

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://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:143831>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-02**



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 Botani kog 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 akanci na pruženoj nesobi noj pomoći i Marijani Juren na korisnim fotografijama.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveu ilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matemati ki fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

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

Željka Kuzman

Botani ki zavod
Maruli ev 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 u inke me u kojima je i protuvirusna aktivnost. Fenolni spojevi sudjeluju u induciranim obrambenim odgovorima biljaka. U ovom radu dokazana je korelacija izme u razvoja virusne infekcije i sinteze polifenolnih spojeva koja se o ituje pove anjem 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 sveu ilišna biblioteka, Zagreb

Klju ne rije i: TYMV/ polifenoli / treslovine / flavonoidi

Mentor: Prof.dr.sc. Gordana Rusak

Ocenjiva i: Prof.dr.sc. Mirjana Kalafati
Prof.dr.sc. Zora Popovi
Doc.dr.sc. Draginja Mrvoš-Sermek

Rad prihva en: 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
Marulićev 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 Kalafatić, 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 metaboličkim procesima izgradnje i održavanja biljnih stanica, te o njima naoko ne ovisi preživljavanje organizma koji ih proizvodi. Uloga sekundarnih metabolita o ituje 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 ultraljubičastog zračenja.

Sekundarne metabolite generalno grupiramo prema kemijskoj strukturi i načinu biosinteze na terpene, alkaloide, 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. Utječe 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 sincijalni virus, parainfluenca virus i adenovirus (Nijveldt i sur., 2001). U novije vrijeme posebna je pažnja posvećena istraživanju djelovanja treslovina i flavonoida na virus humane imunodeficijencije (HIV).

S druge strane vrlo mali broj radova odnosi na djelovanje ovih spojeva na biljne virusne (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 većina tih radova odnosi se na djelovanje pravilnih spojeva u uvjetima *in vitro*.

U ovom diplomskom radu pokušne biljke inficirane su virusom žutog mozaika postrne repe, te su pravene 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 golosjemenja i kritosjemenja, a kod potonjih su esti u drvenastim tkivima (Harborn, 1973). Zamjetne kolичine 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 aju, vinima i u stočnoj hrani (djjetelina, grahorica) (Chung i sur., 1998). Biljni dijelovi bogati treslovinama su kora, listovi, plodovi, stabljika i korijen.esto 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 kolичinu tanina.

Treslovine talože proteine pri čemu nastaju stabilni ko-polimeri netopivi u vodi (Harborn, 1973). Sposobnost treslovina da štave kožu i je gipkom i vrstom temelji se na tom svojstvu. Adstringentno djelovanje treslovina učava 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.

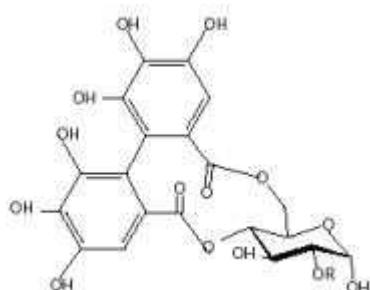
1.2.1.2. Kemijska struktura treslovina

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

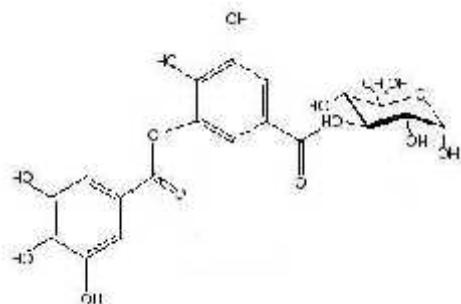
1. Treslovine koje hidroliziraju
2. Treslovine koje ne hidroliziraju (kondenzirane treslovine)

Treslovine koje hidroliziraju

Centralnu jezgru ove skupine treslovina ini naj eš e D-glukoza ije su hidroksilne skupine djelomi no ili u potpunosti esterificirane galnom kiselinom (galotanini) ili heksahidroksidifeni nom kiselinom (elagitanini), (slika 1).



Slika 1. Elagitanin



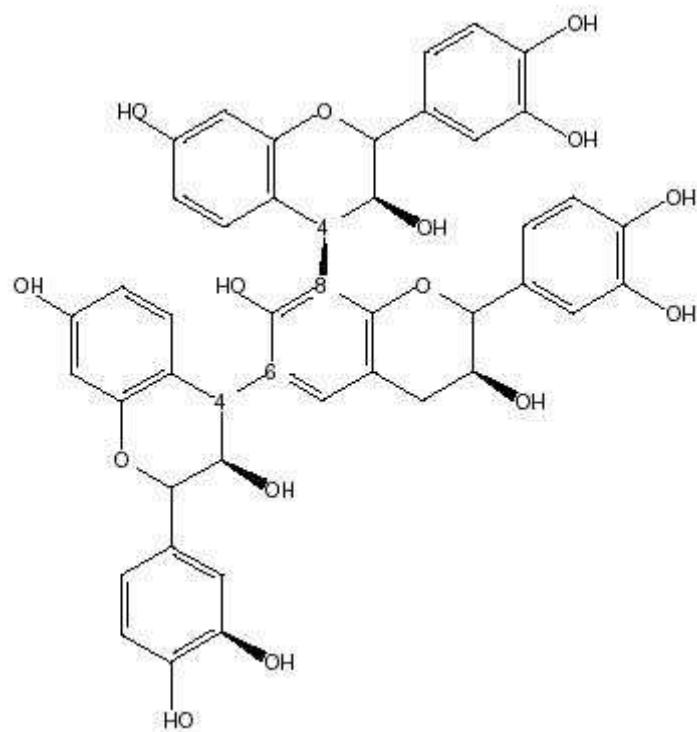
Galotanin

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 izведен je na temelju njihova svojstva da nakon reakcije s jakim kiselinama daju odgovaraju i antocijanidin (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 učinci treslovina

Treslovine kao sastavni dio mnogih plodova voća, mahunarki, ajeva, vina i stočne 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 pokušnih životinja. Djeluju i kao inhibitori probavnih enzima (Chung i sur., 1998). Većina istraživanja dokazuje ovaj u inak u uvjetima *in vitro*, dok u uvjetima *in vivo* za to ima malo dokaza. Treslovine smanjuju dostupnost željeza i vitamina B12. U svijetlu navedenih injenica nije preporučljivo konzumiranje hrane bogate treslovinama u većim količinama.

