

Učinak biotičkog i abiotičkog stresa na sadržaj flavonoida kempferola u vrsti *Arabidopsis thaliana*

Vitko, Sandra

Master's thesis / Diplomski rad

2014

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:217:136628>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-03**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Sandra Vitko

Učinak biotičkog i abiotičkog stresa na sadržaj flavonoida
kempferola u vrsti *Arabidopsis thaliana*

Diplomski rad

Zagreb, 2014.

Ovaj diplomski rad, izrađen u Laboratoriju za fitokemiju Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Gordane Rusak i pomoćnim vodstvom dr. sc. Ivane Šola, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Zahvaljujem,

Mentorici prof. dr. sc. Gordani Rusak na danoj prilici i nesebičnoj pomoći koju mi je pružala prilikom izrade ovog rada.

Srdačno zahvaljujem dr.sc. Ivani Šoli na svom uloženom trudu, inspiraciji i bezuvjetnoj podršci.

Svim zaposlenicima Laboratorija za fitokemiju Botaničkog zavoda koji su, svatko na svoj način, pripomogli ovom radu.

I na kraju, veliko hvala dvjema osobama koje su uvijek bile tu. Hvala mama i tata.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Učinak biotičkog i abiotičkog stresa na sadržaj flavonoida kempferola u vrsti *Arabidopsis thaliana*

Sandra Vitko

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti učinak biotičkog i abiotičkog stresa na sadržaj flavonoida kempferola u različitim tkivima vrste *Arabidopsis thaliana*. Učinak biotičkog stresa proučavan je na listovima spomenute vrste prilikom čega su korištena dva različita patogena: virus mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA (CMVsat) te protist *Plasmodiophora brassicae*; učinak abiotičkog stresa (UV-B zračenja) proučavan je na kalusima iste vrste. Rezultati su pokazali da je uloga kempferola u obrambenom sustavu biljaka tijekom djelovanja biotičkog stresa specifična s obzirom na patogen (CMVsat uzrokuje smanjenje sadržaja kempferola kod inficiranih biljaka, a protist povećanje) te da ovaj flavonoid sudjeluje u prilagodbi biljke na štetno UV-B zračenje. Nadalje, proučavana je interakcija kompleksa kempferola, te njemu strukturno srodnog fisetina, i Eu^{3+} s dvolančanim (*ds*) i jednolančanim (*ss*) molekulama RNA izoliranim iz CMVsat-inficiranih biljaka. Rezultati dobiveni *in vitro* ukazali su kako bi se kompleks s Eu^{3+} mogao koristiti za dokazivanje prisutnosti *ds*RNA u biljnim tkivima.

(50 stranica, 10 slika, 2 tablice, 150 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: kempferol, fisetin, *Arabidopsis thaliana*, CMVsat, *Plasmodiophora brassicae*, UV-B zračenje.

Voditelj: dr. sc. Gordana Rusak, red. prof.

Neposredni voditelj: dr. sc. Ivana Šola

Ocjenitelji:

Dr.sc. Gordana Rusak, red. prof.

Dr.sc. Mirjana Kalafatić, red. prof.

Dr.sc. Martina Šeruga Musić, doc.

Dr.sc. Božena Mitić, red. prof.

Rad prihvaćen: 18. lipnja 2014.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

The effect of biotic and abiotic stress on the content of flavonoid kaempferol in *Arabidopsis thaliana*

Sandra Vitko

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

The aim of this graduation thesis was to investigate the influence of biotic and abiotic stress on the content of flavonoid kaempferol in different tissues of *Arabidopsis thaliana*. The influence of biotic stress was investigated on the *Arabidopsis*'s leaves; two pathogens were used: RNA satellite associated-cucumber mosaic virus (CMVsat) and protist *Plasmodiophora brassicae*; while the influence of abiotic stress (UV-B radiation) was investigated on *Arabidopsis*'s calluses. The results showed that kaempferol has a specific role in plant defense system during biotic stress (CMVsat reduces content of kaempferol in infected plants, while protist enhance it), and that this flavonoid is involved in plant adaptation to UV-B radiation. Furthermore, interactions between flavonoids kaempferol, or structurally related fisetin, and Eu^{3+} with double-stranded (*ds*) and single-stranded (*ss*) RNA isolated from CMVsat-infected species were studied. The *in vitro* obtained results showed that complex with Eu^{3+} could be used for detection of *ds*RNAs in plant tissues.

(50 pages, 10 figures, 2 tables, 150 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library

Key words: kaempferol, fisetin, *Arabidopsis thaliana*, CMVsat, *Plasmodiophora brassicae*, UV-B radiation.

Supervisor: Dr. Gordana Rusak, Prof.

Assistant Supervisor: Dr. Ivana Šola

Reviewers:

Dr. Gordana Rusak, Prof.

Dr. Mirjana Kalafatić, Prof.

Dr. Martina Šeruga Musić, Asst. Prof.

Dr. Božena Mitić, Prof.

Thesis accepted: 18th June 2014.

Sadržaj:

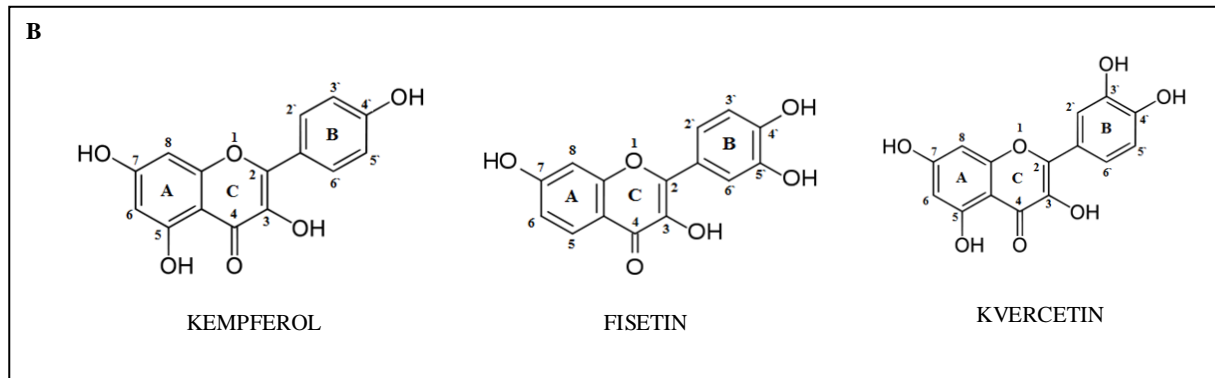
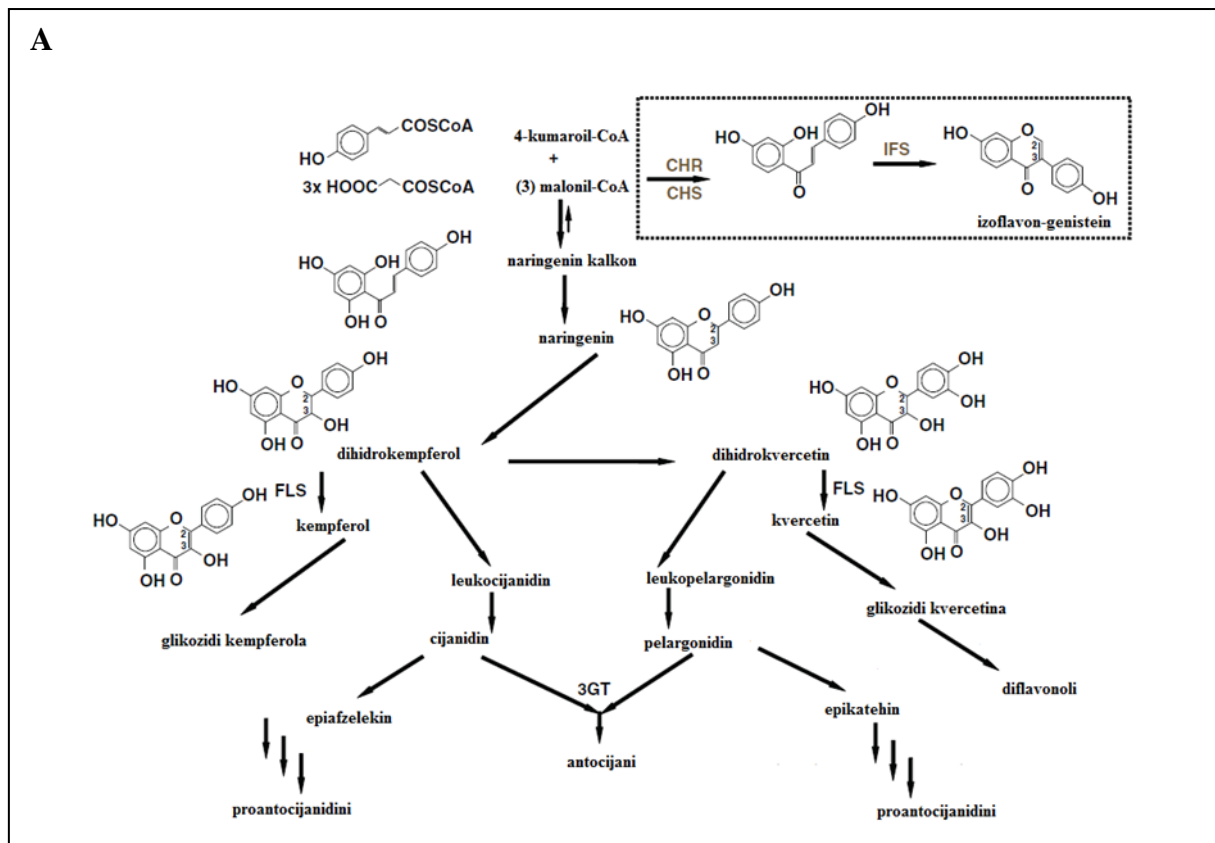
1. UVOD	1
1.1. Biosinteza flavonoida	2
1.2. Biološko djelovanje flavonoida u biljkama	4
1.3. Kompleksi flavonoida i metala	7
1.4. Vrsta <i>Arabidopsis thaliana</i> kao modelni organizam	8
1.5. Virus mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA	10
1.6. Protist <i>Plasmodiophora brassicae</i>	12
1.7. Ciljevi istraživanja	14
2. MATERIJALI I METODE	15
2.1. Materijali	16
2.1.1. Biljni materijal	16
2.2. Metode	16
2.2.1. Infekcija vrste <i>Arabidopsis thaliana</i> virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA	16
2.2.2. Infekcija vrste <i>Arabidopsis thaliana</i> protistom <i>Plasmodiophora brassicae</i> ..	17
2.2.3. Uzgoj kalusa vrste <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
2.2.4. Ekstrakcija fenolnih tvari.....	18
2.2.5. Određivanje sadržaja kempferola metodom HPLC-a	19
2.2.6. Izolacija <i>dsRNA</i> i <i>ssRNA</i> iz vrste <i>Nicotiana megalosiphon</i> inficirane virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA pomoću CF-11 celulozne kromatografije	19
2.2.7. Agarozna gel elektroforeza <i>dsRNA</i>	20
2.2.8. Sintaza kompleksa flavonoid/metal te njegova interakcija s <i>dsRNA</i> i <i>ssRNA</i> izoliranim iz vrste <i>Nicotiana megalosiphon</i> inficirane virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA.....	21
2.2.9. Obrada podataka	22
3. REZULTATI	23
3.1. Dio istraživanja proveden u uvjetima <i>in vivo</i>	24
3.1.1. Učinak infekcije virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA na sadržaj kempferola u listovima vrste <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
3.1.2. Učinak infekcije protistom <i>Plasmodiophora brassicae</i> na sadržaj kempferola u listovima vrste <i>Arabidopsis thaliana</i>	25

3.1.3. Učinak UV-B zračenja na sadržaj kempferola u kalusima vrste <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
3.2. Dio istraživanja proveden u uvjetima <i>in vitro</i>	28
3.2.1. Interakcija kompleksa flavonoid/metal s <i>dsRNA</i> i <i>ssRNA</i> izoliranim iz vrste <i>Nicotiana megalosiphon</i> inficirane virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA	28
3.2.1.1. Kompleks kempferol/Eu ³⁺	28
3.2.1.2. Kompleks fisetin/Eu ³⁺	30
4. RASPRAVA	32
5. ZAKLJUČAK	38
6. LITERATURA	40
7. ŽIVOTOPIS	i

1. UVOD

1.1. Biosinteza flavonoida

Biljke proizvode velik broj organskih spojeva različitih strukturnih klasifikacija, od kojih veći dio, iako ne sudjeluje direktno u rastu i razvoju biljnog organizma, ima važnu ulogu u prilagodbi biljaka na uvjete okoliša. Tradicionalno, ti spojevi definiraju se kao sekundarni metaboliti (Croteau i sur., 2000.). Utvrđeno je da sekundarni metaboliti u biljci djeluju antiviralno, antibakterijski i antifungalno (Wink, 1988.). Pored toga, dokazano je da isti sudjeluju i u interakciji biljaka s drugim, konkurentskim biljkama (alelopatsko djelovanje) (Bourgaud i sur., 2001.). Sekundarni metaboliti se uobičajeno klasificiraju prema svom biosintetskom putu i to u tri velike skupine spojeva – fenolne tvari, terpene i alkaloidne (Harborne, 1999.). Među navedenima, fenolne tvari do sada su najistraživaniji spojevi; riječ je o molekulama koje posjeduju najmanje jedan aromatski prsten (C₆) s jednom ili više hidroksilnih skupina. Dijelimo ih prema broju ugljikovih atoma i strukturi osnovnog fenolnog kostura u nekoliko skupina – polifenole, benzojeve kiseline, fenilpropanoide te flavonoide (Rice-Evans i sur., 1997.). Do sada, s više od 10 000 izoliranih i identificiranih spojeva (Williams i Grayer, 2004., Agati i sur., 2012.), flavonoidi čine jednu od najznačajnijih skupina unutar fenolnih tvari. Biosinteza flavonoida jedan je od najbolje istraženih puteva sinteze sekundarnih metabolita. Njihov nastanak dio je većeg mehanizma poznatijeg kao fenilpropanoidni put kojim se sintetizira velik broj sekundarnih metabolita poput fenolnih kiselina, lignina, lignana i stilbena (Davies i Schwinn, 2006.). Glavni prekursori u biosintezi flavonoida su aminokiselina fenilalanin, koja se sintetizira preko puta šikiminske kiseline (Pevalek-Kozlina, 2003.), te malonil-CoA, derivat citrata dobivenog u ciklusu limunske kiseline. Kalkoni formirani iz koenzimA estera su prvi i osnovni flavonoidi koji služe kao ishodišne molekule za sintezu ostalih flavonoida (Davies i Schwinn, 2006.). S obzirom na modifikacije (hidroksilacija, metilacija, acilacija, glikozilacija) kroz koje osnovni kostur flavonoida prolazi tijekom biosinteze, razlikujemo devet grupa flavonoida – flavanone, dihidroflavone, flavan-3,4-diole, antocijanidine, flavone, flavonole, flavan-3-ole, proantocijanidine i izoflavonoide (Martens i sur., 2010.). Biosintetski put flavonoida dobro je istražen i opisan u vrsti *Arabidopsis thaliana* te su dostupne i mutante s mutacijom na genima koji kodiraju za svaki enzimski korak (Slika 1.) (Buer i sur., 2010.).



Slika 1. A) Prikaz biosintetskog puta flavonoida u vrsti *Arabidopsis thaliana*. Vrsta ne posjeduje kalcion reduktazu/sintazu (CHR/CHS) i izoflavon sintazu (IFS) pa ne dolazi do sinteze izoflavona (označeni crtkanom linijom). Preuzeto i prilagođeno iz Buer i sur. (2010.). B) Prikaz strukture odabranih flavonoida. Preuzeto iz <http://en.wikipedia.org>.

1.2. *Biološko djelovanje flavonoida u biljkama*

Flavonoidi čine biološki najznačajniju grupu biljnih sekundarnih metabolita za koju je dokazano mnoštvo pozitivnih bioloških učinaka (Treutter, 2006.). Biljke su sesilni organizmi i morale su razviti mehanizme koji im pomažu u prilagodbi i preživljavanju nepovoljnih okolišnih uvjeta. Dokazano je tako da flavonoidi imaju značajnu obrambenu ulogu u biotičkom stresu te u pozitivnim interakcijama biljka-kukac (Lattanzio i sur., 2000.), odnosno biljka-mikroorganizam (Andary i sur., 1996.). Flavonoide kao obrambene molekule dijelimo u dvije grupe – stečene i inducirane. Stečeni flavonoidi su molekule koje se sintetiziraju tijekom normalnog razvitka biljnog tkiva. Schlösser (1994.) je opisao ulogu flavonoida u interakciji biljka-patogen te zaključio kako su stečene molekule često pohranjene na strateški važnim mjestima gdje će indirektno funkcionirati kao signalne molekule ili direktno kao obrambene molekule. Jedan od popularnih primjera ovog tipa jest interakcija biljka-kukac gdje flavonoidi služe kao obrana od herbivora (Feeny, 1976.). U tom slučaju, biljke sintetiziraju flavonoide koji snižavaju njihovu nutritivnu vrijednost ili ih čak čine otrovnima za predatora te ih tako štite od istih (Robbins i sur., 1987.). Primjer toksičnog učinka jest utjecaj flavonola kvercetina i njegovog glikozida rutina na smrtnost ličinki vrste *Spodoptera liture*, herbivora na duhanu (Mallikarjunai sur., 2004.). Međutim, ovaj tip interakcije može djelovati i u obrnutom smjeru pa tako postoje kukci koji mogu uzimati flavonoide i ugrađivati ih u kutikulu kao obranu od predatora ili kako bi privukli partnere za parenje (Simmonds, 2003.).

