zamieściłam w **Załączniku nr 4** i **Załączniku nr 5** pt.: „Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki” wersja w języku polskimi i języku angielskim. Poniżej przedstawiam skrócone zestawienie najważniejszych osiągnięć wraz z odnośnikami do odpowiednich punktów wyżej wymienionego wykazu:

- Prace naukowe opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR): **10** (w tym 4 prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego) [I.B., II.A.];
- Monografie, publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych spoza bazy JCR: **7** (w tym 1 praca wchodząca w skład osiągnięcia naukowego) [I.B., II.D.];
- Sumaryczny *Impact Factor* według listy JCR, zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku prac opublikowanych w roku 2019 uwzględniono dostępny *Impact Factor* z roku 2018):
IF = 22,417 [II.F.] (włączając **IF = 8.65**) dla 5 publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego;
- Sumaryczna liczba punktów MNiSW według uaktualnionej w 2016 roku listy:
322 (nie uwzględniono monografii i czasopism, które nie znajdują się na liście) [II.F.];
- Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science Core Collection: **82** [II.G] (wyszukiwanie Pawłowicz I.), wygenerowane dnia 27 marca 2019 roku;
- Indeks Hirscha według bazy Web of Science: **h = 5** [II.H.];
- Liczba realizowanych projektów badawczych: **0** UE, **7** MNiSW/NCN [II.I i II.];

- Liczba wygłoszonych referatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych: 4 [II.K.]. Ponadto, 4 referaty wygłoszone na krajowych seminariach naukowych [III.I.4.];
- Liczba pozostałych komunikatów prezentowanych na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych: 40 [III.B.].

LITERATURA

- Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P (2005) Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Molecular Biology* 59: 469–484.
- Allahverdiyeva, Y, Suorsa M, Rossi F, Pavesi A, Kater M.M, Antonacci A, Tadini L, Pribil M, Schneider A, Wanner G, Leister D, Aro EM, Barbato R, Pesaresi P (2013) Arabidopsis plants lacking PsbQ and PsbR subunits of the oxygen-evolving complex show altered PSII super-complex organization and short-term adaptive mechanisms. *The Plant Journal* 75: 671–684.
- Augustyniak A, Perlikowski D, Rapacz M, Kościelniak J, Kosmala A (2018) Insight into cellular proteome of *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms to decipher crucial mechanisms of cold acclimation in forage grasses. *Plant Science* 272: 22–31.
- Bocian A, Kosmala A, Rapacz M, Jurczyk B, Marczak Ł, Zwierzykowski Z (2011) Differences in leaf proteome response to cold acclimation between *Lolium perenne* plants with distinct levels of frost tolerance. *Journal of Plant Physiology* 168: 1271–1279.
- Bommer M, Bondar AN, Zouni A, Dobbek H, Dau H (2016) Crystallographic and computational analysis of the barrel part of the PsbO protein of photosystem II: carboxylate-water clusters as putative proton transfer relays and structural switches. *Biochemistry* 55: 4626–35.
- Bricker TM, Roose JL, Fagerlund RD, Frankel LK, Eaton-Rye JJ (2012) The extrinsic proteins of Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817: 121–142.
- Byrt CS, Zhao M, Kourghi M, Bose J, Henderson SW, Qiu J, Gilliam M, Schultz C, Schwarz M, Ramesh SA, Yool A, Tyerman S (2017) Non-selective cation channel activity