Istraživanja provedena na miševima i štakorima ukazuju na mutageničnu i kancerogeničnu aktivnost treslovina (Stolz, 1982). Betelov (areka) orah koji sadrži 11-26% treslovina povezuje se s pojavom karcinoma obrazu 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 konzumacije ajeva i pojave karcinoma želuca, pluća i bubrega. S druge strane nije se da utjecaj okoline, zanimanje, pušanje 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 antikancerogeničnu aktivnost treslovina. Dobro je istražen inhibitorni učinak zelenog ajeva na tvorbu karcinoma. Novijim istraživanjima ustanovljeno je da catechini (flavan-3-oli) u

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

Smatra se da treslovine smanju 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 odre enom koncentracijskom rasponu treslovine pokazuju antikancerogenu aktivnost, dok u koncentracijama izvan tog raspona djeluju kao promotori tumoroznih aktivnosti (Chung i sur., 1998).

Treslovine pokazuju i antialergijske u inke, 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 inhibiraju e na 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 u inak treslovina na taj virus (Nonaka i sur., 1990). Mali broj radova odnosi se na djelovanje treslovina na biljne virusse, 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 u inak 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 njihovoju ulozi u biljkama

Flavonoidi su grupa od oko 4000 prirodnih spojeva sveprisutnih u biljaka. Široko su rasprostranjeni u golosjemenjača i kritosjemenjača, rjeđe kod mahovina i papratnjača, 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 najviše nema. Porodice *Fabaceae* i *Asteraceae* posebno su bogate flavonoidima (Rusak, 1991).

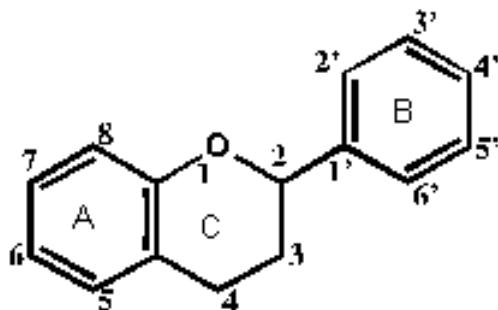
Biološka uloga flavonoida u biljkama je raznolika. Najpoznatija i najbolje istražena je uloga ovih spojeva kao biljnih pigmenata. Ovdje se posebno ističu antocijani odgovorni za modru, grimiznocrvenu i ljubiastu boju mnogih cvjetova i plodova koje privlače biljne oprašivače (Denffer i Ziegler, 1991). 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 biljnem svijetu prisutni preko jedne milijarde godina (Di Carlo i sur., 1999). Naučnost 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 iji osnovni skelet ini 2-fenilbenzo[]piran ili flavanski kostur koji ine dva benzenska prstena (A i B) me usobno povezana heterocikli kim prstenom C (slika 3.,Cushine i Lamb, 2005)



Slika 3. Osnovni skelet flavonoida

Raznolikosti flavonoidnih spojeva uvjetovana je prisutnoš u razli itih supstituenata na benzenskim prstenovima, stupnjem oksidacije heterocikli kog prstena C te položajem vezanja benzenskog prstena B na prsten C. Tako razlikujemo izoflavone, flavone, flavonole, flavanonole, flavanone, antocijanidine i flavanole (catechine).

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

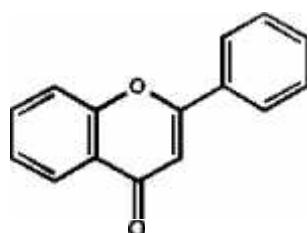
Na osnovni flavonoidni skelet mogu biti vezane hidroksilne, kisikove i metilne skupine i one su podložne kemijskim reakcijama glikozilacije, metilacije, hidrogenacije i sulfatacije. Flavonoidi koji imaju za sebe vezanu jednu ili više še ernih komponenti nazivaju se glikoziliranim flavonoidima. Dakle,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

Flavonoidni spojevi imaju različite tendencije ka stvaranju glikozida. U biljkama se uglavnom pojavljuju u glikoziliranom obliku - napose antocijanini 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. Najčešće se javljaju kao O-glikozidi pri čemu se še er najčešće veže na položaju 3 prstena C (Rusak, 1991).

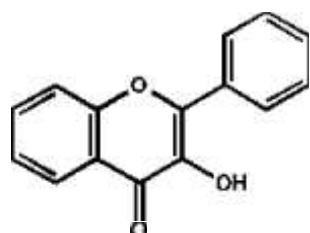
Brojna istraživanja upućuju na zaključak da većinale razlike u kemijskoj strukturi flavonoida doprinose bitnoj razlici u njihovim biološkim učinkima. Tako su provedena istraživanja antioksidativnih svojstava, kao i utjecaja na proliferaciju i ciklus HL-60 stanica (human acute leukemia cells) nekih strukturno srodnih flavonoida (kvercetina, miricetina, kempferola, izoramnetina, metilkvercetagetačina i taksofolina). Kvercetin, miricetin, kempferol i izoramnetin pokazali su se djelotvornima u inhibiciji umnožavanja HL-60 stanica, za razliku od metilkvercetagetačina i taksofolina, što upućuje na injenicu da je za citostatsko djelovanje flavononoida važno prisustvo C2-C3 dvostrukih veza i 6-hidroksilne skupine. Nasuprot tome, prisustvo 6-hidroksilne skupine pokazalo se kao nepovoljno strukturalno svojstvo za antioksidativnu i inkovitost flavonoida. Najsnažnije 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.)

