

# Inhibicija virusa TBSV ekstraktima kalusa vrste *Centaurea rupestris* L.

---

Juren, Marijana

Master's thesis / Diplomski rad

2011

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:217:745525>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Marijana Juren

INHIBICIJA VIRUSA TBSV EKSTRAKTIMA KALUSA VRSTE  
*CENTAUREA RUPESTRIS* L.

Diplomski rad

Zagreb, 2011.

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

Posebna zahvala na beskrajnom strpljenju mojim mentoricama prof. Mirni Ćurković Perica i prof. Gordani Rusak.

Sa zahvalom se prisjećam i svih djelatnika Botaničkog zavoda s kojima sam na bilo koji način surađivala, posebno Darinki Kajić na praktičnim savjetima.

Veliko hvala svim mojim prijateljima koji su me svakodnevno tjerovali i nisu dozvolili da pomislim na odustajanje od završetka studija. Hvala, mojoj Žeži koja mi je bila „srodna duša“ u svim trenucima slabosti, mojoj obitelji koja je imala strpljenja, posebno Tari, Tiboru i Siniši koji su mi bili najjači motiv.

Veliko, veliko hvala svima!

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

Inhibicija virusa TBSV ekstraktima kalusa vrste *Centaurea rupestris* L.

Marijana Juren

Biološki odsjek PMF-a  
Roosveltov trg 6, Zagreb

U ekstraktima cvjetova i listova vrste *Centaurea rupestris* L. već je ranije dokazano prisustvo flavonoida. Ekstrakti cvjetova i listova kao i flavonoid kvercetagetin 3'-metileter-7-O- $\beta$ -D-glukopiranozid izoliran iz cvjetova vrste *C. rupestris* već su pokazali protuvirusni učinak na virus grmolike kržljivosti rajčice, *Tomato bushy stunt virus*, (TBSV). U ovom je radu spektrofotometrijski određen sadržaj flavonoida u tkivima vrste *C. rupestris* uzgojenim *in vitro* na hranidbenoj podlozi s različitim koncentracijama nutrijenata i biljnih regulatora rasta. Sadržaj flavonoida izmjeren u tkivima bio je manji od sadržaja flavonoida u cvjetovima i listovima biljaka sa prirodnog staništa. Ekstrakti tkiva uzgojenih *in vitro* imali su protuvirusni učinak na TBSV, ali je taj učinak bio slabiji od učinka ekstrakta cvijeta.

(40 stranica, 10 slika, 5 tablica, 38 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: endem, flavonoidi, protuvirusna aktivnost

Mentor: dr. sc. Mirna Ćurković Perica, izv. prof.

Suvoditelj: dr. sc. Gordana Rusak, izv. prof.

Ocjenjivači: dr. sc. Draginja Mrvoš Sermek, doc., dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.

Rad prihvaćen: 09. 11. 2011.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

Inhibition of TBSV infection using extracts of *Centaurea rupestris* L. calli

Marijana Juren

Department of Biology  
Roosveltova trg 6, Zagreb

In extracts of *Centaurea rupestris* L. flowers and leaves, the presence of flavonoids has already been proven. Those extracts, along with the flavonoid kvercetaetin 3'-methyl-7-O- $\beta$ -D-glucopyranosid, which was isolated from flowers of *C. rupestris*, have demonstrated the antiviral activity against *Tomato bushy stunt virus* (TBSV). In this paper the content of flavonoids was spectrophotometrically determined in tissues of *C. rupestris* propagated *in vitro*, on medium supplemented with different concentrations of nutrients and plant growth regulators. The content of flavonoids measured in tissues grown *in vitro* was lower than the flavonoid content in flowers and leaves of naturally-growing plants. The antiviral activity of extracts from *in vitro* grown tissues against TBSV was confirmed, but it was weaker than the antiviral activity of flower extract.

(40 pages, 10 figures, 5 tables, 38 references, original in: croatian)

Thesis deposited in the Central biological library

Key words: antiviral activity, endem, flavonoids

Supervisor: Dr. Mirna Ćurković Perica, Assoc. Prof.

Cosupervisor: Dr. Gordana Rusak, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Draginja Mrvoš Sermek, doc., Dr. Ines Radanović, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 9<sup>th</sup> September, 2011.

# SADRŽAJ:

## 1. UVOD

1.1. Flavonoidi, <i>Centaurea rupestris</i> L. i <i>Tobamo bushy stunt virus</i> kao modeli u istraživanju.....	1
1.2. Morfološke karakteristike vrste <i>Centaurea rupestris</i> L.....	3
1.3. Općenito o flavonoidima.....	5
1.4. Kemijska struktura flavonoida.....	7
1.5. Biološki učinci flavonoida .....	11
1.6. Flavonoidi vrste <i>Centaurea rupestris</i> L. ....	13
1.7. <i>Tobamo bushy stunt virus</i> (TBSV).....	14

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA ..... 16

## 3. MATERIJAL I METODE

### 3.1. Materijal ..... 17

### 3.2. Metode ..... 17

3.2.1. Uzgoj biljnog materijala u kulturi tkiva ..... 17

3.2.2. Kvantitativno određivanje sadržaja ukupnih flavonoida ..... 18

#### 3.2.3.

Perkolacija..... 19

3.2.4. Inokulacija virusa TBSV i mjerenje učinka ekstrakata vrste *C. rupestris* L. na virus ..... 19

## 4. REZULTATI

4.1. Sadržaj flavonoida u izdancima i kalusima vrste *Centaurea rupestris* L. uzgojenim u kulturi tkiva ..... 22

4.2. Inhibicija virusa grmolike kržljivosti rajčice (TBSV) ekstraktima kalusa, izdanaka, korijena i cvijeta vrste *Centaurea rupestris* L. ... 24

## 5. RASPRAVA ..... 31

## 6. ZAKLJUČAK ..... 34

## 7. LITERATURA ..... 35

**Popis korištenih kratica:**

1. IAA – indol-3-octena kiselina
2. IBA – indol-3-maslačna kiselina
3. BAP – benzilaminopurin
4. NAA –  $\alpha$ -naftalenoctena kiselina
5. 2,4 – diklorofenoksiocena kiselina
6. K – kinetin
7. NST – 2-aminoetil-difenilborinat
8. PEG – polietilen glikol
9. NST/PEG - modificirani „Naturstoff“ reagens



### **1.1. Flavonoidi, *Centaurea rupestris* L. i *Tobamo bushy stunt virus* kao modeli u istraživanju**

Flavonoidi spadaju u skupinu biljnih fenola i u biljnom su svijetu prisutni stotinama milijuna godina (Di Carlo i sur., 1999). Ti su spojevi prisutni u svim višim biljkama i to u svim njihovim dijelovima (Harborne i Williams, 2000). Zbog tako velike zastupljenosti u biljnom svijetu pripisuje im se i velika evolucijska važnost u razvoju i očuvanju biljaka. Flavonoidi privlače veliki interes istraživača koji proučavaju njihove biokemijske i biološke učinke na ljudsko zdravlje već desetljećima. U velikoj mjeri se proučava uloga flavonoida u biljnom organizmu, njihovo djelovanje na druge organizme, životinje i čovjeka, njihova zastupljenost i uloga u prehrani čovjeka, no i uloga flavonoida u kemotaksonomiji, budući se saznanja o sastavu flavonoida u različitim biljnim vrstama mogu koristiti u biljnoj sistematici i evoluciji (Kuhnau, 1976; Berhow i Vaughn, 1999; Di Carlo i sur., 1999; Nijveldt i sur., 2001).

Poznat je čitav niz pozitivnih učinaka flavonoida na ljudski organizam, od djelovanja na srce i krvožilni sustav, protuupalnog i protualergijskog djelovanja, protutumorskog djelovanja, te protubakterijskog i protuvirusnog djelovanja (Di Carlo i sur., 1999; Rusak i sur., 2002; Rusak i sur., 2005). Novija istraživanja pokazuju da već i male razlike u kemijskoj strukturi flavonoida pokazuju različite biološke učinke (Durgo i sur., 2006).

Dobro su istraženi protuvirusni učinci flavonoida, no istraživanja se uglavnom odnose na inhibiciju animalnih virusa (Spedding i sur., 1989; Ono i sur., 1990; Baylor i sur., 1992; Nijveldt i sur., 2001). U posljednje vrijeme posebna je pozornost posvećena djelovanju flavonoida na virus ljudske imunodeficijencije HIV.

Manje se, dosad, istraživalo protuvirusno djelovanje flavonoida na biljnim virusima (French i sur., 1991; French i Towers, 1992; Rusak i sur.,

1997; Rusak i sur., 2007; Krcatović i sur., 2008), no to je i bio poticaj da se u ovom radu još jednom potvrdi mogućnost upotrebe flavonoida u borbi protiv biljnih virusa.

*Centaurea rupestris* L. endemična je vrsta koja raste na ograničenom području hrvatske obale. Pozornost istraživača već je desetljećima usmjerena na kemizam roda *Centaurea* s ciljem boljeg upoznavanja različitih spojeva prisutnih kod jedinki ovog roda te njihove moguće primjene u farmakoterapiji (Ahmed i sur., 1970; Oksuz i sur., 1988; Rusak i sur., 1993). S obzirom na velik taksonomski značaj (Hegnauer, 1964; 1977) i raznolikost u biološkim djelovanjima velik broj istraživanja odnosi se na flavonoide. Ekstrakti cvatova i listova vrste *Centaurea rupestris* korišteni su za istraživanje protuvirusne aktivnosti, te je dokazano snažno protuvirusno djelovanje na dvjema vrstama roda *Nicotiana* inficiranih virusom grmolike kržljivosti rajčice *Tomato bushy stunt virus*, (TBSV) (Rusak i sur., 1997). Nadalje, iz cvatova ove vrste izoliran je flavonoid 3,4',5,6,7-pentahidroksi-3'-metoksiflavon-7-O- $\beta$ -D-glukopiranozid, (kvercetagetin 3'-metileter-7-O- $\beta$ -D-glukopiranozid) te je dokazano njegovo protufungicidno, protubakterijsko i protufitovirusno djelovanje (Rusak i sur., 1993; 1997; 2002).

