

Popularnonaukowe streszczenie projektu

Postępujące zmiany warunków środowiska naturalnego, będące również wynikiem działalności człowieka, prowadzą do utraty wigoru nasion i ich przyspieszonego starzenia. Nasiona typu ortodoksyjnego, mimo wykształcenia mechanizmów pozwalających im uzyskać stan głębokiego spoczynku również są narażone na niekorzystne czynniki zewnętrzne, takie jak wzrost temperatury czy zmiany wilgotności podłoża. W konsekwencji, problem starzenia nasion i zachowania bioróżnorodności dotyczy nie tylko samego środowiska (naturalne banki nasion), ale również ma aspekt ekonomiczny (negatywny wpływ na produkcję rolniczą, ogrodnictwo, leśnictwo). W związku z tym, że naturalne procesy starzenia zachodzą wolno, w warunkach laboratoryjnych stosuje się różne techniki przyspieszonego postarzania nasion, opisane w specjalnych protokołach. Na zachowanie żywotności nasion mają wpływ reaktywne związki, do których zalicza się m.in. tlenek azotu (NO). Działanie tej regulatorowej cząsteczki na nasiona opisuje model tzw. „drzwi nitrozacyjnych”. Charakterystyczne dla danego gatunku rośliny, optymalne stężenie NO w nasionach stanowi „klucz” umożliwiający przełamanie spoczynku i stymulujący ich kiełkowanie. Z kolei, wysokie – patofizjologiczne stężenie NO sprzyja nieodwracalnym modyfikacjom podstawowych cząsteczek w komórkach i w konsekwencji może prowadzić do śmierci organizmu. Wyniki badań opublikowanych w ostatnich latach wskazują, że w przypadku postępującej utraty żywotności nasion, obserwuje się raczej „niedobór” NO. Z kolei, traktowanie sztucznie postarzałych nasion donorami NO ma działanie „regenerujące”. Proponuje się, że NO moduluje metabolizm reaktywnych form tlenu (ROS), których działanie „postarzające tkanki” jest powszechnie znane, zarówno u roślin jak i zwierząt, w tym ludzi. O ile skąpe informacje dotyczące udziału NO w zachowaniu żywotności nasion dotyczą głównie proponowanych mechanizmów działania, to brakuje danych opisujących zmiany metabolizmu tej cząsteczki. Podstawowym enzymem związanym z biosyntezą NO jest reduktaza azotanowa (NR), która w warunkach niedoboru tlenu (występujących w początkowych etapach kiełkowania / starzenia) katalizuje reakcję powstawania NO. Białkami modulującymi stężenie NO są także fitoglobiny (Pgb), zwłaszcza klasy 1 (Pgb1), odpowiedzialne za przekształcanie NO do jonów azotanowych.

Celem proponowanych badań jest określenie zmiany w metabolizmie NO w osiach zarodkowych nasion typu ortodoksyjnego poddanych sztucznemu postarzaniu przez różny okres czasu, w odniesieniu do przemian NO zachodzących w osiach nasion niepostarzałych - spoczynkowych. Materiał badawczy będą stanowiły osie zarodkowe nasion jabłoni (*Malus domestica* Borkh.) postarzanych od 7 do 21 dni (nasiona zmieszane ze sterylnym piaskiem zwilżonym wodą destylowaną, umieszczone w temperaturze 33 °C), a za kontrole będą służyły osie zarodkowe izolowane ze spoczynkowych nasion, poddanych imbibicji przez 12 h w wodzie, w temperaturze pokojowej.

Realizacja celu będzie wiązała się z badaniami prowadzonymi na poziomie transkryptomycznym, proteomicznym i metabolicznym. W projekcie zostaną wykorzystane techniki z zakresu biologii molekularnej, standardowe analizy biochemiczne i fizjologiczne. W badaniach zaplanowano określenie poziomu transkryptów genów kodujących NR (*NIA*) i Pgb (*Pgb1*) (ilościowa reakcja łańcuchowej polimerazy DNA w czasie rzeczywistym – qRT-PCR), elektroforetyczny rozdział mieszaniny białek oraz oznakowanie specyficznymi przeciwciałami białek NR i Pgb (WesternBlot), pomiar aktywności NR i całkowitej aktywności NO-dioksygenazy fitoglobiny. Ponadto, zostanie przeprowadzony pomiar zawartości metabolitów (jony azotanowe i azotynowe – metody kolorymetryczne) oraz ATP (z wykorzystaniem bioluminescencji). Ponadto, celem jest określenie zmian ilości NO (wykorzystując techniki spektrofluorymetryczne), towarzyszących modyfikacjom aktywności podstawowych enzymów anabolizmu i katabolizmu NO.

Hipoteza badawcza zakłada, że starzeniu nasion typu ortodoksyjnego towarzyszą zmiany w ilości transkryptów jak i aktywności białek związanych z przemianami NO. Zmiany te najprawdopodobniej zależą od czasu trwania zabiegu postarzania nasion i wiążą się z modyfikacją ilości metabolitów będących albo źródłem NO lub stanowiących produkt reakcji enzymatycznych związanych z metabolizmem tej cząsteczki. Postulujemy, że poprzez przekształcanie NO do jonów azotanowych, fitoglobiny mają działanie promujące starzenie, gdyż ograniczają dostępność NO regulującego to zjawisko.

Uzyskane wyniki pozwolą uzupełnić model „drzwi nitrozacyjnych” pod kątem udziału NO w zachowaniu żywotności nasion.