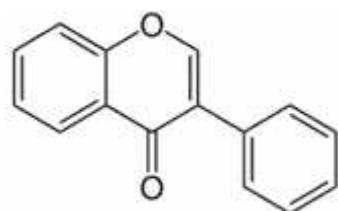
Slika 4. Osnovne kemijske strukture nekih skupina flavonoida



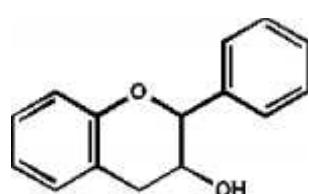
flavon



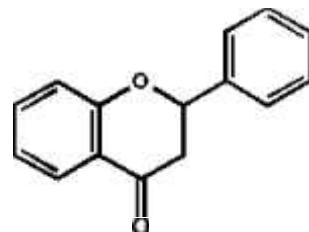
flavonol



izoflavon



flavanol (catechin)



flavanon

1.2.2.3. Biološki učinci flavonoida

Flavonoidni spojevi predstavljaju važan imbenik u svakodnevnoj ljudskoj prehrani. Nalazimo ih u voću (u citrusima ima i do 1% svježeg materijala) i povrću, a prisutni su i u crvenom vinu, aju, kavi, propolisu i medu, te se pretpostavlja da ovjek 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 krvožilni sustav zabilježeno je još 1936. godine kada je dokazan antihemoragični učinak spoja citrina izoliranog iz limunovog soka (Kuhnau, 1976). Flavonoidi su nađeni 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 koji se može razvrstati u nekoliko osnovnih pravaca:

- Djelovanje na srce i krvožilni sustav što je 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 što je u vidu antialergijskog, antiastmatičnog, antiinflamatornog i antiosteoporotičnog djelovanja (Kuhnau, 1976).
- Djelovanje na razini stanica usmjereni 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 općenito

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 (Werma 1973; French i sur. 1991; French i Towers 1992), virusom prstenaste pjegavosti raj ice (Malhotra i sur., 1996) i virusom grmolike kržljavosti 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 (kvercetina, miricetina, apigenina, naringenina i viteksina) 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 ina *Chenopodium amaranticolor* inficiranih virusom mozaika duhana, a kvercetin na listovima doma ina *Datura stramonium* L. inficiranih istim virusom. Lokalne lezije na listovima doma ina *Chenopodium amaranticolor*, ali nešto manje u inkovito, reducirane su i apliciranjem naringenina, dok se apigenin i miricetin nisu pokazali u inkovitima. Protuvirusni u inak u slučaju kvercetin / *Datura stramonium* L. sugerira da djelotvornost virusne inhibicije ovisi o načinu aplikacije flavonoida kao i o sistemu flavonoid - virus – doma in (Krcatović 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 induciranih 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, sistemi na strukturalnu rezistenciju, 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 većinom 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 kvercetina na X-virus krumpira (French i Towers, 1992.), na virus prstenaste pjegavosti rajice (Malhotra i sur., 1996.), na virus grmolike kržljavosti rajice (Rusak i sur., 1997.), te na virus mozaika krastavca (Rusak i sur., 2007.) Flavonoidi kvercetin i viteksin inhibiraju virus mozaika duhana (Krcatović i sur., 2008.). Odgovaraju ih podataka o sintezi tih tvari kod inficiranih biljaka je malo (Sohal i Bajal, 1993.)

U sklopu ovog diplomskog rada prvenstvena 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 domaćini. Sistemi ni su simptomi odraz sveopće 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).

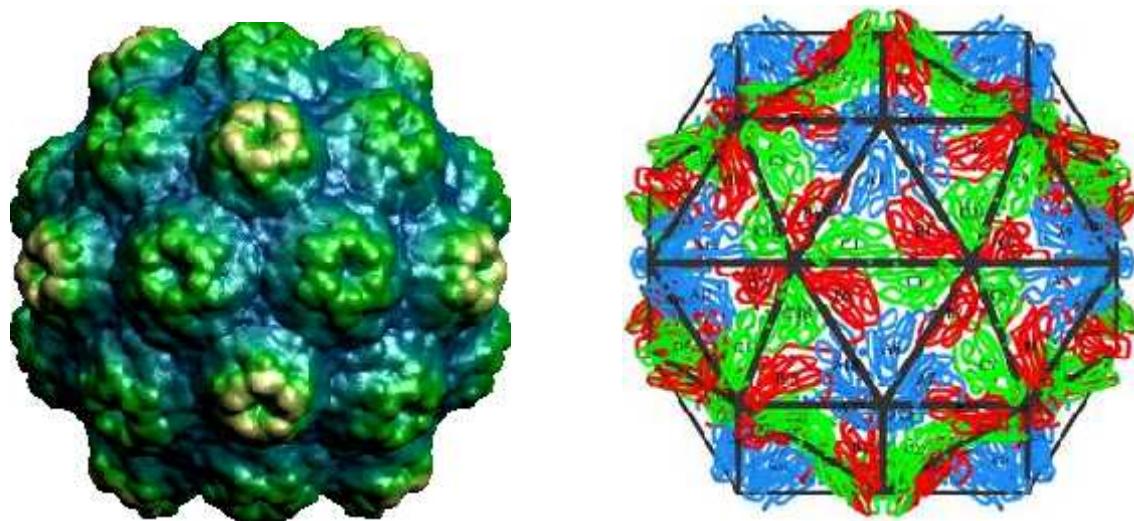
2.1.2. Biološke značajke virusa žutog mozaika postrne repe

(turnip yellow mosaic virus – TYMV)

Virus žutog mozaika postrne repe tip je predstavnik roda timovirusa (tymovirus), koji naziv potječe 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 zaštićena je unutar kapside. raspored proteinskih podjedinica u kapsidi određuje tip simetrije virusne estice. Estice TYMV-a su izometrične, 29.2-31.8 nm u promjeru (ICTV db, 2006). Kapside izometrične (poliedri) nih virusa imaju oblik pravilnog poliedra (ikozadera) za koji je karakteristично da ima 20 jednakih ploha u obliku istostranih 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 graeni su od tri proteinske podjedinice koje se agregiraju u kapsomere (Juretić, 2002). Kapsula TYMV-a graena 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 database)

Genom virusa žutog mozaika postrne repe je jednodijelan i ini 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 stalosti 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 R_o, 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 *Psylloides*) 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 domaćine, uključujući i vršni meristem, no najvišu koncentraciju dosežu u listovima (ICTVdb, 2006).



Slika 6. Mozaik na sistemi no zaraženim listovima vrste *Brassica rapa* L. uzrokovan virusom žutog mozaika postrne repe (snimila Marijana Juren)



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

Virusi uzrokuju promjene u biljnoj stanici prije nego se inficirana stanica mijenja fiziološki, što se odražava u anatomskoj, histološkoj i morfološkoj strukturi biljke. Sistemi niz simptomi virusne bolesti odraz su sveopće infekcije biljke prije nego se virus smjesti po etne infekcije iz inokuliranih listova širi na cijatu biljku. *Brassica rapa* L. i *Brassica pekinensis* Rupr. pokazuju sveobuhvatne simptome u obliku mozaika na listovima, prije nego se žuti kastozeleni 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. Tamnozelena područja u mozaiku sadrže mnogo manje virusa (ili ga uopće ne sadrže) 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 cvjetae (*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 poslijednji 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 ekstrahiru se sa 80 mL 30%-tnog metanola, na kipu oj vodenoj kupelji uz povratno hladilo, oko 15 minuta. Nakon hlađenja ekstrakt se filtrira kroz vatku u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake s 30 %-tним 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 mu ka 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 izračunavanje 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 mjerjenje 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 na injetu 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. Prije enoje 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 kojega se prvih 5 mL baciti. 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 odmjerenu 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 prije enog 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 prije ene otopina za mjerjenje kao kod baždarne krivulje.

