

Z uwagi na rosnącą populację świata i globalny problem zmian klimatu, głównym wyzwaniem staje się rozwój upraw dających wysokie plony i wartości odżywcze. Poprawę efektywności plonowania zbóż można osiągnąć poprzez regulację procesu starzenia, zarówno w kierunku jego opóźnienia jak i przyspieszenia. (1) Opóźnienie starzenia liści i wydłużenie tym samym okresu ich intensywnej fotosyntezy zwiększa zawartość skrobi w ziarnach. (2) Natomiast w uprawach przeznaczonych na paszę dla zwierząt można poprzez przyspieszenie procesu starzenia podnieść poziom azotu w masie zielonej i ziarnach. Pogłębienie wiedzy dotyczącej sygnalizacyjnej roli PA powinno doprowadzić do lepszego zrozumienia mechanizmów starzenia się roślin oraz dostarczyć nowej wiedzy na temat mechanizmów autofagicznych, także u organizmów o odległych pozycjach systematycznych, na poziomie molekularnym i komórkowym.

Poliaminy oraz ich analogi ze względu na łatwą aplikację oraz brak negatywnego wpływu na środowisko naturalne z powodzeniem mogą być stosowane w rolnictwie. Związki te mogą być aplikowane pojedynczo lub w kombinacjach, jako roztwór wodny, podawane dolistnie w formie oprysków i/lub doglebowo roślinom po zaindukowaniu procesu starzenia. Dzięki aplikacji PA możliwe jest zwiększenie tolerancji roślin uprawnych na stres.

Według naszej hipotezy współdziałanie poliamin (PA) z cząsteczkami sygnałowymi takimi jak tlenek azotu (NO) i nadtlenek wodoru (H₂O₂) może stanowić element szlaku transdukcji sygnału NO-PA-H₂O₂. Poliaminy mogłyby w ten sposób warunkować „przeprogramowanie” metaboliczne, które wprowadza komórkę na drogę starzenia.

Proces starzenia jest regulowany poprzez działanie endogennych sygnałów, wśród których opisuje się głównie hormony. Wykazano, że regulatorami procesu starzenia są również poliaminy (PA). W naszym projekcie postulujemy udział PA w sygnalizacji procesu starzenia między innymi z uwagi na fakt, że homeostaza PA jest w komórce ściśle kontrolowana. Zmiany stężeń PA w prawidłowo funkcjonującej komórce są mało prawdopodobne. Indukowane starzenie zaburza ich homeostazę co przyczynia się kolejno do starzeniowo-zależnych zmian metabolicznych. Katabolizm PA został zaproponowany jako sprzyjający starzeniu głównie poprzez produkcję H₂O₂. U mutantów PAO4(bc) *Arabidopsis*, u których wyłączona jest aktywność PAO4(bc) (z ang. PA back-conversion oxidase), stwierdzono opóźnione wejście w fazę starzenia wywołanego ciemnością, którego konsekwencją jest zmniejszona produkcja reaktywnych form tlenu i zwiększony poziom NO. Opublikowana niedawno praca Groß i in. (2017) wiąże katabolizm PA (głównie putrescyny – Put) z syntezą NO. W pracy Sobieszczuk-Nowicka i in. (2016) sugerowano udział katabolizmu Put w starzeniowo-zależnych zmianach zachodzących na terenie komórki. Rozważano tam jednak głównie syntezę z Put kwasu γ -amino masłowego (GABA). Katabolizm Put w procesie starzenia może prowadzić do generowania NO lub zmiatania NO w kierunku syntezy Put. NO-PA-H₂O₂ mogą być zatem składnikami transdukcji sygnału propagującego wprowadzenie komórek liścia na drogę starzenia.

W projekcie będzie wykorzystana opracowana przez nas procedura indukcji ciemnością procesu starzenia w liściach jęczmienia (cv Golden Promise) (Sobieszczuk i in. 2015, 2016). **W celu dokładnej weryfikacji naszej hipotezy współdziałania PA z cząsteczkami sygnałowymi takimi jak NO i H₂O₂, wykorzystane będą inhibitory enzymów metabolizmu PA i syntezy NO.** Pogłębienie wiedzy dotyczącej sygnalizacyjnej roli PA doprowadzi do lepszego zrozumienia mechanizmów starzenia się roślin oraz pozwoli na opracowanie nowych metod agrotechnicznych zwiększających tolerancję roślin uprawnych na stres.

Jęczmienne geny metabolizmu PA nie zostały wystarczająco poznane. Dzięki analizie identyfikacji *in silico* możliwe jest zaprojektowanie starterów i określenie starzeniowo-zależnych zmian poziomu transkryptów genów metabolizmu PA: *ADC*, *ODC*, *SAMDC*, *SPDS*, *DAO* i *PAObc*, metodą Real-Time PCR. Analiza ekspresji genów roślin kontrolnych podpowie nam, który fragment metabolizmu PA i syntezy NO będzie istotny dla dalszych analiz, a tym samym, które z inhibitorów stosowane będą w kolejnych zadaniach. Cel projektu zostanie osiągnięty dzięki: 1) porównaniu fenotypów roślin traktowanych inhibitorami oraz roślin kontrolnych w warunkach stresowych, stosując pomiary: fluorescencji chlorofilu *a*, pomiary względnej zawartości chlorofilu i flawonoidów oraz pomiary morfometryczne. 2) Analizie wolnych poliamin metodą HPLC. 3) Określeniu poziomu NO i H₂O₂. Cytochemiczna wizualizacja NO wykonana zostanie przy użyciu specyficznych fluorochromów tj. DAF-2DA, wraz z pomiarem ilościowym metodą fluorometryczną. Preparaty kontrolne traktowane będą zmiataczem NO (cPTIO). Ponieważ źródło syntezy NO w procesie starzenia nie zostało dotąd zdefiniowane dodatkowo w zadaniu tym zostanie oznaczona pula azotynów, ponieważ to one są bezpośrednim substratem dla NR w syntezie NO. Poza tym NO może powstawać z azotynów na drodze nieenzymatycznej. Pomiar poziomu H₂O₂ przeprowadzony zostanie techniką spektrofotometryczną z wykorzystaniem związków tytanu, jak również wykonana zostanie wizualizacja cytochemiczna H₂O₂ z użyciem specyficznego fluorochromu DCFH-DA.