Uzgoj viroida i fitoplazmi u kulturi izdanaka vrsta Gynura aurantiaca (Blume) DC. i Catharanthus roseus (L.) G. Don.

Panjkota, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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/urn:nbn:hr:217:221307

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Iva Panjkota

Uzgoj viroida i fitoplazmi u kulturi izdanaka vrsta *Gynura aurantiaca* (Blume) DC. i *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za mikrobiologiju
Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
pod voditeljstvom red. prof. dr. sc. Mirne Ćurković Perica,
radi stjecanja zvanja profesor biologije i kemije.

ZAHVALA

Najveću zahvalu upućujem mentorici dr. sc. Mirni Ćurković Perica na stručnom vodstvu, savjetima, pomoći i velikom razumijevanju tijekom izrade diplomskog rada.

Također zahvaljujem svojoj obitelji na podršci, pomoći, beskrajnom strpljenju i pruženoj ljubavi. Mama, tata, Lovro, Martine – hvala vam na svemu!

Nadalje hvala svim mojim kolegicama i prije svega prijateljicama na pruženoj podršci tokom cijelog studija. Margerita, Katarina, Marija, Dubravka, Marina, Ana od srca vam zahvaljujem na svemu!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Diplomski rad**
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Uzgoj viroida i fitoplazmi u kulturi izdanaka vrsta *Gynura aurantiaca* (Blume) DC. i *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

Iva Panjkota
Rooseveltov trg 6, Zagreb

Citrus exocortis viroid (CEVd), '*Candidatus* Phytoplasma asteris' (soj HydB), '*Ca.* Phytoplasma solani' (soj SA-I), '*Ca.* Phytoplasma ulmi' (soj EY-C) i '*Ca.* Phytoplasma pruni' (soj KVI) biljni su patogeni koji uzrokuju bolesti različitih biljnih vrsta. U ovom istraživanju uzgajani su u uvjetima *in vitro* u biljkama domaćinima *Gynura aurantiaca* (Blume) DC. i *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. U hranidbene podloge za uzgoj zaraženih biljaka dodani su biljni regulatori rasta, auksini i citokinini, s ciljem istraživanja kako njihov dodatak utječe na rast i simptome biljaka domaćina. Praćen je rast zaraženih i zdravih biljaka domaćina tijekom tri supkulture. Citokinini su u zdravim i viroidom zaraženim izdancima biljke *G. aurantiaca* uzrokovali slabiji rast, te su i nezaraženi i viroidom zaraženi izdanci bolje rasli na podlozi bez citokinina. Dodatak auksina indol-3-maslačne kiseline u hranidbenu podlogu uzrokovao je bolji rast izdanaka vrste *C. roseus* zaraženih različitim sojevima fitoplazmi, a u nekih je uzrokovao i povlačenje simptoma zaraze.

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici PMF-a, Marulićev trg 20/2, Zagreb
Rad sadrži: 45 stranica, 15 slika, 5 tablica, 75 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: auksin, citokinin, *Citrus exocortis viroid,* '*Candidatus* Phytoplasma asteris', '*Ca.* Phytoplasma solani', '*Ca.* Phytoplasma ulmi' i '*Ca.* Phytoplasma pruni'
Mentor: Dr. sc. Mirna Ćurković Perica, red. prof.
Ocjenjivači: Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, red. prof.
Dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.
Zamjena: Dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek, izv. prof.
Rad prihvaćen: srpanj, 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

In vitro cultivation of viroid-infected shoots of *Gynura aurantiaca* (Blume) DC. and phytoplasmas-infected shoots of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

Iva Panjkota
Rooseveltov trg 6, Zagreb

Citrus exocortis viroid (CEVd), 'C*andidatus* Phytoplasma asteris' (strain HydB), '*Ca.* Phytoplasma solani' (strain SA-I), *'Ca.* Phytoplasma ulmi' (strain EY-C) and *'Candidatus* Phytoplasma pruni' (strain KVI) are plant pathogens that cause diseases of different plant species. In this study they were grown *in vitro* in host plants *Gynura aurantiaca* (Blume) DC. and *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Plant growth regulators, auxins and cytokinins, were supplemented to nutrient medium for cultivation of infected plants in order to test their effect on the growth and symptoms of host plants. The growth of infected and healthy host plants was monitored through three subcultures. In healthy and viroid-infected shoots of *G. aurantiaca* cytokinins suppresed growth; both non-infected and viroid-infected shoots showed better growth on the medium without cytokinins. Addition of auxin indole-3-butyric acid into medium caused better growth of *C. roseus* shoots infected with different phytoplasma strains and in some cases it caused remission of symptoms.

Thesis is deposited in the Central Biological Library
Thesis includes: 45 pages, 15 figures, 5 tables, 75 references, originali in: Croatian
Key Words: auxin, cytokinin, *Citrus exocortis viroid,* '*Candidatus* Phytoplasma asteris', '*Ca.* Phytoplasma solani', '*Ca.* Phytoplasma ulmi' i '*Ca.* Phytoplasma pruni'
Supervisor: Dr. Mirna Ćurković Perica, Prof.
Reviewers: Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Prof.
Dr. Ines Radanović, Prof.
Substitution: Dr. Draginja Mrvoš-Sermek, Prof.
Thesis accepted: July, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD ……1
   1.1. Kultura biljnog tkiva ……1
   1.2. Biljni regulatori rasta ……..4
      1.2.1. Auksini ……4
      1.2.2. Citokinini ……5
   1.3. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don ……7
   1.4. Fitoplazme ……10
   1.5. *Gynura aurantiaca* (Blume) DC. ……14
   1.6. Viroidi ……..16
      1.6.1. Egzokortis-viroid agruma (CEVd) ……17
2. CILJ DIPLOMSKOG RADA ……18
3. MATERIJALI I METODE ……19
   3.1. Materijali ……19
   3.2. Priprema hranidbene podloge za uzgoj biljnih izdanaka ……20
   3.3. Autoklaviranje ……23
   3.4. Rad u komori sa strujanjem sterilnog zraka ……24
   3.5. Statistička obrada rezultata ……25
4. REZULTATI ……..26
   4.1. Učinak citokinina na rast viroidom CEVd zaraženih izdanaka vrste *G. aurantiaca* u uvjetima *in vitro*……26
   4.2. Učinak auksina i citokinina na rast fitoplazmama zaraženih izdanaka vrste *C. roseus* u uvjetima *in vitro* ……30
5. RASPRAVA ……...33
6. ZAKLJUČAK ……..37
7. LITERATURA ……38
8. ŽIVOTOPIS ……45

1. UVOD

1.1. Kultura biljnog tkiva

Tehnike kulture biljnog tkiva i stanica omogućuju istraživanje na mnogim razinama (molekularnoj, staničnoj i razini čitavog organizma). Primjenjuju se u mnogim disciplinama – biokemiji, fiziologiji, genetici, razvojnoj tehnologiji i molekularnoj biologiji. Primjene ovih tehnika postale su izuzetno bitne u posljednjih dvadeset godina u poljoprivredi i šumarstvu, što se najviše vidi u prihvaćanju mikrorazmnožavanja kao pogodne metode za tržišnu proizvodnju (Jelaska 1994). Osim za brzo vegetativno razmnožavanje ove tehnike imaju i druge mogućnosti tržišnog iskorištavanja:

1. za dobivanje biljaka bez patogena, posebno virusa

2. u očuvanju zdravih matičnih biljaka – posebno biljaka potrebnih za biljno oplemenjivanje, ali i očuvanje rijetkih biljnih vrsta i biljnog genofonda

3. u poticanju genetičkih promjena

4. u proizvodnji i izdvajanju vrijednih bioloških proizvoda iz kulture biljnih stanica.

Ovakav način razmnožavanja biljaka bitan je u poljoprivredi jer se na malom prostoru i u kratkom roku može proizvesti veliki broj sadnica - od samo jedne biljke moguće je proizvesti i do 20 milijuna sadnica. To je i ekonomski isplativo zbog znatne uštede energije (Ševo 2011).

Iz malih dijelova tkiva i organa roditeljske biljke pa čak i iz diferenciranih biljnih stanica moguće je regenerirati cijelu biljku u kulturi tkiva (Cheng i sur. 2013). Regeneracija čitave biljke moguća je zbog totipotentnosti biljnih stanica. Svaka diferencirana biljna stanica sadrži sve podatke koji su bili sadržani u prvoj jedinstvenoj stanici te se iz nje može razviti novi biljni organizam. Biljnim regulatorima rasta potiče se razvoj biljnog organizma iz već diferencirane stanice ili tkiva (Jelaska 1994).

Eksplantati se uzgajaju na posebno pripremljenim hranidbenim podlogama koje su najčešće krute, tj. želatinozne, ali mogu biti i tekuće. Te podloge sadržavaju mineralne soli, organske dodatke (vitamine, aminokiseline i sl.) i biljne regulatore rasta. Mlade biljke ili izdanci izloženi su nepromjenjivoj jedinstvenoj mikroklimi koja pruža idealne uvjete za njihov brz rast i razvoj. Biljke se razvijaju u prilagođenim uvjetima male izloženosti zračenju, dovoljne vlažnosti zraka, dovoljne količine šećera i s dodatkom biljnih regulatora rasta. Zbog uzgoja u takvim uvjetima biljke uzgojene *in vitro* (Slika 1) često razviju karakteristike drugačije od biljaka uzgojenih na otvorenom – na polju ili u stakleniku. Zbog posebnih karakteristika kao što je loš mehanizam regulacije nedostatka vode, biljke se često loše aklimatiziraju na uvjete *ex vitro,* a i sama promjena mikroklime im izaziva veliki stres (Hazarika 2006).



Slika 1. Uzgoj biljaka "*in vitro"* (preuzeto iz Aridotech 2016).

Za kulturu biljnog tkiva koristi se često naziv „kultura in vitro" – znači kultura u staklu, jer se kulture uzgajaju u staklenim ili prozirnim plastičnim posudama u sterilnim uvjetima. Izraz „kultura tkiva" upotrebljava se za kultiviranje, tj. manipulaciju bilo kojeg dijela biljnog organizma – od pojedinačne stanice, skupine stanica ili organa (Pevalek-Kozlina 2003). Prema tome razlikujemo kulturu izdanka, embrija, kulturu stanica u suspenziji, kulturu listova, vršnog meristema, protoplasta, kulturu organa, kalusnu kulturu, itd. (Slika 2).



Slika 2. Tipovi biljnih kultura - podjela rađena prema dijelu biljke koji je kultiviran u uvjetima "*in vitro*".

Metode kulture biljnih tkiva i stanica najčešće se koriste za komercijalnu proizvodnju biljka bez patogena (Premkumar i sur. 2001). Na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno–matematičkog fakulteta u Zagrebu održavanje i umnažanje biljaka tehnikom kulture izdanka koristi se za održavanje biljnih patogena. Naime, neke patogene kao što su - viroidi i fitoplazme, nije moguće uzgajati direktno na hranidbenoj podlozi, jer su ovi patogeni izrazito ovisni su o biljci domaćinu.

Viroidi i fitoplazme potrebni za znanstvena istraživanja uzgajaju se u biljkama domaćinima koje se umnožavaju tehnikom kulture izdanka u uvjetima „*in vitro*". Osim genetičkih istraživanja patogena, kulture biljaka zaraženih patogenima koriste se i za istraživanje odnosa biljka-patogen, razjašnjavanje mehanizama obrane biljaka od patogena, te proučavanje mehanizama održavanja patogena u biljci. Dodavanje biljnih regulatora rasta pridonosi boljem rastu zaraženih biljaka, a u posljednje vrijeme i shvaćanju mehanizama preživljavanja i funkcioniranja patogenih organizama.

1.2. Biljni regulatori rasta

Komunikacija i koordinacija između stanica i organa je neophodna za razvoj i preživljavanje višestaničnih organizama. Biljni hormoni (regulatori rasta) su molekule koje funkcioniraju kao kemijski signali koji putuju kroz biljku i održavaju komunikaciju među stanicama (Löfke i sur. 2013). Na taj se način regulira i koordinira metabolizam, rast i morfogeneza biljaka. Neaktivan oblik hormona koji putuje biljkom u stanici se veže na proteinske receptore te zajedno čine aktivan oblik hormona.

Regulatori rasta dijele se u pet grupa: auksini, giberelini, citokinini, etilen i apscizinska kiselina (Pevalek-Kozlina 2003). U ovom radu praćen je rast i razvoj zdravih i patogenima zaraženih biljaka na hranidbenim podlogama s dodatkom auksina ili citokinina.