Inducirana sinteza flavonoida nakon infekcije patogenom, mehaničke ozljede ili djelovanja određenog stresa danas je dobro poznat fenomen (Barry i sur., 2002.; Gallet i sur., 2004.). Inducirani flavonoidi mogu se sintetizirati kontinuirano, pri čemu će stupanj njihove sinteze biti povećan tijekom djelovanja nekog oblika stresa (fitoanticipini) ili će do njihove sinteze doći tek nakon djelovanja određenog tipa stresa, kao što su npr. infekcije patogenom (fitoaleksini). U listovima pamuka, sinteza antocijana u epidermi je indikator tolerancije biljke na bakteriju vrste *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Kangatharalingam i sur., 2002.). Eyles i sur. (2003.) dokazali su da je formiranje periderme koja se kod vrste *Eucalyptus globulus* postiže akumulacijom flavanola u ozljeđena tkiva, odgovor na infekciju patogenom *Cytospora* sp.

Interakcija biljaka s mikroorganizmima ne mora nužno biti negativnog karaktera. Mnoge biljke povezane su s različitim mikroorganizmima putem koje ih opskrbljuju

hranjivim tvarima te im omogućavaju da žive na osiromašenim tlima. Korijen većine mahunarki (porodica *Fabaceae*) koloniziran je bakterijama roda *Rhizobium* koje fiksiraju atmosferski dušik te ga prevode u oblik koji biljke mogu iskoristiti za metabolizam. Ključnu ulogu u procesu infekcije ima nekoliko flavonoida. Njih luči korijen biljke u tlo gdje djeluju kao signalne molekule koje će inducirati transkripciju bakterijskih gena čime će započeti sinteza bakterijskih proteina ključnih za proces infekcije (Mathesius, 2003.; Kobayashi i sur., 2004.; Cooper, 2004.). Biljke pomoću flavonoida mogu djelovati i na druge biljke (Chou, 1999.; Inderjit i Gross, 2000.). Riječ je o interakciji biljka-biljka poznatijoj i kao alelopatija. Bais i sur. (2003.) su dokazali da biljka *Centaurea maculosa* putem korijena luči flavanol (-)-katehin koji djeluje fitotoksično inhibirajući klijanje sjemenki i rast kod vrsta *Centaurea diffusa* i *Arabidopsis thaliana*. Međutim, uloga i način djelovanja flavonoida u mehanizmu ove interakcije još uvijek nisu razjašnjeni.

Osim u biotičkom, flavonoidi imaju i važnu ulogu u abiotičkom stresu kojem su biljke također ponekad izložene. Pizzi i Cameron (1986.), Chalker-Scott i Krahmer (1989.) te Moore i sur. (2004.) dokazali su kako flavonoidi imaju važnu ulogu u procesu prilagodbe biljke na smrzavanje te na uvjete suše. Niske temperature potiču sintezu antocijana, skupine flavonoida koja je odgovorna za boju plodova, cvjetova i listova (Holton i Cornish, 1995.), u klijancima rodova *Arabidopsis* (Graham, 1998.), *Sorghum* (Shichijo i sur., 1993.), *Pinus* (Krol i sur., 1995.) i vrste *Zea mays* (Christie i sur., 1994.). Međutim, Mol i sur. (1996.) su dokazali da će sinteza antocijana prilikom djelovanja niskih temperatura izostati ako biljke nisu izložene vidljivom ili UV-B dijelu spektra. Iako mehanizam djelovanja još nije u potpunosti razjašnjen, Ryan i sur. (2002.) su istaknuli kako je fotoprotekcija jedna od glavnih funkcija flavonoida. Dokaze o ulozi flavonoida prilikom djelovanja UV-B zračenja pružili su Reuber i sur. (1996.), Shirley (1996.) te Rozema i sur. (1997.) istaknuvši kako flavonoidi u epidermi listova apsorbiraju UV-B zračenje čime djeluju zaštitno na unutrašnja tkiva listova i stabljike. Biokemijski gledajući, flavonoidi se ponašaju kao hvatači reaktivnih vrsta kisika (ROS) prilikom čega sprečavaju lipidnu peroksidaciju, ali i oštećivanja proteina i nukleinskih kiselina. Na temelju tih opažanja, nekoliko je autora (Gould i sur., 2002.; Rozema i sur., 2002.; Tattini i sur., 2004.) predložilo da flavonoidi djeluju kao antioksidansi u uvjetima svjetlosnog stresa.

Flavonoidi sudjeluju i u procesu prilagodbe biljaka na visoke koncentracije teških metala u tlu. Gould i Lister (2006.) dokazali su da korijen kukuruza koji je bio izložen povišenim koncentracijama aluminijskih iona sintetizira veće količine flavonoida. Visoke

koncentracije teških metala u biljci mogu rezultirati stvaranjem spomenutih ROS-ova. Kako bi se spriječilo oštećivanje tkiva, flavonoidi stvaraju komplekse s metalima i tako detoksificiraju stanice korijena (Harborne, 1999.).

1.3. Kompleksi flavonoida i metala

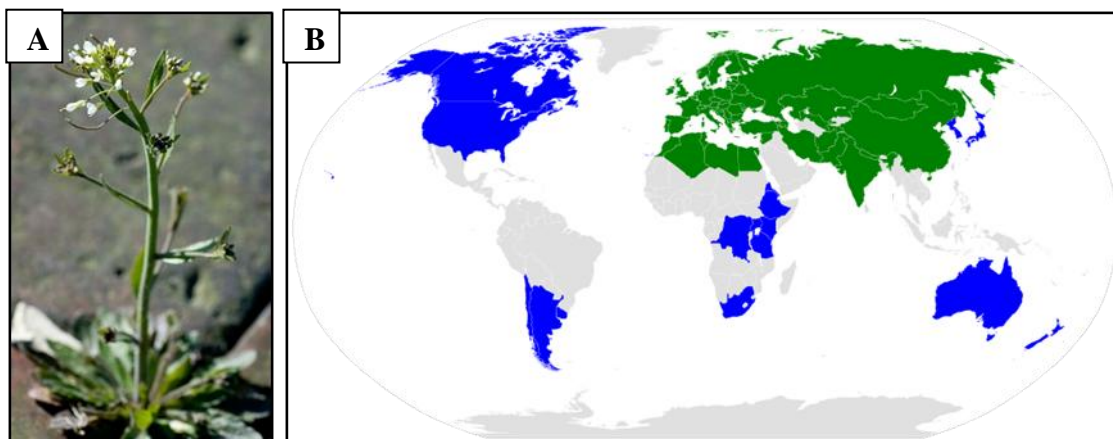
Do sada najbolje proučen mehanizam kojim flavonoidi ostvaruju pozitivne biološke učinke jest njihovo antioksidativno djelovanje (Pietta, 2000.). Nekoliko je autora (Gould i sur., 2002.; Rozema i sur., 2002.; Tattini i sur., 2004.) predložilo da se flavonoidi ponašaju kao hvatači ROS-a prilikom čega sprečavaju lipidnu peroksidaciju, oštećivanje proteina i nukleinskih kiselina. Osim što mogu djelovati direktno na ROS, flavonoidi zahvaljujući svojoj kemijskoj strukturi, mogu s lakoćom kelirati metalne ione i stvarati komplekse (Malešev i Kuntić, 2007.). Stvaranjem kompleksa flavonoid-metal sprječava se stvaranje slobodnih radikala pod utjecajem slobodnih metalnih iona poput Fe^{2+} , Fe^{3+} i Cu^{2+} , pa govorimo o indirektnom antioksidativnom djelovanju flavonoida (Dekermendjian i sur., 1999.). Istraživanje mehanizama keliranja metalnih iona flavonoidima, omogućava bolje razumijevanje antioksidativnih svojstava kompleksa flavonoid-metal (Malešev i Kuntić, 2007.).

Eksperimentalni podaci pokazuju da su kelati učinkovitiji hvatači ROS-a u odnosu na slobodne flavonoide. Kostyuk i sur. (2001.) dokazali su da su kompleksi rutina, dihidrokvercetinina i epikatehina s Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} ili Zn^{2+} bili učinkovitiji u gašenju ROS-a u odnosu na iste slobodne flavonoide zahvaljujući mogućnosti imitiranja antioksidativnog enzima superoksid dismutaze. Također, kompleksi Fe^{3+} i flavonoida bili su učinkovitiji u zaštiti izoliranih hepatocita štakora prilikom djelovanja hipoksije (Moridani i sur., 2003.). Za kompleks Cu-rutin dokazano je da najučinkovitije štiti tkivo pluća od lipidne peroksidacije uzrokovane djelovanjem azbesta (Kostyuk i sur., 2001.). Posljednjih godina istražuje se i interakcija metalnih kompleksa flavonoida s nukleinskim kiselinama (Keek i Lippard, 1992.; Dandliker i sur., 1997.; Rusak i sur., 2009.). Nadalje, s obzirom da je DNA ciljna molekula različitih antivirusnih i antikancerogenih spojeva, pručavane su interakcije flavonoida i njihovih kompleksa s DNA (Sun i sur., 2008.). Naime, utvrđeno je da je inenzitet vezanja kompleksa kvercetinina s lantanom na dvolančanu RNA virusa jači nego čistog kvercetinina (Rusak i sur., 2009.) što upućuje na zaključak da se malim kemijskim modifikacijama pozitivni biološki učinci flavonoida mogu dodatno pojačati.

1.4. Vrsta *Arabidopsis thaliana* kao modelni organizam

Vrsta *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (hrv. talijin uročnjak) je mala jednogodišnja biljka iz porodice krstašica (lat. *Brassicaceae*). Vjeruje se da potječe iz središnje Azije odakle se proširila područjem Euroazije. Danas se rasprostranjuje duž umjerenih područja Sjeverne polutke, od sjeverne Afrike pa sve do tzv. Arktičkog kruga (Slika 2.). Kao i većina europskih biljaka, vrsta se tijekom povijesti rasprostranila i duž Sjeverne Amerike (Weigel i Mott, 2009.).

Jedan od glavnih razloga dominacije vrste *A. thaliana* kao modelnog organizma u području biljnih istraživanja (Chory i sur., 2000.) jest genetika same biljke. Naime, vrsta posjeduje diploidni genom veličine 125 do 150 Mb raspoređen na pet kromosoma s manje od 30 000 protein-kodirajućih gena (Somerville i Koornneef, 2002.). Nadalje, prednost ove vrste jest način razmnožavanja. *A. thaliana* se razmnožava samooplodnjom, pa je većina jedinki sakupljena u prirodi homozigot na razini genoma (Alonso-Blanco i Koornneef, 2000.).



Slika 2. Prikaz A) izgleda vrste *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Preuzeto iz: www.delawarewildflowers.org) te B) geografske rasprostranjenosti vrste *A. thaliana* (L.) Heynh. Zelena boja na karti predstavlja područja u kojima je *A. thaliana* nativna, plava područja na kojima je naturalizirana te bijela područja gdje još nije pronađena (Preuzeto iz: http://en.wikipedia.org/wiki/Arabidopsis_thaliana).

Najpopularniji ekotipovi vrste *A. thaliana* korišteni u različitim genetičkim i molekularnim istraživanjima su Landsberg *erecta* (*Ler*) i Columbia (*Col*) (Meyerowitz, 1989.). Iako se oba ekotipa koriste kao divlji tipovi (Rédei, 1992.), njihov se genom razlikuje što rezultira različitim oblicima rasta i organa. Ekotip *Ler* posjeduje tzv. mutaciju *erecta* zbog

čega razvija kompleksan cvat s cvjetovima grupiranim na vrhu te u odnosu na ekotip Col razvija okrugle listove s kratkim peteljka i kratkim, tupim mahunama. Također, Yamamoto-Toyoda i sur. (1999.) su dokazali da apscizinska kiselina (ABA) uvelike reducira sadržaj klorofila u klijancima ekotipa Col, ali ne i u ekotipa *Ler*. Genetska i molekularna istraživanja metaboličkih mehanizama vrste *A. thaliana* pružila su, između ostalih, informacije o biosintetskom putu flavonoida (Chapple i sur., 1994.). Iznimnu važnost u proučavanju učinka flavonoida na rast i razvoj biljke imaju mutante divljeg tipa *Ler* kod kojih je promijenjen biosintetski put flavonoida. Do danas je na primjeru vrste *A. thaliana* opisano 24 lokusa (Routaboul i sur., 2006.) koji su ključni u koracima biosinteze flavonoida. Mutacije na tim lokusima zajednički su nazvane *tt*, od engleske inačice *transparent testa*, jer dovode do poremećaja u sintezi pigmenata teste (omotača sjemenki). Mutante *tt* proizvode sjemenke žute i svjetlosmeđe boje, u odnosu na tamnosmeđe sjemenke divljih tipova (Shirley i sur., 1995.). Zbog mutacija vezanih uz biosintezu flavonoida, mutante *tt* omogućuju analizu utjecaja pojedinačnih flavonoida na određeni proces u biljci (rast, razvoj, obrambeni odgovor na stres) (Tablica 1.) (Peer i sur., 2001.).

Tablica 1. Sažeti prikaz izabranih ekotipova, inaktiviranih enzima ključnih u biosintezi flavonoida, lokusa, mutagena te akumuliranih flavonoida kod vrste *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Preuzeto i prilagođeno prema Peer i sur. (2001.).

Ekotipovi i mutante	Inaktivirani enzim	Lokus	Akumulacija flavonoida
Col	- (divlji tip)	-	-
<i>Ler</i>	- (divlji tip)	-	-
<i>tt4</i>	kalkon sintaza	At5G13930	nije detektirano
<i>tt5</i>	kalkon izomeraza	At3G55120	naringenin kalkon
<i>tt7</i>	flavonoid 3`-hidroksilaza	At5G07990	kempferol

1.5. *Virus mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA*

Virus mozaika krastavca (CMV) je biljni virus koji pripada rodu *Cucumovirus* (porodica *Bromoviridae*) (Roossinck i sur., 1999.). Među danas poznatim biljnim virusima CMV ima najširi krug domaćina, inficira više od 1 200 vrsta biljaka, uključujući jednosupnice i dvosupnice (Edwardson i Christie, 1991.; Sevik, 2012.). Razlog raširenosti CMV-a leži u nekoliko čimbenika – širokom krugu domaćina, brzom adaptaciji na nove domaćine i okolišne uvjete (Doolittle, 1916.; Jagger, 1916.), prijenosu putem čak 86 vrsta lisnih uši (Edwardson i Christie, 1991.) te prijenosu putem sjemenki kod nekih vrsta (O'Keefe i sur., 2007.). Prijenos virusa putem sjemenki ima značajnu ulogu u preživljavanju virusa od sezone do sezone (Johansen i sur., 1994.). Simptomi se uglavnom sastoje od razvitka srednjeg do jakog mozaika, kržljivosti biljke te deformacije listova (Kearney i sur., 1990.).

CMV je ikosaedarni virus genoma sastavljenog od tri jednolančane, pozitivno usmjerene RNA nazvane RNA1, RNA2 i RNA3 (Lot i sur., 1974.) te dvije subgenomske RNA nazvane RNA4a i RNA4 (Mochizuki i Ohki, 2012.) koje nastaju transkripcijom RNA2, odnosno RNA3 (Schwinghamer i Symons, 1975.; Ding i sur., 1994.). Kao i u većini biljnih virusa, genomske RNA se pakiraju u zasebne čestice. Iako je time velik genom podijeljen na manje virusne čestice – virione, potrebni su svi dijelovi virusnih čestica kako bi došlo do infekcije u biljnoj stanici (Roossinck, 2001.). CMV sadrži pet ORF (engl. *open reading frames*) regija koje kodiraju sljedeće proteine – 1a, 2a, 2b, 3a i 3b. RNA1 i RNA 2 kodiraju 1a, odnosno 2a ORF regiju koje predstavljaju viralne komponente RNA replikaze (Roossinck, 2001.) potrebne za replikaciju virusa unutar domaćina (Hayes i Buck, 1990.). RNA2 kodira protein 2b, supresor posttranskripcijskog utišavanja gena (Brigneti i sur., 1998.). Subgenomska RNA4a također kodira protein 2b (Ding i sur., 1994.). RNA3 kodira 3a, tzv. *movement protein* (MP) te 3b, tzv. *coat protein* (CP), proteine ključne za kretanje virusa unutar domaćina (Suzuki i sur., 1991.). Subgenomska RNA4 također kodira protein CP (Edwardson i Christie, 1991.). U nekih sojeva CMV-a pronađena je satelitna RNA (satRNA) – mala, linearna molekula veličine 332 do 405 nukleotida (Xu i Roossinck, 2000.). Replikacija (Kaper i sur., 1976.), stvaranje kapsule (Lot i Kaper, 1976.), rasprostranjivanje (Ping i Roossinck, 2000.) te kretanje satRNA unutar domaćina (Alonso-Prados i sur., 1998.) ovise o CMV-u, ali satRNA nije nužna za životni ciklus virusa (Xu i Roossinck, 2000.). Njeno prisutstvo može ublažiti ili pojačati razvitak simptoma. Primjerice, D-satRNA, B-satRNA i WL1-satRNA mogu inducirati nekrozu i klorozu u rajčice inficirane virusom CMV

(García-Arenal i Palukaitis, 1999.). Prvi dokaz o prisutstvu CMV-a s pridruženom satelitnom RNA u Hrvatskoj zabilježen je 1996. godine (Škorić i sur.).

