

Utjecaj virusa žutog mozaika postrne repe na sintezu polifenola u inficiranim biljkama

Kuzman, Željka

Master's thesis / Diplomski rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:143831>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Željka Kuzman

UTJECAJ VIRUSA ŽUTOG MOZAIKA POSTRNE REPE
NA SINTEZU POLIFENOLA U INFICIRANIM BILJKAMA

Diplomski rad

Zagreb, 2009.

Ovaj rad izrađen je u Botaničkom zavodu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Gordane Rusak, te predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja prof. biologije i kemije.

Ovim putem zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Gordani Rusak na iskazanom strpljenju i pomoći.

Hvala svim djelatnicima Botaničkog zavoda na ljubaznosti i susretljivosti.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima na dugogodišnjoj podršci i povjerenju, te Romanu i Giti što su bili uz mene.

Hvala mojim prijateljicama Lidiji Šakani na pruženoj neobičnoj pomoći i Marijani Juren na korisnim fotografijama.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj virusa žutog mozaika postrne repe na sintezu polifenola u inficiranim biljkama

Željka Kuzman

Botanički zavod
Marulićev trg 9A, Zagreb

Virusne infekcije mogu potaknuti sintezu polifenolnih spojeva u biljkama. U ovom radu istražen je utjecaj virusa žutog mozaika postrne repe na sintezu ukupnih polifenola, treslovina i ukupnih flavonoida u inficiranim biljkama vrste *Brassica rapa* L. i *Brassica pekinensis* Rupr. Ispitivani spojevi pokazuju brojne biološke i inke me u kojima je i protuvirusna aktivnost. Fenolni spojevi sudjeluju u induciranim obrambenim odgovorima biljaka. U ovom radu dokazana je korelacija između u razvoju virusne infekcije i sinteze polifenolnih spojeva koja se očituje povećanjem sadržaja ispitivanih spojeva u inficiranim biljkama u odnosu na zdrave, neinficirane biljke u vrijeme potpuno razvijene infekcije.

(52 stranice, 15 slika, 8 tablica, 45 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u : Nacionalna i sveučilišna biblioteka, Zagreb

Glavne riječi: TYMV/ polifenoli / treslovine / flavonoidi

Mentor: Prof.dr.sc. Gordana Rusak

Ocjenjivači: Prof.dr.sc. Mirjana Kalafati
Prof.dr.sc. Zora Popović
Doc.dr.sc. Draginja Mrvoš-Sermek

Rad prihvaćen: 3.lipnja 2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Effect of Turnip Yellow mosaic virus on polyphenol synthesis in infected plants

Željka Kuzman

Department of Botany
Maruli ev trg 9A, Zagreb

Viral infections can result in increased synthesis of polyphenolic compounds in infected plants. This paper investigates the effect of turnip yellow mosaic virus infection on total phenol, tannins and total flavonoids synthesis in infected species *Brassica rapa* L. and *Brassica pekinensis* Rupr. Those compounds show many biological effects including antiviral activity. Phenolic compounds participate in induced defence response in plants. This research showed correlation between development of viral infection and polyphenol synthesis that manifests in increased concentration of studied compounds in infected plants in relation to healthy, uninfected plants in a stage of fully developed infection.

(52 pages, 15 figures, 8 tables, 45 references, original in: croatian)

Thesis deposited in: National and University Library, Zagreb

Key words: TYMV / polyphenols / tannins / flavonoids

Supervisor: Gordana Rusak, PhD, Professor

Reviewers: Mirjana Kalafati , PhD, Professor

Zora Popović , PhD, Professor

Draginja Mrvoš-Sermek, Associated Professor

Thesis accepted: 3rd June 2009.

SADRŽAJ:

1.UVOD

1. 1. Obrazloženje teme.....	2
1. 2. Teorijski dio.....	4
1.2.1. Treslovine.....	4
1.2.1.1. Op enito o treslovinama i njihovoj ulozi u biljkama.....	4
1.2.1.2. Kemijska struktura treslovina.....	5
1.2.1.3. Biološki u inci treslovina.....	7
1.2.2. Flavonoidi	10
1.2.2.1. Op enito o flavonoidima i njihovoj ulozi u biljkama.....	10
1.2.2.2. Kemijska struktura flavonoida.....	11
1.2.2.3. Biološki u inci flavonoida.....	14
1. 3. Cilj istraživanja.....	17

2. MATERIJALI I METODE

2. 1. Materijal.....	19
2.1.1. Biljni materijal.....	19
2.1.2. Biološke zna ajke virusa žutog mozaika postrne repe.....	19
2. 2. Metode.....	24
2.2.1. Mehani ka inokulacija virusa.....	24
2.2.2. Kvantitativno odre ivanje sadržaja treslovina primjenom kazeina.....	25
2.2.3. Kvantitativno odre ivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	26

3.REZULTATI

3.1. Kvantitativno odre ivanje sadržaja treslovina.....	28
3.2. Kvantitativno odre ivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	38

4.RASPRAVA.....

42

5.ZAKLJU AK.....

45

6.LITERATURA.....

47

1. UVOD

1.1. OBRAZLOŽENJE TEME

Više biljke štite se od napada mikroorganizama stvaranjem velikog broja sekundarnih metabolita. Sekundarni metaboliti, za razliku od primarnih, nemaju direktnu ulogu u osnovnim metaboli kim procesima izgradnje i održavanja biljnih stanica, te o njima naoko ne ovisi preživljavanje organizma koji ih proizvodi. Uloga sekundarnih metabolita oituje se u interakciji biljne vrste s okolišem. Zaslužni su za odgovor biljaka na razne oblike stresa kao što su promjene intenziteta svjetlosti ili temperature, napad biljojeda i raznih patogena kao i zaštitu od ultraljubi astog zra enja.

Sekundarne metabolite generalno grupiramo prema kemijskoj strukturi i na inu biosinteze na terpene, alkaloidne, fenole i poliamine (Berhow i Vaughn, 1999). Treslovine i flavonoidi spadaju u skupinu biljnih fenola. Široko su rasprostranjeni u biljnom svijetu, a biološka uloga im je raznolika. Utje u na brojne fiziološke i biokemijske procese u biljkama, a djeluju i na ljudski organizam s obzirom da su sastojci svakodnevne ljudske prehrane. Uz mnoga druga djelovanja ovi spojevi pokazuju i protuvirusna svojstva. Dokazano je protuvirusno djelovanje treslovina i flavonoida na herpes simplex virus (HSV) (Takechi i sur., 1985; Serkedjieva i Ivancheva, 1998; Nijveldt i sur., 2001) i poliovirus (Kucera i Hermann, 1967; Konovalchuk i Spears, 1976; Hayashi i sur., 1997). Treslovine inhibiraju reoviruse, virus gripe (Konovalchuk i Spears, 1976; Kucera i Hermann, 1967; Green, 1948), dok je inhibitorni u inak flavonoida dokazan na respiratorni sincicijalni virus, parainfluenca virus i adenovirus (Nijveldt i sur., 2001). U novije vrijeme posebna je pažnja posve ena istraživanju djelovanja treslovina i flavonoida na virus humane imunodeficijencije (HIV).

S druge se strane vrlo mali broj radova odnosi na djelovanje ovih spojeva na biljne viruse (Van Schreven, 1941; Bawden i Kleczkowski, 1945; Tresh, 1956;

Werma, 1973; French i sur., 1991; French i Towers, 1992; Malhotra i sur., 1996; Rusak i sur., 1997). Istraživani spojevi pokazuju raznolika farmakološka djelovanja, no ve ina tih radova odnosi se na djelovanje prou avanih spojeva u uvjetima *in vitro*.

U ovom diplomskom radu pokusne biljke inficirane su virusom žutog mozaika postrne repe, te su pra ene promjene u koncentraciji treslovina i flavonoida ovisno o razvoju virusne infekcije.

1.2. TEORIJSKI DIO

1.2.1. Treslovine

1.2.1.1. Općenito o treslovinama i njihovoj ulozi u biljkama

Treslovine ili tanini su polifenolni spojevi topivi u vodi koji su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu. Prisutni su u golosjemenjačama i kritosjemenjačama, a kod potonjih su česti u drvenastim tkivima (Harborn, 1973). Zamjetne količine treslovina prisutne su u biljkama koje se koriste u svakodnevnoj prehrani. Sastavni su dio mnogih plodova voća kao što su jabuke, banane, kupine, jagode, grožđe, kruške; mahunarke (grašak, ječam, proso); nalazimo ih u čaju, vinima i u stožnoj hrani (djetelina, grahorica) (Chung i sur., 1998). Biljni dijelovi bogati treslovinama su kora, listovi, plodovi, stabljika i korijen. Često se povećana proizvodnja tanina u biljci povezuje sa određenim patološkim stanjima (Haslam, 2007). Najpoznatiji primjer su šiške hrasta, koje predstavljaju patološke promjene na listovima uzrokovane ubodom ose najeznice i odlaganjem jajašaca, a sadrže zamjetnu količinu tanina.

Treslovine talože proteine pri čemu nastaju stabilni ko-polimeri netopivi u vodi (Harborn, 1973). Sposobnost treslovina da štave kožu čine ih gipkom i vrstom temelji se na tom svojstvu. Adstringentno djelovanje treslovina uočava se i prilikom konzumacije vina ili nezrelog voća kao specifičan oštar, stežući okus. To je i razlog što većina biljojeda izbjegava biljna tkiva bogata treslovinama stoga treslovine štite biljku od biljojeda. Treslovine grade komplekse kako sa proteinima tako i sa drugim različitim kosupstratima kao što su polisaharidi, alkaloidi, antocijani, itd. (Katalinić, 1997).

Pripisuje im se izrazito protunutritivno djelovanje jer stvaranjem kompleksa sa proteinima, škrobom te probavnim enzimima smanjuju nutritivnu vrijednost hrane (Chung i sur., 1998). U biljkama djeluju i kao antioksidansi, te kao zaštita od patogena i biljojeda.

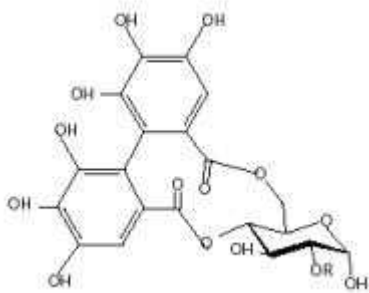
1.2.1.2. Kemijska struktura treslovina

Prema kemijskom sastavu treslovine su derivati fenola i fenilkarboksilnih kiselina. Mogu se podijeliti u dvije skupine:

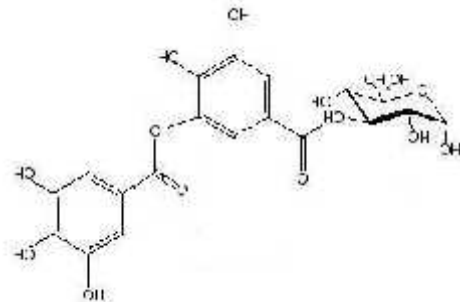
1. Treslovine koje hidroliziraju
2. Treslovine koje ne hidroliziraju (kondenzirane treslovine)

Treslovine koje hidroliziraju

Centralnu jezgru ove skupine treslovina čini najčešće D-glukoza čije su hidroksilne skupine djelomično ili u potpunosti esterificirane galnom kiselinom (galotanini) ili heksahidroksidifenilnom kiselinom (elagitanini), (slika 1).



Slika 1. Elagitanin



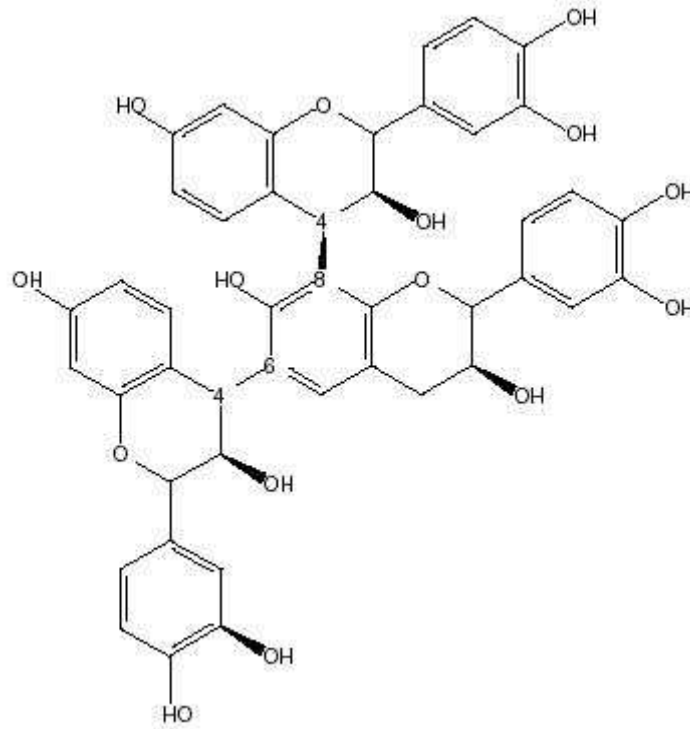
Galotanin

Treslovine koje ne hidroliziraju (kondenzirane treslovine)

Kondenzirane treslovine su strukturno kompleksnije od treslovina koje hidroliziraju. Uglavnom su polimerni produkti flavan-3-ola (katehina) i flavan-3,4-diola, a nazivaju se i proantocijanidinima. Naziv proantocijanidini izveden je na temelju njihova svojstva da nakon reakcije s jakim kiselinama daju odgovarajuće antocijanidine (Haslam, 2007). Antocijanidini su aglikoni antocijana, jedne od skupine flavonoida.