Uzevši u obzir navedeno kao i neistražena potencijalna djelovanja drugih flavonoida iz ove vrste, te činjenicu da je *Centaurea rupestris* L. ilirsko jadranski endem ograničene brojnosti na prirodnim staništima, daljnja su istraživanja usmjerena u pravcu uzgoja ove vrste u kulturi *in vitro*. Istraživane su mogućnosti njenog zakorjenjivanja i uzgoja u svrhu očuvanja ove vrste u slučaju smanjenja brojnosti na prirodnim staništima (Ćurković Perica, 2003), te u svrhu dobivanja dovoljne mase tkiva za daljnja istraživanja učinaka flavonoida. U ovom smo radu željeli istražiti sadržaj flavonoida u različitim tkivima biljke *Centaurea rupestris* L.

uzgojenim *in vitro* i usporediti ih sa sadržajem flavonoida u biljkama koje su rasle na prirodnom staništu.

## 1.2. Morfološke karakteristike vrste *Centaurea rupestris* L.

Rod *Centaurea*, uobičajenog naziva zečina ili različak, pripada porodici *Asteraceae* (glavočike). Porodica *Asteraceae* dijeli se u dvije potporodice *Cichorioideae* (glavočike jezičnjače) i *Asteroideae* (glavočike cjevnjače). *Centaurea rupestris* L. biljka je trajnica s valjkastim rizomom, visine 15-17 cm (slika 1). Stabljika je uspravna, vitka, nerazgranjena ili slabo razgranjena od sredine, a ogranci završavaju pojedinačnim glavicama, cvatovima. Cvjetovi su zlatno do limun žuti (slika 2). Vanjski cvjetovi glavice znatno su duži od unutrašnjih. Listovi involukruma brašnasto su maljav i završavaju tamnosmeđim trokutastim privjeskom koji je na vrhu šiljat i najčešće završava bodljom. Stabljika je prekrivena paučinastim dlakama. Listovi na donjem dijelu stabljike imaju peteljke i dvostruko su perasto razdijeljeni. Listovi na gornjim dijelovima stabljike sjedeći su i jednostruko perasto razdijeljeni. Plod roška olovno je siva, duga oko 4 mm, a papus je upola kraći od roške (Rusak, 1991).



**Slika 1.** *Centaurea rupestris* L. – cijela biljka  
(luirig.altervista.org)



**Slika 2.** *Centaurea rupestris* L. - cvat  
(calphotos.berkeley.edu).

Rod *Centaurea* sa oko 600 vrsta jedan je od vrstama najbogatijih rodova porodice *Asteraceae*. Pripadnici roda *Centaurea*, od kojih je velik broj endema, najvećim brojem vrsta nastanjuju područje Mediterana, od Kanarskih otoka do Iraka, prednje Indije i Egipta. Područje sjeverne Europe i Azije također je bogato vrstama koje pripadaju rodu *Centaurea*, dok u Sjevernoj i Južnoj Americi i Australiji obitava tek manji broj autohtonih vrsta i nešto veći broj vrsta koje su donesene iz Europe i Azije.

*Centaurea rupestris* L., obzirom na središte njena areala, tipičan je ilirsko-jadranski endem s eksklavom na Apeninskom poluotoku i južnom dijelu Balkanskog poluotoka (Rusak, 1991).

### 1.3. Općenito o flavonoidima

Sekundarne biljne metabolite dijelimo na terpene, alkaloide, fenole i poliamine. Ta je podjela zasnovana na razlikama u njihovoj kemijskoj strukturi i procesu biosinteze.

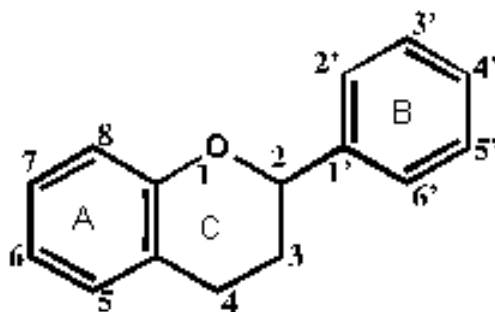
Flavonoidi ili bioflavonoidi, grupa su od oko 5000 prirodnih spojeva fenolnog karaktera koji u biljkama najčešće igraju ulogu pigmenta. Žuta boja (lat. flavus) prvih izoliranih spojeva dala je naziv čitavoj skupini iako ova prirodna bojila cvjetove i plodove boje i narančasto, za što su zaslužni antoksanтини. Ljubičaste, modre i grimiznocrvene boje za koje su zaslužni antocijani privlače mnoge biljne oprašivače (Denffer i Ziegler, 1991). Za privlačenje oprašivača zaslužni su i flavoni i flavonoli kojih dio apsorbira pri kraćim valnim duljinama od 400 nm, te su ljudskom oku nevidljivi, bezbojni, ali su vidljivi insektima.

Flavonoidi se ubrajaju u sekundarne produkte biljaka, te njihova uloga nije presudna u osnovnim metaboličkim procesima i za preživljavanje organizama koji ih proizvode kao što je to uloga primarnih produkata. Sekundarni metabolički produkti igraju bitnu ulogu u interakciji biljnih organizama s njihovim okolišem. Tu je i njihova uloga u privlačenju oprašivača, no flavonoidi imaju bitnu ulogu i u zaštiti biljaka od djelovanja UV zračenja i oksidansa, te su zaslužni za odgovor biljaka na biotički i abiotički stres. Osim toga djeluju kao inhibitori i regulatori brojnih enzima, kao ligandi metalnih iona, te kao prekursori nekih toksičnih spojeva. Imaju ulogu u procesima fotosinteze i morfogeneze, te biljkama pomažu u obrani od patogena i biljojeda (Di Carlo i sur., 1999). Flavonoidi su po brojnosti i zastupljenosti u biljnim organizmima jedna od najvećih skupina biljnih fenola. Prisutni su kod svih viših biljaka. Pronalazimo ih u plodovima, sjemenkama, stabljikama, listovima i cvjetovima voća i povrća, a najnovija istraživanja dokazala su njihovu nazočnost i u korijenu.

Pošto su sastavni dio mnogih plodova voća (u citrusima čine i do 1% svježeg materijala) i povrća, čine dio svakodnevne prehrane, a čest su sastojak i napitaka kao što su crveno vino, čajevi i kava. Prosječno se unosi oko jedan gram flavonoida u ljudski organizam dnevno (Di Carlo i sur., 1999). Ovi spojevi pronađeni su u ljekovitim biljkama koje se širom svijeta koriste u narodnoj medicini te su s tog aspekta značajni za životinje i čovjeka. No, jednako tako važni su i za normalan rast, razvoj i zaštitu biljnih organizama.

## 1.4. Kemijska struktura flavonoida

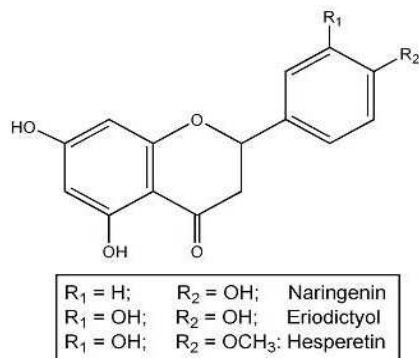
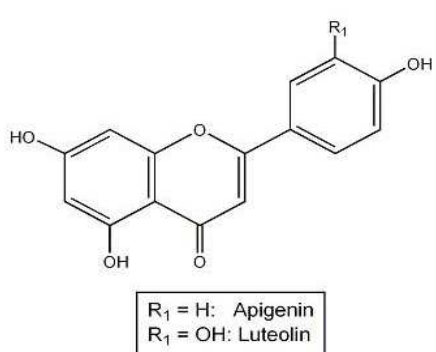
Flavonoidi su polifenolni spojevi čiji osnovni skelet čine dva benzenska prstena međusobno povezana fragmentom od tri ugljikova atoma koji u većine flavonoida zatvaraju heterociklički prsten (slika 3). Klasifikacija flavonoidnih spojeva temeljena je na prisutnosti različitih supstituenata na benzenskim prstenovima, na različitom stupnju oksidacije heterocikličkog prstena, kao i na položaju vezanja benzenskog prstena **B** s **C** – fragmentom. Kod većine flavonoida (flavoni, flavonoli, flavanoni i antocijanini) prsten B vezan je na položaju 2, kod izoflavonoida na položaju 3, te kod neoflavonoida na položaju 4 heterocikličkog prstena (Di Carlo i sur., 1999).



**Slika 3.** Osnovna struktura flavonoida.

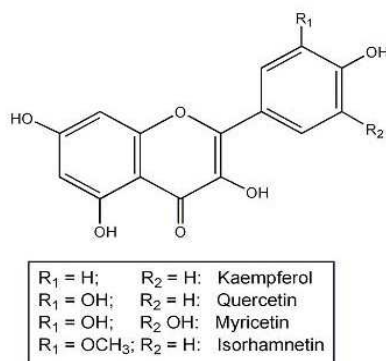
Flavonoidi se sintetiziraju u procesu šikiminske kiseline iz octene kiseline i fenilalanina. U šikimatskom metaboličkom putu nastaju aromatske aminokiseline, fenilalanin, triptofan i tirozin te brojni vitamini i kofaktori. Na fenilpropan, derivat cimetine kiseline, vežu se tri acetata te nastaje poliketid. Slijedi zatvaranje prstena, hidroksilacija i redukcija, te nastanak kalkonske jezgre koja je preteča nastanka svih ostalih flavonoida (Berhow i Vaughn, 1999). Slika 4. prikazuje kemijske strukture nekih skupina

flavonoida, dok su u tablici 1. prikazani supstituenti i njihova pozicija na benzenskom prstenu kod predstavnika pojedinih skupina flavonoida.