1.6. Protist *Plasmodiophora brassicae*

Plasmodiophora brassicae Woronin je obligatni biotrof na korijenju biljaka iz porodice krstašica (lat. *Brassicaceae*), od kultiviranih vrsta roda *Brassica* do divljih poput vrste *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Karling, 1968.; Koch i sur., 1991.; Dixon, 2009.; Kageyama i Asano, 2009.). Vrsta je nedavno klasificirana u novu filogenetsku supergrupu (klad) organizama – *Rhizaria* (Bass i Cavalier-Smith, 2009.) te se trenutno ubraja u razred *Plasmodiophora*, koljeno *Phytomyxea* (prije *Plasmodiophoromycetes*), carstvo *Cercozoa* (prije *Protozoa*) (Cavalier-Smith, 1998.). Infekcija ovim protistom uzrokuje hipertrofiju stanica korijena te formiranje tumora na korijenju (Slika 3.). Simptomi vidljivi iznad razine tla uključuju žućenje listova te venuće biljke. Kombinirani simptomi zakržljalih i često trulih korijena sa smanjenom mogućnošću uzimanja hranjivih tvari i vode iz tla te smanjenog fotosintetskog kapaciteta listova značajno reduciraju rast biljke te smanjuju prinos (Wallenhammer, 1998.; Dixon, 2009.; Kageyama i Asano, 2009.; Hwang i sur., 2011.).

Životni ciklus *P. brassicae* sastoji se od dvije faze – prve koja se javlja u korijenovim dlačicama te druge koja se javlja u stanicama korteksa i srčike korijena. Tijekom druge faze, *P. brassicae* stimulira rast i dijeljenje inficiranih stanica što dovodi do razvitka spomenutih tumora (Fuchs i Sacristán, 1996.). Odrasle jedinke odlažu spore u novonastale tumore koje će se nakon truljenja korijena osloboditi u tlo gdje mogu biti infektivne i do 15-20 godina (Ludwig-Müller, 2004.; Rastas i sur., 2012.). Konvencionalne mjere zaštite protiv *P. brassicae* su uglavnom neekonomične, nepraktične i nedovoljno učinkovite (Ludwig-Müller, 1999.; Donald i Porter, 2009.). Danas se izrazito malo zna o mehanizmu tolerancije biljaka na *P. brassicae*. Prvobitne pretpostavke su se temeljile na posebnim morfološkim, anatomskim i biokemijskim prilagodabama biljaka (Karling, 1968.), međutim niti jedna od tih pretpostavki nije dala opći mehanizam tolerancije. Butcher i sur. (1974.) su dokazali da je osjetljivost određenih jedinki vrste *Brassica campestris* povezana s glukozinolatom glukobrazicin koji se ponašao kao prekursor auksina. Međutim, to se istraživanje nije moglo primijeniti i na druge domaćine (Ockendon i Buczacki, 1979.; Mullin i sur., 1980.). Trenutno se najučinkovitijom, ali i najisplativijom metodom smatra razvitak kultivara tolerantnih na prisutstvo *P. brassicae* (Rastas i sur., 2012.).



Slika 3. Učinak A) infekcije protistom *Plasmodiophora brassicae* na korijen vrste *Arabidopsis thaliana* u odnosu na B) kontrolnu biljku koja nije tretirana istim te ne pokazuje simptome smanjene stope rasta i zakržljalosti korijena. Fotografije su snimljene tri tjedna nakon infekcije.

1.7. Ciljevi istraživanja

- ∞ Istražiti učinak infekcije virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA na sadržaj flavonoida kempferola u listovima vrste *Arabidopsis thaliana*.
- ∞ Istražiti učinak infekcije protistom *Plasmodiophora brassicae* na sadržaj flavonoida kempferola u listovima vrste *A. thaliana*.
- ∞ Istražiti učinak UV-B zračenja na sadržaj flavonoida kempferola u kalusima vrste *A. thaliana*.
- ∞ Istražiti interakciju kompleksa flavonoida kempferola, te strukturno mu srodnog fisetina, i metala Eu^{3+} s dvolančanim (*ds*) i jednolančanim (*ss*) RNA izoliranim iz biljaka inficiranih virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Biljni materijal

Za potrebe ovog istraživanja korištene su tri biljne vrste – *Nicotiana megalosiphon* Van Heurck & Muell. Arg. kao domaćin za uzgoj virusa mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA (CMVsat), *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* (Lour.) Rupr. kao domaćin za uzgoj spora protista *Plasmodiophora brassicae* Woronin te *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. kao modelni organizam za istraživanje učinka biotičkog i abiotičkog stresa na sadržaj kempferola u biljci.

Učinak infekcije CMVsat-om na sadržaj kempferola praćen je u listovima divljeg tipa *Landsberg erecta* (*Ler*) te dvije mutante *tt* (*tt4* i *tt7*). Istovremeno, učinak infekcije protistom *P. brassicae* na sadržaj kempferola praćen je u listovima *Columbia* (*Col*). Učinak abiotičkog stresa na sadržaj kempferola istraživani je u kalusima divljeg tipa *Ler* te tri mutante *tt* (*tt4*, *tt5* i *tt7*).

Prije svake sadnje, sjemenke vrste *A. thaliana* sinkronizirane su na vlažnom filter papiru u Petrijevim zdjelicama (3 dana, 4°C). Sve biljke su uzgajane na filtriranoj i autoklaviranoj (2 h, 128°C) zemlji marke Stender B400 pomiješane s pijeskom u omjeru 4:1. Biljke su uzgajane u kontroliranim uvjetima staklenika s izmjenom dana i noći svakih 12 h.

2.2. Metode

2.2.1. Infekcija vrste *Arabidopsis thaliana* virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA

Nicotiana megalosiphon Van Heurck & Muell. Arg. divlja je vrsta duhana koja se koristi kao sistemski domaćin za virus mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA (CMVsat) pa je stoga ova vrsta izabrana za uzgoj spomenutog virusa. Virusni inokulum korišten za infekciju *N. megalosiphon* pripremljen je iz konzerviranog inficiranog biljnog materijala pohranjenog u Laboratoriju za virologiju, Zavod za mikrobiologiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu pod oznakom 14A. Biljka je inokulirana virusom u stadiju četiri do pet listova. Inficirani listovi korišteni su kao svježiji virusni inokulum za daljnje infekcije. Pri tome je na odvganu masu listova duhana dodan tri puta veći volumen 0.06 M Sørensenovog pufera (pH 6.976) te su listovi homogenizirani u hladnom,

steriliziranom tarioniku. Dobiveni homogenat je centrifugiran (5000 rpm, 5 min, 4°C) te prebačen u novu epruvetu. Inokulacija biljaka provedena je na dva tjedna starim biljkama vrste *Arabidopsis thaliana* s razvijenim tri do četiri lista. Listovi namijenjeni tretmanu prethodno su posipani karborundumom, zatim je nanešeno 5 µL virusnog inokuluma, odnosno Sörensenovog pufera kao negativna kontrola. Zbog boljeg prodiranja virusa u biljno tkivo, inokulum je utrljan u list staklenim štapićem. Nakon 1 min, listovi su isprani destiliranom vodom. Rozete biljaka sakupljene su za daljnje analize dva tjedna nakon tretmana. Sakupljeni materijal je smrznut u tekućem dušiku i liofiliziran 48 h u liofilizatoru CHRIST ALPHA 1-2 (Christ, Osterode am Harz, Njemačka) pri -60°C i 0.01 mbar. Liofilizirano tkivo je usitnjeno u hladnom, steriliziranom tarioniku i pohranjeno na -20°C.

2.2.2. Infekcija vrste *Arabidopsis thaliana* protistom *Plasmodiophora brassicae*

Protist *Plasmodiophora brassicae* Woronin uzrokuje gomoljaste tumore na korijenu vrsta iz porodice krstašica (lat. *Brassicaceae*) stoga je vrsta *Brassica rapa* ssp. *Pekinensis* (Lour.) Rupr. korištena kao lokalni domaćin ovom protistu. Za infekciju vrste *B. rapa* korištene su spore izolata „e3“ pripremljene iz tumora pohranjenih na -20°C u Laboratoriju za biljnu fiziologiju, Institut za Botaniku, Tehničko Sveučilište Dresden, Njemačka. Spore su pripremljene na sljedeći način: 200 g tumora homogenizirano je s 200 mL destilirane vode, homogenat je potom filtriran kroz gazu pora veličine 80 µm. Filtrat je centrifugiran (2000 rpm, 10 min, 4°C) pri čemu je supernatant odstranjen, a talog je ponovno homogeniziran s vodom i centrifugiran (2000 rpm, 10 min, 4°C). Na kraju je talog homogeniziran u 50 mM vodenoj otopini KH₂PO₄ (pH 5.5) u omjeru 1:1 (w/V). Spore su izbrojane pomoću Bürker-Türkove komorice (Brand, Njemačka). Dobiveni homogenat apliciran je na četiri dana stare biljke vrste *B. rapa* ssp. *pekinensis*. Svaka je biljka inficirana ubrizgavanjem 3 mL homogenata sa standardnom koncentracijom 10⁷ spora po mL u zemlju (Siemens i sur., 2002.). Tumori na korijenju sakupljeni su nakon osam tjedana te su pohranjeni na -20°C. Iz ovih tumora pripremao se, prethodno opisanim načinom, homogent za infekciju vrste *Arabidopsis thaliana*. Infekcija je provedena na dva tjedna starim biljkama *A. thaliana*. Svaka je biljka inficirana ubrizgavanjem 1 mL homogenata sa standardnom koncentracijom 7.68 x 10⁸ spora po mL u zemlju. Kao negativna kontrola korišten je pufer. Rozete biljaka sakupljane su za daljnje analize tri tjedna nakon tretmana. Sakupljeni materijal je smrznut u tekućem dušiku i liofiliziran 48 h u liofilizatoru CHRIST ALPHA 1-2 (Christ, Osterode am

Harz, Njemačka) pri -60°C i 0.01 mbar. Liofilizirano tkivo je usitnjeno u hladnom, steriliziranom tarioniku i pohranjeno na -20°C .

2.2.3. Uzgoj kalusa vrste *Arabidopsis thaliana*

Podloga za kaluse pripravljena je prema protokolu Murashige i Skooga (1962.) te je sadržavala 0.43% MS medija, 1% saharoze, 0.02% mioinozitola te 0.8% fitoagara u deioniziranoj vodi; pH vrijednost otopine namještena je na 5.7. Nakon pripreme, otopina je stavljena na sterilizaciju autoklaviranjem. Kada se smjesa dovoljno ohladila (do otprilike 50°C), dodani su sljedeći hormoni: 0.5 $\mu\text{g/mL}$ BAP (6-benzilaminopurin), 1 $\mu\text{g/mL}$ NAA (naftalen-1-octena kiselina), 1 $\mu\text{g/mL}$ IAA (indol-3-octena kiselina) te 1 $\mu\text{g/mL}$ 2,4-D (2,4-diklorofenoksioktenu kiselina). Po završetku, medij je izliven u sterilne Petrijeve zdjelice. Matične otopine auksina NAA, IAA i 2,4-D konačnih koncentracija 1 mg/mL pripravljene su u apsolutnom etanolu te citokinina BAP konačne koncentracije 1 mg/mL u 0.5 M vodenoj otopini NaOH.

Sjemenke vrste *Arabidopsis thaliana* (*Ler*, *tt4*, *tt5* i *tt7*) sinkronizirane su na vlažnom filter papiru (3 dana, 4°C). Prije sađenja na podlogu, sjemenke su sterilizirane u 2.55% vodenoj otopini izosana (20 min na sobnoj temperaturi). Potom su temeljito isprane autoklaviranom deioniziranom vodom te su u sterilnim uvjetima posađene na prethodno pripremljen medij za uzgoj kalusa. Kalusi su uzgajani u trima različitim uvjetima: 1) na bijelom svjetlu tijekom 30 dana, 2) na UV-B svjetlu tijekom 30 dana i 3) na bijelom svjetlu tijekom prvih 15 dana te potom tijekom drugih 15 dana na UV-B svjetlu. Svi kalusi uzgajani su na $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ s trajanjem dana 16 h, odnosno noći 8 h. Materijal je nakon mjesec dana sakupljen, smrznut u tekućem dušiku i liofiliziran 48 h u liofilizatoru CHRIST ALPHA 1-2 (Christ, Osterode am Harz, Njemačka) pri -60°C i 0.01 mbar. Liofilizirano tkivo je usitnjeno u hladnom, steriliziranom tarioniku i pohranjeno na -20°C .

2.2.4. Ekstrakcija fenolnih tvari

Fenolne tvari ekstrahirane su iz listova vrste *Arabidopsis thaliana* inficiranih virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA (CMVsat) ili protistom *Plasmodiophora brassicae*. Na odvaganoj masi listova dodan je 80 puta veći volumen 80% metanola. Uzorci su inkubirani u vodenoj kupelji (150 rpm, 30 min, 80°C). Po završetku, uzorci su stavljani 5 do 10 min na -20°C kako bi se ekstrakcija u svim uzorcima zaustavila. Uslijedila je centrifuga

(11 000 rpm, 10 min, 4°C) nakon čega je odvojen supernatant te je na njega dodana koncentrirana HCl do konačne koncentracije 1.2 M. Nakon dodatka HCl, uzorci su ponovno inkubirani u kupelji (150 rpm, 30 min, 80°C) te su centrifugirani (13 000 rpm, 15 min, 4°C). Odvojeni supernatant centrifugiran je još jednom (13 000 rpm, 10 min, 4°C) te je novodobiveni supernatant sakupljen za daljnje analize na HPLC-u.

2.2.5. *Određivanje sadržaja kempferola metodom HPLC-a*

Za određivanje sadržaja kempferola u listovima vrste *Arabidopsis thaliana* inficiranim virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA (CMVsat) ili protistom *Plasmodiophora brassicae* korištena je metoda tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja (*engl. High Performance Liquid Chromatography – HPLC*) prema Likić (2010.). Uzorci su pripremljeni koristeći metodu opisanu u poglavlju 2.2.4. Korišten je uređaj HPLC (Agilent 1100 Series, Santa Clara, CA, SAD) s kolonom Zorbax RX-C18 (5 µm, 75 x 4.6mm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD), a razdvajanje je provedeno uz protok od 1.0 ml/min pri temperaturi od 35°C. Ubrizgavano je 100 µL uzoraka. Spektar je snimljen na valnoj duljini 374 nm. Korištena su sljedeća otapala: A – 0.05% trifluoroctena kiselina u deioniziranoj vodi (TFA), B – 20% metanol i 0.05% TFA, C – 70% metanol i 0.05% TFA, D – 100% metanol. Sastav otapala mijenjao se prema stupnjevitoj gradijentu kako slijedi: 0 min (80%A, 20%B, 0%C, 0%D), 4 min (0%A, 100%B, 0%C, 0%D), 23 min (0%A, 0%B, 100%C, 0%D), 27 min (0%A, 0%B, 0%C, 100%D), 32 min (0%A, 0%B, 0%C, 100%D), 33 min (80%A, 20%B, 0%C, 0%D). Kromatogram je analiziran pomoću programa ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD).

