

7. 02. 2008.

Dr. sc. Nenad Malenica

Zavod za molekularnu biologiju, Biološki odsjek, PMF Sveučilišta u Zagrebu

Molekularni mehanizmi regulacije transporta auksina

Distribucija auksina u biljci, osim pasivnim transportom ksilemom i floemom, odvija se i aktivnom procesom poznatim kao polarni transport. Polarni transport auksina odvija se u živim stanicama i posredovan je specifičnim transporterima, polarno smještenima samo na jednoj strani stanice. U posljednjih deset godina istraživanja porodice auksinskih transportera doživjela su ekspanziju i stekla "*cutting edge*" status u primarnoj znanstvenoj literaturi.

Danas se sa priličnom sigurnošću može tvrditi da su *PIN* geni glavni, mada ne i jedini, "krivci" za distribuciju auksina u biljci, koji stvarajući, tzv. auksinske gradijente, reguliraju diferencijalnu ekspresiju gena i posljedično diferencijaciju staničja. Zahvaljujući pouzdanim molekularnim alatima razvijenim posljednjih godina (prije svega *PIN* antitjelima i reporter-genima) ova porodica proteina nadrasla je svoj "auksinski kontekst" i danas predstavlja model za istraživanje fenomena stanične polarosti u biljaka općenito. Također, istraživanja na *PIN* genima prešli su okvire glavnog biljnog modela *Arabidopsis thaliana* te se u međuvremenu provode i na vrstama *Populus sp.*, *Oryza sativa* i *Zea mays*.

Iako su poznati pojedini genetski faktori koji utječu na ekspresiju *PIN* gena, fini mehanizmi kontrole ove porodice gena još se intenzivno istražuju. U ovom izlaganju bit će predstavljena karakterizacija dva nova potencijalna regulatora *PIN* proteina, *MOP2* i *MOP3*, izolirana pretraživanjem mutanta defektnih u polarnom transportu auksina.

10. 06. 2008.

Dr. sc. Jakub Rolcik

Laboratory of Growth Regulators, Palacky University & Institute of Experimental Botany
ASCR, Olomouc, Czech Republic

Auxin analysis: Why and how

The quantification, in plant material, of indole-3-acetic acid (IAA) and its metabolites – namely conjugates with amino acids such as Ala, Asp, Gly, Glu, Leu, Phe, Trp and/or Val – presents a highly challenging task. These compounds occur at very low concentrations (typically between 10 fmol and 100 pmol per gram of fresh weight) while the matrix is very complex and contains enzymes and other components which may destroy the analyte during the analytical procedure. One of the possibilities how to cope with the task is to use modern sophisticated instrumentation (UPLC coupled to tandem mass detection). The use of auxin-specific immunoaffinity extraction may further improve the parameters of the analytical protocol. However, in the case of IAA and its metabolites, experience seems to be as important as the methods mentioned above.

30. 06. 2008.

Dr. Raffaele Siano

Laboratory of Plankton Ecology and Evolution, Stazione Zoologica "A. Dohrn"
Napoli, Italy

The diversity of potentially harmful microalgae of the Campania coasts (Italy, Southern Tyrrhenian Sea)

A total number of 45 potentially harmful microalgal taxa have been identified along the Campania coasts (Southern Tyrrhenian Sea, Mediterranean Sea) over almost 40 years of study of the phytoplankton community of the area. The study of their seasonality in different environments (river mouths, eutrophic and pristine areas) suggested that the late spring and summer is the period of most probable occurrence of Harmful Algal Bloom (HAB) events, when therefore monitoring activities should be enhanced.

In order to fill a major gap in the existing information, potentially harmful unarmoured dinoflagellate species were studied over one year. Using the Serial Dilution Culture (SDC) method almost 30 unarmoured dinoflagellates were brought into culture and maintained in species-specific optimal growth conditions. Using morphological (Light and Scanning Electron Microscopy) and phylogenetic (DNA extracting and sequence alignment) tools, a first up-dated taxonomic list of naked dinoflagellates was compiled for the area. The isolates were assigned to 8 different species, of these some have been identified for the first time in the Mediterranean Sea and one is new to science and awaits a taxonomic description.

Despite the variety of potentially harmful species, no human health problems or fish kills have ever been recorded in Campania. The reasons for this apparent paradox are probably to be found in the ecological factors regulating the abundance, toxicity and distribution of the harmful species as well as the relatively low number of aquaculture plants in the area. The most frequent HAB threats in the area seem to be connected to sea-water discolorations and to *Ostreopsis*, a benthic dinoflagellate causing problems to humans at the moment only in other regions of Italy.

7. 10. 2008.

Dr. David Tepfer

Institut National de la Recherche Agronomique, Versailles, France

Plant Science and the Origin of Life

Although the origin of life is experimentally elusive, the commonality of the genetic code is well established, as is the presence of life on Earth early in the planet's history. Spontaneous generation of life has not been documented, but life's ability to travel through space (at least for short distances) is clear from human exploration of the solar system, which has carried men to Earth's moon and microbial stowaways to exoenvironments, such as Mars. Direct evidence for panspermia (the universality of life) is thus limited to exospermia (the exportation of life from Earth). The hypothesis of general panspermia as the source of life on Earth is difficult to test, but microbes appeared during the first billion years of Earth's existence, and all species investigated so far use a similar genetic code, indicating a common origin. General panspermia requires that life survive transfer through the space. Thus, the plausibility of panspermia can be evaluated by examining life forms on Earth for their capacity to survive in space. This approach has mostly concentrated on bacterial spores. Plant seeds are proposed here as model panspermia vehicles, and directed exospermia (the deliberate dispersal of life away from the Earth) is suggested, using plant seeds and bundled, endophytic microorganisms.

10. 12. 2008.