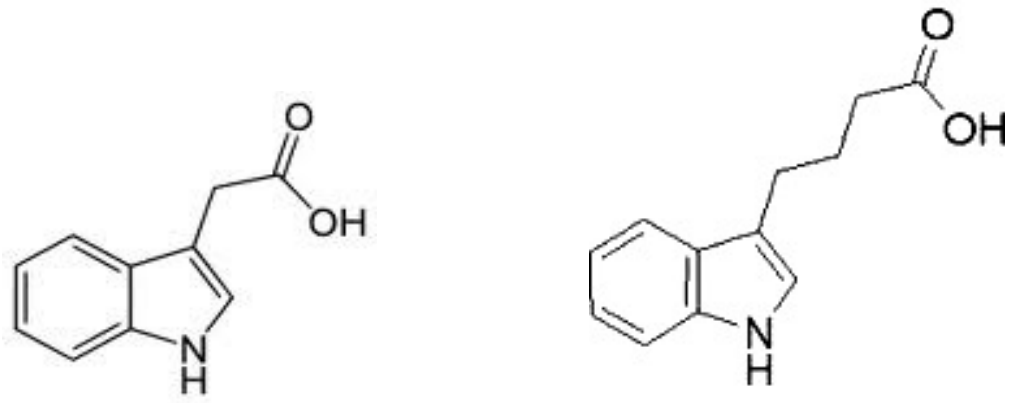
1.2.1. Auksini

U niskim koncentracijama auksini pospješuju produžni rast izdanka i koče rast korijena u dužinu. Ovisno o koncentraciji auksini djeluju na rast, diobu i diferencijaciju biljne stanice (Löfke i sur. 2013). U ovom radu auksini su korišteni kako bismo vidjeli utječu li i na koji način na rast biljaka zaraženih fitoplazmama.

Najpoznatiji prirodni auksin, indol-3-octena kiselina (IAA) (Slika 3a), sintetizira se u meristemskim tkivima i tkivima embrija, kao i u fotosintetizirajućim organima (Finet i Jaillais 2012). Na svom putu prema korijenu biljke auksini djeluju na mnogobrojne razvojne procese biljnog organizma. Tako djeluju na vaskularizaciju tkiva, inhibiraju rast bočnih pupova (apikalna dominacija), a u visokim koncentracijama stimuliraju začetak bočnog i adventivnog korijenja (Tivendale i sur. 2014). Auksini posreduju i u odgovorima na podražaje iz okoliša i to na svjetlost (fototropizam) i na gravitacijsku silu (geotropizam). Odgađaju rane stadije apscizije (otpadanje listova, cvjetova i plodova), te pozitivno utječu na razvoj plodova.

Među prvim otkrivenim auksinima je indol-3-maslačna kiselina (IBA) (Slika 3b), vrlo sličnog kemijskog sastava kao IAA. Neka istraživanja su pokazala da su sintetski auksini stabilniji od prirodnih auksina (Dunlap i sur. 1986). Sintetski auksini koriste se

za poticanje cvjetanja, sprječavanje opadanja listova i plodova, zakorjenjivanje reznica, ubrzavanje zoridbe plodova, te kao selektivni herbicidi.



a) b)

Slika 3. a) indol-3-octena kiselina (IAA); b) indol-3-maslačna kiselina (IBA).

Velike koncentracije auksina mogu inhibirati rast stanica, jer auksin inducira proizvodnju etilena koji zatomljuje produžni rast stanica.

1.2.2. Citokinini

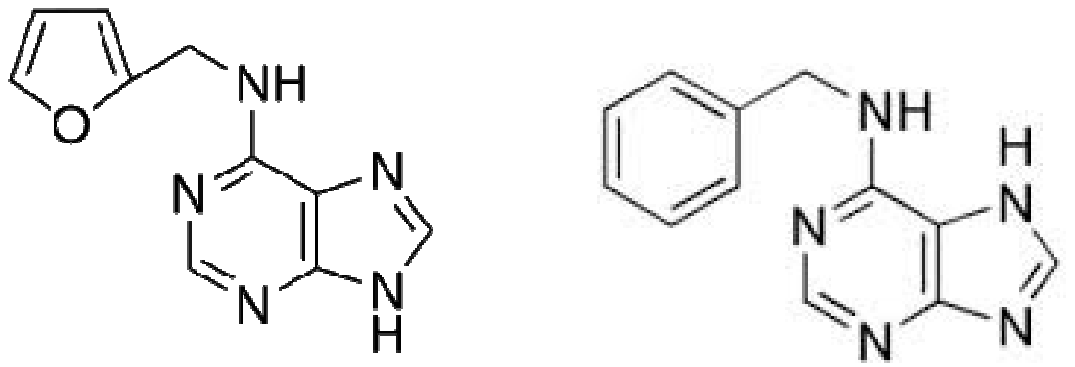
Skoog i sur. 1962. godine (preuzeto iz Pevalek-Kozlina 2003) su prilikom pokušaja pronalaženja tvari koja bi stimulirala rast i razvoj biljnih stanica uzgajanih u kulturi *in vitro* otkrili citokinine. To su biljni regulatori rasta koji sudjeluju u brojnim biološkim procesima u životu biljke (Brault i Maldiney 1999). Oni pospješuju citokinezu, tj. diobu stanica, utječu na mobilizaciju hranjivih tvari, sazrijevanje kloroplasta, odgađanje senescencije listova, regulaciju rasta korijena i izdanka (Heyl i Schmülling 2003), razvoj cvijeta i sjemena, prekid dormancije sjemena, kontrolu morfogeneze (Zalabák i sur. 2013). Bitnu ulogu citokinini imaju u sintezi i razvoju plastida. Tako u tamnom okruženju citokinini aktiviraju diferencijaciju etioplasta, dok na svjetlu stimuliraju razvoj kloroplasta (Kulaeva i sur. 2002). Važnu ulogu imaju u poticanju rasta bočnih pupova djelujući antagonistički prema utjecaju auksina na apikalnu dominaciju.

Prvi je otkriven kinetin (6-furfurilaminopurin) (Mok i Mok 2001), i to prilikom autoklaviranja uzorka DNA. Prirodni citokinini su N^6-supstituirani derivati adenina

(Zalabák i sur. 2013), koji imaju bočni lanac od pet ugljikovih atoma (upravo broj C-atoma utječe na aktivnost citokinina). Sinteza citokinina se odvija u vršnom meristemu korijena, embrijima i plodovima.

Benzil-adenin ili benzilaminopurin (BAP) je sintetski citokinin, koji prema nekim testovima pokazuje veću aktivnost od najjačeg prirodnog citokinina zeatina.

Kemijske strukture kinetina (KIN) i BAP-a prikazane su na slici 4a i 4b.



a) b)

Slika 4. a) 6-furfurilaminopurin (KIN); b) benzilaminopurin (BAP).

Citokinini ne djeluju samostalno na razvojne procese biljke, već djeluju ili sinergistički ili antagonistički s drugim signalima. Ti signali mogu biti endogeni kao npr. drugi hormoni biljke, ili pak egzogeni kao npr. svjetlost (Brault i Maldiney 1999).

Auksini i citokinini međusobnim djelovanjem kontroliraju mnoge razvojne procese biljke. U ovom diplomskom radu praćen je rast zaraženih biljaka s dodatkom egzogenih hormona auksina i citokinina. Oni upravo na rast korijena i izdanka djeluju antagonistički. Auksini potiču rast centralnog izdanka (apikalna dominacija), dok dodatak citokinina utječe upravo na razvoj bočnih izdanaka. U korijenu auksini potiču razvoj sekundarnog korijenja, dok citokinini djeluju antagonistički i potiču rast primarnog korijena. Auksini i citokinini djeluju i sinergistički na ekspresiju nekih gena (Brault i Maldiney 1999).

Za regeneraciju i rast stabljike ili korijena biljke bitan je koncentracijski omjer auksina i citokinina. Ukoliko nedostaje jedan od ova dva hormona neće doći do povećanja i rasta biljnog organizma (Pevalek-Kozlina 2003).

1.3. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

Carstvo: Plantae (biljke)
Podcarstvo: Tracheobionta (vaskularne biljke)
Koljeno: Spermatophyta (sjemenjače)
Potkoljeno: Magnoliophyta (cvjetnice)
Razred: Magnoliopsida – Dicotyledones
Podrazred: Asteridae
Red: Gentianales
Porodica: Apocynaceae
Rod: *Catharanthus* G. Don
Vrsta: *Catharanthus roseus*

Sistematika madagaskarskog zimzelena *Catharanthus roseus* (L.) G. Don prema USA Department of Agriculture (United States Department of Agriculture 2014).

Catharanthus roseus (L.) G. Don služi kao biljka domaćin za fitoplazme uzgajane u kulturi *in vitro*. Fitoplazme su biljni patogeni koji ne mogu rasti direktno na hranidbenoj podlozi. Kao domaćin koristi se *C. roseus* jer su različiti sojevi fitoplazmi upravo u toj biljci prisutni u visokom titru, što je pogodno za istraživanje ovih patogena. *C. roseus* jedna je od nekoliko biljnih vrsta najčešće korištenih u znanstvenim istraživanjima. Model je za proučavanje sekundarnog metabolizma biljaka (Mu i sur. 2012).

Catharanthus roseus (L.) G. Don (madagaskarski zimzelen) je biljka trajnica, iako se kod nas uzgaja kao jednogodišnja biljka. Porijeklom je sa Madagaskara, tijekom 18.-tog stoljeća prenesena je u Europu, a danas je široko rasprostranjena i kultivirana biljka. Pripada tropskoj porodici biljaka *Apocynaceae* (Singh i sur. 2001) što se vidi u navedenoj sistematici. Pogoduje joj toplija tropska i subtropska klima (ne podnosi temperature ispod 5°C). Glatki kožasti listovi madagaskarskog zimzelena tamnozelene su boje, ovalni, od pet do sedam cm dugi, te bez dlaka (glatki). *C. roseus* dobro raste na sunčanom položaju do polusjeni, dok zemlja u kojoj raste mora biti vlažna. Biljka u prirodi raste u obliku grma, te može narasti do 90 cm u visinu. Kao i ostale članice porodice sadrži mliječni sok. Cvjeta tokom cijelog ljeta (cvijet se

sastoji od 5 petala), u nijansama od ružičaste do ciklama boje (Slika 5a), dok su cvjetovi divljeg tipa bijele boje sa tamno-crvenim centrom (Slika 5b) (Heywood 1993).



a)



b)

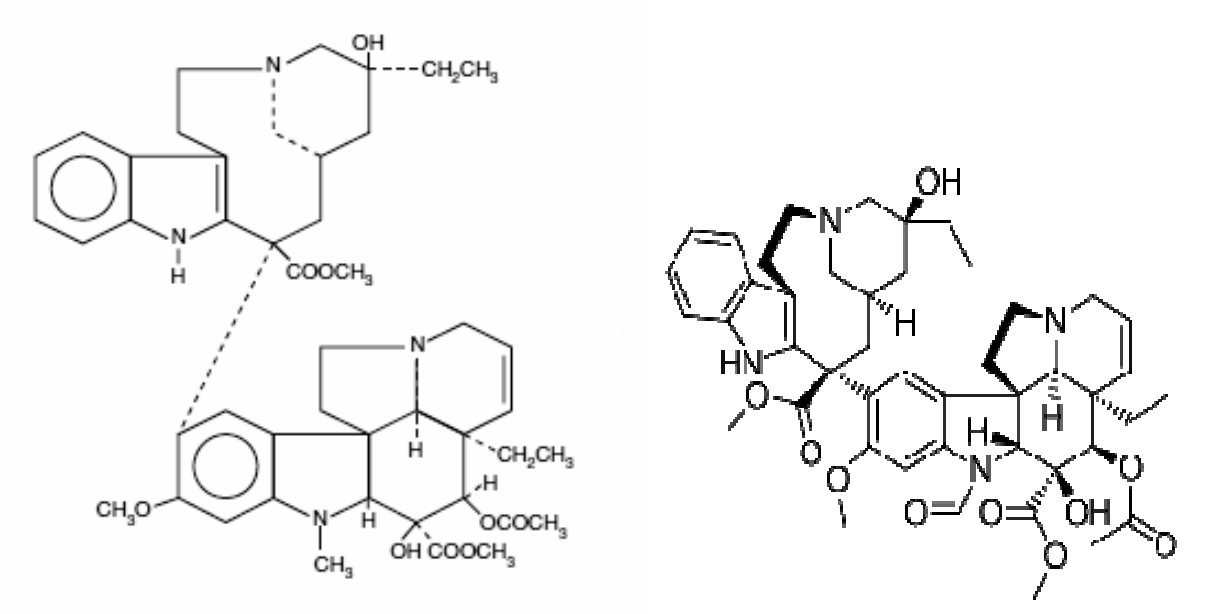
Slika 5. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: a) uzgojen u hortikulturi (preuzeto iz Franco 2011); b) divlji tip (preuzeto iz Prendusi 2014).

