

CEL PROJEKTU Głównym celem projektu jest charakterystyka rodziny lipokalin oraz poznanie funkcji lipokalin chloroplastowych (CHL) w stabilizowaniu aparatu fotosyntetycznego podczas stresu oksydacyjnego u *Festuca glaucescens*. Wśród lipokalin wyróżnia się dwie grupy: tzw. lipokaliny prawdziwe (ang. true lipocalins) oraz białka lipokalino-podobne (ang. lipocalin like proteins). Z kolei do lipokalin prawdziwych klasyfikowane są lipokaliny chloroplastowe (ang. chloroplastic lipocalins – CHL) oraz lipokaliny indukowane temperaturą (ang. temperature induced lipocalins –TIL). Białka te posiadają zdolność wiązania ligandów o charakterze hydrofobowym, a ich ekspresja jest regulowana przez czynniki abiotyczne, takie jak susza, niska oraz wysoka temperatura. Jak dotąd u roślin zidentyfikowano ograniczoną liczbę lipokalin co sugeruje, że ich funkcja ochronna podczas stresu oksydacyjnego nie została w pełni poznana. *F. arundinacea* jako gatunek trawy o wysokiej tolerancji na suszę wydaje się być dobrym modelem do realizacji planowanych badań.

Cele szczegółowe są następujące: (i) identyfikacja genów kodujących lipokaliny w genomie *F. glaucescens* oraz ich klasyfikacja jako prawdziwe lipokaliny oraz białka lipokalino-podobne; (ii) analiza funkcji komórkowej lipokalin prawdziwych u roślin typu dzikiego (iii) analiza aktywności fotosyntetycznej u roślin typu dzikiego oraz roślin transgenicznych z mutacją typu knock-out genu/genów *CHL* w warunkach kontrolnych oraz podczas jednoczesnej ekspozycji roślin na działanie suszy i światła o wysokim natężeniu; (iv) analiza lipidomu błon tylakoidowych u roślin typu dzikiego oraz roślin transgenicznych z mutacją typu knock-out genu/genów *CHL* w warunkach kontrolnych oraz podczas jednoczesnej ekspozycji roślin na działanie suszy i światła o wysokim natężeniu.

OPIS BADAŃ Planowane badania obejmują: sekwencjonowanie *de novo* oraz składanie genomu *F. glaucescens* z wykorzystaniem technologii NGS (ang. Next-Generation Sequencing); anotację genów kodujących lipokaliny TIL i CHL; identyfikację ligandów, które wiążą się z lipokaliniami TIL i CHL; subkomórkową lokalizację lipokalin CHL; otrzymanie roślin transgenicznych *F. glaucescens* z mutacją typu knock-out genu/genów *CHL* (edycja genów metodą CRISPR/Cas9); poddanie roślin typu dzikiego oraz mutantów typu knock-out jednoczesnemu działaniu suszy i wysokiego natężenia światła; pomiar peroksydacji lipidów oraz zawartości reaktywnych form tlenu (ROS); analiza funkcjonowania enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego poprzez pomiar ekspresji i aktywności katalaz, peroksydaz i dysmutaz u roślin typu dzikiego oraz u mutantów typu knock-out w warunkach kontrolnych oraz podczas jednoczesnej ekspozycji na działanie suszy i światła o wysokim natężeniu; analiza funkcjonowania Cyklu Calvina poprzez pomiar fluorescencji chlorofilu i wymiany gazowej oraz ekspresji i aktywności aldolazy chloroplastowej u roślin typu dzikiego oraz mutantów typu knock-out w warunkach kontrolnych oraz podczas jednoczesnej ekspozycji na działanie suszy i wysokiego natężenia światła; analiza kompozycji lipidomu błon tylakoidowych u roślin typu dzikiego oraz u mutantów typu knock-out w warunkach kontrolnych oraz podczas jednoczesnej ekspozycji na działanie suszy i światła o wysokim natężeniu.

UZSADNIENIE PODJĘCIA TEMATYKI BADAWCZEJ Sekwencja genomu *F. glaucescens* nie jest poznana, co znacząco ogranicza zakres badań, jakie mogą być wykonywane z wykorzystaniem tego gatunku, jak również innych gatunków z rodzaju *Festuca*, które posiadają duże znaczenie ekonomiczne. Stąd też wiedza na temat molekularnych podstaw tolerancji *F. glaucescens* na stropy abiotyczne, w tym udziału lipokalin, jest niewystarczająca. Edycja genów metodą CRISPR/Cas9 oraz transformacji traw z rodzaju *Festuca* metodą *Agrobacterium tumefaciens* nie jest rozwinięta w Zespole Fizjologii Molekularnej i Cytogenetyki Roślin.

NAJWAŻNIEJSZE SPODZIEWANE EFEKTY Do najważniejszych efektów należą: (i) otrzymanie pełnej sekwencji genomu *F. glaucescens*, (ii) scharakteryzowanie rodziny lipokaliny u *F. glaucescens*, (iii) określenie roli lipokalin chloroplastowych u *F. glaucescens* w tolerancji na stropy abiotyczne poprzez wyłączenie ekspresji wybranego genu/genów u mutantów.