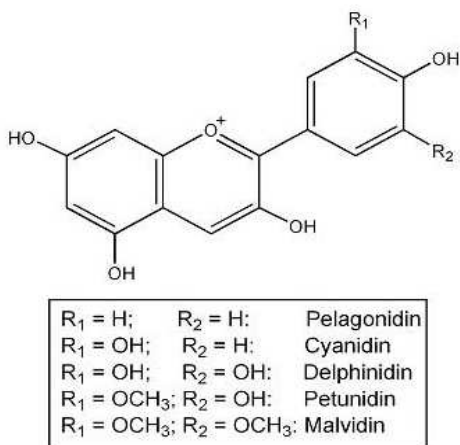


flavon

flavanon



flavonol



antocijanidin

**slika 4.** Kemijske strukture nekih skupina flavonoida.



**Tablica 1.** Neki predstavnici pojedinih skupina flavonoida.

flavonoidi	supstituent i pozicija					
	3	5	6	7	3'	4'
<b>FLAVONI</b>						
Apigenin		OH		OH		OH
Baikalein		OH	OH	OH		
Baikalin		OH	OH	$\beta$ -glukopiranuronosil		
<b>FLAVONOLI</b>						
Kvercetin		OH		OH	OH	OH
Kempferol		OH		OH		OH
Miricetin		OH		OH	OH	OH
Rutin	ramnozilglukozid	OH		OH	OH	OH
<b>FLAVANONI</b>						
Naringenin		OH		OH		OH
<b>FLAVANOLOLI</b>						
Taksifolin		OH		OH	OH	OH
<b>KATEHINI</b>						
Katehin		OH		OH	OH	OH
<b>IZOFLAVONOIDI</b>						
Genistein		OH		OH		OH

Flavonoidi su u biljkama prisutni u obliku slobodnih ili vezanih aglikona, glikozida ili metiliranih derivata. U tablici 2. prikazana je prisutnost flavonoida u određenim biljnim vrstama. Katehini i leukoantocijani dolaze u slobodnom (aglikonskom) obliku, dok antocijani dolaze u vezanom (glukonskom) obliku. U glikozidnoj formi na benzenske prstenove dolaze vezani razni šećeri kao što su: D-glukoza, D-galaktoza, D-ksiloza, L-ramnoza i rjeđe L-arabinoza (Kuhnau, 1976). Šećerna komponenta u glikozidu može biti povezana preko kisikova atoma hidroksilne skupine (tzv. O-glikozidi) ili preko ugljikova atoma (tzv. C-glikozidi). Prema položaju stvaranja glikozidne veze (šećer + aglikon) razlikuju se flavoni (stvaranje glikozidne veze na hidroksilnim skupinama vezanim na C<sub>7</sub> i C<sub>4</sub>), flavonoli (C<sub>3</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>4</sub>), flavanoni (stvaranje glikozidne veze na C<sub>7</sub> položaju aglikona). Karakterističnu boju brojnim cvjetovima i

plodovima daju grimiznocrveni, modri ili ljubičasti antocijani prisutni u glikozidnom obliku gdje je na antocijanski aglikon (antocijanidin) vezana šećerna komponenta. Metiliranjem i hidroksiliranjem aglikonskog skeleta nastaju različito obojeni antocijanidini: žućkastocrven pelargonidin (u vrstama rodova *Pelargonium*, *Dahlia*, *Papaver*), crveni ili modri cijanidin (vrste rodova *Rosa*, *Pulmonaria*, *Centaurea*), modri delfinidin (vrste rodova *Delphinium* i *Malva*), petunidin (vrste rodova *Petunia*, *Primula*), ljubičasti enidin (egzokarp bobica grožđa).

**Tablica 2.** Prirodni izvori flavonoida.

<b>Flavoni</b>	
Apigenin	<i>Petroselinum sativum</i> , <i>Apium graveolens</i>
Baikalin	<i>Scutellaria baicalensis</i>
<b>Flavonoli</b>	
Kvercetin	<i>Allium cepa</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Vaccinium macrocarpon</i> , <i>Vitis vinifera</i> , <i>Olea europaea</i> , <i>Thea sinensis</i> , <i>Crataegus cuneata</i> , <i>Morus alba</i>
Kempferol	<i>Cichorea endivia</i> , <i>Vitis vinifera</i> , <i>Thea sinensis</i>
Miricetin	<i>Vitis vinifera</i> , <i>Vaccinium macrocarpon</i> , <i>Thea sinensis</i>
Rutin	<i>Sophora japonica</i> , <i>Fagopyrum esculentum</i> , <i>Eucaliptus macrohyncha</i> , <i>Stellaria media</i>
<b>Katehini</b>	
Katehin	<i>Vitis vinifera</i> , <i>Thea sinensis</i>
<b>Flavanololi</b>	
Taksifolin	<i>Citrus fruits sp. (aurantium, limon)</i>
<b>Izoflavonoidi</b>	
Genistein	<i>Soya hispida</i> , <i>Stellaria media</i> , <i>Pueraria lobata</i> , <i>Sophora japonica</i>

Brojna istraživanja upućuju na zaključak da je za djelovanje flavonoida vrlo važna njihova struktura, odnosno da male promjene u strukturi doprinose bitno različitom biološkom djelovanju. Ispitivana su antioksidativna svojstva i utjecaj na proliferaciju HL-60 stanica (human

acute leukemia cells) nekih flavonoida slične kemijske strukture: kvercetin, miricetin, kempferol, izoramnetin, metilkvercetaetin i taksofolin. U inhibiciji umnažanja HL-60 stanica pokazali su se djelotvorni kvercetin, miricetin, kempferol i izoramnetin, dok metilkvercetaetin i taksifolin nisu pokazali inhibitoran učinak što upućuje na zaključak da je za citostatsko djelovanje flavonoida važno prisustvo C2-C3 dvostruke veze i 6-hidroksilne skupine. Iz ove skupine istraživanih flavonoida najbolje antioksidativno djelovanje pokazao je miricetin koji u svojoj strukturi na **B** prstenu ima vezane tri hidroksilne skupine te je njihovom prisustvu pripisan dobar antioksidativni učinak (Rusak i sur., 2005).

### **1.5. Biološki učinci flavonoida**

Flavonoidi su prisutni u nadzemnim dijelovima biljke dok su rjeđi u korijenu i podanku. Široko su rasprostranjeni kod golosjemenjača i kritosjemenjača te nešto rjeđe kod mahovina i papratnjača, a prisutni su i kod algi (*Charophyceae*) i gljiva (*Aspergillus*). Porodice posebno bogate flavonoidima su *Asteraceae* i *Fabaceae* (Rusak, 1991). Zbog ovako široke rasprostranjenosti flavonoida istražuje se njihovo biološko djelovanje na sam biljni organizam i djelovanje na druge organizme. Najbolje istražena uloga flavonoida je ona koja se odnosi na biljne pigmente gdje se posebno ističu antocijani. Neki su flavonoidi važni u primamljivanju kukaca i oprašivanju cvjetova, drugi pak štite biljku od uboda insekata (kalkoni odbijajuće djeluju na lisne uši) ili štite biljku od ulaska patogena (virusa, bakterija) i djelovanja UV zračenja.

No, daleko su bolje istraženi učinci izoliranih flavonoida na druge organizme, posebice ljudski. Utvrđen je širok spektar djelovanja flavonoida na razini stanice i organizma u cjelini (Di Carlo i sur., 1999):

- Djelovanje na srce i krvožilni sustav očituje se u boljoj perifernoj prokrvljenosti, dilataciji krvnih žila, sniženju krvnog tlaka, smanjenju serumskog kolesterola.
- Protuhepatotoksični učinak; u narodnoj medicini stoljećima se koriste flavonoidni ekstrakti vrste *Silybum marianum* (L.) Gaertn. u tretmanima poremećaja rada jetre. Mješavina aktivnih sastojaka u tom ekstraktu poznata je pod nazivom silimarin i pokazala je pozitivan učinak u zaštiti jetrenih stanica od toksina, a stimulira i obnavljanje jetrenih stanica (Di Carlo i sur., 1999).
- Protualergijsko djelovanje flavonoida pripisuje se utjecaju flavonoida na produkciju histamina, odnosno inhibiciju enzima koji potiču oslobađanje histamina iz mastocita. Ovakvo djelovanje pokazao je kvercetin (Di Carlo i sur., 1999).
- Protuupalno djelovanje flavonoida istraživano je *in vitro* i *in vivo*, no jedna od najvažnijih nuspojava droga koje djeluju protuupalno je njihovo protuulcerozno djelovanje. U tu su svrhu korištene mnoge flavonoidne droge prirodnog i sintetskog porijekla.
- Djelovanje na razini stanice temeljeno je na zaštiti stanice od štetnog zračenja i mutagena, na sprečavanju djelovanja kancerogenih tvari. Brojni su radovi vezani uz istraživanja citotoksičnog efekta na tumorske stanice.
- Poznato je protutumorsko djelovanje flavonoida katehina prisutnog u zelenom čaju koji umanjuje invazivnost tumora (Di Carlo i sur., 1999). Istraživani su i inhibitorni učinci drugih flavonoida poput kvercetina, epigalokatehina i flavonoida iz ekstrakta zelenog čaja na rast tumorskih stanica (Di Carlo i sur., 1999).