Od svakog uzorka na injetu je ekstrakcija od koje su na injetu po tri mjerjenja koja su nam dala srednju vrijednost apsorbancije.

Na temelju izmjerenih apsorbancija (srednja vrijednost triju mjerjenja) računa 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 apsorbancija. Na osnovi tih mjerjenja izračunata je koncentracija ukupnih polifenola. Dio otopine mu kaže na mu kalici sa kazeinom, pri čemu se treslovine vežu na kazein. Na osnovi razlika u apsorbanciji prije i nakon tog vezanja dobivena je vrijednost sadržaja treslovina u ispitivanim uzorcima.

Količina ukupnih polifenola i treslovina izračunata je pomoću baždarnog pravca. Uzorcima sakupljenim 48, 72, te 96 sati nakon inokulacije listova virusom TYMV-D1 izmjerena je apsorbancija, kao i uzorcima sakupljenim u periodu razvijene infekcije (15., 21., 28., te 35 dan poslije inokulacije). Za svaki uzorak izvršena su najmanje tri mjerjenja, a za izračun je uzeta srednja vrijednost apsorbancije. 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. Mjerjenja 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 mjerjenja prikazani su tablicom i u obliku grafičkog prikaza, radi bolje preglednosti. U tablicama 1, 2 i 3 prikazani su rezultati triju mjerjenja 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 mjerjenja za vrstu *Brassica pekinensis* Rupr.

Kod listova vrste *Brassica rapa* L. sakupljenih 48 sata nakon inokulacije prvim je mjerjenjem dobiven gotovo isti sadržaj ukupnih polifenola u inficiranim biljkama (11,53%) u odnosu na kontrolne biljke (11,58%). Drugo i treće mjerjenje u istom periodu također je pokazalo da je količina ukupnih polifenola u listovima inficiranih biljaka približno jednaka (1,99% u drugom, te 2,5% u trećem mjerenu) kao i u kontrolnih biljaka (1,93% u drugom, te 2,46% u trećem mjerenu), kao što je prikazano u tablicama 1, 2 i 3. Sadržaj treslovina, pak, u istom periodu nešto je veći u listovima inficiranih biljaka u odnosu na kontrolne biljke, što pokazuju sva tri mjerena (tablice 1, 2, i 3).

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 mjerena. 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 značajnije raste u odnosu na kontrolne biljke (prvim je mjerjenjem izrađen sadržaj od 17,68% u listovima inficiranih biljaka u odnosu na 11,21% u listovima kontrolnih biljaka, u drugom mjerenu sadržaj ukupnih polifenola u listovima inficiranih biljaka iznosi 2,04%, a u listovima kontrolnih biljaka 1,87%, dok su treći im mjerjenjem 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 veća je količina treslovina u listovima inficiranih biljaka u odnosu na kontrolne biljke (u prvom mjerenu izrađen je sadržaj treslovina od 0,9% u listovima inficiranih biljaka u odnosu na 0,53% u listovima kontrolnih biljaka, u drugom mjerenu inficirane biljke sadrže 0,29% treslovina, a kontrolne

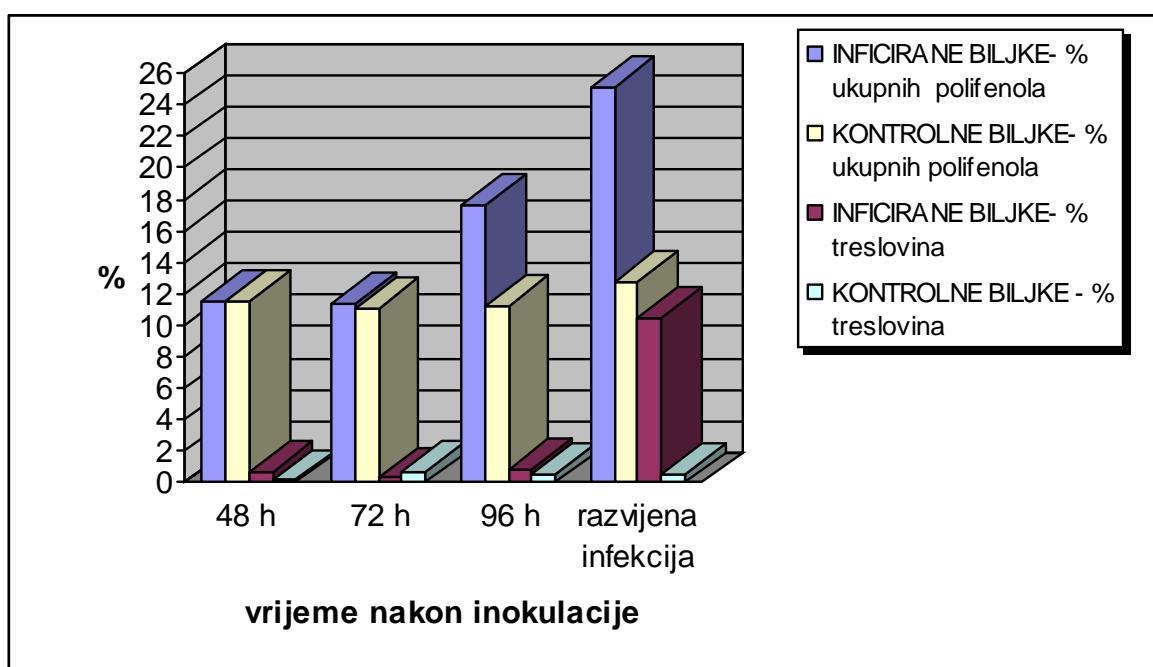
0,17%, dok su tre im mjerjenjem dobiveni rezultati od 0,4% treslovina u listovima inficiranih, te 0,14% u listovima kontrolnih biljaka).