2.2.6. *Izolacija dsRNA i ssRNA iz biljaka vrste Nicotiana megalosiphon inficiranih virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA pomoću CF-11 celulozne kromatografije*

Izolacija dvolančanih (*ds*) i jednolančanih (*ss*) RNA iz tkiva vrste *Nicotiana megalosiphon* inficiranih virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA (CMVsat) provedena je prema Kearney i sur. (1990.) s malim izmjenama. Masa od 200 mg tkiva inficiranog sa CMVsat homogenizirana je sa 600 µL ekstrakcijskog pufera (97 mL 2x STE + 3 g SDS + 0.3 g bentonit + 0.5 mL β-merkaptotanol). Homogenat je promiješan na vrtložnoj miješalici 15 s te je na njega dodano 400 µL fenola (pH vodene faze je bio 7.0 te je zasićen s 0.01 M NaOH, uzeta je donja faza). Ponovljeno je miješanje na vrtložnoj miješalici 1

min. Homogenat je zatim centrifugiran (6000 rpm, 7 min, 4°C) nakon čega je odvojena vodena faza. Vodena faza ekstrahirana je sa 400 µL fenola i kloroforma pripremljenih u omjeru 1:1 (V/V). Ponovljeno je miješanje (45 s) i centrifuga (6000 rpm, 5 min, 4°C) nakon čega je vodena faza ekstrahirana sa 400 µL kloroforma. Dobivena vodena faza sadržavala je TNA (engl. *total nucleic acids*) ili ukupne nukleinske kiseline. Kako bi se izoliralo samo *dsRNA*, na 100 µL odvojene vodene faze dodano je 20 µL 96% etanola sobne temperature te je otopina dodana na 50 mg CF-11 celuloze pripremljene u 200 µL 1x STE u 16% etanolu. 1x STE pripremljen je iz matične otopine 10x STE (5.8% NaCl + 6.06% Tris + 0.3% EDTA u deioniziranoj vodi, pH 6.8). Otopina celuloze je promiješana na vrtložnoj miješalici (45 s) i centrifugirana (6000 rpm, 6 min, 4°C). Dobiveni supernatant je odvojen i korišten dalje za precipitaciju *ssRNA*, a talog je korišten za odvajanje *dsRNA*. Talog je tri puta ispiran sa 400 µL 1x STE u 16% etanolu, promiješan (15 s) i centrifugiran (6000 rpm, 4 min, 4°C). Svaki puta je supernatant odvojen i bačen. U posljednjem koraku izolacije, na talog je dodano 250 µL 1x STE pufera. Otopina je promiješana (1 min) i centrifugirana (6000 rpm, 10 min, 4°C) nakon čega je supernatant sakupljen. Za precipitaciju *dsRNA* na supernatant je dodano 1/10 volumena 3 M natrijevog acetata (pH 5.5) i 4 volumena hladnog 96% etanola. Uzorci su preko noći pohranjeni na -20°C te su idućeg dana centrifugirani (11 000 rpm, 30 min, 4°C). Nakon centrifugiranja supernatant je bačen, a talog pušten da se suši (30 min). Talog je potom resuspendiran u TE puferu (10 mM Tris + 1 mM EDTA u deioniziranoj vodi, pH 7.5).

2.2.7. Agarozna gel elektroforeza *dsRNA*

Za dokazivanje dvolančanih (*ds*) RNA izoliranih iz tkiva vrste *Nicotiana megalosiphon* inficirane virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA (CMVsat) korištena je elektroforeza na 1% agaroznom gelu. Gel je pripremljen miješanjem 1% agaroze i 1x TBE pufera dobivenog iz matične otopine 10x TBE (10.9% TRIS + 5.5% BA + 0.29% KOMPLEXAL II u deioniziranoj vodi, pH 8.3). Dobivena otopina je kuhana dok se sva agarozna nije otopila. Nakon što se ohladila, u otopinu je dodan 0.025% Stain G kao zamjena za etidijev bromid te je smjesa izlivena u kalup za gel. Kada je gel bio spreman, prebačen je u kadicu za elektroforezu koja je zatim napunjena s 1x TBE puferom. Na jažice je nanošeno 2 µL markera za elektroforezu, odnosno uzorka pomiješanih s 4 µL boje za elektroforezu. Elektroforeza je provedena na 80 V tijekom 2 h.

2.2.8. *Sinteza kompleksa flavonoid/metal te njegova interakcija s dsRNA i ssRNA izoliranim iz vrste Nicotiana megalosiphon inficirane virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA*

Nastajanje kompleksa flavonoid/metal te njihova interakcija s dvolančanim (*ds*) i jednolančanim (*ss*) RNA izoliranim iz tkiva vrste *Nicotiana megalosiphon* inficirane virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA (CMVsat) praćeni su na UV/Vis spektrofotometru (Nanodrop 2000®). Prilikom mjerenja korištene su plastične kivete. Za sintezu kompleksa korišten je 0.1 M pufer hepes (pH 7.0). Matična otopina flavonoida kempferola i fisetina (10 mM) pripremljena je u apsolutnom etanolu. Matična otopina metala europija ($\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) koncentracije 10 mM pripremljena je u deioniziranoj vodi. Za istraživanje interakcije s kompleksom flavonoid/metal, izolirane *ds*RNA i *ss*RNA dodavane su postupno prema obrascu navedenom u Tablici 2. Apsorbancija je mjerena na valnim duljinama 260, 370 i 446 nm.

Tablica 2. Obrazac prema kojem je praćeno nastajanje kompleksa flavonoid/metal te njegova interakcija s dvolančanim (*ds*) i jednolančanim (*ss*) RNA izoliranim iz tkiva vrste *Nicotiana megalosiphon* inficiranih virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA (CMVsat). Na lijevoj strani navedene su korištene otopine, a na desnoj njihovi volumeni.

PUFER	→	2 mL
+ FLAVONOID	→	+ 10 µL
+ EUROPIJ	→	+ 10 µL
+ <i>ds</i> ili <i>ss</i> RNA 100x razrijeđena	→	+ 1 µL
+ <i>ds</i> ili <i>ss</i> RNA 100x razrijeđena	→	+ 1 µL
+ <i>ds</i> ili <i>ss</i> RNA 100x razrijeđena	→	+ 6 µL
+ <i>ds</i> ili <i>ss</i> RNA 100x razrijeđena	→	+ 2 µL
+ <i>ds</i> ili <i>ss</i> RNA 100x razrijeđena	→	+ 1 µL
+ <i>ds</i> ili <i>ss</i> RNA 100x razrijeđena	→	+ 1 µL
+ <i>ds</i> ili <i>ss</i> RNA 100x razrijeđena	→	+ 1 µL
+ <i>ds</i> ili <i>ss</i> RNA 100x razrijeđena	→	+ 2 µL
+ <i>ds</i> ili <i>ss</i> RNA 100x razrijeđena	→	+ 2 µL
+ <i>ds</i> ili <i>ss</i> RNA 100x razrijeđena	→	+ 5 µL
+ <i>ds</i> ili <i>ss</i> RNA 10x razrijeđena	→	+ 1 µL
+ <i>ds</i> ili <i>ss</i> RNA 10x razrijeđena	→	+ 5 µL
+ <i>ds</i> ili <i>ss</i> RNA koncentrirana	→	+ 1 µL
+ <i>ds</i> ili <i>ss</i> RNA koncentrirana	→	+ 5 µL
+ <i>ds</i> ili <i>ss</i> RNA koncentrirana	→	+ 5 µL

2.2.9. Obrada podataka

Dobiveni rezultati obrađeni su u programu Microsoft Excel 2007. Prikazane vrijednosti su izražene u odnosu na vrijednosti u kontrolnim biljkama (vrijednost u kontrolnim biljkama postavljena je na 1.0) \pm standardne pogreške izračunate na temelju tri neovisna mjerenja. Statistička analiza provedena je u programu STATISTICA 8 (StatSoft. Inc., SAD). Statistički značajne razlike između ispitivanih skupina procijenjene su primjenom t-testa. Srednje vrijednosti s pridruženim istim slovom međusobno se ne razlikuju značajno ($p < 0.05$).

3. REZULTATI

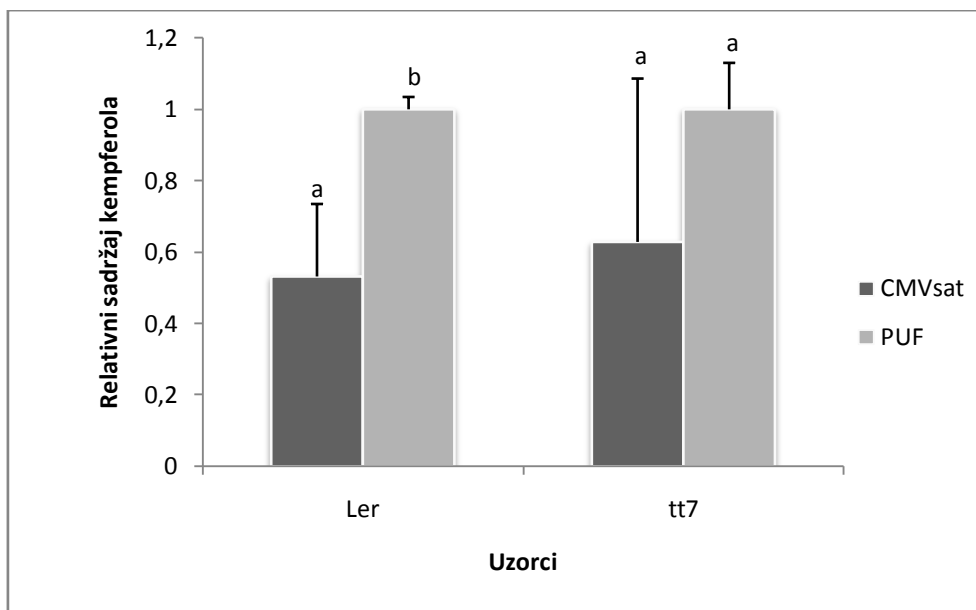
3.1. Dio istraživanja proveden u uvjetima *in vivo*

Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti učinak dvaju različitih patogena te UV-B zračenja na sadržaj flavonoida kempferola u različitim tkivima vrste *Arabidopsis thaliana*. Korištena su dva različita patogena: virus mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA (CMVsat, sustavni patogen koji se s mjesta infekcije (listovi) širi na ostale dijelove biljke) te protist *Plasmodiophora brassicae* (lokalni patogen koji parazitira u korijenu biljke) s ciljem utvrđivanja je li odgovor kempferola u određenoj biljci domaćinu univerzalan ili patogen-specifičan. Učinak abiotičkog stresa (UV-B zračenja) na sadržaj kempferola istražen je na kalusima vrste *A. thaliana*. S obzirom da su prethodno provedena *in vitro* istraživanja pokazala da dvolančane (*ds*) RNA molekule izolirane iz CMVsat-inficiranih biljaka vrste *A. thaliana* uzrokuju značajne promjene u strukturi kompleksa flavonoida kvercetina i Eu^{3+} (Šola, 2013.), u sklopu ovog diplomskog rada istražena je interakcija kompleksa kempferola, te njemu strukturno srodnog fisetina, i Eu^{3+} s RNA molekulama izoliranim iz CMVsat-inficiranih biljaka vrste *Nicotiana megalosiphon*.

3.1.1. Učinak infekcije virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA na sadržaj kempferola u listovima vrste *Arabidopsis thaliana*

S obzirom da je dokazano da kempferol ima antiviralnu ulogu (Amoros i sur., 1992.; Mitrocotsa i sur., 2000.; Min i sur., 2001.; Tsai i sur., 2011.), istraživan je učinak infekcije virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA (CMVsat) na sadržaj kempferola u listovima vrste *Arabidopsis thaliana*. Istraživani su divlji tip Landsberg *erecta* (*Ler*) te dvije mutante *tt* (*tt4* i *tt7*). Biljke su tretirane virusom, odnosno puferom kao negativnom kontrolom.

Prema očekivanjima, mutante *tt4* neovisno o vrsti tretmana ne sadrže kempferol (podaci nisu prikazani). U listovima divljeg tipa *Ler* infekcija CMVsat-om uzrokuje značajno smanjenje sadržaja kempferola u odnosu na kontrolnu skupinu tretiranu puferom. Kod mutante *tt7* razlika u sadržaju kempferola između CMVsat-inficiranih i kontrolnih biljaka nije statistički značajna ($p < 0.05$), no vidljiva je tendencija nižeg sadržaja kempferola u CMVsat-inficiranim biljkama (Slika 4.). Dobiveni rezultati upućuju na uključenost kempferola u neke od obrambenih mehanizama vrste *Arabidopsis thaliana*.

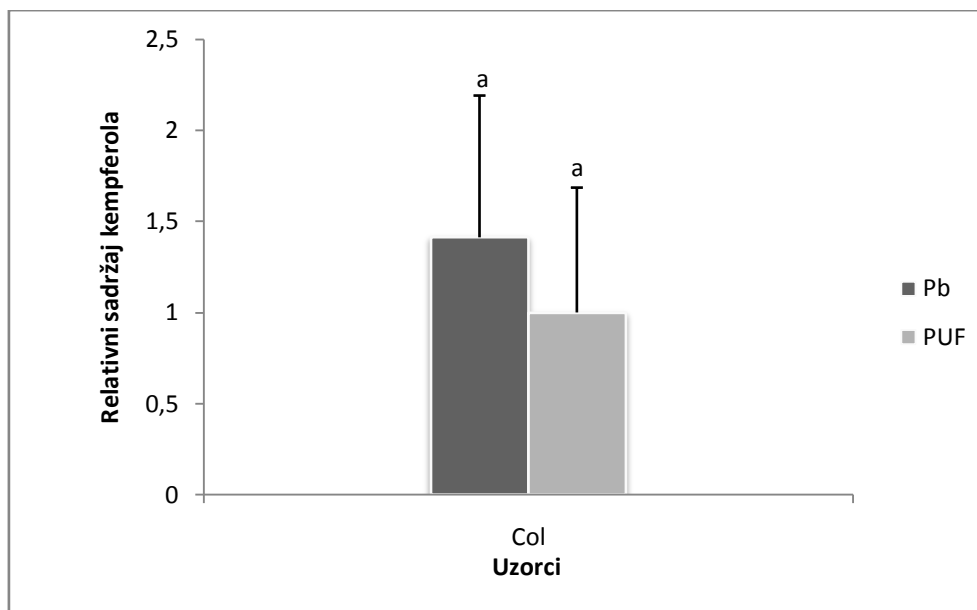


Slika 4. Učinak infekcije CMVsat-om na sadržaj kempferola u listovima vrste *Arabidopsis thaliana*. Mjerenja su provedena dva tjedna nakon infekcije. Vrijednosti su izražene u odnosu na vrijednosti kempferola u kontrolnim biljkama (vrijednost kempferola u kontrolnim biljkama postavljena je na $1.0 \pm SE$). Srednje vrijednosti unutar određenog tkiva s pridruženim istim slovom ne razlikuju se značajno ($n=3$; $p<0.05$). CMVsat – virus mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA, Ler – divlji tip Landsberg *erecta*, PUF – pufer, tt7 – mutanta biosintetskog puta flavonoida (objašnjenja korištenih mutanti nalaze se na stranici 8).

3.1.2. Učinak infekcije protistom *Plasmodiophora brassicae* na sadržaj kempferola u listovima vrste *Arabidopsis thaliana*

Učinak infekcije protistom *Plasmodiophora brassicae* na sadržaj kempferola istraživao je u listovima vrste *Arabidopsis thaliana*, ekotip Columbia (Col). Biljke su tretirane protistom, odnosno puferom kao negativnom kontrolom. Uzorci su sakupljeni tri tjedna nakon infekcije.

Rezultati dobiveni analizom listova sakupljenih tri tjedna nakon tretmana pokazali su tendenciju višeg sadržaja kempferola u biljaka tretiranih protistom u odnosu na biljke tretirane puferom (Slika 5.).

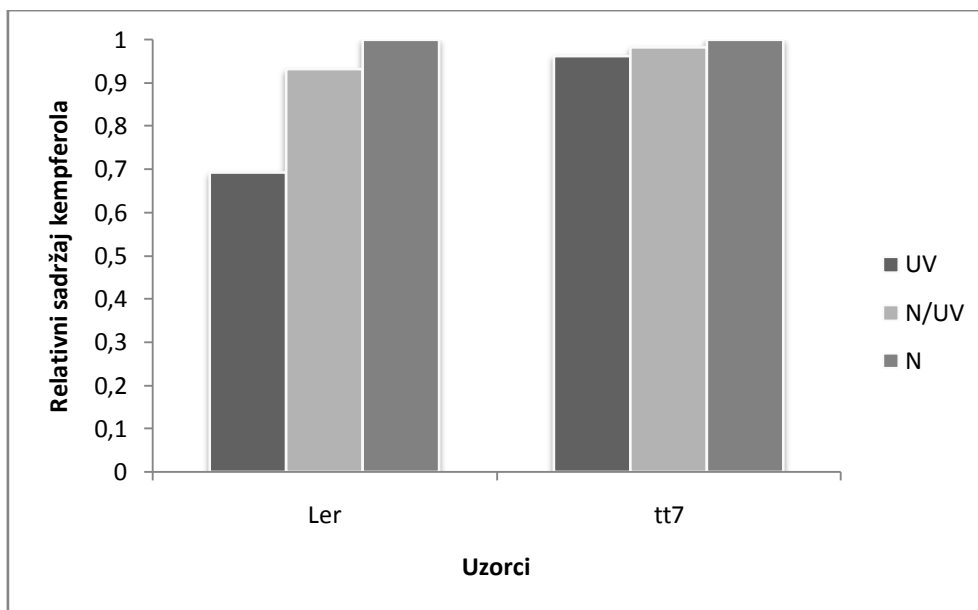


Slika 5. Učinak infekcije protistom *Plasmodiophora brassicae* na sadržaj kempferola u listovima vrste *Arabidopsis thaliana*. Mjerenja su provedena tri tjedna nakon infekcije. Vrijednosti su izražene u odnosu na vrijednosti kempferola u kontrolnim biljkama (vrijednost kempferola u kontrolnim biljkama postavljena je na $1.0 \pm SE$). Srednje vrijednosti unutar određenog tkiva s pridruženim istim slovom ne razlikuju se značajno ($n=3$; $p<0.05$). Col – Columbia divlji tip, Pb – *Plasmodiophora brassicae*, PUF – pufer.