Doc. dr. sc. Mirna Ćurković Perica

Botanički zavod, Biološko odsjek, PMF Sveučilišta u Zagrebu

Što sve mogu auksini

Auksini su biljni regulatori rasta koji utječu na rast i diferencijaciju biljaka. Molekularni mehanizmi učinka auksina na biljke intenzivno se istražuju, ali od nedavno istražuje se i njihov učinak na bakterije i tumore. Otkriveno je, naime, da biljke zaražene fitoplazmama ukoliko su izložene djelovanju auksina mogu biti oslobođene od patogena. Posebno je bio uspješan tretman indol-maslačnom kiselinom. U ovom slučaju auksini su djelovali na biljku domaćina, a posredno na fitoplazme. Međutim, istraženi su i učinci auksina na bakteriju *E. coli*. Pokazalo se da indol-octena kiselina mijenja ekspresiju gena koji su uključeni u prilagodbu ove bakterije na nepovoljne uvjete života i omogućuje joj bolje preživljavanje. Nadalje, na nekoliko tumorskih staničnih linija istražena je moguća primjena auksina u genskoj terapiji tumora. Pokazalo se da auksini u kombinaciji s peroksidazom pokazuju visoku citotoksičnost za tumorske stanice.

10. 03. 2009.

Dr. sc. Genadij Razdorov

Centar za kliničke i translacijske znanosti, Laboratorij za proteomiku
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Proteomika: novo doba

Proteomika (analiza ukupnih proteina) u modernom obliku nastala je povezivanjem triju disciplina: separacije proteina elektroforezom u gelu, spektrometrije masa i sekvenciranja genoma. Prvo desetljeće proteomike bilo je desetljeće velikih očekivanja, napretka i sazrijevanja. Novi pristup u proteomici GeLCMS, omogućio je robustnost i viši stupanj automatizacije. Nastao kao kompromis između starog "2DE" i novijeg "gel-free" pristupa, GeLCMS jest kombinacija razdvajanja proteina "1D" elektroforezom te separacije peptida tekućinskom kromatografijom u kombinaciji sa spektrometrijom masa.

Izumom mekih tehnika ionizacije (ESI/MALDI), krajem 80tih prošlog stoljeća, započinje doba spektrometrije masa. Time je također omogućena spektrometrija masa proteina (odnosno peptida). Makarov izum Orbitrapa, potpuno novog principa spektrometrije masa, omogućio je nevjerojatan pomak u proteomici početkom ovoga stoljeća. Performansa bliskih FT-ICR instrumentima bez njihove kompleksnosti i cijene, Orbitrap je omogućio nisku učestalost lažno pozitivnih proteinskih identifikacija na rutinskoj razini.

Kvantifikacija putem spektrometrije masa (za razliku od kvantifikacije u gelu) drugi je veliki pomak za proteomiku. Uvođenjem SILAC (obilježavanje stabilnim izotopima putem aminokiselina u staničnoj kulturi) tehnologije, kvantifikacija putem spektrometrije masa postigla je visoku točnosti određivanja relativnih odnosa proteina na globalnoj razini. Dodatni efekt SILAC tehnologije u proteomici jest validacijski efekt sparenih signala.

Proteomika danas omogućuje globalno praćenje promjena na proteinskoj razini kao i pojedinih proteinskih modifikacija poput fosforilacije, glikozilacije, metilacije itd; te je postala nezaobilazna u sistemskom pristupu biologiji.

15. 09. 2009.

Dr. sc. Vesne Katavić

Department of Botany, University of British Columbia, Vancouver, Canada

Plant Seed Oils As Feedstock For Industrial Applications And Biodiesel

Plant oils chemically resemble fossil oil and as such have a great potential in reducing consumption of fossil oil in chemical industry and as a source of energy in the form of biodiesel.

There are numerous applications of seed oils in production of various chemicals and materials. However, to be more economically viable for industrial applications seed oils need to be enriched in a single, specific fatty acid. To better meet industrial demands, considerable effort has been directed toward genetically engineering of seed oil crops in order to improve the industrial properties of the oil.

Although biodiesel derived from oilseed crops (particularly Brassica species) has especially high efficiency potential as an alternative to fossil fuels, the production cost of biodiesel is still higher than the production of fossil fuels. In this context, higher oil content would be very useful in aiding the development of biodiesel feedstock oilseed crops and lowering cost of production.

Several examples of genetic engineering of Brassica oilseed for industrial application as well as recent efforts in genetic manipulations of seed oil accumulation will be described and discussed.

21.12.2009.

Dr. sc. Iva Tolić-Nørrelykke

Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden

**Optička stupica i optičke škare u stanicama kvasca:
Studija unutarnje organizacije stanice**

Prostorna organizacija je bitna za život na svim razinama složenosti, od makromolekula do stanica, organa i organizama. Na razini stanice, odgovarajući stanični oblik i položaj organela unutar stanice neophodni su za uspješnu staničnu diobu, dok greške u pozicioniranju organela mogu uzrokovati staničnu smrt ili bolesti poput raka. Za istraživanje mehanizama prostorne organizacije stanice potrebno je mehanički narušiti tu organizaciju. U tu smo svrhu razvili kombinaciju nelinearne mikroskopije, laserskih škara i laserske stupice, što nam je omogućilo seciranje pojedinih mikrotubula i premještanje stanične jezgre, kako bismo razumjeli mehanizme pozicioniranja jezgre, diobenog vretena i diobene ravnine stanice.

31. 03. 2010.