C. roseus se uzgaja kao ukrasna ili kao ljekovita biljka. Lako se uzgaja iz sjemena, a sjemenke su u mahunama. Popularan je kao ukrasna biljka zbog dugog cvjetnog razdoblja, u tropima cvjeta tokom cijele sezone, dok u nas cvjeta od proljeća do kasne jeseni i to do prvih mrazova (Royal Botanic Gardens 2014).

Biljka se od davnina koristila u medicini kao „narodni lijek“ za različite bolesti. Tako se u Indiji, Brazilu, Engleskoj i drugim zemljama koristila protiv dijabetesa i malarije, u Indiji su pomoću soka lišća liječili ubode insekata, dok se u Americi koristila protiv laringitisa, bolova grla, te protiv bolova u prsima (Anthwal i sur. 2012). Na Kubi su ekstraktom cvijeta ispirali oči djece, na Bahamima su koristili ljekovita svojstva za liječenje tuberkuloze, astme te loše probave. Također se *C. roseus* koristio protiv visokog krvnog tlaka, limfoma, menstrualnih bolova i kao diuretik. U Francuskoj se vjerovalo da ima magična svojstva i tjera zle duhove, te su biljku zvali i „čarobnjakova ljubičica“ (Duke i sur. 1985).

Zanimanje znanstvenika za ovu biljku počelo je 50-tih godina prošlog stoljeća, kada se pročulo da se „zimzelenov čaj“ na Jamajci koristi za liječenje dijabetesa. Daljnjim istraživanjima dokazano je da ne liječi dijabetes, ali sadrži spojeve koji su bili djelotvorni u liječenju leukemije (Graham i sur. 2003).

C. roseus sadrži više od 120 različitih alkaloida, a mnogi su jako važni za farmaceutsku industriju. Neki od njih već se koriste u liječenju raznih bolesti. Ajmalicin djeluje u liječenju visokog krvnog tlaka, dok vinblastin i vinkristin posjeduju antikancerogena svojstva, te se koriste za liječenje nekih vrsta tumora (Rischer i sur. 2006). Na slici 6 prikazana je kemijska struktura vinblastina i vinkristina.



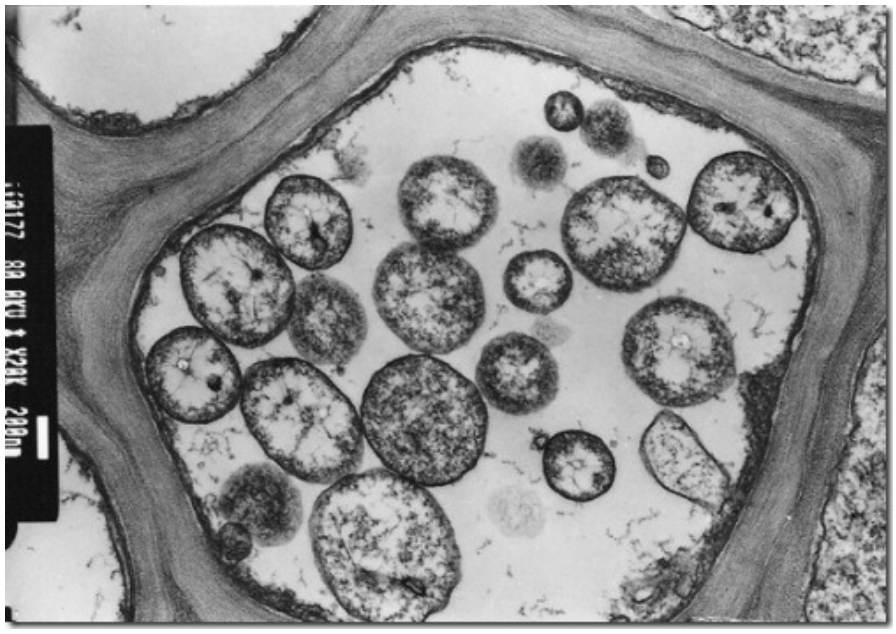
Slika 6. Alkaloid vinblastin (lijevo) i alkaloid vinkristin (desno).

Među alkaloidima koji su zastupljeni u vrsti *C. roseus* su i serpentin i reserpin (jaka sredstva za smirenje), katarantin, vindolinin (smanjuje šećer u krvi), vindolin i mnogi drugi. Sekundarni metaboliti ove biljke koji se koriste kao lijekovi trebaju se uzimati pod nadzorom liječnika.

1.4. Fitoplazme

Fitoplazme su prokarioti bez stanične stijenke. Stanice su pleomorfne, promjenjivog ali najčešće sferičnog oblika (Slika 7), te promjera manjeg od jedan µm (oko 500 nm). Omeđuje ih troslojna membrana, a DNA slobodno pluta u citoplazmi. Genom je najčešće građen od jedne kružne dvolančane molekule DNA (Bai i sur. 2006).

To su biljni patogeni odgovorni za nekoliko stotina bolesti ekonomski značajnih biljaka širom svijeta kao što su vinova loza, drveće i ukrasno bilje (Lee i sur. 2000).



Slika 7. Mikroskopski snimak fitoplazmatskih stanica u biljnom tkivu (preuzeto iz Castro 2011).

Fitoplazme su po građi i svojstvima slične mikoplazmama koje su uzročnici bolesti čovjeka. Do 1993. godine umjesto izraza „fitoplazme“ koristio se izraz MLO (mikoplazmama slični organizmi) za sve uzročnike bolesti žućenja listova, patuljastog rasta ili sindroma vještičje metle (McCoy 1989). Na desetom kongresu Međunarodne organizacije za mikroplazmologiju održanom 1993. godine usvojen je naziv „fitoplazme“ (Tully 1993).

Fitoplazme su zajedno s mikoplazmama smještene u razred *Mollicutes.* Sama klasifikacija unutar razreda je otežana, jer fitoplazme nije moguće uzgajati na umjetnoj podlozi *in vitro*, one su obligatni paraziti pa ne mogu živjeti bez biljke

domaćina ili kukca vektora. Redukcija genoma rezultirala je gubitkom nekih metaboličkih funkcija i zato fitoplazme ne mogu same sintetizirati ATP, nukleotide ili aminokiseline već te esencijalne metabolite moraju pribaviti od biljke domaćina (Bai i sur. 2006). Woese i sur. (1980) pretpostavili su da redovi *Mycoplasma*, *Spiroplasma* i *Acholeplasma* potječu od zajedničkog pretka Gram-pozitivne bakterije, što je potvrđeno i drugim radovima (Weisburg i sur. 1989).

U prošlosti se klasifikacija fitoplazmi temeljila na biološkim svojstvima tj. simptomima bolesti koje uzrokuju na biljkama. U današnje vrijeme razvijene su puno pouzdanije i osjetljivije metode za detekciju, identifikaciju i klasifikaciju, a jedna od njih je lančana reakcija polimerazom (PCR) (Lee i sur. 1993).

Pripadnost fitoplazmi razredu *Mollicutes* potvrđena je filogenetskim analizama gena za 16S rRNA (Lee i sur. 1993, Lee i sur. 2000) i na osnovi polimorfizma tog gena fitoplazme su podijeljene u 15 skupina i više od 40 podskupina (Lee i sur. 2000).

Biljke zaražene fitoplazmama pokazuju čitav niz različitih simptoma. Najčešći simptomi su promjene u boji listova (žućenje ili crvenjenje), kovrčanje listova (u vinove loze), patuljasti rast, kržljavost, ozelenjavanje tj. gubitak pigmenta cvijeta (virescencija), transformacija cvjetnih dijelova u listove (filodija), sterilnost cvjetova, neodrvenjavanje stabljike, abnormalni razvitak bočnih ogranaka (proliferacija, tzv. „vještičja metla“), te skraćivanje i sušenje korjenčića (Cousin 1995). Neki od simptoma prikazani su na slici 8.

Fitoplazme se u najvećoj koncentraciji nakupljaju u floemu biljke (Christensen i sur. 2004), ali ih ima i u citoplazmi stanica floemskog parenhima blizu sitastih elemenata (Sears i Klomparens 1989). Kad su u biljci prisutne u visokoj koncentraciji, izazivaju začepljenje sitastih cijevi provodnih žila koje služe za opskrbu biljke hranjivim tvarima, te poremećaj transporta biljnih regulatora rasta.



a)



b)



c)



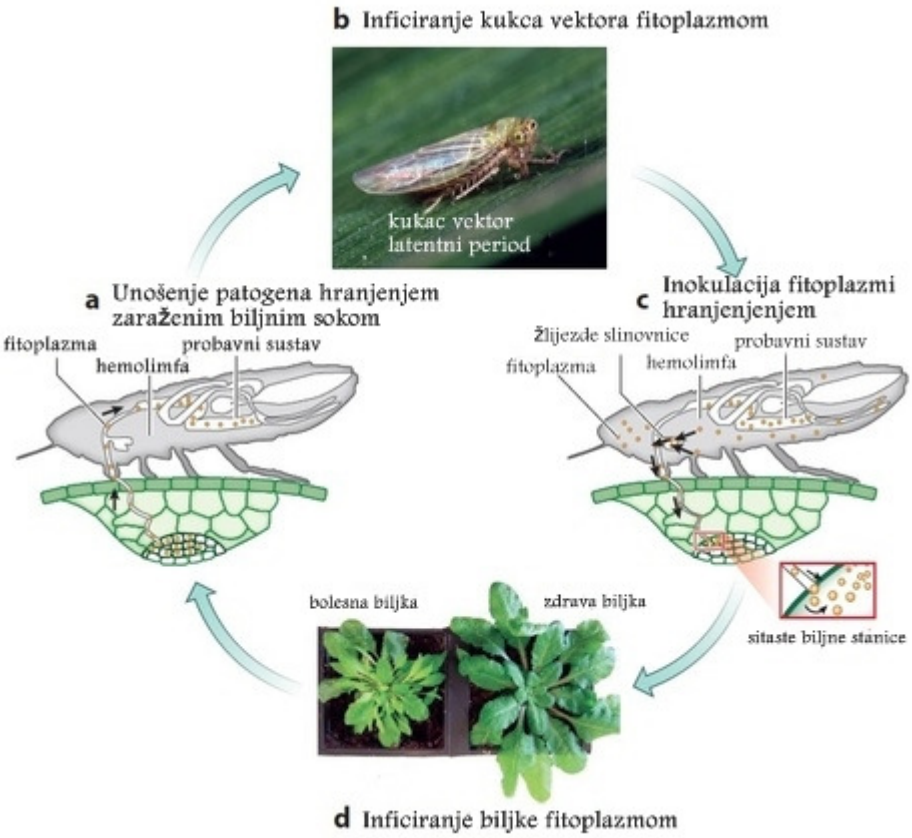
d)

Slika 8. a) bolest žućenja listova na kokosovoj palmi, Florida (preuzeto iz Davis 1977); b) transformacija cvjetnih dijelova u listove na djetelini, Italija (preuzeto iz Davis 1992); c) sindrom „vještičje metle“ (preuzeto iz Panoramio 2014); d) fitoplazmom zaražen vinograd Chardonnay-a u Italiji (preuzeto iz Davis 2010).

Obzirom da su fitoplazme ograničene na floem biljke, za prijenos s jedne na drugu biljku potrebni su vektori, a to su uglavnom kukci koji se hrane biljnim sokom. Vektori fitoplazmi pripadaju redu Hemiptera, podred Homoptera, porodicama: Cicadellidae, Fulgoridae i Psyllidae (Weintraub i Beanland 2006).

Ciklus počinje hranjenjem kukca sokom zaražene biljke. Na taj način kukac u svoj organizam unosi patogene. Fitoplazme prolaze kroz stijenku probavnog trakta, razmnožavaju se u hemolimfi i dospijevaju u žlijezde slinovnice. Fitoplazme zatim prelaze iz stanica žlijezda slinovnica u slinu, pa prilikom slijedećeg hranjenja kukac putem sline prenosi fitoplazme u zdravu biljku (Slika 9) (Lefol i sur. 1994). Latentni period od inficiranja kukca-vektora do mogućnosti da kukac prenese patogene na biljku prilikom hranjenja iznosi između sedam i osamdeset dana (Murral i sur. 1996). U biljci se simptomi infekcije mogu razviti oko sedam dana nakon unošenja fitoplazme, ali i puno kasnije – do dvije godine, što ovisi o vrsti biljke i fitoplazme (Hogenhout i sur. 2008).