Kondenzirani proantocijanidini javljaju se kao oligomeri (topivi u vodi) koji se sastoje od 2-10 katehinskih jedinica, te kao polimeri (netopivi u vodi).

Katehinske jedinice najčešće su vezane preko položaja C-4 i C-8 (Haslam, 2007), kao što je prikazano na slici 2.



Slika 2. Kondenzirani tanini su polimeri katehinskih jedinica

1.2.1.3. Biološki uinci treslovina

Treslovine kao sastavni dio mnogih plodova voća, mahunarki, ajeva, vina i sto ne hrane dio su i svakodnevne ljudske prehrane. Zbog svoje sposobnosti stvaranja kompleksa sa proteinima i probavnim enzimima kao i djelovanja na iskoristivost vitamina i minerala smanjuju nutritivnu vrijednost hrane, te se smatraju nutritivno nepoželjnima (Chung i sur., 1998). Treslovine utječu na smanjenje priljeva hrane, smanjenje stope rasta, iskoristivost hrane i probavljivost proteina kod pokusnih životinja. Djeluju i kao inhibitori probavnih enzima (Chung i sur., 1998). Većina istraživanja dokazuje ovaj učinak u uvjetima *in vitro*, dok u uvjetima *in vivo* za to ima malo dokaza. Treslovine smanjuju dostupnost željeza i vitamina B12. U svjetlu navedenih činjenica nije preporučljivo konzumiranje hrane bogate treslovinama u većim količinama.

Istraživanja provedena na miševima i štakorima ukazuju na mutagenu i kancerogenu aktivnost treslovina (Stolz, 1982). Betelov (areka) orah koji sadrži 11-26% treslovina povezuje se s pojavom karcinoma obraza i jednjaka na Dalekom Istoku gdje je uvriježen običaj žvakanja tih oraha (Ranadive i sur., 1979). Biljni ajevi također sadrže zamjetnu količinu treslovina. Kinlein i sur. (1988.) opisuju pozitivan odnos između učestale konzumacije aja i pojave karcinoma želuca, pluća i bubrega. S druge strane čini se da utjecaj okoline, zanimanje, pušačke navike, konzumacija alkohola i lijekova, te slaba ishrana imaju više utjecaja na pojavu karcinoma nego sama prehrana. Izgleda da povezanost konzumacije betelovih oraha i biljnih ajeva sa pojavom karcinoma nije nužno u svezi sa samim treslovinama već možda sa nekim drugim molekulama vezanim za treslovine (Chung i sur., 1998).

Zanimljivo je da postoje i suprotne teze koje ukazuju na antikancerogenu aktivnost treslovina. Dobro je istražen inhibički učinak zelenog aja na tvorbu karcinoma. Novijim istraživanjima ustanovljeno je da katehini (flavan-3-oli) u

listovima čajevca (*Camellia sinensis*) i do 30% suhe tvari, te su dominantni fenolni spojevi. Najprisutniji je (-)-epigalokatehin galat. Do 4% suhe tvari i flavonoli, i to kvercetin i kempferol u glikoziliranom obliku, dok su flavoni prisutni u tragovima. Galna kiselina, kumarinska i kafeinska kiselina također su prisutne u listovima čajevca, kao i alkaloidi teobromin i kafein. Dokazano je, također, da istraživani ekstrakti zelenog čaja imaju značajna antioksidativna svojstva i da reduciraju katione slobodnih radikala (Rusak i sur., 2007.).

Smatra se da treslovine smanjuju i mutagenu aktivnost brojnih mutagena (Chung i sur., 1998). Antikancerogena i antimutagena aktivnost treslovina dovodi se u vezu sa njihovim antioksidativnim svojstvima. Istraživanja antikancerogenog djelovanja treslovina pokazuju dvojake rezultate. U određenom koncentracijskom rasponu treslovine pokazuju antikancerogenu aktivnost, dok u koncentracijama izvan tog raspona djeluju kao promotori tumorskih aktivnosti (Chung i sur., 1998).

Treslovine pokazuju i antialergijske učinke, a djeluju i na srce i krvožilni sustav u vidu smanjenja krvnog tlaka te ubrzanja zgrušavanja krvi (Chung i sur., 1998).

Treslovine pokazuju i antimikrobna svojstva. Djeluju inhibirajući rast mnogih gljivica, bakterija i virusa. Dokazano je da treslovine inaktiviraju herpes simplex virus (Takechi i sur., 1985; Fukuchi i sur., 1989.), reoviruse, polioviruse, ECHO viruse (Enteric-cytopathogenic-human-orphan virus; Kucera i Hermann 1967; Konovalchuk i Spears, 1976) i virus gripe (Carson i Frisch, 1953). Od pojave virusa ljudske imunodeficijencije (HIV) istražuje se učinak treslovina na taj virus (Nonaka i sur., 1990). Mali broj radova odnosi se na djelovanje treslovina na biljne viruse, gdje je dokazana njihova uloga u inaktivaciji virusa mozaika duhana (Bawden i Kleczkowski 1945; Van Schreven 1941;). Tresh (1956.) je dokazao da ekstrakti dobiveni iz jagode i kupine koji sadrže tanine, kao i taninska kiselina, imaju protuvirusni učinak na virus nekroze duhana i virus mozaika duhana. Infektivnost ekstrakta listova duhana inficiranih virusom

mozaika duhana uvelike je smanjena kada je ekstrakt dobiven iz inficiranih listova koji su namakani u vodi zajedno s listovima kupine. Smatra se da je smanjena infektivnost ovih virusnih estica povezana s taloženjem samih estica virusa pri čemu virusi i treslovine stvaraju neinfektivne komplekse.

1.2.2. Flavonoidi

1.2.2.1. Općenito o flavonoidima i njihovoj ulozi u biljkama

Flavonoidi su grupa od oko 4000 prirodnih spojeva sveprisutnih u biljaka. Široko su rasprostranjeni u golosjemenjaka i kritosjemenjaka, rjeđe kod mahovina i papratnjaka, a prisutni su i kod nekih algi (*Charophyceae*) i gljiva (*Aspergillus*). Uglavnom ih nalazimo u nadzemnim dijelovima biljke dok ih u korijenu i u podanku najčešće nema. Porodice *Fabaceae* i *Asteraceae* posebno su bogate flavonoidima (Rusak, 1991).

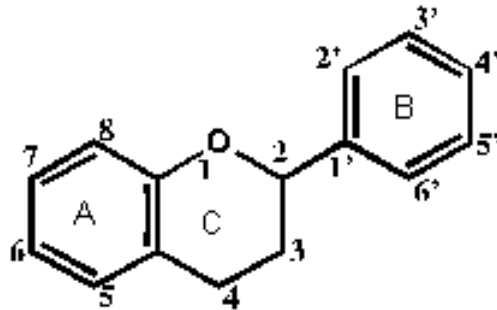
Biološka uloga flavonoida u biljkama je raznolika. Najpoznatija i najbolje istražena je uloga ovih spojeva kao biljnih pigmenata. Ovdje se posebno ističu antocijani odgovorni za modru, grimiznocrvenu i ljubičastu boju mnogih cvjetova i plodova koje privlače biljne oprašivače (Denffer i Ziegler, 1991). Žutoj boji cvjetova doprinose i antoksantini. Flavonoli također pridonose boji cvjetova i plodova. Mada je većina flavonoida obojena, među njima ima i bezbojnih.

Važna je i uloga flavonoida u normalnom rastu, razvoju i obrani biljaka. Flavonoidi štite biljku od štetnog UV zračenja, djeluju kao antioksidansi, inhibitori i regulatori brojnih enzima, keliraju i agensi metalnih iona, prekursori toksičnih spojeva. Sudjeluju u procesima fotosinteze i morfogeneze, te služe biljkama kao zaštita od patogena i biljojeda (Di Carlo i sur., 1999).

Flavonoidi su u biljnom svijetu prisutni preko jedne milijarde godina (Di Carlo i sur., 1999). Nazočnost flavonoida u biljkama kroz tako dugo evolucijsko razdoblje upućuje na njihovu važnu ulogu u opstanku biljaka. Flavonoidi imaju veliki značaj i u kemotaksonomiji budući da se na temelju sastava flavonoida može govoriti o srodstvenim odnosima među pojedinim biljkama

1.2.2.2. Kemijska struktura flavonoida

Flavonoidi su polifenolni spojevi čiji osnovni skelet čini 2-fenilbenzo[*b*]piran ili flavanski kostur koji čine dva benzenska prstena (A i B) međusobno povezana heterocikličkim prstenom C (slika 3., Cushine i Lamb, 2005)



Slika 3. Osnovni skelet flavonoida

Raznolikosti flavonoidnih spojeva uvjetovana je prisutnošću različitih supstituenata na benzenskim prstenovima, stupnjem oksidacije heterocikličkog prstena C te položajem vezanja benzenskog prstena B na prsten C. Tako razlikujemo izoflavone, flavone, flavonole, flavanonole, flavanone, antocijanidine i flavanole (katehine).

Kod većine flavonoida prsten B vezan je na C-2 položaju heterocikličkog prstena dok je kod izoflavonoida vezan na položaju C-3 (Di Carlo i sur., 1999.), što se vidi na slici 4.

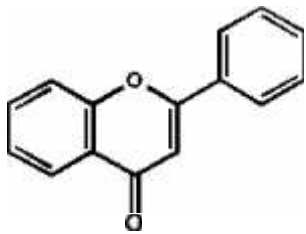
Na osnovni flavonoidni skelet mogu biti vezane hidroksilne, kisikove i metilne skupine i one su podložne kemijskim reakcijama glikozilacije, metilacije, hidrogenacije i sulfatacije. Flavonoidi koji imaju za sebe vezanu jednu ili više šeernih komponenti nazivaju se glikoziliranim flavonoidima. Dakle, glikozilirani flavonoidi sastoje se od neše erne komponente ili aglikona na koji je vezana šeerna komponenta ili glikon. Veza sa šeerom naj eše se ostvaruje preko kisikova atoma hidroksilne skupine (O-glikozidi), no mogu eše i vezanje šeera preko ugljikova atoma (C-glikozidi). Glukoza je najprisutnija kao šeerna komponenta, ali javljaju se i arabinoza, galaktoza, glukoramnoza i ksiloza (Kuhnau, 1976).

Flavonoidni spojevi imaju različite tendencije ka stvaranju glikozida. U biljkama se uglavnom pojavljuju u glikoziliranom obliku - napose antocijani koji u pravilu nikada ne dolaze kao slobodni aglikoni (antocijanidini), dok se katehini, s druge strane, javljaju isključivo u obliku aglikona. Flavoni i flavonoli prisutni su i u aglikonskoj formi i u glikozidnom obliku. Naj eše se javljaju kao O-glikozidi pri emu se šeer naj eše veže na položaju 3 prstena C (Rusak, 1991).

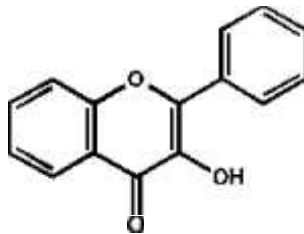
Brojna istraživanja upućuju na zaključak da ve male razlike u kemijskoj strukturi flavonoida doprinose bitnoj razlici u njihovim biološkim učincima. Tako su provedena istraživanja antioksidativnih svojstava, kao i utjecaja na proliferaciju i ciklus HL-60 stanica (human acute leukemia cells) nekih strukturno srodnih flavonoida (kvercetin, miricetin, kempferol, izoramnetin, metilkvercetagetin i taksifolin). Kvercetin, miricetin, kempferol i izoramnetin pokazali su se djelotvornima u inhibiciji umnožavanja HL-60 stanica, za razliku od metilkvercetagetina i taksifolina, što upućuje na činjenicu da je za citostatsko djelovanje flavonoida važno prisustvo C2-C3 dvostruke veze i 6-hidroksilne skupine. Nasuprot tome, prisustvo 6-hidroksilne skupine pokazalo se kao nepovoljno strukturalno svojstvo za antioksidativnu učinkovitost flavonoida. Naj snažnije antioksidativne učinke među istraživanim flavonoidima pokazao je

miricetin pri emu je dokazano da ta sposobnost flavonoida ovisi o broju hidroksilnih skupina vezanih na prstenu B, kojih miricetin ima tri. (Rusak i sur., 2005.)