Doc. dr. sc. Nenad Pavin

Max Planck Institute for the Physics of Complex Systems (MPI-PKS), Dresden, Germany
Department of Physics, Faculty of Science, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

Kako stanica pronalazi vlastito središte: pozicioniranje astera microtubule

Međudjelovanje dinamičkih mikrotubula sa staničnom korom proizvodi sile koje pozicioniraju organele s obzirom na geometriju žive stanice. Tako sile koje nastaju djelovanjem molekularnog motora (dineina) vezanog za staničnu koru omogućuju raznovrsne mehanizme potrebne za pozicioniranje centrosoma u stanicama, od malih stanica kvasca sve do velikih stanica embrija (slika). Ipak, uloga sila te fizikalni mehanizmi koji dovode do pozicioniranja još uvijek nisu objašnjeni. Da bismo odgovorili na ovo pitanje, napravili smo *in vitro* eksperimente u kojima smo dinamične astere mikrotubula stavili u mikrokomore. Mikrotubuli koji rastu i u kontaktu su sa zidom komore odguruju se od zida te su stoga pod kompresijom, dok mikrotubuli koji su u kontaktu s molekularnim motorima vuku te su stoga pod tenzijom. Pronašli smo da je aster mikrotubula preciznije pozicioniran ukoliko na mikrotubule djeluju i sile koje guraju kao i sile koje ih vuku. Teorijski opis mehanizma pozicioniranja zasnovan je na klizanju mikrotubula uzduž zida komore dobivenog guranjem mikrotubula: posljedica guranja je anizotropna raspodjela mikrotubula, koji nakon što se vežu

na molekularne motore proizvode silu koja pozicionira aster u središte mikrokomore. Teorijski rezultati dobiveni za različite geometrije sugeriraju različite strategije pozicioniranja kod raznih tipova stanica.

9. 03. 2010.

Dr. sc. Domagoj Šimić, znanstveni savjetnik

Odjel za oplemenjivanje i genetiku kukuruza, Poljoprivredni institut Osijek

Ionomika – funkcionalna genomika elemenata

Ionomika (analiza ukupnih iona) pripada u novije “-omike”, a nastala je spajanjem tehnologija visoke propusnosti za analizu elementarnog sastava, bioinformatike, genetike i genomike. Ionom su svi minerali i elementi u tragovima koji se mogu naći u organizmu uključujući sve esencijalne i neesencijalne elemente, a predstavlja ukupnu anorgansku komponentu organizma. Kod biljaka, ionomika se očekivano najviše razvila kod uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*), a slijede u znatno manjem obimu riža (*Oryza sativa*), kukuruz (*Zea mays*) i soja (*Glycine max*).

Na Poljoprivrednom institutu Osijek se desetak godina provode ionska istraživanja lista, sjemena, peluda i korijena na više od pet stotina genetskih primki kukuruza. Cilj je napraviti sveobuhvatnu ionsku analizu fenotipizacijom i genotipizacijom koje dovode do analize lokusa kvantitativnih svojstava (QTL). Završnom QTL analizom detektiraju se kromosomski segmenti i/ili geni koji sudjeluju u regulaciji ionoma, odnosno geni koji kontroliraju nakupljanje pojedinog elementa u određenom biljnom organu, kao i način i učinak njihova djelovanja. Nakon poljskih pokusa, fenotipizacija se upotpunjuje analizom elemenata tehnikom induktivno spregnute plazme – optičke emisijske spektroskopije (ICP-OES). Na početku su mjerena 22 elementa, ali je deset elemenata potom isključeno zbog vrijednosti koje su uglavnom bile ispod detekcijskog limita ili zbog niske ponovljivosti rezultata. Pri genotipizaciji genetskih primki kukuruza koristimo rezultate vlastitih DNA analiza uporabom SSR i SNP biljega, ali i javno dostupne baze podataka. Ionom lista i korijena se istražuje prije svega u sklopu programa fitoremedijacije (detoksikacije tla pomoću biljaka), a ionomika zrna se koristi kao osnova u programu biofortifikacije – razvoja kultivara s većim sadržajem minerala. Na predavanju će biti prikazan dio rezultata za koncentracije cinka, željeza, fosfora, bakra, kadmija, magnezija, mangana, bora i stroncija određenih u tkivima lista i sjemena kukuruza.

27. 04. 2010.

Dr. sc. Dudy Bar-Zvi

Department of Life Sciences, Ben-Gurion University, Beer-Sheva, Israel

Too little water - too much salt: molecular response of plants to drought and salinity

Water-deficit and salinity stresses impose major limitations on yield and profit of agricultural crops in dry land and irrigated agricultural settings, respectively. Plants have developed the ability to exhibit a large spectrum of responses to abiotic stresses, including a large number of physiological, biochemical and molecular changes. Understanding the molecular details of plant responses to salt-stress and water-stress is required to design transgenic crops with increased tolerance to these high impact abiotic stresses.

Three studies will be discussed:

1. Analysis of the activity the promoter of the gene encoding Na^+/H^+ exchanger from sugar beet.

2. Structure – function of tomato stress-regulated ASR1 protein. Studies discussed using purified ASR1 protein, and transgenic plants overexpressing ASR1.
3. Lateral root development in Arabidopsis in response to the environment: uncovering a transcription factor mediating abscisic acid- and cytokinin-inhibition of lateral root development.

28. 06. 2010.

Dunja Šamec, dipl. ing.
Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Fenolne kiseline: kvalitativna i kvantitativna analiza UPLC-MS/MS metodom

Fenolne kiseline su mnogobrojna skupina biljnih sekundarnih metabolita koji se nalaze u slobodnom obliku ili vezane na glikozide ili estere. Igraju važnu ulogu u regulaciji biljnog razvitka, a posebno u obrani biljnog organizma od patogena i oksidativnog stresa. Mnoge studije pokazale su pozitivan učinak fenolnih kiselina na zdravlje ljudi zahvaljujući njihovom izrazitom antioksidacijskom učinku.