U periodu razvijene infekcije prvim mjerjenjem dobiven je dvostruko veći sadržaj ukupnih polifenola u listovima inficiranih biljaka (25,12%) u odnosu na kontrolne biljke (12,8%) (tablica 1), a slijedi tendenciju pokazuju i rezultati drugog i trećeg mjerjenja (tablica 2 i 3). Količina treslovina u istom periodu znatno je veća u listovima inficiranih nego kontrolnih biljaka (u prvom mjerjenju sadržaj treslovina iznosi 10,48% u listovima inficiranih biljaka u odnosu na 0,53% u listovima kontrolnih biljaka, u drugom mjerenu listovi inficiranih biljaka sadrže 0,39% treslovina, a kontrolnih 0,18%, dok su tre im mjerjenjem 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 |

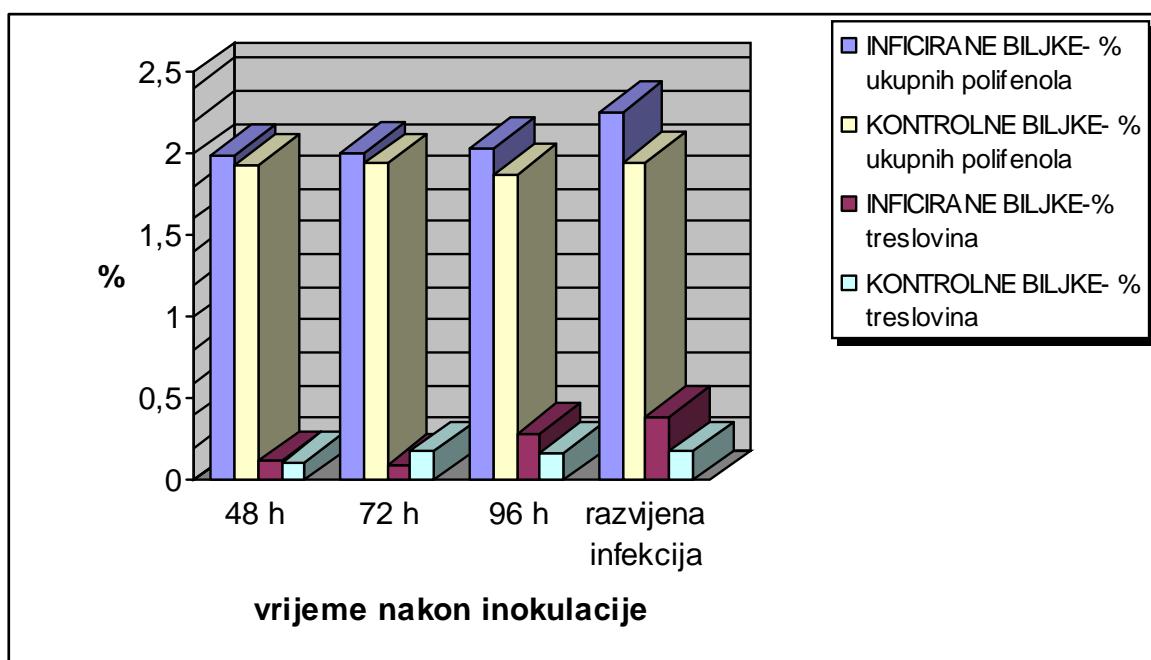
Slika 8. Grafički prikaz sadržaja ukupnih polifenola i treslovina (% suhe tvari) u listovima vrste *Brassica rapa* L. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe i u listovima kontrolnih biljaka iste vrste (1.mjerenje)



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.mjerjenje)

| 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 |

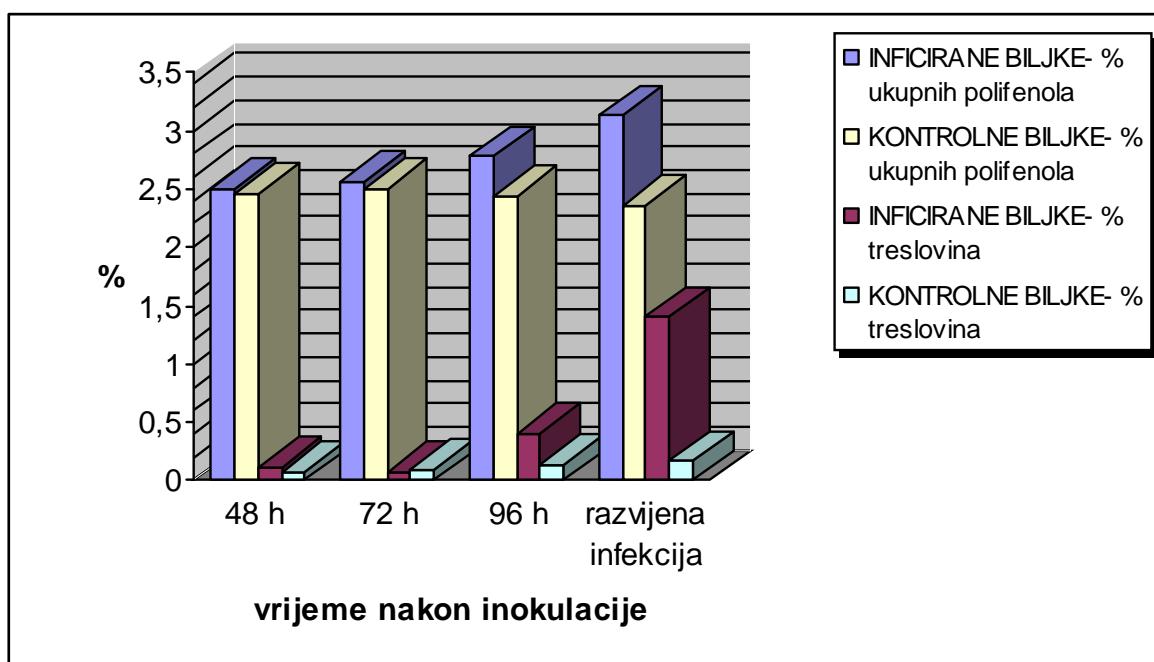
Slika 9. Grafi ki prikaz sadržaja ukupnih polifenola i treslovina (% suhe tvari) u listovima vrste *Brassica rapa* L. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe i u listovima kontrolnih biljaka iste vrste (2.mjerjenje)



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.mjerjenje)

| 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. Grafički 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.mjerjenje)



Kod uzoraka vrste *Brassica pekinensis* Rupr. sakupljenih 48 sati nakon inokulacije prvim je mjerljivom 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 mjerljivo pokazali da je koliina ukupnih polifenola u listovima inficiranih biljaka gotovo ista (2,8% u drugom, te 2,82% u trećem mjerljivom) kao i u kontrolnih biljaka (2,73% ukupnih polifenola dobiveno je drugim i trećim mjerljivom), što je prikazano u tablicama 4, 5 i 6. Sadržaj treslovina u istom periodu veće je u listovima inficiranih biljaka u odnosu na kontrolne biljke, što pokazuju sva tri mjerljiva.