- of aquaporin AtPIP2;1 regulated by Ca^{2+} and pH. *Plant Cell and Environment* 40: 802–815.
- Chang W, Liu X, Zhu J, Fan W, Zhang Z (2016) An aquaporin gene from halophyte *Sesuvium portulacastrum*, SpAQP1, increases salt tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Reports* 35:385–395.
- Charron JB, Ouellet F, Houde M, Sarhan F (2008) The plant apolipoprotein D ortholog protects Arabidopsis against oxidative stress. *BMC Plant Biology* 8: 86.
- Charron JBF (2005) Identification, expression, and evolutionary analyses of plant lipocalins. *Plant Physiology* 139: 2017–2028.
- De Las Rivas, J, Barber, J (2004) Analysis of the structure of the PsbO protein and its implications. *Photosynthesis Research* 81: 329–343.
- Ding L, Gao C, Li Y, Li Y, Zhu Y, Xu G, Shen Q, Kaldenhoff R, Kai L, Guo S (2015) The enhanced drought tolerance of rice plants under ammonium is related to aquaporin (AQP). *Plant Science* 234: 14–21.
- Flower DR (2000) Beyond the superfamily: the lipocalin receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1482: 327–336.
- Flower DR, North AC, Sansom CE (2000) The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochimica et Biophysica Acta* 1482: 9–24.
- Fujiyoshi Y, Mitsuoka K, de Groot BL, Philippsen A, Grubmüller H, Agre P, Engel A (2002) Structure and function of water channels. *Current Opinion in Structural Biology* 12: 509–515.
- Gao LM, Li YF, Han R (2015) He-Ne laser preillumination improves the resistance of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) seedlings to high saline conditions. *Protoplasma* 252: 1135–1148.
- Gitto A, Fricke W (2018) Zinc treatment of hydroponically grown barley plants causes a reduction in root and cell hydraulic conductivity and isoform-dependent decrease in aquaporin gene expression. *Physiologia Plantarum* 164: 176–190.
- Górna K, Pawłowicz I, Waśkiewicz A, Stępień Ł (2016). *Fusarium proliferatum* strains change fumonisin biosynthesis and accumulation when exposed to host plant extracts. *Fungal Biology* 120: 884–893.
- Gururani MA, Upadhyaya CP, Strasser RJ, Yu JW, Park SW (2013) Evaluation of abiotic stress tolerance in transgenic potato plants with reduced expression of PSII manganese stabilizing protein. *Plant Science* 198: 7–16.

- Gururani, MA, Upadhyaya, CP, Strasser, RJ, Woong YJ, Park SW (2012) Physiological and biochemical responses of transgenic potato plants with altered expression of PSII manganese stabilizing protein. *Plant Physiology and Biochemistry* 58: 182–194.
- Hand ML, Cogan NO, Forster JW (2012) Genome-wide SNP identification in multiple morphotypes of allohexaploid tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb). *BMC Genomics* 13: 219.
- Hove RM, Ziemann M, Bhawe M (2015) Identification and expression analysis of the barley (*Hordeum vulgare* L.) aquaporin gene family. *PLoS One* 9;10(6):e0128025. doi: 10.1371/journal.pone.0128025.
- Ifuku K, Yamamoto Y, Ono T-A, Ishihara S, Sato F (2005) PsbP protein, but not PsbQ protein is essential for the regulation and stabilization of photosystem II in higher plants. *Plant Physiology* 139: 1175–1184
- Ishihara S, Takabayashi A, Ido K, Endo T, Ifuku K, Sato F (2007) Distinct functions for the two PsbP-Like proteins PPL1 and PPL2 in the chloroplast thylakoid lumen. *Plant Physiology* 145: 668–679.
- Jang HY, Jang SW, Carlson JE, Ku YG, Ahn SJ (2013) Two aquaporins of *Jatropha* are regulated differentially during drought stress and subsequent recovery. *Journal of Plant Sciences* 170: 1028–1038.
- Jang JY, Kim DG, Kim YO, Kim JS, Kang H (2004) An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 54: 713–725.
- Jurczyk B, Pocięcha E, Grzesiak M, Kalita K2, Rapacz M (2016) Enhanced expression of Rubisco activase splicing variants differentially affects Rubisco activity during low temperature treatment in *Lolium perenne*. *Journal of Plant Physiology* 198: 49-55.
- Jurczyk B, Rapacz M, Budzisz K, Barcik W, Sasal M (2012) The effects of cold, light and time of day during low-temperature shift on the expression of CBF6, FpCor14b and LOS2 in *Festuca pratensis*. *Plant Science* 183: 143-148.
- Kayum MA, Park JI, Nath UK, Biswas MK, Kim HT, Nou IS (2017) Genome-wide expression profiling of aquaporin genes confer responses to abiotic and biotic stresses in *Brassica rapa*. *BMC Plant Biology* 17: 23.
- Kjellsen TD, Shiryaeva L, Schröder WP, Strimbeck GR (2010) Proteomics of extreme freezing tolerance in Siberian spruce (*Picea obovata*). *Journal of Proteomics* 73: 965–975.