Fenolne kiseline u kineskom kupusu (*Brassica rapa* L. var. *pekinensis* Lour), bijelom kupusu (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*), bobičastom voću te u različitim tkivima medicinskog i endemskog bilja (*R. Intermedia*, *M. Croatica*, *G. pentaphyllum*) analizirane su i identificirane koristeći novu, brzu i osjetljivu metodu tekućinske kromatografije i masene spektroskopije UPLC-MS/MS. Metoda je razvijena u Laboratoriju za biljnu regulaciju rasta na Prirodoslovnom fakultetu u Olomoucu, u Republici Češkoj gdje sam boravila u okviru Stipendije za doktorante pod pokroviteljstvom Nacionalne zaklade za znanost, visoko školstvo i tehnološki razvoj Republike Hrvatske. Nadalje, usvojena je i primjenjena ORAC metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata.

U biljnim ekstraktima identificirano je 12 fenolnih kiselina, a njihova zastupljenost i količina uvelike ovisi o ispitivanoj vrsti, varijetetu, ali i o biljnom tkivu. Izmjerene su antioksidacijske aktivnosti u spomenutim ekstraktima te uočena značajna korelacija s količinom fenolnih kiselina. Rezultati upućuju da su upravo fenolne kiseline prisutne u ispitanim biljnim vrstama odgovorne za visoku antioksidacijsku aktivnost, posebno kod medicinskih biljaka koje se koriste u tradicionalnoj medicini.

28. 06. 2010.

Martina Juranić, dipl. ing.
Biološki odsjek, PMF Sveučilišta u Zagrebu

Uloga proteina ZmMAB1 u megagametogenezi kukuruza

U spolnom razmnožavanju biljaka ženski gametofit imaju ključnu ulogu. Međutim, malo se zna o genima i molekularnim mehanizmima uključenim u razvoj ženskog gametofita, a još manje se zna o tim procesima u kukuruza. Analizom cDNA biblioteka dobivenih iz jajnih stanica izoliranih iz embrionske vreće kukuruza identificiran je gen, nazvan *ZmMAB1* čija je ekspresija ograničena samo na ženski gametofit. Protein ZmMAB1 ima moguću ulogu u posttranslacijskoj regulaciji razvoja ženskog gametofita.

02. 02. 2011.

Dr. sc. Petra Peharec-Štefanić
Biološki odsjek, PMF Sveučilišta u Zagrebu

Proteom plastida tumorskih stanica hrena u kulturi *in vitro*

Nakon transformacije lista hrena bakterijom *Agrobacterium tumefaciens*, osim neorganiziranog tumora dobiven je i teratom, koji ima sposobnost morfogeneze izdanaka sa zadebljalim listovima. Stanice tumora imaju osobine nespecijaliziranih parenhimskih stanica, dok stanice malformiranih listića teratoma postižu određeni stupanj diferencijacije, ali se ne vraćaju iz tumorskog u normalno stanje stanica lista.

Tipični biljni organeli plastidi jasno odražavaju diferencijacijski stadij stanica. Pri tumorskoj transformaciji, ti organeli iz razvijenog stadija kloroplasta prelaze u juvenilni oblik plastida sličnog proplastidima. Istraživanjima na tumoru i teratomu hrena, u kulturi *in vitro*, utvrđene su značajne promjene u ultrastrukтури, fotosintetskoj aktivnosti i proteomu plastida.

Analize proteoma plastida provedene su spektrometrom masa LTQ-Orbitrap Discovery. Identificirani proteini razvrstani su prema MapMan Bin funkcionalnoj klasifikaciji pomoću baze podataka proteoma plastida-„The Plastid Proteome Database“ i analizirani pomoću web aplikacije „Babilomics 4 –Fatigo“. Dobiveni rezultati pokazuju da plastidi vrlo osjetljivo reagiraju na promjene u staničnoj diferencijaciji i pri tumorskoj transformaciji. Plastidi teratoma su po svojoj metaboličkoj aktivnosti slični kloroplastima lista, dok su plastidi tumora u razvojnom stadiju između proplastida i nerazvijenih kloroplasta. Iako su fotosintetski slabo aktivni, metabolički aktivno reagiraju na stres..

Budući da je ovo prvo istraživanje proteoma plastida tumora, utvrđivanje proteinskih biljega i njihova identifikacija pridonijet će boljem razumijevanju promjena u proteomu plastida kao odgovor na transformaciju stanica.

9. 03. 2011.

Dr. sc. Tanja Peskan-Berghöfer

Ruperto Carola University Heidelberg, Centre for Organismal Studies (COS), Molecular Physiology, Heidelberg

Molekularne osnove simbioze između bazidiomicete *Piriformospora indica* i korijena viših biljaka

Piriformospora indica, nedavno otkriven mikroorganizam iz obitelji *Sebacinaceae* (*Hymenomyces*, *Basiodomycota*) ulazi u simbiozu sa članovima brojnih biljnih vrsta. Kolonizacija korijena gljivom uzrokuje povećanje biljne biomase i povisuje otpornost domaćina protiv patogena. Za vrijeme rane faze interakcije dolazi kod biljke do pojačane transkripcije gena i sinteze proteina uključenih u obranu organizma. Faza kolonizacije (rast hifa u stanice korijena) povezana je sa opadanjem biljnog imuniteta i promjenom u transkripciji gena koji reguliraju metabolizam biljnih hormona. Intenzitet interakcije, a time i opseg pozitivnog djelovanja *Piriformospora* na biljni rast, reguliran je uvjetima okoliša i njegovim utjecajem na fiziološko stanje biljnog organizma. Identifikacija biljnih faktora, koji reguliraju jačinu interakcije korijena sa *P. indica* nalazi se u sredistu istraživanja i presudna je za razumijevanje simbioze i moguću primjenu.

29. 03. 2011.

Ana Brcko, dipl. ing.

Laboratorij za kemijsku biologiju, ZMB, Institut Ruder Bošković

Utjecaj hormona stresa (SA, JA, ABA) na homeostazu endogenih auksina u klijancima *Brassica rapa* L.