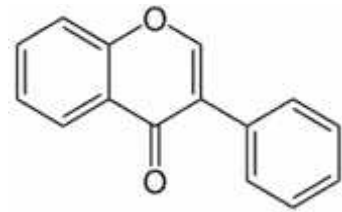
Slika 4. Osnovne kemijske strukture nekih skupina flavonoida



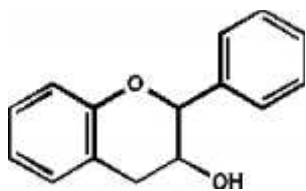
flavon



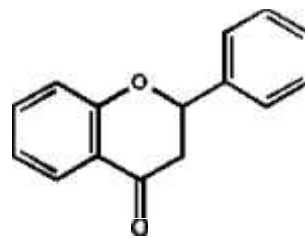
flavonol



izoflavon



flavanol (katehin)



flavanon

1.2.2.3. Biološki učinci flavonoida

Flavonoidni spojevi predstavljaju važan imbenik u svakodnevnoj ljudskoj prehrani. Nalazimo ih u voću (u citrusima čine i do 1% svježeg materijala) i povrću, a prisutni su i u crvenom vinu, čaju, kavi, propolisu i medu, te se pretpostavlja da čovjek u svoj organizam dnevno unese oko jedan gram flavonoida (Kuhnau, 1976). Razumljivo je, stoga, da će ti spojevi imati određeni učinak na organizam. Djelovanje flavonoida na krvni sustav zabilježeno je još 1936. godine kada je dokazan antihemoragični učinak spoja citrina izoliranog iz limunovog soka (Kuhnau, 1976). Flavonoidi su također i u ljekovitim biljkama koje se u narodnoj medicini koriste diljem svijeta i sve su više u središtu interesa medicinskih istraživanja.

Do danas je dokazan širok spektar djelovanja flavonoida na ljudski organizam koje se može razvrstati u nekoliko osnovnih pravaca:

- Djelovanje na srce i krvni sustav očituje se u poboljšanju periferne prokrvljenosti, sniženju krvnog tlaka, te sniženju razine serumskog kolesterola.
- Djelovanje na druge unutarnje organe - pokazuju antihepatotoksični, antiulcerozni i antinefrotoksični učinak (Kuhnau, 1976).
- Utjecaj na razna patofiziološka stanja očituje se u vidu antialergijskog, antiastmatičkog, antiinflamatornog i antiosteoporotičnog djelovanja (Kuhnau, 1976).
- Djelovanje na razini stanica usmjereno je na zaštitu stanica od štetnosti zračenja i mutagena kao i na sprečavanje djelovanja kancerogenih tvari (Kuhnau, 1976).

Flavonoidi pokazuju i antimikrobni učinak. Dokazana su bakteriostatska, fungistatska i virostatska svojstva flavonoida. Flavonoidi, odnosno openito

tvari koje biljka sintetizira kao obrambeni odgovor na kontakt s odre enim patogenom nazivaju se fitoaleksini (Berhow i Vaughn, 1999).

Protuvirusni u inci flavonoida istraživani su prvenstveno na virusima potogenim za ovjeka. Dokazani su protuvirusni u inci flavonoida na herpes simplex virus (HSV), respiratorni sincicijalni virus, parainfluenca virus i adenovirus (Nijveldt i sur.,2001). Posebna pažnja posve ena je istraživanju djelovanja nekih flavonoida na virus ljudske imunodeficijencije (HIV). Velik broj studija odnosi se na inhibiraju i u inak flavonoida na aktivnost reverzne transkriptaze nekih retrovirusa (Spedding i sur.1989; Ono i sur.1990; Baylor i sur. 1992).

Podru je bioloških u inaka flavonoida na biljne viruse gotovo je potpuno neistraženo. Prou avan je inhibitorni u inak flavonoida na razvoj infekcije kod biljaka inficiranih X virusom krumpira i virusom mozaika duhana (Verma 1973; French i sur. 1991; French i Towers 1992), virusom prstenaste pjegavosti raj ice (Malhotra i sur., 1996) i virusom grmolike kržljivosti raj ice (Rusak i sur., 1997). Kvercetin, jedan od najraširenijih flavonoida u biljnom carstvu, inhibira X virus krumpira (PVX), (Verma, 1973.). French i Towers (1992) taj inhibitorni u inak kvercetina na PVX kod doma ina *Chenopodium quinoa* objašnjavaju kao posljedicu interferencije kvercetina u interakciji virusnog proteinskog omota a i stanice doma ina do koje dolazi u ranom stadiju infekcije. Protuvirusno djelovanje kvercetina na virus prstenaste pjegavosti raj ice kod istog doma ina objašnjeno je sli nim modelom interferencije (Malhotra i sur.,1996.). U inhibiciji razvoja infekcije izazvane virusom mozaika duhana (TMV) kod doma ina *Nicotiana glutinosa* kvercetin se pokazao neu inkovitim, pa autori (French i sur., 1991) zaklju uju da je za inhibiciju TMV-a nužna metilacija flavona na položaju 3' i na položaju 4' ili 7'. Ispitivanjem protuvirusnog djelovanja pet razli itih flavonoida (kvercetin, miricetin, apigenin, naringenin i viteksin) naspram TMV-a na lokalnim doma inima (*Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium murale* L., *Datura*

stramonium L.) utvrđeno je da viteksin reducira broj lokalnih lezija na listovima doma i na *Chenopodium amaranticolor* inficiranih virusom mozaika duhana, a kvercetin na listovima doma i na *Datura stramonium* L. inficiranih istim virusom. Lokalne lezije na listovima doma i na *Chenopodium amaranticolor*, ali nešto manje u inkovito, reducirane su i aplikacijom naringenina, dok se apigenin i miricetin nisu pokazali u inkovitima. Protuvirusni učinak u slučaju kvercetin / *Datura stramonium* L. sugerira da je djelotvornost virusne inhibicije ovisna o načinu aplikacije flavonoida kao i o sistemu flavonoid - virus – doma i in (Krcatovići i sur., 2008.)

1.3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Napadi patogenih mikroorganizama na više biljke induciraju aktivaciju različitih obrambenih mehanizama u biljci. Ti su se obrambeni mehanizmi biljaka tijekom evolucije usavršavali. U neke od tih mehanizama uključeni su sekundarni metaboliti od kojih mnogi u uvjetima *in vitro* pokazuju protumikrobne učinke.

Nakon zaraze patogenom jedan od oblika induciranog odgovora biljke je i sinteza toksičnih protumikrobnih biljnih spojeva, fitoaleksina, od kojih veliki broj pripada skupini fenola. Poznati obrambeni mehanizam biljke u koji su uključene fenolne tvari je i SAR, sistem na staničnoj razini, definirana kao povećana otpornost na bolest neinficiranih dijelova biljke nakon napada patogena koja se temelji na sintezi salicilne kiseline.

Dosadašnja istraživanja protumikrobnog djelovanja sekundarnih metabolita u biljkama se odnose na izolirane treslovine i flavonoide koji u uvjetima *in vitro* pokazuju antibakterijske, antifungalne ili antivirusne učinke. Tako je dokazano inhibirajuće djelovanje taninske kiseline na virus mozaika duhana (Tresh, 1956), flavonoida kvercetin na X-virus krumpira (French i Towers, 1992.), na virus prstenaste pjegavosti rajčice (Malhotra i sur., 1996.), na virus grmolike kržljivosti rajčice (Rusak i sur., 1997.), te na virus mozaika krastavca (Rusak i sur., 2007.) Flavonoidi kvercetin i vitexin inhibiraju virus mozaika duhana (Krcatovi i sur., 2008.). Odgovarajućih podataka o sintezi tih tvari kod inficiranih biljaka je malo (Sohal i Bajal, 1993.)

U sklopu ovog diplomskog rada proučena je sinteza ukupnih polifenola, treslovina i ukupnih flavonoida, spojeva aktivnih u obrambenom odgovoru biljaka na zarazu patogenom, u biljnih vrsta *Brassica rapa* L. i *Brassica pekinensis* Rupr. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe. Cilj je ovog rada bio istražiti korelaciju između razvoja virusne infekcije i sinteze navedenih polifenolnih spojeva u istraživanih biljaka.

2. MATERIJALI I METODE

2. MATERIJALI I METODE

2.1. MATERIJAL

2.1.1. Biljni materijal

Za istraživanje djelovanja virusa žutog mozaika postrne repe na sintezu polifenola u inficiranim biljkama korištene su biljne vrste *Brassica rapa* L. i *Brassica pekinensis* Rupr. koje su za taj virus sistemi ni doma ini. Sistemi ni su simptomi odraz sveop e infekcije biljke, pa se tako infekcija sa inokuliranih listova proširila na neinokulirane listove. Biljke su uzgajane u jednakim uvjetima u stakleniku. Uzorci za analizu sakupljeni su u periodu 48 sati, 72 sata, 96 sati nakon inokulacije virusa, te u periodu razvijene infekcije (15., 21., 28. i 35. dan nakon inokulacije virusa).

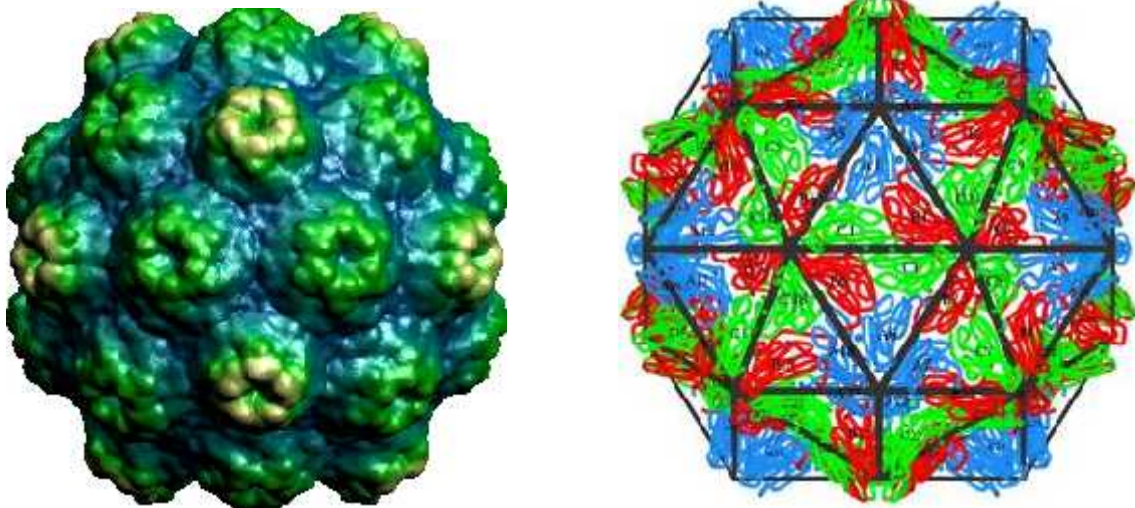
2.1.2. Biološke zna ajke virusa žutog mozaika postrne repe

(turnip yellow mosaic virus – TYMV)

Virus žutog mozaika postrne repe tipi ni je predstavnik roda timovirusa (tymovirus), iji naziv potje e od engleskog imena virusa – turnip yellow mosaic virus. Prvi puta su ga opisali Markham i Smith 1949.g.

Virusne estice sastoje se od proteinske komponente oblikovane u proteinski omota ili kapsidu i ribonukleinske kiseline koja predstavlja genom virusa i zaštiena je unutar kapside. Raspored proteinskih podjedinica u kapsidi odre uje tip simetrije virusne estice. estice TYMV-a su izometri ne, 29.2-31.8 nm u promjeru (ICTV db, 2006). Kapside izometri nih (poliedri nih) virusa imaju oblik pravilnog poliedra (ikozadera) za koji je karakteristi no da ima 20 jednakih ploha u obliku istostrani nog trokuta, te 12 uglova i 30 bridova.

Kod timovirusa svaka od 20 elementarnih trokutastih ploha podijeljena je na 3 manja istostrani na trokuta. Novonastali trokuti gra eni su od tri proteinske podjedinice koje se agregiraju u kapsomere (Jureti , 2002). estica TYMV-a gra ena je od 180 proteinskih podjedinica nakupljenih u 20 heksamera i 12 pentamera (Matthews, 1970), (slika 5, PDB,VIDEdb).