- Kosmala A, Bocian A, Rapacz M, Jurczyk B, Zwierzykowski Z (2009) Identification of leaf proteins differentially accumulated during cold acclimation between *Festuca pratensis* plants with distinct levels of frost tolerance. *Journal of Experimental Botany* 60: 3595–3609.
- Kosmala A, Perlikowski D, Pawłowicz I, Rapacz M (2012) Changes in the chloroplast proteome following water deficit and subsequent watering in a high- and low-drought-tolerant genotype of *Festuca arundinacea*. *Journal of Experimental Botany* 63: 6161–6172.
- Levesque-Tremblay G, Havaux M, Ouellet F (2009) The chloroplastic lipocalin AtCHL prevents lipid peroxidation and protects Arabidopsis against oxidative stress. *The Plant Journal* 60: 691–702.
- Li L, Aro EM, Millar AH (2018) Mechanisms of photodamage and protein turnover in photoinhibition. (2018) *Trends in Plant Science* 23: 667–676.
- Li R, Wang J, Li S, Zhang L, Qi C, Weeda S, Zhao B, Ren S, Guo YD (2016) Plasma membrane intrinsic proteins SIPIP2;1, SIPIP2;7 and SIPIP2;5 conferring enhanced drought stress tolerance in tomato. *Scientific Reports* 6: 31814.
- Liu C, Fukumoto T, Matsumoto T, Gena P, Frascaria D, Kaneko T, Katsuhara M, Zhong S, Sun X, Zhu Y, Iwasaki I, Ding X, Calamita G, Kitagawa Y (2013) Aquaporin OsPIP1;1 promotes rice salt resistance and seed germination. *Plant Physiology and Biochemistry* 63: 151–158.
- Lundin B, Hansson M, Schoefs B, Vener A.V, Spetea C (2007) The Arabidopsis PsbO2 protein regulates dephosphorylation and turnover of the photosystem II reaction centre D1 protein. *The Plant Journal* 49: 528–539.
- Nath K, Jajoo A, Poudyal RS, Timilsina R, Park YS, Aro EM, Nam HG, Lee CH (2013) Towards a critical understanding of the photosystem II repair mechanism and its regulation during stress conditions. *FEBS Letters* 587: 3372–3381.
- Oono Y, Seki M, Nanjo T, Narusaka M, Fujita M, Satoh R, Satou M, Sakurai T, Ishida J, Akiyama K, Iida K, Maruyama K, Satoh S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2003) Monitoring expression profiles of Arabidopsis gene expression during rehydration process after dehydration using ca 7000 full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* 34: 868–887.
- Pawłowicz I, Kosmala A, Rapacz M (2012) Expression pattern of the *psbO* gene and its involvement in acclimation of the photosynthetic apparatus during abiotic stresses in *Festuca arundinacea* and *F. pratensis*. *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 1915–1924.

- Pawłowicz I, Masajada K (2019) Aquaporins as a link between water relations and photosynthetic pathway in abiotic stress tolerance in plants. *Gene* 687: 166-172.
- Pawłowicz I, Rapacz M (2010). Genotype differences in drought tolerance of photosynthetic apparatus in *Festuca arundinacea* Schreb. are connected with Cu-Zn SOD protein accumulation. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 545: 191-197.
- Pawłowicz I, Waśkiewicz A, Perlikowski D, Rapacz M, Ratajczak D, Kosmala A (2018) Remodeling of chloroplast proteome under salinity affects salt tolerance of *Festuca arundinacea*. *Photosynthesis Research* 137: 475-492.
- Perlikowski D, Kosmala A, Rapacz M, Kościelniak J, Pawłowicz I, Zwierzykowski Z (2014). Influence of short-term drought conditions and subsequent re-watering on the physiology and proteome of *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms, with contrasting levels of tolerance to long-term drought. *Plant Biology* 16: 385-394.
- Perlikowski D, Czyżniewski M, Marczak Ł, Augustyniak A, Kosmala A (2016) Water deficit affects primary metabolism differently in two *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms with a distinct capacity for photosynthesis and membrane regeneration. *Frontiers in Plant Science* 7:1063. doi: 10.3389/fpls.2016.01063.
- Płazek A, Pocięcha E, Augustyniak A, Masajada K, Dziurka M, Majka J, Perlikowski D, Pawłowicz I, Kosmala A (2017) Deciphering of resistance to *Microdochium nivale* in *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms. *Plant Physiology and Biochemistry* 123: 43-53.
- Popelkova H, Boswell N, Yocum C (2013) Probing the topography of the photosystem II oxygen evolving complex: PsbO is required for efficient calcium protection of the manganese cluster against dark-inhibition by an artificial reductant. *Photosynthesis Research* 110: 111-121.
- Reinhardt H, Hachez C, Bienert MD, Beebo A, Swarup K, Voß U, Bouhidel K, Frigerio L, Schjoerring JK, Bennett MJ, Chaumont F (2016) Tonoplast aquaporins facilitate lateral root emergence. *Plant Physiology* 170: 1640-1654.
- Roach T, Krieger-Liszkay A (2014) Regulation of photosynthetic electron transport and photoinhibition. *Current Protein and Peptide Science* 15: 351–362.
- Rochaix JD (2014) Regulation and dynamics of the light-harvesting system. *Annual Review of Plant Biology* 65: 287–309.
- Roose JL, Frankel LK, Mummadisetti MP, Bricker TM (2016) The extrinsic proteins of photosystem II: Update. *Planta* 243: 889-908.