3.1.3. Učinak UV-B zračenja na sadržaj kempferola u kalusima vrste *Arabidopsis thaliana*

S obzirom da za fotoprotektivnu ulogu kempferola u biljaka postoji dosta oprečnih rezultata (Li i sur., 1993a; Lois, 1994.; Ryan, 2001.), preliminarno je istražen učinak abiotičkog stresa, odnosno različitih uvjeta svjetlosnog zračenja u periodu od 30 dana na sadržaj kempferola u kalusima vrste *Arabidopsis thaliana*. Istraživani su divlji tip Landsberg *erecta* (Ler) te tri mutante (*tt4*, *tt5* i *tt7*).

Prema očekivanjima, mutante *tt4* i *tt5* neovisno o vrsti tretmana ne sadrže kempferol (podaci nisu prikazani). Kalusi divljeg tipa Ler uzgajani u uvjetima UV-B zračenja u periodu od 30 dana pokazuju niži sadržaj kempferola u odnosu na kaluse uzgajane u uvjetima bijelog svjetla u periodu od 30 dana, odnosno kaluse uzgajane u uvjetima bijelog svjetla tijekom prvih 15 te UV-B zračenja tijekom idućih 15 dana, dok kod mutante *tt7* sadržaj kempferola je gotovo isti neovisno o dijelu spektra kojim je mutanta tretirana (Slika 6.). Preliminarni rezultati ukazuju da UV-B zračenje uzrokuje smanjenje sadržaja kempferola u kalusima divljeg tipa Ler, ali ne i kod mutante *tt7*.



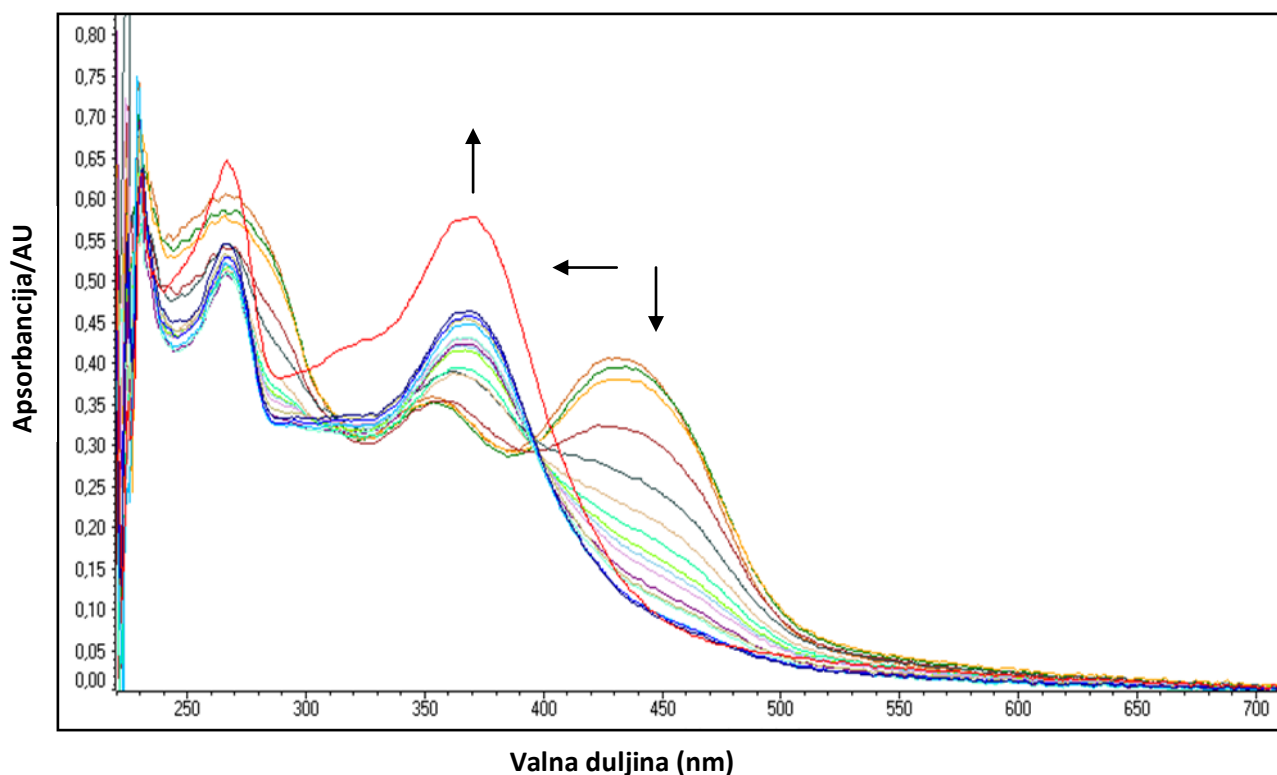
Slika 6. Učinak UV-B zračenja na sadržaj kempferola u kalusima vrste *Arabidopsis thaliana*. Kalusi su bili podvrgnuti različitim uvjetima zračenja u periodu od 30 dana (UV – izloženost UV-B zračenju, N/UV – izloženost bijelom svjetlu tijekom prvih 15 dana te UV-B tijekom idućih 15 dana, N – izloženost bijelom svjetlu). Vrijednosti su izražene u odnosu na vrijednosti kempferola u kontrolnim biljkama (vrijednost kempferola u kontrolnim biljkama postavljena je na 1.0). *Ler* – divlji tip Landsberg *erecta*, *tt7*– mutanta biosintetskog puta flavonoida (objašnjenje korištene mutante nalazi se na stranici 8).

3.2. Dio istraživanja proveden u uvjetima in vitro

3.2.1. Interakcija kompleksa flavonoid/metal s dsRNA i ssRNA izoliranih iz biljaka inficiranih virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA

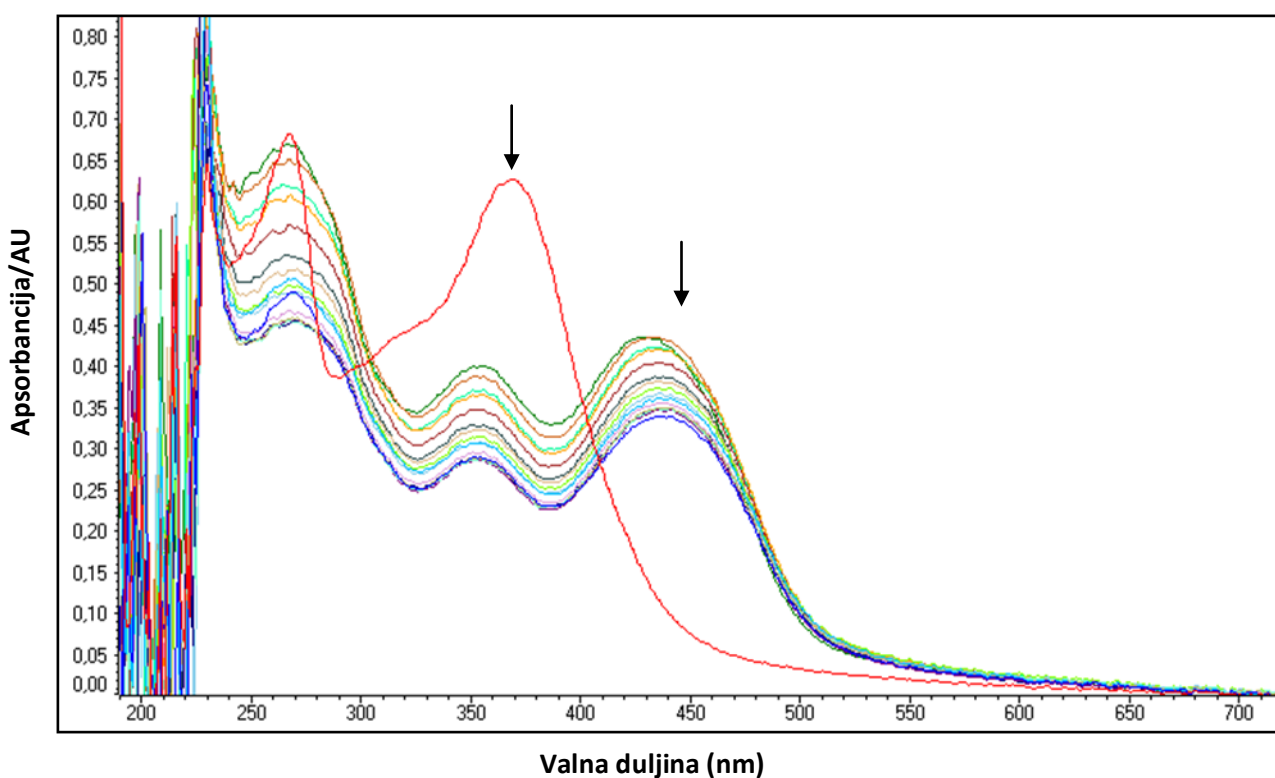
3.2.1.1. Kompleks kempferol/ Eu^{3+}

Uzastopno dodavanje malih volumena dsRNA izoliranih iz biljaka inficiranih CMVsat-om u vodenu otopinu kompleksa kempferol/ Eu^{3+} rezultiralo je značajnim promjenama UV/Vis spektra kompleksa (Slika 7.). Dodavanjem dsRNA smanjuje se intenzitet apsorbcije kompleksa ($\lambda=446$ nm) te istovremeno dolazi do porasta apsorbcije pri valnoj duljini koja odgovara slobodnom kempferolu ($\lambda=370$ nm). Rezultat upućuje na zaključak da se kompleks kempferol/ Eu^{3+} u interakciji s dsRNA razgrađuje na slobodni kempferol.



Slika 7. Promjene UV/Vis spektra kompleksa kempferol/ Eu^{3+} ($c(\text{kempferol}) = 1 \times 10^{-5}$ mol/dm³, $c(\text{Eu}^{3+}) = 5 \times 10^{-5}$ mol/dm³) u hepes puferu (pH 7.0, $c = 0.1$ mol/dm³) uslijed titracije s dsRNA ($c = 1.55 \times 10^{-3}$ ng/mL – 1.82 ng/mL) izoliranih iz CMVsat-inficiranih biljaka. Strelice označavaju smjer promjene apsorbcije (↓ - pad, ↑ - rast) kompleksa uslijed titracije s dsRNA. CMVsat – virus mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA, Eu^{3+} – europij, ds – dvolančane.

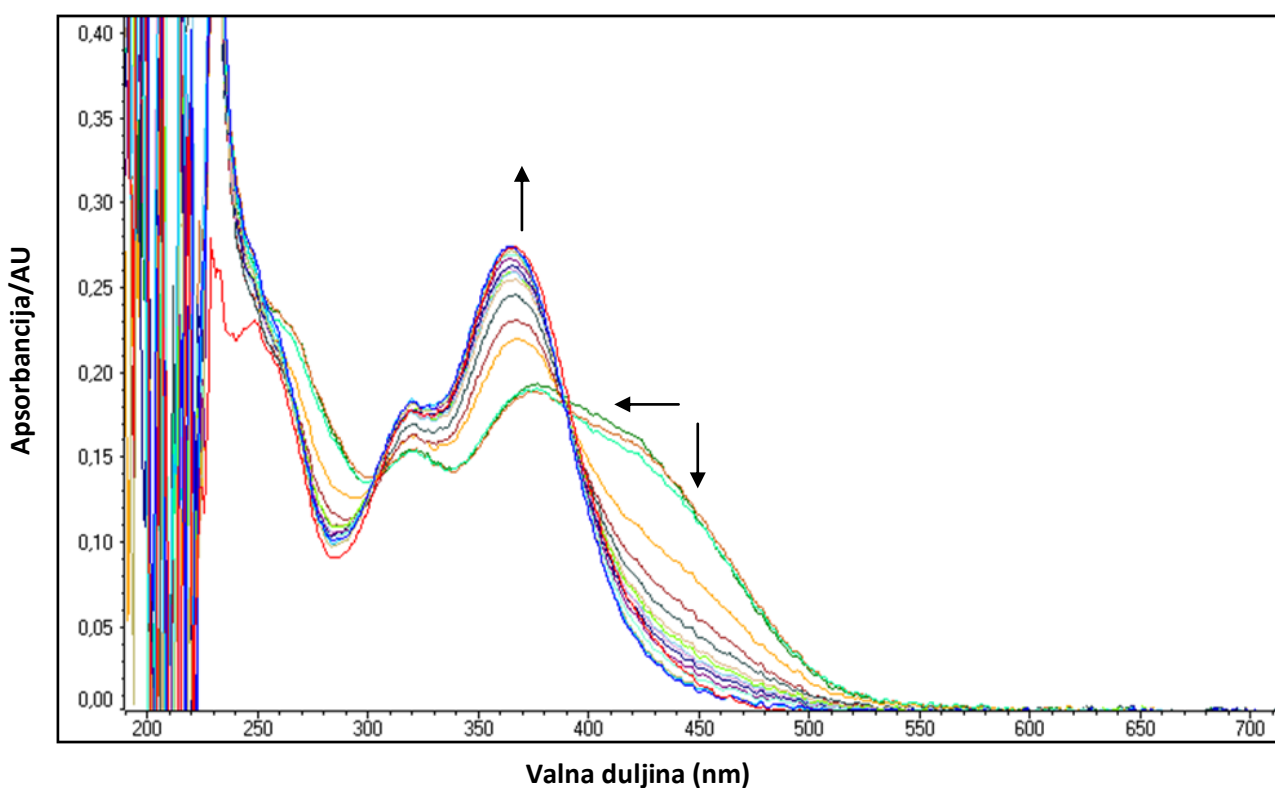
S obzirom da je uzastopno dodavanje malih volumena *ds*RNA izoliranih iz biljaka inficiranih CMVsat-om u vodenu otopinu kompleksa kempferol/ Eu^{3+} rezultiralo razgrađivanjem istog (Slika 3.), testiran je učinak *ss*RNA izoliranih iz CMVsat-inficiranih biljaka. Sukcesivnim dodavanjem malih volumena *ss*RNA u vodenu otopinu kompleksa kempferol/ Eu^{3+} primijećeno je kontinuirano smanjivanje intenziteta apsorbancije pri valnoj duljini koja odgovara kompleksu ($\lambda=446$ nm), kao i slobodnom kempferolu ($\lambda=370$ nm) (Slika 8.). Dobiveni rezultat upućuje na zaključak da u interakciji sa *ss*RNA dolazi do smanjivanja intenziteta apsorbancije kompleksa, ali se pritom kompleks ne razgrađuje na slobodni kempferol.



Slika 8. Promjene UV/Vis spektra kompleksa kempferol/ Eu^{3+} ($c(\text{kempferol}) = 1 \times 10^{-5}$ mol/dm³, $c(\text{Eu}^{3+}) = 5 \times 10^{-5}$ mol/dm³) u hepes puferu (pH 7.0, $c = 0.1$ mol/dm³) uslijed titracije sa *ss*RNA ($c = 1.55 \times 10^{-3}$ ng/mL – 1.82 ng/mL) izoliranih iz CMVsat-inficiranih biljaka. Strelice označavaju smjer promjene apsorbancije (↓ - pad, ↑ - rast) kompleksa uslijed titracije sa *ss*RNA. CMVsat – virus mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA, Eu^{3+} – europij, *ss* – jednolančane.

3.2.1.2. Kompleks fisetin/ Eu^{3+}

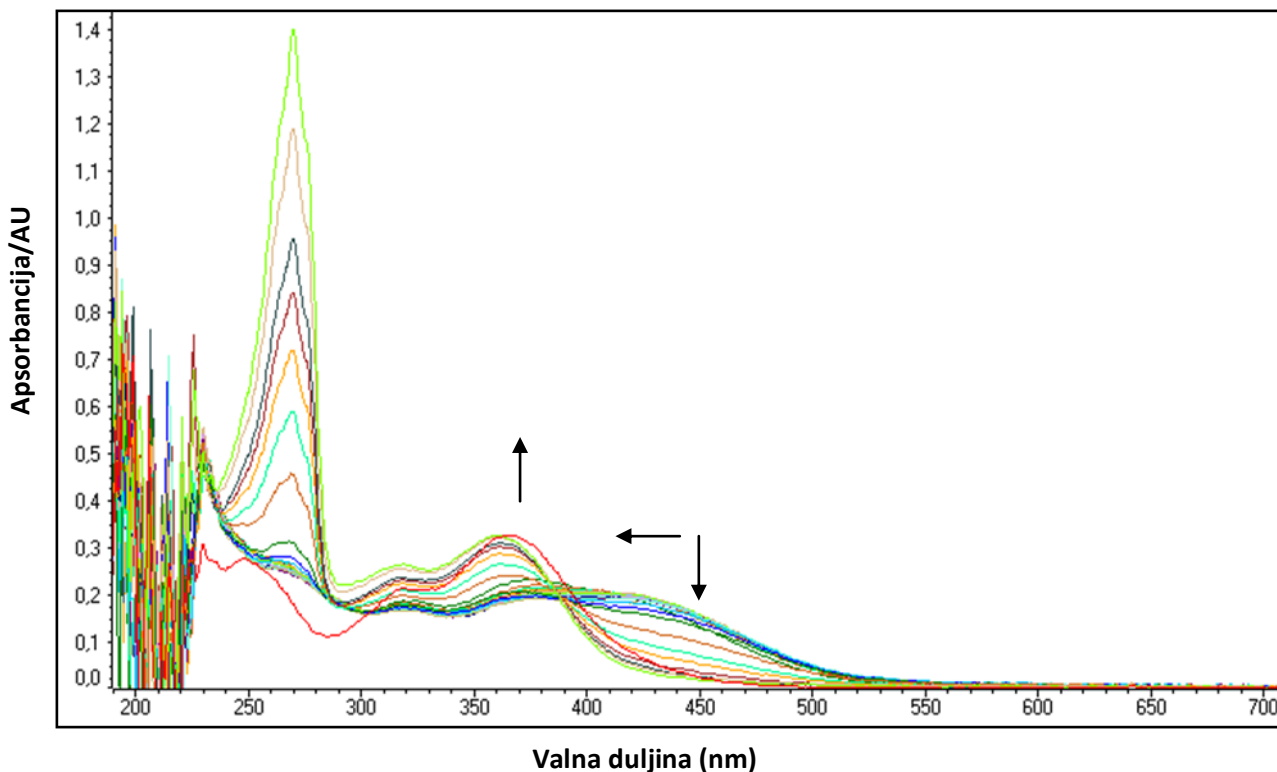
Uzastopno dodavanje malih volumena dvolančanih (*ds*) RNA izoliranih iz biljaka inficiranih virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA (CMVsat) u vodenu otopinu kompleksa fisetin/ Eu^{3+} rezultiralo je značajnim promjenama UV/Vis spektra kompleksa (Slika 9.). Dodavanjem *ds*RNA smanjuje se intenzitet apsorbcije kompleksa ($\lambda=446$ nm) te istovremeno dolazi do porasta apsorbcije pri valnoj duljini koja odgovara slobodnom fisetinu ($\lambda=370$ nm). Vrijednost apsorbcije porasla je sve do početne razine apsorbcije slobodnog fisetina. Rezultat upućuje na zaključak da se dodavanjem *ds*RNA kompleks fisetin/ Eu^{3+} postepeno razgrađuje na slobodan fisetin.