Slika 5. Struktura kapside virusne estice TYMV-a (PDB-protein data bank, VIDEdb-the plant virus detabase)

Genom virusa žutog mozaika postrne repe je jednodijelan i lini ga jedna jednolan ana (+)RNA. Nakon razdvajanja virusnog preparata u gradijentu gusto e cezijevog klorida, u populaciji estica TYMV-a razlikuju se tri osnovna tipa:

1. „Prazne“, neinfektivne proteinske estice (komponenta T)
2. „Pune“, infektivne nukleoproteinske estice (komponenta B) me u kojima se razlikuju 3 vrste estica, B_{1a}, B_{1b} i B_{1c}, a svaka sadrži oko 35% genomske RNA. estice B_{1b} i B_{1c} sadrže i nešto subgenomske mRNA za proteinski omota virusa.
3. Neinfektivne nukleoproteinske estice koje sadrže mRNA za proteinski omota virusa. Njihov je udio u populaciji svih nukleoproteinskih estica oko 5 %.

Na osnovi pokusa *in vitro* utvr eno je da se genom TYMV-a prevodi u tri proteinska produkta od kojih se jedan naknadno raspada na dva manja polipeptida (mase 120 i 78 K), pri emu slijedi daljnji raspad proteina od 120 K na dva manja polipeptida. Zbog te tzv. preklapaju e translacije ti proteini imaju u velikom dijelu isti aminokiselinski sastav. I subgenomske RNA imaju preklapaju u translaciju, od kojih jedna kodira kapsidni protein (Jureti , 2002). TYMV je prvi biljni virus kod kojeg je istražen potpuni slijed nukleotida mRNA za proteinski omota estice.

Osim RNA i proteina estice TYMV-a sadrže i 2 poliamina, od kojih je jedan spermidin. Oni mogu neutralizirati fosfatne skupine nukleinske kiseline, što, kako se ini, olakšava „pakiranje“ razmjerno velikih nukleinskih kiselina u unutrašnjost proteinskog omota a (Jureti , 2002).

Spontane infekcije TYMV-a zabilježene su na 20-tak vrsta krstašica. Me u prirodnim doma inima virusa žutog mozaika postrne repe zastupljene su povrtne, ukrasne i neke druge biljke, dok u pogledu u estalosti nalaza virusa u pojedinim biljkama prednja e vrste roda *Brassica* (Mamula, 1985.). Virus je raširen na sjeverozapadu Europe, a javlja se i u Australiji. U nekim zemljama

izolirano je više različitih izolata, pa se tako navodi 5-10 izolata iz Velike Britanije. Prvi identificirani izolat je izolat T (Markham and Smith, 1949.). Izolat E nosi oznaku Cambridge-type-strain, a poznat je i kao „edinburški“ izolat (Matthews and Ralph, 1966.). Izolati B i N (Broadbent and Heathcote, 1958.), te R₀, R i D1 (Symons i sur.,1963.) poznati su kao „bristolski“, „northumberlandski“, „rothamstedski“, „Rademacherov (nekrotični)“ i „Danski“ soj (Mamula, 1985.).

estice TYMV-a mogu se prenijeti putem vektora (najčešće ih prenose kukci iz reda Coleoptera (vrste *Phyllotreta* i *Psylliodes*) i to inokulacijom biljnog soka prilikom hranjenja tih kukaca. Prenosi se i putem mehaničke inokulacije i cijepljenjem. Virus se ne prenosi polenom. U zaraženim biljkama virusne estice su prisutne u svim dijelovima biljke doma i na, uključujući i vršni meristem, no najvišu koncentraciju dosežu u listovima (ICTVdb, 2006).



Slika 6. Mozaik na sistemski zaraženim listovima vrste *Brassica rapa* L. uzrokovan virusom žutog mozaika postrne repe (snimila Marijana Juren)



Slika 7. Mozaik na sistemima no zaraženim listovima vrste *Brassica pekinensis* Rupr. uzrokovan virusom žutog mozaika postrne repe (snimila M. Juren)

Virusi uzrokuju promjene u biljnoj stanici pri čemu se inficirana stanica mijenja fiziološki, što se odražava u anatomskoj, histološkoj i morfološkoj građini biljke. Sistemni simptomi virusne bolesti odraz su sveopće infekcije biljke pri čemu se virus s mjesta početne infekcije iz inokuliranih listova širi na cijelu biljku. *Brassica rapa* L. i *Brassica pekinensis* Rupr. pokazuju sveobuhvatne simptome u obliku mozaika na listovima, pri čemu se žutozeleni i žuti dijelovi lista jednolično izmjenjuju s normalnim zelenim dijelovima, sa dosta oštrim granicama između tih područja, što se vidi na slikama 6 i 7. Tamnozeleno područje u mozaiku sadrži mnogo manje virusa (ili ga uopće ne sadrži) nego svijetlozelena područja.

2.2. Metode

2.2.1. Mehani ka inokulacija virusa

Biljni se virusi ne mogu adsorbirati na površinu biljne stanice jer se na njoj nalazi kutikula ili kutinizirani slojevi, te vrsta stani na stijenka na kojima nema receptora za koje bi se virusne estice mogle vezati. Jednako tako biljni virusi ne mogu sami probiti stani nu stijenku biljke, ve ulaze u stanicu doma ina pasivno kroz ošte enja u epidermi. U prirodi prijenos biljnih virusa sa bolesne na zdravu biljku omogu uju biljni ili životinjski organizmi koji se u tom slu aju nazivaju vektorima. Eksperimentalno se virusi naj eš e prenose mehani kom inokulacijom (Jureti , 2002).

Za inokulaciju pokusnih biljaka korišteni su listovi cvjeta e (*Brassica oleracea cv. botrytis*) zaraženi virusom TYMV-D1. Ti su listovi homogenizirani u tarioniku uz dodatak fosfatnog (Sörensenovog) pufera (pH 6,976; 0,06 M). Listovi zdravih pokusnih biljaka posipani su karborundom (prah silicijeva karbida, SiC) koji služi kao abrazivno sredstvo. Njegove estice ošte uju epidermu lista stvaraju i sitne porice kroz koje virus ulazi u stanicu. Staklenim se štapi em, zatim, virusni inokul utrlja u listove te ispere destiliranom vodom unutar 10 sekundi nakon inokulacije, što pove ava osjetljivost biljke na virus. Prvi zaraženi listovi koji su se razvili iznad inokuliranih listova sakupljeni su 48 sati nakon inokulacije, slijede i nakon 72, te nakon 96 sati, a posljednji u rasponu 15 - 36 dana nakon inokulacije, kada su sistemi ni simptomi u obliku mozaika bili dobro vidljivi. Postupak mehani ke inokulacije ponovljen je osam puta kako bi se sakupilo dovoljno biljnog materijala za odre ivanje koli ine treslovina i ukupnih flavonoida u inficiranim listovima pokusnih biljaka, te da bi se dobio statisti ki reprezentativan uzorak za navedena istraživanja.

2.2.2. Kvantitativno određivanje sadržaja treslovina primjenom kazeina (Schneider 1976)

250 mg fine praškasto samljevene droge ekstrahira se sa 80 mL 30%-tnog metanola, na kipu u vodenoj kupelji uz povratno hladilo, oko 15 minuta. Nakon hlađenja ekstrakt se filtrira kroz vatu u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake s 30 %-tnim metanolom.

2 mL ovog filtrata pomiješa se sa 8 mL vode i 10 ml otopine natrijevog acetata (1,92 g natrijevog acetata i 0,34 ml octene kiseline nadopuni se vodom do 100 mL). Pufer otopina održava stalnu vrijednost pH=5 koja je optimalna za taloženje treslovina. Tako pripremljenu otopinu zovemo otopinom 1.

10 mL otopine 1 uka se sat vremena na mu kalici sa 50 mg kazeina nakon čega se filtrira preko filter papira. Ovako dobiven filtrat predstavlja otopinu 2.

Po 1 mL otopine 1 i 2 pomiješa se, svaka zasebno, u odmjernoj tikvici od 10 mL sa 0,5 mL Folinovog reagensa, te nadopuni do marke s 33%-tnom otopinom natrijevog karbonata. Apsorbancija ovako pripremljenih otopina mjeri se na 720 nm. Vrijednost koju daje otopina 1 odgovara sadržaju ukupnih polifenola, a razlika vrijednosti za otopine 1 i 2 ukazuje na količinu treslovina vezanih na kazein.

Za izradu unavanje koncentracije ukupnih polifenola i treslovina potrebno je odrediti baždarni pravac. U tu se svrhu 10 mg tanina (acidum tannicum) suši na 80° C i zatim otopi u 100 mL vode. Tako dobivenu otopinu nazivamo standardnom otopinom. Otopina za mjerenje apsorbancije pripremi se miješanjem 5 mL otopine standarda i 5 mL pufer otopine. Te se otopine uzme 0,2 mL, 0,4 mL , 0,6 mL, 0,8 mL, 1,0 mL te 1.2 mL, što odgovara količini tanina od 0,01 – 0,07 mg, te se doda Folinov reagens i otopina natrijevog karbonata, kao što je naprijed navedeno. Na ovaj način dobivamo linearan porast apsorbancije.

2.2.3. Kvantitativno određivanje ukupnih flavonoida (H. Romicsh, 1960.)

Količina ukupnih flavonoida mjerena je prema rutinu te je s rutinom najprije načinjena baždarna krivulja. 5,05 g rutina otopi u 100 mL metanola i od te se smjese uzima 0,25 mL, 0,50 mL, 1,0 mL i 1,5 mL, što odgovara količini od 0,125 mg, 0,250 mg, 0,500 mg i 0,750 mg rutina, te se razrijedi metanolom do 2 mL. Priprenoj otopini doda se 0,60 mL koncentrirane octene kiseline i 10 mL reagensa za flavonoide dobivenog miješanjem 80 mL vode, 20 mL piridina i 2,5 mL otopine aluminijevog klorida ($\text{AlCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$; 12 % - tna otopina u metanolu). Smjesa se dopuni vodom do 25 mL. Profiltrira se kroz gusti filter papir od čega se prvih 5 mL baci. Apsorbancija se mjeri pri 420 nm (prema vodi) u stupcu debljine 1 cm.

Za ekstrakciju se uzima 0,5 g sušene i u prah usitnjene droge. Ekstrakcija se izvodi na vodenoj kupelji sa 25 mL metanola tijekom 30 minuta, nakon čega se ekstrakt filtrira kroz vateni filter u odmjernu tikvicu od 50 mL. Vateni filter kuha se tijekom 30 minuta u 20 mL metanola i ponovo filtrira. Sjedinjeni filtrati nadopune se metanolom do 50 mL. Pet mililitara priprenog metanolnog ekstrakta pomiješa se s 2 mL tetraklor – ugljika i 3 mL vode u epruveti za centrifugiranje, te se u svrhu odvajanja slojeva smjesa centrifugira 5 – 10 minuta na 11 000 rpm.

Gornji, vodeno – metanolni sloj odijeli se i profiltrira kroz naborani filter papir, te se nadopuni metanolom do 10 mL. Od ove smjese uzima se 2 mL te se pripremuje otopina za mjerenje kao kod baždarne krivulje.

Od svakog uzorka načinjena je ekstrakcija od koje su načinjena po tri mjerenja koja su nam dala srednju vrijednost apsorbancije.

Na temelju izmjerenih apsorbancija (srednja vrijednost triju mjerenja) računana se količina ukupnih flavonoida prema rutinu.

3. REZULTATI

3. REZULTATI

3.1. Kvantitativno određivanje sadržaja treslovina i ukupnih polifenola

Kvantitativno određivanje sadržaja treslovina i ukupnih polifenola u listovima pokusnih biljaka vrsta *Brassica rapa* L. i *Brassica pekinensis* Rupr. provedeno je spektrofotometrijskom metodom prema Schneideru (1976.) Ta se metoda zasniva na prethodnom vezanju treslovina na kazein, a potom na reakciji s Folinovim reagensom. Nakon ekstrakcije, filtracije i dodatka Folinovog reagensa dobivenoj je otopini izmjerena apsorbanacija. Na osnovi tih mjerenja izračunata je koncentracija ukupnih polifenola. Dio otopine mu kazein se na mu kalici sa kazeinom, pri čemu se treslovine vežu na kazein. Na osnovi razlika u apsorbanaciji prije i nakon tog vezanja dobivena je vrijednost sadržaja treslovina u ispitivanim uzorcima.