Neke vrste fitoplazmi mogu biti prenošene putem više vrsta kukaca-vektora, dok neke prenosi točno određena vrsta. Nadalje, fitoplazme se često prenose vegetativnim razmnožavanjem (lukovicama, reznicama, rizomima).



Slika 9. Životni ciklus fitoplazmi unutar kukca-vektora i biljke domaćina (preuzeto iz www.scoop.it 2014).

1.5. *Gynura aurantiaca* (Blume) DC.

Carstvo: Plantae (biljke)
Podcarstvo: Tracheobionta (vaskularne biljke)
Koljeno: Spermatophyta (sjemenjače)
Podkoljeno: Magnoliophyta (cvjetnice)
Razred: Magnoliopsida – Dicotyledones
Podrazred: Asteridae
Red: Asterales
Porodica: Asteraceae
Rod: *Gynura* Cass. – gynura
Vrsta: *Gynura aurantiaca* (Blume) DC.

Sistematika biljke *Gynura aurantiaca* (Blume) DC. prema USA Department of Agriculture (United States Department of Agriculture 2014).

Vrsta *Gynura aurantiaca* (Blume) DC. je biljka porijeklom iz Azije i Indonezije. Danas je široko rasprostranjena. Prepoznatljiva je po tamno zelenom lišću prekrivenom gustim ljubičastim dlačicama koje odaju dojam baršuna. Dlake se nalaze na prednjoj i stražnjoj strani plojke, peteljci i stabljici. Zbog toga je često nazivaju „baršunasta biljka“ ili „purpurna strast“. Biljka je puzava, može narasti do jednog metra. Na slici 10a prikazan je karakterističan izgled biljke i njenog cvijeta; cvjeta ljeti, a cvjetovi su žuto-narančaste boje (Slika 10b), te karakterističnog neugodnog mirisa (Wisegeek 2014).

G. aurantiaca raste na svjetlim mjestima, ali ne smije biti direktno izložena jakom suncu. Ukoliko nema dovoljno svjetla gubi svoju ljubičastu boju. Kako biljka stari tako gubi karakterističnu boju a zadržava je na mladim izbojcima. Raste dobro na hranjivoj i vlažnoj zemlji. Prilikom zalijevanja treba izbjegavati polijevanje listova jer će to potaknuti trunjenje. Pošto se lako zakorjenjuje pomoću reznica dobro ju je češće obnavljati. Ova biljka ne podnosi veliku hladnoću, pa ju je potrebno tijekom zime držati u kući (Guide to Houseplants 2014).



a)



b)

Slika 10. *Gynura aurantiaca* (Blume) DC. a) biljka (preuzeto iz House Plants Guru 2014) i b) cvijet (preuzeto iz Jagel 2014).

U kineskoj narodnoj medicini korijen ove biljke koristio se za smanjivanje bolova i za poticanje cirkulacije. *Gynura* sadrži različite alkaloide od kojih su neki jako otrovni za čovjeka. Zato treba paziti s uporabom ovog lijeka (Dai i sur. 2007).

Gynura aurantiaca (Blume) DC. pokazala se i kao jako dobar domaćin viroida. Viroidi se u ovoj biljci nalaze u velikom titru, što omogućava lakše istraživanje utjecaja biljnih regulatora rasta na rast i metabolizam zaražene i zdrave biljke. *Gynura aurantiaca* nakon infekcije viroidom pokazuje različite simptome bolesti kao što su epinastija, malformacija lista i usporen rast biljke (Flores i Rodríguez 1981).

1.6. Viroidi

Viroidi su uzročnici zaraznih bolesti dosad nađeni samo u biljnim vrstama (Di Serio i sur. 2012). Građeni su od male kružne jednolančane molekule RNA. Genom im je veličine od 246 do 401 nukleotida (Ding 2009, Navarro i sur 2012), što znači da su značajno manji od genoma najmanjih virusa. Viroidi su najmanji RNA patogeni poznati u prirodi. Za razliku od biljnih i životinjskih virusa viroidi su nekodirajuće RNA (ne mogu kodirati proteine potrebne za vlastitu replikaciju pa koriste enzime biljke domaćina). Zato se smatraju parazitima transkripcijskih sustava biljke.

Unatoč tome što nemaju nikakvu ovojnicu oko ribonukleinske kiseline viroidi su jako stabilne molekule zbog svoje sekundarne strukture. Naime dolazi do sparivanja nukleotida zbog čega viroidna RNA poprima stabilan štapićast oblik. U uvjetima *in vitro* mogu poprimiti i metastabilne strukture koje poprimaju oblik ukosnice (Flores i sur. 1997).

Prema „Subviral RNA Database „ od 03.05.2016. opisano je ukupno 42 viroidne vrste s ukupno 2870 sekvenci (http://subviral.med.uottawa.ca). Sve vrste viroida svrstane su u dvije porodice. *Pospiviroidae* je porodica sa 31 opisanom viroidnom vrstom koje se repliciraju i akumuliraju u jezgri, četiri vrste su unutar porodice *Avsunviroidae*, dok ostalih sedam nije klasificirano. Za *Avsunviroidae* karakteristično je da se repliciraju i akumuliraju u plastidima i to uglavnom u kloroplastima (Owens i sur. 2011). Većina viroida otkrivena je zbog patogenih promjena koje izazivaju na biljkama. Unatoč tome otkriva se sve veći broj viroida koji ne uzrokuju nikakve simptome zaraze na biljci domaćinu. Hoće li biljka pokazivati simptome zaraze patogenom ovisi o interakciji viroid – biljka domaćin.

Osim za replikaciju viroidi koriste proteine biljke domaćina i za transport duž biljnog organizma kao i za transport s mjesta replikacije (iz citoplazme u jezgru ili kloroplast) i suprotno. Viroidi kroz cijelu biljku putuju floemom, dok između stanica putuju plazmodezmijama (Zhong i sur 2008).

Unatoč tome što su viroidi male nekodirajuće RNA molekule mogu izazvati slične simptome bolesti na biljci domaćinu kao i DNA i RNA virusi (Navarro i sur. 2012). Oni najčešće negativno utječu na metaboličke procese rasta, pa su takve biljke kržljave,

niskog rasta, deformiranih listova i plodova. Neki od simptoma zaraze viroidom su ljuštenje kore stabla, nekroza listova, mozaični simptomi i klorotične pjege listova te propadanje stanica, tkiva ili pak čitave biljke (Diener 1993).

Diener i sur. (1993) navode i da viroidi često u jednom domaćinu izazivaju simptome bolesti dok u drugom (često genetski srodnom) biljnom domaćinu ti simptomi potpuno izostaju iako se viroid pojavljuje u istom titru. Jako male promjene u viroidnom genomu mogu izazvati velike razlike u simptomima zaraze.

Viroidi se najčešće šire utjecajem čovjeka i to vegetativnim razmnožavanjem ili mehaničkim prijenosom preko alatki za obradu zemlje i oblikovanje biljaka. U puno rjeđim slučajevima viroidi se prenose lisnim ušima ili kukcima vektorima (Francki i sur. 1986).

Viroidi se jako često koriste i služe kao model u molekularno-biološkim istraživanjima zbog svoje vrlo jednostavne građe. Također su modeli u istraživanjima molekularne evolucije, a smatra se da su mogući relikti RNA prasvijeta. Osim što mogu izazvati velike štete na usjevima viroidi su neki put i korisni u poljoprivredi. Semancik i sur. (1997) dokazali su da se neki egzokortis-viroidi mogu primjenjivati za ubrzavanje zriobe plodova. Nakon infekcije drveta naranče viroidom plodovi zriju puno ranije.

1.6.1. Egzokortis-viroid agruma (CEVd)

Citrus exocortis viroid (CEVd) uzročnik je bolesti agruma. Uzrokuje karakteristično ljuštenje kore stabala agruma kao i zaostajanje u rastu cijele biljke (Duran-Vila i sur. 2000). Vrlo je značajan patogen jer je široko rasprostranjen i uzrokuje velike ekonomske štete. Svrstan je u porodicu Pospiviroidae (Flores i sur. 2000).

CEVd zaražava mnoge drvenaste i zeljaste biljne domaćine koji su pogodni za eksperimentalna istraživanja jer u fenotipu pokazuju tipične simptome zaraze (Murcia i sur. 2011). Najčešće biljke domaćini su iz porodice Rutaceae (rod *Citrus*), ali su zarazi viroidom podložne i neke druge značajne ekonomske kulture kao što je krumpir (porodica Solanaceae). Domaćin koji pokazuje karakteristične simptome zaraze CEVd-om je i biljna vrsta na kojoj je rađeno istraživanje za ovaj diplomski rad – *Gynura aurantiaca*. CEVd u ovoj vrsti dostiže visoki titar, što je pogodno za daljnja istraživanja ovog patogena.

2. CILJ DIPLOMSKOG RADA

Biljni patogeni viroidi i fitoplazme uzročnici su velikih ekonomskih šteta jer smanjuju poljoprivredne prinose, ali su i vrlo važan model u molekularno-biološkim istraživanjima. Obzirom na građu genoma bitan su dio informacije za bolje shvaćanje evolucije. Zato se ovi patogeni uzgajaju u uvjetima *in vitro* kako bi se na njima vršila daljnja istraživanja, te kako bi bolje shvatili odnos patogena i biljke domaćina. Obzirom da se viroidi i fitoplazme ne mogu uzgajati direktno na hranidbenoj podlozi, uzgajaju se u biljkama domaćinima koje pokazuju simptome infekcije u fenotipu (bioindikatori). U biljkama domaćinima *C. roseus* i *G. aurantiaca* ovi su patogeni prisutni u visokoj koncentraciji te su stoga ovi domaćini i pogodni za održavanje navedenih patogena.

U ovom diplomskom radu osvrnula sam se na odnose biljka – patogen te kako dodatak biljnih regulatora rasta (auksina i citokinina) utječe na rast zdravih i zaraženih biljnih vrsta.

Ciljevi istraživanja su:

- istražiti kako dodatak različitih citokinina utječe na produžni rast zdravih i viroidom CEVd zaraženih biljaka vrste *G. aurantiaca*;
- istražiti kako dodatak različitih regulatora rasta (citokinina i auksina) utječe na produžni rast zdravih i različitim sojevima fitoplazmi (‘*Candidatus* Phytoplasma asteris’ (soj HydB), ‘*Candidatus* Phytoplasma solani’ (soj SA-I), ‘*Candidatus* Phytoplasma ulmi’ (soj EY-C), ‘*Candidatus* Phytoplasma pruni’ (soj KVI)) inficiranih biljaka vrste *C. roseus*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Lančanom reakcijom polimeraze (eng. Polymerase Chain Reaction = PCR) prethodno je utvrđena prisutnost viroida CEVd (*Citrus exocortis viroid*) u biljci *Gynura aurantiaca* (Blume) DC. Izdanci biljke domaćina uzgajani su u laboratorijskim uvjetima *in vitro* na hranidbenoj podlozi MS (Murashige i Skoog 1962). U podlogu su dodani regulatori rasta: benzilaminopurin (BAP) ili kinetin (KIN), u koncentracijama navedenim u Tablici 1. Zdravi izdanci, bez znakova infekcije viroidom, uzgajani su na istoj hranidbenoj podlozi s dodatkom istih koncentracija biljnih regulatora rasta, kao i zaraženi izdanci, te su služili kao kontrola.

Na svakoj hranidbenoj podlozi održavana su po 24 uzorka kroz tri supkulture, pri čemu je praćen njihov rast. Period svake supkulture trajao je šest tjedana. Visina svakog izdanka mjerena je na početku i na kraju supkulture. Omjer konačne i početne vrijednosti za svaki izdanak korišten je za izračunavanje „faktora porasta izdanka". Kulture uzgajane u uvjetima *in vitro* uzgajane su na temperaturi od 20 do 25 °C, uz 16-satno osvjetljenje (fluorescentno svjetlo, 40 W).

Tablica 1. Biljni regulatori rasta i njihova koncentracija u MS (Murashige i Skoog 1962) hranidbenoj podlozi za uzgoj zdravih i viroidom CEVd zaraženih izdanaka vrste *Gynura aurantiaca* (Blume) DC.

Biljka domaćin	Prisutnost viroida	Regulator rasta	Koncentracija regulatora rasta (mg/L)
Gynura aurantiaca (Blume) DC.	CEVd	Ø	Ø
		BAP*	1
		KIN**	1
	Zdrava biljka	Ø	Ø
		BAP*	1
		KIN**	1

*benzilaminopurin (BAP), **kinetin (KIN)

Izdanci biljne vrste *Catharanthus roseus* (L.) G. Don zaraženi su s četiri različita soja fitoplazmi i infekcija je prethodno dokazana PCR-om. Sve zaražene biljke dobivene su iz kolekcije referentnih sojeva fitoplazmi koja se održava u Laboratoriju za fitoplazmologiju Sveučilišta u Bolonji (IRPCM, 2004).