Slika 9. Promjene UV/Vis spektra kompleksa fisetin/ Eu^{3+} ($c(\text{fisetin}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $c(\text{Eu}^{3+}) = 5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$) u hepes puferu (pH 7.0, $c = 0.1 \text{ mol/dm}^3$) uslijed titracije s *ds*RNA ($c = 1.55 \times 10^{-3} \text{ ng/mL} - 1.82 \text{ ng/mL}$) izoliranih iz CMVsat-inficiranih biljaka. Strelice označavaju smjer promjene apsorbcije (\downarrow - pad, \uparrow - rast) kompleksa uslijed titracije s *ds*RNA. CMVsat – virus mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA, Eu^{3+} – europij, *ds* – dvolančane.

S obzirom da je uzastopno dodavanje malih volumena *ds*RNA izoliranih iz biljaka inficiranih CMVsat-om u vodenu otopinu kompleksa fisetin/ Eu^{3+} rezultiralo razgradnjom

kompleksa (Slika 1.), testiran je učinak jednolančanih (*ss*) RNA izoliranih iz CMVsat-inficiranih biljaka. Uzastopnim dodavanjem malih volumena *ss*RNA u vodenu otopinu kompleksa fisetin/ Eu^{3+} došlo je do značajnih promjena UV/Vis spektra kompleksa (Slika 10.). Dodavanje *ss*RNA uzrokovalo je pad apsorbancije kompleksa ($\lambda=446$ nm) te istovremeno porast apsorbancije slobodnog fisetina ($\lambda=370$ nm). Vrijednost apsorbancije fisetina rasla je do početne vrijednosti apsorbancije slobodnog fisetina. Rezultat upućuje na zaključak da *ss*RNA, kao i *ds*RNA, sudjeluju u razgradnji kompleksa fisetin/ Eu^{3+} .



Slika 10. Promjene UV/Vis spektra kompleksa fisetin/ Eu^{3+} ($c(\text{fisetin}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $c(\text{Eu}^{3+}) = 5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$) u hepes puferu (pH 7.0, $c = 0.1 \text{ mol/dm}^3$) uslijed titracije sa *ss*RNA ($c = 1.55 \times 10^{-3} \text{ ng/mL} - 1.82 \text{ ng/mL}$) izoliranih iz CMVsat-inficiranih biljaka. Strelice označavaju smjer promjene apsorbancije (\downarrow - pad, \uparrow - rast) kompleksa uslijed titracije sa *ss*RNA. CMVsat – virus mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA, Eu^{3+} – europij, *ss* – jednolančane.

4. RASPRAVA

Jedan od ciljeva ovog rada bio je istražiti učinak infekcije virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA (CMVsat) na sadržaj flavonoida kempferola kod vrste *Arabidopsis thaliana*. S obzirom da o ulozi kvercetina u obrambenom odgovoru biljaka postoji dosta podataka (Alía i sur., 2006.; Báidez i sur., 2006.; Jullian i sur., 2007.; Li i Xu, 2008.), u sklopu ovog diplomskog rada proučavano je sudjelovanje kempferola u biotičkom i abiotičkom stresu vrste *A. thaliana*. Posljednjih godina kempferol zbog mogućih antiviralnih svojstava privlači pažnju znanstvenika diljem svijeta, međutim većina tih istraživanja temelji se na proučavanju humanih virusa (Amoros i sur., 1992.; Mitrocotsa i sur., 2000.; Min i sur., 2001.; Tsai i sur., 2011.). Mogući mehanizam antiviralnog djelovanja kempferola su 2012. objavili Zhang i sur. istražujući djelovanje flavonoida kempferola i daidzina na virus japanskog encefalitisa. Konkretno, proučavali su ulogu spomenutih flavonoida u inhibiciji replikacije virusa encefalitisa i ekspresiji proteina E, proteina za koji se smatra da omogućava pričvršćivanje virusnih čestica na stanice domaćina (Modis i sur., 2004.), u kulturi stanica BHK-21 (engl. *Baby Hamster Kidney Cells*). Rezultati su otkrili obećavajuću ulogu kempferola u borbi protiv virusa encefalitisa u odnosu na daidzin zbog visokog afiniteta vezanja kempferola na RNA molekule.

Rezultati dobiveni u sklopu ovog diplomskog rada ukazuju da CMVsat uzrokuje smanjivanje sadržaja flavonoida kempferola kod biljaka vrste *A. thaliana*. Kod divljeg tipa Landsberg *erecta* (*Ler*) inficiranog ovim virusom sadržaj kempferola bio je smanjen za 47%, a kod mutante *tt7* (koja prirodno akumulira veću količinu kempferola) za 38% u odnosu na kontrolne biljke (biljke tretirane puferom). Rezultati su u skladu s istraživanjem Šole iz 2013., a koji su pokazali 3.24 puta niži sadržaj kempferola kod divljeg tipa *Ler* te 2.38 puta niži sadržaj kod mutante *tt7* inficiranim CMVsat-om u usporedbi s kontrolnim biljkama. Uočeno je da unatoč tome što nemaju mogućnost akumulacije flavonoida, a time niti kempferola, inficirana mutanta *tt4* sposobna je nastaviti rast i razvoj (slike nisu prikazane). Međutim, u odnosu na *tt7* i *Ler*, kod mutante *tt4* uočena je veća stopa odumiranja tkiva nakon infekcije virusom, smanjena stopa rasta te kržljivost biljaka. To upućuje na zaključak da, iako vjerojatno ima ulogu u obrani biljaka, kempferol nije jedina i ključna komponenta obrane biljaka od infekcije CMVsat-om.

Odgovor biljaka na napad patogena složeni je mehanizam koji uključuje različite biokemijske puteve (Dixon i sur., 1990.). Opće je poznata činjenica da je napad patogena okidač različitih obrambenih mehanizama biljaka, uključujući između ostalog i sintezu različitih antimikrobnih i antifungicidnih spojeva poput glukozinolata (Ludwig-Müller i sur.,

1997.) te fenolnih tvari (Tan i sur., 2004.). Patogen koji uzrokuje velike probleme porodici krstašica (lat. *Brassicaceae*) jest protist *Plasmodiophora brassicae* (Braselton, 1995.). Infekcija biljke spomenutim protistom uzrokuje stvaranje velikih tumora na korijenu biljke domaćina čime je biljci poremećen sustav primanja vode i mineralnih tvari. Posljedično to dovodi do smanjene stope rasta i razvoja, a u nekim slučajevima i do ugibanja biljke (Friberg i sur., 2005.). Malo je informacija o mehanizmu otpornosti biljaka spram patogena *P. brassicae*. Prvi zaključci temeljili su se na morfološkim, anatomskim i biokemijskim karakteristikama biljaka (Karling, 1968.), međutim niti jedna od tih teorija nije pružila jedinstveni mehanizam otpornosti biljke na spomenutog patogena. Butcher i sur. (1974.) dokazali su da je osjetljivost biljaka vrste *Brassica campestris* na ovaj patogen povezana s prisutstvom glukozinolata glukobrazicina koji je djelovao kao prekursor auksina. No ta teorija nije dokazana i na drugim biljkama domaćinima (Ockendon i Buczacki, 1979.; Mullin i sur., 1980.). Cilj istraživanja u sklopu ovog diplomskog rada bio je otkriti učinak infekcije protistom *P. brassicae* na sadržaj flavonoida kempferola kod vrste *A. thaliana*. Analizom listova biljaka sakupljenih tri tjedna nakon infekcije utvrđen je viši sadržaj kempferola kod biljaka inficiranih protistom u odnosu na kontrolne biljke. Ovaj rezultat u skladu je s istraživanjem Päsold i sur. (2010.), navedeni autori su zabilježili povećani sadržaj kempferola i njegovih glikozida u korijenima inficiranim protistom *P. brassicae* u odnosu na zdrave korijene vrste *A. thaliana*. Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da, iako *P. brassicae* obitava u korijenu biljke domaćina, ovaj patogen utječe na sadržaj flavonoida kempferola i u nadzemnim dijelovima biljke (listovima).

S obzirom da su rezultati u sklopu ovog diplomskog rada pokazali da u vrsti *A. thaliana* infekcija CMVsat-om uzrokuje smanjenje sadržaja kempferola u odnosu na kontrolne biljke, a infekcija protistom *P. brassicae* povećanje sadržaja kempferola u odnosu na kontrolne biljke, zaključak je da je uloga kempferola u obrambenom odgovoru biljaka specifična s obzirom na vrstu patogena kojim je biljka inficirana.

Osim uloge kempferola tijekom biotičkog stresa biljke, u sklopu ovog diplomskog rada preliminarno je istražena i njegova uloga tijekom abiotičkog stresa, odnosno učinak UV-B zračenja na sadržaj kempferola u kalusima vrste *A. thaliana*. Kulture kalusa su koristan alat u istraživanjima mehanizama tolerantnosti biljaka na različite stresne čimbenike poput UV-B zračenja jer imaju kratko generacijsko vrijeme, pružaju relativno brz odgovor biljke na stresni podražaj te se mogu uzgajati u kontroliranim uvjetima (Zhao i sur., 2009.). Dugo vremena se smatralo kako akumulacija flavonoida te ostalih fenilpropanoida u slojevima epiderme i

hipoderme listova i stabljike (dijelova najizloženijih zračenju) ima važnu ulogu u obrani biljke od UV-B zračenja (Dixon i Paiva, 1995.). Istraživanja Li i sur. (1993a) te Lois (1994.) na listovima vrste *A. thaliana* potvrdila su da se prilikom izloženosti biljke UV-B zračenju inducira povećana sinteza flavonoida i to uglavnom derivata kempferola. S druge strane, Ryan i sur. 2001. su, također na vrsti *A. thaliana*, pratili omjer kvercetina i kempferola kod biljaka izloženih UV-B zračenju u odnosu na netretirane biljke. Utvrdili su da se kod biljaka izloženih UV-B zračenju povećava sadržaj kvercetina, a smanjuje sadržaj kempferola.

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju pokazali su da je u kalusu divljeg tipa (*Ler*) izloženih tijekom 15 i 30 dana UV-B zračenju prisutan niži sadržaj kempferola u odnosu na kontrolne biljke. Jedan od razloga neslaganja s rezultatima prethodnih istraživanja (Li i sur., 1993a; Lois, 1994.) može biti duljina trajanja eksperimenta, odnosno perioda izloženosti biljaka zračenju. U spomenutim istraživanjima biljke su zračenju bile izložene tijekom 2 do 7 dana, u odnosu na 15 do 30 dana u ovom radu. Nekoliko je autora (Gould i sur., 2002.; Rozema i sur., 2002.; Tattini i sur., 2004.) predložilo da flavonoidi imaju ulogu antioksidansa prilikom djelovanja svjetlosnog stresa ponašajući se kao hvatači ROS-a, koje mogu dovesti do oštećivanja biološki važnih molekula poput nukleinskih kiselina, proteina i membranskih lipida (Polle, 1997.). Stoga je moguće da su biljke bile predugo izložene stresu što je naposljetku dovelo do iscrpljenosti antioksidativnog sustava i pada stope sinteze antioksidansa, time i proučavanog kempferola. Neki autori (Ryan i sur., 1998.; Ryan i sur., 2002.) smatraju da je za fotoprotekciju biljaka osim kempferola, važan i kvercetin. Međutim, u obzir valja uzeti i druge spojeve, a dokaz tomu su mutante *tt4* i *tt5* koje zbog mutacija alela u genima koji kodiraju sintezu kalkan sintaze (CHS), odnosno kalkan izomeraze (CHI) ne akumuliraju kempferol niti kvercetin (Saslowky i sur., 2000.), a rasle su u uvjetima UV-B zračenja (slike nisu prikazane). Li i sur. (1993b) kao moguće spojeve koji također djeluju obrambeno u uvjetima UV-B stresa navode sinapat estere, derivate hidroksicimetne kiseline. Njihovi rezultati pokazali su da je sadržaj sinapat estera u mutanti *tt4* viši i do 60% u odnosu na divlji tip, a u mutanti *tt5* u prosjeku je viši do 42%. To je razlog zašto obje mutante rastu u uvjetima UV-B zračenja, iako su u odnosu na divlji tip osjetljivije. Uzimajući u obzir sve navedeno, rezultati upućuju na zaključak da kempferol, kao i druge fenolne molekule poput derivata hidroksicimetne kiseline, sudjeluju u obrambenom odgovoru biljke spram UV-B zračenja.

Tijekom posljednjeg desetljeća istraživanje flavonoida doživljava procvat zahvaljujući otkrivanju brojnih pozitivnih farmakoloških učinaka tih sekundarnih metabolita poput

antiviralnog (Kreft i sur., 1999.; Chiang i sur., 2003.), antimikrobnog (Hernández i sur., 2000.; Cushnie i Lamb, 2005.) te antioksidativnog djelovanja (Williams i sur., 2004.; Ferreira i sur., 2010.). Zahvaljujući svojoj strukturi, odnosno prisutnosti hidroksilnih i karboksilnih grupa, flavonoidi mogu stvarati komplekse s metalnim ionima (Leopoldini i sur., 2006.). Mogućnost interakcije s metalnim ionima te stvaranje kompleksa flavonoid/metal ima velik biološki značaj jer su istraživanja pokazala da kompleksi posjeduju veću sposobnost uklanjanja reaktivnih vrsta kisika (ROS), koje mogu dovesti do oštećivanja biološki važnih molekula poput proteina ili nukleinskih kiselina, u odnosu na flavonoide same (Afanasév i sur., 2001.; Kostyuk i sur., 2001.). Baldini i sur. su 2003. dokazali kako interakcija flavonoida kvercetina s ionima Cu^{2+} poboljšava farmakološka svojstva kvercetina, ali istovremeno smanjuje i toksični učinak iona Cu^{2+} . Jednom kada se kompleks nađe unutar stanice, dolazi u doticaj s različitim biološki važnim molekulama poput molekula RNA koje imaju važnu ulogu u biokemijskim procesima stanice, poput sinteze proteina i obrambenog odgovora na patogene (Piantanida i sur., 2009.). Dokazano je da je stabilnost interakcije kompleksa kvercetina i rijetkog zemljinog metala lantana s dvolančanim (*ds*) RNA značajno veća u odnosu na stabilnost interakcije slobodnog kvercetina i *ds*RNA (Marinić i sur., 2006.). Rusak i sur. (2009.) dokazali su da kompleks kvercetina i lantana ima veći afinitet vezanja za viralnu *ds*RNA u odnosu na kvercetin ili lantan zasebno. S obzirom da su viralne *ds*RNA replikatni oblici, rezultati upućuju na zaključak da bi vezivanje metala na flavonoid moglo poboljšati antiviralna svojstva slobodnog flavonoida. Stoga je jedan od ciljeva ovog rada bio istražiti interakciju kompleksa flavonoida kempferola, te strukturno mu srodnog fisetina, i metala Eu^{3+} s biološkim dvolančanim (*ds*) i jednolančanim (*ss*) RNA. I *ds*RNA i *ss*RNA korištene tijekom istraživanja izolirane su iz biljaka inficiranih virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA (CMVsat). S obzirom da biljke koje nisu inficirane RNA virusima ne sadrže značajne količine homogenih sekvenci većih molarnih masa ($> 0.1 \times 10^6$) *ds*RNA (Dodds i sur., 1984.), izolirane *ds*RNA mogu se pripisati replikativnim oblicima RNA CMVsat-a.