Količina ukupnih polifenola i treslovina izračunata je pomoću u baždarnog pravca. Uzorcima sakupljenim 48, 72, te 96 sati nakon inokulacije listova virusom TYMV-D1 izmjerena je apsorbanacija, kao i uzorcima sakupljenim u periodu razvijene infekcije (15., 21., 28., te 35 dan poslije inokulacije). Za svaki uzorak izvršena su najmanje tri mjerenja, a za izračun je uzeta srednja vrijednost apsorbanacije. Sadržaj ukupnih polifenola i treslovina izražen je masenim udjelom u suhoj tvari. Isti postupak ponovljen je i sa neinficiranim biljkama, koje u ovom slučaju služe kao kontrolne biljke. Mjerenja su za vrstu *Brassica rapa* L. izvršena tri puta, kao i za vrstu *Brassica pekinensis* Rupr. U prvoj analizi za obje vrste korišten je Folinov reagens starijeg datuma, pa se maseni udjeli dobiveni tom analizom razlikuju od vrijednosti dobivenih 2. i 3. analizom u kojima je korišten svjež reagens. Rezultati pojedinih mjerenja prikazani su tablicama i u obliku grafikona prikaza, radi bolje preglednosti. U tablicama 1, 2 i 3 prikazani su rezultati triju mjerenja izvršenih za vrstu *Brassica rapa* L. i uz

njih su dani pripadaju i grafi ki prikazi, dok su u tablicama 4, 5 i 6 prikazani rezultati mjerenja za vrstu *Brassica pekinensis* Rupr.

Kod listova vrste *Brassica rapa* L. sakupljenih 48 sata nakon inokulacije prvim je mjerenjem dobiven gotovo isti sadržaj ukupnih polifenola u inficiranim biljkama (11,53%) u odnosu na kontrolne biljke (11,58%). Drugo i tre e mjerenje u istom periodu tako er je pokazalo da je koli ina ukupnih polifenola u listovima inficiranih biljaka približno jednaka (1,99% u drugom, te 2,5% u tre em mjerenju) kao i u kontrolnih biljaka (1,93% u drugom, te 2,46% u tre em mjerenju), kao što je prikazano u tablicama 1, 2 i 3. Sadržaj treslovina, pak, u istom periodu nešto je ve i u listovima inficiranih biljaka u odnosu na kontrolne biljke, što pokazuju sva tri mjerenja (tablice 1, 2, i 3).

Kod uzoraka sakupljenih 72 sata nakon inokulacije nastavlja se tendencija rasta koli ine ukupnih polifenola u listovima inficiranih biljaka u odnosu na kontrolne biljke što pokazuju sva tri mjerenja. Sadržaj treslovina je pak u listovima inficiranih biljaka nešto niži nego u kontrolnim biljkama (0,33% u odnosu na 0,67%; 0,1% u odnosu na 0,18%, te 0,08% u odnosu na 0,1%)

U periodu 96 sati nakon inokulacije sadržaj ukupnih polifenola u listovima inokuliranih biljaka zna ajnije raste u odnosu na kontrolne biljke (prvim je mjerenjem izra unat sadržaj od 17,68% u listovima inficiranih biljaka u odnosu na 11,21% u listovima kontrolnih biljaka, u drugom mjerenju sadržaj ukupnih polifenola u listovima inficiranih biljaka iznosi 2,04% , a u listovima kontrolnih biljaka 1,87%, dok su tre im mjerenjem dobivene vrijednosti od 2,78% ukupnih polifenola u listovima inficiranih, te 2,44% u listovima kontrolnih biljaka, kao što se vidi u tablicama 1, 2 i 3).

U istom periodu ve a je i koli ina treslovina u listovima inficiranih biljaka u odnosu na kontrolne biljke (u prvom mjerenju izra unat je sadržaj treslovina od 0,9% u listovima inficiranih biljaka u odnosu na 0,53% u listovima kontrolnih biljaka, u drugom mjerenju inficirane biljke sadrže 0,29% treslovina, a kontrolne

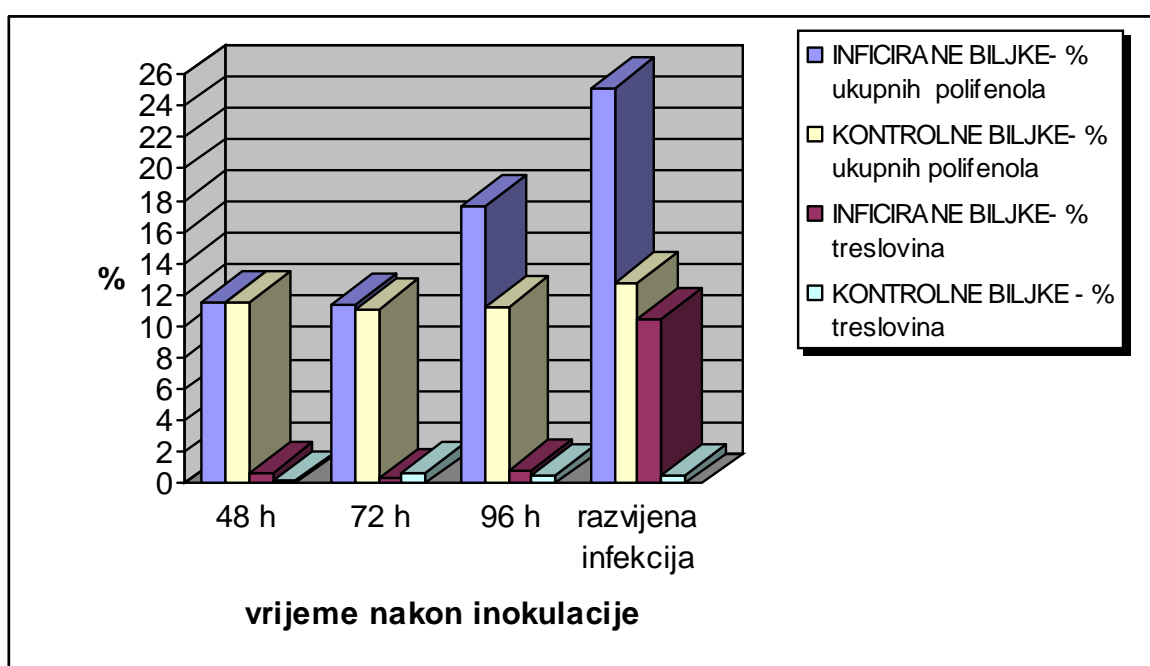
0,17%, dok su tre im mjerenjem dobiveni rezultati od 0,4% treslovina u listovima inficiranih, te 0,14% u listovima kontrolnih biljaka).

U periodu razvijene infekcije prvim mjerenjem dobiven je dvostruko ve i sadržaj ukupnih polifenola u listovima inficiranih biljaka (25,12%) u odnosu na kontrolne biljke (12,8%) (tablica 1), a sli nu tendenciju pokazuju i rezultati drugog i tre eg mjerenja (tablica 2 i 3). Koli ina treslovina u istom periodu znatno je ve a u listovima inficiranih nego kontrolnih biljaka (u prvom mjerenju sadržaj treslovina iznosi 10,48% u listovima inficiranih biljaka u odnosu na 0,53% u listovima kontrolnih biljaka, u drugom mjerenju listovi inficiranih biljaka sadrže 0,39% treslovina, a kontrolnih 0,18%, dok su tre im mjerenjem dobiveni rezultati od 1,4% treslovina u listovima inficiranih, te 0,17% u listovima kontrolnih biljaka).

Tablica 1. Sadržaj ukupnih polifenola i treslovina u listovima (% suhe tvari) vrste *Brassica rapa* L. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe i u listovima kontrolnih biljaka iste vrste (1.mjerenje)

VRIJEME NAKON INOKULACIJE	% UKUPNIH POLIFENOLA		% TRESLOVINA	
	BILJKE INFICIRANE VIRUSOM TYMV-D1	KONTROLNE BILJKE	BILJKE INFICIRANE VIRUSOM TYMV-D1	KONTROLNE BILJKE
48 h	11,53	11,58	0,73	0,16
72 h	11,39	11,1	0,33	0,67
96 h	17,68	11,21	0,9	0,53
razvijena infekcija	25,12	12,8	10,48	0,53

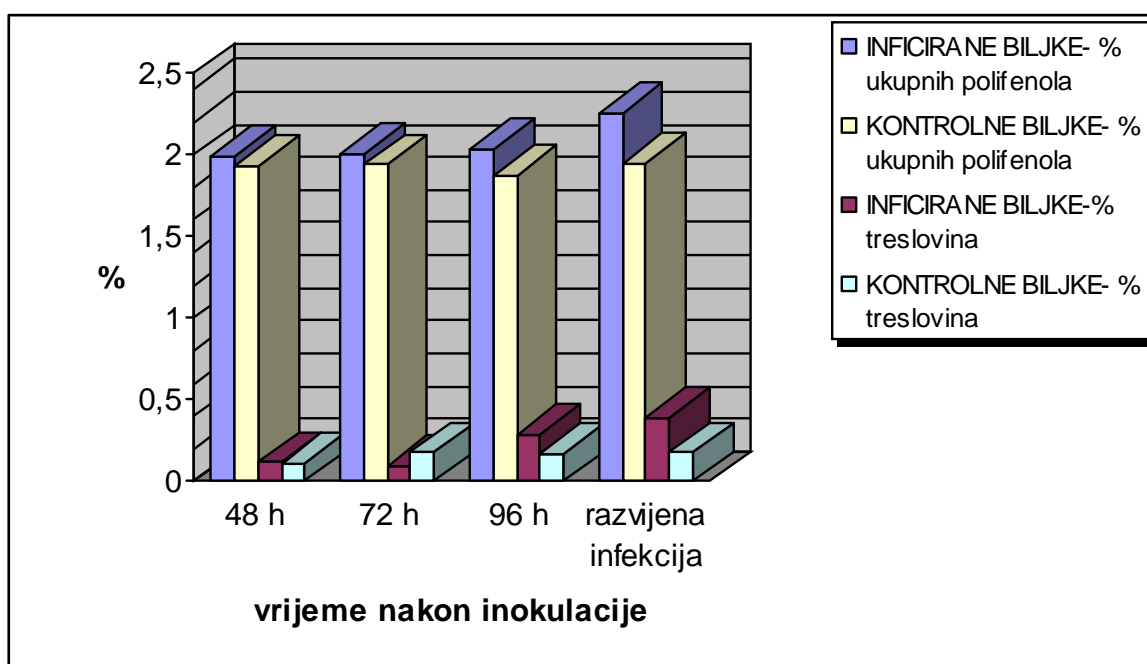
Slika 8. Grafi ki prikaz sadržaja ukupnih polifenola i treslovina (% suhe tvari) u listovima vrste *Brassica rapa* L. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe i u listovima kontrolnih biljaka iste vrste (1.mjerenje)



Tablica 2. Sadržaj ukupnih polifenola i treslovina (% suhe tvari) u listovima vrste *Brassica rapa* L. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe i u listovima kontrolnih biljaka iste vrste (2.mjerenje)

VRIJEME NAKON INOKULACIJE	% UKUPNIH POLIFENOLA		% TRESLOVINA	
	BILJKE INFICIRANE VIRUSOM TYMV-D1	KONTROLNE BILJKE	BILJKE INFICIRANE VIRUSOM TYMV-D1	KONTROLNE BILJKE
48 h	1,99	1,93	0,12	0,11
72 h	2,01	1,94	0,1	0,18
96 h	2,04	1,87	0,29	0,17
razvijena infekcija	2,26	1,95	0,39	0,18

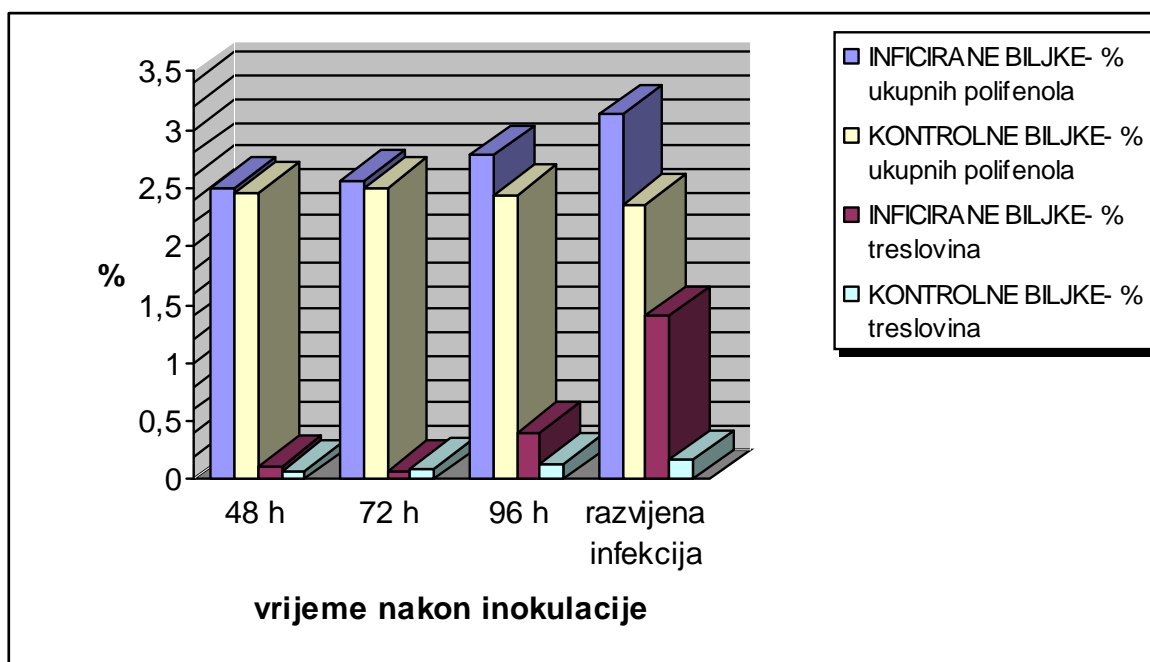
Slika 9. Grafi ki prikaz sadržaja ukupnih polifenola i treslovina (% suhe tvari) u listovima vrste *Brassica rapa* L. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe i u listovima kontrolnih biljaka iste vrste (2.mjerenje)