Djelovanje na mikroorganizme i viruse također je dobro istraženo i dokazano je pozitivno djelovanje flavonoida u sprečavanju rasta gljivica,

bakterija i virusa. Istražena je uloga flavonoida u obrambenom odgovoru biljke pri zaražavanju patogenom, ali i djelovanje flavonoidnih izolata na mikroorganizme *in vitro* (Berhow i Vaughn, 1999).

Dobro su istražena i protuvirusna djelovanja flavonoida na viruse patogene čovjeka, te je dokazano protuvirusno djelovanje na herpes simplex virus (HSV), parainfluenca virus, respiratorni sincicijski virus i adenovirus (Nijveldt i sur., 2001). Od pojave virusa ljudske imunodeficijencije (HIV) mnoga su istraživanja usmjerena u pravcu djelovanja flavonoida na njega (Ono i Nakane, 1990).

Nešto je lošije istraženo djelovanje flavonoida na biljne viruse. Ispitivano je inhibitorno djelovanje flavonoida na razvoj infekcije kod biljaka inficiranih X virusom krumpira i virusom mozaika duhana (Werma, 1973; French i sur., 1991; French i Towers, 1992; Krcatović i sur., 2008) i virusom grmolike kržljivosti rajčice (Rusak i sur., 1997).

#### **1.6. Flavonoidi vrste *Centaurea rupestris* L.**

Među vrstama porodice *Asteraceae* prisutni su u velikom broju flavoni i flavonoli u obliku glikozida i slobodnih aglikona te kalkoni, auron i antocijani u glikozidnom obliku. Flavonoidi roda *Centaurea* istih su kemijskih osobina kao i flavonoidi cijele porodice *Asteraceae* uz nekoliko karakterističnih značajki. Flavonoidi ovog roda vrlo su često prisutni u metiliranom obliku i česta je pojavnost tzv. C-glikozida unutar ovog roda.

Rusak i suradnici 1993. u svojim su istraživanjima pokazali da je ukupni sadržaj flavonoida prisutnih u cvatovima vrste *Centaurea rupestris* L. od 0.73-0.95 %. Daljnjim istraživanjima potvrđeno je prisustvo 7-O- $\beta$ -D-glukopiranozida čiji je aglikonski skelet 3,4',5,6,7-pentahidroksi-3'-metoksiflavon (Rusak i sur., 1997).

### 1.7. *Tobamo bushy stunt virus* (TBSV)

*Tobamo bushy stunt virus* jedan je od sedamnaest pripadnika roda Tombusvirusa([http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhc\\_p=1](http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhc_p=1)). Čestice virusa TBSV su izometrične, kuglaste, oko 30 nm u promjeru, sačinjene od proteinskog omotača, kapside i genoma koji čini jednolančana (+)ssRNA. Prvi je puta izoliran iz rajčica sa simptomima virusne infekcije u Irskoj (Smith, 1935), a nakon toga je njegova pojava primjećena i u nekoliko drugih europskih zemalja, kao i u Sjevernoj i Južnoj Americi te sjevernoj Africi. Virus uzrokuje prestanak rasta ili gromolik rast, klorotične lezije, naboranost, deformacije i nekroze listova rajčice i paprike. Simptomi na listovima rajčice vidljivi su na slici 5. Plodovi inficiranih biljaka bitno su manji od zdravih plodova s vidljivim klorotičnim mrljama i nekrozama što je prikazano na slici 6. Rasprostranjivanje virusa na povrću uzrokuje velike ekonomske gubitke jer su plodovi bitno manji i često neupotrebljivi. Rasprostranjivanje virusa ograničeno je uglavnom na povrće i ukrasno bilje, dok su infekcije drvenastih vrsta bitno rjeđe.



**Slika 5.** Deformacije i nekroze listova rajčice (DPV382 Figure 01).



**Slika 6.** Deformacije i nekroze plodova rajčice (DPV382 Figure 02).

Za determinaciju virusa najčešće se koriste vrste *Chenopodium amaranticolor* Coste i Reyn. i *C. quinoa* Willd. na kojima virus stvara klorotične lokalne lezije okružene klorotičnim krugovima unutar dva dana,

te *Occimum basilicum* L. na kojem je infekcija vidljiva u obliku tamnosmeđih nekrotičnih lokalnih lezija sa svjetlijim područjem u sredini. Vrste *Nicotiana benthamiana* Domin. i *N. clevelandii* A. Gray. dobri su domaćini za uzgoj tkiva za purifikaciju virusa. Poznata su tri soja virusa: (I) soj izoliran iz biljaka rajčice na kojima je prvobitno uočena infekcija virusom TBSV 1935. godine, (II) BS3 soj i (III) TBSV-Ch soj koji najčešće inficira drvenaste vrste. Virus se prenosi sjemenom, polenom, kalemljenjem kod vegetativnog razmnožavanja, ili može biti proširen pomoću viline kose (*Cuscuta sp.*) (<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=382>). Nisu poznati vektori za prijenos virusa bilo u tlu, bilo u zraku poput grinja, lisnih uši ili gljiva (Smith, 1935). Virus je prisutan u tlu gdje zadržava infektivna svojstva i preko šest mjeseci i odolijeva nepovoljnim životnim uvjetima kao što je visoka temperatura. Primjećeno je i prisustvo virusa u vodama gdje dospjeva ispiranjem tla i na taj način „prelazi“ velike razdaljine (Tomlinson i Faithfull, 1984).

## 2.1. Cilj istraživanja

Prijašnjim je radovima dokazan protuvirusni učinak flavonoida iz biljaka vrste *Centaurea rupestris* L. sakupljenih na prirodnom staništu (Rusak i sur., 1997). Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti:

- učinak nutrijenata i biljnih regulatora rasta na sadržaj flavonoida u tkivima vrste *Centaurea rupestris* L. uzgojenim *in vitro* (kalusi i izdanci).
- usporediti sadržaj flavonoida u različitim tkivima uzgojenim *in vitro* i tkivima biljaka sakupljenih na prirodnom staništu
- istražiti protuvirusni učinak ekstrakata iz uzgojenih tkiva koristeći virus grmolike kržljivosti rajčice TBSV kao model.



### 3.1. Materijal

Za kvantitativnu analizu sadržaja flavonoida korišteni su kalusi i izdanci biljke *Centaurea rupestris* L. uzgojeni u kulturi tkiva te cvat i list iste vrste sabrani u prvoj polovici srpnja tijekom tri godine (1988-1990) u Uvali Scott kod Kraljevice. Za istraživanje učinka flavonoida korišten je virus grmolike kržljivosti rajčice (TBSV). Vrste *Nicotiana megalosiphon* L. i *Nicotiana glutinosa* L. služile su za umnažanje i inokulaciju virusa.

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Uzgoj biljnog materijala u kulturi tkiva

Tkiva uzgojena u kulturi rasla su na MS-hranidbenoj podlozi (Murashige i Skoog, 1962) i hranidbenoj podlozi MS  $\frac{1}{2}$  ( $\frac{1}{2}$  ukupne koncentracije makroelemenata) uz dodatak raznih kombinacija regulatora rasta: indol-3-octena kiselina (IAA) (1.5 mg/l) i kinetin (K) (1mg/l); indol-3-maslačna kiselina (IBA) (1.5 mg/l) i kinetin (K) (1 mg/l); 2,4-diklorofenoksiocena kiselina (2,4-D) (1mg/l) i benzilaminopurin (BAP) (1 mg/l); indol-3-maslačna kiselina (IBA) (1.5 mg/l) i benzilaminopurin (BAP) (1mg/l);  $\alpha$ -naftalenoctena kiselina (NAA) (1mg/l) i benzilaminopurin (BAP) (1 mg/l). Na tim su hranidbenim podlogama uzgojeni kalusi označeni kao: **kalus B** (1.5 mg/l IAA+1 mg/l K); **kalus C** (1.5 mg/l IBA + 1 mg/l K); **kalus E** (1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BAP); **kalus G** (1.5 mg/l IBA + 1mg/l BAP); **kalus H** (1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP). Izdanci biljaka uzgojeni su na MS-hranidbenoj podlozi uz dodatak 0.5 mg/l BAP; MS + 1 mg/l BAP; MS + 1 mg/l kinetin i MS  $\frac{1}{2}$  + 0.5 mg/l BAP; MS  $\frac{1}{2}$  + 1 mg/l BAP i MS  $\frac{1}{2}$  + 1 mg/l kinetin, te na MS-hranidbenoj podlozi bez dodatka regulatora rasta. Prije autoklaviranja, pH vrijednost hranidbenih podloga podešena je na 5.7.

Svaki uzorak uzgojen je na istoj hranidbenoj podlozi i sabran kroz tri subkulture.

### ***3.2.2. Kvantitativno određivanje sadržaja ukupnih flavonoida***

Sadržaj ukupnih flavonoida određen je metodom po Römischu (Römisch, 1960). Količina ukupnih flavonoida mjerena je prema rutinu, te je s rutinom najprije načinjena baždarna krivulja iz koje je izračunat sadržaj flavonoida u uzorcima.

U 100 ml metanola otopi se 5.05 g rutina te se od te smjese uzima 0.25 ml, 0.50 ml, 1.0 ml, 1.5 ml (što odgovara količini od 0.125 mg, 0.250 mg, 0.500 mg, 0.750 mg rutina) i razrijedi se metanolom do 2 ml. Priređenoj 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 aluminijskoga klorida ( $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ; 12 % 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 spektrofotometrom pri valnoj duljini od 420 nm u stupcu debljine 1 cm. Za baždarenje spektrofotometra koristi se voda.