Rezultati u sklopu ovog diplomskog rada su pokazali da je interakcija kompleksa i *ds*RNA uzrokovala postepeno slabljenje intenziteta apsorpcije koji odgovara kompleksu flavonoid/ Eu^{3+} te istovremeno porast apsorpcije koja odgovara slobodnom flavonoidu. Na temelju ovih rezultata zaključeno je da *ds*RNA izolirane iz CMVsat-inficiranih biljaka uzrokuju razgradnju kompleksa kempferol/ Eu^{3+} i fisetin/ Eu^{3+} na slobodan flavonoid. Zanimljivo, *ss*RNA izolirane iz istih biljaka razgrađuju fisetin/ Eu^{3+} , no ne i kempferol/ Eu^{3+} . Dobiveni rezultati uspoređeni su s onima Šole (2013.) koja je dokazala da se interakcija

kompleksa kvercetin/ Eu^{3+} s *dsRNA* i *ssRNA* razlikuje. Zaključeno je da kompleksi kvercetin/ Eu^{3+} , kempferol/ Eu^{3+} i fisetin/ Eu^{3+} međusobno slično reagiraju s *dsRNA*, no različito sa *ssRNA*. Naime, sva tri kompleksa u interakciji s *dsRNA* se razgrađuju na slobodan flavonoid. Najvjerojatniji uzrok ovome jest interkalacija kompleksa u strukturu *dsRNA* prilikom čega, zbog veličine kompleksa, dolazi do razgradnje istoga. S druge strane, ova tri kompleksa se s obzirom na interakciju sa *ssRNA* znatno razlikuju. Naime, postepenim dodavanjem *ssRNA* intenzitet apsorbancije koja odgovara kompleksima kempferol/ Eu^{3+} i kvercetin/ Eu^{3+} slabi. Zamijećeno je da je promjena intenziteta apsorbancije slobodnog kempferola i kvercetina uslijed titracije njihovih kompleksa sa *ssRNA* različita. Intenzitet apsorbancije slobodnog kempferola dodavanjem *ssRNA* kontinuirano se smanjuje, dok intenzitet apsorbancije slobodnog kvercetina ostaje gotovo nepromijenjen. Najvjerojatniji razlog ovakve razlike je u strukturi ovih flavonoida. Kvercetin, naime, sadrži jednu hidroksilnu grupu više na prstenu B u odnosu na kempferol (García-Mediavilla i sur., 2007.). S obzirom da se kompleks kempferol/ Eu^{3+} u interakciji s *dsRNA* razgrađuje, a sa *ssRNA* ne, isti bi mogao biti korišten za dokazivanje prisutnosti *dsRNA* u nekom sustavu. Kompleks fisetin/ Eu^{3+} , za razliku od kompleksa kempferol/ Eu^{3+} i kvercetin/ Eu^{3+} , se dodavanjem *ssRNA* postupno razgrađuje na slobodni fisetin. S obzirom da u strukturi fisetina na položaju C5 u A prstenu nedostaje –OH skupina, a kempferol i kvercetin je posjeduju, pretpostavka je da –OH skupina na ovom C atomu ima važnu ulogu u interakciji ovih triju kompleksa sa *ssRNA*. Važnost strukture flavonoida za njihove biološke učinke već je istraživana. Katalinić i sur. (2010.) su pokazali kako inhibitorno djelovanje flavonoida spram humanih enzima butirilkolinesteraza ovisi o strukturi flavonoida. Ciolino i sur. (1999.) su istraživali kempferol i kvercetin kao prirodno dostupne ligande koji bi mogli vezati i time inaktivirati AhR (engl. *aryl hydrocarbon receptor*), stanični receptor za koji se smatra da induciranjem transkripcije proteina CYP1A uzrokuje karcinogenezu. Rezultati su pokazali da su oba flavonoida ligandi AhR-a, međutim upravo zbog nedostatka hidroksilne grupe na prstenu B kempferol ne sjeda optimalno na vezno mjesto spomenutog receptora zbog čega ne utječe direktno na transkripciju CYP1A kao kvercetin, već posredno preko drugog liganda AhR-a.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- ∞ Flavonoid kempferol ima ulogu u obrani biljaka tijekom infekcije virusom mozaika krastavca s pridruženom satelitnom RNA (CMVsat), no nije jedina i ključna komponenta obrane biljaka od ovog patogena. Na to upućuje mutanta *tt4* vrste *Arabidopsis thaliana* koja, iako nema mogućnost akumulacije flavonoida, je sposobna nastaviti svoj rast i razvoj unatoč infekciji virusom. No, u toj mutanti uočena je veća stopa odumiranja tkiva nakon infekcije virusom, smanjena stopa rasta te kržljivost biljaka u odnosu na biljke koje mogu akumulirati kempferol (*Ler* i *tt7*).
- ∞ Uloga kempferola u obrambenom sustavu biljaka tijekom djelovanja biotičkog stresa specifična je s obzirom na patogen. Konkretno, CMVsat uzrokuje smanjenje sadržaja kempferola u inficiranim biljkama, a protist *Plasmodiophora brassicae* povećanje.
- ∞ Preliminarni rezultati pokazuju da kempferol sudjeluje u obrambenom odgovoru kalusa vrste *A. thaliana* spram UV-B zračenja. U kalusima divljeg tipa *Ler* UV-B zračenje uzrokuje smanjenje sadržaja kempferola, dok se sadržaj kempferola u kalusima mutante *tt7* (koja akumulira veću količinu kempferola u odnosu na divlji tip *Ler*) ne mijenja značajno s obzirom na dio spektra kojim je mutanta tretirana.
- ∞ Kompleks kempferola i rijetkog zemljinog metala Eu^{3+} razgrađuje se tijekom interakcije s *dsRNA* izoliranim iz CMVsat-inficiranih biljaka, ali ne i tijekom interakcije sa *ssRNA* izoliranim iz CMVsat-inficiranih biljaka što upućuje na zaključak da bi se ovaj spoj mogao koristiti za dokazivanje prisutnosti *dsRNA* u biljnim tkivima.

6. LITERATURA

- Afanasév I. B., Ostrakhovitchm E. A., Mikhal Chik E. V., Ibraginova G. A., Korkina L. G. (2001): Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochemical Pharmacology*, **61**: 677-684.
- Agati G., Azzarello E., Pollastri S., Tattini M. (2012): Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, **196**: 67-76.
- Alía M., Mateos R., Ramos S., Lecumberii E., Bravo L., Goya L. (2006): Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *European Journal of Nutrition*, **45**: 19-28.
- Alonso-Blanco C., Koornneef M. (2000): Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an underexploited resource for plant genetics. *Trends in Plant Science*, **5**: 22-29.
- Alonso-Prados J. L., Aranda M. A., Malpica J. M., Garcíá-Arenal F., Fraile A. (1998): Satellite RNA of cucumber mosaic cucumovirus spreads epidemically in natural populations of its helper virus. *Phytopathology*, **88**: 520-524.
- Amoros M., Simos C. M. O., Sauvager F., Cormier M. (1992): Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products*, **55**: 1732-1740.
- Andary C., Mondolot-Cosson L., Dai G. H. (1996): In situ detection of polyphenols in plant microorganism interactions. *Developments in Plant Pathology*, **7**: 43-53.
- Báidez A. G., Gómez P., Del Río J. A., Ortuno A. (2006): Antifungal capacity of major phenolic compounds of *Olea europaea* L. against *Phytophthora megasperma* Drechsler and *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **69**: 224-229.
- Bais H. P., Vepachedu R., Gilroy S., Callaway R. M., Vivanco J. M. (2003): Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interaction. *Science*, **301**: 1377-1380.
- Baldini M., Ferrari M. B., Bisceglie F., Pelosi G., Pinelli S., Tarasconi P. (2003): Cu(II) complexes with heterocyclic substituted thiosemicarbazones: the case of 5-formyluracil. Synthesis, characterization, X-ray structures, DNA interaction studies, and biological activity. *Inorganic Chemistry*, **42**: 2049-2055.
- Barry K. M., Davies N. W., Mohammed C. L. (2002): Effect of season and different fungi on phenolics in response to xylem wounding and inoculation in *Eucalyptus nitens*. *The Journal of Pathology*, **32**: 163-178.
- Bass D., Cavalier-Smith T. (2009): *Cercozoa*. Version 22 March 2009 (under construction). <http://tolweb.org/Cercozoa/121187/2009.03.22> in The Tree of Live Web Project, <http://tolweb.org>.
- Bourgau F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. (2001): Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, **161**: 839-851.
- Braselton J. P. (1995): Current status of the Plasmodiophorids. *Critical Reviews in Microbiology*, **21**: 263-275.
- Brigneti G., Voinnet O., Li W.-X., Ji L.-H., Ding S.-W., Baulcombe D. C. (1998): Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *The EMBO Journal*, **17**: 6739-6746.

- Buer S. C., Imin N., Djordjevic A. N. (2010): Flavonoids: new roles for old molecules. *Journal of Integrative Plant Biology*, **52**: 98-111.
- Butcher D. N., El-Tigani S., Ingram D. S. (1974): The role of indole glucosinolates in the club root disease of the Cruciferae. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **4**: 127-141.
- Cavalier-Smith T. (1998): A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews*, **73**: 203.
- Chalker-Scott L., Krahmer R. L. (1989): Microscopic studies of tannin formation and distribution in plant tissue. U: Hemingway R. W., Karchesy J. J. Chemistry and significance of condensed tannins. Plenum Press, New York, str. 345-368.
- Chapple C. C. S., Shirley B. W., Zook M., Hammerschmidt R., Somerville S. C. (1994): Secondary metabolism in Arabidopsis. U: Meyerowitz E. M., Somerville C. R. Arabidopsis, Cold Spring Harbor, NY, str. 989-1030.
- Chiang L. C., Chiang W., Liu M. C., Lin C. C. (2003): *In vitro* antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**: 194-198.
- Chory J., Ecker J. R., Briggs S., Caboche M., Coruzzi G. M., Cook D., Dangl J., Grant S., Guerinot M. L., Henikoff S., Martienssen R., Okada K., Raikhel N. V., Somerville C. R., Weigel D. (2000): National Science Foundation-Sponsored Workshop Report: "The 2010 Project" functional genomics and the virtual plant. A blueprint for understanding how plants are built and how to improve them. *Plant Physiology*, **123**: 423-426.
- Chou C.-H. (1999): Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Critical Reviews in Plant Science*, **18**: 609-636.
- Christie P. J., Alfenito M. R., Walbot V. (1994): Impact of low temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*, **194**: 541-549.
- Ciolino P. H., Daschner J. P., Yeh C. G. (1999): Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochemical Journal*, **340**: 715-722.
- Cooper J. E. (2004): Dominant role of flavonoids among signal molecules involved in the formation of legume-rhizobia symbiosis. *Polyphenol Communications*, **2004**: 87.
- Croteau R., Kutchan M. T., Lewis G. N. (2000): Natural products (secondary metabolites). U: Buchanan B., Grissem W., Jones R. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, str. 1250 – 1317.
- Cushnie T. P. T., Lamb A. J. (2005): Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal Of Antimicrobial Agents*, **26**: 343-356.
- Dandliker P. J., Holmlin R. E., Barton J. K. (1997): Oxidative thymine dimer repair in the DNA helix. *Science*, **275**: 1465-1468.
- Davies M. K., Schwinn E. K. (2006): Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis. U: Andersen M. Ø., Markham R. K. Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications. CRC Press, Taylor & Francis Group, str. 143 – 218.
- Dekermendjian K., Kahnberg P., Witt M. R., Sterner O., Nielsen M., Liljefors T. (1999): Structure activity relationships and molecular modeling analysis of flavonoids binding

- to the benzodiazepine site of the rat brain GABA (A) receptor complex. *Journal of Medicinal Chemistry*, **42**: 4343-4350.
- Ding S. W., Anderson B. J., Haase H. R., Symons R. H. (1994): New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. *Virology*, **198**: 593-601.
- Dixon A. R., Paiva L. N. (1995): Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, **7**: 1085-1097.
- Dixon G. R. (2009): The occurrence and economic impact of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease. *Journal of Plant Growth Regulation*, **28**: 194-202.
- Dixon R. A., Harrison M. (1990): Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Advances in Genetics*, **28**: 165-234.
- Dodds J. A., Morris T. J., Jordan R. L. (1984): Plant viral double-stranded RNA. *Annual Review of Phytopathology*, **22**: 151-168.
- Donald C., Porter I. (2009): Integrated control of clubroot. *Journal of Plant Growth Regulation*, **28**: 289-303.
- Doolittle S. P. (1916): A new infectious mosaic disease of cucumber. *Phytopathology*, **6**: 145-147.
- Edwardson J. R., Christie R. G. (1991): Cucumoviruses. CRC Handbook of viruses infecting legumes. CRC Press, Boca Raton, Florida, str. 293-319.
- Eyles A., Davies N. W., Yuan Z. Q., Mohammed C. (2003): Host response to natural infection by *Cytonaema* sp. in the aerial bark of *Eucalyptus globulus*. *The Journal of Pathology*, **33**: 317-331.
- Feeny P. P. (1976): Plant apparancy and chemical defense. *Recent Advances in Phytochemistry*, **10**: 1-40.
- Ferreira J. F. S., Luthria D. L., Sasaki T., Heyerick A. (2010): Flavonoids from *Artemisia annua* as antioxidants and their potential synergism with Artemisinin against malaria and cancer. *Molecules*, **15**: 3135-3170.
- Friberg H., Lagerlöf J., Rämert B. (2005): Germination of *Plasmodiophora brassicae* resting spores stimulated by a non-host plant. *European Journal of Plant Pathology*, **113**: 275-281.
- Fuchs H., Sacristán M. D. (1996): Identification of a gene in *Arabidopsis thaliana* controlling resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) and characterization of the resistance response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **9**: 91-97.
- Gallet C., Després L., Tollenaere C. (2004): Phenolic response of *Trollius europaeus* to *Chiaetocheta* invasion. *Polyphenol Communications*, **2004**: 759-760.
- García-Mediavilla V., Crespo I., Collado S. P., Esteller A., Sánchez-Campos S., Tunón J. M., González-Gallego J. (2007): The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *European Journal of Pharmacology*, **557**: 221-229.
- Gould K. S., Lister C. (2006): Flavonoid functions in plants. U: Andersen M. Ø., Markham R. K. Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications. CRC Press, Taylor & Francis Group, str. 397-441.

- Gould K. S., McKelvie J., Markham K. R. (2002): Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. *Plant, Cell and Environment*, **25**: 1261-1269.
- Graham T. L. (1998): Flavonoid and flavonol glycoside metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **36**: 135-144.
- Harborne J. B. (1999): Classes and functions of secondary products. U: Walton N. J., Brown D. E., Chemicals from Plants, Perspectives on Secondary Plant Products. Imperial College Press, str. 1-25.
- Hayes R. J., Buck K. W. (1990): Complete replication of a eucaryotic virus RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell*, **63**: 363-368.
- Hernández E. N., Tereschuk M. L., Abdala L. R. (2000): Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucumán, Argentina). *Journal of Ethnopharmacology*, **73**: 317-322.
- Holton A. T., Cornish C. E. (1995): Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell*, **7**: 1071-1083.
- Hwang S. F., Ahmed H. U., Strelkov S. E., Gossen B. D., Turnbull G. D., Peng G., Howard R. J. (2011): Seedling age and inoculum density affect clubroot severity and seed yield in canola. *Canadian Journal of Plant Science*, **91**: 183-190.
- Inderjit, Gross E. (2000): Plant phenolics: potential role in aquatic and terrestrial ecosystems. U: Martens S., Treutter D., Forkmann G. Polyphenols, str. 206-234.
- Jagger I. C. (1916): Experiments with the cucumber mosaic disease. *Phytopathology*, **6**: 149-151.
- Johansen E., Edwards M. C., Hampton R. O. (1994): Seed transmission of viruses: current perspectives. *Annual Review of Phytopathology*, **32**: 363-386.
- Jullian C., Moyano L., Yanez C., Olea-Azar C. (2007): Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: an antioxidant study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **67**: 230-234.
- Kageyama K., Asano T. (2009): Life cycle of *Plasmodiophora brassicae*. *Journal of Plant Growth Regulation*, **28**: 203-211.
- Kangatharalingam N., Pierce M. L., Bayles M. B., Essenberg M. (2002): Epidermal anthocyanin production as an indicator of bacterial blight resistance in cotton. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **61**: 189-195.
- Kaper J. M., Tousignant M. E., Lot H. (1976): A low molecular weight replicating RNA associated with a divided genome plant virus: Defective or satellite RNA? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **72**: 1237-1243.
- Karling J. S. (1968): The Plasmodiophorales. Hafner Publishing Company, New York.
- Katalinić M., Rusak G., Domaćinović Barović J., Šinko G., Jelić D., Antolović R., Kovarik Z. (2010): Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **45**: 186-192.