Tablica 3. Sadržaj ukupnih polifenola i treslovina (% suhe tvari) u listovima vrste *Brassica rapa* L. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe i u listovima kontrolnih biljaka iste vrste (3.mjerenje)

VRIJEME NAKON INOKULACIJE	% UKUPNIH POLIFENOLA		% TRESLOVINA	
	BILJKE INFICIRANE VIRUSOM TYMV-D1	KONTROLNE BILJKE	BILJKE INFICIRANE VIRUSOM TYMV-D1	KONTROLNE BILJKE
48 h	2,5	2,46	0,11	0,07
72 h	2,56	2,5	0,08	0,1
96 h	2,78	2,44	0,4	0,14
razvijena infekcija	3,13	2,36	1,4	0,17

Slika 10. Grafi ki prikaz sadržaja ukupnih polifenola i treslovina (% suhe tvari) u listovima vrste *Brassica rapa* L. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe i u listovima kontrolnih biljaka iste vrste (3.mjerenje)



Kod uzoraka vrste *Brassica pekinensis* Rupr. sakupljenih 48 sati nakon inokulacije prvim je mjerenjem dobiven nešto manji sadržaj ukupnih polifenola u listovima inficiranih biljaka (8,93%) u odnosu na kontrolne biljke (9,8%), (tablica 4), dok su drugo i treće mjerenje pokazali da je količina ukupnih polifenola u listovima inficiranih biljaka gotovo ista (2,8% u drugom, te 2,82% u trećem mjerenju) kao i u kontrolnih biljaka (2,73% ukupnih polifenola dobiveno je drugim i trećim mjerenjem), što je prikazano u tablicama 4, 5 i 6. Sadržaj treslovina u istom periodu veći je u listovima inficiranih biljaka u odnosu na kontrolne biljke, što pokazuju sva tri mjerenja.

Kod uzoraka sakupljenih 72 sata nakon inokulacije nastavlja se tendencija rasta količine ukupnih polifenola u listovima inficiranih biljaka u odnosu na kontrolne biljke što pokazuju sva tri mjerenja. Sadržaj treslovina u listovima inficiranih biljaka malo je manji nego u listovima kontrolnih biljaka (0,057% u odnosu na 0,08%; 0,19% u odnosu na 0,21%), što su rezultati prvih dvaju mjerenja, dok treće mjerenje daje nešto veću količinu treslovina u listovima inficiranih biljaka u odnosu na kontrolne biljke.

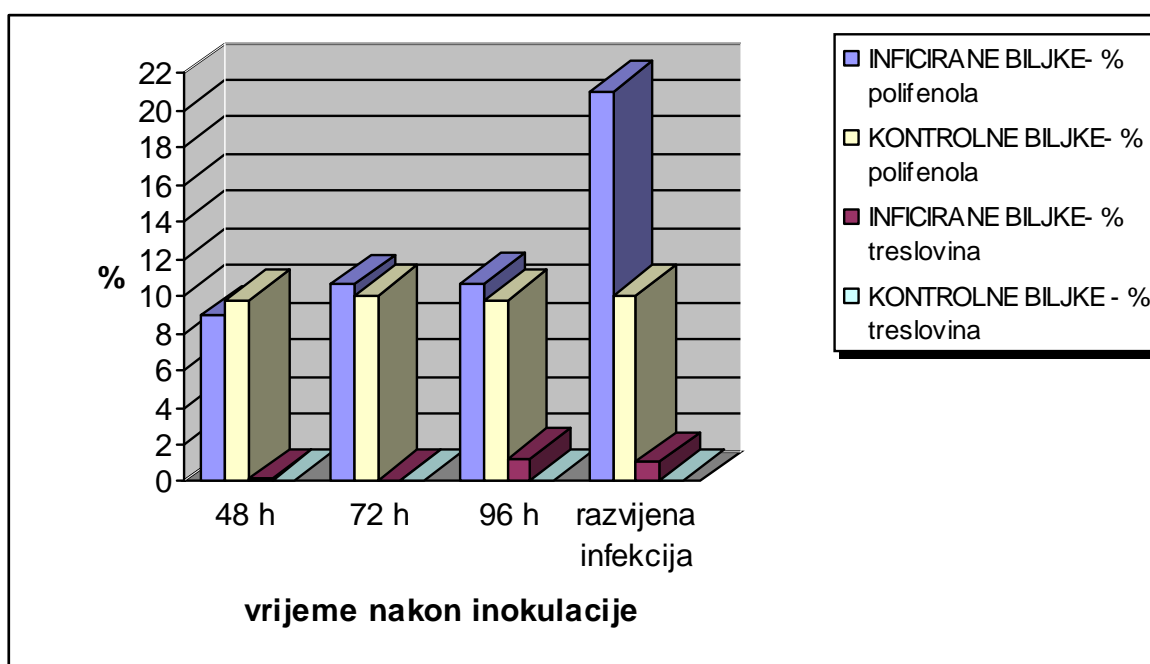
U periodu od 96 sati nakon inokulacije sva tri mjerenja ukazuju na veću količinu ukupnih polifenola, kao i veću količinu treslovina u listovima inficiranih biljaka u odnosu na kontrolne biljke. Ova pojava postaje izraženija u periodu razvijene infekcije kada prvo mjerenje pokazuje da je količina ukupnih polifenola u listovima inficiranih biljaka (20,99%) duplo veća (tablica 4) nego u kontrolnih biljaka (9,99%, tablica 4). Na značajan porast ukupnih polifenola u inficiranim biljkama ukazuje i drugo i treće mjerenje. Količina treslovina također je značajno veća u listovima inficiranih biljaka (u prvom mjerenju izražena je sadržaj treslovina od 1,07% u listovima inficiranih biljaka u odnosu na 0,08% u kontrolnih biljaka, u drugom mjerenju listovi inficiranih biljaka sadrže 0,49%, a kontrolnih 0,35% treslovina, dok su trećim mjerenjem dobiveni rezultati od 1,28% treslovina u listovima inficiranih, te 0,44% u listovima kontrolnih biljaka.) Odstupanja u prvom mjerenju količine ukupnih polifenola

48 sati nakon inokulacije kod obje vrste, kao i u 3.mjerenju koli ine treslovina 72 sata nakon inokulacije u vrste *Brassica pekinensis* Rupr. mogu se objasniti greškom u mjerenju.

Tablica 4. Sadržaj ukupnih polifenola i treslovina (% suhe tvari) u listovima vrste *Brassica pekinensis* Rupr. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe i u listovima kontrolnih biljaka iste vrste (1.mjerenje)

VRIJEME NAKON INOKULACIJE	% UKUPNIH POLIFENOLA		% TRESLOVINA	
	BILJKE INFICIRANE VIRUSOM TYMV-D1	KONTROLNE BILJKE	BILJKE INFICIRANE VIRUSOM TYMV-D1	KONTROLNE BILJKE
48 h	8,93	9,8	0,13	0,07
72 h	10,63	9,99	0,057	0,08
96 h	10,64	9,8	1,23	0,07
razvijena infekcija	20,99	9,99	1,07	0,08

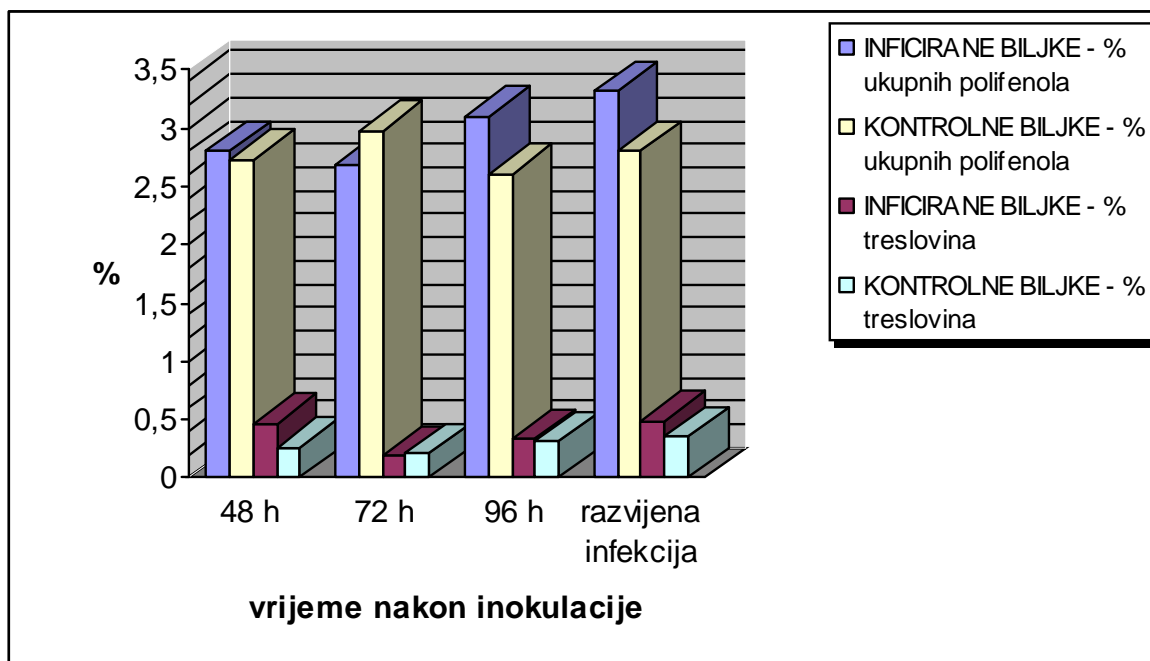
Slika 11. Grafi ki prikaz sadržaja ukupnih polifenola i treslovina (% suhe tvari) u listovima vrste *Brassica pekinensis* Rupr. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe i u listovima kontrolnih biljaka iste vrste (1.mjerenje)



Tablica 5. Sadržaj ukupnih polifenola i treslovina (% suhe tvari) u listovima vrste *Brassica pekinensis* Rupr. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe i u listovima kontrolnih biljaka iste vrste (2.mjerenje)

VRIJEME NAKON INOKULACIJE	% UKUPNIH POLIFENOLA		% TRESLOVINA	
	BILJKE INFCIRANE VIRUSOM TYMV-D1	KONTROLNE BILJKE	BILJKE INFCIRANE VIRUSOM TYMV-D1	KONTROLNE BILJKE
48 h	2,8	2,73	0,47	0,26
72 h	2,69	2,97	0,19	0,21
96 h	3,1	2,6	0,33	0,31
razvijena infekcija	3,31	2,8	0,49	0,35

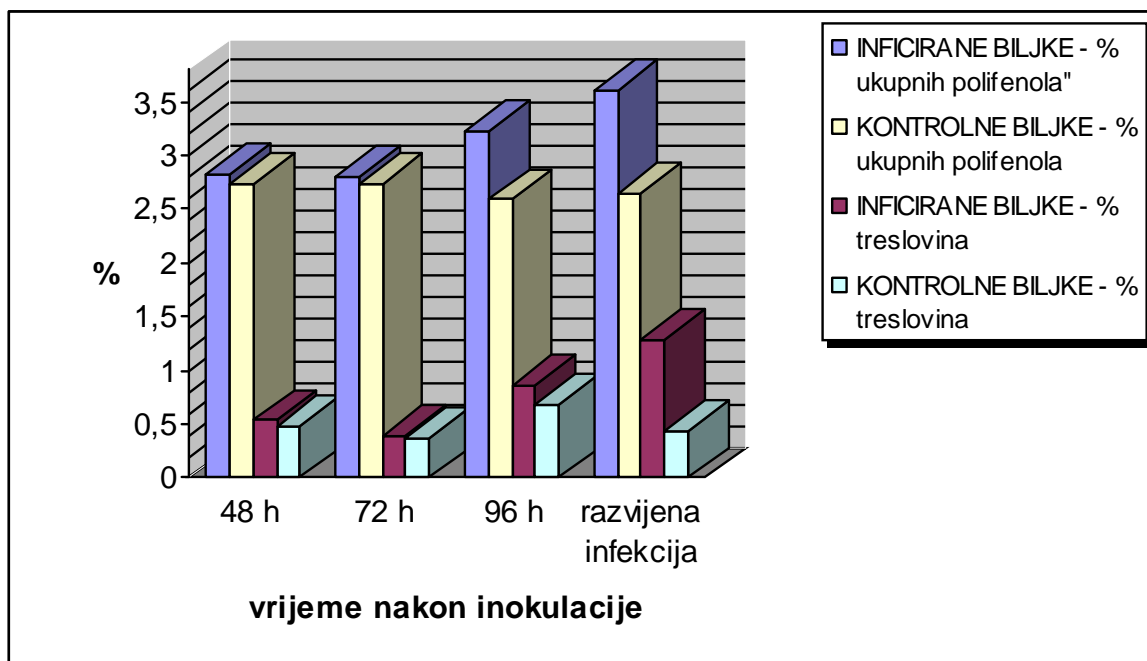
Slika 12. Grafi ki prikaz sadržaja ukupnih polifenola i treslovina (% suhe tvari) u listovima vrste *Brassica pekinensis* Rupr. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe i u listovima kontrolnih biljaka iste vrste (2.mjerenje)