Za ekstrakciju flavonoida iz tkiva uzima se 0.5 g osušene i u prah usitnjene droge kojoj se doda 25 ml metanola. Ekstrakcija se izvodi na vodenoj kupelji ( $70^\circ\text{C}$ ), uz povratno hladilo 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 priređenog metanolnog ekstrakta pomiješa se s 2 ml tetraklorugljika i 3 ml vode u epruveti za centrifugiranje te se u svrhu odvajanja slojeva smjesa centrifugira 5-10 minuta na  $\text{RCF} = 11000 \text{ g}$ . 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 priređuje otopina za mjerenje kao kod baždarne krivulje. Od uzoraka kalusa B, kalusa C, kalusa E, kalusa G, kalusa H, te uzorka izdanaka biljke sa hranidbene podloge MS + 0.5 mg/l BAP, načinjene su po dvije ekstrakcije flavonoida i od svake ekstrakcije po tri mjerenja apsorbancije, te je konačni rezultat srednja vrijednost svih šest mjerenja. Kao kontrolni uzorak načinjene su po dvije ekstrakcije lista i cvata vrste *Centaurea rupestris* L. sabranih na prirodnom staništu. Učinjena su po tri mjerenja apsorbancije ekstrakata, a konačni je rezultat srednja vrijednost dviju priprema, odnosno šest mjerenja.

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

### **3.2.3. Perkolacija**

Perkolacija je oblik kontinuirane ekstrakcije koja se provodi na sljedeći način: osušeno, izvagano i usitnjeno biljno tkivo namoči se 2h u metanolu nakon čega se prebaci u staklenu kolonu prikladne veličine i ostavi preko noći stajati u metanolu. Nakon stajanja pusti se protok na koloni 4-5 kapi u minuti. Sakupljeni perkolat upari se na vakuum uparivaču na početnu masu i takav se koristi za dalje pokuse inokulacije i dokazivanja protuvirusnog djelovanja flavonoida.

### **3.2.4. Inokulacija virusa TBSV i mjerenje učinka ekstrakata vrste *C. rupestris* L. na virus**

Za istraživanje protuvirusnog djelovanja ekstrakata na virus TBSV korištene su biljke vrste *Nicotiana glutinosa* L. na kojima virus TBSV daje lokalne simptome zaraze. Pri ovom tipu virusne infekcije dolazi do rasprostranjivanja patogena samo u određeni broj stanica u blizini inficirane

stanice. Općenito, lokalne lezije mogu biti nekrotične, klorotične i prstenaste, a njihov izgled ovisi o virusu, biljci domaćinu te o uvjetima u kojima biljka raste. Na inficiranim biljkama vrste *N. glutinosa* L. nekoliko dana nakon inokulacije virusom TBSV pojavljuju se male nekrotične lezije, koje se lako prebroje te je stoga vrsta *N. glutinosa* L. odabrana kao pogodan domaćin za određivanje učinka flavonoida na TBSV.

Kao virusni inokulum korišten je biljni sok vrste *N. megalosiphon* L. zaražene virusom TBSV. Virus TBSV na ovom domaćinu daje sistemične simptome što znači da se virus s mjesta početne infekcije iz inokuliranih listova rasprostranjuje na cijelu biljku te novonarasli listovi na inficiranoj biljci postaju smežurani. Sistemični se simptomi, općenito, mogu svrstati u tri skupine: oni koji su nastali zbog promjena u boji, oni koji su posljedica histopatoloških promjena, te oni nastali zbog patomorfoloških promjena (Juretić, 2002). Listovi sa razvijenom sistemičnom infekcijom uberu se, izvažu i doda im se hladni fosfatni (Sørensenov) pufer (pH 7.976; 0.06M) u odnosu 1:1.25 m/V. Tkivo se homogenizira. Iscijeđeni biljni sok koristi se kao izvor virusa za inokulaciju u pokusima istraživanja protuvirusnog djelovanja flavonoida.

Istraživanje inhibicije virusa grmolike kržljivosti rajčice načinjeno je ekstraktima dobivenim iz kalusa uzgojenih u kulturi tkiva označenim kao kalus E i kalus G, te ekstraktima izdanaka uzgojenih na MS i ½ MS hranidbenoj podlozi. Ekstrakt cvatova ubranih na prirodnom staništu koji su u prethodnim istraživanjima već dokazali protuvirusno djelovanje (Rusak i sur., 1997), služio je kao kontrola. Inhibicija je istražena pokusima inokulacije virusa i smjese virusa i ekstrakata na pokusne biljke vrste *Nicotiana glutinosa* L. u stakleničkim uvjetima. Inokulacije su načinjene na mladim biljkama koje su imale razvijena barem četiri listića.

Ekstrakti za istraživanje protuvirusnog djelovanja na TBSV pripremaju se na sljedeći način: u Petrijeve posudice nakapa se po 25 kapi

biljnih ekstrakata pripremljenih perkolacijom, posudice se stave u eksikator i ostave dok se površine potpuno ne osuše. Virusni inokulum priprema se iz svježe ubranih listova biljke *Nicotiana megalosiphon* L. inficiranih virusom TBSV. Uz dodatak fosfatnog (Sörensenovog) pufera (pH 7.976; 0.06 mol dm<sup>-3</sup>) listovi se homogeniziraju, a iscijeđeni biljni sok služi za inokulaciju.

Osušeni ekstrakt u Petrijevim posudicama otopi se u 25 kapi Sörensenovog pufera te se doda 2 kapi biljnog soka koji sadrži TBSV. U drugu, čistu, Petrijevu posudicu nakapa se 25 kapi Sörensenovog pufera i doda se 2 kapi virusom inficiranog biljnog soka. S ovako pripremljenim ekstraktima inokulirani su listovi biljke *Nicotiana glutinosa* L. Pokusne biljke grupirane su u skupine za inokulaciju sa svakim pojedinim ekstraktom i za inokulaciju su odabrana po dva gornja listića. Listovi zdravih pokusnih biljaka posipaju se karborandom (prah silicijeva karbida, SiC) koji služi kao abrazivno sredstvo. Njegove čestice oštećuju epidermu lista čime je omogućen ulaz virusnih čestica u stanice biljke. Na lijevu polovicu lista nanese se izolat flavonoida s virusnim ekstraktom, a na desnu polovicu lista nanese se virusni ekstrakt u Sörensenovom puferu. Nakon nekoliko minuta listovi se oprezno isperu vodom pazeći da se ne preljeva s jedne na drugu polovicu lista kako bi se izbjegle pogreške u rezultatima. Ovisno o uvjetima, infekcija se potpuno razvije kroz 5-7 dana te se tada prebroji broj lezija na inokuliranim listovima.

U tijeku pokusa načinjene su tri serije inokulacija, te je u izračun postotka inhibicije uzet ukupni broj lezija u tri inokulacije. Postotak inhibicije IP računat je prema formuli:

$$IP = 100 - (A/B) \times 100$$

gdje je:

**A** - broj lezija na polovici lista inokuliranom smjesom virusa i ekstrakta

**B** - broj lezija na kontrolnoj polovici lista inokuliranom čistim virusom.

## 4. Rezultati

### 4.1. Sadržaj flavonoida u izdancima i kalusima vrste *Centaurea rupestris* L. uzgojenim u kulturi tkiva

Najniži sadržaj flavonoida izmjereno je u izdancima uzgojenim na hranidbenoj podlozi MS  $\frac{1}{2}$  + 0.5 mg/l BAP, (0.50 %). Suprotno tome, u druga dva uzorka uzgojena na hranidbenoj podlozi MS  $\frac{1}{2}$  sa dodatkom 1 mg/l BAP i 1 mg/l kinetina izmjereno je najveći sadržaj flavonoida, 0.9 %. Od izdanaka uzgojenih na kompletnoj MS-hranidbenoj podlozi najveći je sadržaj flavonoida izmjereno u uzorku uzgojenom na MS-hranidbenoj podlozi uz dodatak 0.5 mg/l BAP (0.8 %), dok su izdanci uzgojeni na hranidbenoj podlozi MS uz dodatak 1 mg/l BAP i 1 mg/l kinetina sadržavali po 0.6 % flavonoida. U svim izdancima uzgojenim *in vitro* izmjereno je manji sadržaj flavonoida nego u listovima ubranim na prirodnom staništu (Tablica 3.).

**Tablica 3.** Sadržaj flavonoida (maseni udio %) u izdancima uzgojenim u uvjetima *in vitro* te listovima i cvatovima biljaka s prirodnog staništa. Sadržaj flavonoida mjeren je metodom po Römischu (1960).

<b>uzorak</b>	<b>hranidbena podloga + biljni regulator rasta (mg/l)</b>	<b>maseni udio flavonoida %</b>
<b>izdanak</b>	MS + BAP (0.5)	<b>0.80</b>
<b>izdanak</b>	MS + BAP (1)	<b>0.60</b>
<b>izdanak</b>	MS + kinetin (1)	<b>0.60</b>
<b>izdanak</b>	MS ½ + BAP (0.5)	<b>0.50</b>
<b>izdanak</b>	MS 1/2 + BAP (1)	<b>0.90</b>
<b>izdanak</b>	MS ½ + kinetin (1)	<b>0.90</b>
<b><i>C. rupestris</i> list</b>	prirodno stanište	<b>1.20</b>
<b><i>C. rupestris</i> cvat</b>	prirodno stanište	<b>1.38</b>

U kalusnom tkivu, najmanji sadržaj flavonoida dobiven je u kalusu C (0.53%), dok je u kalusu B, dobiven najveći sadržaj flavonoida (0.70%). Kalusi E i H dali su jednak sadržaj flavonoida (0.65%), a kalus G sadržavao je 0.60% flavonoida. Svi kalusi sadržavali su manje flavonoida nego list i cvat biljke s prirodnog staništa (Tablica 4).