Madagaskarski zimzelen zaražen fitoplazmom '*Candidatus* Phytoplasma asteris' (soj HydB) uzgajan je na podlozi s BAP-om i različitim koncentracijama indol-3-maslačne kiseline (IBA). Na istim podlogama praćen je rast biljaka zaraženih sojevima fitoplazmi '*Candidatus* Phytoplasma solani' (soj SA-I) i '*Candidatus* Phytoplasma ulmi' (soj EY-C). '*Candidatus* Pytoplasma pruni' (soj KVI) održavana je samo u madagaskarskom zimzelenu uzgojenom na hranidbenoj podlozi s dodatkom regulatora rasta IBA zbog nedovoljne količine biljnog materijala u trenutku izrade diplomskog rada. Uzgajana je i zdrava biljka na podlogama s dodatkom BAP-a i IBA-e koja je služila kao kontrola (Tablica 2).

Tablica 2. Biljni regulatori rasta i njihova koncentracija u MS (Murashige i Skoog 1962) hranidbenoj podlozi za uzgoj zdravih i fitoplazmama zaraženih izdanaka vrste *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

Biljka domaćin	Soj fitoplazme prisutan u zaraženom domaćinu	Regulator rasta	Koncentracija regulatora rasta (mg/L)
Catharanthus roseus (L.) G. Don.	HydB	BAP*	0.5
		IBA**	2
		IBA**	4
	SA-I	BAP*	0.5
		IBA**	2
	EY-C	BAP*	0.5
		IBA**	2
		IBA**	4
	KVI	IBA**	0.5
	Zdrava biljka	BAP*	0.5
		IBA**	2

*benzilaminopurin (BAP), ** indol-3-maslačna kiselina (IBA)

Na svakoj hranidbenoj podlozi s određenom koncentracijom regulatora rasta održavano je po 24 izdanka tijekom provođenja eksperimenta. Izdanci su održavani kroz tri supkulture, a period svake supkulture trajao je šest tjedana. Izračunat je „faktor porasta izdanka“ iz omjera visine izdanka na kraju i početku svake supkulture.

3.2. Priprema hranidbene podloge za uzgoj biljnih izdanaka

Zdravi i patogenima zaraženi izdanci vrsta *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. i *Gynura aurantiaca* (Blume) DC uzgojeni u kulturi rasli su na MS-hranidbenoj podlozi (Murashige i Skoog 1962) čiji je sastav prikazan u Tablici 3.

Posuđe, potrošni materijali i uređaji korišteni za izvedbu diplomskog rada su: epruvete, Erlenmayerove tikvice, pipete, menzure, vata, aluminijska folija, plastična folija, vaga, špatule za vaganje, magnetska miješalica, pH-metar, košare za držanje epruveta.

Pomoću pipeta (za svaku kemikaliju korištena je nova pipeta) dodane su u tikvicu koncentrirane otopine makro-elemenata: NH_4NO_3, KNO_3, $CaCl_2$, $MgSO_4$ x $7H_2O$ i KH_2PO_4, mikro-elemenata i kao izvor željeza 5 ml otopine $FeSO_4$ x $7H_2O$ + EDTA.

Odvagano je 30 g saharoze, 100 mg inozitola, te 1 g kazeina, i sve je otopljeno u pripremljenoj otopini. Također su dodani i vitamini: B_1 i B_6, te nikotinska kiselina.

Za podlogu koja sadrži hormone (IBA, BAP ili KIN) određeni hormon je dodan u pripremljenu otopinu prije određivanja pH otopine. Npr. za dobivanje 1 L medija MS + 1 IBA, dodano je 1 ml navedenog hormona iz otopine koncentracije 1 mg/mL.

Nakon dodatka svih navedenih elemenata tikvica je nadopunjena gotovo do 1 L destiliranom vodom i sve je dobro izmiješano na magnetskoj miješalici.

Tablica 3. Potrebni sastojci za pripremu osnovnog MS medija (Murashige i Skoog, 1962)

TVAR	KONCENTRACIJA TVARI U HRANIDBENOJ MS PODLOZI (mg/mL)
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2 \times 2H_2O$	440
$MgSO_4 \times 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
$FeSO_4 \times 7H_2O$	27,8
Na_2EDTA	37,3
mikroelementi: H_3BO_3	6,2
$MnSO_4 \times H_2O$	16,9
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	8,6
KI	0,83
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	0,25
$CuSO_4 \times 5H_2O$	0,025
$CoCl_2 \times 6H_2O$	0,025
inozitol	100
saharoza	30000
kazein	1000
B_1 (tiamin)	0,1
B_6 (piridoksin hidroklorid)	0,5
nikotinska kiselina	0,5
agar	8000

Pripremljenom mediju namješten je pH između 5,65 i 5,80. Kalibrirana elektroda pH-metra uronjena je u otopinu (koja se cijelo vrijeme miješa na magnetskoj miješalici). Dodavanjem kiseline HCl ili lužine NaOH kap po kap uspostavljen je željeni pH otopine. HCl snižava pH, dok ga NaOH povećava.

Kako bi se postigla želatinoznost medija, u otopinu je dodano 8 g agara, dobro promiješano, te prokuhano u mikrovalnoj dok se agar u potpunosti nije otopio.

Isparena voda nadopunjena je do 1 L. Vruća otopina prelivena je u već pripremljene epruvete u košari. Epruvete su zatvorene čepom od vate, a otvor je prekriven aluminijskom folijom. Prije sterilizacije medija, epruvete u košari pokrivene su papirom koji je zavezan kako ne bi pao i zalijepljen komadić bijele trake za kontrolu sterilizacije. Ukoliko je autoklaviranjem postignuta željena temperatura i tlak koji osiguravaju sterilizaciju traka pocrni.

3.3. Autoklaviranje

Nakon pripreme hranidbene podloge i prije presađivanja biljnog materijala, pripremljenu podlogu potrebno je sterilizirati. Sterilizacijom se uništavaju mikroorganizmi, koji bi mogli „zagaditi“ kulturu. Podloga se može sterilizirati na više načina, ali najčešće se sterilizira u autoklavu.

Autoklav („Papenov lonac“) je uređaj za sterilizaciju vrućom parom i povišenim tlakom. Vruća stlačena para uz odabir optimalnog vremena autoklaviranja može uništiti sve mikroorganizme (uništavaju se i virusne čestice koje nije moguće uništiti filtriranjem). U autoklavu se postižu temperature od 115 do 135 °C. Korišteni autoklav namješten je na 121 °C, dok je tlak bio 118 kPa.

Vrijeme autoklaviranja određuje se prema volumenu podloge koju je potrebno autoklavirati. Prema tome:

1. Epruvete i tikvice s 20-50 ml podloge steriliziraju se 20 min na 121 °C
2. Tikvice i čaše s 50-500 ml hranidbene podloge steriliziraju se 25 min na 121 °C
3. Posuđe s 500-5000 ml hranidbene podloge sterilizira se 35 min na 121 °C
4. Prazno laboratorijsko posuđe i filter papire potrebno je sterilizirati 30 min na 130 °C.

Prilikom autoklaviranja treba paziti da se epruvete i drugo posuđe međusobno ne dodiruju (zato se epruvete stavljaju u za to predviđene košare). Boce i epruvete s hranidbenom podlogom ili bilo kojom drugom tekućinom ne smiju se čvrsto zatvoriti, već se zatvaraju vatenim čepom, i eventualno samo prekriju sa pripadajućim poklopcem. Također, prije otvaranja autoklava obavezno treba paziti da je tlak izjednačen s atmosferskim, a temperatura ispod 100 ˚C.

3.4. Rad u komori sa strujanjem sterilnog zraka

Presađivanje i rezanje biljnog materijala, te uvođenje eksplantata u kulturu *in vitro* potrebno je raditi u sterilnim uvjetima. To je najbolje izvoditi u komori sa strujanjem sterilnog zraka („laminar air-flow cabinet“) tzv. „laminar“. On je napravljen tako da se iz stražnje površine laminara upuhuje zrak, koji prolazi kroz posebne filtere, te tako sterilan ulazi u komoru laminara i ispuhuje se prema van. Na taj način je zrak u laminaru sterilan, a kako struji iz laminara prema van tako sprečava ulazak prašine i mikroorganizama u radnu komoru.

Rad u laminaru obavlja se prema niže opisanom postupku.

Prije ulaska u prostoriju za uzgoj kultura potrebno je staviti naočale sa UV zaštitom. U prostoriji prvo treba ugasiti UV lampe (i one u laminaru) i uključiti ventilator u laminaru. Obući zaštitne rukavice.

Laminar se prije upotrebe sterilizira 96%-tnim alkoholom (prebrišu se sve unutrašnje površine).

Pincete (dvije velike i dvije male) i skalpel stave se u čašu prethodno napunjenu 96%-tnim etanolom. U čašu se stavlja korišteni filtrirani etanol koji se po potrebi nadopuni novim (u posebnim bocama). Upali se špiritna lampa. Pribor uronjen u čašu s etanolom zapali se nad špiritnom lampom i posložiti sa strane za upotrebu.

U laminar se unese košara sa uzorcima biljaka i košara sa novim prethodno pripremljenim i steriliziranim medijem. Također se pripreme i sterilizirane folije i sterilizirani papiri na kojima se režu i obrađuju biljke za presađivanje.

Biljku se iz jedne epruvete u drugu presađuje tako da se epruveti s biljkom skinu zaštitna folija i vata, a otvor epruvete se kratko stavi na otvoreni plamen. Kratkom pincetom izvadi se biljka i položi ju se na sterilni komad papira. Biljku treba obraditi po potrebi (obaviti mjerenje, odstraniti uvenule dijelove, skratiti, podijeliti na manje dijelove) te je usaditi u novi medij pomoću duge pincete. Nakon usađivanja epruveta se zatvori vatom – zapali se vrh vate i stavi se zaštitna folija, prethodno sterilizirana. Treba se paziti vrućih rubova epruvete – čekati da se ohladi!

Upotrijebljeni pribor uroni se u čašu s etanolom i zapali odmah nakon korištenja. Svaku biljku treba presađivati ponovo steriliziranim priborom! Također je potrebno često ispirati ruke etanolom.

Nakon presađivanja laminar i pribor očiste se etanolom, sve se vrati na svoje mjesto, korišteni etanol procijedi se preko vate u bocu za korišteni etanol. Prije izlaska iz prostorije upale se UV lampe.

3.5. Statistička obrada rezultata

Na svakoj hranidbenoj podlozi s određenom koncentracijom biljnog regulatora rasta održavano je po 24 izdanka tijekom provođenja eksperimenta. Na kraju svake supkulture izračunat je „faktor porasta izdanka“ iz omjera visine izdanka na kraju i početku svake supkulture. Za dobivene rezultate izračunata je aritmetička sredina i standardna devijacija svih mjerenja. Usporedba tretmana međusobno provedena je Newman-Keuls-ovim testom u računalnom programu STATISTICA 8.0 (Stat Soft Inc., SAD). Statistički značajne razlike između rezultata izražene su na razini $p \leq 0,05$ i označene različitim slovima.

4. REZULTATI

4.1. Učinak citokinina na rast viroidom CEVd zaraženih izdanaka vrste *G. aurantiaca* u uvjetima *in vitro*

Biljke vrste *Gynura aurantiaca* (Blume) DC. inficirane egzokortis-viroidom agruma (CEVd) pokazivale su tipične simptome infekcije viroidom kao što su kovrčanje, kržljanje i deformacija listova, žućenje listova i epinastija. Inficirane biljke su na svim vrstama medija pokazivale znakove zaraze. Zdrave biljke koje su u uzgoju služile kao kontrola nisu imale navedene simptome infekcije viroidom.

Zdrave i zaražene biljne jedinke rasle su na tri različite hranidbene podloge u uvjetima *in vitro*: MS podloga (Murashige i Skoog 1962) bez dodatka biljnog regulatora rasta, MS podloga s dodatkom benzilaminopurina (BAP) u koncentraciji 1 mg/L, te MS podloga s dodatkom kinetina (KIN) u koncentraciji 1 mg/L (Tablica 4).