Auksini su signalne molekule koje koordiniraju biljni rast i razvitak, kako u povoljnim uvjetima tako i u uvjetima stresa. Način djelovanja auksina te njihovo nakupljanje na mjestima fiziološkog djelovanja nisu do kraja razjašnjeni. Jedan od bitnih čimbenika u regulaciji aktivnosti auksina su enzimi auksin-amidohidrolaze koje hidroliziraju aminokiselinske konjugate auksina oslobađajući aktivne spojeve (slobodne auksine).

Jedan od mehanizama prilagodbe rasta biljaka u uvjetima stresa je smanjenje količine slobodnih auksina i utišavanje auksinske signalne transdukcije u nadzemnim dijelovima biljke. Nadalje, literaturni podaci ukazuju na promjene metabolizma auksina u uvjetima stresa ili uslijed tretmana salicilnom kiselinom (SA), koje dovode do akumuliranja dugolančanih auksina IPA i IBA u odnosu na IAA.

Pretpostavili smo da hormoni stresa imaju utjecaj na raspodjelu endogenih auksina između slobodnih i konjugiranih formi te da je moguća i njihova uloga u regulaciji ekspresije gena za auksin-amidohidrolaze u *Brassica rapa* L. Da bismo dobili informacije o ulozi hormona stresa (SA, JA i ABA) u metabolizmu auksina ispitano je njihovo djelovanje na fiziološkoj razini testom inhibicije rasta korijena na klijancima kupusa. Nadalje, utvrđen je utjecaj hormona stresa na metabolizam endogenih hormona auksina, pri čemu su auksini identificirani i kvantificirani u klijancima kupusa metodom GC-MS. Metodom qRT-PCR istražen je utjecaj hormona stresa na ekspresije gena za auksin-amidohidrolaze. S obzirom na dobivene rezultate diskutirana je uloga hormona stresa u regulaciji metabolizma auksina.

Influence of stress hormones (SA, JA and ABA) on the homeostasis of endogenous auxins in the seedlings of *Brassica rapa* L.

Auxins are signaling molecules that coordinate plant growth and differentiation in normal favorable conditions, as well as in stress conditions. Their mode of action and their accumulation at sites of physiological action are still not well established. One of the crucial factors involved in the regulation of auxin activity are enzymes auxin-amidohydrolases, which hydrolase amino acidic conjugates of auxins thereby releasing active substances (free auxins).

One mechanism of growth adaptation, upon exposure of plants to stress, is a decrease in free auxin content and down-regulation of auxin signal transduction in above-ground organs. Furthermore, it was shown that changes in auxin metabolism in stress conditions or upon treatment with salicylic acid (SA), lead to the accumulation of long chain auxins IPA and IBA, in comparison to short chain IAA.

We assumed these stress hormones are influencing the differences in the distribution of endogenous auxins between free and conjugated forms, so there might be a possibility they affect regulation of gene expression for the auxin-amidohydrolases in *Brassica rapa* L. To gain insight into the role of stress hormones (SA, JA and ABA) on auxin metabolism, their action at the physiological level was studied by the root growth inhibition assay on Chinese cabbage seedlings. Also, the effect of stress hormones on the metabolism of the endogenous auxins was investigated by GC-MS (gas chromatography- mass spectrometry), by which auxins were identified and quantified in the seedlings of Chinese cabbage. By qRT-PCR we investigated the influence of stress hormones on the expression of genes for auxin-amidohydrolases. The role of stress hormones in the regulation of auxin metabolism was discussed with regard to the obtained results.

6. 05. 2011.

Dr. sc. Mihaela-Luiza Márton

Pollen Tube Guidance in Maize

During the evolution of flowering plants, their sperm cells have lost mobility and are transported from the stigma to the female gametophyte via the pollen tube to achieve double fertilization. Despite the fact that the pollen tube path through the pistil towards the female gametophyte has been studied for more than a century, we are only now beginning to understand the underlying molecular mechanisms preceding gamete fusion in flowering plants. It has been shown that before entering the ovary, pollen tube guidance requires intensive communication with the surrounding sporophytic maternal tissues and the presence of the female gametophyte seems not to be necessary for the largest part of the pollen tube journey. However, after exit from the transmitting tract tissue and emergence on the surface of the placenta, pollen tube guidance is thought to be primarily under gametophytic control, although the maternal sporophytic tissues of the ovary might also contribute to guidance cues towards the ovary. Until recently little was known about the molecules produced by the female gametophyte that are involved in this process. The most recent development in the field will be presented, with a special focus on pollen tube guidance in maize and the role of secreted candidate signalling ligands involved in the processes described.

2. 12. 2011.

Doc.dr.sc. Ivana Novak

Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Biologija malignih tumora

Uloga mitohondrijskih receptora u autofagiji

Autofagija je jedan od zaštitnih staničnih mehanizama kojim se uklanjaju štetni stanični dijelovi uključujući proteinske nakupine i oštećeni stanični organeli. S obzirom na svoju razgrađujuću ulogu, autofagija svojom aktivnošću usporava starenje, sprječava nastajanje tumora, upalnih i neurodegenerativnih bolesti te je važna u obrani od patogena.

Nedavnim otkrićima autofagijskih receptora, koji specifično prepoznaju i omogućavaju razgradnju različitih staničnih dijelova kao što su oštećeni organeli, proteinske nakupine ili unutarstanični patogeni, otvorilo se novo poglavlje u istraživanju autofagije. Od velike je važnosti uklanjanje oštećenih mitohondrija ili pak mitohondrija koji su u suvišku specijaliziranim procesom autofagije koji se naziva mitofagija. Nedavno smo otkrili i opisali mitohondrijski protein Nix kao receptor koji specifično prepoznaje mitohondrije te se oni uklanjaju putem interakcije s proteinima- -adaptorima, koji su sastavni dio sustava autofagije (Novak i sur., EMBO Reports, 2010). Proteini---adaptor ATG8/LC3/GABARAP ključni su za nastajanje autofagosoma kojima će se obuhvatiti materijal za razgradnju.