Tablica 6. Sadržaj ukupnih polifenola i treslovina (% suhe tvari) u listovima vrste *Brassica pekinensis* Rupr. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe i u listovima kontrolnih biljaka iste vrste (3.mjerenje)

VRIJEME NAKON INOKULACIJE	% UKUPNIH POLIFENOLA		% TRESLOVINA	
	BILJKE INFCIRANE VIRUSOM TYMV-D1	KONTROLNE BILJKE	BILJKE INFCIRANE VIRUSOM TYMV-D1	KONTROLNE BILJKE
48 h	2,82	2,73	0,54	0,49
72 h	2,8	2,73	0,4	0,37
96 h	3,22	2,59	0,87	0,69
razvijena infekcija	3,6	2,65	1,28	0,44

Slika 13. Grafi ki prikaz sadržaja ukupnih polifenola i treslovina (% suhe tvari) u listovima vrste *Brassica pekinensis* Rupr. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe i u listovima kontrolnih biljaka iste vrste (3.mjerenje)



3.2. Kvantitativno određivanje sadržaja flavonoida

Za vrste *Brassica rapa* L. i *Brassica pekinensis* Rupr. kvantitativno je određen i sadržaj ukupnih flavonoida, metodom prema Romischu.

Količina ukupnih flavonoida izražavala se pomoću baždarnih krivulja. Za uzorke sakupljene 48, 72 i 96 sati nakon inokulacije virusom, kao i za uzorke sakupljene 15., 21., 28. i 35. dan nakon inokulacije, u periodu razvijene infekcije, napravljena su po tri mjerenja, na osnovi kojih je dobivena srednja vrijednost apsorbancije. Na temelju te vrijednosti izražavala se maseni udio ukupnih flavonoida.

Postupak je ponovljen i sa zdravim, kontrolnim biljkama obaju vrsta. Rezultati mjerenja za vrstu *Brassica rapa* L. prikazani su u tablici 7, kao i na grafičkom prikazu (slika 14), dok su za vrstu *Brassica pekinensis* Rupr. rezultati prikazani u tablici 8 i na grafičkom prikazu (slika 15).

U listovima vrste *Brassica rapa* L. sakupljenim u periodu 48 sati nakon inokulacije dobivena količina ukupnih flavonoida u inficiranim biljkama iznosi 0,41% (tablica 7) i veća je od količine ukupnih flavonoida u listovima kontrolnih biljaka koja iznosi 0,23% (tablica 7).

Količina ukupnih flavonoida u listovima iste vrste, sakupljenim u periodu 72 sati nakon inokulacije, veća je kod inficiranih (0,44%, tablica 7) nego kontrolnih biljaka (0,32%, tablica 7).

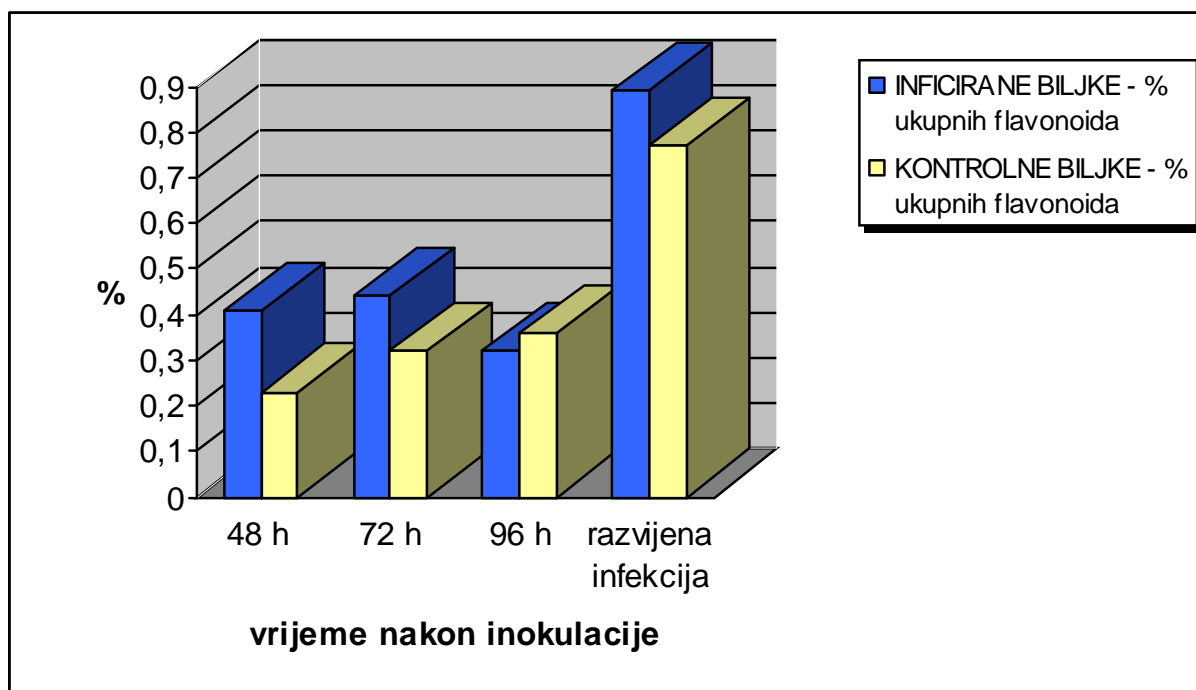
U periodu 96 sati nakon inokulacije količina ukupnih flavonoida u listovima inficiranih biljaka nešto je manja (0,32%, tablica 7) u odnosu na kontrolne biljke (0,36%, tablica 7).

U periodu razvijene infekcije sadržaj ukupnih flavonoida u listovima inficiranih biljaka veći je (0,89%, tablica 7) od sadržaja ukupnih flavonoida u listovima kontrolnih biljaka (0,77%, tablica 7).

Tablica 7. Sadržaj ukupnih flavonoida (% suhe tvari) u listovima vrste *Brassica rapa* L. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe i u listovima kontrolnih biljaka iste vrste

	BILJKE INFICIRANE VIRUSOM TYMV-D1	KONTROLNE BILJKE
VRIJEME NAKON INOKULACIJE	% UKUPNIH FLAVONOIDA	% UKUPNIH FLAVONOIDA
48 h	0,41	0,23
72 h	0,44	0,32
96 h	0,32	0,36
razvijena infekcija	0,89	0,77

Slika 14. Grafi ki prikaz sadržaja ukupnih flavonoida (% suhe tvari) u listovima vrste *Brassica rapa* L. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe i u listovima kontrolnih biljaka iste vrste



U inficiranim listovima vrste *Brassica pekinensis* Rupr. sakupljenim 48 sati nakon inokulacije sadržaj ukupnih flavonoida (0,35%, tablica 8) gotovo je isti kao i u listovima kontrolnih biljaka (0,32%, tablica 8).

U periodu 72 sata nakon inokulacije dobiven je isti sadržaj ukupnih flavonoida u listovima inficiranih biljaka iste vrste kao i kontrolnih biljaka (0,71%, tablica 8).

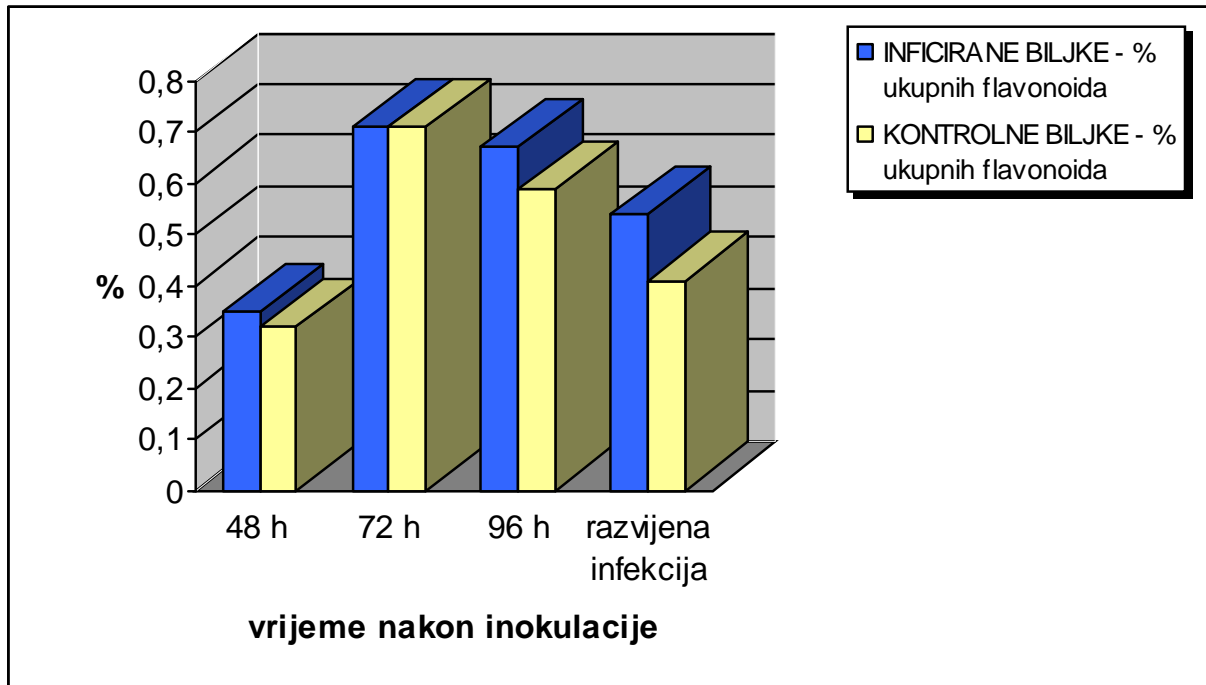
Sadržaj ukupnih flavonoida u listovima inficiranih biljaka sakupljenim u periodu 96 sati nakon inokulacije (0,67%, tablica 8) nešto je ve i od sadržaja ukupnih flavonoida u listovima kontrolnih biljaka sakupljenim u istom periodu (0,59%, tablica 8).

Najve i porast sadržaja ukupnih flavonoida u listovima inficiranih biljaka (0,54%, tablica 8) u odnosu na sadržaj flavonoida u listovima kontrolnih biljaka (0,41%, tablica 8) zabilježen je o periodu razvijene infekcije.

Tablica 8. Sadržaj ukupnih flavonoida (% suhe tvari) u listovima vrste *Brassica pekinensis* Rupr. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe i u listovima kontrolnih biljaka iste vrste

	BILJKE INFIGIRANE VIRUSOM TYMV-D1	KONTROLNE BILJKE
VRIJEME NAKON INOKULACIJE	% UKUPNIH FLAVONOIDA	% UKUPNIH FLAVONOIDA
48 h	0,35	0,32
72 h	0,71	0,71
96 h	0,67	0,59
razvijena infekcija	0,54	0,41

Slika 15. Grafi ki prikaz sadržaja ukupnih flavonoida (% suhe tvari) u listovima vrste *Brassica pekinensis* Rupr. inficiranim virusom žutog mozaika postrne repe i u listovima kontrolnih biljaka iste vrste



4. RASPRAVA

4. RASPRAVA

Biološki uinci treslovina i flavonoida proučavaju se dugi niz godina. Njihova prisutnost u ljekovitim biljkama korištenim u narodnoj medicini, te širok spektar bioloških aktivnosti i pozitivnih učinaka na ljudski organizam (Di Carlo i sur., 1999., Chung, 1998.) stavlja ih u fokus interesa medicinskih istraživanja.