- Kearney C. M., Gonsalves D., Provvidenti R. (1990): A severe strain of cucumber mosaic virus from China and its associated satellite RNA. *Plant Disease*, **74**: 819-823.
- Keek M. V., Lippard S. J. (1992): Unwinding of supercoiled DNA by platinum–ethidium and related complexes. *Journal of the American Chemical Society*, **114**: 3386–3390.
- Kobayashi H., Naciri-Graven Y., Broughton W. J., Perret X. (2004): Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of *nod*-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. *Molecular Microbiology*, **51**: 335–347.
- Koch E., Cox R., Williams P. H. (1991): Infection of *Arabidopsis thaliana* by *Plasmodiophora brassicae* Wor. races in Finland. *Journal of Agricultural Science in Finland*, **63**: 415-434.
- Kostyuk V. A., Potapovich A. I., Vladykovskaya E. N., Korkina L. G., Afanasev I. B. A. (2001): Influence of metal ions on flavonoid protection against asbestos-induced cell injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **385**: 129-137.
- Kreft S., Pompe M., Ravnikar M., Umek A., Strukelj B. (1999): Accumulation rate of rutin is decreased after infection of susceptible potato cultivar with PVY^{NTN}. *Plant Physiology*, **39**: 259-264.
- Krol M., Gray G. R., Hurry V. M., Öquist G., Malck L., Huner N. P. A. (1995): Low-temperature stress and photoperiod affect an increased tolerance to photoinhibition in *Pinus banksiana* seedlings. *Canadian Journal of Botany*, **73**: 1119-1127.
- Lattanzio V., Arpaia S., Cardinali A., Di Venere D., Linsalata V. (2000): Role of endogenous flavonoids in resistance mechanism of Vigna to Aphids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 5316-5320.
- Leopoldini M., Russo N., Chiodo S., Toscano M. (2006): Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 6343-6351.
- Li B. Q., Fu T., Yan Y. D., Baylor N. W., Ruscetti F. W., Kung H. F. (1993b): Inhibition of HIV infection by baicalin--a flavonoid compound purified from Chinese herbal medicine. *Cellular and Molecular Biology Research*, **39**: 119-124.
- Li J., Ou-Lee T. M., Raba R., Amundson G. R., Lasta L. R. (1993a): Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-6 irradiation. *The Plant Cell*, **5**: 171-179.
- Li M., Xu Z. (2008): Quercetin in a lotus leaves extract may be responsible for antibacterial activity. *Archives of Pharmacal Research*, **31**: 640-644.
- Likić S. (2010): Phenolics in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. infected with satellite RNA associated cucumber mosaic virus. Doctoral dissertation, Zagreb.
- Lois R. (1994): Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana* L. *Planta*, **194**: 498-503.
- Lot H., Marchoux G., Marrou J. (1974): Evidence for three functional RNA species in several strains of cucumber mosaic virus. *Journal of General Virology*, **22**: 81-93.
- Lot H., Kaper J. M. (1976): Further studies on the RNA component distribution among the nucleoproteins of cucumber mosaic virus. *Virology*, **74**: 223-226.

- Ludwig-Müller J. (1999): *Plasmiodiophora brassicae*, the causal agent of clubroot disease: a review on molecular and biochemical events in pathogenesis. *Journal of Plant Diseases and Protection*, **106**: 109-127.
- Ludwig-Müller J. (2004): From auxin homeostasis to understanding plant pathogen and plant symbiont interaction: editor's research interests. *Journal of Plant Growth Regulation*, **23**: 1-8.
- Ludwig-Müller J., Schubert B., Pieper K., Ihmig S., Hilgenberg W. (1997): Glucosinolate content in susceptible and resistant Chinese cabbage varieties during development of clubroot disease. *Phytochemistry*, **44**: 407-414.
- Malašev D., Kuntić V. (2007): Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*, **72(10)**: 921-939.
- Mallikarjuna N., Kranthi K. R., Jadhav D. R., Kranthi S., Chandra S. (2004): Influence of foliar chemical compounds on the development of *Spodoptera litura* (Fab.) in interspecific derivatives of groundnut. *Journal of Applied Entomology*, **128**: 321-328.
- Marinić M., Piantanida I., Rusak G., Žinić M. (2006): Interactions of quercetin and its lanthane complex with double stranded DNA / RNA and single stranded RNA. Spectrophotometric sensing of poly G. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2**: 288-298.
- Martens S., Preuss A., Matern U. (2010): Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. *Phytochemistry*, **71**: 1040-1049.
- Mathesius U. (2003): Conservation and divergence of signalling pathways between roots and soil microbes—the *Rhizobium*-legume symbiosis compared to the development of lateral roots, mycorrhizal interactions and nematode-induced galls. *Plant Soil*, **255**: 105-119.
- Meyerowitz E. M. (1989): Arabidopsis, a useful weed. *Cell*, **56**: 263-269.
- Min B. S., Tomiyama M., Ma C. M., Nakamura N., Hattori M. (2001): Kaempferol acetylramnosides from the rhizome of *Dryopteris crassirhizoma* and their inhibitory effects on three different activities of Human Immunodeficiency Virus-1 reverse transcriptase. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **49**: 546-550.
- Mitrocotsa D., Mitaku S., Axarlis S., Harvala C., Malamas M. (2000): Evaluation of the antiviral activity of kaempferol and its glycosides against human cytomegalovirus. *Planta Medica*, **66**: 377-379.
- Mochizuki T., Ohki S. T. (2012): Cucumber mosaic virus: viral genes as virulence determinants. *Molecular Plant Pathology*, **13**: 217-225.
- Modis Y., Ogata S., Clements D., Harrison C. S. (2004): Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, **427**: 313-319.
- Mol J., Jenkins G., Schäfer E., Weiss D. (1996): Signal perception, transduction and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Critical Reviews in Plant Science*, **15**: 525-557.
- Moore J. P., Westall K. L., Ravenscroft N., Farrant J. M., Lindsey G. G., Brandt W. F. (2004): The predominant polyphenol in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus*

- flabellifolius*, 3,4,5-tri-*O*-galloylquinic acid, protects membranes against desiccation and free radical induced oxidation. *Journal of Biochemistry*, **385**: 301-308.
- Moridani M. Y., Pourahmad J., Bui H., Siraki A., O'Brien P. J. (2003): Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radical Biology and Medicine*, **34**: 243-253.
- Mullin W. J., Proudfoot K. G., Collins M. J. (1980): Glucosinolate content and clubroot of rutabaga and turnip. *Canadian Journal of Plant Science*, **60**: 605-612.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Plant Physiology*, **15**: 473-497.
- O'Keefe D. C., Berryman D. I., Coutts B. A., Jones R. A. C. (2007): Lack of seed coat contamination with Cucumber mosaic virus in lupin permits reliable, large-scale detection of seed transmission in seed samples. *Plant Disease*, **91**: 504–508.
- Ockendon J. G., Buczacki S. T. (1979): Indole glucosinolate incidence and clubroot susceptibility of three cruciferous weeds. *Transactions of the British Mycological Society*, **72**: 156-157.
- Päsold S., Siegel I., Seidel C., Ludwig-Müller J. (2010): Flavonoid accumulation in *Arabidopsis thaliana* root galls caused by the obligate biotrophic pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Molecular Plant Pathology*, **11**: 545-562.
- Peer A. W., Brown E. D., Tague W. B., Muday K. G., Taiz L., Murphy S. A. (2001): Flavonoid accumulation patterns of *transparent testa* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **126**: 536–548.
- Pevalek-Kozlina B. (2003): Fiziologija bilja. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Profil International, Zagreb.
- Piantanida I., Mašić L., Rusak G. (2009): Structure-spectrophotometric selectivity relationship in interactions of quercetin related flavonoids with double stranded and single stranded RNA. *Journal of Molecular Structure*, **924-926**: 138-143.
- Pietta P. G. (2000): Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, **63**: 1035-1042.
- Ping X., Roossinck M. J. (2000): Cucumber mosaic virus D satellite RNA-induced programmed cell death in tomato. *Plant Cell*, **12**: 1079-1092.
- Pizzi A., Cameron F. A. (1986): Flavonoid tannins – structural wood components for drought-resistant mechanisms of plants. *Wood Science and Technology*, **20**: 119.
- Polle A. (1997): Defense against photooxidative damage in plants. U: Sandalios J.G. Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, str. 623-666.
- Rastas M., Latvala S., Hannukkala A. (2012): Occurrence of *Plasmodiophora brassicae* in Finnish turnip rape and oilseed rape fields. *Agricultural and Food Science*, **21**: 141-158.
- Rédei G. P. (1992): A heuristic glance at the past of *Arabidopsis* genetics. U: Koncz C., Chua N.-H., Schell J. Methods in *Arabidopsis* Research, World Scientific, Singapore, str. 1–15.
- Reuber S., Bornman J. F., Weissenböck G. (1996): Phenylpropanoid compounds in primary leaf tissues of rye (*Secale cereale*). Light response of their metabolism and the possible role in UV-B protection. *Plant Physiology*, **97**: 160–168.

- Rice-Evans C., Miller N. J., Paganga G. (1997): Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, **2**: 152-159.
- Robbins C. T., Hanley T. A., Hagerman A. E., Hjeljord O., Baker D. L., Schwartz C. C., Mautz W. W. (1987): Role of tannins in defending plants against ruminants: reduction in protein availability. *Ecology*, **68**: 98-107.
- Roossinck M. J. (2001): *Cucumber mosaic virus*, a model for RNA virus evolution. *Molecular Plant Pathology*, **2**: 59–63.
- Roossinck M. J., Bujarski J., Ding S. W., Hajimorad R., Hanada K., Scott S., Tousignant M. (1999): Family *Bromoviridae*. U: van Regenmortel M. H. V., Fauquet C. M., Bishop D. H. L. Virus Taxonomy—Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, California, str. 923–935.
- Routaboul J.-M., Kerhoas L., Debeaujon I., Pourcel L., Caboche M., Einhorn J., Lepiniec L. (2006): Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **224**: 96–107.
- Rozema J., Björn L. O., Bornman J. F., Gaberščik A., Häder D.-P., Trošt T., Germ M., Klisch M., Gröniger A., Sinha R. P., Lebert M., He Y.-Y., Buffoni-Hall R., de Bakker N. V. J., de Staaaj J., Meijkamp B. B. (2002): The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems—an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **66**: 2-12.
- Rozema J., VanDeStaaaj J., Björn L. O., Caldwell M. (1997): UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Tree*, **12**: 22–28.
- Rusak G., Piantanida I., Bretschneider S., Ludwig-Müller J. (2009): Complex formation of quercetine with lanthanum enhances binding to plant viral satellite double stranded RNA. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **103**: 1597-1601.
- Ryan G. K., Swinny E. E., Winefield C., Markham R. K. (2001): Flavonoids and UV photoprotection in *Arabidopsis* mutants. *Zeitschrift für Naturforschung B*, **56**: 745-754.
- Ryan G. K., Swinny E. E., Markham R. K., Winefield C. (2002): Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. *Phytochemistry*, **59**: 23-32.
- Ryan G. K., Markham R. K., Bloor S. J., Bradley J. M., Mitchell K. A., Jordan B. R. (1998): UV-B radiation induced increase in quercetin: kaempferol ratio in wild-type and transgenic lines of *Petunia*. *Photochemistry and Photobiology*, **68**: 323–330.
- Schlösser E. (1994): Preformed phenols as resistance factors. U: Geibel M., Treutter D., Feucht W. International Symposium on natural phenols in plant resistance. *Acta Horticulturae*, **381**: 615–630.
- Schwinghamer M. W., Symons R. H. (1975): Fractionation of cucumber mosaic virus RNA and its translation in a wheat embryo cell-free system. *Virology*, **63**: 252-262.
- Sevik A. M. (2012): Natural occurrence of *Cucumber mosaic virus* infecting water mint (*Mentha aquatica*) in Antalya and Konya, Turkey. *Acta Botanica Croata*, **71**: 187-193.
- Shichijo C., Hamada T., Hiraoka M., Johnson C. B., Hashimoto T. (1993): Enhancement of red-light-induced anthocyanin synthesis in sorghum first internodes by moderate low temperature given in the pre-irradiation culture period. *Planta*, **191**: 238-245.

- Shirley B. W. (1996): Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. *Trends in Plant Science*, **1**: 377–382.
- Shirley W. B., Kubasek L. W., Storz G., Bruggemann E., Koornneef M., Ausubel M. F., Goodman M. H. (1995): Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *The Plant Journal*, **8**: 659-671.
- Siemens J., Nagel M., Ludwig-Müller J., Sacristán M. D. (2002): The interaction of *Plasmodiophora brassicae* and *Arabidopsis thaliana*: Parameters for disease quantification and screening of mutant lines. *Journal of Phytopathology*, **150**: 592-605.
- Simmonds M. S. J. (2003): Flavonoid–insect interactions: recent advances in our knowledge. *Phytochemistry*, **64**: 21–30.
- Somerville C., Koornneef M. (2002): A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nature Reviews Genetics*, **3**: 883-889.
- Sun Y., Bi S., Song D., Qiao C., Mu D., Zhang H. (2008): Study on the interaction mechanism between DNA and the main active components in *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Sensors and Actuators B*, **129**: 799-810.
- Suzuki M., Kuwata S., Kataoka J., Masuta C., Nitta N., Takanami Y. (1991): Functional analysis of deletion mutants of cucumber mosaic virus RNA 3 using an *in vitro* transcription system. *Virology*, **183**: 106–113.
- Škorić D., Krajačić M., Barbarossa L., Gillo F., Grieco F., Šarić A., Gallitelli D. (1996): Occurrence of cucumber mosaic cucumovirus with satellite RNA in lethal necrosis affected tomatoes in Croatia. *Journal of Phytopathology*, **144**: 11-12.
- Šola I. (2013): Molecular mechanisms of transport and biological functions of phenolic derivatives in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Doctoral dissertation, Zagreb.
- Tan J., Bednarek P., Liu J., Schneider B., Svatos A., Hahlbrock K. (2004): Universally occurring phenylpropanoid and species-specific indolic metabolites in infected and uninfected *Arabidopsis thaliana* roots and leaves. *Phytochemistry*, **65**: 691–699.
- Tattini M., Galardi C., Pinelli P., Massai R., Remorini D., Agati G. (2004): Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist*, **163**: 547-561.
- Treutter D. (2006): Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters*, **4**: 147-157.
- Tsai F.J., Lin C.W., Lai C.C., Lan Y.C., Lai C.H., Hung C.H., Hsueh K.C., Lin T.H., Chang C.H., Wan L., Sheu J.C.J., Lin Y.J. (2011): Kaempferol inhibits enterovirus 71 replication and internal ribosome entry site (IRES) activity through FUBP and HNRP proteins. *Food Chemistry*, **128**: 312-322.
- Wallenhammer A. (1998): Observations on yield loss from *Plasmodiophora brassicae* infections in spring oilseed rape. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz*, **105**: 1-7.
- Weigel D., Mott R. (2009): The 1001 genomes project for *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biology*, **10**: 107(1-5).
- Williams C. A., Grayer R. J. (2004): Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Products Report*, **21**: 539–573.

- Williams R. J., Spencer J. P. E., Rice-Evans C. (2004): Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*, **36**: 838-849.
- Wink M. (1988): Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics*, **75**: 225-233.
- Xu P., Roossinck J.M. (2000): Cucumber mosaic virus D satellite RNA–induced programmed cell death in tomato. *The Plant Cell*, **12**: 1079-1092.
- Yamamoto-Toyoda A., Miyata M., Hattori T. (1999): QTL analysis of genetic difference in abscisic acid sensitivity between *Arabidopsis* ecotypes Columbia and Landsberg *erecta*. *Plant and Cell Physiology*, **32**: s53.
- Zhang T., Wu Z., Du J., Hu Y., Liu L., Yang F., Jin Q. (2012): Anti-japanese-encephalitis-viral effects of kaempferol and daidzin and their RNA-binding characteristics. *PLoS ONE*, **7**: 1-16.
- Zhao X., Tan H.J., Liu Y.B., Li X.R., Chen G.X. (2009): Effect of salt stress on growth and osmotic regulation in *Thellungiella* and *Arabidopsis* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **98**: 97-103.

<http://en.wikipedia.org>

http://en.wikipedia.org/wiki/Arabidopsis_thaliana

www.delawarewildflowers.org

7. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI	
Ime i prezime	Sandra Vitko
Datum rođenja	10. srpnja 1989.
Adresa	Trg svetog Nikole 9, Samoborski Otok, 10430 Samobor
Telefon	099/806 7057
E-mail adresa	vitko.sandra@gmail.com

ŠKOLOVANJE	
2011. – trenutno	Diplomski studij ekperimentalne biologije (modul: botanika). Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
2008. – 2011.	Preddiplomski studij biologije. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
2005. – 2008.	Gimnazija Antuna Gustava Matoša. Samobor.

POSTIGNUĆA	
2012.	Dobitnica posebne Rektorove nagrade za sudjelovanje na projektu „Noć biologije“.
2007.	3. mjesto na županijskom natjecanju srednjih škola u talijanskom jeziku.

PUBLIKACIJE	
2013.	Vitko S., Čičak M., Hren M., Matković I., Tkalec M. (2013): Učinak ekstrakta usplođa crnog oraha (<i>Juglans nigra</i> L.) na različite biljne vrste. 4. Hrvatski Botanički Simpozij s međunarodnim sudjelovanjem, Split 2013.