U međuvremenu, otkrili smo još jedan receptor mitofagije Bnip3 (Nix homolog) koji na sličan način omogućava razgradnju mitohondrija (neobjavljeni rezultati). Nastavljamo istraživanje mitohondrijskih receptora autofagije i njihovih interakcijskih partnera kako bismo bolje razumjeli ulogu mitofagije u normalnim fiziološkim ili patološkim uvjetima. Od velike je važnosti odrediti mehanizme koji receptorima mitofagije omogućavaju prepoznavanje upravo onih mitohondrija koje treba razgraditi.

26. 01. 2012.

Dr. sc. Lea Vojta, zn. sur.

Laboratorij za elektronsku mikroskopiju, ZMB, Institut Ruđer Bošković

Biljni galaktolipidi i njihove sintaze

Galaktolipidi čine više od 80% ukupnih membranskih lipida kod viših biljaka te eukariotskih i modrozelenih algi. Monogalaktosyldiacilglicerol (MGDG), glavni strukturalni lipid kloroplasta i ostalih plastida, čini 50% sadržaja galaktolipida. On formira jednoslojne membrane i ujedno je najzastupljeniji lipid u prirodi, a sastavni je dio ovojnica plastida i tilakoidnih membrana. Oko 20% polarnih lipida kod biljaka čini digalaktosyldiacilglicerol (DGDG), galaktolipid koji tvori lipidne dvosloje. Omjer između ova dva galaktolipida važan je za ultrastrukturu kloroplasta, osobito tijekom prilagodbe na stres.

Sinteza galaktolipida odvija se isključivo na ovojnicama kloroplasta, od kuda se oni dalje prenose do tilakoida i ostalih membrana izvan kloroplasta. UDP-galaktosa je hidrofilni donor galaktosne jedinice hidrofobnom receptoru diacilglicerolu (DAG), u reakciji koju katalizira MGDG sintaza, enzim iz heterogene porodice proteina. Unatoč velikoj zastupljenosti galaktolipida MGDG u membranama plastida, MGDG sintaza čini samo 1/1000 membranskih proteina, što njeno pročišćavanje i enzimatske analize čini iznimno zahtjevnima. Lokalizacija MGDG sintaze u ovojnicama kloroplasta još uvijek je nedovoljno istražena i čini se da je različita u 16:3 (uročnjak, krumpir, duhan, uljana repica, špinat) i 18:3 (grašak, krastavac, ječam, kukuruz) biljkama. Pretpostavlja se da je lokalizirana u međumembranskom prostoru kloroplasta, pridružena vanjskoj ili unutarnjoj membrani kloroplasta, a mnoga pitanja vezana uz njenu topologiju ostaju otvorena. To je bio razlog za istraživanje topologije MGDG sintaze i načina unosa proteina atMGD1 u grašak (*Pisum sativum*).

Osim spomenute strukturalne uloge i uključenosti u adaptaciju na stres, galaktolipidi iz povrća predstavljaju nutrijente koji vjerojatno povoljno djeluju na ljudsko zdravlje, a za neke od njih se smatra da mogu spriječiti nastanak raka.

Plant galactolipids and their synthases

Galactolipids represent more than 80% of membrane lipids in higher plants, eukaryotic algae and cyanobacteria. 50% of galactolipid content represents monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), a monolayer forming, major structural lipid of chloroplasts and non-green plastids and the most abundant membrane lipid in nature. It is found in plastid envelopes, as well as in thylakoid membranes. 20% of polar lipids in plants represent digalactosyldiacylglycerol (DGDG), a bilayer forming galactolipid. The ratio between MGDG and DGDG is important for chloroplast ultrastructure, especially during response to stress conditions. Galactolipids are synthesized exclusively at the chloroplast envelopes and from there transported to the thylakoids and extraplastidic membranes. UDP-galactose serves as a water-soluble donor of galactose unit to the hydrophobic receptor diacylglycerol, DAG, in a reaction catalyzed by MGDG synthase. MGDG synthase belongs to a heterogenous family of proteins. Despite the high abundance of MGDG in plastidic membranes, MGDG synthase represents only 1/1000 of membrane proteins, which makes its purification, as well as most of enzymatic analyses, almost impossible. The localization of MGDG synthase activity within envelope membranes is still a matter of controversy and seems to be different in 16:3 (*Arabidopsis*, potato, tobacco, rape, spinach) and 18:3 (pea, cucumber, barley, maize) plants. It has been proposed to be located in the inter membrane space of chloroplasts, associated with both outer or inner chloroplast envelope, and a lot of questions concerning its topology remained unanswered. That was the reason to investigate topology of MGDG synthase in *Pisum sativum* and import properties of *A. thaliana* atMGD1. Beside the mentioned structural roles and involvement in stress regulation, plant galactolipids are potential health promoting compounds in vegetable foods, some even with possible cancer preventive effects.

23. 02. 2012.

Dubravka Špoljarić, dipl. ing.

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju, Zavod za ekologiju voda

**4-hidroksi-2-nonenal u stanicama alga *Chlorella kessleri*
kao bioaktivni indikator onečišćenja i čimbenik prilagodbe na stres**

Oksidativni stres predstavlja stanje prekomjernog stvaranja reaktivnih kisikovih tvari (eng. *reactive oxygen species* - ROS) koje uzrokuju peroksidaciju lipida i stvaranje tzv. sekundarnih glasnika ROS-a, kao što je 4-hidroksi-2-nonenal (HNE). Iako se HNE-u najčešće pripisuju toksični učinci, još nije dovoljno poznato njegovo djelovanje u prijenosu signala i prilagodbi biljnih i algalnih stanica na oksidacijski stres. Rezultati ovog rada ukazuju kako tretmani herbicidima (*S*-metolaklorom i terbutilazinom) i vodikovim peroksidom utječu na rast kulture alga *Chlorella kessleri* Fott et Novákova, stvaranje ROS-a i nastanak HNE-a. Korištenjem monoklonskog protutijela na HNE-histidinske konjugate, po prvi put je otkrivena prisutnost HNE-a u tretiranim stanicama jednostaničnih zelenih alga *C. kessleri*, kao i u netretiranim kulturama. Uz standardne testove toksičnosti, ova metoda može poslužiti za otkrivanje onečišćenja uzrokovanih spojevima koji izazivaju oksidacijski stres te pomoći u rasvjetljavanju uloge reaktivnih aldehida u prilagodbi na stres.