Kod uzoraka sakupljenih 72 sata nakon inokulacije nastavlja se tendencija rasta koliina ukupnih polifenola u listovima inficiranih biljaka u odnosu na kontrolne biljke što pokazuju sva tri mjerljiva. 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 mjerljivih, dok treće mjerljivo daje nešto veće koliinu treslovina u listovima inficiranih biljaka u odnosu na kontrolne biljke.

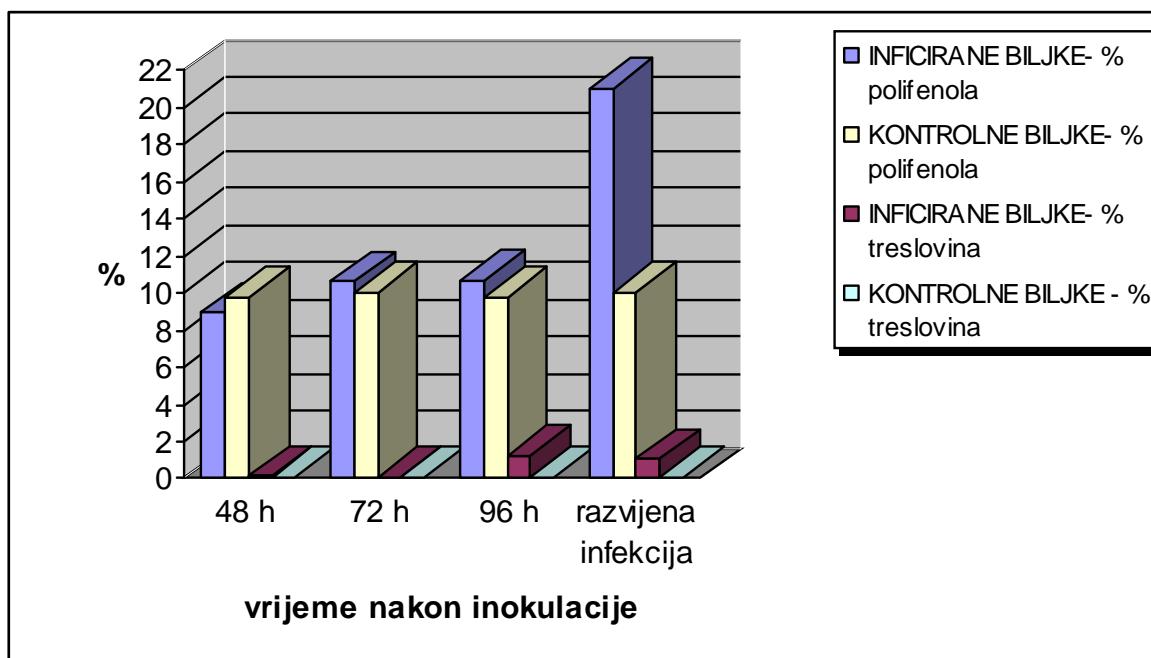
U periodu od 96 sati nakon inokulacije sva tri mjerljiva ukazuju na veće koliinu ukupnih polifenola, kao i veće koliinu treslovina u listovima inficiranih biljaka u odnosu na kontrolne biljke. Ova pojava postaje izraženija u periodu razvijene infekcije kada prvo mjerljivo pokazuje da je koliina ukupnih polifenola u listovima inficiranih biljaka (20,99%) dvostruko veće (tablica 4) nego u kontrolnih biljaka (9,99%, tablica 4). Na značajan porast ukupnih polifenola u inficiranim biljkama ukazuje i drugo i treće mjerljivo. Koliina treslovina takođe je znatno veće u listovima inficiranih biljaka (u prvom mjerljivom izraženju je sadržaj treslovina od 1,07% u listovima inficiranih biljaka u odnosu na 0,08% u kontrolnih biljaka, u drugom mjerljivom listovi inficiranih biljaka sadrže 0,49%, a kontrolnih 0,35% treslovina, dok su treće mjerljivom dobiveni rezultati od 1,28% treslovina u listovima inficiranih, te 0,44% u listovima kontrolnih biljaka.) Odstupanja u prvom mjerljivom koliina 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 mjerenu.

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 |

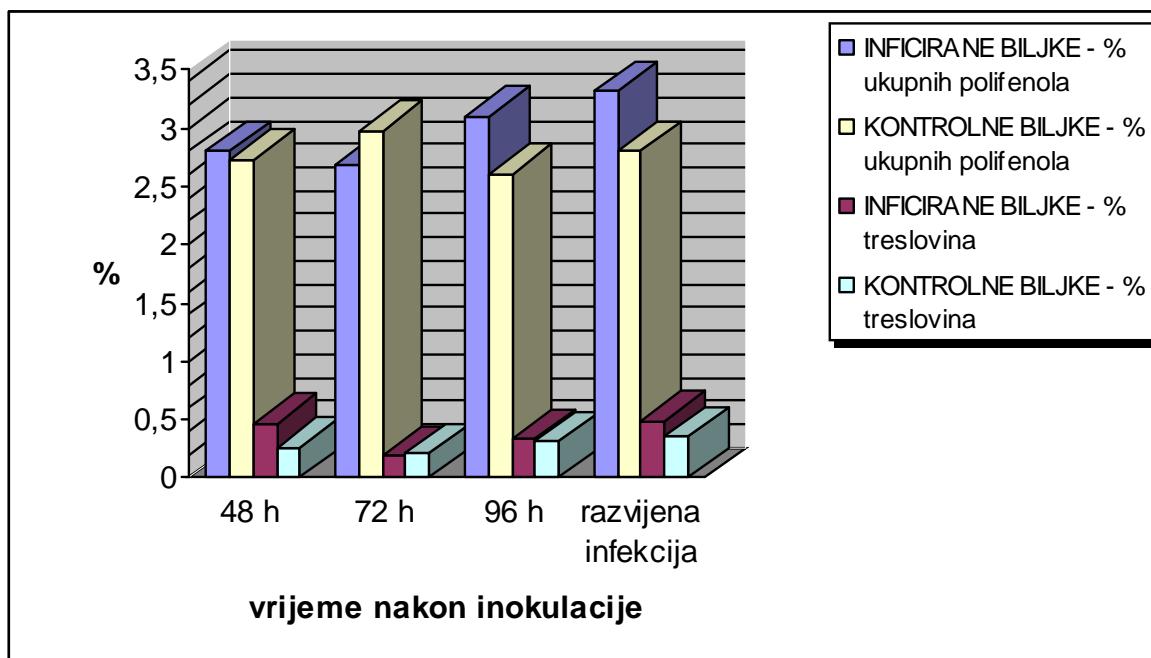
Slika 11. Grafi ki prikaz sadržaja ukupnih polifenola i treslovina (% suhe tvari) u listovima vrste *Brassica pekinensis* Rupr. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe i u listovima kontrolnih biljaka iste vrste (1.mjerenje)