Mjerenja pokazuju da su sve biljke uzgajane u uvjetima *in vitro* relativno dobro napredovale, no pokazano je da postoji statistički značajna razlika na razini $p \leq 0,05$ u faktoru porasta zdravih i zaraženih izdanaka uzgajanih na podlogama s dodanim različitim regulatorima rasta. Biljke inficirane viroidom CEVd pokazivale su znatno slabiji produžni rast u usporedbi sa zdravim biljkama (Tablica 4). Tako je za zdravu biljku koja je rasla na MS podlozi bez dodatka regulatora rasta faktor porasta bio 1,57 ± 0,04 dok je za inficiranu biljku koja je rasla na istoj podlozi faktor porasta bio 1,35 ± 0,02. Razlika u porastu zdravih i viroidom CEVd inficiranih biljaka vidljiva je na mediju bez dodatka citokinina (Slika 11), ali i na mediju s dodatkom kinetina (Slika 12) i benzilaminopurina (Slika 13).

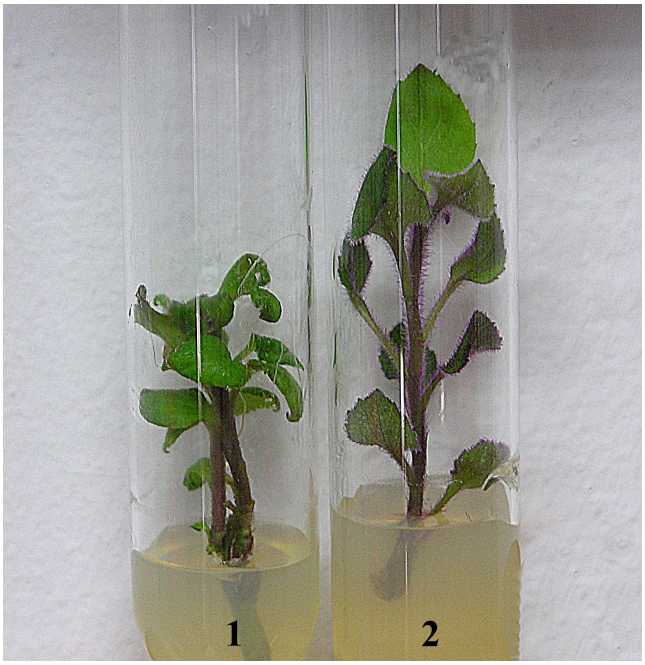
Tablica 4. Faktor porasta zdravih i CEVd-om zaraženih izdanaka vrste *Gynura aurantiaca* uzgojenih na MS hranidbenoj podlozi s dodatkom različitih citokinina. *Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Prisutnost viroida	Regulator rasta (mg/L)	FAKTOR PORASTA IZDANKA*			
		1. supkultura	2.supkultura	3.supkultura	1. 2. i 3. supkultura
CEVd	Ø	1,34±0,01	1,33±0,02	1,37±0,02	1,35±0,02d
CEVd	BAP (1)**	1,12±0,02	1,16±0,02	1,11±0,02	1,13±0,03a
CEVd	KIN (1)***	1,23±0,03	1,19±0,04	1,18±0,03	1,20±0,04b
Zdrava	Ø	1,60±0,04	1,54±0,03	1,56±0,03	1,57±0,04f
Zdrava	BAP (1)**	1,24±0,02	1,27±0,02	1,23±0,04	1,25±0,03c
Zdrava	KIN (1)***	1,37±0,02	1,34±0,03	1,38±0,02	1,36±0,03e

** benzilaminopurin (BAP), *** kinetin (KIN). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku u faktoru porasta izdanaka tijekom tri supkulture na razini $p \leq 0,05$ (Newman-Keulsov test).



Slika 11. Viroidom CEVd zaraženi (1) i zdravi (2) izdanci biljne vrste *G. aurantiaca* na MS podlozi bez dodatka regulatora rasta – slikano na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.



Slika 12. Viroidom CEVd zaraženi (1) i zdravi (2) izdanci biljne vrste *G. aurantiaca* na MS podlozi s dodatkom kinetina – slikano na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.



Slika 13. Viroidim CEVd zaraženi (1) i zdravi (2) izdanci biljne vrste *G. aurantiaca* na MS podlozi s dodatkom benzilaminopurina – slikano na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

Na hranidbenim podlogama s dodatkom citokinina (kinetina ili benzilaminopurina) faktor porasta za sve biljke bio je manji s obzirom na podloge bez dodatka regulatora rasta (Tablica 4). Također se prema rezultatima vidi da zdrave i inficirane biljke rasle na podlozi s dodatkom kinetina pokazuju bolji rast u visinu nego biljke rasle na podlozi s dodatkom BAP-a.

Kao što se vidi na slici 14, normalan fenotip imaju samo zdrave biljke uzgajane na podlozi bez dodatka regulatora rasta, dok su biljke uzgajane na medijima s dodatkom citokinina nešto manjeg rasta. Slične rezultate pokazuju i zaražene biljke.



Slika 14. Zdravi izdanci biljke *G. aurantiaca* uzgajani na tri tipa hranidbenih podloga: MS hranidbena podloga s dodatkom benzilaminopurina (MS+BAP) (1), MS podloga bez dodatka regulatora rasta (MS0) (2) i MS podloga s dodatkom kinetina (MS+KIN) (3) - slikano na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

4.2. Učinak auksina i citokinina na rast fitoplazmama zaraženih izdanaka vrste *C. roseus* u uvjetima *in vitro*

Izdanci vrste *Catharanthus roseus* (L.) G. Don zaraženi su različitim sojevima fitoplazmi: '*Candidatus* Phytoplasma asteris' (soj HydB), '*Ca.* Phytoplasma solani' (soj SA-I), '*Ca.* Phytoplasma ulmi' (soj EY-C) i '*Ca.* Phytoplasma pruni' (soj KVI) i uzgajani na MS hranidbenoj podlozi (Murashige i Skoog 1962) s dodatkom biljnih regulatora rasta u različitim koncentracijama. Kao kontrola služile su zdrave biljke uzgajane na istim hranidbenim podlogama kao i zaražene.

Zdrave biljke nisu pokazivale simptome zaraze, dok su zaraženi izdanci pokazivali karakteristične simptome kao što su kovrčanje, žućenje i zakržljali razvoj listova, patuljasti rast, te dobro razvijene bočne izdanke (Slika 15).

Izdanci vrste *C.roseus* zaraženi fitoplazmom '*Ca*. Phytoplasma asteris' soja HydB pokazivali su različit porast ovisno o hranidbenoj podlozi na kojoj su održavani (Tablica 5). Najslabiji porast izdanaka u visinu bio je na podlozi s dodatkom benzilaminopurina (BAP), tu srednja vrijednost faktora porasta iznosi 1,40 ± 0,04. Izdanci su najbolje rasli na podlozi s dodatkom indol-3-maslačne kiseline (IBA) u koncentraciji 2 mg/L (faktor porast je 1,79 ± 0,1), dok nešto slabiji produžni rast pokazuju na podlozi s većom koncentracijom IBA-e (4 mg/L) (Tablica 5).

Izdanci zaraženi fitoplazmom soja SA-I pokazuju slične odnose rasta kao i izdanci zaraženi sojem HydB (Tablica 5). Biljke uzgajane na podlozi s BAP-om koncentracije 0,5 mg/L patuljastog su rasta, malih zakržljalih listova, imaju više bočnih izdanaka te im je faktor porasta izdanka 1,32 ± 0,04. Rastom su lošije napredovali od izdanaka uzgajanih na podlozi s IBA-om gdje je izračunat faktor porasta izdanka 1,75 ± 0,05.

Tablica 5. Faktor porasta izdanka zdravih i fitoplazmama zaraženih biljaka vrste *Catharanthus roseus* uzgojenih na različitim hranidbenim podlogama. *Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Prisutnost fitoplazme	Regulator rasta (mg/L)	FAKTOR PORASTA IZDANKA*			
		1.supkultura	2.supkultura	3.supkultura	1., 2. i 3. supkultura
HydB	BAP (0,5)**	1,43±0,03	1,35±0,03	1,41±0,03	1,40±0,04c
HydB	IBA (2)***	1,66±0,03	1,82±0,02	1,90±0,03	1,79±0,1f
HydB	IBA (4)***	1,59±0,02	1,80±0,03	1,67±0,02	1,69±0,09d
SA-I	BAP (0,5)**	1,33±0,02	1,28±0,02	1,36±0,03	1,32±0,04b
SA-I	IBA (2)***	1,82±0,02	1,70±0,01	1,73±0,02	1,75±0,05e
EY-C	BAP (0,5)**	1,19±0,02	1,37±0,02	1,24±,01	1,27±0,08a
EY-C	IBA (2)***	1,88±0,02	2,02±0,02	1,75±0,03	1,88±0,11g
EY-C	IBA (4)***	2,36±0,02	1,97±0,01	2,10±0,03	2,14±0,16i
KVI	IBA (0,5)***	1,16±0,02	1,32±0,04	1,29±0,02	1,26±0,08a
Zdrava	IBA (2)***	2,39±0,02	2,77±0,03	2,61±0,03	2,59±0,16j
Zdrava	BAP (0,5)**	2,15±0,02	1,91±0,03	2,09±0,02	2,05±0,10h

**benzilaminopurin (BAP), ***indol-3-maslačna kiselina (IBA). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku na razini $p \leq 0,05$ (Newman-Keulsov test).

Za biljke zaražene sojem fitoplazme KVI praćen je rast samo na hranidbenoj podlozi s dodatkom IBA-e koncentracije 0,5 mg/L. Madagaskarski zimzelen zaražen fitoplazmom '*Ca.* Phytoplasma pruni' (KVI) pokazuje slične simptome zaraze – zakržljalost, žućenje listova, patuljast rast, kao i izdanci zaraženi drugim sojevima fitoplazmi. Faktor porasta za izdanke zaražene sojem KVI je najmanji u usporedbi sa svim drugim izdancima i iznosi 1,26 ± 0,08.

Biljke vrste *C. roseus* zaražene fitoplazmom '*Ca.* Phytoplasma ulmi' soja EY-C malo drugačije reagiraju na koncentraciju dodanog hormona rasta u odnosu na biljke zaražene fitoplazmom '*Ca.* Phytoplasma asteris' soja HydB. Na podlozi s IBA-om koncentracije 2 mg/L madagaskarski zimzelen zaražen fitoplazmom soja EY-C ima faktor porasta 1,88 ± 0,11, dok je na podlozi s IBA-om koncentracije 4 mg/L faktor porasta veći i iznosi 2,14 ± 0,16. Povećanjem koncentracije hormona biljka pokazuje bolji rast u visinu i manje znakova infekcije. Kao što je već prije navedeno biljke zaražene sojem HydB pokazuju slabiji rast u visinu s povećanjem koncentracije dodanog regulatora rasta (Tablica 5).

Zdrave biljke pokazuju puno veći faktor porasta u visinu, te ne pokazuju simptome infekcije. Kao i inficirani izdanci pokazuju uspješniji rast u visinu ako su uzgajane na podlozi s dodatkom regulatora rasta IBA, što se vidi i prema izračunatom faktoru porasta izdanka koji iznosi 2,59 ± 0,16. Izdanci rasli na podlozi s dodatkom BAP-a imaju faktor porasta 2,05 ± 0,10.



Slika 15. Fitoplazmom '*Ca.* Phytoplasma asteris' soja HydB zaraženi (1) i zdravi (2) izdanak biljke vrste *C. roseus* uzgajan na MS podlozi s dodatkom indol-3-maslačne kiseline (IBA) koncentracije 2 mg/L - slikano na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

5. RASPRAVA

Rezultati dobiveni prilikom izrade ovog diplomskog rada potvrđuju prethodno objavljene rezultate.

Rast izdanaka znatno je veći u zdravih nego li u zaraženih biljaka što je u skladu s rezultatima Černi i sur. (2012). Iz priloženih i ranije objavljenih rezultata (Černi i sur. 2012) vidi se da je dodatak citokinina utjecao na smanjen rast u visinu i zdravih i viroidom zaraženih biljaka. Biljke rasle na kinetinu imale su nešto veći porast u visinu od biljaka uzgajanih na benzilaminopurinu, dok daleko najbolji rast pokazuju biljke uzgajane na hranidbenoj podlozi bez dodatka regulatora rasta. Izdanci biljke *G. aurantiaca* zaraženi sojem viroida CEVd pokazuju znakove zaraze kao što su epinastija, smanjeni listovi i smanjen apikalni rast. Zdravi izdanci ne pokazuju znakove zaraze, ali oni uzgajani na hranidbenim podlogama s dodatkom citokinina ne pokazuju zdravi fenotip, već također imaju skraćene internodije i smanjen rast u visinu. S time da zdrave biljke uzgajane na BAP-u imaju zakržljali rast, dok zdrave uzgajane na KIN uz zakržljali rast imaju i razgranate bočne ogranke.