**Tablica 4.** Sadržaj flavonoida (maseni udio %) u uzorcima kalusa uzgojenim u uvjetima *in vitro* te listovima i cvatovima biljaka s prirodnog staništa. Sadržaj flavonoida mjeren je metodom po Römischu (1960).

<b>uzorak</b>	<b>hranidbena podloga MS + biljni regulator rasta (mg/l)</b>	<b>maseni udio flavonoida %</b>
<b>kalus B</b>	IAA (1.5) i K (1)	<b>0.70</b>
<b>kalus C</b>	IBA (1.5) i K (1)	<b>0.53</b>
<b>kalus E</b>	2,4-D (1) i BAP (1)	<b>0.65</b>
<b>kalus G</b>	IBA (1.5) i BAP (1)	<b>0.60</b>
<b>kalus H</b>	NAA (1) i BAP (1)	<b>0.65</b>
<b><i>C. rupestris</i> list</b>	prirodno stanište	<b>1.20</b>
<b><i>C. rupestris</i> cvat</b>	prirodno stanište	<b>1.38</b>

#### **4.2. Inhibicija virusa grmolike kržljivosti rajčice (TBSV) ekstraktima kalusa, izdanaka, korijena i cvata vrste *Centaurea rupestris* L.**

Lokalne lezije u potpunosti su se razvile nakon 5-7 dana, te je pažljivo prebrojen njihov broj na svakoj polovici lista.

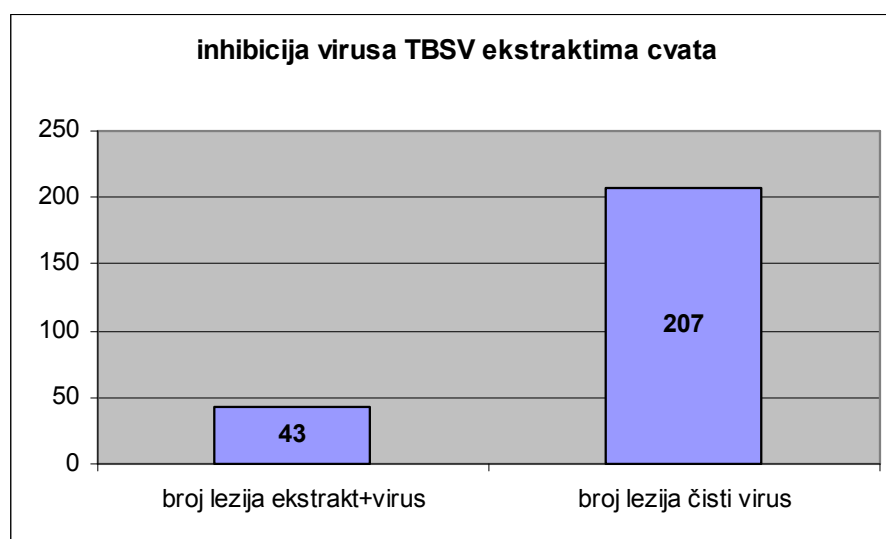
U pokusu prve inokulacije ekstraktima cvata (kontrolne biljke) inokulacija je načinjena na po dva lista na ukupno šest biljaka. Tako je u



prvoj inokulaciji prebrojani broj lezija na kontrolnoj polovici lista (desnoj) sedamdeset i sedam, a broj lezija na lijevoj polovici lista na koju je uz virus nanesen i ekstrakt cvata, šesnaest. Iako ukupni broj lezija nije velik, vidljivo je manji broj lezija na polovici lista inokuliranoj smjesom virusa i ekstrakta.

U drugoj inokulaciji broj lezija na kontrolnoj (desnoj) polovici lista bio je pedeset i tri, a na lijevoj polovici jedanaest. Broj pokusnih biljaka u drugoj je inokulaciji bio osam. I u ovom je pokusu vidljiva inhibicija virusa ekstraktom cvata.

Broj lezija u trećoj je inokulaciji prebrojen na šest biljaka. Ukupni broj lezija je sedamdeset i sedam na kontrolnoj strani lista i šesnaest lezija na lijevoj polovici lista. Iako je ukupni broj lezija manji od očekivanog, vidljivo je manji broj lezija na polovici lista inokuliranoj smjesom virusa i ekstrakta. Ukupno je prebrojano dvije stotine i sedam lezija na kontrolnoj polovici lista i četrdeset i tri lezije na polovici lista tretiranoj ekstraktom cvata. Rezultati triju inokulacija prikazani su grafički, na slici 7.

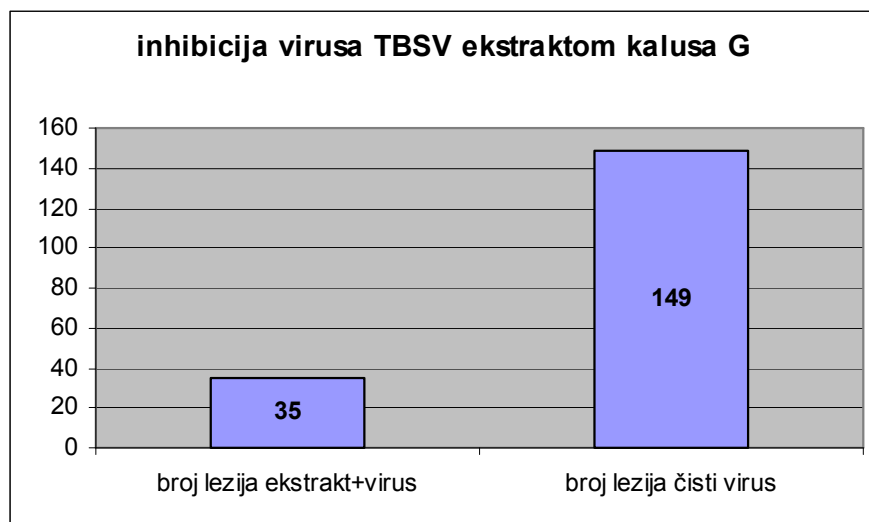


**Slika 7.** Grafički prikaz broja lezija na listovima vrste *Nicotiana glutinosa* L. inokuliranim virusom grmolike kržljivosti rajčice i virusom tretiranim ekstraktom cvata tijekom tri inokulacije.

Druga skupina pokusnih biljaka inokulirana je, također u tri navrata, ekstraktima dobivenim iz kalusa G koji su uzgojeni na MS-hranidbenoj podlozi uz dodatak IBA (1.5 mg/l) + BAP (1 mg/l). U prvoj inokulaciji broj lezija prebrojen je na šest biljaka. Na kontrolnoj polovici lista broj lezija je bio četrdeset i pet, a na lijevoj polovici lista gdje je uz virus u inokulum dodan i ekstrakt kalusa G, razvilo se četrnaest lezija. U odnosu na kontrolni broj lezija na desnoj polovici lista vidljiv je inhibitorni učinak ekstrakta.

U drugoj inokulaciji prebrojeni broj lezija bio je petnaest lezija na kontrolnoj polovici lista i osam lezija na lijevoj polovici lista, te je također vidljiv inhibitorni učinak ekstrakta na virus.

U trećoj inokulaciji broj lezija bio je znatno veći, osamdeset i devet lezija na kontrolnoj strani lista i trinaest lezija na lijevoj polovici lista, te je i ovim pokusom dokazan inhibitorni učinak ekstrakta. Ukupno je prebrojano stotinu četrdeset i devet lezija na kontrolnoj strani lista, te trideset i pet lezija na polovici lista na kojoj je istraživani inhibitorni učinak dodatkom ekstrakta kalusa G u inokulum. Rezultati triju inokulacija u svrhu istraživanja inhibitornog učinka ekstrakta kalusa G prikazani su grafički na slici 8.

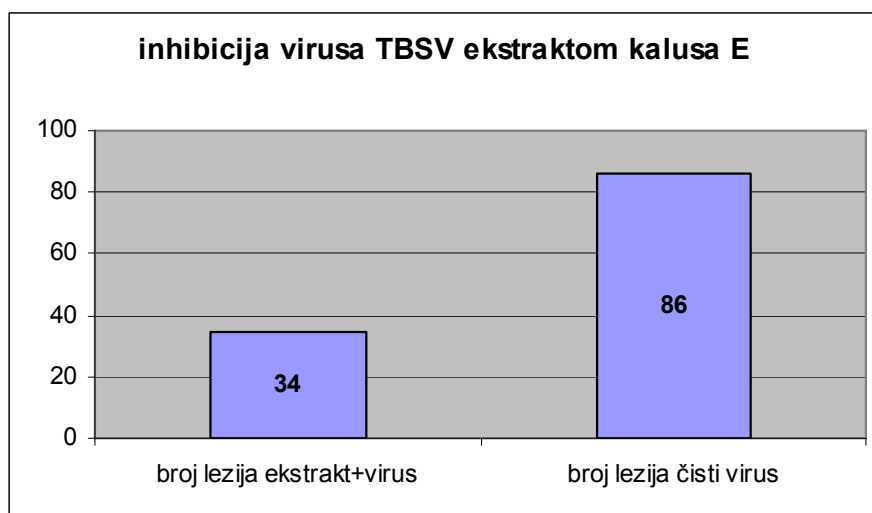


**Slika 8.** Grafički prikaz broja lezija na listovima vrste *Nicotiana glutinosa* L. inokuliranim virusom grmolike kržljivosti rajčice i virusom tretiranim ekstraktom kalusa G uzgojenom na hranidbenoj podlozi Murashige i Skoog uz dodatak indol-3-maslačne kiseline i benzilaminopurina tijekom tri inokulacije.