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.mjerjenje)

| VRIJEME NAKON INOKULACIJE | % UKUPNIH POLIFENOLA | | % TRESLOVINA | |
|---------------------------------|--|---------------------|--|---------------------|
| | BILJKE INFICIRANE VIRUSOM TYMV-D1 | KONTROLNE BILJKE | BILJKE INFICIRANE 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 |

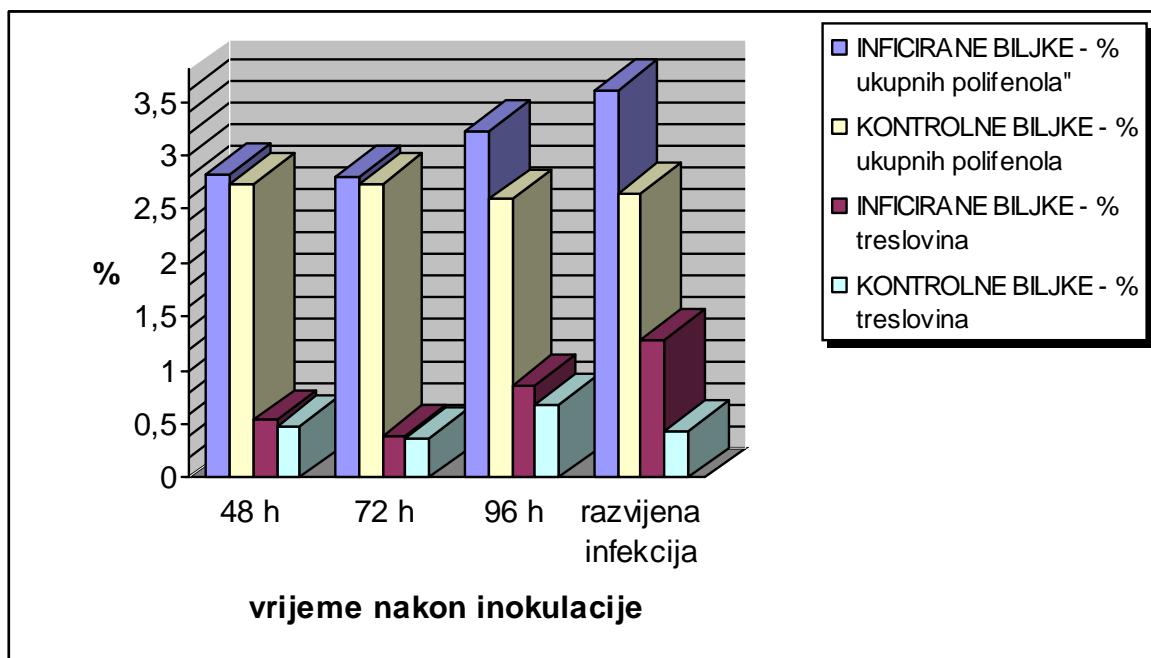
Slika 12. Grafi ki prikaz sadržaja ukupnih polifenola i treslovina (% suhe tvari) u listovima vrste *Brassica pekinensis* Rupr. inficiranih virusom žutog mozaika postrne repe i u listovima kontrolnih biljaka iste vrste (2.mjerjenje)



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.mjerjenje)

| VRIJEME NAKON INOKULACIJE | % UKUPNIH POLIFENOLA | | % TRESLOVINA | |
|---------------------------------|--|---------------------|--|---------------------|
| | BILJKE INFICIRANE VIRUSOM TYMV-D1 | KONTROLNE BILJKE | BILJKE INFICIRANE 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.mjerjenje)



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 izrađena je pomoću baždarne krivulje. 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, na injekciju su po tri mjerena, na osnovi kojih je dobivena srednja vrijednost apsorbancije. Na temelju te vrijednosti izrađena je maseni udio ukupnih flavonoida.

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

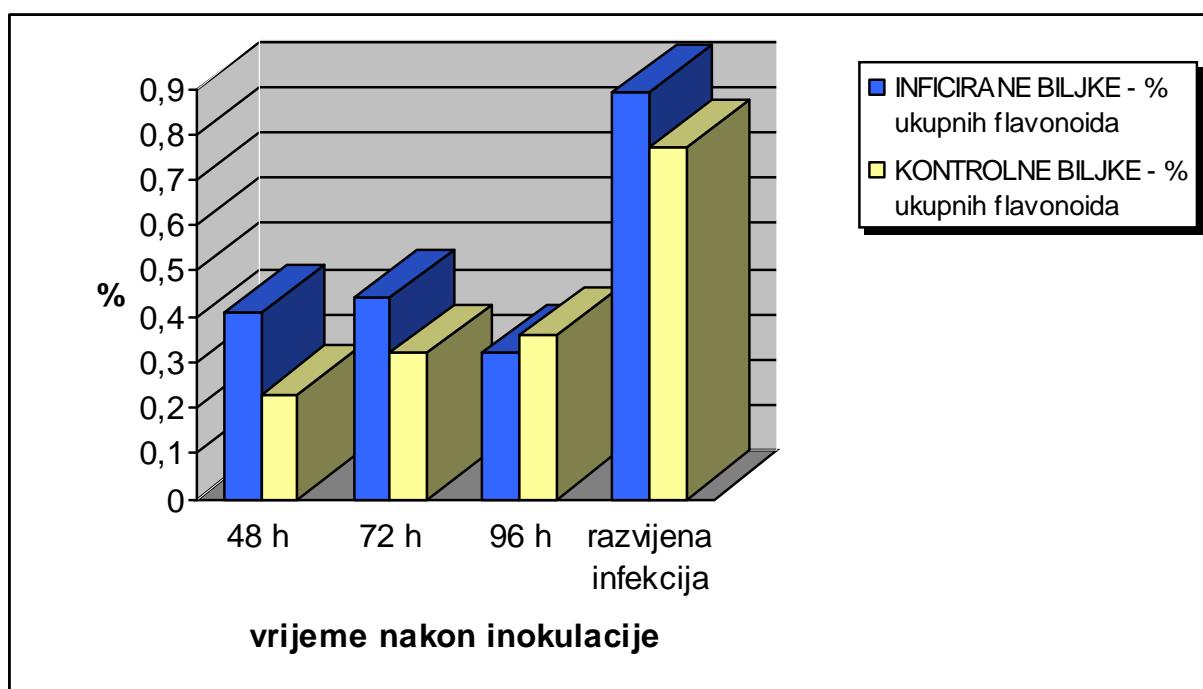
U periodu 96 sati nakon inokulacije količina ukupnih flavonoida u listovima inficiranih biljaka nešto je manja (0,32%, tablica 7) u odnosu na kontrolne biljke (0,36%, tablica 7).