- Sade N, Gebretsadik M, Seligmann R, Schwartz A, Wallach R, Moshelion M (2010) The role of tobacco Aquaporin1 in improving water use efficiency, hydraulic conductivity, and yield production under salt stress. *Plant Physiology* 152: 245–254.
- Song J, Ye G, Qian Z, Ye Q (2016) Virus-induced plasma membrane aquaporin PsPIP2;1 silencing inhibits plant water transport of *Pisum sativum*. *Botanical Studies* 57: 15.
- Su X, Ma J, Wei X, Cao P, Zhu D, Chang W, Liu, Zhang X, Li M (2017) Structure and assembly mechanism of plant C₂S₂M₂-type PSII-LHCII supercomplex. *Science* 357: 815–820.
- Törnroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johansson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Neutze R, Kjellbom P (2006) Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* 439: 688–694.
- Venkatesh J, Yu JW, Park SW (2013) Genome- wide analysis and expression profiling of the *Solanum tuberosum* aquaporins. *Plant Physiology and Biochemistry* 73: 392–404.
- Wang X, Li Y, Ji W, Bai X, Cai H, Zhu D, Sun XL, Chen LJ, Zhu YM. 2011. A novel *Glycine soja* tonoplast intrinsic protein gene responds to abiotic stress and depresses salt and dehydration tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* 168: 1241–1248.
- Yamamoto Y, Aminaka R, Yoshioka M, Khatoon M, Komayama K, Takenaka D, Yamashita A, Nijo N, Inagawa K, Morita N, Sasaki T, Yamamoto Y (2008) Quality control of photosystem II: Impact of light and heat stresses. *Photosynthesis Research* 98: 589–608.
- Yanoff A, Sigaut L, Marquez M, Alleva K, Pietrasanta LI, Amodeo G (2014). Heteromerization of PIP aquaporins affects their intrinsic permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 231–236.
- Yin Z, Pawłowicz I, Bartoszewski G, Malinowski R, Malepszy S, Rorat T (2004). Transcriptional expression of a *Solanum sogarandinum* pGT::Dhn10 gene fusion in cucumber, and its correlation with chilling tolerance in transgenic seedlings. *Cellular and Molecular Biology Letters* 9: 891–902.
- Yi X, Hargett, SR, Frankel, LK, Bricker TM (2009) The PsbP protein, but not the PsbQ protein, is required for normal thylakoid architecture in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 583: 2142–2147.
- Yu Z, Wang X, Zhang L (2018) Structural and Functional Dynamics of Dehydrins: A Plant Protector Protein under Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences* 19. doi: 10.3390/ijms19113420.

- Zelazny E, Borst JW, Muylaert M, Batoko H, Hemminga MA, Chaumont F (2007). FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 12359-12364.
- Zhou S, Hu W, Deng X, Ma Z, Chen L, Huang C, Wang C, Wang J., He Y, Yang G, He G (2012) Overexpression of the wheat aquaporin gene, TaAQP7, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. *PLoS One* 7: e52439.
- Zhuang L, Cao W, Wang J, Yu J, Yang Z, Huang B (2018) Characterization and functional analysis of FaHsfC1b from *Festuca arundinacea* conferring heat tolerance in Arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences*.

I. Pawlowicz