Fenolni spojevi sudjeluju u induciranim obrambenim reakcijama biljaka (Silverman i sur. 2005., Dixon, 2001.) što rezultira njihovom akumulacijom nakon napada patogena. Jedan od oblika inducirane odgovora biljke je i sinteza toksičnih antimikrobnih biljnih spojeva, fitoaleksina, od kojih veliki broj pripada skupini fenola. Poznati obrambeni mehanizam biljke u koji su uključene fenolne tvari je i SAR, sistemna stečajna rezistencija, definirana kao povećana otpornost na bolest neinficiranih dijelova biljke nakon napada patogena (Silverman i sur., 2005.). SAR se često javlja kao reakcija na hipersenzitivni odgovor (HR) biljke na napad patogena. HR je aktivni odgovor biljke u kojem biljka prepoznaje patogen i pokreće kaskadu događaja kojima ograničava patogen na inicijalno mjesto infekcije, a često kulminira lokaliziranim odumiranjem stanica što sprečava daljnje širenje patogena (Hammond-Kosack i Jones, 2000.) SAR ovisi o sintezi salicilne kiseline. Istraživanje protuvirusnog djelovanja kvercetina i viteksina na virus mozaika duhana ukazuje na mogućnost da je protuvirusni učinak flavonoida posredovan indukcijom sinteze salicilne kiseline, te se temelji na nekim procesima srodnim sistemnoj rezistenciji (Rusak i sur., 2007).

U sklopu ovog rada istražena je korelacija između razvoja virusne infekcije i sinteze polifenolnih spojeva (ukupnih polifenola, treslovina i ukupnih flavonoida) u listovima biljaka *Brassica rapa* L. i *Brassica pekinensis* Rupr. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe. Dobiveni rezultati ukazuju na

tendenciju povećanja sadržaja ispitivanih spojeva sa razvojem virusne infekcije. Zanimajen je pad sadržaja treslovina u periodu 72 sata nakon inokulacije virusa u biljaka obje vrste. Dosadašnja ispitivanja djelovanja virusa na sintezu ukupnih polifenola (Sohal i Bajal, 1993.) dokazala su povećanje ukupnih fenola i flavonola u inficiranih biljaka vrste *Vigna radiata* L. Wilczek. Zanimajena je fluktuacija u količini ukupnih fenola kod otpornih biljaka vrste *Vigna radiata* L. Wilczek u ovisnosti o razvoju infekcije, dok je kod osjetljivih biljaka vrste *Vigna radiata* L. Wilczek izmjereno povećanje sadržaja ukupnih fenola i smanjenje sadržaja flavonola.

5. ZAKLJUČAK

5. ZAKLJUČAK

Mehaničkom inokulacijom virusa žutog mozaika postrne repe na biljke vrsta *Brassica rapa* L. i *Brassica pekinensis* Rupr. došlo je do pojave sistemskih simptoma u obliku mozaika.

Kvantitativnim određivanjem sadržaja ukupnih polifenola u listovima biljaka vrsta *Brassica rapa* L. i *Brassica pekinensis* Rupr. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe u odnosu na listove neinficiranih, kontrolnih biljaka došlo je do porasta količine ukupnih polifenola u periodima 72 i 96 sati nakon inokulacije, posebno izraženog u periodu razvijene infekcije (sakupljenim 15., 21., 28. i 35. dana nakon inokulacije).

Sadržaj treslovina u listovima biljaka vrsta *Brassica rapa* L. i *Brassica pekinensis* Rupr. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe polako raste u odnosu na zdrave biljke 48 i 96 sati nakon inokulacije, te u periodu razvijene infekcije (15., 21., 28. i 35. dana nakon inokulacije) postiže maksimum. U periodu 72 sata nakon inokulacije sadržaj je treslovina u listovima biljaka inficiranih virusom malo manji nego u listovima kontrolnih biljaka.

Sadržaj ukupnih flavonoida u listovima inficiranih biljaka vrste *Brassica rapa* L. veći je u listovima biljaka inokuliranih virusom nego u listovima kontrolnih biljaka u periodima 48 i 72 sata nakon inokulacije, te u periodu razvijene infekcije (15., 21., 28. i 35. dana nakon inokulacije), dok je u periodu 96 sati nakon inokulacije manji. U biljaka vrste *Brassica pekinensis* Rupr. sadržaj ukupnih flavonoida veći je u periodima 48 i 96 sata nakon inokulacije, te u periodu razvijene infekcije (15., 21., 28. i 35. dana nakon inokulacije), dok je u periodu 72 nakon inokulacije manji.

Najznačajniji i najujednaeniji rezultati za obje ispitivane vrste koji upućuju na značajan porast svih ispitivanih tvari u inficiranih biljaka u odnosu na zdrave biljke dobiveni su u vrijeme potpuno razvijene infekcije.

6. LITERATURA

6. LITERATURA:

- Baylor, N.W., Fu, T., Yan, Y.D., Ruscelli, F.W. (1992): Inhibition of human T-cell leukemia virus by the plant flavonoid baicalin (7-glucuronic acid, 5,6-dihydroksiflavone). *J. Infect. Dis.*, 165, 433-437
- Bawden, F.C., Kleczkowski, A. (1945): Protein precipitation and virus inactivation by extracts of strawberry plants. *J.Hort.Sci.*, 21, 2
- Berhow, M. A., Vaughn, S. F. (1999): Higher plant flavonoids: biosynthesis and chemical ecology. In *Principles and Practices of Plant Ecology: Allelochemical Interactions*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 423-438
- Carson, R. S., Frisch, A. W. (1953): The inactivation of influenzae viruses by tannic acid and related compounds. *J. Bacteriol.*, 66, 572
- Chung, K. T., Wong T. Y., Wei C. I., Huang Y. W., Lin Y. (1998): Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 421-464
- Chung K. T., Wei C. I., Johnson, M. G. (1998): Are tannins a double-edged sword in biology and health. *Trends in Food and Science Technology*, 9, 168-175
- Cushine T. P. T., Lamb, J. A. (2005): Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agr.*, 26, 343-353
- Denffer D., Ziegler H. (1991): Udžbenik za visoke škole: Morfologija i fiziologija. Grafi ki zavod Hrvatske, Zagreb
- Di Carlo, G., Mascolo N., Izzo A. A., Capasso F. (1999): Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, 65, 337-353
- French C. J., Elder M., Leggett F., Ibrahim, R. K., Towers, G. H. N. (1991): Flavonoids inhibit infectivity of tobacco mosaic virus. *Can. J. Plant Pathol.*, 13, 1-6
- French C.J., Towers, G. H. N. (1992): Inhibition of infectivity of potato virus X by flavonoids. *Phytochemistry*, 31, 3017-3020

Fukuchi, K., Sakagami, H., Okuda, T., Hatano, T., Tanuma, S., Kitajima, K., Inoue, Y., Inoue, S., Ichikawa, S., Nonoyama, M., Konno, K. (1989): Inhibition of herpes simplex virus infection by tannins and related compounds. *Antiviral Research*, 11, 285-297

Green, R. H. (1948): Inhibition of multiplication of influenzae virus by tannic acid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 67, 483,

Harborn, J. B. (1973): Phytochemical methods – a guide to modern techniques of plant analysis. Chapman and Hall, 84,

Haslam, E. (2007): Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*, 68, 2713-2721

Hayashi, K., Otsuka, H., Takeda, Y. (1997): Antiviral activity of 5,6,7-trimethoxyflavone and its potentiation of the antiherpes activity of acyclovir. *J.Antimicrob.Chemother.*, 39, 821-824

ICTVdb Management (2006). 00.077.0.01.020. Turnip yellow mosaic virus, In ICTVdb - *The universal virus database*, version 4, Buechen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/>

Juretić, N. (2002): Osnove biljne virologije. Školska knjiga, Zagreb, 138-139,

Katalinić, V. (1997): Određivanje biljnih tanina primjenom SPE i UV-VIS tehnike. Izvornik: Sažeci XV. hrvatskog skupa kemičara i kem. inženjera, Opatija 24.-26.3.1997., Sažeci, vol.2. ISBN 953-96041-2-5, Zagreb: Hrvatsko kemijsko društvo, 225-225

Kinlen, L. J., Willows, A. N., Goldblatt P., Yudkin, J. (1988): Tea consumption and cancer. *Br. J.Cancer*, 58, 397

Konovalchuk, J., Spears, J. I. (1976): Antiviral activity of fruit extracts. *J.Food Sci.*, 41, 1013

Krcatović, E., Rusak, G., Bezić, N., Krajačić, M. (2008): Inhibition of tobacco mosaic virus infection by Quercetin and vitexin. *Acta Virologica*, 52, 119-124

Kucera, L. S., Hermann, E. C. Jr. (1967): Antiviral substances in plants of the mint family (Labiatae). Tannins of *Melissa officinalis*. *Proc.Soc. Exp. Biol. Med.*, 124, 865

Kuhnau J. (1976): The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.*, 24, 117-191

Malhotra, B., Onyilagha, J. C., Bohm, B. A., Towers, G. H. N., James D., Harborne, J. B., French, C. J. (1996): Inhibition of tomato ringspot virus by flavonoids. *Phytochemistry*, 43, 1271-1276.

Mamula, . (1985): Serološko srodstvo izolata virusa žutog mozaika postrne repe i njihova koncentracija u biljkama. Disertacija, Sveu ilište u Zagrebu

Matthews, R. E. F. (1970): Turnip yellow mosaic virus. *C.M.I./A.A.B. Description of Plant Viruses* No.2

Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E. C., Boelens, P., van Nooren, K., van Leeuwen, P. A. M. (2001): Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.*, 74, 418-25

Nonaka, G. I., Nishioka, I., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Kashiwada, Y., Dutschman, G. E., Bodner, A. J., Kilkuskic, R. E., Cheng Y. C., Lee, K. H. (1990): Anti AIDS agents 2. Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transkriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells. *J. Nat. Prod.*, 53, 587 – 595

Ono, K., Nakane, H., Fukushima, M., Chermann, J. C., Barre-Sinoussi, F. (1990): Differential inhibitory effects on various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and celular DNA and RNA polymerases. *Eur. J. Biochem.*, 190, 469-476

Ranadive, K. J., Ranadive, S. N., Shivapurkar, N. M., Gothoskar S. V (1979): Betel quid chewing and oral cancer : experimental studies on hamster. *Int. J.Cancer*, 24, 853,

Rusak, G., (1991): Anatomska i fitokemijska istraživanja endemi nih vrsta *Centaurea rupestris* L. I *C. Fritschii hayek* (Asteraceae). Magistarski rad, Sveu ilište u Zagrebu, Zagreb, 31,32

Rusak, G., Kraja i , M., Pleše,N. (1997): Inhibition of tomato bushy stunt virus infection using a quercetagenin flavonoid isolated from *Centaurea rupestris* L. *Antiviral research*, 36, 125-129

- Rusak, G., Gutzeit, H.O., Ludwig-Müller, J. (2005): Structurally related flavonoids with antioxidative properties differentially affects cell cycle progression and apoptosis of human acute leukemia cells. *Food Technol. Biotechnol.*, 40, 267-273
- Rusak, G., Kraja i , M., Krsnik-Rasol, M., Gutzeit, H.O. (2007): Quercetin influences response in *Nicotiana megalosiphon* infected by satellite-associated cucumber mosaic virus. *Journal of Plant Disease and Protection*, 114, 145-150
- Rusak G., Komes D., Liki S., Horži D., Kova M. (2008): Phenolic content and antioxidative capacity of green tea and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110, 852-858
- Serkedjieva, J., Ivancheva, S. (1998): Antiherpes virus activity of extracts from the medical plant *Geranium sanguineum* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 64, 59-68
- Sohal, B. S., Bajal, K. L. (1993): Effects of yellow mosaic virus on polyphenol metabolism in resistant and susceptible mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) leaves. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 188, 419-423
- Spedding G., Ratty, A., Middleton E. Jr. (1989): Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antiviral Res.*, 12, 99-100
- Stolz, D. R., (1982): The health significance of mutagens in foods. In: *Carcinogens and mutagens in the environment*, vol.3, Stich H. F., Ed., CRC Press , Boca Raton, Florida, 75
- Takechi, M., Tanaka, Y., Takehara, M., Nonaka, G. I., Nishioka, I. (1985): Structure and antiherpetic activity among the tannins. *Phytochemistry*, 24, 2245
- Tresh, J. M. (1956): Some effects of tannic acid and leaf extracts which contain tannins on the infectivity of tobacco mosaic and tobacco necrosis viruses. *Ann. Appl. Biol.*, 44, 608
- Van Schreven, D. A. (1941): Control of tobacco mosaic by means of extracts of tanning substances. *Natuurwet. Tijdschr. Ned.-Ind.*, 4, 113
- Werma, V. S. (1973): Study on the effect of flavonoids on the infectivity of the potato virus X. *Zbl. Bakt. Abt. II Bd.*, 128, 467-472

VIDEdb-the plant virus detabase,developt in the Australian National University
by Gibbs, A.J.
http://viperdb.scripps.edu/info_page.php?VDB=1w39