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).

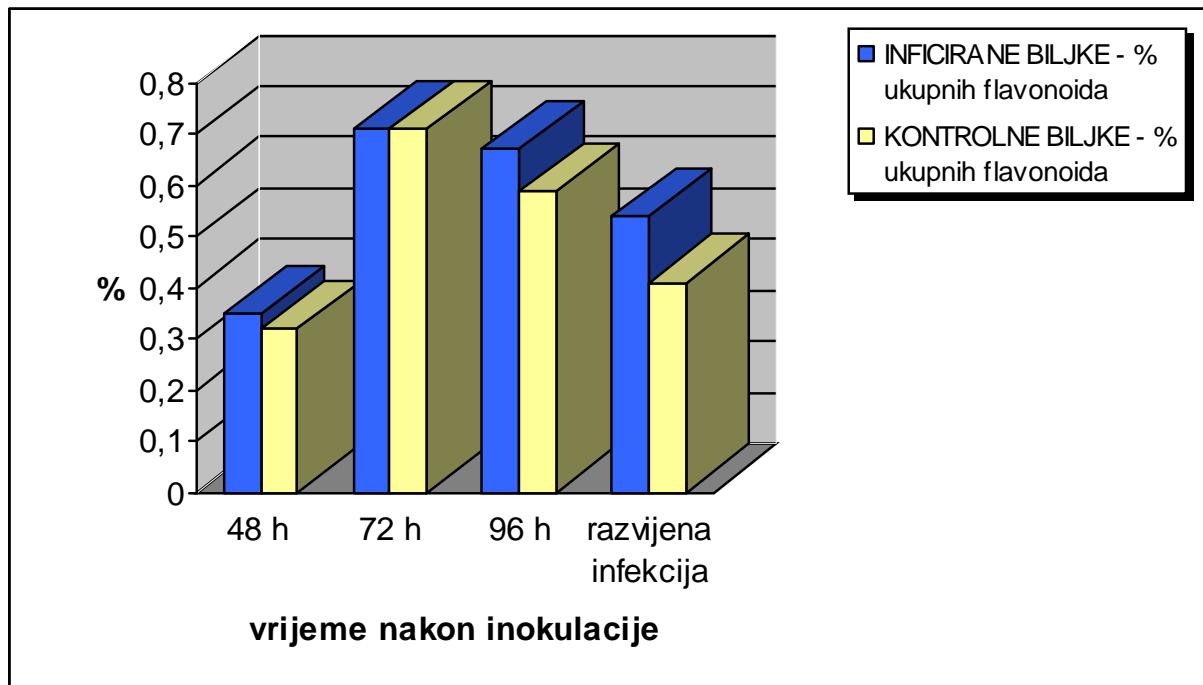
Sadržaj ukupnih flavonoida u listovima inficiranih biljaka sakupljenim u periodu 96 sati nakon inokulacije (0,67%, tablica 8) nešto je veći od sadržaja ukupnih flavonoida u listovima kontrolnih biljaka sakupljenim u istom periodu (0,59%, tablica 8).

Najveći 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 INFICIRANE 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 u inci treslovina i flavonoida prouavaju se dugi niz godina. Njihova prisutnost u ljekovitim biljkama korištenim u narodnoj medicini, te širok spektar bioloških aktivnosti i pozitivnih u inaka 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 induciranog 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, sistemi naštene rezistencija, definirana kao povećana otpornost na bolest neinficiranih dijelova biljke nakon napada patogena (Silverman i sur., 2005.). SAR se estijavlja kao reakcija na hipersenzitivni odgovor (HR) biljke na napad patogena. HR je aktivni odgovor biljke u kojem biljka prepoznaže patogen i pokreće kaskadu događaja kojima ograničava patogen na inicijalno mjesto infekcije, a esti kulinira 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 u inak flavonoida posredovan indukcijom sinteze salicilne kiseline, te se temelji na nekim procesima srodnim sistemi nastenjenoj 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. Zamjene 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. Zamjene 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. ZAKLJU AK

5. ZAKLJU AK

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

Kvantitativnim odreivanjem 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. već 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 već 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 najujednosteniji rezultati za obje ispitivane vrste koji upućuju na znatan 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., Ruscetti, 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 taninns – Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*, 68, 2713-2721

Hayashi, K., Otsuka, H., Takeda, Y. (1997): Antiviral activity of 5,6,7-trimethoxyflavone and it's 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/>

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

Katalini , V. (1997): Odre ivanje biljnih tanina primjenom SPE i UV-VIS tehnike. Izvornik: Sažeci XV. hrvatskog skupa kemiara 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

Krcatovi , E., Rusak, G., Bezi , N., Kraja i , 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., Kilkuskić, R. E., Cheng Y. C., Lee, K. H. (1990): Anti AIDS agents 2. Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase 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 cellular 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 quercetagrin 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

Stoltz, 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 database,developed in the Australian National University
by Gibbs, A.J.

http://viperdb.scripps.edu/info_page.php?VDB=1w39