Treća skupina biljaka tretirana je ekstraktima kalusa E uzgojenog na MS- hranidbenoj podlozi uz dodatak 2,4-D (1 mg/l) i BAP (1 mg/l), u svrhu dokazivanja inhibitornog učinka ekstrakta na virus TBSV. Broj lezija prebrojen na šest biljaka, bio je trideset i dvije lezije na kontrolnoj polovici lista i trinaest lezija na lijevoj polovici lista inokuliranoj smjesom virusa i ekstrakta kalusa E.

U drugoj inokulaciji sa dvanaest listova prebrojeno je dvanaest lezija na kontrolnoj strani lista i dvadeset i devet lezija na lijevoj polovici lista.

U trećoj inokulaciji prebrojeno je dvadeset i pet lezija na kontrolnoj polovici lista i deset lezija na lijevoj polovici lista. I ovi ekstrakti kalusa E pokazali su inhibitorno djelovanje na virus TBSV, no nešto slabije nego kalus G i cvat kao kontrolni ekstrakt. Rezultati inhibitornog djelovanja kalusa E na virus TBSV tijekom tri inokulacije prikazani su grafički na slici 9.



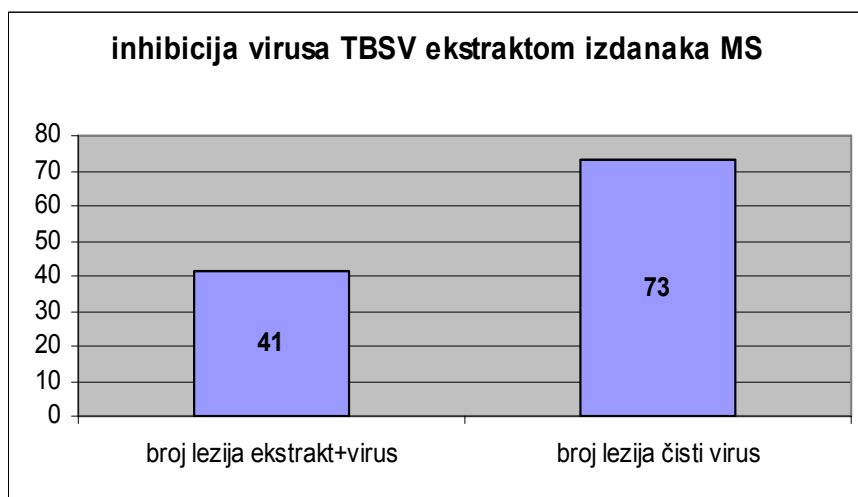
**Slika 9.** Grafički prikaz broja lezija na listovima vrste *Nicotiana glutinosa* L. inokuliranim virusom grmolike kržljivosti rajčice i virusom tretiranim ekstraktom kalusa E uzgojenom na hranidbenoj podlozi Murashige i Skoog uz dodatak 2,4- diklorofenoksiocetene kiseline (1 mg/l) i benzilaminopurina (1 mg/l) tijekom tri inokulacije.

Inhibitorni učinak ispitan je na virus TBSV i za ekstrakte izdanaka vrste *Centaurea rupestris* L. uzgojene u kulturi tkiva na MS-hranidbenoj podlozi bez dodatka regulatora rasta. I u ovoj skupini biljaka načinjene su tri inokulacije na pokusnim biljkama. U prvom pokusu prebrojane su lezije na šest biljaka i to dvadeset i sedam lezija na kontrolnoj polovici lista i petnaest lezija na lijevoj strani lista na koju je nanesen inokulum sa ekstraktom izdanaka.

U drugoj inokulaciji prebrojeno je dvadeset i tri lezije na kontrolnoj polovici lista i trinaest lezija na lijevoj polovici lista.

U trećoj inokulaciji na kontrolnoj polovici lista prebrojano je dvadeset i tri lezije, a na lijevoj polovici lista trinaest lezija. Ukupan broj lezija na kontrolnoj polovici lista bio je sedamdeset i tri, te četrdeset i jedna lezija na lijevoj polovici lista na koju je nanesen inokulum sa dodatkom

ekstrakta izdanaka sa MS-hranidbene podloge. U sve tri inokulacije vidljiv je manji broj lezija na polovici lista inokuliranoj smjesom virusa i ekstrakta izdanaka, no inhibicija je sumarno, slabija nego sa dosad prikazanim ekstraktima kalusa E i kalusa G. Rezultati triju inokulacija sumarno su prikazani grafički na slici 10.



**Slika 10.** Grafički prikaz broja lezija na listovima vrste *Nicotiana glutinosa* L. inokuliranim virusom grmolike kržljivosti rajčice i virusom tretiranim ekstraktima izdanaka uzgojenim na hranidbenoj podlozi Murashige i Skoog bez dodatka regulatora rasta tijekom tri inokulacije.

Za svaki pojedini ekstrakt načinjen je sumarni broj lezija na kontrolnoj polovici lista i polovici lista inokuliranoj smjesom ekstrakta i virusa kroz tri inokulacije (tablica 5). Cvijet je sa ukupnim brojem lezija od dvije stotine i sedam na kontrolnoj polovici listova i četrdeset i tri lezije na lijevoj polovici listova pokazao stupanj inhibicije  $IP=79\%$ . Kod kalusa G sa ukupno stotinu četrdeset i devet lezija na kontrolnoj polovici listova i trideset i pet lezija na lijevoj polovici listova dobiven je stupanj inhibicije  $IP=76\%$ . Kalus E s osamdeset i šest lezija na kontrolnoj polovici listova i trideset i četiri lezije na lijevoj polovici listova pokazao je stupanj inhibicije

IP=60%. Izdanci s hranidbene podloge MS, sa sedamdeset i tri lezije na kontrolnoj polovici listova i četrdeset i jednom lezijom na lijevoj polovici listova pokazali su nešto slabiji stupanj inhibicije IP=43%.

**tablica 5.** Sumarni prikaz broja lezija i postotak inhibicije (IP) virusa grmolike kržljivosti rajčice za svaki pojedini ekstrakt.

<b>ekstrakt</b>	<b>broj lezija ekstrakt+virus</b>	<b>broj lezija čisti virus</b>	<b>% inhibicije</b>
<b>cvat</b>	43	207	<b>79%</b>
<b>kalus G</b>	35	149	<b>76%</b>
<b>kalus E</b>	34	86	<b>60%</b>
<b>izdanci MS</b>	41	73	<b>43%</b>

## 5. Rasprava

Rezultati fitokemijskih istraživanja vrste *Centaurea rupestris* L. koje je u svom magistarskom radu dobila Rusak (1991.) bili su poticaj za daljnja istraživanja koja su se u početku odnosila na određivanje sadržaja fenolnih tvari u nekim vrsta roda *Centaurea* (Rusak i sur., 1993), te se nastavila istraživanjem protuvirusnog djelovanja flavonoida kvercetagetin 3'-metiletera-7-O- $\beta$ -D-glukopiranozida izoliranog iz vrste *C. rupestris* L. (Rusak i sur., 1997). Rezultati dobiveni u sklopu ovog rada potvrdili su neke ranije spoznaje, ali i dali odgovore na neka nova pitanja.

Rezultati određivanja sadržaja flavonoida pokazali su veći sadržaj flavonoida u biljkama koje su rasle na hranidbenoj podlozi  $\frac{1}{2}$  MS uz dodatak kinetina i BAP, oba u koncentraciji 1 mg/l. Visok sadržaj flavonoida sadrže i uzorci s dodatkom BAP u koncentraciji 0.5 mg/l koji su rasli na kompletnoj MS-hranidbenoj podlozi. Uzorci uzgojeni na kompletnoj MS-hranidbenoj podlozi uz dodatak kinetina i BAP, oba u koncentraciji 1mg/l, sadržavali su nešto manje flavonoida u odnosu na uzorke uzgojene na  $\frac{1}{2}$  MS-hranidbenoj podlozi uz dodatak istih biljnih regulatora rasta. Dobiveni rezultati ukazuju da više flavonoida sadrže biljke koje su rasle na MS-hranidbenoj podlozi s polovičnim sadržajem fitonutrijenata, odnosno kod biljaka kojima je u vrijeme njihova rasta i razvoja bila ograničena količina dostupnih hranjivih tvari. Ove bi rezultate bilo moguće objasniti činjenicama da biljke u stresnim uvjetima proizvode više flavonoida kako bi biljku zaštitile od negativnih utjecaja.

Svi su uzorci kalusnih tkiva rasli na kompletnoj MS-hranidbenoj podlozi uz dodatak biljnih regulatora rasta te bi se možda tom činjenicom mogao objasniti nešto niži sadržaj flavonoida u kalusima nego u cijelim biljkama.

U pokusima protuvirusnog djelovanja flavonoida korištena je metoda inokulacije virusa. Inokulacija je unos virusa ili drugog patogena u biljnu stanicu. Virusi se ne mogu adsorbirati na površinu biljne stanice jer se na njoj nalazi kutikula ili kutinizirani slojevi te čvrsta stanična stjenka na kojoj nema receptora na koje bi se virusi mogli vezati. Virusi sami nisu sposobni probiti staničnu stjenku već u stanice domaćina ulaze putem oštećenja u epidermi. U prirodi se često pojavljuju organizmi koji su u stanju prenijeti viruse sa bolesnih na zdrave biljke (kukci, nematode, gljive) te se takvi organizmi nazivaju vektori. Eksperimentalno se virusi najčešće prenose mehaničkom inokulacijom (Juretić, 2002) što je korišteno i u našim pokusima.