Endogenous 4-hydroxy-2-nonenal in microalga *Chlorella kessleri* acts as a bioactive indicator of pollution and growth regulating factor of hormesis

Oxidative stress, i.e. excessive production of reactive oxygen species (ROS), leads to lipid peroxidation and to formation of reactive aldehydes (e.g. 4-hydroxy-2-nonenal; HNE), which act as second messengers of free radicals. Though many deleterious effects have been attributed to this compound, its role in signaling and adaptation to stress, especially in plants and algae, remains to be fully characterized. The results obtained by this study demonstrate that applied herbicides (*S*-metolachlor and terbuthylazine) and hydrogen peroxide alter the growth of *Chlorella kessleri* Fott et Novákova in culture and generate intracellular ROS production, modifying production of HNE. Using *C. kessleri* as a model, the production of HNE was detected for the first time in the cells of unicellular green algae using the antibody specific for the HNE-histidine adducts revealing the HNE-histidine adducts even in untreated, control algal cells. As an addition to the standard toxicity tests, the evaluation of HNE-protein adducts in *C. kessleri* might indicate environmental pollution with lipid peroxidation-inducing compounds and can be used to further study cellular hormetic adaptation to oxidative stress-derived aldehydes.

22. 03. 2012.

Cristian Meriño Gergichevich

Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

Effects of gypsum addition in the reduction of aluminum toxicity in blueberry cultivars growing in an Andisol

Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) is an important crop in Chile that is principally grown in acid soils (pH \leq 5.5) as Andisol. However, it is sensitive to toxic aluminum (Al³⁺), which is liberated under acid conditions. Gypsum addition is an effective agronomical practice to

ameliorate its toxicity, without alters soil pH. In order to know effect of gypsum on chemical (nutrient content), physiological (growth, water relation, and photochemical performance) and biochemical features such as lipid peroxidation, radical scavenging activity, and antioxidant compounds in this species under aluminum toxicity were studied in two separated experiments. In first experiment, one year old plants of two cultivars, Legacy (Al tolerant) and Bluegold (Al sensitive), grown 15 days in nutrient solution (pH 4.5) were subjected to 100 and 200 μ M Al and ameliorated with 2.5, 5 and 10mM of gypsum. In the second, blueberry plants grown (60 days) in an Al saturated Andisol (~70%), were amended with gypsum at rate of 0, 1000, 2000, and 4000 kg ha⁻¹. In both experiments, gypsum improved nutrient balance and Ca/Al molar ratio in leaves and roots, as well as photochemical parameters, carotenoids contents, and relative water content especially in Legacy. However, gypsum did not show clear effects on chlorophyll contents and leaf water potential. This amendment decreased lipid peroxidation and flavonoids in both cultivars, whereas radical scavenging activity, phenol, anthocyanins, and antioxidant enzymes were significantly increased. Gypsum can be an effective amendment to ameliorate Al³⁺ on blueberry, mainly in Al tolerance cultivars. Nonetheless, higher doses could be required to prevent harmful effect of Al³⁺ on Al sensitive cultivars grown in this soil types.

3. 04. 2012.

Prof. dr. Bernd Zechmann

University of Graz, Institute of Plant Sciences, Schubertstrasse 51, 8010 Graz, Austria

Compartment specific protection of ascorbate and glutathione during abiotic stress

Ascorbate and glutathione are important antioxidants and involved in the detoxification of reactive oxygen species, which are commonly formed during environmental stress situations. Changes in ascorbate and glutathione contents are therefore commonly used as stress markers in many fields of plant sciences. Inter- and intracellular ascorbate and glutathione contents and their ratio between certain cell compartments are important measurements of the plants ability to sense and fight oxidative stress and can give key information about the physiological condition of the plant.

Here a method will be presented that allows the quantification of ascorbate and glutathione in all cell compartments simultaneously at a high level of resolution. This method is based on immunogold cytochemistry with anti-ascorbate and anti-glutathione antisera and computer-supported transmission electron microscopy. By applying this method on different *Arabidopsis* mutants during environmental stress situations such as cadmium, light stress and high internal levels of reactive oxygen species it was possible to gain thorough knowledge about the subcellular distribution of ascorbate and glutathione in plants and on the importance of these antioxidants in certain cell compartments during abiotic stress.

12. 07. 2012.

Prof. dr. sc. Hrvoje Fulgosi

Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković

Energetska Bonanza - fotosintetski mikroorganizmi kao proizvođači plina vodika

Pored fotonaponske tehnologije i tehnologije vjetroelektrana posljednjih se desetljeća intenzivno istražuje i plin vodik kao alternativni izvor energije. Sadašnji sustavi za dobivanje vodika zasnivaju se na elektrolizi vode ili na reformaciji prirodnog plina. Glavni nedostatak