Postavlja se pitanje djeluje li dodatak citokinina direktno na odnos s patogenom ili utječe samo na hormonalnu kontrolu. Iz dobivenih rezultata vidi se da dodatak egzogenih citokinina jedako utječe na zdrave i zaražene izdanke biljne vrste *G. aurantiaca*. Iz toga se da zaključiti da je dodatak citokinina djelovao na omjer fitohormona auksini-citokinini. Prijašnja istraživanja pokazuju da to nije uvijek slučaj, te da dodatak različitih regulatora rasta može djelovati različito na rast zdravih odnosno viroidom CEVd-zaraženih izdanaka (Flores i Rodríguez 1981). No, Semancik i Conejero-Tomas (1987) dobili su slične rezultate kao u ovom radu. Dokazali su da zdrave i viroidom CEVd zaražene stanice rajčice pokazuju jednak odgovor na dodatak egzogenih citokinina.

Odgovor biljke domaćina na dodatak egzogenih regulatora rasta ovisi o kombinaciji biljka domaćin – soj viroida – vanjski čimbenici. O ova tri faktora ovisi i hoće li ili neće biljka pokazivati simptome zaraze viroidom.

Izdanci biljne vrste *Catharanthus roseus* (L.) G. Don zaraženi su s četiri različita soja fitoplazmi. Praćen je rast zaraženih i zdravih izdanaka na podlogama s dodatkom citokinina (BAP) ili auksina (IBA). Primjećen je znatno bolji rast u visinu

biljaka koje su uzgajane na podlozi s dodatkom auksina. Najbolji porast u visinu pokazuju zdrave biljke na IBA-i. Ćurković Perica i sur. (2007) radili su istraživanja na izdancima madagaskarskog zimzelena zaraženim istim sojevima fitoplazmi koji su rasli na istim podlogama kao i u ovom radu. Rezultati ovog rada podudaraju se s njihovima. Naime osim što biljke uzgajane na IBA-i pokazuju bolji produžni rast, one zaražene sojevima HydB, SA-I i EY-C pokazuju i remisiju simptoma. U tom radu metodom PCR-a dokazano je da nakon dužeg izlaganja IBA-i pola uzoraka zaraženih sojem HydB pokazuje izostanak fitoplazmi. Izdanci održavani na podlozi s dodatkom BAP-a pokazuju prisutnost fitoplazmi u direktnom PCR-u.

Izdanci madagaskarskog zimzelena zaraženi sojevima EY-C i SA-I nakon istog tretmana IBA-om kao i soj HydB ne pokazuju znakove zaraze fitoplazmom ali pomoću PCR-a je dokazano da je fitoplazma i dalje prisutna u biljci. Nakon ovakvih rezultata postavlja se pitanje na koji način fitoplazme djeluju na biljni organizam? Fitoplazme imaju reduciran genom te kako bi preživjele koriste metabolite biljke domaćina, a njihovo prisustvo u biljci ometa normalni transport biljnih regulatora rasta. Stoga fitoplazme remete metaboličku i hormonsku ravnotežu domaćina te uzrokuju simptome bolesti. Različiti sojevi fitoplazmi utječu na deregulaciju različitih gena, pa zato dolazi do pojavljivanja različitih simptoma bolesti. Neke fitoplazme utječu na deregulaciju jednih a druge na deregulaciju drugih gena. Pitanje je djeluje li dodatak egzogenih hormona direktno na fitoplazmu, ili pak promjena metabolizma biljke utječe na njihov nestanak? Fitoplazme su nakon istog tretmana IBA-om ostale prisutne u izdancima zaraženim sojevima EY-C i SA-I, dok su većinom nestale iz izdanaka zaraženih sojem HydB - iz čega bi se dalo zaključiti da je soj HydB osjetljiviji na promjenu hormonalne ravnoteže (Ćurković Perica i sur. 2007)

U prijašnjim radovima pokušavalo se djelovati na prisustvo, tj. nestanak fitoplazmi raznim metodama – tetraciklinima koji imaju bakteriocidni učinak, terpenima, poliaminima, ali nakon tih tretmana simptomi zaraze su se uvijek vraćali. Postavilo se pitanje mogu li auksini generalno inducirati oporavak biljaka zaraženih fitoplazmama. U radu Ćurković Perica (2008) dobiveni rezultati su slični kao i u ovom radu. Naime nakon uzgoja zaraženih izdanaka soja KVI na hranidbenoj podlozi s dodatkom regulatora rasta IBA - ostaju simptomi zaraze. Tek nakon jedne godine tretmana izostaju simptomi, a nakon dvije godine nema više nađene fitoplazme u 80% izdanaka. Izdanci soja HydB odmah su se nakon kraćeg izlaganja IBA-i oporavili a fitoplazma je eliminirana. U izdanaka zaraženih sojevima SA-I i EY-C nema

simptoma zaraze ali je fitoplazma prisutna i nakon dugotrajnog tretmana IBA-om (Ćurković Perica 2008). Petrot i sur. (1998) objavili su da dodatak auksina utječe na ostanak/izostanak fitoplazmi, a ne na njihove strukturalne promjene.

Direktan učinak auksina na fitoplazme nije vjerojatan, s obzirom da oporavak izdanka ne ovisi o tome je li fitoplazma još prisutna u biljci ili nije. Prije zbog dodatka auksina dolazi do metaboličkih promjena u biljci, što onda vjerojatno utječe na fitoplazmu.

Dokazano je da fitoplazme (HydB i EY-C), ali i egzogeni regulatori rasta utječu na biokemijske promjene u izdancima vrste *C. roseus* (Leljak Levanić i sur. 2010). Dolazi do promjene razine peroksida, fotosintetskih pigmenata i topivih proteina.

Hoski i sur. (2009) pokušali su otkriti faktor koji utječe na pojavljivanje simptoma u biljaka zaraženih fitoplazmom. Oni su izolirali 30 proteina kodiranih genomom fitoplazme i otkrili da samo jedan od tih proteina (PAM765) potiče razvoj simptoma kao što su patuljasti rast i "vještičja metla" u biljci domaćinu. Naveden protein nazvali su TENGU prema japanskom mitološkom biću koje je u šumama Japana savijalo gnijezda nalik "vještičjoj metli" zaraženih biljaka. TENGU je malen protein građen od samo 38 aminokiselina. On se za razliku od fitoplazmi (koje se nalaze samo u floemu biljke) može transportirati u vršne pupove – detektiran je i u parenhimu i u meristemskim tkivima vršnih pupova gdje može direktno utjecati na biosintezu auksina kao i njihov transport duž biljke. Na taj način inhibira se rast apikalnih izdanaka i potiče rast bočnih izdanaka. TENGU deregulira ekspresiju auksina ali i ekpresiju drugih gena vezanih za sintezu i transport auksina.

Pretpostavlja se da fitoplazme pomoću proteina TENGU mogu proširiti ekološke niše i smanjiti mogućnost izumiranja svojih potomaka (Hoshi i sur. 2009). Naime svim simptomima zaraze biljke fitoplazmom ("vještičja metla", patuljasti rast, virescencija) zajedničko je to da zaražene biljke razvijaju puno mladih zelenih listova koje je privlačno kukcima, pogotovo skakavcima, za ishranu i liječenje jajašaca. To je bitno za ciklus i prijenos fitoplazmi s biljke na biljku.

Dobiveni rezultati pokazuju da dodatak egzogenih regulatora rasta utječe na rast zdravih i zaraženih izdanaka biljnih vrsta *Gynura aurantiaca* (Blume) DC. i *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Dodatak auksina može izazvati remisiju simptoma zaraze ali i utjecati na potpuni izostanak patogena. Potrebno je napraviti daljnja

istraživanja na drugim biljkama domaćinima zaraženim različitim sojevima fitoplazmi, te utvrditi hoće li i u tom slučajevu dodatak auksina pospješiti rast izdanka te utjecati na remisiju simptoma, odnosno izostanak fitoplazmi.

6. ZAKLJUČAK

Iz provedenih istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti slijedeći zaključci:

- zdravi izdanci biljke *Gynura aurantiaca* (Blume) DC. pokazuju veći rast u visinu u odnosu na izdanke zaražene viroidom soja CEVd;
- zaraženi izdanci biljke *G. aurantiaca* neovisno na kojoj hranidbenoj podlozi su rasli pokazuju znakove zaraze viroidom – žućenje, deformacija i kovrčanje listova, i epinastija;
- zdravi i zaraženi izdanci biljke *G. aurantiaca* najbolje su rasli na MS podlozi (Murashige i Skoog 1962) bez dodatka biljnog hormona rasta;
- dodatak biljnih hormona citokinina (kinetin i benzilaminopurin) u hranidbenu podlogu utječe na smanjen rast u visinu biljke *G. aurantiaca*;
- zdravi i zaraženi izdanci biljke *G. aurantiaca* pokazivali su veći rast u visinu uz dodatak kinetina u usporedbi s izdancima održavanim na podlozi s dodatkom benzilaminopurina;
- zdravi izdanci biljke *Catharanthus roseus* (L.) G. Don pokazuju veći rast u visinu u odnosu na izdanke zaražene različitim sojevima fitoplazmi;
- zdravi i zaraženi izdanci biljke *C. roseus* najbolje su rasli na MS podlozi s dodatkom auksina indol-3-maslačne kiseline. Dodatak auksina u hranidbenu podlogu potiče rast izdanaka u visinu;
- dodatak citokinina benzilaminopurina smanjuje rast izdanaka biljke *C. roseus* u visinu.

7. LITERATURA

1. Anthwal V., Ishaq F., Singh R. N., Khan A. (2012): Antioxidant and antiatherogenic impacts of *Catharanthus roseus* and *Hibiscus sabdariffa* on Cu^{++} mediated oxidation kinetics of low density lipoprotein. Der Pharmacia Sinica **3** (4), 443-456.
2. Aritotech (2016). < http://aridotech.org/>
3. Bai X., Zhang J., Ewing A., Miller S. A., Jansco R. A., Schevchenko D. V., Tsukerman K., Walunas T., Lapidus A., Campbell J. W., Hogenhout S. A. (2006): Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. Journal of Bacteriology **188**, 3682-3696.
4. Brault M., Maldiney R. (1999): Mechanisms of cytokinin action. Plant Physiology and Biochemistry **37** (5), 403-412.
5. Castro D. (2011): Los fitoplasmas alteran el metabolismo de la planta para promover la fecundidad de su vector. <http://www.biounalm.com/2011/11/los-fitoplasmas-alteran-el-metabolismo.html>.
6. Cheng Z. J., Wang L., Sun W., Zhang Y., Zhou C., Su Y. H., Li W., Sun T. T., Zhao X. Y., Li X. G., Cheng Y., Zhao Y., Xie Q., Zhang X. S. (2013): Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by auxin response factor 3. Plant Physiology **161**, 240-251.
7. Christensen N. M., Nicolaisen M., Hansen M., Schulz A. (2004): Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real – time PCR and bioimaging. Molecular Plant – Microbe Interactions **17**, 1175-1184.
8. Cousin M. T. (1995): Phytoplasmes et phytoplasmoses. Agronomie **15**, 245-264.
9. Černi S., Ćurković Perica M., Rusak G., Škorić D. (2012): In vitro system for studying interactions between *Citrus exocortis viroid* and *Gynura aurantiaca* (Blume) DC. metabolism and growing conditions. Journal of Plant Interactions **7**, 254-261.
10. Ćurković Perica M. (2008): Auxin-treatment induces recovery of phytoplasma-infected periwinkle. Journal of Applied Microbiology **105**, 1826-1834.