Dokazano je antivirusno djelovanje svih istraživanih uzoraka kalusa i izdanaka iako je na pojedinim pokusnim biljkama i u pojedinim ponavljanjima pokusa, broj razvijenih lezija bio mali. Mogući uzroci dobivanja različitog broja lezija u pojedinim ponavljanjima pokusa su sljedeći: (I) nije utvrđen broj virusnih čestica u virusnom inokulumu dobivenom iz *N. megalosiphon* L; (II) pokusi su napravljeni u različitim periodima tijekom godine, te su se razlikovali uvjeti u kojima je pokus proveden: duljina dana, temperatura, što je moglo utjecati i na otpornost biljke domaćina i na infektivnost virusa (Roden i Ingle, 2009). Ono što odstupa od početnih očekivanja je lošiji antivirusni učinak ekstrakata izdanaka jer je veći sadržaj flavonoida očekivan u bolje diferenciranim tkivima. Nakon analize dobivenih podataka o sadržaju flavonoida u ovisnosti o hranidbenoj podlozi možda ovo odstupanje i nije tako neočekivano jer su izdanci iz kojih su pripremani ekstrakti uzgojeni na kompletnoj MS-hranidbenoj podlozi bez dodatka biljnih regulatora rasta, a određeni sadržaj flavonoida bio je veći u izdancima uzgojenim na MS-hranidbenoj podlozi s  $\frac{1}{2}$  ukupne koncentracije makroelemenata. Svi su uzorci pokazali nešto manje protuvirusno djelovanje u odnosu na kontrolni



uzorak ekstrakta cvata što je bilo i za očekivati jer je u ekstraktu cvatova izmjeren najveći sadržaj flavonoida. Izolacija flavonoida iz cvatova biljaka te njihova biološka aktivnost predmet je i mnogih drugih znanstvenih radova (Srivastava i Gupta 2009; Williams i sur. 1999). Jedino se ekstrakt kalusa G približio po rezultatu inhibicije virusa ekstraktu cvatova, čemu objašnjenje ne mogu naći u dobivenim rezultatima. Dobiveni sadržaj flavonoida bio je nešto veći u ekstraktima kalusa E, nego u ekstraktima kalusa G, a dobiveni postotak inhibicije nešto je veći za kalus G. Ovakvi podaci o sadržaju flavonoida u kalusima i protuvirusnom djelovanju njihovih ekstrakata navode na zaključak da u ekstraktima postoje još neke supstance koje imaju inhibitorno djelovanje na virus TBSV što bi moglo biti provjereno dodatnim istraživanjima.

## 6. Zaključak

U ekstraktima kalusa i izdanaka uzgojenih u kulturi tkiva dokazano je prisustvo flavonoida i određen njihov kvantitativni sadržaj.

Najveći sadržaj flavonoida imali su izdanci uzgojeni na hranidbenoj podlozi MS  $\frac{1}{2}$  uz dodatak kinetina ili BAP-a u koncentraciji 1mg/l, te izdanci uzgojeni na kompletnoj MS-hranidbenoj podlozi uz dodatak BAP-a u koncentraciji 0.5mg/l. Sadržaj flavonoida u kalusu uzgojenom na MS-hranidbenoj podlozi uz dodatak IAA u koncentraciji 1.5mg/l i kinetina u koncentraciji 1mg/l bio je veći nego u svim ostalim kalusima.

Ekstrakti kalusa i izdanaka uzgojenih u kulturi tkiva pokazali su, svi redom, protuvirusno djelovanje na virus grmolike kržljivosti rajčice na pokusnim biljkama vrste *Nicotiana glutinosa* L. Protuvirusno djelovanje dokazano je smanjenjem broja lezija na listovima pokusnih biljaka. Od svih *in vitro* uzgojenih tkiva, najjače protuvirusno djelovanje, izraženo stupnjem inhibicije IP, pokazao je kalus G uzgojen na hranidbenoj podlozi MS uz dodatak IBA (1.5 mg/l) i BAP (1 mg/l). Izdanci sa MS-hranidbene podloge bez dodatka fitonutrijenata pokazali su najslabije protuvirusno djelovanje.

## Popis literature:

Ahmed Z. F., Mammouda F. M., Rizk A. M., Ismail S. I. (1970): Phytochemical studies of certain *Centaurea species*. *Planta Medica*, 18, 227-231.

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-dihidroksiflavone). *Journal of Infectious Diseases*, 165, 433-437.

Berhow M. A., Vaughn S. F. (1999): Higher plant flavonoids: biosynthesis and chemical ecology. U: *Principles and Practices of Plant Ecology: Allelochemical Interactions*. Florida, CRC Press, Boca Raton, 423-438.

Chucla M.T., Lamela M., Gato A., Cadavid I. (1988): *Centaurea corcubionensis*: A study of its hypoglycemic activity in rats. *Planta Medica*, 54, 107-109.

Denffer D., Ziegler H. (1991): Udžbenik za visoke škole: Morfologija i fiziologija. Grafički 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.

Durgo K., Vuković L., Rusak G., Osmak M., Franekić Čolić J. (2006): Effect of flavonoids on glutathione level, lipid peroxidation and cytochrome

P450 CYP1A1 expression in human laryngeal carcinoma cell lines. *Food Technology and Biotechnology*, 45, 69-79.

Ćurković Perica M. (2003): In vitro propagation of *Centaurea rupestris* L. *Acta Biologica Cracoviensia (Series Botanica)* 45/2, 127-130.

French C. J., Elder M., Leggett F., Ibrahim R. K., Towers G. H. N. (1991): Flavonoids inhibit infectivity of tobacco mosaic virus. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 13, 1-6.

French C. J., Towers G. H. N. (1992): Inhibition of infectivity of potato virus X by flavonoids. *Phytochemistry*, 31, 3017-3020.

Harborne J. B., Williams C. A. (2000): Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.

Hegnauer R., (1964): *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Band 3, Birkhauser Verlag, Basel und Stuttgart, 447-661.

Hegnauer R., (1977): The chemistry of the *Compositae*. U: Heywood V. H., Harborne J. B., Turner B. L. (ur.). *The biology and chemistry of the Compositae*, Vol. 1, 283-336.

Juretić N. (2002): *Osnove biljne virologije*. Školska knjiga, Zagreb

Kery A. L., Twaij A. A. H., Al-Khazaraji K. N. (1985): Methylated flavonoid from *Centaurea phyllocephala* L. *Herba Hungarica*, 24, 183-194.

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

Kreatović E. (2007): Inhibitorni učinak flavonoida na virus mozaika duhana. Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Kuhnau J. (1976): The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 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.

Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.

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. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 418-425.

Oksuz S., Halfon B., Terem B. (1988): Flavonoids of *Centaurea cuneifolia*. *Planta Medica*, 54, 89.

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. *European Journal of Biochemistry*, 190, 469-476.

Pavletić Z., Trinajstić I. (1983): Istraživanja taksonomskih odnosa između vrsta *Centaurea rupestris* L. i *C. fritschii* Hayek, te njihovog prirodnog hibrida *C. X sordida* Wild. (Asteraceae, sect. *Acrocentron* Cass.1926). *Acta Botanica Croatica*, 42, 137-43.

Römisch H., (1960): Colorimetrische Bestimmung des Rutingehaltes in Pflanzenextrakten und Präparaten mit Aluminiumchlorid in mit Eisessig-Pyridin gepufferter Lösung. *Pharmazie*, 4, 33-38.

Roden Laura C. and Ingle Robert A. (2009): Lights, Rhythms, Infection: The Role of Light and the Circadian Clock in Determining the Outcome of Plant–Pathogen Interactions. *The Plant Cell*, 21, 2546-2552.

Rusak G., (1991): Anatomski i fitokemijski istraživanja endemičnih vrsta *Centaurea rupestris* L. i *C. fritschii* Hayek (Asteraceae). Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

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 Technology and Biotechnology*, 40, 267-273.

Rusak G., Krajačić 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., Kuštrak D., Maleš Ž., Pleše N. (1993): The determination of the content of the polyphenols in the areal parts of the species *Centaurea rupestris* L. and *C. fritschii* Hayek (Asteraceae). *Acta Pharmaceutica*, 43, 121-125.

Rusak G., Robinson N., Pepeljnjak S. (2002): Antibacterial and antifungal activity of extracts and quercetagenin derivative isolated from *Centaurea rupestris* L. (Asteraceae). *Acta Biologica Cracoviensia*, (Series Botanica), 44, 169-174.

Rusak G., Krajačić M., Krsnik-Rasol M., Gutzeit H. (2007): Quercetin influences response in *Nicotiana megalosiphon* infected by satellite-associated cucumber mosaic virus. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 114, 145-150.

Smith K. M. (1935): A new virus disease of the tomato. *Annals of Applied Biology*, 22, 731-741.

Spedding G., Ratty A., Middleton E. Jr. (1989): Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antiviral Research*, 12, 99-110.

Srivastava K. J., Gupta S. (2009): Extraction, Characterization, Stability and Biological Activity of Flavonoids Isolated from *Chamomile* Flowers. *Molecular and Cellular Pharmacology*, 1, 138-147.

Tomlinson J. A., Faithfull E. M. (1984): Studies on the Occurrence of tomato bushy stunt virus in English rivers. *Annals of Applied Biology*, 104, 485-495.

Werma V. S. (1973): Study on the effect of flavonoids on the infectivity of the potato virus X. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, 128, 467-472

Williams A. C., Harborne B. J., Geiger H., Hoult J. S. Hoult. (1999): The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their anti-inflammatory properties. Phytochemistry, 51, 417-423.

[http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img\\_query?query\\_src=photos\\_flora\\_sci&seq\\_num=195594&one=T](http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?query_src=photos_flora_sci&seq_num=195594&one=T)

<http://luirig.altervista.org/cpm/albums/zepigi1/001-centaurea-rupestris.jpg>

<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1>

<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=382>