ovih tehnologija je niska učinkovitost, jer za dobivanje vodika treba utrošiti znatno više energije nego što je možemo dobiti iz stvorenog plina. Zbog toga se intenzivno istražuju i biološki sustavi koji uz pomoć fotosintetskih bakterija ili algi proizvode tzv. biovodik. Ovi organizmi posjeduju enzim hidrogenazu, koja u određenim uvjetima proizvodi energiju potrebnu za njihov život, a kao sporedni produkt stvara se plin vodik. Za dobivanje vodika tako nije potrebno ništa više od hranjivog medija za uzgoj mikroorganizama i sunčeve svjetlosti za fotosintezu. No metabolizam zasnovan na hidrogenazi mikroorganizmi pokreću samo u nepovoljnim uvjetima, npr. u uvjetima stresa ili pomanjkanja nekog nutrijenta. Nadalje, aktivnost nekih hidrogenaza može se lako inhibirati kisikom, koji je sporedni produkt fotosinteze. Stoga se proizvodnja vodika u ovim sustavima može provoditi samo kratko vrijeme jer mikroorganizmi ne mogu dugo podnositi nepovoljne uvjete, ili oksigena fotosinteza brzo inhibira ovaj proces. Kao jedan od stresora u posljednje se vrijeme istražuje deprivacija esencijalnog elementa sumpora. U nedostatku sumpora i u anaerobnim uvjetima mikroorganizmi kratko vrijeme proizvode vodik. Danas se metodama genetičkog inženjerstva pokušava modificirati i hidrogenaze kako bi bile otpornije na prisustvo kisika, ili se u ciljani mikroorganizam unosi gen za hidrogenazu iz nekog drugog organizma.

U našim smo istraživanjima uporabom tehnika metaboličkog inženjeringa razvili soj cijanobakterija *Synechocystis* koje mogu podnijeti deprivaciju sumpora kroz razdoblje od 14 dana. Također smo razvili i sustav za simultano praćenje koncentracije kisika proizvedenog fotosintezom i vodika proizvedenog aktivnošću hidrogenaza.

12. listopada 2012.

Dr. sc. Andrija Finka

Department of Plant Molecular Biology, Biology building, Uni Lausanne, Switzerland

Kako biljke znaju da im je vruće?

Obično u zoru pred nadolazeći vrući ljetni dan, kopnene biljke trebaju precizne molekularne toplomjere kojima mogu osjetiti bezopasna povećanja u temperaturi okoliša. Cilj je izazvati pravovremenu reakciju na nadolazeći toplinski šok, aktivirati mehanizme i akumulirati proteine koji moraju zaštititi biljku od toplinskog šoka sredinom dana.

Kalcijevi kanali aktivirani cikličkim nukleotidima (cyclic nucleotide gated channels; CNGC) koji se nalaze u staničnoj membrani igraju ključnu ulogu primarnog senzora za toplinu kod stanica kopnenih biljaka.

Mutacije u podjedinicama kalcijevih kanala, primjerice CNGCb u mahovinama i CNGC2 u *Arabidopsisu*, izazivaju hiper-osjetljivi toplotni fenotip koji je karakteriziran preuranjenim odgovorom na povećanje temperature (heat shock response; HSR) čime biljka stječe prijevremenu otpornost na toplinski šok.

U transgeničnim mahovinama koje eksprimiraju aequorine, proteinski senzor kalcijevih iona (Ca^{2+}), nedostatak CNGCb urokuje povećani unos Ca^{2+} u citoplazmu i promijenu signalnih puteva koji ovise o njemu. Elektrofiziološka mjerenja na protoplastima mahovina pokazali su prisutnost tri različita termo-osjetljiva Ca^{2+} kanala u divljem tipu, dok je gubitak CNGCb doveo do ukupnog nedostatka jednog i povećao „otvorenu vjerojatnost“ postojanja za preostala dva termo-osjetljiva Ca^{2+} kanala. Stoga, CNGC2 i CNGCb najvjerojatnije čine heterotetramerni Ca^{2+} kanal s drugim srodnim CNGC (slično kao u ljudskim stanicama) koji su u stanju pravovremeno regulirati unos Ca^{2+} iona prilikom povećanja temperature, a samim time i aktivirati signalne puteve koje proizvode proteine odgovorne za zaštitu i otpornost od toplinskog šoka.

Mechanism of plant heat sensing

Typically at dawn on a hot summer day, land plants need precise molecular thermometers to sense harmless increments in the ambient temperature to induce a timely heat shock response (HSR) and accumulate protective heat shock proteins in anticipation of harmful temperatures at mid-day (Mittler et al., 2012). The onset of plant thermotolerance requires the early perception of an upcoming heat stress by timely responding and accumulation of heat shock proteins (Hsps), many of which being molecular chaperones that can protect proteins and membranes from heat-damage (Finka et al., 2011). A strong biochemical evidence for the existence of highly specific Ca^{2+} channels in the plasma membrane of the moss *Physcomitrella patens*, which act as the most upstream heat-sensors of the plant cell has been shown (Saidi et al., 2009). We have found that the cyclic nucleotide gated calcium channel (CNGC) *CNGCb* gene from *Physcomitrella patens* and its *Arabidopsis thaliana* ortholog *CNGC2*, encode a component of cyclic nucleotide gated Ca^{2+} channels that act as the primary thermosensors of land plant cells (Finka et al., 2012). Disruption of *CNGCb* or *CNGC2* produced a hyper-thermosensitive phenotype, giving rise to an HSR and acquired thermotolerance at significantly milder heat-priming treatments than in wild-type plants. In an aequorin-expressing moss, *CNGCb* loss-of-function caused a hyper-thermoreponsive Ca^{2+} influx and altered Ca^{2+} signaling. Patch clamp recordings on moss protoplasts showed the presence of three distinct thermoresponsive Ca^{2+} channels in wild-type cells. Deletion of *CNGCb* led to a total absence of one and increased the open probability of the remaining two thermoresponsive Ca^{2+} channels. Thus, *CNGC2* and *CNGCb* are expected to form heteromeric Ca^{2+} channels with other related CNGCs. These channels in the plasma membrane respond to increments in the ambient temperature by triggering an optimal HSR, leading to the onset of plant acquired thermotolerance. This may prove useful to produce crops with improved survival and yield under high heat conditions. For example, examination of Ca^{2+} flux may allow the selection of heat resistant varieties. Moreover, identification of the key players may allow targeting of the HSR to particularly important or sensitive tissues, such as reproductive structures.