11. Ćurković Perica M., Lepeduš H., Šeruga Musić M. (2007): Effect of indole-3-butyric acid on phytoplasmas in infected *Catharanthus roseus* shoots grown *in vitro*. FEMS Microbiology Letters **268**, 171-177.
12. Dai N., Yu Y. C., Ren T. H., Wu J. G., Jiang Y., Shen L. G., Zhang J. (2007): Gynura root induces hapetic veno-occlusive disease: a case report and review of the literature. World Journal of Gastroenterology **13** (10), 1628-1631.
13. Davis R. E. (1977). USDA Agricultural Research Service. <http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/pclass/pclass_11.html>.
14. Davis R. E. (1992). USDA Agricultural Research Service. <http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/pclass/pclass_12_redclover.html>.
15. Davis R. E. (2010). USDA Agricultural Research Service. <http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/pclass/pclass_20_Chardonnay_1A.html>.
16. Di Serio F., De Stradis A., Delgado S., Flores R., Navarro B. (2012): Cytopathic effects incited by viroid RNAs and putative underlying mechanisms. Frontiers in Plant Science **3**, 288.
17. Diener T. O. (1993): Viroids: the smallest and simplest agents of infectious disease. How do they make the plants sick? Intervirology **35**, 186-195.
18. Ding B. (2009): The biology of viroid-host interactions. Annual Review of Phytopathology **47**, 105-131.
19. Duke J. A., Bogenschutz-Godwin M. J., duCellier J., Duke P. A. K. (1985): Handbook of medicinal herbs. Second edition, Crc Press, Florida.
20. Dunlap J. R., Kresovich S., McGee R. E. (1986): The effect of salt concentration on auxin stability in culture media. Plant Physiology **81**, 934-936.
21. Duran-Vila N., Semancik J. S., Broadbent P. (2000): Viroid diseases, cachexia and exocortis. U: Ito Ta., Namba N., Ito Ts. (ur.) Distribution of citrus viroids and *Apple stem grooving virus* on citrus trees in Japan using multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. Journal of General Plant Pathology **69**, 205-207.
22. Finet C., Jaillais Y. (2012): Auxology: when auxin meets plant evo-devo. Developmental Biology **369**, 19-31.
23. Flores R., Daròs J. A., Hernández C. (2000): The Avsunviroidae family: Viroids with hammerhead ribozymes. Advances in Virus Research **55**, 271-323.

24. Flores R., Di Serio F., Fernandez C. (1997): Viroids: The noncoding genomes. Seminars in Virology **8**, 65-73.
25. Flores R., Rodríguez J.-L. (1981): Altered pattern of root formation on cuttings of *Gynura aurantiaca* infected by citrus exocortis viroid. Phytopathology **71**, 964-966.
26. Francki R. I.B., Zaitlin M., Palukaitis P. (1986): *In vivo* encapsidation of potato spindle tuber viroid by velvet tobacco mottle virus particles. Virology **155**, 469-473.
27. Franco M. (2011): Vinca (*Catharathus roseus*). <http://plantas-ornamentais.blogspot.com/2011/09/vinca-catharanthus-roseus.html>.
28. Graham L. E., Graham J. M., Wilcox L. W. (2003): Plant biology. Pearson Education Inc. Upper saddle River, New Yersey.
29. Guide to Houseplants (2014): Purple Passion Plant or Velvet Plant. <http://www.guide-to-houseplants.com/purple-passion-plant.html>.
30. Hazarika B. N. (2006): Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. Scientia Horticulturae **108**, 105-120.
31. Heyl A., Schmülling T. (2003): Cytokinin signal perception and transduction. Current Opinion in Plant Biology **6**, 480-488.
32. Heywood V. H. (1993): Flowering plants of the world. Oxford University Press, New York, 223-225.
33. Hogenhout S. A., Oshima K., Ammar E.-D., Kakizawa S., Kingdom H. N., Namba S. (2008): Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. Molecular Plant Pathology **9**, 403-423.
34. Hoshi A., Oshima K., Kakizawa S., Ishii Y., Ozeki J., Hashimoto M., Komatsu K., Kakiwada S., Yamaji Y., Namba S. (2009): A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. PNAS 106, No. 15, 6416-6421.
35. House Plants Guru (2014): Purple Velvet Plant – *Gynura aurantiaca*. <http://www.houseplantsguru.com/purple-velvet-plant-gynura-aurantiaca>.
36. IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team–Phytoplasma taxonomy group (2004): 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology **54**, 1243–1255.

37. Jagel A. (2014). Botanischer Garten Ruhr-Universität Bochum. <http://www.boga.ruhr-uni-bochum.de/html/Gynura_aurantiaca_Foto.html>.
38. Jelaska S. (1994): Kultura biljnih stanica i tkiva: temeljna istraživanja i primjena. Školska knjiga, Zagreb.
39. Kulaeva O. N., Burkhanova E. A., Karavaiko N. N., Selivankina S. Y., Porfirova S. A., Maslova G. G., Zemlyachenko Y. V., Börner T. (2002): Chloroplasts affect the leaf response to cytokinin. Journal of Plant Physiology **159**, 1309-1316.
40. Lee I. M., Davis R. E., Gundersen-Rindal D. E. (2000): Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. Annual Review of Microbiology **54**, 221-255.
41. Lee I. M., Davis R. E., Sinclair W. A., DeWitt N. D., Conti M. (1993): Genetic relatedness of mycoplasmalike organisms detected in *Ulmus spp.* in USA and Italy by means of DNA probes and polymerase chain reactions. Phytopathology **83**, 829-833.
42. Lefol C., Lherminier J., Boudon-Padieu E., Larrue J., Louis C., Caudwell A. (1994): Propagation of flavescence doree MLO (mycoplasma – like organism) in the leafhopper vector *Euscelidius variegatus*. Journal of Invertebrate Pathology **63**, 285-293.
43. Leljak Levanić D., Ježić M., Cesar V., Ludwig-Müller J., Lepeduš H., Mladinić M., Katić M., Ćurković Perica M. (2010): Biochemical and epigenetic changes in phytoplasma-recovered periwinkle after indole-3-butyric acid treatment. Journal of Applied Microbiology **109**, 2069-2078.
44. Löfke C., Luschnig C., Kleine-Vehn J. (2013): Posttranslational modification and trafficking of PIN auxin efflux carriers. Mechanisms of Development **130**, 82-94.
45. McCoy R. E., Caudwell A., Chang C. J., Chen T. A., i 14 drugih autora (1989): Plant diseases associated with mycoplasma - like organisms. U: Whitcomb R. F., Tully J. G. (ur.): The Mycoplasmas. New York, Academic Press, 546-640.
46. Mok D. W., Mok M. C. (2001): Cytokinin metabolism and action. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **52**, 89-118.
47. Mu F., Yang L., Wang W., Luo M., Fu Y., Guo X., Zu Y. (2012): Negative – pressure cavitation extraction of four main vinca alkaloids from *Catharanthus roseus* leaves. Molecules **17**, 8742-8752, doi: 10.3390/molecules17088742.

48. Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum **15**, 473-497.
49. Murcia N., Bernad L., Duran-Vila N., Serra P. (2011): Two nucleotide positions in the *Citrus exocortis viroid* RNA associated with symptom expression in Etrog citron but not in experimental herbaceous hosts. Molecular Plant Pathology **12**(2), 203-208.
50. Murral D.J., Nault L. R., Hoy C. W., Madden L., Miller S. A. (1996): Effects of temperature and vector age on transmission of two ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). Journal of Economic Entomology **89**, 1223-1232.
51. Navarro B., Gisel A., Rodio M. E., Delgado S., Flores R., Di Serio F. (2012): Viroids: How to infect a host and cause disease without encoding proteins. Biochimie **94** (7), 1474-1480.
52. Owens R. A., Flores R., Di Serio F., Li S. F., Pallás V., Randles J. W. I sur. (2011): Viroids. U: Virus taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. King A. M. R., Adams M. J., Carstens E. B., Lefkowitz E. J. (ur.). London, Elsevier Academic Press, 1221-1234.
53. Panoramio, Google maps (2014). <http://www.panoramio.com/photo/46542678>
54. Petrot I., Musetti R., Pressacco L., Osler R. (1998): Changes in Indole-3-acetic acid level in micropropagated tissues of *Catharanthus roseus* L. infected by the agent of the clover phyllody and effect of exogenous auxins on phytoplasma morphology. Cytobios **95**, 13-23.
55. Pevalek-Kozlina B. (2003): Fiziologija bilja. Profil International, Zagreb.
56. Premkumar A., Mercado J. A., Quesada M. (2001): Effects of *in vitro* tissue culture conditions and acclimatization on the contents of Rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments, and C/N ratio. Journal of Plant Physiology **158**, 835-840.
57. Prendusi T. (2014): Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*). <http://www.fs.fed.us/wildflowers/ethnobotany/medicinal/images/Catharanthus_roseus_TP_lg.jpg>.
58. Rischer H., Orešič M., Seppänen-Laakso T., Katajamaa M., Lammertyn F., Ardiles-Diaz W., Van Montagu M. C. E., Inzé D., Oksman-Caldentey K.-M., Goossens A. (2006): Gene – to – metabolite networks for terpenoid indole

alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cells. (PNAS) Plant Biology Vol. 103, No. 14, 5614-5619, doi: 10.1073/pnas.0601027103.

59. Royal Botanic Gardens, Kew (2014): *Catharanthus roseus* (Madagascar periwinkle). <http://www.kew.org/plants-fungi/Catharanthus-roseus.htm>.
60. Sears B. B., Klomparens K. L. (1989): Leaf tip cultures of the evening primrose allow stable aseptic culture of mycoplasma – like organisms. Canadian Journal of Plant Pathology **11**, 343-348.
61. Semancik J. S., Conejero-Tomas V. (1987): Viroids and viroid-like pathogens. U: Boca Raton (ur): CRC Press. Viroid pathogenesis and expression of biological activity, p. 71-126.
62. Semancik J. S., Rakowsky A. G., Bash J. A., Gumpf D. J. (1997): Application of selected viroids for dwarfing and enhancement of production of 'Valencia' orange. Journal of Horticultural Science **72**, 563-570.
63. Singh S. N., Vats P., Suri S., Shyam R., Kumria M. M. L., Ranganathan S., Sridharan K. (2001): Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology **76**, 269-277.
64. Ševo A. (2011): Biljke iz staklenke – kultura biljnih tkiva i stanica „in vitro". U: Hortikultura udruga stručnjaka i amatera <www.horti-kultura.hr>. <http://www.horti-kultura.hr/index.php/component/k2/item/94-biljke-iz-staklenke-%E2%80%93-kultura-tkiva-i-stanica-%E2%80%9Cin-vitro%E2%80%9D.html>.
65. Tivendale N. D., Ross J. J., Cohen J. D. (2014): The shifting paradigms of auxin biosynthesis. Trends in Plant Science Vol. 19, No. 1.
66. Tully J. G. (1993): International committee on systematic bacteriology, subcommittee on the taxonomy of mollicutes. Minutes of the interim meetings, 1st – 2nd Aug. 1992, Ames, Iowa. International Journal of Systematic Bacteriology **43**, 394-397.
67. United States Department of Agriculture (2014): Natural Resources Conservation Service. <http://www.plants.usda.gov/core/profile?symbol=Caro14>.
68. United States Department of Agriculture (2014): Natural Resources Conservation Service. <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=GYAU>.

69. Weintraub P. G., Beanland L. (2006): Insect vectors of phytoplasmas. Annual Review of Entomology **51**, 91-111.
70. Weisburg W. G., Tully J. G., Rose D. L., Petzel J. P., Oyaizu H., Yang D., Mandelco L., Sechrest J., Lawrence T. G., Van Etten J., Maniloff J., Woese C. R. (1989): A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. Journal of Bacteriology **171**: 6455-6467.
71. Wisegeek (2014). <http://www.wisegeek.com/what-is-gynura.htm>.
72. Woese C. R., Maniloff J., Zablen L. B. (1980): Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. PNAS **77**, 494-498.
73. www.scoop.it (2014). <http://img.scoop.it/73xDeKFw6MHa15uPFE1mejl72eJkfbmt4t8yenImKBVvK0kTmF0xjctABnaLJIm9>.
74. Zalabák D., Pospíšilová H., Šmehilová M., Mrízová K., Frébort I., Galuszka P. (2013): Genetic engineering of cytokinin metabolism: prospective way to improve agricultural traits of crop plants. Biotehnology Advances **31**, 97-117.
75. Zhong X., Archual A. J., Amin A. A., Ding B. (2008): A genomic map of viroid RNA motifs critical for replication and systemic trafficking. Plant Cell **20**, 35-47.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 21. rujna 1982. godine u Zagrebu. U Zagrebu sam pohađala Osnovnu školu "Dr. Ivan Merz", a potom i Gimnaziju Tituša Brezovačkog, gdje sam maturirala opći smjer 2001. godine. Iste godine upisala sam Prirodoslovno-matematički fakultet, biološki odsjek, smjer Profesor biologije i kemije. Za vrijeme studiranja radila sam u Tehničkom muzeju kao kustos na izložbi „Vladimir Prelog – Novo lice kemije", te sam sudjelovala na radionicama u sklopu Festivala znanosti.

Godine 2008. zaposlila sam se preko student servisa u Erste card clubu, gdje 2009. godine prelazim na ugovor na određeno. Od 2011. godine do danas radim u firmi Provolus d.o.o. na naplati potraživanja pravnih osoba, te sam ovim poslom stekla dobre komunikacijske i organizacijske vještine.

Dobro se služim engleskim jezikom, a pasivno i talijanskim jezikom. U slobodno vrijeme bavim se raznim aktivnostima (žongliranje, aerial dance, pilates, te vožnja biciklom).